



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 98102241.3

[45] 授权公告日 2003 年 11 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1127572C

[22] 申请日 1998.6.9 [21] 申请号 98102241.3

[30] 优先权

[32] 1997.6.9 [33] US [31] 08/871347

[71] 专利权人 埃欧金公司

地址 加拿大安大略

[72] 发明人 布莱恩·弗迪 杰弗里·S·托兰

杰罗姆·D·伯恩斯坦

审查员 王佩兰

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 4 页 说明书 34 页 附图 2 页

[54] 发明名称 改良的将纤维素转化为燃料乙醇的
预处理法

[57] 摘要

一种改良的纤维素原料预处理方法，其能使经酶处理的乙醇生产较经济。该改良的预处理方法包括选择一种其阿拉伯木聚糖与总非淀粉多糖的比率 (AX/NSP) 大于 0.39 的原料，或一种基于其 AX/NSP 高于初始原料而选育的原料，并在破坏其纤维结构及将纤维素与半纤维素部分水解的条件下反应。该预处理产生了一种优异的酶促水解的底物，能用较少纤维素酶生产比许多已知方法较多的葡萄糖。该预处理独特地适于乙醇生产。优选的 AX/NSP 大于 0.39 的原料包括燕麦壳及玉米棒。

1、一种改良的预处理待转化为燃料乙醇的木质纤维素原料的方法，包括以下步骤：

a、选择至少含有半纤维素及纤维素，且特征在于阿拉伯聚糖加木聚糖与总非淀粉多糖的比率（AX/NSP）大于 0.39 的原料；

b、将经选择的原料在破坏其纤维结构并实现半纤维素及纤维素部分水解的条件下反应，以产生在被纤维素酶处理期间具有增高的可消化性的预处理原料。

2、如权利要求 1 所述的方法，其中将经选择的原料在平均温度 $180^{\circ}\text{C}\sim 270^{\circ}\text{C}$ ， $\text{pH}0.5\sim 2.5$ 下处理 5 秒 $\sim$ 60 分钟。

3、如权利要求 1 所述的方法，其中将经选择的原料在平均温度 $220^{\circ}\text{C}\sim 270^{\circ}\text{C}$ ， $\text{pH}0.5\sim 2.5$ 下处理 5 秒 $\sim$ 120 秒。

4、如权利要求 1 所述的方法，其中反应步骤以二步进行，第一步反应平均温度在 180°C 以下，而第二步反应平均温度高于 180°C 。

5、如权利要求 4 所述的方法，其中第一步反应是在平均温度 $60^{\circ}\text{C}\sim 140^{\circ}\text{C}$ ， $\text{pH}0.5\sim 2.5$ 下处理 0.25 $\sim$ 24 小时。

6、如权利要求 5 所述的方法，其中第一步反应是在平均温度 $100^{\circ}\text{C}\sim 130^{\circ}\text{C}$ ， $\text{pH}0.5\sim 2.5$ 下处理 0.5 $\sim$ 3 小时。

7、如权利要求 4 所述的方法，其中第二步反应是将经选择的原料在平均温度 $180^{\circ}\text{C}\sim 270^{\circ}\text{C}$ ， $\text{pH}0.5\sim 2.5$ 下处理 5 秒 $\sim$ 60 分钟。

8、如权利要求 7 所述的方法，其中第二步反应是将经选择的原料在平均温度 $220^{\circ}\text{C}\sim 270^{\circ}\text{C}$ ， $\text{pH}0.5\sim 2.5$ 下处理 5 秒 $\sim$ 120 秒。

9、如权利要求 1 所述的方法，其中原料在反应阶段与水混合成浆。

10、如权利要求 1 所述的方法，其中反应步骤在没有外加水的存在下进行。

11、如权利要求 1 所述的方法，其中反应步骤用蒸汽爆炸或挤出装置进行。

12、一种改良的将木质纤维素原料转化为乙醇的方法，包括以下步骤：

a、选择至少含有半纤维素及纤维素，且特征在于阿拉伯聚糖加木聚糖与总非淀粉多糖的比率（AX/NSP）大于 0.39 的原料；

b、将经选择的原料在破坏纤维结构及实现半纤维素及纤维素部分水解的条件下反应，从而产生在用纤维素酶处理期间具有增高的可消化性的预处理原料；

c、用纤维素酶将预处理原料水解成糖；

d、将所得糖发酵为乙醇；

e、回收乙醇。

13、如权利要求 12 的方法，其中反应步骤的进行是将经选择的原料在平均温度 $180^{\circ}\text{C}\sim 270^{\circ}\text{C}$ ， $\text{pH}0.5\sim 2.5$ 下处理 5 秒 $\sim$ 60 分钟，随后用 1.0 $\sim$ 10.0 滤纸单位（FPU）/g 纤维素的纤维素酶将纤维素酶促水解。

14、如权利要求 13 的方法，其中反应步骤的进行是将经选择的原料在平均温度 $220^{\circ}\text{C}\sim 270^{\circ}\text{C}$ ， $\text{pH}0.5\sim 2.5$ 下处理 5 秒至 120 秒，随后用 1.0 $\sim$ 10.0 滤纸单位（FPU）/g 纤维素的纤维素酶将纤维素酶促水解。

15、如权利要求 12 的方法，其中反应步骤分二步进行，第一步反应平均温度低于 180°C ，第二步反应平均温度高于 180°C 。

16、如权利要求 15 的方法，其中第一步反应是在平均温度 $60^{\circ}\text{C}\sim 140^{\circ}\text{C}$ ， $\text{pH}0.5\sim 2.5$ 下进行 0.25 $\sim$ 24 小时。

17、如权利要求 16 的方法，其中第一步反应是在平均温度 $100^{\circ}\text{C}\sim 130^{\circ}\text{C}$ ， $\text{pH}0.5\sim 2.5$ 下进行 0.5 至 3 小时。

18、如权利要求 15 的方法，其中第二步反应是将经选择的原料

在 180℃~270℃, pH0.5~2.5 下处理 5 秒至 60 分钟, 随后用 1.0~10.0 滤纸单位 (FPU) /g 纤维素的纤维素酶将纤维素酶促水解。

19、如权利要求 15 的方法, 其中第二步反应是将经选择的原料在平均温度 220℃~270℃, pH0.5~2.5 下处理 5 秒至 120 秒, 随后用 1.0~10.0 滤纸单位 (FPU) /g 纤维素的纤维素酶将纤维素酶促水解。

20、如权利要求 12 的方法, 其中原料在反应期间与水混合成浆。

21、如权利要求 12 的方法, 其中反应步骤在没有外加水的存在下进行。

22、如权利要求 12 的方法, 其中用蒸汽爆炸或挤出装置进行预处理。

23、如权利要求 12 的方法, 其中纤维素水解步骤与乙醇发酵步骤是同时进行的。

24、一种改良的将木质纤维素转化为葡萄糖的方法, 包括以下步骤:

a、选择一种原料, 其至少含有半纤维素及纤维素, 且特征在于阿拉伯糖加木聚糖与总非淀粉多糖的比率 (AX/NSP) 大于 0.39;

b、将经选择的原料在破坏纤维结构并实现半纤维素及纤维素部分水解的条件下反应, 以产生在用纤维素酶处理期间具有增高的可消化性的预处理的原料;

c、用纤维素酶将预处理原料中至少 40% 的纤维素水解为葡萄糖。

25、如权利要求 24 的方法, 其中反应的进行是将选择的原料在平均温度 180℃~270℃, pH0.5~2.5 下反应 5 秒至 60 分钟, 随后以每克纤维素用 1.0~10.0 滤纸单位 (FPU) 的纤维素酶将纤维素进行酶水解。

26、如权利要求 24 的方法, 其中反应的进行是将选择的原料在平均温度 220℃~270℃, pH0.5~2.5 下反应 5 秒至 120 秒, 随后以每克纤维素用 1.0~10.0 滤纸单位 (FPU) 的纤维素酶将纤维素进行酶水

解。

27、如权利要求 24 的方法，其中反应以二步进行，第一步反应平均温度低于 180℃，第二步反应平均温度高于 180℃。

28、如权利要求 27 的方法，其中第一步反应在平均温度 60℃～140℃，pH0.5～2.5 下反应 0.25～24 小时。

29、如权利要求 27 的方法，其中第一步反应在平均温度 100℃～130℃，pH0.5～2.5 下进行 0.5～3 小时。

30、如权利要求 27 的方法，其中第二步反应是将选择的原料在平均温度 180℃～270℃，pH0.5～2.5 下处理 5 秒至 60 分钟，并随后以每克纤维素用 1.0～10.0 滤纸单位（FPU）纤维素酶将纤维素水解。

31、如权利要求 27 的方法，其中第二步反应是将选择的原料在平均温度 220℃～270℃，pH0.5～2.5 下进行 5 秒至 120 秒，随后以每克纤维素用 1.0～10.0 滤纸单位（FPU）的纤维素酶将纤维素水解。

