



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101849018 B

(45) 授权公告日 2014. 08. 20

(21) 申请号 200880103346. 7

(22) 申请日 2008. 08. 18

(30) 优先权数据

11/843, 114 2007. 08. 22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 02. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2008/073415 2008. 08. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/045651 EN 2009. 04. 09

(83) 生物保藏信息

PTA-7858 2006. 09. 12

(73) 专利权人 纳幕尔杜邦公司

地址 美国特拉华州

专利权人 可持续能源联盟有限责任公司

(72) 发明人 S·M·亨尼西 M·西潘

R·T·埃兰德 M·P·塔克三世

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 权陆军 付磊

(51) Int. Cl.

C12P 19/02 (2006. 01)

C12P 7/08 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2006056838 A1, 2006. 06. 01,

US 5498766 A, 1996. 03. 12,

审查员 王溯铭

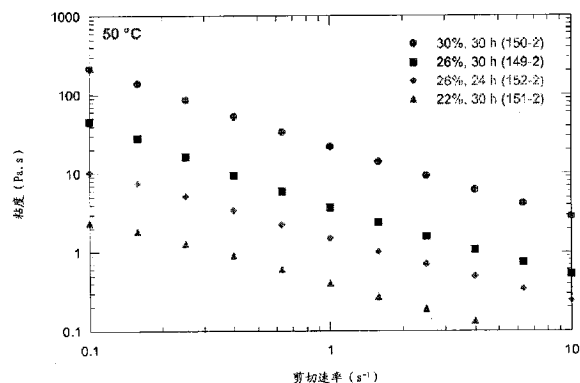
权利要求书2页 说明书25页 附图4页

(54) 发明名称

用于浓缩生物质的糖化方法

(57) 摘要

本发明提供了用于糖化预处理生物质以获取高浓度可发酵糖的方法。具体地讲,开发了一种方法,该方法使用具有粒度减小的分批补料方法以提供高干重的生物质含量酶催化糖化反应,所述反应使用低成本的反应器系统产生高糖浓度的水解产物。



1. 用于由生物质生产高糖含量水解产物的方法,所述方法包括:
 - a) 向具有粒度减小机构的竖式搅拌槽反应器中提供一部分反应组分,所述反应组分包括:
 - i) 一部分可混合的预处理生物质浆液;以及
 - ii) 一部分第一糖化酶聚生体,所述酶聚生体包括至少一种能够水解纤维素的酶;
 - b) 在适当条件下使所述浆液和酶发生反应;
 - c) 施加所述粒度减小机构;
 - d) 加入附加部分的预处理生物质,生产固体含量更高的生物质浆液;
 - e) 任选地加入附加部分的糖化酶聚生体;
 - f) 在适当条件下使所述固体含量更高的生物质浆液发生反应;以及
 - g) 任选地重复一个或多个步骤(c)、(d)、(e)、和(f)一次或多次,以此生产出高糖含量水解产物并且其中所述浆液的屈服应力保持在小于 30Pa,其中所有预处理生物质部分合并后的生物质的干重大于所述最终水解产物的重量的 30%。

2. 权利要求 1 的方法,其中步骤(a)(i)的预处理生物质浆液的可混合部分是通过在所述竖式搅拌槽反应器中将低粘度组分的底液和一部分预处理生物质进行合并,并在加入酶之前调节温度和 pH 来提供的。

3. 权利要求 1 的方法,其中所述生物质部分被连续加入。

4. 权利要求 1 的方法,其中所述粒度减小机构的施加在步骤(b)之前、期间、或之后、或它们的任何组合来执行一次或多次。

5. 权利要求 1 的方法,其中所述粒度减小机构包括机械粒度减小。

6. 权利要求 5 的方法,其中将所述机械粒度减小机构浸入到所述反应器槽中或并入到再循环回路中。

7. 权利要求 1 的方法,其中加入附加部分的预处理生物质之后对 pH 和温度进行控制。

8. 权利要求 2 或 7 的方法,其中将所述 pH 调节至介于 4 和 10 之间。

9. 权利要求 8 的方法,其中将所述 pH 调节至介于 4.5 和 6 之间。

10. 权利要求 2 或 7 的方法,其中将所述温度调节至介于 20℃和 80℃之间。

11. 权利要求 10 的方法,其中将所述温度调节至介于 25℃和 60℃之间。

12. 权利要求 1 的方法,其中一种能够水解纤维素的酶选自纤维素酶、内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、 β -葡萄糖苷酶。

13. 权利要求 1 的方法,其中所述(a)(ii)的第一糖化酶聚生体、所述(e)的附加糖化酶聚生体、以及其他任选重复的附加糖化酶聚生体可以由相同的或不同的酶构成。

14. 权利要求 13 的方法,其中每个聚生体包括纤维素酶、半纤维素酶、或它们的混合物。

15. 权利要求 1 的方法,其中所述生物质选自:柳枝稷、废纸、来自造纸业的淤渣、玉米粒、玉米芯、玉米壳、玉米秸秆、玉米纤维、草、小麦、小麦秸秆、干草、大麦、大麦秸秆、稻秆、蔗渣、高粱、大豆,获取自谷物、树、枝、根、叶、木屑、锯末、灌木及矮树丛、蔬菜、水果、花和动物粪肥的研磨物的组分。

16. 权利要求 15 的方法,其中生物质选自:玉米芯、玉米秸秆、玉米纤维、玉米壳、蔗渣、

锯末、柳枝稷、小麦秸秆、干草、稻秆、和草。

17. 权利要求 15 的方法,其中生物质选自玉米芯、玉米秸秆、玉米纤维、锯末、和蔗渣。

18. 权利要求 1 的方法,其中所述生物质来源于多种原料。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述高糖含量水解产物包括单糖和低聚糖。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述水解产物中的糖的浓度为至少 100g/L。

用于浓缩生物质的糖化方法

[0001] 政府权利声明

[0002] 本发明由美国政府支持并受与能源部签署的合同号 04-03-CA-70224 和 DE-FC36-03G013146 的约束。美国政府拥有本发明的必然权利。

发明领域

[0003] 提供了用于糖化预处理生物质以获取高浓度可发酵糖的方法。具体地讲,开发了一种方法,该方法使用具有粒度减小的分批补料方法以提供高干重生物质含量的酶催化糖化反应,所述反应使用低成本的反应器系统来生产高糖浓度的水解产物。

[0004] 发明背景

[0005] 纤维质的和木质纤维质的原料以及垃圾例如农业残余物、木材、林业垃圾、来自造纸业的淤渣、和市政及工业固体垃圾,提供了潜力巨大的可再生原料,用于生产有价值的产品如燃料和其他化学制品。由碳水化合物聚合物(包括纤维素、半纤维素、葡聚糖和木质素)组成的纤维质的和木质纤维质原料以及垃圾一般用多种化学、机械和酶方法进行处理以释放主要的己糖和戊糖,它们然后能进行发酵以产生有用产物。

[0006] 使用预处理方法以制备纤维质和木质纤维质材料的碳水化合物聚合物,所述聚合物更易于受糖化酶的作用。然后将预处理混合物在存在糖化酶聚生体的条件下进一步水解以在水解产物中释放低聚糖和/或单糖。用于由预处理的生物质来生产可发酵糖的糖化酶通常包括一种或多种糖苷酶,如纤维素水解糖苷酶、半纤维素水解糖苷酶、和淀粉水解糖苷酶,以及肽酶、脂肪酶、木素酶和/或阿魏酸酯酶。用于生物质处理的糖化酶和方法参见 Lynd, L. R. 等人 (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66 :506-577)。

[0007] 为了获取糖化产物,在随后的发酵生产中以经济型方式使用的生物质水解产物应包含高浓度的糖。在用于发酵生成乙醇的水解产物中需要高于 14% 的糖浓度以在经济上可行的水平来生产乙醇。就多数类型的木质纤维质生物质而言,这相当于在糖化过程中使用的生物质干物质含量高于 20%。迄今为止,在经济上可行的反应器系统中以这种高生物质浓度进行的高糖产率的生物质糖化仍然很难完成。

[0008] 因此,需要一种用于糖化生物质的经济型方法,该方法可使用高干重生物质进行,使得收率提高并且所得水解产物包含高浓度的可发酵糖。为了达到所述经济目的和效果,该方法必须提供充分的温度和 pH 控制。申请人已经能够通过多种方式在低成本的传统搅拌槽反应器系统中保持完全混合来利用生物质,从而开发出了所述方法。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明提供用于糖化预处理的高干重生物质以生产可发酵糖的方法。本发明的方法使用分批补料反应器系统,该系统包括多个粒度减小步骤和混合步骤以在竖式搅拌槽中保持完全混合。在本发明的一个实施方案中,所述方法包括:

[0011] a) 向具有粒度减小机构的竖式搅拌槽反应器中提供一部分反应组分,所述反应组分包包括:

[0012] i) 一部分可混合的预处理生物质浆液;以及

[0013] ii) 一部分第一糖化酶聚生体,所述酶聚生体包括至少一种能够水解纤维素的酶;

[0014] b) 在适当条件下使所述浆液和酶发生反应;

[0015] c) 施加粒度减小机构;

[0016] d) 加入附加部分的预处理生物质,生产固体含量更高的生物质浆液;

[0017] e) 任选地加入附加部分的糖化酶聚生体;

[0018] f) 在适当条件下使所述固体含量更高的生物质浆液发生反应;以及

[0019] g) 任选地重复一个或多个步骤(c)、(d)、(e)、和(f)一次或多次,

[0020] 以此生产出高糖含量水解产物并且其中浆液的屈服应力保持在小于 30Pa。

[0021] 本发明的附加方面涉及使用水解产物和靶化学制品,所述水解产物是使用本发明的方法制备的,所述靶化学制品是通过将使用本发明的方法制备的水解产物进行发酵来生产的。

[0022] 附图简述

[0023] 图 1 示出了在糖化器中玉米芯生物质的停滞限。

[0024] 图 2 示出了加入不同量的酶对粒度减小的玉米芯生物质停滞的效应。

[0025] 图 3 示出了具有 % DWB 的水解产物的粘度的变化图。

[0026] 图 4 示出了糖化反应时间对粘度的效应图。

[0027] 发明详述

[0028] 申请人特别将所有引用的参考文献的完整内容引入本公开内容中。此外,当数量、浓度或其他数值或参数以范围、优选范围或优选上限数值和优选下限数值的列表形式给出时,其应理解为具体地公开由任何范围上限或优选数值和任何范围下限或优选数值的任何一对所构成的所有范围,而不管所述范围是否被单独地公开。凡在本文中给出某一数值范围之处,该范围均旨在包含其端点,以及位于该范围内的所有整数和分数,除非另外指明。当定义一个范围时,不旨在将本发明的范围限定于所列举的具体数值。

[0029] 本发明提供用于糖化高干重生物质的方法,所述生物质在所得水解产物中生产高浓度的可发酵糖。在本发明的方法中,使用生物质分批补料系统将生物质导入反应器中,所述生物质经过多个粒度减小步骤,并且将反应器内容物充分混合使得在使用糖化酶的糖化期间进行良好的 pH 和温度控制。所述方法适于在带顶部搅拌的竖式反应器中进行混合,能按比例经济地将该反应器扩大到非常大的体积。糖化过程中包括的粒度减小步骤促进纤维素和 / 或半纤维素与糖化酶的反应速率提高,使得预处理的湿固体生物质迅速液化并使用低成本反应器。粒度减小步骤、更快的酶促糖化和用分批补料方法加入生物质相结合,预防反应器内容物产生显著的屈服应力,因此允许在竖式槽反应器(包括叶轮和马达)中的完全混合。完全混合和防止停滞提供更好的 pH 和温度控制。通过此类控制,可制备具有高干重生物质的水解产物,其糖收率高。可在发酵中使用所得高浓度糖水解产物以制备有价值的产品如燃料和其他化学制品,包括乙醇。

[0030] 定义:

[0031] 在本公开中使用许多术语。给出了如下定义。

[0032] 术语“生物质”指任何纤维质或木质纤维质材料,并包括包含纤维素的材料,以及任选地还包含半纤维素、木质素、淀粉多糖、低聚糖和 / 或单糖的材料。生物质也可包括附

加组分如蛋白质和 / 或脂质。如本发明所述,生物质可来源于单一来源,或者生物质可包括来源于一种以上来源的混合物。例如,生物质可包括玉米芯和玉米秸秆的混合物,或草和叶片的混合物。生物质包括但不限于生物能作物、农业残余物、市政固体垃圾、工业固体垃圾、来自造纸业的淤渣、庭院垃圾、木材和林业垃圾。生物质的实例包括但不限于玉米粒、玉米芯、作物残余如玉米壳、玉米秸秆、草、小麦、小麦秸秆、大麦、大麦秸秆、干草、稻秆、柳枝稷、废纸、蔗渣、高粱、大豆、获取自谷物、树、枝、根、叶、木屑、锯末、灌木及矮树丛、蔬菜、水果、花和动物粪肥的研磨物的组分。在一个实施方案中,用于本发明的生物质包括具有相对高碳水化合物值的生物质,它们相对密集,和 / 或相对易于收集、运输、贮存和 / 或处理。在本发明的一个实施方案中,可用的生物质包括玉米芯、玉米秸秆和蔗渣。

