

预处理与生物脱毒过程强化对木质纤维素干法生物炼制技术的促进

摘要

木质纤维素生物炼制过程需要通过高强度的预处理操作破坏其抗性结构,并对预处理过程中形成的抑制物进行脱毒,才能保证后续纤维素酶水解和发酵步骤的正常进行。前期工作中建立的低水耗、零废水排放的干式稀酸预处理技术,以及发酵抑制物的固态生物脱毒技术,已经成功应用于高固体含量木质纤维素发酵生产乙醇、油脂和乳酸的过程。然而,干式稀酸预处理和生物脱毒两个关键技术都仅在小规模装置上实现,在产业化规模的大型装置中的有效传质和传热没有涉及,过程速率也明显偏低,从而影响了干法生物炼制过程的工程化应用。本文针对干式稀酸预处理和生物脱毒所涉及的传质、传热和低速率问题进行了解析,提出了适用于两个技术在放大尺度下的过程强化方案,并进行了化学工程、发酵工程和微生物代谢机理方面的研究,显著提高了干法生物炼制过程传递效率和转化速率,为未来干法生物炼制技术的工业应用提供了强大的技术支持。

本文第一部分对适用于高固体含量体系混合的预处理反应器展开研究,尝试解决干式稀酸预处理反应器大型化之后所面临的传质和传热问题。通过对比各搅拌桨在高固含量体系中处理固液混合的能力,选定螺带搅拌桨作为干式稀酸预处理反应器中的搅拌装置,并设计了 20 L 容积的螺带搅拌式预处理反应器。与传统的无搅拌混合的预处理过程相比,螺带搅拌预处理后物料酶解糖化效率提高了 2.4%、乙醇发酵得率提高了 17.4%,同时还减少了预处理过程中抑制物的产生。螺带搅拌混合大幅增强了蒸汽和固体物料在预处理反应过程中的传质,强化了蒸汽与物料之间的传热,为工业化生产过程提供了一个合适的预处理反应器设计原型。

本文第二部分研究尝试将稀酸预处理技术中常规的预浸步骤去除,从而提高预处理的操作效率,减少固定投资。实验结果表明,少量稀酸溶液与大量固体秸秆物料并流投放到螺带桨搅拌预处理反应器中,低速短时搅拌即可实现固体秸秆和稀酸溶液的完全混合。经过预处理后,不预浸物料的纤维素转化率达到 84.77%,预浸 12 h 物料的纤维素转化率达到 87.11%,结果基本一致。而在没有搅拌的预处理过程中,无预浸操作的预处理秸秆则比 12 h 预浸的预处理秸秆在纤维素酶解转化率上降低了 18.4%,说明螺带搅拌对少量稀酸液体与大量秸秆固体的混合发挥了重要作用。这一改进对于工业化生产过程的物料储存、输送和腐蚀问题都实现了大幅度简化,增强了干式稀酸预处理技术的经济性和实用性。

本文第三部分在改进预处理反应器的基础之上,针对玉米秸秆原料中灰分对预处理效率的影响进行了详细研究。实验表明,当玉米秸秆灰分含量从约 10%降低至 5%以下,预处理后物料的纤维素酶解转化率增加了 63.9%,乙醇得率增加了 42.1%。玉米秸秆灰分中的碱性化合物对稀酸具有强烈的中和作用,降低了稀酸在预处理过程中的催化效果。

研究发现，灰分物质多存在于微小尺寸的物料中，因此工业生产过程可以通过机械筛分和旋风分离的方式脱除。本工作对生物炼制原料前处理技术指标的制定给出了严格的科学依据，其中灰分含量必须作为一项重要指标对原料进行评估。

本文第四部分研究针对现有的树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 固态生物脱毒技术中因混合、传质和发酵条件控制不足而导致的脱毒速率缓慢的问题，开展了以快速生物脱毒为目标的研究。首先对固态脱毒过程的抑制物代谢与乙醇发酵现象进行了分析，确定糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸完全降解的时间点即为脱毒终点。然后，在螺带搅拌浆生物反应器中对脱毒过程的抑制物降解展开研究，发现增加过程通气速率至 1.00 VVM 可以大幅提升糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸的降解速率，将脱毒终点缩短至 36 h，即缩短至常规脱毒时间的 1/3。同时，改善脱毒霉菌菌体在脱毒物料体系中的分布并保留了大部分木糖组分（水解后木糖浓度约为 45 g/L）。研究发现，快速脱毒过程中增加氧气供给并没有促进菌体生长加速，而是促进了糠醛的代谢产物糠醇向糠酸的转化，提供了足量的抑制物降解代谢所需的还原力，从而进一步促进了 5-羟甲基糠醛和乙酸的降解代谢。快速脱毒的实现使其在工业化生物炼制中更具实用性。

综上，本论文提出的干法生物炼制中预处理和生物脱毒过程的强化方案，使这两个过程能够更好地适用于工业生产规模的生物炼制过程，为干法生物炼制在产业化上的应用提供了重要的技术支持。

关键词：木质纤维素；螺带浆搅拌；预处理；快速生物脱毒；乙醇发酵

Study on Process Intensification of Pretreatment and Biodetoxification for Efficiency Elevation of Lignocellulose Biorefining Processes

Abstract

Pretreatment is the crucial step in lignocellulose biorefinery processes by breaking down the recalcitrance of lignocellulosic feedstock, followed by detoxification step to remove the inhibitory compounds generated from pretreatment step to ensure the efficiencies of consequent enzymatic hydrolysis and fermentation steps using pretreated materials as feedstock. In our previous study, dry dilute acid pretreatment with low water consumption and no waste water generation and biological detoxification process were developed. The combination of these two steps has been successfully applied to the production of ethanol, lipid and lactic acid from lignocellulose feedstock. However, these two processes were only realized in a bench scale thus mass transfer, heat transfer and low rate in large scale processes remained to be problems. In this thesis, the study is focused on the analysis of the mass and heat transfer and low rate involved in the biorefinery processes, and then the research on the chemical engineering, fermentation and metabolism mechanisms of microbe were carried out. Obvious improvements on the transfer efficiency and conversion rate of dry milling biorefinery process were obtained, which provides a powerful technical support for the industrial application of dry milling biorefinery in the future.

The first part of this thesis is focused on the research of suitable pretreatment reactor in high solids loading process for solving the problems of mass and heat transfer at industrial scale. After the comparison with various agitators in the mixing performance at high solids loading, helical ribbon stirrer was chosen to apply in the dry pretreatment reactor. And then a helical ribbon stirrer reactor with the working volume of 20 L was designed. Compared to the pretreatment process in the traditional reactor without agitation, the efficiency of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation using dry pretreated corn stover as feedstock were both improved by the helical agitation. The cellulose conversion after hydrolysis and ethanol yield was increased by 2.4% and 17.4% in the pretreatment with helical agitation, respectively, while the generation of the inhibitors during pretreatment process was reduced. The helical agitation in the pretreatment step greatly improved the mass transfer between steam and solid materials. Also, the heat transfer from steam to solid materials during pretreatment was strengthened during pretreatment. The development of the helical ribbon stirrer reactor provides a suitable prototype of the pretreatment reactor for commercial cellulosic production.

The second part of this thesis is an attempt to remove the routine impregnation step from dilute acid pretreatment to further improve the efficiency of pretreatment operation with reduced the investment cost. The results show that the bulk of solid material and minority dilute acid solution could be completely mixed in a short time under a low agitation rate when the sulfuric acid and solid materials were co-currently fed into the reactor for pretreatment. The results show that the cellulose conversion using the helical agitated corn stover without impregnation reached 84.77% and the cellulose conversion using the pretreated corn stover with 12 hours' impregnation reached 87.11%. The results were almost same. However, an obvious decline of 18.4% in cellulose conversion could be observed in the static pretreatment without impregnation, indicating that helical ribbon stirrer played an important role in the mixing between minority acid solution and bulk of solid materials. The removal of impregnation in industrial production simplified the problems of materials storage, transportation and reactor corrosion, and greatly improved the economy and practicability of the pretreatment.

The third part of this thesis is the detailed research about the impact of ash in the corn stover feedstock on the pretreatment efficiency. The results show that the increase of 63.9% and 42.1% in the cellulose conversion and ethanol yield was obtained using dilute acid pretreated corn stover as feedstock when the ash content was reduced from about 10% to less than 5%. The alkaline materials in the ash would neutralize the sulfuric acid added into the corn stover leading to a decrease of catalysis performance in the pretreatment process. Ash had a larger distribution in the feedstock with small size, thus some mechanic methods such as mechanic vibration screening or cyclone separator could be applied for de-ashing process in the industrial process. This study provides an important proof for the pre-pretreatment of lignocellulosic feedstock, and the ash content should be regarded as an important parameter for the evaluation of feedstock used in the biorefinery process.

The fourth part of this thesis is focused on the low rate caused by the lack of mass transfer and fermentation control in the solid state biodegradation by *Amorphotheca resinae* ZN1. Then the research on the rapid detoxification was carried out. Firstly, the metabolism of inhibitors in the solid state biodegradation and the consequent ethanol fermentation were analyzed, which showed that the termination of biodegradation could be set at the time when furfural, 5-hydroxymethyl furfural (5-HMF) and acetic acid were completely degraded. Then the inhibitor metabolism of the biodegradation in the helical agitated bioreactor was researched. The results show that the increasing aeration rate to 1.00 VVM during biodegradation greatly improved the degradation of furfural, 5-HMF and acetic acid. Then the biodegradation period could be shortened to 36 h equaling to 1/3 of the traditional one. Meanwhile, the distribution of the fungus was improved in the solid state biodegradation

leading to the retention of xylose (about 45 g/L in the hydrolysate). The results also show that the increase in oxygen supply by aeration didn't improve the growth rate of the fungus, but improved the conversion rate from furfuryl alcohol to furoic acid. Thus the reducing power for inhibitors' degradation was also overproduced leading to the further improve on the metabolism of 5-HMF and acetic acid. Therefore, the rapid biodegradation realized in this study increases the potential of its application in the industrial process.

Overall, the intensification of dry pretreatment and biodegradation step raised in this thesis makes these two processes more suitable for the biorefinery process at industrial scale, which provides an important technical support for the application of dry milling biorefinery in the industrial production.

Key Words: Lignocellulose; Helical agitation; Pretreatment; Rapid biodegradation; Ethanol fermentation

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 前言	1
1.2 干式稀酸预处理技术的建立	2
1.2.1 稀酸预处理技术	2
1.2.2 高固体含量预处理的趋势	3
1.2.3 高固体含量稀酸预处理	5
1.2.4 高固含量稀酸预处理反应器应用研究	6
1.2.5 干式稀酸预处理技术的建立与不足	7
1.3 树脂枝孢霉 <i>Amorphotheca resinae</i> ZN1 固态生物脱毒	8
1.3.1 抑制物的形成和传统脱毒研究	8
1.3.2 生物脱毒研究	9
1.3.3 生物脱毒过程的呋喃类化合物代谢研究	11
1.3.4 <i>Amorphotheca resinae</i> ZN1 固态生物脱毒	12
1.4 木质纤维素干法生物炼制	13
1.4.1 干法生物炼制技术的建立	13
1.4.2 干法生物炼制技术的应用	13
1.4.3 干法生物炼制存在的问题	14
1.5 本文的研究目的和技术路线	14
第 2 章 螺带搅拌混合对干式稀酸预处理的促进	16
2.1 引言	16
2.2 材料与方法	17
2.2.1 原材料	17
2.2.2 菌种和酶	17
2.2.3 流体力学冷模实验	17
2.2.4 预处理反应器	18
2.2.5 预处理操作	19
2.2.6 酶解糖化评价预处理物料	19
2.2.7 同步糖化发酵产乙醇评价预处理物料	21
2.2.8 预处理过程的计算流体力学模拟	22
2.2.9 糖类、乙醇以及抑制物检测	22
2.2.10 纤维素和木聚糖含量测定	22
2.3 结果与讨论	23

2.3.1 高固体含量搅拌浆选择的确立.....	23
2.3.2 螺带搅拌干式稀酸预处理和静态预处理的对比.....	23
2.3.3 CFD 模拟干式稀酸预处理过程的螺带搅拌混合.....	25
2.3.4 螺带搅拌预处理反应随条件改变的规律性研究.....	27
2.3.5 预处理秸秆同步糖化发酵生产乙醇.....	30
2.4 本章小结.....	31
第 3 章 无需预浸的干式稀酸预处理过程生产纤维乙醇.....	33
3.1 引言.....	33
3.2 材料与方法.....	34
3.2.1 原料与试剂.....	34
3.2.2 预处理反应器和预处理操作.....	34
3.2.3 同步糖化发酵生产乙醇 (SSF).....	34
3.2.4 纤维素和木聚糖测定.....	34
3.2.5 糖类、乙醇以及抑制物检测.....	35
3.3 结果与讨论.....	35
3.3.1 预浸对螺带搅拌预处理过程的影响.....	35
3.3.2 预浸对无搅拌预处理过程的影响.....	38
3.3.3 经过不同预浸方式的预处理秸秆同步糖化发酵生产乙醇.....	39
3.4 本章小结.....	40
第 4 章 灰分脱除对于稀酸预处理的促进作用.....	41
4.1 引言.....	41
4.2 材料与方法.....	42
4.2.1 原材料与除尘操作.....	42
4.2.2 菌种与酶制剂.....	42
4.2.3 预处理反应器和操作.....	42
4.2.4 预处理秸秆的生物脱毒.....	43
4.2.5 同步糖化发酵生产乙醇 (SSF).....	43
4.2.6 玉米秸秆中组分的测定.....	43
4.2.7 玉米秸秆吸收酸溶液分析.....	44
4.2.8 灰分元素分析.....	44
4.2.9 糖类、乙醇和抑制物的分析.....	44
4.3 结果与讨论.....	44
4.3.1 玉米秸秆原料中灰分含量对于预处理效率的影响.....	44
4.3.2 不同灰分含量秸秆预浸前后的 pH 值测定.....	47
4.3.3 玉米秸秆中和稀酸能力测定和灰分元素组成测定.....	47

4.3.4 同步糖化发酵产乙醇.....	49
4.4 本章小结.....	51
第5章 <i>Amorphotheca resinae</i> ZN1 快速生物脱毒以及后续在位生产纤维乙醇的研究.....	53
5.1 引言.....	53
5.2 材料与方法.....	54
5.2.1 材料与菌种.....	54
5.2.2 固态生物脱毒过程.....	55
5.2.3 同步糖化发酵过程.....	55
5.2.4 在位快速脱毒和发酵.....	55
5.2.5 <i>A. resinae</i> 在合成培养基以及生物脱毒过程中生长研究.....	56
5.2.6 分析方法.....	56
5.3 结果与讨论.....	56
5.3.1 固态生物脱毒过程抑制物代谢研究.....	56
5.3.2 通气条件下 <i>A. resinae</i> 的快速生物脱毒.....	61
5.3.3 同步糖化发酵生产乙醇评价快速脱毒.....	66
5.3.4 改变糠醛含量对快速生物脱毒的影响.....	68
5.3.5 快速生物脱毒过程中菌体生长.....	71
5.3.6 脱毒过程中接种量对于快速脱毒的影响.....	74
5.3.7 快速生物脱毒原理分析.....	75
5.4 本章小结.....	75
第6章 结论与展望.....	77
6.1 结论.....	77
6.2 展望.....	78
参考文献.....	79
附录 I 主要实验试剂与仪器和设备.....	91
学术成果.....	93
致谢.....	95

第 1 章 绪论

1.1 前言

传统的石油炼制技术是通过分馏方法，从石油中提取平台化学品，并通过后续的一系列反应生产各种各样的化学品，比如材料、燃料等。随着石油资源短缺、大气环境问题的浮现，更多的可再生资源受到了关注并被深入研究和探索，以取代目前石油炼制生产的化学品以及能源产品等，其中生物炼制技术因为其利用可再生的生物质资源作为原料进行加工而受到了广泛的关注。生物炼制是将生物质原料通过一定的加工手段，结合生物转化方法生产燃料、化学品等，旨在替代传统的石油炼制过程^[1]。生物炼制可以细分为三种模式^[1,2]，其中模式 1 是利用如玉米、小麦等淀粉原料，通过“干法炼制”生产产品，而模式 2 则通过“湿法炼制”将上述淀粉原料转化为燃料或化学品。在两种模式中，干法生物炼制采用研磨设备直接将粮食作物磨成淀粉之后，直接进行后续的生物转化生产化学品。过程中不涉及复杂的设备和操作，并且用水投入较低，因此称作“干法炼制”；而“湿法炼制”（模式 2）与“干法炼制”（模式 1）最大的不同在于：湿法炼制在利用淀粉生产主要产品之前，还采用各种物理、化学方法对淀粉原料进行加工处理，从中提取高附加值产品。在过程中使用复杂的设备和不同的溶剂，故而称作“湿法炼制”。虽然“湿法炼制”生产过程的设备成本和用水量投入都要比“干法炼制”多，但是相比“干法炼制”而言，其原料利用更加充分、生产产品种类更加丰富、产品价值更高，因此也被广泛应用于第一代生物燃料的工业化生产。生物炼制模式 3 是目前研究最多的一种生物炼制技术，在该模式中，除了淀粉原料之外，农作物的茎秆等废弃物也被综合利用，采用各种加工手段，生产大宗化学品的同时，提炼高附加值产品^[2]。相比于模式 1 和模式 2 单纯的淀粉加工过程，模式 3 对于作物的利用率更高，生产过程更加可持续。该模式中包括了全作物生物炼制、绿色生物炼制和木质纤维素原料生物炼制。其中木质纤维素原料生物炼制由于其不与人争粮、不与粮争地的特点，也成为了第二代生物燃料的最主要生产模式，受到了全世界研究者的瞩目。

木质纤维素是由木质素、纤维素和半纤维素组成，其包括了农作物废弃物（小麦秸秆、玉米秸秆、稻秆、甘蔗渣等），林业废弃物（软木、硬木、灌木等）、能源作物等（芒草、柳枝稷等），是世界上最丰富的碳水化合物资源，因此成为了替代淀粉类生物质进行生物炼制的理想原料^[4]。木质纤维素原料生物炼制通常需要经过以下步骤：预处理、脱毒、酶解糖化、发酵、产物分离纯化。

木质纤维素的三种主要组分之间形成的抗性结构，使其不能直接通过生物转化生产产品，原料必须经过预处理操作破坏抗性结构，所以原料预处理技术成为决定木质纤维素生物炼制生产效率的最关键步骤^[3]。预处理是通过物理化学作用打破木质纤维素原料

的抗性结构，如图 1.1 所示，木质纤维素经过预处理后，结构由致密变得松散，有利于下一步酶解糖化过程中纤维素酶和纤维素底物的结合，保证纤维素酶酶解糖化过程的高效进行。为了破坏木质纤维素各组分之间形成的抗性结构，预处理过程通常需要在高温、高压的严苛条件下，才能将木质纤维素结构进行有效的破坏。然而，在这样的严苛条件下，纤维素、半纤维素和木质素容易过度降解，产生对后续纤维素酶水解和微生物发酵有毒副作用的副产物，因此在预处理操作之后，木质纤维素生物炼制往往需要脱毒工序去除或降低抑制物^[5]，减轻或消除对酶解发酵的抑制作用，再进入下一步的生物转化过程，生产各种各样的生物基化学品。因为预处理技术在生物炼制中起到了举足轻重的作用，也是当前木质纤维素生物炼制中最热门的研究课题；同时介于有效的预处理过程需要配套高效的脱毒过程，保证后续生产的正常进行，因此脱毒技术也同样受到了广泛的研究和关注，这也是本文的两个主要研究内容，本章内容对预处理技术和抑制物脱毒技术的研究进展开展综述。

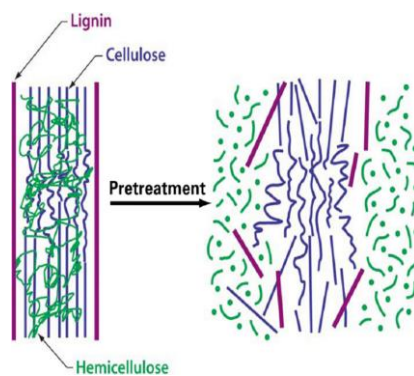


图 1.1 预处理过程对于木质纤维素结构的破坏^[4]。

Fig. 1.1 The destroy of lignocellulose construction by pretreatment.

1.2 干式稀酸预处理技术的建立

1.2.1 稀酸预处理技术

为破坏木质纤维素的结构使后续的酶解发酵能够高效进行，各类预处理方法在木质纤维素生物炼制过程中被采用。目前常用的预处理方法中包括：（1）化学法如酸、碱、有机溶剂预处理等；（2）物理方法如机械挤压、研磨预处理等；（3）物理化学方法如蒸汽爆破、氨纤维爆破处理等；（4）生物预处理^[6]。化学法中的酸式预处理主要针对半纤维素的水解，碱式和有机溶剂预处理则针对木质素的溶解。化学预处理技术在生物炼制的早期就已经开展研究，也是当今应用最为广泛的预处理技术；物理法的主要目的在于尽可能减小木质纤维素原料的尺寸，增大纤维素的比表面积，促进纤维素酶和纤维素的结合，提高酶解糖化过程效率。但是过程中设备要求高，投入能耗较大；物理化学法如蒸汽爆破、氨纤维爆破，其作用原理是在过程中通入高压蒸汽随后立即泄压，对原料造成爆破效果，用于打开木质纤维素的结构。物理化学法是目前报道的较为高效的预处理

技术^[7]，也成为了当今热门研究的预处理技术之一；生物法是利用能够降解木质素的微生物，通过在木质纤维素表面的固态培养，降解木质素，达到预处理效果。虽然生物法具有低成本、无用水投入和无废水排放等优点，但是通常需要一个很长的培养周期^[6,7]，大幅降低了其在工业化预处理过程中的实用性。在上述的预处理方法中，稀酸预处理技术相对于其他方法而言，拥有预处理效率高、溶剂成本较低、能耗低、设备投入少等优点。除了在实验室规模的研究中大量采用之外，亦受到了部分工业化生产过程的青睐，是目前最主流的预处理技术之一^[8]。

稀酸预处理的一般流程如图 1.2 所示^[8-10]。木质纤维素原料经过前处理（清洗、烘干、粉碎）后，预浸于稀酸溶液之中，再将经过稀酸预浸的物料投入预处理反应器中进行高温高压处理，处理后的固液混合物进行固液分离，分别用于后续产品的生产。过程中预处理温度和反应时间通常被认为是决定稀酸预处理效果的两个主要条件参数，通过调整预处理过程的这两个参数来调整稀酸预处理的效果。当预处理温度达到 160 °C 以上的时候，则预处理反应时间只需控制在 10 min 以内，即可达到 70% 以上的纤维素酶解转化率^[7-12]；若预处理温度低于 140 °C 的，反应时间则需要 20 min 以上^[8,11,13]，才能够保证同样的预处理效率。除了温度和反应时间，还可以选择不同的稀酸溶液进行催化来改变预处理的效果，常用的稀酸溶液包括硫酸、盐酸、硝酸、磷酸和一些有机弱酸等，众多酸催化剂中，硫酸因为其价格低廉、预处理效果优良而成为了稀酸预处理过程中最常用的催化剂^[6,7,14]。

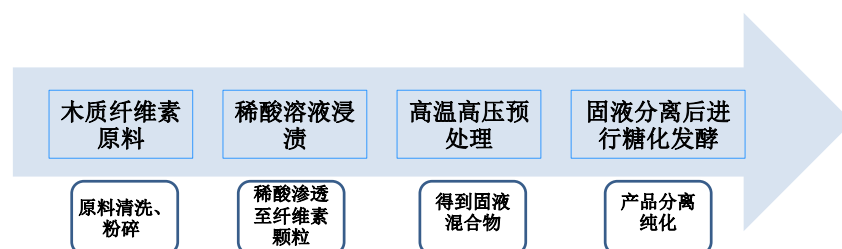


图 1.2 木质纤维素稀酸预处理到产品生产的主要流程。

Fig. 1.2 The major process of dilute acid pretreatment of lignocellulose for chemicals production.

虽然稀酸预处理对木质纤维素的处理效果非常理想，但是过程中会投入大量的稀酸溶液用于预浸纤维素原料，造成大量废水排放；另外，为了在后续生物转化过程中获得高浓度的糖和产品，稀酸预处理过程后的固液混合物不得不采取固液分离的方式，获得更高的发酵固含量。该过程不仅增加了操作成本，亦造成大量在预处理过程中产生的单糖和寡糖的损失。因此，为配合后续转化过程中的高固含量需求，提高稀酸预处理过程中的固含量受到了越来越多的关注^[15]。

1.2.2 高固体含量预处理的趋势

虽然低固含量预处理过程能保证高效率，但是由于考虑到产物分离成本问题，越来

表 1.1 木质纤维素原料高固体含量预处理的研究进展

Table 1.1 Development of pretreatment at high solids loading using lignocellulosic feedstock

预处理方法	底物	固含量 (%)	温度和压力	反应时间 (min)	其他条件	糖得率 ^a (%)		文献出处
						葡萄糖	木糖	
酸式预处理								
蒸汽+SO ₂	杨树	33	160 °C、0.5 MPa	30	3% SO ₂	91.2	91.6	Wayman 等 ^[15]
蒸汽+SO ₂	玉米秸秆	33	160 °C、0.5 MPa	30	3% SO ₂	86.5	79.0	Wayman 等 ^[15]
蒸汽处理	玉米皮	70	215 °C	2	/	87	40	Allen 等 ^[26]
稀酸+蒸汽	玉米秸秆	20-30	180 °C	10	/	98	NC ^b	Schell 等 ^[15]
稀酸	玉米秸秆	25	170 °C	3	1% (w/w) 酸浓度	98.7	94	Zhu 等 ^[27]
有机酸	小麦秸秆	20	150 °C	30	5.17% (w/w) 硫酸	>90	80	Kootstra 等 ^[28]
热水 (Hydrothermal)	小麦秸秆	25-40	195 °C	6-12	/	94	NC	Peterson 等 ^[29]
酸催化的热水处理	油菜秆	20	180 °C	10	1% (w/w) 酸浓度	63.17	75.12	Lu 等 ^[30]
CO ₂ -H ₂ O 两相预处理	玉米秸秆	20	160 °C、20 MPa	60	/	85	10	Luterbacher 等 ^[31]
亚硫酸盐	软木	20	180 °C	30	8-10% (w/w) 亚硫酸盐 +1.8-3.7% (w/w) 硫酸溶液	90	76	Zhu 等 ^[32]
碱式预处理								
氨纤维爆破	玉米秸秆	40	90 °C	5	/	100	NC	Teymouri 等 ^[33]
氨纤维爆破	酒糟	55	70 °C	5	/	68	12.2	Kim 等 ^[34]

a. 糖得率为纤维素酶水解后或预处理后的糖得率；

b. NC——Not calculated, 文中并未计算糖得率。

越多的高效率预处理技术都倾向于向高固含量发展。高固含量预处理是指在预处理反应过程中装载的干物料含量超过 15%^[15]。越来越多的研究者将高固含量预处理过程作为一个更加经济的预处理方法而加以研究，表 1.1 列出了目前已经应用的高固含量预处理过程。

高固含量的预处理过程较低固含量过程而言，其主要优势如下：（1）预处理过程中装载的固体越多，使后续酶解糖化过程能够直接在高固含量下进行，无需经过固液分离^[15-17]；（2）预处理过程更加可持续，用相同的预处理方法，高固含量预处理过程能大幅降低用水的投入^[18]；（3）得到相同转化率的条件下，可以运用更小的反应器和设备进行预处理，大幅降低设备投入^[19]；（4）得到高固含量的预处理后物料，可以直接运用于高浓度乙醇同步糖化发酵过程，降低蒸馏过程成本。目前采用淀粉发酵乙醇的过程，最高固含量可以达到 30%，而木质纤维素原料鲜有超过 20%的案例^[20,21]。因为只有当发酵液乙醇浓度达到 4% 体积浓度后，蒸馏成本才能降低，所以这就要求酶解过程中的固含量至少要 15% 以上，发酵过程中的固含量至少需要 20% 以上，据估算，运用当今的预处理和乙醇发酵技术，要达到 5-10% 的理想乙醇浓度，木质纤维素原料的发酵过程中的固含量要求在 30% 左右^[22]。综上分析，高固含量的预处理过程对于后续加工过程的贡献不言而喻。

虽然高固含量预处理过程有着上述多个优点，但在实际过程中仍然存在一些限制因素。（1）由于高固含量过程中，反应器内没有太多的游离水存在，对于某些已经成熟的预处理过程可能并不适用^[21]；（2）纤维素原料的各个组分之间和水的结合能力不同，使其并不适用于所有的预处理过程，比如半纤维素相对于木质素和纤维素而言，其持水性更强，提高预处理的固体含量，会降低那些作用于木质素的预处理方法的效率^[15]；（3）水在预处理过程中起到了重要的作用^[15]，其可以促进预处理中的化学反应，通过增加预处理物料颗粒的润滑性降低预处理过程中固液混合物的粘度，为预处理过程中产生的可溶性糖类提供溶剂以及过程中通过扩散进行传质等，水用量的减少会造成上述缺陷；（4）高固含量过程加上物料的高吸水性能，使得物料容易结块或者粘度增加^[23]，造成预处理反应过程中的混合能耗增加、过程物料传输难度增大，需要投入额外的试剂进行粘度的控制。在造纸工业中，通常添加二甲基甲酰胺以降低高固含量纸浆的粘度^[24]；（5）在生产高固体以及高糖溶液的同时，有增加过程中抑制物的风险^[25]。因此在提高预处理过程固含量的同时，必须将控制体系粘度、合适的预处理方式、以及抑制物的大量产生等几点纳入考虑。

1.2.3 高固含量稀酸预处理

酸式预处理的主要作用于半纤维素组分的水解，而高固含量体系中存在半纤维素持水作用的问题，因此相对于碱法和物理化学（汽爆）等作用于木质素的方法而言，稀酸预处理过程更加适用于高固含量的预处理之中，高固含量稀酸预处理也是最早进行研究的。1987 年，Wayman 等^[15]用 SO_2 作为催化剂，通过 160 °C、30 min、3% SO_2 用量的条件对玉米秸秆和杨树进行预处理，分别得到了 86.5% 和 91% 的纤维素酶解转化率，

随后的研究中,越来越多的预处理方法诸如稀酸预处理、蒸汽预处理、热水预处理、氨纤维爆破预处理也依次在高固含量下进行。但从表 1.1 中可以看出,除了氨纤维爆破预处理之外,其余的高固含量预处理过程依然以酸式预处理为主,也印证了稀酸处理更加适合高固含量的说法。值得注意的是,高固含量的酸式预处理中,为了得到理想的预处理效果,预处理反应温度都达到了 150 °C 甚至 180 °C 以上,提高温度或反应时间的后果则是抑制物生成的增加,因此如果在高固体含量的稀酸预处理过程中增加有效的混合作用,就可能避免上述提出的主要缺陷,保证高糖化效率的同时,减少预处理过程中的副产物的产生,因此在高固含量酸式预处理过程中需要适合高固体含量混合的反应器。

1.2.4 高固含量稀酸预处理反应器应用研究

高固体含量的预处理过程在实际应用中对反应器有更高的要求,相比于传统的预处理过程而言,固体含量的升高,相同的反应器内,化学催化剂和原料之间的充分混合就减少了,导致传质和传热减少。为了解决高固含量稀酸预处理过程中的混合问题,Hsu 等^[15]开发了水平搅拌式反应器,体积 100 L,通过在卧式反应器中平叶桨以及物料在过程中的自由落体式的混合作用,增加过程中的传质传热,并减少搅拌死区,该反应器能应用于 10-15% 的固含量;Jorgensen 等^[25]设计的水平滚筒式反应器,其原理类似 Hsu 等的设计,并且将 280 L 的反应器分为五个部分,每个部分都安装三个搅拌桨,通过一根轴驱动,外加滚筒式反应器内自由落体的作用进行有效混合,同时该反应器亦可以作为高固含量纤维素的糖化反应器,因此,预处理与糖化发酵可以耦合于一个反应器内进行,该反应器处理固含量约为 25% 左右。但是在大型卧式反应器中,容易造成稀酸预处理过程中蒸汽分布不均匀,在蒸汽入口处的物料受到的蒸汽传热要比反应器另一端高出两倍,虽然物料与稀酸之间的传质问题可以较好的解决,但是传热问题却没有彻底解决。因此卧式反应器并不适合于高固含量的预处理反应过程。

Zhu 等^[27]则采用直筒浸润反应器,处理 25% 固含量下的稀酸预处理过程,该反应器通过预热稀酸溶液后,直接泵入装有固体物料的反应器中,进行高温反应,反应过程中通入氮气进行与泵入的液体进行对流,增加传热和混合,随后通过泵将预处理后的固液混合物进行收集,而该反应器形式也成为了后续高固含量稀酸预处理中应用最多的反应器形式,不过经过改进之后,反应过程改成了通过蒸汽对物料进行加热和传质。

而在 2011 年 Humbrid 等发表的美国可再生能源实验室技术研究报告中^[35],采用了两步法预处理过程,其中第一步采用螺杆连续式预处理反应器(如图 1.3)对物料进行快速的稀酸预处理,随后再以寡糖转化为目的进行第二步预处理反应。在该预处理过程的第一步中,物料首先通过蒸汽预热后,与稀硫酸在螺杆反应器内进行混合,体系为 30% 固含量、158 °C,在反应器中停留 5-10 min,并通过螺杆的不断传输作用,达到连续预处理的效果。螺杆反应器随后亦多次应用于物料连续稀酸预处理过程^[36]。在螺杆反应器中,主要通过对物料和稀酸溶液进行加热,随后在螺杆中以均匀的速率进行传送混合,这样的结构设计虽然能够增强固液传质,却大幅度减慢了反应速率,另外,螺杆长度较长,传送过程中很有可能使经过预热的酸和物料迅速降温,降低预处理的效果。

