



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101090962 B

(45) 授权公告日 2012. 04. 18

(21) 申请号 200580040982. 6

C12M 1/02(2006. 01)

(22) 申请日 2005. 11. 07

C12M 1/10(2006. 01)

C12M 1/16(2006. 01)

(30) 优先权数据

PA200401854 2004. 11. 29 DK

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007. 05. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2005/003308 2005. 11. 07

(87) PCT申请的公布数据

W02006/056838 EN 2006. 06. 01

(73) 专利权人 因必康有限公司

地址 丹麦腓特烈西亚

(72) 发明人 克劳斯·费尔比 扬·拉森

亨宁·约尔根森

雅各布·维伯-佩德森

(56) 对比文件

US 5879637 A, 1999. 03. 09, 全文.

US 4409329 A, 1983. 10. 11, 全文.

US 5185255 A, 1993. 02. 09, 全文.

EP 1130085 A1, 2001. 09. 05,

WO 199728306 A1, 1997. 08. 07,

WO 199728306 A1, 1997. 08. 07,

WO 200145523 A1, 2001. 06. 28,

M. Galbe · G. Zacchi. A review of the production of ethanol from softwood. Appl Microbiol Biotechnol. 2002, 59(6), 全文.

Lee R. Lynd, Charles E. Wyman, and Tillman U. Gerngross. Biocommodity Engineering. Biotechnol. Prog. 1999, 15(5),

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限

责任公司 11219

代理人 王海川 樊卫民

审查员 陈雪梅

(51) Int. Cl.

C12P 19/14(2006. 01)

C12P 19/00(2006. 01)

C12P 7/10(2006. 01)

C12P 19/12(2006. 01)

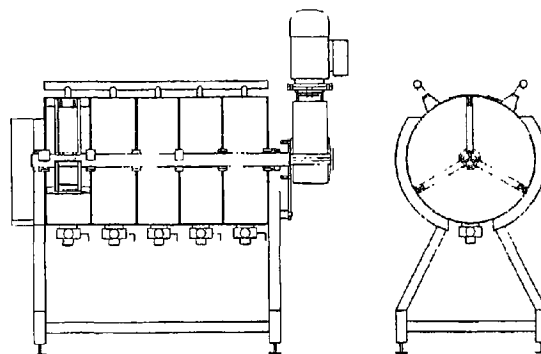
权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图 3 页

(54) 发明名称

干物质(DM)含量高的生物质的酶水解

(57) 摘要

本发明涉及一种将具有相对较高干物质含量的含多糖的生物质液化和糖化的方法。本发明结合了酶水解与依赖于重力原理的混合类型,所述重力原理确保机械力,主要是剪切力和撕裂力作用于生物质。此外,本发明还涉及进一步利用由此加工的生物质,例如用于后续发酵成乙醇、生物气、用于食品和饲料的专用碳水化合物以及用于加工成塑料和化学品的碳原料。



5室水解反应器的纵视图(左)和横视图(右)

1. 一种将含多糖生物质进行液化和糖化的方法,其特征在于使具有最终干物质含量为20%与40%之间且包含木质纤维素生物质的含多糖生物质经受:

a) 利用纤维素酶的酶水解,和

b) 通过自由降落的混合类型进行混合,所述混合提供在水解过程中对生物质的机械降解,

其中在所述方法中,混合的生物质变为适于进一步加工的粘性或高或低的液体。

2. 根据权利要求1的方法,其中所述含多糖生物质是木质纤维素生物质,源自由玉米秆,甘蔗渣,秸秆,块茎,谷类组成的农作物;由软木,硬木组成的木材;或城市固体废物,来自生物气加工的纤维部分和肥料。

3. 根据权利要求2的方法,其中所述秸秆选自稻秸秆、小麦秸秆、黑麦秸秆、燕麦秸秆、大麦秸秆、油菜秸秆和高粱秸秆。

4. 根据权利要求2的方法,其中所述谷类选自稻、小麦、黑麦、燕麦、大麦和高粱。

5. 根据权利要求2的方法,其中所述软木是樟子松或放射松。

6. 根据权利要求2的方法,其中所述硬木是柳树或桉树。

7. 根据权利要求2的方法,其中所述城市固体废物是废纸。

8. 根据权利要求1的方法,其中所述含多糖生物质是淀粉和木质纤维素生物质的混合物,所述木质纤维素生物质源自由玉米秆,秸秆,块茎,谷类组成的农作物;由软木,硬木组成的木材;和城市固体废物。

9. 根据权利要求8的方法,其中所述秸秆选自稻秸秆、小麦秸秆、黑麦秸秆、燕麦秸秆、大麦秸秆、油菜秸秆和高粱秸秆。

10. 根据权利要求8的方法,其中所述谷类选自稻、小麦、黑麦、燕麦、大麦和高粱。

11. 根据权利要求8的方法,其中所述软木是樟子松或放射松。

12. 根据权利要求8的方法,其中所述硬木是柳树或桉树。

13. 根据权利要求8的方法,其中所述城市固体废物是废纸。

14. 根据权利要求1的方法,其中至少20% (w/w) 的木质纤维素生物质具有26mm以上的纤维尺寸。

15. 根据权利要求1的方法,其中木质纤维素生物质已经受110-250°C之间的热预处理。

16. 根据权利要求1的方法,其中酶水解在0-105°C进行。

17. 根据权利要求1的方法,其中含多糖生物质的混合依赖于自由降落混合机。

18. 根据权利要求17的方法,其中所述自由降落混合机是鼓式混合机、翻转式混合机或具有提升生物质的旋转轴的其他混合机。

19. 根据权利要求1的方法,其中酶水解的处理时间为小于72小时。

20. 根据权利要求1的方法,其以批式、流加式或连续方法进行。

干物质 (DM) 含量高的生物质的酶水解

技术领域

[0001] 本发明涉及一种将含有多糖、具有高的干物质含量且优选具有纤维和平均粒度大的粒子的生物质液化和糖化的方法。此外,本发明还涉及由此加工的生物质的进一步应用,例如用于后续发酵成生物乙醇、食品和饲料的专用碳水化合物以及用于加工成塑料和化学品的碳原料。