[0033] 术语“预处理的生物质”意指在糖化之前已经经过处理或预处理的生物质。本文将进一步描述处理,例如预处理。

[0034] 术语“木质纤维质”指包含木质素和纤维素的组合物。木质纤维质材料也可包含半纤维素。

[0035] 术语“纤维质”指包含纤维素的组合物。

[0036] 术语“糖化”指由多糖生产可发酵糖。

[0037] 术语“可发酵糖”指在发酵过程中能被微生物用作碳源的低聚糖和单糖。

[0038] 术语“水解产物”指糖化的产物,该产物包含糖化过程中产生的糖、剩余未水解的生物质、和用于糖化的酶。

[0039] 术语“浆液”指不溶解的材料和液体的混合物。

[0040] 术语“混合浆液”指在搅拌系统作用下变得基本上均匀的浆液。“混合程度”指浆液的这一性质。

[0041] 术语“完全混合浆液”指其中浆液组分在整个浆液中基本上均匀分布(均匀的)的状态。

[0042] 术语“底液”指在导入生物质和开始糖化之前装入反应器中的初始液体或浆液。

[0043] 生物质的“干重”意指移除全部或基本上全部水分后的生物质的重量。干重通常依照美国材料与试验协会 (ASTM) 标准 E1756-01 (Standard Test Method for Determination of Total Solids in Biomass) 或纸浆与造纸工业技术协会, Inc. (TAPPI) 标准 T-412om-02 (Moisture in Pulp, Paper and Paperboard) 进行测量。

[0044] 术语“生物质干重浓度”指在投料时间点进行计算的加入分批补料系统反应器中的生物质干重总量占运行结束时反应器中的反应组合物总重量的百分比。

[0045] 术语“合适的反应条件”指下文详述的时间、温度、pH 和反应物浓度。反应条件包括由竖式槽反应器中的搅拌器(包括但不限于叶轮)进行的混合或搅拌。混合或搅拌可以是连续的或不连续的,例如由加入附加组分或温度和 pH 评估引起的中断。

[0046] 在本发明的方法中,可使用任何预处理生物质。生物质可通过本领域技术人员已知的任何方法进行预处理,例如用酸、碱、有机溶剂、氧化剂、或其他化学制品进行预处理。生物质也可用一种或多种化学制品与蒸汽组合进行预处理,或单独用蒸汽预处理。预处理也可包括机械破坏如通过压碎、碾磨、或剁碎以及应用其他破坏性物理能量如超声波或微波。此外,也可使用未经预处理的生物质,但是使用经过预处理的生物质以促进随后的糖化更合适一些。生物质可以最初以高干重浓度形式存在,或者以较稀的形式存在(例如釜馏

物)。

[0047] 申请人已经开发了一种生物质的糖化方法,该方法在标准搅拌竖式槽系统中组合使用多个粒度减小步骤和多个生物质添加步骤,令人惊讶地保持了足以允许在反应器中加入大于 20%的生物质干重的低粘度,同时保持完全混合状态以提供有效的 pH 和温度控制。这一方法产生高收率的糖。在一个实施方案中,获得了约 38%的生物质干重浓度。因此已经获得了一种经济型生物质糖化方法。

[0048] 将生物质导入一个配有顶部搅拌器系统(如马达和带一个或多个叶轮的轴)的竖式反应槽中。设计轴上使用的叶轮的数量和类型以在不同的糖化阶段在反应器中提供足够的流量和固体悬浮。优选的叶轮是高流量设计,具有低动力参数并因此具有低动力需求,因此减小了该低成本反应器系统所需的马达尺寸。可使用的具有低动力参数的高流量叶轮是本领域技术人员所熟知的,并且可包括例如斜叶桨或翼型桨。高流量叶轮可商购获得,例如:Lightnin A310(Cole-Parmer, Vernon Hills, IL)、APV LEhydrofoil(Invensys APV, Getzville, NY)、和 Chemineer HE-3(Chemineer, Inc., Dayton, OH)。

[0049] 在其他高固体糖化系统中,如水平式槽旋转系统,混合湿固体生物质起始料的起始动力需求很高,并且当湿固体液化后会浪费动力。水平式混合系统的其他缺点包括槽壁高度较低而搅拌器较大,以及搅拌器密封件在液面以下,因此易于渗漏并带来维护问题。

[0050] 在本发明的方法中,生物质从糖化过程的开始阶段以混合浆液形式存在于反应器中。当不溶解材料和液体的混合物在搅拌系统作用下变得基本上均匀时,它是一种混合浆液。本发明的方法在整个糖化过程中保持生物质混合浆液的屈服应力小于约 30Pa。屈服应力是在任何运动发生前足以破坏结构的所需最小应力的量度(Mixing in the Process Industries, 第 2 版, N. Harnby 等人, 第 20 页(1997))。在具有高屈服应力的生物质浆液中,可通过增加额外的叶轮并使其以更高速度运转来克服屈服应力,因此需要更大的马达。因为流体的屈服应力增加,混合所需的搅拌器系统变得不经济。因此通过将生物质混合浆液的屈服应力保持在小于约 30Pa,混合所需的搅拌器系统就结构和动力需求而言是一种经济的系统。

[0051] 在本发明的方法中,加到反应器中的预处理生物质可以已经以混合浆液的形式存在,或者假如它的固体含量使其无法混合,然后加入液体至使其成为混合浆液。初始形式可以是混合浆液的生物质可包括例如釜馏物或使用高液体组分预处理过的生物质。就不以混合浆液形式存在的生物质而言,可在加入之前加入液体,或者可将生物质加入到预载有液体的反应器中。液体可以是新水或从所述方法其他部分再循环的水、来自玉米干法粉碎的稀酒糟、前一批剩余的一部分水解产物(按原样或进行稀释)、或多种其他高水流体。例如,将初始底液装入反应器中,然后将生物质导入以形成生物质浆液,该浆液在竖式搅拌器作用下保持完全混合。装载的浆液可以包括高干重生物质含量,然而该浆液不表现出竖式搅拌器系统不能克服的屈服应力,并且屈服应力不超过约 30Pa。确切重量将取决于生物质类型、反应器尺寸和搅拌机构,并且易于被本领域的技术人员测定。可通过任何适用方法测定混合程度,例如目测、使用探针如激光探针评估颗粒运动,或通过取样分析同质程度或粘度。在此初始加料中的生物质是糖化生产中使用的总生物质的一部分。如下所示在糖化期间加入生物质的附加部分。

[0052] 在任何一个步骤可加入小于 5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、

90%或100%的生物质的部分或其他反应组分。

[0053] 当混合时,取决于生物质的初始 pH(它取决于所用的预处理),通过加入所需的酸或碱来向所述浆液提供期望的 pH。如下所述,所需的具体 pH 取决于加工特定类型生物质使用的糖化酶的最佳 pH。生物质浆液的完全混合确保整个生物质材料获得基本上均匀的 pH,这使得糖化酶发挥最佳功能。在本文实施例 5 中证明了保持所需 pH 的重要性,其中显示当 pH 偏移了设定的 pH 时降低了糖收率。

[0054] 当混合时,也通过加热或冷却生物质浆液使其达到所需的温度。如下所述,所需的具体温度取决于加工特定类型生物质使用的糖化酶的最佳温度,以获得可能的最佳糖化反应速率。由于其他加工原因,也可以选择较低温度下进行加工,虽然酶活性在低于最佳温度的情况下可能降低,该温度对酶无负面效应。在调节好 pH 和温度后将糖化酶加到生物质浆液中。这是一部分加到初始混合预处理生物质中的糖化酶。附加的糖化酶可在下文所述的分批补料方法中加入更多生物质部分后加入,或在开始时全部加入。此外,可在不同时间点加入多种酶以获得最佳糖化效率。

[0055] 糖化酶(也称为糖化酶聚生体)用于水解生物质释放水解产物中的低聚糖和/或单糖。糖化酶参见 Lynd, L. R. 等人 (Microbiol. Mol. Biol. Rev. (2002) 66 :506-577)。糖化酶聚生体包括一种或多种酶,所述酶主要选自(但是非排他地)“糖苷酶”类,所述酶水解二糖、单糖、和多糖的醚键,存在于广义“水解酶”(EC 3.) 的分类酶 EC 3.2.1.x 中 (Enzyme Nomenclature 1992, Academic Press, San Diego, CA with Supplement 1(1993), Supplement 2(1994), Supplement 3(1995), Supplement 4(1997) and Supplement 5[分别在 Eur. J. Biochem. (1994) 223 :1-5, Eur. J. Biochem. (1995) 232 :1-6, Eur. J. Biochem. (1996) 237 :1-5, Eur. J. Biochem. (1997) 250 :1-6, and Eur. J. Biochem. (1999) 264 :610-650 中])。本发明的方法中可用的糖苷酶能根据它们水解的生物质组分进行分类。本发明的方法可用的糖苷酶包括纤维素水解糖苷酶(例如,纤维素酶、内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶、 β -葡萄糖苷酶)、也称为半纤维素酶的半纤维素水解糖苷酶(例如,木聚糖酶、内木聚糖酶、外木聚糖酶、 β -木聚糖苷酶、阿拉伯糖基木聚糖酶、甘露聚糖酶、半乳糖酶、果胶酶、葡糖醛酸酶)、和淀粉水解糖苷酶(例如,淀粉酶、 α -淀粉酶、 β -淀粉酶、葡萄糖淀粉酶、 α -葡萄糖苷酶、异淀粉酶)。此外,它可用于将其他活性加入糖化酶聚生体中,如肽酶 (EC 3.4.x.y)、脂肪酶 (EC 3.1.1.x 和 3.1.4.x)、木素酶 (EC 1.11.1.x)、和阿魏酸酯酶 (EC 3.1.1.73),以帮助从生物质的其他组分中释放多糖。本领域熟知生产多糖水解酶的微生物常常表现出某种活性,如纤维素降解,该活性由若干种酶或一组具有不同底物特异性的酶催化。因此,来自微生物的“纤维素酶”可包括一组酶,所有酶可有助于纤维素降解的活性。取决于获取酶时利用的纯化方案,商业或非商业酶制剂,如纤维素酶,可包括多种酶。因此,在本发明的方法中使用的糖化酶包括至少一种“纤维素酶”,并且其活性可通过一种以上的酶催化。任选地,在本发明方法中使用的糖化酶可包括至少一种半纤维素酶,一般取决于在本发明的方法中使用的预处理生物质的类型。例如,当糖化用酸预处理的生物质时通常不需要半纤维素酶,而当糖化在中性或碱性条件下预处理的生物质时通常包括半纤维素酶。

[0056] 糖化酶可商业获取,如获取自 Spezyme®CP 的纤维素酶 (Genencor International, Rochester, NY) 和 Multifect®的木聚糖酶 (Genencor)。此外,糖化酶可通过生物方法制

备,包括使用重组微生物方法。可开发可在本发明的方法中使用的新型糖化酶。

[0057] 本领域的技术人员将懂得如何测定在本发明的方法中使用的酶的有效量,以及如何调节条件以获得最佳酶活性。本领域的技术人员也将懂得如何优化此类酶的所需活性,以在选择条件下获得给定预处理产物的最佳糖化效果。优选地,糖化在使用的糖化酶的最佳 pH 和温度下或接近此最佳 pH 和温度的条件下进行。最佳 pH 可在约 4 至约 10 的范围内,更典型地介于约 4.5 和约 6 之间。最佳温度可在约 20℃ 至约 80℃ 的范围内,更典型地介于约 25℃ 和约 60℃ 之间。

[0058] 随着糖化进行,可溶性糖从生物质中的纤维素和 / 或半纤维素中产生出来,因此液化生物质浆液的不溶解组分。浆液中的生物质变得部分水解。浆液粘度降低,允许在浆液中加入附加生物质,同时用反应器中的竖式搅拌器保持浆液的混合程度。可在浆液中加入附加的生物质,其量小于会将浆液屈服应力提高至 > 30Pa 水平的量,以允许用经济型竖式搅拌器系统完全混合。附加部分的生物质加入更多的固体,因此提高了糖化浆液中加入的总固体百分比。加入附加生物质之后,当混合和糖化反应继续进行时将 pH 和温度控制在优选范围内。当加入更多生物质时,浆液的完全混合允许将 pH 控制在一个狭窄范围内,这通过加入酸或碱进行 pH 调节。在本发明的方法中允许的严格 pH 控制通过改善糖化酶功能来促进糖化。当加入更多生物质时,浆液的完全混合允许将反应器内容物的温度控制在一个狭窄范围内,这也改善糖化酶的功能。可用的加热源或冷却源是本领域技术人员熟知的,并可包括在反应器上的夹套、在反应器中的内部线圈、或通过其泵入反应器内容物的换热器。在本发明的方法中允许的严格温度控制通过允许糖化在可能的最高温度下进行来促进糖化,该温度不超过反应器温度和热失活酶。

[0059] 糖化酶聚生体的附加部分可任选地加上以下一种或多种新型生物质。糖化酶聚生体的每个加入部分可包括与初始加入的糖化酶聚生体相同的酶,或可包括不同的酶混合物。例如,加入的第一糖化酶聚生体可仅包括或主要包括纤维素酶,然而后来加入的糖化酶聚生体可仅包括或主要包括半纤维素酶。可使用任何糖化酶聚生体加入方法,它经测定在反应器中的特定生物质糖化中是最好的方法。本领域的技术人员能够容易地决定可用的糖化酶聚生体加入方法,如本文实施例 10 所述。

[0060] 生物质液化由进一步的糖化引起,因此再次降低了生物质浆液粘性和屈服应力,如果存在的话,并允许在保持混合的情况下加入更多的生物质。因此附加生物质可在分批补料系统后加入,同时通过竖式搅拌器保持搅拌。附加生物质给料可以是半连续的,使得加料之间存在液化周期。作为另外一种选择,生物质给料可以是连续的,其速率应足够慢以平衡糖化期间发生的连续液化。在任何一种情况下,对浆液混合程度进行监控并控制生物质加入以保持完全混合,这通过搅拌器系统完成以克服浆液的屈服应力。

