



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106536743 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(21)申请号 201580040485.X

A·B·德哈恩

(22)申请日 2015.07.28

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

(30)优先权数据

代理人 李程达

14178813.3 2014.07.28 EP

14178812.5 2014.07.28 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2017.01.25

C12P 7/56(2006.01)

D21C 1/06(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2015/067258 2015.07.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/016233 EN 2016.02.04

(71)申请人 普拉克生化公司

地址 荷兰霍林赫姆

(72)发明人 P·J·M·贝特斯

D·桑切斯加西亚 W·J·赫罗特

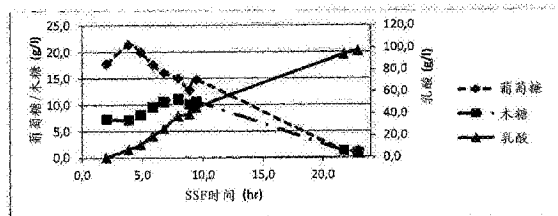
权利要求书3页 说明书19页 附图1页

(54)发明名称

用于制备乳酸的方法

(57)摘要

一种用于制备包含乳酸的发酵产物的方法，所述方法包括：a)在水的存在下用苛性镁盐处理木质纤维素材料以提供经处理的水性木质纤维素材料；b)在水解酶的存在下糖化所述经处理的水性木质纤维素材料以提供包含可发酵的碳水化合物和固体木质纤维素级分的糖化的水性木质纤维素材料；c)与步骤b)同时地，在生成乳酸的微生物和苛性镁盐的存在下，发酵所述糖化的水性木质纤维素材料，以提供包含乳酸镁和固体木质纤维素级分的水性发酵液；d)从所述发酵液中回收乳酸镁，其中所述糖化和所述发酵同时进行。在一个实施方案中，所述方法还包括：e)提供作为水溶液或气体的包含氯化氢(HCl)的进料；和f)通过使所述乳酸镁与包含HCl的所述进料接触，将回收的乳酸镁酸化成乳酸，从而形成包含乳酸和MgCl<sub>2</sub>的液体流出物。



1. 一种用于从木质纤维素材料产生包含乳酸的发酵产物的方法,所述方法包括:
  - a) 提供木质纤维素材料,并在水的存在下用碱性试剂处理所述材料以提供经处理的水性木质纤维素材料,所述碱性试剂包含苛性镁盐;
  - b) 在水解酶的存在下糖化所述经处理的水性木质纤维素材料以提供包含可发酵的碳水化合物和固体木质纤维素级分的糖化的水性木质纤维素材料;
  - c) 在生成乳酸的微生物的存在下并且在苛性镁盐的存在下,发酵所述糖化的水性木质纤维素材料,以提供包含乳酸镁和固体木质纤维素级分的水性发酵液;和,
  - d) 从所述水性发酵液中回收乳酸和/或乳酸盐,  
其中所述糖化和所述发酵同时进行。
2. 权利要求1所述的方法,其中提供给步骤a)的木质纤维素材料已经经受预提取、蒸汽预处理、酸水解和机械粉碎中的一种或多种。
3. 权利要求1或权利要求2所述的方法,其中提供给步骤a)的所述木质纤维素材料是颗粒并且具有0.1至250mm,优选0.1至50mm的平均粒度。
4. 权利要求1至3中任一项所述的方法,其中步骤a)包括:
  - i) 提供木质纤维素材料;
  - ii) 在水的存在下将所述木质纤维素材料与所述碱性试剂混合以形成具有固体物的反应混合物;和,
  - iii) 加热所述反应混合物,以使得所述固体在130℃至250℃的温度保持1分钟至600分钟的时间。
5. 权利要求4所述的方法,其中所述苛性镁盐在所述反应混合物中的浓度为基于所述木质纤维素材料的干重的0.1至50wt.%,优选0.5至40wt.%,更优选5至25wt.%(w/w)。
6. 权利要求4或5所述的方法,其中所述反应混合物的总固体浓度为1-70%(w/w),优选10-60%(w/w),更优选20-50%(w/w)。
7. 权利要求4至6中任一项所述的方法,其中所述反应混合物的pH为8.0至14.0,优选8.5至13.0,更优选9.0至12.0。
8. 权利要求4至7中任一项所述的方法,其中:  
反应混合物的pH为9.0至12.0,和  
在步骤iii)中,将所述固体在130℃至250℃的温度保持1分钟至240分钟,优选1至30分钟的时间。
9. 权利要求4至7中任一项所述的方法,其中:  
所述反应混合物具有5至25%(w/w)的苛性镁盐浓度;和,  
所述反应混合物的固体在140℃至170℃的温度保持180至600分钟,优选240至480分钟的时间。
10. 权利要求4至7中任一项所述的方法,其中:  
所述反应混合物具有5至25%(w/w)的苛性镁盐浓度;和,  
所述反应混合物的固体在170℃至230℃的温度保持1至240分钟,优选1至120分钟的时间。
11. 权利要求1至3中任一项所述的方法,包括在用步骤a)的所述碱性试剂处理所述木质纤维素材料之前使所述材料经受酸处理,

其中所述酸处理包括将所述木质纤维素材料与含有浓度为8wt.%或更低的酸的酸性水溶液混合,所述酸选自无机酸、有机酸、氨基酸、矿物酸、布朗斯台德酸、路易斯酸和它们的混合物,和

其中所述混合在120°C至230°C的温度进行。

12. 权利要求11所述的方法,其中步骤a)的处理如下进行

i) 在2至10,优选4.0至9.0,更优选4.5至8,最优选4.5至5.5的pH;

ii) 在15至100°C,优选30至80°C的温度;和

iii) 1至30分钟的时间,

以中和经酸处理的木质纤维素材料。

13. 权利要求1至12中任一项所述的方法,其中步骤a)的碱性试剂包含选自MgO、Mg(OH)<sub>2</sub>、MgCO<sub>3</sub>、Mg(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>及其混合物的苛性镁盐或由其组成。

14. 权利要求13所述的方法,其中步骤a)的苛性镁盐包括MgO和Mg(OH)<sub>2</sub>中的至少一种。

15. 权利要求1至14中任一项所述的方法,其中步骤c)的苛性镁盐选自MgO、Mg(OH)<sub>2</sub>、MgCO<sub>3</sub>和Mg(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>中的至少一种。

16. 如权利要求1至14中任一项所定义的用于制备乳酸的方法,所述方法包括以下步骤:

a) 在水的存在下用碱性试剂处理木质纤维素材料以提供经处理的水性木质纤维素材料,所述碱性试剂包含苛性镁盐;

b) 在水解酶的存在下糖化所述经处理的水性木质纤维素材料以提供包含可发酵的碳水化合物和固体木质纤维素级分的糖化的水性木质纤维素材料;

c) 在生成乳酸的微生物的存在下并且在苛性镁盐的存在下,发酵所述糖化的水性木质纤维素材料,以提供包含乳酸镁和固体木质纤维素级分的水性发酵液;

d) 从所述水性发酵液中回收乳酸镁;

e) 提供包含氯化氢的进料,所述进料是包含氯化氢的水溶液或包含气态氯化氢的气体进料;和,

f) 通过使所述乳酸镁与包含氯化氢的所述进料接触将所述乳酸镁酸化为乳酸,从而形成包含乳酸和氯化镁的液体流出物,

其中所述糖化和所述发酵同时进行。

17. 权利要求16所述的方法,还包括:

g) 从步骤f)的液体流出物产物中分离木质素。

18. 权利要求16所述的方法,还包括:

g) 从步骤f)的液体流出物产物中分离木质素;和,

h) 分离存在于步骤g)的液体流出物产物中的乳酸和氯化镁以获得乳酸产物流和氯化镁溶液或悬浮液。

19. 权利要求18所述的方法,其中所述分离步骤h)包括乳酸提取步骤。

20. 权利要求18或19所述的方法,其中使所述分离的氯化镁溶液或悬浮液经受至少300°C的温度,由此将氯化镁分解成氧化镁和氯化氢,从而获得包含氧化镁的固体和包含气态氯化氢的气体。

21. 权利要求20所述的方法,其中来源于所述热分解氯化镁的步骤的所述氧化镁直接

用于步骤a)和步骤c)中的至少一个中,或者可选择地,用作用于步骤a)和步骤c)中的至少一个中的苛性镁盐的前体。

22. 权利要求21所述的方法,其中将来自氯化镁的热分解的固体氧化镁中保存的热量转移至步骤a)的木质纤维素材料和/或步骤c)的发酵液。

23. 权利要求20至22中任一项所述的方法,其中用于步骤e)中的包含氯化氢的所述进料至少部分来源于从所述氯化镁的热分解获得的气态氯化氢。

24. 权利要求16至23中任一项所述的方法,其中在步骤d)中回收的乳酸镁至少部分为结晶形式。

25. 权利要求16至24中任一项所述的方法,其中包含氯化氢的所述进料是酸性水溶液,其中氯化氢的浓度为基于酸性溶液的总重量的至少5wt.%,优选至少10wt.%。

## 用于制备乳酸的方法

### 发明领域

[0001] 本发明涉及一种由木质纤维素材料制备乳酸的方法。更具体地,本发明涉及一种方法,其中已经用苛性镁盐预处理的木质纤维素材料经受同时的糖化和发酵以得到乳酸镁,由所述乳酸镁可以通过直接酸化获得乳酸盐。

### [0002] 发明背景

[0003] 乳酸广泛应用于食品、制药、塑料和纺织工业。它还用作乳酸聚合物的来源,所述乳酸聚合物可用作可生物降解的塑料,并且其物理性质可通过调节L(+)-和D(-)-丙交酯的比例来控制。