上述几种高固含量下的预处理反应器虽然已经在研究中得到了应用，但是为保证高固含量预处理在工业化的过程中能够应用，就要求反应器设计达到以下两点^[37]：（1）低能耗的投入。不仅需要能够带动高固含量体系的混合作用，亦要设计合适的搅拌装置来降低能耗作用；（2）在较低的预处理强度下获得高预处理效率。反应器中设计合适的搅拌混合装置，其实是为促进高固含量预处理过程中蒸汽和固体更好的混合，使汽固两相之间的传质传热更加均匀，提高预处理效率的同时，降低蒸汽用量、减弱预处理强度。显然，在本章节中提到的已经运用的预处理反应器，其混合性能还是存在缺陷，因此也减缓了其在大规模工业化生产中的实践。

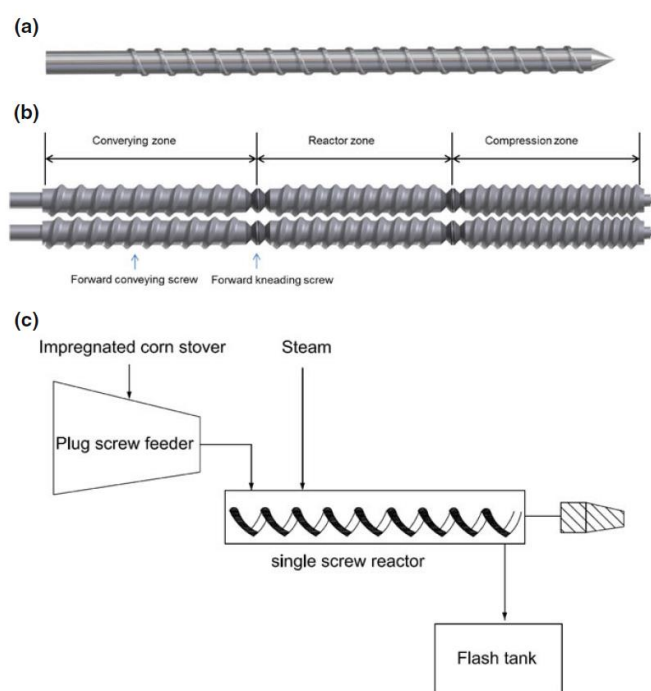


图 1.3 螺杆式反应器示意图^[37]

Fig. 1.3 Schematic diagram of the extruder screw configuration

(a) 单螺杆；(b) 双螺杆；(c) NREL 技术报告中采用的螺杆式预处理反应器

1.2.5 干式稀酸预处理技术的建立与不足

相比于目前美国建立的中试工厂所采用的较高用水量的流程而言，在类似中国这样的水资源紧缺、废水回收处理技术并不健全的发展中国家，开设生物炼制工厂迫切需要高固体含量预处理技术，并且，如果能够将过程中的固体含量进一步增多、用水量进一步减少，对于工业化生产的可持续过程更加有利。

为了达到适合中国发展的高固含量预处理过程，本课题组由 Zhang 等^[38]在高固体含量稀酸预处理的基础上，继续降低稀酸预浸秸秆过程的液固比至 1:2（传统过程 6:1~10:1^[8]），使稀硫酸预浸后的玉米秸秆中不存在游离的酸溶液，预浸后的物料投入直筒式预处理反应器中，自上而下通入蒸汽，对反应器内的物料进行加热的同时，通过气体在固体中间的渗透作用增强传质传热，高温预处理后得到了不含游离水的预处理秸秆。

如图 1.4 所示，由于进出预处理反应器的物料都是没有游离水存在的状态，实现了预处理过程中的低水耗、无废水排放，大幅降低了预处理过程的成本，该方法称为干式稀酸预处理技术。



图 1.4 玉米秸秆的干式稀酸预处理过程

Fig. 1.4 Corn stover pretreated using dry dilute acid pretreatment

干式稀酸预处理的过程目前仍然处于实验室规模的研究阶段，而在小规模反应器中，蒸汽的渗透作用已经起到了较好的传质传热效果。然而，在大规模反应器中，蒸汽的渗透作用就显得非常有限，因此与大部分高固含量预处理过程相同，干式稀酸预处理技术难以解决大规模反应器中的传质传热问题，无法直接放大到工业化反应器中进行应用。其次，在超高的固体含量下，极度缺水状态无法通过水作为介质进行有效的传质，因此在高温预处理过程之前的预浸步骤中，需要将大量的干物料和少量的稀酸溶液彻底混合，通过不少于 12 h 的预浸时间，才能够保证稀酸溶液和固体物料之间的充分渗透传质，提高干式稀酸预处理的效果。整个过程的周期较长，也不利于工业化的应用。因此，如何解决干式稀酸预处理技术中的传质传热成为了本文的研究内容之一。

1.3 树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 固态生物脱毒

1.3.1 抑制物的形成和传统脱毒研究

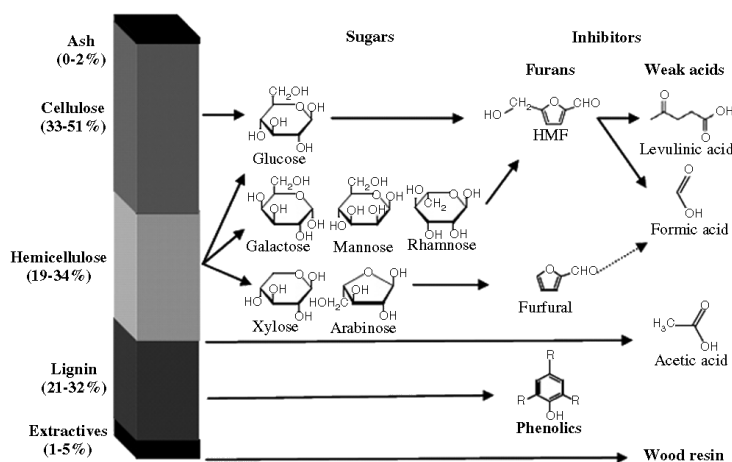


图 1.5 木质纤维素原料经过预处理后产生的抑制物^[41]

Fig. 1.5 Inhibitors generated in the pretreatment of lignocellulose feedstock

木质纤维素原料经过预处理后，木质素、纤维素以及半纤维素都不可避免地在高温化学催化作用下过度降解产生对后续生物转化有抑制作用的抑制物，主要分为三大类

[5,39,40]: (1) 呋喃类衍生物, 包括戊糖高温下产生的糠醛和己糖产生的 5-羟甲基糠醛 (5-HMF); (2) 有机弱酸, 包括乙酰基水解后产生的乙酸、糠醛和羟甲基糠醛进一步降解产生的甲酸和乙酰丙酸; (3) 木质素被破坏后产生的种类繁多的酚类化合物如酚醛、酚醇、酚酸等。这些抑制物既能够抑制纤维素酶的活性, 降低酶解效率, 还可以抑制微生物碳代谢过程, 造成生长的延滞和生产能力的大幅降低^[39-41]。除了单个抑制物对于生物转化过程的抑制性, 木质纤维素预处理后的体系中共存的这些抑制物对于生物转化过程产生协同抑制, 比起单个抑制而言, 更进一步降低了纤维素酶活性和微生物代谢生产能力。

针对预处理后产生的各种抑制物, 脱毒过程不可或缺, 以保证后续发酵过程不受抑制物的影响。脱毒方法中包括了物理方法如物料水洗^[42-46]、真空蒸发^[42,47]; 化学方法如活性炭吸附^[42,48-50]、石灰过碱化 (Overliming)^[51-54]、离子交换处理糖化液或预处理过程产生的水解液^[55-57]; 生物法如微生物降解或酶催化^[40,58]。这些方法中, 水洗法、石灰过碱化和活性炭吸附在脱毒过程中应用较为广泛。水洗预处理物料是最直接有效的脱毒方法, 可以除去大部分的可溶性抑制物, 但是过程中用水量大、废水排放大, 同时会造成大量的糖类损失; 石灰过碱化和活性炭吸附亦有着高效率、低成本的特点, 但却在过程中增加了固液分离步骤, 同样容易造成水解液中的糖损失^[59]。为了避免物理、化学方法脱毒过程中的高成本、高损失, 生物脱毒法降解物料或水解液中的抑制物受到了关注。

1.3.2 生物脱毒研究

生物脱毒法是利用微生物以及微生物中可以有效降解抑制物的酶类, 通过微生物代谢或者生物催化手段, 将抑制物转化为低毒化合物或完全被降解的过程^[40,58]。相比于传统的物理化学手段, 生物脱毒法具有条件温和、无需额外水耗、成本低廉、降解彻底等优点, 因此越来越成为研究的热点。生物脱毒过程中, 酶催化法则是通过从白腐真菌中分离纯化得到的漆酶或过氧化物酶, 利用这两种酶降解酚类化合物的特性, 对预处理、酶解后水解液中酚类化合物进行脱除^[60-63]。微生物脱毒法相比酶催化法而言, 其拥有更加完整的抑制物代谢所涉及的酶系, 从而能够降解抑制物的种类更多, 操作成本更低, 因而更适用于生物脱毒的过程。

目前对于微生物脱毒过程的研究主要分为两大类, 一类是在合成培养基内手动调节抑制物的种类和浓度, 研究脱毒微生物对于抑制物降解的一些基本性质; 另一类则是直接将脱毒微生物应用于木质纤维素物料或水解液中, 并耦合后续的发醇生产过程。目前更多的脱毒过程仍然停留于第一类, 所涉及的菌种包括 *Saccharomyces cerevisiae*^[64-69]、*Escherichia. Coli*^[70-72]、*Trichosporon fermentans*^[73]、*Zymomonas mobilis*^[74-76]、*Corynebacterium glutamicum*^[77]、*Leuconostoc strains*^[78]、*Enterobacter cloacae* GGT036^[79], 虽然这些报道中, 各菌种在液体培养基中表现出了对于糠醛的高降解效率, 但缺乏在木质纤维素体系中的实际应用。表 1.2 列举对于第二类脱毒研究的报道, 在这些经过筛选的脱毒菌种中, 都表现出了在木质纤维素水解液中, 对不同抑制物的广谱降解能力, 因此实用性更强。Lopez 等^[82]从糠醛污染的土壤中筛选得到的丝状真菌 *Coniochaeta*

ligniaria NRRL30616, 已经应用于多种纤维素原料水解液中的抑制物降解。相比于表中其他脱毒菌种而言, 其耐受抑制物、降解抑制物的能力较强, 因此, 该脱毒方法已经成为了该课题组预处理后水解液处理的一个固定流程; 2010 年, *Cupriavidus basilensis* HMF14 被报道可以降解各种木质纤维素预处理过程中产生的抑制物, 而不会利用糖类物质^[86]; 在本课题组的研究中, Zhang 等^[85]从预处理秸秆中筛选得到 *Amorphotheca resinae* ZN1, 可以直接对预处理后的固体物料进行脱毒, 并且在不同种类的预处理原料表现出了广泛的应用性。这几种微生物能够广谱地降解各类抑制物而在实际过程中拥有更高的实用价值。

表 1.2 预处理物料的生物脱毒研究进展

Table 1.2 Research on biological detoxification of pretreated lignocellulosic biomass

生物脱毒菌种	脱毒底物	降解抑制物	文献
<i>Trichoderma reesei</i> RUT-30	柳树水解液	糠醛、5-HMF、乙酸	[80]
<i>Ureibacillus thermosphaericus</i>	废弃木材水解液	5-HMF、酚类化合物	[81]
<i>Coniochaeta ligniaria</i> NRRL30616	玉米秸秆水解液	糠醛、5-HMF、阿魏酸、乙酸	[82]
	柳枝稷、藜草、苜蓿杆水解液	糠醛、5-HMF、乙酸	[13]
	小麦秸秆水解液	糠醛、5-HMF	[83]
	稻壳水解液	糠醛、5-HMF	[84]
<i>Amorphotheca resinae</i> ZN1	预处理后玉米秸秆、芝麻杆、稻杆、小麦秆、油菜秆	糠醛、5-HMF、乙酸	[85]
<i>Cupriavidus basilensis</i> HMF14	小麦秆水解液	糠醛、羟甲基糠醛	[86]
<i>Issatchenkia occidentalis</i> CCTCC M 206097	甘蔗杆、咖啡壳、玉米皮水解液	糠醛、5-HMF、阿魏酸	[87]
<i>Aspergillus nidulans</i> FLZ10	玉米秸秆汽爆水解液	糠醛、5-HMF、乙酸、甲酸	[88]
<i>Enterobacter</i> sp. FDS8	油棕榈空果串水解液	糠醛、羟甲基糠醛	[89]
<i>Scheffersomyces stipitis</i>	石花菜水解液	5-HMF	[90]

虽然微生物脱毒过程效率较高, 但是由于在木质纤维素的水解液中^[80,81,86,87,89,90]引入了其他微生物, 或多或少会造成部分糖类被脱毒微生物所利用, 减少发酵过程中的底物浓度; 同时引入其他微生物亦可能使发酵体系的复杂性有所增加, 这是生物脱毒应用过程中出现的最大弊端。为了克服这个问题, Nichols 等^[13,83,84]将生物脱毒步骤放在了预

处理后经过固液分离得到的预处理水解液中进行，并且严格控制脱毒时间，减少糖类的消耗，经过脱毒的预处理水解液经过灭菌后，被重新用于固体物料的同时糖化发酵过程，对发酵固含量进行调节。虽然该方法能够有效地减少糖类损失以及生物炼制过程的用水投入，但预处理后涉及到了固液分离操作，势必增加过程中的操作成本，在高固含量预处理的趋势下，该菌种的生物脱毒方法可能需要进一步研究改进；Yu 等^[89]则采用了不与酵母竞争葡萄糖代谢的 *Aspergillus nidulans* FLZ10，在同步糖化发酵过程中同时接入该菌种，不仅减少了发酵过程的抑制作用加强了乙醇发酵性能，而且同时接入酵母和 *Aspergillus nidulans* FLZ10 后，将更多的可发酵糖类让酵母进行代谢生产乙醇；Zhang 等^[86]则采用在酶解过程之前对预处理物料直接接入 *Amorphotheca resiniae* ZN1 进行脱毒。由于酶解前葡萄糖是以纤维素和葡寡糖的形式存在，并且该菌株没有分泌纤维素酶的能力，因此过程中几乎完全保留了木质纤维素中的纤维素，减少了木质纤维素酶解后的葡萄糖损失。在这三种有效的保留糖类的脱毒方法中，Zhang 等采用的物料固态脱毒的方式，不仅保留了酶解和发酵过程所需的纤维素，而且还能够保证发酵过程的高固体含量，可以更好地配合高固含量预处理技术。

为了避免引入其他微生物对发酵体系造成的潜在影响，另一种研究致力于通过在抑制物环境中的驯化以及基因改造方式提高发酵微生物对于抑制物的耐受性^[58]，使其能够在高浓度抑制物的水解液中，减轻抑制物对于其代谢生产产品过程的抑制作用，使发酵过程能够正常进行。该方法目前也已经在酿酒酵母生产乙醇过程中的展开较多研究^[91-93]，同时也在 *Escherichia coli*^[71,72]和 *Zymomonas mobilis*^[75,76]中也有所研究。但是，相比于接入特定的脱毒微生物而言，直接提高发酵微生物的耐受性方法其针对的抑制物种类有限，而改变预处理条件或生物质原料就可以制备出含有不同种抑制物组分的水解液，若发酵微生物中没有完整代谢抑制物的代谢机制，也很难适应抑制物含量和抑制物组成的改变，因此相对于微生物脱毒过程而言，提高发酵菌株的耐受方法应用上还是受到了较大的限制。

1.3.3 生物脱毒过程的呋喃类化合物代谢研究

预处理过程中在高温作用下，将纤维素和半纤维素过度降解而产生较多的糠醛和羟甲基糠醛，这两种呋喃化合物对微生物都具有较大的毒性，并且在木质纤维素体系中和其他抑制物产生的协同抑制和相对较高的浓度，成为了在木质纤维素预处理后的体系中对发酵微生物抑制作用最强的，微生物对于呋喃类衍生物的降解和代谢相比其他抑制物的降解机理而言，研究更为广泛。表 1.2 中列出的脱毒微生物 *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616、*Amorphotheca resiniae* ZN1、*Cupriavidus basilensis* HMF14，其代谢呋喃类衍生物的代谢产物以及代谢路径都已经有所研究，作为丝状真菌，*Coniochaeta ligniaria* NRRL30616 和 *Amorphotheca resiniae* ZN1 有着相似的代谢路径^[94,95]，在糠醛的降解中，糠醛首先被还原为糠醇，随后进一步转化为糠酸；同样地，羟甲基糠醛的代谢与糠醛相似，即首先被还原为羟甲基糠醇（2,5-呋喃二甲醇），随后转化为羟甲基糠酸。Koopman 等^[96]则利用代谢工程手段，彻底解析了 *Cupriavidus basilensis* HMF14 代谢糠醛、羟甲基

糠醛的代谢路径,如图 1.4 所示。其中糠醛和羟甲基糠醛的前几步反应与上述真菌相似,并且在后续的代谢过程中,羟甲基糠酸进一步被转化为 2,5-呋喃二甲酸,通过脱羧酶后转化为糠酸,在经过一系列的酶和生理代谢反应,最终转化为 α -酮戊二酸,进入 TCA 循环,彻底降解两种抑制物。在糠醛和羟甲基糠醛的代谢路径中,可以发现醛到醇的转化更多的是通过醇脱氢酶或醛还原酶的作用,因此,许多发酵微生物如 *Saccharomyces cerevisiae*^[65-68]、*Escherichia coli*^[70-72]、*Pichia stipitis*^[97]、*Clostridium acetobutylicum*^[98]、*Trichosporon fermentans*^[73]等都可以将糠醛和羟甲基糠醛转化为低毒的糠醇和羟甲基糠醇,从而减轻对后续发酵过程的影响。呋喃类衍生物代谢路径的解析对于发酵微生物而言,可以改进发酵菌株,使其能够在不降低发酵性能的同时,拥有更强的呋喃醛转化能力;另一方面,对于脱毒微生物而言,有了糠醛和羟甲基糠醛的完整代谢路径,能够更有效地调控呋喃醛类的代谢过程,为增强抑制物的降解提供更为有效的手段。

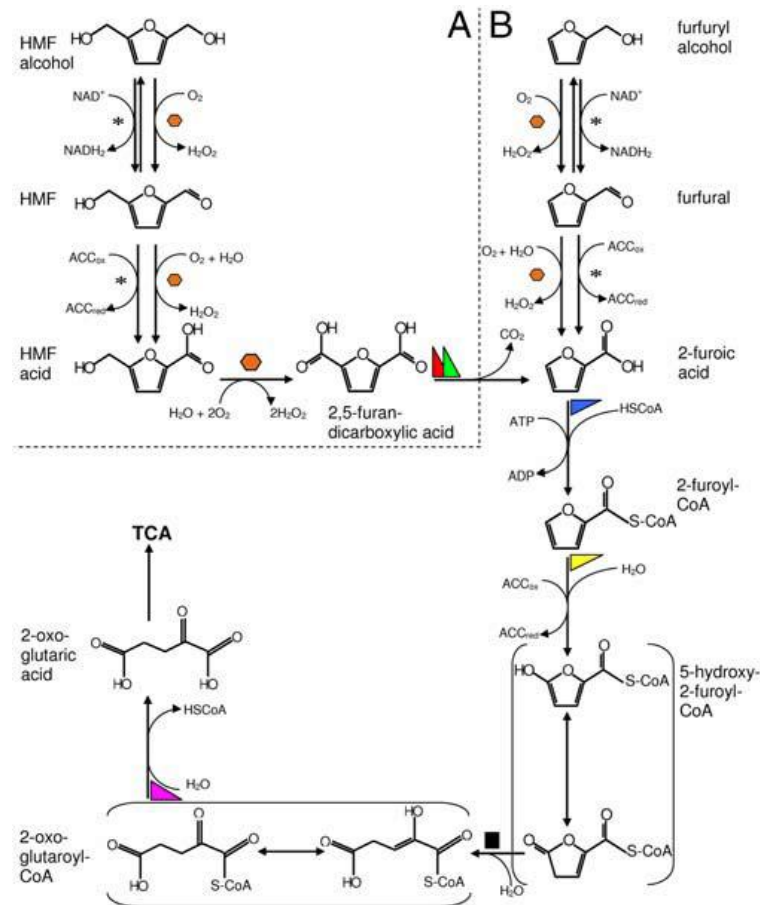


图 1.6 *Cupriavidus basilensis* HMF14 代谢糠醛和羟甲基糠醛的完整路径^[96]

Fig. 1.6 Complete metabolic pathway of furfural and 5-HMF by *Cupriavidus basilensis* HMF14

1.3.4 *Amorphotheca resiniae* ZN1 固态生物脱毒

在先前课题组开发的干式稀酸预处理过程的混合问题比起其他高固体含量预处理而言更加突出,不得不增加预处理过程中的稀硫酸用量和反应温度来达到理想的效果,该方案造成了抑制物含量的提升,不能直接将预处理物料应用于发酵过程中,而且由于预处理后得到的物料中不含有任何游离水的存在,使得传统的脱毒过程难以应用于该体

系中。随后 Zhang 等^[85]偶然中发现了预处理秸秆的霉变现象，并从中筛选得到了适用于预处理物料固态生物脱毒的丝状真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1，解决了干式稀酸预处理的脱毒难题。

Amorphotheca resinae 早期被作为航空煤油的污染菌种而受到研究^[99]，由于其独特的降解烃类化合物的能力，又被称为“煤油真菌”，经过对其种属鉴定研究，命名为树脂枝孢霉。*Amorphotheca resinae* 降解烃类化合物中所涉及的酶类^[100,101]，也使得其对于糠醛、羟甲基糠醛、乙酸等碳氢化合物拥有较强的降解能力，经过对 *A. resiane* 降解抑制物能力的初步研究发现，该菌种固态培养过程中不但可以降解各类木质纤维素抑制物如呋喃类、有机酸类和酚类化合物，还可以在降解抑制物的过程中生长菌丝^[85]，说明抑制物都最终可以进入该霉菌的中心碳代谢路径中，用于菌体的生长。该发现不仅说明 *A. resinae* 有着广谱的抑制物降解能力，还说明该菌种可以在固态基质中进行有效地脱毒作用，这个特点可以保留酶解发酵过程中大量的纤维素组分，也可以保证后续高固含量的生物转化过程中高底物浓度。

然而，在固态生物脱毒的过程中，存在与干式稀酸预处理过程相似的传质传热问题，使菌体脱毒的过程通常要持续 4-7 天，才能够彻底降解预处理物料中的糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸，保证发酵过程的正常进行，脱毒周期延长进一步降低了预处理过程到发酵过程的整体效率，使得固态生物脱毒无法应用于规模更大的工业化生产过程中，因此改进固态生物脱毒过程的效率是本文研究的内容之一。

1.4 木质纤维素干法生物炼制

1.4.1 干法生物炼制技术的建立

将干式稀酸预处理与 *A. resinae* 固态生物脱毒过程的相结合，为后续高固体含量的酶解糖化和发酵过程保证了高固体含量，有助于提高产物浓度，降低分离成本。干式稀酸预处理、固态生物脱毒以及后续的高固体含量同步糖化发酵过程的结合称为木质纤维素的干法生物炼制技术。

1.4.2 干法生物炼制技术的应用

物料经过干式稀酸预处理和固态生物脱毒降解抑制物之后，被置于螺带搅拌浆反应器^[22]内进行高固体含量的酶解发酵生产生物基化学品。螺带搅拌式反应器通过螺带传动将反应器底部的物料带到反应器上方，并通过自由落体使物料再次进入反应器底部，形成上下循环的混合流体，解决了高固体含量下酶解和发酵过程中的固液混合问题，同时大幅降低了高固体含量搅拌过程中的功耗，螺带搅拌式反应器已经应用于玉米秸秆^[22]、稻秆、小麦秆^[38]、菊芋^[102,103]、木薯渣^[104]、玉米芯残渣^[105,106]等多种不同生物物质的高固体含量发酵过程。除此之外，在先前的研究中，玉米秸秆的干法生物炼制已经成功应用，经过干式稀酸预处理、固态生物脱毒到最后的 30% 固含量下同步糖化发酵生产，得到了 45 g/L 左右的乙醇^[38,85]（约 5% 体积浓度）和 100 g/L 左右的乳酸^[107]高浓度指标。

1.4.3 干法生物炼制存在的问题

除了在先前章节中提到的干式稀酸预处理和固态生物脱毒过程各自存在的问题之外，二者相结合的过程亦存在连锁效应。超高固体含量的预处理过程提高了过程中的稀酸用量和预处理温度，造成预处理后物料中抑制物含量的提升，进一步增加后续 *A. resiniae* 生物脱毒法降解抑制物的难度。因此，如果能够解决干式稀酸预处理过程中传质传热缺乏的问题，使预处理反应体系中物料受热更加均匀，减少过程中抑制物的产生^[15]，降低后续脱毒过程中抑制物对脱毒菌 *A. resiniae* ZN1 的胁迫作用；另一方面，在降低物料抑制物含量的同时，如果能解决固态生物脱毒速率缓慢的问题，又能够进一步缩短从原料预处理到最后发酵的周期，提高整体效率。

1.5 本文的研究目的和技术路线

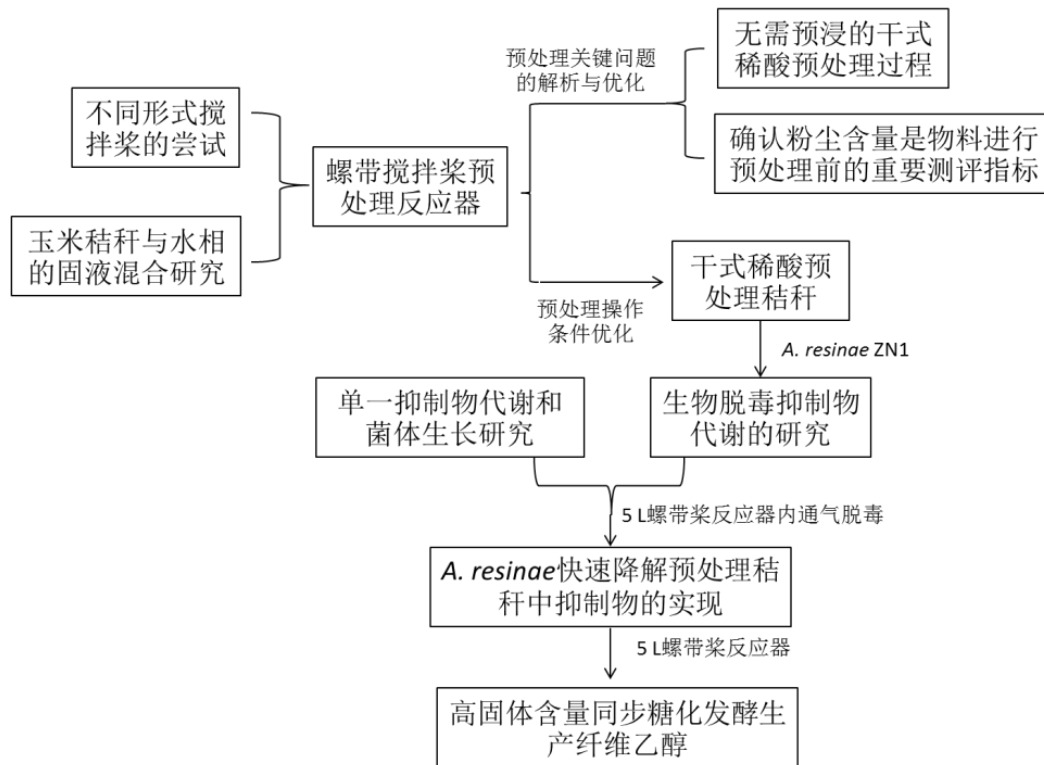


图 1.7 本研究的技术路线与实验流程

Fig. 1.7 The technical and experimental flow sheet in this research.

为了改进干法生物炼制过程中预处理和脱毒过程存在的问题，本文分别展开如下研究：首先运用化学工程方法研究干式稀酸预处理过程中的固液混合问题，设计开发能够处理高固体含量混合的螺带搅拌桨预处理反应器，增强预处理过程的汽固两相混合，使预处理过程的体系更加均一，保证预处理效果的同时，减少抑制物的生成，促进后续酶解发酵的效率。同时通过预浸和除尘步骤的研究，提出更加适合于放大生产应用的干式稀酸预处理技术。在提高预处理效率、降低物料中抑制物的同时，对固态生物脱毒过程进行详细研究，通过在螺带桨反应器中增加脱毒过程中菌体代谢所需的氧气供给以及搅拌混合，加快生物脱毒的速率，缩短生物脱毒的周期，并在同一个反应器内直接进行在

位的发酵生产乙醇，提高脱毒发酵过程的整体效率。将改进后的螺带搅拌式稀酸预处理与快速生物脱毒相结合，缩短整个干法生物炼制生产纤维乙醇的周期，提高干法生物炼制的整体效率，为干法生物炼制技术在未来大规模的商业化乙醇生产过程的推广和应用提供可靠的技术支持。

第 2 章 螺带搅拌混合对干式稀酸预处理的促进

2.1 引言

预处理过程是木质纤维素原料生物炼制生产化学品中最重要的步骤，其作用在于打破木质纤维素的抗性结构，使纤维素暴露，利于纤维素酶水解糖化和产品发酵^[108-110]。在各式预处理方法中，稀硫酸预处理被视为最有工业化应用潜力的预处理技术之一^[8-10,35,111]。然而，稀酸预处理过程中仍然存在一些缺点，主要包括：由于低固含量预处理过程造成的大量用水投入、在固液分离过程中的糖损失以及高浓度抑制物的产生^[59]。为了克服上述的这些问题，近年来越来越多的预处理研究中，研究者尝试尽可能地提高预处理过程的固体含量^[15]，其中包括了本课题组在 2011 年开发的干式稀酸预处理技术^[38]。干式稀酸预处理技术不仅能做到超高的固体含量（超过 70%），并且还能够保证预处理的高效率，该技术也已经应用于乙醇^[38,85]、乳酸^[107]和生物油脂^[112]的生产过程中。这种预处理过程之所以被称作“干”式预处理，是因为进入预处理过程的玉米秸秆原料和预处理后获得的玉米秸秆，都是“干物料”的形式，即在两个过程的物料中都不存在游离水。采用干式稀酸预处理技术可以克服稀酸预处理过程的两大主要缺点：（1）玉米秸秆原料的“干进”和预处理后物料的“干出”，使过程中没有废水生成，无需进行固液分离，无需处理含有稀酸以及各种化合物的废水；（2）没有固液分离，大部分的糖类被保留在了预处理后的固体秸秆中，减少了糖类的损失。

在实施干式稀酸预处理的过程中，要使大量的固体物料和少量的蒸汽充分混合成为了一个极富挑战性的工作。在传统稀酸预处理过程中，由于过程中的液体含量远高于固体，热蒸汽和预处理体系的混合就变得相当容易。因为热蒸汽连续地通入水相后，水相就被快速加热，并同时快速传热至完全浸没在水相中的固相部分，达到较好的传热效果。而当预处理操作过程在高固体含量下进行的时候，尤其在上述提到的“干法”模式中，蒸汽和固体物料的混合、热量从热蒸汽传递到固体秸秆的过程就变得相当困难，究其原因主要包括如下几点：（1）过程中没有游离水作为连续相覆盖固体物料，也就意味着热传递直接发生在了气固两相之间；（2）木质纤维素原料是一种良好的热绝缘体，使得木质纤维素表面虽然达到了预处理温度，但却难以继续将热量传递至深层的木质纤维素原料之中，使内部固体床层温度低于预处理所需的温度。

另一方面，由于木质纤维素具有非常高的持水性和吸收蒸汽的能力，进入反应器的蒸汽迅速被蒸汽入口的物料吸收，使蒸汽无法很好地扩散至上层的物料中。在小规模的反应器中，物料填充在反应器内形成的床层较薄，蒸汽还是可以缓慢地从床层的孔隙中渗透到物料上层，然而，随着工业级反应器规模的放大，填充反应器的物料量增加，使床层增高增厚，蒸汽则无法在大规模反应器中均匀地分布、扩散，就需要强制的搅拌作用进行改善。

综上，高固含量预处理过程中，搅拌混合作用是必须的，并且该搅拌装置要求既能

够处理高固体含量下的固液混合问题，又能够在过程中尽可能地降低能耗。在 2010 年本课题组的研究中，Zhang 等^[22]开发的螺带搅拌桨，能够处理不同种预处理物料同步糖化和发酵过程中大量的固体（木质纤维素）和少量的液体（纤维素酶）之间的混合问题。然而，通过比较预处理过程和糖化发酵过程可以发现，预处理反应器和发酵生物反应器是有本质区别的。在纤维素酶糖化以及后续发酵的过程中，物料投入到反应器中是以固体形式存在的，因此反应开始时的混合状态是高固体含量过程，但是随着酶解的进行，纤维素原料逐渐液化变成浆液，使该过程后期的混合难度降低；而在干式稀酸预处理过程中，反应从始至终都是以固体形式存在，增加了搅拌过程的难度。

本章内容对螺带搅拌桨在干式稀酸预处理过程中处理固体混合作用做了研究。首先通过在不同尺寸冷模反应器中测试螺带搅拌桨的混合性能，参照冷模实验的数据，设计了螺带搅拌桨预处理反应器，并通过实际玉米秸秆的预处理测试其实际的混合性能。预处理效率的评价通过酶解糖化和乙醇发酵进行，糖化和发酵的结果显示，在干式稀酸预处理过程中，螺带搅拌桨的混合作用非常显著，促进了玉米秸秆生物转化生产乙醇的效率。螺带搅拌桨反应器为未来干式预处理的工业化过程提供了反应器设计的原形。

2.2 材料与方法

2.2.1 原材料

玉米秸秆产自河南新乡，于 2011 年秋季收获，玉米秸秆经过水洗除尘后置于 105 °C 烘至含水量不再变化，烘干后的玉米秸秆含水量约为 7%。随后秸秆投入锤式粉碎机进行粉碎，并通过筛分得到直径约为 10 mm 的颗粒，密封待用。