32、如权利要求 24 的方法，其中原料在反应期间与水混合成浆。

33、如权利要求 24 的方法，其中原料在反应期间不另加水分。

34、如权利要求 24 的方法，其中反应步骤在蒸汽爆炸或挤出装置中进行。

改良的将纤维素转化为燃料乙醇的预处理法

本发明涉及从纤维素中生产乙醇燃料的方法。本发明尤其涉及为乙醇生产而对纤维素原料进行的预处理。对经选择的其阿拉伯聚糖加木聚糖与非淀粉多糖的比率（AX/NSP）大于 0.39 的原料进行预处理，可以产生比其它原料更优良的酶促水解的底物。这些预处理的原料只适于乙醇生产。在如此预处理法中可供选择的原料的实例包括一些燕麦壳及玉米棒，及高 AX/NSP 的经选育的原料。

由于大量原料的可用性，避免燃烧或将其堆积在土壤中的需求及乙醇燃料的清洁性，从纤维素中生产乙醇的可能性已得到更多的关注。如此方法对社会的贡献已有阐述，如见 ATLANTIC MONTHLY, (April, 1996) 封面题材的报道。

如此方法中的天然纤维素原料特指为“生物量”。许多类型的生物量，包括木材、农业残余物、草本作物及城市固体垃圾等，已被认为可作为生产乙醇的原料。这些物质主要由纤维素、半纤维素、及木质素组成。本发明涉及的是将纤维素转化为乙醇。熟知的将玉米淀粉转化为乙醇的方法不在本发明范围内，该方法中是使用硫酸及淀粉酶将淀粉转化成乙醇。

纤维素是一种经 $\beta-1, 4$ 键连接的单糖葡萄糖聚合物。纤维素

可明显抗酸、酶或微生物的降解或解聚。一旦纤维素被转化成葡萄糖，所得糖经使用酵母易于发酵成为乙醇。该方法的难点所在是将纤维素转化成葡萄糖。

最古老的将纤维素转化成葡萄糖的方法研究基于酸水解（参见 Grethlein, 纤维素材料的化学降解，应用化学及生物技术 28:296-308(1978)）。该方法可包括使用浓酸或稀酸。浓酸方法是使用 72%（重）的硫酸或 42%（重）的盐酸在室温下溶解纤维素，随后将酸稀释至 1% 并加热至 100℃~120℃ 3 小时以上以将纤维素寡聚体转化成葡萄糖单体。该方法可产生高产量的葡萄糖，但酸的回收，构建特殊材料的需求及需使系统中水量降至最低则是该方法的明显不足。当浓缩的有机溶剂用于纤维素转化时，也会遇到相似的难题。

稀酸方法是使用 0.5%~2%（重）的硫酸在 180℃~240℃ 下进行几分钟至几小时。BRINK(美国专利 5,221,537 及 5,536,325) 描述了一种木质纤维素经酸水解成葡萄糖的二步法。第一步是将半纤维素解聚成木糖及其它糖。第二步将纤维素解聚成葡萄糖。低水平的酸可免于化学回收。但最大的葡萄糖产量只大约是纤维素的 55%，且解聚产物的高度产生可抑制经酵母发酵为乙醇的作用。这些难题阻止了稀酸水解方法达到商品化。

为克服酸水解法中的难题，已研究发展了纤维素转化方法，其利用两步：（1）预处理，（2）包括酶促水解的处理。预处理的目的是不将纤维素完全水解成葡萄糖，而是相反地破坏纤维结构的完整，从而使纤维素更易于在处理阶段被纤维素酶作用。在经该类型特异

性预处理后，底物具有一种泥样质地。预处理物看上去类似纸浆，但具有较短纤维和对原料的更明显的物理破坏。

众多预处理方法的目的是提供一机械和化学作用的充分联合，以破坏纤维结构并增强原料对纤维素酶的接受能力。机械作用典型地包括使用压力、研磨、碾磨、切碎、搅拌、压缩/膨胀、或其它类型的机械作用。化学作用典型地包括使用加热（通常为蒸汽）、酸及溶剂。下面将阐述一些已知预处理装置，具体参照挤出机、压力容器及批式反应器。

一种经酶促水解的典型处理是将底物与水混合以得到含 5%~12%（重）的纤维素的浆液，然后加入纤维素酶。典型地，水解在 50℃，pH5 下进行 24~150 小时。在水解作用的末期，水溶性葡萄糖在液体内，而未转化的纤维素，木质素及其它底物未溶部分残留于悬浮液中。通过过滤水解浆液收集葡萄糖浆；将纤维固体进行冲洗以提高葡萄糖的产量。然后用酵母将葡萄糖浆发酵成乙醇，并用蒸馏或其它方法回收乙醇。乙醇的发酵及回收可使用醇工业中共识的方法进行。

预处理加上酶水解的二步法克服了许多与用单一强酸水解相关的难题。酶的特异作用降低了降解产物量而提高了葡萄糖产量。另外，对纤维破坏的预处理比对纤维素水解的预处理较温和的事实，意味着可使用较少的化学载荷，降低化学回收的需求及产生较少的降解产物，提高产量并降低对酵母发酵成乙醇的作用的抑制。

遗憾地，到目前为止预处理及酶水解的处理方法还不能在足够

低费用下生产葡萄糖，以使发酵为乙醇的工艺具有商业吸引力。甚至目前众多已知的预处理方法中，使纤维素转化为葡萄糖所需的纤维素酶的量太大，以至于使乙醇生产费用太高。

已有许多方法尝试去降低所需纤维素酶量。

简单地在系统中加入较少量纤维素酶的方法使葡萄糖的生产降低到难以接受的程度。

通过延长酶作用于原料的时间来降低所需酶量的方法，导致生产力的浪费，及水解槽的高费用。

通过使纤维素水解与葡萄糖的酵母发酵同时进行以降低所需纤维素酶量的方法也是不足的。如此称作同步糖化及发酵（SSF）方法也不适于商业化，这是由于酵母起作用的最适温度 28°C 远远低于纤维素酶所要求的 50°C 的条件。在平均 37°C 温度下运行 SSF 系统同样无效，且引起微生物的污染。

对低耗费的乙醇生产方法的需求促进了大量研究工作以发展有效的预处理系统。如此的预处理系统将吸收目前预处理的所有优点，包括降解产物的低产出及化学回收的低需求，但具有纤维素酶的低需求以便使工艺经济。

预处理系统的性能特征在于将一定量的纤维素水解成葡萄糖所需的酶量。如果预处理 A 比 B 需较少酶去生产定量的葡萄糖，则预处理 A 比 B 的性能好。

预处理的早期工作集中在作用装置的构建及最佳性能所需条件的确定上。

预处理的一主导方法是通过蒸汽爆炸 (steam explosion)，使用 FOODY (美国专利 4,461,648) 所述的工艺条件，该文在本文并入参考。在 FOODY 工艺中，将生物量装入已知作为蒸汽枪的容器中。将大于 1% 的酸任选地加入在蒸汽枪或预浸液中的生物量中。然后用蒸汽将蒸汽枪迅速装满，并在高压下保持一定长时间，已知为蒸煮 (cooking) 时间。一旦蒸煮时间过去，将容器快速减压以排出预处理的生物量，由此有了这些术语“蒸汽爆炸”和“蒸汽枪”。

在 FOODY 工艺中，预处理的性能依赖于蒸煮时间，蒸煮温度、所用酸的浓度及原料的粒径。FOODY 工艺中建议的预处理条件对所有试验的纤维素原料 (硬木，麦秆及蔗渣) 都相似，条件是它们需分成细小颗粒。进一步地，蒸煮温度的确定是通过装入蒸汽枪中的饱和蒸汽的压力来进行的。因而影响预处理性能的实际操作变量是气压，蒸煮时间及酸浓度。FOODY 工艺描述了最适性能的变量组合；正如可以预料的，延长时间能降低所用温度，反之亦然。FOODY 所教导的气压范围在 250~1000psig，相应温度为 208℃~285℃。

关于蒸汽爆炸预处理参量的另一公开的研究是 FOODY 等人，蒸汽爆炸预处理优化的最终报告，美国能源部报告 ET230501 (April 1980)。该研究报道了预处理变量，温度 (蒸汽压)、粒径、含水量、预调节作用、模头构型及木质素含量的作用。报道了对三类麦秆，五种硬木及四种庄稼残余物而言的最佳蒸汽爆炸条件。

由 FOODY 公布的最佳预处理条件随后被其它人通过使用其它原料及不同设备而确认。例如，GRETHLEIN (美国专利 4,237,226)

描述了栎木、新闻纸、杨木及禾茎经连续活塞式流动反应器的预处理，该装置同挤出机相似。转动螺杆输送原料浆通过一小孔，在那里机械及化学作用使纤维被破坏。

GRETHLEIN 列出了所需的孔径、系统压力、温度（180℃～300℃）。存留时间（最长 5 分钟），酸浓度（最多 1%硫酸）及粒径（优选 60 目）。GRETHLEIN 对他所鉴定的所有特异性底物都获得了相似结果（见栏 3，行 30）。尽管 GRETHLEIN 的装置非常异于 FOODY 的蒸汽枪，但最适性能的时间、温度及酸浓度等是相似的。

