



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103998615 B

(45)授权公告日 2018.11.06

(21)申请号 201280062065.8

(22)申请日 2012.12.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103998615 A

(43)申请公布日 2014.08.20

(30)优先权数据
61/579,552 2011.12.22 US
61/579,559 2011.12.22 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.06.16

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/071097 2012.12.20

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/096703 EN 2013.06.27

(73)专利权人 希乐克公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 M·梅多夫 T·马斯特曼 M·芬

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

代理人 郝文博

(51)Int.Cl.

C12P 7/16(2006.01)

(56)对比文件

JP 2001000200 A, 2001.01.09,
CN 101434969 A, 2009.05.20,
WO 2011133536 A1, 2011.10.27,
CN 102076862 A, 2011.05.25, 权利要求1-13.
CN 102066063 A, 2011.05.18, 摘要.

Nakata et al..Ethanol production with β -xylosidase, xylose isomerase, and *Saccharomyces cerevisiae* from the hydrolysate of Japanese beech after hot-compressed water treatment.《Journal of Wood Science》.2009, 289-294.

邓攀 等.果糖及葡萄糖混合物为底物的丙酮丁醇发酵.《生物工程学报》.2011, 第27卷(第10期), 1448-1456.

审查员 马驰

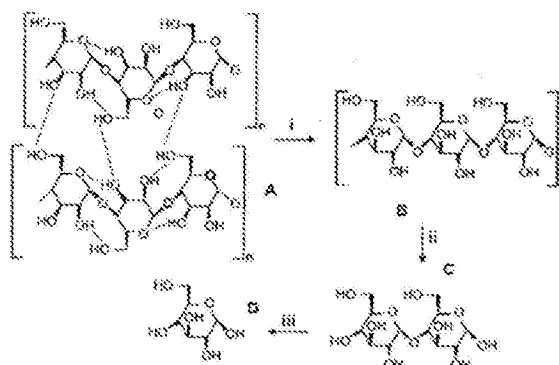
权利要求书1页 说明书25页 附图4页

(54)发明名称

生物质加工

(57)摘要

使用果糖,例如从纤维素或木质纤维素材料衍生的果糖,例如使所述果糖发酵以产生产物,例如溶剂。



1. 一种用于产生醇的方法,所述方法包括:
 - (a) 将纤维素或木质纤维素生物质糖化以产生葡萄糖;
 - (b) 使所述糖化的纤维素或木质纤维素生物质与所选择的以将葡萄糖转化为果糖的异构化试剂接触来产生果糖,并且
 - (c) 用微生物将所述果糖转化成醇同时保持引起所述微生物产生保护性底物的代谢条件,其中保护性底物保护所述微生物防止其受醇的毒性效应影响,且其中所述微生物是梭菌属某些种。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述异构化试剂是异构酶。
3. 如权利要求2所述的方法,其中所述异构酶是木糖异构酶。
4. 如权利要求1所述的方法,其中所述生物质经过处理以减少其对于糖化的不顺应性。
5. 如权利要求4所述的方法,其中所述处理方法选自由以下组成的组:用电子轰击、超声处理、氧化、热解、蒸汽爆炸、化学处理、机械处理、冷冻研磨及其组合。
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述处理方法是用电电子轰击。
7. 如权利要求1所述的方法,其中所述生物质选自由以下组成的组:纸、木材、草、农业废弃物、工业废料和任何这些物质的混合物。
8. 如权利要求1所述的方法,其中所述微生物是糖乙酸多丁醇梭菌。
9. 如权利要求8所述的方法,其中所述微生物是糖乙酸多丁醇梭菌菌株ATCC 27021。
10. 如权利要求8所述的方法,其中所述微生物是糖乙酸多丁醇梭菌菌株ATCC 27022。
11. 如权利要求1所述的方法,其中所述醇包括丁醇。
12. 如权利要求11所述的方法,其中所述丁醇为异丁醇或正丁醇。
13. 如权利要求7所述的方法,其中所述生物质选自由以下组成的组:纸制品、废纸、纸浆、有色纸、装料纸、涂布纸、填充纸、杂志、印刷品、打印纸、涂塑纸、卡片材料、卡纸板、纸板、棉花、刨花板、林业废弃物、锯末、杨木、木屑、柳枝稷、芒草、绳草、草芦、谷物残渣、稻壳、燕麦壳、麦糠、大麦壳、青贮饲料、油菜秸、小麦秸、大麦秸、燕麦秸、稻秸、黄麻、大麻、亚麻、竹子、剑麻、蕉麻、玉米穗轴、玉米秸秆、大豆秸秆、玉米纤维、苜蓿、干草、椰子毛、糖加工残渣、甘蔗渣、甜菜浆、龙舌兰渣、海藻、海草、粪肥、污水、秘鲁胡萝卜、荞麦、香蕉、大麦、木薯、葛藤、圆齿酢浆草、西米、高粱、马铃薯、甘薯、芋头、山药、豆类、蚕豆、扁豆、豌豆和任何这些物质的混合物。

生物质加工

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2011年12月22日提交的美国临时申请号61/579,559的权益。以上申请的全部公开内容以引用的方式并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及将生物质转化成有用产物的方法。具体地说,本发明涉及从糖如果糖产生产物如丁醇。

[0004] 背景

[0005] 随着对石油的需求增加,对用于制造生物燃料和生物化学物质的可再生原料的兴趣也在增加。自20世纪70年代以来已对木质纤维素生物质作为用于所述制造方法的原料的用途进行了研究。木质纤维素生物质因其丰富、可再生、在国内生产,并且不与食品工业用途竞争而具有吸引力。

[0006] 现今可获得许多潜在的木质纤维素原料,包括例如农业残余物、木质生物质、城市废物、油籽/油饼以及海草,仅举几例。目前这些材料用作动物饲料、生物堆肥材料、在联产设施中燃烧抑或被填埋。

[0007] 木质纤维素生物质由于植物细胞壁具有坚硬并且紧凑的结构而难以降解。所述结构包括嵌入半纤维素基质中由木质素围绕着的晶体纤维素原纤维。这种紧凑基质难以由酶以及其它化学、生物化学和生物方法接近。纤维素生物质材料(例如,已基本除去所有木质素的生物质材料)可以更易于由酶和其它转化方法接近,但是即便如此,天然存在的纤维素材料当与水解酶接触时通常具有低产率(相对于理论产率)。木质纤维素生物质甚至更难以受酶攻击。此外,每种类型的木质纤维素生物质具有其自身特定的纤维素、半纤维素和木质素组成。

[0008] 虽然多种方法已试图从木质纤维素生物质中提取结构性碳水化合物,但其不是过于昂贵、生产产率过低、在所得产物中留有不期望的化学物质,就是仅降解糖类。

[0009] 来自可再生生物质源的单糖可以通过代替、补充或取代石油和其它化石原料而成为化学和燃料工业的基础。然而,需要开发将使得可大量并且以可接受的纯度和价格获得这些单糖的技术。

[0010] 发明概述

[0011] 本文提供提高生物质的糖化效率的方法。具体地说,可通过避免酶反应的负反馈抑制来实现效率。

[0012] 在一方面,本发明特征在于用于产生产物的方法,所述方法包括:通过使生物质糖化并且使糖化生物质与异构化试剂接触来产生果糖,并且用微生物和/或酶将果糖转化成产物。

[0013] 在一些实施方式中,所述生物质包含纤维素或木质纤维素材料。例如使用选自由以下组成的组的处理方法:用电子轰击、超声处理、氧化、热解、蒸汽爆炸、化学处理、机械处理、冷冻研磨和其组合,处理纤维素或木质纤维素生物质以减少其对于糖化的不顺应性。

[0014] 异构化试剂可为例如异构酶,例如,木糖异构酶。

[0015] 在一些实施方式中,纤维素或木质纤维素生物质选自由以下组成的组:纸、纸制品、废纸、纸浆、有色纸、装料纸、涂布纸、填充纸、杂志、印刷品、打印纸、涂塑纸 (polycoated paper)、卡片材料、卡纸板、纸板、棉花、木材、刨花板、林业废弃物、锯末、杨木、木屑、草、柳枝稷、芒草、绳草、草芦、谷物残渣、稻壳、燕麦壳、小麦壳、大麦壳、农业废弃物、青贮饲料、油菜秸、小麦秸、大麦秸、燕麦秸、稻秸、黄麻、大麻、亚麻、竹子、剑麻、蕉麻、玉米穗轴、玉米秸秆、大豆秸秆、玉米纤维、苜蓿、干草、椰子毛、糖加工残渣、甘蔗渣、甜菜浆、龙舌兰渣、海藻、海草、粪肥、污水、秘鲁胡萝卜、荞麦、香蕉、大麦、木薯、葛藤、圆齿酢酱草 (oca)、西米、高粱、马铃薯、甘薯、芋头、山药、豆类、蚕豆、扁豆、豌豆、工业废料和任何这些物质的混合物。

[0016] 在一些情况下,微生物包括梭菌属某些种 (*Clostridium* spp.) 的菌株。例如,微生物可为糖乙酸多丁醇梭菌 (*C. saccharoperbutylacetonicum*), 例如,糖乙酸多丁醇梭菌菌株 ATCC27021 或糖乙酸多丁醇梭菌菌株 ATCC27022。

[0017] 产物可包括溶剂,例如,醇如异丁醇或正丁醇。

[0018] 在本文描述的一些实施方案中,虽然总体上优选的是产物如丁醇由来自纤维素或木质纤维素材料的糖,如果糖来产生,但是可使用来自其它来源的果糖。

[0019] 应理解,本发明不限于此概述中所公开的实施方案,并且其旨在涵盖在如由权利要求书所定义的本发明的精神和范围内的修改。

[0020] 附图简述

[0021] 上文将由如附图中所示的本发明的以下示例性实施方案的更具体的描述而显而易见,在附图中,相似参考标号指所有不同视图中的相同部分。附图不必按比例绘制,而是将重点放在示出本发明的实施方案上。

[0022] 图1是示出纤维素酶促水解成葡萄糖的的图表。纤维素底物 (A) 由内切纤维素酶 (i) 转化为纤维素 (B), 所述纤维素 (B) 由外切纤维素酶 (ii) 转化为纤维二糖 (C), 所述纤维二糖 (C) 由纤维二糖酶 (β -葡萄糖苷酶) (iii) 转化为葡萄糖 (D)。

[0023] 图2是图示生物质原料转化成一种或多种产物的流程图。将原料通过物理方式预处理 (例如,减小其尺寸) (200), 任选地处理以减小其不顺应性 (210), 糖化以形成糖溶液 (220), 将溶液运输 (230) 至制造厂 (例如,通过管道、有轨车) (或如果糖化在途中执行,则运输原料、酶和水), 将糖化原料生物加工以产生所需产物 (例如,醇) (240), 并且产物可例如通过蒸馏来进一步加工以产生最终产物 (250)。对于不顺应性的处理可通过测量木质素含量 (201) 并且设置或调整过程参数 (205) 来修改。使原料糖化 (220) 可通过将原料与培养基和酶混合 (221) 来修改。

[0024] 图3是显示葡萄糖和果糖的代谢的制备相的图表。

[0025] 图4是显示果糖代谢期间形成甘油三酯的代谢途径的图表。

[0026] 图5是显示丁醇产生有机体的发酵途径的图表。

[0027] 详述

[0028] 本发明涉及加工生物质材料 (例如,生物质材料或生物质衍生材料) 以获得糖如果糖的方法,然后,所述糖可用于产生产物。例如,糖,例如果糖可发酵以产生溶剂,如醇,例如丁醇,例如,异丁醇或正丁醇。也可产生丁酸。本发明人已经发现在一些情况下与葡萄糖溶液相比,果糖溶液可更快速地并且以更好产量来发酵成醇。

[0029] 不受任何特定理论的束缚,据信产物如溶剂(例如,丁醇)对于溶剂产生生物体具有毒性,并且与葡萄糖代谢相比,使用一些糖如果糖的代谢在更大程度上或更快地产生保护性底物(例如,甘油三酯)。溶剂的暗示效应是其与细胞膜相互作用,从而干扰膜流动性。还认为溶剂,如丁醇对于膜具有离液效应。离液试剂干扰由非共价力介导的稳定化分子内相互作用。由于这些效应,溶剂可抑制活性营养物质运输、膜结合酶的活性和葡萄糖摄取。溶剂还可部分或完全地消除膜pH梯度、降低细胞内pH和ATP浓度。响应于溶剂增加,细胞可试图调整脂质组成以保持流动性(Christopher A.Tomas,J.Bacteriol.186:2006-2018(2004))。果糖代谢可促进脂质如甘油三酯的增加。

[0030] 不受任何特定理论的束缚,进一步认为糖如果糖对于溶剂产生的益处可与糖酵解的调控相关。调控的目的是控制有机体的生长和健康。据信因为一些糖如果糖并非如葡萄糖那样在世界上天然地丰富,所以抑制其糖酵解的调控机制没有得到很好的开发。这可允许那些糖如果糖通过有机体的更高摄取和代谢。

[0031] 如图1所示,例如,在糖化期间,纤维素底物(A)由内切葡聚糖酶(i)在随机位置初始水解,以产生低聚中间体(例如,纤维素)(B)。这些中间体随后为外切葡聚糖酶(ii)(如纤维二糖水解酶)的底物,以从纤维素聚合物的末端产生纤维二糖。纤维二糖是水溶性的1,4-连接的葡萄糖二聚体。最后纤维二糖酶(iii)裂解纤维二糖(C)以得到葡萄糖(D)。因此,内切葡聚糖酶特别有效于攻击纤维素的晶体部分以及增加外切纤维素酶的效力以产生纤维二糖,这随后需要纤维二糖的特异性来产生葡萄糖。因此,明显的是,取决于纤维素底物的性质和结构,可能需要改变三种不同酶的数量和类型。