2.2.2 菌种和酶

脱毒菌种 *Amorphotheca resinae* ZN1 CGMCC 7452 用于降解预处理后玉米秸秆中的抑制物^[84]，将 *A. resinae* 的孢子悬浮液接入已用 20% $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液调节 pH 至 5.5 的预处理秸秆中，开始固态脱毒过程，脱毒过程中不添加任何额外的营养物质，以 HPLC 检测不出预处理物料中各类抑制物作为脱毒结束的终点。

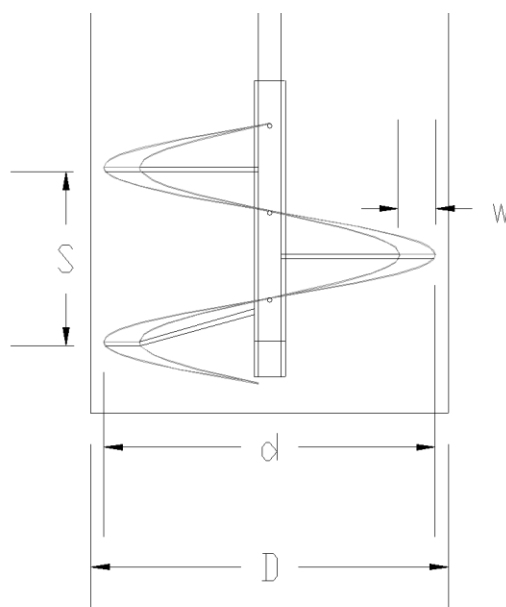
发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 CGMCC 2528 用于乙醇发酵过程。*S. cerevisiae* DQ1 首先在合成培养基（20 g/L 葡萄糖、2 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 g/L Yeast Extracts）中活化后，随后转接入玉米秸秆水解液中进行短期驯化，经过驯化的酵母作为后续发酵种子^[22,113]。

纤维素酶 Youtell 6#是由湖南尤特尔生化有限公司（湖南岳阳）提供，固体纤维素酶呈颗粒状，其酶活采用美国可再生能源实验室（NREL）的纤维素酶滤纸酶活测定方法（LAP-006）^[114]进行测定，酶活 135 FPU/g，纤维二糖酶活根据 Sherma 等人^[115]报道的方法进行测定，酶活 344 CBU/g，纤维素酶蛋白含量按照 Bradford 法测定，其蛋白含量为 90 mg/g。

2.2.3 流体力学冷模实验

冷模实验被设计用于检测玉米秸秆和水在螺带浆反应器内的混合效果。冷模实验分

别在 5 L、50 L、500 L 的反应器中进行，图 2.1 显示了冷模反应器的内部构造和尺寸参数，其中玉米秸秆和水的混合时间用来表示螺带搅拌桨的混合效果。实验中，玉米秸秆首先加入反应器中，随后从反应器的入口处加入等质量的水，混合时间以体系中物料达到恒定含水量的时间点作为最终结果。



Reactor volume (L)	D (mm)	Solids content (% w/w)	Mixing time (s)
5.0	170	50	180
50.0	384	50	168
500.0	786	50	120

图 2.1 装有螺带搅拌桨的流体力学冷模反应器的结构示意图

Fig. 2.1 Schematic diagram of the fluid dynamic reactors equipped with helical ribbon stirrer

反应器为装配有螺带搅拌桨的直筒式反应器，螺带搅拌桨尺寸随着反应器尺寸的放大而放大，但是螺带桨的结构比例在三个反应器中保持一致，混合时间的计算以物料中含水量达到恒定后的时间点作为标准。 d —螺带桨直径 (mm)； D —反应器直径 (mm)； S —螺带桨的螺距 (mm)； w —螺带桨螺带宽度 (mm)。

2.2.4 预处理反应器

图 2.2 为本章节用到的预处理反应器的结构图，其中图 2.1a 是带有螺带搅拌桨的预处理反应器，反应器是一个 20 L 直筒反应器（直径 260 mm，高 400 mm），螺带桨是由安装在反应器顶部的电机通过电磁转化器驱动的。图 2.1b 是没有搅拌桨的反应器，在本研究中作为螺带桨反应器的对比。该反应器是本课题组先前所使用的干式稀酸预处理反应器^[38]，是一个 10 L 直筒反应器（直径 180 mm，高 400 mm）。反应过程中的热蒸汽供给由蒸汽发生器（DZFZ4.5C）提供，通过反应器底部通入蒸汽，并由底部的两个蒸汽入口对蒸汽进行分散，两个蒸汽入口的直径为 6 mm，通入反应器的蒸汽平均流量为每分钟 0.1 到 1 kg。

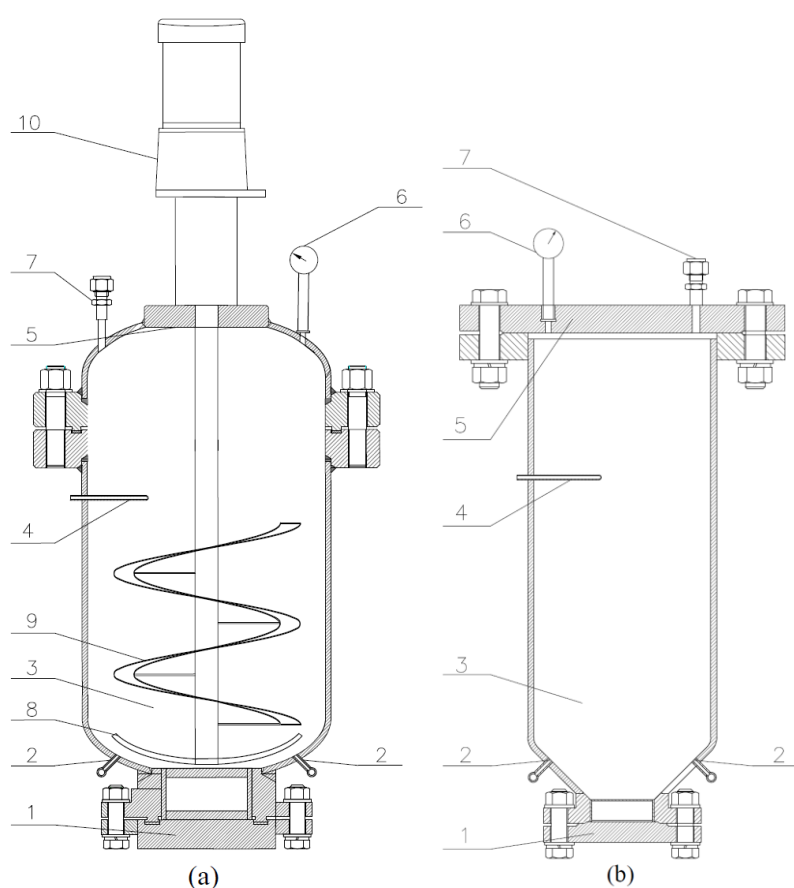


图 2.2 螺带搅拌桨预处理反应器和无搅拌预处理反应器示意图

Fig. 2.2 Schematic diagram of the dry pretreatment reactors with and without helical agitator

(a) 带有螺带搅拌桨的 20 L 预处理反应器；(b) 不带搅拌的 10 L 预处理反应器。图中，1—产物出口；2—蒸汽进口；3—反应器内部；4—温度计；5—反应器顶部；6—压力表；7—排气阀；8—锚式底桨；9—螺带搅拌桨；10—驱动螺带桨的电机

2.2.5 预处理操作

干秸秆和稀硫酸溶液以 2:1 的固液比进行预浸操作，将稀硫酸溶液均匀地洒在干秸秆上，充分混合后，密封于塑料袋中，室温（18~25 °C）静置 12 h。每批预处理操作中，将 2100 g 稀硫酸预浸后的物料（1400 g 干秸秆加 700 g 稀硫酸溶液）加入预处理反应器中，此刻反应器被物料完全填充以达到减少蒸汽用量的效果^[38]。物料装填完毕后，打开蒸汽入口阀，开始通蒸汽。反应器顶部的排气阀在预处理过程中打开两次，每次持续 2~3 秒，用于排出罐内残余的不凝气，当温度升至条件所需的预处理温度后，开始计算反应时间，维持几分钟后，反应结束。关闭蒸汽阀门，打开顶部排气阀，快速将蒸汽排出，预处理后的物料由底部出料口获得，过程中无游离水产生和废水排放。每个预处理条件分别做两个批次实验作为平行，测得的预处理参数都是平均自两个平行批次的实验数据。

2.2.6 酶解糖化评价预处理物料

预处理秸秆的酶解糖化评价参照美国可再生能源实验室（NREL）标准实验方法（LAP-009）^[116]并稍作修改。称取预处理后的秸秆（以干固体 1 g 为标准），加入去离

子水 10 ml、用 5 M NaOH 溶液调节 pH 至 4.8 后，加入 80 μ l 四环素溶液，并用 0.1 M 柠檬酸缓冲溶液 (pH 4.8) 将糖化体系固含量调节至 5% (w/w)。随后加入固体纤维素酶，纤维素酶用量为每克干物料 15 FPU (15 FPU/g DM)，蛋白含量约为每克干物料 10 mg (10 mg/g DM)，酶解温度 50 $^{\circ}$ C，摇床 150 rpm 酶解 72 h 后取样测定葡萄糖浓度。用于纤维素酶酶解糖化的物料不经过任何脱毒处理。

纤维素和木聚糖回收率是基于预处理前后秸秆干重进行计算的。预处理后的纤维素含量包括干物料中的纤维素、游离的葡萄糖单糖、葡寡糖；而预处理后的木聚糖含量包括干物料中的木聚糖、木糖和木寡糖。回收率定义为预处理后的纤维素和木聚糖含量和预处理前的纤维素和木聚糖含量的比值 (干物料)。回收率计算公式如下：

$$\text{Cellulose recovery (\%)} = \frac{DM_2 \times f_{\text{cellulose}2} \times 1.111 + \frac{C_{\text{glu}} \times DM_2}{1000}}{DM_1 \times f_{\text{cellulose}1} \times 1.111} \times 100\% \quad (2-1)$$

Cellulose recovery—纤维素回收率，%；

DM_2 —预处理后干物料质量，g；

$f_{\text{cellulose}2}$ —预处理后干物料纤维素含量，%；

C_{glu} —预处理后游离的葡寡糖和葡萄糖总浓度，g；

DM_1 —预处理前干物料质量，g；

$f_{\text{cellulose}1}$ —预处理前干物料纤维素含量，%。

$$\text{Xylan recovery (\%)} = \frac{DM_2 \times f_{\text{xylan}2} \times 1.111 + \frac{C_{\text{xyl}} \times DM_2}{1000}}{DM_1 \times f_{\text{xylan}1} \times 1.111} \times 100\% \quad (2-2)$$

Xylan recovery—木聚糖回收率，%；

DM_2 —预处理后干物料质量，g；

$f_{\text{xylan}2}$ —预处理后干物料木聚糖含量，%；

C_{xyl} —预处理后游离的寡糖和单糖总浓度，g；

DM_1 —预处理前干物料质量，g；

$f_{\text{xylan}1}$ —预处理前干物料木聚糖含量，%。

预处理秸秆的纤维素直接转化率定义为 72 h 糖化后产生的葡萄糖含量 (扣除物料中含有的游离葡萄糖和寡糖) 与理论上从纤维素转化得到的葡萄糖含量的比值。秸秆的总纤维素转化率定义为预处理后产生的所有葡萄糖 (包括酶解糖化、游离葡萄糖和葡寡糖) 与预处理前秸秆理论上能产生的最大葡萄糖的比值，这个计算过程中将纤维素的损失列入考量，原始纤维素含量是通过预处理后纤维素含量除以纤维素的损失来计算的。计算公式如下：

$$\text{Direct cellulose conversion (\%)} = \frac{C_{glu} \times V - \frac{m \times C_0}{1000}}{m \times f_{cellulose} \times 1.111} \times 100\% \quad (2-3)$$

Direct cellulose conversion—直接纤维素转化率；

m —糖化体系中干物料质量，g；

C_{glu} —预处理后游离的葡寡糖和葡萄糖总浓度，g；

V —糖化体系的液体体积，L；

C_0 —预处理后葡萄糖单糖和寡糖的总量，mg/g DM；

$f_{cellulose}$ —预处理后干物料纤维素含量，%。

$$\text{Overall cellulose conversion (\%)} = \frac{C_{glu} \times V}{\left(m \times f_{cellulose} \times 1.111 + \frac{m \times C_0}{1000} \right) \times \frac{1}{r_{cellulose}}} \times 100\% \quad (2-4)$$

Overall cellulose conversion—纤维素总转化率，%；

m —糖化体系中干物料质量，g；

C_{glu} —预处理后游离的葡寡糖和葡萄糖总浓度，g；

V —糖化体系的液体体积，L；

C_0 —预处理后葡萄糖单糖和寡糖的总量，mg/g DM；

$f_{cellulose}$ —预处理后干物料纤维素含量，%；

$r_{cellulose}$ —预处理后物料的回收率，%。

2.2.7 同步糖化发酵产乙醇评价预处理物料

在利用预处理物料进行同步糖化发酵（Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF）的过程之前，高固体含量预处理过程中会产生较高浓度的抑制物，极大程度地抑制了同步糖化发酵过程中发酵微生物的发酵性能。因此，在同步糖化发酵过程之前，首先利用煤油真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 对预处理秸秆进行生物脱毒，生物脱毒程序严格按照先前本课题组先前报道的脱毒流程^[85]，所有的脱毒过程都在固定的时间内结束。而利用生物脱毒后玉米秸秆的同步糖化发酵过程在 5 L 螺带浆生物反应器中进行^[22]，同步糖化发酵过程的固体含量为 30%（以干物料进行计算），纤维素酶用量 15 FPU/g DM。经过脱毒处理的物料于 115 °C 灭菌 20 min 后待用，SSF 过程中前 12 h 为纤维素酶预酶解过程，过程中保持温度 50 °C、pH 4.8、搅拌转速 150 rpm；预糖化 12 h 后以 10% 接种量（v/v）接入经过驯化的 *S. cerevisiae* DQ1，开始同步糖化发酵，过程中保持温度 37 °C、pH 5.5、搅拌转速 150 rpm，定时取样测定组分，每个条件实验做两个发酵批次作为平行实验，最终发酵数据取自两组数据的平均值。乙醇得率计算采用 Zhang 等^[117]改进的适用于高固含量发酵体系的得率计算公式，该公式中将纤维素水解过程中的水量减少以及发酵醪液的密度改变纳入考虑，能够更加准确地表现高固含量体系乙醇得率。计算公式如下：

$$\text{实际乙醇得率 (\%)} = \frac{[C] \times W}{976.9 - 0.804 \times [C]} \times \frac{1}{0.511 \times f \times [\text{Biomass}] \times m \times 1.111} \times 100\% \quad (2-5)$$

[C]—乙醇浓度, g/L;

W—SSF 体系中的液体体积, L;

f—物料中纤维素含量;

[Biomass]—加入体系的物料质量, g;

m—物料的含水量。

2.2.8 预处理过程的计算流体力学模拟

首先采用 Solid Works 2010 软件做出预处理反应器的模型, 随后采用网格生成工具 ICEM CFD 11.0 软件对反应器模型生成三维网格, 搅拌桨叶采用多参考坐标系模型 (Multiple Reference Frame, MRF)。所有数学模型的处理都是由 CFX 11.0 软件完成, 其中计算过程中的边界条件设定如下: (1) 搅拌桨叶和搅拌轴区域相对于流动区域是静止的; (2) 无壁面边界条件; (3) 残差设定为 1×10^{-4} ; (4) 模拟中采用 Eulerian-Eulerian 模型和 κ - ε 湍流模型。

图 2.3a 和 2.3b 分别显示了反应器的 CFD 网格和几何结构, 其中气体入口是相同的, 将反应器顶盖设定为气体出口, 并且反应器顶盖是完全敞开的。在模拟中, 整个过程假定为气液两相的混合问题, 玉米秸秆被假设为假塑流体, 蒸汽被假设为惰性气体, 假塑流体的表观粘度通过扭矩仪测定, 粘度为 2.31 Pa·S; 气体密度设定为 14.18 g/L, 相当于 3.0 MPa、250 °C 的蒸汽的密度。模拟过程中, 通气量设定为 3 min 内从两个通气口向反应器通入蒸汽 700 g, 根据蒸汽密度计算得到通入通气口的气体线速度为 1.75 m/s。保守气含率作为表征气液两相在不同搅拌过程中的混合情况。

2.2.9 糖类、乙醇以及抑制物检测

糖类、乙醇、糠醛、羟甲基糠醛和乙酸采用装有 Bio-rad Aminex HPX-87H 色谱柱 (300 mm × 7.8 mm) 的高效液相色谱 (LC-20AD 泵, RID-10A 示差折光检测器) 测定, 检测条件: 柱温 65 °C, 流动相为 5 mM 的稀硫酸溶液, 流速 0.6 ml/min, 样品过滤之前都经过 0.22 μm 滤膜过滤。

2.2.10 纤维素和木聚糖含量测定

木质纤维素中纤维素和木聚糖含量根据美国可再生能源实验室 (NREL) 两步酸解方法 (TP-510-42618) 进行测定^[118], 预处理秸秆经过去离子水彻底清洗后, 于 105 °C 烘干 12 h, 通过差重法测定物料中不溶性固含量。称取烘干的物料 100 mg 置于压力试管中, 滴加 1 ml 72% 质量浓度的硫酸溶液, 在 30 °C 下用玻璃棒搅动, 维持 1 h 后, 加去离子水稀释至 29 ml 体系, 即体系酸浓度为 4% 质量浓度, 随后置于 121 °C 反应 1 h。取出反应液后, 用 CaCO₃ 粉末将反应液中和至 pH 值 5~6, 取样离心后用 HPLC 检测葡萄糖和木糖的含量, 再反算回原料纤维素和木聚糖含量。

葡寡糖和木寡糖含量的测定按照美国可再生能源实验室 (NREL) 的标准方法

(TP-510-42623) 进行^[119]。称取 5 g 预处理秸秆, 加入 50 g 去离子水, 摇床 150 rpm 混合 2 h, 随后真空抽滤得到滤液部分, 通过液相色谱测定糖类以及抑制物的浓度。再取出 5 ml 滤液, 加入 1 ml 72% 质量浓度的硫酸溶液, 用去离子水稀释至 29 ml, 相当于酸浓度 4% (w/w), 随后将反应液置于 121 °C 反应 1 h 后, 用 CaCO₃ 粉末将反应液中和至 pH 值 5~6, 取样离心测定葡萄糖和木糖的浓度, 反应前后糖浓度的差值即为葡寡糖和木寡糖含量。

2.3 结果与讨论

2.3.1 高固体含量搅拌浆选择的确立

一些釜式反应器中常用的涡轮搅拌桨、平叶搅拌桨等, 在先前的稀酸预处理的研究中有所采用^[9,10], 但是在这些预处理反应过程中, 木质纤维素固体和稀酸溶液的比例大约在 1:10, 反应体系还是液体状态, 因此这些传统搅拌反应器可以起到良好的搅拌作用; 相反, 在先前 30% 固体含量的同步糖化发酵生产乙醇的研究中, 这些传统搅拌桨已经无法为反应体系提供足够的搅拌混合, 因此, 在本研究的高固体含量的预处理过程中, 其适用性更差。螺杆装置能够将固体物料通过螺旋传送作用, 增强高固含量体系的混合效果, 在木质纤维素加工过程中有所应用, 同时也被列入了美国可再生能源实验室(NREL) 技术报告(TP-5100-47764) 中的稀酸预处理过程^[35,37]。然而, 当传送过程中的物料固含量过高, 紧密的双螺杆结构就无法正常的运行, 本章节在预处理物料的混合研究中, 也测试了双螺杆结构在干式稀酸预处理这样高达 70% 以上固体含量体系中的传送性能, 但由于高固体含量下存在较大阻力, 使得螺杆传送过程中遭到挤压损坏。在测试了框式、锚式以及螺带式搅拌桨的混合效果之后, 本章仍然采用先前应用于高固体含量酶解发酵过程中的螺带式搅拌桨的设计。螺带浆混合原理和螺杆有相似之处, 结构上要比螺杆疏松, 依靠螺带将物料从底部进行传送, 在反应器内的纵向形成连续的流体, 增加体系混合。本章首先通过冷模实验测试了干秸秆和水在螺带搅拌作用下的混合情况, 冷模实验分别在不同尺寸的反应器内进行, 玉米秸秆和水以 1:1 的比例加入到反应器内。根据图 2.1 显示, 在不同规格的反应器内, 当玉米秸秆的含水量最终达到 50% 的时候, 其混合时间大约在 2 到 3 分钟, 本实验得到的正面结果加上之前在 30% 固含量同步糖化发酵的应用实例, 说明螺带搅拌桨可能是适合超高固含量 (>70%) 干式稀酸预处理过程中的搅拌混合装置。因此, 设计开发了用于高固体含量预处理过程的 20 L 螺带搅拌浆反应器 (图 2.2a), 并用于实际预处理过程, 对混合效果以及预处理效率进行测试。

2.3.2 螺带搅拌干式稀酸预处理和静态预处理的对比

在先前的研究中, 预处理过程在 10 L 直筒反应器内进行, 反应器直径 180 mm, 高 400 mm, 通过底部的两个通气口向反应器内通入蒸汽并分散, 由于反应器规模较小, 蒸汽与反应器内的物料能够充分混合。而在本研究中, 预处理反应器的直径由 180 mm 增加到了 260 mm, 反应器体积由 10 L 增加到了 20 L, 但是通气口的数量和大小都和原先反应器保持一致。对于新反应器的这个设计, 其目的是作为一个工业化预处理装置的

缩影, 在工业化规模的反应器中, 很难只依靠通蒸汽就达到良好的混合效果, 而在 10 L 反应器内的预处理研究中, 蒸汽的渗透作用已经能够达到较好的传热效果, 在其中添加螺带搅拌桨显得意义并不明显, 所以本研究中将新反应器的体积放大至 20 L, 模拟预处理放大生产的效果, 验证螺带搅拌桨在干式稀酸预处理中是否真正起到了增强混合、改进预处理效果的作用。

在 10 L 预处理反应器中, 最佳的预处理条件为 190 °C、2.5% 酸用量 (每 100 g 干固体中含有 2.5 g 硫酸)、反应时间 3 min, 而作为对比实验, 新反应器中的预处理也应该将温度调节至 190 °C 进行, 但由于两个预处理反应器都使用了相同的蒸汽发生器 (DZFZ4.5C), 该蒸汽发生器因为不具备持续补水加热的功能, 使其只能为 10 L 反应器供给足够的蒸汽; 当反应器体积增大至 20 L, 则出现了蒸汽供给不足的状况, 造成当反应器内部温度升到 190 °C 的时候, 需要耗费 10 L 反应器两倍以上的高温时间 (大约 20 min 左右), 变相地延长了物料在高温下的反应时间, 降低了过程的对比性。所以本实验中选择了与 10 L 反应器相同升温时间内 (10 min), 20 L 反应器能够达到的最高预处理温度 185 °C, 作为静态预处理中 190 °C 温度条件的对比, 其他条件保持一致, 开展预处理研究以及效率评价。另一方面, 选择 10 L 而不是 20 L 反应器进行静置预处理过程作为对比, 是由于在 20 L 反应器内经过静置预处理反应后, 得到的物料分层现象明显, 位于反应器底部的物料和蒸汽充分接触, 呈现出预处理物料具备的深棕色, 而反应器上部的物料则还是与刚加入反应器内的秸秆相似, 无法反映出预处理物料应有的状态, 缺乏对比性。究其原因, 除了反应器体积的增大弱化了原先的气固混合外, 静态条件下, 反应器中的螺带搅拌桨结构阻碍了蒸汽继续向上的渗透作用。因此该实验中最终选定了四组实验进行对比 (表 2.1 中所示): 条件 (1) 10 L 无搅拌反应器: 190 °C、2.0% 酸用量、3 min 反应时间; 条件 (2) 10 L 无搅拌反应器: 190 °C、2.5% 酸用量、3 min 反应时间; 条件 (3) 20 L 螺带搅拌桨反应器: 185 °C、2.0% 酸用量、3 min 反应时间; 条件 (4) 20 L 螺带搅拌桨反应器: 185 °C、2.5% 酸用量、3 min 反应时间。

从表 2.1 中的数据中可以看出, 螺带搅拌在干式预处理过程中起到了重要的作用, 强化了物料酶解糖化效率的同时, 降低了抑制物的产生。在硫酸用量 2.0%, 反应 3 min 的实验中, 物料酶解后的纤维素转化率从 72.10% (条件 3) 升高至 77.55% (条件 1), 而在 2.5% 硫酸用量、反应 3 min 的实验中, 纤维素转化率由 85.10% (条件 4) 升高到了 87.11% (条件 2)。值得一提的是, 在螺带搅拌桨反应器内, 达到更高转化率时反应温度为 185 °C, 比静置反应中低了 5 °C。在一般的预处理过程中, 降低温度会导致预处理效率的降低^[10,38,111,120,121], 而在本实验中, 开启螺带搅拌的过程, 能在更低的预处理温度下, 预处理秸秆拥有更高的纤维素酶解转化率, 这个结果初步阐明了螺带混合对于预处理过程的促进作用。

另外从表 2.1 还可以看出, 预处理后秸秆中产生的抑制物含量也大幅降低, 同样地, 预处理过程中也存在抑制物含量越高, 预处理后糖化效率越强的规律^[11,12,38,122]。对比条件 1 (螺带搅拌) 和条件 3 (无搅拌) 中得到的物料中三大抑制物——糠醛、羟甲基糠

醛、乙酸的含量,其浓度从条件 3 中的 5.04、2.53、7.65 mg/g DM 降低至条件 1 中的 1.78、0.90、5.78 mg/g DM; 类似地,抑制物浓度从条件 4 (无搅拌) 中的 9.03、2.11、12.10 mg/g DM 降低至条件 2 (螺带搅拌) 中的 6.28、1.75、8.12 mg/g DM。与抑制物含量相对应,较多的葡萄糖、木糖以及其寡糖在含有螺带搅拌作用的预处理过程中得到了保留。这些现象亦体现出了螺带搅拌作用对于预处理效果的促进。

表 2.1 在静置反应器和螺带搅拌反应器中预处理的效果

Table 2.1 Pretreatment performance in the static reactor and in the helically agitated reactor

预处理反应条件 ^a	纤维素转 化率 ^b (%)	抑制物 (mg/g DM)			游离糖 (mg/g DM)			
		糠醛	5-HMF ^c	乙酸	葡萄糖	木糖	葡寡糖	木寡糖
螺带浆搅拌								
185 °C、2.0%、3 min	77.55	1.78	0.90	5.78	4.78	53.37	7.19	84.50
185 °C、2.5%、3 min	87.11	6.28	1.75	8.12	10.14	102.02	11.01	28.44
无搅拌								
190 °C、2.0%、3 min	72.10	5.04	2.53	7.65	8.81	55.79	22.75	75.54
190 °C、2.5%、3 min	85.10	9.03	2.11	12.10	15.84	80.43	15.79	42.86

a—预处理条件中每条分别表示预处理温度、稀硫酸用量和反应时间;

b—酶解糖化实验条件: 5% 固含量、酶用量 15 FPU/g DM、50 °C、pH 4.8、150 rpm、糖化 72 h;

c—5-羟甲基糠醛。

2.3.3 CFD 模拟干式稀酸预处理过程的螺带搅拌混合

螺带搅拌能够为玉米秸秆和蒸汽之间提供良好的混合作用,为预处理反应器中硫酸溶液和预处理温度的均匀分布做出了贡献,因此减少了底部物料的过热和顶部物料的受热不足。为了更清晰地解析螺带搅拌在干式稀酸预处理过程中对于预处理效率的提升,本章采用计算流体力学(CFD)方法模拟螺带搅拌过程中的固体和蒸汽的流动,CFD 模型通过一系列的假定条件进行简化,并应用这个简化的模型对预处理过程中的流体流动做出了模拟。

图 2.3c 显示了在螺带搅拌作用下,蒸汽在罐内的分布(保守气含率表征)情况大幅改善。在静置状态或者低转速条件下(0、10、30 rpm),蒸汽集中于靠近蒸汽入口和反应器壁面非常有限的区域内,随后沿着壁面快速向上渗透,却没有和固体物料充分地接触。而当搅拌转速提升至 50 rpm 后,蒸汽的分布扩充到了固体物料的每一处,继续增加搅拌转速后,蒸汽分布情况与 50 rpm 基本类似。蒸汽分布的 CFD 模拟结果体现出螺带搅拌混合给 20 L 反应器内提供了良好的气液传质作用。

根据图 2.3d 所示,在无搅拌或者低搅拌转速的情况下,固体物料并没有产生有效的流动(用液体速度分布表征),而当搅拌转速逐渐提高后,固体物料的流动性迅速改进,并且在反应器内形成了流体的流动状态,与均匀的蒸汽分布相结合,体现出反应器内更加均匀的流体和蒸汽分布,避免了加热过程中的局部过热现象。另一方面,图 2.3c 和 2.3d

清晰地阐明了在螺带搅拌混合作用下，蒸汽分布和固体流动无需在一个特别高的转速下就可以达到较好的状态，50 rpm 就可以作为一个适合该预处理过程中的转速。

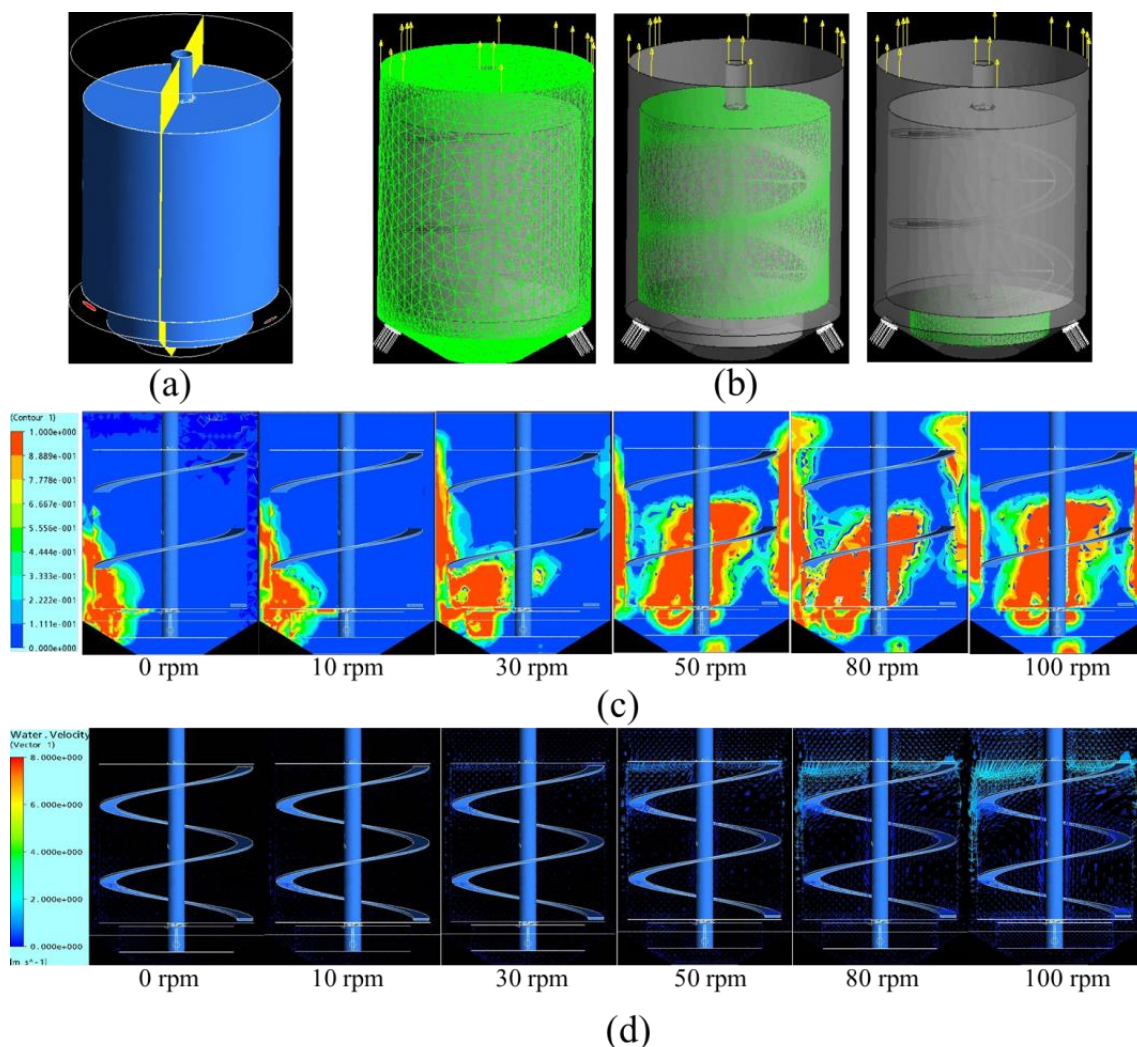


图 2.3 用 CFD 模拟在螺带搅拌浆预处理反应器中蒸汽分布和固体的流动情况

Fig. 2.3 CFD modeling of steam holdup and solids flow in the helically agitated pretreatment reactor (a) 反应器示意图，其中横断面的流动用 CFD 进行模拟；(b) CFD 模型中反应器的几何结构。左，网格单元和结构；中，螺带搅拌桨的动区；右，底部锚式桨的动区；(c) 不同搅拌转速下的保守气含率；(d) 不同搅拌转速下的流体速度分布。在模拟中，预处理秸秆被假设为高粘度液体，其表观粘度为 2.31 Pa·S；热蒸汽被假设为惰性气体，气体流速 1.75 m/s。

