

学校代码：10251

学 号：010120119

華東理工大學

博 士 学 位 论 文

论文题目 木质纤维素干法生物炼制生产葡萄糖
酸和木糖酸的微生物发酵过程研究

学科专业 生物化学与分子生物学

研究方向 生物炼制

论文作者 张宏森

指导教师 鲍杰 教授

定稿日期：2016年 11月 29日

分类号: Q936 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

木质纤维素干法生物炼制生产葡萄糖酸
和木糖酸的微生物发酵过程研究

张宏森

指导教师姓名:

鲍杰 教授

生物工程学院

申请学位级别: 博士 专业名称: 生物化学与分子生物学

论文定稿日期: 2016. 11. 29 论文答辩日期: 2016. 11. 29

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 刘荣厚 教授

评 阅 人: 杨 晟 研究员

孙润仓 教授

贾士儒 教授

欧阳嘉 教授

金明杰 教授

华东理工大学研究生学位论文提交要求

根据校学位评定委员会要求，研究生学位论文全文（含纸质版和电子版）必须提交档案馆保存。

研究生学位论文全文电子版由档案馆按_____（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

注：选择②、③或④的需经学校国家技术转移中心备案，以为学校技术转移提供服务。

学位论文作者签名：

年 月 日

指导教师签名：

年 月 日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作者声明

我郑重声明：本人恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的结果。除文中明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何他人已经发表或撰写过的内容。论文为本人亲自撰写，并对所写内容负责。

论文作者签名：

年 月 日

木质纤维素干法生物炼制生产葡萄糖酸和木糖酸的微生物发酵过程研究

摘要

当前,木质纤维素生物质的生物炼制主要集中于通过微生物厌氧发酵的方式生产乙醇、乳酸等生物基化学品,生产过程中微生物的代谢路径容易受到木质纤维素水解液中抑制物的影响,导致产率和得率的降低。本论文通过微生物有氧发酵的方式对木质纤维素水解得到的可发酵糖类进行直接氧化生产糖酸产品,其生产过程主要依靠微生物体内氧化酶的催化,转化得率高、反应速率快、不易受到抑制物的影响,具有比较明显的优势。葡萄糖酸和木糖酸作为大宗生物基平台化合物具有功能多、用途广的特点,被广泛应用于食品、药品、建筑等行业。当前葡萄糖酸、木糖酸的工业生产主要依赖于粮食作物的微生物发酵,随着产品需求量的增加,工业化扩张与粮食生产的矛盾日益加剧。木质纤维素生物质作为一种储量丰富、价格低廉的可再生有机资源,可以代替粮食作物生产大宗生物基化学品。本论文主要以典型的木质纤维素生物质-玉米秸秆为原料,采用干法生物炼制工艺通过微生物有氧发酵生产葡萄糖酸和木糖酸,极大减少生产过程中废水的产生。

首先,选用工业上普遍应用的黑曲霉(*Aspergillus niger*)作为葡萄糖酸生产菌株,以玉米秸秆为原料进行葡萄糖酸的生产。*A. niger* SIIM M276 是一株发酵性能良好的葡萄糖酸生产菌株,对9种典型的木质纤维素来源的抑制物具有一定的耐受性和转化能力。*A. niger* SIIM M276 可以直接利用15%固体含量的新鲜玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸,但随着固体含量的增加(25%, w/w),在高浓度抑制物的胁迫下,其菌体干重和葡萄糖酸的生产速率与15%固体含量时相比分别下降了51.4%和28.9%。对预处理后玉米秸秆进行生物脱毒以后,*A. niger* SIIM M276 的生长速率和葡萄糖酸产率分别提高了约1倍和3倍,最终得到葡萄糖酸浓度达到105.36 g/L。但是在研究中发现,*A. niger* SIIM M276 对水解液体系敏感,生长存在24-96 h 延滞期,菌体形态和发酵性能不稳定。除此之外,*A. niger* SIIM M276 对玉米秸秆水解液中的木糖利用能力弱,超过80%的木糖残留在发酵液中。

其次,为了解决*A. niger* SIIM M276 在水解液体系中稳定性差、葡萄糖酸生产速率低和木糖利用能力差的问题,一株菌体形态稳定、葡萄糖酸生产速率高、能同时利用葡萄糖和木糖生产葡萄糖酸和木糖酸的革兰氏阴性菌-氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)成为新的生产菌株。*G. oxydans* DSM 2003 表现出更强的抑制物耐受性以及抑制物的转化能力,即使在20%固体含量(w/w)的新鲜玉米秸秆水解液中*G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖酸生产速率依然能够达到1.72 g/L/h。将预处理后的玉米秸秆脱毒以后,*G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖酸和木糖酸生产速率最大分别达到5.59 g/L/h 和2.16 g/L/h。在50 L 发酵罐放大试验中发酵32 h 得到119.10 g/L 的葡萄糖酸和14.04 g/L 的木

糖酸，其中葡萄糖酸的产率达到 3.68 g/L/h，是 *A. niger* SIIM M276 生产葡萄糖酸最大产率的 2 倍以上。经过测试，得到的葡萄糖酸/木糖酸发酵液可直接作为水泥缓凝剂使用，缓凝效果可以与商品水泥缓凝剂媲美。通过降低发酵过程的 pH 可以有效抑制葡萄糖酸进一步转化成酮基葡萄糖酸，同时得到高浓度的葡萄糖酸和木糖酸，分别为 111.59 g/L 和 36.56 g/L。对利用玉米秸秆同时生产葡萄糖酸和木糖酸的工艺进行技术经济分析，基于 Aspen Plus 模拟计算得到纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品的最低售价为 \$0.404/kg，低于商品葡萄糖酸钠的售价，表现出较大的经济竞争力。

最后，为了有效利用纤维素乙醇生产废水中的木糖，对利用纤维素乙醇精馏后塔釜液中的木糖生产木糖酸的微生物发酵和全细胞催化过程进行了研究，设计一条新型联产乙醇和木糖酸的工艺流程。本工艺流程以玉米秸秆为原料，经过干式稀酸预处理、固态生物脱毒、高固体含量同步糖化与发酵生产乙醇，得到乙醇浓度为 59.80 g/L。随后将发酵醪中的乙醇精馏回收后，塔釜液中木糖浓度为 65.39 g/L。使用 *G. oxydans* DSM 2003 对含有木糖的塔釜液进行微生物发酵或者全细胞催化，最高得到了 66.42 g/L 的木糖酸。基于 Aspen Plus 模型分析，本工艺与已有工艺相比，能耗与废水都有明显的降低。

综上所述，本论文以干法生物炼制工艺为基础，以实现葡萄糖酸、木糖酸绿色工业化生产为目标，建立一条从木质纤维素生物质到葡萄糖酸和木糖酸产品的完整工艺流程，得到的产品浓度高，表现出优良的水泥缓凝剂性能。此外，本论文还为传统纤维素乙醇生产中残留的木糖寻找出路，设计一条新型联产乙醇和木糖酸的工艺流程，与已有工艺相比大大降低了废水和能耗，降低了纤维素乙醇整体生产成本，促进了木质纤维素木糖酸行业的发展。木质纤维素生物质通过微生物有氧发酵方式生产葡萄糖酸和木糖酸产品表现出明显的优势，水解液中的葡萄糖和木糖直接被 *G. oxydans* 膜上葡萄糖脱氢酶催化生成葡萄糖酸和木糖酸，反应受水解液体系的影响较小，产率和得率较高。基于 Aspen Plus 的技术经济分析表明木质纤维素葡萄糖酸和木糖酸生产具有很强的经济竞争力和可行性，本论文为未来利用木质纤维素原料大规模工业化生产葡萄糖酸和木糖酸提供了理论依据。

关键词：木质纤维素；干法生物炼制；葡萄糖酸；木糖酸；Aspen Plus 模拟

Study on Microbial Fermentation of Gluconic and Xylonic Acids

Production from Lignocellulose Biomass through Dry Mill Biorefinery

Process (DMBP)

Abstract

The lignocellulose was usually used to produce biobased chemicals such as ethanol, lactic acid and so on by anaerobic fermentation at present. Metabolic pathways of microorganism for these products were easily influenced by inhibitors which could lead to the reduction of productivity and yield. In this thesis, sugars from lignocellulosic hydrolysate were directly oxidized to produce saccharic acid products with high productivity and yield by aerobic fermentation. This production process is simple and hard to be influenced by inhibitors, shows some obviously advantages. Gluconic and xylonic acids were both two kinds of multifunction and multipurpose bulk biobased platform chemicals, could be applied widely in food, pharmaceutical, construction industry and so on. Industrial production of gluconic and xylonic acids were mostly depend on microbial fermentation from grain crop at present. With the increasing demand of these products, the contradiction between expansion of industrialization and production of grain intensifies day by day. Lignocellulose biomass as an abundant and cheap renewable resource could be used to replace grain crop for bulk biobased chemicals production. In this thesis, a typical lignocellulose, corn stover, was selected as feedstock to produce gluconic and xylonic acids by dry mill biorefinery strategy, which could reduce the generation of wastewater obviously.

Firstly, a most widely applied in gluconic acid industrial production strain, *Aspergillus niger*, was selected to produce gluconic acid using corn stover feedstock, the glucose oxidase of *A. niger* could directly oxidized glucose into gluconic acid. *A. niger* SIIM M276 as an gluconic acid producer showed good gluconic acid fermentability, inhibitors tolerance for 9 kinds of typical lignocellulose derived inhibitors and could convert most of these inhibitors. *A. niger* SIIM M276 could utilize 15% solids loading freshly pretreated corn stover hydrolysate to produce gluconic acid directly, but in the stress of high titer inhibitors from 25% (w/w) solids loading hydrolysate, the dry cell weight and gluconic acid productivity of *A. niger* SIIM M276 were decreased 51.4% and 28.9%, respectively. After the pretreated corn stover was detoxified, the cell growth and gluconic acid productivity of *A. niger* SIIM M276 were improved about 1 time and 3 times, gluconic acid titer achieved to 105.36 g/L. But, *A. niger* SIIM M276 showed some drawbacks in cellulosic gluconic acid production process. *A. niger* SIIM M276 was sensitive in corn stover hydrolysate system, a 24-96 h lag phase occurred in fermentation

process, the mycelial morphology became unstable after transfer several generations, which reduced the gluconic acid productivity harshly. In addition, *A. niger* SIIM M276 mostly could not utilize xylose in the corn stover hydrolysate which lead to more than 80% of xylose was retained in fermentation broth.

Secondly, aim to solve these drawbacks of *A. niger* SIIM M276 in cellulosic gluconic acid production process such as unstable mycelial morphology, low gluconic acid productivity and poor xylose utilization, a gram-negative bacterium, *Gluconobacter oxydans*, which had stable bacterial morphology, high gluconic acid productivity and could produce gluconic and xylonic acids together by oxidizing glucose and xylose, was selected as new producer in this study. *G. oxydans* DSM 2003 showed stronger inhibitors tolerance and inhibitors conversion performance, the gluconic acid productivity could reach to 1.72 g/L/h even in high solids loading (20%, w/w) freshly pretreated corn stover hydrolysate. The gluconic and xylonic acids productivity of *G. oxydans* DSM 2003 were further improved to 5.59 and 2.16 g/L/h using detoxified corn stover hydrolysate. 119.10 g/L gluconic acid and 14.04 g/L xylonic acid were obtained in 50 L fermentor large scale experiment using detoxified corn stover hydrolysate after 32 h fermentation, the gluconic acid productivity reached to 3.68 g/L/h, was more than twice the highest gluconic acid productivity of *A. niger* SIIM M276. The obtained fermentation broth was test as cement retarder and showed similar excellent retarding performance. Low pH could inhibit the future conversion of gluconic acid into keto-gluconic acid, both high concentration of gluconic acid (111.59 g/L) and xylonic acid (36.56 g/L) were obtained at pH 3.0. This gluconic and xylonic acids production process from corn stover was carried out a techno-economic analysis based on Aspen Plus modeling, the minimum sodium gluconate/xylonate product selling price (MGSP) was only \$0.404/kg, which was not only lower than commercial sodium gluconate from starch, showed a very strong economic competitiveness.

Finally, in order to effectively utilize the xylose existed in wastewater from cellulosic ethanol production process, a novel xylonic acid production by microbial fermentation or direct catalysis using the xylose in stillage after ethanol distillation of cellulosic ethanol fermentation slurry was investigated. Corn stover as the feedstock though dry dilute acid pretreatment, solid biodetoxification, high solids loading SSF for ethanol production, then 59.80 g/L ethanol fermentation slurry was distilled and the ethanol was collected from column top, 65.39 g/L xylose was retained in column bottom stillage. Xylonic acid production using xylose of ethanol distillation stillage by microbial fermentation or whole cell catalysis of *G. oxydans* DSM 2003 was carried out and highest 66.42 g/L xylonic acid was obtained. Compared with previous xylonic acid fermentation technology from the xylose in pretreatment liquid, this study reduced the energy consumption and waste water generation significantly based on Aspen Plus model analysis.

In conclusion, dry mill biorefinery process was the basis, come true the green industrial production of gluconic and xylonic acids was the goal, a whole process flowsheet from lignocellulose biomass to gluconic and xylonic acids products was established in this thesis, and the obtained high titer products showed excellent application as cement retarder. In addition, in order to solve the residual xylose from cellulosic ethanol industry, a novel integrated ethanol and xylonic acid production process flowsheet using corn stover was designed, which generated less wastewater and consumed less energy obviously compared with previous process flowsheet. This new flowsheet reduced the whole production cost of cellulosic ethanol, and improved the development of cellulosic xylonic acid industry. The gluconic and xylonic acids production by aerobic fermentation showed obvious advantages, the glucose and xylose were dicretly converted into gluconic and xylonic acids by the catalysis of glucose dehydrogenase located on the membrane of *G. oxydans*, it showed strong adaptability in hydrolysate system, high productivity and yield. The tech-economic analysis demonstrated strong practicability and competitiveness of gluconic and xylonic acid production from lignocellulose biomass, this thesis provided a theoretical foundation for large scale industrial cellulosic gluconic and xylonic acids production in future.

Keywords: Lignocellulose; Dry mill biorefinery; Gluconic acid; Xylonic acid; Aspen Plus simulation

目录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 木质纤维素生物质.....	1
1.2 生物炼制.....	3
1.2.1 预处理.....	4
1.2.2 脱毒.....	5
1.2.3 水解.....	8
1.2.4 发酵.....	9
1.3 葡萄糖酸.....	10
1.3.1 黑曲霉.....	11
1.3.2 氧化葡萄糖酸杆菌.....	12
1.4 木糖酸.....	14
1.5 立题依据和意义.....	15
1.6 本论文的主要研究内容.....	15
第 2 章 <i>Aspergillus niger</i> 利用玉米秸秆生产葡萄糖酸.....	17
2.1 引言.....	17
2.2 材料与方法.....	18
2.2.1 原料.....	18
2.2.2 酶和试剂.....	18
2.2.3 仪器设备.....	18
2.2.4 菌种、培养基和培养方法.....	18
2.2.5 预处理、生物脱毒和水解液的制备.....	19
2.2.6 样品分析.....	20
2.2.7 葡萄糖氧化酶活性测定.....	20
2.2.8 葡萄糖酸得率的计算.....	21
2.3 结果与讨论.....	21
2.3.1 <i>A. niger</i> 发酵菌株的选择.....	21
2.3.2 <i>A. niger</i> SIIM M276 对木质纤维素来源抑制物的耐受性.....	25
2.3.3 <i>A. niger</i> SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中摇瓶发酵条件优化.....	34
2.3.4 溶氧对 <i>A. niger</i> SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中生产葡萄糖酸的影响.....	37
2.3.5 <i>A. niger</i> SIIM M276 在高固体含量的新鲜玉米秸秆水解液中的葡萄糖酸生产.....	40
2.3.6 <i>A. niger</i> SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中的适应性进化.....	42
2.3.7 <i>A. niger</i> SIIM M276 半连续发酵生产葡萄糖酸.....	45
2.3.8 <i>A. niger</i> SIIM M276 利用脱毒玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸.....	47

2.4 本章小结	47
第 3 章 抑制物耐受型 <i>Gluconobacter oxydans</i> 利用玉米秸秆生产高浓度葡萄糖酸和木糖酸	49
3.1 引言	49
3.2 材料与方法	50
3.2.1 原料	50
3.2.2 酶、试剂和仪器设备	50
3.2.3 菌种、培养基和培养方法	50
3.2.4 预处理、生物脱毒和水解液的制备	51
3.2.5 样品分析	51
3.2.6 产品得率的计算	52
3.2.7 水泥添加剂性能测试	52
3.2.8 Aspen Plus 生产工艺模型建立和经济学分析方法	53
3.3 结果与讨论	56
3.3.1 <i>G. oxydans</i> ATCC 621H 葡萄糖酸生产性能及菌种驯化	56
3.3.2 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 利用新鲜玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸	60
3.3.3 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 对木质纤维素来源抑制物的耐受性及转化性能	62
3.3.4 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 利用玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸和木糖酸	68
3.3.4.1 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 在新鲜玉米秸秆水解液中的产酸研究	68
3.3.4.2 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 在脱毒玉米秸秆水解液中发酵产酸研究	70
3.3.5 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 利用玉米秸秆 SSF 生产葡萄糖酸和木糖酸	74
3.3.6 影响 <i>G. oxydans</i> DSM 2003 发酵过程中 KGA 产生因素的研究	79
3.3.6.1 木糖浓度的影响	80
3.3.6.2 pH 的影响	82
3.3.7 纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品的水泥缓凝性能测试	86
3.3.8 纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品的技术经济分析 (TEA)	89
3.4 本章小结	93
第 4 章 利用乙醇发酵废液中的木糖生产木糖酸	94
4.1 引言	94
4.2 材料与方法	95
4.2.1 原料	95
4.2.2 酶、试剂和仪器设备	95
4.2.3 预处理、生物脱毒	95
4.2.4 菌种、培养基和培养方法	96
4.2.5 样品分析	97
4.2.6 乙醇和木糖酸得率计算	97

4.2.7 Aspen Plus 模型的建立.....	98
4.3 结果与讨论.....	98
4.3.1 纤维素乙醇的生产以及蒸馏塔釜废液中木糖的回收.....	98
4.3.2 利用纤维素乙醇蒸馏废液中的木糖生产木糖酸.....	100
4.3.3 利用玉米秸秆联合生产乙醇和木糖酸钠工艺的 Aspen Plus 模拟分析.....	105
4.3.3.1 利用 Aspen Plus 模型进行生产工艺中的物料衡算.....	105
4.3.3.2 利用 Aspen Plus 模型计算生产工艺中的废水排放和能耗.....	111
4.4 本章小结.....	112
第 5 章 结论与展望	114
5.1 结论与创新点.....	114
5.1.1 结论.....	114
5.1.2 创新点.....	115
5.2 展望.....	116
参考文献.....	118
附录 I 主要试剂.....	139
附录 II 仪器设备.....	140
致谢.....	141
博士期间研究成果.....	142

第 1 章 绪论

当前世界能源依然主要依赖于不可再生的化石能源，如石油、煤、天然气等^[1]。这些化石能源储量有限，并且至少需要上百万年的时间才能形成，未来将难以满足人们对能源日益增长的需求。与此同时，当前化石能源的肆意使用已经导致了一系列严重的环境问题，如环境污染、温室效应^[2,3]。近年来，迫于化石能源对环境的负面影响越来越严重，寻找化石能源的替代品来满足人类社会的能源需求成为亟待解决的问题。期望能够找到一种廉价、丰富的原料通过生物炼制的方法生产生物燃料和化学品，从而代替传统的化石能源，使能源利用走上可持续发展道路^[4-6]。

1.1 木质纤维素生物质

木质纤维素生物质是世界上种类最丰富，储量最巨大的可再生有机资源^[7]。当前木质纤维素生物质在工业上主要用于造纸、建筑和纺织，用量不足其总量的 2%^[8]，存在巨大的生产潜力。木质纤维素生物质根据来源不同主要分为以下几类：农业废弃物（如玉米秸秆^[9-12]、麦秆^[13-17]等）、林业废弃物（如软木^[18-20]、硬木^[21-24]、柳枝稷^[25-29]等）和市政垃圾（如废纸^[30,31]、报纸^[32-34]等）。在这些木质纤维素生物质中，农业废弃物的来源最为广泛，产量最大。据统计，我国的农业废弃物中仅农作物秸秆年产量就达到了 8-10 亿吨，大部分被直接焚烧或者随意丢弃，使得秸秆的资源化利用率不足 1%^[35,36]，不仅造成了巨大的资源浪费还产生了严重的环境问题。尤其是近年来秸秆焚烧已经成为大气污染排放源中重要组成之一，是诱发雾霾的主要原因之一^[37,38]。从上世纪 80 年代开始，围绕木质纤维素生物质的高效利用展开研究，逐渐形成了一个比较成熟的生物炼制工艺。首先这些木质纤维素生物质通过预处理、酶水解生成可发酵的糖，继而通过微生物发酵生产生物燃料和生物基化学品。木质纤维素生物质成为一种潜在的、优质的化石能源替代品，可以大大减轻人类对不可再生能源的依赖，缓解了如环境污染、温室效应等一系列环境问题所引发的负面影响^[38-40]。

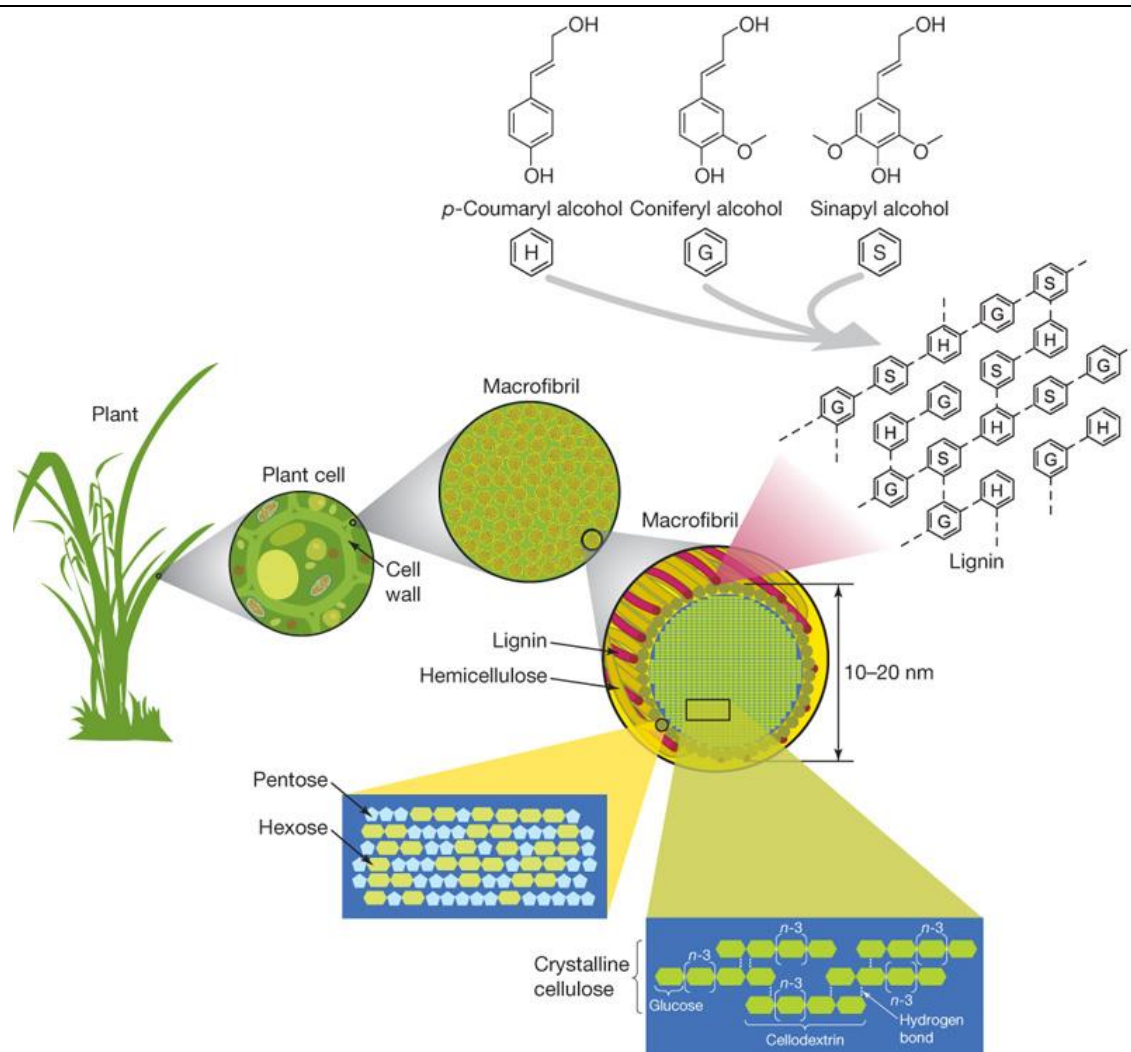
木质纤维素生物质主要是由碳水化合物的聚合物（纤维素和半纤维素）和芳香族化合物的聚合物（木质素）组成^[41-43]，除此之外还含有结构蛋白，脂类和灰分等^[44-47]，其结构如图 1.1 所示。这些碳水化合物的聚合物包含多种单体（主要是己糖和戊糖），紧密结合在木质素上^[48-50]。在木质纤维素生物质中，纤维素构成了基本的骨架，半纤维素与其相互缠绕，又被木质素包裹成为一个空间矩阵结构，使得其整体结构非常致密，稳定性强，难以被直接利用^[51-53]。木质纤维素生物质的化学组成依据植物的年龄、品种、生长条件、加工方法等因素会有一定的差异^[54-57]，表 1.1 列举了几种代表性的木质纤维素生物质的化学组成。在当前的生物炼制领域中，木质纤维素生物质主要用来生产燃料乙醇，但由于木质纤维素生物质结构的致密型和组成的复杂性导致了它非常难以被转化利用，造成其加工和利用过程复杂而且昂贵，利用木质纤维素生物质生产与生物燃料相关的高附加值化学品可以相对降低成本，使生物炼制工艺更有经济竞争力^[58-63]。

表 1.1 木质纤维素生物质种类及主要成分 (%)

Table 1.1 Main species and compositions of lignocellulose biomass (%)

Lignocellulosic Biomass		Cellulose	Hemicellulose	Lignin
Agricultural wastes	Corn stover ^[8-12]	35.1-39.5	20.7-24.6	11.0-19.1
	Corn cob residue ^[64, 65]	32.3-45.6	39.8	6.7-13.9
	Rice straw ^[66-69]	31.5-41.5	18.0-23.0	16.8-20.3
	Rice husk ^[70-72]	21.5-35.9	18.2-23.1	14.6-24.5
	Wheat straw ^[13-17]	34.8-41.8	22.2-28.0	17.7-23.4
	Barley straw ^[73, 74]	36.0-44.0	24.0-33.0	6.3-9.8
	Rapeseed straw ^[75, 76]	27.6-44.6	20.0-22.9	16.8-20.0
	Sweet sorghum ^[77-79]	35.1-43.5	18.0-22.2	18.6-19.7
	Sugarcane bagasse ^[80]	42.1-42.8	25.8-27.5	22.1-23.7
Forestry wastes	Aspen wood log ^[81]	45.6	17.8	20.2
	Eastern red cedar ^[82]	34.2	21.3	32.2
	Spruce ^[83, 84]	43.0-44.9	19.7-21.4	27-31.1
	Salix ^[85]	43	21.3	26.6
	Bermuda grass ^[86-87]	47.8	13.3	19.4
	Switch grass ^[25-29]	32-38.9	21.5-28.9	21.4-30.4
Municipal waste	Leaves ^[88, 89]	15-20	80-85	0
	Paper ^[20, 21]	85-99	0	0-15
	Newspaper ^[22-24]	40-55	25-40	18-30

尽管经过学术界和产业界多年的不懈努力,木质纤维素生物质的利用仍然没有实现大规模工业化,最主要的瓶颈在于与化石能源产业相比生产成本过高^[90]。生物炼制工艺仍存在诸多的难点,如预处理方法效率低、纤维素酶成本高、纤维素转化率低等问题。因此为了通过生物炼制产生更高的经济价值,需要寻求适合生物炼制的产品,尽可能使生物炼制过程中产生高附加值的生物基产品^[1, 4, 91]。除此之外,还可以通过对木质纤维素中纤维素和半纤维素的完全利用从而降低整体生产成本^[6, 92]。本文选择一种典型的木质纤维素原料-玉米秸秆作为原料,通过微生物有氧发酵同时生产葡萄糖酸和木糖酸。葡萄糖酸和木糖酸作为大宗生物基化学品由于其独特的性能在多个领域有广泛应用^[93, 94],尤其是都可以作为水泥添加剂而大量应用于建筑行业,近年来需求量一直有明显的升高。当前工业上生产葡萄糖酸的主要原料是玉米淀粉或者蔗糖,随着产品需求量日益增长,对粮食产物的消耗也逐渐增加,造成与人争粮的不利局面,因此使用木质纤维素原料代替传统粮食作物来生产葡萄糖酸就变得尤为重要。当前利用木质纤维素原料生产葡萄糖酸和木糖酸的研究比较少,Zhu 等^[95]和 Zhou 等^[96]使用玉米秸秆为原料,采用 *G. oxydans* 全细胞催化的方法生产木糖酸,得到不错的结果,与此同时纤维素葡萄糖酸的研究在逐渐兴起。随着这两种大宗化学品越来越多的功能的开发,应用将越来越广泛,需求量越来越大,未来将会引起人们足够的重视。整体来说,使用木质纤维素生物质取代传统粮食作物通过生物炼制工艺生产葡萄糖酸和木糖酸具有非常大的潜力。

图 1.1 木质纤维素的结构示意图^[41]Fig 1.1 Schematic structure of lignocellulose^[41]

1.2 生物炼制

面向 21 世纪最大的挑战之一，就是减缓全球变暖趋势的同时满足日益增长的能源需求。为了寻找一种廉价的可再生能源来代替化石能源，一种与石油炼制类似的以木质纤维素为原料的炼制体系被建立起来，命名为“生物炼制”^[97-101]。根据美国国家可再生能源实验室（National Renewable Energy Laboratory, NREL）的解读，生物炼制是一种结合木质纤维素生物质的转化过程和设备工艺，以木质纤维素生物质为出发点生产燃料和化学品，正如石油炼制以原油为出发点生产燃料和石油产品。为了丰富产品种类，生物炼制需要对生物质原料的不同组分、中间产物最大化的利用，因此生物炼制的主要的目标就是利用生物质原料不同的组分生产高价值的精细化学品或者低价值大宗化学品，同时在生产过程中发电或者产热为自身所用甚至可以将多余的电力和蒸汽出售来降低生产成本^[102]。生物炼制工艺设计中必须要实现质量和能量利用最大化，废水最小化，才能符合现代工业生产的要求。高附加值的产品可以增加利润，大宗化学品和燃料可以满足社会对物质和能源的需求，最后生产的电能或热能还能降低成本以及避免温室气体的

排放。木质纤维素生物炼制前景十分广阔，但目前仍然存在比较多的问题需要解决，其中阻碍生物炼制大规模工业化生产的首要因素就是成本过高^[1, 103, 104]。当前阶段利用农作物如甘蔗和玉米来生产生物基产品仍然是主流，通过酶解液化和糖化生产葡萄糖的技术已经相当成熟，得到的糖液可以直接发酵生产乙醇，这就是所谓的第一代燃料乙醇^[105, 106]。然而第一代生物乙醇最大的局限就在于原料的供应，大量粮食作物应用于工业生产增加了粮食危机的风险^[107]，因此更有前景的第二代生物燃料开始使用价格更加低廉、储量更加丰富、来源更加广泛的可再生原料-木质纤维素生物质^[108]。在中国农业废弃物数量众多，大多数得不到有效的利用，如果能够被大规模利用将会刺激当地农民收集木质纤维素生物质作为能源供给的积极性，提高这些废弃物的价值，这将为减少二氧化碳排放和支持农村经济做出重要的贡献^[109, 110]。

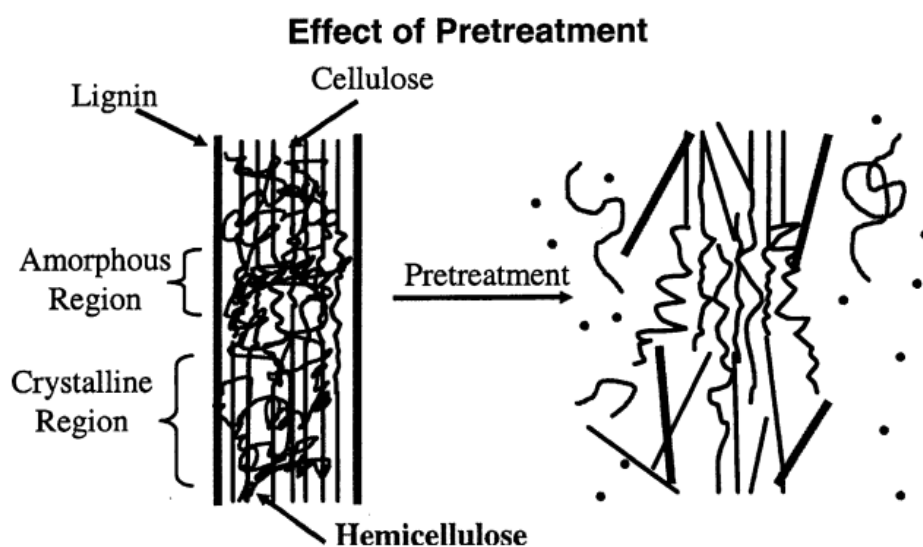


图 1.2 预处理的原理示意图^[112]

Fig. 1.2 Schematic representation of pretreatment^[112]

1.2.1 预处理

木质纤维素的结构非常致密，需要破坏外部结构才能使内部的纤维素暴露出来，从而更有利于与纤维素酶结合，被水解成可发酵的糖类^[111]，预处理的基本原理如图 1.2 所示^[112]。预处理是转化木质纤维素生物质生产燃料和化学品的生物炼制过程中必不可少的一环^[113]。一般情况下木质纤维素经过预处理以后将会有助于酶与底物接触，增强酶水解效率 3-10 倍^[113]。木质纤维素的酶水解过程一般受可接触表面积^[114]、粒径^[115]、以及纤维素的聚合度和结晶度^[116]、半纤维素侧链分化^[117]、木质素含量和分布^[118]、香豆酸和阿魏酸的交联^[118, 119]等因素影响。预处理过程可以使原本结构致密的木质纤维素变得多孔、疏松，木质素结构被打开，最大程度的增大纤维素酶与纤维素接触的表面积，从而达到一种能耗最低、糖回收率最高的高效水解^[4, 120]

由于预处理的必要性与重要性，近年来预处理技术成为生物炼制领域内研究的热点，

预处理的方法主要分为三类^[121-126]：物理法（非催化蒸汽爆破、热水预处理、机械碾磨、高能辐射等）；化学法（催化蒸汽爆破、酸式预处理、碱式预处理、氨纤维爆破、有机溶剂预处理等）；生物法等。理想的预处理方法应该满足以下几个条件：颗粒小、保留半纤维素、抑制物生成少、能耗低、成本低^[127, 128]。为了应对木质纤维素生物质自身结构的多样性，需要通过选择合适的方法与细胞壁的组分发生相互作用，使细胞壁结构被破坏，内部组分能够暴露出来与相应的酶结合，达到促进酶解的效果。依据不同预处理方法的各自特点，结合最终所要达到的目标来选择一种合适的预处理方法非常有必要^[128-130]，预处理方法的选择将会影响到生物炼制后续的水解和发酵的成本和性能^[131]。稀酸预处理方式是日前一种应用广泛的预处理方式，其主要优点为：（1）预处理效率高，可以有效克服木质纤维素生物抵抗性；（2）所用的原料价格比较低廉；（3）可以将半纤维素水解生成木糖和其他糖类；（4）可以改变木质素的结构。主要缺点包括：（1）常规稀酸预处理产生大量废水；（2）产生大量抑制物组分；（3）稀酸对设备的腐蚀严重^[132]。本实验室前期工作在常规稀酸预处理方法的基础上进行改进，提出了一种干法稀酸预处理技术，采用螺带式搅拌实现了预处理过程中对大量固体物料与极少量稀酸溶液和过热蒸汽的充分混合，将常规预处理的固体与酸液比从 1: 6-1: 10^[132]提高到了 2: 1，极大降低了酸用量、新鲜水用量和废水排放，实现了预处理过程废水零排放、设备腐蚀降低到常规稀酸预处理的 1/10，同时产生的抑制物通过生物脱毒的方式得到了彻底、有效的脱除，较为彻底的解决了常规稀酸预处理的原有缺陷^[133]。本文中全部采用干法稀酸预处理技术进行木质纤维素生物质的预处理操作。

1.2.2 脱毒

在预处理的过程中，在高温高压的物理化学作用下，纤维素、半纤维素和木质素会不可避免的降解并产生一些对微生物的生长、发酵性能以及纤维素酶活性有负面影响的化合物，称之为抑制物^[134-136]。这些抑制物根据结构特征主要分为三大类：呋喃类化合物（糠醛^[137-140]、5-羟甲基糠醛^[140-143]等）；弱酸类化合物（甲酸^[142, 143]、乙酸^[144, 145]、乙酰丙酸^[140, 143]等）和酚类化合物（香草醛^[146-148]、丁香醛^[140, 148]、4-羟基苯甲醛^[140, 149]等）。其中酚类化合物根据构成木质素的基本单元的不同可分为：H 族的对羟基苯甲醛、对羟基苯甲酸和对香豆酸，G 族的香草醛、松柏醛和阿魏酸以及 S 族的丁香醛和丁香酸等^[148]。这些抑制物的来源以及生成的过程如图 1.3 所示^[150]。研究发现呋喃类化合物中的糠醛主要由半纤维素水解的戊糖产生，5-羟甲基糠醛（HMF）由纤维素和半纤维素水解产生的己糖生成。在稀酸预处理过程中，这些呋喃类化合物的浓度一般在 0-5 g/L，通常对微生物有较强的抑制作用。有弱酸类化合物中，甲酸由糠醛和 HMF 进一步降解产生，乙酸是由糖类脱水或者乙酰基木聚糖水解产生的，是半纤维素水解过程中的一种副产物，乙酰丙酸是由 HMF 进一步降解产生的。弱酸类化合物中乙酸的浓度最高，约为 0-10 g/L，虽然浓度比较高但是通常对微生物的影响比较小。酚类化合物主要是由木质素产生，在糖类水解的过程中也会有酚类化合物的生成^[150, 151]。大多数的木质素及其衍生物都是水不溶性物质，浓度普遍较低，对微生物的抑制作用比较有限。

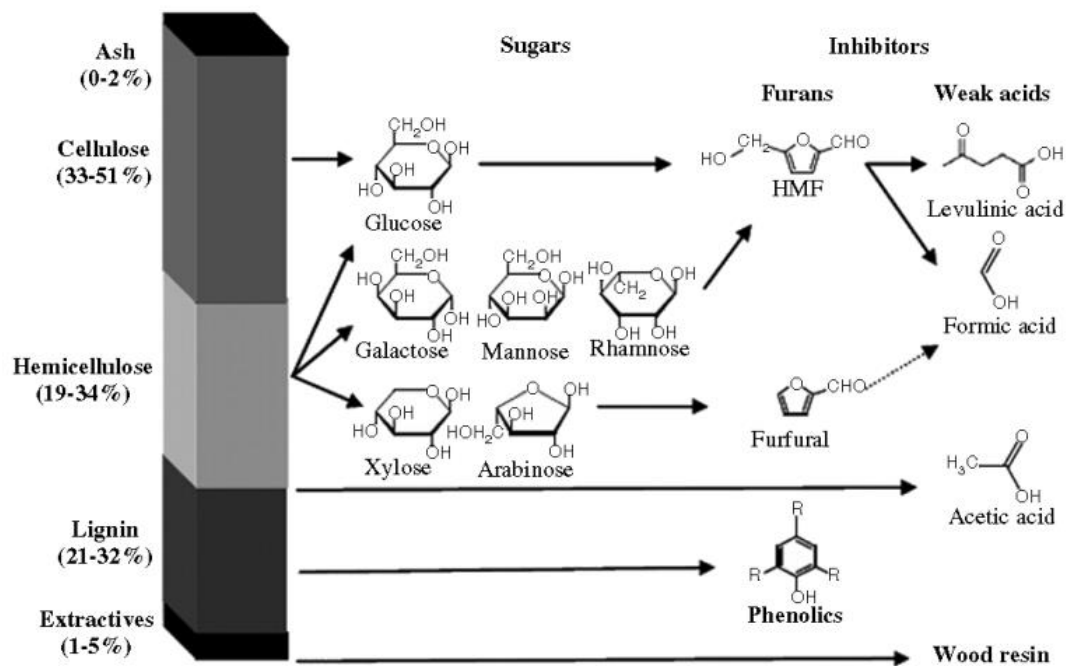


图 1.3 木质纤维素生物质各组分主要降解产物^[150]

Fig. 1.3 Average composition of lignocellulosic biomass and main derived hydrolysis products^[150]

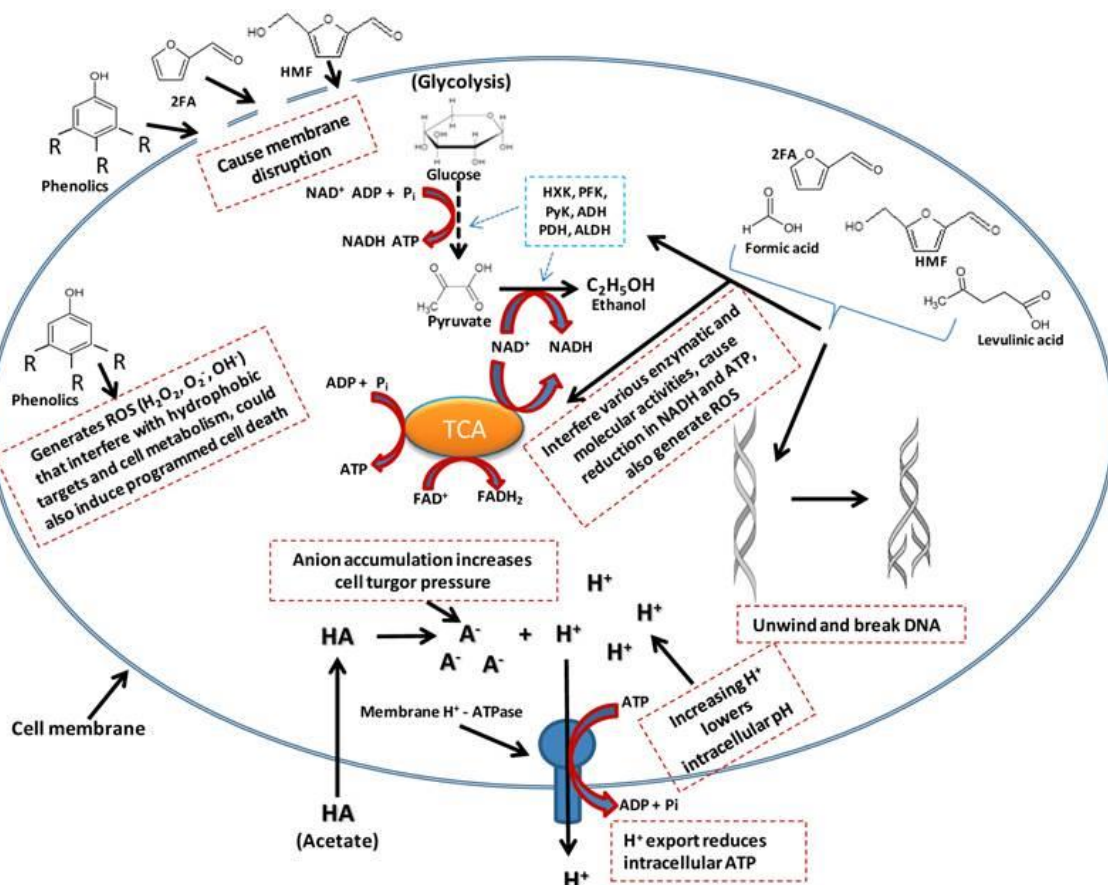


图 1.4 木质纤维素来源抑制物对酿酒酵母抑制机理的推测^[151]

Fig. 1.4 Schematic representation of a presumed inhibition mechanism of lignocellulose-derived inhibitors in *Saccharomyces cerevisiae* ^[151]

目前关于抑制物作用机理的研究很多,以酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)为例,推测三类抑制物对微生物的抑制机理,如图 1.4 所示。咪唑类抑制物对微生物的伤害主要是由于抑制了中心碳代谢中与糖酵解有关的酶的活性,如丙酮酸脱氢酶、乙醛脱氢酶和乙酸脱氢酶等^[152],还会造成蛋白质交联以及 DNA 由双链降解成单链^[153-156]。其次,由于糠醛和 HMF 的高度疏水性导致它们可以破坏细胞膜,最终严重影响细胞生长速率、ATP 产生和乙醇的生产^[157]。在随后的研究中还发现咪唑类可以与弱酸类和酚类抑制物产生协同作用,从而增强对细胞的伤害^[151, 157]。弱酸类抑制物中,乙酸分子量较小,而且是脂溶性的酸可以透过细胞膜进入细胞内,在胞内以游离的阴离子的形式存在,将 H⁺ 释放到细胞内,造成细胞内 pH 下降,从而破坏膜上的转运蛋白,影响细胞的代谢调控,造成细胞内渗透压升高,从而影响细胞的生长和乙醇的生成^[158]。甲酸和乙酰丙酸是 HMF 代谢产生的副产物^[153],其中甲酸的毒性要强于乙酰丙酸,这是因为甲酸的分子量更小,同时由于甲酸以不解离的形式存在具有更强的细胞膜渗透性。研究表明甲酸抑制微生物体内大分子的合成,比如 DNA 的合成与修复^[159, 160]。酚类化合物可以破坏细胞膜从而进入胞内,改变渗透压和脂肪/蛋白质比例,破坏了细胞膜的选择透过性^[161],从而导致细胞内的蛋白质、RNA、ATP、金属离子释放出来,降低了 ATP 水平和质子动力,影响蛋白质功能和营养物质的传递^[161]。此外,酚类化合物会加速活性氧簇(Reactive Oxygen Species, ROS)的生成,如 H₂O₂、O²⁻、OH⁻将会使蛋白或者酶失活,它们还会破坏细胞骨架和其它的细胞内疏水性靶点,造成 DNA 突变从而诱发细胞程序凋亡^[162]。研究表明大多数的酚类化合物即使在浓度很低时也会比咪唑类对微生物的抑制作用更强^[163, 164]。

预处理过程中产生的抑制物不仅影响微生物的生长和代谢,造成微生物的生长缓慢或者死亡,造成微生物的发酵性能大幅度下降;还能够抑制纤维素酶的酶活,使纤维素的酶解效率大大降低,是生物炼制领域的一大难题^[153, 165]。由于抑制物的存在将会影响后续的微生物发酵生产,因此需要将这些对微生物有害的抑制物进行脱除,这个过程称为“脱毒”。脱毒的主要目的是降低毒性物质的浓度,或者把高毒性物质转化成低毒性或者活性弱的物质,常见的脱毒方法主要包括三种:(1)物理法(如水洗^[166-168]、活性炭吸附^[169, 170]);(2)化学法(如过碱中和^[171-173]、离子交换^[174]);(3)生物法(如酶催化^[175]、生物降解^[165])。物理法会产生过多的废水,同时造成糖类的损失;化学法需要使用大量的化学品,成本较高。生物法是当前比较有潜力的一种脱毒方法,其反应条件比较温和,耗水少,对抑制物的降解比较彻底(尤其是对酚类抑制物),成本较低,随着近年来研究人员对生物脱毒过程中脱毒菌株和工艺的不断的改进和完善,生物法越来越受到学术界和产业界的重视^[176-178]。

本实验室从预处理后的木质纤维素原料中筛选分离出一株脱毒性能优良的霉菌,属于树脂枝孢霉(*Amorphotheca resinae*),是煤油菌的一种,被命名为 *A. resinae* ZN1。其自身通过分泌过氧化物酶或者漆酶可以将稀酸预处理过程中产生的抑制物降解作为自身正常代谢的一部分,可以直接在干式稀酸预处理后的原料中进行固体培养。*A. resinae* ZN1 作为脱毒菌株最大的优点在于打破了传统生物脱毒在液体中进行的局限,实现了固

体条件下的生物脱毒。在液体条件下进行生物脱毒时,抑制物被稀释,降低了脱毒的效率,还有一个明显的缺陷在于液体条件下水解液中的大量糖类物质会被脱毒微生物快速消耗,这些问题大大限制了液体生物脱毒的实际应用价值。经过对 *A. resinae* ZN1 的抑制物降解能力进行研究,发现其处理后的木质纤维素原料有很好的适应性,可以直接在预处理后的原料中生长并降解高浓度的抑制物,可以利用抑制物作为碳源进行快速生长,同时可以完整的保留纤维素^[179]。在随后的研究中发现,采用静态生物脱毒的方式脱毒时间较长,降低了整个脱毒过程的效率,同时还会大量消耗半纤维素在稀酸预处理过程中产生的木糖。在 *A. resinae* ZN1 对单一抑制物降解的试验中发现,向反应体系中持续通气可以大幅度提高 *A. resinae* ZN1 对稀酸预处理过程中产生两种主要的抑制物-糠醛和 HMF 的降解速率,因此在原有的静态生物脱毒的基础上对生物脱毒方式进行改进,将生物脱毒过程在螺带搅拌式生物反应器中进行,通入无菌空气,并加入间歇式搅拌,显著提高了生物脱毒的效率,称为在位脱毒。在通入空气的过程中, *A. resinae* ZN1 对抑制物的降解速率有明显的提高,但菌体量增加不明显。对于 *A. resinae* ZN1 而言,抑制物与木糖相比是优先利用的碳源,但静态脱毒时间较长依然会造成大量木糖的损失。在位脱毒效率明显提高,脱毒时间缩短, *A. resinae* ZN1 对预处理物料中的木糖的消耗量与之前的静态生物脱毒相比有显著降低。经过改进后的生物脱毒在加快脱毒速率的同时还能尽可能多的保留木糖,为提升生物炼制整体效率提供了一种实用的脱毒方法^[180]。

1.2.3 水解

预处理之后得到的新鲜的预处理原料或者经过脱毒后的预处理原料在进行发酵生产之前需要先转化成可溶性的可发酵糖。这个过程主要通过化学水解^[181, 182]或者酶水解^[183, 184]来实现,在水解过程中木质纤维素生物质中的纤维素将会被水解成葡萄糖,半纤维素主要被水解为木糖和少量的阿拉伯糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖等^[130],木质纤维素水解的过程也称为糖化过程。化学水解如酸水解存在比较明显的缺陷,在高温高压条件下水解生成的单糖会继续降解生成不期望得到的抑制物,如木糖会进一步降解为糠醛^[104, 185, 186],葡萄糖会进一步降解为 HMF^[187-189]。

酶水解的条件比较温和,可以有效避免单糖的继续降解,并具有较高的水解效率。在过去的半个世纪内,大量研究已经证明了一些具有水解纤维素能力的高度特异性的酶可以有效地使木质纤维素中的纤维素聚合物解聚^[51, 117, 190],由纤维素转化成葡萄糖的得率几乎可以达到 100%,使用酸水解时很难达到如此高的得率^[51]。然而酶水解也存在一定的问题,比如酶水解反应的时间往往会持续数天,而酸水解只需要几十分钟。其次,尽管近年来随着技术突破已经降低了纤维素酶的价格,但依然要高于使用酸水解所需硫酸的价格,而且酸水解产生的抑制物并不会影响其水解反应的进行。因此在当前生物炼制过程中,如何使用低蛋白当量的酶达到高效、快速、彻底地水解木质纤维素仍然存在着重大的技术瓶颈,与上述木质纤维素预处理过程中产生的抑制物问题合称为阻碍生物炼制发展的两大难题^[191, 192]。限制酶水解速率的因素主要有两方面:(1)底物,包括木质素与半纤维素的交联程度、纤维素的结晶度和聚合度、表面积的大小等;(2)酶,包

括终产物反馈抑制、协同作用、酶无效吸附等^[193-196]。通常用于水解木质纤维素生物质中的纤维素和半纤维素的酶是一个特异性的纤维素酶系，其中至少含有 15 种蛋白家族和一些亚家族^[197, 198]，许多种细菌和真菌都可以产生纤维素酶^[196, 199]。当前广泛被接受的纤维素酶水解机制是由外切酶（Endo-1,4- β -D-Glucanases, EC 3.2.1.4）、内切酶或者称为纤维二糖酶（1,4- β -Dglucan cellobiohydrolases, EC 3.2.1.91）和 β -葡萄糖苷酶（Cellobiases, EC 3.2.1.21）的协同作用。内切酶主要作用于纤维素的低结晶区，将纤维素分解成更小的片段，随后外切酶将这些小片段进一步逐个分解为纤维二糖（葡萄糖的二聚体）单位，最后这些二聚体在 β -葡萄糖苷酶的作用下裂解为葡萄糖单糖^[194, 200]。纤维素酶的水解条件（如温度、pH 和混合强度）成为影响酶水解效率的重要因素，其最适温度和 pH 通常由原料的特性、酶来源和水解时间共同决定的，一般情况下酶水解最适温度为 40-50 °C，pH 为 4-5^[197]。在酶解过程中，首先纤维素表面被纤维素酶吸附，在其催化作用下生成可发酵的糖，随后与纤维素酶解吸附^[201]。

在实际生物炼制生产中，为了得到高浓度的产品需要提高酶水解过程中木质纤维素的添加量。然而底物浓度的增加也会影响酶水解效率，高底物浓度可能会引起纤维素酶的底物抑制，同时产生的高浓度的糖类也会对纤维素酶产生反馈抑制，从而降低酶水解的速率。除此之外，高底物浓度意味着酶解液中固体含量高，还会导致混合和传质传热变得更加困难。在这种情况下，虽然提高纤维素酶的添加量可以有效的提高酶水解的效率，但是会显著增加整个生产过程的成本，纤维素酶的添加量一般在 5-35 FPU 每克干底物^[202]。为了解决高固体含量木质纤维素原料水解过程中混合困难的问题，本实验室在原有生物反应器的基础上对搅拌桨进行了改进，采用螺带式搅拌桨，有效地解决了高固体含量下混合不均匀的问题^[203, 204]。

1.2.4 发酵

木质纤维素生物炼制过程中，由木质纤维素原料得到的可发酵糖通常采用生物发酵的方法生产需要的生物基产品。发酵的方式主要分为两种，一种方式是先把处理好的木质纤维素原料进行酶水解后，得到可发酵的糖化液，再接入发酵菌株进行发酵生产，糖化过程和发酵过程是分离的，称为分步糖化与发酵（SHF）^[205-209]；另一种方式是将处理好的木质纤维素原料、酶和发酵菌株一起投入生物反应器中，将糖化过程和发酵过程合在一起同时进行，称为同步糖化与发酵（SSF）^[205, 207-211]。这两种发酵方式各有优劣，SHF 的优势在于糖化和发酵可以分别在各自最佳的条件下进行，而且 SHF 可以实现发酵微生物细胞的循环利用，提高生产的效率，但在 SSF 中几乎无法把发酵微生物细胞和固体木质纤维素颗粒分开。但 SHF 这种方式主要的缺陷在于在糖化过程中使用高底物浓度时，高浓度的产物会对纤维素酶产生反馈抑制作用，同时在发酵过程中，较高的初始糖浓度也会对发酵菌株的发酵性能产生一定的影响^[208]。SSF 将纤维素的酶水解和微生物发酵结合在一起，优势在于纤维素酶水解释放的糖类可以被微生物快速的消耗，大大减弱了糖类对纤维素酶的产物抑制，同时也解决了较高的初糖浓度对发酵菌株的不利影响^[209]。SSF 将糖化过程和发酵过程在同一个反应器中同时进行，可以有效的减少设备

占用率、降低成本、缩短反应时间、降低糖损失。但是 SSF 也存在一些缺陷, 如酶水解与发酵的最适条件很难保持完全一致, 只能选择一个两者都可以接受的次优的反应条件^[210, 211]。在实际应用中, 需要从目的出发, 权衡这两种方式的优缺点, 选择出最合适的发酵方式。

在发酵过程中对发酵菌株的选择也是影响生物炼制效率的重要因素。尽管已经对预处理后木质纤维素原料中的抑制物进行了脱毒, 但是仍然会有部分抑制物(尤其是酚类化合物)残留在原料中从而影响发酵微生物的生长和发酵性能。因此选择对抑制物具有更高耐受性或降解能力的微生物作为生物炼制过程中的生产菌株就显得尤为必要。随着近年来对生物脱毒研究的深入, 发现多种微生物具有一定脱除抑制物的能力, 包含了细菌, 酵母和真菌^[180]。尤其一些用于工业生产的菌株在利用木质纤维素原料生产生物基产品的同时还对抑制物具有一定的耐受性或者降解转化能力。如酿酒酵母(*S. cerevisiae*) 在利用木质纤维素原料中的葡萄糖快速生产乙醇的同时, 还对原料中的抑制物具有较好的耐受性, 尤其是对糠醛和 HMF 的耐受性较强, 在 1 g/L 的糠醛和 HMF 胁迫下, 菌体的生长和乙醇的发酵速率均没有受到明显的影响。同时在发酵生产乙醇的过程中也可以将这两种抑制物快速的降解, 表现出了不俗的抑制物降解能力^[212]。除此之外, 谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) 是生产谷氨酸的一种常用微生物, 以木质纤维素原料为底物生产谷氨酸时, 在有氧条件下可以将糠醛降解为糠醇和 2-糠酸^[213]。

微生物之所以可以将这些抑制物降解转化, 是由于微生物在这些抑制物的刺激下, 抑制物降解途径中所需要的酶或者辅酶被合成和激活, 在这些酶的作用下抑制物被降解转化。涉及抑制物降解的酶主要是一些与氧化还原相关的酶, 并且这些酶将抑制物降解以后的产物对微生物的抑制作用会减弱, 比如将细胞内的醛基或者羧基化合物转化为醇基化合物以后, 可以促进细胞的生理活性^[214, 215], 多种细菌内含有的糠醛还原酶可以将糠醛和 HMF 降解为低毒性的糠醇和 HMF 醇^[216, 217]。氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*) 中的醛还原酶可以将香草醛转化成香草醇, 降低抑制物对细胞的伤害^[218]。*G. oxydans* 的基因组已经被测定, 其中包含 75 个编码功能尚不明确的氧化还原酶的基因, 由于在 *G. oxydans* 的代谢过程中会产生大量的醛基化合物, 推测这些非特异性的酶可能与醛基化合物的降解转化有关^[219]。这些具有一定抑制物耐受性以及降解抑制物能力的生产发酵菌株, 在利用木质纤维素原料生产生物基化学品的同时还具有一定的“脱毒”能力, 这些发酵菌株的发酵性能更稳定, 不容易受到残留的抑制物的影响, 更适合生物炼制生产生物基产品。

1.3 葡萄糖酸

葡萄糖酸(Gluconic acid, 五羟基己酸)是一种自然界普遍存在的多羟基己酸^[220, 221], 历史可以追溯到 19 世纪 70 年代, Hlasiwetz 和 Habermann 首次发现了葡萄糖酸^[220]。1880 年 Boutroux 首次发现醋酸杆菌具有生产葡萄糖酸的能力^[220], 1922 年 Molliard^[222] 发现 *A. niger* 的培养液中存在葡萄糖酸, 从此对葡萄糖酸的研究拉开了序幕。

作为一种不易腐蚀、不易挥发、无毒性的温和有机酸，葡萄糖酸及其衍生物得到了广泛的应用和关注，被应用于食品、建筑、制药等行业^[220]。例如，葡萄糖酸作为食品添加剂可以增加白酒、果汁等产品酸爽的口感，从而得以在食品行业广泛应用；葡萄糖酸凭借其卓越的螯合能力可以应用于清洗行业；葡萄糖酸可以有效延长水泥的缓凝时间从而作为当前一种常用的水泥缓凝剂应用在建筑行业，除此之外葡萄糖酸还可以增强水泥在极端环境的抵抗力和稳定性^[223-228]。为了满足葡萄糖酸日益增长的市场需求，工业生产规模逐渐扩大，葡萄糖酸的生产越来越受到广泛关注。

葡萄糖酸可以通过化学方法生产^[229]，但副产物较多反应不容易控制；或者通过酶催化的方法生产^[230]，使用从微生物提取的葡萄糖氧化酶和过氧化氢酶直接催化葡萄糖生成葡萄糖酸，在适宜的条件下，葡萄糖酸的得率可以接近 100%。酶催化的优点是产品纯度较高，但是生产成本较高，不符合实际工业生产的需求。当前，工业上生产葡萄糖酸普遍选用微生物法^[219-221]。目前，微生物法生产葡萄糖酸的工艺已经比较成熟，可以生产葡萄糖酸的微生物种类很多，其中使用最普遍、研究最广泛的葡萄糖酸生产菌株主要有以黑曲霉 (*A. niger*) 为代表的真菌以及以氧化葡萄糖酸杆菌 (*G. oxydans*) 为代表的细菌^[221]。

1.3.1 黑曲霉

黑曲霉 (*A. niger*) 是曲霉属真菌中最常见的一种，是一种专性好氧的真菌，在自然界中分布很广。随着葡萄糖酸越来越多的功能被人们发现和应用，葡萄糖酸生产备受瞩目，*A. niger* 成为了目前工业葡萄糖酸生产中最常用的发酵菌株之一^[231-233]。真菌中除了 *A. niger* 以外，能够生产葡萄糖酸的还有青霉 (*Penicillium*)、粘帚霉 (*Gliocladium*)、帚霉 (*Scopulariopsis*) 和漆葡孢霉 (*Gonatotryps*) 等^[221]。越来越多的研究表明在真菌中 *A. niger* 生产葡萄糖酸的性能尤为突出，Bernhauer 等^[234]发现 *A. niger* 生产葡萄糖酸时使用碳酸钙调节 pH 会提高葡萄糖酸的得率，并提出 pH 在 *A. niger* 生产葡萄糖酸过程中起重要作用^[235]。Moyer 等^[236]使用 *A. niger* 在 150-200 g/L 初始葡萄糖浓度的情况下，24h 得到的葡萄糖酸达到理论得率的 95%。Porges 等^[237]使用半连续的方式生产葡萄糖酸，将 *A. niger* 的菌丝体通过过滤或者离心回收利用 9 次，大大缩短生产周期，提高生产效率。Wells 等^[238]发现可以在高达 250 g/L 的葡萄糖中 24 h 内仍然保持 95% 以上的转化效率，并且菌体可以循环利用，在每个循环的菌体生长后期添加 1% (w/w) 的硼有利于菌丝体的回收利用。当前商业生产葡萄糖酸钠主要依据由 Blom^[231]等人改进的 *A. niger* 深层液体发酵方法，间歇补充葡萄糖批次培养，用氢氧化钠调节 pH 在 6.0-6.5，温度在 34 °C，葡萄糖酸生产速率最高可以达到 15 g/L/h。

与此同时 *A. niger* 生产葡萄糖酸的相关酶特性以及发酵动力学也都得到深入的研究，并取得了很大的进展^[239, 240]。研究发现 *A. niger* 可以产生多种生物酶如葡萄糖氧化酶 (Glucose oxidase, GOD)、淀粉酶 (Amylase)、纤维素酶 (Cellulase) 等，因此被广泛应用于工业生产，是一种重要的发酵工业菌株^[241]。在 *A. niger* 中，葡萄糖酸是由葡萄糖氧化酶催化葡萄糖生成的，反应过程比较简单，首先 β -D-葡萄糖 C-1 的醛基在葡萄糖氧化

酶的催化下氧化成羧基,从而生成葡萄糖酸- δ -内酯和过氧化氢,随后葡萄糖酸- δ -内酯可以自发或者在内酯水解酶的作用下水解开环生成葡萄糖酸,同时过氧化氢在过氧化氢酶的催化下生成氧气和水^[220]。葡萄糖氧化酶最早于 1928 年被 Muller^[242]在 *A. niger* 的提取物中发现,如今其在很多领域的应用都引起广泛的关注。葡萄糖氧化酶可以消耗氧气并生成过氧化氢,根据此特性用来作为食品防腐剂。由于葡萄糖氧化酶自身的电化学活性,可以用来制造葡萄糖传感器,燃料电池,除此之外还可以应用于面包烘焙干蛋粉的生产、白酒生产,最主要的功能还是用来生产葡萄糖酸^[241]。

1.3.2 氧化葡萄糖酸杆菌

除了真菌以外,多种细菌也可以生产葡萄糖酸,如氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)^[220]、假单胞菌(*Pseudomonas*)^[243, 244]、肠杆菌(*Enterobacter*)^[245]和醋酸杆菌(*Acetobacter*)^[246-248]等,其中研究与应用最广泛的生产葡萄糖酸的细菌是氧化葡萄糖酸杆菌。*G. oxydans* 是一种革兰氏阴性菌,属于醋酸杆菌属,是一种专性需氧的微生物。*G. oxydans* 以其能够快速不完全氧化多元醇的特点而著称,可以生成多种化学品,如葡萄糖酸、酮基葡萄糖酸(KGA)、维生素 C、二羟基丙酮、米格列醇以及具有手性的醛和酸等^[249, 250]。*G. oxydans* 是一株非常重要的工业菌株,不但在发酵过程中对底物进行高效生物转化而且这些催化不完全氧化的酶主要位于细胞膜上,几乎可以把这些产物完全分泌到培养基中^[251-253]。*G. oxydans* 主要通过磷酸戊糖途径来进行分解代谢,将糖类和多元醇分解成二氧化碳。研究表明在 *G. oxydans* 中磷酸戊糖途径是完整的,这些途径上所有酶的编码基因都在 *G. oxydans* 中逐个得到鉴定。*G. oxydans* 中 ED 途径不完整,虽然找到了该途径所有酶的编码基因,但是有些关键酶并没有在 *G. oxydans* 中检测到。糖酵解路径在 *G. oxydans* 中是缺失的,而且 TCA 循环不完整,缺少了磷酸果糖激酶以及琥珀酸脱氢酶的编码基因从而不能将乙酸降解为二氧化碳和水^[250],主要作用是生物合成谷氨酸、天冬氨酸和琥珀酸^[253]。*G. oxydans* 在磷酸戊糖途径中具有转化多种多元醇、糖以及糖的衍生物的能力,通常情况下这些底物首先被特异性的激酶磷酸化,随后进一步被脱氢酶和异构酶分解,推测磷酸戊糖途径可能是 *G. oxydans* 最主要的代谢途径。

G. oxydans 具有生产葡萄糖酸的能力是在上世纪七十年代末期发现的, Olijve 等^[251]在含有葡萄糖的培养基中研究 *G. oxydans* 生长情况时发现葡萄糖酸的产生,并发现 *G. oxydans* 可以在葡萄糖和限制氮源的恒化培养过程中连续生长。在以葡萄糖为底物的培养过程中,发现 *G. oxydans* 与大多数微生物中葡萄糖通过磷酸戊糖途径进行代谢不同,在 *G. oxydans* 中大多数的葡萄糖直接氧化生成葡萄糖酸,并且通过连续生产的方式使得葡萄糖酸的得率高达 96%。*G. oxydans* 与 *A. niger* 生产葡萄糖酸的不同之处在于,葡萄糖酸的生成是由葡萄糖脱氢酶(Glucose dehydrogenase, GDH)催化的, GDH 对低 pH 的敏感性要弱于 *A. niger* 中 GOD。*G. oxydans* 中生成的葡萄糖酸并不是最终产物,会受 pH 等其他因素的影响在相应的葡萄糖酸脱氢酶催化下进一步氧化成 2-酮基葡萄糖酸、5-酮基葡萄糖酸和 2-5-二酮基葡萄糖酸^[233, 234, 249]。这些葡萄糖酸脱氢酶都位于细胞膜上,会被高浓度的葡萄糖(>15 mM)诱导。

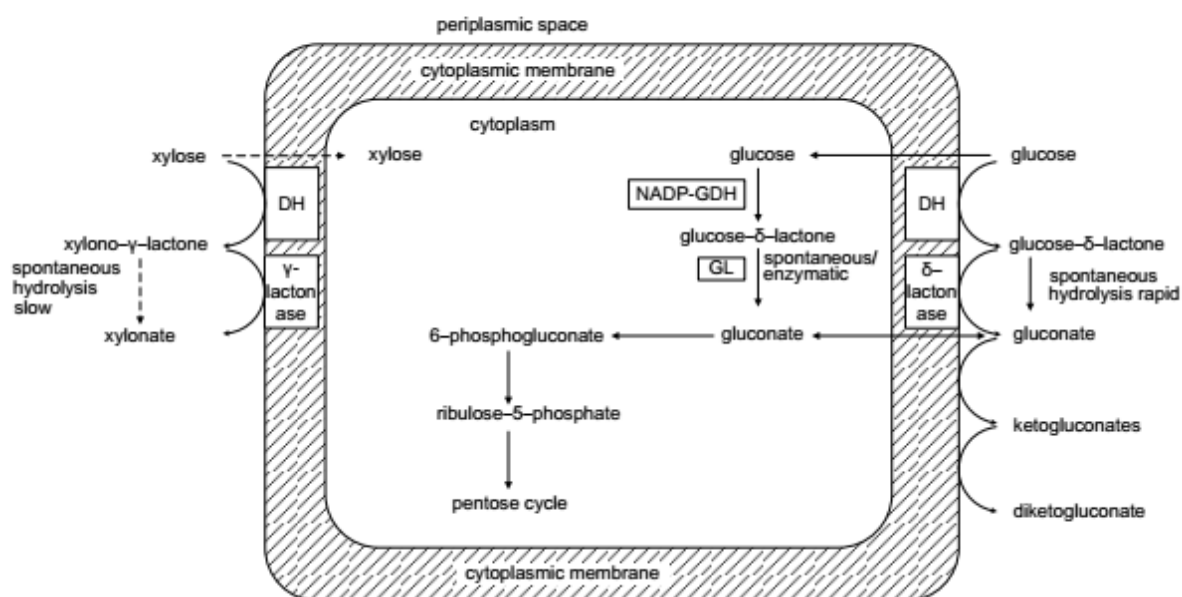


图 1.5 *G. oxydans* 中葡萄糖和木糖的氧化代谢路径示意图^[254]

Fig. 1.5 Schematic representation of oxidative metabolism of glucose and xylose in *G. oxydans*^[254]

Explanations: NADP-GDH, NADP-linked glucose dehydrogenase EC 1.1.1.47; DH, PQQ-linked glucose dehydrogenase EC 1.1.99.17; GL, Glucono- δ -lactonase.