[0032] 制造醇,例如丁醇的过程示于图2。制造醇的过程可包括,例如,任选地机械处理原料以例如减小其尺寸(200),在此处理之前和/或之后,任选地以另一个物理处理来处理原料以进一步减少其不顺应性(210),然后使用酶复合物来使原料糖化,以形成糖溶液(220)。任选地,所述方法还可包括例如通过管道、有轨车、卡车或驳船来将溶液(或原料、酶和水,如果糖化在途中执行)运输至制造厂(230)。在一些情况下,将糖化原料进一步生物加工(例如,发酵)以产生所需产物例如,醇(240)。在一些实施方式中,此所得产物可例如通过蒸馏(250)来进一步处理以产生最终产物。减少原料的不顺应性的一种方法是通过原料的电子轰击。如果需要,测量原料的木质素含量(201)和基于此测量来设置或调整过程参数(205)的步骤可在此过程的不同阶段来执行,如2010年8月12日公开的Medoff和Masterman的美国专利申请公布2010/0203495A1所描述,所述申请的全部公开内容以引用方式并入本文。使原料糖化(220)还可通过将原料与培养基和酶混合(221)来修改。

[0033] 以上参照图2讨论的方法步骤现在进一步详细地讨论,随后对于此过程中的材料进行讨论。

[0034] 果糖发酵成有用产物

[0035] 通过糖化或糖化随后异构化来产生的果糖溶液可发酵以产生醇,例如,丁醇,或丁酸。

[0036] 图3示出果糖和葡萄糖的糖酵解的制备相。发酵包括多相糖酵解反应,其制备相产生甘油醛3-磷酸。如图3所示并且如下详细地讨论,与从葡萄糖产生相比,从果糖产生甘油醛3-磷酸涉及较少反应,与葡萄糖发酵相比,这可促成通过果糖发酵所观察到的较大效率。

[0037] 参看图3中的葡萄糖途径,葡萄糖通过己糖激酶与ATP的作用来转化成葡萄糖6-磷

酸。然后,通过磷酸己糖异构酶将葡萄糖6-磷酸异构化成果糖6-磷酸,并且然后通过磷酸果糖激酶和ATP的作用来进一步转化成果糖1,6-磷酸。在这一点上,二磷酸糖被果糖二磷酸醛缩酶切分成二羟丙酮磷酸和甘油醛3-磷酸。通过丙糖磷酸异构酶的作用将二羟丙酮磷酸异构化成甘油醛3-磷酸。

[0038] 再次参看图3,存在果糖的糖酵解的多个路径。虽然己糖激酶与葡萄糖强烈反应,但是其对于果糖的亲合力较低。因此,虽然果糖可通过己糖激酶和ATP来磷酸化成葡萄糖6-磷酸,但是预期此途径对于糖酵解的贡献相当低。更可能路径开始于果糖通过果糖激酶和ATP的作用来磷酸化,从而产生果糖1-磷酸。然后,果糖1-磷酸被果糖1-磷酸醛缩酶切分成二羟丙酮磷酸和D-甘油醛。如在葡萄糖途径中,通过丙糖磷酸异构酶将二羟丙酮磷酸异构化成甘油醛3-磷酸。通过丙糖激酶和ATP将D-甘油醛转化成甘油醛3-磷酸。

[0039] 优选地选择用于发酵的微生物以产生丁醇例如,异丁醇或正丁醇。合适的微生物包括在以下材料部分中论述的那些微生物。许多丁醇产生生物体是专性嫌气微生物。

[0040] 果糖可驱动作为糖酵解副产物的甘油三酯的产生,如图4所示。图4中显示的形成甘油三酯的最终步骤涉及甘油3-磷酸与脂肪酸之间的酯化。脂肪酸从甘油醛3-磷酸来形成,所述甘油醛3-磷酸的形成已经如上描述,其中多个中间体未在此显示。甘油3-磷酸的形成显示于图4并且可通过甘油3-磷酸脱氢酶对于二羟丙酮磷酸的作用来发生。这还可经由甘油脱氢酶D-甘油醛的作用来发生,从而形成甘油,然后所述甘油以甘油激酶和ATP来磷酸化成甘油3-磷酸。虽然从葡萄糖经由二羟丙酮磷酸中间体来形成甘油3-磷酸是可能的,但是通过只可经由果糖来获得的D-甘油醛的额外途径可产生更多此中间体。由甘油3-磷酸的酯化产生的甘油三酯可通过防止丁醇产生有机体受丁醇的毒性效应影响来有助于产生丁醇。

[0041] 图5示出丁醇产生有机体(丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*))的发酵途径。在典型发酵中,在诱导期之后,细胞进入指数生长相。在生长相中,首先与细胞生长必需的ATP一起来产生丁酸和乙酸。此相也称为酸化相。处于接近中的,并且在固定相中,培养物经历朝向形成作为主要溶剂产物的丙酮、丁醇和乙醇的代谢转变。此阶段也称为产溶剂相。在产溶剂相期间和之后,细胞将变得滋养生长、死亡和/或产孢。在图5中,反应由粗体箭头表示并且由符号R1至R19指示。产酸反应是R9和R18(分别由PTA-AK和PTB-BK催化),分别生成乙酸和丁酸。两种酸经由R7和R17(R9和R18的反向路径)再吸收,或经由R8和R15(由辅酶A转移酶(CoAT)催化)直接转化成乙酰辅酶A和丁酰辅酶A。产溶剂反应是R11、R16和R19(分别由AAD、AADC和BDH催化),分别生成乙醇、乙酸和丁醇。R14是由BHBD、CRO和BCD催化的反应组成的集中反应(<http://www.biomedcentral.com/1752-0509/5/S1/S12>“An improved kinetic model for the acetone-butanol-ethanol pathways of *Clostridium acetobutylicum* and model-based perturbation analysis”)。

[0042] 发酵的最佳pH是约pH4至7。典型的发酵时间是约24小时至168小时,温度在20℃至40℃的范围内,而嗜热微生物偏好更高的温度。对于厌氧有机体来说,优选的是在不存在氧时例如,在惰性气体如N₂、Ar、He、CO₂或其混合物的覆盖层下进行发酵。另外,混合物可具有在部分或全部发酵期间流经储罐的惰性气体的恒定吹扫。

[0043] 射流混合或其它搅动可在发酵期间使用,并且在一些情况下糖化和发酵在同一储罐中执行。在一些实施方案中,发酵在没有任何机械混合的情况下进行。

[0044] 营养物可在糖化和/或发酵期间添加,例如在USSN61/365,493和US6,358,717中描述的基于食品的营养物封包,所述参考文献的全部公开内容以引用方式并入本文。

[0045] 可利用移动发酵罐,如美国序列号12/374,549和国际申请号W02008/011598中所描述。类似地,糖化设备可以是可移动的。此外,糖化和/或发酵可以在转运期间部分或完全地进行。

[0046] 优选的发酵剂

[0047] 在发酵中使用的微生物可以是天然存在的微生物和/或工程微生物。例如,微生物可以是细菌(例如,纤维素分解细菌)、真菌(例如,酵母)、植物或原生生物(例如,海藻)、原生动物或类真菌原生生物(例如,黏菌)。当有机体相容时,可以使用有机体的混合物。

[0048] 合适的发酵微生物具有将果糖和优选地也将其它糖,如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、寡糖或多糖转化为醇,例如,丁醇或丁醇衍生物的能力。

[0049] 示例性微生物包括但不限于,以下梭菌属菌株:

[0050] 表1. 示例性梭菌属菌株

[0051]

糖乙酸多丁醇梭菌	ATCC27021
糖乙酸多丁醇梭菌	ATCC27022
糖丁醇梭菌 (<i>C.saccharobutylicum</i>)	ATCC BAA-117
紫色梭菌 (<i>C.puniceum</i>)	ATCC43978
拜氏梭菌 (<i>C.beijernckii</i>)	ATCC6014
丙酮丁醇梭菌 (<i>C.acetobutylicum</i>)	NRRL B-527
丙酮丁醇梭菌	NRRL B-591
拜氏梭菌	NRRL B593
丙酮丁醇梭菌	NRRL B-596
拜氏梭菌	ATCC11914
丙酮丁醇梭菌	DSM1732
拜氏梭菌	NRRL B-592
丙酮丁醇梭菌	ATCC3625
糖丁醇梭菌	NRRL B-643
丙酮丁醇梭菌	NRRL B595
玫瑰色梭菌 (<i>C.roseum</i>)	NRRL17797
丙酮丁醇梭菌	ATCC4259
金黄丁酸梭菌 (<i>C.aurantibutyricum</i>)	DSM793
拜氏梭菌	ATCC309058
费新尼亚梭菌 (<i>C.felsineum</i>)	ATCC17788
糖丁醇梭菌	NRRL B-643

[0052] 木糖异构酶

[0053] 木糖异构酶 (ES5.3.1.5) 是在D-木糖与D-木酮糖之间来回催化化学反应的酶。它也被系统地称为葡萄糖异构酶和D-木糖醛糖-酮糖异构酶,并且属于异构酶家族,确切地说是使醛糖和酮糖相互转化的那些分子内氧化还原酶类。其它常用名称包括D-木糖异构酶、

D-木糖酮异构酶,以及D-木糖酮醇-异构酶。所述酶参与戊糖与葡萄糖醛酸酯相互转化以及果糖与甘露糖代谢。在高果糖玉米糖浆的制造中,工业上使用它来将葡萄糖转化为果糖。有时它称为“葡萄糖异构酶”。“木糖异构酶”和“葡萄糖异构酶”在本文可互换地使用。在体外,葡萄糖异构酶催化葡萄糖与果糖的相互转化。在体内,它催化木糖与木酮糖的相互转化。

[0054] 若干类型的酶被认为是木糖异构酶。第一种产自嗜水假单胞菌 (*Pseudomonas hydrophila*)。此酶与葡萄糖的亲合力比与木糖的亲合力低160倍,但尽管如此其适用于在葡萄糖的存在下增加果糖的量。第二种酶发现于中间型埃希杆菌 (*Escherichia intermedia*) 中。此酶是磷酸葡萄糖异构酶 (EC5.3.1.9) 并且可仅在砷酸盐的存在下使未磷酸化的糖异构化。葡萄糖异构酶 (EC5.3.1.6) 可分离自巨大芽孢杆菌 AI (*Bacillus megaterium* AI) 并且为NAD连接型并对葡萄糖是特异性的。具有相似活性的另一种葡萄糖异构酶是从类产气副大肠杆菌 (*Paracolobacterium aerogenoide*) 中分离的。由异质乳酸菌产生的葡萄糖异构酶需要木糖作为诱导物并且在高温下相对不稳定。木糖异构酶 (EC5.3.1.5) 最适用于商业应用,因为其不需要昂贵的辅因子,如NAD⁺或ATP,并且其为相对热稳定的。

[0055] 葡萄糖异构酶通常在细胞间产生,但是葡萄糖异构酶的细胞外分泌的报道是已知的。所使用的酶可分离自许多细菌,所述细菌包括但不限于:*Actinomyces olivocinereus*、*Actinomyces phaeochromogene*、密苏里游动放线菌 (*Actinoplanes missouriensis*)、产气杆菌 (*Aerobacter aerogenes*)、阴沟气杆菌 (*Aerobacter cloacae*)、果聚糖气杆菌 (*Aerobacter levanicum*)、节杆菌属某些种 (*Arthrobacter* spp.)、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*)、巨型芽孢杆菌 (*Bacillus megabacterium*)、凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*)、双歧杆菌属某些种 (*Bifidobacterium* spp.)、未完短杆菌 (*Brevibacterium incertum*)、*Brevibacterium pentosoaminoacidicum*、钦氏菌属某些种 (*Chainia* spp.)、棒状杆菌属某些种 (*Corynebacterium* spp.)、栗色棒状杆菌 (*Cortobacterium helvolum*)、弗罗因德埃希杆菌 (*Escherichia freundii*)、中间型埃希杆菌 (*Escherichia intermedia*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、树状黄杆菌 (*Flavobacterium arborescens*)、贪食黄杆菌 (*Flavobacterium devorans*)、短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*)、布氏乳杆菌 (*Lactobacillus buchneri*)、发酵乳杆菌 (*Lactobacillus fermenti*)、甘露醇乳杆菌 (*Lactobacillus mannitopoeus*)、盖氏乳杆菌 (*Lactobacillus gayonii*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、蕃茄乳杆菌 (*Lactobacillus lycopersici*)、戊糖乳杆菌 (*Lactobacillus pentosus*)、肠膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)、玫瑰小双孢菌 (*Microbispora rosea*)、黄小荚孢囊菌 (*Microellobosporia flavea*)、天蓝色小单孢菌 (*Micromonospora coerula*)、分支杆菌属某些种 (*Mycobacterium* spp.)、星形诺卡氏菌 (*Nocardia asteroides*)、珊瑚诺卡氏菌 (*Nocardia corallia*)、德松威利氏诺卡氏菌 (*Nocardia dassonvillei*)、类产气副大肠杆菌 (*Paracolobacterium aerogenoide*)、假诺卡氏菌属某些种 (*Pseudonocardia* spp.)、嗜水假单胞菌 (*Pseudomonas hydrophila*)、八叠球菌属某些种 (*Sarcina* spp.)、*Staphylococcus bibila*、黄绿色葡萄球菌 (*Staphylococcus flavovirens*)、*Staphylococcus echinatus*、不产色链球菌 (*Streptococcus achromogenes*)、产褐色链球菌 (*Streptococcus phaeochromogenes*)、弗氏链球菌 (*Streptococcus fracliae*)、玫瑰产