[0002] 发明背景

[0003] 许多工业和农业过程,例如城市运转、食品和饲料加工和林业都产生含有聚合糖类的生物质、废物和副产物,所述聚合糖类例如为淀粉、纤维素和半纤维素的形式。农业综合企业和化工业以及公共组织对开发将该类生物质转化成价值更高的材料的方法具有相当大的兴趣。因此,例如使用微生物和/或水解酶可将该类生物质转化成生物乙醇、生物气或化学品。然而,目前已知的大多数方法由于生产成本低、能量需求高以及由此所具有不确定的经济可行性,它们都尚未实现大规模工业实践。

[0004] 除了作为食品和饲料重要之外,源自生物质的碳水化合物还可用作许多工业方法的原料。以聚合物的形式,众所周知的产品是其中纤维素为主要组分的纸。然而,当加工成低聚物和单体时,碳水化合物是许多工业方法的重要原料。正若要详细描述的那样,它们在许多微生物方法所必需的,但此外,它们还可以用作例如酶催加工成为食品和饲料专用碳水化合物如海藻糖的原料。碳水化合物低聚物和单体也可以代替石油化学品用于加工成塑料和有机化学品。此外,碳水化合物可以用作催化氢化作用中的氢载体。

[0005] 因此,显然,若成本低且来源丰富的加工得到的碳水化合物可用于工业加工,则其可具有巨大的经济潜力。

[0006] 淀粉是植物中最普遍储存的碳水化合物且以颗粒形式存在,其大小和物理性质在种属间有明显差异。淀粉颗粒通常非常耐水和水解酶的渗透,这是由于在相同分子内和与其它相邻分子形成了氢键。然而,当升高悬浮液温度时,这些分子内和分子间氢键可变弱。当加热淀粉的水悬浮液时,氢键变弱,水被吸收且淀粉颗粒溶胀。因为形成的溶液呈凝胶状的高粘稠度,该过程通常被称为胶凝化。在化学上,淀粉是葡萄糖的天然聚合物,其通常在室温下不能溶于但可分散在水中,由类似于纤维素的重复单元构成,并且通过 $\alpha-1,4$ 和 $\alpha-1,6$ 糖苷键连接在一起,这与纤维素的 $\beta-1,4$ 糖苷键正相反。所述单元或形成称为直链淀粉的直链组分,或形成称为支链淀粉的支链组分。大多数植物种子、谷粒和块茎含有约 20-25% 的直链淀粉。但某些植物,例如豌豆淀粉具有 60% 的直链淀粉,并且某些种类玉米具有 80% 直链淀粉。诸如大米的蜡状谷类的直链淀粉含量低。

[0007] 除了淀粉外,植物生物质的三种主要成分是纤维素、半纤维素和木质素,它们通常被专业术语称为木质纤维素。“含有多糖的生物质”作为专业术语包括淀粉和木质纤维素生物质这两类。

[0008] 纤维素、半纤维素和木质素以不同的量存在于不同的植物和不同的植物部分中,并且它们紧密结合形成植物的结构骨架。

[0009] 纤维素是完全由通过 $\beta-1,4$ -糖苷键连接在一起的 D-葡萄糖组成且具有高达

10,000 的聚合度的同多糖。纤维素的直链结构使分子内和分子间氢键都得以形成,这导致纤维素链聚集成微纤维。具有高度秩序的微纤丝内部区域被称为晶态,秩序差的区域被称为无定形态。微纤维装配成纤丝,纤丝又形成纤维素纤维。纤维素的部分晶态结构与微纤维型排列一起,赋予了纤维素高的拉伸强度,这使得纤维素不溶于大多数溶剂,并且这是纤维素耐微生物降解,即酶水解的一部分原因。

[0010] 半纤维素是复合的异多糖,由许多单体残基组成: D-葡萄糖、D-半乳糖、D-甘露糖、D-木糖、L-阿拉伯糖、D-葡糖醛酸和 4-O-甲基-D-葡糖醛酸。半纤维素具有低于 200 的聚合度、具有侧链且可被乙酰化。在诸如冷杉、松树和云杉的软木中,半乳葡甘露聚糖和阿拉伯-4-O-甲基-葡糖醛酸木聚糖是主要的半纤维素部分。在诸如桦树、白杨树、山杨树或橡树等的硬木中,4-O-乙酰基-4-甲基-葡糖醛酸木聚糖和葡甘露聚糖是主要的半纤维素成分。诸如稻、小麦、燕麦和软枝草 (switch grass) 等的禾草具有主要由葡糖醛酸阿糖基木聚糖组成的半纤维素。

[0011] 木质素是通过苯基丙烷单元聚合形成的复杂网络,且其构成了木质纤维素中的最丰富的非多糖部分。木质素中的三种单体是对香豆醇 (p-coumaryl alcohol)、松柏醇和芥子醇,它们最经常通过芳基甘油基- β -芳基醚键连接。木质素连接于半纤维素并嵌入碳水化合物中从而提供保护免受微生物降解和化学降解。

[0012] 如上所述,使用微生物和/或水解酶具有可将经加工的生物质转化成生物乙醇或化学品的潜力,或者可以将源自经加工的生物质的碳水化合物用作许多工业方法的原料,例如酶加工成食品或饲料用的专门碳水化合物或在塑料和有机化学品的制造中作为石油化学品的替代品。此外,本发明的生物质中的碳水化合物的加工可以与非碳水化合物组分的分离和分馏相结合。本发明方法的特别优选的用途是作为生物乙醇生产方法的集成部分。