最近更多的工作集中在通过预处理所用装置能增进所供底物的酶促水解这一理解上。BRINK（美国专利 5,628,830）描述了通过使用蒸汽法破坏半纤维素，随后应用纤维素酶进行纤维素的水解来预处理木质纤维素。

预处理的代表性优点首要说明的是预处理应估价木质素去除的量，脱木质化作用度越高，则完成的越好。参见 Fan,Gharpuray,and Lee, 农业残留物的酶促转化的预处理，第三届能量产生和转化中的生物技术研讨会资料（Gatlinburg,TENNESSEE,May 12-15,1981）。对作为预处理特征的脱木质化的见解也见于 Cunricingahm 等的报道。第七届燃料和化学品的生物技术研讨会资料（Gatlinburg, Tennessee, May 14-17, 1985）。

Grethlein 及 Converse,用于预处理木材的酸预水解和蒸汽爆炸的通用方面，生物能源技术 36(2): 77—82（1991），提出了如下见解即脱木质化程度只对已干燥的底物是重要的，因而对大多数使用非干

燥原料的预处理方法没有大的相关性。

Knappert 等在“作为酶促水解的预处理的纤维素材料的部分酸水解”,生物技术和生物工程, 23:1449-1463(1980)中报道了在预处理后提高的对酶水解的易感性的产生是通过半纤维素的去除所形成的微孔, 底物结晶度的变化及纤维素分子的聚合度的严重降低所致的。

Grohmann 等在“生物量的稀酸预处理的优化”, 第七届燃料和化学品生物技术研讨会(Gatlinburg, Tennessee May 14-17, 1985) 中特别支持 Knappert 等的一个假设, 他证明预处理中半纤维素的去除导致原料酶水解的增进(见第 59—801 页)。Grohmann 等用麦秆和杨木在 95℃~160℃及 蒸煮时间最多 21 小时条件下工作。在最初预处理后, 这两种原料的大约 80%的纤维素被纤维素酶消化, 其中 80—90%的木聚糖从初始物中去除。

Grohmann 和 Converse 也报道了纤维素的结晶度指数没有被预处理明显改变。他们还进一步报道预处理可导致广泛范围的聚合度, 但产生对酶促水解的相似易感性。

由预处理改良酶水解作用的另一解释是增加了底物表面积。Grethlein 和 Converse 改进了该解释, 相关表面积是与纤维素酶相接触的表面积, 其具有大约 51 埃的大小。由小分子如氮的接触性测定的总表面积与底物的酶水解率不相关, 原因是不能使酶透过的微孔不影响水解率。

尽管对预处理的设备和优化条件有良好的了解并且进行了大量预处理方法的机制研究, 还不存在一种商业可行的适当的预处理方

法使纤维素物质转化为乙醇。如此预处理方法应使纤维素转化为乙醇的方法具有巨大商业应用价值。

图 1 是根据实施例 3, 某些原料在 121℃预处理反应后, 作为原始材料的 AX/NSP 的函数的纤维素转化曲线。

图 2 是根据实施例 4, 某些原料在 230℃预处理反应后, 作为原始材料的 AX/NSP 的函数的纤维素转化曲线。

本发明揭示了原料的关键性能决定了在预处理反应后, 使纤维素转化为葡萄糖所需的相应纤维素酶。该性能是阿拉伯聚糖加木聚糖与总非淀粉多糖的比率, 在后文我们指作“AX/NSP”。本发明人发现 AX/NSP 越高, 则预处理反应后需求的纤维素酶越少, 且产生更经济的乙醇产物。原料的 AX/NSP 大于约 0.39 尤适用于纤维素转化为乙醇工艺。如此原料的一些实例可以是某些燕麦壳及玉米棒。

基于这些发现, 本发明人开发了一种改良的在使木质纤维素原料转化为乙醇的酶处理前的预处理方法。一种如此方法由以下步骤组成:

- 1、选择阿拉伯聚糖加木聚糖与总非淀粉多糖的比率 (AX/NSP) 大于 0.39 的木质纤维素原料。

- 2、在破坏纤维结构, 并水解部分纤维素和半纤维素的条件下使选择的原料反应, 以改良预处理后的原料在随后纤维素酶处理中的可消化性。

另一种如此方法由以下步骤组成:

- 1、选择一种木质纤维素原料, 其被选育以具有相对增加的阿拉

伯聚糖加木聚糖与总非淀粉多糖的比率 (AX/NSP)。

2、在破坏纤维结构并使纤维素和半纤维素部分水解的条件下使选择的原料反应,, 以改良预处理的原料在随后纤维素酶处理中的可消化性。

一旦基于高 AX/NSP 选择了原料, 预处理反应可以在与前述报告一致装置中进行。这可包括在蒸汽枪、挤出机或其它以前使用的设备中的单步或二步反应。

基于 AX/NSP 选择原料, 预处理反应后纤维素酶所需比除外情况下所需要低得多。这可明显节约从木质纤维素物质中生产乙醇的费用。

还没有在特殊选择的原料预处理后优异性能的前期报道, 这是由于没有 AX/NSP 的特定水平, 更不必说 AX/NSP 的重量比是大于 0.39 。

鉴于 FOODY 等, 文献同上的 U.S.D.O.E 研究, 其观察到在蒸汽爆炸及纤维素酶水解后, 原料的木聚糖含量与葡萄糖产量之间没有关联, 本发明是令人惊奇的。

FOODY 等研究了 13 种原料。纤维素转化为葡萄糖的转化率在预处理原料之间变化很大, 栎木和向日葵茎为 46~50%, 大麦秆和槭木为 86~87%。FOODY 等的两种最佳原料大麦秆和槭木, 木聚糖的含量分别为 31%和 19%, 其在所报道的最高与最低值之间。栎木和杨木都含 21%的木聚糖, 而它们在纤维素酶水解后却得到分别为 46%和 72%的非常不同的葡萄糖产量。

鉴于 GRETHLEIN, 文献同上的专利, 本发明也是令人惊奇的。GRETHLEIN 描述了使用稀硫酸对原料预处理的装置。GRETHLEIN 所有的 4 种原料(栎木, 新闻纸, 杨木和玉米棒)性能相似(栏 3, 第 25~32 行)。这一报道结果与本发明的教导完全相反, 本发明发现并鉴定了一种新原料性质, AX/NSP, 其可用于预期处理后原料的特性。

鉴于 Knappert 等, 文献同上, 发表的文章, 本发明也是令人惊奇的。Knappert 研究了 4 种原料: Solka 絮凝物、新闻纸、栎木及玉米棒。Knappert 等获得了在预处理反应后从纤维素中生产葡萄糖的最佳产量。从新闻纸, 玉米棒和栎木中获得 100%产量, 从 Solka 絮凝物中获得 81%产量(表 I、II、第 1453~1457 页)。由于具有纤维素和木聚糖报道含量的原料是新闻纸和 Solko 絮凝物, 该研究没有提到原料的 AX/NSP 与预处理反应后纤维素酶对物质的消化能力之间的关系。

本发明实际上提示 Knappert 等的教导是不正确的。至少 Knappert 等的教导与本发明的教导是不一致的。Knappert 等教导物质的低半纤维素含量预示着在预处理期间纤维素消化能力的极少改良。在本发明的实施例 5 显示在半纤维素经适度反应被去除后, 预处理反应消化燕麦壳的能力大大改良。

后文所述的本发明及优选实施方案的描述中使用了下述一些术语。

木质纤维素原料: 意为一些原材料, 其可被看作是纤维素转化

为乙醇工艺的原材料。如此材料至少有大约 25% 的纤维素，且纤维素在工艺中基本上被转化成葡萄糖，然后转化为乙醇。典型的木质纤维素原料是木材、谷类及农业废物。本发明没有关于木质素、淀粉、蛋白质或灰分含量的特殊规定。已被认为用于乙醇生产工艺的木质纤维素原料的实例为木材、草、麦秆及作物垃圾。通常木质纤维素原料源于一种纤维。但本发明中木质纤维素原料可以是源于许多不同种类的混合物。

燃料乙醇的转化指大约至少 40% 的纤维素转化为葡萄糖，然后葡萄糖发酵为乙醇。本发明没有关于产自木质素或半纤维素的转化产物的特殊规定。在一优选实施方案中，至少 60% 的纤维素被转化为葡萄糖且发酵成乙醇。

木聚糖及木聚糖含量：是用于表达现存于原料中脱水木糖含量的术语。许多脱水木糖的存在形式是木糖的线性 $\beta-1, 4$ 连接的多糖。但木聚糖的定义不受限于这种结构的脱水木糖。

阿拉伯聚糖及阿拉伯聚糖含量：是用于表达原料中脱水阿拉伯糖含量的术语。许多脱水阿拉伯糖是阿拉伯糖的支化 $\alpha-1, 3$ 键连的多糖。但阿拉伯聚糖的定义不受限于这种结构的脱水阿拉伯糖。