色链球菌 (*Streptococcus roseochromogenes*)、橄榄色链球菌 (*Streptococcus olivaceus*)、加州链球菌 (*Streptococcus californicus*)、*Streptococcus venueus*、*Streptococcus virginial*、橄榄产色链霉菌 (*Streptomyces olivochromogene*)、*Streptococcus venezaelie*、威德摩尔链球菌 (*Streptococcus wedmorensis*)、浅灰链球菌 (*Streptococcus griseolus*)、淡青链球菌 (*Streptococcus glaucescens*)、比基尼链球菌 (*Streptococcus bikiniensis*)、赤褐色链球菌 (*Streptococcus rubiginosus*)、*Streptococcus achinatus*、肉桂地链球菌 (*Streptococcus cinnamonensis*)、弗氏链球菌 (*Streptococcus fradiae*)、白色链球菌 (*Streptococcus albus*)、灰色链球菌 (*Streptococcus griseus*)、*Streptococcus hivers*、马特链球菌 (*Streptococcus matensis*)、鼠灰色链球菌 (*Streptococcus murinus*)、雪白链球菌 (*Streptococcus nivens*)、普拉特链球菌 (*Streptococcus platensis*)、白色链孢子囊菌 (*Streptosporangium album*)、*Streptosporangium oulgare*、热多孢菌属某些种 (*Thermopolyspora* spp.)、栖热菌属某些种 (*Thermus* spp.)、黄单胞菌属某些种 (*Xanthomonas* spp.) 以及运动发酵单孢菌 (*Zymomonas mobilis*)。

[0056] 葡萄糖异构酶可在溶液中游离地使用或者固定在载体上以便将葡萄糖转化成果糖。可固定全细胞或不含细胞的酶。载体结构可为任何不溶性材料。载体结构可为阳离子材料、阴离子材料或中性材料,例如二乙氨基乙基纤维素、金属氧化物、金属氯化物、金属碳酸盐以及聚苯乙烯。固定可通过任何合适的手段来实现。例如,固定可通过使载体与全细胞或酶在溶剂(如水)中接触并随后去除溶剂来实现。溶剂可通过任何合适的手段(例如过滤或蒸发或喷雾干燥)来去除。作为另一个实例,喷雾干燥具有载体的全细胞或酶可为有效的。

[0057] 葡萄糖异构酶也可以存在于活细胞中,所述活细胞在所述过程期间产生所述酶。例如,葡萄糖异构酶产生细菌可以在所述过程中与乙醇发酵细菌共培养。或者,葡萄糖异构酶产生细菌可首先与底物接触,随后用乙醇产生底物接种。

[0058] 葡萄糖异构酶还可存在于能够进行糖的进一步有用转变的细胞内或从所述细胞中分泌。例如,可对葡萄糖发酵物种进行基因修饰以含有并表达用于产生葡萄糖异构酶的基因。

[0059] 溶剂的分离

[0060] 发酵后,所得流体可使用任何适用方法来纯化。例如,一些适用方法是蒸馏、吸附、液-液萃取、渗透萃取、反渗、渗透蒸发和气提(参见例如, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2009) 36:1127-1138)。

[0061] 生物质材料

[0062] 如本文使用的术语“生物质材料”包括木质纤维素、纤维素、淀粉以及微生物材料。

[0063] 木质纤维素材料包括但不限于木材、刨花板、林业废弃物(例如,锯末、杨木、木屑)、草(例如,柳枝稷、芒草、绳草、草芦)、谷物残渣(例如,稻壳、燕麦壳、小麦壳、大麦壳)、农业废弃物(例如,青贮饲料、油菜秸、小麦秸、大麦秸、燕麦秸、稻秸、黄麻、大麻、亚麻、竹子、剑麻、蕉麻、玉米穗轴、玉米秸秆、大豆秸秆、玉米纤维、苜蓿、干草、椰子毛)、糖加工残渣(例如,甘蔗渣、甜菜浆、龙舌兰渣)、海藻、海草、粪肥、污水、以及任何这些的混合物。

[0064] 在一些情况下,木质纤维素材料包括玉米穗轴。磨碎或锤磨粉碎的玉米穗轴可以相对均匀厚度的层进行铺展以用于照射,并且在照射之后易于分散在介质中以进行进一步

加工。为了促进收获和收集,在一些情况下,使用整个玉米植株,包括玉米秸秆、玉米粒,并且在一些情况下甚至包括所述植株的根系统。

[0065] 有利地,在玉米穗轴或含有显著大量玉米穗轴的纤维素或木质纤维素材料的发酵期间不需要另外的营养物(除了氮源,例如尿素或氨之外)。

[0066] 玉米穗轴在粉碎之前和之后也更易于输送和分散,并且与如干草和草的其它纤维素或木质纤维素材料相比,具有较小的在空气中形成爆炸混合物的倾向。

[0067] 纤维素材料包括例如纸、纸制品、废纸、纸浆、着色纸、装载纸、涂覆纸、填充纸、杂志、印刷品(例如,书、目录、手册、标签、日历、贺卡、小册子、内容说明书、新闻用纸)、打印纸、多涂层纸、卡片坯料、硬纸板、纸板、具有高 α -纤维素含量的材料(如棉花),以及任何这些的混合物。例如,如美国申请号13/396,365(在2012年2月14日由Medoff等提交的“Magazine Feedstocks”)中所述的纸制品,所述申请的全部公开内容以引用的方式并入本文。

[0068] 纤维素材料还可包括已脱木质化的木质纤维素材料。

[0069] 淀粉材料包括淀粉本身(例如玉米淀粉、小麦淀粉、马铃薯淀粉或米淀粉)、淀粉衍生物或者包括淀粉的材料(如可食用的食物产品或农作物)。例如,淀粉材料可以是秘鲁胡萝卜、荞麦、香蕉、大麦、木薯、葛藤、圆齿酢酱草(*oca*)、西米、高粱、普通家用马铃薯、甜薯、芋头、山药、或一种或多种豆类,如蚕豆、扁豆或豌豆。任何两种或更多种淀粉材料的共混物也是淀粉材料。还可使用淀粉、纤维素和或木质纤维素材料的混合物。例如,生物质可以是整个植株、植株的一部分或植株的不同部分,例如,小麦植株、棉花植株、玉米植株、水稻植株或树。可通过本文所述的任何方法处理淀粉材料。

[0070] 微生物材料包括但不限于含有或能够提供碳水化合物(例如,纤维素)源的任何天然存在或基因修饰的微生物或有机体,例如原生生物,例如动物原生生物(例如,原生动物,如鞭毛虫、变形虫、纤毛虫和孢子虫)和植物原生生物(例如,海藻,如alveolates、chlorarachniophytes、隐藻、裸藻、灰藻、定鞭藻、红藻、不等鞭毛藻、以及绿色植界(viridiaeplantae))。其它实例包括海草、浮游生物(例如,大型浮游生物、中型浮游生物、小型浮游生物、微型浮游生物、超微型浮游生物以及超微微型浮游生物)、浮游植物、细菌(例如,革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌以及极端微生物)、酵母和/或这些的混合物。在一些情况下,微生物生物质可从天然来源获得,例如海洋、湖泊、水体(例如,咸水或淡水)或在陆地上。或者或另外,微生物生物质可从培养系统获得,例如大规模干燥与湿润培养和发酵系统。

[0071] 生物质材料还可包括下水和类似来源的材料。

[0072] 在其它实施方案中,如纤维素、淀粉和木质纤维素原料材料的生物质材料可从已相对于野生型品种修饰的转基因微生物和植物获得。所述修饰可例如通过选择和育种的迭代步骤来在植物中获得所希望的性状。此外,所述植物相对于野生型品种可已被去除、修饰、沉默和/或添加遗传材料。例如,遗传修饰的植物可通过重组DNA方法产生,其中遗传修饰包括引入或修饰来自亲本品种的特定基因;或者例如通过使用转基因育种来产生,其中将一个或多个特定基因从不同品种的植物和/或细菌中引入到植物中。形成遗传变异的另一种方式是通过突变育种,其中新的等位基因由内源基因人工形成。人工基因可通过多种方式形成,所述方式包括用例如化学诱变剂(例如,使用烷化剂、环氧化物、生物碱、过氧化

物、甲醛)、照射(例如,X-射线、 γ 射线、中子、 β 粒子、 α 粒子、质子、氘核、UV辐射)以及温度冲击或其它外部应力处理植株或种子,以及随后的选择技术。提供修饰的基因的其它方法是通过易错PCR和DNA改组,随后将所希望的修饰的DNA插入到所希望的植株或种子中。在种子或植株中引入所希望的遗传变异的方法包括例如细菌载体的使用、基因枪、磷酸钙沉淀法、电穿孔、基因剪接、基因沉默、脂转染、微量注射以及病毒载体。另外的遗传修饰的材料已在2012年2月14日提交的美国申请序列号13/396,369中描述,所述申请的全部公开内容以引用的方式并入本文。

[0073] 可使用本文所述的任何生物质材料的混合物实践本文所述的任何方法。

[0074] 生物质材料制备-机械处理

[0075] 生物质可处于干燥形式,例如具有小于约35%含湿量(例如,小于约20%、小于约15%、小于约10%、小于约5%、小于约4%、小于约3%、小于约2%或甚至小于约1%)。生物质还可在湿润状态下例如作为湿固体、具有至少约10wt%固体的浆液或悬浮液(例如,至少约20wt.%、至少约30wt.%、至少约40wt.%、至少约50wt.%、至少约60wt.%、至少约70wt.%)递送。

[0076] 本文公开的方法可利用低堆积密度材料,例如已物理预处理成具有小于约0.75g/cm³,例如小于约0.7、0.65、0.60、0.50、0.35、0.25、0.20、0.15、0.10、0.05或更小,例如小于约0.025g/cm³的堆积密度的纤维素或木质纤维素原料。使用ASTM D1895B确定堆积密度。简单地说,所述方法涉及用样品填充具有已知体积的量筒以及获得样品的重量。堆积密度通过用样品重量(克)除以已知的量筒体积(立方厘米)来计算。如果需要,可通过Medoff的美国专利号7,971,809中所述的方法对低堆积密度材料进行致密化,所述专利的全部公开内容以引用的方式由此并入。

[0077] 在一些情况下,预处理加工包括生物质材料的筛选。可通过具有所希望的开口尺寸的网或多孔板进行筛选,所述开口尺寸例如小于约6.35mm(1/4英寸,0.25英寸)(例如,小于约3.18mm(1/8英寸,0.125英寸)、小于约1.59mm(1/16英寸,0.0625英寸)、小于约0.79mm(1/32英寸,0.03125英寸)、例如小于约0.51mm(1/50英寸,0.02000英寸)、小于约0.40mm(1/64英寸,0.015625英寸)、小于约0.23mm(0.009英寸)、小于约0.20mm(1/128英寸,0.0078125英寸)、小于约0.18mm(0.007英寸)、小于约0.13mm(0.005英寸),或甚至小于约0.10mm(1/256英寸,0.00390625英寸))。在一种配置中,所希望的生物质通过穿孔或筛网掉落,并且因此不照射大于穿孔或筛网的生物质。这些较大材料可以例如通过粉碎来重新加工或者可简单地将其从加工中去除。在另一种配置中,照射大于穿孔的材料并且通过筛选方法去除较小材料或将其再循环。在这种配置中,输送器本身(例如,输送器的一部分)可为有穿孔的或者用网制成。例如,在一个具体实施方案中,生物质材料可以是湿的并且穿孔或网允许在照射之前将水从生物质中排出。

[0078] 材料的筛选还可通过手动方法,例如通过去除不想要的材料的操作员或机械体(例如,配备有颜色、反射率或其它传感器的机器人)进行。筛选还可通过磁筛选进行,其中将磁铁设置在输送的材料附近并且通过磁力去除磁性材料。

[0079] 任选预处理加工可包括加热材料。例如,输送器的一部分可传送通过加热区域。加热区域可例如通过IR辐射、微波、燃烧(例如,气体、煤、油、生物质)、电阻性加热和/或感应线圈来形成。可从至少一个侧面或一个以上侧面施加热量,热量可以是连续的或间断的,并

且可仅用于部分材料或者用于所有材料。例如,可通过使用加热套来加热输送溜槽的一部分。可以例如出于干燥材料的目的进行加热。在干燥材料的情况下,在加热或不加热的情况下,这还可通过在正在输送生物质时,气体(例如,空气、氧气、氮气、He、CO₂、氩气)在生物质上和/或通过所述生物质的移动来促进。

[0080] 任选地,预处理加工可包括冷却所述材料。冷却材料在Medoff的美国专利号7,900,857中描述,所述专利的公开内容以引用的方式并入本文。例如,可通过将冷却流体,例如水(例如,具有甘油)或氮(例如,液氮)供应至输送溜槽的底部来进行冷却。或者,可将冷却气体,例如冷冻氮气吹送到生物质材料上或输送系统下。