[0013] 由含有多糖的生物质生产生物乙醇可分成三步: 1) 预处理, 2) 将多糖水解成可发酵碳水化合物, 3) 将碳水化合物发酵。

[0014] 若后续的多糖水解(例如酶水解)需要破坏植物材料的另外保护结构(例如木质素),则预处理是需要的。已知几种预处理技术。对于谷物和谷粒,预处理可以为简单干磨的形式以使表面易于接触,但对于木质纤维素生物质,还需要热和/或化学方法。例如由精制淀粉构成的含多糖生物质在酶加工前不需要所述预处理方法。预处理方法可基于酸性水解、蒸汽喷发、氧化、用碱或乙醇等萃取。预处理技术的共同特征在于,与可能添加的反应物的作用相结合,这些技术利用了植物材料在 100°C 之上的温度出现软化和松散。

[0015] 在利用含多糖生物质生产生物乙醇或其他生物化学品中,预处理之后的下一步骤是将释放的淀粉、纤维素和半纤维素水解成可发酵的糖。如果按酶法进行,则这需要大量的具有不同作用模式的不同酶。酶可以外部添加或者在生物质上生长的微生物可提供酶。

[0016] 通过糖水解纤维素酶 (carbohydrolytic cellulases) 将纤维素水解成葡萄糖。纤维素水解体系的普遍理解将纤维素酶分成三类;外切-1,4- β -D-葡聚糖酶或纤维素生物水解酶 (CBH) (EC3.2.1.91),其由纤维素链末端切下纤维二糖;内切-1,4- β -D-葡聚糖酶 (EG) (EC3.2.1.4),其水解纤维素链中任意的内部 β -1,4-糖苷键;1,4- β -D-葡糖苷酶 (EC3.2.1.21),其将纤维二糖水解成葡萄糖并还由纤维素寡糖中切下葡糖糖。

[0017] 半纤维素中的不同糖通过半纤维素酶释放。半纤维素水解体系由于半纤维素

的异质性而比纤维素水解体系更复杂。所述体系尤其包括内切-1,4- β -D-木聚糖酶 (EC3. 2. 1. 8), 其水解木聚糖链中的内键; 1,4- β -D-木糖苷酶 (EC3. 2. 1. 37), 其从非还原末端进攻低聚木糖并释放木聚糖; 内切-1,4- β -D-甘露聚糖酶 (EC3. 2. 1. 78), 其断裂内键; 1,4- β -D-甘露糖苷酶 (EC3. 2. 1. 25), 其将甘露寡糖断裂为甘露糖。侧基通过多种酶去除; α -D-半乳糖苷酶 (EC3. 2. 1. 22)、 α -L-阿拉伯呋喃糖苷酶 (EC3. 2. 1. 55)、 α -D-葡萄糖苷醛酸酶 (EC3. 2. 1. 139)、肉桂酰酯酶 (EC3. 1. 1. -)、乙酰木聚糖酯酶 (EC3. 1. 1. 6) 和阿魏酰酯酶 (EC3. 1. 1. 73)。

[0018] 用于淀粉水解的最重要的酶是 α -淀粉酶 (1,4- α -D-葡聚糖葡萄糖水解酶 (EC3. 2. 1. 1)。这些是断裂 1,4- α -D-糖苷键并可以绕过但不能水解 1,6- α -D-糖苷支化点的内切作用水解酶。然而, 外切作用淀粉糖化酶如 β -淀粉酶 (EC3. 2. 1. 2) 和支链淀粉酶 (EC3. 2. 1. 41) 也可以用于淀粉水解。淀粉水解主要得到葡萄糖、麦芽糖、麦芽三糖、 α -糊精和各种量的寡糖。当使用基于淀粉的水解产物用于发酵时, 可有利地添加蛋白水解酶。这类酶可以防止微生物絮凝并可以产生微生物可用的氨基酸。

[0019] 在木质纤维素生物质的预处理和酶水解的结合中, 人们已经发现使用氧化酶可对整个水解以及对用于例如后续发酵的微生物的生存力具有积极效果。该效果的原因是由氧化性酶引起的木质素与其他酚类抑制剂的氧化性交联。通常, 漆酶 (EC1. 10. 3. 2) 或过氧化物酶 (EC1. 11. 1. 7) 外部施用或通过所用微生物中引入漆酶基因而施用。

[0020] 前面已经描述了生物质的酶水解。然而, 在木质纤维素生物质的情况下, 通过该方法仅成功水解了由平均尺寸低于 1 英寸 (25. 4mm) 的纤维和粒子构成并且还具有较低干物质含量 (即低于 20% (w/w)) 的材料。

[0021] US4409329 描述了将固体纤维素材料水解成糖, 其中通过用纤维素酶复合物处理含 30-80% (w/w) 纤维素的 3-20% (w/w) 固体进料的颗粒状浆液, 从而将纤维素水解成单糖。所述含固体纤维素的进料具有直径为 0. 01-1 英寸 (0. 0254-25. 4mm) 的平均粒度。使用多孔动叶片进行混合。

[0022] US2002117167A 描述了生物质材料中的半纤维素的酶水解, 包括将至少一部分半纤维素溶解并将溶解的半纤维素水解以产生至少一种单糖。所用生物质优选为原料或预处理材料的含水浆液。生物质材料可以是包括半纤维素的任意纤维素材料。据述, 该方法对诸如玉米、小麦、稻、燕麦或大麦的谷粒纤维特别有效。

[0023] US2004005674A 描述了一种将木质纤维素酶水解的方法。木质纤维素到糖的降解包括使木质纤维素与至少一种辅助酶和至少一种纤维素酶接触。所述木质纤维素材料被研磨 (未进一步具体规定该材料的平均纤维尺寸) 且其干物质含量低 (在 10mL 酶溶液中具有 0. 2g 研磨的香草材料)。