阿拉伯聚糖加木聚糖：指原料的阿拉伯聚糖及木聚糖含量的总和。它区别于术语“阿拉伯糖基木聚糖”，其是指阿拉伯糖和木糖的一种 $\alpha-1, 3$ 键连的聚合物。阿拉伯糖基木聚糖是阿拉伯聚糖和木聚糖一种具体实例，但未包括阿拉伯聚糖和木聚糖的所有可能的形式。

半纤维素是一通用术语，包括除纤维素及淀粉外所有天然多糖。该术语包括木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖等的聚合物及其混合物。在本发明中半纤维素的基本组分是阿拉伯糖和木糖。

AX/NSP 是阿拉伯聚糖加木聚糖与非淀粉多糖的比率，且可基于本文所述分析程序测定任何原料的 AX/NSP 。

AX/NSP 可由公式 (1) 计算：

$$\text{AX/NSP} = (\text{木聚糖} + \text{阿拉伯聚糖}) / (\text{木聚糖} + \text{阿拉伯聚糖} + \text{纤维素}) \quad (1)$$

其中原料的木聚糖、阿拉伯聚糖及纤维素的含量可依据实施例 1 中的程序测定，且 AX/NSP 的计算也见于实施例 1。

AX/NSP 在本文用以代表预处理方法的性能。AX/NSP 越高，在预处理后将纤维素水解为葡萄糖所需的纤维素酶则越少。预处理性能对于 AX/NSP 高于约 0.39 的原料特别好。该点见实施例 3 及 4 的论述。

应测定每批使用的原料的 AX/NSP，毫无疑问其将受原料的季节、时期、地理位置及品种而变化。因而没有 AX/NSP 的绝对值总能正确地适应所供品种。但燕麦壳和玉米棒在收集到的数据中呈最高的 AX/NSP，同样也是预处理性能最好的。源自大量样品中的燕麦壳和玉米棒因而是生产乙醇工艺中的优选原料。

AX/NSP 的理论最高限为 0.75，这存在于有 25% 纤维素及 75% 阿拉伯聚糖加木聚糖的物质中。本发明人了解没有物质具有这种组分。发明人观测到的 AX/NSP 最高值为 0.422。

各种物质的半纤维素、纤维素、阿拉伯聚糖及木聚糖的含量已经广泛发表。但使用的分析方法可明显影响表观组成，且这些发表的文章通常是基于许多变化方法的。因而这些可供依据的公开文献只能提供一种这些物质的近似组分的普通观点。为实施本发明，对每种候选原料都要进行相同的分析方法，实施例 1 的那些方法对于所要求的绝对值是优选的。

在本发明中，可通过两种一般方法对高 AX/NSP 值的原料加以鉴定：（1）筛选天然纤维和谷物；（2）筛选各种选育的具有较高 AX/NSP 水平的品种。

反应或预处理反应：是指一种用于改变木质纤维素原料，使其更易于经纤维素酶水解的化学方法。不进行预处理，所需生产葡萄糖的纤维素酶的数量太大而不切实际。

通过由纤维素酶经破坏纤维结构及实现一部分半纤维素及纤维素水解而改良可消化性。该术语指的是由预处理反应所引起的原料的物理及化学上的改变。至少，预处理提高了由纤维素酶从原料中水解出的葡萄糖的量，破坏了纤维，并水解了纤维素及半纤维素的某些部分。

本发明的预处理方法优选是将木质纤维素原料转化为乙醇的完整方法的一部分。该方法包括：预处理后纤维素经酶促水解为葡萄糖，葡萄糖发酵成乙醇及乙醇的回收。

纤维素水解指的是使用酶将预处理的纤维素转化成葡萄糖。在本发明中，在预处理期间少量纤维素被水解，而大部分未水解而由

纤维素酶水解。酶水解进行的方式本发明未做限制，但优选的方式如下：在含 5%~12%纤维素的水浆中，保持 pH 值为 4.5~5.0，在 50℃ 下进行水解。所用的纤维素酶可以是任何可商购的纤维素酶，其可由 IOGEN CORPORATION, NOVO NORDISK, GENENCOR INTERNATIONAL, PRIMALCO, 或其它公司生产。纤维素酶可补加 β -葡萄糖苷酶使纤维二糖完全地转化为葡萄糖。一种商购的 β -葡萄糖苷酶是由 NOVO NORDISK 所售的 NOVOZYM188。

熟练的从业者明白水解中使用的纤维素酶的数量可通过酶的成本，所需水解时间，葡萄糖产量及葡萄糖浓度来检测，所有这些都受方法经济性的影响，并将随每种估价的相关技术而变化。代表性的酶用量范围是 12~128 小时，每克纤维素需 1~50 滤纸单位 (FPU) 纤维素酶。在一优选的实施方案中，纤维素酶的范围是每克纤维素需 1~10FPU 纤维素酶。实施例 2 和 3 较详细地描述了纤维素的水解。

在一优选的实施方案中，纤维素水解和乙醇发酵同时进行，使用的是前文所述的在 SSF 方法中通用的那些技术。

乙醇发酵及回收：其是通过已熟知的常规方法，如酵母发酵及蒸馏进行。本发明不受这些方法限制。

在本发明中，可应用任何类型的原料，包括但不限于天然生成的及选择性繁殖的原料。由以上所强调的，本发明新颖性在于使用到目前为止未认识到的高 AX/NSP 率作为选择葡萄糖及乙醇生产的最佳原料的关键标准；原料的由来是次要方面。

在一实施方案中，原料是天然生成的。在这种情况下，原料

AX/NSP 的测定通过实施例 1 的方法进行。AX/NSP 大约高于 0.39 的原料优选用于纤维素→乙醇工艺。

由于 AX/NSP 毫无疑问随季节及原料的年龄、地理位置及栽培而变化，因而应测定所用的每批原料的 AX/NSP 值。随着对原料积累的经验，可减少测试 AX/NSP 的频率。

在另外一个优选的实施方案中，原料是经选育的。在这种情况下，选育的原料的 AX/NSP 的测定可用实施例 1 的方法，并与天然原料的 AX/NSP 比较。如果因选育而 AX/NSP 提高，则选育的原料比天然的或起始原料更适于纤维素转化。

原则上，如此的选育可通过各种在植物繁殖时用于筛选所需性状的一般方法进行。这些方法见 H.B.Tukey, 《美国植物杂志》44 (3): 279~289 (1957) 中“园艺是覆盖地球的大绿毯”，及 Ann M.Thayer, 《化学及工程新闻》1997 年 4 月 28 日 p15~19 中“转基因农场的赌注”的综述。这些方法包括：

- 1、科学繁殖：筛选高 AX/NSP 值的品种并重复栽培那些显示该性状的品种。
- 2、嵌合体：将两种或更多品种嫁接，并筛选所得品种的 AX/NSP 水平。
- 3、授粉繁殖：通过杂交授粉组合两个或多个品种，并筛选其 AX/NSP 水平。
- 4、化学稀释，将作物暴露于化学毒素，如此只有最适合的可存活。要求毒素是阿拉伯聚糖或木聚糖抗性的。

5、诱导：将品种暴露于可致较高 AX/NSP 的条件下。

6、环境遇险（distress）：将品种暴露于可致死亡除非由高水平的 AX/NSP 保护的条件下。

7、营养及施肥：开发营养方案以提高 AX/NSP。

8、基因工程：遗传修饰品种以提高其 AX/NSP 水平。

在一优选的实施方案中，选育的木质纤维素原料的 AX/NSP 高于 0.39，然后将该选育原料反应以提高其由纤维素酶的可消化性并通过用纤维素酶将纤维素水解为葡萄糖，发酵葡萄糖，及回收乙醇来转化成乙醇。

在另一优选实施方案中，选择性繁殖的木质纤维素原料比初始原料具有增高的 AX/NSP 值，但仍低于 0.39。然后将该原料反应以提高其由纤维素酶的可消化性并转化为乙醇。将原料的 AX/NSP 含量提高是有利的，即使低于 0.39 水平，原因是在某些地理区域气候只适合小范围原料的生长。例如玉米就不能生长在每年超过 40F 的天数少于 240 天的气候里。在这些较寒冷区域，原料的选择要受限制，且也许没有哪些原料的 AX/NSP 接近 0.39。在这些气候中，通过选择性繁殖以使原料的 AX/NSP 比初始原料有所提高而对原料加以改良，从而即使 AX/NSP 仍<0.39 也可有效地改良纤维素转化为乙醇作物的功效。在这些情况下，本发明将提供一种新的对比标准，通过该标准可测定和比较这种选育的原料。