[0081] 另一种任选的预处理加工方法可包括向生物质添加一种材料。所述另外的材料可以(例如)通过在输送所述生物质时将材料喷淋、喷洒和或倾倒至生物质上来添加。可添加的材料包括例如金属、陶瓷和/或离子,如美国专利申请公布2010/0105119A1(2009年10月26日提交)和美国专利申请公布2010/0159569A1(2009年12月16日提交)中所描述,所述公布的全部公开内容以引用的方式并入本文。可添加的任选材料包括酸和碱。可添加的其它材料为氧化剂(例如,过氧化物、氯酸盐)、聚合物、可聚合单体(例如,含有不饱和键)、水、催化剂、酶和/或有机体。可例如以纯的形式、作为在溶剂(例如,水或有机溶剂)中的溶液和/或作为溶液添加材料。在一些情况下,溶剂是挥发性的并且可例如通过加热和/或吹送如先前所述的气体使其蒸发。添加的材料可在生物质上形成均匀涂层或者为不同组分(例如,生物质和另外的材料)的均匀混合物。添加的材料可通过增加照射效率、阻尼照射或改变照射效果(例如,从电子束至X-射线或加热)来调节随后的照射步骤。所述方法可不影响照射,但可对进一步的下游加工有用。添加的材料可例如通过降低粉尘水平来帮助输送材料。

[0082] 生物质可通过皮带输送机、气动输送机、螺旋输送机、料斗、管、手动或者通过这些的组合递送至输送机。可通过任何这些方法将生物质例如滴加、倾倒和/或放置在输送机上。在一些实施方案中,使用封闭的材料分配系统将材料递送至输送机,以帮助维持低氧气氛和/或控制粉尘和细粉。漂浮的或空气悬浮的生物质细粉和粉尘是不希望的,因为这些可形成爆炸隐患或损害电子枪的窗口箔(如果所述装置用于处理材料)。

[0083] 可使材料均衡以形成在约0.0312英寸与5英寸之间的统一厚度(例如,在约0.0625英寸与2.000英寸之间、在约0.125英寸与1英寸之间、在约0.125英寸与0.5英寸之间、在约0.3英寸与0.9英寸之间、在约0.2英寸与0.5英寸之间、在约0.25英寸与1.0英寸之间、在约0.25英寸与0.5英寸之间、0.100+/-0.025英寸、0.150+/-0.025英寸、0.200+/-0.025英寸、0.250+/-0.025英寸、0.300+/-0.025英寸、0.350+/-0.025英寸、0.400+/-0.025英寸、0.450+/-0.025英寸、0.500+/-0.025英寸、0.550+/-0.025英寸、0.600+/-0.025英寸、0.700+/-0.025英寸、0.750+/-0.025英寸、0.800+/-0.025英寸、0.850+/-0.025英寸、0.900+/-0.025英寸、0.900+/-0.025英寸)。

[0084] 一般来说,优选尽可能快地将材料输送通过电子枪以使流通量最大化。例如,可以至少1ft/min的速率,例如至少2ft/min、至少3ft/min、至少4ft/min、至少5ft/min、至少10ft/min、至少15ft/min、20、25、30、35、40、45、50ft/min的速率输送材料。输送速率与射束电流相关,例如对于1/4英寸厚的生物质和100mA,输送机可以约20ft/min移动以提供有用的照射剂量,在50mA下,输送机可以约10ft/min移动以提供近似相同的照射剂量。

[0085] 生物质材料在输送通过辐射区域之后,可进行任选后处理加工。任选后处理加工

可以是例如相对于预照射加工所描述的方法。例如,生物质可进行筛选、加热、冷却和/或与添加剂组合。对于后照射独特的是可发生自由基的淬灭,例如通过添加流体或气体(例如,氧气、一氧化二氮、氨、液体)、使用压力、加热和/或添加自由基清除剂进行自由基的淬灭。例如,可将生物质输送出封闭的输送机并将其暴露于气体(例如,氧气),其在所述气体中淬灭,从而形成羧基化基团。在一个实施方案中,在照射反应性气体或流体期间暴露生物质。已照射的生物质的淬灭在Medoff的美国专利号8,083,906中描述,所述专利的全部公开内容以引用的方式并入本文。

[0086] 如果需要,可使用除照射之外的一种或多种机械处理以进一步减小生物质材料的不顺应性。可在照射之前、期间和或之后应用这些方法。

[0087] 在一些情况下,机械处理可包括如通过粉碎(例如切割、研磨、剪切、磨粉或斩切)来初始制备所接收的原料,如材料的尺寸缩减。例如,在一些情况下,通过剪切或切剁来制备疏松原料(例如,再循环的纸、淀粉材料或柳枝稷)。机械处理可减小生物质材料的堆积密度、增加生物质材料的表面面积和/或降低生物质材料的一个或多个尺寸。

[0088] 或者或另外,原料材料可首先通过一种或多种其它物理处理方法(例如化学处理、辐射、超声处理、氧化、热解或蒸汽爆炸)进行物理处理,并随后进行机械处理。这个顺序可以是有利的,因为通过一种或多种其它处理(例如照射或热解)进行处理的材料倾向于更脆,并且因此可更易于通过机械处理进一步改变材料的结构。例如,可如本文所述使用输送机将原料材料输送通过电离辐射并且随后进行机械处理。化学处理可除去一些或全部木质素(例如,化学制浆)并且可使材料部分或完全水解。所述方法还可用于预先水解的材料。所述方法还可用于未预先水解的材料。所述方法可用于水解材料和未水解材料的混合物,例如具有约50%或更多的未水解材料、具有约60%或更多的未水解材料、具有约70%或更多的未水解材料、具有约80%或更多的未水解材料或甚至具有90%或更多的未水解材料的混合物。

[0089] 除了尺寸缩减(可在加工期间初期和/或后期进行)之外,机械处理还可有利地“打开”、“压紧”、破坏或破碎生物质材料,从而使材料的纤维素在物理处理期间更易于断链和/或晶体结构破裂。

[0090] 机械处理生物质材料的方法包括例如碾磨或研磨。可使用例如锤磨机、球磨机、胶体磨、圆锥或锥形磨、盘磨机、轮碾机、威利磨(Wiley mill)、谷物碾磨机或其它磨进行碾磨。可使用例如切割/冲击型研磨机进行研磨。一些示例性研磨机包括石料研磨机、销棒研磨机、咖啡研磨机以及磨盘式研磨机。研磨或碾磨可以例如通过使销棒或其它元件往复移动来提供,在销棒碾磨机中就是这样。其它机械处理方法包括机械撕破或撕裂、对纤维施加压力的其它方法以及空气摩擦碾磨。合适的机械处理进一步包括继续进行由先前的加工步骤引发的材料内部结构破裂的任何其它技术。

[0091] 机械进料制备系统可被配置成产生具有特定特征(例如像特定最大尺寸、特定长宽比或特定表面积比)的进料流。物理制备可提高反应速率、改善材料在输送机上的移动、改善材料的照射曲线、提高材料的辐射均匀度、或者减少打开材料并使其对于方法和/或试剂(如溶液中的试剂)更易接近所需要的加工时间。

[0092] 可以控制(例如,增大)原料的堆积密度。在一些情况下,可希望例如通过使材料致密化(例如,致密化可使将其运输到另一个位置更容易并且成本更低)以及随后使材料恢复

到较低堆积密度状态(例如,在运输之后)来制备低堆积密度材料。可使材料致密化,例如从小于约0.2g/cc至大于约0.9g/cc(例如,小于约0.3g/cc至大于约0.5g/cc、小于约0.3g/cc至大于约0.9g/cc、小于约0.5g/cc至大于约0.9g/cc、小于约0.3g/cc至大于约0.8g/cc、小于约0.2g/cc至大于约0.5g/cc)。例如,可通过在Medoff的美国专利号7,932,065和国际公布号W02008/073186(2007年10月26日提交,以英语公布并且指定美国)中公开的方法和设备来使材料致密化,所述专利的全部公开内容以引用的方式并入本文。可通过本文所述的任何方法加工致密化的材料,或者由本文所述的任何方法加工的任何材料可随后致密化。

[0093] 在一些实施方案中,待加工的材料呈纤维材料的形式,所述纤维材料包括通过剪切纤维来源提供的纤维。例如,可用旋转切割机进行剪切。

[0094] 例如,可以例如在旋转切割机中剪切例如具有不顺应性的或其不顺应性水平已减小的纤维来源,以提供第一纤维材料。使第一纤维材料通过例如具有1.59mm或更小(1/16英寸,0.0625英寸)的平均开口尺寸的第一筛网,提供第二纤维材料。如果需要,可在剪切之前例如用切碎机切割纤维来源。例如,当使用纸作为纤维来源时,可首先用切碎机,例如反相旋转螺旋切碎机(如由Munson(Utica,N.Y.)制造的那些)将纸切割成例如1/4-英寸至1/2-英寸宽的条。作为切碎的替代,可通过使用闸刀式切纸机切割至所希望的尺寸来减小纸的尺寸。例如,闸刀式切纸机可用于将纸切割成例如10英寸宽×12英寸长的片。

[0095] 在一些实施方案中,纤维来源的剪切和使所得的第一纤维材料通过第一筛网是同时进行的。也可以在间歇型过程中进行剪切和通过。

[0096] 例如,旋转切割机可用于同时剪切纤维来源和筛选第一纤维材料。旋转切割机包括可装载有通过切碎纤维来源制备的切碎的纤维来源的料斗。切碎的纤维来源。

[0097] 在一些实施方式中,在糖化和/或发酵之前对原料进行物理处理。物理处理方法可包括一种或多种本文所述的任何那些方法,如机械处理、化学处理、照射、超声处理、氧化、热解或蒸汽爆炸。处理方法可与两种、三种、四种或甚至所有这些技术组合使用(以任意顺序)。当使用一种以上的处理方法时,所述方法可同时或不同时应用。改变生物质原料的分子结构的其它方法也可单独使用或与本文所公开的方法组合使用。

[0098] 可使用的机械处理以及机械处理的生物质材料的特征在2011年10月18日提交的美国专利申请公布2012/0100577A1中进一步详细描述,所述公布的全部公开内容以引用的方式由此并入。

[0099] 生物质材料的处理—粒子轰击

[0100] 使用高能粒子轰击的一个或多个处理可用于加工来自多种不同来源的未加工过的原料以从原料中提取有用物质,并且提供部分降解的有机材料,所述有机材料充当进一步加工步骤和/或序列的输入。粒子轰击可减少原料的分子量和/或结晶度。在一些实施方案中,可使用在从其原子轨道释放电子的材料中储存的能量处理材料。所述轰击可以由以下提供:重带电粒子(如 α 粒子或质子)、电子(例如在 β 衰变或电子束加速器中产生)或电磁辐射(例如 γ 射线、x射线或紫外线)。或者,由放射性物质产生的辐射可用于处理原料。可利用这些处理的呈任何顺序或同时的任何组合。在另一个方法中,电磁辐射(例如,使用电子束发射器来产生)可用于处理原料。

[0101] 每种能量形式经由特定相互作用来使生物质电离。重带电粒子主要通过库仑散射使物质电离;此外,这些相互作用产生可以进一步使物质电离的高能电子。 α 粒子与氦原子

核相同,并且由各种放射性核的 α 衰变所产生,如铋、钋、砷、氡、钫、镭的同位素,一些铜系元素,如铜、钍、铀、镎、钼、铟、铷和钇。

[0102] 当使用粒子时,它们可以是中性(不带电)、带正电或带负电的。当带电时,所述带电粒子可以带有单个正电荷或负电荷,或多个电荷,例如一个、两个、三个或甚至四个或更多电荷。在希望断链的情况下,可能希望是带正电的粒子,部分是由于其酸性性质。当使用粒子时,所述粒子可以具有静止电子的质量,或更大,例如静止电子质量的500、1000、1500或2000或更多倍。例如,所述粒子可以具有约1原子单位至约150原子单位的质量,例如约1原子单位至约50原子单位,或约1至约25,例如1、2、3、4、5、10、12或15原子单位。用于加速粒子的加速器可以是静电DC、电动DC、RF线性、磁感应线性或连续波。例如,回旋型加速器可从IBA (Ion Beam Accelerators, Louvain-la-Neuve, Belgium) 购得,如Rhodotron™系统,而DC型加速器可从RDI (现在是IBA Industrial) 购得,如Dynamitron™。离子和离子加速器讨论于以下文献中: Introductory Nuclear Physics, Kenneth S. Krane, John Wiley & Sons, Inc. (1988), Krsto Prelec, FIZIKA B6 (1997) 4, 177-206; Chu, William T., "Overview of Light-Ion Beam Therapy", Columbus-Ohio, ICRU-IAEA会议, 2006年3月18-20日; Iwata, Y. 等 "Alternating-Phase-Focused IH-DTL for Heavy-Ion Medical Accelerators", Proceedings of EPAC2006, Edinburgh, Scotland; 和 Leitner, C.M. 等 "Status of the Superconducting ECR Ion Source Venus", Proceedings of EPAC2000, 维也纳, 奥地利。

[0103] 所施加的剂量取决于所需效应和具体原料。例如,高剂量可破坏原料组分内的化学键并且低剂量可增加原料组分内的化学键结(例如,交联)。

[0104] 在一些情况下,当希望断链和/或希望聚合物链官能团化时,可以使用比电子重的粒子,如质子、氦核、氦离子、硅离子、氟离子、碳离子、磷离子、氧离子或氮离子。当希望开环断链时,可以使用带正电粒子的路易斯酸(Lewis acid)性质以增强开环断链。例如,在需要含氧的官能团时,可执行在氧存在下的处理或甚至用氧离子的处理。例如,在需要含氮的官能团时,可执行在氮存在下的处理或甚至用氮离子的处理。