[0024] 发明概述

[0025] 本发明涉及一种将含有多糖的生物质液化和糖化的方法, 所述生物质具有相对高的干物质含量, 优选 20% 以上, 且优选由相对较大的纤维和粒子组成, 其中较大的纤维和粒子优选具有的纤维和粒子尺寸分布为至少 20% (w/w) 生物质在 26-70mm 范围内。此外, 该方法特别适用于主要由淀粉、精制淀粉、纤维素、半纤维素和木质素组成的含多糖生物质如谷粒或小麦杆的液化和糖化。在木质纤维素生物质的情况下, 其优选在 110-250 $^{\circ}$ C 下经 1-60 分钟进行预处理, 处理的方式要确保纤维素易接触到酶并同时确保在预处理的生物质中发

酵抑制剂的含量有限。本发明结合了基于水解酶（包括糖水解酶）和氧化酶的组合酶水解与依赖于确保机械力（主要是剪切力和撕裂力）施用于生物质的重力原理的混合类型。优选的混合类型例如是诸如鼓式混合机、翻转式混合机或类似的混合装置的自由降落混合机。

[0026] 发明描述

[0027] 就随后发酵或其他微生物方法而言，生产浓的糖溶液因改进了体积生产率和降低了下游加工成本而有利。在生产生物乙醇的情况下，若发酵液含有超过 4% 的乙醇，则蒸馏的能量需求显著降低 (Galbe and Zacchi, 2002)。这要求糖浓度在 8% 以上，对大多数类型的木质纤维素生物质，这对应于初始干物质含量在 20% 以上。换言之，需要将干物质含量高，优选 20% 以上的含多糖生物质进行酶水解，以便能够随后生产适于乙醇蒸馏的含生物乙醇的发酵液。

[0028] 本发明方法提供了通常 30-50% 的酶水解度。然而，在优化的条件下，甚至可以获得更高的酶水解度。经液化和糖化的生物质因此含有相对大量的葡萄糖、木糖、纤维二糖、木质素、未降解纤维素和半纤维素以及仍具活性且适于进一步加工（即发酵工艺（乙醇、乳酸等））的酶。经液化的生物质还适于气化、氢化、有机合成或生产生物气和饲料。

[0029] 若含多糖生物质是木质纤维素类的，则预处理必须确保使木质纤维素内容物的结构对酶而言更易接触，并且同时使有害抑制性副产物如乙酸、糠醛和羟甲基糠醛保持很低。实现上述效果的措施有数种，所有措施都包含使木质纤维素材料经受 110-250°C 的温度 1-60 分钟，例如：

[0030] • 热水提取

[0031] • 多阶段稀酸水解，该操作在抑制性物质形成之前去除溶解的材料

[0032] • 在相对不太严格的条件下稀酸水解

[0033] • 碱性湿式氧化

[0034] • 蒸汽喷发

[0035] • 几乎任意的预处理，随后脱毒

[0036] 本发明的含多糖生物质包括任何含聚合糖的材料，所述聚合糖例如淀粉以及精制淀粉、纤维素和半纤维素形式。优选干物质含量在 20% 以上的生物质。

[0037] 用于本发明的酶水解和混合的生物质的有关类型包括源自农作物的生物质，例如：

[0038] • 淀粉，例如含淀粉谷粒和精制淀粉

[0039] • 玉米秆

[0040] • 甘蔗渣

[0041] • 秸秆，例如来自稻、小麦、黑麦、燕麦、大麦、黑麦、油菜、高粱

[0042] • 软木，例如樟子松 (*Pinus sylvestris*)、放射松 (*Pinus radiata*)

[0043] • 硬木，例如柳树 (*Salix* spp.)、桉树 (*Eucalyptus* spp.)

[0044] • 块茎，例如甜菜、土豆

[0045] • 谷类，例如来自稻、小麦、黑麦、燕麦、大麦、黑麦、油菜、高粱和玉米

[0046] • 废纸、来自生物气加工的纤维部分、肥料、来由油棕加工的残渣、城市固体废物等具有相似干物质含量的物质。

[0047] 若含多糖物质是木质纤维素类的,则在预处理前可将该材料切成片,其中 20% (w/w) 物质优选在 26-70mm 范围内。经预处理的材料优选在进入混合装置前具有 20% 以上的干物质含量。除了从生物质释放碳水化合物外,预处理工艺杀菌并将生物质部分溶解并且同时从木质素部分中洗脱氯化钾。

[0048] 在本发明方法中进行的混合达到至少四种目的。

[0049] 首先,其确保所用酶与含多糖物质(底物)之间的紧密接触,而所述底物在大多数情况下是不溶或仅有极少的溶解。

[0050] 其次,在混合过程中在所述材料上进行的机械操作有助于将较大生物质纤维和粒子撕碎并因此有助于增加材料的表面积。这将增加例如纤维素和半纤维素对所用酶的可接触性。为了进一步增加材料上的机械操作,可向滚筒中加入钢球或类似装置与所述材料碰撞。

[0051] 第三,材料的混合防止高的纤维二糖浓度局部累积,如本领域熟练技术人员熟知的那样,所述累积可抑制例如纤维素酶,尤其是纤维素生物水解酶。

[0052] 第四,纤维素酶的重要性质是纤维素结合区域(CBD)对酶性能的影响。CBD是纤维素降解酶的功能部分。CBD使水溶性酶粘附在不溶性底物表面(纤维素)上。CBD所提供的酶与纤维素之间的紧密缔合增大了酶的催化速率和稳定性。为了水解纤维素,酶必须改变CBD在纤维素链上的位置。据信,机械作用,即混合对CBD移动是重要的,并因此对酶沿纤维素链的酶作用是重要的。

[0053] 除了以上所述,应注意的是,传统上生物质的酶水解在装配有叶轮(例如 Rushton 涡轮机或 Intemig 叶轮)的搅拌釜反应器中进行,所述叶轮安装在与发酵工业中所用类似的中心放置的叶轮轴上。由于该装置,具有高粘度的溶液、非常粘或非常干燥的材料的溶液不能被有效搅拌,而是导致产生搅拌很差或没有搅拌的区域。此外,该类溶液的搅拌要求非常大的能量输入,这有损于生产节约。采用含多糖物质进行操作,这已预先将可能上限限制在大约 20%。本发明的基于重力的混合原理克服了该问题,并且可以用于干物质含量高达 80%,优选 20-50%的含多糖物质。本发明的重力混合原理可以容易地按比例增加,并除了精制淀粉外,还可以用于所有类型的含有高达超过 80%纤维素的生物质。