所需预处理程度可由一些适当方法而获得，包括但不限于那些在本文优选实施方案及实施例中讨论的方法。可引起化学改变的机

械与化学处理的任何组合均包括在本发明范围内。这包括任何反应器，化学添加物，温度、时间、粒径、湿度及其它可改变原料的参数。

在第一个优选实施方案中，在 GRETHLEIN 所述的酸预处理的条件下进行预处理反应，这是将经选择的原料在 $180^{\circ}\text{C}\sim 270^{\circ}\text{C}$ 下进行 5 秒 $\sim$ 60 分钟处理。本领域技术人员已知原料温度是它自身的，其可不同于在反应器外所测的温度。本领域技术人员也已知一段时间内指定的温度范围是那个时期的平均温度，考虑到温度对反应速率的影响。例如，反应器需从环境条件升至 180°C 的短期加热。基于反应动力学的知识（如在给定物质的限定温度范围内，温度每提高 10°C ，反应速率几乎双倍增长），温度增高对总反应的影响可被计算出且从而可确定平均温度。

预处理反应典型地用存在于水解浆料中的 0.1 $\sim$ 2% 硫酸进行。但本领域的技术人员能意识到，一些原料中存在的碱或酸可改变酸需求量使其在典型范围之外。酸度最好用 pH 范围表达，不管使用的是何种酸或浓度如何，其应在 0.5 $\sim$ 2.5 之间。实施例 8 详述了在此条件范围内的预处理反应。

第二个优选的实施方案使用了由 FOODY 发表的作为蒸汽爆炸预处理优化的较窄的条件。该条件见于实施例 4 所述，预理由蒸煮步骤组成，是在 $220\sim 270^{\circ}\text{C}$ ，pH 为 0.5 $\sim$ 2.5 的条件下处理 5 秒 $\sim$ 120 秒。用于进行该预处理的设备优选包括密封批式反应器及连续挤出机。这些预处理条件的大规模实例见实施例 6、7 所述。

第三个优选实施方案使用二步预处理，其中第一步改良纤维素水解同时主要增溶半纤维素而不是纤维素。第二步完成整个预处理。在该实施方案中，第一步反应在低于 180℃下进行而第二步反应在高于 180℃下进行。二步预处理的优点是，如后文实施例 5 所示，促进了半纤维素的分离回收用于下游加工。

在第三个优选实施方案中，第一步反应是在大约 60℃~140℃，在 pH 为 0.5~2.5 条件下进行 24 小时。更优选地，预处理的第一步是在 100℃~130℃，pH 为 0.5~2.5 下进行 3 小时。

在第 4 个实施方案中，第二步反应是在 180℃~270℃，pH 为 0.5~2.5 条件下进行 5 秒~120 秒。原料可以是干燥的（脱水的）或水浆性的。

在一优选实施方案中，选育的原料是木质纤维。木材是寒冷气候下最普遍的木质纤维素物质。

成功实施本发明的另一方面是将预处理工艺与用纤维素酶水解预处理的原料以生产葡萄糖的工艺结合起来。在一优选实施方案中，预处理原料中至少 40%纤维素由纤维素酶水解成葡萄糖。生产出的葡萄糖可经提纯、结晶并以固体糖包装。或者，其可溶解成液浆以进一步处理或使用。

实施例 1 原料中 AX/NSP 的测定

所供原料的阿拉伯聚糖加木聚糖与总非淀粉多糖的比率的测定基于对原料的组分分析。该分析如下进行：

受检的原料是大麦秆、小麦秆、小麦壳、燕麦壳、禾本植物、

玉米茎、槭木、松木及三种玉米棒。除了燕麦壳来自 Peterborough, Ontario 的 Quaker Oats, 其余的都得自 Ottawa, Ontario。在 Waring 搅拌器内粗磨原料, 然后用 Wiley 研磨机经一#20 筛研磨。将原料在环境温度下贮存于密封口袋中直至使用。小样品的水含量为 5%~10%, 通过在 100℃ 下干燥而检测到。

将大约 0.3g 的样品置入试管, 每个试管都含有 5ml 70% 的硫酸。将试管涡旋混合, 盖盖并置于 50℃ 水浴中一小时, 每 10 分钟剧烈涡旋一次。经 1 小时保温后, 将试管内容物转入含 195ml 去离子水的预称重的 250ml 的烧瓶中, 其使酸含量降至 1.75%。将内容物混合, 然后将 10g 等份转入试管中。涡旋混合试管然后将其转至一蒸汽高压灭菌器中, 在 121℃ 下保持 1 小时。高压灭菌后, 用少量碳酸钡将溶液内容物中和, 然后在玻璃微纤维滤纸上真空抽滤。

用 Dionex Pulse-Amperometric HPLC 测定滤过物中葡萄糖, 木糖及阿拉伯糖的浓度, 然后将这些测量值与原料初始样品的重量相关并分别以原料中葡聚糖、木聚糖及阿拉伯聚糖含量表示, 根据 (1) 使聚合物产生单体的水合作用的水, (2) 由浓酸破坏的物质的量进行微调, 其可通过采用纯纤维素、木糖及阿拉伯糖对照来测定。检测可用三份进行并报告其平均值。

纤维素含量是通过在总葡聚糖中减去淀粉含量而测定的。淀粉含量的测定是通过向含 20ml 去离子水, 0.2ml 的 91.7g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 贮存液及 50 微升的 1: 100 的 Sigma α -淀粉酶 # A3403 的去离子水溶液的 250ml 烧瓶中加入 1g Wiley-研磨的原料而进行的。将每个

烧瓶用稀氢氧化钠将 pH 调至 6.4—6.6，然后在一沸水浴中将其温育 1 小时。在另加入 50ml 淀粉酶后将烧瓶在蒸汽高压灭菌器中在 121 °C 下温育 30 分钟。最终，在烧瓶中再加入 50ml 淀粉酶，再在沸水浴中温育 60 分钟。然后将烧瓶冷却至室温，并用稀盐酸将 pH 值调至 4.2—4.4。加入 0.5ml Novo Spritamylase 贮存液，贮存液由 100ml 去离子水及 3g 酶组成。以 150RPM 在 50°C 将烧瓶振荡 20 小时。将后将烧瓶冷却，并将其内容物经玻璃微纤维滤纸过滤。然后用 Yellow Springs Instrument (YSI) 葡糖分析仪测葡萄糖浓度，并考虑水解淀粉所需水用于检测原料中淀粉含量。

原料中蛋白质及灰分含量的测定可通过凯氏定氮法及灰分烘箱法进行。

样品中木质素含量的测定是通过测定在对原料进行硫酸处理后仍保留的不溶固体量，然后减去灰分量而得。

这些结果示于表 1。回收物在 842~1019mg/g 初始固体物之间。其相当于 84.2%（重）~101.9%（重）的初始物，是这些系统中典型的物料衡算。

表 1：原料的组成

原料	测定的组分 (mg/g)							
	葡聚糖	淀粉	木聚糖	阿拉伯 聚糖	木质素	灰分	蛋白质	总重
大麦秆	426	19.6	161	28	168	82	64	929
小麦秆	464	8.6	165	25	204	83	64	1005
小麦壳	405	14.4	200	36	160	121	33	955
禾本植物	403	3.4	184	38	183	48	54	910
玉米茎	411	3.2	128	35	127	60	81	842
槭木	504	4.0	150	5	276	6	6	947
松木	649	1.0	33	14	320	0	2	1018
玉米棒（红）	436	34	253	38	ND (2)	ND	ND	ND
玉米棒（白）	439	28	250	38	ND	ND	ND	ND
玉米棒（印地 安）	438	8.5	240	36	ND	ND	ND	ND
燕麦壳	481	89	247	39	170	44	38	1019

(1) 总重 = 葡聚糖 + 木聚糖 + 阿拉伯聚糖 + 木质素 + 灰分 + 蛋白质

(2) ND = 未测

原料的 AX/NSP 示于表 2。在 11 种分析的原料中，有 4 种其 AX/NSP 大于 0.39。这些原料包括燕麦壳及玉米。其余的 7 种原料的 AX/NSP 小于约 0.39。

表 2：原料的 AX/NSP 组成

原料	纤维素 (mg/g) (1)	AX(mg/g)(2)	NSP (mg/g)(3)	AX/NSP
大麦秆	407	189	596	0.317
小麦秆	455	190	645	0.295
小麦壳	391	236	627	0.376
禾本植物	399	222	621	0.357
玉米茎	408	163	571	0.285
槭木	500	155	655	0.237
松木	648	47	695	0.068
玉米棒(红)	402	291	693	0.420
玉米棒(白)	411	288	699	0.412
玉米棒(印地安)	429	276	705	0.391
燕麦壳	392	286	678	0.422

(1) 纤维素=葡聚糖-淀粉

(2) AX=木聚糖+阿拉伯聚糖

(3) NSP=木聚糖+阿拉伯聚糖+纤维素

实施例2 一种酶的纤维素酶活性测定

一种酶的纤维素酶活性的测定是使用如下 Ghose,PURE AND APPL.CHEM.59: 257-268(1987)所述步骤。将一片 50mg 的 Whatman #1 滤纸置于每个含有 1ml 50mM 柠檬酸钠缓冲液 pH4.8 的试管上。将滤纸卷起并将试管涡旋使滤纸混入液体中。制备在 50mM 柠檬酸钠缓冲液, pH4.8 中起始浓度的 1: 200~1: 1600 浓度范围之间的一系列稀释酶。将稀释酶贮液及底物分别预热至 50℃, 然后将每种稀