在 *G. oxydans* 中葡萄糖酸的生成路径见图 1.5，葡萄糖脱氢酶（GDH）主要有两类，一类是 PQQ 依赖型的 mGDH，位于细胞膜上（PQQ-mGDH）；还有一类是 NADP 依赖型的 GDH，位于细胞质中（NADP-GDH）^[254, 255]。*G. oxydans* 氧化葡萄糖生成葡萄糖酸也主要通过两个途径^[255]：（1）磷酸戊糖途径氧化磷酸化（NADP-GDH）；（2）直接氧化（PQQ-mGDH）。研究发现，在 *G. oxydans* 中这两条途径同时进行，但 90% 以上的葡萄糖酸是由葡萄糖通过直接氧化的方式产生的，即 *G. oxydans* 膜结合的 PQQ-mGDH 耦合呼吸链在胞外直接催化葡萄糖产生的。具体途径为膜结合的 PQQ-mGDH 催化葡萄糖生成葡萄糖酸内酯，同时辅酶 PQQ 接受葡萄糖氧化过程中产生的电子被还原为 PQQH₂。随后 PQQH₂ 将两个电子依次传递给 mGDH 上的可以接受电子的结合醌^[256]，PQQH₂ 被氧化回 PQQ，结合醌变为还原态。mGDH 同时具备辅酶 Q 还原酶的活性，因此将还原呼吸链上的辅酶 Q 还原生成泛醇，从而将还原态结合醌氧化^[257]。泛醇在呼吸链上的细胞色素 b₀₃ 或者细胞色素 bd 的催化下被氧化生成辅酶 Q，同时将 O₂ 还原为水，同时将胞内 H⁺ 泵出胞外，为 ATP 的形成提供质子梯度^[258]。胞外产生的葡萄糖酸可以被运输到胞内，通过磷酸戊糖途径进一步被代谢。当培养基中的葡萄糖浓度高于 15 mM 时，磷酸戊糖途径被抑制，葡萄糖酸开始积累^[255]。利用 *G. oxydans* 生产葡萄糖酸在工业生产中具有一定的限制性，生成的葡萄糖酸会发生次级反应，不利于产物积累^[259]。因此，在实际使用 *G. oxydans* 生产葡萄糖酸的过程中，为了防止生成的葡萄糖酸进一步氧化，需要严格控制反应条件和反应时间。

近年来随着葡萄糖酸需求量的增加,生产葡萄糖酸的底物也不只局限于葡萄糖,以微晶纤维素、葡萄汁、废纸和乳清等为原料的葡萄糖酸生产也都取得了一定的成果^[260-264]。但是由于这些原料数量较少,难以满足大规模生产的需求,仍需要寻找一种丰富的、廉价的原料来代替传统原料淀粉或者蔗糖来进行葡萄糖酸的生产。

1.4 木糖酸

木糖酸,主要由木糖转化而来,是一种多功能、多用途的新型平台化合物,被美国能源部评为可以生物转化的三十种最有价值的化学品之一^[265, 266]。木糖酸的功能与应用范围与葡萄糖酸比较相似,可以作为葡萄糖酸的替代品,近年来在众多行业得到广泛应用,尤其是在建筑行业,木糖酸作为一种水泥分散剂,在水泥水化阻滞过程中对混凝土的分散效果大约是常用的木质素磺酸盐的两倍^[267]。除此之外,木糖酸还可以生产共聚酰胺^[268],作为 1,2,4-丁三醇合成的前体^[269]。随着对木糖酸研究的深入,其更多的功能和用途将被发掘出来。

木糖酸可以通过多种方法生产,如酶催化法^[270]、电化学法^[271]、化学氧化法^[272, 273]等,但是由于这些方法存在成本高、能耗大、步骤繁琐、反应条件苛刻、污染严重等诸多问题,很难被应用于工业化生产,目前工业上生产木糖酸最常用的方法是生物法^[266]。利用微生物生产木糖酸的历史可以追溯到十九世纪末期^[274],随着对木糖酸生产菌株的研究深入,发现多种可以生产木糖酸的微生物,如氧化葡萄糖酸杆菌 (*Gluconobacter*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、醋酸杆菌 (*Acetobacter*)、气杆菌 (*Aerobacter*)、欧文氏菌 (*Erwinia*) 等^[275]。在生物法生产木糖酸的过程中,以 *G. oxysans* 为例,木糖的电子被细胞膜上 PQQ 依赖型的木糖脱氢酶转移到氧化呼吸链上的细胞色素 C,最终传递到氧分子,产生的木糖酸积累在培养基中^[276, 277]。研究表明, *G. oxysans* 中催化木糖生成木糖酸的木糖脱氢酶实际上就是葡萄糖脱氢酶 (GDH) ^[268, 278]。

G. oxysans 中木糖酸的生成过程与葡萄糖酸的生成过程相似 (图 1.5),大多数的木糖直接与细胞膜上的 PQQ-mGDH 反应,木糖首先生成木糖酸- γ -内酯作为一种中间产物,随后可以自发或者在对应的内酯酶的作用下开环生成木糖酸^[279],细胞质中 NADP-GDH 也可以催化相同的反应^[280-282]。在大多数的微生物中,木糖酸是最终产物,但也有些特殊的细菌和古生菌可以通过非磷酸化木糖代谢途径将木糖酸进一步代谢^[283, 284]。除了细菌以外还有一些酵母和真菌可以生产木糖酸^[285-287]。当前在生产木糖酸的研究过程中,越来越多的分子生物学手段被应用,如多种酵母被工程改造导入编码木糖脱氢酶的基因,用来生产木糖酸^[266, 267, 288],多种假定的木糖酸内酯酶的基因序列被确定^[283, 284, 289],期望通过基因改造得到发酵性能更好的木糖酸生产菌株。

直接用木糖来生产木糖酸的成本过高,寻求廉价的原料来代替木糖成为木糖酸生产行业最亟待解决的问题。木糖是半纤维素的重要组成成分,木糖作为木聚糖的单体,可以在木质纤维素原料的稀酸预处理过程中大量释放出来,也是一种用来生产生物燃料和化学品的重要碳源^[290]。半纤维素在木质纤维素生物质中普遍都有比较高的含量,如在

农业废弃物和硬木中半纤维素的比重可以达到 15-30%^[290]，木糖是木质纤维素生物质中仅次于葡萄糖的第二大糖类物质，可以被微生物利用生产多种生物基产品，如乙醇、丁醇、丙酮、2,3-丁二醇、衣康酸、木糖醇和木糖酸等^[291]。在这些产品中，木糖酸的产量和得率都具有明显的优势，因此利用木质纤维素生物质中的木糖生产木糖酸具有很大的工业化生产的潜力^[291]。利用丰富、廉价的木质纤维素生物质生产木糖酸可以极大程度的降低生产成本，加速木糖酸生产的工业化进程，并且增加以农业废弃物类木质纤维素原料生物转化的附加值，具有广阔的工业化生产前景。

1.5 立题依据和意义

当前对木质纤维素生物质的利用主要集中在通过厌氧还原生产生物基化学品，如乙醇、乳酸等，对其好氧发酵方面的研究比较少。将木质纤维素水解得到的糖类直接通过微生物催化生产糖酸产品的过程不容易受到抑制物的影响，具有高产率、高得率、高稳定性的特点，具有重要的研究价值。葡萄糖酸、木糖酸的应用广泛，均可作为水泥添加剂应用于建筑行业。随着近年来建筑行业的蓬勃发展，这两种有机酸的需求量也逐渐增加。当前工业上生产葡萄糖酸和木糖酸所使用的原料主要是玉米淀粉、蔗糖和木糖，随着需求量的日益增加，会导致粮食深加工企业的一味扩张从而引发粮食危机。寻求价格低廉且来源广泛的生产原料是葡萄糖酸、木糖酸行业健康可持续发展所面临的首要问题。我国是农业大国，以农业废弃物为代表的木质纤维素生物质的产量巨大，但大部分都被低效的焚烧，不仅造成了巨大的资源浪费，而且导致了比较严重的环境污染和气候问题。将二者进行合理的结合，利用这些农业废弃物等木质纤维素生物质通过微生物有氧发酵来生产葡萄糖酸、木糖酸，不仅可以有效解决葡萄糖酸、木糖酸行业的原料来源问题，同时还可以有效缓解当前的三农问题，缓解环境污染，减轻雾霾压力，为农业废弃物的深加工以及葡萄糖酸、木糖酸行业扩大生产提供新的出路。

1.6 本论文的主要研究内容

本论文主要以典型的木质纤维素生物质-玉米秸秆为主要原料，采用独特的干法生物炼制工艺，即干式稀酸预处理、固态生物脱毒、高固体含量酶水解糖化，选用产酸性能优良的、对水解液体系适应性强的生产菌株进行有氧发酵直接氧化葡萄糖和木糖生产葡萄糖酸和木糖酸，实现了纤维素和半纤维素的共同利用，拓展了木质纤维素化学品的种类。随后将得到的纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品作为水泥缓凝剂进行了性能测试，缓凝效果与玉米淀粉来源的商品葡萄糖酸钠性能非常接近。同时利用纤维素乙醇发酵液经精馏后塔釜残醪中的木糖通过微生物发酵和直接催化生产木糖酸，解决了纤维素乙醇生产中木糖难以利用的问题。在过程研究基础上，在 Aspen Plus 流程模拟平台上建立了严格的纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品流程模拟模型，并进行详细的技术经济分析，结果表明以玉米秸秆为原料得到的葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品与以淀粉或者蔗糖为原料得到的同类工业产品相比，具有更强的经济竞争力。利用纤维素乙醇废液中木糖生产木糖酸的工艺与以往利用预处理液中的木糖进行木糖酸发酵技术相比，大幅度降低了能耗

与废水的产生。

本论文的主要内容包括以下三个方面：

(1) 首先选用工业上使用最普遍的葡萄糖酸生产菌株黑曲霉 (*A. niger*)，以玉米秸秆为原料生产葡萄糖酸。比较了 *A. niger* SIIM M276 在合成培养基与新鲜玉米秸秆水解液中生长和产酸性能的差异，随后对 *A. niger* SIIM M276 的抑制物耐受性进行研究。对发酵条件进行优化有效缩短了 *A. niger* SIIM M276 在玉米秸秆水解液发酵过程中的延滞期，提高葡萄糖酸的生产速率。为了得到高浓度的葡萄糖酸，对预处理后玉米秸秆中的抑制物进行脱毒操作，*A. niger* SIIM M276 在脱毒玉米秸秆水解液中的发酵性能得到明显的提升。

(2) 为了解决 *A. niger* SIIM M276 在玉米秸秆水解液体系中生产葡萄糖酸所遇到的问题，选择一株发酵性能好、适应性强、能够利用木糖的细菌 *G. oxydans* DSM 2003 作为葡萄糖酸生产菌株。分别在不同固体含量的新鲜玉米秸秆水解液和脱毒玉米秸秆水解液中进行葡萄糖酸和木糖酸的生产，并在 50 L 罐中进行了放大试验。对得到的纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品进行水泥缓凝性能的测试以及技术经济分析。

(3) 为了解决传统纤维素生物乙醇发酵过程中木糖难以利用的问题，使用在玉米秸秆水解液中发酵性能优良的木糖酸生产菌株 *G. oxydans* DSM 2003，以纤维素乙醇发酵醪蒸馏废液中的木糖为原料进行木糖酸的生产。研究了采用发酵和全细胞催化两种不同的生产方式对木糖酸生产的影响，以及通过 Aspen Plus 平台建立联合生产乙醇和木糖酸工艺流程模型，与以前的生产工艺相比，本工艺表现出更强的可行性和经济竞争力。

第 2 章 *Aspergillus niger* 利用玉米秸秆生产葡萄糖酸

2.1 引言

葡萄糖酸是一种重要的大宗生物基化学品，广泛应用在食品、饲料和制药等行业。近年来，葡萄糖酸钠是一种多羟基化合物具有延缓水泥凝结时间的作用，成为一种常用的水泥缓凝剂而广泛应用于建筑行业^[292]。并且葡萄糖酸钠作为水泥缓凝剂具有掺量低、与高效减水剂复合使用以后可以有效降低塌落度的经时损失、与水泥和易性好、有助于后期强度的提高等优点，越来越受到人们的青睐，需求量也在逐年上升。仅仅在中国，每年水泥的产量大约为 25 亿吨，其中 70-80%用于大型建筑的浇筑，需要添加缓凝剂。假如以 0.05%-0.2%葡萄糖酸钠添加量来算，葡萄糖酸钠仅作为水泥添加剂每年的需求量就高达 100-400 万吨^[293]。随着近年来，尤其是发展中国家基础设施建设正处于迅速发展时期，葡萄糖酸的需求量还会进一步增加。

当前工业上生产葡萄糖酸主要是以丝状真菌 *A. niger* 为生产菌株，以玉米淀粉或者蔗糖作为原料进行生物发酵生产所得^[220]。如今使用传统淀粉原料生产的葡萄糖酸浓度已经达到相当高的水平，如 Matsui 等^[294]通过 *A. niger* 的固定化技术将 300 g/L 玉米淀粉浆转化得到 272 g/L 的葡萄糖酸。随着葡萄糖酸钠需求量逐年增加，找到一种价格低廉且储量丰富的可再生原料来代替传统的淀粉和蔗糖生产葡萄糖酸，从而实现葡萄糖酸产业的可持续性发展就显得尤为迫切。蔗糖蜜^[295]、甜菜糖蜜^[296]、糖浆^[297]、葡萄汁^[263, 298]、无花果果汁^[240]都已经被尝试用来作为葡萄糖酸生产的原料。相比于这些原料，木质纤维素原料如玉米秸秆、小麦秆和稻秆等由于其自身的优势，若用于生产葡萄糖酸将具有更大的潜力。当前关于利用木质纤维素原料生产葡萄糖酸的研究却鲜有报道，2006 年 Ikeda 等^[263]使用办公室废纸生产葡萄糖酸，办公室废纸被酶解成葡萄糖然后使用 *A. niger* IAM2049 发酵得到 46 g/L 葡萄糖酸，得率为 92%。尽管办公室废纸被认为是木质纤维素的一种，但是它的成分与农林废弃物类原料有比较明显的差别，主要是因为造纸的过程中添加了大量的碳酸钙，使得办公室废纸中碳酸钙含量高达 20% (w/w) 以上，导致在酶解前需要大量的酸去中和^[299]，不仅提高了原料成本还产生大量的废水，除此之外如果以办公室废纸作为工业葡萄糖酸发酵的原料，其来源以及收集也有一定的限制。我国是农业大国，以农业废弃物为代表的木质纤维素生物质的产量巨大，但大部分都被低效的焚烧，不仅造成了巨大的资源浪费，而且导致了一系列的环境污染和气候问题。而如果可以利用这些农业废弃物来生产葡萄糖酸，不仅可以有效解决葡萄糖酸行业的原料来源问题，同时还可以有效缓解当前的三农问题，为农业废弃物的深加工提供新的出路^[300]。

在本章节中，一种典型的木质纤维素原料-玉米秸秆，通过生物炼制的手段生产葡萄糖酸。主要的工艺流程为玉米秸秆经过预处理、酶水解糖化生成可发酵的糖，这种含糖的玉米秸秆水解液被用来发酵生产葡萄糖酸。在整个生物炼制过程中，干式稀酸预处理

技术^[133,211,212]的应用使该过程的废水排放接近于零,非常符合未来的工业化生产的发展趋势。经过筛选,一株工业葡萄糖酸生产菌株 *A. niger* SIIM M276 被用来利用玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸,并得到了较高的葡萄糖酸浓度和得率。本研究首次建立了一种非常有前景的使用木质纤维素原料生产葡萄糖酸从而代替传统淀粉基葡萄糖酸生产的技术模式。

2.2 材料与方法

2.2.1 原料

玉米秸秆 (Corn Stover, CS) 来自于中国河南省周口市郸城县,收获于 2012 年秋季。从田间收集的玉米秸秆首先经过粗粉,得到的玉米秸秆碎块经过水洗除去泥沙、石子和金属,然后 105°C 烘干至恒重。将烘干后的玉米秸秆使用 SF-300 锤式粉碎机粉碎,使用孔径为 10mm 的筛孔对粉碎的秸秆进行筛选,最终得到的玉米秸秆颗粒封存于密封袋中备用,整个操作过程称作玉米秸秆的前处理。经过前处理后的玉米秸秆含有纤维素 38.72%、半纤维素 20.55%、木质素 26.51%、灰分 2.76%,基于干物料(w/w),使用 ANKOM 220 纤维素分析仪检测 (ANKOM Technology, Macedon, NY, USA)。

2.2.2 酶和试剂

商品纤维素酶 Youtell #6 购自湖南尤特尔生化有限公司 (中国,湖南)。该酶为固体酶,滤纸酶活为 135 FPU/g 酶粉,测定方法参照 NREL 纤维素酶活测定方法^[303]。纤维二糖酶活性为 344 CBU/g 酶粉,其测定方法参照 Ghost 提出的测定方法^[304]。蛋白含量为 90 mg/g 酶粉,使用 Bradford 法^[305]测定,以 BSA 为标准蛋白。本章节所使用的主要试剂见附录 I。

2.2.3 仪器设备

螺带搅拌式预处理反应器^[211]为本实验室自主设计,由烟台科立化工设备有限公司生产 (中国,山东)。主体部分由 314 不锈钢制成,内部容积为 20 L。内含螺带搅拌桨,有利于高固体含量木质纤维素原料的混合。

螺带搅拌式生物反应器^[211]为本实验室自主设计,由保兴生物设备工程有限公司生产 (中国,上海),生物反应器规格分别为 5 L, 15 L 和 50 L。

其他仪器设备见附录 II。

2.2.4 菌种、培养基和培养方法

A. niger SIIM M276、*A. niger* SIIM M290 均购自上海工业微生物研究所科技有限公司 (Shanghai Industrial Microbiology Institute Tech. Co., Ltd, SIIM, 中国,上海)。使用的培养基如下:

(1) 活化培养基: 8.0 g Glucose, 2.0 g Yeast extract, 0.2 g MgSO₄, 0.1 g NaH₂PO₄, 0.01 g MnSO₄, 20.0 g Agar, 加入 1L 的去离子水中。

(2) 种子培养基: 60.0 g Glucose, 0.2 g MgSO₄, 0.1 g NaH₂PO₄, 0.01 g MnSO₄, 加入 1 L 的去离子水中。

(3) 发酵合成培养基: 100.0 g Glucose, 0.3 g MgSO_4 , 0.2 g KH_2PO_4 , 0.9 g $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 0.06 g MnSO_4 , 加入 1 L 的去离子水中。

(4) 玉米秸秆水解液培养基: 玉米秸秆水解液, 不添加任何额外营养物质。

A. niger 的孢子悬液保存在 2 mL 冻存管中, 甘油浓度 30% (w/w), $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 保存。接种时, 取出冻存管, 吸取 200 μL 菌液于活化平板上, $30\text{ }^\circ\text{C}$ 培养 72h。将平板上的孢子用无菌水洗脱, 接入含有 100 mL 种子培养基的 500 mL 三角瓶中, 要求种子培养基中孢子浓度大约在 1.0×10^5 个/mL, $30\text{ }^\circ\text{C}$, 200 rpm 培养 24 h。种子培养成熟以后, 对于摇瓶发酵, 将种子接入到含有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中, 接种量 10%, $30\text{ }^\circ\text{C}$, 200 rpm 发酵 72-144 h, 所有的摇瓶试验都有重复对照。对于发酵罐发酵, 将种子接入含有 1 L 玉米秸秆水解液的 3 L 发酵罐中, 接种量 10%, $33\text{ }^\circ\text{C}$, 500 rpm, 通气量 1.6 vvm, 发酵 48-96 h。摇瓶中 pH 的控制依靠添加碳酸钙维持, 添加量为每 1 mol 葡萄糖添加 0.7 mol 碳酸钙, 发酵罐中 pH 靠 5 M NaOH 和 2 M H_2SO_4 调节。培养基和水均在 $115\text{ }^\circ\text{C}$ 灭菌 20 min。本论文以玉米秸秆为原料, 采用的发酵方式均为液态发酵, 这是由于预处理或脱毒后的玉米秸秆不能被黑曲霉利用生产葡萄糖酸。首先要将其在纤维素酶的酶解作用下制备成水解液, 释放出葡萄糖, 从而进行后续的葡萄糖酸生产。另一方面, 葡萄糖酸的生产过程是一个需氧的过程, 固态发酵或半固态发酵与液态发酵相比, 氧气传递速率低, 葡萄糖酸的生产速率会受到明显的影响。因此本论文没有进行利用黑曲霉固态发酵生产葡萄糖酸的试验。

Amorphotheca resinae ZN1, 由本实验室从自然界筛选分离得到, 用于对预处理后的玉米秸秆进行固态脱毒, 除去在预处理过程中产生的大部分抑制物。*A. resinae* ZN1 保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbial Collection Center, CGMCC), 保藏编号为 CGMCC 7452。

2.2.5 预处理、生物脱毒和水解液的制备

干式稀酸预处理方法^[133]: 首先, 将 2.5% (w/w) 硫酸和干玉米秸秆一起投入具盖储物箱中, 其中干玉米秸秆与硫酸溶液的质量比为 2:1。仔细混合均匀, 静置 8-12 h, 完成稀酸溶液对玉米秸秆的预浸。将预浸后的物料投入预处理反应器中, 通入压力为 1.6 MPa 的蒸汽, 当预处理反应器中压力为 0.5 Mpa 时, 顶部排汽 5-10 s, 底部排汽 5-10 s。当温度升高到 $185\pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ 时开始计时, 在此温度下停留 3 分钟, 螺带搅拌桨的转速始终为 50 rpm。从通入蒸汽使釜内温度达到 $100\text{ }^\circ\text{C}$ 到温度升到 $185\text{ }^\circ\text{C}$ 称为升温过程, 控制在 6-7 min 之内, 以保证预处理强度的稳定性。预处理结束时, 迅速排空压力, 将物料放出。预处理后的玉米秸秆的含水量大约在 50%, 在此预处理过程中没有废水产生。经过预处理后的玉米秸秆含有纤维素 39.47%、半纤维素 6.80%、灰分 6.57%, 组分使用两步酸解法测定, 其测定方法参照 NREL 技术报告^[301,302]。每克干预处理后的玉米秸秆中抑制物的含量为: 5.13 mg 糠醛, 3.38 mg HMF, 16.65 mg 乙酸, 1.97 mg 甲酸, 2.54 mg 乙酰丙酸, 0.27 mg 香草醛, 0.67 mg 丁香醛, 0.18 mg 4-羟甲基糠醛, 0.11 mg 松柏醛。在以下的章节中, 使用的玉米秸秆来源地均不同, 受气候、土壤、收获时间等因素的影响,

玉米秸秆的成分会有差异。针对不同的来源的秸秆会通过调整预处理的条件来尽量达到相同的预处理效果。

固态生物脱毒的方法^[179]：将培养好的 *Amorphotheca resinae* ZN1 斜面接入预处理强度较低、硫酸用量为 2% (w/w) 的预处理后玉米秸秆，使用 20% (w/w) 碳酸氢钙溶液调节 pH 至 5.0-5.5，培养 5-7 天作为固体种子。将固体种子按照 10% 的接种量接入正常预处理后玉米秸秆，置于具盖储物箱内，静置脱毒 5-7 天。将脱毒后的玉米秸秆放入 4 °C 冰箱保存，备用。本章所使用的固态脱毒方式由于时间较长会损失大量的木糖，因此经过酶解以后得到的玉米秸秆水解液木糖含量较少。在以下的章节中，由于试验需要对脱毒方式进行了改进，缩短了脱毒时间，更多的木糖被保留。

水解液的制备^[212]：水解液的制备是在 5 L 螺带搅拌式生物反应器中进行，将预处理过的木质纤维素原料（或者脱毒后的木质纤维素原料）121 °C 灭菌 20 min 后加入螺带搅拌式生物反应器中，加入适量无菌水调节固体含量，同时用 5M NaOH 调节 pH 至 4.8 后加入纤维素酶，纤维素酶的用量为 15 FPU/g DM，水解条件为 50 °C，pH 4.8，48 h。得到的醪液经过 10000 rpm 离心 10 分钟除去不溶的固体，得到清澈的水解液。随后，水解液在 115 °C 灭菌 20 分钟，使用滤纸过滤除去残余的固体杂质，备用。

2.2.6 样品分析

样品定期从发酵醪中取出，13000 rpm 离心 5 min，在进行分析之前经过 0.22 μm 滤膜过滤。葡萄糖使用 SBA-40D 生化分析仪测定（山东省农科院，中国，济南）。葡萄糖酸使用 HPLC 测定（LC-20AD，示差检测器 RID-10A，岛津，日本，京都），色谱柱为 JJ50-4D 色谱柱（Shodex，日本，东京），柱温 40 °C，流动相为 12 mM 碳酸氢钠，流速 0.5 mL/min。乙酸、甲酸、乙酰丙酸、糠醛、糠醇、HMF 和羟甲基糠醇都是通过 HPLC 测定（LC-20AD，示差检测器 RID-10A，岛津，日本，京都），使用 Aminex HPX-87H 色谱柱（300 mm×7.8 mm）（Bio-rad，美国，Hercules），柱温 65 °C，流动相为 5 mM 硫酸，流速为 0.6 mL/min。酚类化合物（香草醛、香草酸、丁香醛、丁香酸、4-羟基苯甲醛、4-羟基苯甲酸和松柏醛）均使用 HPLC 测定（LC-20AT，UV/VIS 检测器 SPD-20A，岛津，日本京都），色谱柱为 YMC-Pack ODS-A（YMC，日本，东京），柱温 35 °C，检测波长为 270nm，流速为 1.0 mL/min，具体设定如下：初始的流动相由 0.1% 的甲酸（泵 A）和乙腈（泵 B）组成，比例为 9:1。在 0-4 min，乙腈的浓度从 0% 升高到 10%，随后 4-5 min 乙腈的浓度从 10% 升高到 35%，5-15 min 乙腈的浓度维持在 35%，15-21 min 已经浓度从 35% 降到 10%，最后 21-30 min 乙腈浓度保持在 10%^[306]。

2.2.7 葡萄糖氧化酶活性测定

葡萄糖氧化酶活性测定的方法参照 Barham 和 Trinder 提出的测定方法^[307]。葡萄糖在氧化过程中生成的过氧化氢可以与苯酚和 4-氨基安替比林耦合生成红色的醌亚胺类化合物，反应条件 37 °C，pH 7.0。测定酶活的反应体系共 5 mL：其中包含 50 mM β-D-葡萄糖 2 mL，25 mM 的 4-氨基安替比林 1 mL，25 mM 苯酚 1 mL，0.05 mg/mL 辣根过氧化物酶 0.5 mL，含有葡萄糖氧化酶的测试液 0.5 mL。按上述顺序添加完毕后剧烈晃动

30 秒。在 500 nm 波长下测定一分钟内吸光度的变化，以此来计算酶活。酶活定义：37 °C 条件下，每分钟每毫升反应体系产生 1 μmol 过氧化氢所需要的酶为 1 U。

$$\text{葡萄糖氧化酶 (U)} = \frac{(A_1 - A_0) \times k}{v \times t} \times n$$

这里 A_0 和 A_1 分别表示在 500 nm 下初始吸光度和反应结束时吸光度。 k 是通过 500 nm 吸光度与过氧化氢浓度的转换系数。 v 是指反应的体系的体积 (mL)。 t 是指反应的时间 (min)。 n 是指葡萄糖氧化酶液的稀释倍数。

2.2.8 葡萄糖酸得率的计算

葡萄糖酸基于葡萄糖的得率是指葡萄糖酸实际生成量与葡萄糖理论生成的葡萄糖酸量的比值的百分数。

$$\text{葡萄糖酸得率 (\%)} = \frac{[GA] - [GA]_0}{[Glu]_0 \times 1.089} \times \frac{V}{V_0} \times 100\%$$

在这里， $[GA]$ 和 $[GA]_0$ 分别表示发酵结束时和最初时的葡萄糖酸浓度 (g/L)； $[Glu]_0$ 表示初始葡萄糖的浓度 (g/L)；1.089 是葡萄糖到葡萄糖酸的化学计量转化系数，是葡萄糖酸与葡萄糖相对分子量的比值； V 和 V_0 分别表示发酵结束后和最初的发酵液的总体积。

2.3 结果与讨论

2.3.1 *A. niger* 发酵菌株的选择

A. niger 是一种常见的，工业上应用最普遍的葡萄糖酸生产菌。从上海工业微生物研究所科技有限公司 (SIIM) 购得两株 *A. niger*, *A. niger* SIIM M276 和 *A. niger* SIIM M290。对这两株 *A. niger* 的葡萄糖酸发酵性能进行比较，选出更适合于本研究的葡萄糖酸生产菌株。首先测试这两株 *A. niger* 在合成培养基中发酵生产葡萄糖酸的能力，试验在摇瓶中进行，装液量为 50/250 mL，温度 30 °C，转速 200 rpm，结果见图 2.1a。从图 2.1a 可以看出这两株 *A. niger* 在合成培养基中的葡萄糖酸发酵性能比较接近，都能够在 72 h 内将初始约 100 g/L 的葡萄糖完全消耗，转化成葡萄糖酸的得率均高于 90%。*A. niger* SIIM M276 在发酵末期的菌体量略高于 *A. niger* SIIM M290，但整体上来说两株 *A. niger* 均在合成培养基中均表现出比较优秀的葡萄糖酸生产能力。随后使用 15% 固体含量 (w/w, 原料干重占酶解体系总质量的百分数，下同) 的未经过脱毒的新鲜玉米秸秆水解液来作为发酵培养基，对这两株 *A. niger* 生产葡萄糖酸性能进行比较，试验在摇瓶中进行，装液量为 50/250 mL，温度 30 °C，转速 200 rpm，结果见图 2.1b。由于玉米秸秆水解液体系成分的复杂性，尤其是新鲜的玉米秸秆水解液中含有多种预处理过程中产生的可以抑制微生物生长和发酵的化合物，发酵结果与合成培养基中相比产生了比较大的差别。从图 2.1b 可以看出，*A. niger* SIIM M276 和 *A. niger* SIIM M290 在新鲜玉米秸秆水解液中无论是菌体生长速率和葡萄糖酸生产速率都受到了明显的抑制，与在合成培养基中相比，这两株 *A. niger* 的延滞期长达 72 h，葡萄糖酸在 96 h 以后才有明显的积累。

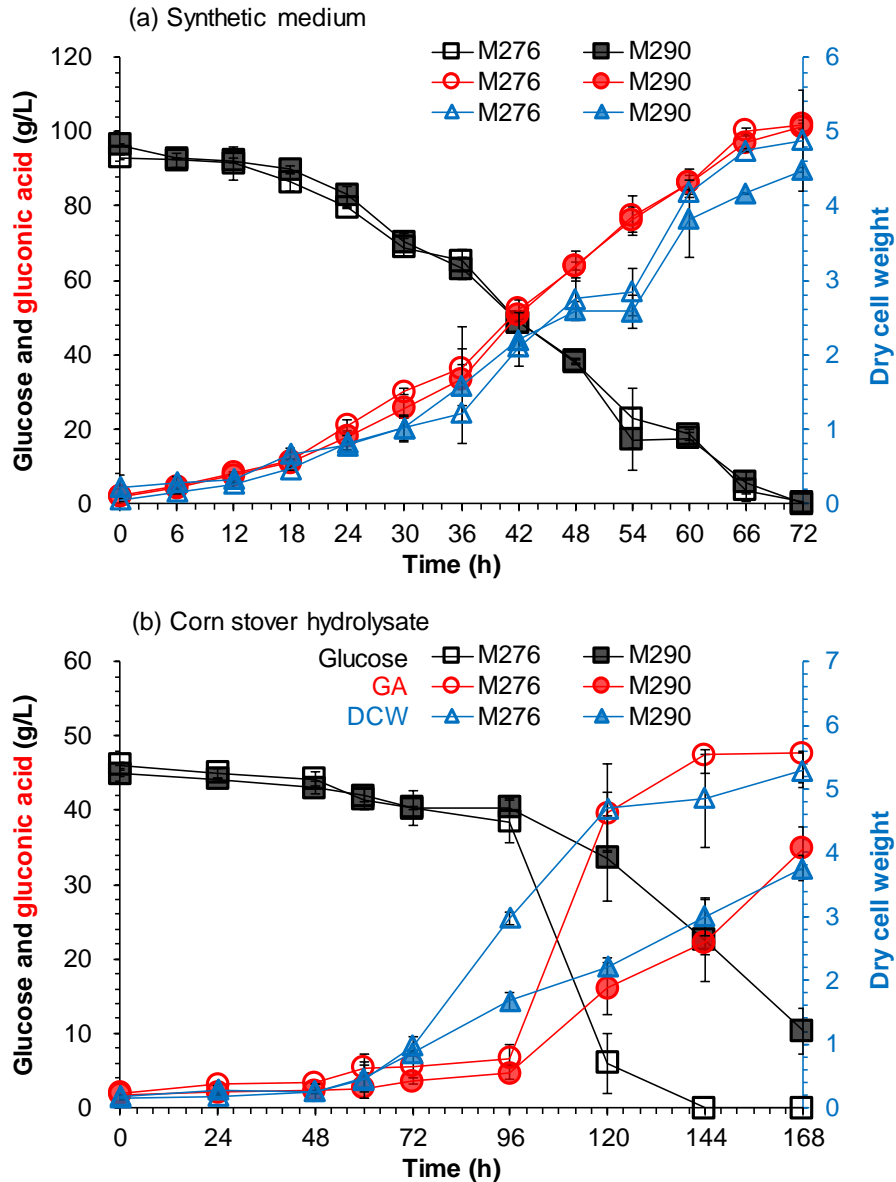


图 2.1 *A. niger* SIIM M276 和 M290 在合成培养基和玉米秸秆水解液中的葡萄糖酸发酵性能比较

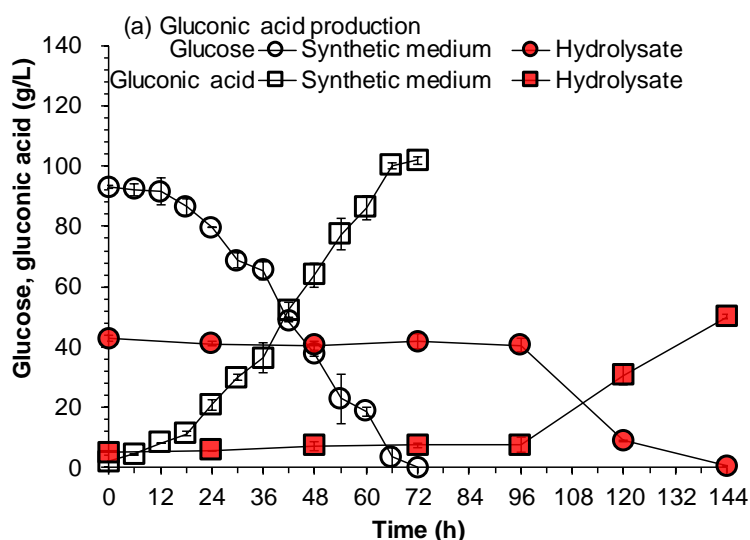
(a) 合成培养基；(b) 新鲜玉米秸秆水解液（固体含量 15%）。玉米秸秆水解液的成分为：44.49g/L 葡萄糖，21.84 g/L 木糖，3.24 g/L 乙酸，0.20 g/L5-羟甲基糠醛（HMF），0.37 g/L 糠醛，0.16 g/L 甲酸，0.21 g/L 乙酰丙酸，0.11 g/L 香草醛，0.06 g/L 丁香醛，0.02 g/L 4-羟基苯甲醛（HBA），0.01 g/L 松柏醛。发酵过程在 250 mL 摇瓶中进行，温度 30°C，pH 6.0，转速 200 rpm，装液量 20%，接种量 10%。

Fig. 2.1 Compare with gluconic acid fermentability of *A. niger* SIIM M276 and *A. niger* SIIM M290 in synthetic medium and corn stover hydrolysate.

(a) Synthetic medium; (b) 15% solids loading freshly pretreated corn stover hydrolysate. Corn stover hydrolysate contained 44.49g/L of glucose, 21.84 g/L of xylose, 3.24 g/L of acetic acid, 0.20 g/L of HMF, 0.37 g/L of furfural, 0.16 g/L formic acid, 0.21 g/L levulinic acid, 0.11 g/L vanillin, 0.06 g/L syringaldehyde, 0.02 g/L 4-hydroxybenzaldehyde (HBA), 0.01 g/L coniferaldehyde. The fermentation was carried out in 250 mL flasks at 30 °C, pH about 6.0, 200 rpm, liquid volume ratio 20%, inoculum size 10%.

相比而言, *A. niger* SIIM M276 各方面性能都表现出明显的优势, 其在 72 h 的延滞期以后菌体开始了快速的生长, 在 96 h 后葡萄糖酸快速积累, 144 h 将葡萄糖完全消耗, 葡萄糖酸浓度为 47.71 g/L, 转化率为 95.84%。而 *A. niger* SIIM M290 在 168 h 时仍有 10.35 g/L 葡萄糖剩余, 葡萄糖酸的浓度只有 34.82 g/L。 *A. niger* SIIM M276 对玉米秸秆水解液体系的适应性更强, 更适合用来在玉米秸秆水解液体系中生产葡萄糖酸。因此 *A. niger* SIIM M276 被选择用来进行后续利用木质纤维素原料生产葡萄糖酸的研究。

A. niger SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中最显著的差异就是出现一个明显的、较长的延滞期: 72 h 菌体才开始快速生长, 96 h 葡萄糖酸开始积累, 144 h 葡萄糖消耗殆尽; 与此同时在合成培养基中: 菌体在接入以后立刻开始生长, 72 h 葡萄糖消耗殆尽, 葡萄糖酸浓度达到最大值 (图 2.2)。与合成培养基相比, 在新鲜玉米秸秆水解液中抑制物的存在通常是造成菌体生长延滞以及发酵生产性能下降的主要因素。为了探究 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液发酵生产葡萄糖酸的过程中产生延滞期的原因, 在 144 h 的发酵过程中对三种稀酸预处理过程中产生的典型抑制物-糠醛、HMF 和乙酸的浓度变化进行了监测 (图 2.2c)。试验结果显示在这些抑制物中, 糠醛从菌种接入以后浓度就开始稳定的降低, 但是 HMF 和乙酸浓度的降低速率特别缓慢。只有当糠醛从 72 h 开始进入快速降解期时, HMF 才相应的开始快速降解。只有当糠醛在 96 h 达到完全降解的时候, 乙酸才开始进行显著的降解。值得一提的是, *A. niger* SIIM M276 在 48-72 h 范围内菌体量有了小幅度的提升, 随后糠醛在 72 h 就开始快速降解; 另一方面糠醛在 72 h 进入快速降解期以后 *A. niger* SIIM M276 才开始快速的生长, 直到糠醛在 96 h 完全消耗以后葡萄糖酸开始进行明显的积累。这些结果显示 *A. niger* SIIM M276 的生长与糠醛的浓度存在一定的关系, 当糠醛浓度降低到一定浓度以下时, 菌体才可以正常生长。除此之外, *A. niger* SIIM M276 与典型的生物脱毒真菌如 *Amorphocethca resiniae* ZN1^[179] 类似, 可以对抑制物进行转化或者说“脱毒”, 也正是由于 *A. niger* SIIM M276 的这个能力才使得其得以在富含抑制物的新鲜玉米秸秆水解液中生存, 并保持一定的葡萄糖酸生产性能, 从而实现了直接利用新鲜玉米秸秆水解液进行葡萄糖酸的生产。



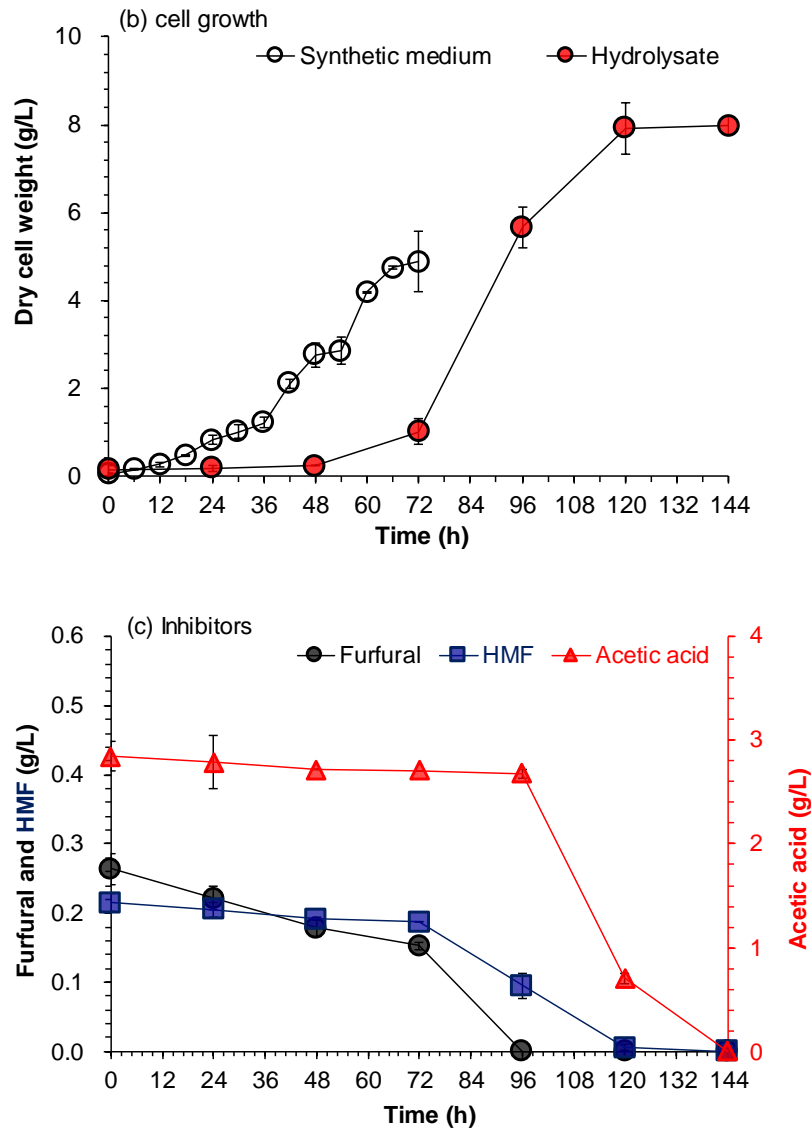


图 2.2 *A. niger* SIIM M276 在合成培养基与在玉米秸秆水解液中的葡萄糖酸发酵情况

(a) 葡萄糖酸生成; (b) 细胞生长; (c) 玉米秸秆水解液中的抑制物降解。玉米秸秆水解液的成分为: 44.49g/L 葡萄糖, 21.84 g/L 木糖, 3.24 g/L 乙酸, 0.20 g/L 5-羟甲基糠醛 (HMF), 0.37 g/L 糠醛, 0.16 g/L 甲酸, 0.21 g/L 乙酰丙酸, 0.11 g/L 香草醛, 0.06 g/L 丁香醛, 0.02 g/L 4-羟基苯甲醛 (HBA), 0.01 g/L 松柏醛。在发酵过程中对三种主要的抑制物 (糠醛, HMF 和乙酸) 进行监测。发酵过程在 250 mL 摇瓶中进行, 温度 30°C, pH 6.0, 转速 200 rpm, 装液量 20%, 接种量 10%。

Fig. 2.2 Gluconic acid fermentation of *A. niger* SIIM M276 in synthetic medium and corn stover hydrolysate.

(a) Gluconic acid formation; (b) Cell growth; (c) Inhibitors degradation in corn stover hydrolysate. Corn stover hydrolysate contained 44.49g/L of glucose, 21.84 g/L of xylose, 3.24 g/L of acetic acid, 0.20 g/L of HMF, 0.37 g/L of furfural, 0.16 g/L formic acid, 0.21 g/L levulinic acid, 0.11 g/L vanillin, 0.06 g/L syringaldehyde, 0.02 g/L 4-hydroxybenzaldehyde (HBA), 0.01 g/L coniferaldehyde. The three major inhibitors including furfural, HMF and acetic acid were monitored during the fermentation period. The fermentation was carried out in 250 mL flasks at 30 °C, pH about 6.0, 200 rpm, liquid volume ratio 20%, inoculum size 10%.

总体来说, *A. niger* SIIM M276 展现了较好的对新鲜玉米秸秆水解液的适应性和葡萄糖酸生产性能, 尽管在发酵过程中生长受到一定的抑制并产生了一个较长的延滞期, 但是菌体对抑制物的耐受性和葡萄糖酸的得率都比较令人满意, 最终的菌体浓度比在合成培养基中高出了 60%, 在发酵结束时葡萄糖酸的得率达到了 94.17%。

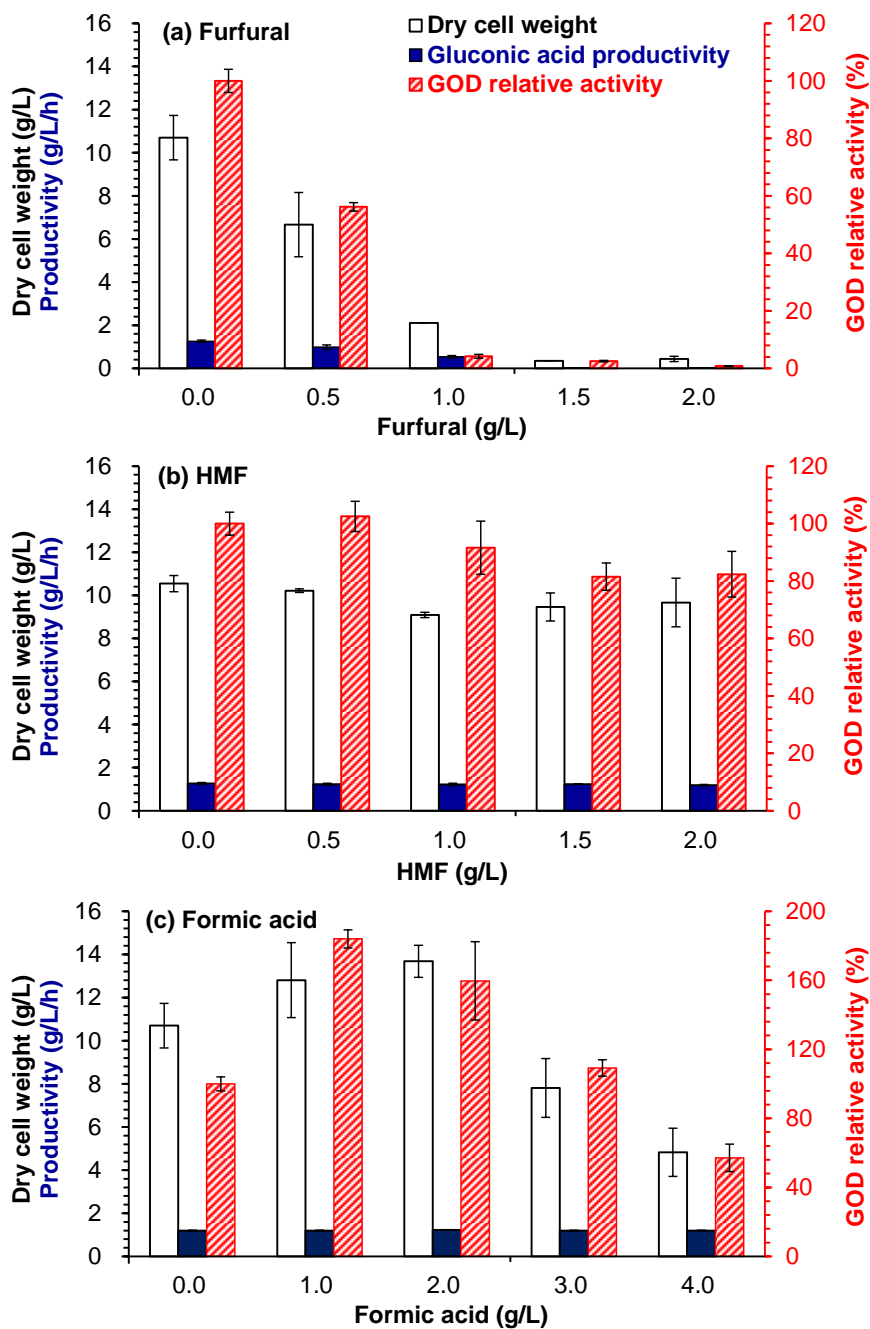
2.3.2 *A. niger* SIIM M276 对木质纤维素来源抑制物的耐受性

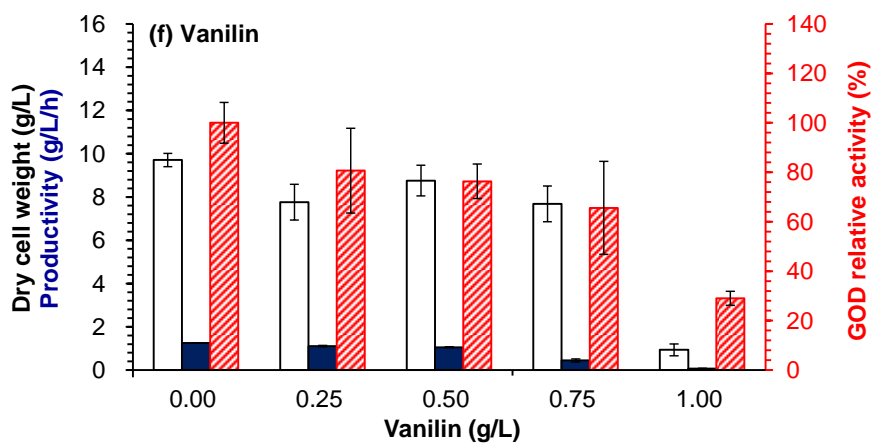
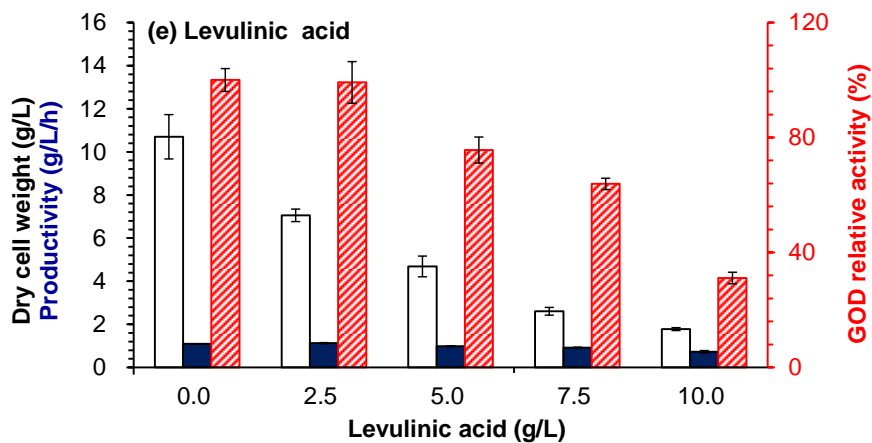
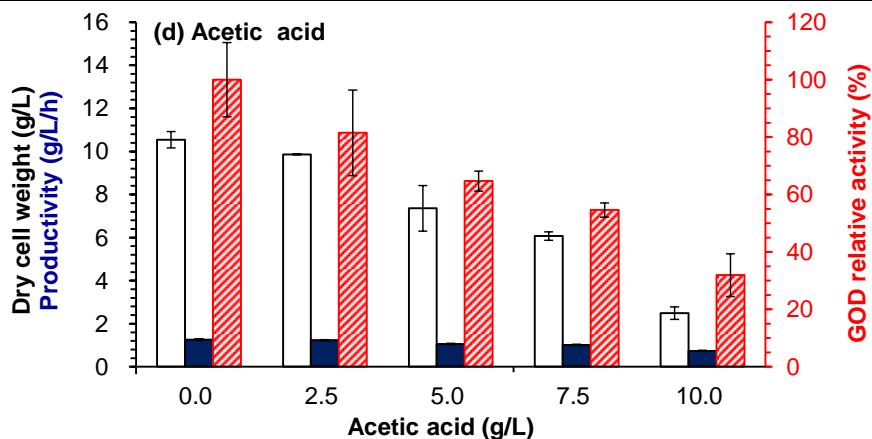
新鲜玉米秸秆水解液中抑制物的存在对 *A. niger* SIIM M276 的葡萄糖酸生产造成了很大的影响, 同时 *A. niger* SIIM M276 在这些抑制物存在的情况下仍然可以缓慢生长并最终将其中一部分抑制物转化, 表现出良好的抑制物耐受性和生物转化性能, 这种能力对木质纤维素生物炼制具有一定的启示, 但抑制物对 *A. niger* SIIM M276 的具体影响并不明确, 因此对 *A. niger* SIIM M276 的菌体生长、葡萄糖酸浓度以及葡萄糖氧化酶活性在单一抑制物胁迫下的影响进行了详细的研究。稀酸预处理过程中产生的抑制物主要被分为三大类^[6]: 呋喃类、弱酸类和酚类。呋喃类及其衍生物主要是预处理过程中产生的糖类物质进一步降解的产物, 在稀酸预处理后的木质纤维素水解液中主要出现的呋喃类衍生物包括糠醛和 5-羟甲基糠醛 (HMF) 等。呋喃类化合物毒性主要是由于其自身的疏水性造成的, 较高的疏水性会破坏细胞膜的完整性, 从而导致细胞生长和发酵性能的下降。有机弱酸类抑制物主要包括: 乙酸、甲酸和乙酰丙酸等。这类抑制物主要是在木质纤维素原料经过预处理过程和后续的糖化过程中产生的。未解离的弱酸分子透过细胞膜进入细胞以后在细胞质中解离, 释放的氢离子会导致细胞内 pH 的降低, 从而造成细胞生长代谢受到抑制。酚类化合物种类很多, 形成于酸解或者木质纤维素预处理过程中, 根据其官能团的不同主要分为三类^[149]: 分别是对羟基苯基类 (H)、丁香基类 (S) 和愈创木酚基类 (G)。酚类化合物会破坏细胞膜的结构, 使细胞质中的功能蛋白变性失活, 造成 DNA 突变引发细胞程序性凋亡。

本研究中从以上三类抑制物中选择其中 9 种典型的抑制物作为研究目标, 包括 2 种呋喃类衍生物: 糠醛和 HMF; 3 种弱酸类化合物乙酸、甲酸和乙酰丙酸; 4 种酚类化合物: 对羟基苯基类 (H) 的 4-羟基苯甲醛和松柏醛, 丁香基类 (S) 的丁香醛, 愈创木酚基类 (G) 的香草醛。*A. niger* SIIM M276 在单一抑制物胁迫下的试验结果见图 2.3。

对呋喃类抑制物 (糠醛、HMF) 来说, 之前的研究表明 *A. niger* SIIM M276 利用新鲜玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸的过程中, 糠醛表现出明显的抑制作用, 并且糠醛是稀酸预处理过程中产生的一种浓度较高的抑制物, 因此作为首先被考察的抑制物。随着预处理强度和固体含量的变化, 制得的新鲜玉米秸秆水解液中糠醛的浓度一般在 0.3-2.0 g/L, 本试验中在合成培养基中分别添加 0-2.0 g/L 的糠醛, 对在不同糠醛浓度胁迫下 *A. niger* SIIM M276 的生物量、葡萄糖酸产率、葡萄糖氧化酶 (GOD) 活性进行监测。试验结果表明, 糠醛在 *A. niger* SIIM M276 的葡萄糖酸发酵中表现出很强的抑制作用 (图 2.3a), 菌体的生长和葡萄糖氧化酶的活性在糠醛浓度只有 0.5 g/L 时就减少了一半; 当糠醛的浓度高于 1.0 g/L 时, *A. niger* SIIM M276 的代谢活动几乎完全停止, 菌体量几乎没有增加, 说明在此浓度下糠醛已经对 *A. niger* SIIM M276 造成了严重的损伤, 不利于

后续使用更高固体含量新鲜玉米秸秆水解液进行葡萄糖酸的生产。另一种呋喃类衍生物 HMF 也在新鲜玉米秸秆水解液中具有较高的浓度，设置的 HMF 浓度范围从 0-2.0 g/L。试验结果表明，HMF 对 *A. niger* SIIM M276 的抑制作用比较弱，明显弱于糠醛(图 2.3b)。HMF 在浓度 0.5-2.0 g/L 时，只会对 M276 生长有轻微的影响，对葡萄糖酸的产率和 GOD 活性影响不明显。在玉米秸秆水解液中，HMF 的浓度一般不会超过 2.0 g/L，而 *A. niger* SIIM M276 在 2.0 g/L HMF 时受到的抑制作用并不显著，葡萄糖酸生产速率降低到 1.18 g/L/h（空白对照组生产速率为 1.51 g/L/h），葡萄糖酸的得率仍高达 95.98%。与糠醛相比，HMF 对 *A. niger* SIIM M276 抑制作用较弱。HMF 虽然单独存在时抑制作用比较有限，但是 HMF 还可以与其他的抑制物产生协同抑制作用从而导致抑制物强度增加。





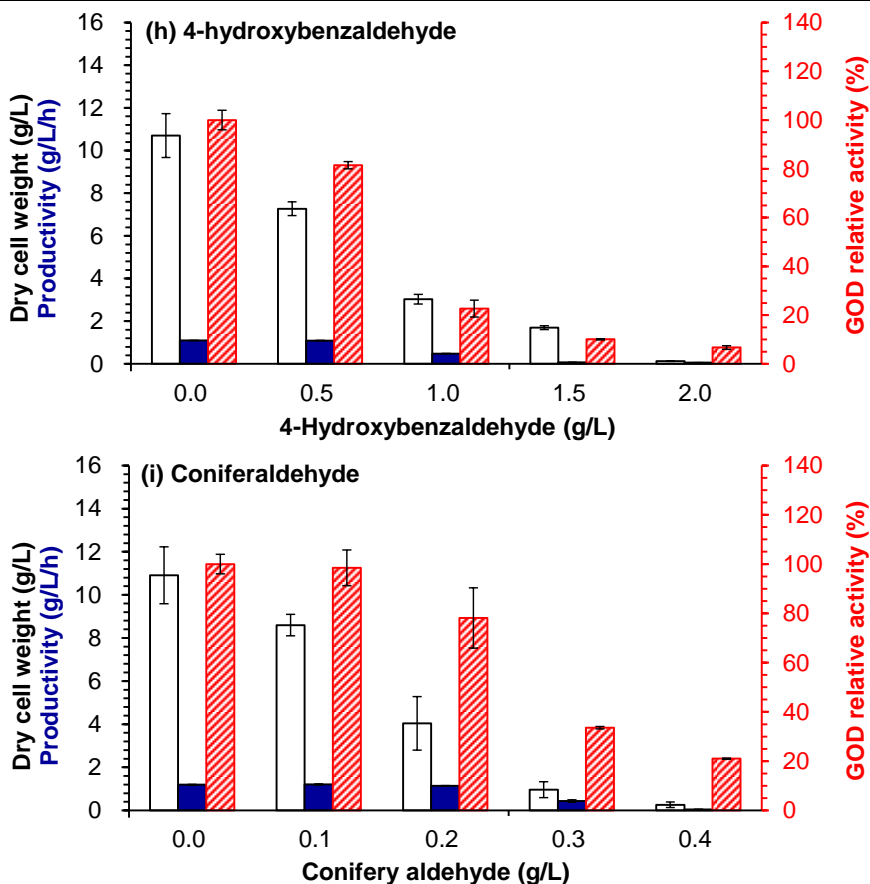


图 2.3 抑制物对 *A. niger* SIIM M276 的生长、葡萄糖酸产率和葡萄糖氧化酶活性的影响 (72 h)

(a) 糠醛; (b) HMF; (c) 甲酸; (d) 乙酸; (e) 乙酰丙酸; (f) 香草醛; (g) 丁香醛; (h) 4-羟苯甲醛; (i) 松柏醛。在 250 mL 摇瓶中进行, 发酵条件: 温度 30°C, pH 6.0, 装液量 20%, 接种量 10%, 发酵时间 72 小时。

Fig. 2.3 Inhibitor tolerance on cell growth, gluconic acid productivity and gluconic oxidase activity of *Aspergillus niger* SIIM M276 (72 h)

(a) Furfural; (b) HMF; (c) Formic acid; (d) Acetic acid; (e) Levulinic acid; (f) Vanillin; (g) Syringaldehyde; (h) 4-Hydroxybenzaldehyde; (i) Coniferyl aldehyde. Conditions: 30 °C, pH 6.0, liquid volume ratio 20%, inoculate size 10% for 72 hours.