[0004] 乳酸可以通过发酵生产,但是这种生产的经济性强依赖于原材料的成本。例如,当精制糖和淀粉用作发酵原料时,其非常昂贵。没有竞争性食品价值的木质纤维素生物质是具有广泛可用性和可持续获得的潜力的更低成本的替代原料。然而,本领域仍然需要改进用于乳酸生产的木质纤维素生物质的商业规模发酵。

[0005] 本发明部分地涉及处理木质纤维素材料的方法,所述方法使得所述材料更适于生物介导的转化。更具体地,本发明涉及使木质纤维素材料更适合于以下至少一种的处理方法:通过存在于预处理的生物质中的糖分解酶将碳水化合物组分酶促水解成糖;通过能够发酵己糖例如葡萄糖、甘露糖和半乳糖的微生物的微生物水解;和通过能够发酵戊糖例如木糖和阿拉伯糖的微生物的微生物水解。

[0006] 大多数植物材料的大约90%的干重以纤维素、半纤维素、木质素和果胶的形式储存,其余部分由蛋白质、灰分和萃取物例如非结构性糖、含氮物质、叶绿素和蜡构成。

[0007] 纤维素是植物细胞壁中的主要结构成分。它主要以结晶形式存在并且通常存在于组织化的纤维结构中:线性纤维素聚合物由通过 $\beta$ -(1,4)-糖苷键彼此连接的D-葡萄糖亚单元组成;纤维二糖是通过该键联建立的重复单元,并且其构成纤维素链;进而,长链纤维素聚合物通过氢键和范德华键连接在一起,这导致纤维素被包装在微纤维中;并且半纤维素和木质素随后覆盖所述微纤维。可发酵的D-葡萄糖可以通过破坏 $\beta$ -(1,4)-糖苷键联的酸或酶的作用产生,并且纤维素的无定形形式对这种酶降解更敏感。然而,高纤维素结晶度、低可及表面积、木质素的保护和半纤维素的包覆均促成木质纤维素生物质中的纤维素对水解的抗性。

[0008] 半纤维素与纤维素的主要不同在于半纤维素具有带有由不同糖组成的短侧链的分支。这些单糖包括戊糖(木糖,鼠李糖和阿拉伯糖),己糖(葡萄糖,甘露糖和半乳糖)和糖醛酸(例如4-O-甲基葡萄糖醛酸,D-葡萄糖醛酸和D-半乳糖醛酸)。半纤维素的主链是具有通过 $\beta$ -(1,4)-糖苷键和偶尔地 $\beta$ -(1,3)-糖苷键连接的短分支的均聚物或杂聚物。此外,半纤维素可具有一定程度的乙酰化。

[0009] 木质素是由通过各种醚和碳-碳键连接在一起的苯基丙烷类亚基构成的复杂的三维聚合物。木质素与植物细胞壁中的半纤维素紧密地交织,形成覆盖结晶纤维素微纤维的基质。虽然其赋予细胞壁结构支持和不可渗透性,但其存在同时提供防止植物细胞壁被真菌和将生物质转化为有机酸所必需的那些细菌破坏的保护性屏障。木质素的芳香性质和复

杂的结构使木质素降解非常困难。木质素和木质素衍生的化合物对生物质的酶促水解具有有害的影响,因为它们物理上阻碍纤维素酶的可及性;它们还结合纤维素酶并导致它们的失活。

[0010] 因此,分解木质素的预处理方法对于木质纤维素的有效酶促和微生物水解以及因此对于木质纤维素转化成有机酸如乳酸、琥珀酸和乙酸是必需的。已知的预处理方法可以粗略地分为不同的类别:物理(研磨和碾磨),物理化学(蒸汽预处理/自动水解,水热解和湿氧化),化学(碱,稀酸,氧化剂,和有机溶剂),生物的,电的,或这些的组合。本发明涉及利用碱性试剂的化学预处理方法。

[0011] 与酸预处理方法相比,碱性方法被认为导致较少的糖降解,并且许多苛性盐可以被回收和/或再生。Kong等人Effects of cell-wall acetate,xylan backbone,and lignin on enzymatic hydrolysis of aspen wood,Appl.Biochem.Biotechnol.1992,34/35,23-35报道了碱从半纤维素(主要是木聚糖)中除去乙酰基,从而减少水解酶的空间位阻,并大大增强碳水化合物的可消化性。

[0012] 历史上,氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化钙和氢氧化铵已经优选作为碱性预处理剂,并且其中氢氧化钠是研究最多的,例如记载于:Fox,D.J等人,Comparison of alkali and steam(acid)pretreatments of lignocellulosic materials to increase enzymic susceptibility:Evaluation under optimized pretreatment conditionsJ.Chem.Tech.Biotech.1989,44,135-146;和,MacDonald,D.G.等人Alkali treatment of corn stover to improve sugar production by enzymatic hydrolysisBiotechnol.Bioeng.1983,25,2067-2076。

[0013] 氢氧化钙(熟石灰)也被发现可用作预处理剂,主要是由于它相对便宜(每千克)并且可以从水性反应体系中通过用廉价的二氧化碳中和来回收钙作为不溶性碳酸钙的事实;氢氧化钙可以随后使用已建立的石灰窑技术再生。然而,石灰预处理倾向于增加经预处理的木质纤维素生物质的结晶度指数。尽管这可能不会对酶促水解的最终糖产率有影响,但结晶度显著影响初始水解速率,如Chang等人Fundamentalfactors affecting biomass enzymatic reactivity,Appl.Biochem.Biotechnol.2000,84-86,5-37中报道的。

[0014] 此外,Kim等人Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover,Bioresour.Technol.2006,97,583-591所报道的,使用氢氧化钙的对给定木质纤维素材料的脱木质素化可随氧化条件和温度显著变化。这对氢氧化钙在工业过程中的功效带来了问题,其中氧化条件不容易被缓和,并且其中木质纤维素原料可以源自多于一种植物材料或来源,应注意木质素、半纤维素和纤维素的组成可以从一个植物种类到另一种变化,并且对于单种植物类型可以随着年龄和生长阶段而变化。

[0015] W02013/062407(Wageningen University等)描述了将木质纤维素材料转化为有机酸的方法,其包括碱性预处理步骤和发酵步骤。尽管该文献声称氧化镁或氢氧化镁可用于碱性预处理步骤,但这是未经证实的。相反,该文献仅证明在预处理步骤中使用氧化钙或氢氧化钙,该预处理步骤在20°C至115°C的温度进行。为了在该方法中实现水平衡的目的,在发酵步骤中获得的液相必须被再循环至碱性预处理和/或发酵步骤。

## 发明内容

[0016] 根据本发明的第一方面,提供了用于从木质纤维素材料产生包含乳酸的发酵产物的方法,所述方法包括:a) 在水的存在下用碱性试剂处理木质纤维素材料以提供经处理的水性木质纤维素材料,所述碱性试剂包括苛性镁盐;b) 在水解酶的存在下糖化所述经处理的水性木质纤维素材料以提供包含可发酵的碳水化合物和固体木质纤维素级分的糖化的水性木质纤维素材料;c) 在生成乳酸的微生物的存在下并且在苛性镁盐的存在下,发酵所述糖化的水性木质纤维素材料,以提供包含乳酸镁和固体木质纤维素级分的水性发酵液;和d) 从所述水性发酵液中回收乳酸和/或乳酸盐,其中所述糖化和所述发酵同时进行。

[0017] 来源于同时的糖化和发酵步骤的固体木质纤维素级分包括未水解的纤维素和半纤维素和未溶解的木质素级分。

[0018] 在一个重要的实施方案中,上述定义的方法的步骤a) 包括:i) 提供木质纤维素材料,其可任选地已经经受预提取、酸水解和机械粉碎中的一种或多种;ii) 在水的存在下将所述木质纤维素材料与所述碱性试剂混合以形成具有固体物的反应混合物;和iii) 加热所述反应混合物,以使得所述固体在130°C至250°C的温度保持1分钟至600分钟的时间。

[0019] 优选地,在所定义的方法的步骤a) 和步骤c) 中使用的苛性镁盐独立地选自MgO、Mg(OH)<sub>2</sub>、MgCO<sub>3</sub>和Mg(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>中的至少一种;在步骤a) 中使用MgO和Mg(OH)<sub>2</sub>中的至少一种是特别优选的。

[0020] 不受理论束缚,认为在升高的温度下执行预处理步骤a) 通过执行以下中的至少一种促进木质纤维素材料的随后的糖化和发酵:有效降解木质素;增加木质纤维素材料的孔隙率;消除非生产性酶吸附位点;增加对纤维素和半纤维素的酶和/或微生物接近;和降低纤维素的结晶度;最小化碳水化合物的降解或损失;和最小化对随后的糖化和发酵过程具有抑制作用的副产物的形成。

[0021] 已经发现在同时糖化和发酵[b) 和c)] 中使用二价镁离子比用一价离子进行的相应步骤更具生产性-产生更高的滴度。

[0022] 根据本发明的一个重要实施方案,上述定义的方法用于制备乳酸;具体地,该实施方案的方法步骤包括:a) 在水的存在下用碱性试剂处理木质纤维素材料以提供经处理的水性木质纤维素材料,所述碱性试剂包含苛性镁盐;b) 在水解酶的存在下糖化所述经处理的水性木质纤维素材料以提供包含可发酵的碳水化合物和固体木质纤维素级分的糖化的水性木质纤维素材料;c) 在生成乳酸的微生物的存在下并且在苛性镁盐的存在下,发酵所述糖化的水性木质纤维素材料,以提供包含乳酸镁和固体木质纤维素级分的水性发酵液;d) 从所述水性发酵液中回收乳酸镁;e) 提供包含氯化氢的进料,所述进料是包含氯化氢的水溶液或包含气态氯化氢的气体进料;和f) 通过使所述乳酸镁与包含氯化氢的所述进料接触将所述乳酸镁酸化为乳酸,从而形成包含乳酸和氯化镁的液体流出物。在所述步骤f) 中如此获得的氯化镁可以容易地回收和再利用。