释酶贮液的 0.5ml 等份与底物置入试管中。在 50℃下将试管温育 60 分钟。经在每试管中加入 3ml 二硝基水杨酸 (DNS) 试剂并煮沸 10 分钟而使反应终止。在每个试管中加入 Rochelle 盐及去离子水以显色还原糖和 DNS 试剂之间的反应。测定由每种酶的样品产生的糖的量, 计入酶及滤纸的背景, 并将每试管中糖的量与经反应产生的已知糖标准相对比。

滤纸活性单位定义为每分钟产生的糖的微摩尔数。用产生 2mg 糖所需的酶量计算活性。发现 Iogen 纤维素酶样品每 ml 具有 140 滤纸单位, 如表 3 所示:

表 3—Iogen 纤维素酶的滤纸活性

产生 2mg 糖所需酶量 (ml)	酶活性 (FPU/ml):
0.00264	140.0

实施例 3 原料的适度预处理反应:

该实施例介绍了在对原料进行适度预处理即主要分解半纤维素之后, 原料的对照性能。这种其自身的预处理反应不是最优化的, 但是其可以是两步预处理反应的第一步。这个适度反应说明了利用 AX/NSP 表示原料在乙醇生产中的合适性。优化的预处理反应见稍后实施例所述。

将 4g 实施例 1 中的经 Wiley 研磨过的样品置于在 250ml 烧瓶内的 96g 1%硫酸 (pH0.6~0.9) 中。将烧瓶内容物充分混合, 然后将烧瓶置于 121℃蒸汽高压灭菌器中 1 小时。后将烧瓶冷却, 并经玻璃微纤维滤纸真空抽滤。用碳酸钡中和并用 Dionex Pulsed-Amperometric

HPLC 分析以检测选定的滤液中的葡萄糖、木糖及阿拉伯糖的浓度。用自来水冲洗滤纸上的结块物，并在空气中干燥。用实施例 1 所述的方法。将该固体物等份溶于 70%硫酸中，用以检测其中纤维素，木聚糖和阿拉伯聚糖的浓度。

反应对所选的原料中纤维素及半纤维素水平的影响如表 4 所示。在所有情况下，少量（小于 8%）的纤维素被水解，而超过 70%的半纤维素被水解。

表 4：在 121℃的预处理反应对不同原料的影响

原料	纤维素	半纤维素
大麦秆	3.2	85
小麦秆	3.6	72
小麦壳	<2	75
禾本植物	5.7	80
玉米茎	4.3	82
槭木	<2	80
燕麦壳	7.9	85

随后将所有 11 种原料用纤维素酶水解。将相应于 0.2g 纤维素的预处理的固体样品加入含 19.8g 0.05M 柠檬酸钠缓冲液，pH5.0 的 250ml 烧瓶中，将 Iogen 纤维素酶（标化至 140FPU/ml）和 Novozym188 β -葡糖苷酶（1440BGU/ml）以相应于 9FPU/g 纤维素及 125BGU/g

纤维素的量加入至烧瓶中。少量与 β -葡萄糖苷酶一起加入至烧瓶中的葡萄糖计算在内。

将每个烧瓶在 50℃ 置于 New Brunswick 旋转摇床上并以 250RPM 摇动 20 小时。在这个阶段末期，将烧瓶内容物经玻璃微纤维滤纸过滤，并用 YSI 葡萄糖分析仪测定滤液中葡萄糖浓度。将葡萄糖浓度与预处理原料的纤维素浓度相关联以确定纤维素的转化。

图 1 是依据实施例 3, 作为 AX/NSP 函数的某些原料 在平均温度 121℃ 的纤维素转化图解。

如图 1 所示，令人惊奇的是，经这种特定的预处理反应纤维素转化随初始原料的 AX/NSP 呈线性提高。具有最高 AX/NSP 的四种原料（燕麦壳及三种玉米棒）具有最高的转化为葡萄糖的能力。

这些结果表明，原料的 AX/NSP 越高，经预处理后原料越适于乙醇的生产。

实施例 4 原料的高效预处理反应

该实施例介绍了在预处理反应后原料的对照性能。该预处理反应是在随后纤维素水解中呈最佳性能的条件下进行的。

来自实施例 1 的 0.28g Wiley 研磨的样品被置于密闭的不锈钢“弹式反应器”中的 7g 1% 硫酸 (pH 0.6-0.9) 中。高压反应器的容积为 9ml。对于任一个试验，准备 5 个等含量的弹式反应器，且将反应产物合并以产生足够量。将弹式反应器置入一预热的 290℃ 的油浴中 50 秒钟，然后取出并置入自来水中冷却。温差电偶测定结果显示在加热阶段末期弹式反应器的内部温度达到 260℃。平均等效温度为 235℃。

经用自来水漂洗取出弹式反应器内容物，然后经玻璃微纤维滤纸真空抽滤。用自来水冲洗过滤结块物并在空气中干燥。如实施例 1 所述将结块物溶于 70%硫酸中检测其纤维素浓度。

随后将反应过的原料用纤维素酶水解。将相应于 0.05g 纤维素的反应固体样品加入含 4.9g 0.05M 柠檬酸钠缓冲液,pH4.8 的 250ml 烧瓶中。在烧瓶中加入相应于 9FPU/g 纤维素和 125BGU/g 纤维素量的 Iogen 纤维素酶 (140FPU/ml) 和 Novozym 188 β -葡萄糖苷酶 (1440GBU/ml),要计入与 β -葡萄糖苷酶一起带至烧瓶中的少量葡萄糖。

将每个烧瓶放在 50°C Orbit 旋转摇床上并以 250RPM 摇动 20 小时。在该阶段末期，将烧瓶内容物经玻璃微原纤维滤纸过滤，滤液中葡萄糖浓度经 Dionex Pulsed-Amperometric HPLC 测定。将葡萄糖浓度与预处理原料中纤维素浓度相关以确定纤维素的转化。

图 2 是依据实施例 4,作为 AX/NSP 函数的某些原料在平均温度 235°C 的纤维素转化图解。

如在 121°C 的反应,图 2 呈现纤维素的转化随初始原料的 AX/NSP 呈线性提高。具有最高 AX/NSP 的四种原料(燕麦壳及三种玉米棒),观测到它们的纤维素转化水平最高,大约有超过 65%的纤维素水解为葡萄糖。

这些结果表明原料的 AX/NSP 越高,则在高效预处理之后原料越适于乙醇的生产。

表 5 示出达到 80%转化为葡萄糖所需纤维素酶量。所需酶量是

确定乙醇生产工艺可行性的关键因素，表 5 的数据来自图 2 所示结果加上其它描述作为纤维素酶剂量的函数的纤维素转化数据。

最高的四种原料，包括燕麦壳及玉米棒，比次佳原料小麦壳在将纤维素转化为葡萄糖时，所需的纤维素酶要少 23%~68%。最高的四种原料具有比其它试验原料好得多的性能。

最高四种原料的 AX/NSP 大于 0.39，而其它原料的 AX/NSP 低于该值。这数据表明 AX/NSP 大于 0.39 的原料所需纤维素酶较少，酶的低需求量是乙酸生产工艺的显著优势。

表 5 纤维素酶需求量

原料	在 20 小时 80%转化所需纤维素酶量 (FPU/g)	AX/NSP
玉米棒（红）	6.6	0.420
玉米棒（白）	8.7	0.412
玉米棒（印第安）	15.6	0.391
燕麦壳	16.3	0.422
小麦壳	21.0	0.376
禾本植物	27.1	0.357
大麦秆	28.3	0.317
小麦秆	44.5	0.295
槭木	45.5	0.237
玉米茎	63.4	0.285

实施例 5 燕麦壳的二步预处理反应

该实施例介绍燕麦壳二步预处理反应的使用，第一步温和处理

后接第二步较剧烈处理。

在第一步，将 4g 来自实施例 1 的经 Wiley 研磨的原料样品置于 250ml 烧瓶内的 96g 1%硫酸（pH0.6~0.9）中。将烧瓶内容物充分混合，然后将烧瓶置于蒸汽高压灭菌器中在 121℃处理 40 分钟。然后将烧瓶冷却并经玻璃微原纤维滤纸真空抽滤。用碳酸钡中和并用 Dionex Pulsed-Amperometric HPLC 分析样品以检测滤液中葡萄糖，木糖及阿拉伯糖浓度。用自来水冲洗滤物块并在空气中干燥。如实施例 1 所述将固体物等份溶于 70%硫酸中检测其中纤维素，木聚糖及阿拉伯聚糖浓度。温和反应对原料中纤维素及半纤维素（阿拉伯聚糖+木聚糖）水平的影响见表 6 所示。几乎所有的半纤维素都溶解了，这提高了纤维素的浓度。