对弱酸类抑制物来讲, 甲酸、乙酸和乙酰丙酸在稀酸预处理过程中的产生量都比较高, 在新鲜玉米秸秆水解液中浓度也比较高, 浓度普遍要高于酚类化合物, 因此设置的浓度梯度较高。试验结果表明, 这三种典型的弱酸整体对 *A. niger* SIIM M276 各方面抑制作用都比较有限。甲酸作为一种分子量更小的弱酸类化合物, 依据现有的抑制机理其抑制作用应该强于乙酸和乙酰丙酸。试验结果表明甲酸在较低浓度范围 (1.0-2.0 g/L) 时表现出促进发酵性能的趋势 (图 2.3c)。低浓度甲酸对 *A. niger* SIIM M276 的生长也有促进作用。这可能是由于低浓度的甲酸可以对 *A. niger* SIIM M276 的细胞膜产生轻微的破坏从而提高其通透性, 使得外界影响物质可以快速进入细胞内加快菌体生长, 同时产生的葡萄糖酸可以快速分泌到培养基中。通过对培养基中 GOD 酶活的测定结果也证实了在甲酸浓度为 0-2.0 g/L 的范围内, 随着甲酸浓度的提高进入到培养基中的 GOD 含量更高, 从而造成 GOD 的活性明显提高, 细胞的通透性得到了提升, 此时甲酸发挥了部分

诱导剂的作用。但是随着甲酸的浓度进一步提高, 又开始表现出了一定的抑制作用, 但是抑制作用并不明显, 甲酸浓度即使达到 4g/L, 对产酸性能也只有微弱的影响。经过稀酸预处理后玉米秸秆水解液中乙酸浓度较高, 在选择的这 9 种抑制物中浓度最高。为了更好的研究 *A. niger* SIIM M276 对乙酸的耐受程度选取的乙酸的浓度为 0-10 g/L。图 2.3d 可以看出, 低浓度乙酸的存在对 *A. niger* SIIM M276 产酸速率影响微弱, 在乙酸浓度为 5.0 g/L 时, 生产速率依旧有 0.99 g/L/h (对照组生产速率为 1.14 g/L/h)。随着乙酸浓度的升高, 抑制作用越来越强, 乙酸浓度达到 10 g/L 时抑制作用尤为明显, 此时的生产速率只有 0.70 g/L/h, 只有对照组的 61.4%。但是实际稀酸预处理玉米秸秆水解液中一般情况下乙酸不会达到如此高的浓度, 在本研究中测定 15-30% 固体含量新鲜玉米秸秆水解液中一般乙酸浓度在 2-10 g/L, 因此随着玉米秸秆水解液中乙酸浓度的升高, 也可以对 *A. niger* SIIM M276 造成严重的影响。乙酰丙酸对 *A. niger* SIIM M276 的抑制情况与乙酸相似, 当乙酰丙酸浓度为 2.5g/L 时, 对 M276 发酵生产葡萄糖酸的抑制很弱, 几乎与对照组相同。随着乙酰丙酸浓度的提高, 抑制作用越来越明显, 当乙酰丙酸浓度达到 10g/L 时, 葡萄糖的消耗速率明显减缓, 72 h 时仍有葡萄糖剩余, 葡萄糖酸生产速率降低到 0.78g/L/h, 明显低于对照组的 1.18 g/L/h。但是在利用新鲜玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸时, 甲酸和乙酰丙酸的浓度一般都低于产生明显抑制的浓度, 所以在后续的研究中弱酸类抑制物主要考虑乙酸的影响。

对酚类抑制物来说, 其单位浓度毒性是这三类抑制物中最强的, 即使浓度低时也会有较强的抑制效果。选择的 4 种酚类化合物中, 松柏醛对 *A. niger* SIIM M276 的发酵性能表现出了最强的抑制作用, 在浓度只有 0.4 g/L 时其生长代谢几乎完全停止(图 2.3i), 随后的抑制强度从强到弱依次是香草醛、4-羟基苯甲醛和丁香醛(图 2.3f-h)。由于酚类抑制物的毒性比较强, 选取的香草醛的浓度范围为 0-1.0 g/L。从图 2.4f 看出, 随着培养基中香草醛浓度的增加, 葡萄糖酸的生产速率逐渐降低, 当香草醛浓度达到 1.0 g/L 时, 几乎没有葡萄糖酸的产生。高浓度香草醛严重抑制了 *A. niger* SIIM M276 的生长, GOD 酶活也大幅度降低, 从而影响葡萄糖酸生成。丁香醛同样具有较强的抑制作用, 但整体比香草醛的抑制强度要弱, 设定的浓度范围为 0-2.0 g/L。从图 2.4h 看出, 丁香醛对 *A. niger* SIIM M276 葡萄糖酸生产性能的抑制作用随着丁香醛浓度的增加而变得更强, 菌体浓度的下降也比较有规律, 当丁香醛浓度达到 2.0 g/L 时, 菌体生长被严重抑制, 几乎没有葡萄糖酸的生成。4-羟基苯甲醛浓度范围 0-2.0 g/L, 在同等浓度条件下, 抑制效果要强于丁香醛, 当 4-羟基苯甲醛的浓度达到 1.5 g/L 时, 就几乎没有葡萄糖酸的产生, 浓度达到 2.0 g/L 时, 菌体浓度几乎没有任何增长。由于酚类化合物主要来自于木质素, 在稀酸预处理后的玉米秸秆水解液中含量并不高, 经过测定, 15%-25% 固体含量的新鲜玉米秸秆水解液中香草醛的浓度在 0-0.2 g/L, 丁香醛浓度 0-0.5 g/L, 4-羟基苯甲醛浓度在 0-0.2 g/L, 松柏醛浓度在 0-0.1 g/L, 在这个浓度范围制度, 单一的酚类抑制物对 *A. niger* SIIM M276 的影响非常有限。就酚类化合物而言, *A. niger* SIIM M276 的耐受浓度要远高于玉米秸秆水解液中酚类化合物的浓度, 后续的研究中没有进行监测。

综上所述, *A. niger* SIIM M276 对 9 种单一抑制物的耐受性试验结果表明 *A. niger* SIIM M276 对这些玉米秸秆水解液中的典型抑制物具有较强的耐受性, 同等浓度下对弱酸类化合物耐受性最强, 其次是呋喃类抑制物, 对酚类抑制物耐受最弱。考虑到新鲜玉米秸秆水解液中抑制物实际浓度, 结合耐受性试验结果, 推测 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中出现延滞期主要是受到呋喃类抑制物尤其是糠醛的影响。

A. niger SIIM M276 之所以能够耐受这些抑制物, 一方面可能是由于自身保护机制可以阻碍这些抑制物进入细胞内部, 或者将进入的抑制物快速排出体外, 从而提高自身的耐受性。另一个主要原因是其具有可以将这些毒性较强的化合物转化为对菌体生长和葡萄糖酸发酵性能毒性较弱的化合物的能力, 如将高毒性的醛类转化成对应的低毒性的醇类或者酸类 (图 2.4)。 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中发酵生产葡萄糖酸的过程中糠醛、HMF 以及乙酸浓度的大幅度降低也证明了 *A. niger* SIIM M276 确实具有转化部分抑制物的能力。图 2.4 考察了 *A. niger* SIIM M276 对这 9 种抑制物的转化情况, 发现 *A. niger* SIIM M276 可以对大多数的抑制物有转化能力。

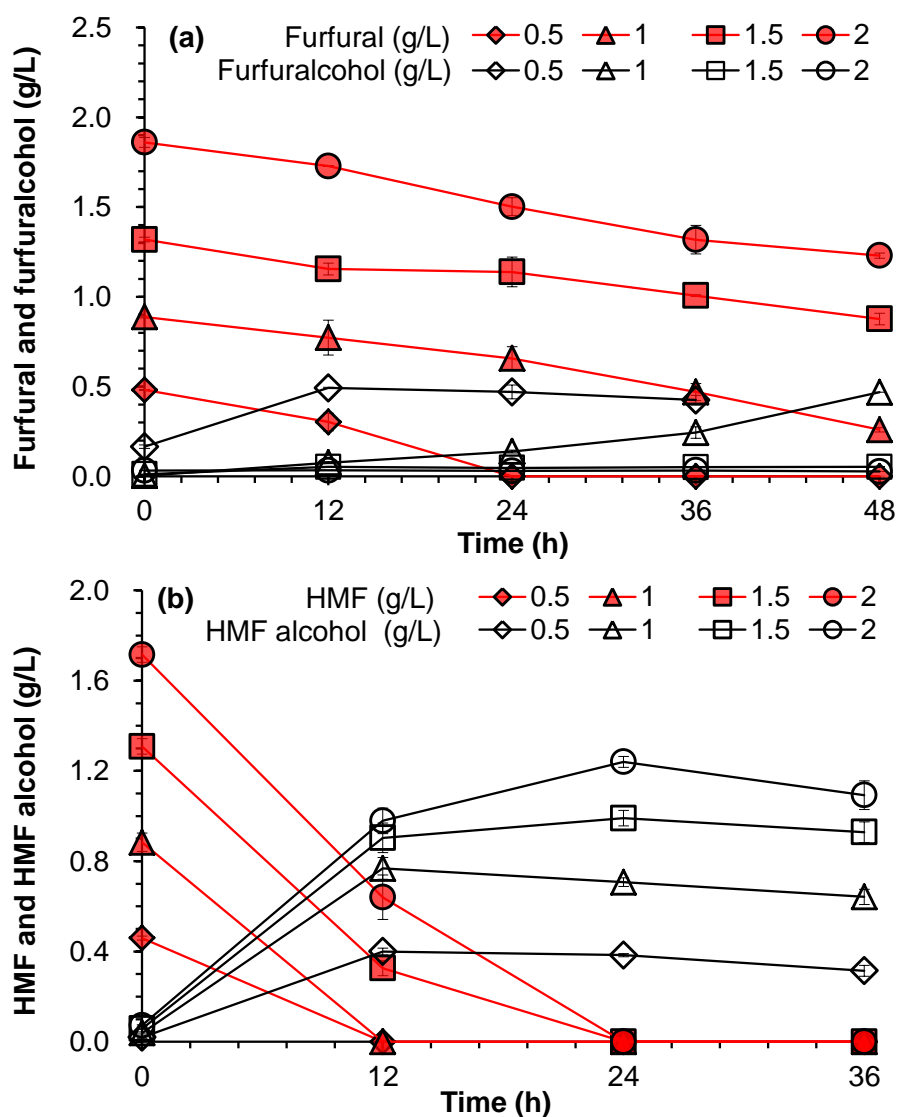
对于呋喃类衍生物, 糠醛是影响 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中生长和生产葡萄糖酸最主要的抑制物之一, 在一定浓度范围内可以被转化。在糠醛单一胁迫下, 当糠醛浓度低于 1.0 g/L 时, *A. niger* SIIM M276 可以在 48 h 内将全部的糠醛转化为毒性较弱的糠醇。随着糠醛浓度的升高, *A. niger* SIIM M276 转化糠醛的能力受到明显的抑制 (图 2.4a), 高浓度的糠醛对菌体产生了不可修复的损伤, 使其完全丧失了生长的能力, 没有发生糠醛的转化。然而, 对于 HMF 来说, 其抑制作用要远弱于糠醛。图 2.4b 也表明了 *A. niger* SIIM M276 对 HMF 的转化能力更强, 可以快速转化较高浓度的 HMF 生成 HMF 醇。即使 HMF 浓度达到 2.0 g/L 时, 依然可以在 24 h 以内将 HMF 转化成 HMF 醇, 这也正是 *A. niger* SIIM M276 能够耐受高浓度 HMF 的主要原因。

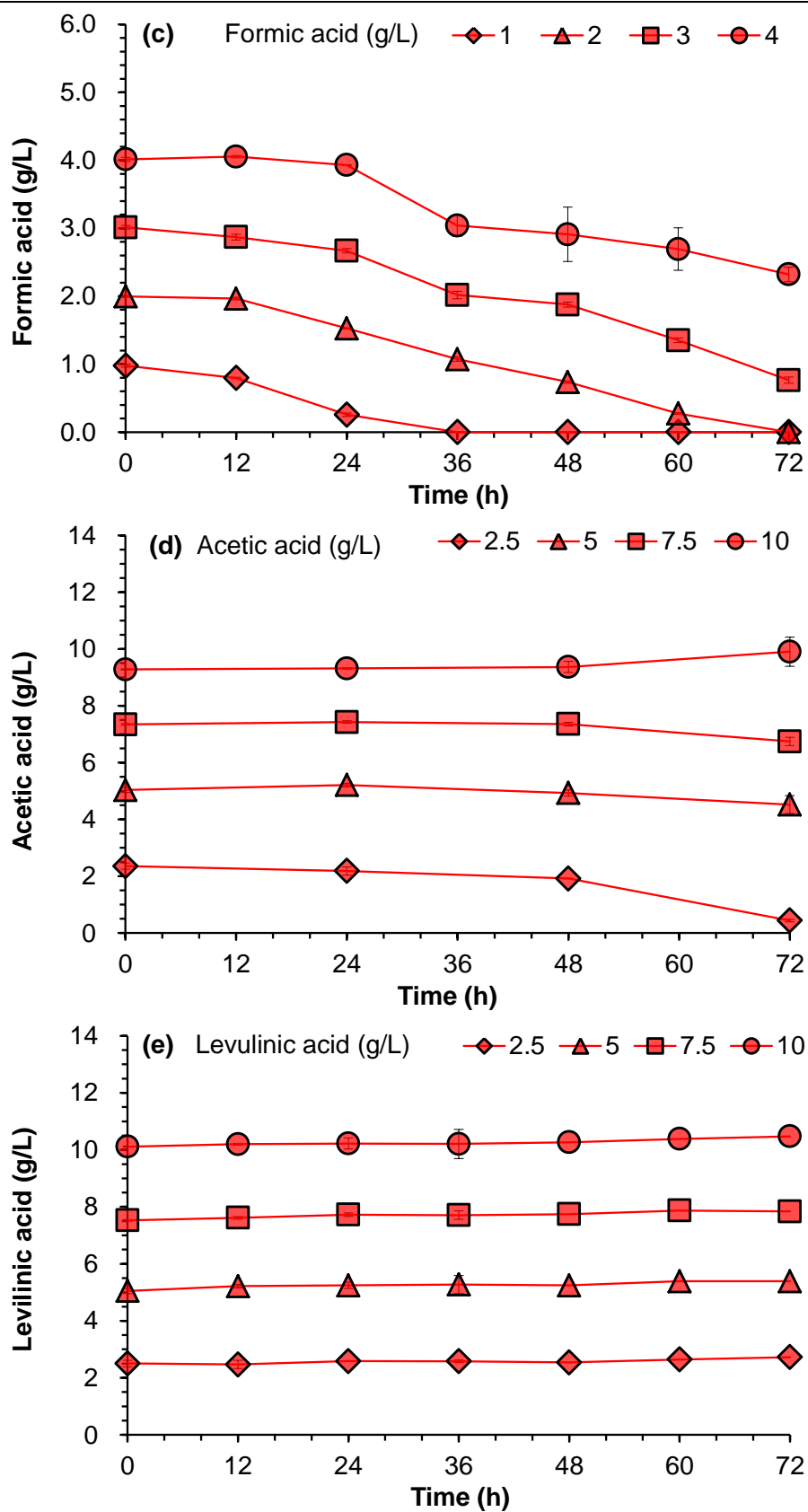
对于三种弱酸类抑制物, *A. niger* SIIM M276 对甲酸有比较明显的降解, 72 h 可以完全将 2.0 g/L 的甲酸降解, 即使是 4.0 g/L 高浓度的甲酸也能被缓慢降解。但是对乙酸而言, *A. niger* SIIM M276 只在乙酸浓度较低 (2.5 g/L) 时表现出较强的转化能力, 当浓度高于 2.5 g/L 时在 72 h 内几乎不能转化。同样的, *A. niger* SIIM M276 对于乙酸丙酸的转化能力也比较弱, 即使在乙酸丙酸浓度只有 2.5 g/L 时也几乎看不到乙酸丙酸的减少 (图 2.4c-e)。虽然 *A. niger* SIIM M276 转化乙酸和乙酰丙酸的能力很弱, 但是依然表现了比较强的耐受性, 比如在 5.0 g/L 的乙酸或者乙酰丙酸的胁迫下依然保持比较高的生物量和葡萄糖酸产率。可能是由于 *A. niger* SIIM M276 对进入细胞膜的弱酸具有较强的转移 H^+ 的能力, 或者可以阻止这些弱酸类物质进入细胞质。

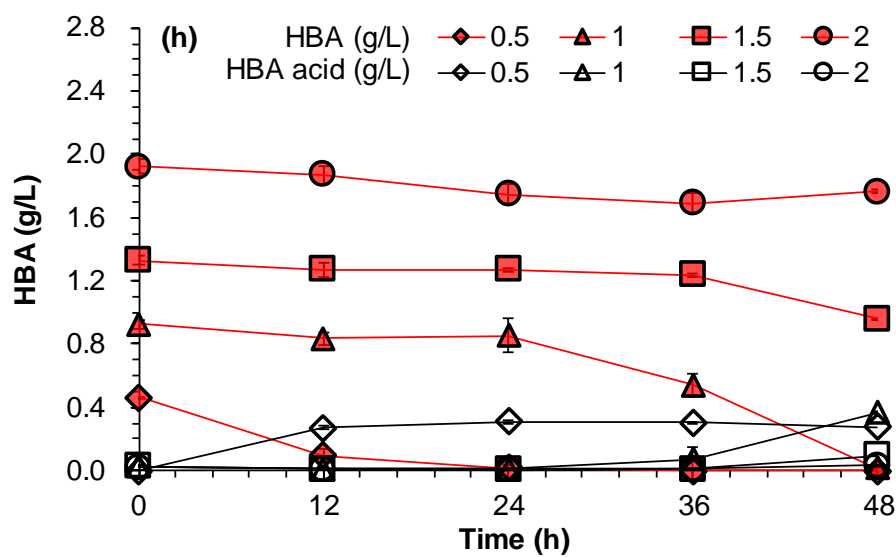
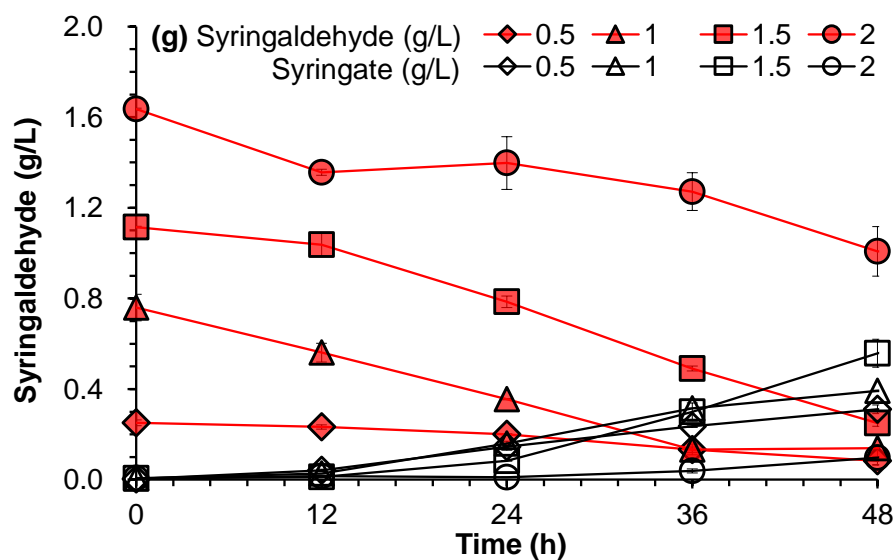
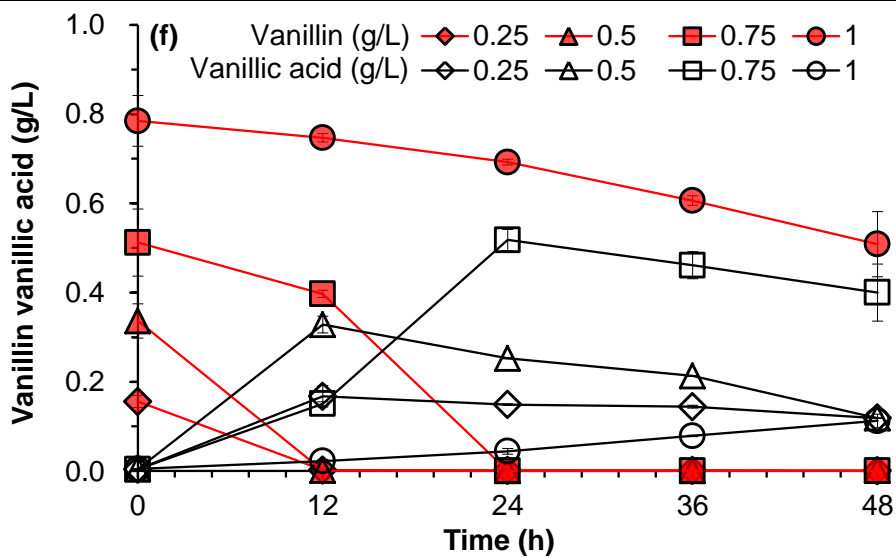
对酚类抑制物来说, *A. niger* SIIM M276 对这 4 种酚类化合物都具有一定的转化能力, 主要将这些酚醛类化合物转化成相应的酸。在较低浓度酚类抑制物的胁迫时, *A. niger* SIIM M276 可以将香草醛转化成香草酸, 将丁香醛转化成丁香酸, 将 4-羟基苯甲醛转化成 4-羟基苯甲酸, 将松柏醛转化成香草醛 (图 2.4f-i)。与酚类化合物胁迫下 *A. niger* SIIM M276 耐受性试验相一致的是, 只要酚类抑制物的浓度不足以将 *A. niger* SIIM M276 直

接致死，它就可以转化这些酚类抑制物，并产生一定的葡萄糖酸。4 种酚类抑制物中，*A. niger* SIIM M276 对丁香醛的转化能力最强，即使丁香醛浓度达到 2.0 g/L 时，依然可以被转化生成少量的丁香酸；对 4-羟基苯甲醛的转化能力略弱于丁香醛，可以将 1.0 g/L 的 4-羟基苯甲醛较快的转化生成少量的 4-羟基苯甲酸；对香草醛的转化能力比较有限，在香草醛浓度达到 1.0 g/L 时，其转化速率已经有明显降低；对松柏醛的转化能力最弱，当松柏醛浓度达到 0.3 g/L 时已经严重抑制了菌体的生长，所以松柏醛也基本没有被转化（图 2.4f-i）。从图 2.4i 看出，4 种酚类抑制物中之所以松柏醛的抑制作用最强，是由于松柏醛的转化产物为香草醛，依然具有很高的抑制效果。

综上所述，抑制物转化的试验结果表明 *A. niger* SIIM M276 能够在含有抑制物的新鲜玉米秸秆水解液中存活是依靠其对多种抑制物较强的耐受性，以及一定的生物转化能力，可以转化这些醛类抑制物如糠醛、HMF 生成低毒性的相应的醇，还可以将酚醛类抑制物转化成低毒性的酸，从而缓解了这些抑制物对 *A. niger* SIIM M276 生长和葡萄糖酸发酵性能的胁迫压力。*A. niger* SIIM M276 良好的抑制物耐受性和抑制物转化能力的结合对其在玉米秸秆水解液中保持葡萄糖酸发酵性能发挥着关键的作用。







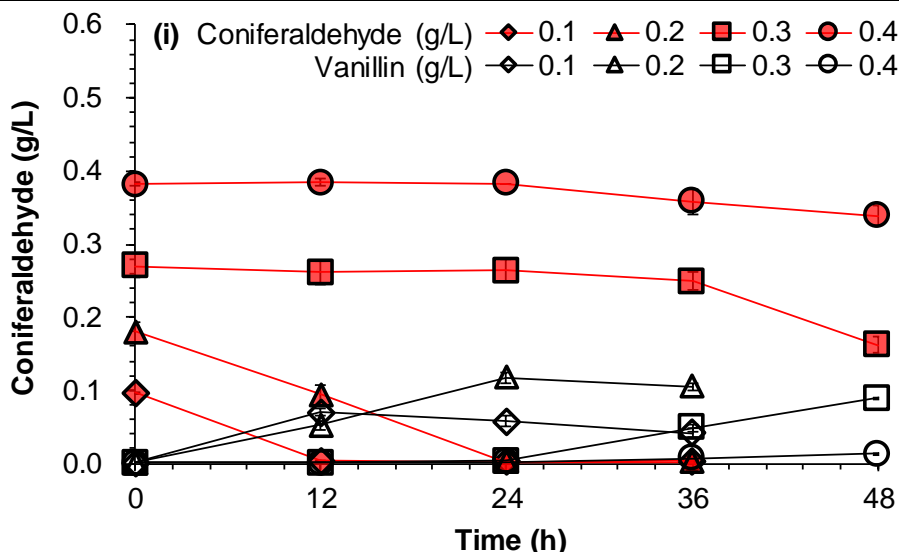


图 2.4 *A. niger* SIIM M276 对抑制物的转化

(a) 糠醛; (b) HMF; (c) 甲酸; (d) 乙酸; (e) 乙酰丙酸; (f) 香草醛; (g) 丁香醛; (h) 4-羟基苯甲醛; (i) 松柏醛。在 250 mL 摇瓶中进行, 发酵条件: 温度 30°C, pH 6.0, 装液量 20%, 接种量 10%。

Fig. 2.4 Conversion of inhibitors by *A. niger* SIIM M276

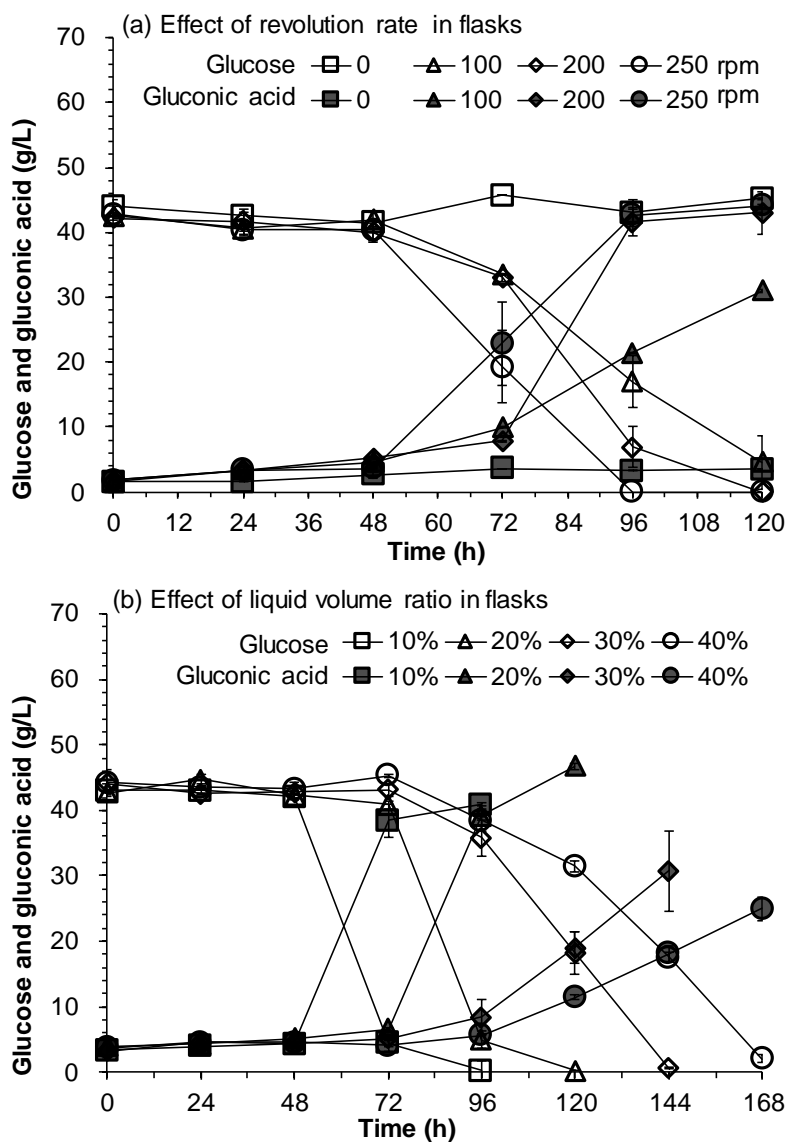
(a) Furfural; (b) HMF; (c) Formic acid; (d) Acetic acid; (e) Levulinic acid; (f) Vanillin; (g) Syringaldehyde; (h) 4-hydroxybenzaldehyde (HBA); (i) Coniferaldehyde. In 250 mL flasks, Conditions: 30 °C, 200 rpm, pH 6.0, liquid volume ratio 20%, inoculate size 10%.

2.3.3 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中摇瓶发酵条件优化

尽管 *A. niger* SIIM M276 可以直接在低固体含量的新鲜玉米秸秆水解液中生长并生产葡萄糖酸, 但是葡萄糖酸生产速率比较慢, 并表现出一个明显的、较长的延滞期, 结果不能令人满意。造成这种现象的原因一方面是由于水解液中的抑制物的影响, 还有可能是因为发酵条件的限制, 接下来对 *A. niger* SIIM M276 利用新鲜玉米秸秆水解液发酵生产葡萄糖酸的过程中的发酵条件进行优化。*A. niger* 是一种专性好氧的丝状真菌, 尤其是在生产葡萄糖酸的过程中, 氧气作为反应的最终电子受体, 因此发酵液中氧气的浓度即溶氧是影响反应速率的一个重要指标。在摇瓶发酵中, 影响发酵液中溶氧的因素主要有摇床转速和装液量。除此之外, 温度会影响 *A. niger* 体内酶的活性, 如葡萄糖酸生产的关键酶 GOD 的活性, 也是影响 *A. niger* 发酵生产葡萄糖酸性能的重要因素。因此, 分别对摇床转速、装液量和温度这三个因素进行优化, 结果见图 2.5。

摇床转速设置的范围从 0-250 rpm, 温度 30 °C, 装液量 50/250 ml, 使用 15% 固体含量的新鲜玉米秸秆水解液作为培养基, 不添加任何营养物质, *A. niger* SIIM M276 发酵生产葡萄糖酸结果见图 2.5a。转速为 0 时, 即静置培养时, 葡萄糖酸的发酵几乎无法进行, 葡萄糖没有被消耗, 也没有葡萄糖酸的产生。随着转速的提高, 葡萄糖的消耗速率和葡萄糖酸的生产速率都得到明显的提高, 当转速达到 250 rpm 时葡萄糖酸生产速率达到最大, 不过在 96 h 时葡萄糖酸的浓度与 200 rpm 相差无几。装液量的设置范围从 10-40%, 在试验中使用的摇瓶规格为 250 mL, 即发酵体系的体积范围从 25-100 mL, 结

果见图 2.5b。装液量的不同对葡萄糖酸的发酵性能影响相当明显，随着装液量的增加，葡萄糖糖酸的生产速率以一个稳定、显著的趋势降低，当装液量为 100 mL 时，葡萄糖经过 168 h 才消耗完，而且葡萄糖酸的得率不足 60%，经过观察在此装液量条件下，菌体的浓度要远高于低装液量的试验组，通过比较菌体干重发现，100 mL 装液量时 *A. niger* SIIM M276 的菌体干重是 25 mL 时的 4.8 倍。这可能是由于当装液量变大时，发酵液中的溶氧降低，在低溶氧条件下，葡萄糖酸生产速率会受到抑制，大量的糖类不能及时的被转化成葡萄糖酸，因此进入代谢循环用于菌体自身的生长从而导致最终的葡萄糖酸的得率降低。值得注意的是，装液量为 25 mL 时，*A. niger* SIIM M276 的发酵性能有了一个大幅度的提升，在 48 h 菌体开始快速生长，96 h 葡萄糖完全消耗，葡萄糖酸浓度达到 40.86 g/L，基于葡萄糖的得率达到 92.01%。通过降低装液量使得 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中延滞期大幅度降低，从原有的 72-96 h 降低到只有 48 h，同时也反映了改变与溶氧水平相关的发酵条件确实对其发酵性能有比较显著的影响。



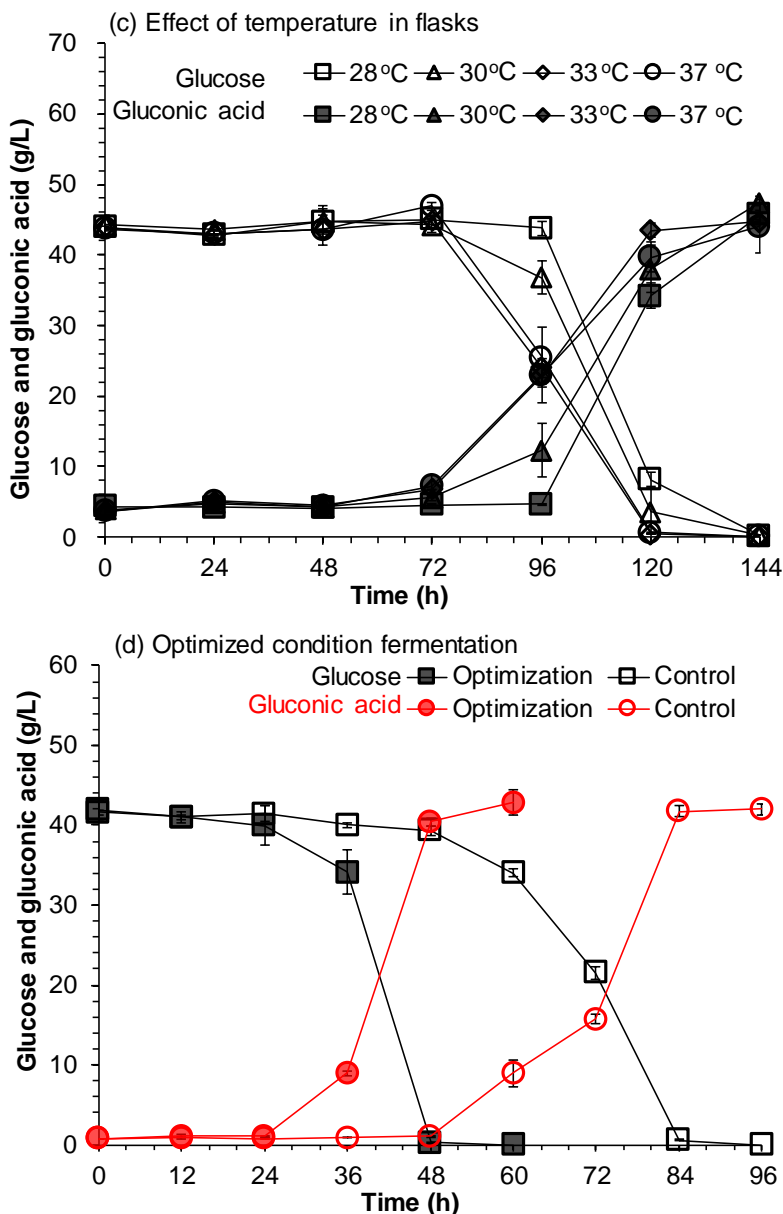


图 2.5 发酵条件对 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中生产葡萄糖酸的影响

(a) 转速; (b) 装液量; (c) 温度; (d) 优化后条件发酵对比。

Fig. 2.5 The effect of fermentation conditions on gluconic acid production in freshly pretreated corn stover hydrolysate by *A. niger* SIIM M276.

(a) Revolution rate; (b) Liquid volume; (c) Temperature; (d) Optimized condition fermentation.

温度是影响微生物生长以及酶活性的关键因素, 对 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中的温度条件进行了研究 (图 2.5c)。在 28-33 °C 的范围内, 随着温度的升高不论是葡萄糖的消耗速率还是葡萄糖酸的产率都升高, 但是当温度从 33 °C 升高到 37 °C 时葡萄糖的消耗速率和葡萄糖酸的产率都有轻微的降低。在发酵结束时, 不同温度梯度的葡萄糖几乎都被消耗光, 此时葡萄糖酸的浓度和得率也都比较接近, 整体比较而言, 温度为 33 °C 时的葡萄糖酸速率更高一些。*A. niger* SIIM M276 作为一种丝状真菌, 如预期一样表现出对高温较好的适应性, 37 °C 时的葡萄糖酸浓度和产率与最适温度 33 °C 时

相差无几,均优于 30 °C。*A. niger* SIIM M276 对高温良好的适应性可以降低工业生产中的冷却成本。为了进一步验证温度对 *A. niger* SIIM M276 生产葡萄糖酸性能的影响,在合成培养基中以同样的温度梯度进行葡萄糖酸的生产,结果与在玉米秸秆水解液中的结果吻合,说明 *A. niger* SIIM M276 可以在较高的温度下保持良好的葡萄糖酸发酵性能。

在摇瓶中对条件优化的结果表明,最适条件为转速 250 rpm,装液量 10%,温度 33 °C。在此最优条件下进行葡萄糖酸的生产,*A. niger* SIIM M276 的发酵性能与原有条件相比具有明显的提升(图 3.5e),发酵时间缩短了 36 h。通过对发酵条件进行优化,发现溶氧对 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中的发酵性能有重要的影响。

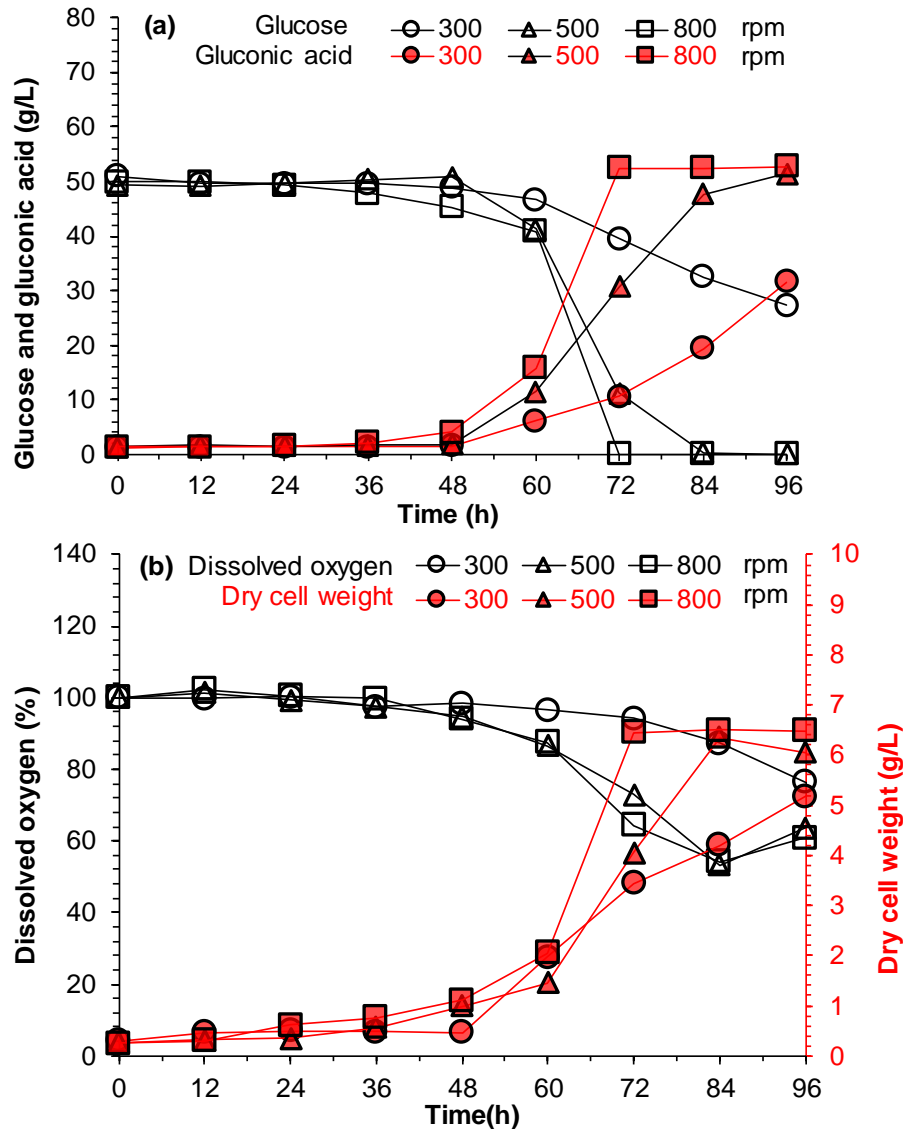
2.3.4 溶氧对 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中生产葡萄糖酸的影响

A. niger 的生长和代谢需要大量的氧气,尤其当 *A. niger* 作为发酵菌株进行葡萄糖酸生产时,需要更多的氧气去氧化葡萄糖生成葡萄糖酸^[220]。在摇瓶中条件优化试验中得到证实,在摇瓶中葡萄糖酸终浓度、得率和产率在设定的范围内随着转速的增加和装液量的减少而显著的增加。转速和装液量都是影响溶氧水平的关键因素,这也表明溶氧水平是影响 *A. niger* SIIM M276 在玉米秸秆水解液中葡萄糖酸发酵性能的一个非常重要的参数。在本试验中,使用可以监测溶氧的发酵罐来研究溶氧对 *A. niger* SIIM M276 在玉米秸秆水解液中葡萄糖酸发酵性能的影响,同时发酵罐的使用可以精确的控制 pH 和温度。

在发酵罐试验中,溶氧水平主要由转速和通气量决定。对溶氧的控制通过两个方面,首先在固定的通气量(1.6vvm)条件下改变转速(300-800 rpm)。随着转速的增加,葡萄糖的消耗速率和葡萄糖酸的产率均显著提高,在 300rpm 时,葡萄糖酸的生产速率(0.45 g/L/h)明显低于 500 rpm (0.52 g/L/h) 和 800 rpm (0.71 g/L/h),96 h 时葡萄糖依然剩余 27.3 g/L。转速从 500 rpm 提高到 800 rpm,葡萄糖酸生产速率的提高变得比较有限,最终的葡萄糖酸浓度和延滞期几乎相同(图 2.6a)。随着转速的增加,菌体生长速率也有明显增加,但是溶氧水平在发酵过程中一直维持在一个较高的水平,即使是在葡萄糖酸快速积累、氧气消耗最剧烈的时期依然维持在饱和溶氧的 60% (图 2.6b)。这说明即使在 300 rpm 这个转速下,溶氧已经足够维持菌体的生长和葡萄糖酸生产。从发酵过程中三种主要的抑制物变化情况来看,糠醛转化速率最快,但是糠醛和乙酸转化速率随着转速的提高并没有太明显的变化,高转速(800 rpm)对 HMF 的转化有比较明显的促进作用(图 2.6c)。

另一方面,溶氧水平的控制通过在固定的转速下(500 rpm)改变通气量(0.8-2.4 vvm)。随着通气量的增加,葡萄糖的消耗速率、葡萄糖酸的产率都得到显著的增加,值得注意的是,当通气量为 0.8 vvm 时,菌体的生长完全受到抑制,几乎没有葡萄糖酸的生成和葡萄糖的消耗(图 2.7a)。说明 0.8 vvm 通气量不足,影响了 *A. niger* SIIM M276 正常的生长和代谢。溶氧水平随着菌体生长和葡萄糖酸的生成而改变,当菌体快速生长、葡萄糖酸大量生成时,溶氧降低,但仍然始终维持在饱和溶氧的 50-60% (图 2.7b)。从抑制物浓度的变化情况来看,糠醛的转化速率表现出了明显的随着通气量增加而增快的趋势,

但是 HMF 和乙酸的在不同通气量下的转化速率差别不大, 通气量 0.8 vvm 时除外 (图 2.7c)。这些结果表明增加氧气的供给可以增加葡萄糖酸的产率, 但不会随着通气量的增加而一直增加。在这个试验中值得注意的一点是通气促进了抑制物的转化, 尤其是糠醛。糠醛与 HMF 和乙酸相比更容易挥发, 通气量的增加会加快糠醛的挥发随气体排出或者促进了菌体对糠醛的生物转化, 从而使 *A. niger* SIIM M276 的葡萄糖酸产率得到促进。糠醛在 *A. niger* SIIM M276 利用新鲜玉米秸秆水解液中扮演了重要的角色, 多项试验都表明了 *A. niger* SIIM M276 菌体的延滞期很有可能是由较高浓度糠醛的存在造成的。在延滞期中, 菌体量较少, 首先对糠醛进行转化, 当糠醛浓度降低到一定范围时, 菌体的生长抑制被解除, 开始快速增长, 随后葡萄糖酸快速产生, 糠醛对 *A. niger* SIIM M276 抑制的机制仍需要进一步研究。综上所述, 溶氧确实对 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中发酵生产葡萄糖酸的性能有显著地影响, 充足的氧气有助于菌体的生长和葡萄糖的氧化, 同时还有助于菌体对抑制物的转化。



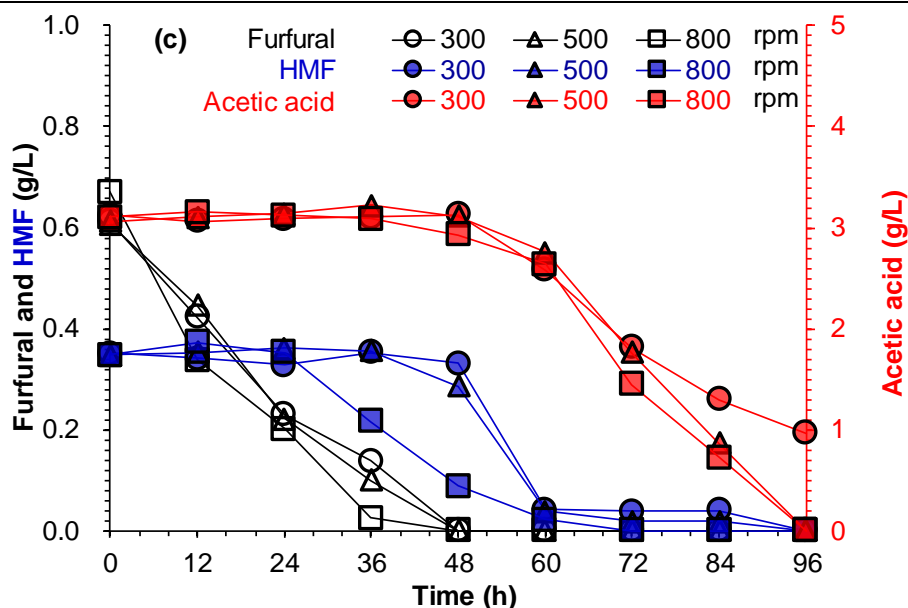
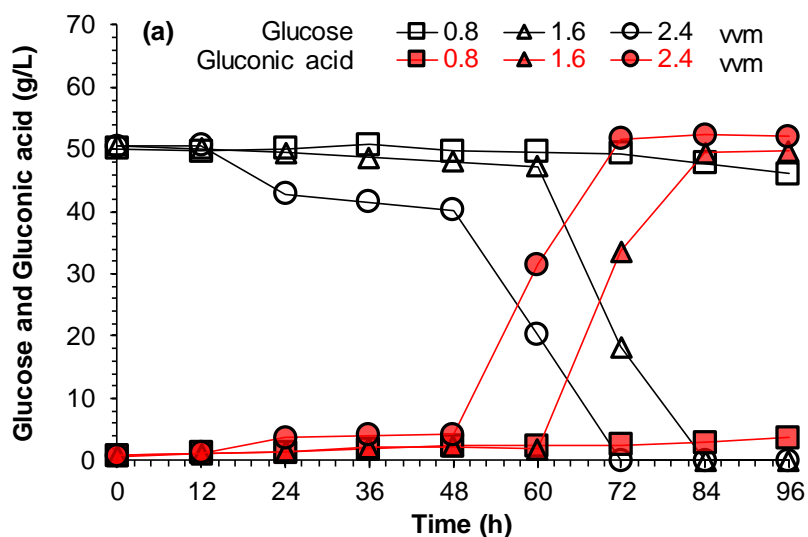


图 2.6 发酵罐中转速对 *A. niger* SIIM M276 生产葡萄糖酸的影响

(a) 葡萄糖和葡萄糖酸; (b) 溶氧和菌体生长; (c) 抑制物。使用 15% 固体含量新鲜玉米秸秆水解液成分为 54.67 g/L 葡萄糖, 26.75 g/L 木糖, 3.72 g/L 乙酸, 0.47 g/L HMF, 0.72 g/L 糠醛。在 3 L 发酵罐中进行, 发酵条件为温度 33 °C, 通气量 1.6 vvm, pH 6.0, 装液量为 1 L, 接种量为 10%。

Fig. 2.6 The effect of revolution rate on gluconic acid production by *A. niger* SIIM M276 in fermentors (a) Glucose and gluconic acid; (b) Dissolved oxygen; (c) Inhibitors. 15% solids loading freshly pretreated corn stover hydrolysate contained 54.67 g/L of glucose, 26.75 g/L of xylose, 3.72 g/L of acetic acid, 0.47 g/L of HMF, 0.72 g/L of furfural. The fermentation was carried out at 30 °C, pH 6.0, 1.6 vvm, liquid volume 1 L in 3 L fermentor, inoculum size 10%.



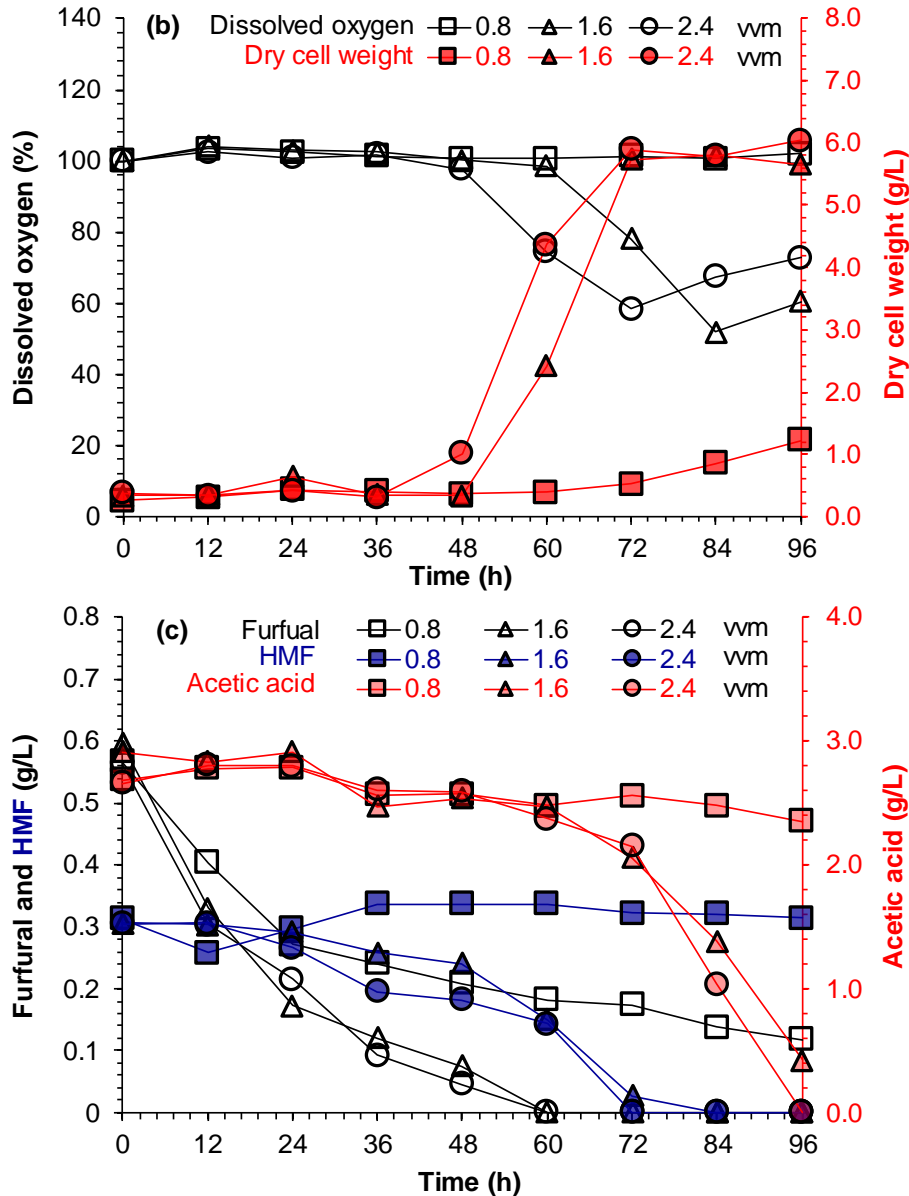


图 2.7 发酵罐中通气量对 *A. niger* SIIM M276 生产葡萄糖酸的影响

(a) 葡萄糖和葡萄糖酸; (b) 溶氧和菌体生长; (c) 抑制物。使用 15% 固体含量新鲜玉米秸秆水解液成分为 54.67 g/L 葡萄糖, 26.75 g/L 木糖, 3.72 g/L 乙酸, 0.47 g/L HMF, 0.72 g/L 糠醛。在 3 L 发酵罐中进行, 发酵条件为温度 33 °C, 转速 500 rpm, pH 6.0, 装液量为 1 L, 接种量为 10%。

Fig. 2.7 The effect of aeration rate on gluconic acid production by *A. niger* SIIM M276 in fermentors (a) Glucose and gluconic acid; (b) Dissolved oxygen; (c) Inhibitors. 15% solids loading freshly pretreated corn stover hydrolysate contained 54.67 g/L of glucose, 26.75 g/L of xylose, 3.72 g/L of acetic acid, 0.47 g/L of HMF, 0.72 g/L of furfural. The fermentation was carried out at 30 °C, pH 6.0, 500 rpm, liquid volume 1 L in 3 L fermentor, inoculum size 10%.

2.3.5 *A. niger* SIIM M276 在高固体含量的新鲜玉米秸秆水解液中的葡萄糖酸生产

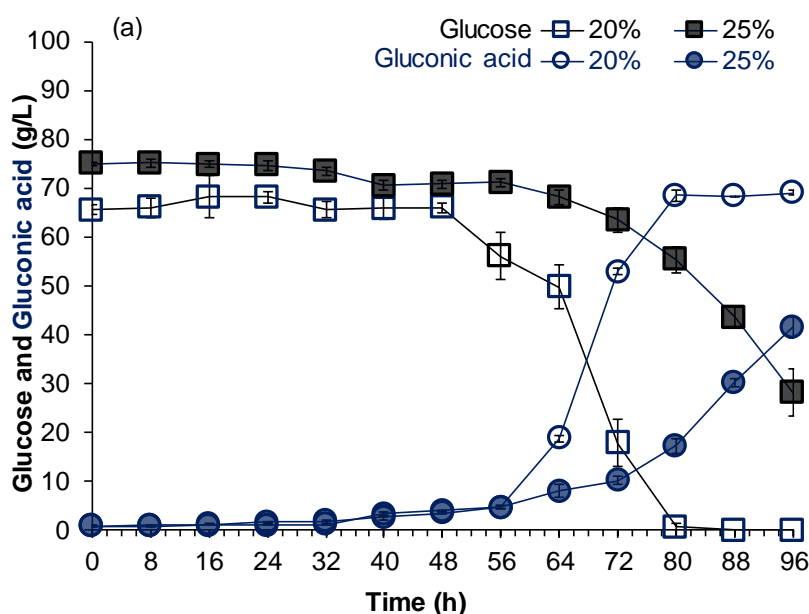
A. niger SIIM M276 在发酵罐中生产葡萄糖酸速率与摇瓶相比得到明显的提升, 但是由于低固体含量玉米秸秆水解液葡萄糖浓度的限制, 得到葡萄糖酸浓度不足 60 g/L, 为了得到更高浓度的葡萄糖酸, 需要提高水解过程玉米秸秆的添加量来提高玉米秸秆水解液中糖的浓度。在本研究中采用了独特的螺带搅拌式生物反应器, 克服了高固体含量

玉米秸秆水解糖化过程混合不均匀、酶解效果差的难题，得到更高糖浓度的新鲜玉米秸秆水解液。增加预处理后玉米秸秆添加量使得水解体系的固体含量分别达到 20%(w/w) 和 25% (w/w)，水解液的主要成分见表 2.1。图 2.8 显示了利用这些高固体含量新鲜玉米秸秆水解液生产高浓度葡萄糖酸的结果，温度 33 °C，转速 500 rpm，通气量 2.4 vvm。20%固体含量的新鲜玉米秸秆水解液中含有 70.21 g/L 葡萄糖，最终发酵结束时，葡萄糖酸的浓度达到 66.74 g/L，葡萄糖酸生产速率为 0.69 g/L/h，葡萄糖酸得率（基于玉米秸秆水解液中的葡萄糖）为 92.25%。随着水解液固体含量增加，20%与 15%固体含量相比，葡萄糖酸的生产速率几乎没有变化，即使抑制物浓度的增加，并没有对 *A. niger* SIIM M276 的产酸性能产生严重的抑制，说明了该菌株对抑制物良好的耐受性。继续提高玉米秸秆水解液的固体含量，当增加到 25%时，问题随之而来，随着抑制物的浓度进一步升高，达到了能够抑制 *A. niger* SIIM M276 的生长和产酸性能的程度。在固体含量为 25%时，发酵 96 h 发酵液中依然剩余 28.1 g/L 的葡萄糖，此时的 *A. niger* SIIM M276 菌体量也只有 20%固体含量时的 40%左右。虽然 *A. niger* SIIM M276 表现出了对抑制物较强的耐受性，但是当抑制物浓度升高到一定浓度时，尤其是糠醛浓度的提升，仍然会对 *A. niger* SIIM M276 的生长和发酵产酸性能产生严重的抑制，因此为了得到更高糖浓度的玉米秸秆水解液，需要提升菌株对抑制物的耐受性。

表 2.1 高固体含量新鲜玉米秸秆水解液组分

Table 2.1 Composition of high solids loading freshly pretreated corn stover hydrolysate

Content	Glucose	Xylose	Acetic acid	HMF	Furfural
20% (g/L)	70.21	32.25	2.29	0.49	0.6
25% (g/L)	80.08	38.28	3.23	0.69	0.83



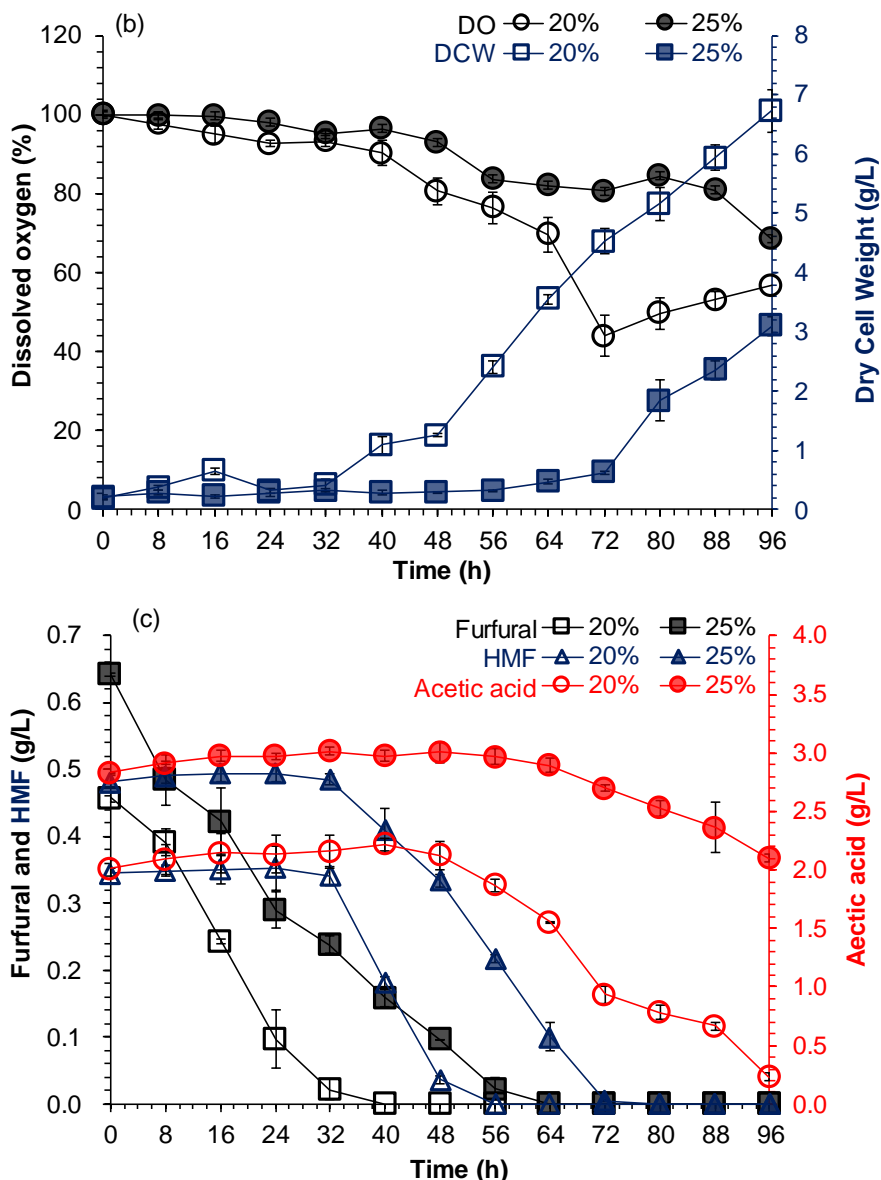


图 2.8 利用高固体含量新鲜玉米秸秆水解液的高浓度葡萄糖酸发酵

(a) 葡萄糖和葡萄糖酸; (b) 溶氧和菌体生长; (c) 抑制物。在 3 L 发酵罐中进行, 发酵条件为温度 33 °C, 转速 500 rpm, 通气量 1.6 vvm, pH 6.0, 装液量为 1 L, 接种量为 10%。

Fig. 2.8 Production of high titer gluconic acid by high solid loading corn stover hydrolysate.

(a) Glucose and gluconic acid; (b) Dry cell wight and dissolved oxygen; (c) Inhibitor. In 3 L fermentor, fermentation conditions: temperature 33 °C, pH 6.0, liquid volume 1L, inoculum size 10%, 500 rpm, 2.4 vvm.

2.3.6 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中的适应性进化

新鲜的玉米秸秆水解液对 *A. niger* SIIM M276 生长和葡萄糖酸生产均具有较强的抑制作用, 而适应性进化的策略是一种常用的可以提高菌种的抗逆性的方法, 适应性进化也称为驯化^[308]。本研究中为了提高 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中抑制物的耐受性、葡萄糖酸生产速率, 对菌株进行驯化。驯化所使用的 15%新鲜玉米秸秆水解液成分如下: 葡萄糖 53.23g/L、木糖 24.34 g/L、乙酸 3.62 g/L、HMF 0.34g/L、糠醛 0.45g/L。

驯化在摇瓶中进行，温度 30 °C，转速 200 rpm，装液量 50/250 mL，每次转接的接种量为 20%，每次转接的时间为 48 h，碳酸钙调节 pH。

在驯化的过程中发现，随着转接次数的增加，在同样的转接时间内（48 h）*A. niger* SIIM M276 对水解液中葡萄糖的消耗速率明显增加，葡萄糖酸的产率也明显增加。在第 5 次转接时，M276 在 48h 内几乎可以把新鲜玉米秸秆水解液中的葡萄糖全部转化成葡萄糖酸。但是在转接 6 次以后，随着转接次数的增加，菌种的葡萄糖酸发酵性能发生了退化，在摇瓶中的生长形态产生了比较大的变化，如图 2.9a 所示，从而导致产酸性能的下降。在第 1 次转接时，*A. niger* 菌丝团成球形，直径小于 1mm。但随着转接次数的增加，菌球体型越来越大，单位体积内菌球数越来越少，当转接到第 9 代时，多数菌球的形态发生巨大的变化，直径达到了 3mm 以上。这可能是菌体老化以后，产酸减少，细胞碎片在碳酸钙的作用下，凝集在一起形成了体积较大的不规则形状。

(a)

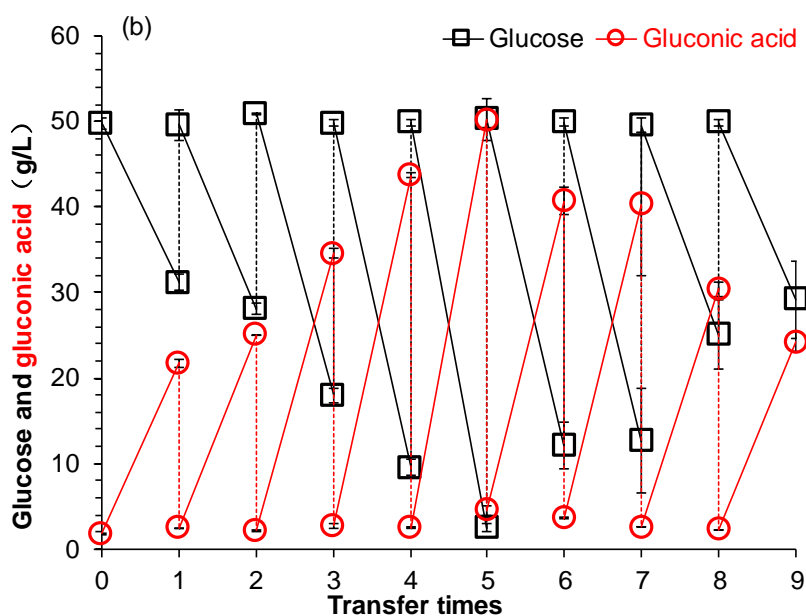
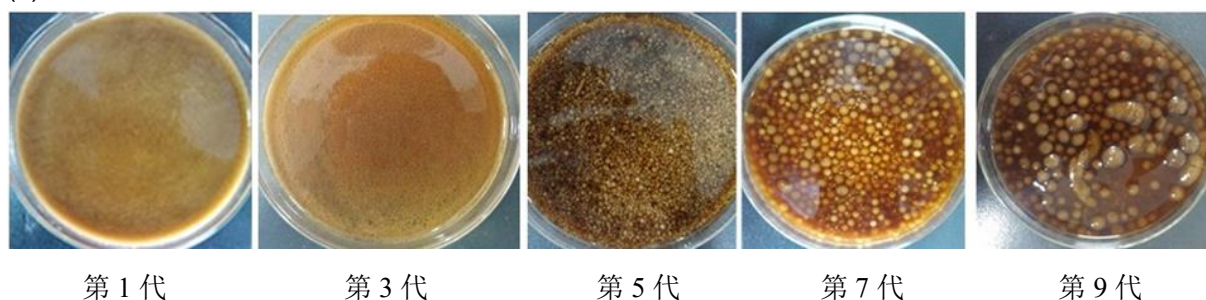


图 2.9 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中的驯化

(a) 菌体形态；(b) 葡萄糖酸生产。在 250 mL 摇瓶中进行，发酵条件为温度 30 °C，转速 200 rpm，pH 6.0，装液量为 20%，接种量为 20%，每次转接时间为 48 h。

Fig.2.9 Adaptation of *A. niger* SIIM M276 in freshly pretreated corn stover hydrolysate

(a) Mycelial morphology; (b) Gluconic acid production. In 250 mL flasks, fermentation conditions: temperature 33 °C, pH 6.0, liquid volume 20%, inoculum size 10%, 200 rpm. Every transfer time 48 h.

尝试添加玻璃珠来解决菌体结团的问题，当添加玻璃珠数量较少时 (<5 颗) 对防止菌丝结球的效果不理想，菌体仍会结成团；当添加玻璃珠数量较多时 (>5 颗) 容易将菌体打碎，影响了黑曲霉的生长，严重影响葡萄糖酸的产生。这个结果表明，真菌尤其是丝状真菌，由于其菌体形态的特殊性（菌丝较长，容易形成菌球），在新鲜的玉米秸秆水解液中经过适应性进化以后菌体形态会发生比较大的变化，导致发酵性能也大大降低，难以得到形态、性能稳定的菌株，说明 *A. niger* 对水解液体系比较敏感，可能会在将来的工业应用上造成一些问题。驯化过程中葡萄糖的消耗和葡萄糖酸的生成见图 2.9b。经过一个短期的驯化（3-5 代），*A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中的发酵产葡萄糖酸的性能得到了显著的提升，大大提升了利用玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸的可行性。但是随后发酵性能发现了明显的下降，在第 9 代时退化到与初始水平相当。选取发酵性能最佳时即经过 3 次转接以后的菌种作为驯化菌株，与原始菌株的发酵性能进行对比，结果见图 2.10。

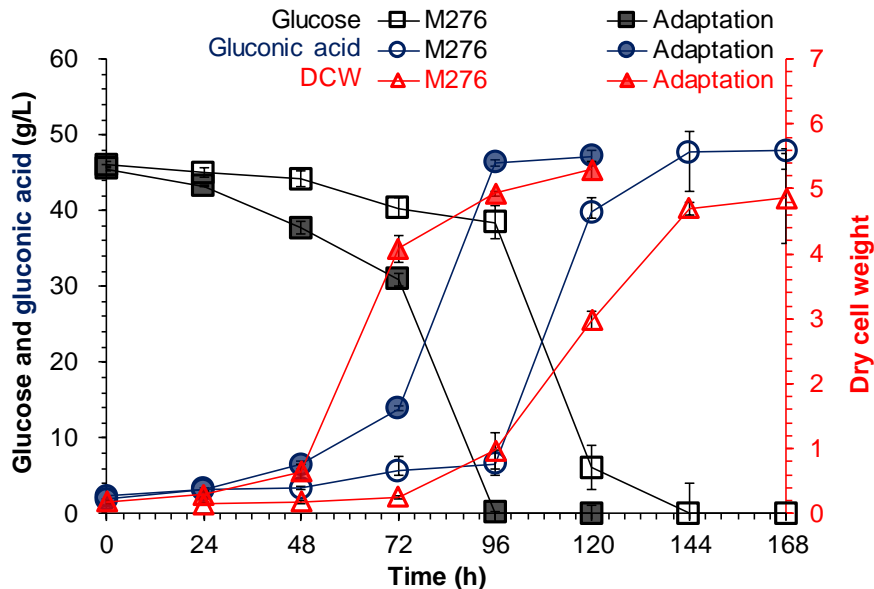


图 2.10 *A. niger* SIIM M276 驯化菌株与原始菌株在新鲜玉米秸秆水解液中葡萄糖酸生产性能在 250 mL 摇瓶中进行，发酵条件为温度 33 °C，转速 200 rpm，pH 6.0，装液量为 20%，接种量为 10%。

Fig. 2.10 Gluconic acid productivity of parental and adapted *A. niger* SIIM M276 in freshly pretreated corn stover hydrolysate

In 250 mL flasks, fermentation conditions: temperature 33 °C, pH 6.0, liquid volume 20%, inoculum size 10%, 200 rpm.

图 2.10 表明，经过一个短期的驯化，*A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中的发酵生产葡萄糖酸的性能得到了明显的提升，菌体开始快速生长的时间点从最初的 72 h 缩短为 24 h，葡萄糖被完全消耗的时间从 144 h 缩短到 96 h。两株菌株最高葡萄糖浓度相差无几，*A. niger* SIIM M276 驯化菌株最终葡萄糖酸浓度为 47.15 g/L，得率 93.15%；*A. niger* SIIM M276 原始菌株最终葡萄糖酸浓度为 47.95 g/L，得率 94.50%。在短期驯化

的过程中, *A. niger* SIIM M276 在水解液中抑制物的胁迫下, 适应性更强的菌株得以存活并大量生长, 在发酵液中所占比例逐步增加, 整体提高了菌体的生长和产葡萄糖酸的性能。

2.3.7 *A. niger* SIIM M276 半连续发酵生产葡萄糖酸

A. niger SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中的生长存在一个比较明显的延滞期, 从而大大降低了葡萄糖酸整个生产过程的生产速率。但是当菌体开始快速生长并达到一定的菌体浓度水平后, 葡萄糖酸的生产速率相当可观。利用 *A. niger* 生产葡萄糖酸主要是依靠菌体内的 GOD 催化氧化葡萄糖实现的, 菌体可以作为葡萄糖酸生产的催化剂。因此尝试将发酵结束以后的发酵液进行固液分离, 将菌体收集起来, 直接转入新鲜的培养基, 实现菌体的循环利用, 以半连续发酵的形式生产葡萄糖酸。本次试验所采用的 *A. niger* 菌株为驯化后的菌株。当培养基中的葡萄糖消耗完毕后及时加入新鲜的玉米秸秆水解液, 该试验在摇瓶中进行, 葡萄糖酸的半连续发酵结果见图 2.11。

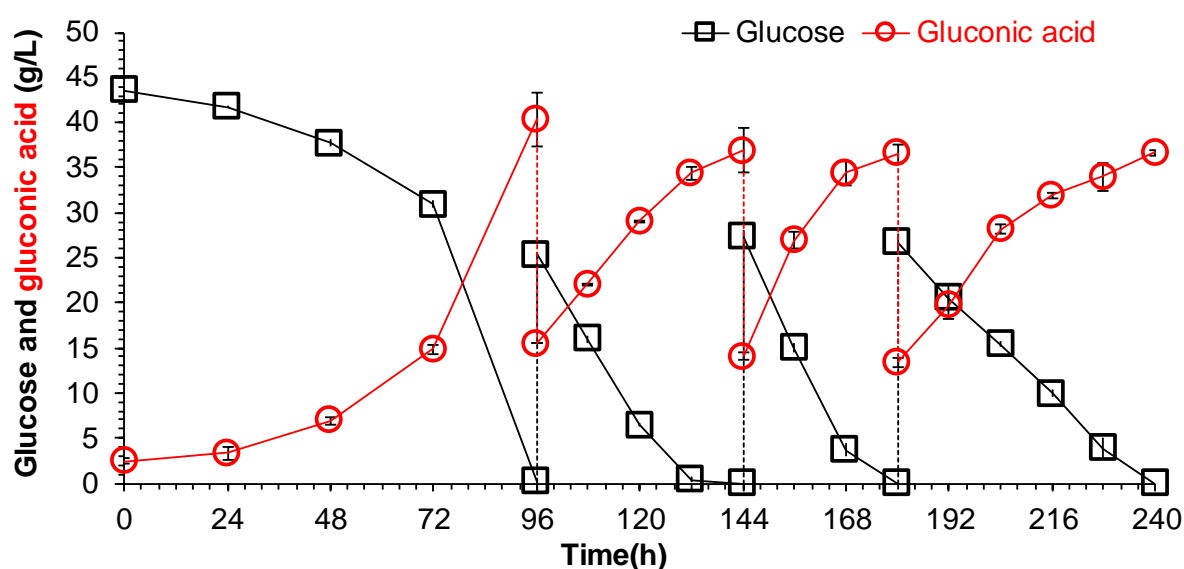


图 2.11 *A. niger* SIIM M276 利用新鲜玉米秸秆水解液半连续生产葡萄糖酸

在 250 mL 摇瓶中进行, 发酵条件为温度 33 °C, 转速 200 rpm, pH 6.0, 装液量为 20%, 接种量为 10%。

Fig. 2.11 Semi-continuous fermentation of gluconic acid by *A. niger* SIIM M276 using freshly pretreated corn stover hydrolysate

In 250 mL flasks, fermentation conditions: temperature 33 °C, pH 6.0, liquid volume 20%, inoculum size 10%, 200 rpm.