[0061] 在本发明的方法中,不溶解生物物质的粒度也被反复减小。本文证实粒度减小能显著地降低反应时间并提高收率。如本文实施例 2 和 3 所述,一些粒度减小发生在搅拌和糖化期间。在本发明的方法中通过应用多种机械力来达到促进粒度减小的目的。机械粒度减小机构可以是例如共混机、研磨机、剪切机、剁碎机、剪切分散器、分散器、或转子定子粉碎机。粒度减小也可通过其他非机械方法进行,例如超声波方法。粒度可以在初始生产用于糖化的浆液之前、在加入预处理生物质到现有糖化浆液之前、和 / 或在浆液糖化期间进行减小。例如,可将切刀或高速分散器浸入糖化浆液中减小粒度。也可通过使加入的预处理生物质

通过研磨机或盘式精炼器减小粒度。在一个实施方案中,将带内嵌式研磨机的循环回路连接到生物质反应器上使得当浆液进入回路、通过研磨机、然后再进入反应器时粒度减小。在这些实例的任何一个中,可监控浆液的混合程度以优化粒径减小,用于加入最大干重的生物质并在所得水解产物中生产大量的糖。

[0062] 带内嵌式研磨机的循环回路也可加入一个温度控制点,例如包括一个内嵌式换热器。通过用竖式搅拌器完全混合浆液,控制从循环回路再进入反应器的生物质浆液的温度,提供了对糖化浆液的温度控制。用相同方法,控制在分批补料系统中加入的生物质的温度,这提供了控制糖化浆液温度的方法。如前文所述,控制温度以提供糖化酶达到最佳活性所需的温度。

[0063] 在本发明的方法中使用分批补料系统,加入生物质直到加入的生物质干重达到至少大于 20%。将加入生物质的干重百分比给定为加入到反应器中的生物质干重量对在生产运行末期反应器中反应组合物或水解产物的总重量的比值。补料分批运行周期可持续约 12 小时至约 7 天。72 小时的周期尤其适用。在一个实施方案中,在第一个 12 小时至 24 小时期间定时加入生物质。在本发明的方法中加入生物质至少两次。在一个实施方案中,加入生物质超过三次以使加入的生物质的干重达到 24%,或在另一个实施方案中达到 30%。可加入生物质至恰好低于临界点,此时其中糖化浆液将具有大于约 30Pa 的屈服应力,使得搅拌系统不能克服屈服应力并完成混合。

[0064] 申请人已经令人惊讶地发现使用本发明的方法,通过组合多个粒度减小步骤和多个生物质添加步骤,当在竖式搅拌槽系统中保持混合浆液状态时,可完成对干重浓度大于 20%的生物质的糖化。可获得约 24%或更高,或甚至 30%或更高的生物质干重浓度。在一个实施方案中,获得了约 38%的生物质干重浓度。在本发明的方法中由于粒度减小的生物质的高度液化,当使用竖式搅拌反应器持续保持允许完全混合的小于 30Pa 的屈服应力时,获得了高生物质固体含量。申请人已经令人惊讶地发现使用包括搅拌、粒度减小、pH 和温度保持、以及随着时间过去加入附加生物质的所述方法,随着这些高生物质固体的糖化获得了高收率的糖。

[0065] 使用具有粒径减小功能的竖式搅拌器槽系统所需的能量少于水平式旋转系统,并且其资本成本显著地少于水平式旋转系统,因此允许在经济型反应器系统中从高干重生物质中生产糖,其产生的可溶性糖的高收率比得上使用较低百分比的固体糖化的收率。在水平式反应器系统中尚未发现高收率的可溶性糖。从高干重生物质中生产糖从而允许生产包含高浓度糖的水解产物。在本发明的方法中制备的水解产物中的糖浓度为至少约 100g/L 总可溶性糖,通常将高于 80g/L 总可溶性糖认为是高浓度糖。可获得 150g/L、或 200g/L、以及甚至更高的如 240g/L 的糖浓度。葡萄糖收率大于约 80%,并可获得最多 90%,甚至 95%或更高的收率。水解产物中的葡萄糖浓度为至少约 90g/L,并可获得 100g/L 或更高的,如约 140g/L 的浓度。高糖浓度的水解产物和需要低能量输入的低成本生产系统一起使得本发明的方法成为用于制备有价值的燃料和其他化学制品的经济型方法的一部分。

[0066] 作为提供充分糖化的水解产物的另外一种选择,糖化可进行直至达到最终的固体百分比目标,然后可将糖化生物质转移到发酵过程中,其中糖化与发酵一起继续进行(称为 SSF:同时进行糖化和发酵。)

[0067] 在本发明的方法中产生的可发酵糖可通过合适的微生物进行发酵,所述微生物或

者天然存在或者通过基因操纵产生,能够生产足够量的所需目标化学制品。可通过发酵制备的目标化学制品包括例如酸、醇、烷烃、烯烃、芳族、醛、酮、生物高聚物、蛋白质、肽、氨基酸、维生素、抗生素、和药物。醇包括但不限于甲醇、乙醇、丙醇、异丙醇、丁醇、乙二醇、丙二醇、丁二醇、甘油、赤藓醇、木糖醇、和山梨醇。酸可包括乙酸、乳酸、丙酸、3-羟基丙酸、丁酸、葡萄糖酸、衣康酸、柠檬酸、琥珀酸和乙酰丙酸。氨基酸可包括谷氨酸、天冬氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸、甘氨酸、精氨酸、苏氨酸、苯基丙氨酸和酪氨酸。附加的目标化学制品包括甲烷、乙烯、丙酮和工业酶。

[0068] 可通过一种或多种合适的生物催化剂在一步或多步发酵中把糖发酵成目标化学制品。生物催化剂可以是选自细菌、丝状真菌和酵母的微生物。生物催化剂可以是野生型微生物或重组微生物,并可以包括埃希氏菌属、发酵单胞菌属、糖酵母属、假丝酵母属、毕赤酵母属、链霉菌属、芽孢杆菌属、乳酸杆菌、和梭菌属。通常,生物催化剂可以是重组大肠杆菌、运动发酵单胞菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、啤酒糖酵母、嗜热梭菌、高温产氢菌、和树干毕赤酵母。

[0069] 已经描述了多种用于发酵生产目标化学制品的生物催化剂,并可发现、通过突变生产、或通过重组方法工程化其他生物催化剂。可以使用任何利用以本发明的方法生产的可发酵糖的生物催化剂以制备已知可通过发酵生产的目标化学制品。

[0070] 生产包括乙醇和丁醇在内的生物燃料的生物催化剂是尤其受关注的。例如,通过产溶剂梭菌将碳水化合物发酵成丙酮、丁醇、和乙醇(ABE发酵)是为人熟知的(Jones和Woods(1986)Microbiol. Rev. 50:484-524)。US 5192673描述了用于使用丙酮丁醇梭菌突变株生产高含量丁醇、丙酮和乙醇的发酵方法。US 6358717描述了用于使用拜氏梭菌突变株生产高含量丁醇、丙酮和乙醇的方法。共有的和共同未决的专利申请W02007/041269和W0 2007/050671分别公开了遗传工程的微生物宿主中生产1-丁醇和异丁醇。共有的和共同未决的美国专利申请#11/741892和#11/741916公开了遗传工程的微生物宿主中生产2-丁醇。通过微生物宿主按照公开的方法可以从使用本发明方法生产的水解产物中发酵生产异丁醇、1-丁醇或2-丁醇。

[0071] 已经使用遗传修饰的大肠杆菌菌株作为用于乙醇生产的生物催化剂(Underwood等人,(2002)Appl. Environ. Microbiol. 68:6263-6272)。在US 2003/0162271 A1中描述了已经改善了乙醇生产的遗传修饰运动发酵单胞菌菌株。在共有的和共同未决的美国专利申请60/847813和60/847856中分别描述了用于乙醇生产的进一步工程化的运动发酵单胞菌乙醇生产菌株及其作用。通过运动发酵单胞菌按照公开的方法可以从使用本发明的方法生产的水解产物中发酵生产乙醇。在本文实施例13中,使用本发明的方法,用运动发酵单胞菌作为生物催化剂,将预处理的玉米芯生物质糖化成可发酵糖以用于乙醇生产。

[0072] 也可使用本发明的方法用于由生物质生产1,3-丙二醇。已经使用大肠杆菌重组菌株作为生物催化剂在发酵中生产1,3-丙二醇(US 6013494, US6514733)。如共有的和共同未决的美国专利申请#11/403087的实施例10所述,可通过大肠杆菌发酵使用本发明方法糖化制备的水解产物以生产1,3-丙二醇。

[0073] 通过大肠杆菌重组菌株(Zhou等人,(2003)Appl. Environ. Microbiol. 69:399-407)、芽孢杆菌属天然菌株(US20050250192)、和米根霉(Tay和Yang(2002)Biotechnol. Bioeng. 80:1-12)在发酵过程中生产乳酸。已经使用大肠杆菌重组菌株作

为生物催化剂在发酵中生产 1,3- 丙二醇 (US 6013494, US 6514733) 和己二酸 (Niu 等人, (2002)Biotechnol. Prog. 18 :201-211)。使用重组梭菌 (Cheryan 等人, (1997)Adv. Appl. Microbiol. 43 :1-33) 和新鉴定的酵母菌株 (Freer (2002)World J. Microbiol. Biotechnol. 18 :271-275) 通过发酵制备乙酸。在 US 6159738 中公开了通过重组大肠杆菌和其他细菌生产琥珀酸, 在 Lin 等人 ((2005)Metab. Eng. 7 :116-127) 中公开了通过突变型重组大肠杆菌生产琥珀酸。已经通过光滑球拟酵母突变株 (Li 等人, (2001)Appl. Microbiol. Technol. 55 :680-685) 和大肠杆菌突变株 (Yokota 等人, (1994)Biosci. Biotech. Biochem. 58 :2164-2167) 制备了丙酮酸。已经使用大肠杆菌重组菌株作为生物催化剂用于生产对羟基肉桂酸 (US20030170834) 和奎尼酸 (US20060003429)。

[0074] 已经在发酵过程中使用丙酸杆菌突变株生产丙酸 (Suwannakham 和 Yang (2005)Biotechnol. Bioeng. 91 :325-337), 并已经使用酪丁酸梭菌制备丁酸 (Wu 和 Yang (2003)Biotechnol. Bioeng. 82 :93-102)。已经通过发酵从梭菌属菌株 17cr1 (Janssen (2004)Arch. Microbiol. 182 :482-486) 的苏氨酸中制备了丙酸盐和丙醇。已经使用酵母样普鲁兰出芽短梗霉 (Anantassiadis 等人, (2005)Biotechnol. Bioeng. 91 :494-501) 通过曲霉菌曲霉突变株 (Singh 等人, (2001)Indian J. Exp. Biol. 39 :1136-43) 制备葡萄糖酸。通过氧化葡萄糖酸杆菌突变株制备 5- 酮基 -D- 葡萄糖酸 (Elfari 等人, (2005)Appl. Microbiol. Biotech. 66 :668-674), 通过土曲霉突变株制备衣康酸 (Reddy 和 Singh (2002)Bioresour. Technol. 85 :69-71), 通过曲霉菌曲霉突变株生产柠檬酸 (Ikram-Ul-Haq 等人, (2005)Bioresour. Technol. 96 :645-648), 并通过高里假丝酵母 FTI 20037 生产木糖醇 (Mussatto 和 Roberto (2003)J. Appl. Microbiol. 95 :331-337)。通过重组红串红球菌和富养罗尔斯通氏菌 (Gorenflo 等人, (2001)Biomacromolecules 2 :45-57) 生产包含 4- 羟基戊酸乙酯和显著量 3- 羟基丁酸 3- 羟基戊酸的生物聚酯。通过重组大肠杆菌 (Ui 等人, (2004)Lett. Appl. Microbiol. 39 :533-537) 制备 L-2,3- 丁二醇。

[0075] 可通过使用棒状杆菌、短杆菌、和沙雷氏菌的营养缺陷型菌株和氨基酸类似物抗性菌株发酵生产氨基酸。例如, 日本专利公布 56008596 描述了使用组氨酸类似物抗性菌株生产组氨酸, EP 136359 描述了使用重组菌株生产组氨酸。日本专利公布 47004505 和 51019037 描述了使用色氨酸类似物抗性菌株生产色氨酸。日本专利公布 47038995、51006237、54032070 描述了使用异亮氨酸类似物抗性菌株生产异亮氨酸。日本专利公布 56010035 描述了使用苯基丙氨酸类似物抗性菌株生产苯基丙氨酸。已经描述了使用需要苯基丙氨酸生长的酪氨酸抗性菌株 (Agr. Chem. Soc. Japan 50 (1) R79-R87 (1976), 或重组菌株 (EP263515, EP332234) 生产酪氨酸, 以及使用 L- 精氨酸类似物抗性菌株生产精氨酸 (Agr. Biol. Chem. (1972) 36 :1675-1684, 日本专利公布 54037235 和 57150381)。也通过在大肠杆菌菌株 ATCC 31882、31883、和 31884 中通过发酵生产苯基丙氨酸。US 6962805 描述了在重组棒状杆菌中生产谷氨酸。在 Okamoto 和 Ikeda (2000)J. Biosci. Bioeng. 89 :87-79 中描述了通过大肠杆菌突变株生产苏氨酸。通过百合棒状杆菌突变株生产甲硫氨酸 (Kumar 等人, (2005)Bioresour. Technol. 96 :287-294)。

[0076] 通过生物催化剂也已经制备出有用的肽、酶、和其他蛋白质 (例如参见 US6861237、US6777207、US6228630)。

[0077] 通过生物催化剂在发酵过程中制备的目标化学制品可使用多种本领域已知的方

法进行回收。可通过离心、过滤、微量过滤、和纳滤从其他发酵组分中分离产品。可通过离子交换、溶剂萃取、或电透析提取产品。可使用絮凝剂帮助产品分离。一个具体实例是可使用 ABE 发酵领域已知的方法从发酵培养基中分离生物生产的 1-丁醇（参见例如 Durre, Appl. Microbiol. Biotechnol. 49 :639-648(1998), Groot 等人, Process. Biochem. 27 : 61-75(1992), 以及本文参考）。例如, 可通过离心、过滤、透析等方法从发酵培养基中移除固体。然后, 可使用诸如蒸馏、共沸蒸馏、液液萃取、吸附、汽提、膜蒸发、或全蒸发的方法从发酵培养基中分离 1-丁醇。通过使反应混合物经过有机溶剂、蒸馏、和柱层析提取, 可以从发酵培养基中纯化 1,3-丙二醇（美国专利 5,356,812）。就此方法而言尤其好的一种有机溶剂是环己烷（美国专利 5,008,473）。氨基酸可以通过如离子交换树脂吸附和 / 或结晶的方法从发酵培养基中收集。