[0023] 优选地,该用于生产乳酸的方法的特征在于其还包括以下步骤:g) 从步骤f) 的液体流出物产物中分离木质素;和优选地,h) 分离存在于步骤g) 的液体流出物产物中的乳酸和氯化镁以获得乳酸产物流和氯化镁溶液或悬浮液。在一个实施方案中,分离步骤h) 应包括乳酸提取步骤。

[0024] 在步骤h) 中获得的分离的氯化镁溶液或悬浮液可以经受至少300°C的温度,以使盐热水解为固体氧化镁和气态氯化氢。通过进行该水解,获得的氧化镁可以直接用于步骤

a) 和步骤c) 中的至少一个, 或者可选择地, 可以用作用于步骤a) 和步骤c) 中的至少一个中的替代苛性镁盐的前体; 例如, 可以熟化氧化镁以提供 $Mg(OH)_2$ 用于这些步骤中的至少一个。类似地, 包含本发明的步骤e) 中使用的氯化氢的酸化进料可以至少部分地来源于从氯化镁的热分解获得的气态氯化氢。

[0025] 因此, 热水解步骤的执行使得能够在所述过程中重复利用重要的反应物。还可以通过交换存储在热水解产物中的热量来减轻所述过程的能量成本。

[0026] 定义

[0027] 为了本说明书的目的, “包含苛性镁盐的碱性试剂” 也称为“含镁碱性试剂”, 或简称为“碱性试剂”。碱性试剂可以以固体形式、以水溶液的形式或以水性浆料的形式(例如使苛性镁盐部分溶解在水中并部分处于固体形式) 加入到木质纤维素材料中。

[0028] 基于碱性试剂的干重, 碱性试剂可包含多达50wt. %, 例如多达20wt. % 的一种或多种苛性盐而非苛性镁盐, 例如苛性钠盐、苛性钾盐、苛性钙盐和/或苛性铵盐。补充的苛性盐的具体实例包括 $Ba(OH)_2$ ,  $NaOH$ ,  $Na_2CO_3$ ,  $NaHCO_3$ ,  $KOH$ ,  $K_2CO_3$ ,  $KHCO_3$ ,  $CaO$ ,  $Ca(OH)_2$ ,  $CaCO_3$ ,  $Ca(HCO_3)_2$ ,  $NH_4OH$ ,  $(NH_4)_2CO_3$ , 和  $(NH_4)HCO_3$ 。然而优选的是, 基于碱性试剂的干重, 碱性试剂包含大于90wt. %, 优选大于95wt. %, 更优选大于98wt. % 的苛性镁盐。特别地, 碱性试剂可以仅由苛性镁盐组成。例如, 碱性试剂可以由 $MgO$ 和/或 $Mg(OH)_2$ 组成。

[0029] 本文给出的粒度测量可以通过使用公知的粒度分析仪(例如可从Compagnie Industrielle des Lasers获得的CILAS 1064仪器) 的激光散射来测量。用于分析亚毫米范围内的粒度的其它标准技术包括使用标准筛振荡器、显微镜和激光衍射; 这些可以在本文中同等地使用。

[0030] 如本文所述, 木质纤维素材料的“固体物”或“干重”通过根据ASTM E1756-08在105°C 在空气中将该材料加热至恒重来测定。

[0031] 为了本说明书的目的, 水相留在碱性水解反应器中的时间长度通过将反应器的工作体积除以反应器的体积混合物或浆料流进料速率来简单地确定。如本领域已知的, 未水解的固体保留在水解反应器中的时间长度基于出口处和水解反应器内进料中的固体浓度来确定。固体保留时间可以同等地通过使用结合固体的示踪剂化合物来计算。

[0032] 本申请中的术语“乳酸”是指化学式为 $C_3H_6O_3$ 的2-羟基丙酸。乳酸的盐形式被称为“乳酸盐”, 不管中和剂如何(例如碳酸钙或氢氧化铵)。如本文所述, 乳酸可以是乳酸的立体异构形式(L-乳酸或D-乳酸)。术语乳酸盐也可以指乳酸盐的立体异构形式(L-乳酸盐或D-乳酸盐)。当提及乳酸产生时, 这包括产生乳酸或乳酸盐的单一立体异构体或乳酸或乳酸盐的两种立体异构体的混合物。

[0033] 如本文所用, 术语“可发酵的碳水化合物”是指可以通过产生有机酸的微生物发酵的碳水化合物。通常, 可发酵的碳水化合物是 $C_5$ 糖,  $C_6$ 糖, 其低聚物(例如二聚 $C_{12}$ 糖) 和/或其多聚物。 $C_5$ 糖和 $C_6$ 糖分别是指具有5和6个碳原子的糖, 并且 $C_{12}$ 糖是指具有12个碳原子的糖(例如二糖)。

[0034] 特定微生物可发酵的碳水化合物是本领域普通技术人员通常已知的或在公开的背景文献中容易获得。为了完整性, 可由产生乳酸的微生物发酵的常见碳水化合物包括但不限于: $C_5$ 糖, 例如阿拉伯糖, 木糖和核糖; $C_6$ 糖, 例如葡萄糖, 果糖, 半乳糖, 鼠李糖和甘露糖; 和 $C_{12}$ 糖, 例如蔗糖, 麦芽糖和异麦芽糖。



[0035] 生物质中可发酵的碳水化合物的含量可以通过本领域已知的方法测定。特别有说明性的公开内容是Milne等人, Sourcebook of Methods of Analysis for Biomass Conversion and Biomass Conversion Processes. SERI/SP-220-3548. Golden, CO: Solar Energy Research Institute, February 1990。

[0036] 如本文所用, 术语“同时糖化和发酵”意指将预处理的木质纤维素材料的寡聚和多聚碳水化合物同时酶促水解成可发酵的糖以及通过一种或多种微生物进一步将糖转化为发酵产物。

[0037] 苛性镁盐

[0038] 本发明的苛性镁盐包含选自氧化镁 ( $MgO$ )、氢氧化镁 ( $Mg(OH)_2$ )、碳酸镁 ( $MgCO_3$ )、碳酸氢镁 ( $Mg(HCO_3)_2$ )、碱性硅酸镁、磷酸三镁和磷酸一镁中的一种或多种化合物。优选地, 苛性镁盐选自  $MgO$ 、 $Mg(OH)_2$ 、 $MgCO_3$ 、 $Mg(HCO_3)_2$  及其混合物。更优选地, 苛性镁盐包含  $MgO$  和/或  $Mg(OH)_2$  或由其组成。

[0039] 如果适用, 可以在水溶液中提供苛性镁盐。然而, 苛性镁盐可以以其固体、颗粒形式或作为其水性分散体等价地提供。

[0040] 木质纤维素材料的提供

[0041] 用于本发明的方法的原料是木质纤维素材料, 其广泛地包括含有纤维素、半纤维素和木质素的任何材料, 例如可以源自植物生物质。优选地, 木质纤维素原料的特征在于纤维素含量为20或30wt.%至70wt.% (基于材料的干重) 和/或组合的纤维素和半纤维素含量为30至99wt.%, 优选35至95wt.% (基于材料的干重)。

[0042] 示例性但非限制性的木质纤维素材料包括: 麻风树; 油菜籽; 草, 特别是  $C_4$  草, 例如柳枝稷, 线草, 黑麦草, 芒草, 草芦及其组合; 棕榈叶; 糖加工残余物, 包括甘蔗渣和甜菜浆; 农业废料, 特别包括稻壳, 稻草, 玉米, 玉米纤维, 玉米芯, 玉米秸秆, 小麦, 小麦秆, 玉蜀黍, 玉蜀黍秸秆, 高粱, 高粱秸秆, 甜高粱, 甜高粱秸秆, 大豆秸秆, 大麦秆, 油菜秸秆, 燕麦秸秆和燕麦壳; 林业生物质, 例如回收木浆纤维, 锯屑, 木材, 硬木, 软木及其组合; 和纤维素废料, 例如废纸, 新闻纸, 纸板, 纸浆, 造纸厂残渣等。

[0043] 优选的木质纤维素材料选自: 小麦秆; 甘蔗渣; 玉米秸秆和它们的混合物。

[0044] 木质纤维素原料可以单独包含一种材料的颗粒、纤维或其它残余物, 或者可选择地, 可以源自多种不同的材料。还设想木质纤维素原料是新鲜的、部分干燥的或完全干燥的。在某些情况下, 使用新鲜的木质纤维素材料可能是有利的; 该材料的天然或结合水含量可以减少或消除在形成本发明的预处理反应混合物中加入水的需要。

[0045] 本发明不排除木质纤维素材料的物理预处理—其可以在使用苛性镁盐的所述预处理之前、与其结合或整合。例如, 木质纤维素材料可以经受蒸汽注射、烘焙、热解或  $\gamma$ -照射。更通常地, 材料可以经受通过撕碎、削片、碾磨、压缩/膨胀、挤出和研磨 (包括振动球研磨) 中的一种或多种的机械粉碎: 这些方法可用于: 减少木质纤维素材料的粒度; 增加材料的表面积及其对水解酶的可及性; 和, 降低纤维素结晶度。

[0046] 在一个实施方案中, 木质纤维素材料可以具有或被粉碎至0.1-250mm, 优选0.1-50mm的粒度。碾磨可以例如用于将材料的平均粒度减小到10-30mm; 研磨可以获得更小的粒度, 例如具有0.1至2mm的平均尺寸。木质纤维素材料的期望粒度分布或粉碎比部分地取决于基于预测的乳酸产率确定机械粉碎步骤的可接受能量消耗。Cadoche, L. 等人 Assessment

of size reduction as a preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes Biol.Wastes 1989,30,153-157的教导在评估作为最终粒度和粉碎比的函数的硬木和农业废料的尺寸减小的能量消耗方面是有指导意义的。