从图 2.11 中可以看出, 第 1 次发酵后收集的菌体几乎没有任何延滞期就迅速将新鲜玉米秸秆水解液中的葡萄糖转化成葡萄糖酸, 一共循环 4 次。在 *A. niger* SIIM M276 的抑制物耐受性试验中发现, 抑制物的存在并不会对生产葡萄糖酸的葡萄糖氧化酶产生影响, 这也肯定了半连续生产的可行性。在第 2 次和第 3 次循环发酵过程中, 葡萄糖酸的生产速率与第 1 次相比有明显的提高, 第 1 次发酵过程中葡萄糖酸的生产速率为 0.39

g/L/h, 在第 2 次和第 3 次循环发酵过程中分别增加到 0.59 和 0.62 g/L/h。但是在 3 次循环过后, 无论是葡萄糖的消耗速率还是葡萄糖酸的生成速率都明显降低, 葡萄糖酸的生产速率降低至 0.38 g/L/h, 甚至低于第 1 次发酵。与驯化试验结果类似, *A. niger* SIIM M276 经过了几次循环 (转接) 以后, 活性开始降低, 也印证了 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液体系中的性能比较不稳定。

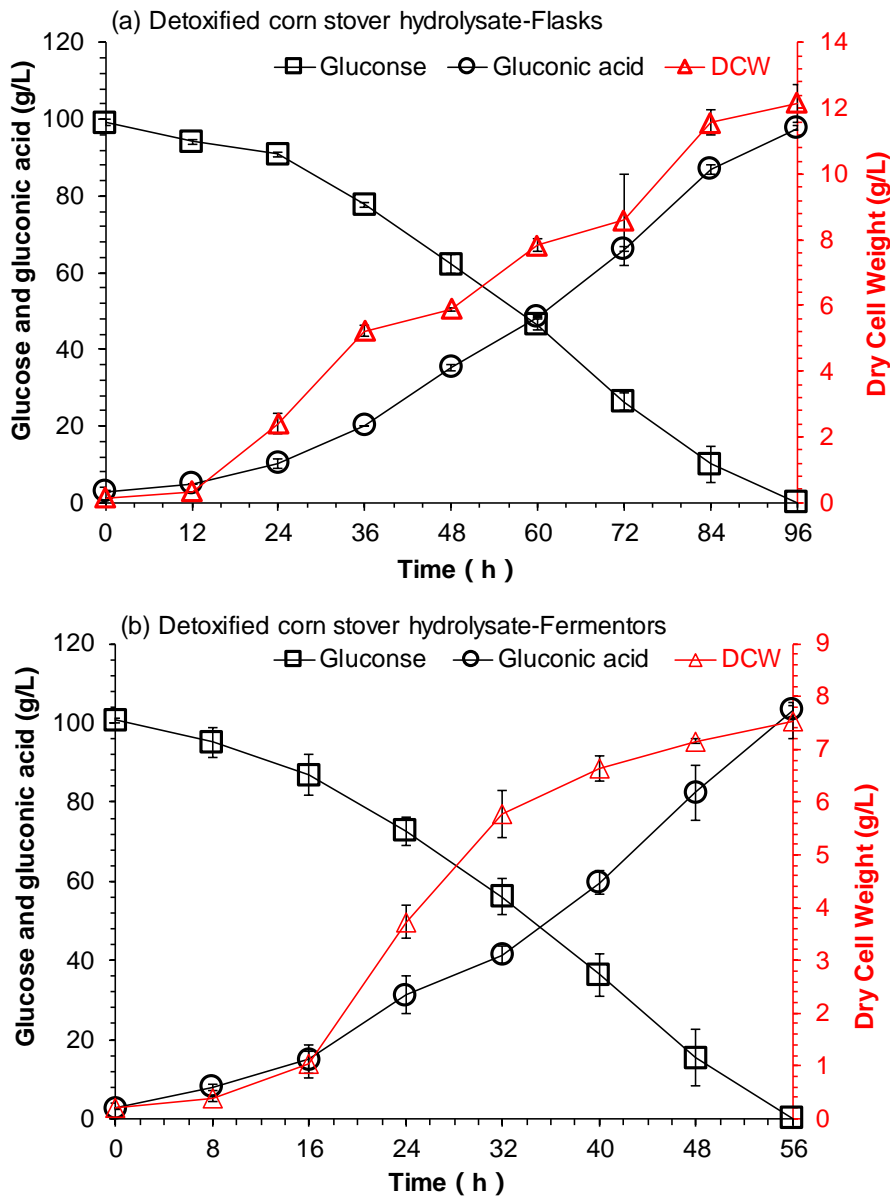


图 2.12 *A. niger* SIIM M276 利用脱毒玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸

(a) 摇瓶; (b) 发酵罐。25% 固体含量的脱毒玉米秸秆水解液成分为 106.15 g/L 葡萄糖, 32.18 g/L 木糖, 1.43 g/L 乙酸, 0.15 g/L HMF, 0.06g/L 糠醛。

Fig. 2.12 Gluconic acid production of *A. niger* SIIM M276 using detoxified corn stover hydrolysate (a) In flakss; (b) In fermentors. The composition of the 25% solids loading detoxified corn stover hydrolysate: 106.15 g/L of glucose, 32.18 g/L of xylose, 1.43 g/L of acetic acid, 0.15 g/L of HMF, 0.06 g/L of furfural.

2.3.8 *A. niger* SIIM M276 利用脱毒玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸

A. niger SIIM M276 虽然对稀酸预处理过程中产生的抑制物表现出一定的耐受性，但是随着预处理后玉米秸秆固体含量的增加，经过纤维素酶水解以后的水解液中含有的抑制物浓度也不断升高。当固体含量达到 25% 时，制得的新鲜玉米秸秆水解液中抑制物含量将会严重影响 *A. niger* SIIM M276 的生长和产酸性能。通过对 *A. niger* SIIM M276 在 15% 固体含量新鲜玉米秸秆水解液中进行驯化，虽然在短期内 *A. niger* SIIM M276 的葡萄糖酸发酵性能有比较明显的提升，但 *A. niger* SIIM M276 在水解液中抑制物胁迫下，菌体形态与产酸性能都不够稳定，想要通过驯化得到一株在含有抑制物的水解液体系中性能稳定的高产黑曲霉菌株还存在比较大的困难。为了得到更高浓度的葡萄糖酸，接近工业葡萄糖酸生产的水平，需要解除抑制物的不良影响，因此对预处理后玉米秸秆中抑制物的脱除就变得尤为必要。所用的脱毒菌株为 *Amorphotheca resinae* ZN1，为本实验室从自然界中筛选分离所得^[179]。预处理后的物料经过静态脱毒处理 120 h 后，几种典型的抑制物（如糠醛、HMF 和乙酸）几乎完全被脱除，很大程度上解除了抑制物对纤维素酶的抑制，使得纤维素的酶解得率也得到比较明显的提高，在同样 25% 固体含量的情况下，脱毒以后玉米秸秆经过酶解得到的葡萄糖浓度达到了 106.15 g/L，然而未经过脱毒的玉米秸秆酶解得到的葡萄糖浓度只有 84.08 g/L。

使用脱毒玉米秸秆水解液发酵生产葡萄糖酸的试验首先在摇瓶中进行，结果见图 2.12a。在脱毒玉米秸秆水解液中葡萄糖酸的生产速率已经达到了在合成培养基中的水平，远高于未经过脱毒处理的新鲜玉米秸秆水解液中的葡萄糖酸的生产速率，并且没有出现明显的延滞期。说明预处理后的玉米秸秆原料经过脱毒以后更利于 *A. niger* SIIM M276 的利用，也说明了抑制物确实会对 *A. niger* SIIM M276 的生长和葡萄糖酸生产性能造成不良影响。随后在发酵罐上进行放大试验，通气量 1.6 vvm，转速 500 rpm，温度 33 °C，结果见图 2.12b。在更充足的通气和更高的搅拌速度下，葡萄糖酸的生产速率与摇瓶相比得到明显的提高，从摇瓶中的 0.99 g/L/h 提高到 1.80 g/L/h，几乎提高一倍，同样浓度的葡萄糖完全消耗的时间从 96 h 缩短到 56 h，最终葡萄糖酸浓度达到了 105.36 g/L，得率达到 94.58%。*A. niger* SIIM M276 在脱毒的玉米秸秆水解液中表现出优良的葡萄糖酸生产性能，使得利用玉米秸秆等木质纤维素原料代替传统的玉米淀粉、蔗糖等原料工业化生产葡萄糖酸成为可能。

2.4 本章小结

(1) *A. niger* SIIM M276 利用玉米秸秆水解液发酵生产葡萄糖酸时表现出良好的发酵性能，可以直接利用较低固体含量（15%）的未经过脱毒处理的新鲜玉米秸秆水解液进行葡萄糖酸的生产。但是与在合成培养基中发酵结果相比，抑制物的存在使 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中出现了一个较长的延滞期，导致葡萄糖酸的生产速率明显下降。

(2) 选取稀酸预处理过程中产生的 9 种典型抑制物，对 *A. niger* SIIM M276 在单一

抑制物胁迫下的发酵性能进行研究, 结果表明 *A. niger* SIIM M276 对呋喃类抑制物(糠醛和 HMF) 有一定的耐受性和转化能力, 其中对糠醛的耐受性较差, 对 HMF 的耐受性较强; *A. niger* SIIM M276 对弱酸类抑制物(甲酸、乙酸和乙酰丙酸)的耐受性比较强, 并且可以将甲酸进行完全降解, 对乙酸和乙酰丙酸进行部分降解; 对酚类抑制物(香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛和松柏醛)耐受性较弱, 转化速率也比较慢, 但由于酚类抑制物在玉米秸秆水解液中浓度较低, 一般不足以产生明显的抑制作用, 综合考虑推测糠醛可能是影响 *A. niger* SIIM M276 生长和葡萄糖酸生产性能的主要抑制物。

(3) 对 *A. niger* SIIM M276 生成葡萄糖酸的发酵条件进行研究, 发现溶氧是影响葡萄糖酸生产速率的重要因素。以 15%新鲜玉米秸秆水解液为原料生产葡萄糖酸时, 通气量的增加不仅提供了充足的氧气, 还可以带走新鲜玉米秸秆水解液中的糠醛, 从而大大缩短了延滞期。当固体含量提高到 20%时, 此时的抑制物浓度并没有对 *A. niger* SIIM M276 的生长以及葡萄糖酸发酵性能造成明显的影响, 得到了 76.67 g/L 的葡萄糖酸。但是当固体含量增加到 25%时, 随着抑制物浓度的进一步提高, 高浓度的抑制物严重影响了 *A. niger* SIIM M276 的生长和葡萄糖酸发酵性能。

(4) 对 *A. niger* SIIM M276 采取适应性进化策略(驯化)以增强其对抑制物的耐受性以及玉米秸秆水解液体系的适应性, 使其能够在高抑制物浓度的玉米秸秆水解液体系中的生长速率和葡萄糖酸发酵性能得到明显的提升。试验结果表明短期的驯化(3-5代)可以有效的增强 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中的发酵性能, 但是随着转接次数的增加, 菌体形态发生明显改变, 发酵性能退化显著, 暴露出 *A. niger* SIIM M276 对含抑制物的木质纤维素水解液体系敏感性较强的缺陷。

(5) 为了得到高浓度的葡萄糖酸, 解决抑制物对 *A. niger* SIIM M276 在高固体含量水解液体系中的不良影响, 对预处理过程中产生的抑制物的脱除就显得尤为必要。使用本实验室从自然界筛选得到的脱毒真菌 *A. resiniae* ZN1 对预处理后的玉米秸秆中的抑制物进行了固态生物脱毒, *A. niger* SIIM M276 在脱毒后的玉米秸秆水解液中的葡萄糖酸发酵性能得到显著提升。使用 25%固体含量的脱毒玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸时, 最高得到了 105.36 g/L 的葡萄糖酸, 基于葡萄糖的得率达到 94.58%。

本章节主要研究了以 *A. niger* 为生产菌株, 利用木质纤维素原料-玉米秸秆生产葡萄糖酸。虽然经过脱毒以后 *A. niger* SIIM M276 在玉米秸秆水解液体系中的葡萄糖酸生产速率得到比较明显的提升, 但依然与工业生产存在比较大的差距, 除此之外, 利用 *A. niger* SIIM M276 以玉米秸秆为原料生产葡萄糖酸过程中还存在一些难以解决的问题, 如菌体形态和发酵性能不稳定不利于工业生产, 对木糖的利用能力比较弱造成大量的木糖残留在发酵液中等。为了使纤维素葡萄糖酸的工业生产成为现实, 还需要寻找更适合生物炼制体系的葡萄糖酸生产菌株。

第 3 章 抑制物耐受型 *Gluconobacter oxydans* 利用玉米秸秆生产高浓度葡萄糖酸和木糖酸

3.1 引言

葡萄糖酸钠作为一种常用的水泥缓凝剂，可以有效地延长水泥的凝结时间，缓凝效果比较温和，近年来被广泛的应用于建筑业^[292]。木糖酸盐具有减缓水泥颗粒的絮凝反应的作用，从而保持水泥浆具有较好的流动性，成为一种有效地水泥减水剂。缓凝剂和减水剂复掺使用，会进一步增强水泥的性能，对硬化砂浆的后期强度有明显的增强作用^[267]。在上一章的研究中发现，*A. niger* 可以利用木质纤维素原料生产葡萄糖酸，并表现出较好的发酵性能，但是仍然存在一些问题。如 *A. niger* 对玉米秸秆水解液体系比较敏感，菌体形态和发酵性能不稳定，菌丝受到外界胁迫以后容易结成菌球，随着转接次数的增加菌球还会逐渐变大，葡萄糖酸发酵性能显著下降，这很大程度上不利于木质纤维素葡萄糖酸工业化生产过程中多级种子放大培养过程，菌株的这种不稳定性将成为大规模生产的不确定因素造成不必要的损失，给将来的工业化生产造成了很大的困扰。而且 *A. niger* 作为丝状真菌，菌体受外力作用时将会更加脆弱，如在利玉米秸秆原料同步糖化发酵生产葡萄糖酸时，菌丝体会更容易受到强大的剪切力的破坏，从而不利于葡萄糖酸的生产。另一方面，玉米秸秆水解液中木糖的利用一直以来就是木质纤维素领域的重点，试验结果表明 *A. niger* SIIM M276 并没有利用木糖生产大宗化学品的能力，从而造成发酵液中残留大量的木糖，对木质纤维素资源利用不充分，是对木质纤维素资源的极大浪费，并且木糖的存在会影响葡萄糖酸钠作为水泥缓凝剂的效果，容易造成工程事故。再次，*A. niger* SIIM M276 利用玉米秸秆生产葡萄糖酸的过程中，虽然经过条件优化和脱毒以后很大程度上提高了其葡萄糖酸生产速率，但是与工业葡萄糖酸生产相比生产速率仍然相差比较大。

为了解决这些问题，一株可以同时利用玉米秸秆水解液中葡萄糖和木糖生成葡萄糖酸和木糖酸的细菌-*Gluconobacter oxydans* 成为新的生产菌株^[249]。*G. oxydans* 是一种革兰氏阴性菌，属于醋酸杆菌属，以细胞膜上富含丰富的氧化还原酶系而闻名，可以将多种醛类化合物不完全氧化成对应的酸或者酮，因此是一株被广泛应用的工业微生物^[249, 254]。本研究旨在建立一种利用木质纤维素原料生产葡萄糖酸的最具有实际工业应用价值的生物炼制工艺，选择 *G. oxydans* 具有比较明显的优势：（1）*G. oxydans* 能够生产葡萄糖酸主要依靠自身的葡萄糖脱氢酶（Glucose dehydrogenase, GDH），分为两种，一种是 PQQ 依赖型 mGDH 锚定在细胞膜上，另一种 NAD 依赖型的 GDH 存在于细胞膜内^[237]。有文献报道，在利用 *G. oxydans* 生产葡萄糖酸的过程中，发挥主要作用的葡萄糖脱氢酶是 PQQ-mGDH，约占总葡萄糖酸产生量的 90%以上^[249, 254, 255]。由于关键酶 GDH 位于细胞膜上，催化葡萄糖的反应可以直接在细胞膜上进行，氧气和底物不需要进入细胞内，生成的产物可以直接进入发酵液，打破了细胞膜对氧气、底物和产物的传递的屏障，反

应速率可以大大提高^[251-254]；(2) *G. oxydans* 可以氧化多种己糖和戊糖生成对应的酸或酮，可以同时催化氧化玉米秸秆水解液中葡萄糖和木糖，生成对应的葡萄糖酸和木糖酸^[309]；(3) 木质纤维素来源的抑制物的降解转化过程主要就是醛类物质被氧化还原的过程，*G. oxydans* 膜上富含多种与醛类化合物氧化还原相关的酶系，会对抑制物的转化有一定的促进作用^[309]。综合以上优势，在本研究中选择 *G. oxydans* 来代替 *A. niger* 利用木质纤维素原料同时生产葡萄糖酸和木糖酸。

3.2 材料与方法

3.2.1 原料

玉米秸秆来自于中国河南省南阳市，收获于 2014 年秋。收集以后的玉米秸秆经过收割机打碎成秸秆块，水洗除去灰尘，烘干至恒重。将烘干后的玉米秸秆块使用 SF-300 锤式粉碎机粉碎，粉碎机的筛孔直径为 10mm。得到的玉米秸秆粉放入密封袋于干燥处保存备用。经过前处理后的玉米秸秆含有纤维素 35.78%、半纤维素 19.36%、木质素 28.36%、灰分 3.56%，基于干物料(w/w)，使用 ANKOM 220 纤维素分析仪检测(ANKOM Technology, Macedon, NY, USA)。

3.2.2 酶、试剂和仪器设备

商品纤维素酶 Youtell #7 购自湖南尤特尔生化有限公司(中国, 湖南)。该纤维素酶的滤纸酶活为 63.0 FPU/g DM，纤维二糖酶活性为 102.0 IU/g DM，蛋白含量为 49.5 mg/g DM。本章节所使用的试剂见附录I。本章节所使用的仪器见附录II。

3.2.3 菌种、培养基和培养方法

G. oxydans ATCC 621H 来自美国模式培养物集存库(American Type Culture Collection, ATCC, USA, Manassas)，*G. oxydans* DSM 2003 购自德国微生物菌种保藏中心(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany, Braunschweig)。

Amorphotheca resiniae ZN1，由本实验室从自然界筛选分离，用于对预处理后的玉米秸秆进行固态脱毒。保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbial Collection Center, CGMCC)，保藏编号为 CGMCC 7452。

G. oxydans 使用的培养基如下：

(1) 种子培养基：80.0 g Sorbitol, 20 g Yeast extract, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g KH_2PO_4 , 1.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，加入 1 L 的去离子水中。

(2) 发酵合成培养基：80.0 g Glucose, 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5g KH_2PO_4 , 1.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，加入 1 L 的去离子水中。

(3) 玉米秸秆水解液培养基：玉米秸秆水解液，不添加任何营养物质。

G. oxydans 培养方法如下：*G. oxydans* 保存在 2 mL 冻存管中，甘油浓度 30%(v/v)，-80 °C 保存。使用时，取出冻存管，直接倒入 20ml 种子培养基中，30 °C、220 rpm 培养 24h，按照 10% 的接种量对种子进行扩培。种子培养好以后：对于摇瓶发酵，将种子接入到含有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 摇瓶中，接种量 10%，30 °C，220 rpm 培养，所

有的摇瓶都有重复对照；对于发酵罐发酵，将种子接入含有 1 L 玉米秸秆水解液的 3 L 发酵罐中，接种量 10%，30 °C，500 rpm，通气量 2.4 vvm，发酵 24-96 h。摇瓶中 pH 的控制依靠取样时手动添加 5M 氢氧化钠维持，发酵罐中 pH 靠 5 M 氢氧化钠自动调节。培养基和水均在 115 °C 灭菌 20 min。

3.2.4 预处理、生物脱毒和水解液的制备

稀酸预处理方法^[212]：本章节使用的稀酸预处理方法有所改进，前处理后的玉米秸秆不需要经过预浸，仍然能够达到与预浸相同的预处理效果，简化了预处理的步骤。首先，直接将前处理后的玉米秸秆与稀硫酸溶液一起投入预处理反应器中，其中干玉米秸秆与硫酸溶液的固液质量比为 2:1，硫酸质量分数为 2.5%，50 rpm 搅拌 3 min 将其混匀。通入蒸汽压力为 1.6 Mpa，温度升高至 100 °C 时计时，在 5-6 min 升高温度至预处理温度 175 °C，停留时间为 5 分钟，转速为 50 rpm。预处理后的玉米秸秆的含水量大约在 50%，在此预处理过程中无废水产生。经过预处理后的玉米秸秆含有纤维素 37.24%、半纤维素 8.21%、灰分 5.86%，使用两步酸解法测定，该方法基于 NREL 报告^[301, 302]。每克干预处理后玉米秸秆中抑制物含量为：5.64 mg 糠醛, 3.54 mg HMF, 18.43 mg 乙酸, 0.23 mg 香草醛, 0.67 mg 丁香醛和 0.18 mg 4-羟甲基糠醛。

在位固态生物脱毒的方法^[180]：本章节采用的生物脱毒的方法有所改进，在原脱毒过程中通入足量的空气来改善脱毒的效率。脱毒开始前，首先将预处理后的玉米秸秆使用 20% (w/w) 碳酸氢钙溶液调节 pH 至 5.0-5.5，随后进行磨浆，将培养好的 *Amorphotheca resinae* ZN1 斜面接入磨浆后的玉米秸秆，培养 4-5 天作为固体种子。将固体种子按照 10% 的接种量接入磨浆后的预处理玉米秸秆，脱毒在 15 L 螺带搅拌式生物反应器中进行，通气量为 1vvm，大量氧气的供给可以快速去除预处理过程中产生的抑制物，每 12 h 开启搅拌 1-2 min，转速 50 rpm。生物脱毒的过程在 28 °C、pH 4.8-5.5 条件下持续 36-48 h，可以除去预处理后玉米秸秆中大部分的糠醛、HMF、乙酸等抑制物。脱毒后玉米秸秆物料经过 115 °C 灭菌 30 min，存于 4 °C 保存，备用。

玉米秸秆水解液的制备是在 5 L 螺带搅拌式生物反应器中进行^[211]，同时加入适量的经过预处理(或者脱毒)的玉米秸秆、水和纤维素酶，纤维素酶的用量为 15 FPU/g DM，酶水解条件为 50 °C，pH 4.8，水解 48 h。得到的醪液经过 10000 rpm 离心 10 min 除去不溶性固体，得到玉米秸秆水解液。随后，水解液在 115 °C 灭菌 20 min，使用滤纸过滤除去固体杂质，4 °C 密封保存，备用。

3.2.5 样品分析

样品定期从发酵醪中取出，13000 rpm 离心 5 min，在分析之前经过 0.22 μm 滤膜过滤。葡萄糖使用 SBA-40D 生化分析仪测定(山东省农科院，中国，济南)。木糖使用 HPLC 测定(LC-20AD，示差检测器 RID-10A，岛津，日本，京都)，使用 Aminex HPX-87H 色谱柱(Bio-rad，美国，Hercules)，柱温 65 °C，流动相为 12 mM NaHCO₃，流速为 0.6 mL/min。葡萄糖酸和木糖酸使用 HPLC 测定(LC-20AD，UV/VIS 检测器 SPD-20A，岛津，日本，京都)，色谱柱为 Aminex HPX-87H 色谱柱(Bio-rad，美国，Hercules)，柱

温 55 °C，检测波长 210 nm，流动相为 5 mM 硫酸，流速 0.4mL/min。由于葡萄糖和木糖没有紫外吸收峰，因此可以消除对葡萄糖酸和木糖酸测定的影响。乙酸、糠醛、糠醇、HMF 和羟甲基糠醇和酚类化合物（香草醛、香草醇、丁香醛、丁香醇、4-羟基苯甲醛、4-羟基苯甲醇和松柏醛）的测定方法见 2.2.6。

3.2.6 产品得率的计算

葡萄糖酸得率定义为生成的葡萄糖酸与由葡萄糖生成葡萄糖酸理论值的比值的百分数。

$$\text{葡萄糖酸得率 (\%)} = \frac{[GA] \times V - [GA]_0 \times V_0}{[Glu]_0 \times V_0 \times 1.089} \times 100\%$$

在这里， $[GA]$ 和 $[GA]_0$ 分别表示结束时和最初时的葡萄糖酸浓度 (g/L)； $[Glu]_0$ 表示初始葡萄糖的浓度 (g/L)；1.089 是理论上由葡萄糖生成葡萄糖酸的转化系数，依据于分子量的比值； V 和 V_0 分别表示发酵结束后和最初的发酵液的体积 (L)。

木糖酸得率定义为生成的木糖酸与由木糖生成木糖酸理论值的比值的百分数。

$$\text{木糖酸得率 (\%)} = \frac{[XA] \times V - [XA]_0 \times V_0}{[Xyl]_0 \times V_0 \times 1.107} \times 100\%$$

在这里， $[XA]$ 和 $[XA]_0$ 分别表示结束时和最初时的葡萄糖酸浓度 (g/L)； $[Xyl]_0$ 表示初始木糖的浓度 (g/L)；1.107 是理论上由木糖生成木糖酸的转化系数，依据分子量的比值； V 和 V_0 分别表示发酵结束后和最初的发酵液的体积 (L)。

3.2.7 水泥添加剂性能测试

使用葡萄糖酸和木糖酸放大培养 (50 L 发酵罐) 生产的含有葡萄糖酸钠和木糖酸钠的发酵液经过简单的离心固液分离、活性炭脱色，得到的葡萄糖酸钠和木糖酸钠产品 (液体) 用来作为水泥添加剂对其性能进行测试。得到的液体样品中含有葡萄糖酸钠 132.46 g/L，木糖酸钠 15.90 g/L。本研究选择用来表征水泥添加剂性能的指标主要有三个：凝结时间、净浆流动度和水泥强度。

在测定凝结时间之前，需要确定加水量以确保水泥浆的稠度在标准稠度范围之内，水泥浆的稠度使用水泥标准稠度及凝结时间测定仪 (维卡仪，上海路达实验仪器有限公司，中国，上海) 测定，依据中国国标 GB/T 1346-2011 的标准，维卡仪的水泥稠度试针在 30 s 时间内在水泥浆中下沉 34 ± 1 mm 时，则此时的水泥稠度达到了标准稠度。水泥浆的具体制备过程如下：首先将 500 g 基准水泥加入水泥净浆搅拌机 (NJ-160，无锡建筑工业有限公司，中国，江苏) 中，加入适量的去离子水，在特定的程序下进行搅拌。首先在低速条件下 (桨叶的自传速度为 140 rpm，公转速度为 62 rpm) 搅拌 2 min，暂停 15 s，紧接着在高速条件下 (桨叶的自传速度为 285 rpm，公转速度为 125 rpm) 搅拌 2 min。搅拌结束后快速将水泥浆倒入标准圆锥形试模 (顶端直径 65 mm，底端直径 75 mm，高 40 mm) 中，倒入过量的水泥浆使其高出试模约三分之一，用刮刀轻轻拍打五次，将顶部刮平，立刻放入水泥标准养护箱 (SHBY-40A，沧州华韵实验仪器有限公司，中国，河北)，温度 20 °C，湿度不低于 95%，水泥与水接触的时间记为测试凝结时间的开始时

间。初凝时间的测定：在水泥养护箱中 30min 以后开始第一次测试，将初凝试针装在维卡仪上，使试针与试模的水泥表面接触，固定试针，此时试针调整刻度为 40 mm。快速松开试针后，初凝试针垂直自由落体沉入试模中的水泥浆内，当刻度显示为 4 ± 1 mm 时（即试针与底部相距 4 ± 1 mm 时），则认为水泥浆已经达到初凝状态。当水泥浆接近初凝状态时，每 5min 测试一次，从水泥与水接触开始至此的时间记为初凝时间（min）。终凝时间：试模中的水泥将达到初凝以后，立刻将试模翻转 180° ，直径大端朝上，迅速放入水泥养护箱中。测定时当终凝试针（具有环形附件）进入所测水泥浆块表面 0.5mm 时，即环形附件开始不能在水泥浆块表面留下痕迹时，记为终凝时间（min）。

净浆流动度的测定方法依据中国国标 GB/T 2419-2005，首先称取基准水泥 300 g，去离子水 87mL，选择聚羧酸作为高效减水剂，通过预试验确定聚羧酸的添加量为 0.06%。将水泥、水、聚羧酸以及需要测试的水泥添加剂样品一起加入水泥净浆搅拌机中，在低速条件下（浆叶的自传速度为 140 rpm，公转速度为 62 rpm）搅拌 3min，搅拌结束后快速将水泥浆倒入置于湿润玻璃板上的标准截锥圆模（顶端直径 60 mm，底端直径 75 mm，高 50 mm）中，将水泥浆刮平后迅速提起，水泥浆在玻璃板上辐射状散开，30 s 后测量玻璃板上水泥浆相互垂直的两个直径并取平均值，作为净浆流动度（mm）。

混凝土强度的测定方法依据中国国标 GB/T 17671-1999，首先将水泥、沙、水按照 2:6:1 的比例混合，制成棱柱体试件（40 mm×40 mm×160 mm），立刻放入水泥标准养护箱中养护。测定抗折强度时，将试体的一个长侧面放在水泥压力试验机上（300KN，济南凯恩试验机制造有限公司，中国，山东），通过试验机上加荷圆柱速度均匀地垂直将荷载加到混凝土试体的侧面上，直至折断，一组三个试件抗折结果的平均值记为抗折强度（MPa）。试件折断以后，保持两个半截棱柱体处于潮湿状态进行抗压试验。压板在整个加荷过程中速率均匀运行，直至试件破坏，以一组三个试件折断后形成的六个断件的抗压强度测定值的平均值记为抗压强度（Mpa）。

3.2.8 Aspen Plus 生产工艺模型建立和经济学分析方法

利用玉米秸秆生产葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品的生物炼制工艺模型使用 Aspen Plus 软件（AspenTech Co., Cambridge, MA, USA）建立。基础的模型参数依据 NREL 提供的利用玉米秸秆生产乙醇的设计报告^[310]，但是在几个重要工段有显著的修改。预处理工段，NREL 采用的方法是传统的稀酸预处理，本模型采用的是干式稀酸预处理方法（DDAP）^[133]；脱毒工段，NREL 采用的是过碱中和法，本模型采用的是在位固态生物脱毒^[180]；同步糖化与发酵工段，木质纤维素原料的固体含量从 NREL 的 20%（w/w）提高到 30%（w/w）；产品回收工段，NREL 的产品是乙醇，本模型的产品是葡萄糖酸钠和木糖酸钠。设计生产规模为每天处理 900 吨秸秆（30 万吨每年），每年工作时间 8000 小时。

Aspen Plus 模型工艺流程图共包括 10 个工段（见图 3.1）：原料收集、预处理、生物脱毒、酶解和发酵、纤维素酶生产、产品回收、废水处理、残渣焚烧、储存和公共应用系统。A200 工段是干式稀酸预处理（DDAP）单元，原料在经过稀硫酸预处理的过程中，

固体原料与稀硫酸溶液的质量比为 2:1，硫酸的质量分数为 2.5%。A300 工段是生物脱毒单元，在位固态生物脱毒所使用的脱毒菌株为 *A. resinae* ZN1，脱毒体系在充分氧气供给的情况下，将预处理后玉米秸秆中的大部分抑制物脱除只需要 36 h。A400 工段是酶解和发酵，经过预处理和脱毒以后的玉米秸秆以 30%的固体含量被纤维素酶水解，其中的葡萄糖和木糖被 *G. oxydans* DSM 2003 转化成葡萄糖酸和木糖酸，随后立即被氢氧化钠中和，生成葡萄糖酸钠和木糖酸钠产品。A500 工段是产品回收，葡萄糖酸钠和木糖酸钠混合产品经过固液分离、活性炭脱色和多效蒸发以后得到纯度为 98% (w/w) 的产品。本 Aspen Plus 模型的工艺流程中其他工段与 NREL 的模型保持一致。

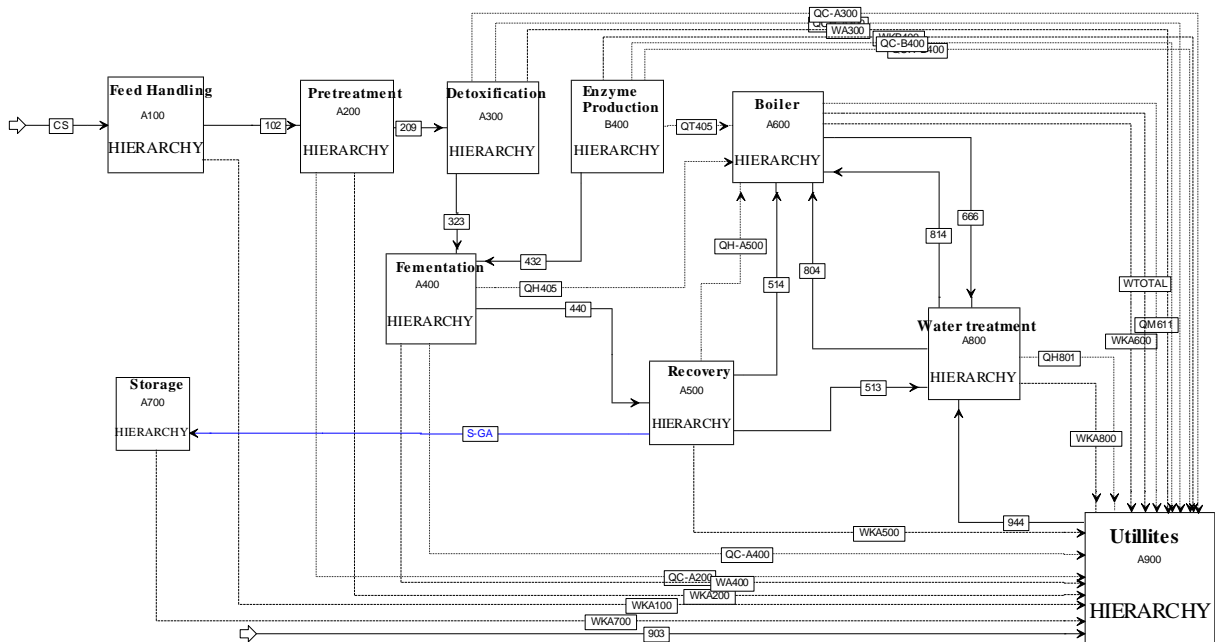


图 3.1 玉米秸秆原料生产纤维素葡萄糖酸钠的 Aspen Plus 模型流程图

Fig. 3.1 Aspen Plus modeling flowchart of cellulosic sodium gluconate production from corn stover feedstock

表 3.1 玉米秸秆原料的组成

Table 3.1 Composition of corn stover feedstock

Components	Dry matter (w/w, %)
Glucan	35.78
Xylan	19.36
Lignin	28.36
Ash	3.56
Acetate	1.81
Protein	3.10
Extractives	14.65
Arabinan	2.38
Galactan	1.43
Mannan	0.60
Water	15.00

表 3.2 木质纤维素干法生物炼制过程中主要反应器报价

Table 3.2 Prices provided by the vendors for main reactors used in dry lignocellulose biorefinery process.

Reactors	Size (m ³)	Material	Price (\$)	Year of Quote
Pretreatment reactors	10	SS316L	161,290 ^a	2014
Biodetoxification reactors	500	SS304	291,363 ^a	2014
Saccharification reactors	100	SS340	63,382 ^a	2014
SSF reactors	800	SS340	404,874 ^a	2014
Helical impeller mounted on pretreatment reactors	10	SS316L	18,000 ^{db}	2014
Helical impeller mounted on saccharification reactors	100	SS340	25,102 ^b	2014

^a 由周口压力容器制造厂提供，中国，河南周口。

^b 由杭州远征化工科技设备有限公司提供，中国，浙江杭州。

表 3.3 成本分析中原材料的售价

Table 3.3 Raw material unit cost for cost analysis

Raw material cost	Cost (2013\$, per metric ton)
Feedstock (corn stover)	\$61.72
Sulfuric acid, 93%	\$53.33
Lime	\$142.23
Sodium hydroxide	\$483.87
Glucoamylase	\$4838.71
Diammonium phosphate	\$1111.24
Boiler chemicals	\$5625.31
Cooling tower chemicals	\$3371.25
Fresh water	\$0.29

表 3.4 折现现金流分析参数

Table 3.4 Discounted cash flow analysis parameters

Plant life	30 years
Discount rate	8%
General plant depreciation	200% declining balance (DB)
General plant recovery period	7 years
Steam plant depreciation	150% DB
Steam plant recovery period	20 years
Corporate income tax	15%
Financing	40% equity
Loan terms	10-year loan at 6.55% APR
Construction period	1 years
Working capital	5% of fixed capital investment
Start-up time	3 months
Revenues during start-up	50%

Aspen Plus 模型中的物料和能量平衡数据被用来设计工厂生产设备的规模以及确定原料的用量。模型中所用到的商品价格标准参照 2013 年的物价水平, 美元兑换人民币的汇率为 1:6.2。常见的通用设备如泵、输送带和蒸发器参考 NREL 的价格^[310]。特定的设备如螺带搅拌式预处理反应器、螺带搅拌式生物反应器、化学品和员工薪资等根据中国的实际情况进行了调整。原料的成分、生产工艺中使用的主要设备和化学品的价格分别列在表 3.1, 3.2, 3.3 中。值得一提的是, 生产过程中剩余的固体残渣可用来焚烧发电, 依照中华人民共和国国家发展和改革委员会印发的《可再生能源发电价格和费用分摊管理试行办法》的规定 (http://www.gov.cn/ztlz/2006-01/20/content_165910.htm), 入网价格为 0.75 CNY/kWh。

通过折现现金流量分析, 在净现值为零、内部收益率为 8% 时计算葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品的最低售价 (Minimum Sodium Gluconate/xylonate product Selling Price, MGSP, \$/kg)。表 3.4 列出了在折现现金流分析中的假设参数。

3.3 结果与讨论

3.3.1 *G. oxydans* ATCC 621H 葡萄糖酸生产性能及菌种驯化

G. oxydans ATCC 621H 是工业上用来生产葡萄糖酸最常用的菌株之一, 首先尝试用来取代 *A. niger* SIIM M276 作为本章节的葡萄糖酸生产菌株。首先对 *G. oxydans* ATCC 621H 的葡萄糖酸生产性能进行测定, 结果见图 3.2。*G. oxydans* ATCC 621H 在葡萄糖合成培养基中表现出较好的葡萄糖酸生产性能, 初始 60 g/L 左右的葡萄糖在 24 h 基本被消耗完, 28h 时产生葡萄糖酸达到最高值 58.65g/L, 葡萄糖酸的转化率为 93.54%, 同时 *G. oxydans* ATCC 621H 的葡萄糖酸生产速率 (2.04 g/L/h) 与 *A. niger* SIIM M276 (1.39 g/L/h) 相比有明显的提高。然而在随后的 15% 固体含量的新鲜玉米秸秆水解液中, 其主要成分为: 54.49 g/L 葡萄糖, 23.53 g/L 木糖, 3.24 g/L 乙酸, 0.20 g/L HMF, 0.31 g/L 糠醛, *G. oxydans* ATCC 621H 的发酵产酸情况却并不能令人满意, 与在葡萄糖合成培养基中发酵性能相比, 同样 32 h 发酵时间内只有 16.15 g/L 葡萄糖被消耗, 16.01 g/L 的葡萄糖酸产生, 说明新鲜玉米秸秆水解液中的抑制物对 *G. oxydans* ATCC 621H 生长和产酸都造成明显的影响。图 3.2c 可以看出, 在 32h 时, 糠醛和 HMF 都没有被消耗完, 尤其是 HMF 浓度几乎没有明显的降低。*G. oxydans* ATCC 621H 虽然在合成培养基中发酵性能优良, 但是在新鲜玉米秸秆水解液中的葡萄糖酸生产性能并不能让人满意。

为了提高 *G. oxydans* ATCC 621H 在新鲜玉米秸秆水解液中的葡萄糖酸生产性能, 采用微生物驯化策略, 这也是在实际生产中提高微生物对恶劣环境耐受性的一种常用策略, 主要原理是利用微生物为了适应某特定环境从而自身发生特定突变以适应该环境的特点, 将微生物长期在一定的环境胁迫下培养, 并通过不断的转接传代, 将发生优势突变体一代代筛选保留下来, 最终获得期望得到的具有特定优良性状的突变菌株^[308]。这种方法广泛应用于筛选抗胁迫如酸、碱、抗生素、抑制物等的微生物, 优化或激活特定产物的合成途径来生产特殊生物产品, 提高微生物代谢物产量^[311-313]。

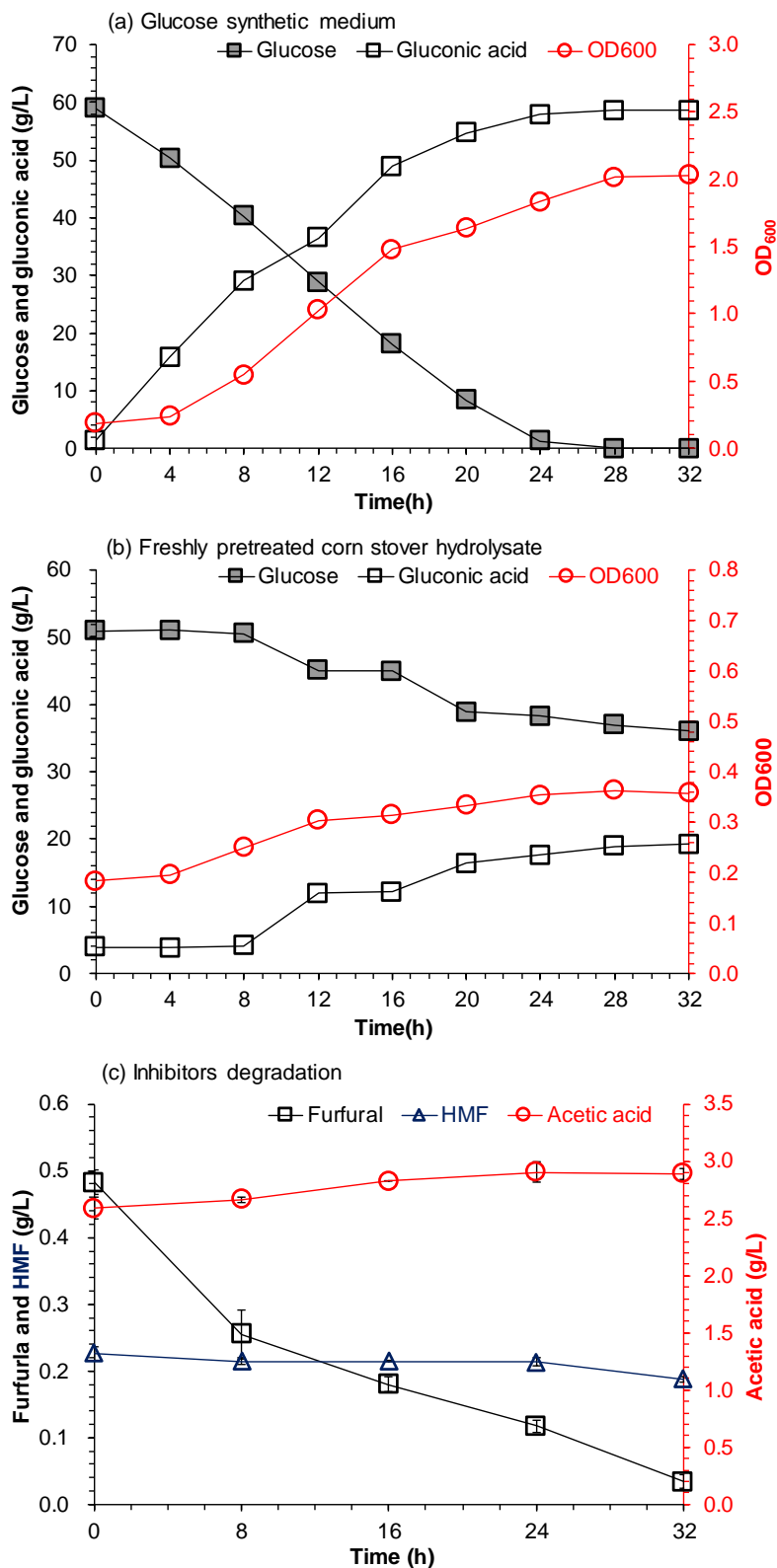


图 3.2 *G. oxydans* ATCC 621H 的葡萄糖酸生产性能

(a) 葡萄糖合成培养基; (b) 新鲜玉米秸秆水解液; (c) 水解液中抑制物。在 250 mL 摇瓶中进行, 装液量 20%, 温度 30 °C, 转速 220 rpm, pH 5.5, 接种量 10%。

Fig. 3.2 Gluconic acid productivity of *G. oxydans* ATCC 621H

(a) Glucose synthetic medium; (b) Freshly pretreated corn stover hydrolysate; (c) Inhibitors in hydrolysate. In 250 mL flask, liquid volume 20%, 30 °C, 220 rpm, pH 5.5, inoculum size 10%.

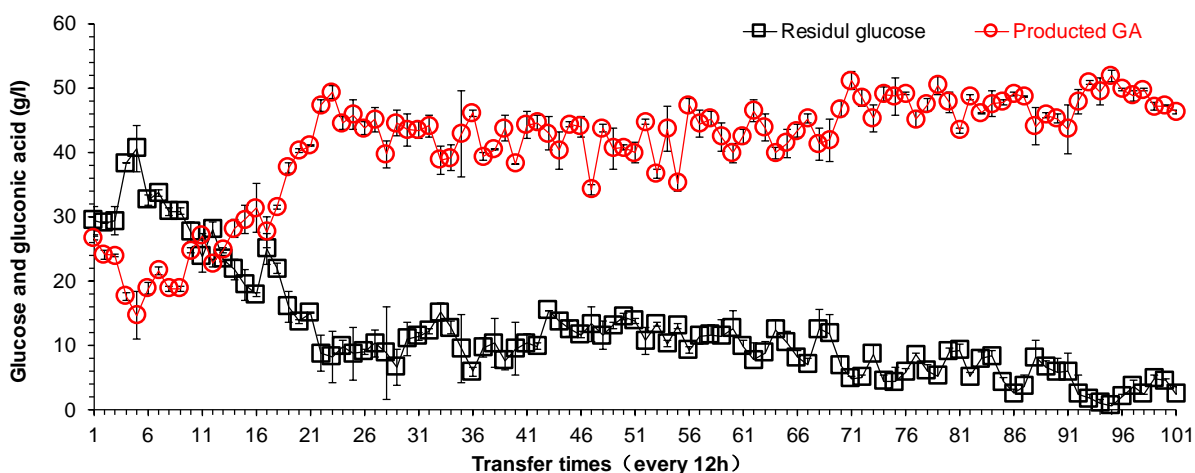


图 3.3 *G. oxydans* ATCC 621H 在新鲜玉米秸秆水解液混合培养基中驯化

Fig. 3.3 Adaptation of *G. oxydans* ATCC 621H in freshly pretreated corn stover hydrolysate

由于 *G. oxydans* ATCC 621H 不能直接在 15% 固体含量的新鲜玉米秸秆水解液中生长，将 15% 固体含量新鲜玉米秸秆水解液用等体积等葡萄糖浓度的合成培养基稀释后的混合培养基中用来对 *G. oxydans* ATCC 621H 进行驯化，培养条件保持不变，为了提高驯化效率，将接种量提高为 20%，每一代培养的时间为 12h，驯化结果见图 3.3，在驯化过程中，对残留葡萄糖和产生的葡萄糖酸进行监测。结果表明 *G. oxydans* ATCC 621H 通过驯化的方法，在混合培养基中的葡萄糖酸生产性能得到很大的提升，在 0-20 代中，葡萄糖酸的积累浓度比较低，且很不稳定，随着驯化代数的增加，产酸性能逐步提高，残留的葡萄糖浓度越来越低，产生的葡萄糖酸的浓度越来越高。在 95 代左右几乎可以在 12h 内完全将葡萄糖转化成葡萄糖酸，此时产酸的性能已经比较稳定，驯化在 101 代时结束。将驯化 101 代以后的驯化菌株与原始菌株在同样的条件下进行比较，结果见图 3.4。

从图 3.4a 可以看出，经过驯化后的 *G. oxydans* ATCC 621H 产酸性能明显优于原始菌株，28h 内将 50.75 g/L 葡萄糖完全消耗，产生了 50.54 g/L 葡萄糖酸，生产速率与原始 *G. oxydans* ATCC 621H 在合成培养基中接近，说明在驯化后的 *G. oxydans* ATCC 621H 在玉米秸秆水解液中的生长和产酸性能都得到明显的提升，同时也说明了与真菌相比，通过驯化策略来提高微生物抗逆性更适用于细菌。将驯化后的 *G. oxydans* ATCC 621H 接入更高固体含量（20%）的新鲜玉米秸秆水解液中，其主要成分为 72.20 g/L 葡萄糖，37.60 g/L 木糖，4.28 g/L 乙酸，0.48 g/L HMF，0.51 g/L 糠醛。随着固体含量的增加，制得的新鲜玉米秸秆水解液中抑制物浓度也有明显的提高，发酵结果见图 3.4b。高浓度的抑制物仍然对驯化后的 *G. oxydans* ATCC 621H 的生长和产酸速率都产生很大的抑制，驯化策略虽然有效地增强了 *G. oxydans* ATCC 621H 对玉米秸秆水解液体系的适应性，但是仍然存在比较大的局限性，这可能是由于原始 *G. oxydans* ATCC 621H 自身对木质纤维素来源抑制物耐受性过弱导致的。

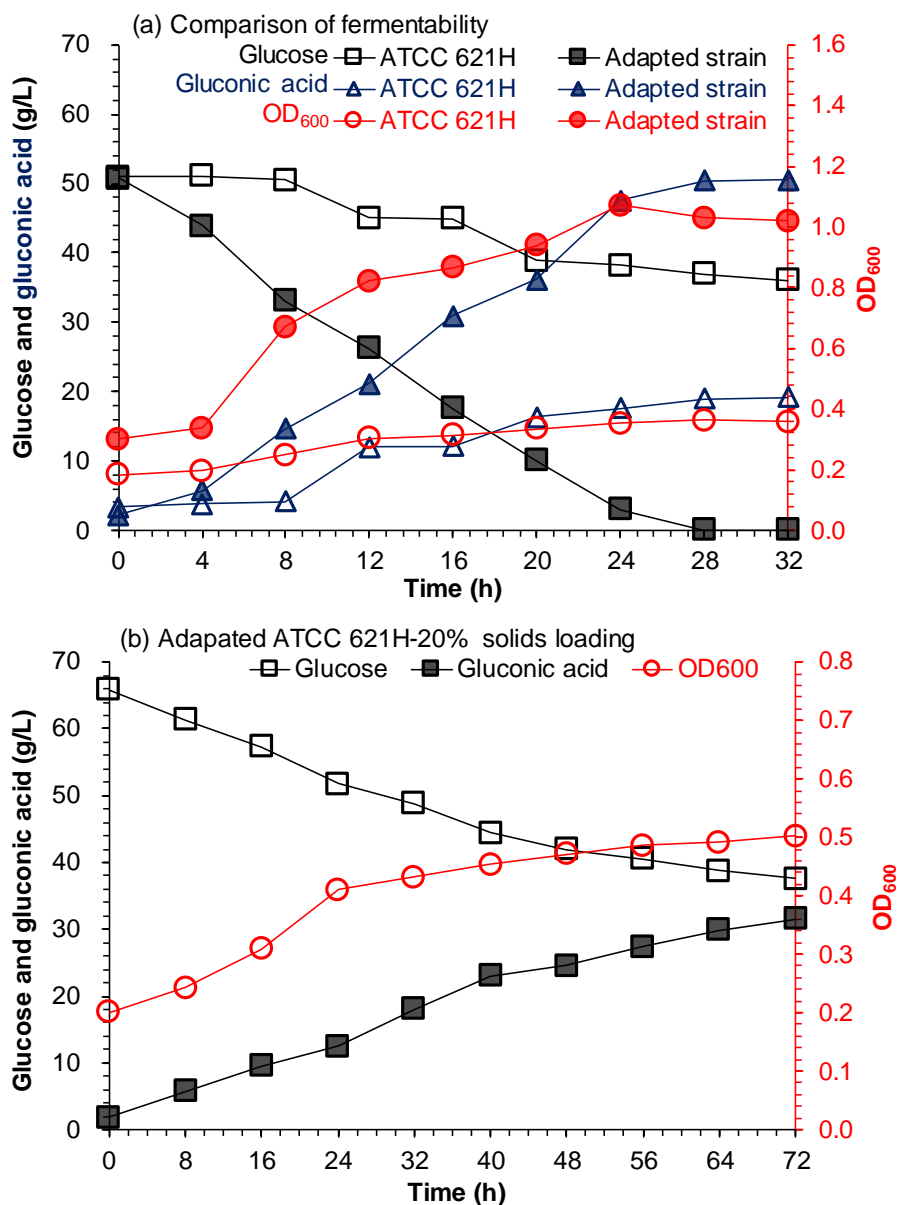


图 3.4 *G. oxydans* ATCC 621H 驯化菌株和原始菌株在新鲜玉米秸秆水解液中生产葡萄糖酸
 (a) 驯化菌株和原始菌株发酵性能比较; (b) 驯化菌株在 20% 固体含量新鲜玉米秸秆水解液中发酵情况。在 250 mL 摇瓶中进行, 装液量 20%, 温度 30 °C, 转速 220 rpm, pH 5.5, 接种量 10%。

Fig. 3.4 Gluconic acid production in freshly pretreated corn stover hydrolysate by *G. oxydans* ATCC 621H and adapted strain

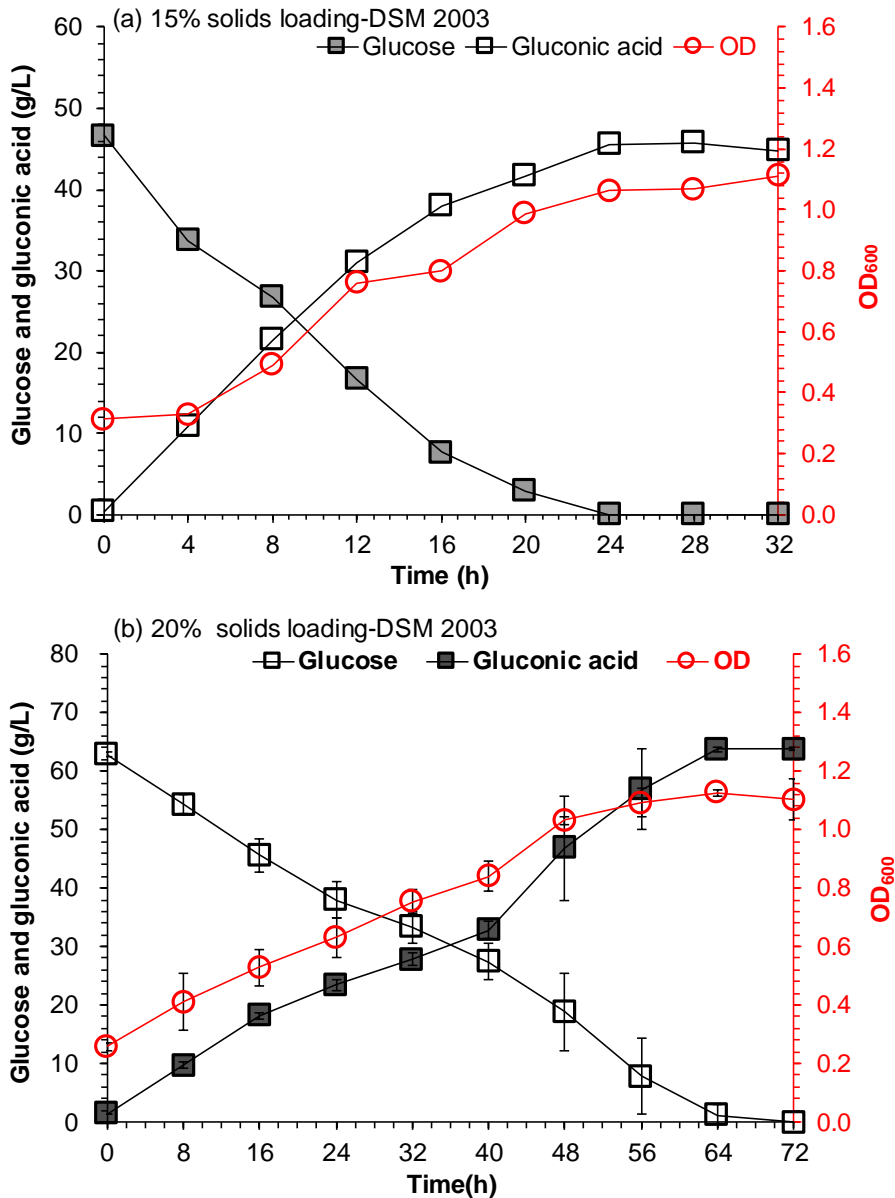
(a) Comparison of adapted strain and *G. oxydans* ATCC 621H; (b) Adapted strain in 20% solids loading freshly pretreated corn stover hydrolysate. In In 250 mL flask, liquid volume 20%, 30 °C, 220 rpm, pH 5.5, inoculum size 10%.

为了进一步增强 *G. oxydans* ATCC 621H 在高抑制物浓度新鲜玉米秸秆水解液中的发酵性能, 将在混合培养基中驯化 101 代的 *G. oxydans* ATCC 621H 转接入 15% 新鲜玉米秸秆水解液中继续进行驯化。但结果并不理想, 在 101-103 代时发酵性能还能保持稳定, 但 103 代以后菌体的生长和发酵产酸能力均迅速下滑, 菌体量逐代降低, 使得驯化

难以继续进行, 到 107 代时, 菌体几乎无法生长。综上所述, *G. oxydans* ATCC 621H 虽然是一株实际生产中应用广泛的工业菌株, 但并不适应木质纤维素生物炼制体系, 仍需要寻找一株自身对抑制物具有良好耐受性的菌株。

3.3.2 *G. oxydans* DSM 2003 利用新鲜玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸

微生物能够耐受玉米秸秆水解液中抑制物, 在水解液中保持良好的生长和发酵性能, 主要归结于自身具有降解这些高毒性化合物的能力, 或者可以将这些高毒性化合物(如醛类)转化成毒性较弱的化合物(如醇类、酸类), 这就需要微生物本身具有较强的氧化还原能力。有研究表明, *G. oxydans* DSM 2003 的细胞膜表面的氧化还原酶系活性比 *G. oxydans* ATCC 621H 更强, 氧化还原活性强将会更有利于降解转化预处理过程中产生的抑制物^[314-316]。



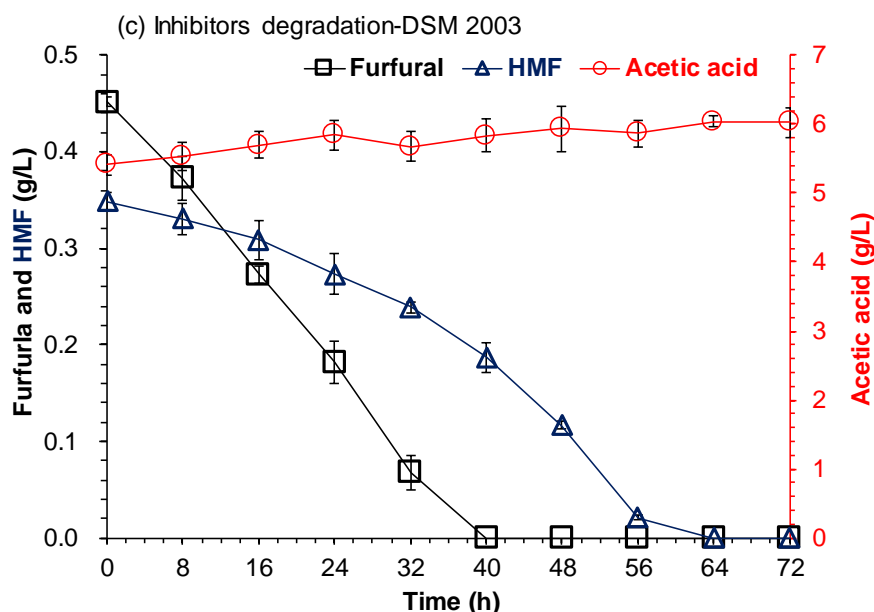


图 3.5 *G. oxydans* DSM 2003 在新鲜玉米秸秆水解液中发酵生产葡萄糖酸

(a) *G. oxydans* DSM 2003 在 15% 固体含量新鲜玉米秸秆水解液中发酵情况；(b) *G. oxydans* DSM 2003 在 15% 固体含量新鲜玉米秸秆水解液中发酵情况；(c) 在 20% 固体含量新鲜玉米秸秆水解液中抑制物浓度。

Fig. 3.5 The fermentation of *G. oxydans* DSM 2003 in freshly pretreated corn stover hydrolysate (a) *G. oxydans* DSM 2003 in 15% solids loading freshly pretreated corn stover hydrolysate; (b) *G. oxydans* DSM 2003 in 20% solids loading freshly pretreated corn stover hydrolysate; (c) Inhibitors of *G. oxydans* DSM 2003 in 20% solids loading freshly pretreated corn stover hydrolysate.