[0105] 其它形式的能量

[0106] 电子通过库仑散射和由电子速度改变产生的轫致辐射相互作用。电子可以由经历 β 衰变的放射性核产生,如碘、铯、铊和铷的同位素。或者,可以使用电子枪通过热电子发射作为电子源。

[0107] 电磁辐射通过三个过程相互作用:光电吸收、康普顿散射(Compton scattering)和对产生。主要的相互作用由入射辐射的能量和材料的原子序数决定。促成纤维素材料中的吸收辐射的相互作用的总和可通过质量吸收系数来表示。

[0108] 电磁辐射可以根据波长再分为 γ 射线、x射线、紫外线、红外线、微波或无线电波。

[0109] 例如, γ 辐射可用来处理材料。 γ 辐射在样品的多种材料中具有显著的穿透深度的优势。 γ 射线源包括放射性核,如钴、钙、镅、铬、镓、铟、碘、铁、氦、钐、钠、铊和氡的同位素。

[0110] x射线源包括电子束与金属靶(如钨或钼或合金)的碰撞,或紧凑光源,如由Lyncean商业化生产的那些光源。

[0111] 紫外辐射源包括氙灯或镓灯。

[0112] 红外辐射源包括蓝宝石、锌或硒化物窗口陶瓷灯。

[0113] 微波源包括速调管、Slevin型RF源或使用氢气、氧气或氮气的原子束源。

[0114] 各种其它装置可在本文所公开的方法中使用,包括场电离源、静电离子分离器、场电离发生器、热电子发射源、微波放电离子源、再循环或静止加速器、动态线性加速器、范德格拉夫加速器(van de Graaff accelerator)和折叠式串列加速器。这类装置公开于例如美国专利号7,931,784B2中,其全部公开内容以引用方式并入本文。

[0115] 生物质材料的处理—电子轰击

[0116] 原料可用电子轰击处理以改变其结构,并从而减少其不顺应性。这类处理可例如减少原料的平均分子量、改变原料的晶体结构,且/或增加原料的表面积和/或孔隙率。

[0117] 经由电子束的电子轰击总体上是优选的,因为它提供很高通量并且因为使用相对较低电压/大功率电子束装置消除对于昂贵混凝土拱顶屏蔽的需求,因为此类装置是“自身屏蔽的(self-shielded)”并且提供安全、有效过程。虽然“自我-屏蔽的”装置包括屏蔽(例如,金属板屏蔽),其不需要构建混凝土拱顶,从而极大地减少资本支出并且经常允许现有制造设施在无需昂贵修整的情况下即可使用。电子束加速器可例如从IBA(Ion Beam Applications,Louvain-la-Neuve,Belgium)、Titan Corporation(San Diego, California,USA)和NHV Corporation(Nippon High Voltage,Japan)获得。

[0118] 电子轰击可使用电子束装置来执行,所述电子束装置其具有小于10MeV,例如,小于7MeV、小于5MeV或小于2MeV,例如,约0.5至1.5MeV、约0.8至1.8MeV、约0.7至1MeV或约1至3MeV的标称能量。在一些实施方式中,标称能量为约500至800keV。

[0119] 电子束可具有相对高总波束功率(所有加速头的组合波束功率,或,如果使用多个加速器,所有加速器和所有头),例如,至少25kW,例如,至少30、40、50、60、65、70、80、100、125或150kW。在一些情况下,功率甚至高达500kW、750kW,或甚至1000kW或更高。在一些情况下,电子束具有1200kW或更大的波束功率。

[0120] 此高总波束功率通常通过利用多个加速头来实现。例如,电子束装置可包括两个、四个或更多个加速头。使用多个头部,其每个具有相对低波束功率,防止材料的过度温度上升,从而防止材料燃烧,并且还增加材料层厚度中的剂量的均匀性。

[0121] 在一些实施方式中,需要在电子轰击期间使材料冷却。例如,在材料例如通过螺杆挤出机或其它输送设备来输送时,可使材料冷却。

[0122] 为了减少不顺应性减小过程所需要的能量,需要尽快地处理材料。总体上,优选处理以大于约0.25毫德拉//秒,例如,大于约0.5、0.75、1、1.5、2、5、7、10、12、15或甚至大于约20毫德拉//秒,例如,约0.25至2毫德拉/秒的剂量率来执行。较高剂量率一般需要较高线路速度,以避免材料的热分解。在一个实施方式中,对于厚度为约20mm(例如,具有0.5g/cm³的堆积密度的粉碎玉米穗轴材料)的样品,加速器设定为3MeV,50mA射束电流,并且线路速度为24英尺/分钟。

[0123] 在一些实施方案中,执行电子轰击直到材料收到至少0.5毫德拉,例如,至少5、10、20、30或至少40毫德拉的总剂量为止。在一些实施方案中,执行处理直到材料收到约0.5毫德拉至约150毫德拉、约1毫德拉至约100毫德拉、约2毫德拉至约75毫德拉、10毫德拉至约50毫德拉,例如约5毫德拉至约50毫德拉、约20毫德拉至约40毫德拉、约10毫德拉至约35毫德拉,或约25毫德拉至约30毫德拉的剂量为止。在一些实施方式中,25至35毫德拉的总剂量是优选的,理想地例如在5毫德拉/遍次下在几秒内施加,其中每个遍次施加约一秒。在一些情

况下,采用大于7至8毫德拉/遍次的剂量可导致原料材料的热分解。

[0124] 使用如以上讨论的多个头,材料可以多个遍次来处理,例如,10至20毫德拉/遍次下的两个遍次,例如,12至18毫德拉/遍次,间隔几秒以冷却下来,或7至12毫德拉/遍次,例如,9至11毫德拉/遍次的三个遍次。如以上讨论,使用多个相对低剂量,而非一个高剂量来处理材料倾向于防止材料过度加热,并且也增加材料厚度中的剂量均匀性。在一些实施方式中,在每个遍次期间或之后将材料搅拌或以其它方式混合,然后平滑成均匀层,然后再次进行下一个遍次,以进一步增强处理均匀性。

[0125] 在一些实施方案中,电子被加速到例如大于75%光速的速度,例如大于85%、90%、95%或99%光速的速度。

[0126] 在一些实施方案中,本文中描述的对木质纤维材料的任何加工在木质纤维材料获得时就保持干燥或已经例如使用加热和/或减压干燥之后发生。例如,在一些实施方案中,在25℃和50%相对湿度下测量,纤维素和/或木质纤维材料具有小于约5重量%的滞留水。

[0127] 电子轰击可以在纤维素和/或木质纤维材料暴露于空气、富氧空气或甚至氧气本身时施加,或被惰性气体如氮气、氩气或氦气覆盖时施加。当希望最大化氧化时,使用氧化环境,如空气或氧气,并且优化与放射源的距离以使反应性气体形成(例如,臭氧和/或氮的氧化物)最大化。

[0128] 在一些实施方案中,使用两种或两种以上电子源,如两种或两种以上电离源。例如,可以以任何顺序用电子束接着用 γ 射线和具有约100nm至约280nm波长的UV光处理样品。在一些实施方案中,用三种电离辐射源处理样品,如电子束、 γ 射线和高能UV光。生物质输送穿过处理区域,其中它可用电子来轰击。一般优选的是在处理时,生物质材料床具有相对均匀厚度,如前所述。

[0129] 可能有利的是重复处理以更充分地减少生物质不顺应性且/或进一步改变生物质。具体地说,取决于材料的不顺应性,过程参数可在第一(例如,第二、第三、第四或更多个)遍次之后调整。在一些实施方案中,可使用包括循环系统的输送机,其中生物质多次输送穿过如上所述的各种过程。在一些其它实施方案中,多个处理装置(例如,电子束发生器)用于多次处理生物质(例如,2、3、4或更多次)。在其它实施方案中,单一电子束发生器可为多个光束(例如,2、3、4或更多个光束)源,其可用于处理生物质。

[0130] 改变生物质的分子/超分子结构和/或减少生物质的不顺应性的有效性取决于所使用的电子能量和所施加的剂量,同时暴露时间取决于功率和剂量。

[0131] 在一些实施方案中,执行处理(用任何电子源或来源的组合)直到材料收到至少约0.05毫德拉,例如,至少约0.1、0.25、0.5、0.75、1.0、2.5、5.0、7.5、10.0、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175或200毫德拉的剂量为止。在一些实施方案中,处执行理直到材料收到0.1-100毫德拉、1-200、5-200、10-200、5-150、5-100、5-50、5-40、10-50、10-75、15-50、20-35毫德拉之间的剂量为止。

[0132] 在一些实施方案中,处理以介于5.0和1500.0千拉德/小时之间的剂量速率进行,例如介于10.0和750.0千拉德/小时之间或介于50.0和350.0千拉德/小时之间。在其它实施方案中,处理以10与10000千拉德/小时之间、100与1000千拉德/小时之间,或500与1000千拉德/小时之间的剂量率来执行。

[0133] 电子源

[0134] 电子通过库仑散射和由电子速度改变产生的轫致辐射相互作用。电子可以由经历 β 衰变的放射性核产生,如碘、铯、铊和铋的同位素。或者,可以使用电子枪通过热电子发射作为电子源并且经由加速电势来加速。电子枪产生电子、经由较大电势(例如,大于约50万、大于约1百万、大于约2百万、大于约5百万、大于约6百万、大于约7百万、大于约8百万、大于约9百万,或甚至大于10百万伏)来将其加速,并且然后在x-y平面中对其磁性扫描,其中电子最初沿着管在z方向中加速并且经由箔窗口来提取出。在照射输送穿过扫描光束的材料,例如,生物质时,扫描电子束适用于增加照射表面。扫描电子束也使热载荷均匀分布于窗口上并且帮助减少由于电子束的局部加热而引起的箔窗口破裂。窗口箔破裂由于随后需要修复和重新启动电子枪而造成显著停机时间。

[0135] 各种其它照射装置可在本文所公开的方法中使用,包括场电离源、静电离子分离器、场电离发生器、热电子发射源、微波放电离子源、再循环或静止加速器、动态线性加速器、范德格拉夫加速器和折叠式串列加速器。这类装置公开于例如Medoff的美国专利号7,931,784,其全部公开内容以引用方式并入本文。

[0136] 电子束可用作辐射源。电子束具有高剂量速率(例如1.5或甚至10毫德拉/秒)、高通量、更小的容积和更小的密封设备的优势。电子束还可具有高电效率(例如,80%),允许相对于其它辐射方法来使用较低能量,这可变为与所使用的较少量的能量对应的较低操作成本和较低温室气体排放。电子束可以例如由静电发生器、联级发生器、变压器发生器、具有扫描系统的低能量加速器、具有线性阴极的低能量加速器、线性加速器和脉冲加速器来产生。

[0137] 电子还可例如通过断链机制来更有效地导致生物质材料的分子结构的变化。另外,具有0.5-10MeV能量的电子可穿透低密度材料,如本文描述的生物质材料,例如,具有小于0.5g/cm³堆积密度,和0.3-10cm深度的材料。作为电离辐射源的电子可适用于例如相对薄的材料堆、层或床,例如,小于约0.5英寸,例如,小于约0.4英寸、0.3英寸、0.25英寸或小于约0.1英寸。在一些实施方案中,电子束的各个电子的能量是约0.3MeV至约2.0MeV(兆电子伏特),例如约0.5MeV至约1.5MeV,或约0.7MeV至约1.25MeV。照射材料的方法讨论于2011年10月18日提交的美国专利申请公布2012/0100577A1中,其全部公开内容以引用的方式并入本文。

[0138] 电子束照射装置可商购自Ion Beam Applications(Louvain-la-Neuve, Belgium)、Titan Corporation(San Diego, California, USA)和NHV Corporation(Nippon High Voltage, Japan)。典型的电子能量可以是0.5MeV、1MeV、2MeV、4.5MeV、7.5MeV或10MeV。典型电子束照射装置功率可为1KW、5KW、10KW、20KW、50KW、60KW、70KW、80KW、90KW、100KW、125KW、150KW、175KW、200KW、250KW、300KW、350KW、400KW、450KW、500KW、600KW、700KW、800KW、900KW或甚至1000KW。

[0139] 考察电子束照射装置功率规格的权衡因素包括操作成本、投资成本、折旧和装置占地面积。考察电子束照射的暴露剂量水平的权衡因素是能量成本和环境、安全和健康(ESH)相关方面。典型地,发生器容纳于例如铅或混凝土的拱顶中,尤其用于从在所述过程中生成的X射线产生。考虑电子能量的权衡因素包括能量成本。

[0140] 电子束照射装置可以产生固定光束或扫描光束。具有大扫描长度和高扫描速度的扫描光束可能是有利的,因为这将有效地代替大的、固定的光束宽度。此外,可得到0.5m、

1m、2m或更大的可用扫描宽度。由于较大扫描宽度和局部加热和窗口故障可能性减少,扫描光束在本文描述的大多数实施方案中是优选的。

[0141] 生物质材料的处理—超声处理、热解、氧化、蒸汽爆炸

[0142] 如果需要,除了或代替其它处理可使用一个或多个超声处理、热解、氧化或蒸汽爆炸过程以进一步减少生物质材料的不顺应性。这些过程可在一个或多个其它处理之前、期间和或之后施加。这些过程在Medoff的美国专利号7,932,065中详细描述,其全部公开内容以引用方式并入本文。