[0054] 与传统上用于酶水解的常规搅拌釜反应器不同,基于重力的混合原理,即鼓式混合机、具有提升生物质的旋转轴的混合机或类似的利用自由降落原理的混合装置,即使在小的功率输入和高的干物质含量下也同时确保有效混合,并且还通过重力力进行机械加工/降解,所述重力包括材料与鼓之间的剪切力和撕裂力以及由下落材料和鼓底部间的碰撞产生的力,且同时对于纤维素结合区域(CBD)对酶性能的影响发挥了积极作用。

[0055] 尽管非混溶性植物材料,如具有干物质含量相对高和纤维及粒子平均尺寸大的含多糖生物质的加工,已由固态发酵或生物反应器而为公众所知,其中翻转型混合机用于混合(Giovanozzi 等人,2002),但该原理以前并未在专门的液化/糖化工艺或生物乙醇发酵工艺中实施。

[0056] 本发明提供了一种在较高干物质含量下加工生物质的方法,如干物质含量在 20-80%之间,优选 20-50%之间。此外,本发明方法确保了有效的液化和糖化,使终产物可以直接用于例如发酵罐中。

[0057] 将能够将淀粉、纤维素和半纤维素或其部分转化成葡萄糖、木糖和纤维二糖的酶,

以天然形式或以引起该类酶累积的微生物形式添加到生物质中。参考所用酶的最适宜 pH 和最适宜温度调节生物质的 pH 和温度。

[0058] 取决于酶用量,生物质在 3-24 小时内液化和糖化成不含或仅含极少剩余大纤维和粒子的液体。在水解和液化过程中的任意指定时间添加葡萄糖代谢微生物可以增强酶催水解度,因为由此除去了抑制性的酶产物。

[0059] 发明详述

[0060] 可以使用下列优选的技术参数进行本发明方法。

[0061] • 干物质含量 :20-80%, 优选 25-70%, 更优选 25-60%, 更为优选 25-50% 或 25-40%, 最优选 25-35%

[0062] • 木质纤维素生物质的纤维和粒子的尺寸分布 :0-150mm, 优选 5-125mm, 更优选 10-100mm, 更加优选 15-90mm 或 20-80mm, 最优选 26-70mm。纤维和粒子的优选尺寸分布定义为至少 20% (w/w) 木质纤维素生物质分布在优选区间内。

[0063] 若含多糖的生物质是木质纤维素类的,则必须进行预处理,例如热水提取。若选择水热预处理,则优选下列技术数据 :

[0064] • 预处理温度 :110-250°C, 优选 120-240°C, 更优选 130-230°C, 更优选 140-220°C, 更优选 150-210°C, 更优选 160-200°C, 更加优选 170-200°C, 或最优选 180-200°C

[0065] • 预处理时间 :1-60 分钟, 优选 2-55 分钟, 更优选 3-50 分钟, 更优选 4-45 分钟, 更优选 5-40 分钟, 更优选 5-35 分钟, 更优选 5-30 分钟, 更优选 5-25 分钟, 更优选 5-20 分钟, 最优选 5-15 分钟

[0066] • 预处理后的干物质含量为至少 20w/w%。

[0067] 含多糖生物质在重力混合机中的酶处理 :

[0068] 若使用基于自由下落混合概念的容器,并且是具有用于提升生物质的水平放置搅拌轴的反应器形式或类似混合装置的形式,则优选下列技术数据 :

[0069] • 转动速度 :0-30rpm, 优选 0-20rpm, 更优选 0-15rpm, 更加优选 0-10rpm, 最优选 0-5rpm。

[0070] • 周期性变换旋转方向的旋转。

[0071] • 以预定间隔旋转。

[0072] 最佳旋转速度取决于容器容积,当在相对小的容器中进行加工时,优选的旋转速度因此可能相对高,而当在相对大的容器中进行加工时,它可以相对小。

[0073] • 用于木质纤维素生物质的酶 :

[0074] - 纤维二糖酶 (例如 Novozym188)

[0075] - 纤维素酶 (例如 Celluclast1.5FG L)

[0076] • 酶用量,以滤纸单位 (FPU)/g 干物质表示。1FPU 等于在本领域技术人员已知的特定条件下在 Whatmann#1 滤纸上水解 $1 \mu\text{mol}/\text{min}$ 糖苷键需要的酶量。然而,酶活性原则上可以以任何可能的形式提供,包括通过添加引起所需酶活性的微生物 :对应于 0.001-15FPU/g 干物质,优选 0.01-10FPU/g 干物质,更优选 0.1-8FPU/g 干物质,更优选 1-7FPU/g 干物质,最优选低于 6FPU/g

[0077] • 用于含淀粉生物质的酶 :

[0078] - 淀粉加工中的酶 : α -淀粉酶和葡糖淀粉酶

[0079] • 酶水解的处理时间 :0-72 小时, 优选 1-60 小时, 更优选 2-48 小时, 更优选 3-24 小时, 如 4-24 小时, 如 6-24 小时, 如 8-24 小时, 如 10-24, 如 12-24 小时, 如 18-24 小时或 22 小时

[0080] • 酶水解的温度。根据所用酶活性的最适宜温度调节 :0-105℃, 优选 10-100℃, 更优选 15-90℃, 更优选 20-80℃, 更优选 25-70℃, 最优选 30-70℃, 如 40-45℃或室温