虽然 CFD 模型对于预处理反应器中螺带搅拌混合作用只是做了一个简单的模拟，但对于过程混合的促进作用已经通过图 2.3 清晰地表征。由于螺带搅拌混合作用，使蒸汽和固体物料的混合更加均匀，因此过程中用于物料之间渗透传热的蒸汽量减少，使得预处理能够在更低的温度下得到相似甚至更好的预处理效率，这也印证了 2.3.2 中，螺带搅拌预处理过程中，温度降低预处理效果反而更好的现象；另一反面，局部过热现象的消除，也能够减少预处理过程中物料在反应器内的局部过度降解，从而大幅减少抑制物的产生。综合 CFD 模拟结果与增强的预处理效果，说明螺带搅拌在高固体含量的预

处理过程中起到的混合作用，增强了过程中的传质传热，进而增强了预处理的效率。

2.3.4 螺带搅拌预处理反应随条件改变的规律性研究

表 2.2 螺带搅拌干式预处理过程中的纤维素和木聚糖回收

Table 2.2 Glucan and xylan recovery of the dry pretreatment in the helically agitated reactor

预处理条件	纤维素含量 (%)	木聚糖含量 (%)	葡聚糖回收 (%)	木聚糖回收 (%)
未处理秸秆	37.15	19.86		
温度				
165 °C 、2.5%、3 min、50 rpm	38.04	8.57	100.09	94.24
175 °C 、2.5%、3 min、50 rpm	37.23	5.28	96.69	79.32
185 °C 、2.5%、3 min、50 rpm	40.93	2.93	96.50	62.00
酸用量				
185 °C、 1.5% 、3 min、50 rpm	37.71	6.48	92.05	78.89
185 °C、 2.0% 、3 min、50 rpm	37.41	4.16	96.63	74.91
185 °C、 2.5% 、3 min、50 rpm	40.93	2.93	96.50	62.00
185 °C、 3.0% 、3 min、50 rpm	38.48	2.52	73.97	43.18
185 °C、 3.5% 、3 min、50 rpm	36.85	1.79	75.12	36.37
185 °C、 4.0% 、3 min、50 rpm	35.98	1.05	65.53	29.75
反应时间				
185 °C、2.5%、 1 min 、50 rpm	41.52	4.06	92.71	64.08
185 °C、2.5%、 3 min 、50 rpm	40.93	2.93	96.50	62.00
185 °C、2.5%、 5 min 、50 rpm	38.54	2.93	82.78	57.29
185 °C、2.5%、 10 min 、50 rpm	39.29	2.21	76.44	42.96
搅拌转速				
185 °C、2.5%、3 min、 10 rpm	40.23	3.00	84.81	54.03
185 °C、2.5%、3 min、 30 rpm	38.41	2.86	93.20	64.19
185 °C、2.5%、3 min、 50 rpm	40.93	2.93	96.50	62.00

纤维素、木聚糖含量采用两步酸解法测得，葡聚糖和木聚糖回收率按照 2.2.6 回收率计算公式进行计算，表格中黑体字代表有所改变的预处理过程中的条件。

从表 2.2 中可以看出，玉米秸秆的纤维素含量在预处理前后含量变化较小，但是木聚糖含量随着温度的升高和酸用量的增加急剧下降。葡聚糖回收率在不同温度的预处理实验中基本保持恒定，但当酸用量超过 2.5%、反应时间超过 3 min 的条件中，其回收率随着强度的增强而逐渐减少，这个实验结果表明，在目前的预处理反应器中，过高的酸用量和过长的反应时间都不适用，因为在这个强度的预处理条件下，纤维素更容易转化为诸如 5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 这样的降解副产物，造成纤维素的损失。另一方面，由

于木聚糖在稀酸预处理过程中首先被水解，并且容易在高温条件下转化为糠醛，因此木聚糖的回收率相比纤维素回收而言要低，并且随着温度的升高、酸用量的增强、反应时间的延长而逐渐降低，符合稀酸预处理过程的一般趋势。

表 2.3 在螺旋带搅拌预处理过程中反应条件对于抑制物和糖类含量的影响

Table 2.3 Impact of the operation parameters on the inhibitor and sugar level of the dry pretreatment in the helically agitated reactor

条件	抑制物 (mg/g DM) ^a				游离糖 (mg/g DM) ^a		
	糠醛	5-HMF ^b	乙酸	葡萄糖	木糖	葡寡糖	木寡糖
温度 (2.5%酸用量、3 min 反应时间、50 rpm 搅拌转速)							
165°C	1.35	0.34	4.50	4.33	75.78	9.42	92.85
175°C	1.86	0.60	0.55	6.05	100.52	7.82	64.19
185°C	6.28	1.75	0.81	10.14	102.02	11.01	28.44
酸用量 (185 °C、3 min 反应时间、50 rpm 搅拌转速)							
1.5%	0.82	0.35	5.94	4.55	23.4	7.19	110.21
2.0%	1.78	0.90	5.78	4.78	53.4	7.72	84.49
2.5%	6.28	1.75	8.12	10.14	102.02	11.01	28.44
3.0%	8.91	2.98	12.87	24.13	99.91	3.90	8.06
3.5%	7.91	3.67	12.42	20.70	78.47	4.45	8.01
4.0%	8.42	4.14	12.16	35.08	83.39	4.27	4.46
反应时间 (185 °C、2.5%酸用量、50 rpm 搅拌转速)							
1 min	3.90	1.20	7.29	7.92	97.90	9.00	25.59
3 min	6.28	1.75	8.12	10.21	102.02	10.94	28.44
5 min	8.02	2.72	10.91	12.08	79.13	9.61	13.53
10 min	9.94	3.00	11.26	11.67	62.66	6.88	3.71
搅拌转速 (185 °C、2.5%酸用量、3 min 反应时间)							
10 rpm	5.88	1.81	8.03	9.88	106.54	4.92	15.29
30 rpm	5.23	1.92	7.86	9.68	105.78	7.80	20.42
50 rpm	6.28	1.75	0.81	10.21	102.02	10.94	28.44

表中预处理条件为温度、酸用量、反应时间和搅拌转速。

a—单位表示每 g 干秸秆中所含的组分含量；

b—5-羟甲基糠醛

从表 2.3 中可以看出，那些典型的抑制物糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸的浓度随着预处理强度的增强（升高温度、增加酸用量和延长反应时间）而升高，游离的葡萄糖亦随着预处理强度加大而增多，对应着葡寡糖含量的降低；木糖含量随着预处理强度的增强而升高，但随着强度继续增强而降低，对应着不断升高的糠醛浓度，说明木糖和木寡糖

在高温以及稀酸催化条件下容易继续转化生成副产物糠醛。从表 2.2 和 2.3 中的数据看出，在现有的预处理条件下，木聚糖的过度降解仍然很剧烈，而预处理条件的优化必需要考虑到纤维素、半纤维素的损失，抑制物的产生以及纤维素的转化率，而不是只考虑葡萄糖的得率，因此强度较大的几个预处理条件并非最优。

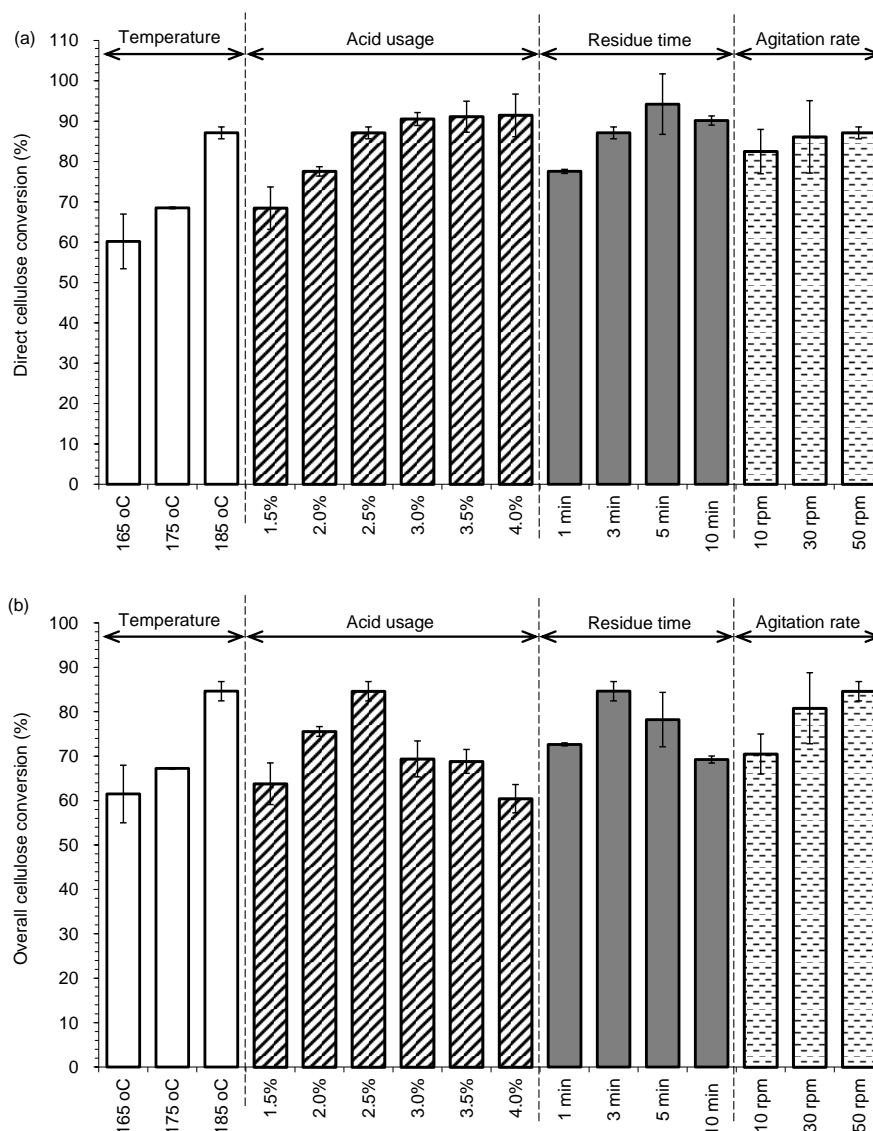


图 2.4 通过纤维素酶解转化率评价螺旋式搅拌干式预处理

Fig. 2.4 Enzymatic hydrolysis assay of the pretreatment parameters in the helically agitated reactor

(a) 预处理秸秆的直接纤维素转化率；(b) 预处理秸秆纤维素总转化率。预处理条件：改变温度，保持 2.5% 酸用量、3 min 反应时间、50 rpm 搅拌转速；改变酸用量，保持 185 °C、3 min 反应时间、50 rpm 搅拌转速；改变反应时间，保持 185 °C、2.5% 酸用量、50 rpm 搅拌转速；改变搅拌转速，保持 185 °C、2.5% 酸用量、3 min 反应时间。所有酶解过程都在如下条件进行：5% 固含量、纤维素酶用量 15 FPU/g DM、50 °C、pH 4.8、150 rpm。

图 2.4a 为预处理后物料酶解糖化后的直接纤维素转化率，图 2.4b 为预处理后物料酶解糖化后的纤维素总转化率，该计算方法中考虑到了纤维素的损失。从图 2.4a 中可以

看出, 酶解糖化后的纤维素转化率随着温度的升高、酸用量的增加、反应时间的延长而升高, 符合稀酸预处理过程的一般趋势。不同酸用量下, 直接纤维素转化率随着酸用量的增加而迅速提升, 当酸用量进一步增加至 3.0% 以上后, 纤维素转化率基本保持恒定, 随着反应时间的延长, 纤维素转化率也有同样的变化趋势。当酸用量增大到 2.5% 时, 纤维素总转化率随着酸用量的增大而提高, 而当酸用量进一步增加后, 纤维素总转化率开始下降, 该现象主要是由于酸用量的增大造成了纤维素更多地向 5-羟甲基糠醛转化, 使物料中纤维素的总量减少, 进而减少了糖化后的总转化率, 同样的现象在不同反应时间的实验中亦可观察到。直接纤维素转化率随着搅拌转速的增加而小幅度增加, 结果与 CFD 模拟不同转速的结果相类似, 但纤维素总转化率却随着搅拌转速的增大而大幅增加, 造成该现象原因如下: 在 20 L 的反应器中, 为了保证反应器的气密性良好, 采用了电磁搅拌机对螺带桨进行驱动, 增加了电磁搅拌机后, 使原本通过拆卸反应器取出物料的方式无法在该反应器中实施, 因此预处理物料只能通过螺带搅拌桨和扫底桨的搅拌作用从反应器中带出。低搅拌转速的过程使物料无法被充分带出, 造成了一定量的纤维素损失, 对应地, 从表 2.2 数据中也显示出, 纤维素和半纤维素回收率随着搅拌转速的降低有所降低。

在螺带搅拌预处理过程中, 其组分降解、抑制物生成以及酶解糖化效率等参数, 其随着预处理条件改变的变化趋势与大部分稀酸预处理过程相类似^[11,12,38,122]。经过初步的预处理条件探究实验后, 得到适用于螺带搅拌预处理的反应条件——185 °C、2.5% 酸用量、3 min 反应时间和 50 rpm 搅拌转速, 该条件下的预处理物料酶解糖化后的纤维素总转化率达到 83.09%, 为本批次实验中最高。

2.3.5 预处理秸秆同步糖化发酵生产乙醇

本节研究中将预处理秸秆应用于同步糖化发酵生产乙醇的过程中, 对螺带搅拌预处理效率的促进作用进行评价, 发酵原料分别取自螺带搅拌预处理过程制备的秸秆(条件: 185 °C、2.5% 酸用量、3 min 反应时间、50 rpm 搅拌转速) 和静态预处理过程中最优条件下制备的秸秆(190 °C、2.5% 酸用量、3 min 反应时间)。秸秆原料在发酵之前都经过生物脱毒处理直至糠醛和羟甲基糠醛被完全降解, 生物脱毒过程中保留了大部分的纤维素。同步糖化发酵过程固含量 30%, 纤维素酶用量 15 FPU/g DM, 具体发酵过程的糖耗和乙醇生产如图 2.5 所示。

如图 2.5 所示, 经过 12 h 预糖化后, 螺带搅拌预处理过程得到的秸秆在 12 h 时产生了 81.92 g/L 的葡萄糖, 相比于静置预处理得到的秸秆糖化产生的葡萄糖(55.87 g/L), 增幅大约为 47%, 预糖化的结果也说明了螺带搅拌预处理过程的高效率, 而乙醇发酵结果同样显示出了螺带搅拌预处理过程的高效率, 经过后续 48 h 的同步糖化发酵过程, 螺带搅拌预处理过程得到的玉米秸秆能够生产 56.20 g/L 的乙醇, 在同一发酵条件下, 静置预处理过程得到的玉米秸秆只生产了 44.44 g/L 的乙醇。螺带搅拌预处理得到的玉米秸秆, 其经过同步糖化发酵过程后, 从纤维素转化为乙醇的得率达到了 69.43%, 静置预处理过程得到的秸秆, 生产乙醇的得率为 59.14%。相比之下, 在螺带搅拌预处理秸

秆生产乙醇的过程中，其乙醇浓度和得率比起静置预处理的秸秆分别增加了 26.5% 和 17.4%，这些结果都充分说明了螺带搅拌混合在干式预处理过程中起到的促进作用。本章节中开发应用的螺带搅拌浆预处理反应器，在无废水排放、低糖损失的干式预处理过程中表现出的优良混合作用，进一步降低预处理过程抑制物的产生、减少蒸汽用量，为干式预处理的工业化过程提供了理想的反应器原形。

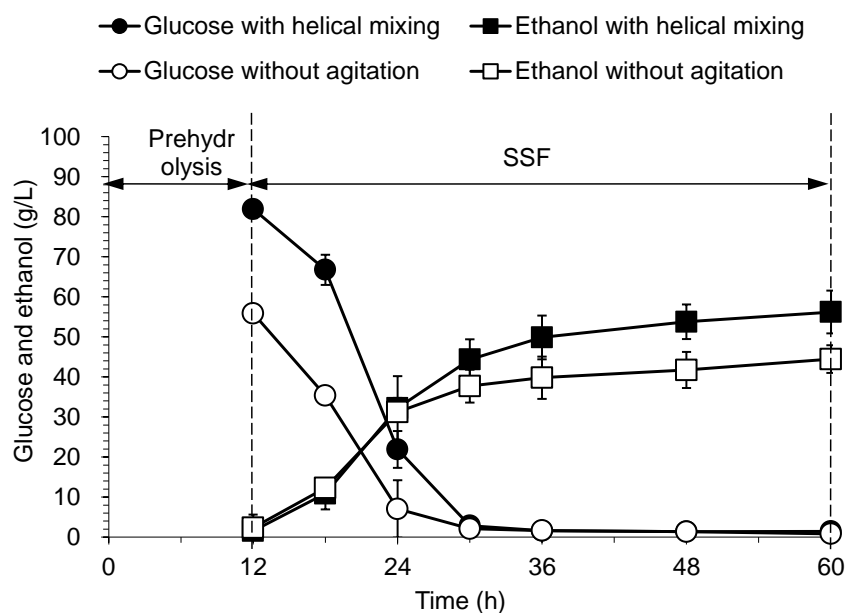


图 2.5 预处理秸秆同步糖化发酵生产乙醇

Fig. 2.5 SSF for ethanol production using pretreated corn stover as feedstock

预处理秸秆分别取自在螺带搅拌浆反应器内的预处理秸秆（185 °C、2.5%、3 min、50 rpm）和静置反应器内的预处理秸秆（190 °C、2.5%、3 min）。SSF 条件：30% 固含量、15 FPU/g DM 酶用量，预糖化过程中温度 50 °C、pH 4.8，预糖化 12 h 后以 10%（v/v）接种量接入驯化后的 *S. cerevisiae* DQ1 种子液，开始 SSF，过程中温度 37 °C、pH 5.5。

2.4 本章小结

本章重点关注了干式稀酸预处理在工业规模尺度反应器内传质传热不足的问题，通过比较不同搅拌桨在高固体含量体系中的混合能力，选定螺带搅拌桨作为干式稀酸预处理过程的搅拌装置，并开发放大规模的 20 L 预处理反应器，进行预处理研究，保证预处理效率的同时，降低抑制物的生成，不仅向后续生物脱毒以及乙醇发酵提供了更加优越的预处理原料，也为工业化预处理过程提供了良好的反应器设计原型。本章得到的主要结论如下：

- 1) 在不同尺度的冷模反应器中，用螺带搅拌桨处理 50% 固含量的干秸秆和水的混合体系，体系混匀所需的混合时间只需要 2~3 min，说明螺带搅拌桨除了在酶解发酵过程中表现出优良的混合效果之外，还能够处理完全由固体填充的反应体系。将螺带搅拌桨运用于模拟工业化装置的 20 L 反应器之中，开发了螺带搅拌桨预处理反应器。

- 2) 在实施干式稀酸预处理的过程中，分别对比了螺带搅拌式预处理过程和静置预处理过程的预处理效果，结果表明在两个过程最优的预处理条件下，螺带搅拌预处理过程在反应温度降低 5 °C (185 °C) 的条件下，获得了更高的酶解糖化效率（纤维素转化率 87.11%）和乙醇得率（69.43%），大幅减少了预处理过程中抑制物的产生。温度的降低还有利于蒸汽用量的减少，降低连续生产过程中的能量投入。
- 3) 通过 CFD 模拟预处理过程的结果显示，螺带搅拌作用大幅增强了预处理反应过程中蒸汽与固体之间的混合传质，使蒸汽分布更加均匀。同时，秸秆在搅拌作用下，在反应器内形成流体运动，相比没有搅拌的过程，反应器内汽固之间的传质传热更加均匀。螺带搅拌桨在干式预处理过程中的运用，有效解决了干式预处理在工业化装置中的传质传热问题，该反应器的开发和应用，为纤维乙醇商业化生产中高固体含量预处理过程供了良好的反应器设计原型。

第 3 章 无需预浸的干式稀酸预处理过程生产纤维乙醇

3.1 引言

在木质纤维素预处理过程中, 通过将生物质原料预浸于液体催化剂中, 以增强木质纤维素的预处理效率, 已经成为了大部分预处理过程中一个固定的步骤^[110]。在造纸工业中, 木质纤维素向纸浆的转化之前, 都需要经过液体催化剂的预浸^[123]。而在纤维乙醇的生产过程中, 采用不同的化学催化剂如稀酸溶液^[12,124]、碱溶液^[125]、过氧化氢^[126]、液氨^[127]、二氧化硫^[128]等对原料进行预浸, 也逐渐成为预处理过程中的一个必不可少的操作。长时间预浸可以使化学催化剂充分渗透到木质纤维素的内部结构和孔径中, 渗透到物料内部的催化剂在低温下亦可起到部分水解的作用, 将纤维素和半纤维素分别转化为葡寡糖和木寡糖, 如此可以增强预处理过程中液体催化剂和木质纤维素之间的混合传质, 从而加强预处理的效率。

在传统的稀酸预处理过程中, 木质纤维素原料以固液比 1:10 的比例预浸于大量的稀酸溶液中, 随后将预浸后的固液混合物用于高温 (160-220 °C) 预处理过程中^[8]。而本课题组为克服预处理过程中大量的用水投入, 于 2011 年开发了低用水投入、无废水排放的干式稀酸预处理过程 (Dry dilute acid pretreatment)^[38]。在干式稀酸预处理过程中, 固体秸秆和稀硫酸溶液以固液比 2:1 进行混合预浸, 之后再进入预处理工序, 因此进出反应的物料都是没有游离水存在的固体。由于玉米秸秆能够快速吸收加入其中的稀硫酸溶液, 使得稀硫酸与固体间的混合和传质不足, 所以干式稀酸预处理的预浸过程不仅需要彻底地搅拌混合后, 还需要一个较长的周期 (过夜), 加强稀酸向木质纤维素的渗透作用。然而, 物料的预浸过程在工业化生产中却成了一大困难, 因为这个过程要求配备额外的物料传送、储存罐以及搅拌混合装置, 直接增加了预处理中的设备投入, 将预浸操作从预处理过程中去除是预处理的最理想模式。

在上一章节中, 螺带搅拌式预处理反应器被开发应用, 不仅有效地促进了高固含量下固体秸秆和液体的混合, 还大幅促进了预处理过程中玉米秸秆和蒸汽的传热作用。在此基础上, 本节的研究主旨在于尝试将预浸步骤从预处理过程中去除, 玉米秸秆原料和稀硫酸溶液并流加入螺带搅拌浆预处理反应器中, 没有预浸步骤, 直接进行高温预处理。结果显示, 将没有经过预浸的预处理秸秆用于酶解糖化评价以及同步糖化发酵生产乙醇后, 得到了与经过长时间预浸后预处理秸秆基本相同的纤维素转化率, 而乙醇得率略有提高。这些结果也为大型预处理反应器内实施无预浸的干式稀酸预处理提供了有力的依据, 也为未来纤维乙醇的商业化生产节省了设备投入、简化了过程操作。

3.2 材料与方法

3.2.1 原料与试剂

玉米秸秆产自河南新乡,收获于 2011 年秋季,玉米秸秆经过水洗除尘后,置于 105 °C 烘干至恒重,烘干后含水量约为 7%。随后将干秸秆经过锤式粉碎机粉碎成尺寸为 10 mm 的颗粒,密封待用。纤维素酶 Youtell 6#是由湖南尤特尔生化有限公司(湖南岳阳)提供,固体纤维素酶呈颗粒状,其滤纸酶活为 135 FPU/g,纤维二糖酶活为 344 CBU/g,纤维素酶蛋白含量 90 mg/g。

脱毒菌种 *Amorphotheca resinae* ZN1 CGMCC 7452 用于预处理后玉米秸秆中抑制物的降解,种子培养以及脱毒步骤同 2.2.2。

发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 CGMCC 2528 用于乙醇发酵过程。*S. cerevisiae* DQ1 首先在合成培养基(配方同 2.2.2)中活化后,转接入不添加葡萄糖的玉米秸秆水解液中进行短期驯化后作为发酵种子。

3.2.2 预处理反应器和预处理操作

预处理反应器是第 2 章中所使用的螺带搅拌桨预处理反应器,是 20 L 直筒反应器(直径 260 mm,高 400 mm),螺带桨通过安装在反应器顶部的电机以及电磁转化装置驱动的,预处理操作同 2.2.5。预处理条件固定在 185 °C、2.5%硫酸用量(每 100 g 秸秆中含有 2.5 g 硫酸)、反应时间 3 min,搅拌转速 50 rpm,作为对照组实验中的预处理过程中,反应器搅拌转速设为 0 rpm,而预处理实验中设定的两组条件分别为经过稀硫酸溶液预浸和不经过预浸。

预浸操作中,700 g 5%质量浓度的稀硫酸溶液加入到 1400 g 干玉米秸秆,充分混合后密封于塑料袋中,在室温下(18~25 °C)放置 0.5、12、24 h,随后将预浸后的物料投入预处理反应器中进行高温预处理过程。无预浸预处理过程中,1400 g 干秸秆和 700 g 稀硫酸溶液并流加入螺带桨预处理反应器中,加料的同时设定搅拌转速 50 rpm,搅拌 3 min,没有额外的预浸操作。预处理结果的糖化评价参照美国可再生能源实验室(NREL)标准实验方法^[116]并稍作修改,糖化方法参见本章 2.2.6,糖化后纤维素转化率采用本文公式(2-3)进行计算。

3.2.3 同步糖化发酵生产乙醇(SSF)

在预处理秸秆进行同步糖化发酵的过程之前,首先利用丝状真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 对预处理秸秆进行生物脱毒,直至主要抑制物被完全降解后结束脱毒。而利用生物脱毒后玉米秸秆的 SSF 过程在 5 L 螺带桨生物反应器中进行^[22]。SSF 过程的固体含量为 25%(以干物料进行计算),纤维素酶用量 15 FPU/g DM。同步糖化发酵过程操作同 2.2.7,乙醇得率采用本文中公式(2-5)进行计算。

3.2.4 纤维素和木聚糖测定

木质纤维素中纤维素和木聚糖含量通过两步酸解方法进行测定,方法同 2.2.10,可

溶性组分以及葡寡糖和木寡糖测定方法同 2.2.10。

3.2.5 糖类、乙醇以及抑制物检测

糖类、乙醇和抑制物采用装有 Bio-rad Aminex HPX-87H (300 mm×7.8 mm) 色谱柱的高效液相色谱 (LC-20AD 泵, RID-10A 示差折光检测器) 测定, 检测条件: 柱温 65 °C, 流动相为 5 mM 的稀硫酸溶液, 流速 0.6 ml/min, 样品过滤之前都经过 0.22 μm 滤膜过滤。

3.3 结果与讨论

3.3.1 预浸对螺带搅拌预处理过程的影响

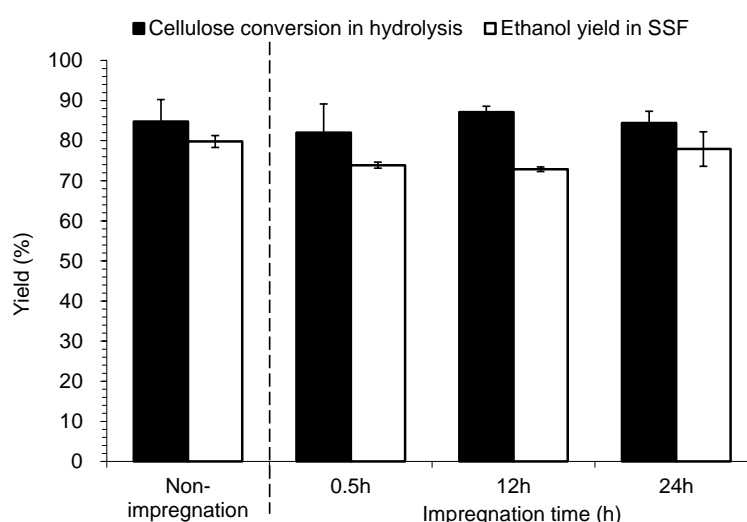


图 3.1 螺带搅拌干式稀酸预处理后, 不同预浸条件下预处理物料的酶解纤维素转化率和乙醇得率

Fig. 3.1 Cellulose conversion after enzymatic hydrolysis and ethanol yield in SSF using dry dilute acid pretreated corn stover with different impregnation conditions under helically agitation

酶解糖化实验条件: 5% 固含量、酶用量 15 FPU/g DM、50 °C、pH 4.8、150 rpm、糖化 72 h; SSF 过程前, 预处理秸秆首先经过生物脱毒去除抑制物。同步糖化发酵实验条件: 25% 固含量、15 FPU/g DM 酶用量, 预糖化过程中温度 50 °C、pH 4.8, 预糖化 12 h 后以 10% (v/v) 接种量接入驯化后的 *S. cerevisiae* DQ1 种子液, 开始同步糖化发酵, 过程中温度 37 °C、pH 5.5。

本节研究了预浸过程对螺带搅拌干式稀酸预处理 (固液比 2:1) 效率的影响。图 3.1 显示了经过不同预浸条件的预处理秸秆酶解糖化 72 h 后的纤维素转化率和 72 h 的乙醇发酵得率。使用不预浸的预处理过程得到的秸秆, 其糖化后纤维素转化率达到 84.77%, 经过 0.5 h、12 h 和 24 h 预浸后预处理得到的秸秆, 其糖化后纤维素转化率分别达到了 82.00%、87.11% 和 84.43%, 都达到了理想的预处理效果, 该实验结果说明在预浸和不预浸的预处理秸秆之间, 酶解糖化后纤维素转化率基本相似。图 3.1 同样也说明了在螺带搅拌作用下, 预浸不同时间的预处理秸秆进行糖化过程中, 纤维素转化率随着预浸时间的延长变化不大。

为了进一步评价预浸对于预处理效果的影响,不同预浸条件的玉米秸秆被用作 25% 固体含量下同步糖化发酵生产乙醇的原料。图 3.1 中不预浸的预处理秸秆经过 72 h 的同步糖化发酵后,乙醇得率达到了 79.80%,而预浸 0.5 h、12 h、24 h 的预处理秸秆经过发酵后,72 h 达到的乙醇得率分别为 73.87%、72.88%、77.92%,相比而言,不预浸的原料的乙醇得率略高于经过预浸的原料。纤维素转化率和乙醇得率的结果表明,经过预浸的秸秆与不预浸的秸秆预处理效果类似。

表 3.1 和 3.2 分别列出了玉米秸秆在预处理前后的不溶性组分和可溶性组分的变化。从表 3.1 中可以看出,预处理前未经预浸的玉米秸秆,其纤维素含量和原始秸秆基本相同,而随着稀硫酸预浸秸秆时间的延长,纤维素含量略有升高,从未经预浸秸秆中的 37.46%,增加至预浸 0.5 h、12 h 和 24 h 秸秆中的 37.67%、37.71% 和 38.38%,而木聚糖含量则略有降低(20.92%、20.14%、20.88%、20.84%),说明在预浸过程中,稀酸对于纤维素和半纤维素的水解能力非常有限。

表 3.1 干式稀酸预处理前后秸秆中不溶性组分的测定

Table 3.1 Composition of the insoluble components of corn stover during the dry dilute acid pretreatment

	纤维素含量 (%)	木聚糖含量 (%)	纤维素转化 率 (%)	乙醇得率 (%)
未处理秸秆	37.15	19.86		
预处理前秸秆				
不预浸	37.46	20.92	\	\
预浸 0.5 h	37.67	20.14	\	\
预浸 12 h	37.71	20.88	\	\
预浸 24 h	38.38	20.84	\	\
预处理后秸秆				
不预浸	39.02	2.66	84.77	79.80
预浸 0.5 h	40.17	2.33	82.00	73.87
预浸 12 h	40.93	2.93	87.11	72.88
预浸 24 h	39.17	2.90	84.43	77.92

“原始秸秆”是指未经过稀硫酸预浸的秸秆,“不预浸预处理前秸秆”是指秸秆中加入稀硫酸后,没有经过预浸步骤,直接进行各参数测定。

从表 3.2 中看出,预处理前秸秆中可溶性组分的浓度(葡萄糖、木糖、乙酸和寡糖)随着预浸时间的延长而有所增加,其中葡萄糖和木糖含量的增幅要比其他组分略大一些;乙酸随着预浸时间的延长含量有微小的提升。这些结果说明稀硫酸预浸时间的延长能够小幅度地增加玉米秸秆的预水解,但是这些微小的组分含量差距在预处理后基本都不再体现:不预浸的预处理秸秆纤维素含量为 39.02%,预浸 0.5 h、12 h 和 24 h 的预处理秸

表 3.2 预处理前和预处理后秸秆中可溶性组分的测定

Table 3.2 Composition of the soluble components of corn stover before and after pretreatment

	葡萄糖 (mg/g DM)	木糖 (mg/g DM)	乙酸 (mg/g DM)	糠醛 (mg/g DM)	5-HMF ^a (mg/g DM)	葡寡糖 (mg/g DM)	木寡糖 (mg/g DM)
预处理前秸秆							
不预浸	0.13	0.11	0.42	0.00	0.00	0.45	1.01
预浸 0.5 h	0.14	0.40	0.57	0.00	0.00	0.87	1.09
预浸 12 h	0.82	0.53	0.56	0.00	0.00	1.22	1.42
预浸 24 h	0.37	0.39	0.59	0.00	0.00	1.57	1.69
预处理后秸秆							
不预浸	13.51	98.29	10.43	5.68	2.25	7.40	24.21
预浸 0.5 h	14.22	95.76	9.82	6.57	2.26	8.06	18.73
预浸 12 h	10.10	101.75	9.10	6.28	1.75	11.04	28.65
预浸 24 h	10.71	94.76	9.22	5.15	1.83	16.44	27.22