[0143] 处理的生物质材料的用途

[0144] 使用本文公开的方法,可使用起始生物质材料(例如,植物生物质、动物生物质、纸以及城市废物生物质)作为原料来生产有用的中间体和产品,如有机酸、有机酸的盐、酸酐、有机酸的酯以及燃料,例如用于内燃机的燃料或用于燃料电池的原料。本文描述了可使用纤维素和/或木质纤维素材料作为原料的系统和方法,所述纤维素和/或木质纤维素材料容易获得但可能常常难以加工,例如城市废物流和废纸流,如包括报纸、牛皮纸、瓦楞纸或这些的混合物的流。

[0145] 为了将原料转化成可易于加工的形式,可通过糖化剂(例如酶或酸)将原料中含有葡聚糖或木聚糖的纤维素水解为低分子量碳水化合物,如糖,这个过程称为糖化。随后,低分子量碳水化合物可用于例如现有制造工厂,如单细胞蛋白质工厂、酶制造工厂或燃料工厂(例如,乙醇制造设施)。

[0146] 例如通过使材料和酶在溶剂(例如,水溶液)中组合,可以使用酶水解原料。

[0147] 或者,可通过有机体供应酶,所述有机体分解生物质(如生物质的纤维素和/或木质素部分),含有或制造各种纤维分解酶(纤维素酶)、木质素酶或各种小分子生物质降解代谢物。这些酶可为协同作用来降解生物质的晶体纤维素或木质素部分的酶的复合物。纤维素分解酶的实例包括:内切葡聚糖酶、纤维二糖水解酶以及纤维二糖酶(β -葡萄糖苷酶)。

[0148] 在糖化期间,可通过内切葡聚糖酶在随机位置初步水解纤维素底物产生低聚中间体。这些中间体随后为外切葡聚糖酶如纤维二糖水解酶的底物,以从纤维素聚合物的末端产生纤维二糖。纤维二糖是水溶性的1,4-连接的葡萄糖二聚体。最后,纤维二糖酶裂解纤维二糖以得到葡萄糖。此过程的效率(例如,水解的时间和/或水解的完成度)取决于纤维素材料的不顺应性。

[0149] 中间体和产品

[0150] 本文描述的过程优选地用于产生丁醇,例如,异丁醇或正丁醇,和衍生物。然而,所述过程可用于产生其它产物、副产物和中间体,例如,2011年10月18日提交并且2012年4月26日公开的美国专利申请公布2012/0100577A1中描述的产物,其全部公开内容以引用方式并入本文。

[0151] 使用本文所述的方法,可将生物质材料转化为一种或多种产品,如能量、燃料、食品以及材料。产品的特定实例包括但不限于:氢气、糖(例如,葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、果糖、二糖、寡糖以及多糖)、醇(例如,一元醇或二元醇,如乙醇、正丙醇、异丁醇、仲丁醇、叔丁醇或正丁醇)、水合醇或含水醇(例如,含有大于10%、20%、30%或甚至大于40%的水)、生物柴油、有机酸、烃(例如,甲烷、乙烷、丙烷、异丁烯、戊烷、正己烷、生物柴油、生物汽油以及其混合物)、副产品(例如,蛋白质,如纤维素分解蛋白(酶)或单细胞蛋白

质)、以及处于任何组合或相对浓度的这些物质中的任何物质的混合物,并且所述任何物质任选与任何添加剂(例如,燃料添加剂)组合。其它实例包括羧酸、羧酸的盐、羧酸与羧酸的盐的混合物以及羧酸的酯(例如,甲基、乙基以及正丙基酯)、酮(例如,丙酮)、醛(例如,乙醛)、 α 和 β 不饱和酸(例如,丙烯酸)以及烯烃(例如,乙烯)。其它醇和醇衍生物包括:丙醇、丙二醇、1,4-丁二醇、1,3-丙二醇、糖醇以及多元醇(例如,乙二醇、甘油、赤藓醇、苏糖醇、阿糖醇、木糖醇、核糖醇、甘露醇、山梨醇、半乳糖醇、艾杜醇、肌醇、庚七醇、异麦芽酮糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、麦芽三糖醇、麦芽四糖醇以及聚糖醇和其它多元醇)以及任何这些醇的甲基或乙基酯。其它产品包括丙烯酸甲酯、甲基丙烯酸甲酯、乳酸、柠檬酸、甲酸、乙酸、丙酸、丁酸、琥珀酸、戊酸、己酸、3-羟基丙酸、棕榈酸、硬脂酸、草酸、丙二酸、戊二酸、油酸、亚油酸、羟乙酸、 γ -羟基丁酸以及其混合物、任何这些酸的盐、任何所述酸及其对应盐的混合物。

[0152] 以上产品与彼此的任何组合和/或以上产品与其它产品(所述其它产品可通过本文所述的方法或以其它方式制备)的任何组合可包装在一起并且作为产品出售。可将产品组合,例如混合、共混或共溶解,或者可简单地包装在一起或一起出售。

[0153] 本文所述的任何产品或产品的组合可在产品出售之前,例如纯化或分离之后或甚至在包装之后进行消毒或灭菌,以中和可能存在于一种或多种产品中的一种或多种潜在不希望的污染物。可以用例如小于约20毫拉德,例如从约0.1毫拉德至15毫拉德、从约0.5毫拉德至7毫拉德或从约1毫拉德至3毫拉德剂量的电子轰击进行所述消毒。

[0154] 本文所述的方法可产生适用于产生用于工厂的其它部分(热电联产)或在公开市场上出售的蒸汽和电力的各种副产品流。例如,由燃烧副产品流产生的蒸汽可用于蒸馏过程。作为另一个实例,由燃烧副产品流产生的电力可用于为预处理中使用的电子束发生器提供动力。

[0155] 用于产生蒸汽和电力的副产品来源于整个过程的众多来源。例如,废水的厌氧消化可产生甲烷含量高的沼气和少量废弃生物质(污泥)。作为另一个实例,可使用糖化后和/或蒸馏后固体(例如,从预处理和主要过程剩余的未转化的木质素、纤维素和半纤维素),例如作为燃料燃烧。

[0156] 获得的许多产品(如乙醇或正丁醇)可用作燃料,用于为汽车、卡车、拖拉机、船或火车提供动力,例如作为内部燃烧燃料或作为燃料电池原料。获得的许多产品还可用于为飞行器(如,例如具有喷气发动机的飞机,或直升机)提供动力。此外,本文所述的产物可以例如在常规蒸汽发电厂或燃料电池工厂中用于电能产生。

[0157] 包括食品和药物产品的其它中间体和产品描述于Medoff的2010年5月20日公布的美国专利申请公布2010/0124583A1,所述公布的全部公开内容以引用的方式由此并入。

[0158] 糖化

[0159] 为了从不顺应性减小原料获得果糖溶液,一般通过将材料和纤维素酶在液体培养基,例如,水溶液中组合,可使经过处理的生物质材料糖化,然后异构化并且任选地纯化。在一些情况下,在糖化之前在热水中对材料进行煮沸、浸泡或蒸煮,如在由Medoff和Masterman在2012年4月26日公布的美国专利申请公布2012/0100577A1中所描述,所述公布的全部内容并入本文。

[0160] 糖化过程可在制造工厂的罐(例如,具有至少4000、40,000或500,000L的体积的罐)中部分或完全地进行,和/或可在转运中,例如在轨道车、油罐卡车中、或在超级油轮或

船仓中部分或完全地进行。完全糖化所需要的时间将取决于工艺条件和所使用的生物质材料和酶。如果在受控的条件下在制造工厂中进行糖化,则可在约12-96小时内将纤维素基本上完全转化为糖,例如葡萄糖。如果在转运中部分或完全地进行糖化,则糖化可能花费较长时间。

[0161] 通常优选在糖化期间例如使用喷射混合对罐内容物进行混合,如在2010年5月18日提交的国际申请号PCT/US2010/035331中所描述,所述申请以英语公布为W02010/135380并且指定美国,所述申请的全部公开内容以引用的方式并入本文。

[0162] 表面活性剂的添加可提高糖化的速率。表面活性剂的实例包括非离子型表面活性剂(如 **Tween®** 20或 **Tween®** 80聚乙二醇表面活性剂)、离子型表面活性剂或者两性表面活性剂。

[0163] 通常优选由糖化得到的糖溶液的浓度相对较高,例如,大于40重量%,或大于50重量%、60重量%、70重量%、80重量%、90重量%或甚至大于95重量%。可以例如通过蒸发去除水分以增加糖溶液的浓度。这减小了待装运的体积并且还抑制了溶液中的微生物生长。

[0164] 例如在糖化溶液异构化之后,果糖溶液浓度可在约1与40%之间。例如,约5与40%之间、约10与40%之间、约15与40%之间、约5与10%之间、约10%与30%之间和约30%与40%之间。

[0165] 还可利用其它果糖来源。例如,果糖可从糖浆获得。不同种类糖浆的一些实例是甘蔗糖浆、柑橘糖浆、淀粉糖浆、赤糖糊糖浆和/或甜菜糖浆。糖浆中的葡萄糖可在葡萄糖/果糖总量的约30%至70%(例如,40%至60%,例如,45%至55%)的范围内,例如高果糖玉米糖浆是55%果糖和45%葡萄糖。来自水果的提取物还可为高果糖产物的来源,例如龙舌兰提取物可具有90%果糖和10%葡萄糖。葡萄糖溶液的异构化可增加葡萄糖溶液的浓度并且是果糖的另一个来源。异构化可通过如本文论述的异构酶来完成。果糖的另一个来源是蔗糖的水解,例如使用酶(例如,蔗糖酶),使用酸和/或使用碱。

[0166] 可选地,可使用较低浓度的糖溶液,在这种情况下,可能希望以低浓度(例如,50ppm至150ppm)添加抗微生物添加剂,例如广谱抗生素。其它合适的抗生素包括两性霉素B、氨苄青霉素、氯霉素、环丙沙星、庆大霉素、潮霉素B、卡那霉素、新霉素、青霉素、嘌呤霉素、链霉素。抗生素将在运输和储存期间抑制微生物的生长,并且可以适当的浓度(例如,以重量计在15ppm与1000ppm之间,例如,在25ppm与500ppm之间,或在50ppm与150ppm之间)使用。如果希望,则即使糖浓度相对较高也可包括抗生素。可选地,可使用具有抗微生物防腐特性的其它添加剂。优选的,一种或多种抗微生物添加剂是食品级的。

[0167] 可以通过限制与酶一起添加到生物质材料中的水量来获得相对较高浓度的溶液。可以例如通过控制糖化发生多少来控制浓度。例如,可以通过向溶液中添加更多生物质材料来增加浓度。为了保持正在溶液中产生的糖,可以添加表面活性剂,例如,以上所讨论的那些中的一种。也可以通过增加溶液的温度来增加溶解度。例如,可将溶液维持在40℃-50℃、60℃-80℃或甚至更高的温度下。

[0168] 通过将葡萄糖异构酶添加至储罐的内含物,高浓度果糖可在糖化不被储罐中的糖抑制的情况下获得。葡萄糖异构酶可以任何量添加。例如,浓度可低于约500U/g纤维素(低于或等于100U/g纤维素、低于或等于50U/g纤维素、低于或等于10U/g纤维素、低于或等于5U/g纤维素)。浓度至少约0.1U/g纤维素(至少约0.5U/g纤维素、至少约1U/g纤维素、至少约

2U/g纤维素、至少约3U/g纤维素)。

[0169] 添加葡萄糖异构酶使所产生的糖的量增加至少5% (至少10%、至少15%、至少20%)。

[0170] 溶液中的糖浓度还可通过限制与酶添加至原料的水量来增强,且/或浓度可通过在糖化期间将更多原料添加至溶液来增加。为了保持正在溶液中产生的糖,可添加表面活性剂,例如,上文所论述的那些表面活性剂中一种。也可以通过增加溶液的温度来增加溶解度。例如,溶液可保持在40-50℃、60-80℃或甚至更高的温度下。

[0171] 糖化剂

[0172] 合适的纤维素分解酶包括来自以下属中的种的纤维素酶:芽孢杆菌属、鬼伞属、毁丝霉属、头孢霉属、柱顶孢霉属、青霉属、曲霉属、假单孢菌属、腐质霉属、镰刀菌属、梭孢壳属、枝顶孢属、金孢子菌属以及木霉属;特别是由选自以下种的菌株产生的那些纤维素酶:曲霉属(参见,例如,欧洲公布号0458162)、特异腐质霉(*Hemicola insolens*) (被重新分类为嗜热柱顶孢霉(*Scytalidium thermophilum*),参见例如美国专利号4,435,307)、灰盖鬼伞(*Coprinus cinereus*)、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、嗜热毁丝霉(*Myceliophthora thermophila*)、大型亚灰树花菌(*Meripilus giganteus*)、太瑞斯梭孢壳霉(*Thielavia terrestris*)、枝顶孢属某种(*Acremonium* sp.) (包括但不限于桃色枝顶孢(*A. persicinum*)、*A. acremonium*、*A. brachyphenium*、*A. dichromosporum*、*A. obclavatum*、*A. pinkertoniae*、粉灰枝顶孢(*A. roseogriseum*)、*A. incoloratum*以及棕色枝顶孢(*A. furatum*))。优选菌株包括特异腐质霉DSM1800、尖孢镰刀菌DSM2672、嗜热毁丝霉CBS117.65、头孢霉属某种RYM-202、枝顶孢菌属某种CBS478.94、枝顶孢菌属某种CBS265.95、桃色枝顶孢CBS169.65、*Acremonium acremonium* AHU9519、头孢霉属某种CBS535.71、*Acremonium brachyphenium* CBS866.73、*Acremonium dichromosporum* CBS683.73、*Acremonium obclavatum* CBS311.74、*Acremonium pinkertoniae* CBS157.70、粉灰枝顶孢CBS134.56、*Acremonium incoloratum* CBS146.62,以及棕色枝顶孢CBS299.70H。纤维素分解酶还可由金孢子菌属,优选*Chrysosporium lucknowense*的菌株获得。可使用的另外的菌株包括但不限于:木霉属(特别是绿色木霉(*T. viride*)、里氏木霉(*T. reesei*)以及康宁木霉(*T. koningii*))、嗜碱性芽孢杆菌(*alkalophilic Bacillus*) (参见,例如美国专利号3,844,890和欧洲公布号0458162)以及链霉菌属(参见,例如欧洲公布号0458162)。