[0081] • 生物质的 pH。根据所用酶活性的最适宜 pH 调节 :3-12, 如 5-10, 如 6-9, 如 7-8, 优选 4-11。

[0082] • 酶处理可以批式、流加式或连续方法进行。

[0083] 实施例 1 :实验室规模酶水解

[0084] 将平均尺寸约 40mm、对应于 25g 干重 (= 67.0g 预处理的秸秆) 的压制的预处理小麦秆 (在 180-200℃, 逆流水提取 5-10 分钟, 水与干物质流量之比为 5:1) 放入塑料袋中。将 0.75mL 的 Novozym188、3.75mL 的 Celluclast1.5FG L 和 11.9mL 的 50mM 柠檬酸钠缓冲液 (pH5.0) 混合并喷涂在麦秆上。这得到 30% 的最终干物质含量。酶用量对应于 10 滤纸单位 (FPU)/g 干物质。

[0085] 混合机由鼓 (长为 1.0m 且直径为 0.78m) 组成, 该桶沿长轴具有 5 根内肋以确保材料的适当混合。所述鼓沿水平轴以 26rpm 的速度旋转。材料的混合 / 水解在室温下进行 18-24 小时。这得到不含任何剩余大纤维的稠糊。具有相同酶用量但没有进行混合的对照袋没有显示出秸秆降解迹象。

[0086] 在蓝色带盖的瓶中将酶水解 24 小时后所得材料的一部分 (其量对应于 29g 干物质) 稀释至 15% 干物质并加入酵母 (Baker 酵母, De Danske Spritfabrikker)。通过气塞封闭该瓶并在 30℃ 放置 72 小时, 同时以 500rpm 搅拌。所得液体含有 33g/L 的乙醇、10g/L 的木糖。没有检测到葡萄糖, 这表明酵母能够利用水解过程中产生的所有葡萄糖。假定乙醇基于葡萄糖的收率为 0.5g 乙醇 /g 葡萄糖, 这对应于原始纤维素的转化率为 70%。

[0087] 实施例 2 :中试规模的酶水解

[0088] 以平均尺寸约 40mm、对应于 7kgDW (= 20kg 预处理的秸秆) 的压制的预处理小麦秆 (通过在 180-200℃ 逆流水提取 5-10 分钟预处理, 水与干物质流量之比为 5:1) 放入具有倾斜约 10° 的水平轴的常规旋转水泥混合机中。该混合机沿长轴具有 2 根内肋以确保材料的混合。在开口上安装盖子以避免从混合机中蒸发。该混合机鼓沿水平轴以 29rpm 的速度旋转。

[0089] 将 200-1150mL 的 Celluclast1.5FG L 和 40-225mL Novozym188 加入秸秆中。这得到 30% 的最终干物质含量。酶用量对应于 3-15FPU/g 干物质。通过添加碳酸钠将 pH 调节至 4.8-5.0。

[0090] 使用风扇式加热器将水泥混合机加热至 40-45℃。材料的混合 / 水解进行 22 小时。取决于酶用量, 这得到不含任何剩余大纤维的粘性或高或低的液体。大约 3-5 小时后预处理的秸秆降解成糊。混合 5-24 小时后, 糊变为粘性液体。仅使用预处理小麦秆的对比试验或使用相同的酶用量但仅在 160℃ 预处理的小麦秆对比试验没有显示出秸秆液化迹象。

[0091] 使用 10-15FPU/g 干物质的酶用量, 在 40-45℃ 水解 24 小时后, 通过向水泥混合机中添加酵母同时进行糖化和发酵。可以将温度冷却至 35℃ 以下并添加压榨酵母 (Baker 酵母, De Danske Spritfabrikker) 至基于秸秆初始干物质大约为 1% (w/w) 的浓度。糖化和

发酵在在 25℃继续 48 小时。

[0092] 将所得材料在 2500rpm 离心 15 分钟。通过 0.45 μm 过滤器过滤上清液并在 HPLC 上分析糖。在 15FPU/g 干物质的酶用量下,水解 24 小时后,上清液含有 70g/L 葡萄糖、30g/L 木糖。这相当于原始存在于秸秆中的纤维素和半纤维素的 50%水解。使用 10FPU/g 干物质的酶用量的同时糖化和发酵得到 42g/L 乙醇和 30g/L 木糖。

[0093] 实施例 3:液化、水解和发酵

[0094] 设计水解反应器以便进行液化和水解 20%干物质以上固体浓度的实验(图 1)。反应器由水平放置的分隔成 5 个独立室的鼓组成,所述室各为 20cm 宽且直径为 60cm。在各室中使用安装有 3 个浆叶的水平旋转轴用于混合/搅拌。使用 1.1kW 电动机作为驱动,且旋转速度在 2.5 至 16.5rpm 的范围内可调。程序控制旋转方向使其每分钟在顺时针和逆时针之间变换两次。外部的充水加热套可以将温度控制在高达 80℃。

[0095] 各室中装入平均尺寸约为 40mm 的、压制的预处理小麦秆(通过在 180-200℃逆流水提取 5-10 分钟预处理,水与干物质流量之比为 5:1)和水,获得 20-40%的初始干物质含量。加入比例为 5:1 的 Celluclast1.5FGL 和 Novozym188,获得 7FPU/g 干物质的酶用量。液化和水解在 50℃和 4.8-5.0 的 pH 下进行。混合速度为 6.6rpm。通过在液化和水解 8 小时后将温度降至 32℃,随后添加基于初始干物质为 15g/kg 的压榨 baker 酵母(De Danske Spritfabrikker)进行同时糖化和发酵。

[0096] 可以高达 40%干物质的初始干物质含量进行液化和水解(图 2 和 3)。在 40%的初始干物质时,可以在 96 小时后达到 80gkg⁻¹ 的葡萄糖浓度。还可以以 SSF 操作所述工艺(图 3),从而降低由葡萄糖累积引起的纤维素酶的产物抑制。还可以使用常规 bake 酵母,以高达 40%初始干物质含量发酵水解产物。在不完全厌氧的条件下,乙醇在 20%、25%、30%、35%和 40%干物质下理论得到的产率分别为 80%、79%、76%、73%和 68%。