玉米秸秆预处理条件：185 °C、2.5%酸用量、3 min 反应时间、50 rpm 搅拌转速。浓度单位被定义为每克干秸秆中含有几毫克物质。

a—5-羟甲基糠醛

秆的纤维素含量分别为 40.17%、40.93%、39.17%，没有特别大的差异；木聚糖含量也同样没有体现出较大差异，预处理后分别达到了 2.66%（不预浸）、2.33%（预浸 0.5 h）、2.93%（预浸 12 h）和 2.90%（预浸 24 h）。而在预处理后秸秆的可溶性组分（葡萄糖、木糖、乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛、葡寡糖、木寡糖）数据的比较中（表 3.2），其含量随着预浸时间的延长也未呈现出明显增加或降低的趋势，说明在螺带搅拌反应器中，预浸时间对后续预处理的影响较小。图 3.1、表 3.1 和 3.2 的结果显示，不经过稀硫酸预浸的预处理过程（秸秆与稀硫酸溶液同时加入螺带搅拌浆预处理反应器中），预处理后物料的酶解糖化性能与预浸后的基本相似，而乙醇得率略有提升，并且预处理后的组分含量与经过长时间预浸（12 h 或 24 h）的秸秆基本相同。在先前的文献报道中，Sorensen 等^[124]研究了稀酸预浸芒草对预处理效率的影响，结果表明随着预浸时间的延长，稀酸预处理效率增加；而本节中，不预浸和预浸 12 h 以上的秸秆表现出了基本相似的预处理效果。对比两个过程，本过程采用了搅拌式反应器，增强了预处理过程中的混合，改进了稀硫酸和玉米秸秆之间的传质传热，因此预处理前无需经过预浸步骤，即可达到与预浸后类似的预处理效果。

3.3.2 预浸对无搅拌预处理过程的影响

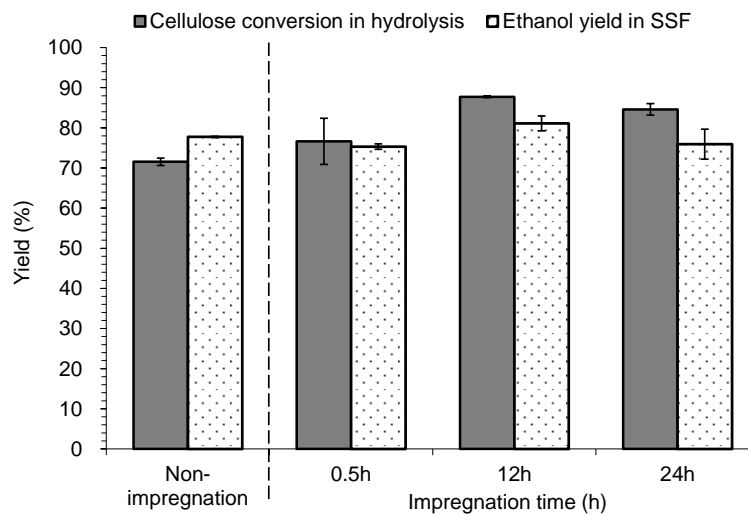


图 3.2 静态预处理条件下，不同预浸时间的预处理秸秆的纤维素转化率和乙醇得率

Fig. 3.2 Cellulose conversion after enzymatic hydrolysis and ethanol yield in SSF using dry dilute acid pretreated corn stover with different impregnation conditions under static state

酶解糖化实验条件：5% 固含量、酶用量 15 FPU/g DM、50 °C、pH 4.8、150 rpm、糖化 72 h；SSF 过程前，预处理秸秆首先经过生物脱毒去除抑制物。同步糖化发酵实验条件：25% 固含量、15 FPU/g DM 酶用量，预糖化过程中温度 50 °C、pH 4.8，预糖化 12 h 后以 10% (v/v) 接种量接入驯化后的 *S. cerevisiae* DQ1 种子液，开始同步糖化发酵，过程中温度 37 °C、pH 5.5。

上一节中证明了在带有螺带搅拌的预处理过程中，预浸过程对于干式稀酸预处理影响并不大，本节则研究了预浸对静态预处理过程的影响。由于 20 L 反应器在不开搅拌的预处理过程中会出现底部和顶部物料受热不均的现象（2.3.2 章），因此本节没有搅拌

的预处理对照实验中，预处理后只取预处理反应器底部的物料进行评价。图 3.2 中，不预浸的预处理秸秆，酶解糖化后纤维素转化率为 71.56%，而经过 12 h 预浸的预处理秸秆的转化率达到 87.74%，不预浸的过程比预浸 12 h 的过程低了大约 23%。不预浸、预浸 0.5 h、12 h 和 24 h 的秸秆预处理后纤维素转化率分别达到了 71.56%、76.68%、87.74% 和 84.48%，随着预浸时间的延长而有所增加，但预浸时间超过 12 h 后基本持平。该实验清晰地显示出了在静态的预处理过程中，预浸和不预浸的预处理秸秆之间存在的巨大差距，说明了预浸在静置预处理过程中的重要性。与 Sorensen 等^[124]的研究结果一致，经过 12 h 以上的预浸后，使稀硫酸在秸秆中充分传质，增强了无搅拌预处理过程中的催化效率，进而增强了预处理效率。另一方面，在同步糖化发酵过程的乙醇得率来看，四个预处理条件得到的秸秆分别达到了 77.76%、76.03%、81.11% 和 76.32%，比起酶解预处理转化率而言相差并不大，乙醇同步糖化发酵过程中菌体对于酶解后葡萄糖的迅速利用，使酶解反应进一步向生成葡萄糖的方向进行，使发酵过程得到了促进。

3.3.3 经过不同预浸方式的预处理秸秆同步糖化发酵生产乙醇

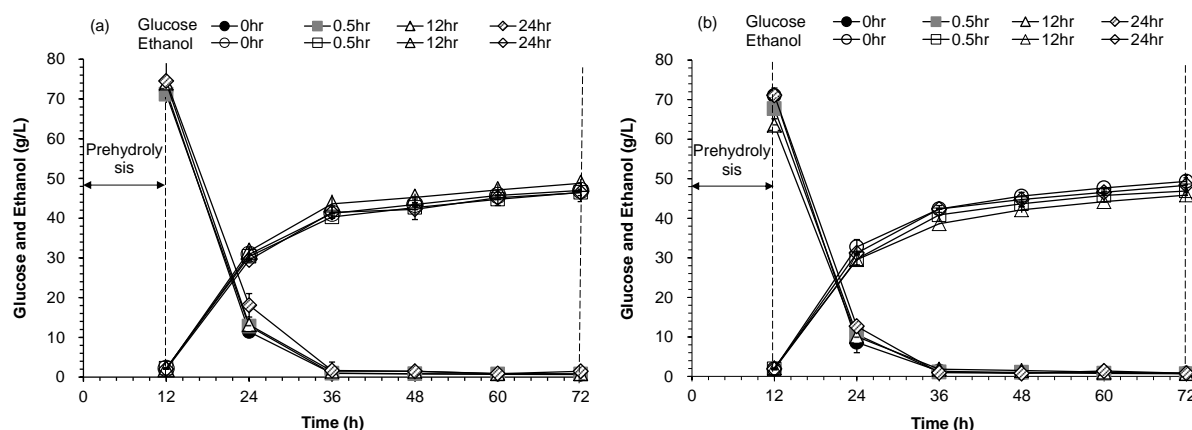


图 3.3 不同预处理操作模式下，预浸和不预浸的预处理秸秆同步糖化发酵生产乙醇

Fig. 3.3 SSF performance using the pretreated CS under different impregnation conditions

(a) 不搅拌的预处理过程；(b) 螺带搅拌混合的预处理过程。预处理秸秆首先经过生物脱毒去除抑制物，随后进入 SSF 过程。SSF 实验条件：25% 固含量、15 FPU/g DM 酶用量，预糖化过程中温度 50 °C、pH 4.8，预糖化 12 h 后以 10% (v/v) 接种量接入驯化后的 *S. cerevisiae* DQ1 种子液，开始 SSF，过程中温度 37 °C、pH 5.5。

本节阐述了在不同预浸模式下预处理秸秆经过同步糖化发酵生产乙醇的影响，如图 3.3 所示。图 3.3a 中，静态预处理过程中，不同预浸时间的预处理秸秆发酵生产乙醇浓度分别达到了 46.99 g/L（不预浸）、46.50 g/L（预浸 0.5 h）、48.78 g/L（预浸 12 h）、48.08 g/L（预浸 24 h），乙醇得率达到了 77.66%、75.32%、81.11% 和 75.95%，相比于酶解糖化过程，预浸时间对于同步糖化发酵过程似乎并没有产生特别大的影响，该现象是由于同步糖化发酵过程中微生物快速利用葡萄糖，促使酶解过程能向生成葡萄糖的方向继续进行，因此最终在不同预浸条件下得到了相类似的乙醇得率。在螺带搅拌预处理秸秆的

同步糖化发酵过程中观察到 (图 3.2b), 不同预浸条件下, 发酵后最终乙醇浓度分别达到了 49.34 g/L (不预浸)、46.91 g/L (预浸 0.5 h)、46.11 g/L (预浸 12 h)、48.36 g/L (预浸 24 h), 乙醇得率分别达到了 79.80%、73.87%、72.88% 和 77.92%。和纤维素酶解糖化得率相似, 在螺带搅拌预处理过程中, 预浸时间的长短并不影响乙醇的发酵过程, 甚至没有预浸的秸秆较预浸后的秸秆乙醇浓度略高一些。产生该现象的原因在于不预浸的预处理批次中, 玉米秸秆和稀硫酸溶液并流加入反应器后, 经过了 50 rpm、3 min 的搅拌混合作用。在第二章中已经阐明, 螺带搅拌桨可以在 2-3 min 内即可混匀玉米秸秆和水溶液的混合体系, 因此 3 min 的搅拌混合极大程度促进了稀硫酸在玉米秸秆之间的传质作用, 使其相当或者甚至优于 12 小时以上的预浸操作起到的传质混合作用。

3.4 本章小结

本章节重点关注了长期以来被研究者认为是预处理过程中必不可少的预浸步骤, 研究其在螺带搅拌预处理过程中对预处理效果的影响。结果表明螺带搅拌作用很好地促进了预处理过程中稀酸溶液和玉米秸秆的混合传质, 取代了长时间预浸步骤, 缩短了预处理周期, 做到了工业化过程中最理想的无预浸预处理模式。本章研究内容得到的主要结论如下:

- 1) 在螺带搅拌作用下, 不预浸的干式稀酸预处理效率与长时间预浸的预处理效率基本一致。无预浸的预处理秸秆经过酶解糖化后, 纤维素转化率达到 84.77%, 与长时间预浸预处理过程得到的结果基本类似; 而在后续高固体含量 (25%) 同步糖化发酵过程中, 乙醇得率达到 79.80%, 略优于 12 h 预浸的预处理。该结果说明预浸步骤可以从预处理过程中去除。
- 2) 在没有搅拌的静态预处理过程中, 不经过预浸的预处理过程相比长时间预浸过程, 其效率明显降低。说明在静态预处理过程中, 预浸起到了重要的传质作用, 同时也更加凸显出螺带搅拌混合作用对于少量稀酸溶液和大量干秸秆在混合传质方面的促进作用。
- 3) 本章研究内容提供的无需预浸的预处理技术, 简化了预处理的操作工序, 缩短了预处理过程的周期。同时减少了工业化过程中由预浸操作带来的物料储存、传输以及反应器腐蚀等问题, 增加了预处理技术在工业化过程中的实用性和经济性。

第 4 章 灰分脱除对于稀酸预处理的促进作用

4.1 引言

农作物废弃物如玉米秸秆、小麦秸秆、稻草等由于产量大、纤维素含量高而被视为是第二代生物燃料生产的重要原料来源，但由于这些粮食作物生长期间长期暴露于尘土以及外界环境中，因此在收割粮食和秸秆的同时，大量的尘土不可避免地会沾在木质纤维素原料的表面，在木质纤维素原料的组分分类中，这部分尘土和木质纤维素中包含的一些无机元素统称为木质纤维素的灰分。灰分可以被分为两大类^[129]：（1）一些可以用水洗或者溶液萃取方法去除的灰分，叫做可提取灰分，其主要的组成就是沾在叶子、外壳等纤维素原料表面的尘土；（2）另一部分则是生物质从土壤中吸收的无机营养盐形成的木质纤维素结构的组成部分，由于该部分无法通过一般的处理方法将其去除，又是构成木质纤维素结构的重要元素，因此这部分灰分称作结构灰分。灰分含量一般占木质纤维素干重的 10% 左右^[130]。然而，在木质纤维素生物炼制加工过程中，这些灰分颗粒会吸收大量的蒸汽、水、酸溶液或者其他预处理过程中用到的溶剂，使原本应该渗透到木质纤维素原料内孔起催化水解作用的化学催化剂被大量转移至灰分颗粒，从而导致木质纤维素预处理过程的效率大幅降低。为了避免灰分对预处理效率的干扰，在实验研究中，研究者通过大量水洗或者机械振动法尽可能多地在预处理前除去木质纤维素原料中的灰分（可提取灰分），以维持较好的预处理效果^[27,131,132,133]。

但是，在许多关于木质纤维素生产生物乙醇的研究中，去除灰分的操作变得可有可无，甚至都没有在操作流程中提及灰分去除这一步骤。省略灰分去除步骤，可能原因如下：（1）经过纤维素组分测定，发现灰分在木质纤维素原料的干重中所占比例非常小，其存在对于后续原料的预处理效率几乎没有影响，这类低灰分含量的原料主要包括一些木本植物（硬木和软木类）；（2）由于预处理过程中，大量的化学催化剂被用于预浸少量的木质纤维素原料，即使灰分会吸收一部分化学催化剂，但是仍然留有足够的催化剂用于预浸木质纤维素原料，使得灰分吸收造成的影响被弱化了。这类预处理过程涵盖了传统的稀酸预处理、碱溶液预处理和蒸汽爆破预处理等。

在前两章已经提出，为了减少预处理过程中的用水投入、废水排放，预处理过程逐渐朝着越来越高的固含量发展^[11,12,15,38]，这也意味着用于预浸原料的液体催化剂含量逐渐减少，而预处理体系中原料的灰分含量却随着固含量的提升而增加。Chen 等^[134]在稀酸预处理过程中将固含量提升至 30% 后，预处理效率呈现出明显的降低，其主要原因是固含量提升，降低了稀酸溶液的使用量，因此灰分吸收同量的稀酸，则用于催化预处理反应的稀酸量就减少了，进而对预处理过程造成影响。而在本文的研究中，玉米秸秆预处理过程均采用干式稀酸预处理，过程中固体含量超过 70%，稀酸用量进一步降低，物

料在稀酸预浸之后是没有游离水存在的“干式”状态。在这样的预处理环境中，灰分吸收稀酸溶液的能力保持一致，则用于催化预处理的稀酸量比 30% 固含量过程更少，灰分是否影响干式预处理过程值得深究。

在前两章对预处理反应器以及预处理操作进行开发改进的基础之上，本章的研究重点放在了原料灰分对于干式稀酸预处理（70% 左右固含量）效率的影响，并探讨除尘过程在干式稀酸预处理技术中的必要性。结果表明，灰分含量对于预处理后酶解和发酵过程的影响非常大，糖化后纤维素、木聚糖转化率、以及乙醇浓度和得率都随着灰分含量的提高有所降低，同时通过分析秸秆中的灰分组成以及中和硫酸溶液的能力，初步解析了灰分对预处理前稀酸预浸过程存在较大影响，使预处理效率进一步降低。本章节的研究内容为预处理之前原料灰分去除的重要性提供了可靠的科学证据。

4.2 材料与方法

4.2.1 原材料与除尘操作

与第二、第三章不同，本章研究中所用到的玉米秸秆产自河南郸城，2012 年秋季收获，未经任何处理的玉米秸秆中纤维素含量为 31.54%、木聚糖含量 18.10%、灰分含量 9.6%。玉米秸秆的除尘操作是通过自来水水洗进行，具体方法如下：在一个塑料盒中加入一定量的干秸秆，随后向其中添加秸秆质量的 10 倍、30 倍、50 倍、100 倍的自来水，浸泡 1 h 除去秸秆中的石子和金属，捞起漂浮在液面上方的玉米秸秆，通过压榨机将玉米秸秆中所含的游离水进行分离，保留下来的湿秸秆置于 105 °C 烘箱中烘至恒重，烘干的秸秆随后经过锤式粉碎机粉碎至 10 mm 的尺寸，作为后续干式稀酸预处理的原料。实验中采集的土壤样品亦来自玉米秸秆收割地河南郸城。

4.2.2 菌种与酶制剂

脱毒菌种 *Amorphotheca resinae* ZN1 CGMCC 7452 用于预处理后玉米秸秆中抑制物的降解，脱毒过程同章节 2.2.2 中描述。发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 CGMCC 2528 用于乙醇发酵过程。*S. cerevisiae* DQ1 经过在预处理秸秆水解液中驯化 3 次后，转接入水解液培养基中进行短期驯化后作为发酵种子，步骤同章节 2.2.2。

纤维素酶 Youtell 6# 是由湖南尤特尔生化有限公司（湖南岳阳）提供，其滤纸酶活为 135 FPU/g，纤维二糖酶活测定方法根据 Ghose^[135] 的报道，其酶活为 344 CBU/g，纤维素酶蛋白含量按照 Brandford 法测定，蛋白含量为 90 mg/g。

4.2.3 预处理反应器和操作

首先干秸秆和稀硫酸溶液以 2:1 的固液比进行预浸，将 5% 质量浓度的稀硫酸溶液均匀的洒在 1400 g 干秸秆上，充分混合，密封于塑料袋中，室温（18~25 °C）静置 12 h，预浸后每 100 g 干秸秆中含有 2.5 g 硫酸（2.5% 酸用量），经过预浸的秸秆随后被置于螺旋带搅拌式预处理反应器中，开始预处理反应。本章节中预处理条件固定为 185 °C、2.5%

酸用量、反应 3 min 和 50 rpm 搅拌转速。每个预处理条件分别做两个批次实验作为平行，测得的预处理数据都是取自两个平行批次实验的平均值。

预处理结果的糖化评价方法参照 2.2.6，纤维素转化率按照本文公式 (2-3) 进行计算，木聚糖转化率计算按照如下公式进行：

$$\text{Xylan conversion (\%)} = \frac{(C_{xyl} - C_0) \times V}{m \times f_{xylan} \times 1.136 + \frac{m \times C_{olixyl}}{1000}} \times 100\% \quad (3-1)$$

C_{xyl} —酶解 72 h 后木糖浓度，g/L；

C_0 —糖化前木初始浓度，g/L；

V —糖化液体积，L；

m —干物料质量，g；

f_{xylan} —纤维素含量，%；

C_{olixyl} —预处理后干秸秆中寡糖含量，mg/g；

4.2.4 预处理秸秆的生物脱毒

在利用预处理物料进行同步糖化发酵生产乙醇之前，预处理秸秆首先用丝状真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 进行生物脱毒，降解在预处理过程中产生的抑制物（糠醛、羟甲基糠醛、乙酸等），不同条件预处理的物料用 20% 质量浓度的氢氧化钙溶液调节 pH 至 5.5，随后接入菌种，脱毒过程以 HPLC 检测不到纤维素原料中的各类抑制物作为时间节点。

4.2.5 同步糖化发酵生产乙醇 (SSF)

生物脱毒后玉米秸秆同步糖化发酵产乙醇的过程在 5 L 螺带桨生物反应器中进行。同步糖化发酵过程的固含量为 25%（以干物料进行计算），纤维素酶用量 15 FPU/g DM。同步糖化发酵过程中前 12 h 为纤维素酶预酶解过程，保持温度 50 °C、pH 4.8、搅拌转速 150 rpm；预糖化 12 h 后以 10% 接种量 (v/v) 接入经过驯化的 *S. cerevisiae* DQ1，开始同步糖化发酵，发酵温度 37 °C、pH 5.5、搅拌转速 150 rpm，过程中定时取样测定糖耗和乙醇生产。乙醇得率采用本文中公式 (2-5) 进行计算。

4.2.6 玉米秸秆中组分的测定

玉米秸秆预处理前后的纤维素、半纤维素、单糖、寡糖和抑制物测定方法参照本文 2.2.10。玉米秸秆中灰分含量按照美国可再生能源实验室提供的标准方法^[129]进行测定。称取大约 1 g 干秸秆于彻底烘干的坩埚中，置于马弗炉内煅烧，马弗炉通过如下升温程序逐渐进行升温：(1) 从室温加热至 105 °C；(2) 以每分钟 10 °C 的速率从 105 °C 升高至 250 °C；(3) 250 °C 下保持 30 min；(4) 以每分钟 20 °C 的速率从 250 °C 升温至 575 °C，并在 575 °C 下保持 3 h，进行煅烧；(5) 反应结束后，马弗炉自然冷却至 105 °C 后，取出煅烧后的秸秆进行称重。经过反应后剩余的残渣质量与初始干秸秆的质量比值即为玉米秸秆中灰分含量，实验数据取自两组平行实验数据的平均值。

4.2.7 玉米秸秆吸收酸溶液分析

为测定不同灰分含量的玉米秸秆对于稀硫酸溶液的吸收能力，本实验采用 5% 质量浓度的稀硫酸溶液滴定干秸秆与水的混合物（1 g 干秸秆+20 g 水），同时用 pH 计测定 pH 值，当 pH 达到 2.4 时（预浸固液比 2:1 预浸后的秸秆和水混合物的 pH 值），记录酸用量，并反算回每 100 g 干秸秆所需要的酸用量。另一组实验中，将经过清洗和未经清洗的玉米秸秆通过标准筛进行筛分，筛孔尺寸分别为 10 目、20 目、40 目、60 目，经过筛分后的秸秆尺寸分别如下：>2.00 mm、0.85~2.00 mm、0.425~0.850 mm、0.250~0.425 mm 和 <0.250 mm，筛分后的秸秆亦用于稀酸溶液滴定实验中，验证不同尺寸下秸秆对于稀酸的中和能力。实验数据取自三组平行实验的平均值。

4.2.8 灰分元素分析

玉米秸秆经过马弗炉煅烧后，从坩埚中收集灰分用于元素组成测定。元素组成测定通过扫描电镜（JSM-6360LV, Joel Co., 日本）/能谱仪（Falcon, Edax Co., 美国）进行测定，测定结果表示灰分中所占元素百分比。

4.2.9 糖类、乙醇和抑制物的分析

糖类、乙醇和抑制物采用装有 Bio-rad Aminex HPX-87H 色谱柱（300 mm×7.8 mm）的 HPLC（LC-20AD 泵，RID-10A 示差折光检测器）测定，检测条件：柱温 65 °C，流动相为 5 mM 的稀硫酸溶液，流速 0.6 ml/min，样品过滤之前都经过 0.22 μm 滤膜过滤。

4.3 结果与讨论

4.3.1 玉米秸秆原料中灰分含量对于预处理效率的影响

表 4.1 玉米秸秆经过不同程度水洗除尘后的灰分含量

Table 4.1 Ash content in the virgin corn stover after de-ashing by washing

用水量	未水洗	10 倍水洗	30 倍水洗	50 倍水洗	100 倍水洗
灰分含量 (%)	9.60	7.75	6.79	5.30	4.98

秸秆浸泡在不同用量的自来水中，漂洗 1 h 后，取出秸秆，通过压榨固液分离。压榨后的秸秆经过烘干、粉碎后用于实验操作。物料经过马弗炉煅烧后用差重法测定灰分含量。

不同灰分含量的秸秆都在 185 °C、2.5% 酸用量、反应 3 min、50 rpm 搅拌转速的条件下进行预处理，预处理过程中固含量约为 67%。通过不同用量的自来水水洗进行灰分脱除。如表 4.1 所示，随着除尘过程用水量的加大（干秸秆质量的 10 倍、30 倍、50 倍、100 倍），玉米秸秆中灰分的含量逐渐减少，从 9.60% 降低至 4.98%。随后对不同灰分含量的物料进行预处理效率评价，如图 4.1 所示，当灰分含量从 9.60% 降低至 7.75%、6.79%、5.30% 和 4.98% 之后，纤维素酶解转化率从 43.30% 逐渐升高至 45.56%、53.39%、65.26% 和 70.99%，同样的变化趋势在木聚糖转化率中亦可以观察到，从 56.83% 增加至 57.09%、66.36%、81.69% 和 90.07%。该结果说明秸秆中的灰分含量对于预处理后的酶解糖化过

程影响非常大，因此原料的除尘是预处理之前一个不可或缺的步骤。

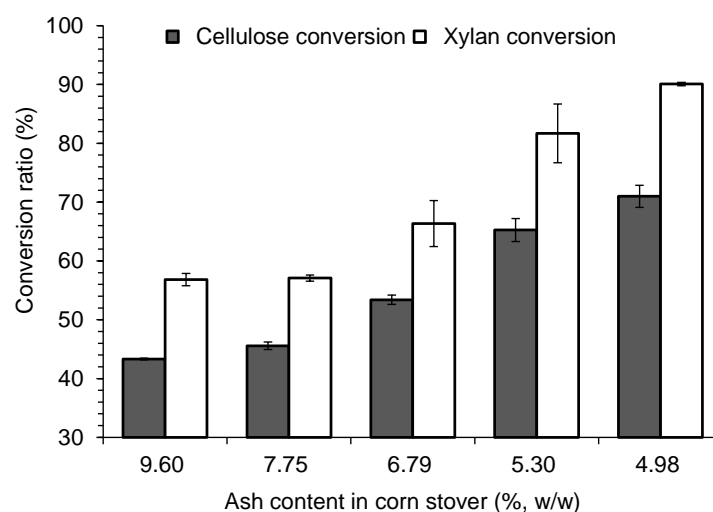


图 4.1 不同灰分含量预处理后秸秆经过 72 h 酶解糖化后的纤维素和木聚糖转化率

Fig. 4.1 Cellulose conversion and xylan conversion after 72 h enzymatic hydrolysis using the pretreated corn stover with different ash content

酶解条件：5% 固含量、酶用量 15 FPU/g DM、50 °C、pH 4.8、150 rpm。

表 4.2 显示了不同灰分含量的秸秆经过预处理后，不溶性组分和可溶性组分含量的变化。当水洗强度增大，灰分含量从 9.60% 降低至 7.75%、6.79%、5.30% 和 4.98% 之后，预处理秸秆中的纤维素组分从 35.38%（未水洗）逐渐增加至 36.99%、37.15%、37.13%、37.61%，相反木聚糖含量从 5.82%（未水洗）降低至 4.32%、4.41%、3.69% 和 3.08%。预处理后逐渐降低的木聚糖含量和逐渐增长的纤维素含量说明稀酸预处理的强度随着灰分含量的减少而逐渐增强。

预处理后秸秆中的可溶性葡萄糖、木糖、葡寡糖、木寡糖和抑制物含量亦能从一个侧面反映预处理的效果。从表 4.2 中可以观察到，随着除尘强度的增强，可溶性单糖的含量逐渐增加，寡糖含量则逐渐降低，由木聚糖降解得到的木糖含量从 15.38 mg/g DM（未水洗）逐渐增加至 28.45（灰分含量 7.75%）、28.88（灰分含量 6.79%）、31.75（灰分含量 5.30%）和 38.89 mg/g DM（灰分含量 4.98%）。稀酸预处理过程中产生的三类主要抑制物糠醛、羟甲基糠醛和乙酸的含量亦随着灰分含量的减少逐渐增加，这也说明了灰分含量的降低增加了预处理的效率。

在已经报道的研究中，原料中的灰分具有较强的中和液体催化剂的能力，尤其在稀酸预处理过程中，灰分元素对于稀酸溶液的中和大幅降低了其在后续预处理过程中的催化能力，导致预处理后物料酶解性能的降低^[130,132,134]。本研究中，同样的现象在预处理物料的纤维素酶解能力、预处理后可溶性单糖和寡糖、以及抑制物含量中有所体现。因此，灰分对于预处理过程的影响需要进行验证。

表 4.2 不同灰分含量的玉米秸秆经过稀酸预处理后秸秆中组分的变化

Table 4.2 Components in the corn stover under different washing conditions after pretreatment

秸秆灰分含量 (%)	纤维素含量 (%)	木聚糖含量 (%)	葡萄糖 (mg/g DM)	木糖 (mg/g DM)	葡寡糖 (mg/g DM)	木寡糖 (mg/g DM)	乙酸 (mg/g DM)	5-HMF (mg/g DM)	糠醛 (mg/g DM)
干式稀酸预处理前									
9.60	31.54	18.10	\	\	\	\	\	\	\
7.75	33.67	18.81	\	\	\	\	\	\	\
6.79	34.04	19.89	\	\	\	\	\	\	\
5.30	35.05	21.26	\	\	\	\	\	\	\
4.98	36.18	19.83	\	\	\	\	\	\	\
干式稀酸预处理后									
9.60	35.38	5.82	3.24	15.38	17.38	87.90	6.91	0.91	0.53
7.75	36.99	4.32	4.56	28.45	15.90	77.00	6.94	1.52	1.27
6.79	37.15	4.41	3.60	28.88	14.36	81.95	8.73	1.37	1.45
5.30	37.13	3.69	4.00	31.75	12.05	74.57	8.34	1.42	1.67
4.98	37.61	3.08	4.52	38.89	10.36	70.19	8.80	1.66	1.54

预处理过程在 185 °C、2.5%酸用量、反应 3 min、50 rpm 搅拌转速的条件下进行，可溶性组分单位表示每克干秸秆中所含组分的质量。实验数据取自两组平行实验的平均值。

4.3.2 不同灰分含量秸秆预浸前后的 pH 值测定

为验证灰分含量对于预处理的影响，本实验中对不同灰分含量的秸秆在稀酸预浸前后的 pH 值进行测定（表 4.3）。经过水洗除尘处理后，预浸前秸秆的 pH 值从未经水洗的 9.10 降低至 8.61、8.60、8.51 和 8.28，逐渐从碱性趋于中性。而经过稀硫酸溶液预浸 12 h 之后，秸秆的 pH 值从 4.15（未水洗秸秆，灰分含量 9.60%）迅速降低至 3.61（灰分含量 7.75%）、3.46（灰分含量 6.79%）、3.37（灰分含量 5.30%）和 2.78（灰分含量 4.98%）。该结果显示，秸秆灰分含量越高，则原始秸秆的初始 pH 值升高，说明灰分中存在碱性物质，造成 pH 值的上升，同时预处理过程中的稀酸溶液容易被这些碱性物质吸收中和，致使物料的 pH 值没有酸性水平（表 4.3），削弱稀酸的催化能力。这个结果间接说明了秸秆预处理效率降低的潜在原因：稀硫酸溶液被秸秆灰分中的碱性物质中和，降低了稀酸在预处理反应中催化木质纤维素发生结构变化反应的能力，导致预处理效率的下降。

表 4.3 不同灰分含量的秸秆在和水的混合物中 pH 值测定

Table 4.3 pH measurement of corn stover slurry with different ash content

不同灰分含量的秸秆 (%)	稀酸预浸前的秸秆	稀酸预浸后的秸秆
9.60	9.10	4.15
7.75	8.61	3.61
6.79	8.60	3.46
5.30	8.51	3.37
4.98	8.28	2.78

预浸过程为将 5% 质量浓度的稀硫酸溶液和秸秆以固液比 2:1 的比例进行混合，放置 12 h。pH 测定方法为称取 1 g 秸秆（干基），加入 20 g 去离子水，用 pH 计测定浆液的 pH 值。

4.3.3 玉米秸秆中和稀酸能力测定和灰分元素组成测定

秸秆 pH 值测定初步阐明了灰分中和稀酸的能力，在此基础上，本节通过设计两个实验来进一步验证秸秆中的灰分对稀硫酸溶液在预浸过程中的吸收能力：（1）用 5% 质量浓度的稀硫酸对秸秆和去离子水的混合物进行滴定操作，将秸秆滴定至 pH 2.4（固液比 2:1 预浸后秸秆的 pH 值），计算酸用量（图 4.2）；（2）通过检测灰分中所含的元素组成，分析除尘过程中灰分中元素组成的变化对于稀硫酸中和能力的影响（表 4.4）。

如图 4.2a 所示，随着秸秆中灰分含量由 9.60% 降低至 7.75%、6.79%、5.30% 和 4.98% 后，用于滴定 100 g 秸秆的酸用量从 3.70 g、3.75 g 降低至 3.28 g、2.55 g 和 2.05 g，而在干式稀酸预处理中，预浸 100 g 秸秆需要 2.5 g 硫酸。该实验结果表明秸秆原料的灰分如果没有被完全去除，大量稀硫酸溶液将被用于中和秸秆灰分中的碱性物质，因而达不到 2.5%（100 g 干秸秆含有 2.5 g 硫酸）所需的预处理要求。

图 4.2b 显示了不同尺寸的秸秆对于稀硫酸溶液的中和能力。实验中，首先通过标准筛分别将未清洗和 100 倍水洗烘干后的秸秆筛分为如下尺寸：大于 10 目（>10 目）、小

于 10 目大于 20 目 (10-20 目)、小于 20 目大于 40 目 (20-40 目)、小于 40 目大于 60 目 (40-60 目) 和小于 60 目 (<60 目)。对于未水洗的秸秆, 随着秸秆的尺寸从 >10 目减小到 <60 目后, 滴定 100 g 秸秆需要的酸用量从 2.63 g 增加至 2.80、3.20、3.73 和 5.93 g; 而对于经过 100 倍水洗后的秸秆, 随着秸秆尺寸的减小, 滴定 100 g 秸秆所需要的酸用量同样有所增加, 但增加幅度较未水洗秸秆的要小, 当秸秆尺寸从 >10 目减小到 <60 目后, 滴定酸用量从 1.78 g 增加至 2.10、2.33、2.43 和 3.08 g。该实验结果表明, 无论是在经过除尘处理还是未经除尘处理的秸秆, 尺寸越小的秸秆吸收酸溶液的能力越强, 因此秸秆中的灰分大部分存在于尺寸较小的秸秆中, 即使经过水洗除尘将灰分含量降低一半之后, 这个趋势仍然存在, 该结果同样暗示了将秸秆原料粉碎至更小的尺寸并非完全有利, 亦会造成预处理效率的降低。