[0047] 在本发明的一个实施方案中,将任选地物理预处理的木质纤维素材料经受预提取步骤。如本文所使用的,术语“预提取”是指在定义的预处理步骤之前施加的旨在从木质纤维素物质中除去可溶性组分的任何方法或技术。虽然这种预提取通常用于除去包含在生物质中的不可发酵的可溶性组分,例如蛋白质、氨基酸和可溶性无机组分,但是还可以设想的是,可以使用预提取以从生物质除去可溶的可发酵的组分。

[0048] 在本发明的另一个实施方案中,酸水解步骤可以在木质纤维素材料与苛性镁盐接触之前进行,由此苛性盐可以用于中和至少部分的存在酸。这种酸水解步骤通常通过使原料与酸性水溶液流接触来进行,所述酸性水溶液流可以包括无机酸、有机酸、氨基酸、矿物酸、布朗斯台德酸和路易斯酸中的一种或多种。更通常地,酸可以是硫酸,磺酸,磷酸,硝酸,乙酸,乳酸,甲酸,草酸,琥珀酸,乙酰丙酸,碳酸,乙醇酸,糖醛酸,葡糖二酸,氢氟酸,盐酸,硼酸,三氟化硼,或这些酸的任意组合。含有酸性盐(例如硫酸铝,硫酸铁,硝酸铝或硝酸铁)的溶液也可以是有用的。

[0049] 虽然浓酸可能是纤维素水解的强力试剂,但它们伴随有毒性、苛性和危险性,因此不优选用于本文。因此,期望地,当使用时,酸性预处理水溶液应当具有小于8wt.%,例如小于4wt.%的浓度。稀酸预处理步骤通常可以在120°C至230°C,例如150至200°C的温度进行。

[0050] 本领域普通技术人员当然能够确定用于特定酸和木质纤维素原料的合适的接触或停留时间、酸浓度和接触温度。并且下面的教导在这方面可能是特别地有指导意义的: Esteghlalian, A.等人 Modeling and optimization of the dilute-sulfuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass, Bioresour. Technol. 1997, 59, 129-136. (77); Hinman, N.D.等人 Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology, Appl. Biochem. Biotechnol. 1992, 34/35, 639-649; 和, Brennan, A.H.等人 High temperature acid hydrolysis of biomass using an engineering-scale plug flow reactor: Result of low solids testing, Biotechnol. Bioeng. Symp. 1986, 17, 53-70。

[0051] 用苛性镁盐处理

[0052] 根据本发明的方法,任选地如上所述处理的木质纤维素材料在水的存在下与碱性试剂组合以形成反应混合物。

[0053] 确定如此组合的碱性试剂的量,以使得反应混合物或浆料中的苛性镁盐的浓度为至少0.1wt.%(w/w),优选至少0.5wt.%(w/w)(基于木质纤维素材料的干重)。通常,碱性试剂的量被确定为使得苛性镁盐的浓度为至多50wt.%(w/w)(基于木质纤维素材料的干重)。当预处理反应混合物中的苛性镁盐的浓度为0.5至40%(w/w),特别是5至30%(w/w)时,获得了良好的结果。

[0054] 形成的反应混合物或浆料通常应具有1至70%(w/w),例如10至60%(w/w),优选20至50%(w/w)的固体物。反应混合物或浆料的特征还可在于8.0至14.0,优选8.5至13.0,更优选9.0至12.0的pH。如本领域普通技术人员将认识到的,可以通过向反应混合物或浆料中加入一种或多种除苛性镁盐之外的苛性盐来实现大于9的pH。

[0055] 反应混合物或浆料的镁盐浓度、固体物和pH的这些特性不是相互排斥的；混合物可以具有所定义的性质的任何组合。本领域技术人员还将认识到，水和盐的量是结果有效变量，因此其最优选的量可以取决于木质纤维素材料的类型而不同于所述的那些值。

[0056] 如前所述，碱性试剂可以在将固体物调节至适当水平所需的任何水之前或之后以固体颗粒形式加入。或者，碱性试剂可以作为水溶液或分散体加入，但此变型不排除向混合物中进一步加入水或颗粒状固体碱性试剂。

[0057] 在本发明的一个重要实施方案中，在高于25°C的温度提供固体、水溶液或水性悬浮液形式的碱性试剂，用于与木质纤维素生物质混合；25°C至300°C或100°C至250°C的温度是可行的。该实施方案使得苛性镁盐能够源自在原位进行的热处理，而没有中间的热能损失。举例来说，可以以这种方式使用来自原位煅烧的氧化镁。

[0058] 其中可以放置反应混合物的合适的反应器或反应容器应该是封闭的和可加压的，但优选允许连续或周期性地排出反应期间形成的任何二氧化碳。本领域普通技术人员将能够基于反应是否作为分批过程或基本上连续过程以反应混合物的连续进料和水解产物的提取进行合适的反应器或合适的一系列反应器的适当确定。不旨在限制本发明，合适的反应器的实例包括：具有生物质的螺旋输送的卧式反应器；垂直塔式反应器，例如在英国专利号GB 706,686和GB 812,832中公开的那些。

[0059] 在分批和连续过程中，当然需要充分混合水、苛性盐和木质纤维素材料。还可能引起含有木质纤维素材料的液相和可能存在于反应器中的任何气相本身的混合。充分混合可以通过例如机械搅拌、液相再循环或通过选择通过管式反应器的合适流速来实现。

[0060] 可通过任何合适的方法向反应混合物供热，包括但不限于：蒸汽加热；感应加热；微波加热；将反应器或反应容器浸入合适的加热浴中；通过导热材料，其接触反应器或反应容器或浸入混合物中，并且加热的流体通过该导热材料；或类似地通过接触反应器或反应容器的外部和/或浸入反应介质中的一个或多个电阻加热元件。反应器或反应容器可任选地在引入木质纤维素材料之前预热。

[0061] 在本发明的一个重要实施方案中，将水性盐/生物质反应混合物在130°C至250°C，例如140°C或170°C至250°C，优选170°C至230°C的温度保持在反应容器中。反应混合物应在容器内处于压力下，以使得在所讨论的温度条件下不发生液体、水性介质的沸腾。在上述温度下在反应器中的总停留时间和对反应混合物中存在的固体所定义的总停留时间应为1至600分钟，更通常为1至480分钟。如将认识到的，水在反应器内的停留时间可以与固体的停留时间不同，这取决于所使用的反应器的类型。

[0062] 优选的停留时间将显著取决于所选择的温度、pH和木质纤维素材料的类型。选择在限定范围内的较高温度可以减少实现有效水解所需的停留时间。类似地，在所述范围内的较高pH下操作也将允许减少的停留时间。

[0063] 作为例证，已经获得了良好的结果，其中反应混合物具有5至25% (w/w) 的苛性镁盐浓度和9.0至12的pH，并且所述固体在130°C至250°C保持1分钟至240分钟，优选1至30分钟的时间。类似地，独立于pH，已经获得良好的结果，其中反应混合物具有5至25% (w/w) 的苛性镁盐浓度，并且其中反应混合物的所述固体在 i) 170°C至230°C的温度保持1至240分钟，优选1至120分钟的时间；或 ii) 140°C至170°C的温度保持180至600分钟，优选240至480分钟的时间。

[0064] 在其中木质纤维素材料已经预先经受酸水解步骤(酸预处理,任选地在升高的温度下),并且其中碱性处理a)作为中和步骤进行的本发明的该实施方案中,该处理步骤a)的温度不需要高达130℃。例如,温度可以为15至100℃,特别是30至80℃或45至70℃。在此上下文中,步骤a)的示例性处理如下进行:i)在2-10,优选4.0-9.0,更优选4.5-8,最优选4.5-5.5的pH下进行;ii)在15至100℃,优选30至80℃的温度进行;和iii)进行1至30分钟的时间,以中和经酸处理的木质纤维素材料。

[0065] 在必需的停留时间后,收集碱性水解的产物用于进一步处理。

[0066] 虽然不是强制性的,但是在用苛性镁盐预处理后可以处理木质纤维素原料,以获得包含预处理原料的固体流和包含可溶性组分的水性流。这可以通过用水溶液洗涤预处理的原料以产生洗涤流和包含预处理的原料的固体流来进行。或者或另外地,可使用已知方法例如离心、微滤、板框过滤、交叉流过滤、加压过滤、真空过滤等对经预处理的原料进行固液分离。由此获得的水性流本身可以单独经受发酵以发酵可用的糖:例如,可以将存在于该流中的木糖发酵成乙醇、木糖醇、乳酸、丁醇或其混合物。

[0067] 以上述方式预处理的木质纤维素材料用作通过酶促水解和微生物水解进行消化的底物。酸水解和湿氧化(其中预处理的材料在150至185℃的升高的温度下与氧接触,例如在酶促和/或微生物水解之前)的中间步骤不被本发明排除。此外,如本领域众所周知的,可以调节经预处理的木质纤维素材料或包含木质纤维素材料的固体流的pH和温度以促进酶促水解和/或微生物发酵。

[0068] 在生物介导的转化的制备中,预处理的木质纤维素原料或包含预处理的原料的固体流通常在水溶液例如工艺水、淡水、蒸汽冷凝物或工艺再循环流中浆化。水性浆料理想地应具有能使其被泵送的固体浓度,并且浆料中经预处理的木质纤维素原料的耐受浓度将特别取决于原料的粒度和水保留以及泵容量。

[0069] 在实践中,固体浓度通常为基于浆料总重量的3至30wt.%,优选为10至25wt.%的固体浓度。在需要时,悬浮或未溶解的固体的浓度可以通过使用玻璃微纤维滤纸过滤浆料的样品、用水洗涤滤饼、并将滤饼干燥过夜来确定。进一步优选的是,纤维状或颗粒状固体包含20或30wt.%至70wt.%的纤维素。