[0097] 实施例 4:整株作物的液化、糖化和发酵

[0098] 可使用重力混合和纤维素酶、半纤维素酶与淀粉酶的混合物同时加工含木质纤维素和淀粉的生物物质。木质纤维素生物物质源自由例如玉米秆,例如源自稻、小麦、黑麦、燕麦、大麦、黑麦、油菜和高粱的秸秆,如甜菜、土豆的块茎;例如源自稻、小麦、黑麦、燕麦、大麦、黑麦、油菜和高粱的谷类组成的农作物;由软木如樟子松(*Pinussylvesris*)、放射松(*Pinus radiata*),硬木如柳树(*Salix spp.*)、桉树(*Eucalyptus spp.*)组成的木材;城市固体废物,废纸和类似生物物质。

[0099] 使用实施例 3 中所述水解反应器进行实验。利用在 180-200℃逆流水提取 5-10 分钟预处理小麦秆(主要为木质纤维素来源),其中水与干物质流量之比为 5:1。使用 Kongskilde 辊磨机干磨小麦粒(主要为淀粉来源)。以基于干态为 1:1 的比例混合小麦粒和预处理的平均尺寸为约 40mm 的秸秆。通过添加水调节干物质至 30-40%。以 5:1 的比例添加 Celluclast1.5FG L 和 Novozym188,获得 7FPU/g 秸秆干物质的酶用量。以 3.5g/kg 小麦粒的用量使用冷的糖化酶(mash enzyme)NS50033(Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)进行淀粉水解。液化和水解在 50℃和 4.8-5.0 的 pH 下进行。8 小时后将温度降至 34℃,随后基于初始干物质添加 15g/kg 的压榨 baker 酵母(De Danske Spritfabrikker)。以仅有 30%干物质的秸秆进行并行实验。

[0100] 与仅用秸秆相比,秸秆与麦粒的混合使葡萄糖在液化和水解步骤中有迅速的初始

累积(图4)。仅使用小麦秆作为唯一底物时,液化和SSF96小时后的乙醇浓度为 41gkg^{-1} (图4)。在使用秸秆和麦粒的实验中,乙醇浓度达到 68g kg^{-1} 。

[0101] 实施例5:淀粉和含淀粉材料的低温液化

[0102] 根据本发明的方法还可以用于低温加工精制淀粉或含淀粉的材料(例如甜菜,土豆,来自稻、小麦、黑麦、燕麦、大麦、黑麦、高粱的谷类)。根据实施例4,对于液化和水解淀粉而言,热预处理不是必需的。另一方面,通常利用干磨来预处理含淀粉的谷粒。将干物质含量为20-60%的干磨谷粒装入重力混合机中。同时添加冷的糖化酶NS50033(Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)或 α -淀粉酶和葡糖淀粉酶。然后可以以一锅法进行淀粉的完全液化和糖化。酶水解工艺中的温度和pH范围由酶限定,并分别在25-60°C,优选40-55°C,和pH为3-12,优选pH为3-8的范围内。

[0103] 该方法可与SSF结合。

[0104] 引用文献:

[0105] Galbe, M., Zacchi, G. (2002). A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59 :618-628。

[0106] Giovannozzi-Sermanni, G., D' Annibale, A., Perani, C, Porri, A., Falesiedi, G. (2002). Solid-state bioreactors for the sustainability.

[0107] <http://www.unitus.it/dipartimenti/dabac/progetti/ssbioreactors/solidstatebioreactor.htm>

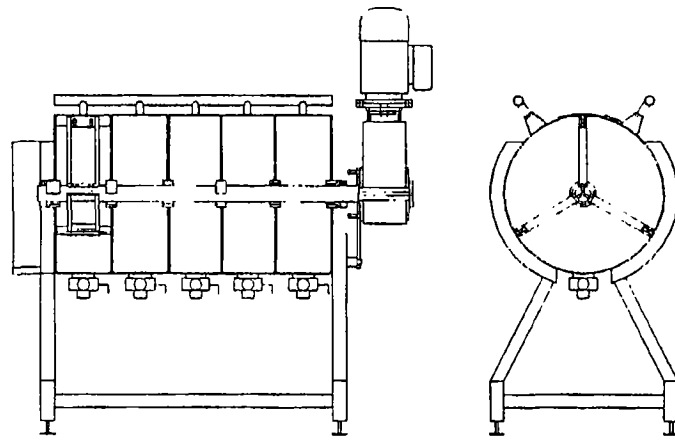
[0108] Gregg, D., Saddler, J. N. (1995). Bioconversion of lignocellulosic residues to ethanol: Process flow-sheet development. *Biomass Bioenerg.* 9 :287-302。

[0109] Mais, U., Esteghalalian, A. R., Saddler, J. N. (2002). Influence of mixing regime on enzymatic saccharification of steam-exploded softwood chips. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 98-100 :463-472。