实施例

[0078] 一般方法和材料

[0079] 使用以下缩写：

[0080] “HPLC”是高效液相色谱,“C”是摄氏度,“kPa”是千帕斯卡,“m”是米,“mm”是毫米,“kW”是千瓦,“ μm ”是微米,“ μL ”是微升,“mL”是毫升,“L”是升,“min”是分钟,“mM”是毫摩尔,“cm”是厘米,“g”是克,“kg”是千克,“wt”是重量,“hr”是小时,“temp”或“T”是温度,“theoret”是理论,“pretreat”是预处理,“DWB”是生物质的干重,“ASME”是美国机械工程师学会 (American Society of Mechanical Engineers),“s.s.”是不锈钢,“in”或“”是英寸,“PSD”是粒度分布,“d-50”是其中 50% 的颗粒的累积体积小于此尺寸的粒径,“d-95”指其中 95% 的颗粒的累积体积小于此尺寸的粒径,“rpm”是每分钟转数。

[0081] 硫酸、氢氧化铵、乙酸、乙酰胺、酵母提取物、葡萄糖、木糖、山梨醇、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、磷酸和柠檬酸从 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 商购获得。

[0082] 测量物质中的纤维素和半纤维素

[0083] 生物质组合物通过任何一种本领域熟知的标准方法进行测量, 如 ASTM E1758-01 “Standard method for the determination of carbohydrates by HPLC”。

[0084] 测量糖、乙酰胺、乙酸、和乳酸含量

[0085] 通过 HPLC (Agilent Model 1100, Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 使用 Bio-Rad HPX-87P 和 Bio-Rad HPX-87H 柱 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 以及合适的保护柱来测量糖化液体中的可溶性糖（葡萄糖、纤维二糖、木糖、木二糖、半乳糖、阿拉伯糖、和甘露糖）乙酰胺、乙酸、和乳酸。

[0086] 单糖在水解产物中直接测量。通过离心机从水解产物中移除不溶性物质。如需要的话, 用硫酸将分离液体的 pH 调节至 5 至 6 以用于 Bio-Rad HPX-87P 柱和 1 至 3 以用于 Bio-Rad HPX-87H 柱。如需要的话稀释分离液体, 然后使其通过 $0.2\ \mu\text{m}$ 注射过滤器直接进入 HPLC 小瓶进行过滤。

[0087] 为了分析总溶解糖, 将 10mL 稀释样本置于耐压小瓶中, 加入 $349\ \mu\text{L}$ 75% H_2SO_4 。将小瓶加盖置于高压釜中一小时以把所有糖水解成单糖。冷却样本并用碳酸钠将它们的 pH 调节至必需 pH, 然后如上所述将样本过滤到 HPLC 小瓶中并用 HPLC 进行分析。

[0088] HPLC 运行条件如下：

- [0089] Biorad Aminex HPX-87P(用于碳水化合物)：
- [0090] 注射体积：10–50 μ L, 取决于浓度和检测器限制
- [0091] 流动相：HPLC 级水, 0.2 μ m, 过滤并脱气
- [0092] 流速：0.6 mL/ 分钟
- [0093] 柱温：80–85°C, 保护柱柱温 < 60°C
- [0094] 检测器温度：尽可能的接近主要柱柱温
- [0095] 检测器：折射指数
- [0096] 运行时间：35 分钟数据采集时间加上 15 分钟运行后时间（对后来的洗脱化合物进行可能的调节）
- [0097] Biorad Aminex HPX-87H(用于碳水化合物、乙酰胺、乙酸和乳酸)
- [0098] 注射体积：5–10 μ L, 取决于浓度和检测器限制
- [0099] 流动相：0.01N 硫酸, 0.2 μ m, 过滤并脱气
- [0100] 流速：0.6 mL/ 分钟
- [0101] 柱温：55°C
- [0102] 检测器温度：尽可能的接近柱温
- [0103] 检测器：折射指数
- [0104] 运行时间：25–75 分钟的数据采集时间
- [0105] 运行结束后, 根据标准曲线测定每个化合物在样本中的浓度。
- [0106] 粒度测量
- [0107] 取决于颗粒的粒度范围, 使用下文所述的一种或两种技术来测量预处理生物物质和水解产物样本的粒度分布 (PSD)。就大于 2mm 的粗颗粒而言, 使用湿筛技术。更小的颗粒通过 Beckman Coulter LS13320 仪进行分析。
- [0108] 在湿筛方法中, 将全部样本洗涤通过四个经选择的筛网, 这些筛网按大小顺序叠在一起, 最小的筛网在底部。该工序中使用的四个筛网具有 2300、2360、2800、3350 微米的筛孔。然后将每个筛网置于含水烧杯中, 水量足以覆盖筛网并移除遗留下来的细小颗粒。将筛网浸没并移除数次, 使得更细小的颗粒通过筛网进入液体。然后收集遗留下来的固体并干燥称重。将通过单一筛网的浆液注入到下一个筛网中。每个经选择的筛网均重复这一过程。
- [0109] Beckman Coulter LS13320(Beckman Coulter, Inc., Miami, FL) 是一种利用激光衍射技术, 使用湿模件来测量材料的 PSD 的仪器。LS13320 能测量介于 40 纳米至 2000 微米之间的颗粒。使用带夹套的烧杯, 用 Millipore DI 水稀释样本并用超声波探针超声处理 10 分钟, 超声处理时用冷循环水保持样本冷却。将稀释浆液以 50% 的再循环速度导入仪器再循环系统中, 直至它达到最佳模糊度。在再循环 30 分钟以达到完全混合和均匀状态后, 测量 PSD。重复测量两次以校验悬浮液稳定性和测量可重复性。将两次稳定测量的平均值报道为样本的 PSD。
- [0110] 将结果以 d-50 的形式报道, 它指其中 50% 的颗粒的累积体积小于此尺寸的粒径。同样的, d-95 指其中 95% 的颗粒的累积体积小于此尺寸的粒径。
- [0111] 粘度测量
- [0112] 使用 TA Instruments(New Castle, DE) AR-G2 流变仪在 StarchPasting Cell 中测

量水解产物的粘度。水解产物的流变能力不能在常规同心圆筒式、锥板式、或平板式和滚筒式粘度计中测量。Starch PastingCell 具有同心滚筒形状的样品杯和 bob 转子。然而, bob 转子是一种特殊转子, 将其设计为当进行测量时保持颗粒混合并阻止沉淀产生。将该仪器设计用于在恒定剪切速率下的温度斜坡。然而, 它也能被用于剪切力提高情况下的恒定温度斜坡, 剪切范围为 0.1 至 10s^{-1} , 精确度为 10% 。数据能通过 Herschel-Bulkley 模型进行分析 (Bird, R. B., 等人 Rev. Chem. Eng. (1983) 1:1-70), 或按线性比例以剪切速率对剪切应力绘制曲线图。就无屈服应力的流体而言, 该曲线通过原点。然而, 就有屈服应力的流体而言, 该曲线通过其中剪切速率为零的点, 此时剪切应力为正值, 将其认为是屈服应力。

[0113] 制备预处理玉米芯

[0114] 如共有的和共同未决的美国专利申请 #US20070031918A1 所述, 在其中一种以下反应器中制备这些生产运行中使用的玉米芯。

[0115] Jaygo 反应器

[0116] Jaygo 反应器是一种 130 升 (大约 51cm 直径 $\times$ 91cm 长度), 卧式桨叶型反应器 (Jaygo Manufacturing, Inc., Mahwah, NJ), Hastelloy® C-22 合金加工。该反应器配备有蒸汽夹套, 能够加热到大约 177°C (862kPa)。也可直接注入蒸汽以使生物质迅速达到预处理温度。调节并控制汽压以保持所需的预处理温度。

[0117] 蒸汽喷射反应器

[0118] 4 升蒸汽喷射反应器 (Autoclave Engineers, Erie, PA) 是一种蒸汽套反应器, 由长度为 102mm schedule 80 的 Hastelloy® 管组成, 用两个球形阀闭合。将附加电加热器置于反应器所有暴露的、不带夹套的表面上, 并将温度控制到预设温度。也可直接注入蒸汽以使生物质迅速达到预处理温度。调节并控制汽压以保持所需的预处理温度。将反应器底部颈缩至 51mm。所有预处理材料通过反应器底部的可置换模头放出, 并收集在一个尼龙 (Hotfill®) 0.21m^3 袋中, 该尼龙袋套在一个厚壁、带夹套的低温闪蒸槽中。

[0119] 预处理和酶水解反应器 (PEHR)

[0120] 该反应器公开于共有的和共同未决的美国专利申请公布 #US20070029252 中。

[0121] 9-L PEHR (产自 NREL, Golden, CO) 具有大约 $15\text{cm} \times 51\text{cm}$ 的不锈钢反应容器, 该容器带有用于导入加工反应物的喷枪。使用旋转接头将喷枪连接到容器一端覆盖件的端口上, 该容器具有用于容器连接的附加端口。四个导流板与容器壁等长, 垂直连接到壁上。当容器旋转时, 导流板和二十二个 $3.2\text{cm} \times 3.2\text{cm}$ 的陶瓷研磨介质滚筒 (E. R. Advanced Ceramics, East Palestine, OH)、在容器中的自由漂浮物一起对生物质和反应物施加机械混合, 促使反应物同化到生物质中。将 PEHReactor 置于提供一个旋转机构的 Bellco Cell-Production Roller Apparatus (Bellco Technology, Vineland, NJ) 上, 该反应器具有滚轴设备, 位于提供加热的温度控制舱中。可通过将外部来源连接到上盖中的喷枪连接端口上, 对反应容器施加真空和压力。

[0122] 大型筒式活塞反应器

[0123] 该反应器公开于共有的和共同未决的美国专利申请 CL3949 中。

[0124] 筒式活塞反应器由配备有水平取向活塞的 $5.1\text{cm} \times 68.6\text{cm}$ 的不锈钢圆筒组成。用四个 O 形环将活塞密封到筒上, 并在排放期间在活塞背面用氮气为活塞加压。68.6cm 的圆筒配备有八个多用途端口, 允许用真空、氨水注射、蒸汽注射、和插入热电偶的方法测量筒

内温度。反应器圆筒配备有蒸汽夹套用于圆筒的均匀加热。将反应器圆筒直接连接到垂直取向的 15.2cm×61cm 的不锈钢闪蒸槽上。通过锥形喷嘴和底座末端剪切阀排列从闪蒸槽上分离圆筒。末端阀剪切模具的直径是 3.5cm。锥形喷嘴和底座上的背压是可调的,大多数测试使用~138kPa(测量压力)的背压进行,使其进入 10.2cm 直径的空气圆筒中,该圆筒与末端剪切阀的锥形嘴相连。末端剪切阀门的锥形嘴能缩回最多 1.6cm,允许排放闪蒸槽中的颗粒。在末端剪切阀出口的弯管引导预处理固体向下进入闪蒸槽的底部,其中所述固体可通过打开槽底部的圆顶螺栓轻易移除。闪蒸槽的上部汽室凸缘加入一个具有被加工成与闪蒸槽轴线呈直角的狭槽的特殊出口,这引起释放的蒸汽沿着拐角路径进入排出装置中,有助于防止产生的生物质颗粒遗留和水滴进入排气冷凝器中。沿着闪蒸槽加上三个带状电加热器(设为 60℃)和绝缘物,使得热预处理的固体闪蒸到加热容器中,更好的模拟商业规模的方法。

[0125] 糖化设备

[0126] 糖化实验在三种类型系统中进行。

[0127] 一种系统是上文所述的预处理和酶水解反应器(Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis Reactor, PEHR),也称其为转瓶(Roller Bottle)。转瓶系统的可供选择的变型是体积为 1.3 加仑的陶瓷转瓶(US Stoneware, East Palestine, Ohio)。研磨介质和转动及加热系统与上文的 PEHR 所述的那些系统相同。在转瓶中的实验始终以成批模式进行。

[0128] 第二种系统由搅拌槽反应器组成,其中实验以成批模式或分批补料模式进行。该系统由带玻璃夹套的圆柱形反应容器组成,或者 500mL 或者 2000mL(LabGlass Number LG-8079C, LabGlass, Vineland, NJ),配有四颈反应容器盖(LG-8073)。安装一个搅拌器使其通过中央端口以搅拌反应器内容物。将一个玻璃冷凝器连接到其中一个颈上,并通过来自冷却器的再循环水使其保持 5℃冷却。其他两个端口用于加入反应物和温度及 pH 测量。通过再循环热水控制反应器温度,热水通过加热循环器水浴供应。在 2000mL 反应器中使用 Teflon®包被的锚式搅拌器,在 500mL 反应器中使用桨角度为 45 度的四桨玻璃搅拌器。