[0173] 可用于使生物质材料糖化并且产生糖的许多微生物也可用于使那些糖发酵并且转化为有用的产物。

[0174] 糖

[0175] 在本文所述的方法中,例如在糖化之后,可对糖(例如,葡萄糖和木糖)进行分离。例如,可以通过沉淀法、结晶法、色谱法(例如,模拟的移动床色谱法、高压色谱法)、离心法、萃取法、本领域已知的任何其它分离方法以及其组合来对糖进行分离。

[0176] 氢化和其它化学转化

[0177] 本文所述的方法可包括氢化。例如,葡萄糖和木糖可分别氢化为山梨醇和木糖醇。可以通过在高压(例如,10psi至12000psi)下与H₂组合使用催化剂(例如,Pt/ γ -Al₂O₃、Ru/C、雷尼镍或本领域已知的其它催化剂)来实现氢化。可以使用来自本文所述方法的产物的

其它类型的化学转变,例如有机糖衍生的产物(例如,糠醛和糠醛衍生的产物)的产生。糖衍生的产物的化学转变描述于2012年7月3日提交的美国临时申请号61/667,481中,所述申请的公开内容以引用的方式整体并入本文。

[0178] 发酵

[0179] 优选地,梭菌属某些种用于将糖(例如,果糖)转化成丁醇。发酵的最佳pH是约pH4至7。例如,酵母的最佳pH为约pH4至pH5,而发酵单胞菌的最佳pH为约pH5至pH6。典型的发酵时间为约24小时至168小时(例如,24小时至96小时),其中温度范围为20℃至40℃(例如,26℃至40℃),然而嗜热微生物偏好较高的温度。

[0180] 在一些实施方案中,例如当使用厌氧有机体时,至少一部分发酵是在缺乏氧气,例如在惰性气体(如N₂、Ar、He、CO₂或其混合物)的覆盖下进行的。另外,所述混合物可在部分或全部发酵期间使惰性气体的持续吹扫流动通过罐。在一些情况下,可以通过发酵期间的二氧化碳产生来实现或维持厌氧条件而不需要额外的惰性气体。

[0181] 在一些实施方案中,可在低分子量糖完全转化成产物(例如,乙醇)之前中断全部或部分发酵过程。中间体发酵产物包括高浓度的糖和碳水化合物。糖和碳水化合物可经由本领域已知的任何手段进行分离。这些中间体发酵产物可用于制备用于人或动物消耗的食品。另外或者可选地,可以在不锈钢实验室磨中将中间体发酵产物磨碎成细小颗粒大小,以产生面粉状物质。

[0182] 可在发酵期间使用喷射混合,并且在一些情况下,可在同一个罐中进行糖化和发酵。

[0183] 可以在糖化和/或发酵期间添加微生物的营养物,例如,在2011年7月15日提交的美国专利申请公布2012/0052536中所述的基于食物的营养物包,所述公布的完整公开内容以引用的方式并入本文。

[0184] “发酵”包括在2012年12月22日提交的美国临时申请号61/579,559和2012年12月22日提交的美国临时申请号61/579,576中所公开的方法和产物,所述申请的内容均以引用的方式整体并入本文。

[0185] 可以利用移动发酵罐,如在国际申请号PCT/US2007/074028(所述申请在2007年7月20日提交,以英语公布为W02008/011598并且指定美国)中所描述的,所述申请的内容以引用的方式整体并入本文。类似地,糖化设备可为移动的。此外,糖化和/或发酵可在转运期间部分或完全地进行。

[0186] 其它发酵剂

[0187] 虽然梭菌属是优选的,但是可使用其它微生物。例如,酵母和发酵单胞菌细菌可用于发酵或将糖转化成其它醇。其它微生物如下讨论。其可为天然发生的微生物和/或工程化微生物。例如,微生物可为细菌(包括但不限于例如纤维素分解细菌)、真菌(包括但不限于例如酵母)、植物、原生生物,例如,原生动物或真菌样原生动物(包括但不限于,例如,黏液菌)或海藻。当有机体相容时,可以使用有机体的混合物。

[0188] 合适的发酵微生物具有将碳水化合物(如葡萄糖、果糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖、寡糖或多糖)转化成发酵产物的能力。发酵微生物包括以下种属的菌株:酵母属某些种(*Saccharomyces* spp.) (包括但不限于酿酒酵母(*S.cerevisiae*) (面包酵母)、糖化酵母(*S.distaticus*)、葡萄汁酵母(*S.uvarum*))、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*) (包括但不限

于马克斯克鲁维酵母 (*K.marxianus*)、脆壁克鲁维酵母 (*K.fragilis*)、假丝酵母属 (*Candida*) (包括但不限于伪热带假丝酵母 (*C.pseudotropicalis*) 和芸薹假丝酵母 (*C.brassicae*))、树干毕赤酵母 (*Pichiastipitis*) (休哈塔假丝酵母 (*Candida shehatae*) 的亲缘菌)、棒孢酵母属 (*Clavispora*) (包括但不限于葡萄牙棒孢酵母 (*C.lusitaniae*) 和仙人掌棒孢酵母 (*C.opuntiae*))、管囊酵母属 (*Pachysolen*) (包括但不限于嗜鞣管囊酵母 (*P.tannophilus*))、酒香酵母属 (*Bretannomyces*) (包括但不限于,例如 *B.clausenii* (Handbook on Bioethanol: Production and Utilization, Wyman, C.E. 编辑, Taylor & Francis, Washington, DC, 179-212 中的 Philippidis, G.P., 1996, Cellulose bioconversion technology))。其它合适的微生物包括例如运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*)、梭菌属某些种 (*Clostridium spp.*) (包括但不限于热纤维梭菌 (*C.thermocellum*) (Philippidis, 1996, 同上)、糖丁基丙酮梭菌 (*C.saccharobutylacetonicum*)、糖丁酸梭菌 (*C.saccharobutylicum*)、略紫色梭菌 (*C.Puniceum*)、拜氏梭菌 (*C.beijerinckii*) 以及丙酮丁醇梭菌 (*C.acetobutylicum*))、丛梗孢酵母 (*Moniliella pollinis*)、*Moniliella megachiliensis*、乳杆菌属某些种 (*Lactobacillus spp.*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、短梗霉属某种 (*Aureobasidium sp.*)、三型孢菌某种 (*Trichosporonoides sp.*)、变异三角酵母 (*Trigonopsis variabilis*)、毛孢子菌属某种 (*Trichosporon sp.*)、丛梗孢酵母属某种 (*Moniliella acetobutans sp.*)、*Typhula variabilis*、木兰假丝酵母 (*Candida magnolia*)、黑粉菌纲某种 (*Ustilaginomycetes sp.*)、*Pseudozyma tsukubaensis*、接合酵母属 (*Zygosaccharomyces*) 的酵母种、德巴利酵母属 (*Debaryomyces*)、汉逊酵母属 (*Hansenula*) 和毕赤酵母属 (*Pichia*)、以及暗丛梗孢形圆酵母属 (*Torula*) 的真菌。

[0189] 例如,梭菌属某些种可用于产生乙醇、丁醇、丁酸、乙酸和丙酮。乳杆菌属某些种可用于产生乳酸。

[0190] 许多所述微生物菌株可公开商购获得抑或通过储藏所获得,所述储藏所如,例如,ATCC (美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection), Manassas, Virginia, USA)、NRRL (农业研究机构保藏中心 (Agricultural Research Service Culture Collection), Peoria, Illinois, USA) 或 DSMZ (德意志微生物保藏中心 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig, Germany)。

[0191] 可商购获得的酵母包括,例如,Red Star®/Lesaffre Ethanol Red (购自 Red Star/Lesaffre, USA)、FALI® (购自 Fleischmann's Yeast (Burns Philip Food Inc. 的部门), USA)、SUPERSTART® (购自 Alltech, 现在的 Lalemand)、GERT STRAND® (购自 Gert Strand AB, Sweden) 以及 FERMOL® (购自 DSM Specialties)。

[0192] 可用于使生物质材料糖化并且产生糖的许多微生物还可用于使那些糖发酵并且转化成有用的产物。

[0193] 蒸馏

[0194] 发酵之后,可使用例如“醪塔”对所得的流体进行蒸馏,以使乙醇和其它醇与大部分水和残余固体分离。流出醪塔的蒸气可以是例如 35 重量%乙醇并且可进料到精馏塔中。

可以使用气相分子筛将来自精馏塔的接近共沸的(92.5%)乙醇与水的混合物纯化至纯(99.5%)乙醇。可将醪塔底部物传送到三级蒸发器的第一级。精馏塔回流冷凝器可为此第一级提供热量。在第一级之后,可以使用离心机分离固体并且在旋转干燥器中干燥。可将离心机流出液的一部分(25%)再循环至发酵,并且将其余部分传送到第二蒸发器级和第三蒸发器级。大部分蒸发器冷凝液可作为相当干净的冷凝液返回到所述过程中,其中分离小部分至废水处理以防止低沸点化合物的堆积。

[0195] 除了在本文的实施例中或者除非以其它方式明确指出之外,本说明书的以下部分和所附权利要求书中的所有数值范围、量、值以及百分比,如用于材料的量、元素含量、反应的时间和温度、量之比以及其它的那些,可被理解为如同前置有词语“约”,即使术语“约”可能没有连同值、量或范围明确地出现。因此,除非有相反的指示,否则以下说明书和所附权利要求书中所阐述的数值参数为近似值,其可根据本发明要寻求获得的所需性质而变化。在最低限度并且不试图限制对权利要求书范围的等价范围的原则的应用,每个数值参数均应当至少根据报道的有效数字的数值和通过应用普通四舍五入技术来解读。

[0196] 尽管陈述本发明的宽泛范围的数值范围和参数是近似值,但在特定实施例中所述数值尽可能准确地进行报道。然而,任何数值都固有地含有必然由其以下各自测试量测中存在的标准偏差引起的误差。此外,当在本文阐述数值范围时,这些范围是将所引用范围端点包含在内的(即,可使用端点)。当本文使用以重量计的百分比时,所报道的数值相对于总重量。

[0197] 同样,应理解,本文所引用的任何数值范围意在包括其中包含的所有子范围。例如,“1至10”的范围意在包括在引用的最小值1与引用的最大值10(含1和10)之间的所有子范围,即具有等于或大于1的最小值以及等于或小于10的最大值。除非另外指明,否则如本文使用的术语“一个/种(one、a或an)”意在包括“至少一个/种”或“一个或多个/一种或多种”。

实施例

[0198] 实施例1.葡萄糖、木糖和果糖上的丁醇产生

[0199] 如美国6,358,717描述的基于P2的培养基用于以下试验。培养基主要由以下个别制备的溶液组成(以克/100ml蒸馏水表示,除非另外指示):糖(关于类型和量,参见下文)、790ml蒸馏水(溶液I)、0.5gK₂HPO₄、0.5g KH₂PO₄、2.2g CH₃COONH₄(溶液II)、2.0gMgSO₄·7H₂O、0.1g MnSO₄·H₂O、0.1g NaCl、0.1g FeSO₄·7H₂O(溶液III)和100mg对氨基苯酸、100mg硫胺、1mg生物素(溶液IV)。溶液I和II过滤灭菌并且随后混合以形成糖缓冲溶液。溶液III和IV过滤灭菌。溶液III和IV的部分(10和1ml)分别无菌添加至糖缓冲溶液。P2培养基的最终pH是6.6。

[0200] 所使用的糖的量为:对于培养基GXP2来说,43g葡萄糖和24g木糖;对于培养基FP2来说,43g果糖;对于培养基FGP2来说,43g果糖和43g葡萄糖。

[0201] 将溶液用氩吹扫45分钟,然后送至厌氧室中。量取溶液(10ml)测量置于21、20ml先前高压处理的血清小瓶中。小瓶用可密封的隔膜密封,然后从厌氧箱取出。将小瓶以来自水性甘油储备物的1体积%糖乙酸多丁醇梭菌(ATCC27021)接种,所述储备物遵循ATCC推荐方案从ATCC提供小丸来制备。使小瓶在30℃下生长48或96小时。关于丁醇产生,使用GC来分析

液面上空间。结果(以g/L表示)展示于下表。

[0202] 表2.三个不同碳源上的丁醇产生

样品 ID	时间点	培养基	正丁醇
1	48 小时	GXP2	3.2
2	48 小时	GXP2	2.9
3	48 小时	GXP2	2.0
4	48 小时	FP2	11.5
5	48 小时	FP2	11.0
6	48 小时	FP2	11.7
7	48 小时	FGP2	3.1
8	48 小时	FGP2	3.0
9	48 小时	FGP2	3.5
10	96 小时	GXP2	2.6
11	96 小时	GXP2	2.9
12	96 小时	GXP2	3.0
对照-13	96 小时	GXP2	0.0
14	96 小时	FP2	11.1
15	96 小时	FP2	12.0
16	96 小时	FP2	11.4
对照-17	96 小时	FP2	0.0
18	96 小时	FGP2	2.3
19	96 小时	FGP2	2.7
20	96 小时	FGP2	3.4
对照-21	96 小时	FGP2	0.0