[0070] 在本发明的方法中,通过以下过程处理经预处理的木质纤维素材料:在水解酶的存在下糖化经处理的水性木质纤维素生物质,以提供包含可发酵的糖和不溶性木质纤维素级分的糖化水性木质纤维素生物质;在生成乳酸的微生物的存在下和在苛性镁盐的存在下发酵糖化的水性木质纤维素生物质,以提供包含乳酸镁和固体木质纤维素级分的水性发酵液;和从发酵液中回收乳酸镁。糖化和发酵步骤同时进行。来源于糖化和发酵步骤的固体木质纤维素级分包含未水解的纤维素和半纤维素和未溶解的木质素级分。

[0071] 糖化通常使用选自以下的一种或多种酶:纤维素酶例如CBH1,CBH2,EG和BGL;具有纤维素分解增强活性的GH61多肽,如例如W02005/074647、W0 2008/148131和W0 2011/035027中所述的;半纤维素酶;膨胀素;酯酶,例如催化来自多聚木聚糖、乙酰化木糖、乙酰化葡萄糖、乙酸 $\alpha$ -萘酯和乙酸对硝基苯酯的乙酰基的水解的乙酰木聚糖酯酶(EC 3.1.1.72);漆酶;木质素分解酶;果胶酶;过氧化物酶;蛋白酶;淀粉分解辅助酶;菊粉酶,叶绿素酶;和溶胀素。

[0072] 在本发明的一个令人感兴趣的实施方案中,在同时糖化和发酵(SSF)之前可以进

行在高于50℃,例如50至75℃的温度下进行的30至180分钟的预糖化步骤。在这样的预糖化步骤对经预处理的木质纤维素材料如此执行的情况下,以下的示例性文献的教导可以是有指导意义的:US 201301222554 (Honda Motor Co.Ltd) 和日本专利公开号2006-101829和2008-271962。

[0073] 现在将更详细地描述木质纤维素材料(以下称为发酵培养基)的同时糖化和发酵。

[0074] 同时糖化和发酵

[0075] 如本领域已知的,可以为发酵培养基提供额外的可发酵的碳水化合物。如果通过基于针对适当的C5、C6和/或C12糖标准物的校准的高pH阴离子交换色谱法测量的可发酵的碳水化合物的含量被认为太低,则这可能是必需的。还可以将具有相对低的可发酵的碳水化合物含量的初级浆料与具有相对高的可发酵的碳水化合物含量的次级浆料组合。

[0076] 还已知的是,除了木质纤维素材料之外,用额外的营养物补充发酵培养基。可以以固体形式或作为在水中的溶液或分散体添加的这种额外的营养物通常包含以下的一种或多种:矿物盐,特别是矿物氮、磷酸盐、硫和微量元素如锌、镁、钙、锰、钾、钠、硼、铁、钴、铜、钼、镍和铝的来源;有机氮,例如酵母自溶物和水解产物,植物蛋白水解产物和动物蛋白水解产物。这种有机氮源通常提供游离氨基酸、寡肽、肽、维生素和痕量的酶辅助因子形式的氮;也不排除以纯形式向培养基中加入这些物质。

[0077] 在发酵期间,如前所述,可以将碳水化合物降解酶加入到发酵液中以帮助可发酵的碳水化合物,特别是聚合物形式的碳水化合物的降解。这种同时糖化和发酵的概念描述于例如W003/095659和US2013236933 (Huang等人)中。

[0078] 在接种之前,发酵培养基的pH应当调节至适于用所选择的微生物发酵的pH。通过向发酵培养基中加入合适的化合物(通常为酸,例如硫酸,硝酸,盐酸或优选乳酸),将其pH调节至通常为2-10的值。例如,对于同时糖化和发酵,培养基的pH值通常为5或6至8,对于所谓的低pH发酵,培养基的pH值通常为2至5。当木质纤维素材料在混合并用苛性镁盐处理之前经受酸水解时,在此阶段,用该盐对酸的中和可以减轻使pH达到所需水平所需的pH调节剂的量。

[0079] 在一个令人感兴趣的实施方案中,发酵培养基的pH可以通过加入一定量的木质纤维素材料来调节,所述木质纤维素材料本身由于通过酸水解处理(例如如上所述的)而具有酸性pH。

[0080] 在苛性镁盐的存在下,通过产生乳酸的微生物(例如细菌,酵母和/或真菌)发酵发酵培养基,以提供含有乳酸镁的发酵液。发酵通常通过将发酵培养基与微生物在合适的温度孵育合适的一段时间来进行。

[0081] 合适的产生乳酸的微生物可以包括细菌、真菌和酵母,并且可以选自作为同型乳酸生产者或产生乳酸的异型发酵微生物的微生物。微生物可以被遗传工程化以产生或过量产生乳酸。

[0082] 这样的微生物的实例包括但不限于:乳杆菌属(Lactobacillus),明串珠菌属(Leuconostoc),片球菌属(Pediococcus),乳球菌属(Lactococcus),链球菌属(Streptococcus),气球菌属(Aerococcus),肉杆菌属(Carnobacterium),肠球菌属(Enterococcus),酒球菌属(Oenococcus),芽胞乳杆菌属(Sporolactobacillus),四联球菌属(Tetragenococcus),漫游球菌属(Vagococcus),魏斯氏菌属(Weissella),芽孢杆菌属

(*Bacillus*) (包括凝结芽孢杆菌 (*Bacillus coagulans*), 地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*), 史氏芽孢杆菌 (*Bacillus smithii*), 热弹性芽孢杆菌 (*Bacillus thermolactis*), 和热噬淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus thermoamylovorans*)), 土芽孢杆菌属 (*Geobacillus*) (包括嗜热脂肪土芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*) 和 *Geobacillus thermoglucosidans*), 热解纤维素菌属 (*Caldicellulosiruptor*) (包括 *Caldicellulosiruptor saccharolyticus*), 梭菌属 (*Clostridium*) (包括热纤维梭菌), 热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacterium*) (包括热厌氧杆菌属), 热厌氧杆菌属 (包括 *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*), 好热厌氧杆菌属 (*Thermoanaerobacter*) 和大肠杆菌属 (*Escherichia*) (包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)); 和来自酵母菌属 (*Saccharomyces*) (包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*))、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) (包括乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) 和马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*))、伊萨酵母属 (*Issatchenkia*) (包括东方伊萨酵母 (*Issatchenkia orientalis*))、毕赤酵母属 (*Pichia*) (包括树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*))、假丝酵母属 (*Candida*) (包括博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*), 木兰假丝酵母 (*Candida magnolia*) *Candida methanosorbosa*, *Candida sonorensis* 和产脲假丝酵母 (*Candida utilis*)) 和根霉菌属 (*Rhizopus*) (包括无根根霉菌 (*Rhizopus arrhizus*), 小孢子根霉菌 (*Rhizopus microspores*) 和米根霉菌 (*Rhizopus oryzae*))。

[0083] 特别感兴趣的细菌属是乳杆菌属、芽孢杆菌属 (包括包括凝结芽孢杆菌, 地衣芽孢杆菌, 史氏芽孢杆菌, 热弹性芽孢杆菌, 和热噬淀粉芽孢杆菌), 土芽孢杆菌属 (包括嗜热脂肪土芽孢杆菌和 *Geobacillus thermoglucosidans*) 和大肠杆菌属 (大肠杆菌)。另外或可选地, 优选的细菌物种是在约6至约8范围内的pH显示最佳生长的那些。

[0084] 孵育温度可以取决于所使用的微生物。例如, 可以通过分析发酵微生物在不同温度条件下的活性来确定使用的最佳温度。通常, 温度可以在30至80°C的范围内; 优选使用40至75°C的温度, 更优选45至70°C的温度。

[0085] 如本领域已知的, 可以在发酵期间调节和控制发酵培养基的pH: 取决于方法中使用的微生物, pH降到临界值以下可能损害微生物的代谢过程, 并使发酵过程停止。通常, 在发酵过程中调节pH以维持4至9或优选5至8的上述范围。

[0086] 本文中, pH的调节通过优选选自MgO、Mg(OH)<sub>2</sub>、MgCO<sub>3</sub>、Mg(HCO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>及其混合物的苛性镁盐实现: 苛性镁盐中和发酵期间微生物排泄的乳酸, 从而产生乳酸镁盐。任选地, 在发酵期间存在的一部分苛性镁盐可能已经通过预处理步骤提供或者是来自预处理步骤的残余物。另外或可选地, 苛性镁盐可以在发酵过程中有目的地添加。不排除加入少量的补充量的其它苛性盐, 特别是碱金属和碱土金属的苛性盐。

[0087] 本领域普通技术人员将意识到, 在发酵期间可以形成乳酸镁晶体, 其中盐的浓度足够高。乳酸镁的沉淀是否发生将因此取决于发酵培养基中可发酵的碳水化合物的浓度、发酵温度、发酵培养基的其它成分的浓度和添加的苛性镁盐的稀释因子。通常, 当在80°C的温度测量时, 乳酸镁在至多9.5wt.%的浓度下保持溶于发酵液中。

[0088] 使发酵进行4小时至1周的时间; 可提及8小时至3天的示例性时间段。当发酵液体的液相中的可发酵的碳水化合物的含量低于5g/l, 例如低于2g/l或1g/l时, 发酵可以同样停止。可发酵的碳水化合物的量可以通过使发酵液的提取样品经受固/液分离步骤, 从而从

液相中除去任何固体来监测;然后通过高pH阴离子交换色谱法使用合适的装置例如脉冲电流检测器 (HPAEC-PAD) 获得该液相的色谱图。然后基于通过使用适当的标准物 (例如C<sub>5</sub>、C<sub>6</sub>和/或C<sub>12</sub>糖标准物) 进行的校准来确定液相的碳水化合物组成。通常,相对于消耗的可发酵的碳水化合物 (例如C<sub>5</sub>、C<sub>6</sub>和/或C<sub>12</sub>糖) 产生的乳酸的摩尔产率为70至100%,特别是80至100%。