[0129] 第三个系统由 B. Braun Biotech International 型 10K 15- 升发酵罐反应器组成,将其用作糖化反应器。通过 BioStat ED DCU(数据控制单位)对其进行控制,并且关联控制模块包含:循环泵、酸泵和碱泵、螺线管阀门、用于温度控制的换热器、蒸汽供应、处理水、供气控制阀门、过滤和背压控制阀门、和排气过滤器。该反应器配备有两个 4.5 英寸(11.4cm)直径的三叶片高效 Lignitin A-310 叶轮。底部叶轮距反应器底部 3 英寸(7.6cm),上部叶轮距反应器底部 9 英寸(22.9cm)。该容器具有 7.5 英寸(19.1cm)的直径和 22 英寸(55.9cm)的最大高度。在分批补料糖化生产运行中使用四个可移除的导流板,每个导流板具有 5/8 英寸(1.6cm)的宽度和 19 英寸(48.3cm)的长度(从容器底部至顶部约 3 英寸(7.6cm))。在导流板边缘和容器壁之间有~1/8 英寸(0.3cm)的狭窄间隙,但此间隙通常不会截留生物质。在开始分批补料糖化时,浆液体积占容器底部约 5 英寸(12.7cm)深,此深度足以覆盖靠近容器底部的侧端口,该端口当回路充满糖化浆液时用于泵循环回路。该初始含量的深度在两个叶轮之间。在分批补料加料期间,浆液含量最终上升到覆盖顶部叶轮。

[0130] 对容器的顶板进行改变以加上 2 英寸(5.1cm)的清洁配件,用于加入生物质和加入酶。此外,将环绕回路的联动泵安装到反应器系统的顶部和底部端口中。泵循环回路用

具有 CF8M 阀体、316SS 球体、和 PTFE 底座的 1-1/2 英寸 (3.8cm) Valmicro 和 SVF 全端口球阀从发酵容器上分离。包括部分泵循环回路的 1-1/2 英寸 (3.8cm) 挠性软管由用 316SS 线材强化的铂金硬化硅胶内管和硅胶外护套构成, 具有 150 磅 / 英寸的工作压力, 250°C 的额定温度, 和清洁末端接头。将特氟隆流动观测指示器接到通过清洁配件的凸轮泵的入口中。将三通管接到泵循环回路中, 这允许直接注入蒸汽和排出冷凝物, 并允许分开消毒泵循环回路软管、APV 凸轮泵、特氟隆观察孔、球形阀和 V 形端口阀。泵循环回路中的所有组件在无菌装配成回路之前均需清洁分离并消毒。具体地讲, 部分打开球形阀, 清洁其底座后部, 然后在装配泵循环回路之前在高压釜中用蒸汽消毒球形阀的部分打开位置, 以最小化材料残留在底座和球体后部致使污染物在消毒后仍存活并污染发酵的几率。在连接了所有泵循环回路的组件后, 再次用蒸汽在适当位置对泵循环回路和组件进行灭菌。

[0131] 泵循环回路中央是 APV 凸轮泵。316SS 构建的 APV 凸轮泵 (M1/028/06 型) 由通过 Dodge Master XL 减速器连接到凸轮泵上的 3-hp Reliance 电动马达驱动。1755rpm 的马达 rpm 通过带连接到凸轮泵上的 5:1 齿轮减速器的 Dodge 直角减速器进行减速。Reliance 电动马达通过 Reliance SP500 变频调速进行控制。凸轮泵在 960rpm 下额定值为 85 磅 / 平方英寸。通过清洁配件将泵连接到外部泵循环回路上。当泵内部暴露在 30 磅 / 平方英寸的蒸汽压力时, 凸轮泵通过缓慢运行凸轮在适当的位置进行消毒。该泵正向运转, 允许将任何泵中形成的冷凝物泵送到位于泵压管道排放端的凝汽阀中。使用一种清洁型隔膜分离压力计监控消毒期间的蒸汽压力, 以及泵循环和 V 形端口阀剪切循环期间的泵压。

[0132] 将 V 形端口剪切阀连接到泵循环回路中, 位于凸轮泵下游, 恰好在将泵循环回路从发酵罐顶部端口分离的球形阀之前。Triac Controls “V”88 系列控制端口球形阀与 1-1/2 英寸 (3.8cm) 的球和球体依序排列, 在球中有一个 60° Vee 凹口。该阀阀体用额定值 1500 磅 / 平方英寸的 CF8MSS 与 316 SS 60° V 形端口球以及 PTFE 底座一起构建。使用带清洁连接器的 1-1/2 英寸 (3.8cm) 的螺纹管连接在 V 形端口阀阀体中的螺纹连接和泵循环回路。

[0133] 实施例 1

[0134] 在搅拌和不搅拌的情况下进行预处理生物质的糖化

[0135] 用研磨的预处理生物质在 50°C, pH = 5.5 条件下, 以约 20% DWB (生物质干重) 的加料进行两次生产 (#25 和 26)。在这些生产运行中使用的生物质是第三批粒径减小至约 1mm 的预处理玉米芯的共混物。在如上所述的蒸汽喷射反应器中, 通过用 4g NH₃ 每 100 克干重生物质和 145°C 蒸汽处理破碎玉米芯 20 分钟, 制备一批标记为 HT-4 的产品。在如上所述的筒式活塞反应器中, 通过用 6g NH₃ 每 100 克干重生物质和 145°C 蒸汽处理玉米芯 10 分钟, 制备另外两批产品。在用于糖化实验前, 将这三批预处理生物质的共混物在 Waring 商业共混机中研磨, 并通过 1.1mm 筛网进行筛分。

[0136] 如通用方法所述, 在 500mL 的玻璃夹套圆柱形反应容器中进行生产。底液由约 100g 去离子水和来自前一生产运行的约 100g 糖化水解产物组成, 它被加入有助于提高水解终产物的固体含量。在将温度提高到 50°C 后, 将 pH 调节至 5.5, 并加入约 180g 研磨预处理生物质。在生产运行 25 和 26 中的水解终产物中的生物质干重百分比分别为 20.97% 和 17.83%。各个反应器中加入的酶是 Spezyme® CP (Genencor International, Rochester, NY), 加入量为 10mg 蛋白质 / g 纤维素, 以及 Multifect® 木聚糖酶 (Genencor), 加入量为

4.1mg 蛋白质 /g 半纤维素。在生产运行 25 中,在成分初混 30 分钟后停止搅拌,然而在生产运行 26 中保持以 500rpm 进行搅拌。在糖化 17 小时后,按照通用方法所述的糖测量规程测定所得糖化液体的糖含量。表 1 给出了 17 小时后的糖释放。

[0137] 生产运行 25 显示甚至在无搅拌的情况下,酶仍能糖化纤维素和半纤维素。然而,在生产运行 26 中形成的糖量高于生产运行 25 中形成的糖量,这指示搅拌反应器中的糖化速率较高。在搅拌反应器中将葡聚糖糖化成总葡萄糖和葡萄糖单体的速率比在静止反应器中的速率高约 50%。

[0138] 表 1:在加入酶后 17 小时形成的多种糖

[0139] 生产运行 搅拌器 DWB 总葡萄糖, 葡萄糖 总木糖, 木糖单体,

[0140] 编号	rpm	%	g/L	单体, g/L	g/L	g/L
[0141] 25	0	20.97	30.08	16.03	33.54	9.78
[0142] 26	500	17.83	43.99	23.69	39.13	9.39

[0143] 该实施例清楚显示更快和更高性价比的糖化方法将需要在反应器混合物中连续搅拌固体。

[0144] 在糖化期间,将不溶性纤维素和半纤维素转化成水溶性葡萄糖、木糖和其他低聚物。随着反应进行,不溶性固体部分减少而液体量增加。此外,按通用方法中的方法测量的粒径分布也减小。给料中的粒度中值 (d-50) 从 614 微米减小到生产运行 25 的 309 微米,以及生产运行 26 的 113 微米,这再次证实搅拌提高了固体的溶解速率。

[0145] 实施例 2

[0146] 具有不同初始尺寸的预处理生物质的糖化

[0147] 用研磨成不同尺寸的预处理生物质进行生产运行 50 至 52 和 64 至 65。从碾碎的玉米芯中制备预处理生物质,所述玉米芯用锤磨机碾碎并通过 1/2 英寸的筛网进行筛分。它们在 Jaygo 反应器中,如通用方法所述,用 4g NH₃ 每 100 克干重生物质和 145℃ 蒸汽处理 20 分钟。将此预处理的玉米芯生物质标记为 Jaygo-10。在糖化之前,在多个步骤中进一步磨碎预处理的玉米芯并通过合适尺寸的筛网进行筛分以制备用于每个糖化生产运行的生物质。下表 2 中显示了用于制备每个生产运行的样本的筛网尺寸。

[0148] 生产运行 50 和 51 在 2-L 反应器中进行,生产运行 52、64 和 65 在 0.5L 反应器中进行。在所有情况下,用去离子水作为反应底液。加入预处理生物质以在生产运行 50 至 52 中制备约 12% DWB 的水解产物,并在生产运行 64 和 65 中制备约 21% DWB 的水解产物。升温至 50℃,并用磷酸调节 pH 至 5.5。在生产运行 50 至 52 中,加入 Spezyme® CP,加入量为 40mg 蛋白质 /g 纤维素,以及 Multifect® 木聚糖酶,加入量为 15.6mg/g 半纤维素。在生产运行 64 和 65 中,加入 Spezyme® CP,加入量为 35.4mg 蛋白质 /g 纤维素,以及 Multifect® 木聚糖酶,加入量为 14.4mg/g 半纤维素。以 300 至 500rpm 的速度连续搅拌反应器以保持颗粒悬浮和良好的搅拌状态。72 小时后,按照通用方法中所述的糖测量规程测量所得糖化液体的糖含量,测量结果以理论收率百分比的形式显示于表 2 中。

[0149] 如表 2 所示,在预处理生物质和糖化过程中形成的糖收率之间存在着清楚的联系,初始尺寸更小的玉米芯颗粒产生的糖量更高。

[0150] 表 2:加入酶 72 小时后的理论收率百分比

[0151]

生产运行 编号	初始粒度	葡萄糖单体	总葡萄糖	木糖单体	总木糖
生产运行 50	< 10mm	38.1	41.4	20.6	35.9
生产运行 51	< 6.2mm	58.3	64.6	34.4	60.3
生产运行 52	< 1.12mm	78.8	86.2	52.4	76.6
生产运行 64	< 1.12mm	80.5	88.8	47.7	84.7
生产运行 65	< 0.5mm	77.0	95.7	46.8	90.1

[0152] 生产运行 64 是生产运行 52 的平行测定,显示了生产运行的可重复性。

[0153] 每个生产运行测定了其 72 小时后的水解产物的粒度分布,结果见表 3。初始粒度更小的生产运行其水解产物的颗粒更小。这些结果证实减小粒度有利于糖化,显示用更小的颗粒能获得更高的收率,使得生产获得了 90%至 95%的糖化收率以及 d-95 小于 75 微米的最终粒度。

[0154] 表 3:水解产物的粒度分布

[0155]

生产运行 编号	初始粒度	水解产物 d-50 微米	水解产物 d-95 微米
生产运行 50	< 10mm	29.7	484
生产运行 51	< 6.2mm	116	560
生产运行 52	< 1.12mm	17.1	136
生产运行 64	< 1.12mm	20.3	158
生产运行 65	< 0.5mm	12.9	74.7

[0156] 这些实验显示糖化速率是一种传质控制的现象。因此,如果将水解产物中的颗粒减小到小于约 75 微米,在快速条件下能获得超过 90%的高收率。

[0157] 实施例 3

[0158] 在酶催化糖化期间的生物质液化

[0159] 如上所述,当糖化过程继续进行时生产运行 52 可用于测定粒度分布的变化和生物质的液化。在 6 小时和 72 小时后,测量进行初始研磨预处理的玉米芯生物质和水解产物的粒度分布。

[0160] 表 4:在糖化 - 生产运行 52 期间的粒度分布减小

	生产运行时间	水解产物 d-50 微米	水解产物 d-95 微米
[0161]	0 小时	177.5	1020.8
	6 小时	38.9	163.5
	72 小时	17.1	136

[0162] 该结果清楚地指明酶催化糖化减小了固体的粒度分布,因此引起固体液化,使得能将附加固体加入到水解产物中。

[0163] 实施例 4

[0164] 测量固体加入限度

[0165] 当糖化水解产物中有高浓度的糖用于发酵时,木质纤维素至乙醇方法的经济意义重大。这需要糖化器在高固体浓度的情况下进行。运行生产运行 43 至 45 以测定糖化反应器中加入的固体运行限度。

[0166] 在 500mL 反应器中用预处理玉米芯(研磨并通过 1.12mm 筛网筛分)运行生产运行 43。将经研磨的玉米芯增量加入反应器中的 200g 水底液中并进行搅拌。在初始速度为 100rpm 的每个搅拌速度下,加入生物质以目测其中生物质固体将停滞并停止与整个流体一起移动的点。加入约 13.6% DWB 在 100rpm 搅拌速度下引起停滞。在更高的搅拌速度 200、300 和 500rpm 下继续该方法,分别在 13.8%、15.5%、和 15.7% DWB 时导致停滞。最初,所有生物质分散在水中并且搅拌器搅拌良好。在 100rpm 条件下,随着生物质干重百分比到达约 13.8%,一部分固体从搅拌混合物中分离出来并在反应器底部积聚。通过提高搅拌器转速,可加入更多生物质并保持混合状态。然而,随着搅拌速度达到 500rpm,不发生停滞情况下能加入的% DWB 达到约 15.7%的平台状态,如图 1 所示。

[0167] 在生产运行 46 中,用经研磨并通过 6.2mm 筛网筛分的颗粒重复该生物质加入容量测试。该粗糙固体的表现与生产运行 43 的较小颗粒相似,当% DWB 提高时开始从混合物质中分离出来并停滞在反应器底部。如图 1 所示,粗糙颗粒比较小颗粒更易于停滞。就粗细均有的颗粒而言,15.7% DWB 显示是固体加入的限度。该固体百分比是此实验中使用的反应器和叶轮形状的限制度,不同的系统它的值也将不同。然而,在所有形状和叶轮排列方式中,期望某一固体百分比成为良好混合的限制因子。