表 6：温和预处理反应后燕麦壳的组成

原料：燕麦壳	纤维素（%）	半纤维素（%）
预处理前	27.9	22.0
预处理后	39.5	3.0

在温和处理条件下将 0.28g 反应的原料样品置入如实施例 4 所述不锈钢弹式反应器中的 7g 1%硫酸（pH0.6~0.9）中。准备 5 个等含量弹式反应器并将反应产物合并以得到足够量。将弹式反应器置入预热至 290℃的油浴中 50 秒钟，然后取出并置于自来水中冷却。

用自来水漂洗除下容器内容物，然后经玻璃微原纤维滤纸真空抽滤。用自来水冲洗滤物块并在空气中干燥。如实施例 1 所述将滤物块等份溶于 70%硫酸中以检测其中纤维素浓度。

在一级或二级预处理反应后，如下用纤维素酶将各种原料水解。将相应于 0.05g 纤维素的预处理固体样品加入含 4.9g 0.05M 柠檬酸钠缓冲液 pH4.8 的 25ml 烧瓶中。以相应于 10FPU/g 纤维素及 125BGU/g 纤维素量的 Iogen 纤维素酶（140FPU/ml）和 Novozym 188 β -葡萄糖苷酶（1440BGU/ml）加入到烧瓶中。要计入随 β -葡萄糖苷酶带至烧瓶中的少量葡萄糖。

将每个烧瓶在 50℃ 置于 Orbit 摇床上以 250RPM 摇动 20 分钟。在该阶段末期将烧瓶内容物经玻璃微原纤维滤纸过滤，用 Dionex Pulsed-Amperometric HPLC 测定滤物中葡萄糖浓度。将葡萄糖含量与预处理的原料中纤维素浓度相关以确定葡萄糖产量。

结果见表 7。

在第一步反应后，在燕麦壳中残留少量半纤维素。在纤维素被纤维素酶水解后葡萄糖产量仅为 340mg/g。

在第二步预处理反应后，葡萄糖产量比第一步高 85%，因而第二步预处理反应提供了水解性能的明显增强。二步预处理使葡萄糖产量在如实施例 4 所述燕麦壳的单步反应后的产量少 6% 之内。

这些结果明显与 Knappert 等的教导相反，他们断定低半纤维素含量的物质在预处理之后不具备改善的由纤维素酶的可消化性。在本实施例，经第一步反应之后燕麦壳中只有极少量半纤维素残留，但第二步反应明显地提高了其可消化性。Knappert 等教导，如此低半纤维素的物质对预处理没有较良好反应。本发明的教导正相反。

表 7：燕麦壳的二步预处理反应

预处理反应	在此步前半纤维素含量 (%)	葡萄糖产量 (mg/g 纤维素)
二步	3.0	645
一步	22.0	340
单步	22.0	685

实施例 6 燕麦壳的大规模预处理

使用 Werner-Pfleiderer 双螺杆挤出机 (Ramsey,NJ) 进行燕麦壳大规模预处理。在 Wiley 研磨机内研磨之后, 将燕麦壳用 1% 硫酸 (pH0.7~1.2) 浆化为 30% 固体的浓度。以每小时 10 磅的速度及压力为 500psig 将浆液填入挤出机。向挤出机内注入新蒸汽而使之保持在 230℃。在平均速度下, 物质在 30 秒内经过挤出机。收集挤出的燕麦壳并用水冲洗以除去溶解物, 然后经玻璃微原纤维滤纸过滤。

用实施例 1 的方法测定挤出的燕麦壳的纤维素含量。

随后用纤维素酶将挤出的燕麦壳水解。将相应于 0.05g 纤维素的挤出的燕麦壳样品加入含 4.9g 0.05M pH4.8 的柠檬酸钠缓冲液的 25ml 烧瓶中。以相应于 9FPU/g 纤维素和 125BGU/g 纤维素的量的 Iogen 纤维素酶 (140FPU/ml) 和 Novozym188 β -葡萄糖苷酶 (1140BGU/ml) 加入烧瓶中。随葡萄糖苷酶带至烧瓶中的少量葡萄糖要计入。

将每个烧瓶置于 50℃ Orbit 旋转摇床上, 并以 250RPM 摇动 20 小时。在该阶段末期, 将烧瓶内容物经玻璃微原纤维滤纸过滤, 并用 Dionex Pulse-Amperometric HPLC 测定滤液中葡萄糖浓度。将葡萄糖浓度与挤出的燕麦壳的纤维素浓度相关以确定葡萄糖产量。

结果见表 8。大规模燕麦壳的预处理反应的葡萄糖产量比实施例 4 的实验室规模预处理的产量略少（8%）。这表明可以进行大规模燕麦壳预处理反应，这是由于挤出机运转的优化毫无疑问可以克服实验室预处理反应的 8% 的优势。

表 8：产生自预处理燕麦壳的葡萄糖产量

预处理	葡萄糖（mg/g 纤维素）
挤出机	630
弹式反应器（实施例 4）	685

实施例 7 硬木的大规模预处理

用蒸汽 爆炸方法及 FOODY,US 专利 4,461,648 所述技术预处理杨木样品。用水冲洗所得预处理物并命名为“蒸汽分解的硬木”。用实施例 1 的方法测定蒸汽分解的硬木的纤维素含量。

随后用纤维素酶将蒸汽分解的硬木水解。将相应于 0.05g 纤维素的蒸汽分解硬木样品加入含 4.9g 0.05M pH4.8 的柠檬酸钠缓冲液的 25ml 烧瓶中。将相应于 9FPU/g 纤维素和 125BGU/g 纤维素的量的 Iogen 纤维素酶（140FPU/ml）和 Novozym188 β -葡萄糖苷酶（1440BGU/ml）加入烧瓶中。要计入随 β -葡萄糖苷酶带至烧瓶中的少量葡萄糖。

将每个烧瓶置于 50°C Orbit 旋转摇床上，并以 250RPM 摇动 20 小时。在该阶段末期将烧瓶内容物用玻璃微原纤维滤纸过滤，并用 Dionex Pulsed-Amperometric HPLC 测定滤物中葡萄糖浓度。将葡萄糖浓度与蒸汽分解硬木的纤维素浓度相关以确定葡萄糖产量。

结果见表 9。用大规模方法反应的硬木的产量与实验室规模的产量相差 2%（重）。在此情况下蒸汽 爆炸的大规模应用大大地优化且能胜过实验室结果。

表 9：硬木的预处理反应：

方法	葡萄糖产量（mg/g 纤维素）
蒸汽 爆炸	415
实验室（实施例 4）	425

实施例 8 温度对燕麦壳单步及二步预处理反应的影响

实施例介绍在燕麦壳的单步及二步预处理反应中温度范围的使用。

在单步预处理反应，将 0.28g 燕麦壳样品置于实施例 4 所述密闭不锈钢弹式反应器中的 7g 1%硫酸（pH0.6）中。准备 5 个等含量弹式反应器并将反应产物合并以得到足够量。将弹式反应器置入预热的油浴中，然后取出并置入自来水中冷却。

在油浴中的温度及时间如下：

（1）235℃，50 秒；（2）180℃，6 分钟；（3）170℃，8 分钟。

用自来水漂洗以除下容器内容物，然后经玻璃微原纤维滤纸真空抽滤。用自来水洗滤物块并在空气中干燥。如实施例 1 所述将滤物块等份溶于 70%硫酸中以检测其中纤维素浓度。

对于二步预处理反应，第一步是将 4g Wiley 研磨的燕麦壳样品置入含 96g 1%硫酸（pH0.6）的 250ml 烧瓶。将烧瓶内容物轻轻混合，然后将烧瓶置于 蒸汽高压处理器中在 121℃处理 40 分钟。将烧

瓶冷却并用玻璃微原纤维滤纸真空抽滤。用自来水冲洗滤物块并在空气中干燥。如实施例 1 所述将滤物块等分溶于 70%硫酸中以检测其纤维素、木聚糖及阿拉伯聚糖浓度。

第二步反应的进行是将 0.28g 来自第一步反应的物质置入如实施例 4 所述密封不锈钢“弹式反应器”中的 7g 1%硫酸 (pH0.6) 中。准备 5 个等含量弹式反应器并将反应产物合并以获得足够量。将弹式反应器置于预热的油浴中, 然后取出并将其置入自来水中冷却。

在油浴中的温度及时间与单步反应类似:

(1) 235°C, 50 秒; (2) 180°C, 6 分钟; (3) 170°C, 8 分钟。

经用自来水漂洗除下容器内容物, 然后将其经玻璃微原纤维滤纸真空抽滤。用自来水洗下滤物块并在空气中干燥。如实施例所述将滤物块等分溶于 70%硫酸中, 以检测其中纤维素浓度。

将一步或二步反应后的原料用纤维素酶水解。将相应于 0.05g 纤维素的反应后固体样品置于含 4.9g 0.05M 柠檬酸钠缓冲液 pH4.8 的 25ml 烧瓶中。向烧瓶内加入相应于 9FPU/g 纤维素及 125BGU/g 纤维素的量的 IOGEN 纤维素酶 (140FPU/ml) 及 NOVOZYM 188 β -葡萄糖苷酶 (1440BGU/ml)。要计入随葡萄糖苷酶带至烧瓶中的少量葡萄糖。