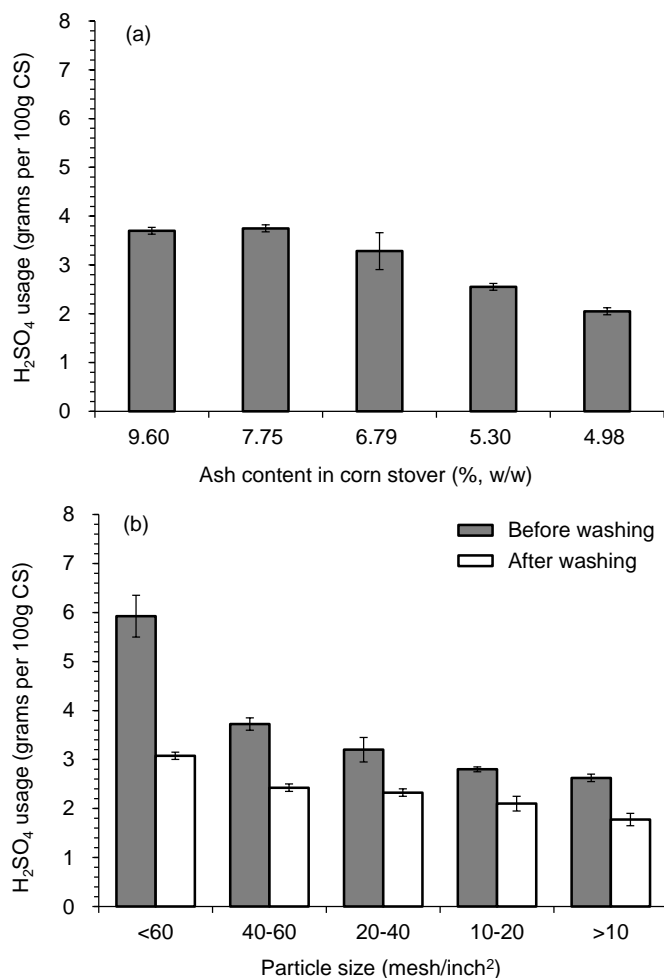


图 4.2 秸秆吸收酸溶液能力的测定

Fig. 4.2 Measurement of the adsorption capacity of dilute acid by corn stover

(a) 不同灰分含量秸秆酸溶液吸收能力; (b) 不同尺寸的未水洗和水洗秸秆酸溶液吸收能力。用 5% 质量浓度的稀硫酸溶液滴定不同灰分含量的秸秆, 计算 pH 值达到 2.4 时所消耗的酸用量。实验中用 1 g 秸秆 (干基) 和 20 g 去离子水后混合后, 用酸溶液滴定混合物并同时测定 pH; 滴定后消耗的稀酸用量单位用每 100 g 干秸秆所消耗的酸用量来表示。

经过滴定实验结果发现，灰分中确实存在能够大量中和稀硫酸溶液的碱性物质，因此本实验通过测定灰分含量的元素组成，进一步解析灰分中包含的碱性组分。在测定秸秆中灰分元素组成之前，首先将秸秆置于马弗炉中煅烧，将所有的碳水化合物、蛋白、脂类等含碳物质全都去除，随后采用扫描电镜/能谱仪测定后的灰分元素组成（表 4.4）。从表 4.4 中可以观察到，秸秆灰分中包含的元素组成与土壤中的元素组成非常相似，特别是硅和氧的含量，在土壤中，硅和氧的比例占了 68%，而在不同秸秆的灰分中，硅和氧所占比例大约在 46-68%，随着除尘强度的增强，硅和氧所占的比例越大，硅和氧的对应着土壤中的主要成分二氧化硅，意味着灰分来源于土壤。灰分中比较容易形成可溶性化合物的元素如 K 和 Mg，随着水洗除尘强度的增强而含量大幅减少，而容易形成沉淀的 Ca 和 Al 则并没有随着水洗强度的增强而减少。这也意味着水洗除尘可以除去灰分中大部分的可溶性盐类，而不溶或难溶性的化合物则被留在了原料中。本章伊始提到过灰分分为可提取灰分和结构灰分，可提取灰分是指可以通过各种除尘手段进行提取和分离，因此此处灰分中的可溶性组分可以算作可溶性组分的一部分，这一部分随着水洗后液体部分一起从秸秆中脱离，减弱了灰分对酸溶液的吸收作用，增强了预处理的效率。

表 4.4 秸秆完全煅烧后的灰分元素组成

Table 4.4 Elemental compositions in the ash of corn stover after complete combustion

	Si (%)	Ca (%)	Mg (%)	K (%)	Al (%)	O (%)	S (%)	P (%)
土壤中的元素组成	33.23	5.45	2.18	3.17	11.57	34.56	\	\
秸秆灰分中的元素组成								
灰分含量 9.60%的秸秆	19.00	13.81	11.94	16.02	1.87	26.84	1.81	2.88
灰分含量 7.75%的秸秆	25.79	15.31	8.92	11.54	1.60	29.49	2.35	2.67
灰分含量 6.79%的秸秆	30.48	13.60	8.97	6.72	1.93	32.35	2.07	2.58
灰分含量 5.30%的秸秆	34.77	11.61	7.55	7.61	0.96	32.64	1.91	1.72
灰分含量 4.98%的秸秆	32.81	16.11	7.36	2.58	1.31	34.30	1.75	2.63

表 4.4 中亦可以归结出另一个现象，当水洗强度最大的时候（灰分含量 4.98%），秸秆中的灰分元素组成与土壤的元素组成最为接近，这也意味着在作物生长阶段，作物与土壤之间可能存在的一个微妙的平衡：作物在生长过程中吸收土壤中的无机盐作为生长营养物，另一方面，在农作物废弃物如秸秆、玉米皮、稻壳、小麦麸皮、叶片在生长过程中亦会通过雨水冲刷、凋落、腐烂等方式，重新将这些元素带入土壤，为作物提供营养。由于生物炼制工业的需要，大量农作物废弃物从土壤中被收割，会导致二者之间的元素平衡被打破，进一步影响生态循环，这也是未来工业化规模的生物炼制过程需要纳入考虑的重要因素。

4.3.4 同步糖化发酵产乙醇

为进一步评价预处理的效果，将不同灰分含量的预处理秸秆用于高固体含量（25%

固含量、15 FPU/g DM 酶用量) 的 SSF 过程生产乙醇, 物料用于乙醇发酵之前, 首先用 *A. resinae* ZN1 进行生物脱毒降解过程中的抑制物。图 4.3 给出了不同灰分含量的预处理物料用于同步糖化发酵生产乙醇的结果。从图 4.3 中可以看出, 随着秸秆中灰分含量的降低, 同步糖化发酵过程预糖化 12 h 后的糖浓度以及发酵 72 h 后的乙醇得率都有所提高。12 h 预糖化后的葡萄糖浓度从 44.97 g/L (9.60% 灰分含量) 增加至 57.06 g/L (7.75% 灰分含量)、58.57 g/L (6.79% 灰分含量)、57.38 g/L (5.30% 灰分含量) 和 66.06 g/L (4.98% 灰分含量), 同时 72 h 发酵后的乙醇浓度从 28.52 g/L 增加至 33.64、38.23、38.80、43.03 g/L, 对应的得率分别为 51.74%、66.11%、67.13%、73.52%。

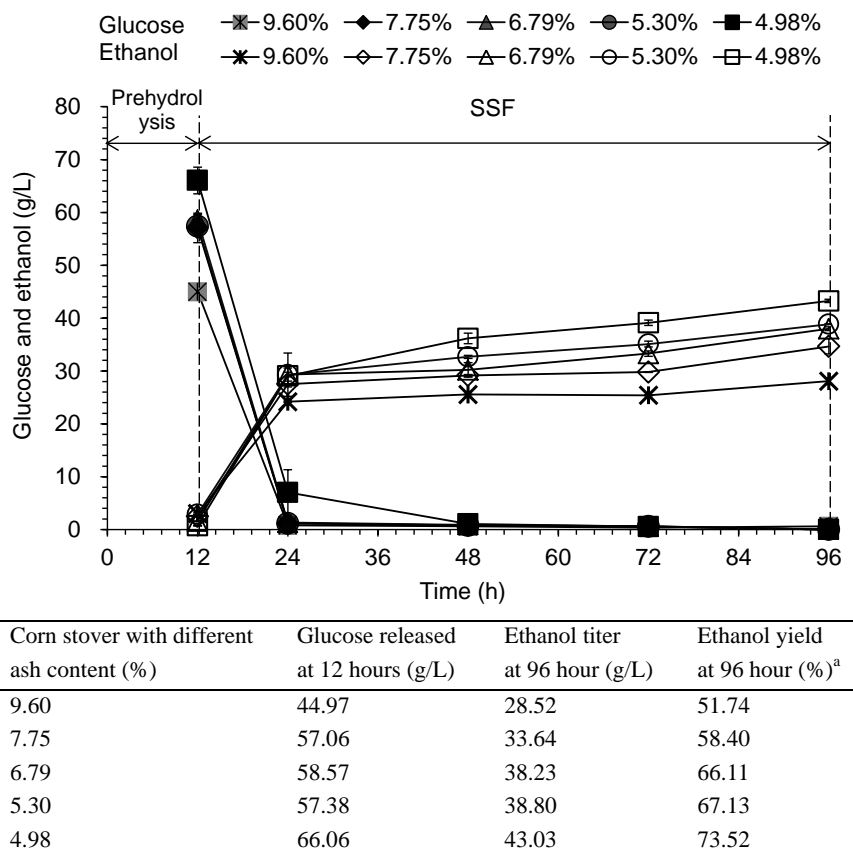


图 4.3 用不同灰分含量的预处理秸秆进行同步糖化发酵产乙醇

Fig. 4.3 SSF performance using the pretreated CS with different ash content

预处理秸秆首先经过生物脱毒去除抑制物, 随后进入 SSF 过程。SSF 实验条件: 25% 固含量、15 FPU/g DM 酶用量, 预糖化过程中温度 50 °C、pH 4.8, 预糖化 12 h 后以 10% (v/v) 接种量接入驯化后的 *S. cerevisiae* DQ1 种子液, 开始 SSF, 过程中温度 37 °C、pH 5.5。

在美国可再生能源实验室 (NREL) 的技术报告中, 对原料中的灰分含量指标定为 10% 以下, 即除尘操作只需使灰分含量降低至 10% 以下, 就可进入后续的预处理工段 [35,130]。然而, 在本章节研究中, 即使秸秆中的灰分含量为 9.60%, 但是预处理效率依然处于低水平 (纤维素酶解转化率低于 50%), 其主要原因在于干式稀酸预处理操作过程

中超高的固体含量（70%左右）。相比于传统预处理过程中的低固含量（低于 10%），酸用量的急剧降低，不仅使灰分在固液混合物中所占的比例升高，而且少量的稀酸溶液会被灰分迅速的中和，进一步减少了稀酸溶液在物料中的渗透作用，降低预处理效率。经过彻底除尘处理后，秸秆中的灰分含量从 9.60%降低至 4.98%，此时经过 25%固含量同步糖化发酵生产得到的乙醇得率达到了相对较高的 73.52%，比原始秸秆增加了 42.1%。结合同步糖化发酵和酶解糖化过程，可以观察到同步糖化发酵过程中纤维素酶酶解步骤受到的影响大于乙醇发酵步骤受到的影响，充分说明了灰分影响的是预处理秸秆的酶解性能，而不是酵母发酵的性能。在先前 Yu 等^[132]的研究中发现，原料灰分中存在的金属离子会很大程度上影响纤维素酶的活性，从而抑制了酶解糖化步骤。在本研究中，纤维素酶也一定程度上受到了灰分中金属离子的影响，但是从预处理秸秆的不溶性以及可溶性组分含量来看（表 4.2），受到影响的不单单是酶解过程，而是预处理效率的整体降低。因此，本研究给出了在高固含量稀酸预处理过程中原料除尘操作的重要性，而在一些液体化学催化剂与木质纤维素原料直接接触的预处理过程中，比如蒸汽爆破、氨纤维爆破、碱式预处理等，也可能存在同样的现象。

本章节的研究中，用于秸秆除尘的主要方法是通过大量的水洗，但这种方法由于大量的用水投入，明显不适用于大规模的工业化生产中。因为在本研究中已经证实了灰分存在于原料中的小颗粒部分（图 4.2），因此机械振动法和旋风分离法可能更适合工业化过程的应用，这两种方法与筛分颗粒的原理相似。美国可再生能源实验室在其最新的生物炼制过程设计方案中，已经将旋风分离法和机械振动法作为固定的除尘方法用于稀酸预处理前的物料前处理^[35]；而加拿大 SunOpta 公司已经设计了机械振动和旋风分离相结合的方法，用于原料蒸汽爆破预处理之前的除尘步骤中。在这些实践案例中，除尘步骤可以通过低水耗的过程实现。因此，在未来的工业化生产中，机械除尘法是解决水洗除尘高水耗的有效方案，而在干式稀酸预处理过程中，机械除尘法替代水洗除尘法能够进一步降低过程中的用水投入，增强干式稀酸预处理在生产应用中的可持续性。

4.4 本章小结

本章的研究重点关注了常被研究者忽视的原料灰分含量对于预处理过程的影响，并对此展开详细研究。实验结果表明在高固体含量的预处理过程中，灰分含量的升高会导致预处理效率急剧下降，因此灰分含量必须作为评价预处理原料的一项重要指标，而预处理前物料的除尘步骤在工业化生物炼制过程中更是不可或缺。本章研究中得到了如下结论：

- 1) 灰分的存在会大幅降低稀酸预处理后秸秆酶解糖化和乙醇发酵的效率。经过除尘的玉米秸秆，其灰分含量从 9.60%降低至 4.98%，预处理后物料的酶解糖化过程中，纤维素转化率从 43.30%增加到了 70.99%；而在同步糖化发酵生产乙醇的过程中，

乙醇得率从 51.74% 提高到了 73.52%。预处理效率的大幅度提升说明了灰分含量对预处理的影响非常大。

- 2) 经过稀酸滴定实验发现,原料中的灰分会强烈中和预处理过程中添加的稀硫酸溶液,降低稀硫酸在预处理过程中的催化作用。根据灰分元素测定,灰分中含有较多的碱性金属离子,随着水洗强度的增强,一些易形成可溶性盐的离子含量有所降低,使灰分中和酸溶液的能力减弱,增强预处理的效果。
- 3) 无论是彻底清洗还是未清洗的原料,在尺寸越小的原料中含有的灰分含量越高,中和酸的能力越强。根据这个特点,在工业化过程中可以采用机械振动筛和旋风分离器除去物料中的微小颗粒,达到除尘效果,进而取代水耗、能耗较高的水洗除尘。
- 4) 灰分含量是决定预处理后物料高效生物转化的一个重要前提,因此,灰分含量必须作为一项评估预处理原料的重要指标。比起预处理反应器以及预处理过程的改进,原料的灰分控制和除尘操作起到的作用更加明显。本章实验内容也为生物炼制过程中,木质纤维素原料前处理指标的制定给出了严格的科学依据。

第 5 章 *Amorphotheca resinae* ZN1 快速生物脱毒以及后续在位生产纤维乙醇的研究

5.1 引言

利用木质纤维素原料加工生产纤维乙醇是化石燃料有力的替代品。木质纤维素加工生产化学品必须通过预处理方法破坏抗性结构,以保证后续的纤维素酶水解产糖和微生物发酵生产化学品的高效进行^[110]。预处理方法包含物理、化学、物理化学方法等,在催化剂和高温的条件下,木质纤维素中的纤维素、半纤维素和木质素均会进一步降解产生一些不利于后续酶水解和微生物发酵的抑制性副产物,主要包括呋喃类衍生物如糠醛、5-羟甲基糠醛(5-HMF),有机酸如乙酸、甲酸、乙酰丙酸,和各种各样的酚类化合物如香草醛、4-羟基苯甲醛、丁香醛等^[5]。在木质纤维素进一步生物转化前,如何去除这些抑制物成为了研究的热点。目前用于抑制物脱除的方法包括水洗预处理物料、离子交换法处理纤维素水解液、石灰过碱化法处理水解液、活性炭吸附等,这些物理化学方法不仅额外地增加了过程的水耗,而且会产生大量的含有抑制物的废水废渣、额外地废水处理以及设备、操作成本,降低了木质纤维素加工生产化学品的效率^[39,137,138]。

生物脱毒法是利用微生物代谢抑制物或者特异性酶催化抑制物的转化,消除或降低抑制物的抑制性^[39,40,49]。该过程相比其他脱毒手段具有条件温和、操作成本低、抑制物降解效率高、低能耗等优点,因此在木质纤维素加工生产化学品的过程中被广泛研究。微生物脱毒法较酶催化法而言,其降解抑制物的方式以生理代谢为主,脱毒菌体内拥有较完整的抑制物降解路径,因而其能够较彻底的降解各类抑制物,比起酶催化过程更具实用性,所以也成了当今脱毒研究的热点。目前报道的可以用于微生物脱毒过程的微生物中,包括了细菌、酵母、丝状真菌、白腐真菌等,这些微生物都可以特异降解单种或广谱地应用于各类抑制物的降解过程中。其中,部分研究通过在合成培养基中添加的单个或数个抑制物,研究微生物对于抑制物的耐受性和代谢机制^[65,77,78,96]。另一类研究则直接将微生物脱毒应用降解预处理后木质纤维素的含有的抑制物,随后将脱毒完的固体或液体应用于后续产品发酵过程。而在后者的研究中, Palmqvist 等^[80]用里氏木霉 (*Trichoderma ressi*) 对半纤维素水解液进行同步脱毒和产酶的研究; Lopez 等^[82]从富含糠醛的土壤中筛选得到丝状真菌 *Coniochaeta ligniaria*, 能够有效降解木质纤维素水解液中呋喃类衍生物、有机酸和酚类化合物^[94], 并且将该生物脱毒过程应用于各种不同的生物质水解液或发酵菌株生产乙醇^[13,83,84]; Fonseca 等^[87]利用酵母 *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 对各种木质纤维素水解液中的糠醛、羟甲基糠醛、丁香醛和阿魏酸进行降解,降解率都高于 60%,但脱毒之后并没有进一步的发酵应用; Zhang 等^[89]筛选得

到 *Enterobacter* sp. FDS8 能够高效降解油棕榈空果串水解液中的糠醛和羟甲基糠醛，保证后续乳酸发酵的正常进行。这些研究中，比较典型的特点是脱毒的体系多为木质纤维素预处理后得到的水解液部分，通常需要经过固液分离后得到，而为了降低发酵后产物分离的操作成本，越来越多的发酵过程倾向于高固体含量体系（15-30% 以上）^[15]，也就要求提高预处理过程中的固体含量，同时也意味着生物脱毒过程也必须适用于高固体含量的体系。

为了解决高固体含量下的脱毒问题，Zhang 等^[85]从霉变的稀酸预处理秸秆中筛选得到一株丝状真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1，能够直接在预处理后的固体物料（固含量约 50%）中以固态培养的形式进行生物脱毒，降解稀酸预处理玉米秸秆中的糠醛、羟甲基糠醛和乙酸的同时，保留了大量固体纤维素组分，并应用于高固体含量下乙醇、油脂以及乳酸的同步糖化发酵过程^[38,107,112]。但是，在实现对固体物料脱毒的过程中，*A. resinae* 需要花费至少 4-7 天的脱毒周期，才能够将糠醛、羟甲基糠醛完全降解，降低了生物炼制过程的整体效率。其原因主要在于 *A. resinae* 所在的固态生物脱毒过程中，反应器内缺乏有效的混合作用，弱化了过程的传质和传热，造成反应体系不均一；另一方面，*A. resinae* 为好氧菌，固态培养过程中并没有针对霉菌的溶氧调控措施，因此菌体在抑制物的代谢方面速率有所减缓。

针对先前研究中 *A. resinae* 降解抑制物时间周期长的问题，本研究尝试对固态脱毒加速。在文献报道的真菌固态培养生产纤维素酶以及微生物预处理的过程中，通过对反应体系的加湿^[139]、有效的通气措施^[140]、增加固体搅拌^[141]等手段均可以增加真菌在固态基质上的生长代谢和产酶，而这些手段也有可能对固态生物脱毒过程起到促进作用，另一方面，Ran 等^[95]在研究该菌种代谢抑制物的过程中，发现通气增加过程中的溶氧能够有效提速糠醛、羟甲基糠醛的代谢，因此在过程中增加通气和溶氧是一个可靠的加速生物脱毒的手段。本研究将干式稀酸预处理玉米秸秆的固态生物脱毒过程转移至可处理高固含量混合的螺旋搅拌桨生物反应器中，在通气条件下对 *A. resinae* ZN1 降解抑制物的行为进行了研究。结果表明，在适量通气条件下，预处理玉米秸秆物料中的糠醛、羟甲基糠醛和乙酸只需要 36 h 即可完成快速降解，后续高固体含量 SSF 过程生产的乙醇浓度、乙醇产率与传统脱毒 4 天后发酵结果相当，即快速脱毒时间缩短到常规脱毒的 1/3，大幅增加了整体生物炼制的速率。快速脱毒期间，葡萄糖和木糖在抑制物降解阶段都消耗非常有限，同时在抑制物降解阶段菌体的生长缓慢。基于这个特点，木糖可以在脱毒结束时得到保留，提高了生物炼制的综合效率。

5.2 材料与方法

5.2.1 材料与菌种

玉米秸秆于 2012 年秋季收获自河南郸城，秸秆经过水洗除尘、105 °C 烘干后密封

储存备用。干式稀酸预处理是将玉米秸秆和 5% 质量分数的稀硫酸溶液以固液比 2:1 的比例, 并流加入螺带搅拌式预处理反应器中, 开始预处理操作。由于预处理过程更换了可以持续供给蒸汽的蒸汽发生器, 因此预处理条件得到了进一步的降低, 本章所用的秸秆预处理条件为 175 °C、2.5% 酸用量、5 min 反应时间、50 rpm 搅拌转速 (2.5% 预处理秸秆)。用 4% 质量分数的稀硫酸溶液与玉米秸秆以固液比 2:1 加入反应器内进行预处理后, 得到了 2% 预处理秸秆。

生物脱毒菌种 *Amorphotheca resinae* ZN1 (CGMCC 7452) 筛自稀酸预处理秸秆^[85], 保藏于 4 °C 冰箱的 PDA 斜面。乙醇发酵菌种 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 (CGMCC2528) 是经过筛选诱变得到的可耐受高温和抑制物的酿酒酵母^[113], 保藏于 -80 °C 冰箱甘油管中, 酵母的培养过程以及驯化同 2.2.2。纤维素酶是由尤特尔公司提供的 Youtell 6# 纤维素酶, 滤纸酶活为 135 FPU/g, 纤维二糖酶活 344 CBU/g, 蛋白含量 90 mg/g。

5.2.2 固态生物脱毒过程

用无菌水制备 *A. resinae* ZN1 孢子悬浮液 20 ml, 接入 200 g 已调 pH 至 5.5 的 2% 预处理秸秆中 (20% 质量浓度的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节), 接种量 10% (v/w), 作为生物脱毒的种子, 于 28 °C 下培养, 待菌丝生长旺盛且抑制物消耗完全后, 以 10% (w/w) 接种量转接至已经调节 pH 的 2.5% 预处理秸秆中, 进行固态培养, 过程中取样测定抑制物的消耗情况, 并冷冻保存物料, 用于后续的高固体含量的同步糖化发酵过程。

5.2.3 同步糖化发酵过程

将 5.2.2 中的经过不同时间脱毒处理的秸秆不经过灭菌处理, 与乙醇发酵营养盐溶液以 30% 固含量混合后, 加入 5 L 螺带搅拌式生物反应器^[22], 并添加 15 FPU/g DM 的酶用量 (蛋白含量 10 mg/g DM), 预糖化 12 h 后, 接入驯化后的酿酒酵母 DQ1, 开始同步糖化发酵。预糖化过程为 50 °C、150 rpm 搅拌转速、pH 4.8; 同步糖化发酵过程为 37 °C、150 rpm 搅拌转速、pH 5.5。发酵过程定时取样, 测定糖类消耗以及乙醇生产。

5.2.4 在位快速脱毒和发酵

在 5 L 螺带式生物反应器中加入 900 g 2.5% 预处理秸秆, 并同时用 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液调节 pH 至 5.5, 搅拌转速 50 rpm, 混合 3 min 后, 以 10% 接种量接入在 2% 预处理秸秆中培养的 *A. resinae* 种子 90 g, 混合 90 s 后停止搅拌, 向反应器中通入无菌空气, 过程中定时取样分析, 取样前用 50 rpm 搅拌转速混合 90 s, 取出 5 g 左右固体样品, 加入 50 g 左右去离子水中, 在摇床 180 rpm 转速下混合 1 h 后, 取出悬浮液离心取上清进行组分分析。通过调节在位脱毒过程中的通气速率以确定最佳的快速脱毒条件, 通气速率调节如下: 0、50、75、100、150 和 200 L/h, 900 g 物料与 90 g 种子物料在发酵罐中的体积约为 2.5 L, 对应每分钟单位体积的通气量约为 0、0.33、0.50、0.67、1.00 和 1.33 VVM, VVM 被定义为每分钟每升秸秆固体中的通气量。脱毒 36 h 后, 直接在同一反应器中加入营养盐溶液、纤维素酶开始预糖化以及后续的同时糖化发酵过程。

5.2.5 *A. resiniae* 在合成培养基以及生物脱毒过程中生长研究

用无菌水制备 *A. resiniae* ZN1 孢子悬浮液，接种于种子培养基中，培养基成分包括 2 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 g/L 酵母粉和 0.5 g/L CaCl_2 ，其中碳源为 20 g/L 葡萄糖或 20 g/L 木糖，pH 自然，28 °C 培养 5 天形成菌膜后，以 10% (v/v) 接种量将菌丝接入相同组分的发酵培养基中，培养基中加入 1 g/L 糠醛。在糠醛作为唯一碳源的发酵过程中，培养基中不添加酵母粉和糖类，接种前用等体积的无菌水清洗菌膜后，以 10% 接种量接入发酵培养基中。菌体干重采用真空抽滤法进行测定，抽滤后滤纸与菌丝在 105 °C 烘箱内烘干 12 h 后测定质量，减去滤纸质量即为菌体干重，并换算为浓度单位 g/L。

快速生物脱毒过程中菌体的生长通过环境扫描电子显微镜 (Quanta 250, FEI Co., 美国) 进行观察，不同脱毒时间节点的预处理秸秆直接置于显微镜下进行表面观察，通过显微镜图片显示菌体在快速脱毒过程中的生长情况。

5.2.6 分析方法

糠醛、糠醇采用装配 YMC-ODS-C18 色谱柱 (150 mm×4.6 mm) 的 HPLC (LC-20AT, 岛津, 日本) 进行测定，检测器为 SPD-20A 紫外检测器，检测条件：柱温 35 °C，检测波长 220 nm；流动相为 50% 配比的乙腈和超纯水，进行等度洗脱，流速 1 ml/min。羟甲基糠醛、羟甲基糠醇测定方法采用装配 YMC-ODS-C18 色谱柱 (150 mm×4.6 mm) 的 HPLC (LC-20AT 泵, SPD-20A 紫外检测器, 岛津, 日本) 进行分析，检测条件：柱温 35 °C，检测波长 230 nm；初始流动相为 5% 乙腈水溶液，流速 0.6 ml/min，采用梯度洗脱进行测定；0-15 min 流动相配比由 5% 乙腈升至 100% 乙腈；15-20 min，流动相配比由 100% 乙腈降至 5% 乙腈；20-30 min 用 5% 乙腈水溶液平衡。酚类化合物的测定采用装配 YMC-ODS-C18 色谱柱 (150 mm×4.6 mm) 的 HPLC (LC-20AT 泵, SPD-20A 紫外检测器, 岛津, 日本) 进行分析，检测条件：柱温 35 °C，检测波长 270 nm；初始流动相为纯乙腈和 0.1% 甲酸水溶液以 1:9 配比进行混合，流速 1 ml/min，0-4 min 流动相为 10% 乙腈，4-5 min 乙腈浓度升至 35%，5-20 min 保持 35% 乙腈浓度进行洗脱，20-30 min 乙腈浓度由 35% 降至 10% 并重新平衡。糖类、乙醇、有机酸采用装有 Bio-rad Aminex HPX-87H 色谱柱 (300 mm×7.8 mm) 的 HPLC (LC-20AD 泵, RID-10A 示差折光检测器) 进行分析，流动相为 5 mM 稀硫酸溶液，流速 0.6 ml/min。所有样品都经过稀释并使用 0.22 μm 滤膜过滤后进行检测。

5.3 结果与讨论

5.3.1 固态生物脱毒过程抑制物代谢研究

利用 *A. resiniae* 固态生物脱毒作为一种降解预处理物料中抑制物的常规手段，已经在生物炼制生产乙醇、乳酸、油脂等化学品中应用。本部分重点在于解析预处理后玉米

秸秆生物脱毒过程中的抑制物代谢情况以及后续对乙醇生产的影响。将生长于预处理秸秆中的 *A. resiniae* 种子以 10% 接种量接种至装有 2 kg 预处理秸秆的塑料盒中，混匀后开始固态生物脱毒过程。

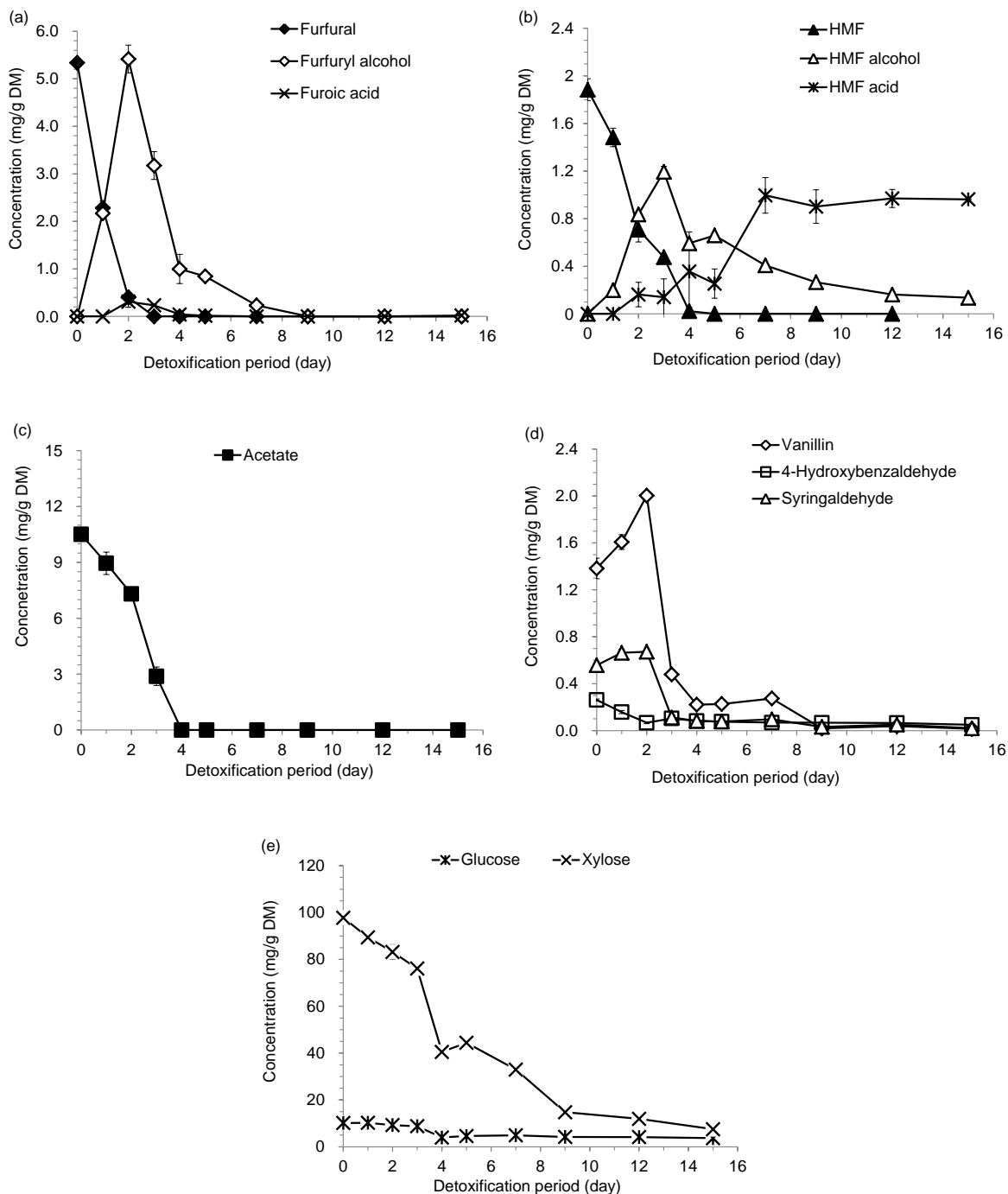


图 5.1 固态脱毒过程中的抑制物代谢情况

Fig. 5.1 Inhibitor degradation in solid state biodetoxification

脱毒条件：28 °C、pH 5.5、接种量 10% (w/w)，塑料盒中静置培养，过程中没有搅拌。(a)糠醛代谢；(b) 5-羟甲基糠醛代谢；(c)乙酸代谢；(d)酚类化合物代谢；(e)葡萄糖和木糖。