[0168] 该实施例显示在分批模式生产中,其中在分批生产开始时加入全部生物质,存在约 16%的生物质干重百分比限度,高于此限度时将开始停滞。虽然实施例 1 显示甚至在不搅拌的混合物中,酶催化糖化能缓慢进行,但是在大规模的工业生产中,则无法将生物质和酶轻易混合以开始较慢的糖化。因此,大约 16% DWB 成为分批生产的限度。此外,在大型槽式反应器中,如果运行生物质停滞,将其重新悬浮到浆液中需要大量动力。

[0169] 实施例 5

[0170] 分批补料糖化的 pH 控制

[0171] 实施例 4 证明在高于约 16%的 DWB 下,部分生物质从浆液中分离并停滞。在混合不充分的情况下,不能调节预处理固体的 pH。甚至因为混合浆液变得困难, pH 的局部变化可能损害酶催化糖化。虽然每个酶的最佳 pH 范围可能是不同的,大多数糖化酶具有 5 至 5.5 的最佳 pH。酶需要严格的 pH 控制以发挥有效功能。

[0172] 进行生产运行 96 至 99 以测定酶对 pH 变化的敏感性。这些生产运行命名为

Jaygo-10 的预处理玉米芯进行,该预处理玉米芯在如上所述的 Jaygo 反应器中,通过用 4g NH_3 每 100 克干重生物质和 145℃ 蒸汽处理破碎玉米芯 20 分钟进行制备。在糖化前,进一步在锤磨机中研磨预处理的生物质并通过 1.12mm 的筛网进行筛分。生产运行以分批模式在 500mL 反应器中以 % DWB 13.1 至 14.5% 进行,因此目测的混合总是均匀的。所有四个生产运行均在 $\text{pH} = 5.5$ 和 50℃ 条件下开始,并按 35.4mg/g 纤维素加入 Spezyme®CP,按 14.4mg/g 半纤维素加入 Multifect®木聚糖酶。在每个生产运行开始两小时后,将 pH 调节至一个新值并保持一小时。将生产运行 97 的 pH 保持在 5.5,但将生产运行 96、98、和 99 的 pH 分别调节至 4.0、6.5 和 7.5。在一小时后,将 pH 再调节至其初始值 5.5 并继续运行 48 小时。表 5 显示在 48 小时时不同糖的收率。该结果清楚表明酶活性对 pH 波动敏感,其中葡萄糖和木糖单体生产最敏感。

[0173] 表 5:一小时 pH 改变对收率的效应

生产运行 编号	pH 改变	糖收率百分比			
		葡萄糖单体	总葡萄糖	木糖单体	总木糖
[0174] 96	4.0	49.6	60.3	33.2	62.1
97	5.5	67.8	81.5	41.8	75.5
98	6.5	58.6	69.5	36.4	66.9
99	7.5	43.2	54.0	26.0	64.1

[0175] 该实施例证实为了将 pH 保持在糖化高固体含量水解产物的最佳范围,需要进行充分混合。

[0176] 实施例 6

[0177] 提高的分批补料糖化的固体加入量

[0178] 生产运行 43 (如实施例 4 所述),在到达其流动性的临界固体含量 15.7% DWB 后,在 $\text{pH} = 5.5$ 和 50℃ 条件下,按 35.4mg/g 纤维素加入 Spezyme®CP 和按 14.4mg/g 半纤维素加入 Multifect®木聚糖酶,继续进行生产和糖化。如图 2 所示,在两小时内混合物再次变成流体,并且所有固体开始在反应器中搅拌。将研磨的更碎的预处理玉米芯生物质 ($< 1.12\text{mm}$) 加到反应器内容物中,它将反应器中的总 % DWB 提高到固体再次分离前的 19%。反应器内容物中的固体是基于加入作为反应器内容物终体积中固体材料百分比。18 小时后,再次搅拌反应器内容物并加入更多的 $< 1.12\text{mm}$ 的玉米芯生物质以将总固体浓度变为 23.7%,同时反应器内容物保持搅拌状态。因此在酶催化糖化期间,以半间歇给料模式或分批补料模式给料预处理的和磨碎的玉米芯生物质使得糖化反应中的固体含量提高是可能的。

[0179] 生产运行 44 使用与生产运行 43 相同的条件进行,不同的是加入的酶比生产运行 43 中加入的酶少 10 倍。如图 2 所示,酶催化糖化再次导致固体液化,允许以分批补料模式加入更多固体到反应器内容物中,同时保持搅拌状态。然而,在低加入酶量条件下,液化速率较慢,因此固体加入速率也较慢,使得在 0.1 倍的加入酶量条件下,当保持反应器内容物搅拌状态时,需要 48 小时使得加入固体的固体百分比提高到 24%。

[0180] 该实施例清楚地指明将酶催化糖化、合适的混合以及分批补料方法组合到一起允许当所有固体保持搅拌状态时,在糖化器中达到高生物质浓度 (% DWB)。

[0181] 实施例 7**[0182] 在高生物质固体水解产物中的粘度和屈服应力**

[0183] 水解产物是非牛顿流体,并且其粘度随生物质加入量、糖化程度、施加剪切力、以及温度发生变化。生产运行 149 至 152 用不同水平的 % DWB 进行,并且在不同时间采集样本以测量水解产物的流变学特性。这些生产运行在 2 升反应器中用预处理玉米芯进行。该破碎玉米芯在如上所述的 Jaygo 反应器中,用 6g NH₃ 每 100 克干重生物质和 145℃ 蒸汽预处理 20 分钟,将样本命名为 Jaygo-9。在糖化器中使用前,将预处理的玉米芯进一步研磨成小于 1.12mm 的颗粒。糖化在 pH = 5.5 和 50℃ 条件下开始,并按 35mg 蛋白质 /g 纤维素加入 Spezyme® CP,按 15mg 蛋白质 /g 半纤维素加入 Multifect® 木聚糖酶。

[0184] 采集将酶加入 22%、26%、和 30% 干重的生物质 30 小时后,以及将酶加入 26% 的样本 24 小时后的水解产物样本,如通用方法所述用改变剪切速率测量其粘度。图 3 所示数据清楚地指明水解产物是剪切致稀非牛顿流体。图 3 也显示粘度很大程度上取决于水解产物的 % DWB,当 % DWB 从 22% 提高到 30% 时粘度发生两个数量级的变化,

[0185] 就 26% 的固体样本而言,在加入酶后 6、24、48、和 72 小时取样,用改变剪切速率测量它们的粘度。图 4 给出的结果显示糖化时间或糖化程度对粘度的效应。具有 26% 固体的水解产物甚至在糖化 6 小时后仍具有非常高的粘度,并且当酶糖化纤维素和半纤维素时其粘度随时间持续降低,水解产物中不溶性固体的体积也降低。

[0186] 使用 Herschel-Bulkley 模型对这些数据进行进一步分析,结果显示具有 26% 固体的水解产物在糖化的首个 24 小时期间具有屈服应力。表 6 显示 Herschel-Bulkley 模型参数和用 σ_{HB} , 特定指示的屈服应力。实验上,通过停滞特定地靠近反应器壁的反应器内容物观察屈服应力。

[0187] 表 6 :26% DWB 的水解产物的 Herschel-Bulkley 参数

[0188]
$$\sigma = \sigma_{HB} + K_{HB} \dot{\gamma}^q$$

[0189]

样本	固体	反应时间	σ_{HB} (Pa)	K_{HB} (Pa)	q (-)
152-1	26%	6h	3.4	1.17	0.066
152-2	26%	24h	0.52	1.02	0.260
152-4	26%	48h	0.0	0.687	0.248
152-6	26%	72h	0.0	0.425	0.256

[0190] 实施例 8**[0191] 超高生物质固体糖化**

[0192] 进行生产运行 63 以证明可以用经济型方法以比当前设想的生物质浓度高得多的浓度进行糖化。如上文实施例 2 所述,收到的命名为 Jaygo-10 的预处理玉米芯包含约 36% 的 DWB。在研磨成 1.12mm 的尺寸后,将它们风干以将含水量减少到小于 11%。该材料以分批补料模式在 500mL 反应器中,在 pH = 5.5 和 50℃ 条件下,按 35.4mg 蛋白质 /g 纤维素加

入 Spezyme®CP 并按 14.4mg 蛋白质/g 半纤维素加入 Multifect®木聚糖酶进行糖化。将最初的 44.55g 预处理生物质（约 36% 的生产运行总固体）加入到 170g 水底液中并以 500rpm 开始搅拌。在调节 pH 后，加入该量的预处理生物质所需的酶。该生物质处于停滞临界状态，并且在靠近反应器壁处的搅拌非常缓慢，但在靠近搅拌器的中心搅拌迅速。在约 30 分钟后，一些生物质已经液化，使得反应器中的生物质（包括靠近反应器壁的生物质）达到相当好的搅拌状态。此时加入高于约 17% 总预处理生物质，调节 pH 并加入相应量的酶，使得反应器达到停滞临界状态。在 1 小时 15 分钟后，反应器内容物搅拌良好。加入附加的 17% 预处理生物质，同时加入相应量的酸和酶。在另一个 3 小时 15 分钟后，反应器搅拌相当好，然后加入剩余的 30% 总生物质。在调节 pH 并加入酶后，反应器内容物大部分停滞。在 16 小时后，缓慢搅拌反应器内容物，这主要是由于混合物的高粘度。在最初加入酶后，该生产运行持续共 77 小时。

[0193] 该分批补料方法允许制备 38.09% DWB 的水解产物，具有 55% 的葡萄糖收率和 58% 的木糖收率。该水解产物在总计 207g/L 的可溶性糖中包含 108g/L 的葡萄糖及其低聚物，以及 99g/L 的木糖及其低聚物。在分批补料分批模式下，在总计 5 小时中加入经研磨和预处理的生物质以及酶。在该实验室测试中，仅仅最后加入的生物质引起反应器中停滞约 10 至 16 小时，如果最后的固体加料在 10 至 16 小时内以两次递增方式完成，则能够轻易地避免该问题。在这些高固体加料中，水解产物的粘度变得相当高并且引起流体处理问题。

[0194] 实施例 9

[0195] 就地和外部碾磨对糖化的效应

[0196] 上文实施例 1 至 8 证明需要进行粒度减小以获得高糖化收率和高 % DWB 加料。在这些实施例中使用的生物质在开始糖化之前已经经过研磨。通过就地碾磨减小粒度就大规模生产而言将是更经济的。设想了一种商业方法，该方法具有在回路内带有内嵌式研磨机的再循环回路。为了测试不同类型研磨机的功效，使用不同的研磨排列方式进行生产运行 115F、116F、117F、118F 和 125F。

[0197] 在这些生产运行中使用的预处理生物质是按固体干重计 40% 的玉米芯和 60% 的纤维的混合物。纤维指覆盖玉米谷粒的外层，也称为玉米外壳。它是一种类似玉米芯的木质纤维素生物质，它附加地包含淀粉并能被用于糖化生产。如通用方法所述，该 40/60 的玉米芯 / 纤维混合物在 Jaygo 反应器中，用 6g NH₃ 每 100 克干重生物质和 145℃ 蒸汽预处理 20 分钟。将此预处理的玉米芯 / 纤维混合物标记为 DTM-17。在糖化前，进一步在锤磨机中研磨预处理的生物质并通过 1.12mm 的筛网进行筛分。

[0198] 该材料以分批补料模式在 500mL 反应器中，在 pH = 5.5 和 50℃ 条件下进行糖化。该生物质经 6 小时分三批装入反应器。这些生产运行的 % DWB 不同，从约 23% 至约 28%。在分批补料模式下也加入酶，按 12.9mg/g 纤维素加入 Spezyme®CP，按 15.0mg/g 半纤维素加入 Multifect®木聚糖酶，以及按 1mg/g 淀粉加入 Spirizyme®B4U (Novozymes North America, Franklinton, NC)。

[0199] 生产运行 115F 是一个参考生产运行，在糖化期间不进行附加的粒度减小。整个生产运行中始终用上述的标准搅拌器，在 500rpm 下搅拌反应器内容物。所有五个生产运行 115F、116F、117F、118F 和 125F 共进行 72 小时。在生产运行 116F 中，使用手持式转子定子粉碎机 (Ultra-TurraxT25 S-1 with T-18 head, IKA Works, Inc., Wilmington, NC 28405)

在 20, 500rpm 下就地碾碎生物质。在加入第一酶后 25、26.5、45、47、和 49 小时进行就地碾磨。转子定子粉碎机每次运行 10 分钟, 进行间歇停机以防止转子定子粉碎机或水解产物的任何过热情况。在生产运行 117F 中, 将反应器内容物转移到瓦林混碎机中, 冷却至约 30℃, 每次混碎机以 2 分钟的间歇运行 10 分钟。然后将水解产物返送回反应器中继续糖化。该方法在加入第一酶后 22、26、46、50、和 69 小时进行五次。在生产运行 118F 中, 重复生产运行 117F 的方法, 不同的是该混碎机每次运行 30 分钟。该方法在加入第一酶后 23、27、47、51、和 70 小时进行五次。在生产运行 125F 中, 如上所述用高剪切分散器 (R1300 Dissolver Stirrer, IKA Works, Inc., Wilmington, NC 28405) 置换常规搅拌器, 该搅拌器在间歇期间以 500rpm 运行, 在实验期间搅拌速度增加到 900rpm。

[0200] 糖化收率和粒度减小结果在表 7 中显示。在参考糖化生产运行 115F 中, 未进行任何附加碾磨, 给料生物质的粒度分布 (PSD) 减小了约三倍。在瓦林混碎机中的碾磨显示 d-50 和 d-95 进一步减小, 但是仅仅轻微改善了糖化收率。然而, 使用转子定子粉碎机或用高剪切分散器置换常规搅拌器进一步减小了粒度分布并提高了糖化收率。虽然该剪切分散器可能不是大规模生产的可行性选项, 但置于外循环回路中的转子定子粉碎机是用于粒度减小的适宜低成本选项。