[0089] 包含与苛性镁盐组合的经预处理的木质纤维素材料的发酵培养基的发酵可产生包含乳酸镁的发酵液,其中乳酸镁的浓度为乳酸镁仅存在于溶液中的浓度。然而,优选乳酸镁的结晶在发酵液中进行。

[0090] 在本发明中实际优选的是,将包含溶解的和结晶的乳酸镁、木质纤维素级分和生物质的发酵液完全回收并在没有预先处理发酵液的情况下或在浓缩步骤后用盐酸进行酸化,从而在环境压力或减压下从发酵液中蒸发水以进一步结晶出乳酸镁。

[0091] 然而,在本发明中并不旨在限制可以从发酵液中浓缩和回收乳酸镁的方法。术语回收旨在包括从发酵液中分离乳酸镁和提取乳酸镁作为与来自发酵步骤的生物质残余物组合的固体、溶液或悬浮液。在本文中可以采用一种或多种已知或常规的回收方法,如液/液萃取、纳滤、活性炭处理、蒸馏和重结晶、吸附、电透析、膜分离、反应萃取和酯化。其它合适的方法尤其公开于W02005/123647和W0 2011/095631 (均为Purac Biochem B.V.) 中,其公开内容通过引用并入本文。并且这样的方法同样可以用于应用于乳酸镁的进一步的纯化步骤。

[0092] 本发明不排除回收乳酸镁的使该盐部分纯化的方法。例如,在一个示例性方法中,对包含溶解的和结晶的乳酸镁的发酵液进行固/液分离;然后进一步处理由此获得的包含乳酸镁、木质素和生物质的固体;并且母液可以再循环至生物介导的转化过程-酶促水解和/或发酵步骤-以提供水平衡。

[0093] 在替代的部分纯化方法中,溶解的乳酸镁可以通过依次进行以下步骤从发酵液中分离:i) 固/液分离步骤,任选地在20至75°C或30至60°C的温度进行,其中通过浮选、沉降、絮凝、离心、过滤和倾析中的一种或多种处理含乳酸镁的发酵液,以提供含有乳酸镁的培养基,其与保留在固体残渣中的生物质和其它固体杂质分离;和ii) 浓缩步骤,以从所述乳酸镁培养基提供乳酸镁晶体。该浓缩步骤ii) 可以通过在环境压力或减压下除去水或通过蒸发结晶进行。或者,该浓缩步骤可以通过蒸发然后冷却结晶进行。源自木质纤维素材料的盐保留在液相中,因此不会与乳酸镁晶体共沉淀或共结晶。形成的乳酸镁晶体可以通过固/液分离法分离并洗涤。

[0094] 基于发酵期间产生的乳酸的量,乳酸镁晶体形式的乳酸的回收产率通常为50wt.%至99wt.%或甚至为70wt.%至99wt.%。

[0095] 回收的乳酸镁的酸化

[0096] 在从发酵液中回收乳酸镁之后,本发明方法的一个重要实施方案包括以下步骤:e) 提供包含氯化氢的进料,所述进料是包含氯化氢的水溶液或包含气态氯化氢的气体进料;和f) 通过使所述乳酸镁与包含氯化氢的所述进料接触,将回收的乳酸镁酸化成乳酸,从而形成包含乳酸和氯化镁的液体流出物。

[0097] 酸化通常使用摩尔过量的酸进行。然而,摩尔过量应该是小的,以使得获得的液体流出物不是高度酸性的 (这对于该流出物的进一步处理是不期望的)。

[0098] 此外,酸化通常在20℃至150℃,例如40℃至120℃,优选45℃至80℃的温度进行。在较高的温度,使设备适应高温下酸性环境的恶劣条件变得不经济。

[0099] 在步骤f)中处理的乳酸镁可以是固体、溶液或悬浮液的形式。虽然最后一种形式不太常见,但是如可在低pH发酵中获得的乳酸和乳酸镁的混合物可以具有这种形式并且可经受酸化。

[0100] 在其中乳酸镁以固体形式提供的优选实施方案中,酸化步骤f)通过使固体乳酸镁与酸性HCl溶液接触来进行。该酸性溶液应当优选具有尽可能高的酸浓度以驱动形成具有高羧酸浓度的水性混合物。理想地,基于酸性溶液的总重量,酸性水溶液应包含至少5wt.%,优选至少10wt.%,甚至更优选至少20wt.%的HCl。在这样的加工条件下,可以获得非常高的乳酸浓度;可提及15至50wt.%的浓度。

[0101] 当乳酸镁以溶解形式(通常为水溶液)或分散形式提供时,酸化步骤f)可以通过使乳酸镁与如上所述的氯化氢的酸性溶液或与包含气态氯化氢的酸性气体接触来进行。在后一种情况下,包含气态HCl气体的气体进料可以吹过该盐的溶液或悬浮液。

[0102] 提供给酸化反应的气体进料通常包含至少1wt.%,优选至少2wt.%,更优选至少5wt.%的氯化氢(基于气体总重量)。小于1wt.%的浓度通常是不希望的;为了保持有效的酸化,这样的低浓度将需要管道的基本结构以将酸化气体进料到乳酸镁溶液或悬浮液进料中。虽然在气体进料中的高浓度的氯化氢通常是期望的,但实际上气体进料将包含基于气体总重量的20wt.%或更少的氯化氢。

[0103] 气体进料中气态HCl的示例性浓度为基于气体总重量的5至15wt.%或7至12wt.%。如下所述的在氯化镁的热水解中获得的气体的HCl浓度通常落在这些范围之内。

[0104] 在本发明的一个实施方案中,包含气态氯化氢的气体进料还包含气态水,其中气态进料中的氯化氢与水的重量比为1:10至10:1。特别地,HCl/H<sub>2</sub>O重量比可以为1:10至1:4,优选为1:6至1:4,更优选为1:5至1:4。

[0105] 独立于此实施方案,但优选附加地,包含气态氯化氢的气体进料还包含一种或多种惰性气体。如本文所用,本文所用的术语“惰性气体”是指在酸化期间不与液体进料反应、凝结或吸收的气体,并且在已经与液体进料接触之后作为气体离开液体进料。这样的惰性气体优选选自N<sub>2</sub>,O<sub>2</sub>,CO<sub>2</sub>及其混合物。尽管惰性气体可占基于气体总重量的至多95wt.%,但更典型的是40至80wt.%的惰性气体的量。

[0106] 在乳酸镁的水溶液或悬浮液的酸化(使用包含通过其的气态氯化氢的气体进料)中,优选在与气体进料的任何接触之前将该溶液或悬浮液的温度升高至60℃至120℃。通过这样升高温度,与气流中包含的水的吸附相比,HCl从气流中的吸附具有增强的选择性:这最小化乳酸镁的水溶液或悬浮液的稀释。虽然气体进料的温度在此上下文中不太重要,但是其不应该如此低以使得存在于其中的水在其通过乳酸镁的溶液或悬浮液时凝结。

[0107] 酸化步骤f)的液体流出物可以包含固体材料,例如木质素。优选地,例如通过过滤从液体流出物中除去这样的固体材料,因为其存在进一步的加工步骤例如乳酸提取过程中是不期望的。

[0108] 乳酸分离

[0109] 无意限制可以从酸化步骤f)的液体流出物或任意的分离步骤g)中分离乳酸的方



法。可以想到,可以使用通过萃取、固体吸附、蒸发或膜分离的分离,条件是所述方法还有效地产生氯化镁溶液或悬浮液。在这方面,本文优选的是分离步骤h)包括乳酸的萃取。

[0110] 在W02013/093028 (Purac Biochem B.V.)中教导了从酸化步骤f)的液体流出物产物或任意的分离步骤g)中萃取乳酸的合适方法,其公开内容通过引用并入本文。其中,水性混合物(在从其除去固体材料之后)通过使其与包含选自C5+酮、二乙醚和甲基叔丁基醚的有机溶剂的有机液体接触进行萃取步骤,由此获得有机乳酸溶液和包含氯化镁的水性废液。在该正向萃取中,通过将乳酸溶解在第一有机液体中,将乳酸与存在于水性混合物中的杂质分离。杂质将保留在水性混合物中。

[0111] 已知的是,W02013/093028 (Purac Biochem B.V.)的萃取方法在包含至少5wt.%的氯化镁的水性介质中进行。如果从酸化步骤f)获得的产物不满足此要求,可以采取各种措施。例如,可以将氯化镁加入到产物中直至达到所需的浓度。或者或另外地,可以进行浓缩步骤以通过除去水来增加氯化镁的浓度。水性混合物可以在酸化之后但在萃取之前浓缩至最高氯化镁的溶解度的所需浓度。在浓缩期间,优选不发生或基本上不发生氯化镁的沉淀。

[0112] 从酸化步骤f)的产物中萃取乳酸的替代方法公开于:美国专利号6,509,179 B1 (Veldhuis-Stribos);和W0 00/17378 (IMI Institute for Research&Development)。这些文献的公开内容通过引用并入本文。

[0113] 本发明不排除使用本领域已知的方法纯化萃取的乳酸。作为非限制性实例,以下文献的教导可以在这方面具有指导意义:美国专利号6,630,603 (van Breugel等);荷兰专利申请号1013265和1013682;Ullmans **Encyklopädie** der Technischen Chemie, Verlag Chemie GmbH, Weinheim, Fourth Edition, Volume 17, pp.1-7 (1979); H. Benninnga "History of Lactic Acid Making", Kluwer Academic Publishers, Dordrecht-Boston-London (1990); C.H. Holten, "Lactic Acid; Properties and Chemistry of Lactic Acid and Derivatives", Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1971); The Merck Index, Merck&Co., Inc., Eleventh Edition, p.842 (1989); 和, **Römmp** Chemie Lexicon, G.Thieme Verlag, Stuttgart and New York, Ninth Edition, Volume 4, pp.2792-2893 (1991)。