首先将 *G. oxydans* DSM 2003 接入 15% 固体含量的新鲜玉米秸秆水解液中，*G. oxydans* DSM 2003 表现出了卓越的葡萄糖酸发酵性能，46.70 g/L 葡萄糖在 24 h 被消耗完，得到了葡萄糖酸 45.60 g/L，葡萄糖酸的速率和得率分别是 1.88 g/L/h 和 93.21%，与在葡萄糖合成培养基中的发酵结果接近（图 3.5a）。随后将 *G. oxydans* DSM 2003 直接接入更高固体含量（20%）的新鲜玉米秸秆水解液中，葡萄糖浓度增加的同时抑制物浓度也更高，其生长情况和葡萄糖酸生产情况见图 3.5b。令人惊喜的是，*G. oxydans* DSM 2003 在 20% 固体含量的新鲜玉米秸秆水解液中依然表现了优良的葡萄糖酸生产性能，这种足以严重抑制 *G. oxydans* ATCC 621H（以及驯化后的菌株）生长和发酵性能的玉米秸秆水解液并没有对 *G. oxydans* DSM 2003 造成严重的影响，不过依然在一定程度上降低了菌体的生产速率和葡萄糖酸的产率。在 64 h 时葡萄糖几乎被完全消耗，产生了 63.76g/L 葡萄糖酸，葡萄糖酸的产率达到 0.97 g/L/h，得率达到 95.68%。

在整个发酵过程中，对三种主要的抑制物（糠醛、HMF 和乙酸）进行监测（图 3.5c）。结果表明，*G. oxydans* DSM 2003 转化糠醛的能力特别强，在同样新鲜玉米秸秆水解液中糠醛的转化速率要明显高于 *A. niger* SIIM M276。*G. oxydans* DSM 2003 对 HMF 也有比较好的转化能力，但是对乙酸却不能降解，这可能与 *G. oxydans* 的 TCA 循环路径不完整有关，不能将乙酸降解为二氧化碳和水。总体来说，在 20% 固体含量的新鲜玉米秸

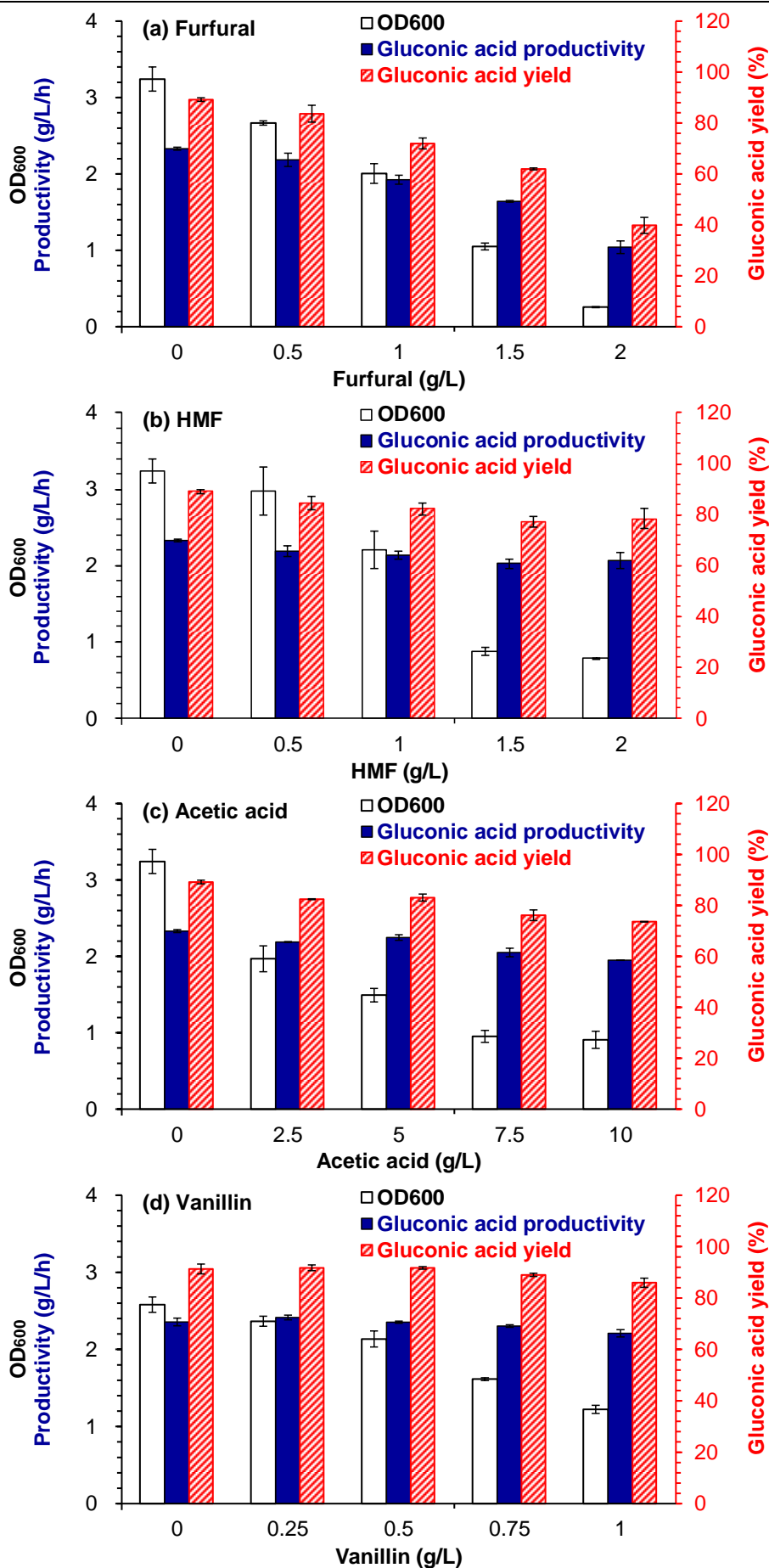
秆水解液中, *G. oxydans* DSM 2003 表现出了更强的抑制物的耐受性, 更适合玉米秸秆水解液的体系, 最终选择 *G. oxydans* DSM 2003 作为后续研究中的葡萄糖酸生产菌株。

3.3.3 *G. oxydans* DSM 2003 对木质纤维素来源抑制物的耐受性及转化性能

G. oxydans DSM 2003 在含有较高浓度抑制物的新鲜玉米秸秆水解液中表现出优良的耐受性和产酸性能, 但抑制物的存在依然会对 *G. oxydans* DSM 2003 的生长和葡萄糖酸的产率有一定的影响, 为了了解单一抑制物对 *G. oxydans* DSM 2003 的影响, 对 *G. oxydans* DSM 2003 在单一抑制物胁迫下的菌体生长、葡萄糖酸产率和得率进行了详细的研究, 结果见图 3.6。从稀酸预处理过程中产生的三大类抑制物中选择 6 种典型的抑制物, 包括 2 种呋喃类衍生物-糠醛和 HMF; 1 种弱酸类化合物-乙酸; 和 3 种酚类化合物: 对羟基苯基类 (H) 的 4-羟基苯甲醛, 丁香基类 (S) 的丁香醛, 愈疮木酚基类 (G) 的香草醛。同种抑制物浓度范围的设定与 *A. niger* SIIM M276 基本保持一致。

糠醛作为稀酸预处理过程中产生的浓度较高、毒性较强的典型呋喃类抑制物, 对 *A. niger* SIIM M276 具有很强的抑制作用, 是影响 *A. niger* SIIM M276 在新鲜玉米秸秆水解液中发酵性能的主要因素之一。图 3.6a 显示糠醛对 *G. oxydans* DSM 2003 的生长产生了也比较强的抑制作用, 菌体的生长在 1.5 g/L 时减少了一半; 当糠醛的浓度达到 2.0 g/L 时, *G. oxydans* DSM 2003 的生长代谢几乎完全停止, 菌体浓度没有明显的变化。但是值得注意的是, 即使在糠醛浓度为 2.0 g/L 时, 菌体生长被完全抑制, 依然有一定浓度的葡萄糖酸产生, 32 h 时葡萄糖酸的产率达到对照组的约 50%。这表明了抑制物胁迫下, *G. oxydans* DSM 2003 与 *A. niger* SIIM M276 相比具有更强的葡萄糖酸生产性能, *G. oxydans* 催化葡萄糖生成葡萄糖酸主要依靠位于膜上的葡萄糖脱氢酶, 受到抑制物胁迫时即使菌体停止生长或者死亡, 葡萄糖脱氢酶可能受抑制物影响比较小, 依然可以发挥作用, 继续产生葡萄糖酸; *A. niger* 生产葡萄糖酸依靠位于细胞内的葡萄糖氧化酶, 其可以分泌至胞外, 但需要受到细胞的调控, 当受到抑制物胁迫时菌体生长代谢被抑制, 葡萄糖氧化酶的分泌也会受到影响, 从而导致葡萄糖酸的产率大幅度下降。这也说明了选择 *G. oxydans* 作为木质纤维素生物炼制工艺中的葡萄糖酸生产菌株比 *A. niger* 更有优势。另一种呋喃类化合物 HMF 对 *G. oxydans* DSM 2003 的生长也有比较明显的影响, 当 HMF 浓度高于 1.5 g/L 时, 菌体生长特别缓慢, 32 h 时菌体浓度只有对照的三分之一左右 (图 3.6b)。但是 HMF 对于葡萄糖酸的产生并没有明显的影响, 即使 HMF 浓度高达 2 g/L, 葡萄糖酸的产率几乎与对照相同。与 *A. niger* SIIM M276 相比, *G. oxydans* DSM 2003 在 HMF 胁迫下菌体生长受到的抑制性更强, 推测 HMF 可能是在玉米秸秆水解液中对 *G. oxydans* DSM 2003 其主要抑制作用的抑制物。

对弱酸类抑制物来讲, 随着乙酸的浓度增加, *G. oxydans* DSM 2003 的发酵性能只有微弱的降低, 在 10 g/L 的乙酸浓度时, 葡萄糖酸的产率也几乎没有受到影响, 但是在这个浓度下 *G. oxydans* DSM 2003 的生长受到比较明显的抑制, 只有对照组菌体浓度的 30% 左右。即使在乙酸浓度为 5.0 g/L 时菌体浓度只有对照的 50% 左右。整体分析, 乙酸对 *G. oxydans* DSM 2003 的产酸性能影响非常有限 (图 3.6c)。



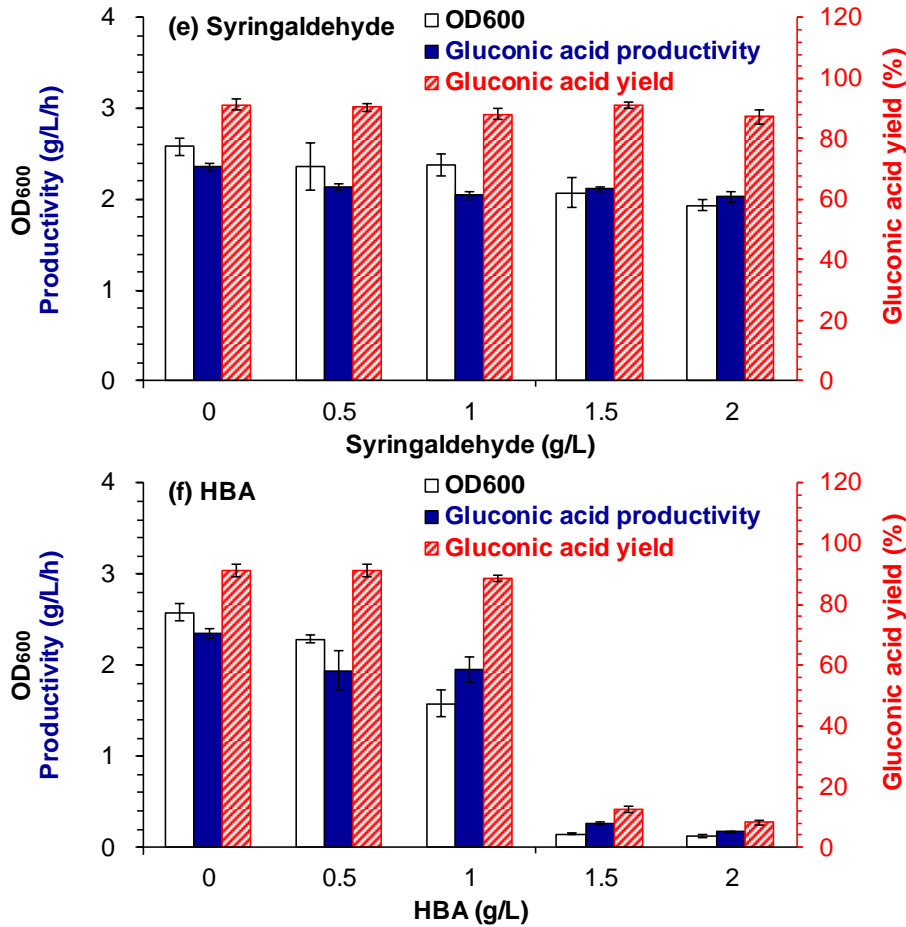


图 3.6 抑制物对 *G. oxydans* DSM 2003 的生长、葡萄糖酸产率和得率的影响 (32 h)

(a) 糠醛; (b) HMF; (c) 乙酸; (d) 香草醛; (e) 丁香醛; (f) 4-羟基苯甲醛。在 250mL 摇瓶中进行, 条件为温度 30 °C, pH 5.5, 转速 220 rpm, 装液量 20%, 接种量 10%。

Fig. 3.6 Inhibitor tolerance on cell growth, gluconic acid productivity and gluconic acid yield of *G. oxydans* DSM 2003 (32 h).

(a) Furfural; (b) HMF; (c) Acetic acid; (d) Vanillin; (e) Syringaldehyde; (f) 4-Hydroxybenzaldehyde (HBA). In 250 mL flasks, conditions: 30 °C, pH 5.5, 220 rpm, liquid volume ratio 20%, inoculate size 10%.

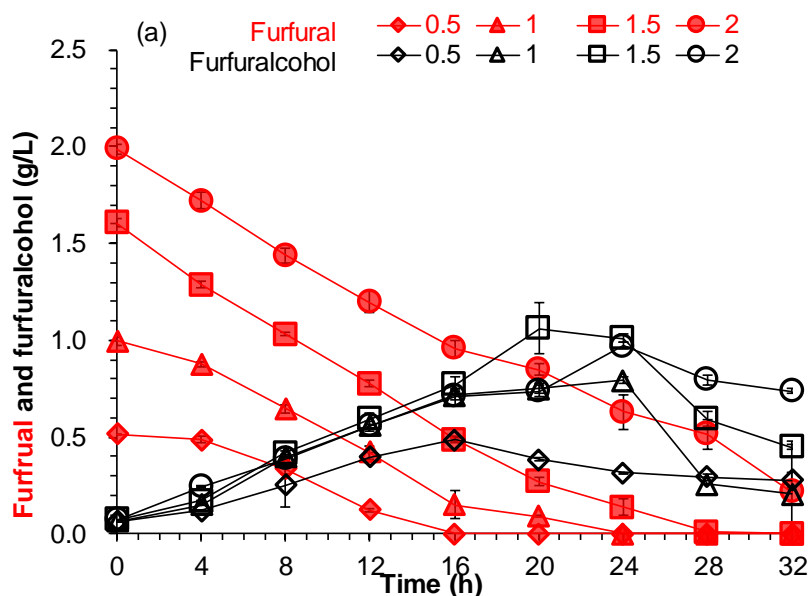
对酚类抑制物来说, 4-羟基苯甲醛对 *G. oxydans* DSM 2003 的发酵性能表现出了最强的抑制作用, 在浓度大于 1.0 g/L 时其生长代谢几乎完全停止。而且高浓度的 4-羟基苯甲醛不止对菌体的生长抑制明显, 还对葡萄糖酸的产率产生强烈的抑制, 比另外两种酚类抑制物毒性要更强, 可能是 4-羟基苯甲醛对葡萄糖脱氢酶的活性也有影响(图 3.6f)。香草醛也对 *G. oxydans* DSM 2003 具有比较强的抑制作用, 当香草醛浓度为 1.0 g/L, 菌体浓度只有对照的一半, 但是对葡萄糖酸的产率和得率影响比较弱(图 3.6d)。在三种酚类化合物中, 对 *G. oxydans* DSM 2003 抑制最弱的是丁香醛, 在 0-2.0 g/L 的范围内, 菌体的生长和葡萄糖酸的生产受到的影响都比较微弱(图 3.6e)。这些结果表明了 *G. oxydans* DSM 2003 对这些玉米秸秆水解液中的典型抑制物具有相当卓越的耐受性, 而且其葡萄糖酸的生产性能受抑制的影响更小, 整体性能要优于 *A. niger* SIIM M276。在这 6 中典型的抑制物中, 高浓度的糠醛、HMF 以及酚类物质虽然都会对 *G. oxydans* DSM 2003

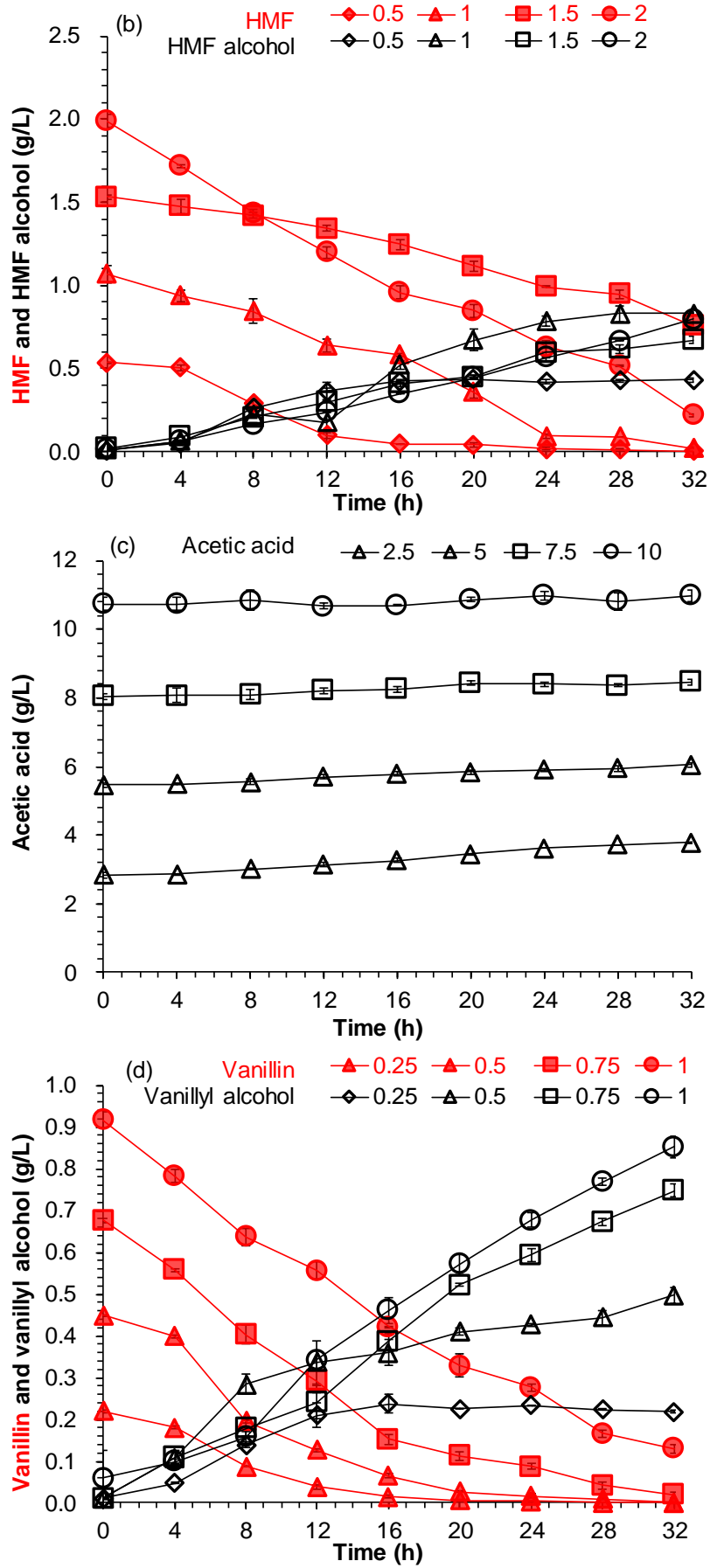
的生长有比较明显的影响,但是对葡萄糖酸的产率影响要弱于对生长的抑制。即使细胞浓度很低,依然会将葡萄糖转化成葡萄糖酸,表现出更强的葡萄糖酸生产能力。这也说明了这些抑制物虽然影响了菌体的生长但是可能并不会对葡萄糖脱氢酶的活性造成明显的抑制,这也是 *G. oxydans* DSM 2003 利用木质纤维素原料生产葡萄糖酸的一大优势。

G. oxydans DSM 2003 对这些抑制物体现出优良的耐受性,归结于其具有较强的把高毒性抑制物转化为对菌体生长和葡萄糖酸发酵毒性较低化合物的能力(图 3.7)。尤其是对于呋喃类抑制物,即使糠醛浓度达到 2.0 g/L 时,在 32 h 内可以将其转化 80%左右,生成对应毒性较低的糠醇(图 3.7a)。随后糠醇的浓度开始降低,可能是进一步转化生成了毒性更弱糠酸,或者通过别的途径进行降解。*G. oxydans* DSM 2003 转化糠醛的能力要明显强于 *A. niger* SIIM M276,即使在 2.0 g/L 糠醛的胁迫下 *G. oxydans* DSM 2003 菌体生长受到严重抑制,但是依然可以对糠醛进行快速的转化。然而,*G. oxydans* DSM 2003 对 HMF 的转化能力要弱于糠醛,当 HMF 浓度达到 2.0 g/L 时,32 h 内 *G. oxydans* DSM 2003 只能转化 50%左右的 HMF 生成队形毒性较低的 HMF 醇(图 3.7b)。

对于弱酸类抑制物来说,*G. oxydans* DSM 2003 由于缺少 TCA 循环的关键酶,导致 TCA 循环缺失,不能降解乙酸生成二氧化碳和水,相反在生长代谢过程中还会生成少量的乙酸,这是由于 *G. oxydans* DSM 2003 在代谢过程中会产生乙酸^[251](图 3.7c)。

对酚类抑制物来说,*G. oxydans* DSM 2003 对香草醛表现出很强的转化能力,生成对应低毒性香草醇,1.0 g/L 的香草醛在 32 h 内可以被转化 80%以上,这也解释了 *G. oxydans* DSM 2003 之所以对香草醛耐受性比较强。但是对丁香醛的转化情况比较特殊,从 *G. oxydans* DSM 2003 在丁香醛胁迫下的生长和葡萄糖酸生产性能来看,丁香醛对其抑制作用很有限,但是图 3.7d 所示,*G. oxydans* DSM 2003 对丁香醛并没有很好的转化能力,即使在只有 0.5 g/L 的丁香醛胁迫下 32 h 也只有约 50%的丁香醛被转化,可能 *G. oxydans* DSM 2003 内部还存在其他抵抗丁香醛抑制作用的途径。





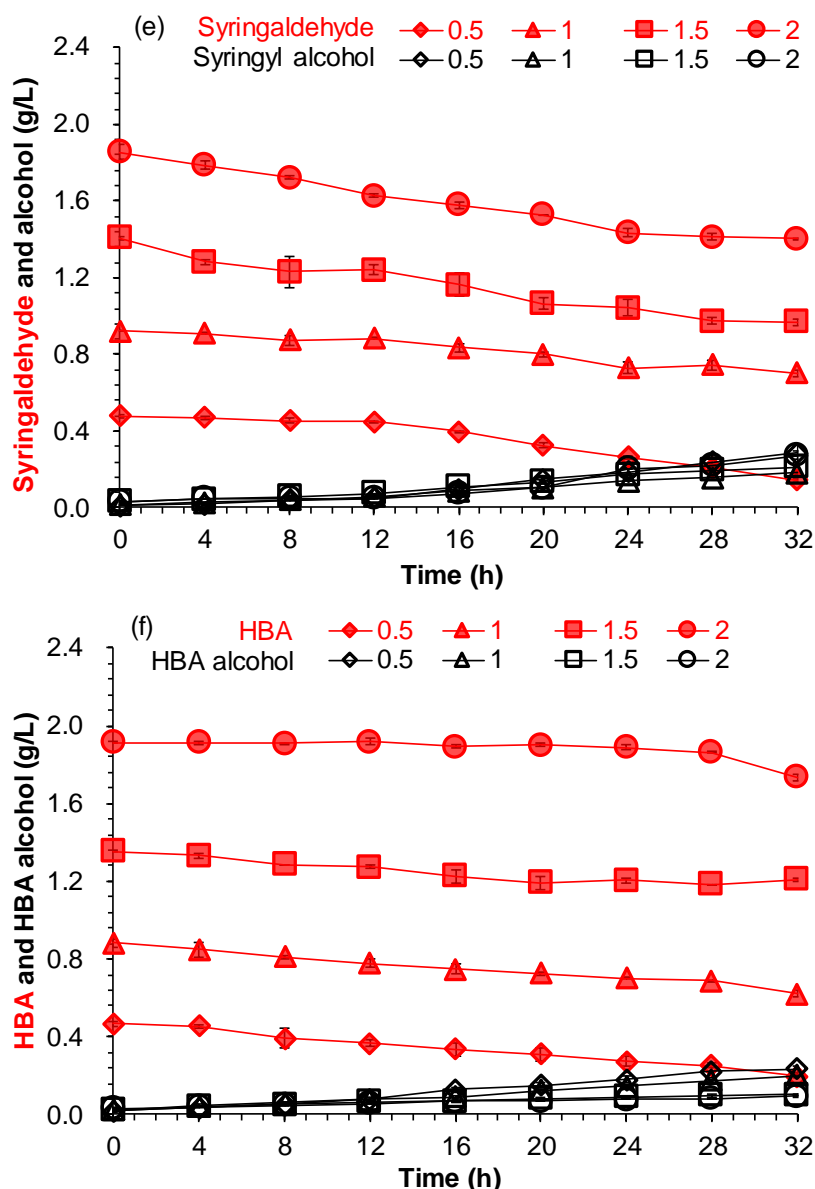


图 3.7 *G. oxydans* DSM 2003 对抑制物的转化

(a) 糠醛；(b) HMF；(c) 乙酸；(d) 香草醛；(e) 丁香醛；(f) 4-羟基苯甲醛。在 250mL 摇瓶中进行，条件为温度 30 °C，pH 5.5，转速 220 rpm，装液量 20%，接种量 10%。

Fig. 3.7 Inhibitors degradation of *G. oxydans* DSM 2003.

(a) Furfural; (b) HMF; (c) Acetic acid; (d) Vanillin; (e) Syringaldehyde; (f) 4-Hydroxybenzaldehyde (HBA). In 250 mL flasks, conditions: 30 °C, pH 5.5, 220 rpm, liquid volume ratio 20% in 250 mL flasks, inoculate size 10%.

在三种酚类抑制物中，4-羟基苯甲醛（HBA）表现的毒性最强，*G. oxydans* DSM 2003 对 HBA 转化能力也最弱，即使在 0.5 g/L HBA 的胁迫下，32 h 转化率不足 40%，更高浓度 HBA 条件下，几乎没有转化发生（图 3.7f）。以上结果表明了 *G. oxydans* DSM 2003 能够在高毒性的玉米秸秆水解液中存活是依靠其对多种抑制物具有较强的耐受性，以及强大的可以将这些醛类抑制物包括呋喃醛和酚醛转化生成低毒性的相应的醇的能力，从而缓解了生长和发酵性能的胁迫压力。整体上比较，*G. oxydans* DSM 2003 对水解液中

主要抑制物的耐受性和转化能力要强于 *A. niger* SIIM M276，这也是 *G. oxydans* DSM 2003 能够在高固体含量未脱毒的新鲜玉米秸秆水解液中进行葡萄糖酸发酵并保持较高葡萄糖酸生产速率的重要原因。

3.3.4 *G. oxydans* DSM 2003 利用玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸和木糖酸

3.3.4.1 *G. oxydans* DSM 2003 在新鲜玉米秸秆水解液中的产酸研究

G. oxydans DSM 2003 在摇瓶中利用 15%、20% 固体含量的新鲜水解液可以保持优秀的葡萄糖酸生产性能，但是由于摇瓶的局限性，葡萄糖酸的生产速率依然比较低。在 *G. oxydans* 的葡萄糖酸和木糖酸生产过程中，对氧气的需求量很大^[220, 267]，从摇瓶发酵的结果来看，葡萄糖酸的生产速率从发酵开始一直保持稳定，即使菌体浓度增加，葡萄糖酸的生产速率并没有明显的提高，这可能是葡萄糖酸的生产速率受到摇瓶中溶氧水平的限制。使用发酵罐可以更好的为微生物发酵提供氧气，而且可以更精确的控制 pH 和温度，有利于提高葡萄糖酸生产速率。*G. oxydans* DSM 2003 在 3 L 发酵罐中进行葡萄糖酸和木糖酸的生产，使用的转速为 500 rpm，通气量 2.5 vvm，pH 控制在 5.5，使用不同固体含量的新鲜玉米秸秆水解液 15%、20% 和 25%，水解液主要成分见表 3.5，在整个发酵过程中细胞浓度、葡萄糖和木糖消耗量、葡萄糖酸和木糖酸积累以及抑制物降解转化情况见图 3.8。

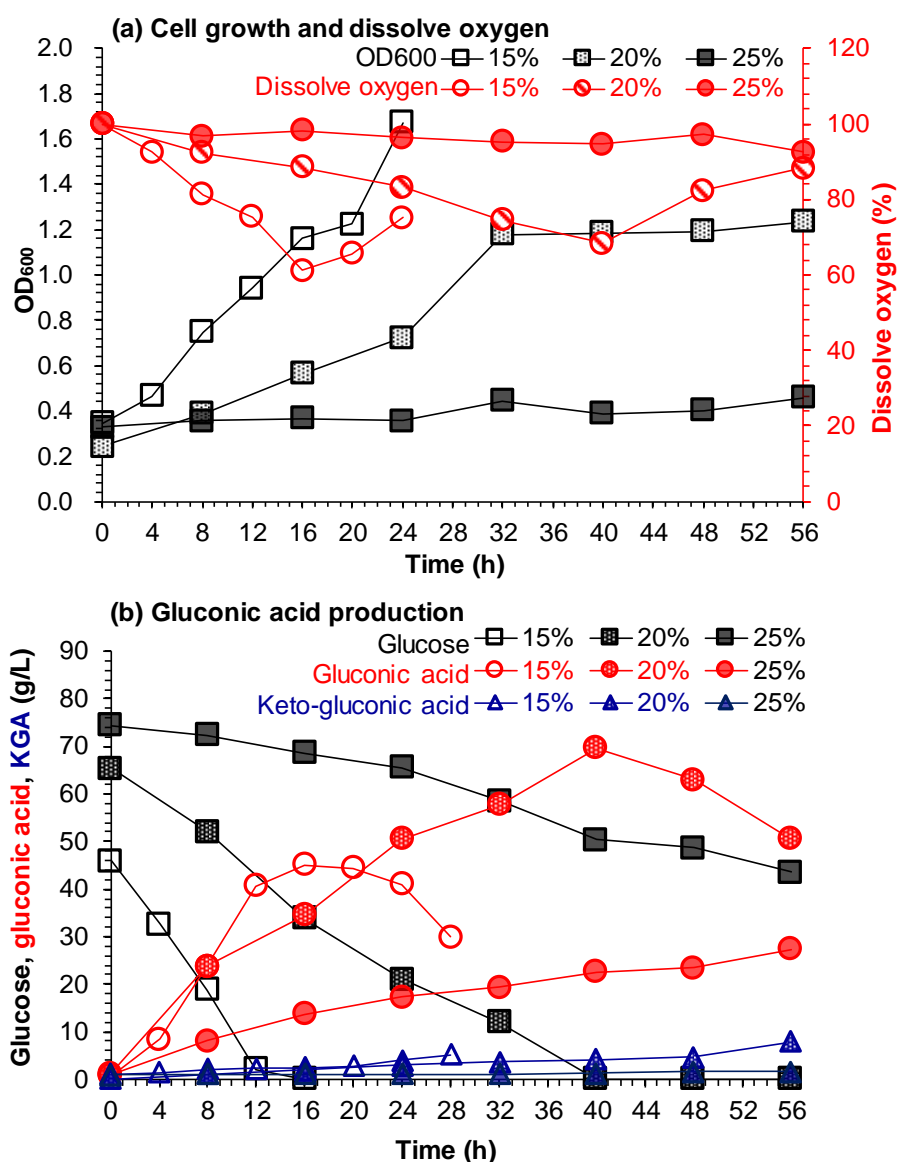
表 3.5 不同固体含量新鲜玉米秸秆水解液组分

Table 3.5 Composition of different solids loading freshly pretreated corn stover hydrolysate

Content	Glucose	Xylose	Acetic acid	HMF	Furfural
15% (g/L)	54.49	23.53	3.24	0.20	0.31
20% (g/L)	72.20	37.60	4.98	0.48	0.51
25% (g/L)	86.32	46.49	6.83	0.62	0.64

如图 3.8a 所示，*G. oxydans* DSM 2003 在发酵罐中利用 15% 固体含量的新鲜玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸的速率与摇瓶相比得到了很大的提升（从 1.90 g/L/h 提升到 2.82 g/L/h），更是远远高于 *A. niger* SIIM M276 的 0.71 g/L/h。当水解液中的糖浓度随着玉米秸秆的固体含量增加到 20% 时，细胞生长速率开始降低但是葡萄糖酸的生产速率与 15% 固体含量时相比没有明显的降低（图 3.8b）。在葡萄糖接近被消耗光时，木糖开始快速转化成木糖酸，但与此同时，达到最高浓度的葡萄糖酸开始进一步氧化生成酮基葡萄糖酸（KGA）。利用木质纤维素原料中的纤维素和半纤维素来生产葡萄糖酸和木糖酸具有比较积极的意义，首先是对木质纤维素原料的利用更充分，解决了传统生物炼制中木糖无法利用的难题，另一方面木糖酸具有水泥减水剂的效果，在建筑行业得到比较广泛的应用^[267]，与葡萄糖酸钠混合后可以增强水泥缓凝效果，改善水泥性能。然而 KGA 与水泥添加剂相关的功能尚不明确，因此在生产过程中需要在保证葡萄糖酸和木糖酸得率的前提下尽量减少 KGA 的产生。发酵罐中发酵条件与摇瓶相比，氧气供给大大提高，使得水解液中糠醛和 HMF 转化速率相比摇瓶中也大大增加，乙酸的浓度保持稳定并略有

提高,但是这个浓度的乙酸对 *G. oxydans* DSM 2003 抑制作用非常有限。当固体含量增加到 25%时, *G. oxydans* DSM 2003 发酵性能受到了明显的抑制,葡萄糖酸的产率明显降低,56 h 后依然有葡萄糖剩余(图 3.8b)。从表 3.5 可以看出,25%固体含量的水解液中抑制物浓度要明显高于 20%固体含量的水解液,虽然菌体生长被抑制,发酵液中菌体浓度很低,但是糠醛依然有比较明显的减少,这与糠醛胁迫下的耐受性试验结果一致,表明了 *G. oxydans* DSM 2003 具有很强的转化糠醛的能力。但在整个发酵过程中 HMF 几乎没有被转化,推测可能是 HMF 浓度升高到某一水平时,与其他抑制物形成了更强的协同抑制效应,从而严重影响了 *G. oxydans* DSM 2003 的生长代谢。在 25%固体含量的新鲜玉米秸秆水解液中,木糖也无法被利用,几乎没有木糖酸的生成。除此之外,25%固体含量时,高浓度的抑制物不仅影响了 *G. oxydans* DSM 2003 的生长和产酸性能,还严重影响了酶解过程中纤维素酶的活性,导致木质纤维素原料中纤维素的得率明显降低。为了得到更高浓度的葡萄糖酸和木糖酸,如果只依靠提高新鲜玉米秸秆水解液的固体含量,可行性比较差,对预处理后的玉米秸秆进行脱毒就显得尤为必要。



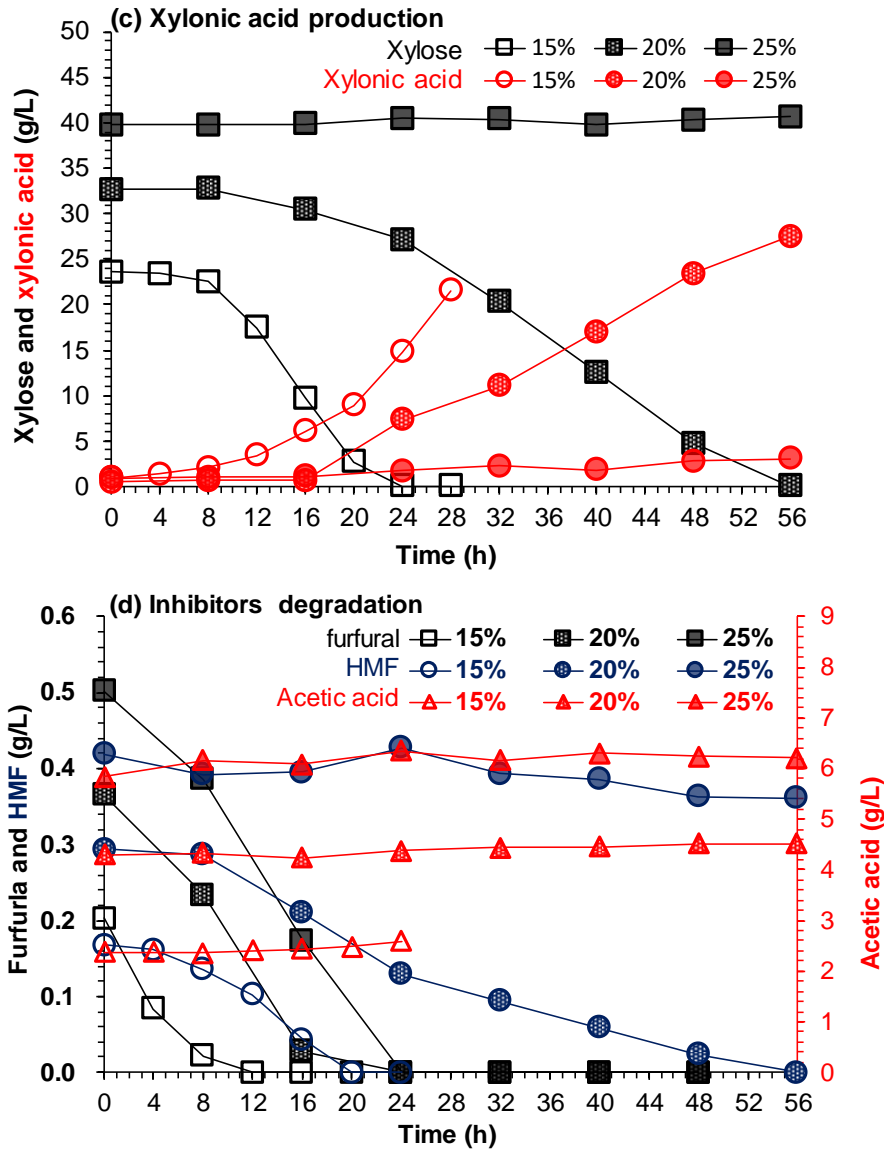


图 3.8 发酵罐中 *G. oxydans* DSM 2003 利用新鲜玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸和木糖酸

(a) 细胞生长; (b) 葡萄糖酸生成; (c) 木糖酸生成; (d) 抑制物降解。在 3 L 发酵罐中进行, 发酵条件为温度 30 °C, pH 5.5, 转速 500 rpm, 通气量 2.5 vvm, 装液量 20%, 接种量 10%。

Fig. 3.8 Gluconic and xyloic acids fermentation of *G. oxydans* DSM 2003 in fermentors using inhibitor containing corn stover hydrolysates.

(a) Cell growth; (b) Gluconic acid generation; (c) Xyloic acid generation; (d) Inhibitors degradation. The fermentation was carried out at 30 °C, pH 5.5, 500 rpm, 2.5 vvm, inoculum size 10%.

3.3.4.2 *G. oxydans* DSM 2003 在脱毒玉米秸秆水解液中发酵产酸研究

随着新鲜玉米秸秆水解液固体含量的增加, 高浓度的抑制物成为 *G. oxydans* DSM 2003 利用玉米秸秆生产高浓度葡萄糖酸和木糖酸最大的障碍, 为了提高葡萄糖酸和木糖酸的浓度、生产速率和得率, 同时降低抑制物对纤维素酶活的抑制作用, 需要对预处理后玉米秸秆进行脱毒。传统的生物脱毒方式会造成木糖大量损失, 不利于后期木糖酸的生产。为了尽可能多的保留预处理后玉米秸秆中的木糖, 本试验对原有的固态生物脱毒方法^[179]进行了改进, 脱毒过程在发酵罐中进行, 引入了通气和搅拌, 可以将抑制物快

速脱除，将这种新型固态脱毒方法称作在位固态脱毒^[180]。将预处理后的玉米秸秆使用氢氧化钙调节调节 pH 至 4.5-5.5，磨浆后与 10% 固体脱毒种子一起装入螺带搅拌式生物反应器中，温度 28 °C，通气量 1vvm，每隔 12 h 以 50 rpm 搅拌 2 min。经过 48 h 脱毒以后的玉米秸秆物料制备成不同固体含量的水解液，此时玉米秸秆中残留的糠醛和 HMF 浓度均很低，在发酵过程的前 16 h 就完全降解（图 3.9d），*G. oxydans* DSM 2003 利用不同固体含量的脱毒玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸和木糖酸的结果见图 3.9，水解液主要成分见表 3.6。

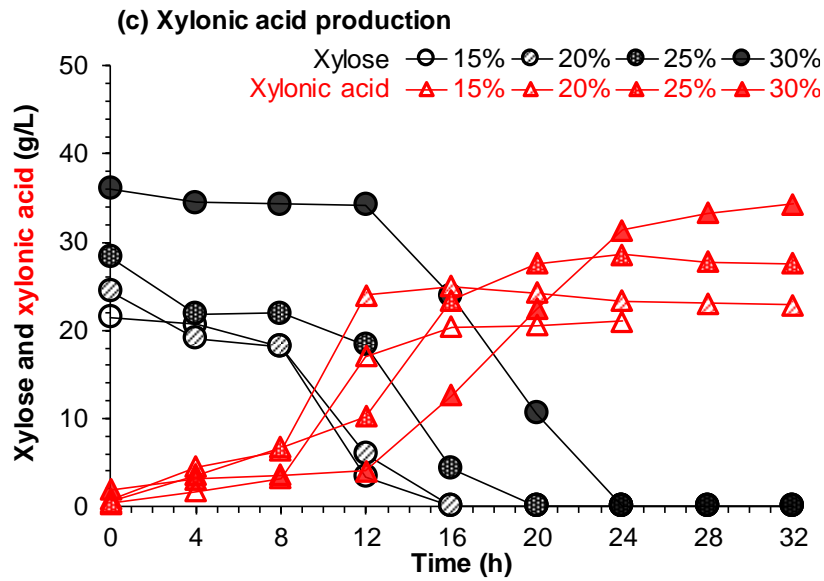
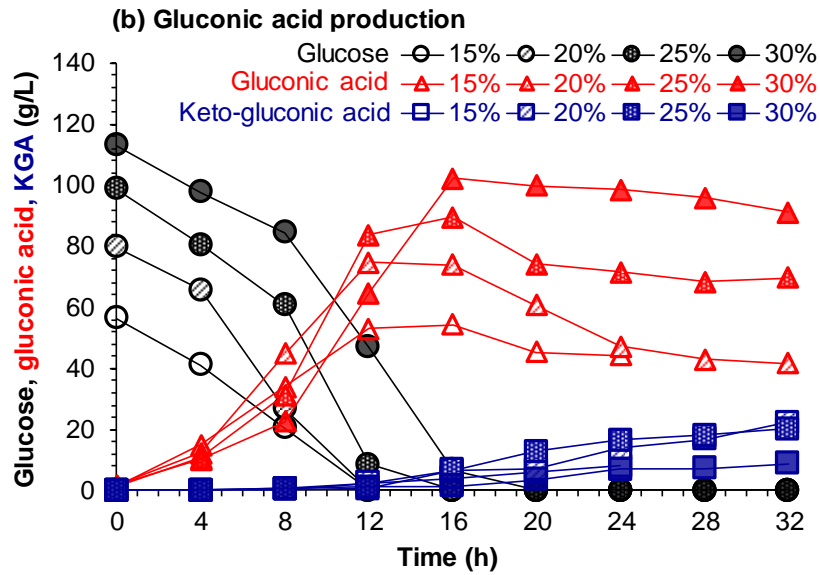
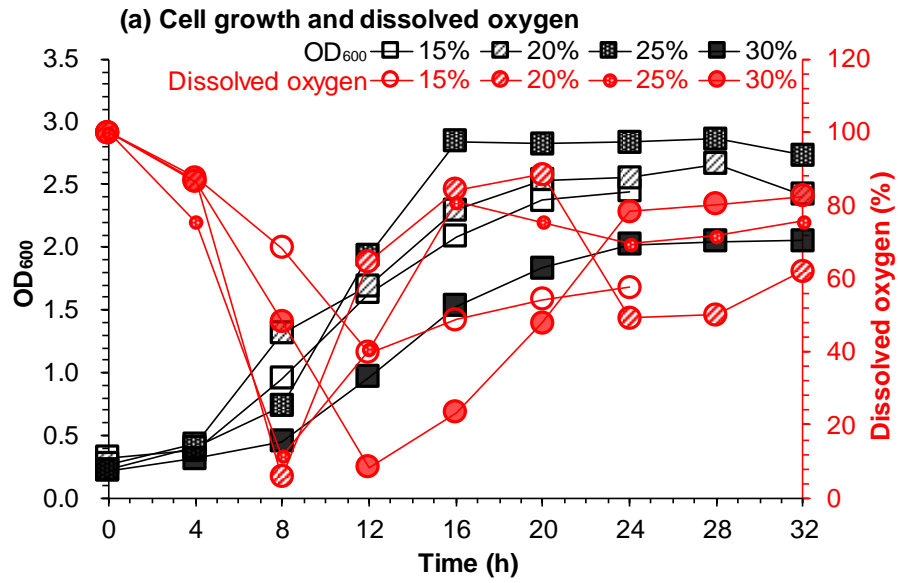
表 3.6 不同固体含量脱毒玉米秸秆水解液组分

Table 3.6 Composition of different solids loading detoxified corn stover hydrolysate

Content	Glucose	Xylose	Acetic acid	HMF	Furfural
15% (g/L)	67.72	23.88	1.09	0.02	0.04
20% (g/L)	88.47	27.13	1.03	0.06	0.07
25% (g/L)	109.78	31.46	1.13	0.07	0.08
30% (g/L)	124.80	40.03	1.46	0.12	0.10

同样固体含量为 15% 的水解液中，脱毒以后 *G. oxydans* DSM 2003 生长情况得到很大程度的改善，细胞浓度达到了新鲜玉米秸秆水解液的 2-3 倍，接近在合成培养基中细胞浓度的水平。经过脱毒后的预处理玉米秸秆，随着固体含量的不断增加，水解液中葡萄糖和木糖的浓度也随之增加，有利于产生高浓度的葡萄糖酸和木糖酸。令人满意的是脱毒以后的玉米秸秆水解液中固体含量从 15% 增加到 30%，葡萄糖酸的生产速率均比未脱毒水解液中有显著的提高，而且菌体浓度明显高于在新鲜玉米秸秆水解液中的菌体浓度。与 *A. niger* SIIM M276 在脱毒玉米秸秆水解液中生产葡萄糖酸的情况相比，*G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖酸生产速率依然有很大的优势，在同样使用 25% 固体含量的脱毒水解液时，葡萄糖被全部消耗、葡萄糖酸浓度达到最大值的时间从 56 h 缩短到 16 h，如果应用在工业生产上这将是一个巨大的提升。

另一方面，从发酵过程中溶氧的变化情况也可以看出 *G. oxydans* DSM 2003 具有更高的反应速率，葡萄糖酸迅速产生时发酵液中的溶氧一度下降到 10% 以下。值得注意的一点是，随着固体含量的增加，葡萄糖浓度逐渐升高，但是菌体终浓度却逐渐降低，推测可能有以下几个因素造成。首先这可能是由于底物的升高造成对具体细胞的渗透压力增大导致细胞生长减慢；其次可能是由于葡萄糖浓度升高导致 *G. oxydans* DSM 2003 膜上的氧化还原反应更加剧烈，与菌体生长竞争电子流，从而导致更少的碳源用来菌体的生长；最后，虽然经过脱毒仍然会有某些抑制物随着固体含量的增加积累了较高的浓度对细胞的生长造成了一定的抑制。但是这种情况对于生产葡萄糖酸和木糖酸而言更有利，菌体量较低却依然保持很高的生产速率，使得底物更多的用来生产产品，将会提高产品的得率。在固体含量为 30% 时，最高的葡萄糖酸浓度达到 102.10 g/L，得率 91.13%；最高的木糖酸浓度达到了 34.31 g/L，得率为 90.02%（图 3.9c）。



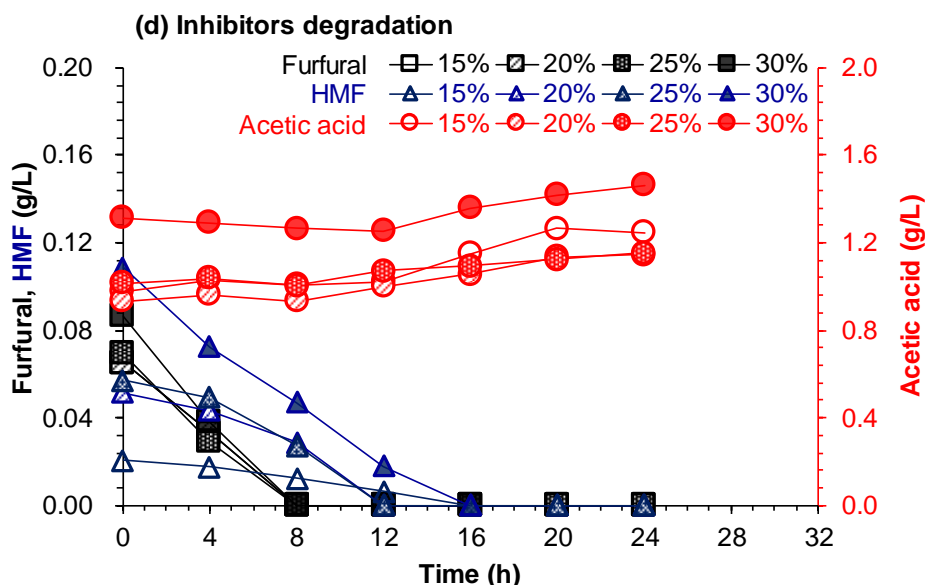


图 3.9 *G. oxydans* DSM 2003 利用脱毒玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸和木糖酸

(a) 细胞生长; (b) 葡萄糖酸生成; (c) 木糖酸生成; (d) 抑制物降解。在 3 L 发酵罐中进行, 发酵条件为温度 30 °C, pH 5.5, 转速 500 rpm, 通气量 2.5 vvm, 装液量 20%, 接种量 10%。

Fig. 3.9 Gluconic and xylonic acids fermentation of *G. oxydans* DSM 2003 in fermentors using biotetoxified corn stover hydrolysates.

(a) Cell growth; (b) Gluconic acid generation; (c) Xylonic acid generation; (d) Inhibitors degradation. Conditions: 30 °C, pH 5.5, 500 rpm, 2.5 vvm, the inoculum size 10%, 1 L liquid in 3 L fermentor.

G. oxydans DSM 2003 在脱毒的玉米秸秆水解液中表现出了相当令人满意的葡萄糖酸生产系能, 使用高固体含量的脱毒玉米秸秆水解液得到的葡萄糖酸浓度超过 100 g/L, 葡萄糖酸的产率超过 5.0 g/L/h, 展示出工业化生产的潜力。进一步在发酵罐中进行放大试验, 所使用的 50 L 生物反应器, 装液量为 35 L, 原料是固体含量为 30% 的脱毒玉米秸秆水解液, 接种量 1%, 结果见图 3.10。由于本试验中所使用的水解液体积比较大, 离心后没有经过滤纸过滤, 因此会含有少量的不溶性固体, 影响了对菌体浓度的检测, 同时还会影响发酵液中氧气的传递, 可能会导致生产速率受到一定影响。从图 3.10 可以看出, 由于降低了接种量, 因此 0-12 h 葡萄糖酸的积累与在 3 L 发酵罐中发酵情况相比有一个比较明显的延滞期, 同时本试验考虑到工业化生产时机械设备的限制, 将通气量从 2.5 vvm 降低到 1.5 vvm, 转速从 500 rpm 降低到 300 rpm, 这也导致了在本试验的放大生产时, 葡萄糖酸的生产速率有略微降低。12 h 以后葡萄糖酸的产率迅速升高, 到 32 h 葡萄糖消耗完全时, 此时得到了葡萄糖酸浓度最高达到 119.10 g/L (相当于 132.46 g/L 葡萄糖酸钠), 在目前已经报道的利用木质纤维素原料生产葡萄糖酸的研究中浓度最高, 葡萄糖酸的得率达到 97.12%。本研究生产的产品主要定位于替代商业葡萄糖酸钠作为水泥缓凝剂使用, 因此期望得到尽量多的葡萄糖酸。为了尽量避免 KGA 的产生, 发酵在 32 h 葡萄糖消耗完全时停止, 此时木糖还没有完全转化成木糖酸, 木糖酸的浓度为 14.04 g/L (相当于 15.90 g/L 木糖酸钠)。得到的高浓度葡萄糖酸钠发酵液经过简单的纯化作为水泥缓凝剂进行测试。

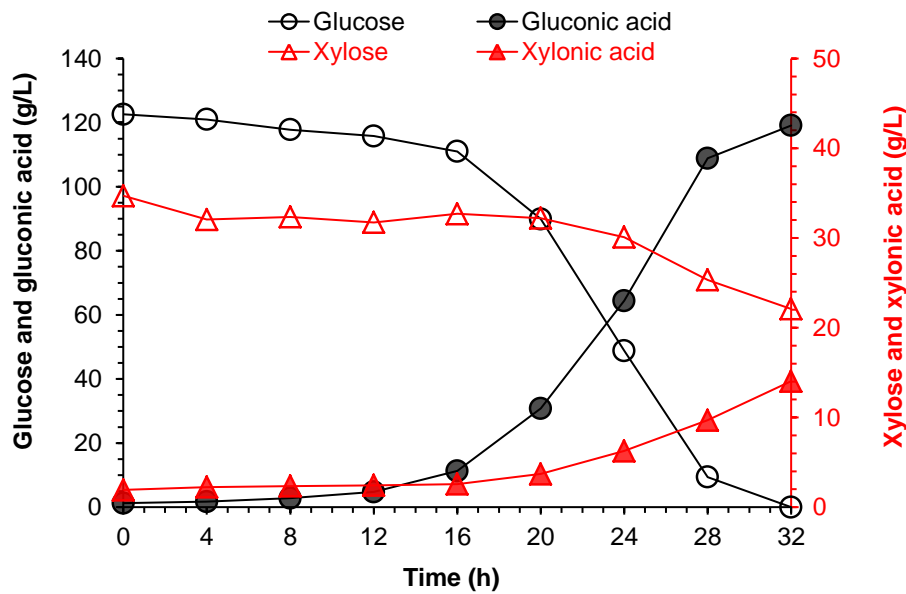


图 3.10 利用 30% 固体含量脱毒玉米秸秆水解液在 50 L 生物反应器中放大生产葡萄糖酸和木糖酸
 发酵条件为温度 30 °C, pH 5.5, 转速 300 rpm, 通气量 1.5 vvm, 装液量 35 L, 接种量 1%。水解液
 主要成分为 124.80 g/L 葡萄糖, 40.03 g/L 木糖, 1.46 g/L 乙酸, 0.12 g/L HMF, 0.10 g/L 糠醛。

Fig. 3.10 Large scale sodium gluconate fermentation in 50 L fermentor in corn stover hydrolysate from
 30% pretreated and biodetoxified corn stover.

The fermentation was carried out at 30 °C, pH 5.5, 300 rpm, 1.5 vvm, inoculum size 1%, liquid volume 35 L in 50 L fermentor. Corn stover hydrolysate contained 124.80 g/L of glucose, 40.03 g/L of xylose, 1.46 g/L of acetic acid, 0.12 g/L of HMF, 0.10 g/L of furfural.

抑制物耐受性强、菌体传代稳定、同时利用葡萄糖和木糖生产葡萄糖酸和木糖酸, *G. oxydans* DSM 2003 成功的解决了利用 *A. niger* SIIM M276 生产葡萄糖酸时存在的生产速率低、菌体发酵性能不稳定和木糖无法利用的问题。然而目前 *G. oxydans* DSM 2003 存在的问题是, 木糖的利用总是落后于葡萄糖, 当木糖被消耗完、木糖酸浓度达到最高值时, 已经有相当一部分葡萄糖酸转化成了 KGA。在今后的研究中, 通过优化试验条件, 控制发酵结束时间尽可能的避免 KGA 的产生从而达到葡萄糖酸和木糖酸能同时达到较高的浓度。

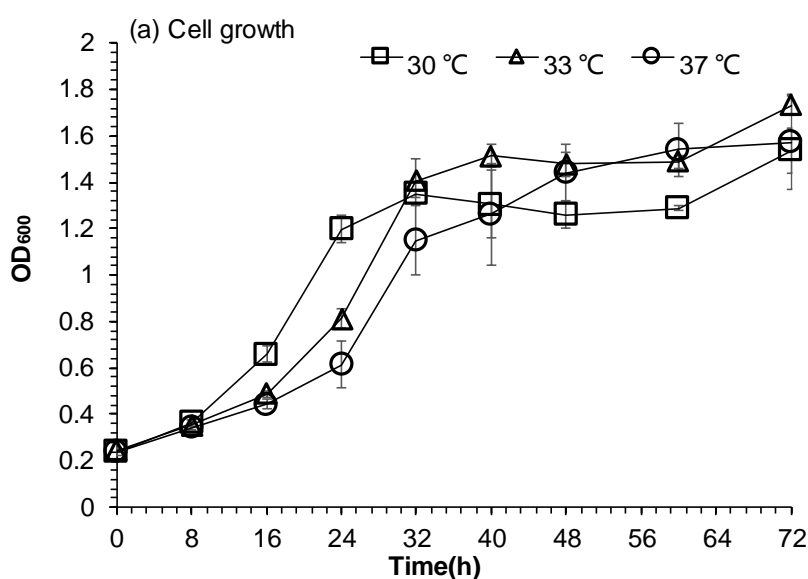
3.3.5 *G. oxydans* DSM 2003 利用玉米秸秆 SSF 生产葡萄糖酸和木糖酸

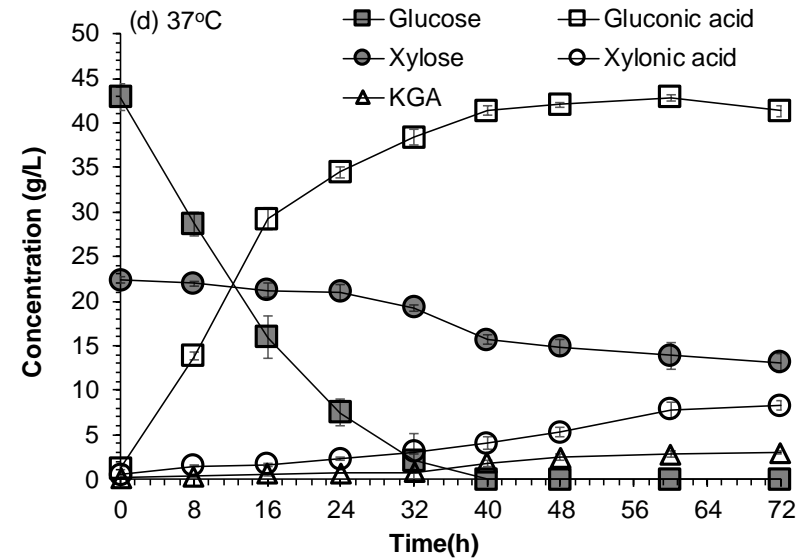
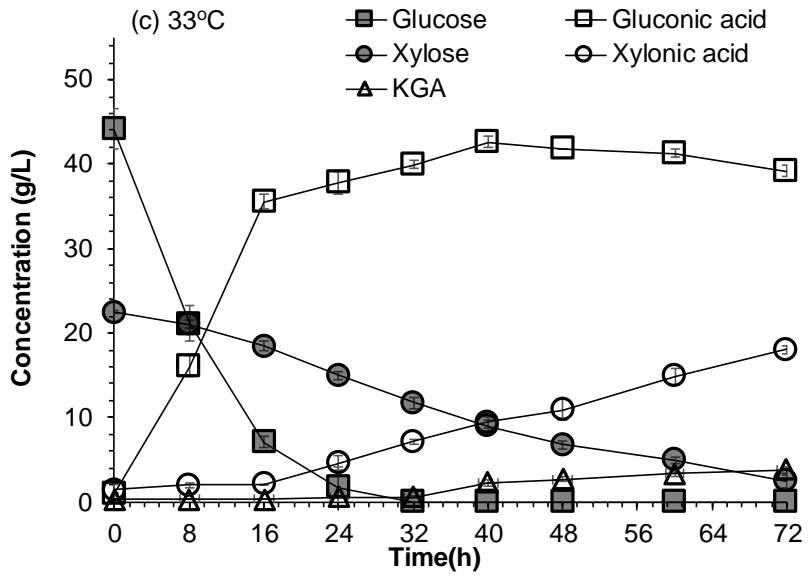
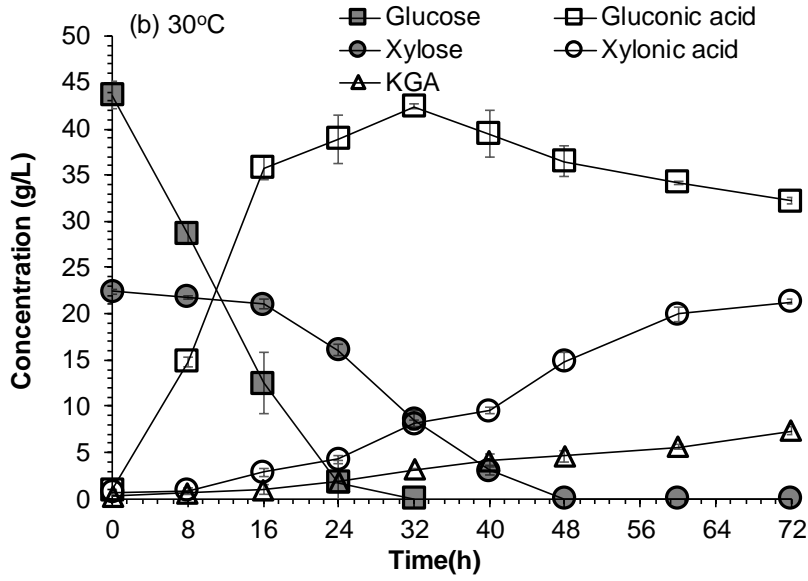
同步糖化与发酵 (SSF) 是指将纤维素酶的水解与产品的发酵生产同时进行的过程, 水解得到的葡萄糖会迅速被微生物利用, 生成所需要的产品, 这样就使得整个体系中葡萄糖浓度维持在一个比较低的浓度, 有利于木质纤维素原料的充分酶解。除此之外, 同步糖化与发酵的方法在工业化生产中也存在优势, 如有效降低设备的占用率, 缩短生产时间, 减少能耗等。在当前采用分步糖化与发酵 (SHF) 生产高浓度葡萄糖酸和木糖酸的过程中, 酶解时需要加入更多的物料, 酶解积累的高浓度葡萄糖会对纤维素酶的活性产生产物抑制, 影响木质纤维素原料的酶解得率, 因此本试验尝试利用 *G. oxydans* DSM 2003 通过 SSF 生产高浓度的葡萄糖酸和木糖酸。在以前的研究中尝试了使用 *A. niger*

SIIM M276 利用玉米秸秆进行 SSF 生产葡萄糖酸,但是由于丝状真菌在粘度较大的糖化液中受到剪切力比较大,并且糖化液粘度较高影响氧气的传递,从而使葡萄糖酸的生产速率比较低。*G. oxydans* DSM 2003 作为细菌受到剪切力的影响要远小于丝状真菌,应该会得到一个比较好的发酵结果。而且在以 *G. oxydans* DSM 2003 为生产菌株的 50 L 放大试验中,水解液由于没有进过滤纸过滤,大约含有 5%左右的不溶性固形物,可 *G. oxydans* DSM 2003 依然表现出优秀的发酵性能,说明其具有 SSF 生产的潜力。本试验中,尝试使用 *G. oxydans* DSM 2003 利用玉米秸秆进行 SSF 生产葡萄糖酸和木糖酸。

在 SSF 过程中,温度是一个影响整体效率的重要因素,纤维素酶糖化的最适温度为 50 °C,而一般微生物生长和代谢适合的温度都远低于 50 °C。要保证 SSF 高效进行,需要不影响发酵结果的情况下尽可能的提高 SSF 温度以达到更好的酶解糖化效果。因此,进行 SSF 生产葡萄糖酸和木糖酸之前首先研究了温度对 *G. oxydans* DSM 2003 生产葡萄糖酸的影响,确定 SSF 的最适温度,选择 15%固体含量的新鲜玉米秸秆水解液作为培养基,结果见图 3.11。

选择的温度分别是 30、33 和 37 °C,试验结果表明温度在 30 和 33 °C 时,葡萄糖的消耗速率比较相似,但是在 30 °C 时葡萄糖酸的生成速率有略微的提高,最显著的差别在于木糖的利用以及木糖酸的生成,30 °C 时发酵结果要优于 33 °C。当温度提升到 37 °C 时,*G. oxydans* DSM 2003 的生长受到了一定的影响,生长速率减慢,而且葡萄糖酸的生产速率降低,木糖酸的生产受到明显的抑制,剩余大量木糖没有利用。本试验中,发现温度对葡萄糖酸和木糖酸的生产有比较重要的影响,尤其是高温会严重影响木糖的利用、木糖酸的生成,可能是由于高温影响了木糖脱氢酶催化木糖生成木糖酸的活性。与此同时,高温还会阻碍葡萄糖酸的继续转化,即抑制了 KGA 的生成,可能是由于高温会使葡萄糖酸脱氢酶的活性降低。综合考虑葡萄糖酸和木糖酸的生产速率,选择 33 °C 作为 SSF 的反应温度。





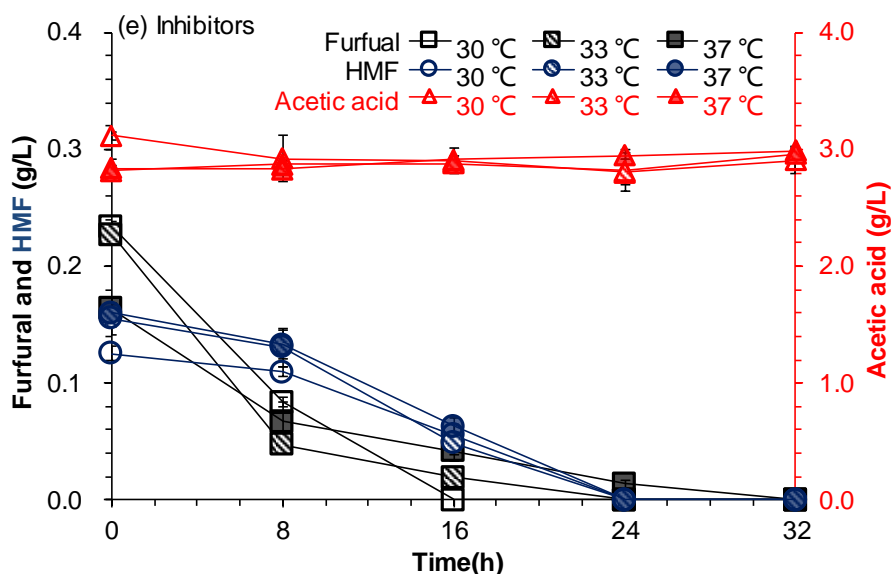


图 3.11 温度对 *G. oxydans* DSM 2003 生产葡萄糖酸木糖酸生产的影响

(a) 细胞生长; (b) 30 °C; (c) 33 °C; (d) 37 °C; (e) 抑制物降解。使用 15% 固体含量新鲜玉米秸秆水解液, 在 250mL 摇瓶中进行, 条件为温度 30 °C, pH 5.5, 转速 220 rpm, 装液量 20%, 接种量 10%。

Fig. 3.11 The effect of temperature on production of gluconic and xylonic acid by *G. oxydans* DSM 2003 (a) Cell growth; (b) 30 °C; (c) 33 °C; (d) 37 °C; (e) Inhibitors. 15% solids loading freshly pretreated corn stover hydrolysate was used in 250 mL flasks, conditions: 30 °C, pH 5.5, 220 rpm, liquid volume ratio 20% in 250 mL flasks, inoculate size 10%.

SSF 温度确定为 33 °C 以后, 开始使用 *G. oxydans* DSM 2003 进行 SSF 生产葡萄糖酸木糖酸的试验。首先将预处理后的玉米秸秆原料与纤维素酶一起加入 5L 螺带搅拌式生物反应器中, 固体含量调整为 15%, 装液量为 3 kg, 进行 24 h 预糖化 (50 °C, 150 rpm)。 *G. oxydans* DSM 2003 具有较强的抑制物转化能力, 可以在 SSF 过程中将抑制物转化成毒性较低的化合物, 降低抑制物对纤维素酶的影响, 从而省去固体生物脱毒的过程。通常预糖化的时间比较短, 为 8-12 h, 但本试验采取 24 h 是由于 *G. oxydans* DSM 2003 发酵最适的温度比较低, 33 °C 可能会对纤维素酶的活性有比较明显的降低, 从而影响酶解效率, 因此延长了预糖化的时间, 保证预处理后的玉米秸秆有一个比较好的酶解效果。预糖化以后, 对 3 kg 的预糖化液采取两种不同的方式进行 SSF 生产葡萄糖酸和木糖酸: (1) 取出 1 kg 预糖化液装入 3 L 平叶浆生物反应器, 转速 500 rpm, 通气量 2.5 vvm, 温度 33 °C 以 10% 的接种量接入培养好的 *G. oxydans* DSM 2003 种子进行 SSF 生产葡萄糖酸和木糖酸; (2) 剩余 2 kg 预糖化液, 留于螺带式搅拌生物反应器中, 调整生物反应器温度为 33 °C, 转速 250 rpm, 通气量 2.5 vvm, 同样以 10% 接种量接入培养好的 *G. oxydans* DSM 2003 种子进行 SSF 生产葡萄糖酸木糖酸。这是由于螺带搅拌式生物反应器主要设计用来进行高固体含量的粘稠液体的混合, 转速受到限制, 另外螺带式搅拌桨的搅拌效果不如平叶浆剧烈, 因为一般的酶解糖化过程不需要剧烈的搅拌。两种不同生产方式对 SSF 生产葡萄糖酸和木糖酸的结果见图 3.12。

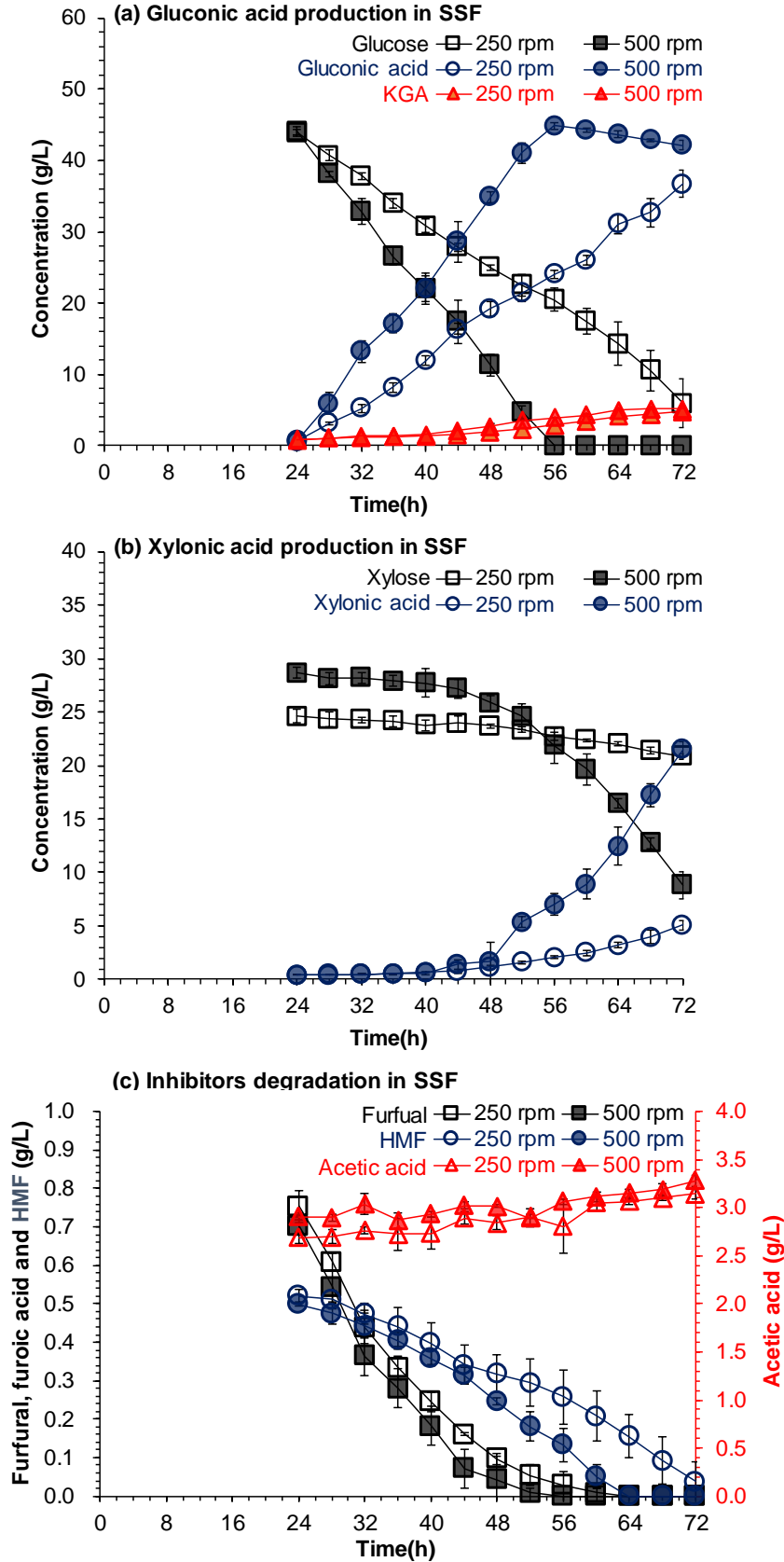


图 3.12 *G. oxydans* DSM 2003 同步糖化发酵生产葡萄糖酸木糖酸

(a) 葡萄糖酸生成; (b) 木糖酸生成; (c) 抑制物。预糖化时间为 24 h。

Fig. 3.12 gluconic and xylonic acid production of *G. oxydans* DSM 2003 by SSF

(a) Gluconic acid generation; (b) Xylonic acid generation; (c) Inhibitors. Prehydrolysis time 24 h.