[0201] 表 7: 不同碾磨方法对 PSD 和收率的效应

[0202]

生产运行 编号	搅拌	粒度, 微米		百分比收率			
		d-50	d-95	葡萄糖单体	总葡萄糖	木糖单体	总木糖
DTM-17, 研磨至 1.12mm	----	71.3	494.0	----	----	----	----
115F	无附加碾磨	27.8	175.3	54.0	70.0	28.2	84.9
117F	瓦林混碎机, 50 分钟	20.9	47.7	55.9	71.8	27.3	85.6
118F	瓦林混碎机, 2 小时 30 分钟	17.0	73.8 ^a	54.7	72.1	27.1	85.5
125F	高剪切分散器	8.0	30.8	64.2	80.1	33.9	93.6
116F	转子定子粉碎 机, 10 分钟	21.0	42.9	63.7	83.7	33.8	103.2

[0203] ^a 该数字被认为是取样错误, d-50 数据提供精确数字。

[0204] 实施例 10

[0205] 在外部回路研磨机中的粒度减小糖化

[0206] 生产运行 163 通过将水解产物移出糖化器并在带内嵌式 1/2hp 转子定子研磨机 (Charles Ross 和 Son Co., Hauppauge, NY 11788) 中回路反应器中研磨进行。玉米芯在如上所述的 Jaygo 反应器中, 用 4g NH₃ 每 100 克干重生物质和 145℃ 蒸汽预处理 20 分钟, 标记为 Jaygo-9。将预处理的生物质研磨成 1.12mm 大小并用于测试。该材料在 500mL 反应器中, 在 pH = 5.5 和 50℃ 条件下进行糖化。将生物质一批装入, 用刮刀混合, 调节 pH, 按 20.0mg/g 纤维素加入 Spezyme® CP 并按 10.0mg/g 半纤维素加入 Multifect® 木聚糖酶。加

入生物质的 % DWB 为 25.76%。该混合物非常粘稠,仅在靠近搅拌器的中心进行搅拌。

[0207] 在固体浸泡在酶中二十小时以部分糖化后,将反应器内容物转移到与内嵌式研磨机相连的槽中。研磨机以 3 分钟间歇在 3600rpm 下运行两次,共六分钟。将水解产物返送到反应器中并在糖化条件下运行附加的 4 小时。表 8 显示该碾磨步骤之前和 4 小时后的水解产物糖分析结果。外部碾磨显示了对糖化的较强积极效果,具体地讲显示了对葡萄糖单体和总葡萄糖的积极效果,它们分别提高了 61% 和 44%。

[0208] 表 8:外部转子定子碾磨对糖化的效应

[0209]

	从加入酶的时间 小时	糖滴定度 g/L			
		葡萄糖单体	总葡萄糖	木糖单体	总木糖
碾磨前	20	29.73	45.02	29.32	69.88
碾磨后和 4 小时糖化	25	47.91	64.96	34.51	73.03

[0210] 实施例 11

[0211] 酶加入方法对糖化的效应

[0212] 以分批补料模式进行的糖化允许优化多种酶的加入方式以发现最佳的酶加入方法并获得最高的糖化收率。生产运行 164 至 167 作为一组测试用于分析该优化方法。这些生产运行在 500mL 反应器中用预处理玉米芯进行。该破碎玉米芯在如上所述的 Jaygo 反应器中,用 4g NH₃ 每 100 克干重生物质和 145℃ 蒸汽预处理 20 分钟,将其命名为 Jaygo-9。在糖化器中使用前,将预处理的玉米芯进一步研磨成小于 1.12mm 的颗粒。糖化在 pH = 5.5 和 50℃ 条件下开始,并按 20mg 蛋白质 /g 纤维素加入 Spezyme® CP,按 10mg 蛋白质 /g 半纤维素加入 Multifect® 木聚糖酶。使用表 9 列出的不同方法加入酶。在糖化第 54 或第 142 小时采样并进行糖分析。表 9 和 10 给出的结果显示在开始阶段加入纤维素酶 (Spezyme® CP) 和半纤维素酶 (Multifect® Xylanase) 有利于纤维素的糖化,这表明发生协同效应。然而,当首先加入半纤维素酶,然后加入纤维素酶时,会改善木糖单体的形成。该实施例仅仅显示优化的潜力,并不一定提出一种优化的酶加入方法。

[0213] 表 9:酶加入方法对第 54 小时的糖化收率的效应

[0214]

生产运行 编号	酶加入	第 54 小时的收率 克/升			
		葡萄糖单体	总葡萄糖	木糖单体	总木糖
164	在 $t = 0$ 时的所有酶	51.5	65.7	37.8	73.0
165	$t = 0$ 时的 Spezyme [®] CP, $t = 22$ 小时时的 Multifect [®] 木聚糖酶	41.8	54.0	34.5	70.6
166	$t = 0$ 时的 Multifect [®] 木 聚糖酶, $t = 22$ 小时时的 Spezyme [®] CP	39.2	41.8	38.9	61.4
167	$t = 0$ 的 1/2 酶, $t = 22$ 小时的 1/2 酶	36.5	49.0	34.5	68.4

[0215] 表 10: 酶加入方法对第 142 小时的糖化收率的效应

[0216]

生产运行 编号	酶加入	第 142 小时的收率 g/L			
		葡萄糖单 体	总葡萄糖	木糖单体	总木糖
164	在 $t = 0$ 时的所有酶	67.9	79.1	45.5	78.6
165	$t = 0$ 时的 Spezyme [®] CP, t $= 22$ 小时时的 Multifect [®] 木 聚糖酶	61.7	73.5	43.2	77.5
166	$t = 0$ 时的 Multifect [®] 木聚 糖酶, $t = 22$ 小时时的 Spezyme-CP	64.9	72.7	47.4	78.2
167	$t = 0$ 的 1/2 酶 $t = 22$ 小时的 1/2 酶	64.1	72.3	48.5	78.6

[0217] 实施例 12

[0218] 糖化期间的大规模外部碾磨

[0219] 将具有外部碾磨回路的糖化按比例扩大到 15 升反应器, 使用凸轮泵和剪切阀作为减小生物质粒度的方法, 用 SOT-06-B 表示运行周期。

[0220] 破碎玉米芯在如上所述的筒式活塞反应器中, 用 6g NH_3 每 100 克干重生物质和 145°C 蒸汽预处理 10 分钟。进行总共 17 次此类预处理。注入来自四次预处理的预处理玉米芯用于糖化以提供用于分批补料糖化的初始底液。注入来自剩余 13 次生产运行的预处理玉米芯用于分批补料糖化。

[0221] 为了开始分批补料糖化, 在如通用方法所述的分批补料糖化反应器中首先加入底液水解产物以装满反应器第一叶轮的底部。该底液水解产物通过在 2.8-L 摇瓶中糖化预处理玉米芯进行制备。这些摇瓶装入 465g 预处理固体, 1000mL 去离子水, 以及 28.4mg Spezyme[®] CP/g 纤维素和 4.2mg 活性蛋白 /g 纤维素的半纤维素酶聚生体 (Diversa, now Verenium Corp., Cambridge, MA), 该酶聚生体包括 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 β -木糖苷酶和阿拉伯糖苷酶。在加入酶之前, 用 8.5% H_3PO_4 将 pH 调节至 5。将摇瓶保持在 50°C 并在

旋转振荡器中以 150rpm 振荡 48 小时,此时将水解产物装入分批补料反应器中。

[0222] 一旦加入了底液水解产物,将预处理生物质与氨的混合物(~700g)的等分试样加入反应器中。加入 8.5% H_3PO_4 将 pH 调节至设定值 5.5。一旦将 pH 再调节至设定值,加入 28.4mg Spezyme®CP/g 纤维素和 4.2mg 活性蛋白/g 纤维素的半纤维素酶聚生体(Diversa),该酶聚生体包括 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 β -木糖苷酶和阿拉伯糖苷酶。在 $t = 4, 8, 12, 22, 26, 30$ 和 34 小时加入相同预处理的生物质与氨的混合物的附加等分试样、Spezyme®CP 纤维素酶和半纤维素酶酶聚生体。在加入每个生物质后加入 8.5% H_3PO_4 ,调节 pH 至设定值 5.5。一般在加入酶约 1 小时后开启泵循环回路,并运行约 1 小时直至在第 22 小时加入固体。在 26 小时和 30 小时加料后,在加入酶后约 50 分钟开启泵并运行 30 分钟。在 34 小时加料后,在加入酶后约~3 小时开启泵并运行 30 分钟。泵也在 $t = 29, 33, 47$ 和 49 小时运行 30 分钟。总糖化时间为 120 小时。此时水解产物包含~60g/L 葡萄糖单体、25g/L 木糖单体和 10g/L 乙酸。水解产物中的% DWB 为 24.7%,葡萄糖单体、总葡萄糖、木糖单体、和总木糖的收率分别为 60.9%、84.7%、28.2%、和 76.6%。

[0223] 总之,实施例 12 证明在循环回路中配有内嵌式研磨机的槽式反应器中,糖化具有高收率。

[0224] 实施例 13

[0225] 使用来自移除液体中抑制剂的预处理生物质的糖化水解产物生产乙醇

[0226] 将蒸汽加到圆筒夹套中将大型筒式活塞反应器的圆筒(如通用方法所述)预热到~130°C。用带状加热器将闪蒸接收器预热到~60°C。如下所述制备破碎的玉米芯。用颚间距为大约 0.95cm 的颚式粉碎机(2.2kW 马达)处理完整玉米芯,然后用破碎机(1.5kW 马达, Franklin Miller Inc., Livingston, NJ)处理,随后用配备有 1.9cm 美国标准筛网的 Sweco 筛网进行筛分,使完整玉米芯破碎成更小的块。用手将这些处理后的玉米芯(175g, 基于干重)装入大型筒式活塞反应器中,置于移除活塞的反应器末端。把活塞放回原处以堵上末端。将反应容器和闪蒸接收器抽真空以减压至<10kPa,将稀释氢氧化铵溶液注入到反应器中,使氨水浓度为 6g/100g 生物质干重,生物质干重浓度为 45g/100g 总生物质氨水混合物。一旦注入氨,将蒸汽注入反应器中以升温至 145°C。通过监控温度以及如需要的话注入蒸汽,使混合物保持该温度 10 分钟,然后开启活塞将其排入预热闪蒸槽中。将闪蒸槽抽真空直至闪蒸接收器达到~59°C。当从闪蒸接收器收获产品时,将游离液体从预处理固体中分离出来,并且不把它们再加回去用于糖化。进行总共 17 次此类预处理。注入来自 4 次预处理的预处理玉米芯用于糖化以提供用于分批补料糖化的初始水解产物。注入来自剩余 13 次生产运行的预处理玉米芯用于分批补料糖化。

[0227] 为了开始分批补料糖化,在如通用方法所述的分批补料糖化反应器中首先加入水解产物以装满反应器第一叶轮的底部。该水解产物通过在 2.8-L 摇瓶中糖化预处理玉米芯进行制备。这些摇瓶装入 465g 预处理固体,1000mL 去离子水,以及 28.4mg Spezyme®CP/g 纤维素和 4.2mg 活性蛋白/g 纤维素的半纤维素酶聚生体(Diversa, San Diego, CA),该酶聚生体包括 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 β -木糖苷酶和阿拉伯糖苷酶。在加入酶之前,用 8.5% H_3PO_4 将 pH 调节至 5。将摇瓶保持在 50°C 并在旋转振荡器中以 150rpm 振荡 48 小时,此时将水解产物装入分批补料反应器中。

[0228] 一旦加入了初始水解产物,将预处理生物质与氨的混合物(~700g)的第一等

分试样加入反应器中。加入 8.5% H_3PO_4 将 pH 保持设定值 5.5。一旦将 pH 再调节至设定值,加入 28.4mg Spezyme®CP/g 纤维素和 4.2mg 活性蛋白 /g 纤维素的半纤维素酶聚生体 (Diversa),该酶聚生体包括 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 β -木糖苷酶和阿拉伯糖苷酶。在 $t = 4, 8, 12, 22, 26, 30$ 和 34 小时加入预处理的生物质与氨的混合物的附加等分试样、Spezyme®CP 纤维素酶和半纤维素酶聚生体。一般在加入酶约 1 小时后开启泵循环回路,并运行约 1 小时直至在第 22 小时加入固体。在 26 小时和 30 小时加料后,在加入酶后约 50 分钟开启泵并运行 30 分钟。在 34 小时加料后,在加入酶后约~3 小时开启泵并运行 30 分钟。泵也在 $t = 29, 33, 47$ 和 49 小时运行 30 分钟。总糖化时间为 120 小时。此时水解产物包含~60g/L 葡萄糖单体、25g/L 木糖单体和 10g/L 乙酸。

[0229] 该水解产物用于运动发酵单胞菌菌株 ZW800 或 ZW658(ATCC#PTA-7858) 发酵。ZW658 是运动发酵单胞菌菌株,它已经被工程化用于将木糖发酵成乙醇,在共有的和共同未决的美国专利申请 60/847813 中对此进行了描述。ZW658 通过经由序列转座事件将两个操纵子整合到 ZW1(ATCC#31821) 基因组中,然后通过包含木糖的选择培养基筛选进行构建,所述操纵子是 $P_{\text{gap}}\text{xy1AB}$ 和 $P_{\text{gap}}\text{tal1kt}$,它们包含四个编码木糖异构酶、木酮糖激酶、转醛醇酶和转酮醇酶的木糖利用基因。ZW800 是具有编码葡萄糖果糖氧化还原酶灭活基因的 ZW658 菌株,它也在共有的和共同未决的美国专利申请 60/847813 中进行了描述。