将每个烧瓶在 50°C 置于 Orbit 旋转摇床上并以 250RPM 摇动 20 小时。在该阶段末期, 用玻璃微原纤维滤纸过滤烧瓶内容物, 并用 Dionex Pulsed-Amperometric HPLC 测定滤物中葡萄糖浓度。将葡萄糖浓度与预处理原料中纤维素浓度相关以确定葡萄糖产量。

结果见表 10。

使用单步反应，葡萄糖产量在 180℃几乎与在最适温度 相同。

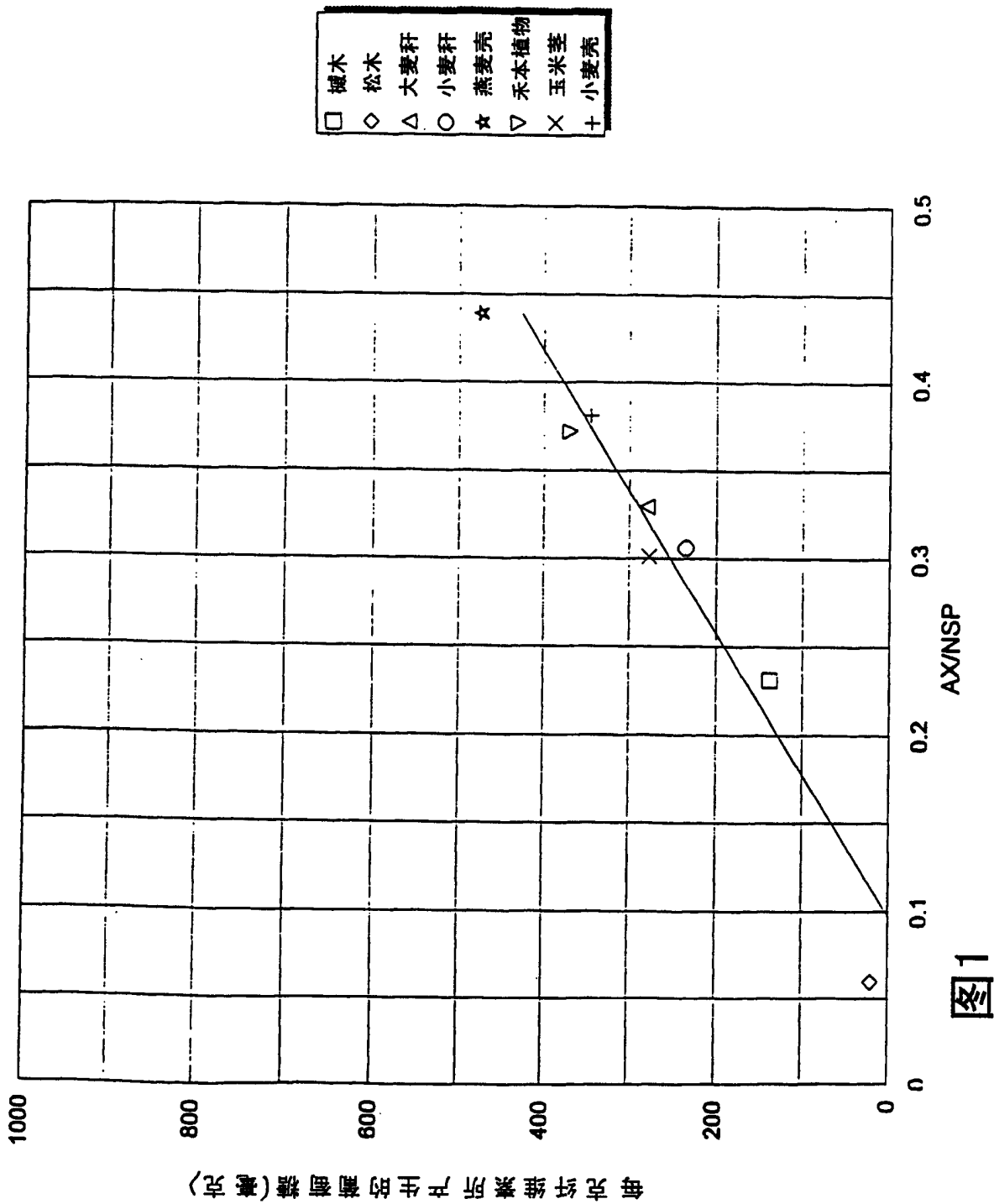
随着温度由 180℃降至 170℃，葡萄糖产量下降。

二步反应与单步预处理反应具有相同温度曲线，在 180℃和最适温度有相似性能，且低于 180℃时性能下降。葡萄糖产量在二步反应比在单步反应低 15%。

表 10：温度对燕麦壳的葡萄糖产量的影响

预处理	反应温度	反应时间（秒）	葡萄糖产量（mg/g 纤维素）	相对葡萄糖产量
单步	235	50	685	100
单步	180	360	660	96
单步	170	480	555	81
二步	235*	50	575	84
二步	180*	360	560	82
二步	170*	480	485	71

本发明的优选实施方案已呈现并加以叙述，本发明仅限于权利要求书的范围内，包括本领域普通技术人员能想到并未被现有技术所预示的每一权利要求引述元素的任何等价物。



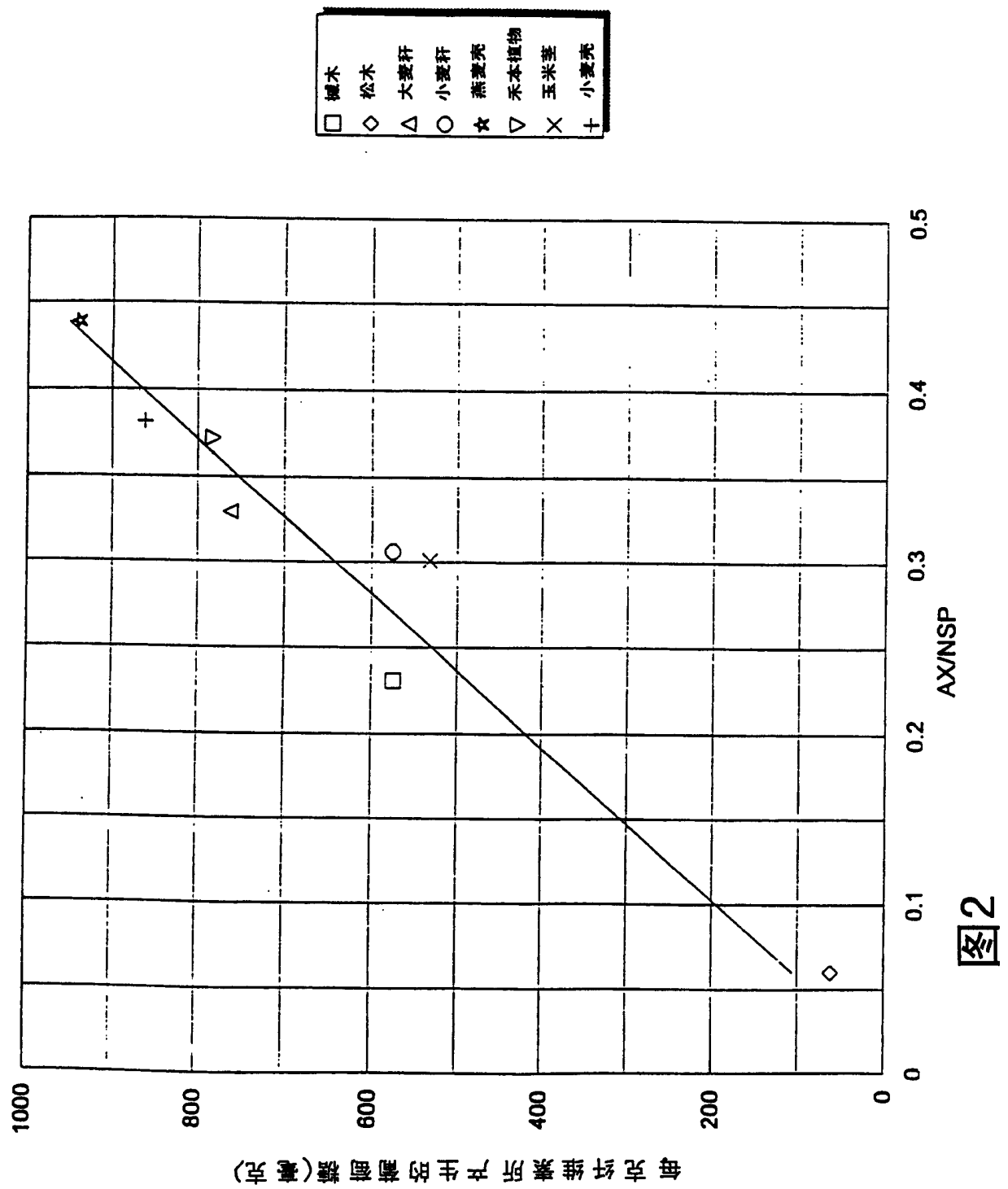


图2