[0114] 热水解

[0115] 在本发明的一个重要方面,所述方法包括将在分离或萃取步骤中获得的包含氯化镁的水性废液在至少300°C的温度经受热分解步骤的步骤。在这些条件下,氯化物盐被热水解产生固体氧化镁和包含气态氯化氢的气体。

[0116] 优选地,热分解在至少350°C的温度进行。由于能量成本,温度优选低于1000°C,更优选低于800°C,还更优选低于600°C。另外,对于热分解步骤使用过高的温度是不期望的,因为它将降低所形成的MgO的反应性,从而使其不太适合用作例如发酵中的中和剂。在示例性实施方案中,进行热分解的温度可以为350-600°C或400-500°C。所述温度是当气体从热水解单元中除去时它们的温度。

[0117] 基于水性液体的总重量,待热水解的水性液体中的氯化镁的浓度优选为15至40wt.%,更优选为20至30wt.%。尽管它们是可容忍的,但由于在热水解期间蒸发水中所涉及的高能量成本,较低的MgCl<sub>2</sub>浓度是不期望的。

[0118] 重要的是,固体氧化镁和气态氯化氢产物可以再循环到用于乳酸制备的所述方法中的其它阶段:这可以导致其中产生相对少的废物的整体过程。特别地,至少部分的氧化镁可以在本发明的步骤a)或步骤c)中直接使用。或者,其可以用作在这些步骤中使用的另一种苛性镁盐的前体。在后者方面可以具体提及通过使氧化镁与水接触形成氢氧化镁浆料。

[0119] 因为热分解步骤在高温下发生,所以它消耗大量的能量。然而,从热分解步骤回收的氧化镁将处于升高的温度,并且热量可因此从其转移至预处理步骤a)和发酵步骤c)的水性介质和/或木质纤维素材料。这可以减少商业过程中的那些步骤的能量负担。此外,在步骤a)中,在升高的温度将固体氧化镁引入到木质纤维素材料的固体块中,可以促进结合水从该材料中释放,并且可以有助于其木质素的分解。

[0120] 源自氯化镁热分解的至少部分的HCl可用于酸化在发酵过程中获得的乳酸镁。现实的是,在酸化步骤f)中使用的至少80mol.%的HCl来源于热分解步骤;以这种方式获得至少90mol.%或至少95mol.%是不寻常的。

[0121] 通过以这种方式获得HCl还存在至少两种热能保存机制。源自热分解步骤的HCl气流可以经受热交换步骤,其中气流的温度降低至80-150°C范围内的值:可以将具有该温度的气流直接提供至酸化步骤f)并且可以进一步输送到其中,而不需要昂贵的耐热和耐腐蚀的管道材料。类似地,在升高的温度下来源于热分解步骤的HCl的溶解可以至少部分地减轻将氯化氢的水溶液加热至酸化温度所需的热能。

[0122] 应注意,除了气态HCl以外,热分解产物流通常还含有气态水。虽然可以从气流中除去水,但是这样的中间水除去不是必需的:如上所述,可以在酸化步骤中使用包含氯化氢和水的的多相气流。在至少一种惰性气体的存在下进行热水解将类似地产生包含氯化氢、所述一种或多种惰性气体和通常水的气体产物流:这样的气流还可直接用于酸化步骤f)。在MgCl<sub>2</sub>热水解中获得的用于酸化步骤的示例性气体进料包含40-50wt.%N<sub>2</sub>,0-5wt.%O<sub>2</sub>和5-15wt.%CO<sub>2</sub>。

[0123] 在特定情况下,获得的气流中的水的量将特别取决于氯化镁溶液中的水的量和热分解期间存在的惰性气体的量。在一个示例性实施方案中,通过20-40wt.%氯化镁溶液的热水解获得的气体进料通常将具有至少1:10和至多1:4的氯化氢与水的重量比(HCl/H<sub>2</sub>O比)。在使用25-30wt.%的氯化镁浓度的情况下,其通常将具有1:6至1:4,特别是1:5至1:4的HCl/H<sub>2</sub>O比。在这种情况下,获得的用于酸化步骤f)的气体进料通常包含5-15wt.%的HCl和30-45wt.%的水。本领域普通技术人员将能够浓缩或稀释获得的气体进料,其中期望使用较高或较低的HCl浓度。

[0124] 虽然乳酸的工业效用是众所周知的,但源自本发明的预提取、预处理和/或发酵步骤的那些杂质也可在适当的物理和/或化学处理之后得到应用。设想残余的纤维素和木质素可以用作电或蒸汽生产的锅炉燃料。此外,木质素的黑液气化是最近的商业开发。某些杂质可以用作肥料,特别是富镁肥料。并且可以捕获在发酵过程中释放的二氧化碳用于销售,例如用于饮料工业。

[0125] 通过以下实施例进一步说明本发明,但不限于此。

## 实施例

[0126] 原材料及其分析:

[0127] 甘蔗渣由Purac Thailand Ltd. (Rayong, Thailand) 提供。

[0128] 磨碎的小麦秸秆从当地供应商处获得。对于下面的实施例1至9, 使用Retch Cutting Mill (SM100) 研磨小麦秸秆, 然后筛分以获得在500微米至1mm范围内的中值粒度。对于以下实施例10至12, 使用锤式粉碎机 (Apex Commuting Mill) 研磨小麦秸秆, 筛分尺寸为1.5mm。

[0129] 使用Mettler Toledo Advanced Moisture Analyzer测量所选的0.5-2.0g磨碎的小麦秸秆样品库的干重含量。

[0130] 根据在Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass:Laboratory Analytical Procedure (LAP), National Renewable Energy Authority (August 2012) <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy13/42618.pdf>; 和Determination of Ash in Biomass:Laboratory Analytical Procedure (LAP), National Renewable Energy Authority (January 2008) <http://www.nrel.gov/docs/gen/fy08/42622.pdf>中给出的程序, 分析小麦秸秆和甘蔗渣的碳水化合物、酸溶性木质素、酸不溶性木质素和灰分含量。在适用的情况下, 与所述程序有关的当前实践可以在[http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html)找到。

[0131] 在适用的情况下, 使用Megazyme D-葡萄糖测定试剂盒 (葡萄糖氧化酶/过氧化物酶; GOPOD), 使用脉冲电流检测器 (Roche/Hitachi GOD-PAD) 和分光光度法 (Hitachi U-2800, 540nm) 测定葡萄糖。木糖可以使用Megazyme D-木糖试剂盒和分光光度法 (Hitachi U-2800, 340nm) 测定。

[0132] 基于总干重, 来自小麦秸秆的葡萄糖的理论最大产量被测定为37.1wt.%。

[0133] 实施例1-9

[0134] 预处理: 将磨碎的小麦秸秆或甘蔗渣的经称取的12.45g部分分别在150ml去矿物质水中浆化, 然后向其中加入固体氧化镁或在适用的情况下, 加入固体氧化钙或氢氧化钠; 不加入其它碱性化合物。为了完整性, 应注意到在下面的实施例9中, 在固体氧化镁之后将NaOH加入到磨碎的小麦秸秆中, 从而提高该样品的pH。

[0135] 所述样品的预处理在双壁不锈钢搅拌反应器 (Buchi Autoclave) 中进行。反应器额定为60巴, 并配备有压力安全弹簧。使用高达190℃的热油进行加热。

[0136] 每个单独部分的性质和它们经受的温度和停留时间的不同条件示于下表1中。将所有样品在反应器中连续搅拌所需的停留时间。此外, 用苛性氧化镁或氧化钙处理的所有样品在任何加热步骤之前具有8.5-9.4的初始pH。

[0137] 酶促水解的准备: 使用Buchner过滤器在减压 (约200mBar) 下对如此预处理的固体进行第一固/液分离步骤。收集液体级分用于分析。收集固体, 分散在水中并用乳酸中和至6-7的pH。

[0138] 接下来, 使用配备有5微米滤布的过滤离心机 (Hermle Sieva 2) 对固体进行两阶段第二固/液分离步骤。在第一阶段中, 离心机以5000rpm开始, 然后增加至10000rpm; 收集滤液并再次加入到离心机中; 收集随后获得的滤液和滤饼的样品用于分析。在第二阶段中, 通过向其中加入1升去矿物质水来重新启动离心。然后收集分离的固体部分; 在经受酶促水解之前测量其干物质含量。

[0139] 酶促水解: 在10% (w/w) 的干物质含量下, 将预处理的固体在50mL聚丙烯管中用可

从Dyadic获得的纤维素酶混合物CMAX4水解。使用磷酸钾缓冲液 (pH6.4), 此外, 存在叠氮化钠 (0.02%, w/w) 以防止水解产物的微生物感染。在实验中酶的添加量是不同的 (如表1所示), 其中20mg/g干重的酶装载量是更常见的, 应注意此装载应当确保碳水化合物的令人满意的释放 (NREL, 2011)。

[0140] 水解反应在52℃以300rpm孵育。24小时、48小时和72小时后, 取出一式两份0.2ml样品并使用微量板过滤; 然后分析一式两份的上清液。

[0141] 葡萄糖的浓度在下表1中给出。

[0142] 表1

[0143]

| 实例 | 底物      | 预洗涤 (Y/N) | 处理温度 (°C) | 停留时间 (min.) | 碱性试剂 | 碱性试剂剂量 (% w/w) | 酶剂量 (mg 蛋白质/g 干固体) | 葡萄糖浓度 (g/L, 在 72h) |
|----|---------|-----------|-----------|-------------|------|----------------|--------------------|--------------------|
| 1  | 磨碎的小麦秸秆 | Y         | 190       | 60          | MgO  | 12             | 5                  | 23.3               |
| 2  | 磨碎的小麦秸秆 | Y         | 190       | 120         | MgO  | 12             | 5                  | 14.9               |
| 3  | 磨碎的小麦秸秆 | Y         | 190       | 60          | MgO  | 8              | 5                  | 18.1               |
| 4  | 磨碎的小麦秸秆 | Y         | 190       | 120         | MgO  | 8              | 5                  | 13.0               |
| 5  | 磨碎的小    | Y         | 190       | 60          | MgO  | 10             | 20                 | 40.6               |