[0230] 发酵在灭菌的 1 升发酵罐 (BIOSTAT®B-DCU 系统, Sartorius BBI System Inc., Bethlehem, Pennsylvania, USA) 中进行,初始工作体积为 500mL。将种菌加入到发酵罐中,含量为 10% (v/v),使得加样后肉汤的 $\text{OD}_{600} \sim 1$ 。水解产物与水的平衡比例为 80%或 40% (v/v)。加入附加葡萄糖和木糖以使它们在肉汤中的终浓度分别为 92g/L 和 82g/L。肉汤也补充有 10mM 山梨醇和 1g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。在 33°C, pH5.8, 搅拌速度 150rpm 的条件下进行 72 小时的发酵。ZW800 菌株的最终乙醇滴定度为在 40%的水解产物中 8g/L,在 80%的水解产物中 7g/L。ZW658 的最终乙醇滴定度为在 40%的水解产物中 8g/L,在 80%的水解产物中 6.5g/L。

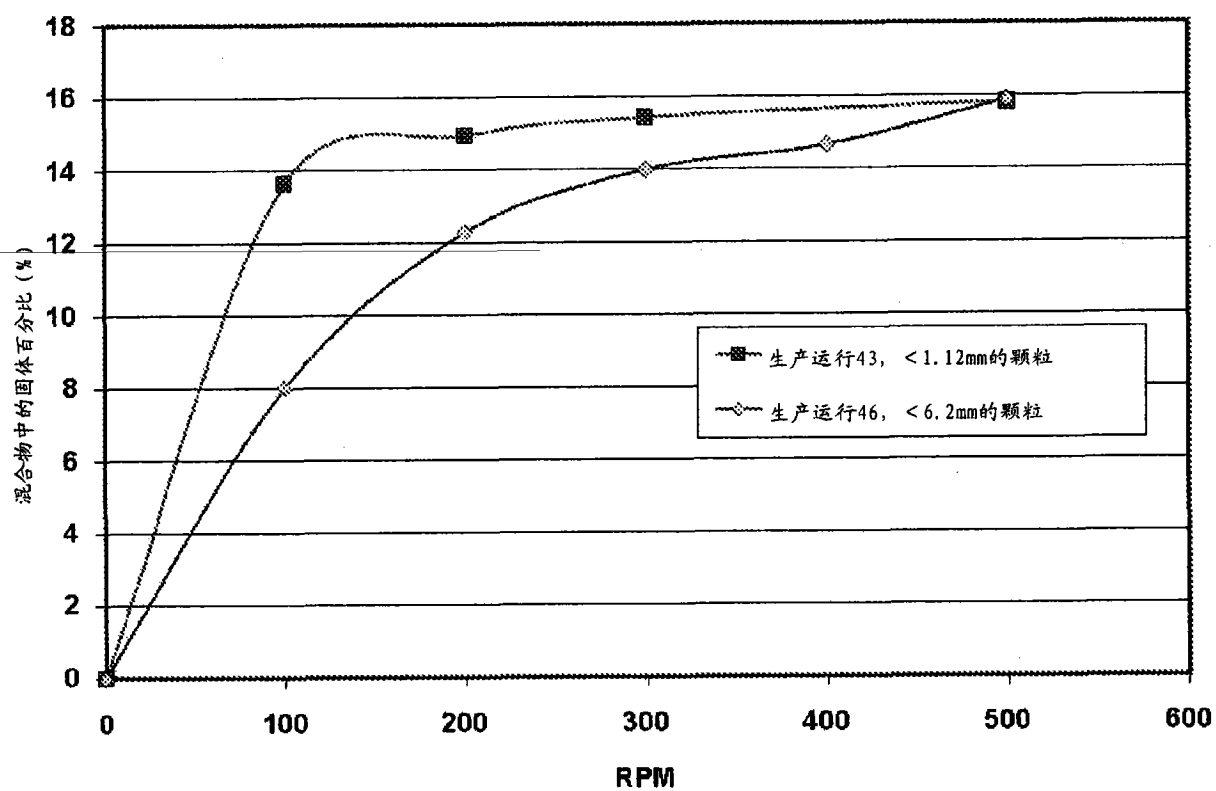


图 1

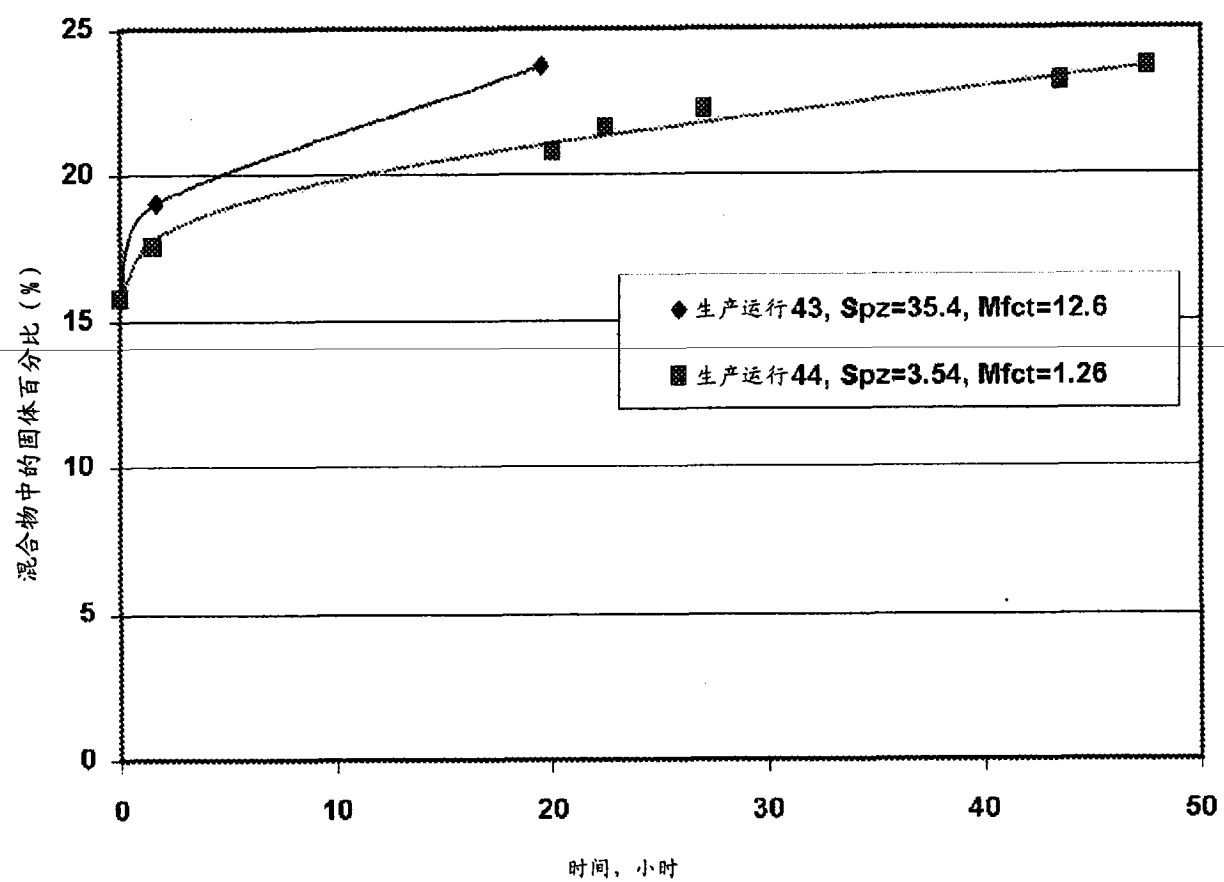


图 2

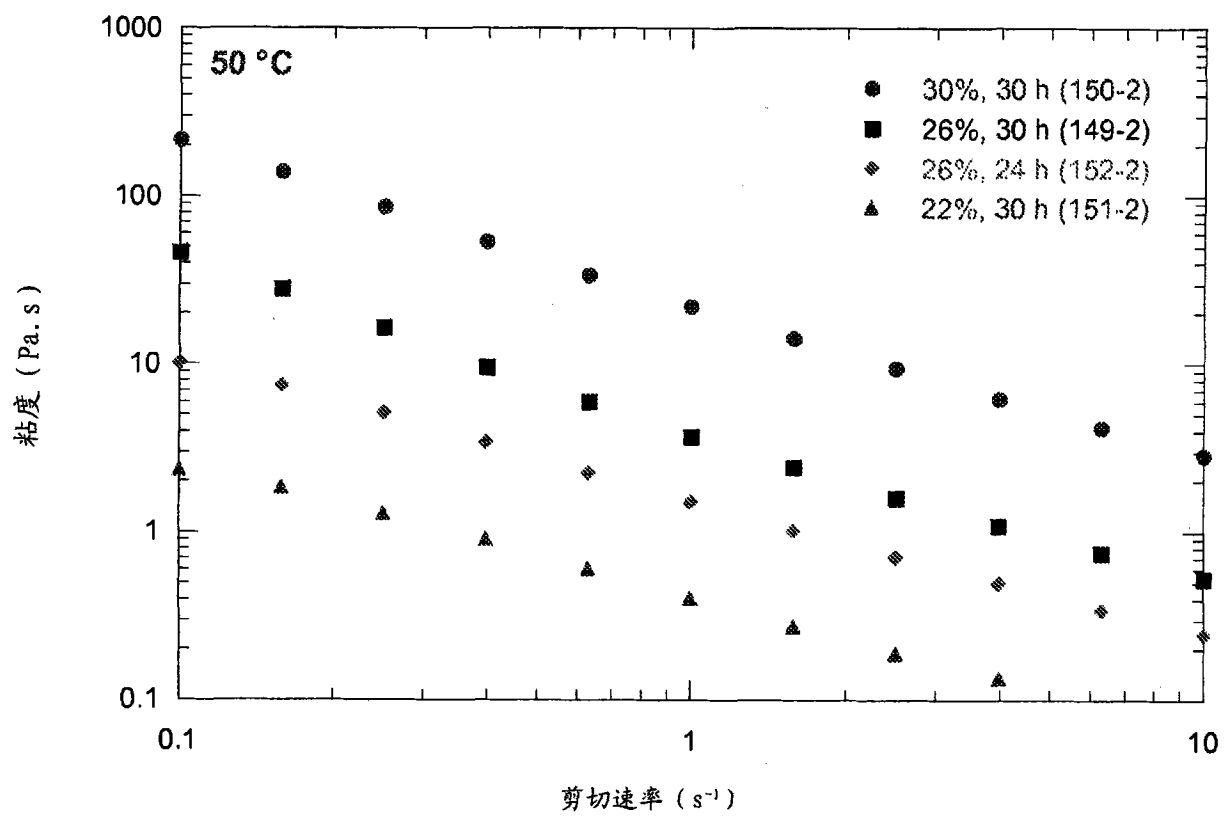


图 3

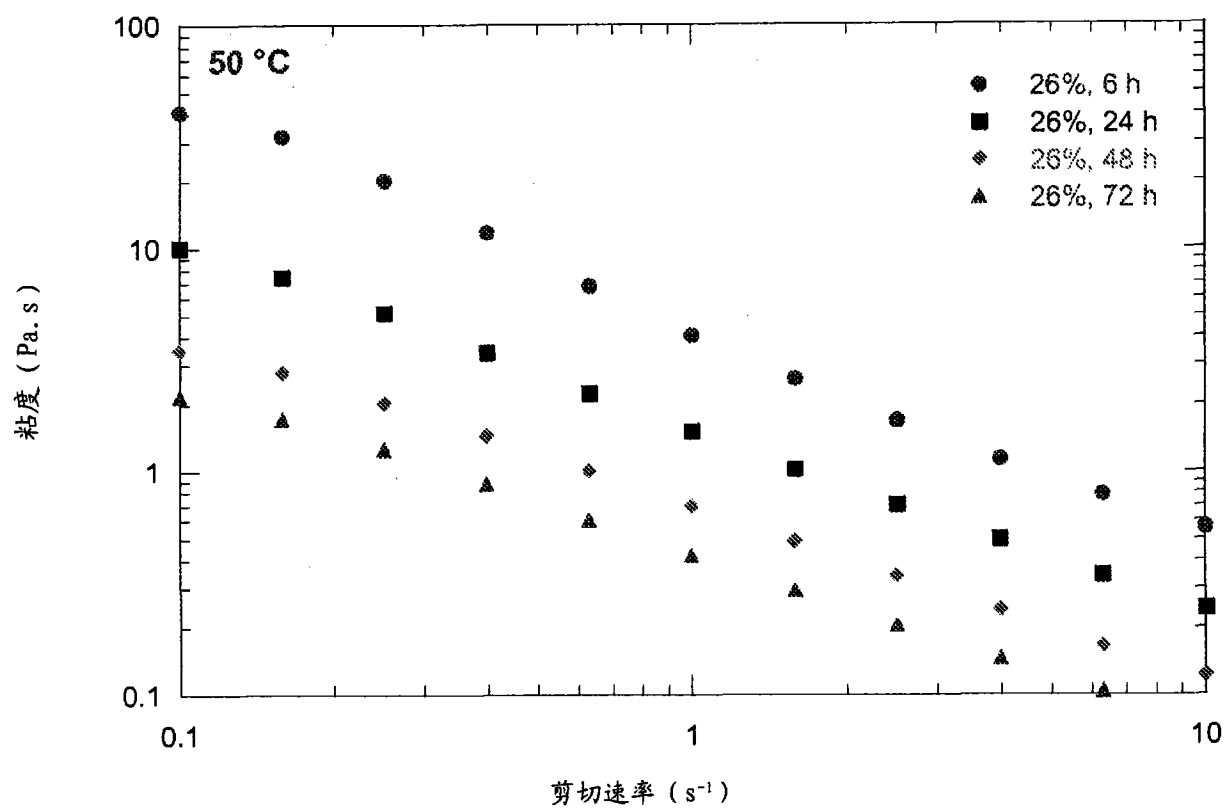


图 4