图 5.1 为传统固态脱毒过程中各类抑制物和糖类的代谢情况。首先，糠醛从脱毒菌

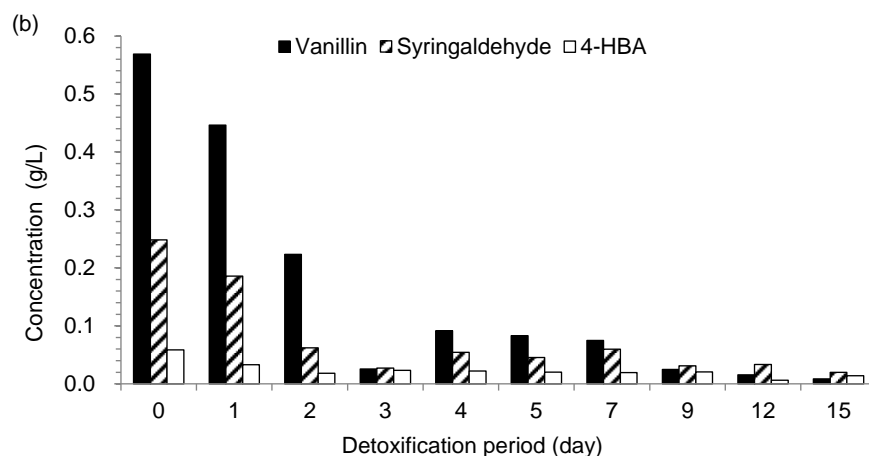
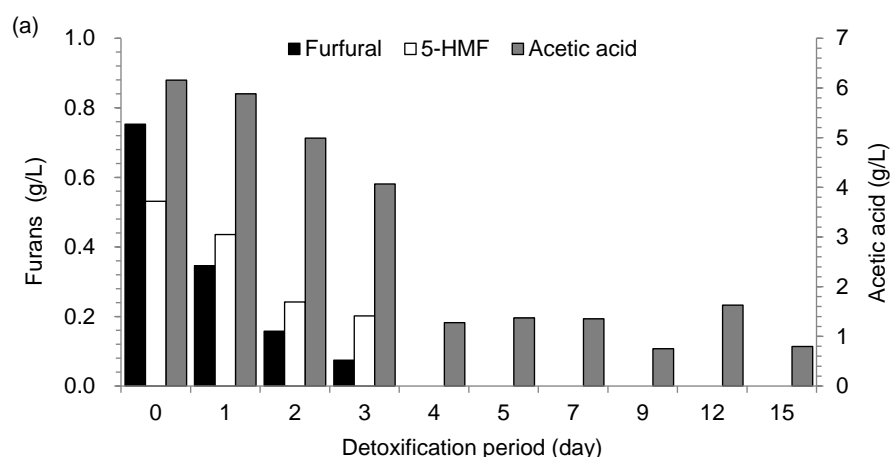
中接入后即开始降解,经过 1 天后降解至原先浓度的一半,同时糠醇以对应的浓度生成,羟甲基糠醛和乙酸开始缓慢降解;脱毒 2 天后,糠醛浓度由初始的 5.34 mg/g DM 降低至 0.40 mg/g DM,生成 5.42 mg/g DM 浓度的糠醇。同时羟甲基糠醛和乙酸的代谢加快,羟甲基糠醛代谢生成其对应的代谢产物羟甲基糠醇,而乙酸的代谢过程中并没有检测出对应的代谢产物;至脱毒 3 天后,糠醛降解完全,4 天后,乙酸降解完全,5-羟甲基糠醛浓度由降低至 0.02 mg/g DM。随着脱毒过程继续进行,糠醇和羟甲基糠醇逐渐被 *A. resinae* 降解,生成相应的糠酸和羟甲基糠酸。糠酸浓度升至 0.31 mg/g DM 后随即被降解,但羟甲基糠酸浓度积累至 1.00 mg/g DM,直至脱毒 15 天后,仍然没有被降解。在稀酸预处理秸秆中含量最多的三种抑制物,糠醛的降解最优先,并对应生成糠醇以及糠酸。羟甲基糠醛和乙酸的代谢在糠醛浓度降低至一半后,其代谢速率加快,羟甲基糠醛生成对应的羟甲基糠醇(2,5-呋喃二甲醇)和羟甲基糠酸。

图 5.1d 监测了预处理秸秆中所含有的三种酚类化合物——香草醛、丁香醛和 4-羟基苯甲醛,在固态脱毒过程中的降解,这三种抑制物对于微生物发酵以及纤维素酶糖化过程有一定的抑制作用,但在干式稀酸预处理后的玉米秸秆中,这三种酚类化合物的浓度比糠醛、羟甲基糠醛和乙酸的浓度都要低。在脱毒过程中,浓度最低的 4-羟基苯甲醛持续降解,而香草醛和丁香醛在脱毒前 2 天出现了浓度上升的现象,脱毒 3 天后,两种化合物被逐渐降解。该现象可能是由于酚类复杂的代谢机制,使得预处理物料中的一些其他酚类物质经过 *A. resinae* 代谢后,产生了额外的香草醛和丁香醛,随后再被进一步降解。固态脱毒过程中,除了持续降解的 4-羟基苯甲醛外,香草醛和丁香醛的降解始于脱毒 3 天后(糠醛被彻底降解的时间点)。在对抑制物降解的研究中,5-羟甲基糠醛、乙酸和酚类化合物的代谢与糠醛的降解紧密相关,暗示着糠醛可能是 *A. resinae* 代谢抑制物过程中的限制因素。

另一方面,当脱毒过程进行到 4 天的时候,即糠醛、羟甲基糠醛和乙酸都被降解完全后,*A. resinae* 开始大量利用秸秆中的葡萄糖和木糖(图 5.1e)。在脱毒 3 天时,糠醛降解完全,葡萄糖消耗约为 1.4 mg/g DM,木糖消耗约为 14 mg/g DM。从脱毒第 4 天开始至脱毒 15 天结束,抑制物完全降解,葡萄糖共消耗了约 5.0 mg/g DM,而木糖共消耗了约 75 mg/g DM,这个过程中,*A. resinae* 的菌丝和孢子生长旺盛,葡萄糖和木糖在抑制物完全降解后,为菌体生长提供了碳源。过多的木糖消耗降低了脱毒过程的效率,并且固态过程中难以兼顾木糖的保留和抑制物的脱除。

随后经过不同脱毒天数的预处理秸秆被用于高固体含量下同步糖化发酵生产乙醇,评价脱毒效率。糖化发酵过程中固体含量 30%,酶用量 15 FPU/g DM,预糖化 12 h 后以 10%接种量接入驯化后的酿酒酵母 DQ1,结果如图 5.2 所示。从图 5.2 中看出,未经脱毒处理的预处理秸秆,预糖化水解液中糠醛浓度达到 0.75 g/L、羟甲基糠醛浓度达到 0.53 g/L、香草醛浓度达到 0.57 g/L、丁香醛浓度 0.26 g/L,此时纤维素酶的酶解过程和

乙醇发酵都受到了严重抑制，预糖化后的葡萄糖浓度只有 41.99 g/L，72 h 后的乙醇浓度只有 5.31 g/L。经过一天脱毒后，预糖化醪液中的糠醛浓度降低至 0.35 g/L（图 5.2a），糖化和发酵过程皆可正常进行，预糖化后醪液中葡萄糖浓度达到 71.57 g/L，最终乙醇浓度达到 46.16 g/L。此时醪液中的羟甲基糠醛浓度达到 0.44 g/L，而香草醛和丁香醛浓度分别达到 0.45 g/L 和 0.19 g/L，说明这些抑制物的存在相比糠醛而言，对于酶解和发酵的抑制作用并不明显。随着生物脱毒时间的延长，预糖化醪液中的各类抑制物逐渐降低（图 5.2a、5.2b），同时高固体含量下的纤维素酶糖化能力逐渐增强，乙醇发酵性能也逐渐增强。脱毒时间从 0 天延长至 1、2、3、4、5、7、9、12、15 天的时候，预糖化醪液中的葡萄糖浓度从 41.99 g/L 升高至 71.57、71.52、74.27、81.13、79.28、82.47、81.25、83.01、91.31 g/L（图 5.2c），而 72 h 后乙醇浓度从 5.31 g/L 增加至、46.16、46.85、47.88、50.00、51.07、50.41、52.33、53.88 g/L。由此可见，未经脱毒的秸秆显示出了对酶解和发酵过程的巨大抑制作用，其中最主要的抑制作用来源于糠醛，一旦糠醛浓度降低，酶解过程和酵母发酵乙醇过程均可正常进行，即使在其他强抑制作用的抑制物存在（5-羟甲基糠醛和酚类物质）。



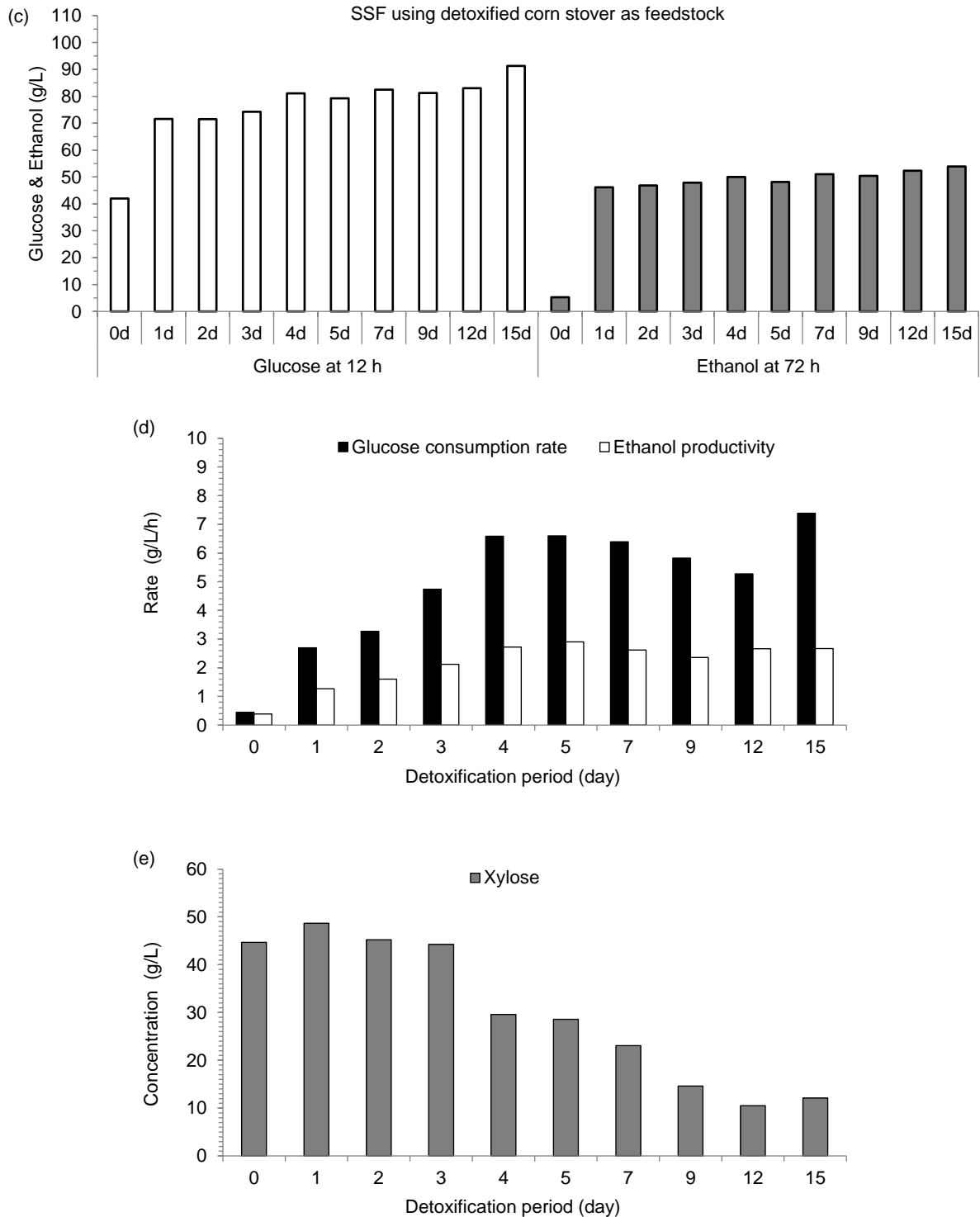


图 5.2 利用经过不同时间脱毒的玉米秸秆同步糖化发酵生产乙醇。

Fig. 5.2 SSF for ethanol production using the detoxified corn stover with different day

SSF 条件：30%固含量、15 FPU/g DM 酶用量,酵母接种量 10% (v/v)。(a) 预糖化 12 h 后的糖化液中呋喃类和乙酸浓度；(b) 预糖化 12 h 后糖化液中的酚类化合物含量；(c) SSF 过程中糖耗情况和乙醇发酵情况；(d) SSF 过程 20 h 时的葡萄糖糖耗速率和乙醇产率；(e) 预糖化液中的木糖浓度。

另一方面，除了乙醇浓度随着抑制物的降解缓慢提高，预糖化后 8 h 时的葡萄糖消

耗和乙醇产率也逐渐加快(图 5.2d), 相比于乙醇浓度, 发酵速率对于抑制物更加敏感。当脱毒时间从 0 天增加至 5 天时, 发酵前 8 h 的糖耗速率由 0.45 g/L/h 增加至 2.69、3.27、4.74、6.59 和 6.60 g/L/h, 继续延长脱毒时间, 发酵过程的糖耗速率基本持平, 而脱毒 15 天后, 发酵过程糖耗速率达到 7.39 g/L/h; 乙醇产率从 0.39 g/L/h 增加至 1.27、1.60、2.12、2.72、2.90 g/L/h (脱毒天数从 0 增加至 1、2、3、4、5 天) 后, 继续延长脱毒时间, 产率基本保持平稳。预糖化液中的木糖浓度随着脱毒时间的延长而有所降低, 这个结果与秸秆(图 5.1e) 中的趋势一致。从同步糖化发酵生产乙醇的结果来看, 虽然羟甲基糠醛和乙酸的抑制性弱于糠醛, 但醪液中残存的 5-羟甲基糠醛和乙酸会降低酵母的发酵速率; 而四种呋喃醛的代谢产物(糠醇、糠酸、羟甲基糠醇、羟甲基糠酸, 图 5.1a 和 5.1b) 和酚类化合物的存在, 并没有对发酵过程造成抑制性影响。

综合脱毒和乙醇发酵两个过程来看, 螺带搅拌预处理的秸秆最佳脱毒时间是 4 天, 即糠醛、羟甲基糠醛和乙酸代谢完全, 该时间节点不仅得到了较高的乙醇浓度(50.00 g/L), 同时由于羟甲基糠醛和乙酸的代谢完全, 发酵速率有较大地提升, 但此时木糖已经开始消耗, 如图 5.1e 和 5.2e 所示。虽然脱毒原料中的纤维素得到了很好的保留, 但木糖的损失依然造成了整个过程效率的下降。木糖被菌体大量消耗的原因可能在于较大体系的固态脱毒过程中缺乏有效混合传质, 使菌体代谢抑制物和糖类的过程中存在局部效应, 即有些部位菌体量较大, 其代谢抑制物速率快, 并较早地利用木糖, 而代谢慢的部位则仍然有抑制物的残留, 这一特性还造成了抑制物完全降解的周期较长。低速率、高木糖损失这两大缺点使得该过程难以进一步应用于放大规模的脱毒过程。

5.3.2 通气条件下 *A. resinae* 的快速生物脱毒

Ran 等^[95]在解析 *A. resinae* 对糠醛、羟甲基糠醛的代谢实验中, 发现在液体培养基中增加通气作用, 能够有效促进液体培养基中糠醛和羟甲基糠醛的降解效率, 因此相比于其他促进固态培养过程的手段^[139,141], 增加溶氧更加适合 *A. resinae* 的固态脱毒过程; 另一方面, 因为过程中需要增加传质混合, 所以本研究将固态生物脱毒过程转移至 5 L 螺带搅拌生物反应器内进行。实验中在反应器中加入 900 g 预处理秸秆(pH 值 5.5), 随后以 10% 接种量(w/w) 接入固态培养的 *A. resinae* 种子, 低速率短时搅拌混匀, 通入无菌空气, 测试通气速率对生物脱毒速率的影响。实验中设定了六个通气通气量: 0 L/h、50 L/h、75 L/h、100 L/h、150 L/h 和 200 L/h, 装载的秸秆和种子所占反应器体积约为 2.5 L, 换算为通气速率单位分别为 0、0.33、0.50、0.67、1.00、1.33 VVM。图 5.3、图 5.4、图 5.5 分别描述了带有通气的生物脱毒过程中抑制物以及糖类的代谢情况。

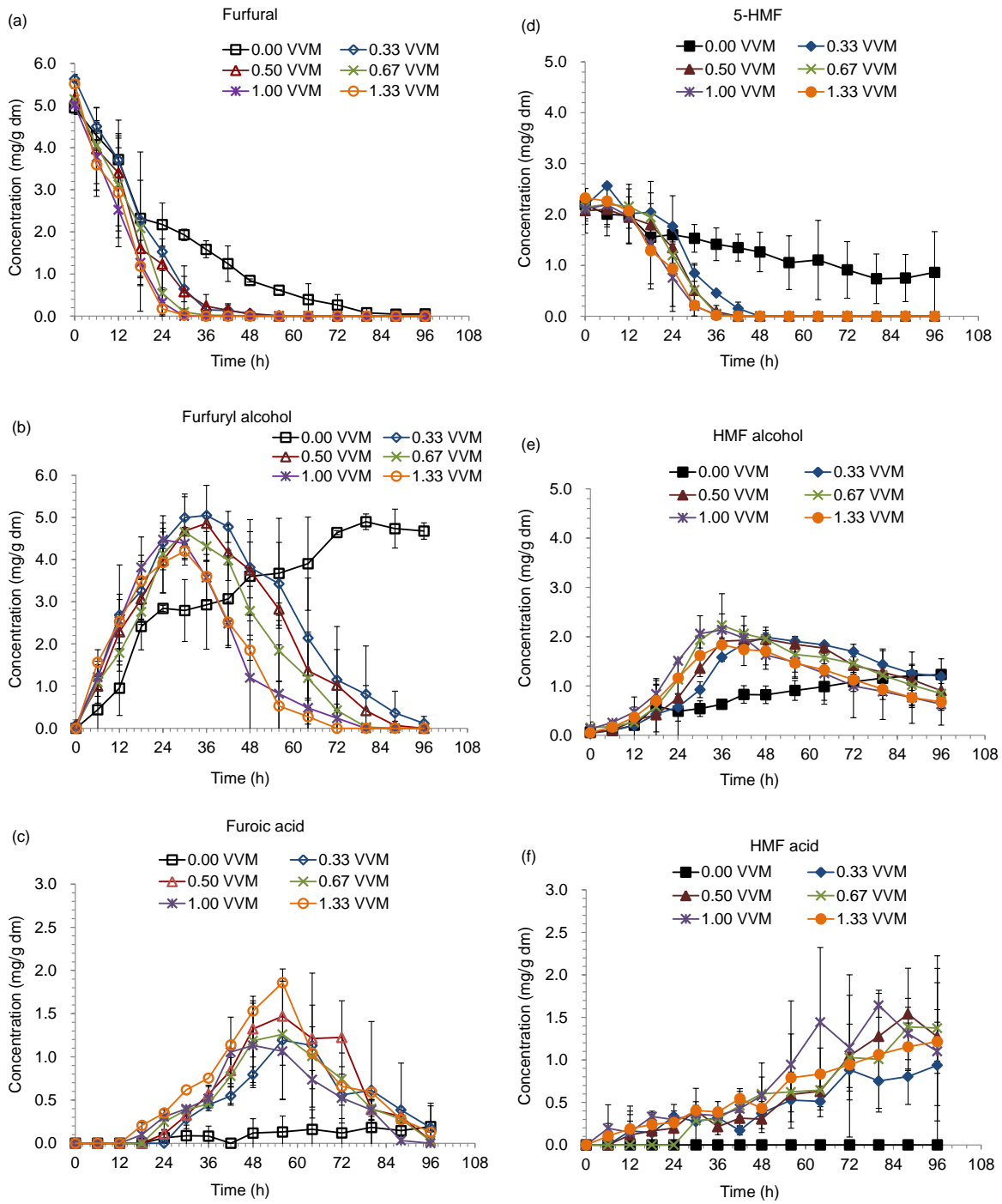


图 5.3 不同通气速率下 *A. resiniae* ZN1 在预处理秸秆中呋喃醛类代谢研究

Fig. 5.3 Furans' conversion in the pretreated corn stover by *A. resiniae* ZN1 under different aeration rate 脱毒条件: 28 °C、pH 5.5, 过程中不搅拌, 取样前 50 rpm 搅拌 90 s 用于混合, 通气速率单位 VVM。(a)糠醛代谢; (b)糠醇代谢; (c)糠酸代谢; (d) 5-羟甲基糠醛代谢; (e)羟甲基糠醇代谢; (f)羟甲基糠酸代谢。

从图 5.2a 中可以看出, 当通气速率设为 0.33 VVM 时, *A. resiniae* 可以将秸秆中糠醛在 56 h 完全降解, 当通气速率增加至 0.50 VVM 后, 糠醛在 48 h 内降解完全, 进一步增加通气速率至 0.67 VVM, 糠醛在 36 h 内降解完成; 而当通气速率增加至 1.00 VVM

和 1.33 VVM 后, *A. resinae* 糠醛都可以在 30 h 完全降解, 增加脱毒过程中的氧气供应, 糠醛的降解速率被大幅提升。当脱毒进行到 36 h 时, 随着通气量的增加, 糠醛浓度分别从 0.15 mg/g DM 降低至 0.15、0.24、0.02、0.00 和 0.00 mg/g DM。相反, 在没有氧气供给的过程中 (0 VVM), 糠醛降解过程进行缓慢。在该实验结果中可以观察到另一个现象, 糠醛前 18 h 内的降解速率在不同通气条件下基本类似, 但是当脱毒继续进行后, 糠醛的代谢速率随通气速率的增加而提升, 说明在脱毒过程中, 氧气供给直接影响糠醛后期的代谢速率, 从而影响后续其他抑制物的降解。通过糠醛代谢加速的现象来看, 增加氧气供给确实是脱毒加速的一个重要因素。

糠醇的生成速率亦随着通气量的增加而提升 (图 5.3b、5.3c), 但是最大生成量逐渐降低。不同通气量下, 糠醇的生成量分别为 4.90 mg/g DM (0 VVM、80 h)、5.05 mg/g DM (0.33 VVM、36 h)、4.86 mg/g DM (0.50 VVM、36 h)、4.65 mg/g DM (0.67 VVM、30 h)、4.47 mg/g DM (1.00 VVM、24 h) 和 4.20 mg/g DM (VVM、30 h)。另外, 糠酸的生成速率有所增加, 在 36 h 内分别达到 0.09 mg/g DM (0 VVM)、0.44 mg/g DM (0.33 VVM)、0.57 mg/g DM (0.50 VVM)、0.46 mg/g DM (0.67 VVM)、0.52 mg/g DM (1.00 VVM) 和 0.75 mg/g DM (1.33 VVM)。糠醇最大生成量的降低与糠酸生成量的增多, 说明氧气供给加速了糠醇转化为糠酸的过程。结合图 5.3a 中的糠醛代谢可以看出, 18 h 是糠醛降解速率出现差异的时刻, 而此时正是糠醇向糠酸转化速率加快的时间点。这个现象暗示着在糠醛代谢的过程中, 氧气增加促进了糠醇向糠酸转化的加速, 从而促进了糠醛代谢的加速。

羟甲基糠醛的代谢始于糠醛浓度降解至初始浓度一半的时刻 (图 5.3a、5.3d)。在没有通气的情况下, 由于糠醛降解的减慢, 羟甲基糠醛到了 96 h 后仍然有一定残留; 当通气从 0.33 VVM 增加至 1.33 VVM 后, 羟甲基糠醛分别在 56 h、42 h、42 h、36 h 和 36 h 完全降解。羟甲基糠醛的代谢起点和速率极大程度地受到了糠醛降解的制约, 这点与传统固态脱毒相似。羟甲基糠醛在通气加速的条件下, 其向羟甲基糠醇的转化速率亦有所加快 (图 5.3e), 但是继续向羟甲基糠酸转化的过程中, 加速并不明显, 羟甲基糠酸在后续脱毒过程中仍然有积累。

图 5.4 显示了不同通气量下, 脱毒过程中酚类化合物和乙酸的降解情况。在过程中增加氧气供给后, 酚类化合物的降解与固态脱毒过程相类似, 香草醛和丁香醛浓度有先增长后降低的趋势, 4-羟基苯甲醛保持持续降解, 当脱毒经过 36 h 后, 即糠醛浓度低于 1 mg/g DM 后, 香草醛和丁香醛开始降解, 随着通气量的增加, 降解速率略有提升, 但并不明显。脱毒进行到 96 h 后, 酚类物质浓度都降低至 0.3 mg/g DM 以下。图 5.4d 描述了乙酸在通气脱毒过程中的降解情况, 其代谢的趋势与固态脱毒过程中相似, 都是在糠醛浓度降低至初始的一半时开始进行代谢。随着糠醛降解速率的加快, 乙酸的降解速率也有所加快。在没有通气的脱毒对照实验中, 酚类和乙酸的降解都处于停滞状态。

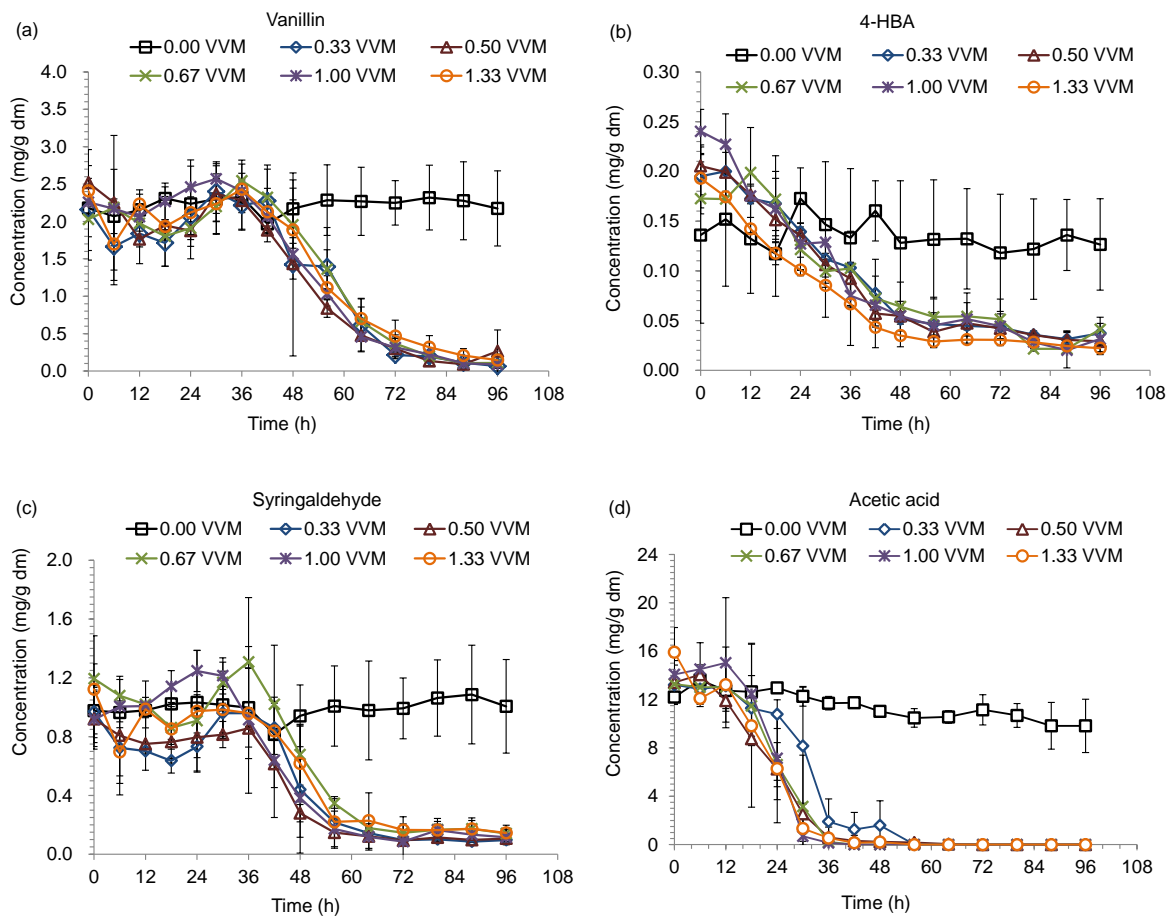


图 5.4 不同通气速率下 *A. resinae* ZN1 在预处理秸秆中酚类和乙酸代谢研究。

Fig. 5.4 The metabolism of phenolics and acetate in the pretreated corn stover by *A. resinae* under different aeration rate

脱毒条件: 28 °C、pH 5.5, 过程中不搅拌, 取样前 50 rpm 搅拌 90 s 用于混合, 通气速率单位 VVM。

(a)香草醛; (b) 4-羟基苯甲醛; (c)丁香醛; (d)乙酸。

与传统固态脱毒过程现象不同, 在生物反应器内的通气脱毒过程中, 葡萄糖和木糖的代谢是在三种抑制物都降解完全后才开始大量降解, 尤其是木糖 (图 5.5a、5.5b), 其降解与糠醛、羟甲基糠醛和乙酸的代谢密切相关。在 36 h 时, 三种抑制物降解完全后, 葡萄糖首先被利用, 但利用量较少。当脱毒进行到 96 h 后, 葡萄糖一共消耗了约 10 mg/g DM 左右; 在 42 h 后, 木糖的消耗量有所增加, 在 96 h 的通气脱毒过程中, 木糖的消耗则在 40 mg/g DM 左右。通气脱毒过程中木糖的总消耗相比于传统固态脱毒而言较少, 说明反应器中的间歇搅拌作用, 能够增强菌体和秸秆在反应器中的混合传质, 有效消除了菌体在固态体系中的局部代谢效应, 减少了菌体对木糖的消耗。结合抑制物代谢和糖类消耗的结果来看, 通气脱毒过程中, 菌体开始利用木糖的时间点受到抑制物的代谢情况所制约, 这意味着可以在快速脱毒过程中同时实现木糖保留与抑制物脱除。

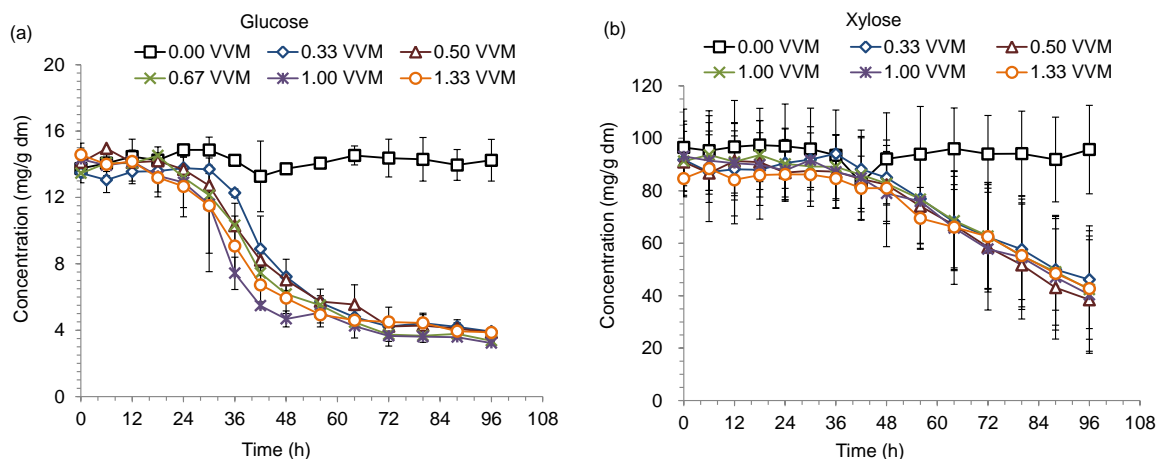


图 5.5 不同通气速率下 *A. resiniae* 在在预处理秸秆中糖类代谢研究

Fig. 5.5 The metabolism of sugars in the pretreated corn stover by *A. resiniae* under different aeration rate 脱毒条件: 28 °C、pH 5.5, 过程中不搅拌, 取样前 50 rpm 搅拌 90 s 用于混合, 通气量单位 VVM。

(a) 葡萄糖; (b) 木糖。

图 5.6 总结了通气脱毒 36 h 后秸秆中残余的抑制物和糖类。在脱毒 36 h 时刻, 随着通气速率的加快, 秸秆中抑制物的残余量逐渐降低, 至 1.00 VVM 以上的通气速率, 糠醛、羟甲基糠醛和乙酸能够被完全降解; 并且该时刻下, 菌体还未开始大量代谢木糖。因此, 通气速率 1.00 VVM、脱毒 36 h 达到了生物脱毒终点的脱毒效果。然而, 在快速脱毒 36 h 的时间点上, 呋喃醛类的代谢产物——糠醇、羟甲基糠醇, 其累积量高于传统固态脱毒 4 天时的累积量; 同样, 酚类物质在 36 h 的脱毒时间内尚未有效降解, 其浓度亦高于传统固态脱毒 4 天时的浓度。这些抑制物的存在是否会对后续乙醇发酵造成抑制作用, 有待进一步的评价。