[0144]

|           |         |   |     |     |                     |    |    |      |
|-----------|---------|---|-----|-----|---------------------|----|----|------|
|           | 麦秸秆     |   |     |     |                     |    |    |      |
| 6         | 磨碎的小麦秸秆 | N | 190 | 60  | MgO                 | 10 | 20 | 37.5 |
| 7         | 磨碎的小麦秸秆 | Y | 190 | 30  | MgO                 | 10 | 20 | 37.2 |
| 8<br>(比较) | 磨碎的小麦秸秆 | Y | 85  | 480 | CaO                 | 8  | 20 | 22.9 |
| 9         | 甘蔗渣     | Y | 190 | 20  | MgO+NaOH<br>(pH=11) | 10 | 20 | 13.7 |

[0145] 从表1中可以清楚地看出,用苛性镁盐对小麦秸秆的升高的温度的预处理促进了该生物质的随后的水解,如所获得的葡萄糖浓度所证明的。

[0146] 实施例10

[0147] 本实施例旨在显示预处理过程的按比例扩大以适应更大量的木质纤维素材料。

[0148] 预处理:将磨碎的小麦秸秆的经称取的1.6kg部分单独地在13.4升去矿物质水中浆化,然后向其中加入固体氧化镁;不加入其它碱性化合物。

[0149] 所述样品的预处理在配备有锚式螺旋桨的双壁不锈钢夹套反应器(50升Buchi Autoclave)中进行。反应器额定为大于20巴,并配备有压力安全弹簧。使用加压蒸汽的直接注入和通过夹套循环的热油进行加热至190℃。将反应混合物在其在反应器中的停留时间期间连续搅拌。

[0150] 在进行反应后,使用在夹套中循环的油冷却反应器,然后通过释放反应器的压力进行快速冷却。然后收集反应器的内容物。

[0151] 所收集材料的性质和该材料所经受的温度和停留时间的条件示于下表2中。此外,以这种方式用苛性氧化镁处理的样品在任何加热步骤之前具有8.5-9.4的初始pH。

[0152] 酶促水解的准备:使用1mm筛网在重力下对如此预处理的固体进行第一固/液分离步骤,将液体级分收集在120升容器中。收集固体,将其分散在另一个120升容器中的水中并用乳酸(50wt.%水溶液)中和至6-7的pH。

[0153] 如上所述将形成的浆料在重力下再次过滤(1mm筛网),除了将26升去矿物质水均匀地撒在滤饼上。将滤饼分成六个部分(SP),使用台式压滤机(Fischer Machine Fabrik)在施加的250巴的压力下将每个部分压制。然后收集每个分离的固体级分;随后将滤饼破碎、匀化并分配在两个容器(SP1,SP2)上。测量每个容器的干物质含量,发现为38-42%(w/w)。

[0154] 酶促水解:将预处理的固体在聚丙烯管中用可从Dyadic获得的纤维素酶混合物CMax4水解;加入预处理的固体以达到按干重量计10wt.%的量(约1g干重)。使用磷酸钾缓冲液(pH6.4),此外,存在叠氮化钠(0.02%,w/w)以防止水解产物的微生物感染。酶装载为20mg/g干重。

[0155] 水解反应在52℃以300rpm孵育。24小时和48小时后,取出一式两份0.2ml样品并使用微量板过滤;然后分析一式两份的上清液。

[0156] 葡萄糖的浓度在下表2中给出。

[0157] 表2

[0158]

| 实例 | 底物      | 处理温度(°C) | 停留时间(min.) | 碱性试剂 | 碱性试剂剂量(% w/w) | 酶剂量(mg protein/g dry solids) | 葡萄糖浓度(g/L, 在48h) |
|----|---------|----------|------------|------|---------------|------------------------------|------------------|
| 10 | 磨碎的小麦秸秆 | 190      | 59         | MgO  | 10            | 20                           | 53.2             |

[0159] 实施例11

[0160] 预处理: 以与上述实施例10所述相同的方式对磨碎的小麦秸秆的经称取的1.6kg部分进行预处理。因此, 所收集的材料性质和该材料所经受的温度和停留时间的条件示于上表2中。此外, 如前所述, 用苛性氧化镁以这种方式处理的样品在任何反应器加热步骤之前具有8.5-9.4的初始pH。

[0161] 同时糖化和发酵的准备: 使用1mm筛网在重力下对如此预处理的固体进行第一固/液分离步骤, 将液体级分收集在120升容器中。将滤饼分成11份(SSFP), 使用台式压滤机(Fischer Machine Fabriek)在施加的250巴的压力下将每个部分压制。然后收集每个分离的固体级分; 随后将滤饼破碎、匀化并分配在两个容器(SSF1, SSF2)上。每个容器的平均干物质含量测量为: 40.26%w/w, SSF1; 和42.95%w/w, SSF 2。

[0162] 同时糖化和发酵

[0163] 如本实施例中所用, 凝结芽孢杆菌DSM2314是公开可得的非GMO菌株。凝结芽孢杆菌DSM2314的工作储备物从-80℃冰箱中取出, 并在含有7.7g/l葡萄糖一水合物、2g/l DAP、3.5g/l DAS、1g/l CaCl<sub>2</sub> · 5H<sub>2</sub>O和10g/l酵母提取糊状物的无菌培养基(50%干固体)中预培养。

[0164] 种子发酵: 为了产生种子发酵, 向标准Minifors单位装载1升所述无菌发酵培养基。向该培养基中加入50ml上述接种物。将培养基在200rpm下搅拌并在52℃的温度保持约20小时。在此期间, 还通过向其中加入氢氧化镁(水溶液)来将培养基的pH保持在6.4。

[0165] 同时糖化和发酵: 在适于包括高扭矩、螺旋搅拌器和外部1rpm泵的另外的minifors单元中进行同时糖化和发酵, 所述泵用于向所述单元中添加污泥。

[0166] 在本实施例中, 使用两小时的预糖化步骤, 其中在不存在接种物的情况下, 在5%(w/w)干物质的底物装载下, 首先将底物(SSF1)装载到经适应的minifors单元中。使用纤维素酶混合物C MAX4 (Dyadic)以20mg/g干重的酶装载进行预糖化; 在1300ml的起始体积下, 将预糖化培养基在200rpm下搅拌并保持在52℃的温度和6-7的pH。

[0167] 两小时后, 引入100ml接种物, 并将反应器在搅拌、温度和pH的上述条件下再保持3小时, 再次使用氢氧化镁控制pH。

[0168] 之后, 停止搅拌器, 并首先引入50g剂量的底物(SSF1); 然后将搅拌器重新启动至200rpm, 并且如果需要, 将反应器的温度调节至52℃。监测pH, 并且当培养基的pH降至6.4之下时, 以相同的方式加入另外50g剂量的底物。继续这种底物添加, 直到反应器的内容物为约20%(w/w)干物质。

[0169] 平均每3小时定期取出25ml上清液样品, 并用于测定葡萄糖、木糖和乳酸的浓度, 使用HPLC测定乳酸浓度。在24.8小时的总时间(预糖化加SSF时间)停止测量。

[0170] 表3

[0171]

| 实施例 | 固体装载<br>预糖化 | *初始葡萄糖<br>糖浓度<br>(g/L) | *初始木糖<br>浓度(g/L) | 总发酵/<br>SSF时间<br>(小时) | 最终乳<br>酸浓度<br>(g/L) |
|-----|-------------|------------------------|------------------|-----------------------|---------------------|
| 11  | 5%wt        | 17.8                   | 7.3              | 24.8                  | 99.6                |

[0172] \*在预糖化结束时测量的浓度

[0173] 附图1示出了在同时糖化和发酵期间葡萄糖、木糖和乳酸的浓度随时间的变化。

[0174] 对于本领域技术人员明显的是,在考虑本说明书之后,可以在所公开的实施方案中进行各种修改而不脱离本发明的范围。因此,意图实施方案和实施例仅被认为是举例说明性的,本发明的真实范围由所附权利要求指示。

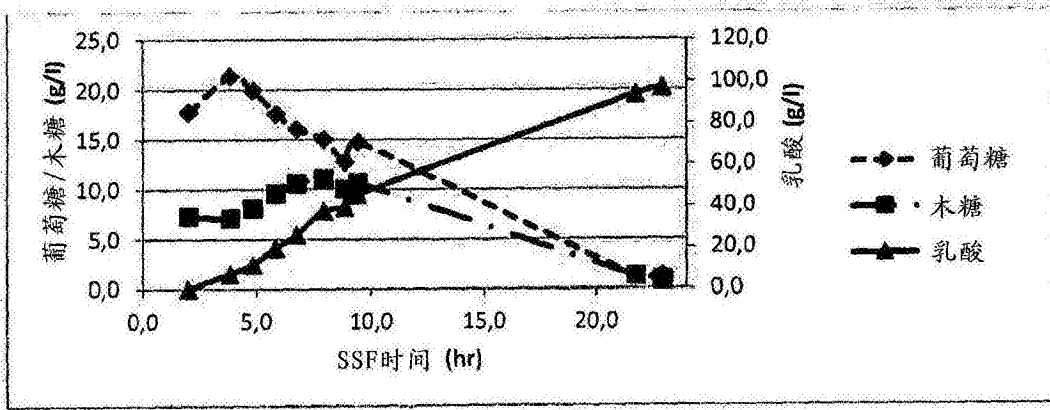


图1