发酵过程中 *G. oxydans* DSM 2003 需要大量的氧气参与到葡萄糖和木糖的氧化过程中来, SSF 过程中由于固体含量较高导致体系粘度上升, 不利于氧气的传递, 溶氧仍然是 SSF 过程中比较大的限制因素。发酵结果可以看出, 随着转速的提高, 葡萄糖的消耗速度、葡萄糖酸的生产速度均有明显的提升, 不仅如此, 主要抑制物糠醛和 HMF 也都随着转速的提高而降解速度加快, 这也证明了氧气的传递是制约 *G. oxydans* DSM 2003 发酵性能的关键因素。然而值得注意的是, 在 SSF 过程中发现葡萄糖酸的最高浓度低于预期值, *G. oxydans* DSM 2003 只是把预糖化液中的葡萄糖转化成了葡萄糖酸, 在发酵过程中没有发生明显的继续糖化, 没有更多的糖产生, 即酶解过程受到了抑制。温度的降低以及少量抑制物固然是影响酶解的重要因素, 但是不会造成如此明显的抑制, 因此还存在其他的影响酶解的因素。而且在随后进行的高固体含量的同步糖化发酵中同样发现相同的问题, 酶解过程在接入 *G. oxydans* DSM 2003 以后受到了严重的抑制。有研究表明, 葡萄糖酸中间产物葡萄糖酸- δ -内酯会严重抑制纤维素酶的活性, 准确来说是抑制 β -葡萄糖苷酶的活性, 20mM 的葡萄糖酸- δ -内酯可以降低纤维素酶中 β -葡萄糖苷酶活性的 50%, 60 mM 的葡萄糖酸- δ -内酯将会抑制纤维素酶整体活性的 80%^[317]。因此 *G. oxydans* DSM 2003 利用玉米秸秆生产葡萄糖酸和木糖酸不适合 SSF 的方式, 中间产物葡萄糖酸- δ -内酯会严重抑制纤维素酶的活性, 从而起不到继续糖化的效果, 更适合采取 SHF 的方式进行葡萄糖酸和木糖酸的生产。本试验虽然没有达到预期的效果, 实现 *G. oxydans* DSM 2003 通过 SSF 方式利用玉米秸秆生产葡萄糖酸和木糖酸, 但依然具有一定的意义。本试验说明了 *G. oxydans* DSM 2003 在没有经过固液分离的玉米秸秆糖化醪中依然可以保持较好的葡萄糖酸和木糖酸的发酵性能, 其产率下降主要是由于使用的生物反应器的混合能力较弱导致氧气的传递受到阻碍, 可以通过对生物反应器进行改进从而更适合直接利用高固体含量的糖化醪以 SHF 的方式进行葡萄糖酸和木糖酸的生产, 这样可以有效减少由于对糖化醪进行固液分离而造成糖类的大量损失, 更符合工业生产的需求。

3.3.6 影响 *G. oxydans* DSM 2003 发酵过程中 KGA 产生因素的研究

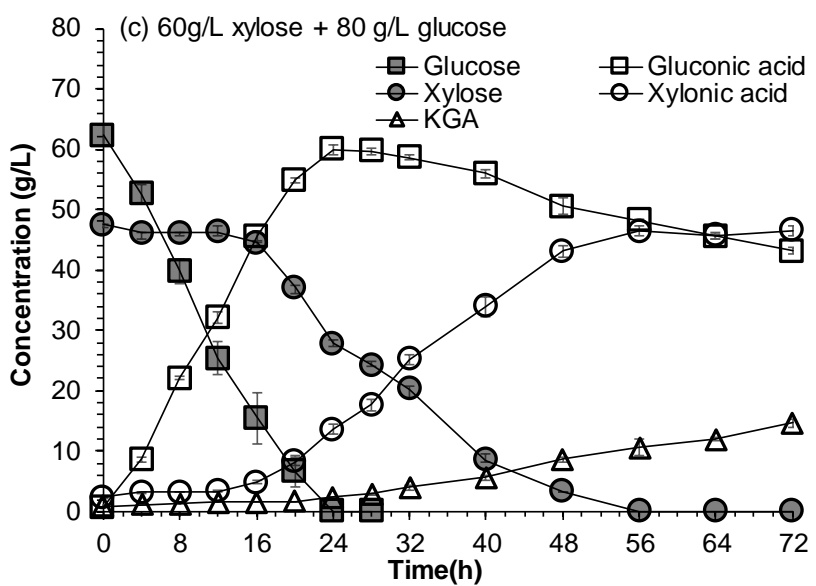
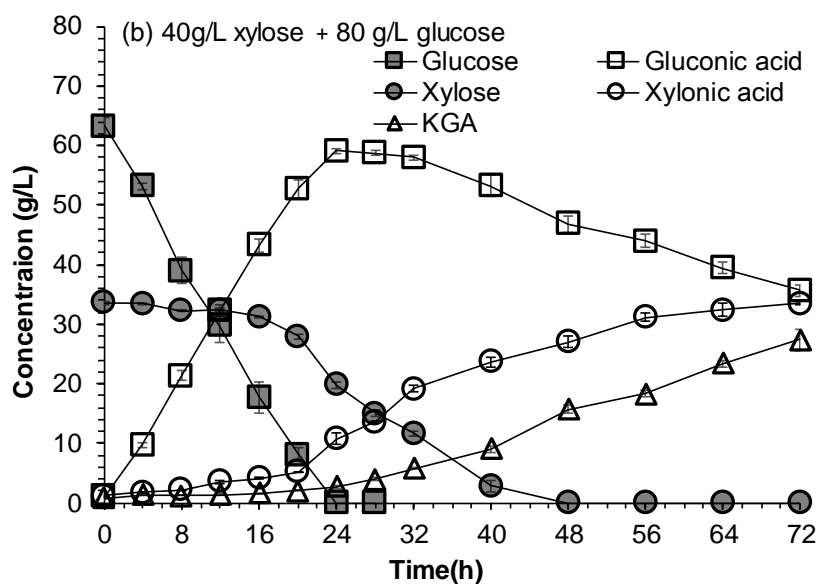
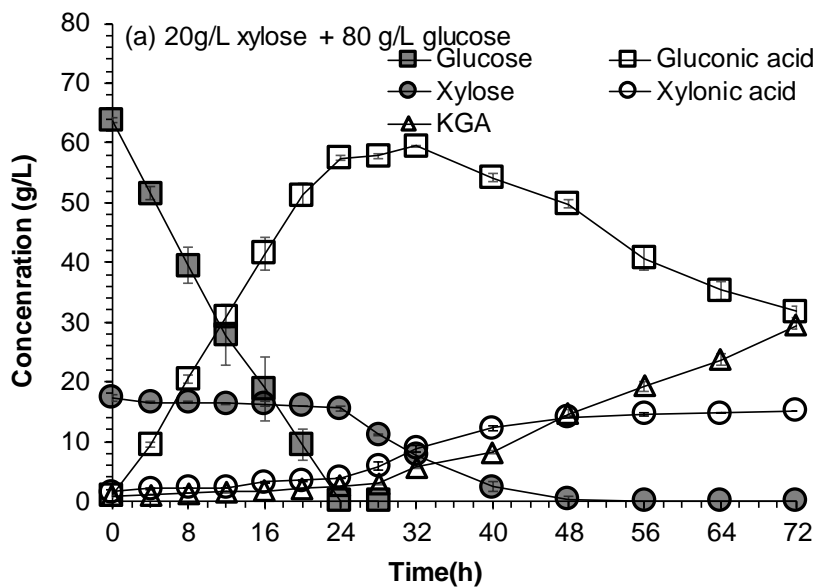
G. oxydans DSM 2003 可以利用将玉米秸秆水解液中的葡萄糖氧化成葡萄糖酸, 但是得到的葡萄糖酸不是最终产物, 会在葡萄糖酸脱氢酶的催化下进一步氧化成酮基葡萄糖酸 (KGA)。目前为止 KGA 对水泥性能的影响还不明确, 是葡萄糖酸生产中不期望得到的产物, 需要尽可能减少 KGA 的生成。结合相关研究和试验中的现象, 选取几个可能会影响 KGA 生成因素进行研究, 期望找到一种简便、有效抑制 KGA 生成的办法。首先需要了解 *G. oxydans* 生产葡萄糖酸和木糖酸的主要过程, 通常有大约 90% 的葡萄糖被 *G. oxydans* 膜结合的 PQQ-mGDH 直接不完全氧化生成葡萄糖酸^[249], 木糖的氧化是由膜上的木糖脱氢酶催化产生的, 与葡萄糖酸的生成过程类似。这两个路径主要有两个不同点: (1) 葡萄糖- δ -内酯的水解生成葡萄糖酸的过程要比木糖发酵更快; (2) 葡萄糖酸会被进一步氧化成酮基葡萄糖酸或者二酮基葡萄糖酸, 在木糖的发酵中木糖酸是最终产物, 不会再被进一步氧化^[318, 319]。正是由于木糖酸生产速率要低于葡萄糖酸的生产速率, 当

木糖完全转化成木糖酸时,葡萄糖酸会被进一步脱氢生成 KGA。有多项研究表明,在 *G. oxydans* 中葡萄糖酸、木糖酸和 KGA 的生成均受 pH 的影响很大^[94, 266]。除了 pH 之外可能会产生影响的因素还包括底物浓度、营养盐以及缓冲液的用量,都将会造成最终发酵产品组分的不同^[320]。Weenk 等发现初始葡萄糖浓度 100mM,只有当葡萄糖浓度低于 15 mM 时 KGA 才开始产生^[321]。对 *G. oxydans* 的单糖氧化过程中起催化作用的脱氢酶进行研究发现,木糖和葡萄糖都是被同一种位于细胞膜上的葡萄糖脱氢酶催化的^[265, 321, 322]。然而关于底物浓度和 pH 对 KGA 生成的影响的研究并不多见,本试验就选取这两个因素作为研究的重点。

3.3.6.1 木糖浓度的影响

G. oxydans DSM 2003 在脱毒玉米秸秆水解液中发酵生产葡萄糖酸和木糖酸的试验中发现,底物(葡萄糖和木糖)浓度随着固体含量的增加而升高,当固体含量为 30%(w/w)时,葡萄糖酸转化生成 KGA 的速率明显要低于低固体含量(15-25%)时的速率。高浓度的葡萄糖会抑制 KGA 的产生已经得到了证实,但在实验过程中发现当葡萄糖完全被消耗后,KGA 的生成速率还是会随着玉米秸秆固体含量的增加而减慢,此时随着固体含量增加而改变的除了葡萄糖以外主要是木糖的浓度,因此推测木糖的浓度可能也会影响 KGA 的生成。水解液的体系比较复杂,会对试验造成影响,选用合成培养基在摇瓶中进行研究,发酵条件与在水解液中的发酵条件一致。固定葡萄糖浓度为 80 g/L,改变木糖的浓度从 20-80 g/L,发酵结果见图 3.13。

试验结果表明,在葡萄糖浓度不变的情况下,随着木糖浓度的增加,葡萄糖消耗速率几乎没有受到影响,葡萄糖均在 24 h 左右消耗完,但是 KGA 的生成速率以及最终浓度都随着木糖浓度的升高而逐渐降低。在木糖浓度达到 80g/L 时, KGA 最终浓度不足 10 g/L,明显低于 20 g/L 木糖时 KGA 的终浓度。与木糖相比,葡萄糖优先被葡萄糖脱氢酶催化,葡萄糖在发酵过程中快速转化为葡萄糖酸,木糖酸的生成也依靠葡萄糖脱氢酶的催化,葡萄糖的存在会对木糖的催化形成竞争,从而产生竞争。推测木糖的存在可能也对 KGA 的生成形成竞争,在木糖转化生成木糖酸的过程中,电子流主要流向了葡萄糖脱氢酶,这样葡萄糖酸脱氢酶就没有足够的氧化力去进一步快速氧化葡萄糖酸生成 KGA,从而抑制了 KGA 的形成速率,具体的作用机理还需要进一步的研究。本试验的结果表明,高浓度的木糖会对 KGA 的生产速率造成抑制作用,因此,提高玉米秸秆水解液固体含量,增加木糖浓度可以在一定程度上降低葡萄糖酸的转化,有利用在将木糖完全转化成木糖酸时保留更多的葡萄糖酸。



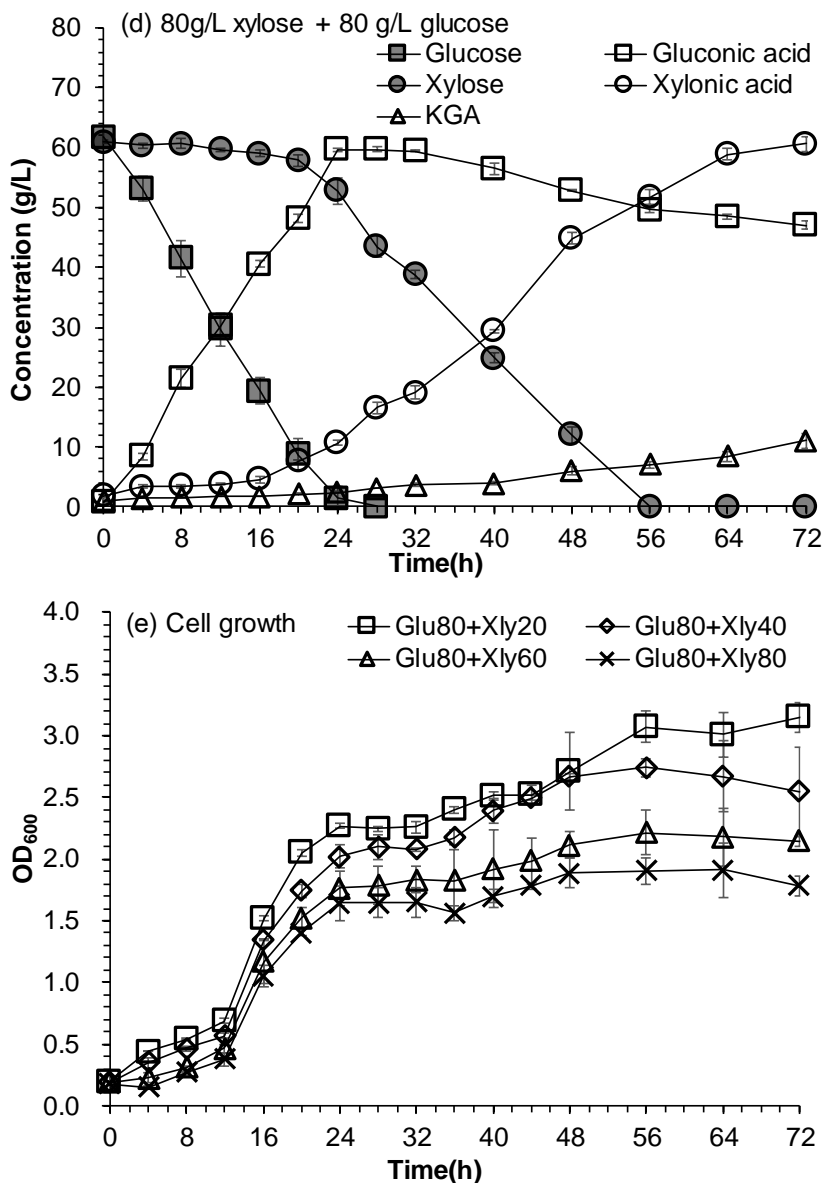


图 3.13 木糖浓度对 KGA 产生的影响

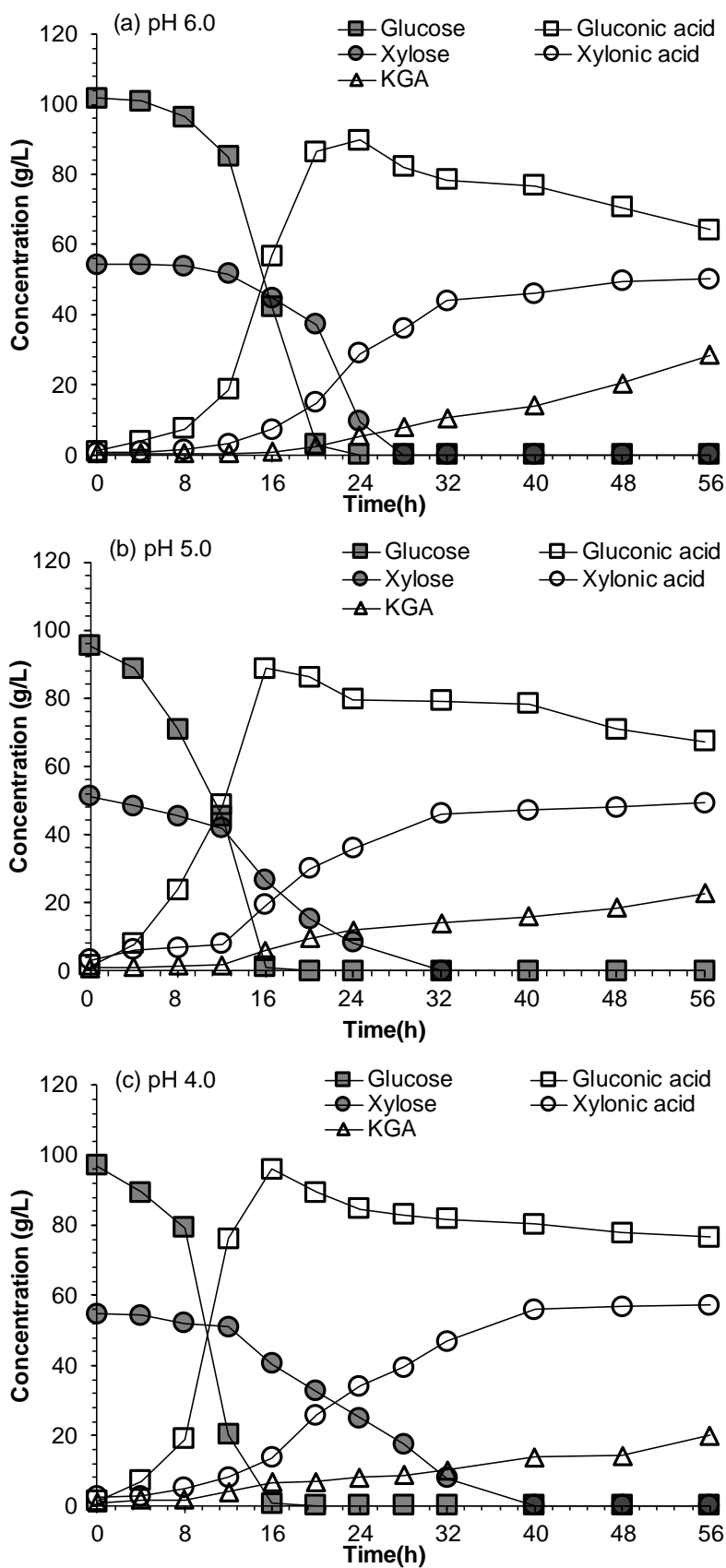
(a) 20 g/L 木糖+80 g/L 葡萄糖；(b) 40 g/L 木糖+80 g/L 葡萄糖；(c) 60 g/L 木糖+80 g/L 葡萄糖；(d) 80 g/L 木糖+80 g/L 葡萄糖；(e) 细胞生长。在 250 mL 摇瓶中进行。

Fig. 3.13 The effect of xylose concentration on the production of KGA

(a) 20 g/L xylose + 80g/L glucose; (b) 40 g/L xylose + 80g/L glucose; (c) 60 g/L xylose + 80g/L glucose; (d) 80 g/L xylose + 80g/L glucose; (e) Cell growth. In 250 mL flasks.

3.3.6.2 pH 的影响

pH 对 KGA 生成的影响在含有葡萄糖、木糖合成培养基的 3 L 发酵罐中进行研究，装液量为 1 L，葡萄糖浓度为 120 g/L，木糖浓度为 60 g/L，葡萄糖和木糖浓度的选择是依据 30%脱毒玉米秸秆水解液中的浓度，设置 pH 梯度范围从 3.0-6.0，结果见图 3.14。



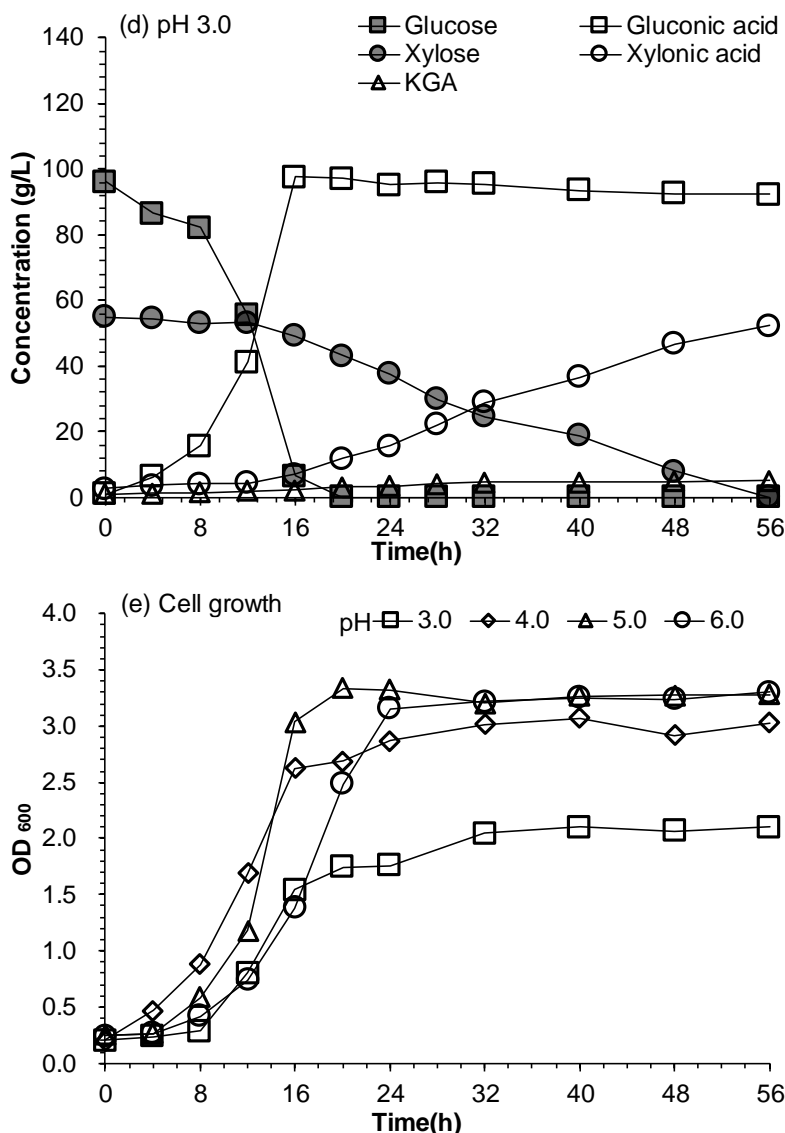


图 3.14 pH 对 KGA 生成的影响

(a) pH 6.0; (b) pH 5.0; (c) pH 4.0; (d) pH 3.0; (e) 细胞生长。在 3 L 发酵罐上进行，培养基中葡萄糖浓度为 120 g/L，木糖浓度为 60 g/L。

Fig. 3.14 The effect of pH on generation of KGA

(a) pH 6.0; (b) pH 5.0; (c) pH 4.0; (d) pH 3.0; (e) Cell growth. In 3 L fermentors, 120 g/L glucose and 60 g/L xylose in synthetic medium.

当 pH 在 4.0-6.0 时, *G. oxydans* DSM 2003 的生长速率和菌体浓度没有太大的区别, 但是当 pH 降到 3.0 时, 菌体的生长受到了一定的影响, 最终的细胞浓度与其他 pH 条件相比下降了约 30%, 但是菌体量的下降并没有对葡萄糖酸的生产速率造成明显的不良影响, 说明 *G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖脱氢酶催化葡萄糖的活性对 pH 不敏感, 活性不会随着 pH 降低而发生明显降低。随着 pH 的降低, KGA 产生的速率和反应结束时终浓度都有明显的降低, 当 pH 降到 3.0 时, KGA 的生产速率变得特别缓慢, 葡萄糖酸浓度达到最大值后, 其消耗速度也明显降低, 几乎保持不变。结果表明了葡萄糖酸脱氢酶对 pH 比较敏感, 其活性在较低的 pH 下甚至会失活, 从而避免了葡萄糖酸向不期望得

到的 KGA 转化。但随之而来的问题是，随着 pH 的降低，在 KGA 生成受到抑制的同时，木糖的利用速率也开始降低，初始木糖浓度相同的情况下，pH 为 6.0 时木糖在 28h 消耗完，而 pH 为 3.0 时木糖在 56h 才消耗完，说明 pH 的降低还影响了葡萄糖脱氢酶催化木糖的活性。葡萄糖脱氢酶可以在 pH 为 3.0 时仍然快速催化葡萄糖生产葡萄糖酸，但是催化木糖酸的能力却大大降低，这可能与其不同作用位点的特性有关。有研究表明，*G. oxydans* 氧化木糖生成木糖酸的最适 pH 在 6.5 左右，当发酵的 pH 低于 5.5 时，将会显著的影响 GDH 催化木糖的活性导致木糖到木糖酸的转化速率变慢甚至停止^[94]。

pH 的试验结果表明，通过调整合适的 pH，*G. oxydans* 可以同时将葡萄糖和木糖转化成葡萄糖酸和木糖酸，并且两者转化率都可以达到 90% 以上，这个试验说明了 pH 确实是 *G. oxydans* DSM 2003 发酵过程中影响最终产物组成的一个重要的因素，通过调节合适的 pH 可以有效地避免葡萄糖酸向 KGA 的转化。

综合木糖浓度和 pH 的试验结果，当高木糖浓度、低 pH 时可以有效地抑制 KGA 的产生，在将木糖完全转化为木糖酸的基础上，保留尽可能多的葡萄糖酸。为了得到更高的木糖浓度，在脱毒时进一步缩短脱毒的时间，从 48 h 缩短至 36 h 从而使脱毒后玉米秸秆中保留更多的木糖。虽然缩短脱毒时间会导致抑制物脱除不彻底，但 *G. oxydans* DSM 2003 对抑制物的耐受性较强，这个程度的抑制物不会对其生长和产酸产生明显的抑制作用。选择 30% 固体含量的脱毒玉米秸秆水解液，pH 控制在 3.0（初始 pH 保持自然，当 pH 降低到 3.0 时开始控制），在 3 L 发酵罐中进行葡萄糖酸和木糖酸的共生产，其他发酵条件与前面的研究保持一致，结果见图 3.15。30% 的固体含量的玉米秸秆水解液中葡萄糖和木糖的总浓度达到 160 g/L 左右，在 pH 为 3.0 的情况下葡萄糖酸的生产速率与 pH 为 5.5 时相比几乎没有变化，113.5 g/L 的葡萄糖在 20 h 左右全部被消耗，此时产生的葡萄糖酸浓度最高达到了 114.36 g/L，葡萄糖酸的生产速率达到了 5.61 g/L/h。20 h 以后葡萄糖酸的浓度开始降低，KGA 开始生成。但是受到木糖和 pH 的影响，葡萄糖酸被转化成 KGA 的速率相当缓慢，直至发酵结束，生成 KGA 的浓度只有 5.10 g/L。同时与 pH 为 5.5 时的试验结果相比，pH 降低使木糖酸的生产速率受到了一定的影响。通过缩短脱毒时间，使得水解液中木糖的浓度提升了 5 g/L 左右，达到 46.32 g/L。pH 为 3.0 时木糖消耗速率受到一定的影响，比 pH 为 5.5 时降低了约 40%，当 56 h 发酵结束时，共得到 111.59 g/L 葡萄糖酸（相当于 124.12 g/L 葡萄糖酸钠）和 41.52 g/L 木糖酸（相当于 47.02 g/L 木糖酸钠），葡萄糖酸和木糖酸的得率分别为 92.81% 和 93.83%。本试验结果表明通过降低 pH 的方法，同时结合高浓度木糖玉米秸秆水解液，有效地抑制了葡萄糖酸进一步氧化成 KGA，实现了同时得到高浓度、高得率的葡萄糖酸和木糖酸的目标。

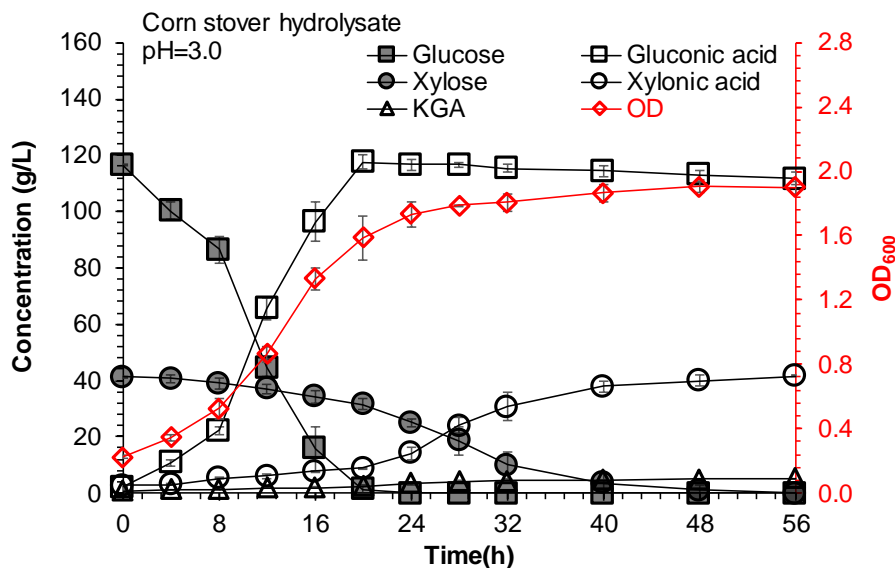


图 3.15 *G. oxydans* DSM 2003 利用脱毒玉米秸秆水解液生产高浓度葡萄糖酸和木糖酸

在 3 L 发酵罐中进行，发酵条件为温度 30 °C，pH 3.0，转速 500 rpm，通气量 2.5 vvm，装液量 1 L，接种量 10%。原料为 30% 固体含量脱毒玉米秸秆水解液，主要成分为 125.42 g/L 葡萄糖，47.63 g/L 木糖，1.85 g/L 乙酸，0.16 g/L HMF，0.13 g/L 糠醛。

Fig. 3.15 High titer gluconic and xylonic acid production using detoxified corn stover hydrolysate by *G. oxydans* DSM 2003.

The fermentation was carried out in 3 L fermentors and at condition 30 °C, pH 3.0, 500 rpm, 2.5 vvm, inoculum size 10%, liquid volume 35 L in 50 L fermentor. Corn stover hydrolysate contained 125.42 g/L of glucose, 47.63 g/L of xylose, 1.85 g/L of acetic acid, 0.16 g/L of HMF, 0.13 g/L of furfural.

3.3.7 纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品的水泥缓凝性能测试

葡萄糖酸钠和木糖酸钠都具有改善水泥性能的功效，通常被作为水泥添加剂使用。葡萄糖酸钠主要用于延长水泥凝结时间，是一种最常用的水泥缓凝剂；木糖酸被认为与葡萄糖酸功能比较接近，可以作为葡萄糖酸的一种替代品。木糖酸盐具有减水剂的效果，减少水泥用量的同时，可以改善水泥浆的流动性，会对延缓水泥凝结时间有一定的促进作用。*G. oxydans* DSM 2003 可以同时利用玉米秸秆水解液中的葡萄糖和木糖生产葡萄糖酸和木糖酸，在发酵过程中产生的酸立即被氢氧化钠中和，最终生成葡萄糖酸钠和木糖酸钠的混合产品，将发酵醪经过简单的固液分离和脱色处理后，得到纤维素葡萄糖酸/木糖酸产品 (Cellulosic sodium gluconate/xylonate product, CSGXP)，将其作为样品进行水泥缓凝剂性能的测试。同时对纤维素木糖酸缓凝性能进行测试，单一的纤维素木糖酸是 *G. oxydans* DSM 2003 利用乙醇发酵液蒸馏废醪中的木糖生产的，由于传统的乙醇发酵菌株利用木糖的效率非常低，因此在将葡萄糖完全消耗用来生产乙醇之后，发酵液中残留了大量的木糖，具体的内容会在下一章节介绍。

水泥缓凝剂性能主要测试的指标分为凝结时间、净浆流动度、水泥强度。凝结时间分为初凝时间和终凝时间，初凝时间是指水泥浆从加水时算起至塑性开始消失，流动性降低所需的时间；终凝时间是指水泥浆从加水时算起至塑性完全消失，并产生一定的机械强度所需的时间。凝结时间是检测水泥缓凝剂性能最直观的指标。净浆流动度在一定

程度上可以反映出缓凝剂和水泥的适应性,对预拌混凝土的品质和性能的评估都有比较重要的意义。水泥强度主要分为抗折强度和抗压强度,是评价水泥质量的一个重要指标,也是划分水泥强度等级的主要依据,水泥的强度表示了水泥硬化后所能够承受外力破坏的能力。通常情况下,水泥缓凝剂的加入会延长水泥的凝结时间,对前期强度产生一定的影响,如果对水泥的强度有比较明显的减弱则不能作为缓凝剂使用。对纤维素葡萄糖酸/木糖酸产品(CSGXP)和纤维素木糖酸这两种样品进行测试,结果见表 3.7。在对 CSGXP 测试时,选择玉米淀粉来源的商品葡萄糖酸钠(山东西王集团有限公司,中国,山东)作为对照。对于 CSGXP,添加量是以该混合产品中葡萄糖酸钠的含量计算。结果表明,在葡萄糖酸钠的添加量在 0.01%-0.03%这个范围内,在添加量相同时,CSGXP 与商品葡萄糖酸钠相比,无论初凝时间和终凝时间均大于商品葡萄糖酸钠,说明 CSGXP 的缓凝效果更强。这可能是由于样品中存在一定浓度的木糖酸钠,对葡萄糖酸钠缓凝效果有一定的增强。当添加量大于 0.03%时,缓凝效果变得更强以至于凝结时间超出了国标规定的 390 min 的上限,这也说明了在实际使用水泥缓凝剂时,一定要根据实际需要严格控制水泥缓凝剂的添加量,避免加入过量导致水泥无法凝结,影响工程质量,严重时可能引发工程事故。

净浆流动度方面,在葡萄糖酸钠添加量为 0.01-0.06%范围内,CSGXP 和商品葡萄糖酸钠的效果没有明显的差别,两者添加后均可以提升水泥浆的净浆流动度,说明 CSGXP 可以像商品葡萄糖酸钠一样与水泥有很好的适应性,发酵液中的复杂组分没有影响到水泥的性能。

强度测试方面,根据 GB/T 17671-1999,选择水泥胶砂硬化试件在水泥养护箱中养护 3 天和 28 天的值作为衡量水泥强度的标准。在葡萄糖酸钠添加量为 0.01-0.03%时,CSGXP 在抗折强度测试中无论 3 天和 28 天强度均与商品葡萄糖酸钠的强度相差无几,说明 CSGXP 的添加并没有影响水泥的抗折强度。在抗压强度测试中发现,CSGXP 与商品葡萄糖酸钠相比,在添加量较低的情况下(0.01-0.02%),3 天和 28 天抗压强度均有小幅度的降低(约 6-7%),但在添加量增加到 0.03%时 3 天和 28 天抗压强度达到了商品葡萄糖酸钠相同的结果,甚至还有了小幅的提升,整体结果表明由玉米秸秆制备的纤维素葡萄糖酸/木糖酸产品(CSGXP)达到了替代商品葡萄糖酸钠作为水泥缓凝剂的标准。

综合以上的测试结果分析,CSGXP 在延长凝结时间方面有更好的表现,在净浆流动度和水泥强度测试上也不输于商品葡萄糖酸钠,生物炼制过程中产生的一些杂质并没有表现出对水泥缓凝剂性能不利的影 响,作为一种水泥缓凝剂产品总体表现出比商品葡萄糖酸钠更优良的性能。这可能是由于木糖酸钠的存在会增强葡萄糖酸钠的缓凝效果以及对水泥的适应性。为了验证这一推测,对纤维素来源的木糖酸进行缓凝时间和净浆流动度的测试,结果见表 3.7。

表 3.7 葡萄糖酸钠和木糖酸钠作为水泥缓凝剂性能测试

Table 3.7 Assay of sodium gluconate and xylonate as cement retarder additives

Properties		Addition (%, w/w)	Commercial sodium gluconate	Cellulosic sodium gluconate	Cellulosic sodium xylonate	
Setting Time (min)	Initial	0	163±4	163±4	163±4	
		0.01	185±0	186±6	165±3	
		0.02	223±4	239±5	170±0	
		0.03	308±4	325±7	230±4	
		0.06	>390	>390	225±4	
		0.1	>390	>390	ND	
		Final	0	220±0	220±0	220±0
	0.01	248±4	253±4	215±4		
	0.02	288±4	303±4	225±4		
	0.03	355±7	380±7	280±7		
	0.06	>390	>390	275±4		
	0.1	>390	>390	ND		
	Fluidity (mm)	0	243±1	243±1	243±1	
		0.01	271±2	276±4	246±3	
0.02		281±1	282±4	244±4		
0.03		289±1	286±1	246±1		
0.06		253±4	240±6	240±7		
0.1		198±4	153±4	ND		
Flexural strength (MPa)		3 days	0.01	5.4±0.3	5.3±0.3	ND
	0.02		6.1±0.4	5.6±0.4	ND	
	0.03		5.5±0.5	5.7±0.3	ND	
	28 days	0.01	9.1±0.4	8.8±0.2	ND	
		0.02	8.6±0.3	8.6±0.3	ND	
		0.03	8.8±0.2	8.7±0.2	ND	
	Compressive strength (MPa)	3 days	0.01	28.5±0.8	26.4±0.6	ND
			0.02	28.3±0.8	26.1±0.6	ND
			0.03	26.6±0.6	26.9±0.9	ND
28 days		0.01	53.8±1.1	50.3±0.8	ND	
		0.02	52.4±0.8	51.0±0.6	ND	
		0.03	50.2±1.0	50.9±0.5	ND	

净浆流动度、凝结时间和强度的测定分别依据中国国标 GB/T 1346-2011、GB/T 2419-2005 和 GB/T 17671-1999。所使用的纤维素葡萄糖酸钠样品成分主要为 132.46 g/L 葡萄糖酸钠和 15.90 g/L 木糖酸钠，所使用的纤维素木糖酸钠样品主要成分为 80.50 g/L 木糖酸钠。在测试净浆流动度时需要加入 0.06% (w/w) 聚羧酸作为减水剂。依据国标 GB/T 2419-2005，凝结时间在 390 min 之内。ND 表示没有测定。

结果表明，木糖酸钠的缓凝效果要弱于葡萄糖酸钠，在浓度较低时 (0.01%)，对凝结时间几乎没有影响。随着添加量的增加，缓凝效果才逐渐显现出来，当木糖酸的添加量达到 0.06% 时，缓凝效果与添加量 0.02% 时的葡萄糖酸钠的缓凝效果相当，这也与 Chun

等人^[267]的研究结果相吻合。在净浆流动度方面，虽然木糖酸的添加并没有增强水泥浆的流动性，但是也没有对流动性造成负面影响，木糖酸钠的存在可以辅助增强葡萄糖酸钠的缓凝效果，从而解释了 CGSXP 的性能略优于纯度更高的商品葡萄糖酸钠。本试验结果表明，以玉米秸秆为原料经过生物炼制制备的高浓度葡萄糖酸钠/木糖酸钠发酵液，只需经过简单的处理就可以作为水泥缓凝剂而应用于建筑行业，性能能够与商品葡萄糖酸钠相媲美。初步的测试结果为木质纤维素基葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品的实际应用提供了最可行的出路，作为水泥添加剂最大的优势在于对产品的纯度要求不高，省去了产品纯化过程高昂的费用，能够进一步降低生产成本，极大缓解了生物基化学品成本过高的压力，经济竞争力十足，极具工业化生产的潜力。

3.3.8 纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品的技术经济分析 (TEA)

本研究建立了一条完整的玉米秸秆生物炼制生产葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品的工艺流程，表现出了很强的经济竞争力。为了更直观的体现出本工艺存在的经济优势，对该工艺得到的纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品进行经济技术分析，分析所使用的 Aspen Plus 模型依据方法部分 3.2.8 提到的原则建立，模型的建立主要基于本章试验结果，同时参考本实验室木质纤维素乳酸产品的技术经济分析中模型建立的方法^[323]，整个工艺流程中涉及到的主要参数列于表 3.8。在这个 Aspen Plus 模型中选择使用最优的发酵结果，即 pH 为 3.0 时 *G. oxydans* DSM 2003 利用 30% 固体含量脱毒玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸钠/木糖酸钠的试验结果为依据，最终产品中葡萄糖酸钠浓度为 124 g/L，得率 93%，木糖酸钠浓度为 47 g/L，得率 94%。产品回收率参照 Liu 等^[323]利用玉米秸秆生产乳酸钠的回收率 (92%)。设计的工厂每年处理干玉米秸秆总量为 30 万吨，计算得到每年葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品总量为 151,688 吨(产品中包含 71.06% 葡萄糖酸钠，26.94% 木糖酸钠，2.0% 水，w/w)。

整个工艺流程中详细的物料平衡结果见图 3.16a，图中数值表示每小时的物流质量，设计工厂年处理干玉米秸秆量为 30 万吨，年生产时间为 8000 h，则每小时处理干玉米秸秆 37.5 t，假设使用的玉米秸秆含水量为 15%，因此初始玉米秸秆的物流质量为 44.118 t/h。通过严谨的计算，1 t 干玉米秸秆可以产生 0.506 t 葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品。用水量方面，每生产 1 t 产品需要消耗 4.92 t 的水，其中蒸气冷凝水可以循环利用，相当于每生产 1 t 产品只需要消耗 1.20 t 新鲜水。预处理工段和酶水解工段是用水量比较大的工段，分别需要占总用水量的 19.16% 和 57.12%。由于采用干法生物炼制的工艺，干式稀酸预处理的固液比高达 2:1，远高于传统稀酸预处理的固液比 1:10，仅此一处的用水量比传统稀酸预处理降低了 20 倍，用水量减少也会大大降低废水的排放。废水的生成方面，每生产 1 t 产品会产生 1.88 t 的废水，主要包括在产品回收工段产生的发酵残渣以及清洗回收活性炭产生的废水。干式稀酸预处理工段得到的玉米秸秆含水量大约 50%，几乎没有废水的产生，因此本工艺废水的产生总量远低于常规的稀酸预处理。

表 3.8 Aspen Plus 模型建立过程主要参数

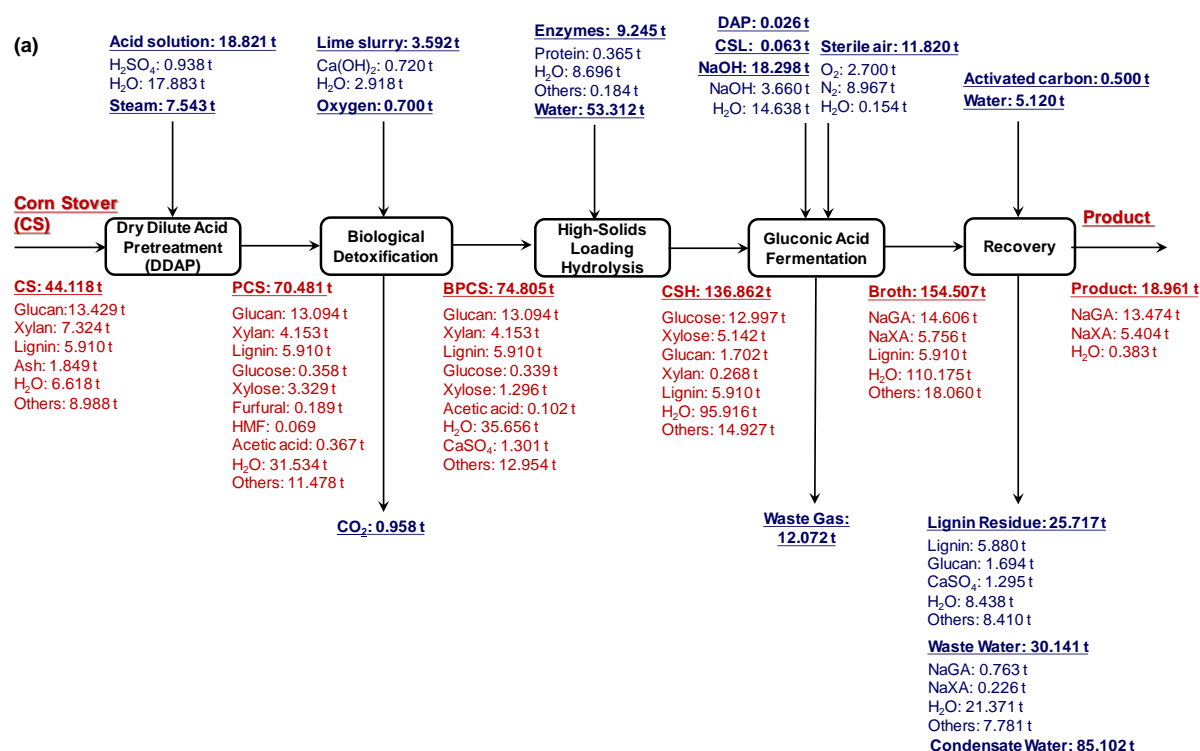
Table 3.8 Main process input data for the established Aspen Plus simulation model

Features	Values
Pretreatment	
Sulfuric acid dosage (%)	2.5
Residence time (min)	5
Temperature (°C)	175
Pressure (MPa)	0.89
Solids after pretreatment (%)	50
Glucose yield from glucan (%)	4
Hemicellulose sugar yields (%)	40
Furfural yield from xylan (%)	3.3
Acetic acid hydrolysis ratio (%)	60
Biodetoxification	
Temperature (°C)	28
Residence time (hour)	36
Furfural conversion (%)	100
Acetic acid conversion (%)	70
Glucose consumed for cell growth (%)	5
Xylose consumed for cell growth (%)	90
H ₂ SO ₄ neutralized (%)	100
Saccharification and Fermentation	
Temperature for hydrolysis (°C)	50
Temperature for fermentation (°C)	30
Residence time for hydrolysis (hour)	48
Residence time for fermentation (hour)	24
Solids loading (%)	30
Cellulase dosage (mg protein/g cellulose)	28
Glucan conversion to glucose (%)	87
Xylan conversion to xylose (%)	82
Sodium gluconate yield from glucose (%)	93
Sodium xylonate yield from xylose (%)	94
Glycerol yield from glucose (%)	1
Glucose consumed for cell growth (%)	2
Sodium gluconate concentration (g/L)	124
Sodium xylonate concentration (g/L)	47
Product recovery	
Purity (sodium gluconate and sodium xylonate)	98% (w/w)
Water content	2% (w/w)

整个工艺流程中详细的能量平衡结果见图 3.16b，热蒸汽的用量方面，每生产 1 t 产品需要消耗 6349MJ 的热量，这相当于 2.18t 热蒸汽（273 °C，1.3MPa）。预理工段和产品回收工段中的三效蒸发所需要的蒸汽所占的比重比较大，分别占热蒸汽总用量的 18.05%和 73.65%，纤维素酶水解糖化过程加热所需要热蒸汽占总用量的 8.3%。用电

量方面，每生产 1 t 产品需要消耗电能大约 504 kWh，预处理后玉米秸秆的磨浆和水解过程中高粘度物料的搅拌混合的用电量分别占总用电量的 33.71%和 14.91%。另一方面，生产过程中产生的木质素残渣可以经过焚烧产生热量和电能可以满足整个生产过程的需求，除此之外每 1 t 秸秆还可以额外产生 251kWh 的电能，可以输送入电网作为补贴从而降低产品的成本。

图 3.16c 列出了总成本中每个工段具体的资本、运营和固定成本所占的比例。与其他预处理技术相比^[310]，干式稀酸预处理和生物脱毒的成本与传统技术相比有显著的降低，达到\$0.030/kg 产品。使用的原料中，玉米秸秆和氢氧化钠所占的成本比重最大，分别达到了\$0.122/kg 和\$0.090/kg 产品，这两样原料的成本占糖化与发酵工段成本的 78%，占总成本的 52%。由于电力补贴，焚烧工段的成本只有\$0.024/kg 产品。经过模拟计算，年处理 30 万吨干秸秆的葡萄糖酸钠生产工厂总投资达到\$166.9 MM，葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品最低售价（Minimum Sodium Gluconate/xylonate product Selling Price, MGSP）为 \$0.404/kg 产品。在这个价格中，原料、酶生产、非酶转化成本分别为\$0.122、\$0.095 和 \$0.187/kg 产品。与中国市场上使用传统工艺、利用玉米淀粉或者蔗糖生产的葡萄糖酸钠的成本相比（\$0.476/kg，中国最大的葡萄糖酸钠生产厂家-山东西王集团有限公司在阿里巴巴网站上葡萄糖酸钠的售价），纤维素葡萄糖酸钠产品具有明显的经济优势。



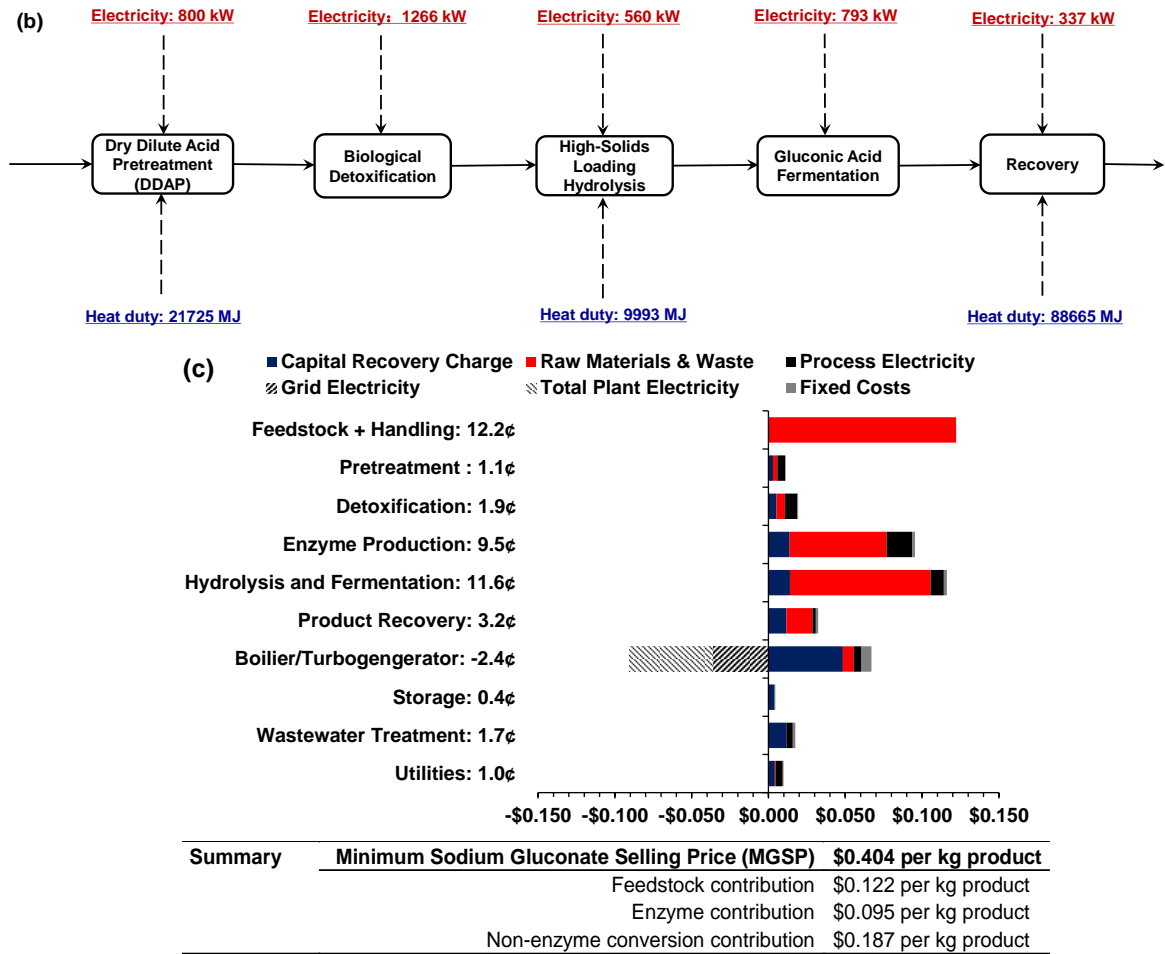


图 3.16 玉米秸秆生产纤维素葡萄糖酸钠单位时间的物料、能量和成本衡算 (tons/h)

(a) 物料平衡; (b) 能量平衡; (c) 成本组成。

Fig. 3.16 Materials, energy and cost balance of cellulosic sodium gluconate production from corn stover feedstock on the hour basis (tons per hour).

(a) Materials balance; (b) Energy balance; (c) Cost contribution details from each process area.

Abbreviations: CS, Corn stover; DDAP, Dry dilute acid pretreatment; PCS, Pretreated corn stover; BPCS:

Pretreated biodetoxification corn stover; CSL, Corn steep liquor; CSH, Corn stover hydrolysate; DAP:

Ammonium phosphate. NaGA, Sodium gluconate; NaXA, Sodium xylonate.

与玉米淀粉基的商品葡萄糖酸钠生产工艺相比,纤维素葡萄糖酸钠产品的生产工艺具有低成本、低蒸汽用量、低用水量、低废水排放、高发酵性能等优点,其中干法磨浆生物炼制工艺(DMBP)发挥了重要的作用^[133, 179, 180, 211, 212]。值得注意的是,在利用玉米秸秆发酵的过程中不需要额外添加营养物质,粗发酵液具有优良的水泥缓凝剂效果,可以作为传统玉米淀粉基葡萄糖酸钠的替代品。基于严谨的 Aspen Plus 模拟计算得出 MGSP 只有\$0.404/kg 产品,与玉米秸秆生产的纤维素乙醇相比(使用同样的计算原则和相似的工艺流程得到的最低乙醇售价为\$2.15/gallon^[310],相当于\$0.702/kg,价格上具有很强的竞争力。即使与中国市场上的商品葡萄糖酸钠(\$0.476/kg)相比,也有一定的价格优势。生物炼制技术用于实践生产高附加值生物基化学品,其实用性和经济竞争力为今后木质纤维素生物质高效利用提供了理论依据。

3.4 本章小结

G. oxydans DSM 2003 代替 *A. niger* SIIM M276 成为新的葡萄糖酸生产菌株, 显现出了卓越的葡萄糖酸发酵性能以及较强的抑制物耐受性, 很好的解决了 *A. niger* SIIM M276 在玉米秸秆水解液中生产葡萄糖酸所产生的问题。

(1) *G. oxydans* DSM 2003 细胞膜上富含氧化还原酶系, 能将大多数毒性较高的醛类抑制物快速转化成毒性较低的醇类化合物, 在 15%、20% 固体含量的新鲜玉米秸秆水解液产酸速率快, 比 *G. oxydans* ATCC 621H 更适合玉米秸秆水解液体系。*G. oxydans* DSM 2003 具有将多种多元醇不完全氧化的能力, 可以同时 will 玉米秸秆水解液中的葡萄糖和木糖氧化生产葡萄糖酸和木糖酸。

(2) 将预处理后的玉米秸秆固态生物脱毒以后, *G. oxydans* DSM 2003 的葡萄糖酸生产速率大幅度提高。随后在 50 L 发酵罐中进行放大试验, *G. oxydans* DSM 2003 依然保持了稳定、高效的发酵性能, 得到葡萄糖钠浓度为 132.46 g/L, 木糖酸钠浓度为 15.90 g/L。将获得的发酵液进行简单的固液分离和脱色后作为水泥缓凝剂, 对其缓凝性能进行测试。纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品由于木糖酸钠的存在, 在缓凝效果上略强于商品葡萄糖酸钠, 展现出广阔的应用前景。

(3) 葡萄糖酸的中间产物葡萄糖酸- δ -内酯会严重抑制纤维素酶中 β -葡萄糖苷酶的活性, 从而使糖化反应不能继续, 表明同步糖化与发酵的方式在木质纤维素葡萄糖酸生产过程中的局限性, 分步糖化与发酵的方式更适合木质纤维素葡萄糖酸和木糖酸的生产。好氧发酵菌株 *G. oxydans* DSM 2003 可以在未经过固液分离的糖化醪中保持良好的发酵性能, 在今后实际生产中可以避免因固液分离而造成可发酵糖的损失。

(4) 针对葡萄糖酸进一步氧化生成 KGA 从而降低产品中葡萄糖酸浓度的问题, 通过缩短脱毒时间和提固体含量以得到更高的木糖浓度, 同时将 pH 降低至 3.0, 有效地减少了葡萄糖酸向 KGA 的转化, 从而同时得到高浓度的葡萄糖酸和木糖酸, 浓度分别达到 111.59 g/L 和 41.15 g/L。

(5) 根据试验结果, 对整个生产工艺进行了一个基于 Aspen Plus 模拟的技术经济分析, 基于干法生物炼制技术的葡萄糖酸和木糖酸生产工艺的众多优势, 通过计算得到纤维素葡萄糖酸钠产品的最低售价为 \$0.404/kg, 远低于采用相似模型下纤维素乙醇的最低售价 (\$0.702/kg), 即使与商品葡萄糖酸相比 (\$0.476/kg) 也有一定的经济优势。本章研究为利用木质纤维素生物质工业化生产葡萄糖酸钠/木糖酸钠作为水泥添加剂提供了理论依据。

第 4 章 利用乙醇发酵废液中的木糖生产木糖酸

4.1 引言

木糖酸是近年来受到关注的一种新型生物基化学品，作为一种功能多、用途广的平台化合物被美国能源部评为生物炼制领域三十种最有生产价值的化学品之一。木糖酸与葡萄糖酸的性能比较接近，是葡萄糖酸、柠檬酸等的潜在替代品。近年来木糖酸的功能逐渐被开发出来，如今已经在多个行业得到广泛应用，尤其是在建筑行业，木糖酸作为一种水泥分散剂、减水剂、缓凝剂、黏合剂，功能全面，其作为水泥分散剂的效果大约是常用的木质素磺酸盐的两倍^[267]；其作为减水剂可以改善混凝土浆的流动性，减少水泥用量的同时提高混凝土的强度^[94]。水泥行业是全球最大的产业之一，仅仅在中国每年水泥的产量达到 25 亿吨左右，普通减水剂按照 0.6% 的添加量加入到混凝土中可以减少 15% 的水泥用量，这样计算的话减水剂的需求量将达到 1500 万吨左右，市场需求量巨大，为木质纤维素生物炼制中木糖的利用提供一条非常有前景的出路^[324]。同时可以节省大约 3.75 亿吨的水泥，经济效益显著，对缓解全球性环境问题有明显的帮助。除此之外，木糖酸还是多种重要化学过程必不可少的中间体^[267]。

当前的研究中，生产木糖酸的方法主要有化学合成法和微生物发酵法两种^[94]。化学合成法主要通过碘或者钨等作为催化剂对木糖进行催化生产木糖酸，但是其过程繁琐、不易操作、反应条件苛刻、对环境污染大。与化学合成法相比，微生物发酵法条件温和，生产成本较低，对环境危害比较小，因而得到了广泛的应用，成为工业上生产木糖酸最常用的方法。微生物发酵法生产木糖酸的原料主要是木糖，但是木糖的售价较高，直接用木糖作为原料生产木糖酸将会大大提高生产成本。随着木糖酸行业的兴起，木糖酸生产规模的日益扩大，寻求价格低廉且来源广泛的木糖酸生产原料是木糖酸行业实现可持续发展所面临的首要问题，传统的纤维素乙醇工业生产中残留的木糖成为一种比较有潜力的木糖酸生产原料。纤维素乙醇是一种环境友好型绿色生物燃料，主要由数量巨大的农业废弃物、草本植物、以及其他非粮作物等木质纤维素原料生产所得^[3]。纤维素乙醇行业的蓬勃发展将会大大减轻人类对化石燃料等不可再生资源的依赖，同时也缓解了温室效应、环境污染等一系列环境问题所引发的负面影响^[38]。但是直到目前为止，纤维素乙醇的大规模工业化生产还存在着许多障碍，比如传统的乙醇生产菌株只能利用纤维素来源的葡萄糖，难以利用半纤维素来源的戊糖，从而导致发酵醪中仍存在大量未利用的糖类，其中主要是木糖，对木质纤维原料资源浪费的同时还增加了废水处理的难度。木糖在纤维素原料中所占的比例大约为 15-30%，是自然界存在的总量第二多的糖类^[43, 45]。通常情况下，木糖的利用主要有一下两个方面：（1）使用一些基因工程菌株如酿酒酵母^[325]和运动发酵单胞菌^[326]将木糖还原成木糖醇，随后进入磷酸戊糖途径生产乙醇；（2）将木糖氧化成一种应用广泛、高附加值的化学品-木糖酸。然而同时利用木质纤维素中的葡萄糖和木糖生产乙醇时，存在木糖利用效率低的问题，严重影响了乙醇发酵的

速率,用木糖生产木糖酸成为了一种更好的选择。可以将乙醇蒸馏提取后剩余的木糖作为生产木糖酸的廉价原料,乙醇和木糖酸的联合生产实现了木质纤维素原料中纤维素和半纤维素组分的高效利用,不仅降低了纤维素乙醇的总成本,还减轻了废水处理的环境压力,将进一步推动纤维素乙醇的工业化进程。

在以前的研究中,Zhu 等^[95]利用木质纤维素原料联合生产乙醇和木糖酸工艺的主要流程为首先将木质纤维素原料经过稀酸蒸汽爆破预处理,然后经过固液分离,将含有纤维素的固体部分进行中和、酶解后生产燃料乙醇,将含有木糖的液体部分经过浓缩、中和后作为原料生产木糖酸。在这个生产工艺中,由于预处理方法的限制,液体含量比较多,预处理后得到木糖浓度比较低,需要消耗大量的能量进行浓缩,同时产生大量废水。本章根据本实验室的干法生物炼制的技术特点,设计了一种新型的利用木质纤维素原料联合生产乙醇和木糖酸的生产工艺:首先将木质纤维素原料经过干式稀酸预处理、固态生物脱毒后,进行同步糖化与发酵生产乙醇,将乙醇蒸馏提取后利用塔釜废液中的木糖生产木糖酸。与以前技术相比,本生产工艺可以降低设备投入成本,降低浓缩和固液分离的操作强度,减少废水产生,降低水耗能耗。

4.2 材料与方法

4.2.1 原料

玉米秸秆来自中国内蒙古自治区巴彦淖尔市,收获于 2015 年秋。经过一系列的前处理以后玉米秸秆含有纤维素 35.38%,半纤维素 24.62%、木质素 16.05%、灰分 3.47%,基于干物料 (w/w)。

4.2.2 酶、试剂和仪器设备

商品纤维素酶购自青岛康地恩生物科技有限公司,中国,山东。该液体纤维素酶的滤纸酶活为 199.4 FPU/mL,纤维二糖酶活为 5500 CBU/mL,蛋白含量 75.9 mg/mL。本章节使用的试剂见附录I,仪器设备见附录II。

4.2.3 预处理、生物脱毒

干式稀酸预处理方法^[212]:首先,将稀硫酸溶液和干玉米秸秆一起投入预处理反应器中,50 rpm 搅拌 3 min 将其混匀,硫酸的质量分数为 2.25% (w/w),其中干玉米秸秆与硫酸溶液的固液比 (w/w) 为 2:1。通入蒸汽压力为 1.6 Mpa,温度升高至 100 °C 时计时,在 5-6 min 升高温度至预处理温度 175 °C,停留时间为 5 分钟,转速为 50 rpm。预处理后玉米秸秆的主要组分为纤维素 37.00%,半纤维素 4.31%、灰分 6.57%,使用两步酸解法测定,该方法基于 NREL 木质纤维素组分测定报告^[301,302]。每克预处理后的玉米秸秆(干基)中含有木糖 139.02 mg,葡萄糖 20.14 mg,乙酸 18.06 mg,糠醛 5.20 mg, HMF 3.19 mg。

在位固态生物脱毒的方法^[180]:首先将预处理后的玉米秸秆使用 20% (v/v) 碳酸氢钙溶液调节 pH 至 5.0-5.5,将培养好的 *Amorphotheca resinae* ZN1 斜面接入预处理后玉米秸秆,固体培养 4-5 天作为种子。将固体种子按照 10% 的接种量接入用于脱毒的 15 L

螺带搅拌式生物反应器中, 通气量为 1vvm, 每 12 h 开启搅拌 1-2 min, 转速 50 rpm。生物脱毒的过程在 28 °C、pH 4.5-5.5 条件下持续 36h, 除去大部分的糠醛和 HMF 以及一部分的乙酸。脱毒后的玉米秸秆在 121 °C 灭菌 30 分钟, 存于 4 °C 保存, 备用。

4.2.4 菌种、培养基和培养方法

Saccharomyces cerevisiae DQ1, 由本实验室经过驯化得到的一株对木质纤维水解液体系具有更好适应性的乙醇生产菌株, 在本研究中用于同步糖化发酵生产乙醇。保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbial Collection Center, CGMCC), 保藏编号为 CGMCC 2528。

Amorphotheca resinae ZN1, 由本实验室从自然界筛选分离的一株用于脱除预处理后的玉米秸秆中抑制物的脱毒菌株。保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (China General Microbial Collection Center, CGMCC), 保藏编号为 CGMCC 7452。

G. oxydans DSM 2003 购自德国微生物菌种保藏中心 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Germany, Braunschweig)。

乙醇生产菌株 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 的培养基如下:

(1) 种子合成培养基: 20 g Glucose, 2 g KH_2PO_4 , 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g Yeast extract, 加入 1L 的去离子水中。

(2) 一级种子驯化培养基: 1/4 体积的玉米秸秆脱毒水解液 (固体含量 25%, w/w) 与 3/4 体积种子培养基混合。

(3) 二级种子驯化培养基: 等体积的玉米秸秆脱毒水解液 (固体含量 25%, w/w) 与种子培养基混合。

S. cerevisiae DQ1 保存在 2 mL 冻存管中, 甘油浓度 30%, -80 °C 保存。接种时, 取出冻存管, 直接倒入 20ml 种子培养基中, 30 °C, 180 rpm 培养 18 h。随后转接到一级驯化培养基中 30 °C, 180 rpm 培养 15 h, 再转接到二级驯化培养基中 30 °C, 180 rpm 培养 15 h, 以 10% 的接种量在二级驯化培养基中扩培, 30 °C, 180 rpm, 作为种子液。将种子液按照 10% 的接种量直接接入预糖化后的玉米秸秆水解液中进行 SSF 发酵生产乙醇, 37 °C, 180 rpm。

木糖酸生产菌株 *G. Oxydans* DSM 2003 的培养基如下:

(1) 种子培养基: 80.0 g Sorbitol, 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5g KH_2PO_4 , 1.5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 加入 1L 的去离子水中。

(2) 木糖培养基: 80.0 g Xylose, 0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5g KH_2PO_4 , 1.5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 加入 1L 的去离子水中。

(3) 发酵培养基: 乙醇蒸馏塔釜废液, 不额外添加任何营养物质。

G. oxydans DSM 2003 保存在 2 mL 冻存管中, 甘油浓度 30%, -80 °C 保存。接种时, 取出冻存管, 直接倒入 20ml 种子培养基中, 30 °C 培养 24h, 随后按照需要以 10% 的接种量对种子进行扩培。种子培养好以后, 以两种方式进行木糖酸的生产: (1) 生物发酵, 将种子接入含有 0.9 L 乙醇蒸馏废液的 3 L 发酵罐中, 接种量 10%; (2) 全细胞催化,