[0110] US4409329

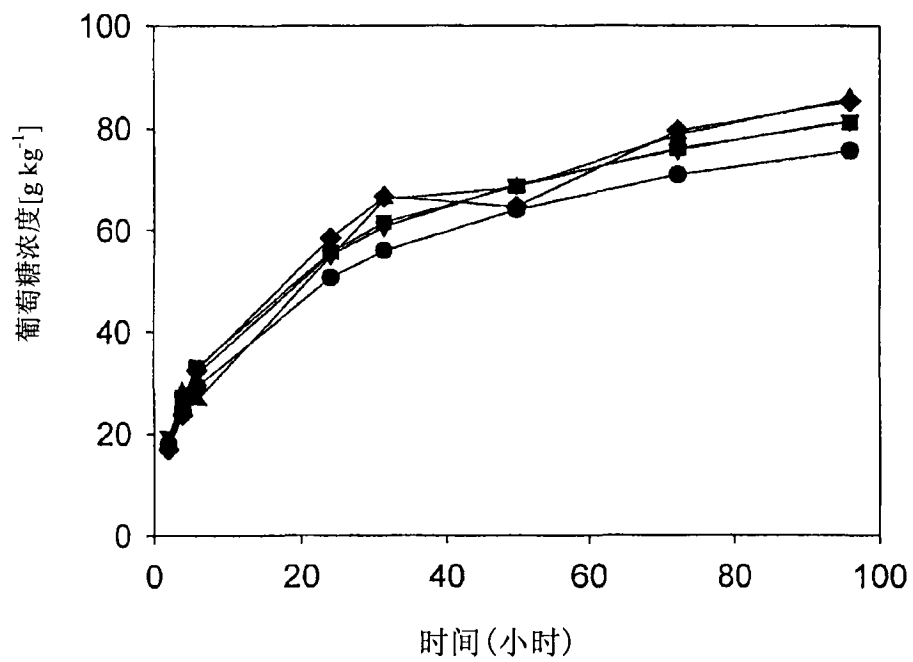
[0111] US2002117167A

[0112] US2004005674A



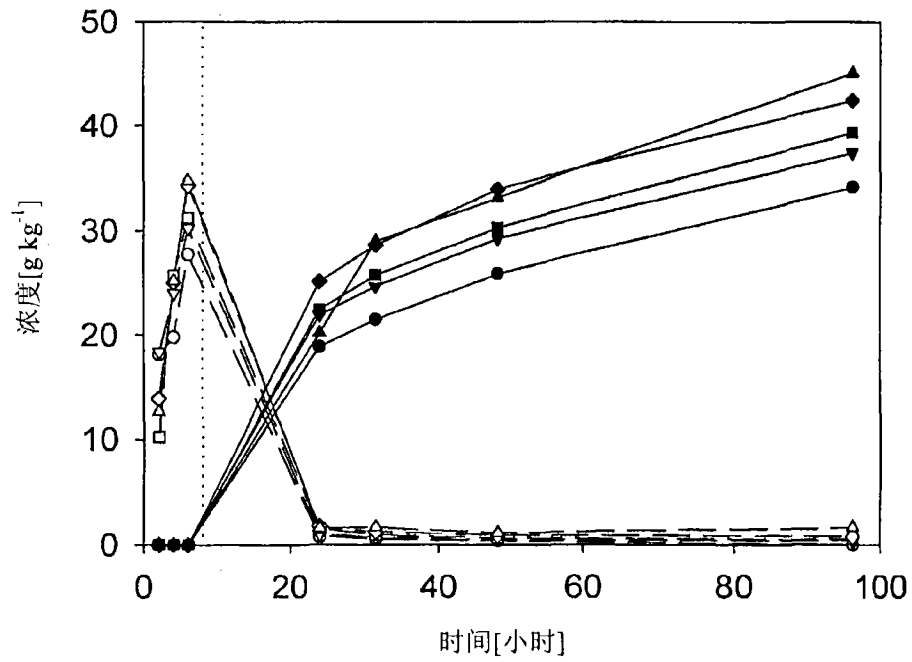
5室水解反应器的纵视图(左)和横视图(右)

图 1



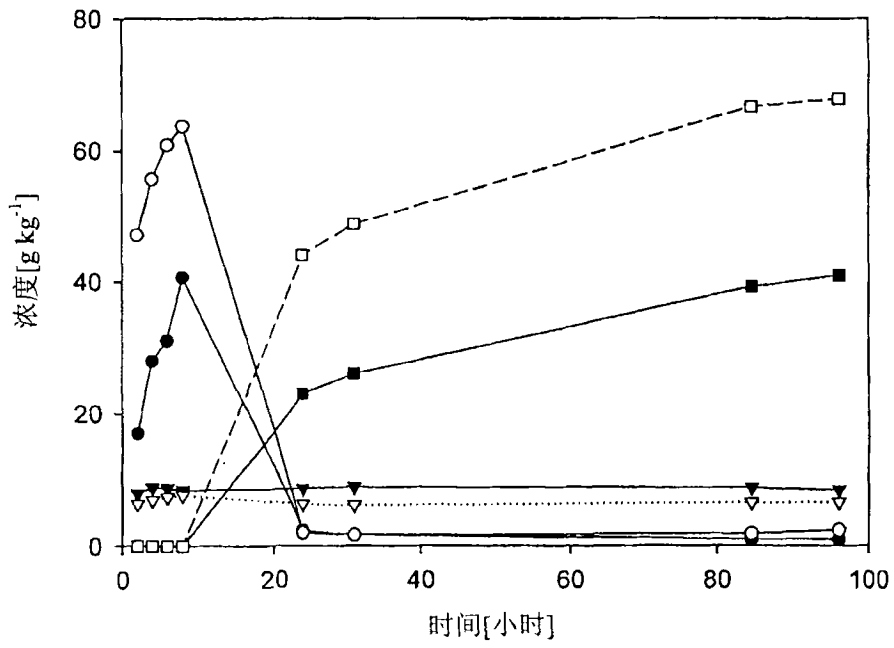
使用 $7 \text{ FPU}(\text{g DM})^{-1}$ 的酶用量在 20% (●)、25% (▼)、30% (■)、35% (◆) 和 40% (▲) 的干物质含量下对预处理的小麦秆液化和水解过程中的葡萄糖浓度

图 2



使用 $7 \text{ FPU}(\text{g DM})^{-1}$ 的酶用量在 20% (●)、25% (▼)、30% (■)、35% (◆) 和 40% (▲) 的干物质含量下对预处理的小麦秆液化、水解和发酵过程中的葡萄糖(空心符号)和乙醇(实心符号)浓度

图 3



对预处理的小麦秆(空心符号)和预处理的小麦秆与小麦粒的混合物(实心符号)液化和发酵过程中的葡萄糖(●)、木糖(▼)和乙醇(■)的浓度

图 4