[0204] 实施例2.果糖相比于葡萄糖和木糖上的丁醇产生

[0205] 将含有葡萄糖/木糖混合物或单独果糖(32g/L)的10ml的P2培养基在30℃下与糖乙酸多丁醇梭菌ATCC菌株27021或27022中的一种一起孵育。如在实施例1中,下表中呈现的结果显示与葡萄糖或木糖相对,当梭菌属在果糖上生长时,产生更多丁醇。

[0206] 表3.作为碳源的果糖或葡萄糖/木糖上的梭菌属小瓶生长

[0207]

菌株	底物	丁醇产生 (g/L)	时间点(小时)
ATCC 27021	果糖	11.7	48
ATCC 27021	葡萄糖/木糖	2.3	48
ATCC 27022	果糖	11.6	96
ATCC 27022	葡萄糖/木糖	4.0	96

[0208] 被描述成以引用方式全文或部分并入本文的任何专利、公布或其它公开材料必须满足以下前提:并入的材料不得与本公开内容中阐述的现有定义、声明或其它公开材料冲突。因此,并且在必要的程度上,如本文所明确阐述的公开取代以引用的方式并入本文的任何冲突的材料。据称以引用的方式并入本文、但与本文所阐述的现有定义、陈述、或其它公开材料相冲突的任何材料或其部分将仅仅是在不会在所并入的材料与现有公开材料之间出现冲突的程度上并入。

[0209] 虽然本发明已参考其优选实施方案进行特定显示和描述,但是本领域技术人员应了解,可在不脱离由随附权利要求书所涵盖的本发明的范围的情况下在其中在形式和细节方面做出各种改变。

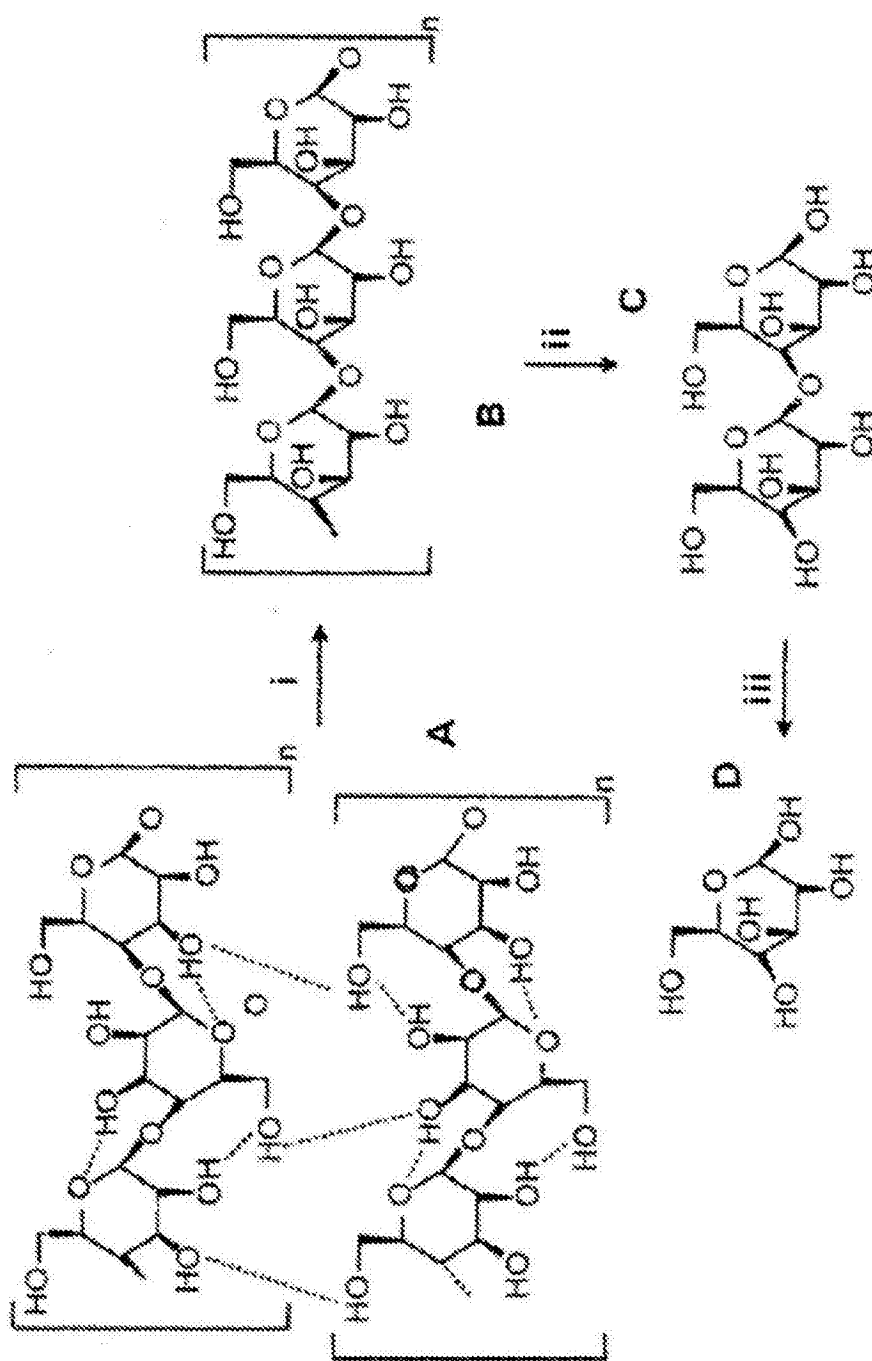


图1

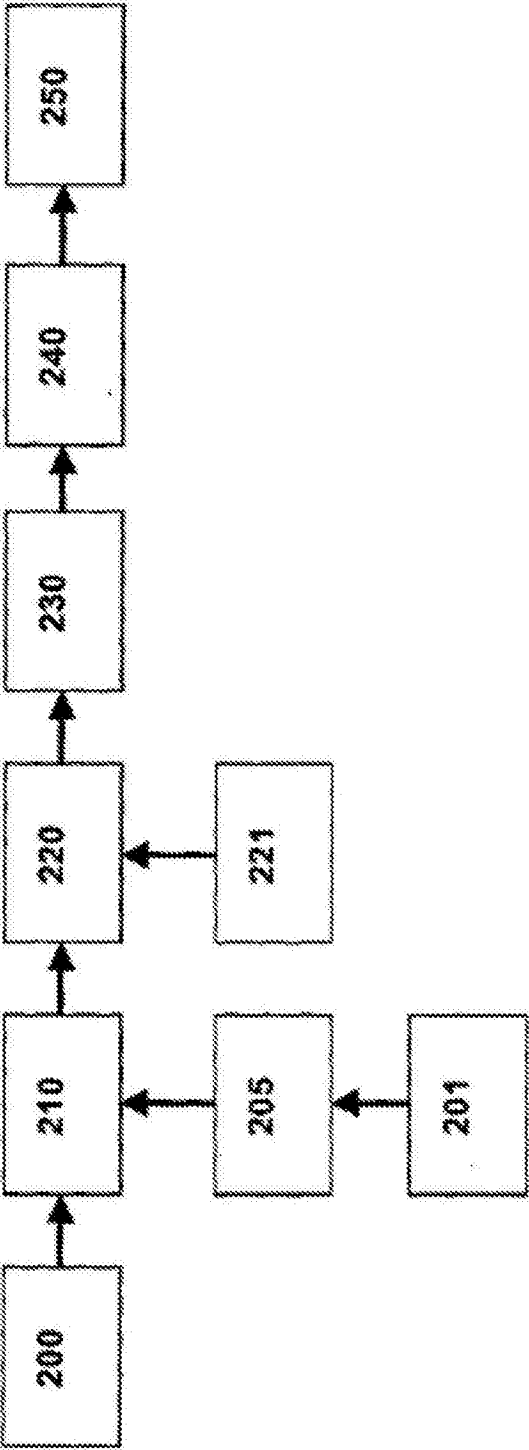


图2

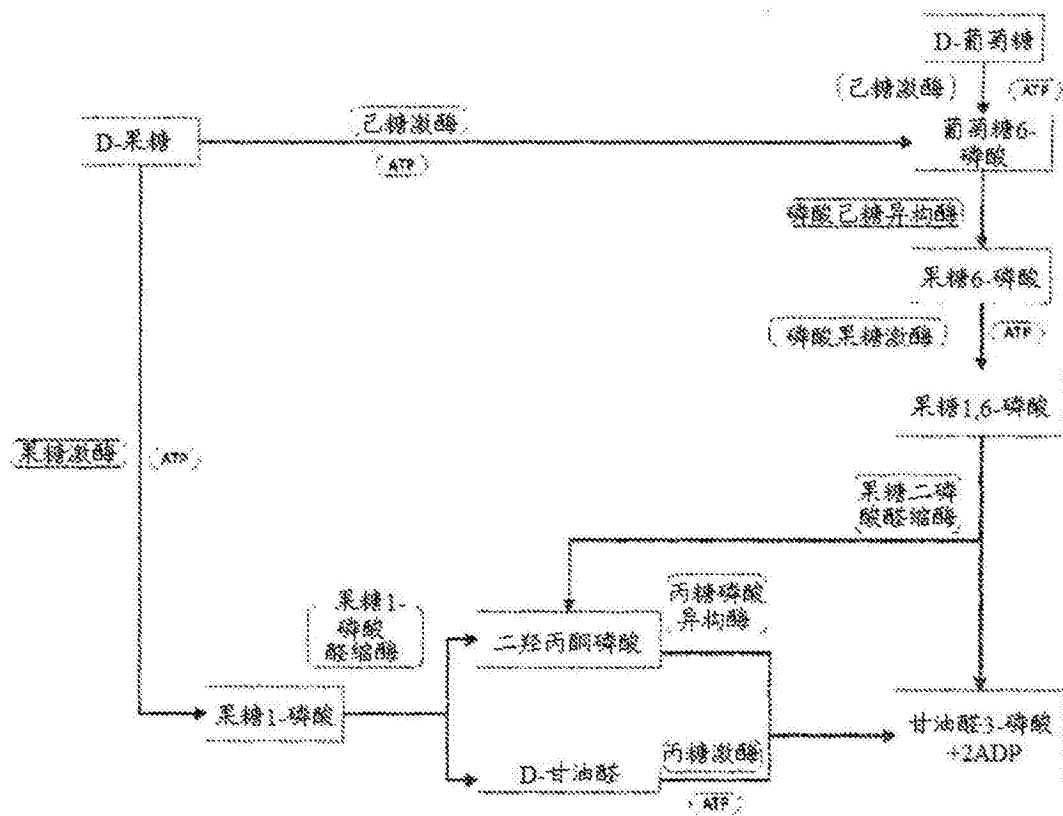


图3

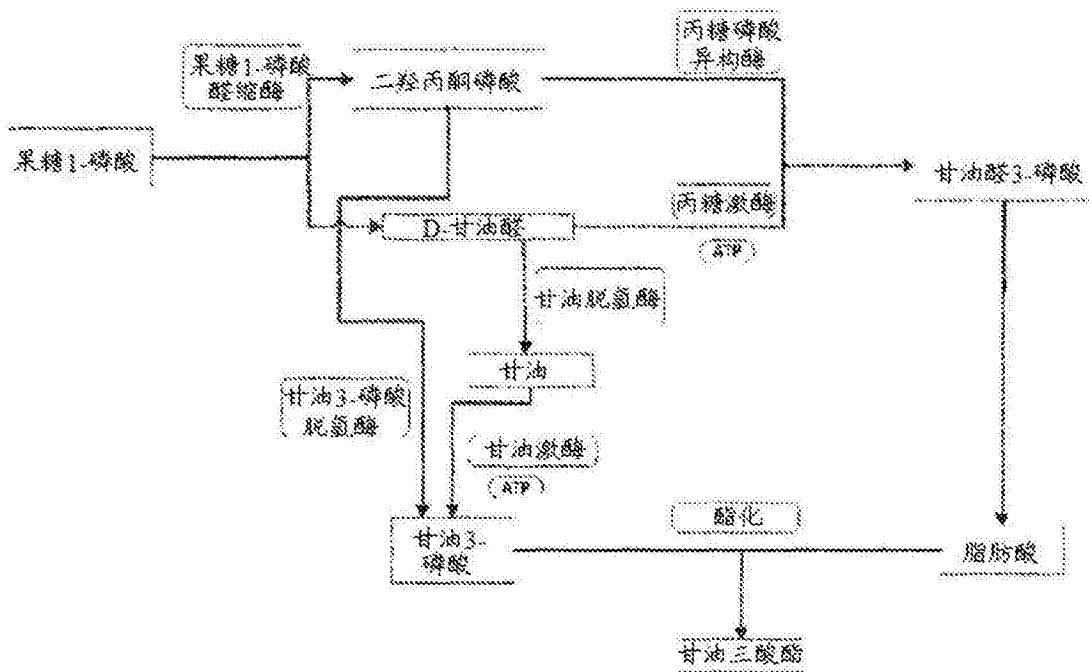


图4