将培养好的种子离心收集菌体，将菌体接入含有 1 L 乙醇蒸馏废液的 3 L 发酵罐中使细胞浓度在 2.5-3.0 g/L 之间。两种不同生产方式的条件相同，30 °C，500 rpm，通气量 2.4 vvm。pH 通过 5 M 氢氧化钠自动调节，维持在 5.5-6.0 之间。培养基和水均在 115 °C 灭菌 20 分钟。

SSF 生产乙醇：利用玉米秸秆 SSF 生产乙醇是在 50 L 螺带搅拌式生物反应器中进行，将预处理脱毒后的玉米秸秆和纤维素酶一同加入生物反应器中，纤维素酶的用量为 15 FPU/g DM，预糖化条件为 50 °C，pH 4.8，预糖化时间 12 h。预糖化后将温度降到 37 °C，将培养好的乙醇生产菌株种子液按 3% 的接种量接入生物反应器中，进行 SSF 生产乙醇。发酵结束后，将得到的发酵醪经过精馏提取乙醇，剩余的蒸馏废液作为生产木糖酸的原料。

4.2.5 样品分析

样品都是经过定期从发酵醪中取出，13000 rpm 离心 5 min，在分析之前经过 0.22 μm 滤膜过滤。木糖使用 HPLC 测定 (LC-20AD，示差检测器 RID-10A，岛津，日本，京都)，使用 Aminex HPX-87H 色谱柱 (Bio-rad，美国，Hercules)，柱温 65 °C，流动相为 12 mM NaHCO₃，流速为 0.6 mL/min。木糖酸使用 HPLC 测定 (LC-20AD，UV/VIS 检测器 SPD-20A，岛津，日本，京都)，色谱柱为 Aminex HPX-87H 色谱柱 (Bio-rad，美国，Hercules)，柱温 55 °C，流动相为 5 mM 硫酸，流速 0.4 mL/min。葡萄糖、乙醇、乙酸、糠醛、HMF 都是通过 HPLC 测定 (LC-20AD，示差检测器 RID-10A，岛津，日本，京都)，使用 Aminex HPX-87H 色谱柱 (Bio-rad，美国，Hercules)，柱温 65 °C，流动相为 5 mM 硫酸，流速为 0.6 mL/min。

4.2.6 乙醇和木糖酸得率计算

乙醇得率是指基于纤维素的得率，计算参照 Zhang 等^[327]提出的针对同步糖化过程中高固体含量高乙醇浓度情况下乙醇得率的计算公式：

$$\text{乙醇得率 (\%)} = \frac{[C_1] \times W}{976.9 - 0.804 \times C_1} \times \frac{1}{0.511 \times \text{Biomass} \times m \times f \times 1.111} \times 100\%$$

此公式中，[C₁]指 SSF 过程中发酵醪的乙醇浓度 (g/L)；W 表示 SSF 过程中总液体质量 (g)；f 表示预处理物料中纤维素的含量 (g/g)；Biomass 指 SSF 开始时干玉米秸秆的比重 (g/g)；m 指的是 SSF 过程中物料的总质量 (g)；0.511 是指基于酿酒酵母的生化计量学理论上从葡萄糖转化为乙醇的系数；1.111 是指纤维素转化成葡萄糖的理论转化系数。

木糖酸基于木糖的得率定义为生成的木糖酸与木糖酸理论值的比值的百分数。

$$\text{木糖酸得率 (\%)} = \frac{[XA] \times V - [XA]_0 \times V_0}{[Xy]_0 \times V_0 \times 1.107} \times 100\%$$

在这里，[XA]和[XA]₀分别表示结束时和最初时的葡萄糖酸浓度 (g/L)；[Xy]₀表示初始木糖的浓度 (g/L)；1.107 是理论上由木糖生成木糖酸的转化系数，依据分子量的比值；V 和 V₀分别表示发酵结束后和最初的发酵液的体积 (L)。

4.2.7 Aspen Plus 模型的建立

本章设计的利用玉米秸秆联合生产乙醇和木糖酸的工艺流程为 Case 1, Zhu 等^[95]提出的工艺流程为 Case 2。这两种模型中, Case 1 完全按照本章试验结果进行模拟, Case 2 则是按照 Zhu 等^[95]提出的工艺流程和试验结果进行模拟。

两种模型最大的区别在于生产工艺流程的不同: Case 1 中预处理以后的玉米秸秆经过磨浆脱毒以后, 先进行 SSF 生产乙醇, 将发酵液中的乙醇蒸馏回收后, 蒸馏塔釜废液中的木糖进行木糖酸发酵; Case 2 中预处理之后的玉米秸秆预处理醪, 固液分离后含有纤维素的固体部分进行 SSF 生产乙醇, 含有木糖的液体部分进行浓缩以后用作木糖酸发酵。针对这两种不同的生产工艺流程, 分别建立两种 Aspen Plus 模型对这两种流程中的乙醇产量、木糖酸产量进行分析, 以及在不同工艺流程的能耗和废水排放量。模型的建立主要参照美国可再生能源实验室 (NREL) 的纤维素乙醇模型^[310], 并对其进行了一定的改变, 如预处理的工段由传统的稀酸预处理改为干式稀酸预处理^[211]; 脱毒工段由过碱中和改为固态生物脱毒^[180]; SSF 生产乙醇的玉米秸秆固体含量由 20% 提高到 30%。模型设定以玉米秸秆为原料, 工厂规模设定为年处理玉米秸秆量 (干基) 30 万吨, 年生产时间为 8000 小时。物性数据由 Aspen Plus 系统内置数据库和试验数据得到, 基础热力学方法选用 NREL 提供的方法^[310]。

模型建立中的主要假设包括:

- (1) 在没有装置开停工过程中考虑连续模式操作;
- (2) 淀粉、纤维素和木聚糖水解为葡萄糖和木糖, 但只有葡萄糖参与乙醇发酵, 只有木糖参与木糖酸发酵;
- (3) 木质素和抽提物等成分不涉及乙醇和木糖酸发酵的代谢
- (4) 设备的散热量被忽略;
- (5) 不考虑种子液的加入;
- (6) 磨浆工段不考虑物质损失, 仅考虑中和反应;
- (7) 两种模型中回收环节的操作条件及得率均相同。

4.3 结果与讨论

4.3.1 纤维素乙醇的生产以及蒸馏塔釜废液中木糖的回收

本试验使用的乙醇发酵菌株为 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1, 是在原有酿酒酵母基础上经过在玉米秸秆水解液中驯化后得到的对抑制物耐受性更强的菌株, 但 *S. cerevisiae* DQ1 对玉米秸秆水解液中的木糖利用能力很弱, 几乎不能利用木糖。含有木糖的纤维素乙醇发酵废液就成为木糖酸生产原料。

前期利用玉米秸秆 SSF 生产乙醇的试验结果表明, 预处理后玉米秸秆的固体含量达到 30% 时, 在减少用水量的同时还能保持较高的乙醇得率, 还能产生高浓度的木糖有利于后续木糖酸的生产, 因此选择 30% 固体含量的玉米秸秆进行 SSF 生产乙醇, 为了得到足够的原料以进行后续的研究, SSF 生产乙醇过程在 50 L 螺带搅拌式生物反应器中进

行, 装液量 33 L, 发酵结果如图 4.1 所示。在 *S. cerevisiae* DQ1 通过 SSF 生产乙醇过程中, 首先将 30% 固体含量的玉米秸秆与纤维素酶一同加入生物反应器, 经过 12h 的预糖化 (50 °C, pH 4.8, 150 rpm) 以后, 将温度调整为 37 °C, pH 和转速保持不变。接入培养好的 *S. cerevisiae* DQ1 菌种, 接种量为 3%, SSF 生产乙醇 60 h。在 12h 的预糖化过程中, 预处理后物料中含有的少量的木聚糖和木寡糖, 在木聚糖酶的作用下生成少量木糖。在 SSF 发酵初期木糖浓度保持稳定, 后期随着乙醇发酵的进行, 乙醇的积累使得发酵醪液的总体积增大, 木糖总量保持不变的情况下, 木糖的浓度有略微下降 (图 4.1)。经过脱毒以后的玉米秸秆, 主要的抑制物如糠醛已经完全脱除, HMF 浓度很低, 虽然还有部分乙酸存在, 但是乙酸对乙醇发酵的影响很小。经过 12h 预糖化后, 预糖化液的主要成分见表 4.1。

表 4.1 预糖化液的组成

Table 4.1 The composition of hydrolysate after prehydrolysis

Component	Glucose	Xylose	Acetic acid	HMF	Furfural
Concentration (g/L)	89.87	65.39	2.51	0.15	0.00

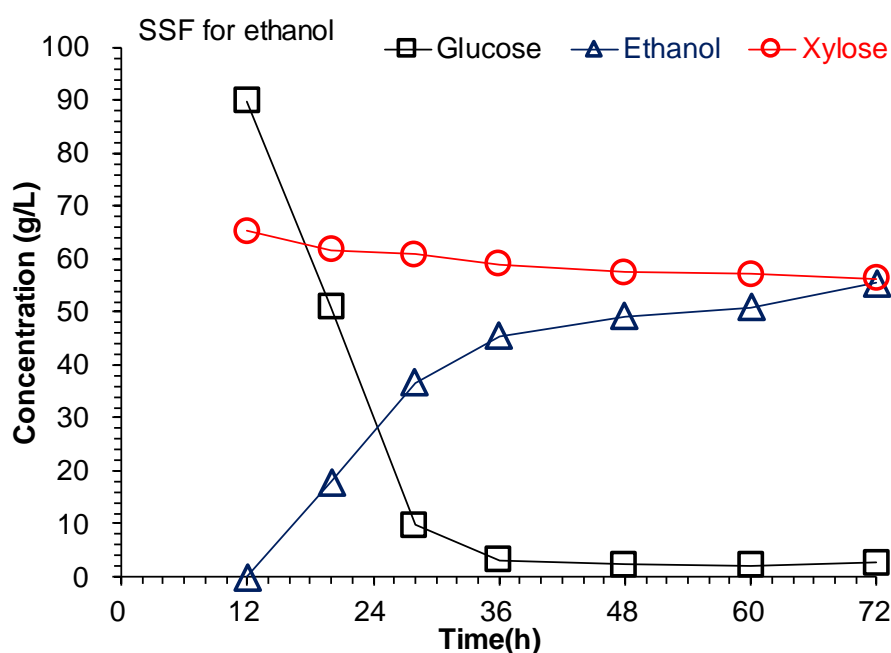


图 4.1 同步糖化与发酵生产乙醇

在 50 L 螺带搅拌式生物反应器中进行, 装液量 33 L。发酵条件: 0-12 h 为预糖化阶段, 温度 50 °C, pH 4.8, 转速 150 rpm; 12-72 h 为 SSF 生产乙醇阶段, 温度 37 °C, pH 4.8, 转速 150 rpm, 接种量 3%。

Fig. 4.1 SSF for ethanol production

The fermentation was carried out in 50 L helical ribbon stirring fermentor, liquid volume 33 L. Prehydrolysis phase (0-12 h) conditions: 50 °C, pH 4.8, 150 rpm; SSF phase (12-72 h) conditions: 37 °C, pH 4.8, 150 rpm, inoculum size 3%,

发酵开始时木糖浓度达到 65.39 g/L, 随着乙醇浓度的增加, 发酵液的密度降低、总体积变大, 导致发酵结束时木糖的浓度降到 55.35 g/L, 基于半纤维素的得率为 64.31%, 同时乙醇的浓度达到了 59.80 g/L, 基于纤维素的得率为 73.88%。研究表明, 当乙醇的浓度至少达到 40 g/L 时即体积浓度达到 5% (v/v), 进行精馏时才会得到较好的经济效益^[1], 本次 SSF 的乙醇浓度远远超过这个指标, 有比较好的工业生产潜力。将得到的乙醇发酵醪经过精馏塔进行精馏, 收集, 剩余的塔釜废液含有大量的木糖, 将精馏中产生的蒸馏水回补入发酵醪中, 乙醇的提取导致发酵醪总体积减少, 以及回补的水会有部分损失, 从而导致木糖浓度升高。将蒸馏后的发酵醪进行固液分离以后得到纤维素乙醇蒸馏废液, 其中木糖浓度为 67.42 g/L, 葡萄糖和乙醇的浓度均未检测到, 作为生产木糖酸的原料。

高木糖浓度的获得与使用的脱毒方法有密切的关系, 在传统的生物脱毒过程中, 脱毒菌株的生长过程中会消耗大量的木糖, 这将不利于后续木糖酸的生产。本试验采用了一种经过改进的生物脱毒的方法^[180], 对预处理后的玉米秸秆原料中的木糖的消耗大大降低, 从而保留了大量的木糖。新型固体生物脱毒方式的引入可以有效地降低设备的占用率, 减少生产过程中能量的消耗, 从而降低生产成本。整体而言, 本试验乙醇发酵液制备的过程中, 最大的优点在于用废水排放少, 其中干式稀酸预处理、固态生物脱毒和高固体含量 SSF 乙醇生产, 在减少用水量的同时也降低了废水的产生, 在整个过程中几乎没有废水的产生。

4.3.2 利用纤维素乙醇蒸馏废液中的木糖生产木糖酸

G. oxydans DSM 2003 是一种常用的木糖酸生产菌株, 其细胞膜上的葡萄糖脱氢酶既可以催化葡萄糖生成葡萄糖酸, 也可以催化木糖生成木糖酸。在玉米秸秆水解液中 *G. oxydans* DSM 2003 可以利用其中木糖生成木糖酸, 但是在以木糖为唯一碳源时的生长和发酵情况还需要进行试验。首先在木糖合成培养基中, 研究 *G. oxydans* DSM 2003 利用木糖的情况, 结果见图 4.2。

试验首先在摇瓶中进行, 在 250 mL 的三角瓶中装液量为 50 mL, 接种量 10%, 转速 220 rpm, 温度为 30 °C。图 4.2 可以看出, 在木糖为唯一碳源的培养基中, *G. oxydans* DSM 2003 可以利用木糖进行菌体生长, 但是菌体的生长速率要低于在葡萄糖培养基以及山梨醇培养基中的速率, 也说明了木糖并不是 *G. oxydans* DSM 2003 的优势碳源。初始 63.77 g/L 的木糖经过 40 h 被完全消耗, 最终产生木糖酸的浓度达到 64.82 g/L, 木糖酸的得率为 96.15%。说明 *G. oxydans* DSM 2003 在木糖合成培养基中依然具有很好的生长和木糖酸发酵性能, 与以前的研究相比, *G. oxydans* DSM 2003 生产木糖酸的速率比葡萄糖酸的生产速率慢, 为了提高生产速率, 在发酵罐中继续进行木糖酸的生产试验, 在 3 L 发酵罐中进行, 总装液量 1 L, 接种量 10%, 通气量 2.5 vvm, 转速 500 rpm, 温度为 30 °C。充足的氧气供应使得 *G. oxydans* DSM 2003 生产木糖酸的速率明显升高, 从之前摇瓶中的 0.96 g/L/h 升高到 3.24 g/L/h, 说明木糖酸的生产也需要大量的氧气, 在发酵罐中的木糖酸发酵效果要明显优于摇瓶。

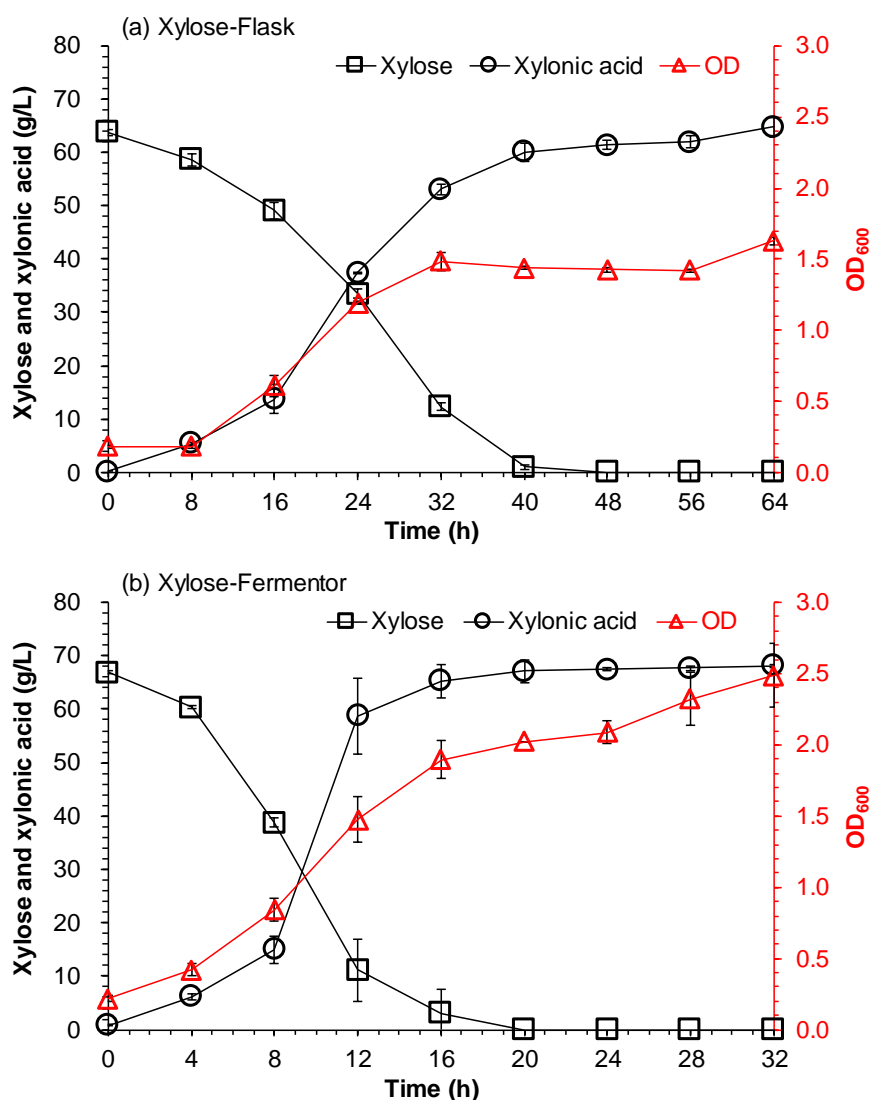


图 4.2 *G. oxydans* DSM 2003 利用单一木糖生产木糖酸

(a) 摇瓶; (b) 发酵罐。

Fig. 4.2 Xylonic acid production of *G. oxydans* DSM 2003 using xylose as only carbon source

(a) In flasks; (b) In fermentors.

表 4.2 纤维素乙醇蒸馏废液组分

Table 4.2 The composition of cellulosic ethanol distilled residual

Composition	Glucose	Xylose	Ethanol	Acetic acid	HMF	Furfural
Concentration (g/L)	0.47	67.42	0.00	3.18	0.00	0.00

G. oxydans DSM 2003 在以木糖为碳源的情况下可以较好地生长和生产木糖酸，接着使用乙醇蒸馏废液作为原料进行木糖酸的生产。使用的乙醇蒸馏废液的组分如表 4.2 所示，其中还含有极少量的葡萄糖，乙醇已经被完全蒸馏除去，主要的抑制物糠醛、HMF 在脱毒以后只有少量剩余，在随后的 SSF 生产乙醇过程中也被完全被转化。还含有 3.18 g/L 的乙酸，但是乙酸对 *G. oxydans* DSM 2003 的抑制作用很小。在乙醇蒸馏废液中木糖的浓度达到了 67.42 g/L，可以用来生产较高浓度的木糖酸产品。将培养好的 *G. oxydans*

DSM 2003 种子液接入含有乙醇蒸馏废液的 3 L 发酵罐中，其中不添加任何营养物质，总装液量 1 L，接种量 10%，通气量 2.5 vvm，转速 500 rpm，温度为 30 °C。发酵生产木糖酸的结果见图 4.3a。

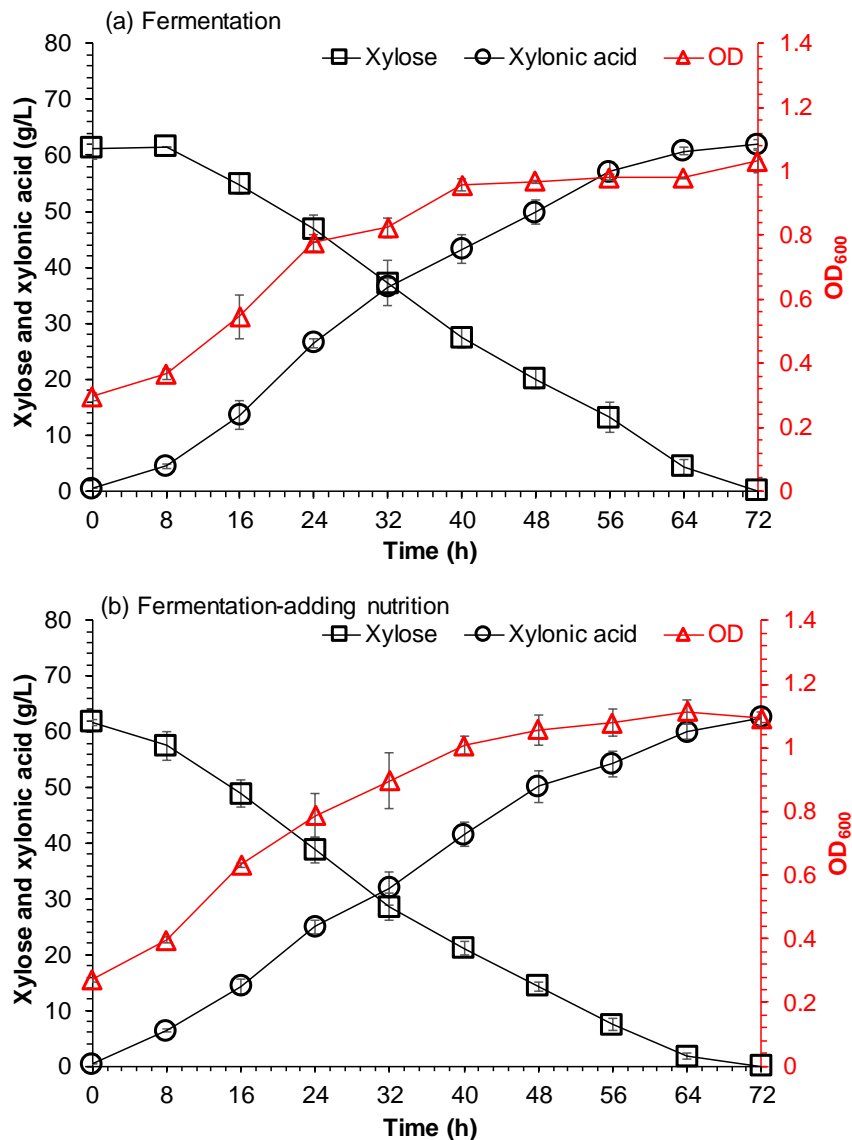


图 4.3 *G. oxydans* DSM 2003 利用乙醇蒸馏废液发酵生产木糖酸

(a) 不添加营养物质发酵；(b) 添加营养物质发酵。所添加营养物质与木糖合成培养基相同。

Fig. 4.3 Xylonic acid production of *G. oxydans* DSM 2003 using ethanol stillage by fermentation
(a) Fermentation without extra nutrition; (b) Fermentation with nutrition which as same as xylose synthetic medium.

图 4.3a 表明，虽然乙醇蒸馏废液中主要的抑制物糠醛、HMF 都已经被去除，但是 *G. oxydans* DSM 2003 的生长和发酵性能与木糖合成培养基中相比，仍然受到比较明显的影响。*G. oxydans* DSM 2003 利用乙醇蒸馏废液发酵生产木糖酸时，初始 62.97 g/L 木糖经过 72 h 才被完全消耗，木糖酸的生产速率只有 0.89 g/L/h，远低于木糖合成培养基中的 3.24 g/L/h。推测木糖酸生产速率比较低可能是 *G. oxydans* DSM 2003 缺少营养物质

导致的。在以前的研究中, *G. oxydans* DSM 2003 以玉米秸秆水解液作为原料时, 生长和发酵都不需要添加额外的营养物质, 但是在以乙醇发酵废液作为原料时, 玉米秸秆水解液中富含的微生物所必须的营养物质可能已经被酵母消耗, 从而导致 *G. oxydans* DSM 2003 在乙醇蒸馏废液中缺少营养物质从而影响生长, 导致木糖酸生产速率降低。随后, 在乙醇蒸馏废液中加入与合成培养基中相同组分、相同浓度的营养物质 (Yeast extract 和无机盐离子), 发酵结果见图 4.3 b。试验结果表明, 添加营养物质并不能明显改善 *G. oxydans* DSM 2003 在乙醇蒸馏废液中的发酵生产木糖酸的性能, 说明营养物质并不是影响其性能的原因。可能是酵母菌生产乙醇过程中产生了一些不利于 *G. oxydans* DSM 2003 生产木糖酸的代谢产物。

为了提高在乙醇蒸馏废液中木糖酸的生产速率, 根据 *G. oxydans* DSM 2003 自身特性 (催化木糖酸生成的酶位于细胞膜上, 产生的木糖酸直接进入培养基中), 采用 *G. oxydans* DSM 2003 全细胞催化的方式生产木糖酸。首先将培养好的 *G. oxydans* DSM 2003 种子液 6000 rpm 离心 5min, 弃上清, 小心用乙醇蒸馏废液收集菌体, 接入到 3 L 发酵罐中, 装液量为 1 L, 使初始菌体细胞浓度控制在 2.5 g/L 左右, 即 OD₆₀₀ 保持在 5.0 左右。在 30 °C, pH 5.5, 转速 500 rpm, 通气量 2.5 vvm 的条件下, 以乙醇发酵废液中的木糖作为底物, 进行全细胞催化生产木糖酸, 结果见图 4.4。

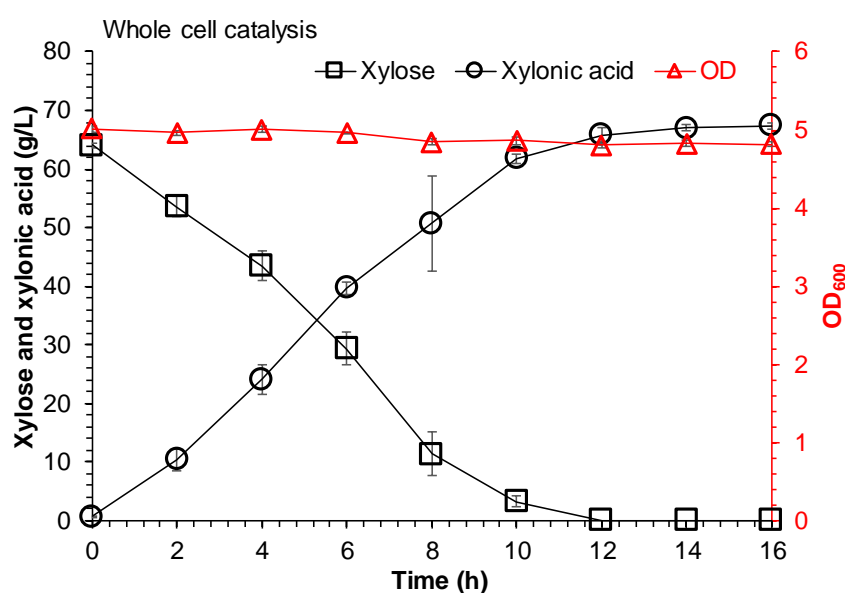


图 4.4 *G. oxydans* DSM 2003 利用乙醇蒸馏废液全细胞催化生产木糖酸

全细胞催化反应在 3 L 发酵罐中进行, 总装液量 1 L, 接种菌体浓度为 2.5 g/L, 通气量 2.5 vvm, 转速 500 rpm, 温度为 30 °C。

Fig. 4.4 Xylonic acid production of *G. oxydans* DSM 2003 using ethanol distilled stillage by whole cell catalysis

In 3 L fermentor, liquid volume 1 L, inoculum cell concentration was 2.5 g/L, 2.5 vvm, 500 rpm, 30 °C.

全细胞催化过程中菌体浓度大约是发酵过程中菌体浓度的 5 倍, 其催化木糖产生木

糖酸的速率也有了大幅度的提高,从采用发酵方式的 0.89 g/L/h 提高到 5.42 g/L/h, 64.06 g/L 的木糖在 12h 被消耗完, 得到 65.84 g/L 的木糖酸, 木糖酸得率达到 96.42%。在整个全细胞催化过程中, *G. oxydans* DSM 2003 的菌体量保持比较稳定, OD₆₀₀ 一直维持在 5.0 左右, 表明菌体没有明显的生长, 只是起到酶催化的作用。Zhu 等^[95]的研究也采用了全细胞催化的方式, 但是由于他们所使用的稀酸预处理后的预处理液中含有高浓度的抑制物, 而且不容易被生物脱除, 同时, 由于其预处理液中木糖的浓度很低, 只有 12.03 g/L, 所以将预处理液进行了浓缩 5 倍左右以提高初始木糖的浓度, 从而提高最终木糖酸的浓度。但是在浓缩的过程中, 预处理过程中产生的抑制物也会随着浓缩而增加, 高浓度的抑制物极大的影响了木糖酸生产菌株的生长和木糖酸生产性能, 木糖酸生产菌株几乎不能在这种浓缩液中生长, 还会影响到催化木糖酸生产的葡萄糖脱氢酶的活性, 即使采取全细胞催化的方式生产木糖酸, 其生产速率依然比较低。在细胞浓度与本试验比较接近的情况下, 大约 50 g/L 的初始木糖经过 96 h 催化后, 依然有木糖残留。

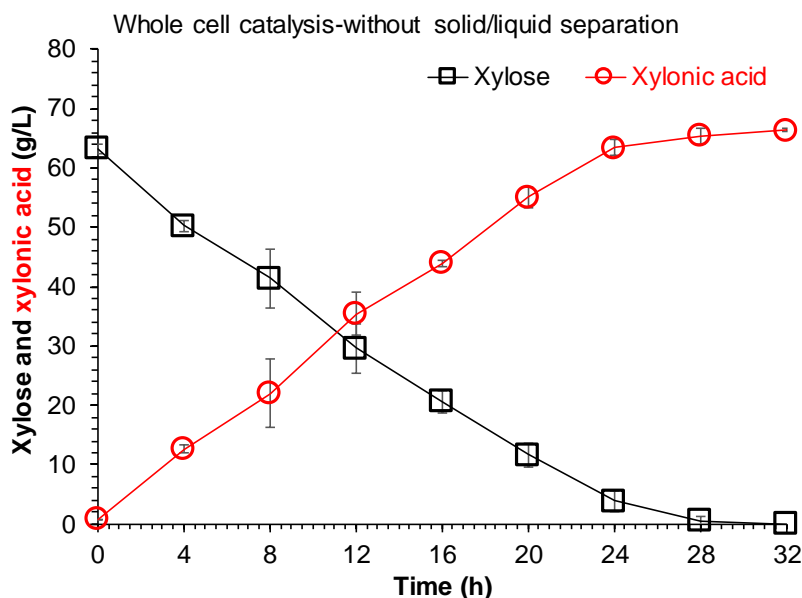


图 4.5 *G. oxydans* DSM 2003 利用乙醇蒸馏废醪全细胞催化生产木糖酸

全细胞催化反应在 3 L 发酵罐中进行, 总装液量 1 L, 接种菌体浓度为 2.5 g/L, 通气量 2.5 vvm, 转速 500 rpm, 温度为 30 °C。

Fig. 4.5 Xylonic acid production using ethanol distilled residual by whole cell catalysis

In 3 L fermentor, liquid volume 1 L, inoculum cell concentration was 2.5 g/L, 2.5 vvm, 500 rpm, 30 °C.

在对乙醇蒸馏废醪的固液分离过程中, 相当可观的一部分木糖(约四分之一)进入到残渣中, 造成了木糖的损失, 如果能直接利用乙醇蒸馏废醪进行木糖酸的生产就可以更充分的利用其中的木糖, 提高木糖的利用率以及最终木糖酸的产量。但是在乙醇蒸馏废醪中即使经过酶解和乙醇发酵以后仍保持较高的不溶性固体浓度(约 15-20%), 会对 *G. oxydans* DSM 2003 在其中的传质传热造成比较大的阻碍, *G. oxydans* DSM 2003 的生长和木糖酸生产性能均会受到比较大的影响。最初尝试使用正常发酵方式利用不经过固

液分离的乙醇蒸馏残醪进行木糖酸生产，木糖酸生产速率非常低，不具有生产价值。在乙醇蒸馏废液中，*G. oxydans* DSM 2003 使用全细胞催化的方式生产木糖酸时，木糖酸生产速率比较令人满意，尝试在不进行固液分离的乙醇蒸馏废醪中直接催化生产木糖酸，期望可以得到更好的生产结果，发酵结果见图 4.5。

全细胞催化的方式可以使 *G. oxydans* DSM 2003 高效利用乙醇蒸馏废醪（不经过固液分离的醪液）中的木糖，催化 32 h，木糖全部被消耗，木糖酸的浓度达到 66.42 g/L。虽然与利用乙醇蒸馏废液（经过固液分离后的液体部分）催化生产木糖酸相比，生产速率有一定的下降，但是生产速率依然达到了 2.34 g/L/h。而且这其中还有设备限制的因素，使用的发酵罐中的搅拌桨的桨叶比较短，且只在底部有一个单桨，在高固体含量的乙醇蒸馏废醪中不能起到很好的混合效果，使得溶氧无法满足木糖酸生产的需求。如果进一步改进发酵设备的性能，预计可能会提高木糖酸的生产速率。

4.3.3 利用玉米秸秆联合生产乙醇和木糖酸钠工艺的 Aspen Plus 模拟分析

4.3.3.1 利用 Aspen Plus 模型进行生产工艺中的物料衡算

在本研究中，一个基于干式稀酸预处理和固体生物脱毒的新型的通过利用纤维素乙醇蒸馏废液中的木糖生产木糖酸的生产工艺流程被建立。在以前的研究中，Zhu 等^[95]报道了一种基于稀酸蒸汽爆破预处理的利用预处理液中木糖生产木糖酸的方法。为了更直观、更精确的比较这两种联产乙醇和木糖酸工艺流程不同的设计理念所产生的差别，对这两种生产工艺流程进行了 Aspen Plus 模拟，详细的 Aspen Plus 模拟工艺流程图见图 4.6，模型的建立参考 Zhang 等^[328]利用木质淀粉生产乙醇的 Aspen Plus 工艺流程模型。本试验所采用的工艺流程即 Case 1 所涉及到的试验数据列于表 4.3。Case 2 所涉及到的试验数据参考 Zhu 等^[95]的试验数据。

Case 1 模拟的是本研究所设计的利用玉米秸秆联产乙醇和木糖酸的工艺流程。如图 4.6a 所示，玉米秸秆物流首先进入预处理反应器 R101 进行干式稀酸预处理（Area 1）；预处理后的玉米秸秆与 20%（w/w）氢氧化钙溶液中和并进入磨浆机 M201 磨浆粉碎，然后进入脱毒生物反应器 R201 开始生物脱毒以脱除预处理过程产生的抑制物（Area 2）；脱毒后的玉米秸秆与纤维素酶一起加入预糖化反应器 R301，经过预糖化以后的预糖化液进入生物反应器 R302 进行 SSF 生产乙醇（Area 3）。乙醇发酵液经过蒸馏得到 40%（v/v）乙醇蒸馏液，同时保留收集蒸馏后塔釜废醪（Area 5）。随后乙醇蒸馏后塔釜废醪进入生物反应器 R401，利用其中的木糖进行木糖酸的生产（Area 4）。最后将木糖酸发酵醪液进行固液分离提纯回收得到 98%（w/w）木糖酸钠产品（Area 6）。

Case 2 模拟的是 Zhu 等^[95]设计的利用玉米秸秆联产乙醇和木糖酸的工艺流程。如图 4.6b 所示，玉米秸秆物流首先进入预处理反应器 R101（Area 1）进行稀酸蒸汽爆破预处理（Area 1）；得到预处理产物固液比为 1:15，经过固液分离以后得到预处理液（Area 2）。固液分离后的固体纤维素部分进入预糖化反应器 R301 进行预糖化，随后进入生物反应器 R302 进行 SSF 生产乙醇（Area 3），乙醇的回收流程与 Case 1 相同（Area 5）。预处理液经过蒸汽加热，蒸发浓缩以后木糖浓度达到 55 g/L（Area 7），随后进入生物反应器

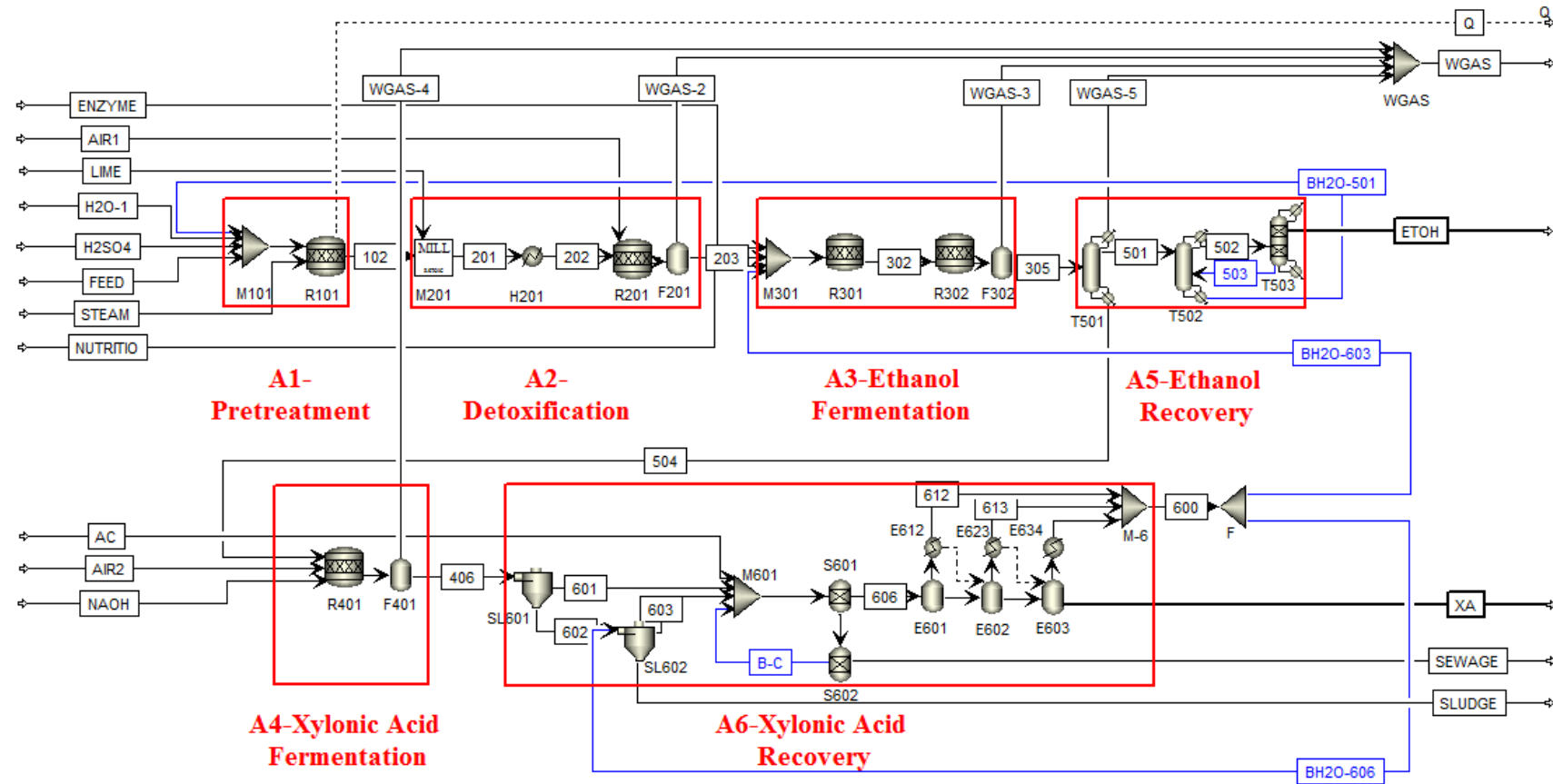
R401 进行木糖酸生产 (Area 4), 木糖酸的回收过程与 Case 1 相同 (Area 6)。

表 4.3 Aspen Plus 模型 Case 1 建立所涉及的主要参数

Table 4.3 Main process input data for the established Aspen Plus simulation model of Case 1

Features	Values
Pretreatment	
Sulfuric acid usage (g/kg dry feedstock)	25
Residence time (min)	5
Temperature (°C)	175
Pressure (MPa)	0.89
Solids content of pretreated corn stover (%)	50
Glucan conversion to glucose (%)	4
Hemicellulose conversion to xylose (%)	40
Xylan conversion to furfural (%)	3.3
Acetyl group conversion to acetic acid (%)	60
Biodetoxification	
Temperature (°C)	28
Residence time (hour)	36
Furfural conversion (%)	100
Acetic acid conversion (%)	70
Glucose consumed for cell growth (%)	5
Xylose consumed for cell growth (%)	90
H ₂ SO ₄ neutralized (%)	100
Saccharification and Ethanol Fermentation	
Temperature for pre-hydrolysis (°C)	50
Temperature for fermentation (°C)	37
Residence time for pre-hydrolysis (hour)	12
Residence time for fermentation (hour)	84
Solids loading (%)	30
Cellulase dosage (mg protein/g cellulose)	28
Glucan conversion to glucose (%)	87
Xylan conversion to xylose (%)	82
Ethanol yield from glucose (%)	93
Glycerol yield from glucose (%)	1
Glucose consumed for cell growth (%)	2
Ethanol concentration (g/L)	60
Sodium Xylonate Fermentation	
Temperature for fermentation (°C)	30
Residence time for fermentation (hour)	32
Sodium xylonate concentration (g/L)	75
Sodium xylonate yield from xylose (%)	98
Product recovery	
Purity (ethanol)	99% (w/w)
Purity (sodium xylonate)	98% (w/w)

(a) Case 1-Xylose in stillage



(b) Case 2-xylose in pretreatment liquid

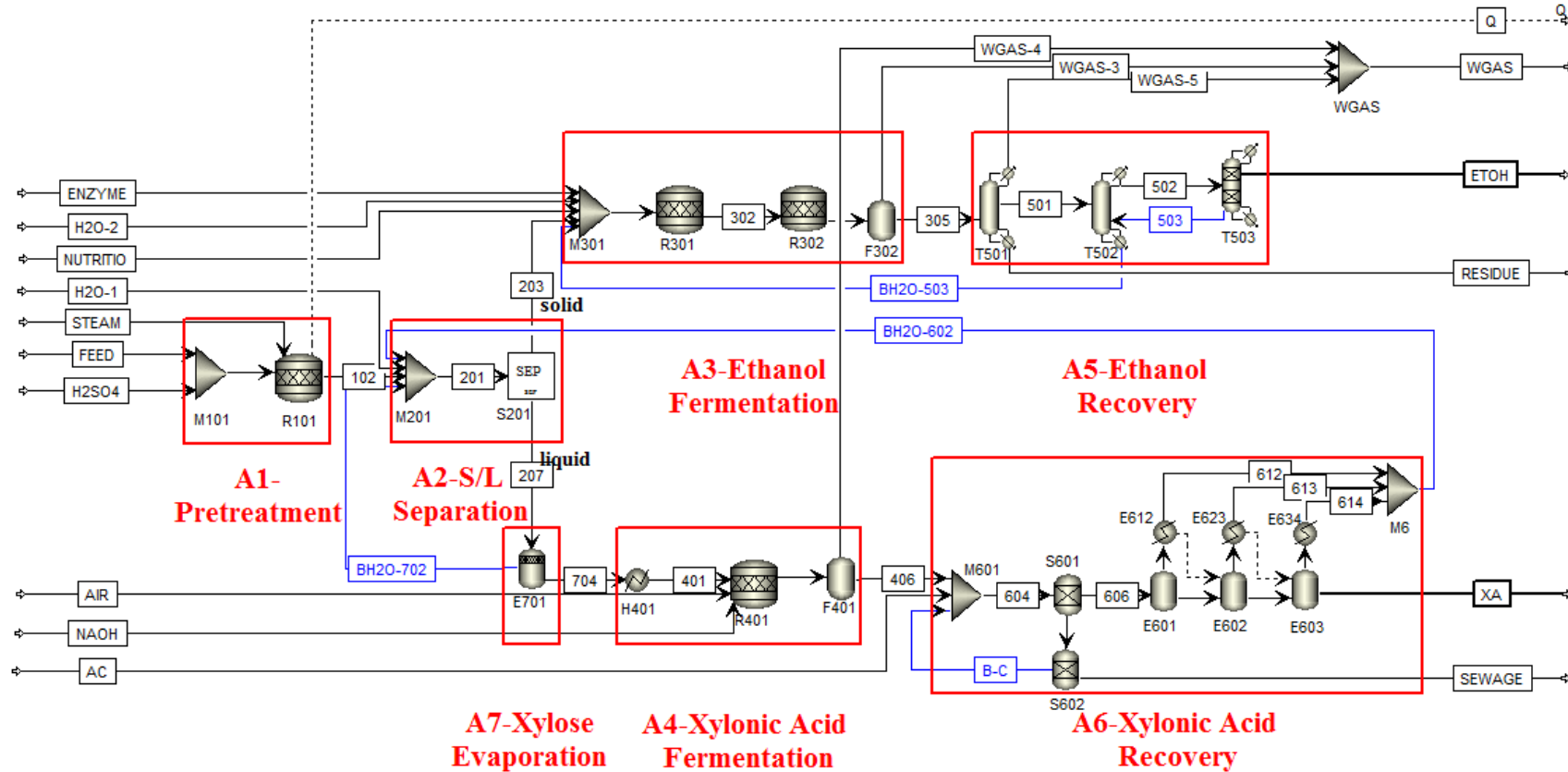


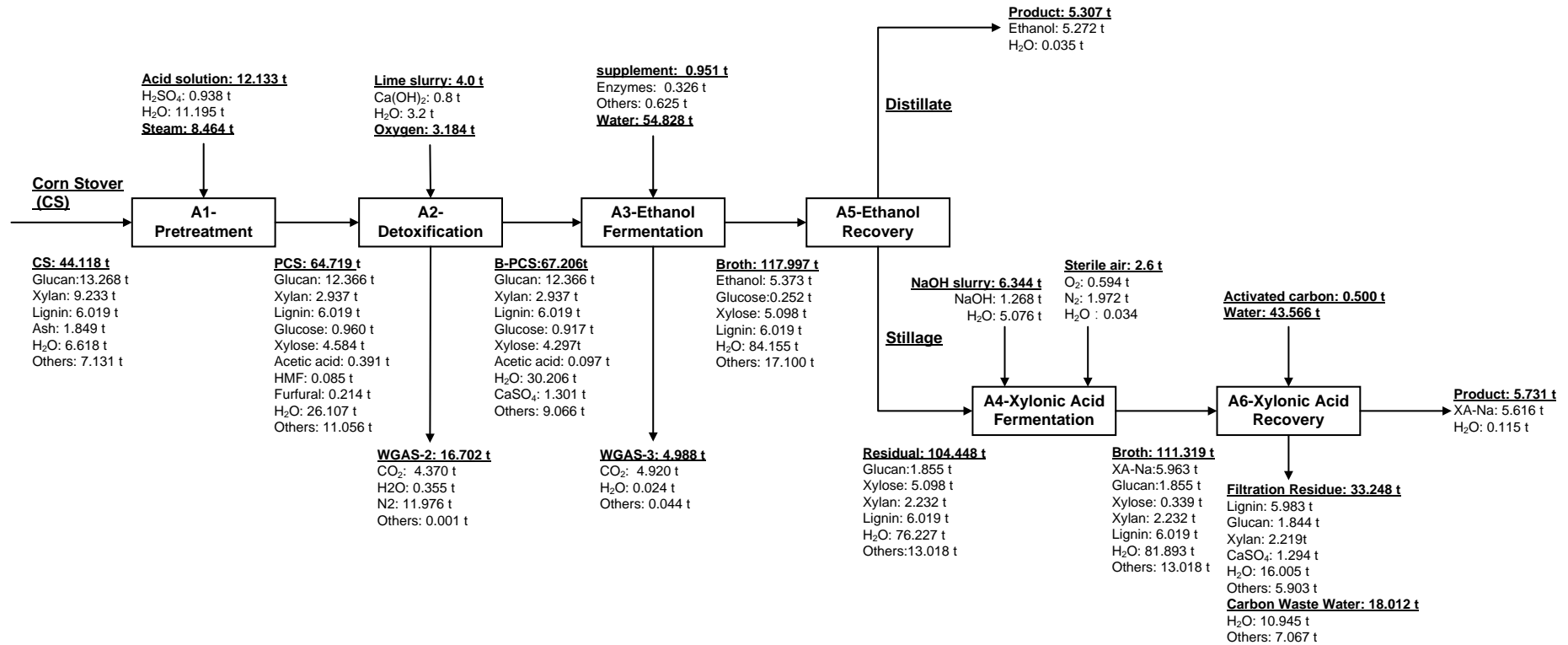
图 4.6 木糖酸生产工艺流程的 Aspen Plus 模型

(a) 本研究的流程模型，Case 1，使用乙醇蒸馏醪液中的木糖生产木糖酸；(b) Zhu 等^[95]研究的流程模型，Case 2，使用预处理液中的木糖生产木糖酸。

Fig. 4.6 The flowsheets modeling of xylonic acid production based on Aspen Plus.

(a) Flowsheet modeling based on this study, Case 1, the distillation stillage containing xylose was used for the xylonic acid production; (b) Flowsheet modeling based on previous study of Zhu et al.^[95], Case 2, pretreatment liquid containing xylose was used for xylonic acid production. Abbreviations: ETOH, ethanol; XA, xylonic acid; SEP, solid/liquid separation; AC, active carbon; WGAS, waste gas.

(a) Case 1-Xylose in stillage



(b) Case 2-xylose in pretreatment liquid

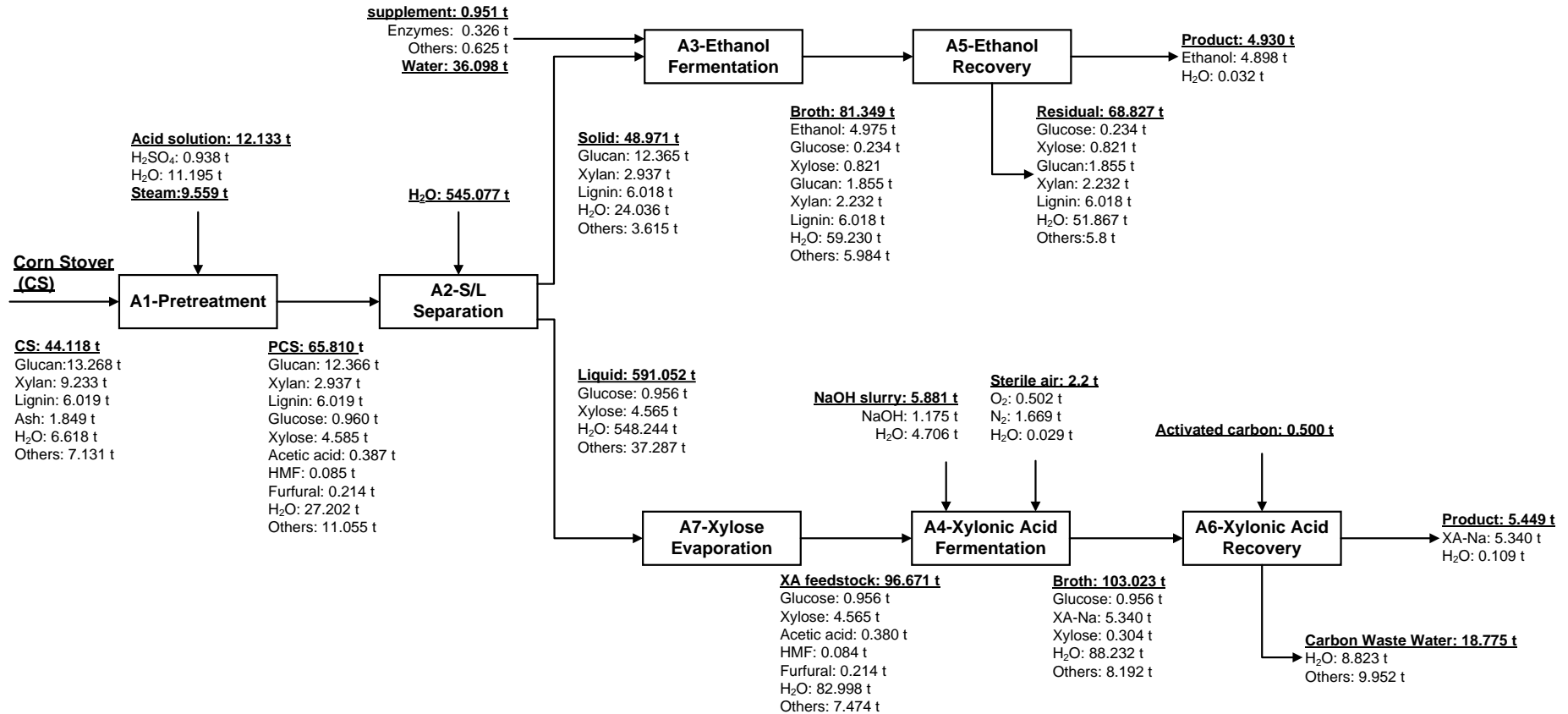


图 4.7 木糖酸生产工艺流程的物料衡算

(a) 本研究工艺流程的物料衡算, Case 1; (b) Zhu 等^[95]研究工艺流程的物料衡算, Case 2。

Fig. 4.7 The mass balance of xyloonic acid production flowsheets.

(a) Mass balance of flowsheet in this study, Case 1; (b) Mass balance of flowsheet in previous study of Zhu et al. ^[95], Case 2.

Abbreviations: PCS, pretreated corn stover; B-PCS, biodetoxified and pretreated corn stover; XA-NA, sodium xylonate

对这两种工艺流程模型进行详细的物料衡算，结果见图 4.7。图 4.7a 表示 Case 1 的物料衡算结果，流程从玉米秸秆原料的预处理开始，按照年处理干玉米秸秆（干基）量 30 万吨的规模设计，每年的生产时间为 8000 小时，因此每小时处理干秸秆量为 37.5 t，实际物流使用的玉米秸秆含水量为 15%。图 4.7b 表示 Case 2 的物料衡算结果，原料的物流与 Case 1 相同。经过这两个不同的工艺流程最终得到的乙醇和木糖酸钠总量比较接近，Case 1 中每吨干秸秆最终得到 142 kg 的乙醇和 151 kg 的木糖酸钠；Case 2 中每吨干秸秆最终得到 131 kg 的乙醇和 142 kg 的木糖酸钠。

4.3.3.2 利用 Aspen Plus 模型计算生产工艺中的废水排放和能耗

利用 Aspen 仿真流程模型对全流程的两个方面进行计算：（1）整个流程的废水产量；（2）整个流程的蒸汽能耗计算。这两个工艺流程最大的区别在于废水产生量和能耗（表 4.4）。

表 4.4 Aspen Plus 模拟两种木糖酸生产工艺的废水和能耗

Table 4.4 Wastewater and energy consumption in the two processes of sodium xylonate production calculated by Aspen Plus modeling

Contents	Areas	Case 1	Case 2
Wastewater (ton/ton sodium xylonate)	XA-Na recovery	5.921	0
	Ethanol Distillation	0	12.890
	Decoloration	3.207	3.517
	Total	9.117	16.406
Steam energy consumption (MJ/ton sodium xylonate)	Pretreatment	5671	6736
	Ethanol distillation	10202	8432
	Ethanol Rectification	1171	1259
	Triple Effect Evaporation	17714	15218
	Prehydrolysate Evaporation	0	208343
Total	34758	239989	

Case 1: 本研究设计的工艺流程；Case 2: Zhu 等^[95]报道的工艺流程。

Case 1: the flowsheet used in this study. Case 2: the flowsheet cited in previous study of Zhu et al.^[95].

Case 1 的废水包括：木糖酸回收过程中，木糖酸发酵液固液分离后的残渣；活性炭对木糖酸发酵液脱色时，活性炭的回收率为 90%，损失的 10%活性炭为废水，共计 51.260 t/h，相当于 9.117 t/t 木糖酸钠。Case 2 的废水包括：乙醇回收过程中，三效蒸发第一次蒸馏塔釜所排蒸馏废液和损失的活性炭废液，共计 87.602 t/h，相当于 16.406 t/t 木糖酸钠。在这两个工艺流程中废水产生量的差异主要在于：乙醇回收时，乙醇发酵醪经过蒸馏以后，得到 40%（w/w）的乙醇蒸馏液，剩余的蒸馏废醪（大约乙醇发酵醪总质量的 80%）。在 Case 1 中，这些蒸馏废醪不需要排放，直接作为木糖酸生产的原料进行木糖酸生产，木糖酸回收过程中排出。然而在木糖酸回收之前需要将木糖酸发酵醪进行固液分离，最终只有木糖酸发酵醪总质量 30%左右的废水排出。在 Case 2 中，这些蒸馏废醪直接作为废水排出，从而造成废水的排放量远大于 Case 1。

在本研究中, 能耗的计算只考虑蒸汽的用量, 这两个工艺流程中生产 1 吨木糖酸钠所消耗的能量见表 4.4。Case 1 中, 能耗主要来自于预处理、乙醇蒸馏和精馏、以及木糖酸发酵液的三效蒸发, 每生产 1 吨木糖酸钠总共消耗了 34,758 MJ 的能量。在 Case 2 中, 能耗主要来自于预处理、乙醇蒸馏和精馏、木糖酸发酵液的三效蒸发、以及预处理液的浓缩。与 Case 1 相比, Case 2 中还需要将大量含木糖的预处理液加热蒸发浓缩将近 6 倍, 从最初约 10 g/L 的木糖浓缩到 55 g/L, 从而适合后续木糖酸发酵生产。仅此一项, 就使得 Case 2 每生产 1 吨木糖酸钠需要消耗 208,343 MJ 的热能, 占 Case 2 总能耗的 86.81%。从而使 Case 2 每生产 1 吨木糖酸钠总能耗达到了 239,989 MJ, 大约是 Case 1 总能耗的 8 倍。根据中国国家标准 GB/T 2589-2008《标准煤不同能源的转换系数》, 用于乙醇低压蒸馏的低热值是 3763 MJ/t steam。Case 1 和 Case 2 每生产 1 吨木糖酸钠所需蒸汽用量分别是 9.24 吨和 63.78 吨。基于同样的中国国家标准 GB/T 2589-2008, 生产 1 吨低压蒸汽需要 0.1286 吨标准煤, 因此, Case 1 和 Case 2 中每生产 1 吨木糖酸钠的标准煤用量分别为 1.19 吨和 8.20 吨。与以前的工艺相比, 使用本工艺每生产 1 吨木糖酸钠可以节省 7.01 吨标准煤, 减少 7.289 吨废水, 以年处理干基玉米秸秆 30 万吨为例, 每年可以生产木糖酸 4.493 万吨, 节省标准煤 31.496 万吨, 减少废水 32.750 万吨, 表现出更强的经济竞争力和实用性。

本试验设计的利用玉米秸秆联合生产乙醇和木糖酸的工艺 (Case 1) 采用了干式稀酸预处理, 固液比 (w/w) 从普通预处理的 1:10 提高到 2:1, 预处理物料没有游离水, 没有预处理液的产生, 极大减少了水用量和废水的产生。另一方面, 本工艺中在预处理过程中产生的木糖存在于玉米秸秆物料中, 最终通过乙醇发酵进入乙醇蒸馏废醪中, 直接用来木糖酸生产、回收。与以前的工艺中将乙醇和木糖酸分开生产、回收相比也能够大大减少废水的产生, 这是由于以前的工艺与本工艺相比, 乙醇回收过程也会产生大量废水。乙醇的回收首先要经过蒸馏得到浓度为 40% 的乙醇, 剩余大量的乙醇蒸馏废液在以前的工艺中直接作为废水, 而在本工艺中这些乙醇发酵液直接作为生产木糖酸的原料。正是如此, 本工艺产生的废水只有以前工艺的一半左右。以前的工艺中, 由于使用蒸汽爆破预处理, 产生了大量的废水, 直接产生了两个问题: 一个是废水多, 处理成本过高; 另一个是木糖浓度低, 不利于后续发酵。本工艺中, 由于干式稀酸预处理、固态生物脱毒、高固体含量 SSF 的应用, 得到乙醇发酵醪中木糖浓度要远高于现有工艺预处理液中的木糖, 可以直接用来生产木糖酸, 省去了对含有木糖的预处理浓缩的操作, 大大降低了能耗, 使得本工艺每生产 1 吨木糖酸钠产品所消耗的标准煤只有现有工艺的七分之一左右。综合分析, 本试验所设计的联合生产乙醇和木糖酸钠的工艺流程 (Case 1) 更环保、更实用, 在实际的工业应用中具有很大的优势。

4.4 本章小结

纤维素乙醇是目前最主要的木质纤维素原料生物基产品, 在其生产过程中大多数乙醇生产菌株不能利用木糖, 或者利用木糖的效率过低, 从而导致乙醇发酵醪中大量的木

糖被浪费。为了解决这个问题，本章提出了一种联合生产乙醇和木糖酸的工艺流程。

(1) 玉米秸秆原料经过干式稀酸预处理得到含水量 50%左右的预处理物料，固态生物脱毒除去预处理物料中绝大多数的抑制物。随后对脱毒后的玉米秸秆以 30%高固体含量进行 SSF 生产乙醇，所用乙醇生产菌株为 *S. cerevisiae* DQ1，其对抑制物有较强的耐受性但不能利用木糖，最终得到乙醇浓度为 59.80 g。将乙醇蒸馏提取后，剩余的蒸馏废醪含有高浓度木糖 (67.42 g/L) 直接作为生产木糖酸的原料。

(2) 以乙醇蒸馏废液为底物时，*G. oxydans* DSM 2003 发酵得到的木糖酸的生产速率只有 0.89 g/L/h，远低于木糖合成培养基 (3.24 g/L/h)，说明乙醇蒸馏废液中仍然存在一些抑制 *G. oxydans* DSM 2003 生长和木糖酸发酵性能的物质。*G. oxydans* DSM 2003 采用全细胞催化方式生产木糖酸，其生产速率达到 5.24 g/L/h，远高于发酵方式，体现出卓越的生产性能。随后以同样的全细胞催化方式，直接以未经过固液分离的乙醇蒸馏废醪为底物生产木糖酸，生产速率受到大量不溶性固形物的影响降为 2.34 g/L/h，但可以明显减少固液分离过程中木糖的损失，依然具有实际应用价值。

(3) 基于 Aspen Plus 模拟分析，本章设计的利用木质纤维素原料联合生产乙醇和木糖酸的生产工艺与以前的工艺相比具有比较明显的优势，在乙醇产量和木糖酸钠产量都比较接近的情况下，本工艺的能耗只有以前工艺的 1/7，废水只有以前工艺的 1/2，更符合工业化生产的需求。本章节的研究为乙醇工业中木糖的利用找到了新的出路，可以降低纤维素乙醇生产成本，有助于纤维素乙醇行业的蓬勃发展，同时为木糖酸生产行业寻找到了可替代的优质原料，为纤维素木糖酸的工业化生产提供了理论依据。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论与创新点

本研究以储量丰富、价格低廉的木质纤维素生物质取代传统玉米淀粉或者蔗糖作为原料,采用独特的干法生物炼制工艺通过有氧发酵生物合成高浓度、高得率、高生产速率的纤维素葡萄糖酸钠和木糖酸。首先使用一株工业上常用的葡萄糖酸生产菌株-*A. niger* SIIM M276 以玉米秸秆水解液为底物生产葡萄糖酸,在研究过程中发现 *A. niger* SIIM M276 表现出一定的抑制物耐受性和较好的葡萄糖酸生产性能。随着研究的深入,发现 *A. niger* SIIM M276 不能利用木糖等非葡萄糖类型的单糖生产需要的化学品,且在木质纤维素水解液体系中菌体形态不稳定,影响工业规模的扩大培养。为了解决这些问题,引入了一株新的葡萄糖酸生产菌株-*G. oxydans* DSM 2003,其对玉米秸秆水解液中的抑制物耐受性和降解能力更强,葡萄糖酸生产速率更快,而且菌体形态在木质纤维素水解液体系中稳定,并可以利用木糖转化成具有相同水泥添加剂功能的木糖酸。*G. oxydans* DSM 2003 还能够解决传统纤维素乙醇生产过程中发酵液中木糖残留的问题,将乙醇蒸馏废醪中的木糖生产成木糖酸,为传统纤维素乙醇工业生产中残留的木糖找到新的出路。

对得到的产品进行水泥添加剂性能测试,纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品表现出与商品葡萄糖酸钠相似的性能。Aspen Plus 技术经济分析表明,本生产工艺的废水和能耗均低于传统工艺,产品的最低售价要低于同样生产工艺的纤维素乙醇,并低于商品葡萄糖酸钠的价格,表现出非常强的经济竞争力和使用价值。本研究始终以工业化生产为最终目标,研究重点主要放在如何通过改进技术和工艺设计解决将来工业生产中可能出现的问题,如控制废水的产生和能耗,构建一条切实可行的以木质纤维素生物质为原料生物炼制生产葡萄糖酸和木糖酸的工艺流程,以符合未来工业化生产的需求。

5.1.1 结论

(1) *A. niger* SIIM M276 是一株工业上应用普遍的葡萄糖酸生产菌株,在含有抑制物的低固体含量新鲜玉米秸秆水解液中的葡萄糖酸得率超过 90%,但生产速率要低于合成培养基。对 *A. niger* SIIM M276 在 9 种典型的稀酸预处理过程中产生的抑制物胁迫下的生长、葡萄糖氧化酶活性以及葡萄糖酸生产速率进行研究发现 *A. niger* SIIM M276 具有一定的抑制物耐受性,并能将其中大多数的高毒性抑制物转化成低毒性的化合物从而使自身在水解液体系中存活。尝试采用适应性进化策略提高 *A. niger* SIIM M276 在水解液中的适应性和生产速率,结果发现随着传代次数的增加,*A. niger* SIIM M276 的菌体形态会发生比较明显的变化,从而使其发酵性能大大衰退,但短期的驯化依然会明显提升 *A. niger* SIIM M276 在水解液中发酵性能。在发酵罐中对发酵条件进行优化,葡萄糖酸的生产速率明显提高,发现溶氧是影响 *A. niger* SIIM M276 利于玉米秸秆水解液生产葡萄糖酸速率的一个重要因素。*A. niger* SIIM M276 在高固体含量的新鲜玉米秸秆水解

液中由于抑制物浓度过高而不能生长,对预处理后的玉米秸秆进行脱毒,提高水解液的固体含量得到高浓度的葡萄糖酸,最终发酵得到的葡萄糖酸浓度和生产速率都得到明显的提升,但是和工业葡萄糖酸生产速率还有一定的差距。

(2) 针对 *A. niger* SIIM M276 作为丝状真菌在利用玉米秸秆生产葡萄糖酸过程中所存在种种问题,一株具有葡萄糖酸生产能力的革兰氏阴性菌-*G. oxydans* DSM 2003 成为了本研究新的生产菌株。*G. oxydans* DSM 2003 在同等条件下葡萄糖酸生产速率是 *A. niger* SIIM M276 的 3-4 倍,体现出更好的发酵性能。同时 *G. oxydans* DSM 2003 还可以利用玉米秸秆水解液中的木糖生产木糖酸,浓度最高可以达到 40 g/L 左右,但木糖酸的生产速率要低于葡萄糖酸。*G. oxydans* DSM 2003 发酵过程中葡萄糖酸会被进一步氧化为酮基葡萄糖酸(KGA),从而影响葡萄糖酸的积累。对影响 KGA 生成的因素进行研究,发现低 pH 和高木糖浓度可以有效抑制 KGA 的生成,从而实现同时得到高浓度的葡萄糖酸和木糖酸。由于发酵过程的中间产物葡萄糖- δ -内酯会严重影响纤维素酶中的 β -葡萄糖苷酶的活性,严重影响酶解过程,*G. oxydans* DSM 2003 不适合 SSF 方式生产葡萄糖酸和木糖酸。木质纤维素来源的葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品作为水泥缓凝剂表现出不弱于玉米淀粉来源的商品葡萄糖酸钠的性能。对整个生产工艺进行 Aspen Plus 模拟,并进行技术经济分析,生产过程中产生废水少、能耗低,计算得到葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品的最低售价为\$0.404/kg,低于同样工艺生产的纤维素乙醇,并低于商品葡萄糖酸钠的售价。

(3) 为了解决传统纤维素乙醇生产过程中残留的木糖得不到有效利用的问题,利用 *G. oxydans* DSM 2003 将传统纤维素乙醇生产废水中残留的木糖生产木糖酸,为纤维素乙醇工业中残留的木糖找到一条适合的出路。本文建立了一条从玉米秸秆原料出发,经过干式稀酸预处理、固态生物脱毒、高固含量同步糖化发酵生产乙醇、精馏塔釜液生产木糖酸的新型联产乙醇和木糖酸的工艺流程。*G. oxydans* DSM 2003 可以直接在乙醇精馏塔釜液中生长并生产木糖酸,但生产速率较低,采用全细胞催化的方式可以大大提升木糖酸的生产速率。经过严谨的 Aspen Plus 模拟,将本工艺和以前工艺进行比较,发现本工艺在秸秆消耗量、乙醇产量和木糖酸产量都相当的情况下,废水和能耗分别只有以前工艺的 1/2 和 1/7,表现出明显的优势,更符合大规模工业化生产的趋势。

5.1.2 创新点

(1) 通常木质纤维素生物质水解得到的糖类通过厌氧发酵方式被微生物利用,通过自身代谢生产生物基化学品,微生物的代谢途径容易受到抑制物的影响,从而降低产品的得率和速率。本论文通过有氧发酵方式利用微生物自身生产的酶直接催化氧化葡萄糖和木糖生产葡萄糖酸和木糖酸,这种生产方式速率快,转化率高,受抑制物的影响小,更适合生物炼制体系。

(2) 首次建立了一条具有工业化生产潜力的利用玉米秸秆原料干法生物炼制生产高浓度葡萄糖酸和木糖酸的工艺流程,选用了抑制物耐受性强的生产菌株 *G. oxydans* DSM 2003 在发酵过程中实现了对纤维素和半纤维素组分的共同高效利用,得到的葡萄

糖酸/木糖酸产品的产率高、得率高、浓度高,在以玉米秸秆为原料生产时全程不需要额外营养物质的添加,最大限度的降低了生产成本。

(3) 对得到的纤维素葡萄糖酸钠/木糖酸钠产品进行了水泥缓凝性能测试,性能优良,表现出替代商品葡萄糖酸钠作为水泥缓凝剂使用的潜力,木糖酸钠具有减水剂效果,可以对葡萄糖酸钠的缓凝性能起到辅助和强化的功能。作为水泥添加剂对产品纯度要求比较低,简化了产品的后续回收分离与纯化的工序,极大节省了生产成本。并对该产品进行了技术经济分析,表现出很强的经济竞争力,非常具有工业化生产的潜力。

(4) 围绕干法生物炼制特点,建立一种新型的以玉米秸秆为原料联产乙醇和木糖酸钠的生产工艺,独特的干式稀酸预处理、固态生物脱毒以及高固体含量的 SSF 乙醇生产技术的运用,使得本工艺与以前工艺相比,能耗和废水排放大大降低,更符合现代工业生产的要求。本工艺的建立为纤维素乙醇工业中木糖的利用提供更好的出路,有效降低纤维素乙醇的生产成本,同时带动了纤维素木糖酸生产的工业化进程。

5.2 展望

本论文通过对木质纤维素原料预处理、生物脱毒、高固体含量糖化、耐受性菌株高效生产葡萄糖酸和木糖酸的干法生物炼制技术中存在的 key 问题进行了研究分析。构建了实用性很强的生产工艺,发现了一些新的问题并对其中一部分问题进行解决,除此之外还对一些试验现象和机理给出了合理的推测,但是在本研究中仍然存在一些有待进一步研究的问题。

(1) 在利用 *G. oxydans* DSM 2003 以玉米秸秆为原料同时生产高浓度葡萄糖酸和木糖酸的过程中,葡萄糖酸并不是最终产物,可以进一步被葡萄糖酸脱氢酶氧化成酮基葡萄糖酸(KGA),当葡萄糖浓度低于一定范围时,积累的葡萄糖酸开始向 KGA 转化,而此时木糖才开始被利用。正是由于木糖的利用与葡萄糖的利用不同步,导致了当木糖完全转化成木糖酸时,有相当一部分的葡萄糖酸已经被转化成 KGA,造成葡萄糖酸的损失,从而导致无法同时得到最高浓度的葡萄糖酸和木糖酸。虽然本研究从 pH 和木糖浓度入手,降低了从葡萄糖酸到 KGA 的转化速率,初步解决了这个问题。但是 pH 过低也会影响木糖酸的生成速率,从而使反应延长。在下一步的研究中,首先对葡萄糖脱氢酶利用葡萄糖和木糖的特性进行深入研究,期望能够实现葡萄糖和木糖的同步利用,既可以减少葡萄糖酸的损失,也可以加快整体的生产速率。另外计划使用基因改造手段对葡萄糖酸脱氢酶的编码基因进行敲除,从而从根源上阻止葡萄糖酸向 KGA 的转化,实现高效高浓度的葡萄糖酸、木糖酸生产。

(2) *G. oxydans* DSM 2003 在利用玉米秸秆原料同步糖化发酵生产葡萄糖酸和木糖酸的研究中,发现葡萄糖酸的产生对糖化作用有比较明显的抑制,需要对其抑制机理进行进一步的研究,从而尝试解除抑制作用,实现葡萄糖酸木糖酸的同步糖化发酵生产。同时针对 *G. oxydans* DSM 2003 在高固体含量糖化醪中氧气传递不足的问题,对生物反应器进行改良,增大搅拌桨叶并增加桨叶数目,加强混合强度以增加氧气传递速率,提

高葡萄糖酸和木糖酸的生产速率。

(3) *G. oxydans* DSM 2003 在利用木质纤维素原料联产乙醇和木糖酸的研究中, *G. oxydans* DSM 2003 在乙醇蒸馏废液中发酵性能比较差, 虽然采用全细胞催化的方式可以解决木糖酸生产速率低的问题, 但是全细胞催化的生产方式会提高木糖酸的生产成本, 并且在不经固液分离的乙醇蒸馏废醪中进行全细胞催化菌体难以回收, 增加生产操作的复杂性。在下一步研究中, 使用适应性进化策略对 *G. oxydans* DSM 2003 进行优化, 进一步提高其抑制物耐受性, 以及利用木糖的效率, 得到一株能够更好的适应乙醇蒸馏废醪体系以及木质纤维素水解液体系的稳定的生产菌株。同时对木糖酸生物反应器进行改良, 加快木糖酸的生产速率, 期望能够直接在不经过固液分离的乙醇蒸馏废醪中进行传统的发酵生产木糖酸, 使其更符合工业化生产的需求。

(4) *G. oxydans* DSM 2003 在木质纤维素来源的抑制物的胁迫下表现出优良的耐受性和对抑制物的降解转化能力, 非常适合生物炼制生产体系。希望对 *G. oxydans* DSM 2003 的抗抑制物机理进行深层研究, 通过转录组分析对其关键抗性基因进行发掘, 为生物炼制菌株的抑制物抗性改造和发酵性能强化提供重要的基因元器件。

参考文献

- [1] Hill J, Nelson E, Tilman D, et al. Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006, 103(30): 11206-11210.
- [2] Goldemberg J. Ethanol for a sustainable energy future. *Science*. 2007, 315(5813): 808-810.
- [3] Tomás-Pejó E, Oliva JM, Ballesteros M, et al. Realistic approach for full-scale bioethanol production from lignocellulose: a review. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2008, 67(11): 874-884.
- [4] Pan X, Gilkes N, Kadla J, et al. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: optimization of process yields. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006, 94(5): 851-861.
- [5] Hu G, Heitmann JA, Rojas OJ. Feedstock pretreatment strategies for producing ethanol from wood, bark, and forest residues. *Bioresources*. 2008, 3(1): 270-294.
- [6] Thomsen M, Thygesen A, Thomsen AB. Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 83(3): 447-455.
- [7] Duchesne LC, Larson DW. Cellulose and the evolution of plant life. *Bioscience*. 1989, 39: 238-241.
- [8] Chandel A, Singh O. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of 'Biofuel'. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 89(5): 1289-1303.
- [9] Lu Y, Wang Y, Xu G, et al. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 160: 360-369.
- [10] Ohgren K, Bengtsson O, Grauslund MG, et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of glucose and xylose in steam-pretreated corn stover at high fiber content with *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400. *Journal of Biotechnology*. 2006, 126: 488-498.
- [11] Ohgren K, Bura R, Lesnicki G, et al. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochemistry*. 2007, 42: 834-839.
- [12] Varga E, Klinke HB, Réczey K, et al. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, 88: 567-574.
- [13] Alvira P, Moreno AD, Ibarra D, et al. Improving the fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* by laccase during ethanol production from steam exploded wheat straw at high substrate loadings. *Biotechnology Progress*. 2013, 29: 74-82.
- [14] Erdei B, Galbe M, Zacchi G. Simultaneous saccharification and cofermentation of whole wheat in integrated ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2013, 56: 506-514.
- [15] Georgieva TI, Hou X, Hilstrom T, et al. Enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of high dry matter wet exploded wheat straw at low enzyme loading. *Applied Biochemistry and*

Biotechnology. 2008, 148(1-3): 35-44.

[16] Jorgensen H, Pedersen JV, Larsen J, et al. Liquefaction of lignocellulose at high solids concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, 96: 862-870.

[17] Toquero C, Bolado S. Effect of four pretreatments on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation of wheat straw. Influence of inhibitors and washing. *Bioresource Technology*. 2014, 157: 68-76.

[18] Gellerstedt G. Softwood kraft lignin: raw material for the future. *Industrial Crops and Products*, 2015, 77(23): 845-854.

[19] Trinh LTP, Lee YJ, Lee JW, et al. Characterization of ionic liquid pretreatment and the bioconversion of pretreated mixed softwood biomass. *Biomass and Bioenergy*. 2015, 81: 1-8.

[20] Stenberg K, Tengborg C, Galbe M, et al. Optimisation of steam pretreatment of SO₂-impregnated mixed softwoods for ethanol production. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 1998, 71(4): 299-308.

[21] Yamamoto M, Iakovlev M, Bankar S, et al. Enzymatic hydrolysis of hardwood and softwood harvest residue fibers released by sulfur dioxide-ethanol-water fractionation. *Bioresource Technology*. 2014, 167: 530-538.

[22] Santos RB, Treasure T, Gonzalez R, et al. Impact of hardwood species on production cost of second generation ethanol. *Bioresource Technology*. 2012, 117: 193-200.

[23] Pereira SR, Portugal-Nunes DJ, Evtuguin DV, et al. Advances in ethanol production from hardwood spent sulphite liquors. *Process Biochemistry*. 2013, 48(2): 272-282.

[24] Jones BW, Venditti R, Park S, et al. Comparison of lab, pilot, and industrial scale low consistency mechanical refining for improvements in enzymatic digestibility of pretreated hardwood. *Bioresource Technology*. 2014, 167: 514-520.

[25] Capecchi L, Galbe M, Wallberg O, et al. Combined ethanol and methane production from switchgrass (*Panicum virgatum* L.) impregnated with lime prior to steam explosion. *Biomass and Bioenergy*. 2016, 90: 22-31.

[26] Wang X, Zhang ZT, Wang Y, et al. Improvement of acetone-butanol-ethanol (ABE) production from switchgrass pretreated with a radio frequency-assisted heating process. *Fuel*. 2016, 182(15): 166-173.

[27] Aurangzaib M, Moore KJ, Archontoulis SV, et al. Compositional differences among upland and lowland switchgrass ecotypes grown as a bioenergy feedstock crop. *Biomass and Bioenergy*. 2016, 87: 169-177.

[28] Kumar S, Kothari U, Kong L, et al. Hydrothermal pretreatment of switchgrass and corn stover for production of ethanol and carbon microspheres. *Biomass and Bioenergy*. 2011, 35: 956-968.

[29] Xu J, Cheng JJ, Shivappa RRS, et al. Lime pretreatment of switchgrass at mild temperatures for ethanol production. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 2900-2903.

[30] Nishimura H, Tan L, Sun ZY, et al. Efficient production of ethanol from waste paper and the biochemical methane potential of stillage eluted from ethanol fermentation. *Waste Management*. 2016, 48: 644-651.

[31] Guan W, Shi S, Tu M, et al. Acetone-butanol-ethanol production from Kraft paper mill

sludge by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*. 2016, 200: 713-721.

[32] Limayem A, Ricke SC. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012, 38(4): 449-467.

[33] Kuhad RC, Mehta G, Gupta R, et al. Fed batch enzymatic saccharification of newspaper cellulose improves the sugar content in the hydrolysates and eventually the ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*. 2010, 34(8): 1189-1194.

[34] Wu FC, Huang SS, Shih IL. Sequential hydrolysis of waste newspaper and bioethanol production from the hydrolysate. *Bioresource Technology*. 2014, 167: 159-168.

[35] Wu G, Zhang YJ. Does China factor matter? An econometric analysis of international crude oil prices. *Energy Policy*. 2014, 72: 78-86.

[36] Hache E, Lantz F. Speculative trading and oil price dynamic: A study of the WTI market. *Energy Economics*. 2013, 36: 334-340.

[37] Azad AK, Rasul MG, Khan MMK, et al. Prospect of biofuels as an alternative transport fuel in Australia. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, 43: 331-351.

[38] Michael W, May W, Hong H. Life cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types. *Environmental Research Letters*. 2007, 2(2): 24001-24013.

[39] Demirbas A. Products from lignocellulosic materials via degradation processes. *Energy Sources, Part A: Recovery Utilization and Environmental Effects*. 2007, 30(1): 27-37.

[40] Martinez-Hernandez E, Campbell G, Sadhukhan J, et al. Economic value and environmental impact (EVEI) analysis of biorefinery systems. *Chemical Engineering Research and Design*. 2013, 91(8):1418-1426.

[41] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008, 454(7206): 841-845.

[42] Pauly M, Keegstra K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal*. 2008, 54: 559-568.

[43] Pérez J, Muñoz-Dorado J, Rubia TDL, et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview. *International Microbiology*. 2002, 5(2): 53-63.

[44] Zhao X, Cheng K, Liu D, et al. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 82(5): 815-827.

[45] Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annual Review of Plant Biology*. 2010, 61: 263-289.

[46] Agbor VB, Cicek N, Sparling R, et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnology Advances*. 2011, 29(6): 675-685.

[47] Duan X, Zhang C, Ju X, et al. Effect of lignocellulosic composition and structure on the bioethanol production from different poplar lines. *Bioresource Technology*. 2013, 140(7): 363-367.

[48] Wyman CE, Spindler DD, Grohmann K. Simultaneous saccharification and fermentation of several lignocellulosic feedstocks to fuel ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 1992, 3(5): 301-307.

- [49] Foyle T, Jennings L, Mulcahy P. Compositional analysis of lignocellulosic materials: evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. *Bioresource Technology*. 2007, 98(16): 3026-3036.
- [50] Moxley G., Zhu Z, Zhang YH. Efficient sugar release by the cellulose solvent-based lignocellulose fractionation technology and enzymatic cellulose hydrolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008, 56(17): 7885-7890.
- [51] Walker L, Wilson D. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresource Technology*. 1991, 36(1): 3-14.
- [52] O'sullivan AC. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*. 1997, 4(3): 173-207.
- [53] Klemm D, Heublein B, Fink HP, et al. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie International Edition*. 2005, 44(22): 3358-3393.
- [54] Nidetzky B, Steiner W, Hayn M, et al. Enzymatic hydrolysis of wheat straw after steam pretreatment: experimental data and kinetic modelling. *Bioresource Technology*. 1993, 44(1): 25-32.
- [55] Agblevor F, Besler S, Wiselogle AE. Production of oxygenated fuels from biomass: impact of feedstock storage. *Fuel science and technology international*. 1996, 14(4): 589-612.
- [56] Ragauskas AJ, Nagy M, Dongho K, et al. From wood to fuels: integrating biofuels and pulp production. *Industrial biotechnology*. 2006, 2(1): 55-65.
- [57] Li M, Tu M, Cao D, et al. Distinct roles of residual xylan and lignin in limiting enzymatic hydrolysis of organosolv pretreated loblolly pine and sweetgum. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2013, 61(3): 646-654.
- [58] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, 56(1-2): 17-34.
- [59] Blazej A. Wood chemistry. *Chemie Des Holzes*. 1979, 103(3): 1254-1262.
- [60] Fengel D, Wegener G. Wood: chemistry, ultrastructure, reactions. *Holz als Roh-und Werkstoff*, 1984, 42(8):314-314.
- [61] Gray KA, Zhao L, Emptage M. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2006, 10(2): 141-146.
- [62] Bozell JJ, Petersen GR. Cheminform abstract: technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates-The US Department of Energy's "Top 10" Revisited. *Green Chemistry*. 2010, 12(4): 539-554.
- [63] Zhao X, Zhang L, Liu D, et al. Biomass recalcitrance Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2012, 6(4):465-482.
- [64] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*, 2002, 83(1): 1-11.
- [65] Cai D, Dong Z, Wang Y, et al. Biorefinery of corn cob for microbial lipid and bio-ethanol production: an environmental friendly process. *Bioresource Technology*. 2016, 211: 677-684.
- [66] Abraham A, Mathew AK, Sindhu R, et al. Potential of rice straw for bio-refining: an overview. *Bioresource Technology*. 2016, 215: 29-36.

- [67] Sun WL, Tao WY. Simultaneous saccharification and fermentation of rice straw pretreated by a sequence of dilute acid and dilute alkali at high dry matter content. *Energy Sources Part A: Recovery Utilization and Environmental Effects*, 2013, 35: 741-752.
- [68] Wang G, Tan L, Sun ZY, et al. Production of bioethanol from rice straw by simultaneous saccharification and fermentation of whole pretreated slurry using *Saccharomyces cerevisiae* KF-7. *Environmental Progress and Sustainable Energy*, 2015, 34: 582-588.
- [69] Watanabe I, Miyata N, Ando A, et al. Ethanol production by repeated batch simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of alkali-treated rice straw using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Bioresource Technology*. 2012, 123: 695-698.
- [70] Barana D, Salanti A, Orlandi M, et al. Biorefinery process for the simultaneous recovery of lignin, hemicelluloses, cellulose nanocrystals and silica from rice husk and *Arundo donax*. *Industrial Crops and Products*. 2016, 86: 31-39.
- [71] Megawati, Sediawan WB, Sulisty H, et al. Kinetics of sequential reaction of hydrolysis and sugar degradation of rice husk in ethanol production: effect of catalyst concentration. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 2062-2067.
- [72] Zhang H, Ding X, Chen X, et al. A new method of utilizing rice husk: consecutively preparing D-xylose, organosolv lignin, ethanol and amorphous superfine silica. *Journal of Hazardous Materials*. 2015, 291: 65-73.
- [73] García-Aparicio MP, Oliva JM, Manzanares P, et al. Second generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel*, 2011, 90: 1624-1630.
- [74] Schneider L, Dong Y, Haverinen J, et al. Efficiency of acetic acid and formic acid as a catalyst in catalytical and mechanocatalytical pretreatment of barley straw. *Biomass and Bioenergy*. 2016, 91: 134-142.
- [75] Li H, Kim NJ, Jiang M, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic residues pretreated with phosphoric acid-acetone for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2009, 100: 3245-3251.
- [76] López-Linares JC, Ballesteros I, Tourán J, et al. Optimization of uncatalyzed steam explosion pretreatment of rapeseed straw for biofuel production. *Bioresource Technology*. 2015, 190: 97-105.
- [77] Cai D, Wang Y, Chen C, et al. Acetone-butanol-ethanol from sweet sorghum juice by an immobilized fermentation-gas stripping integration process. *Bioresource Technology*. 2016, 211: 704-710.
- [78] Shen F, Hu J, Zhong Y, et al. Ethanol production from steam pretreated sweet sorghum bagasse with high substrate consistency enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*. 2012, 41: 157-164.
- [79] Wang L, Luo Z, Shahbazi A. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) bagasse using response surface methodology. *Industrial Crops and Products*. 2013, 42: 280-291.
- [80] Wanderley MCA, Martín C, Rocha GJM, et al. Increase in ethanol production from sugarcane bagasse based on combined pretreatments and fed-batch enzymatic hydrolysis.

Bioresource Technology. 2013, 128: 448-453.

[81] Zhu JY, Gleisner R, Scott CT, et al. High titer ethanol production from simultaneous enzymatic saccharification and fermentation of aspen at high solids: a comparison between SPORL and dilute acid pretreatments. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 8921-8929.

[82] Ramachandriya KD, Wilkins M, Atiyeh HK, et al. Effect of high dry solids loading on enzymatic hydrolysis of acid bisulfite pretreated Eastern redcedar. *Bioresource Technology*. 2013, 147: 168-176.

[83] Hoyer K, Galbe M, Zacchi G. Effects of enzyme feeding strategy on ethanol yield in fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce at high dry matter. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 14-24.

[84] Rudolf A, Alkasrawi M, Zacchi G, et al. A comparison between batch and fed batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005, 37: 195-204.

[85] Sassner P, Galbe M, Zacchi G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated *Salix* at high dry matter content. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006, 39: 756-762.

[86] Xu J, Wang Z, Cheng JJ. Bermuda grass as feedstock for biofuel production: a review. *Bioresource Technology*. 2011, 102(17): 7613-7620.

[87] Lee JM, Jameel H, Venditti RA, et al. A comparison of the autohydrolysis and ammonia fiber explosion (AFEX) pretreatments on the subsequent enzymatic hydrolysis of coastal Bermuda grass. *Bioresource Technology*. 2010, 101(14): 5449-5458.

[88] Kraujalienė V, Pukalskas A, Kraujalis P, et al. Biorefining of *Bergenia crassifolia* L. roots and leaves by high pressure extraction methods and evaluation of antioxidant properties and main phytochemicals in extracts and plant material. *Industrial Crops and Products*. 2016, 89: 390-398.

[89] Romero-García JM, Lama-Muñoz A, Castro E. Obtaining sugars and natural antioxidants from olive leaves by steam-explosion. *Food Chemistry*. 2016, 210: 457-465.

[90] Liguori R, Faraco V. Biological processes for advancing lignocellulosic waste biorefinery by advocating circular economy. *Bioresource Technology*. 2016, 215: 13-20.

[91] Demirbas A. Recent progress in biorenewable feedstocks. *Energy Education Science and Technology*. 2008, 22:69-95.

[92] Zhang X, Tu M, Paice MG. Routes to potential bioproducts from lignocellulosic biomass lignin and hemicelluloses. *Bioenergy Research*. 2011, 4(4): 246-257.

[93] Meiberg J, Spa H. Microbial production of gluconic acid and gluconates. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1983, 49(1): 89-90.

[94] Toivari MH, Nygård Y, Penttilä M, et al. Microbial D-xylonate production. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2012, 96:1-8.

[95] Zhu J, Rong Y, Yang J, et al. Integrated production of xylonic acid and bioethanol from acid-catalyzed steam-exploded corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015, 176:1370-1381.

[96] Zhou X, Xu Y, Yu S. Simultaneous bioconversion of xylose and glycerol to xylonic acid

- and 1,3-dihydroxyacetone from the mixture of pre-hydrolysates and ethanol-fermented waste liquid by *Gluconobacter oxydans*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2016, 178:1-8.
- [97] Cherubini F. The biorefinery concept: using biomass instead of oil for producing energy and chemicals. *Energy Conversion and Management*. 2010, 51: 1412-1421.
- [98] Demirbas A. Biorefineries for biofuel upgrading: a critical review. *Applied Energy*. 2009, 86: 151-161.
- [99] Demirbas A. Biorefineries: current activities and future developments. *Energy Conversion and Management*. 2009, 50: 2782-2801.
- [100] Octave S, Thomas D. Biorefinery: toward an industrial metabolism. *Biochimie*. 2009, 91: 659-664.
- [101] Fernando S, Adhikari S, Chandrapal C. Biorefineries: current status, challenges, and future direction. *Energy Fuels*. 2006, 20: 1727-1737.
- [102] Melero JA, Iglesiasb J, Garcia A. Biomass as renewable feedstock in standard refinery units. Feasibility, opportunities and challenges. *Energy and Environmental Science*. 2012, 5: 7393-7420.
- [103] Kumar R, Singh S, Singh OV. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2008, 35(5): 377-391.
- [104] Binder JB, Raines RT. Simple chemical transformation of lignocellulosic biomass into furans for fuels and chemicals. *Journal of the American Chemical Society*. 2009, 131(5): 1979-1985.
- [105] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals and biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012, 38: 522-550.
- [106] Tilman D, Socolow R, Foley JA, et al. Beneficial biofuels-the food, energy, and environment trilemma. *Science*. 2009, 325: 270-271.
- [107] Nonhebel S. Renewable energy and food supply: will there be enough land? *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2005, 9: 191-201.
- [108] Schubert C. Can biofuels finally take center stage? *Nature Biotechnology*. 2005, 24: 777-784.
- [109] Ji LQ. An assessment of agricultural residue resources for liquid biofuel production in China. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015, 44: 561-575.
- [110] Lange JP. Lignocellulose conversion: an introduction to chemistry, process and economics. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2007, 1(1): 39-48.
- [111] Brodeur G, Yau E, Badal K, et al. Chemical and physicochemical pretreatment of lignocellulosic biomass: a review. *Enzyme Research*. 2011, 2011: 787532.
- [112] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2005, 96: 673-686.
- [113] Sousa LD, Chundawat SPS, Balan V, et al. 'Cradle-to-grave' assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009, 20: 339-347.
- [114] Ishizawa CI, Davis MF, Schell DF, et al. Porosity and its effect on the digestibility of dilute sulfuric acid pretreated corn stover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007,

55: 2575-2581.

[115] Zadrazil F, Puniya AK. Studies on the effect of particle size on solid-state fermentation of sugarcane bagasse into animal feed using white-rot fungi. *Bioresource Technology*. 1995, 54: 85-87.

[116] Fan LT, Lee Y, Beardmore DR. The influence of major structural features of cellulose on rate of enzymatic hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 1980, 22:177-190.

[117] Chang VS, Holtzaple MT. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000, 84-86: 5-37.

[118] Besle J, Cornu A, Jouany J. Roles of structural phenylpropanoids in forage cell wall digestion. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1994, 64:171-190.

[119] Laureano-Perez L, Teymouri F, Alizadeh H, et al. Understanding factors that limit enzymatic hydrolysis of biomass: characterization of pretreated corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005, 124: 1081-1100.

[120] Kärcher MA, Iqbal Y, Lewandowski I, et al. Efficiency of single stage- and two stage pretreatment in biomass with different lignin content. *Bioresource Technology*. 2016, 211: 787-791.

[121] Bals B, Wedding C, Balan V, et al. Evaluating the impact of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment conditions on the cost of ethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(2): 1277-1283.

[122] Kim Y, Hendrickson R, Mosier NS, et al. Enzyme hydrolysis and ethanol fermentation of liquid hot water and AFEX pretreatment distillers' grains at high solids loading. *Bioresource Technology*. 2008, 99(12): 5206-5215.

[123] Philip TP, Zhang M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*. 2009, 16: 743-762.

[124] Zhao X, Peng F, Cheng K. Enhancement of the enzymatic digestibility of sugarcane bagasse by alkali-peracetic acid pretreatment. *Enzyme and Microbial technology*. 2009, 44(1): 17-23.

[125] Zheng Y, Pan Z, Zhang RH. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. 2009, 2(3): 51-68.

[126] Zhu JY, Pan XJ. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: technology and energy consumption evaluation. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13): 4992-5002.

[127] Mansfield SD, Mooney C, Saddler JN. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis. *Biotechnology Progress*. 1999, 15(5): 804-816.

[128] Kumar P, Barrett DM, Delwiche M, et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2009, 48(8): 3713-3729.

[129] Guragain YN, Wang D, Vadlani PV. Appropriate biorefining strategies for multiple feedstocks: critical evaluation for pretreatment methods, and hydrolysis with high solids loading. *Renewable Energy*. 2016, 96: 832-842.

- [130] Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management*. 2011, 52(2): 858-875.
- [131] Ren N, Wang A, Cao G, et al. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: potential and challenges. *Biotechnology Advances*. 2009, 27(6): 1051-1060.
- [132] Lloyd TA, Wyman CE. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*. 2005, 96: 1967-1977.
- [133] Zhang J, Wang X., Chu D, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 4480-4488.
- [134] Liu Y, Zhou H, Wang L, et al. Improving *Saccharomyces cerevisiae* growth against lignocellulose-derived inhibitors as well as maximizing ethanol production by a combination proposal of γ -irradiation pretreatment with in situ detoxification. *Chemical Engineering*. 2016, 287: 302-312.
- [135] Zhang L, Li X, Yong Q, et al. Impacts of lignocellulose-derived inhibitors on L-lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*. 2016, 203: 173-180.
- [136] Jönsson LJ, Martín C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 103-112.
- [137] Peleteiro S, Rivas S, Alonso JL, et al. Furfural production using ionic liquids: a review. *Bioresource Technology*. 2016, 202: 181-191.
- [138] Lin K, Ma B, Sun Y, et al. Comparison between liquid and solid acids catalysts on reducing sugars conversion from furfural residues via pretreatments. *Bioresource Technology*. 2014, 167: 133-136.
- [139] Haroun BM, Nakhla G, Hafez M, et al. Impact of furfural on biohydrogen production from glucose and xylose in continuous-flow systems. *Renewable Energy*. 2016, 93: 302-311.
- [140] Nilsson RLK, Holmgren M, Madavi B, et al. Adaptability of *Trametes versicolor* to the lignocellulosic inhibitors furfural, HMF, phenol and levulinic acid during ethanol fermentation. *Biomass and Bioenergy*. 2016, 90: 95-100.
- [141] Greetham D, Hart AJ, Tucker GA. Presence of low concentrations of acetic acid improves yeast tolerance to hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural. *Biomass and Bioenergy*. 2016, 85: 53-60.
- [142] Ra CH, Jeong GT, Shin MK, et al. Biotransformation of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) by *Scheffersomyces stipitis* during ethanol fermentation of hydrolysate of the seaweed *Gelidium amansii*. *Bioresource Technology*. 2013, 140: 421-425.
- [143] Kumar G, Cheon HC, Kim SH, et al. Effects of 5-hydroxymethylfurfural, levulinic acid and formic acid, pretreatment byproducts of biomass, on fermentative H₂ production from glucose and galactose. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2014, 39(30): 16885-16890.
- [144] Takahashi CM, Takahashi DF, Carvalhal MLC, et al. Effects of acetate on the growth and fermentation performance of *Escherichia coli* KO11. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999, 81: 193-203.
- [145] Narendranath NV, Thomas KC, Ingledew WM. Effects of acetic acid and lactic acid on

- the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2001, 26(3): 171-177.
- [146] Li Y, Qi B, Wan Y, et al. Inhibitory effect of vanillin on cellulase activity in hydrolysis of cellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2014, 167: 324-330.
- [147] Nguyen TTM, Iwaki A, Ohya Y, et al. Vanillin causes the activation of Yap1 and mitochondrial fragmentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2014, 117(1): 33-38.
- [148] Cortez DV, Roberto IC. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. *Bioresource Technology*. 2010, 201(6): 1858-1865.
- [149] Michelin M, Ximenes E, Lourdes M, et al. Effect of phenolic compounds from pretreated sugarcane bagasse on cellulolytic and hemicellulolytic activities. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 275-278.
- [150] Almeida JRM, Modig T, Petersson A, et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 2007, 82(4): 340-349.
- [151] Ibraheem O, Ndimba BK. Molecular adaptation mechanisms employed by ethanologenic bacteria in response to lignocellulose derived inhibitory compounds. *International Journal of Biological Sciences*. 2013, 9(6): 598-612.
- [152] Modig T, Liden G, Taherzadeh MJ. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. *Biochemical Journal*. 2002; 363:769-776.
- [153] Hadi SM, Shahabuddin H, Rehman A. Specificity of the interaction of furfural with DNA. *Mutation Research*. 1989; 225: 101-106.
- [154] Shahabuddin H, Rahman A, Hadi SM. Reaction of furfural and methylfurfural with DNA: use of single-strand-specific nucleases. *Food and Chemical Toxicology*. 1991, 29: 719-721.
- [155] Khan QA, Hadi SM. Effects of furfural on plasmid DNA. *Biochemistry and molecular biology international Journal*. 1993, 29(6): 1153-1160.
- [156] Uddin S, Hadi SM. Reactions of furfural and methylfurfural with DNA. *Biochemistry and molecular biology international Journal*. 1995, 35(1): 185-195.
- [157] Zaldivar J, Martinez A, Ingram LO. Effect of selected aldehyde on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, 65: 24-33.
- [158] Roe AJ, Mclaggan D, Davidson I, et al. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *Journal of Bacteriology*. 1998, 180: 767-772.
- [159] Cherrington CA, Hinton M, Chopra I. Effect of short-chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology*. 1990, 68: 69-74.
- [160] Sinha RP. Toxicity of organic acids for repair-deficient strains of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986, 51: 1364-1366.
- [161] Endo A, Nakamura T, Shima J. Involvement of ergosterol in tolerance to vanillin, a

potential inhibitor of bioethanol fermentation, in *Saccharomyces cerevisiae*. Fems Microbiology Letters. 2009, 299(1): 95-99.

[162] Mikulásová M, Vodny S, Pekarovicová A. Influence of phenolics on biomass production by *Candida utilis* and *Candida albicans*. Biomass. 1990, 23: 149-154.

[163] Kelly MR, Xu J, Alexander KE, et al. Disparate effects of similar phenolic phytochemicals as inhibitors of oxidative damage to cellular DNA. Mutation Research. 2001, 485(4): 309-318.

[164] García-Aparicio MP, Ballesteros I, González A, et al. Effect of inhibitors released during steam-explosion pretreatment of barley straw on enzymatic hydrolysis. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2006, 129: 278-288.

[165] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. Critical Review in Biotechnology. 2011, 31: 20-31.

[166] Rajan K, Carrier DJ. Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. Biomass Bioenergy. 2014, 62: 222-227.

[167] Li H, Chen H. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. Process Biochemistry. 2008, 43: 1447-1451.

[168] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, et al. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolysates of spruce. Applied Biochemistry and Biotechnology. 1999, 77-79: 91-103.

[169] Canilha L, Carvalho W, Felipe MGA, et al. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. Brazilian Journal of Microbiology. 2008, 39: 333-336.

[170] Mussatto SI, Roberto IC. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. Biotechnology Letters. 2001, 23: 1681-1684.

[171] Martinez A, Rodriguez ME, York SW, et al. Effects of Ca(OH)₂ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. Biotechnology and Bioengineering. 2000, 69: 526-536.

[172] Mohagheghi A, Ruth M, Schell DJ. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. Process Biochemistry. 2006, 41: 1806-1811.

[173] Ranatunga TD, Jervis J, Helm RF, et al. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble organics. Enzyme and Microbial Technology. 2000, 27: 240-247.

[174] Nilvebrant NO, Reimann A, Larsson S, et al. Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2001, 91(1): 35-49.

[175] Chandel AK, Silva SSD, Singh OV. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. Bioenergy Research. 2013, 6: 388-401.

- [176] Huang C, Wu H, Smith TJ, et al. In vivo detoxification of furfural during lipid production by the oleaginous yeast *Trichosporon fermentans*. *Biotechnology Letters*. 2012, 34: 1637-1642.
- [177] Wierckx N, Koopman F, Bandounas L, et al. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microbial Biotechnology*. 2010, 3: 336-343.
- [178] Lopez MJ, Nichols NN, Dien BS, et al. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64: 125-131.
- [179] Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26.
- [180] He Y, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 19.
- [181] Roberto R, Ferdi S. Acid hydrolysis of cellulose as the entry point into biorefinery schemes. *Chemsuschem*. 2009, 2(12): 1096-1107.
- [182] Yan L, Ren XZ, Wei Q, et al. A review of dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Journal of Jilin Institute of Chemical Technology*. 2009, 156(2): 395-403.
- [183] Ladisch M, Lin K, Voloch M, et al. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial technology*. 1983, 5(2): 82-102.
- [184] Taherzadeh MJ, Karimi K. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*. 2007, 2(4): 707-738.
- [185] Dunlop A. Furfural formation and behavior. *Industrial and Engineering Chemistry*. 1948, 40(2): 204-209.
- [186] Mamman AS, Lee JM, Kim YC, et al. Furfural: Hemicellulose/xyloseederived biochemical. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2008, 2(5): 438-454.
- [187] Ulbricht RJ, Northup SJ, Thomas JA. A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1984, 4(5): 843-853.
- [188] Capuano E, Fogliano V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-Food Science and Technology*. 2011, 44(4): 793-810.
- [189] Rosatella AA, Simeonov SP, Frade RFM, et al. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) as a building block platform: biological properties, synthesis and synthetic applications. *Green Chemistry*. 2011, 13(4): 754-793.
- [190] Xia L, Cen P. Cellulase production by solid state fermentation on lignocellulosic waste from the xylose industry. *Process Biochemistry*. 1999, 34(9): 909-912.
- [191] Berlin A, Maximenko V, Gilkes N, et al. Optimization of enzyme complexes for lignocellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, 97(2): 287-296.
- [192] Arantes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3: 4
- [193] Coughlan MP. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their

- production and application. *Biotechnology and genetic engineering reviews*. 1985, 3: 39-109.
- [194] Zhang YHP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, 88(7): 797-824.
- [195] Bansal P, Hall M, Realff MJ, et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*. 2009, 27(6): 833-848.
- [196] Sannigrahi P, Miller SJ, Ragauskas AJ. Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine. *Carbohydrate Research*. 2010, 345(7): 965-970.
- [197] Juturu V, Wu JC. Microbial cellulases: Engineering, production and applications. *Biotechnology Advances*. 2012, 30(6):188-203.
- [198] Ryu DD, Kim C, Mandels M. Competitive adsorption of cellulase components and its significance in a synergistic mechanism. *Biotechnology and Bioengineering*. 1984, 26(5): 488-496.
- [199] Himmel ME, Ruth MF, Wyman CE. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Current Opinion in Biotechnology*. 1999, 10(4): 358-364.
- [200] Lee I, Evans BR, Woodward J. The mechanism of cellulase action on cotton fibers: evidence from atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*. 2000, 82(1): 213-221.
- [201] Garvey M, Klose H, Fischer R, et al. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms. *Trends in Biotechnology*. 2013, 31(10):581-593.
- [202] Kuhad RC, Gupta R, Singh A. Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme Research*. 2011, 2011: 1-10.
- [203] Zhang J, Chu D, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105: 718-728.
- [204] He Y, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation. *Bioresource Technology*. 2014, 158: 360-364.
- [205] Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*. 2003, 19(4):1109-1117.
- [206] Cotana F, Cavalaglio G, Gelosia M, et al. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2015, 69: 424-432.
- [207] Ask M, Olofsson K, Felice TD, et al. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*. 2012, 47(10): 1452-1459.
- [208] Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, et al. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2000, 25(4): 184-192.
- [209] Tomás-Pejó E, Oliva JM, Olsson L. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-

- fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, 100(6): 1122-1131.
- [210] Huang YH, Jin YL, Fang Y, et al. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of non-starch polysaccharides and starch from fresh tuber of *Canna edulis* ker at a high solid content for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2013, 52: 8-14.
- [211] Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. 2008, 1(1):7.
- [212] Tian S, Zhu J, Yang X. Evaluation of an adapted inhibitor-tolerant yeast strain for ethanol production from combined hydrolysate of softwood, *Applied Energy*. 2011, 88(5): 1792-1796.
- [213] Tsuge Y, Hori Y, Kudou M, et al. Detoxification of furfural in *Corynebacterium glutamicum* under aerobic and anaerobic conditions. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2014, 98: 8675-8683.
- [214] Zaldivar J, Ingram LO. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*. 1999, 66: 203-210.
- [215] Heipieper HJ, Weber FJ, Sikkema J, et al. Mechanism of resistance of whole cell to toxic organic solvent. *Trends in Biotechnology*. 1994, 12: 409-415.
- [216] Gutierrez T, Buszko ML, Ingram LO, et al. Reduction of furfural to furfuryl alcohol by ethanologenic strain of bacteria and its effect on ethanol production from xylose. *Applied Biochemical Biotechnology*. 2002, 98-100: 327-340.
- [217] Boopathy R, Bokang H, Daniels L. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural by enteric bacteria. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 1993, 11: 147-150.
- [218] Schweiger P, Deppenmeier U. Analysis of aldehyde reductase from *Gluconobacter oxydans* 621H. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 85(4): 1025-1031.
- [219] Prust C, Hoffmeister M, Liesegang H, et al. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature Biotechnology*. 2005, 23: 195-200.
- [220] Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A, et al. Gluconic acid: properties, applications and microbial production. *Food Technology Biotechnology*. 2006, 44(2): 185-195.
- [221] Singh O, Kumar R. Biotechnological production of gluconic acid: future implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 75(4): 713-722.
- [222] Molliard M, A new acidic fermentation by *Sterigmatocystis nigra*. *Comptes Rendus de Academie Bulgare des Sciences*. 1922, 174: 881-883.
- [223] Seiskari P, Linko YY, Linko P. Continuous production of gluconic acid by immobilized *Gluconobacter oxydans* cell bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1985, 21(6): 356-360.
- [224] Shiraishi F, Kawakami K, Tamura A, et al. Continuous production of free gluconic acid by *Gluconobacter suboxydans* IFO 3290 immobilized by adsorption on ceramic honeycomb monolith: effect of reactor configuration on further oxidation of gluconic acid to keto-gluconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1989, 31(5): 445-447.
- [225] Perfettini JV, Revertegat E, Langomazino N. Evaluation of cement degradation induced

- by the metabolic products of two fungal strains. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 1991, 47(6): 527-533.
- [226] Kim DM, Kim HS. Continuous production of gluconic acid and sorbitol from Jerusalem artichoke and glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis* and inulinase. *Biotechnology and Bioengineering*. 1992, 39(3): 336-342.
- [227] Marcincinova-Benabdillah K, Boustta M, Coudane J, et al. Novel degradable polymers combining D-Gluconic acid, a sugar of vegetal origin, with lactic and glycolic acids. *Biomacromolecules*. 2001, 2(4): 1279-1284.
- [228] Anastassiadis S, Aivasidis A, Wandrey C, et al. Continuous gluconic acid production by isolated yeast-like mould strains of *Aureobasidium pullulans* *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, 61(2): 110-117.
- [229] Abbadi A, Makkee M, Visscher W, et al. Cheminform abstract: effect of pH in the pd-catalyzed oxidation of D-glucose to D-gluconic acid. *Journal of Molecular Catalysis A Chemical*. 1995, 97(2): 111-118.
- [230] Kulbe KD, Schwab U, Gudernatsch W. Enzyme-catalyzed production of mannitol and gluconic acid, *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1987, 506 (506): 552-568.
- [231] Blom RH, Pfeifer VF, Moyer AJ, et al. Sodium gluconate production-fermentation with *Aspergillus niger*, *Industrial and Engineering Chemistry*. 1952, 44: 435-440.
- [232] Nyeste L, Sevella B, Szigeti L, et al. Modeling and off line optimization of batch gluconic acid fermentation. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1980, 10 (1): 87-94.
- [233] May OE, Herrick HT, Moyer AJ, et al. Gluconic acid production by submerged mold growths under increased air pressure. *Industrial and Engineering Chemistry*. 1934, 26: 575-578.
- [234] Bernhauer K. About the problem of acid formation by *A. niger*, *Biochemical Zeitschrift*. 1924, 153: 517-521.
- [235] Bernhauer K. Distinguishing *A. niger* genera based on their biochemical characterization. *Biochemical Zeitschrift*. 1928, 197: 278-287.
- [236] Moyer AJ, Welss PA, Stubbs JJ, et al. Gluconic acid production-development of inoculum and composition of fermentation solution for gluconic acid production by submerged mold growths under increased air pressure. *Industrial and Engineering Chemistry*. 1937, 29: 777-781.
- [237] Porges N, Clark TF, Gastrock EA. Gluconic acid production-repeated use of submerged *A. niger* for semi-continuous production. *Industrial and Engineering Chemistry*. 1940, 32: 107-111.
- [238] Wells P.A., Moyer A.J., Stubbs J.J., et al., Gluconic acid production-effect of pressure, air flow, and agitation on gluconic acid production by submerged mold growths, *Industrial and Engineering Chemistry*. 1937, 29: 635-656.
- [239] Vassilev NB, Vassileva MC, Spassova DI. Production of gluconic acid by *Aspergillus niger* immobilized on polyurethane foam. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1993, 39(3): 285-288.
- [240] Roukas T. Citric and gluconic acid production from fig by *Aspergillus niger* using solid-state fermentation. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2000, 25(6): 298-304.

- [241] Wong CM, Wong KH, Chen XD, et al. Glucose oxidase: natural occurrence, function, properties and industrial applications. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2008, 78: 927-938.
- [242] Muller D. Oxidation von glukose mit extrakten aus *Aspegillus niger*. *Biochemical Zeitschrift*. 1928, 199: 136-170.
- [243] Kaur R, Macleod J, Foley W, et al. Gluconic acid: An antifungal agent produced by *Pseudomonas species* in biological control of take-all. *Phytochemistry*. 2006, 67(6): 595-604.
- [244] Alonso S, Rendueles M, Díaz M. Simultaneous production of lactobionic and gluconic acid in cheese whey/glucose co-fermentation by *Pseudomonas taetrolens*. *Bioresource Technology*. 2015, 196: 314-323.
- [245] Gómez W, Buela L, Castro LT, et al. Evidence for gluconic acid production by *Enterobacter intermedium* as an efficient strategy to avoid protozoan grazing. *Soil Biology and Biochemistry*. 2010, 42(5): 822-830.
- [246] Mounir M, Shafiei R, Zarmehrshid R, et al. Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacterstrain* during acetous fermentation in a bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 121, (2): 166-171.
- [247] Sainz F, Navarro D, Mateo E, et al. Comparison of D-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*. 2016, 222(2): 40-47.
- [248] Attwood MM, Dijken JP, Pronk JT. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1991, 72(2): 101-105.
- [249] Silberbach M, Maier B, Zimmermann M, et al. Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*: characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, 62(1): 92-98.
- [250] Elfari M, Ha S, Bremus C, et al. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-gluconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, 66: 668-674.
- [251] Olijve W, Kok JJ. Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Archives of Microbiology*. 1979, 121(3): 283-290.
- [252] Herrmann U, Merfort M, Jeude M, et al. Biotransformation of glucose to 5-keto-D-gluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64(1): 86-90.
- [253] Schweiger P, Gross H, Deppenmeier U. Characterization of two aldo-keto reductases from *Gluconobacter oxydans* 621H capable of regio- and stereoselective α -ketocarbonyl reduction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 87(4): 1415-1426.
- [254] Buchert J, Viikari L. Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacwr oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1988,29:375-379.
- [255] Velizarov S, Beschkov V. Production of free gluconic acid by cells of *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology Letters*. 1994, 16(7): 715-720.
- [256] Yamada M, Elias MD, Matsushita K, et al. *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: its structure comparison with other quinoproteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2003, 1647(1-2): 185-192.
- [257] Matsushita K, Shinagawa E, Adachi O, et al. Reactivity with ubiquinone of quinoprotein

D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. Journal of Biochemistry. 1989, 105(4); 633-637.

[258] Richhardt J, Luchterhand B, Bringer S, et al. Evidence for a key role of cytochrome bo3 oxidase in respiratory energy metabolism of *Gluconobacter oxydans*. Journal of Bacteriology. 2013, 195(18): 4210-4220.

[259] Stubbs JJ, Lockwood LB, Roe ET, et al., Keto-gluconic acids from glucose. Industrial and Engineering Chemistry. 1940, 32: 1626-1630.

[260] Buzzini P, Gobetti M, Rossi J, et al. Utilization of grape must and concentrated rectified grape must to produce gluconic acid by *Aspergillus niger*, in batch fermentations. Biotechnology Letters. 1993, 15(2): 151-156.

[261] Sankpal NV, Kulkarni BD. Optimization of fermentation conditions for gluconic acid production using *Aspergillus niger* immobilized on cellulose microfibrils. Process Biochemistry. 2002, 37(12): 1343-1350.

[262] Znad H, Markoš J, Baleš V. Production of gluconic acid from glucose by *Aspergillus niger*: growth and non-growth conditions. Process Biochemistry. 2004, 39(11): 1341-1345.

[263] Ikeda Y, Park EY, Okuda N. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. Bioresource Technology. 2006, 97(8): 1030-1035.

[264] Sharma A, Vivekanand V, Singh RP. Solid-state fermentation for gluconic acid production from sugarcane molasses by *Aspergillus niger* ARNU-4 employing tea waste as the novel solid support. Bioresource Technology. 2008, 99(9): 3444-3450.

[265] Liu H, Valdehuesa KN, Nisola GM, et al. High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. Bioresource Technology. 2012, 115: 244-248.

[266] Nygård Y, Toivari MH, Penttilä M, et al. Bioconversion of D-xylose to D-xylonate with *Kluyveromyces lactis*. Metabolic Engineering. 2011, 13(4): 383-391.

[267] Chun BW, Dair B, Macuch P, et al. The development of cement and concrete additive: based on xylonic acid derived via bioconversion of xylose. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2006, 131(1): 645-658.

[268] Zamora F, Bueno M, Molina I, et al. *Stereoregular copolyamides* derived from D-xylose and L-arabinose. Macromolecules. 2000, 33: 2030-2038.

[269] Niu W, Molefe MN, Frost JW. Microbial synthesis of the energetic material precursor 1,2,4-butanetriol. Journal of the American Chemical Society. 2003, 125:12998-12999.

[270] Pezzotti F, Therisod M. Enzymatic synthesis of aldonic acids. Carbohydrate research. 2006, 341:2290-2292.

[271] Jokic A, Ristic N, Jaksic MM, et al. Simultaneous electrolytic production of xylitol and xylonic acid from xylose. Journal of Applied Electrochemistry. 1991, 21:321-326.

[272] Isbell HS, Hudson CS. The course of the oxidation of the aldose sugars by bromine water. Journal of Research of the National Bureau of Standards. 1932, 8:327-338.

[273] Lockwood LB, Nelson GEN. The oxidation of pentoses by *Pseudomonas*. Journal of Bacteriology. 1946, 52:581-586.

[274] Buchert J, Niemelä K, Puls J, et al. Improvement in the fermentability of steamed

- hemicellulose hydrolysate by ion exclusion. *Process Biochemistry*. 1990, 25:176-180.
- [275] Galar ML, Boiardi JL. Evidence for a membrane-bound pyrroloquinoline quinone-linked glucose-dehydrogenase in *Acetobacter diazotrophicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1995, 43: 713-716.
- [276] Hardy GPMA, Mattos MJTD, Neijssel OM. Energy conservation by pyrroloquinoline quinol-linked xylose oxidation in *Pseudomonas putida* NCTC 10936 during carbon-limited growth in chemostat culture. *FEMS Microbiology Letters*. 1993, 107:107-110.
- [277] Suzuki T, Onishi H. The production of xylitol and xylonic acid by Yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*. 2014, 31(10): 1233-1236.
- [278] Buchert J, Viikari L. The role of xylonolactone in xylonic acid production by *Pseudomonas fragi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1988, 27:333-336.
- [279] Weimberg R. Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*. *Journal of Biological Chemistry*. 1961, 236:629-635.
- [280] Dahms AS. 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 1974, 60: 1433-1439.
- [281] Johnsen U, Dambeck M, Zaiss H, et al. D-xylose degradation pathway in the halophilic archaeon *Haloferax volcanii*. *Journal of Biological Chemistry*. 2009 284: 27290-27303.
- [282] Stephens C, Christen B, Fuchs T, et al. Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*. 2007, 189: 2181-2185.
- [283] Suzuki T, Onishi H. Oxidation and reduction of D-xylose by cell-free extract of *Pichia quercuum*. *Applied Microbiology*. 1973, 25:850-852.
- [284] Johnsen U, Schönheit P. Novel xylose dehydrogenase in the halophilic archaeon *Haloarcula marismortui*. *Journal of Bacteriology*. 2004, 186: 6198-6207.
- [285] Kiesling H, Lindberg B, McKay J. Some products of the metabolism of D-xylose by *Pullularia pullulans*. *Acta Chemica Scandinavica*. 1962, 16: 1858-1862.
- [286] Kanauchi M, Bamforth CW. Use of xylose dehydrogenase from *Trichoderma viride* in an enzymic method for the measurement of pentosan in barley. *Journal of the Institute of Brewing*. 2003, 109: 203-207.
- [287] Toivari MH, Nygård Y, Kumpula EP, et al. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for bioconversion of D-xylose to D-xylonate. *Metabolic Engineering*. 2012, 14(4): 427-436.
- [288] Brouns SJ, Walther J, Snijders AP, et al. Identification of the missing links in prokaryotic pentose oxidation pathways: evidence for enzyme recruitment. *The Journal of Biological Chemistry*. 2006, 281: 27378-27388.
- [289] Maris AJAV, Winkler A, Kuyper M, et al. Development of efficient xylose fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* xylose isomerase as a key component. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2007, 108: 179-204.
- [290] Buchert J, Viikari L, Linko M, et al. Production of xylonic acid by *Pseudomonas fragi*. *Biotechnology Letters*. 1986, 8(8): 541-546.
- [291] Li H, Dai Q, Ren J, et al. Effect of structural characteristics of corncob hemicelluloses

fractionated by graded ethanol precipitation on furfural production. *Carbohydrate Polymers*. 2016, 136(20): 203-209.

[292] Ma S, Li W, Zhang S, et al. Influence of sodium gluconate on the performance and hydration of Portland cement. *Construction and Building Materials*. 2015, 91: 138-144.

[293] Li N, Ma D, Chen W. Projection of cement demand and analysis of the impacts of carbon tax on cement industry in China. *Energy Procedia*. 2015, 5: 1766-1771.

[294] Matsui T, Tooyama K, Sato S. Simultaneous saccharification of corn starch in gluconic acid production by *Aspergillus niger* immobilized on nonwoven fabric in a pressurized reactor. *Journal of Microbial and Biochemical Technology*. 2013, 05: 88-91.

[295] Rao DS, Panda T. Critical analysis of the effect of metal ions on gluconic acid production by *Aspergillus niger* using a treated Indian cane molasses. *Bioprocess Engineering*. 1994, 10: 99-107.

[296] Roukas T, Harvey L. The effect of pH on production of citric acid and gluconic acid from beet molasses using continuous culture. *Biotechnology Letters*. 1988, 10: 295-300.

[297] Purane NK, Salunkhe PD, Labade DS, et al. Gluconic acid production from golden syrup by *Aspergillus niger* strain using semiautomatic stirred-tank fermenter. *Microbial and Biochemical Technology*. 2012, 4: 4.

[298] Singh OV, Singh RP. Bioconversion of grape must into modulated gluconic acid production by *Aspergillus niger* ORS-4.410. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, 100: 1114-1122.

[299] Wang X, Song A, Li L, et al. Effect of calcium carbonate in waste office paper on enzymatic hydrolysis efficiency and enhancement procedures. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2011, 28: 550-556.

[300] Ren LT, Cafferty K, Roni M, et al. Analyzing and comparing biomass feedstock supply systems in china: corn stover and sweet sorghum case studies. *Energies*. 2015, 8:5577-5597.

[301] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL/TP-510-42618. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2011.

[302] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of ash in biomass. NREL/TP-510-42622. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2008.

[303] Adney B, Baker J, Measurement of cellulase activities, NREL/TP-510-42628. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2008.

[304] Ghose T. Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*. 1987, 59(2): 257-268.

[305] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72(1-2): 248-254.

[306] Khoddami A, Wilkes M, Roberts T, et al. Techniques for analysis of plant phenolic compounds. *Molecules*. 2013, 18: 2328-2375.

[307] Barham D, Trinder P. An improved color reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst*. 1972, 97: 142-145.

[308] Portnoy VA, Bezdán D, Zengler K. Adaptive laboratory evolution-harnessing the power

- of biology for metabolic engineering. *Current opinion in biotechnology*. 2011, 22: 590-594.
- [309] Gupta A, Singh VK, Qazi GN, et al. *Gluconobacter oxydans*: Its biotechnological applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2001, 3(3): 445-456.
- [310] Humbird D, Davis R, Tao L, et al. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. NREL/TP-5100-47764. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2011.
- [311] Tiukova IA, Pita WDB, Sundell D, et al. Adaptation of *Dekkera bruxellensis* to lignocellulose-based substrate. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2014, 61(1): 51-57.
- [312] Jang Y, Lim Y, Kim K. *Saccharomyces cerevisiae* strain improvement using selection, mutation, and adaptation for the resistance to lignocellulose-derived fermentation inhibitor for ethanol production. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2014, 24(5): 49-51.
- [313] Hahn-Hägerdal B, Lindén T, Senac T, et al. Ethanol fermentation of pentoses in lignocellulose hydrolysates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1991, 28-29(1): 131-144.
- [314] Wang X, Lv M, Zhang L, et al. Efficient bioconversion of 2,3-butanediol into acetoin using *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6(6): 237-237.
- [315] Wei G, Yang X, Zhou W, et al. Adsorptive bioconversion of ethylene glycol to glycolic acid by *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, 47(3): 127-131.
- [316] Wei G, Yang X, Gan T, et al. High cell density fermentation of *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 for glycolic acid production. *Journal of Industrial Microbiology*. 2009, 36(8): 1029-34.
- [317] Cannella D, Hsieh CC, Felby C, et al. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5: 26.
- [318] Ye L, Haemmerle M, Olsthoorn AJJ, et al. High current density “wired” quinoprotein glucose dehydrogenase electrode. *Analytical Chemistry*. 1993, 65(3): 238-241.
- [319] Matsushita K, Toyama H, Adachi O, et al. Respiratory chains and bioenergetics of acetic acid bacteria. *Advances in microbial physiology*. 1994, 36(6): 247-301.
- [320] Levering P, Weenk G, Olijve W, et al. Regulation of gluconate and ketogluconate production in *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H. *Archives of Microbiology*. 1988: 149(6): 534-539.
- [321] Weenk G, Olijve W, Harder W, et al. Ketogluconate formation by *Gluconobacter species*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1984, 20(6): 400-405.
- [322] Rauch B, Pahlke J, Schweiger P, et al. Characterization of enzymes involved in the central metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 88(3): 711-718.
- [323] Liu G, Sun J, Zhang J, et al. High titer L-lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen Plus modeling. *Bioresource Technology*. 2015, 198, 803-810.
- [324] Lin D, Qiu XQ, Lin ZH. Study on combination use of polycarboxylate based water

reducer and lignosulphate based water reducer. *Advanced Materials Research*. 2013, 721: 252-257.

[325] Ho NW, Chen Z, Brainard AP. Genetically engineered *Saccharomyces* Yeast capable of effective co-fermentation of glucose and xylose. *Applied and Environmental Microbiology*. 1998, 64(5): 1852-1859.

[326] Zhang M, Eddy C, Deanda K, et al. Metabolic engineering of a Pentose Metabolism Pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*. *Science*, 1995, 267(5195): 240-243.

[327] Zhang J, Bao J. A modified method for calculating practical ethanol yield at high lignocellulosic solids content and high ethanol titer. *Bioresource Technology*, 2012, 116: 74-79.

[328] Zhang J, Fang Z, Deng H, et al. Cost analysis of cassava cellulose utilization scenarios for ethanol production on flowsheet simulation platform. *Bioresour. Technol.* 2013, 134: 298-306.

附录 I 主要试剂

试剂	规格	生产厂家
葡萄糖酸钠	色谱纯	Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司
木糖酸铵	色谱纯	Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司
香草醛	分析纯	Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司
丁香醛	分析纯	Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司
4-羟基苯甲醛	分析纯	Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司
松柏醛	分析纯	Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司
香草酸	分析纯	Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司
丁香酸	分析纯	Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司
4-羟基苯甲酸	分析纯	Sigma-Aldrich (上海) 贸易有限公司
酵母提取物	生化试剂	安琪酵母股份有限公司
硫酸	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸氢二铵	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
七水合硫酸镁	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸铵	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
碳酸钙	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
甲酸	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
葡萄糖	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
木糖	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
甘油	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
糠醛	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
2-糠酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
糠醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
5-羟甲基糠醛	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
5-甲基-2-糠酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
2,5-呋喃-二甲醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
香草醇	分析纯	梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司
对羟基苯甲醇	分析纯	梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司
丁香醇	分析纯	梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司
松柏醇	分析纯	梯希爱 (上海) 化成工业发展有限公司

附录 II 仪器设备

仪器名称	型号	生产厂家
预处理蒸汽发生器	HX-36D-2.5	上海华征特种锅炉制造有限公司
螺带搅拌式预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工设备有限公司
3 L 发酵罐	BIOTECH-4BG-3L	上海保兴生物设备工程有限公司
5 L 螺带搅拌式发酵罐	BIOTECH-4BG-5L	上海保兴生物设备工程有限公司
50L 发酵罐	50 L-A	上海保兴生物设备工程有限公司
50L 螺带搅拌式发酵罐	50 L-B	上海保兴生物设备工程有限公司
锤式粉碎机	SF-300	上海科太粉碎设备厂
纤维素分析仪	ANKOM 220	美国 Ankom 科技有限公司
磨浆机	DSX-32S	江苏启东市东盛化工机械厂
马弗炉	SX2-2.5-10	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
高效液相色谱	LC-20AT 紫外检测器	日本岛津仪器有限公司
高效液相色谱	LC-20AD 示差检测器	日本岛津仪器有限公司
台式离心机	5415R	德国 Eppendorf 公司
超纯水机	Milli-Q Synthesis	德国 Merck Millipore (美国) 公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化
隔水式恒温培养箱	DK-8D	上海一恒科学仪器
气浴摇床	ZDLH-8050K-3S	太仓华利达实验设备有限公司
超高速离心机	J-26	美国 Beckman Coulter 有限公司
超低温冰箱	Forma-86C	美国 Thermo Fisher 科技有限公司
pH 计	PHS-3C	上海仪电科学仪器股份有限公司
水浴恒温摇床	HZ-9212S	太仓华利达实验设备有限公司
自动灭菌锅	YXQ-LS-75SII	上海博迅实业有限公司
核酸蛋白质分析仪	DU-800	美国 Beckman Coulter 有限公司
水泥净浆搅拌机	NJ-160	无锡建筑工业有限公司
维卡仪	ISO	上海路达实验仪器有限公司
水泥压力试验机	300KN	济南凯恩试验机制造有限公司

致谢

在本论文完成撰写之际，我百感交集，脑海中浮现出攻读博士学位四年以来的酸甜苦辣，论文中饱含了我在最初设计试验时的茫然若失，刚接触试验时的不知所措，熟悉试验后的得心应手，等待关键试验结果和论文投稿时的惴惴不安，试验遇到困难无法继续时的心烦意乱，还有得到满意试验结果和论文接收时的欣喜若狂……科研生活是艰辛枯燥而又充满挑战的，我庆幸当年我考入了华东理工大学，这里浓厚的科研氛围深深感染了我。优秀导师的悉心教导、热心同学的出谋划策及家人和朋友的支持鼓励是我坚持完成论文的动力源泉，向你们敬上我最衷心的感谢。

首先，我要感谢的是我敬爱的导师鲍杰教授，从论文方向的把握、试验方案的推敲、试验困难的解决、试验数据的分析、到最终论文撰写、修改和发表都与鲍老师的辛勤付出密切相关。鲍老师为人师表，平易近人，严于律己宽于律人，科研态度严谨求实，工作作风一丝不苟，一直以来都是我学习的楷模。鲍老师学识渊博、思维开阔，对木质纤维素生物炼制领域有自己独到的见解，富有创新精神。事必躬亲，经常在百忙中抽出时间与学生一起动手试验。鲍老师不仅帮助我解决科研学术上的难题，更培养我解决问题的能力以及对待工作生活的态度，这无疑将使我受益一生。谨在此论文撰写完成之际，向鲍老师致以我深深的谢意和敬意。

其次，要感谢的是本实验室的张建副教授和高秋强老师，他们将精力都放在了科研上，经常给我提供科研上的帮助，鼓励我进步。当我试验中遇到的难题和困惑总能提出建设性意见，使我豁然开朗。另外，要感谢在本论文中给我提供重要帮助的同学：周平平博士对我的发酵菌株的选择提供了建设性意见以及在生活上对我鼓励和无微不至的帮助；刘刚博士和魏成香硕士在 Aspen Plus 模拟方面给我提供了大量的帮助；韩响身博士帮助我完成乙醇的放大发酵；易霞博士在科研和生活中都给我提供了重要的帮助。以及在我刚进入实验室时给予我耐心指导和帮助的顾翰琦博士、何燕青博士、孟佼硕士、肖雁秋硕士，特别是与我一起入学的我的同桌王娟博士，经常就学术问题进行深入探讨并交换意见，同时在试验中给予我很大的帮助。在此我一并向你们表示衷心的感谢。

此外，我还要感谢生物炼制团队中关心、鼓励和帮助我的同学，包括博士研究生罗紫臣、王霞、高小创、邱忠洋、邵帅、温经柏、侯伟亮、金慈、Abdul Sattar Qureshi；硕士研究生包艳文、崔振阳、方镇宏、涂毅、安瑞鑫、刘阳、冉红、吴倩、张龙平、雷成、刘克、孙娇娥、张鹏、张强、谌泽宇、胡明珊、阚家伦、魏成香、周奇圣以及其他的师弟师妹们。在此感谢你们陪伴我度过这四年难忘的博士生涯，有你们科研才不那么枯燥。

最后我要感谢感谢我的父母对我的养育之恩，感谢我的家人这么多年来对我的理解包容和无私帮助，是你们成就了我今天的全部。

张宏森

2016年10月18日 于上海

博士期间研究成果

已发表论文:

1. **Hongsen Zhang**, Jian Zhang, Jie Bao*. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource Technology*. 2016, 203: 211-219. (IF: 4.917 对应本论文第 2 章)
2. **Hongsen Zhang**, Gang Liu, Jian Zhang, Jie Bao*. Fermentative production of high titer gluconic and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. *Bioresource Technology*. 2016, 219: 123-131. (IF: 4.917 对应本论文第 3 章)
3. **Hongsen Zhang**, Xushen Han, Chengxiang Wei, Jie Bao*. Oxidative production of xylonic acid using xylose in distillation stillage of cellulosic ethanol fermentation broth by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*. 2017, 224: 573-580. (IF: 4.917 对应本论文第 4 章)

学术会议论文:

1. **Hongsen Zhang**, Jian Zhang, Jie Bao. High titer gluconic acid production from corn stover by *Aspergillus niger*. *The 6th International Symposium on Biocatalysis and Biosynthetic Engineering*. 2013, Shanghai, China. (Poster)
2. **Hongsen Zhang**, Jian Zhang, Jie Bao. Gluconic acid: a promising commercial chemical produced from corn stover. *AFOB Bioenergy and Biorefinery Division Annual Meeting and Bioenergy and Biorefinery Summit*. 2014, Jinan, China. (Oral presentation)
3. **Hongsen Zhang**, Jian Zhang, Jie Bao. Gluconic acid and xylonic acid production from corn stover by *Gluconobacter oxydans*. *21st Young Asian Biochemical Engineers' Community*, 2015, Chuncheon, Korea. (Poster)

已申请发明专利:

1. 鲍杰、张宏森、张建, 一种生物转化木质纤维素生产葡萄糖酸的方法(专利公开号: CN104805137A, 公开日期: 2015.07.29)
2. 鲍杰、张宏森、韩昀身、张建, 一种高效转化纤维素乙醇蒸馏醪中木糖生产木糖酸的方法(专利申请号: 201610443682.2)

参与科研项目与课题:

- 973 项目 “木质纤维素降解转化过程强化的工程学原理与方法”
973 项目 “微生物抗纤维素水解物抑制元器件的构建与性能评估”
863 项目 “农作物秸秆制备生物化工醇产业化示范”
863 项目 “极限低水稀酸预处理技术体系研究”

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 壹佰肆拾贰 页

立卷人 _____

检查人 _____

立卷时间 _____