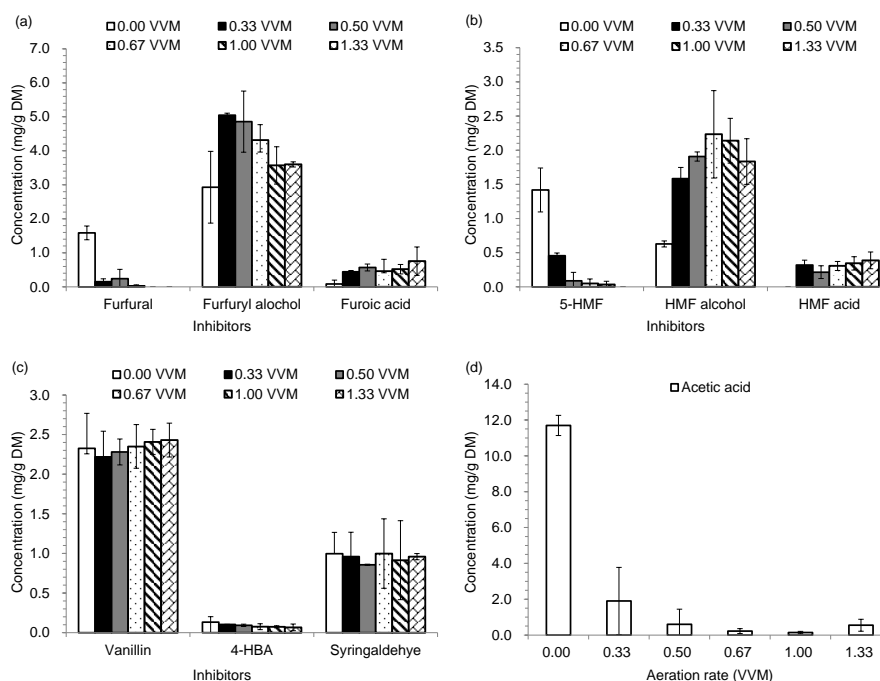


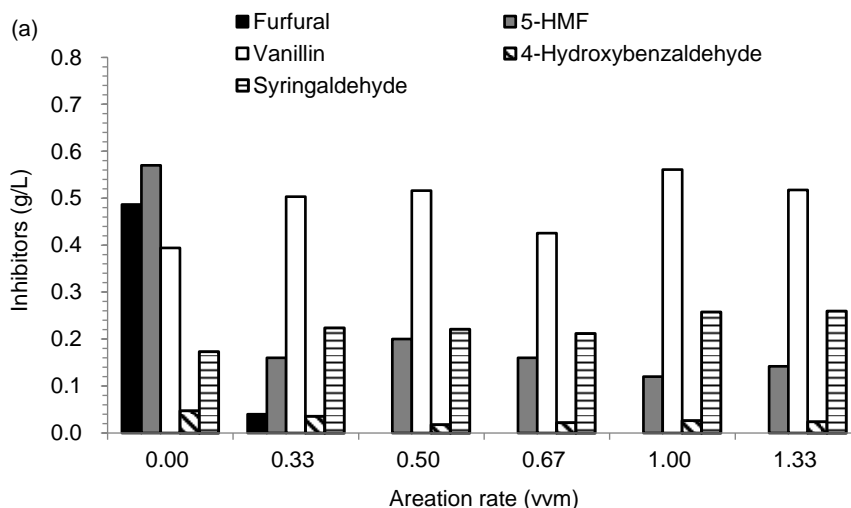


图 5.6 不同通气速率下生物脱毒 36 h 后抑制物和糖类的含量

Fig. 5.6 Content of inhibitors and sugars at 36 hours' biodegradation under different aeration rate
 脱毒条件: 28 °C、pH 5.5。样品取自不同通气速率 (0、0.33、0.50、0.67、1.00、1.33 VVM) 脱毒过程中 36 h 时的脱毒秸秆。(a) 糠醛、糠醇和糠酸; (b) 羟甲基糠醛、羟甲基糠醇和羟甲基糠酸; (c) 香草醛、4-羟基苯甲醛和丁香醛; (d) 乙酸; (e) 葡萄糖和木糖。

5.3.3 同步糖化发酵生产乙醇评价快速脱毒

将不同通气速率下快速脱毒预处理秸秆经过 36 h 的快速生物脱毒之后, 直接在同一反应器内进行后续同步糖化发酵生产乙醇, 评价脱毒效率, 同步糖化发酵固含量 30%, 纤维素酶用量 15 FPU/g DM, 预糖化 12 h。图 5.7 为快速生物脱毒耦合后续乙醇同步糖化发酵过程的结果。如图 5.7a 和 5.7b 所示, 经过 12 h 的预糖化后, 不通气脱毒的秸秆在水解后, 仍然残留了较多的抑制物, 其中糠醛浓度为 0.48 g/L、5-羟甲基糠醛浓度为 0.57 g/L、乙酸浓度为 7.66 g/L、香草醛浓度为 0.39 g/L、丁香醛浓度为 0.17 g/L。由于抑制物的残留, *S. cerevisiae* DQ1 同步糖化发酵生产乙醇的过程也受到了一定的抑制, 发酵速率和乙醇浓度都有所降低 (图 5.7c 和 5.7d); 而随着通气速率增大至 0.33、0.50、0.67、1.00 和 1.33 VVM, 糠醛浓度快速下降, 乙醇发酵性能大幅改善, 发酵 72 h 后的乙醇浓度分别达到 49.55、50.12、49.03、48.56、49.72 g/L。而发酵过程中木糖都没有消耗, 得到了较好的保留 (图 5.7), 由于酿酒酵母 DQ1 无法消耗木糖, 木糖保留说明 *A. resinae* 在糖化发酵过程中失去了菌体活性, 因此脱毒耦合在位糖化发酵的模式是可行的。



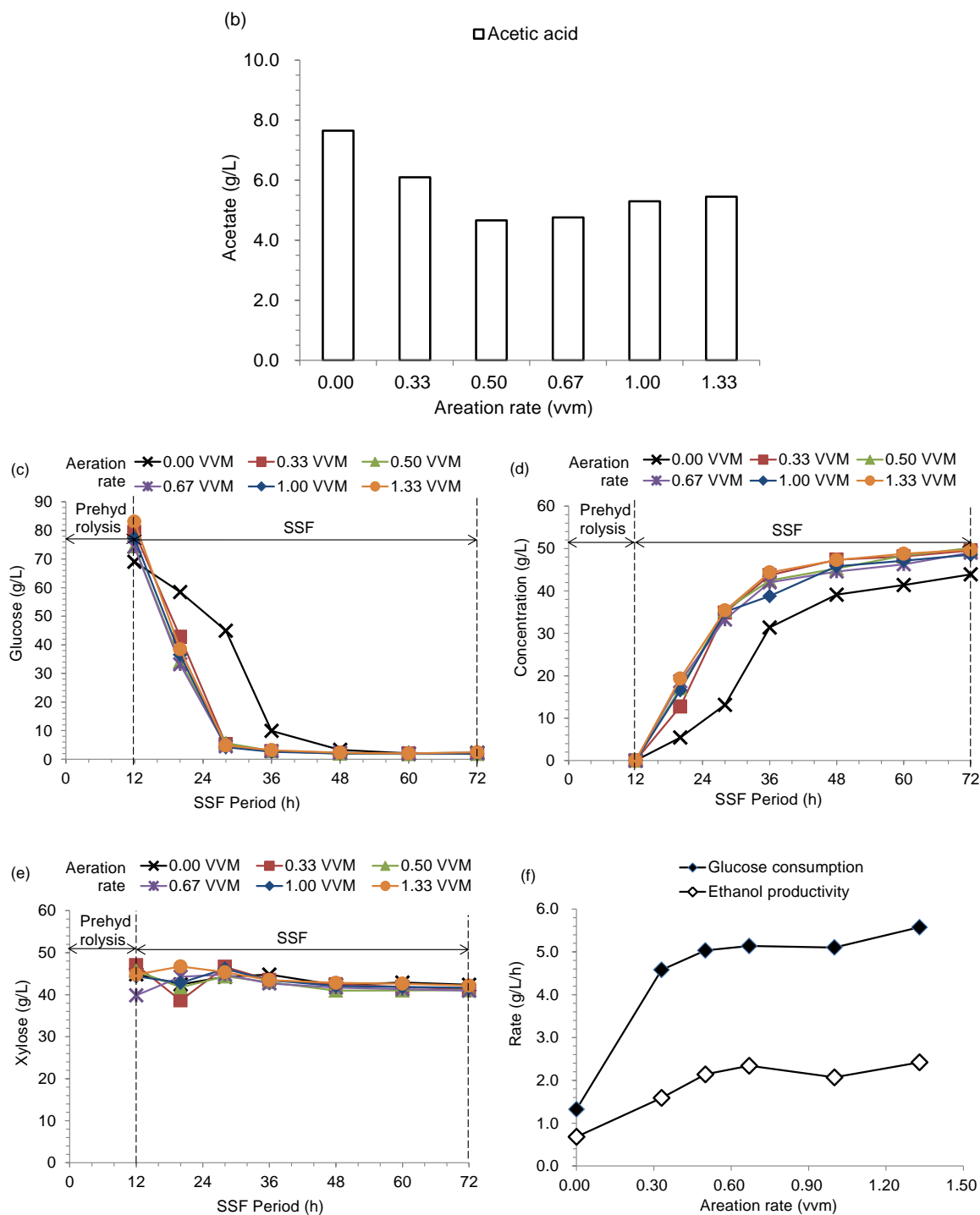


图 5.7 *A. resiniae* 在不同通气速率条件下脱毒后同步糖化发酵过程

Fig. 5.7 SSF using the detoxified corn stover by *A. resiniae* under different aeration rate

同步糖化发酵条件：30%固含量、15 FPU/g DM 酶用量、150 rpm 转速；预糖化 12 h、50 °C、pH 4.8；SSF：酿酒酵母接种量 10%、37 °C、pH 5.5。(a) 预糖化 12 h 后水解液中抑制物的含量；(b) 预糖化 12 h 后水解液中乙酸的含量；(c)葡萄糖消耗；(d)乙醇生产；(e)木糖变化趋势；(f) 发酵前 8 h 的葡萄糖消耗速率和乙醇产率。

与固态脱毒物料的乙醇发酵过程相似，增加氧气促进了脱毒过程中抑制物的降低，

提升了酵母的发酵速率 (图 5.7f), 当通气量从 0 增加至 1.33 VVM 后, 乙醇产率分别由 0.68 g/L/h 增加至 1.59、2.14、2.34、2.07 和 2.42 g/L/h。综合发酵 72 h 后的乙醇浓度以及乙醇产率来看, 经过 36 h 通气脱毒处理的预处理秸秆, 得到了与固态脱毒 4 天的秸秆相类似的结果 (81.13 g/L 葡萄糖, 50.00 g/L 乙醇以及 2.72 g/L/h 乙醇产率), 同时醪液中的木糖得到更多的保留 (图 5.5d、5.6e、5.7e)。另一方面, 在快速脱毒 36 h 后残留的呋喃醛类的代谢产物以及酚类物质, 并没有对乙醇的发酵产生明显的抑制作用, 因此快速脱毒过程只需要考虑将预处理秸秆中的糠醛、乙酸和 5-羟甲基糠醛快速降解, 作为快速生物脱毒的终点。结合对这些因素的考量, 1.00 VVM 通气速率、36 h 的脱毒时间是适合 *A. resinae* ZN1 在反应器内快速生物脱毒的条件, 并在后续脱毒研究中继续沿用这个条件。

5.3.4 改变糠醛含量对快速生物脱毒的影响

糠醛是预处理过程中由半纤维素在高温下降解产生的抑制物, 其浓度最容易受到预处理条件改变而发生变化。而快速脱毒以及后续发酵过程都受到了糠醛浓度的制约, 快速生物脱毒的性能也可能会受到糠醛浓度的改变而受到影响, 因此本节研究在于测试糠醛浓度的变化对于快速生物脱毒的影响。

图 5.8 显示了利用 *A. resinae* ZN1 对不同糠醛含量的秸秆进行快速生物脱毒以及同步糖化发酵的结果。实验中保持预处理秸秆中其他抑制物浓度不变, 人为调节初始糠醛浓度至 5 个梯度, 分别为 2.93、4.77、7.32、9.37、11.79 mg/g DM。随后接入 *A. resinae* 种子进行快速脱毒。随着糠醛浓度的上升, 快速脱毒 36 h 后糠醛残留的浓度越来越高, 糠醇的转化量逐渐减少, 当糠醛浓度由 2.93 增加至 11.79 mg/g DM 后, 糠醛被菌体转化为糠醇的转化率分别为 99.97%、95.70%、73.20%、31.50% 和 35.15% (图 5.8a 和 5.8b); 同时 5-羟甲基糠醛的代谢逐渐减慢, 当预处理秸秆中的糠醛浓度增加到 7.32 mg/g DM, 羟甲基糠醛在脱毒 36 h 后仍有残留, 并且在更高的糠醛初始浓度秸秆中, 其代谢被完全抑制 (图 5.8c), 同时羟甲基糠醇的生成量也相应降低。乙酸的代谢情况与羟甲基糠醛相似 (图 5.8e), 其代谢速率逐渐变缓并受到了抑制。本实验中, 糠醛浓度提高之后, 所有抑制物的代谢都受到了严重的抑制, 糠醛的增加使过程中糠醛到糠醇的转化率逐渐降低, 但糠醛依然随着脱毒的进行而浓度降低, 说明 *A. resinae* 在高浓度糠醛的胁迫下, 代谢能力减弱, 糠醛浓度的降低以挥发作用为主。另一方面, 糠醛转化能力的降低, 直接导致菌体继续将糠醇转化的能力下降, 降低了后续羟甲基糠醛和乙酸的代谢能力。

图 5.8f 中显示了经过快速脱毒 36 h 处理的不同初始糠醛浓度的秸秆进一步进行在位乙醇生产的结果。从图 5.8f 中可以看出, 初始含有 9.37 和 11.79 mg/g DM 糠醛浓度的预处理秸秆中, 经过预糖化后, 醪液中葡萄糖浓度只有 65.41 g/L 和 67.22 g/L, 低于初始糠醛浓度为 2.93、4.77 和 7.32 mg/g DM 的秸秆 (78.60、77.34 和 73.69 g/L)。而在乙醇发酵过程中, 初始糠醛浓度为 11.79 mg/g DM 的秸秆, 其发酵延滞期达到了 36 h 之久,

发酵 72 h 后的乙醇浓度只有 34.66 g/L; 而利用含有 2.93、4.77、7.32、9.37 mg/g DM 的秸秆, 发酵 72 h 的乙醇浓度达到了 51.55、48.56、52.12、49.82 g/L, 并且发酵速率都有

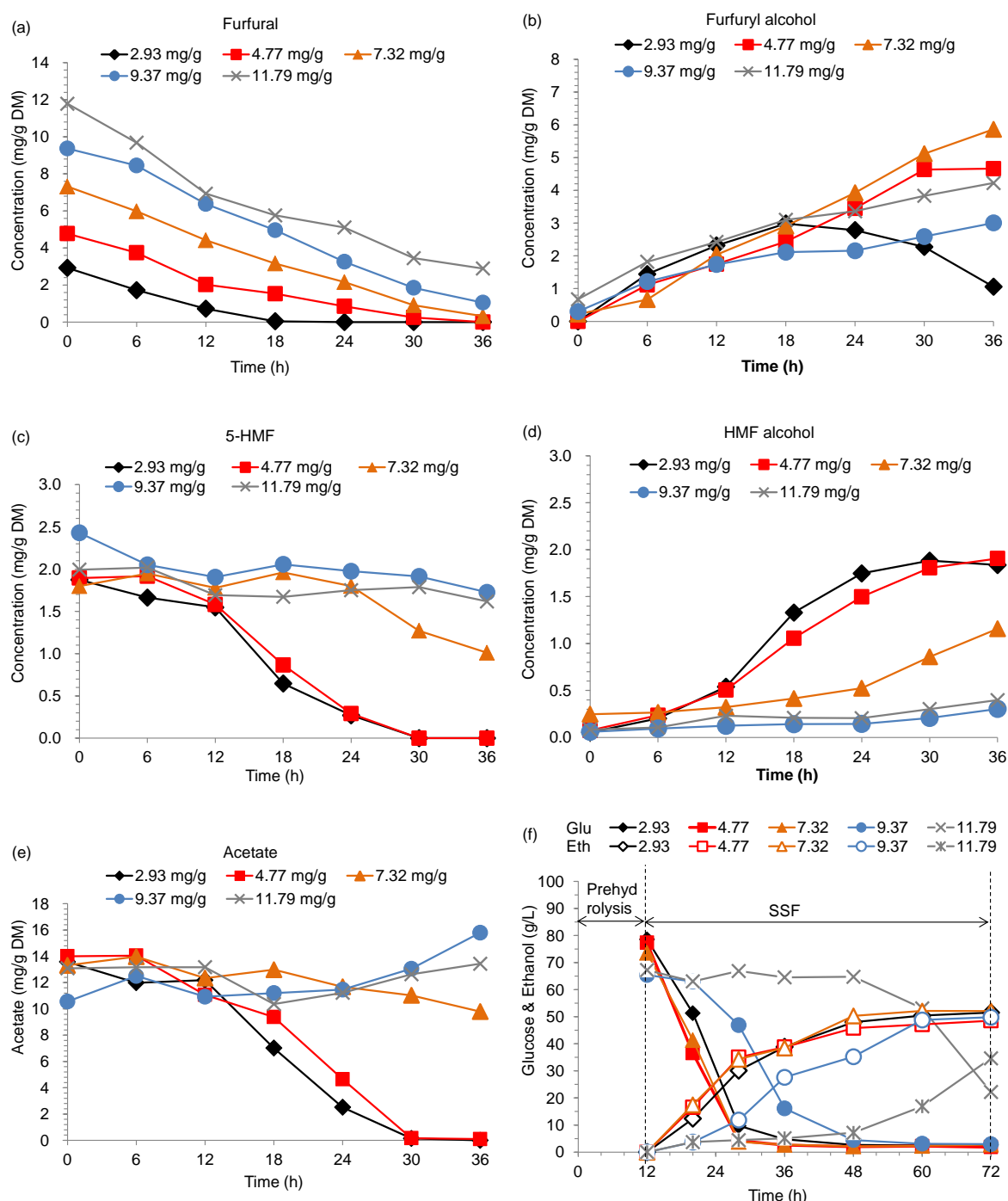


图 5.8 在不同初始浓度糠醛的预处理秸秆中 *A. resinae* 快速脱毒的应用

Fig. 5.8 Rapid detoxification by *A. resinae* under different initial furfural concentration

秸秆中糠醛初始浓度分别调整为 2.93、4.77、7.32、9.37 和 11.79 mg/g DM, 其他抑制物浓度不变。实验中脱毒时间为 36 h, 温度 28 °C, pH 5.5, 脱毒通气速率 150 L/h, 取样前 50 rpm 搅拌 90 s 混匀, 其他时间为静态过程。(a) 糠醛; (b) 糠醇; (c) 羟甲基糠醛; (d) 羟甲基糠醇; (e) 乙酸; (f) 30% 固含量、15 FPU/g DM 酶用量的 SSF 过程。

提高。另一方面, *S. cerevisiae* DQ1 乙醇发酵过程受到糠醛浓度的抑制作用比 *A. resinae* 快速脱毒更弱, 有两种可能原因, 第一, 从图 5.2 中的结果可以看出, 降低糠醛就可以促进同步糖化发酵过程。虽然高浓度糠醛的没有被菌体大量降解, 但是糠醛挥发降低了其在体系中的浓度, 从而减轻了对发酵过程的抑制作用; 第二, *S. cerevisiae* DQ1 在种子培养阶段需要经历驯化过程, 使其耐受糠醛的能力有所增加。本章中 *A. resinae* 在含有 7 mg/g DM (相当于液态浓度的 6 g/L) 的糠醛初始浓度下, 依然保持了生物代谢的活性, 并且经过生物降解后, 糠醛浓度不影响后续乙醇生产, 即 *A. resinae* 在复杂的预处理物料的体系中能够耐受大约 6 g/L 的糠醛浓度, 相比于文献中报道的高糠醛耐受菌株 *Leuconostoc strains* (5.2 g/L) [78] 和 *Enterobacter cloacae* GGT036 (5.8 g/L) [79] 而言, *A. resinae* ZN1 对于糠醛的耐受性处于较高水平。

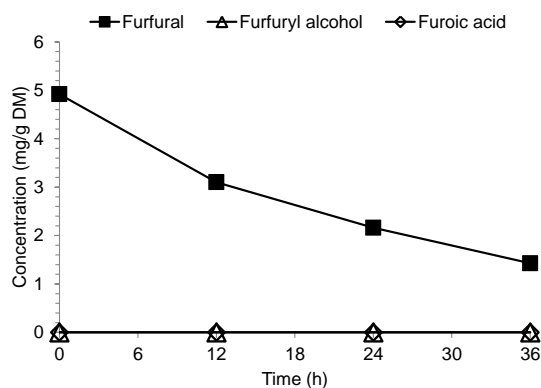


图 5.9 糠醛在 1.00 VVM 通气速率下的挥发情况

Fig. 5.9 Volatilization of furfural under 1.00 VVM aeration

5 L 反应器内装载 900 g 预处理物料, 不接入脱毒菌种。过程中调节无菌空气通气速率 1.00 VVM, 定时取样测定糠醛的挥发情况。

本实验中虽然菌体受到糠醛的严重抑制, 但是糠醛在通气作用下, 浓度仍然持续降低, 造成该现象的原因在于 1.00 VVM 通气速率下的糠醛挥发作用。为了解析糠醛生物转化和糠醛挥发两个因素在生物脱毒过程中所占的比重, 本实验亦研究了高空气通量下糠醛的挥发情况。在没有接种 *A. resinae* 的预处理秸秆中, 将空气通气量调节至 1.00 VVM, 观测糠醛的挥发 (图 5.9)。结果显示, 通气 12 h 后, 糠醛挥发量达到 36.95%, 通气 24 h 后, 糠醛挥发量达到 56.05%, 而通气 36 h 后, 糠醛挥发量高达 70.97%; 不过, 在糠醛的挥发过程中, 并没有糠醛的代谢产物糠醇和糠酸的生成, 该现象与 Ran 等 [95] 在合成培养基中的糠醛挥发现象一致。由于快速生物脱毒过程中, 糠醛、糠醇和糠酸之间的互相转化基本遵循物料守恒, 将该现象与糠醛的挥发实验结果相结合, 说明了糠醛在快速生物脱毒过程中, 生物转化起到了主导作用。另一方面, 在高浓度糠醛的胁迫作用下, 霉菌代谢糠醛能力大幅下降, 糠醛在持续通空气的过程中通过挥发作用, 浓度有所降低, 但是此时糠醛含量的减少并没有促进 *A. resinae* 对后续其他抑制物的快速降解。因此在

接入脱毒菌后，单纯地降低糠醛浓度并不能加速生物脱毒过程；相反，脱毒过程中通入空气后，霉菌代谢糠醛速率的加快，是促进整体抑制物转化的主导因素。另一方面，在本实验中添加的高通气量对升高的糠醛含量并没有产生转化促进作用，说明过程中供氧的增加无法加速糠醛转化为糠醇的还原反应，这也从一个侧面印证了在 5.3.2 章节中的推断：糠醛加速的过程中，增加供氧加速了糠醇向糠酸转化的氧化反应，从而使得后续抑制物的降解都得到了加速。

5.3.5 快速生物脱毒过程中菌体生长

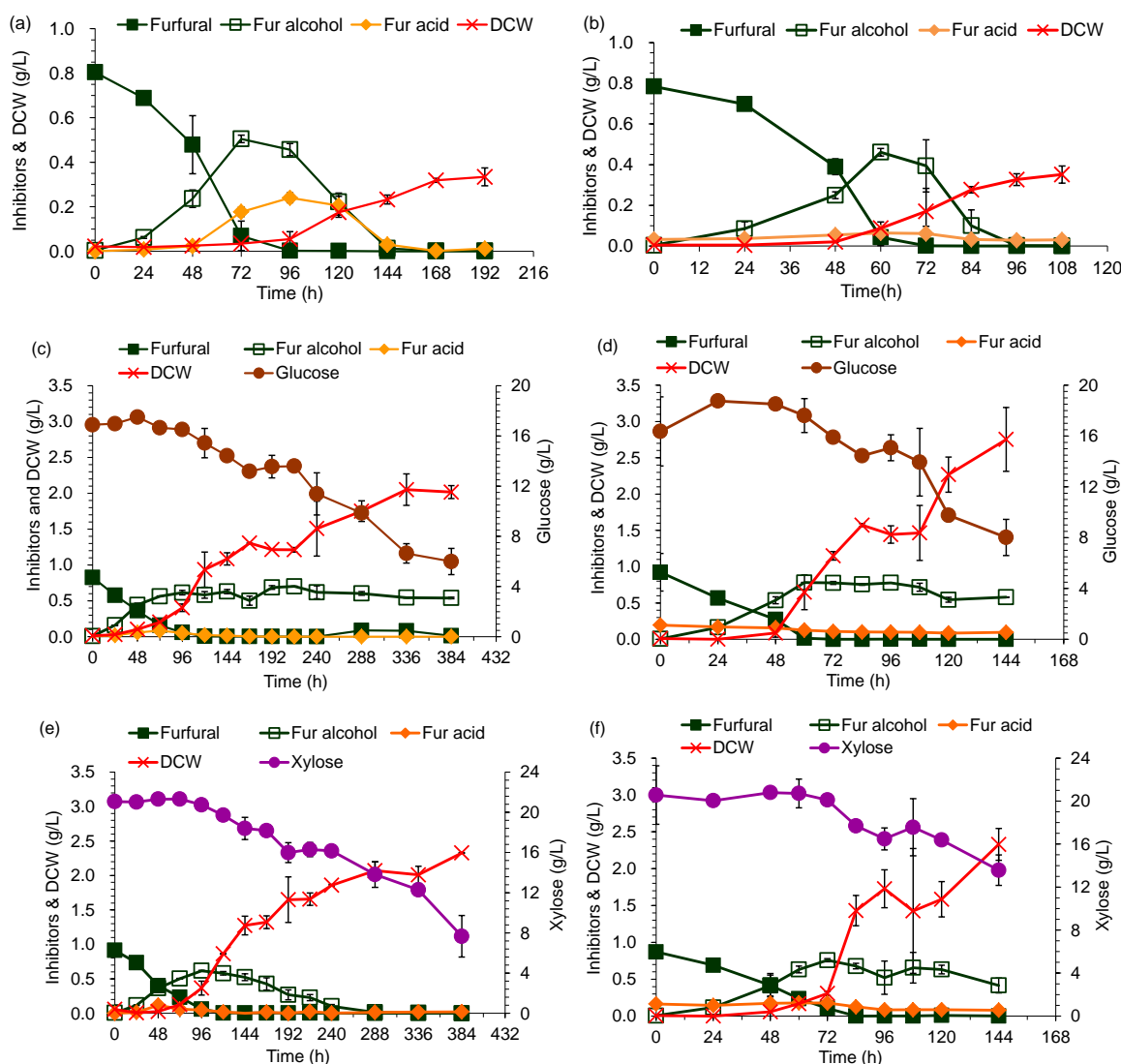


图 5.10 合成培养基中 *A. resiniae* 代谢糠醛过程中的代谢以及生长情况

Fig. 5.10 The growth and furfural metabolism by *A. resiniae* in the synthetic medium

培养条件 28°C，培养基 pH 自然。(a) 以 1 g/L 糠醛为唯一碳源静置培养；(b) 以 1 g/L 糠醛为唯一碳源 100 rpm 摇床培养；(c) 1 g/L 糠醛+20 g/L 葡萄糖静置培养；(d) 1 g/L 糠醛+20 g/L 葡萄糖 100 rpm 摇床培养；(e) 1 g/L 糠醛+20 g/L 木糖静置培养；(f) 1 g/L 糠醛+20 g/L 木糖 100 rpm 摇床培养。

在前两节的研究中发现通气对于糠醇氧化的促进作用是快速脱毒的主要因素，但是

A. resinae ZN1 作为好氧菌，在培养过程中增加溶氧有利于其生长代谢，菌体在氧气供给条件下的生长促进作用，也有可能是脱毒加速的另一个原因。因此本实验分别在液体培养基以及环境扫描电镜两种方式解析菌体在脱毒过程中生长情况。

由于糠醛的降解是整个脱毒过程的限速步骤，并且在实际快速脱毒的研究中，糠醛的生物转化促进了所有抑制物的代谢，因此本研究通过在合成培养基中添加糠醛，分别在低转速和静置条件下培养 *A. resinae*，研究菌体在糠醛这个脱毒限速步骤中过程中表现出的生长规律。图 5.10 为 *A. resinae* 在液体培养基中代谢糠醛的情况，其中图 5.10a、5.10c、5.10e 是静置培养过程，5.10b、5.10d、5.10f 是摇床 100 rpm 培养过程。在静置培养过程中，*A. resinae* 在转化糠醛生成糠醇，而此时菌体的生长处于停滞，当培养至糠醛浓度低于 0.1 g/L 后，菌体干重开始指数增长。在糠醛为唯一碳源的培养过程中，糠醇的消耗提供了菌体生长所需的碳源；而在含有葡萄糖和木糖的培养过程中，糖类的代谢为菌体生长提供了碳源。三个过程中都有一个共同点，在糠醛的代谢过程中，菌体的生长十分缓慢，当糠醛基本降解后，菌体才开始指数增长，因此糠醛无法成为菌体的直接碳源物质供给菌体的生长。

当培养过程置于摇床 100 rpm 后（图 5.10b、5.10d、5.10f），反应体系溶氧有所增加，三个过程中糠醛的降解都提速了约 24 h，但在糠醛降解阶段，菌体的生长依然没有明显增长趋势。而当糠醇或糖类的代谢启动后，菌体开始进入对数增长，这点与静置培养过程基本相同。增加溶氧后，除了糠醛代谢速率有所增加，其对于葡萄糖、木糖以及糠醇（糠醛为唯一碳源）代谢的促进作用明显。生长相同菌体量所用的时间，分别从 144 h 缩短至 96 h（图 5.10a、5.10b），384 h 缩短至 144 h（图 5.10c、5.10d、5.10e、5.10f），这样的碳源代谢现象符合好氧菌在溶氧充足条件下的生长规律。在脱毒过程中增加溶氧，能够有效地促进糠醛降解，但是糠醛生物转化过程中，菌体生长并不显著，当糠醛降解完全后，碳源物质的代谢速率随着溶氧的上升而大幅增加，使菌体代谢速率大幅加快，因此溶氧增加促进了菌体利用碳源生长的速率，但是并没有促进糠醛代谢过程中菌体的生长，糠醛代谢加速的原因可能与快速脱毒过程相似，糠醇到糠酸的快速生物转化使糠醛的代谢速率有所加快。

在快速脱毒过程中，由于菌体在反应器内难以观察到生长情况，且固体物料之中，菌体干重无法准确地进行测定，因此在本研究中曾经尝试采用菌体细胞壁内氨基葡萄糖含量、细胞体内 β -actin 含量等方法间接表征菌体生长，但是都因为预处理秸秆的复杂性而使实验受到严重干扰，难以准确测定。因此在比较各个检测方式之后，本研究采用环境扫描电镜（ESEM）对菌体以及秸秆表面直接进行形态观察，近似地表征菌体在脱毒过程中的生长情况。

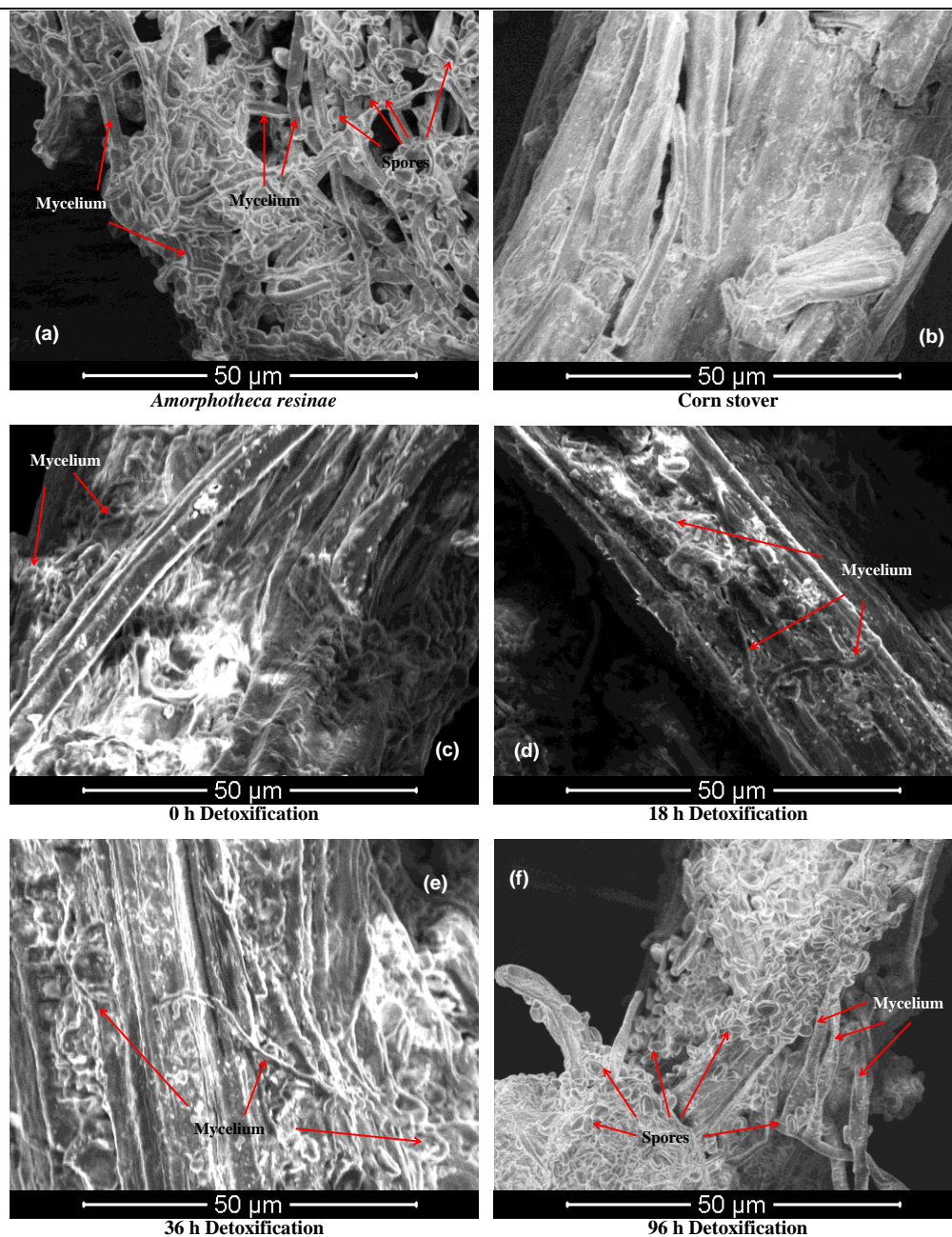


图 5.11 1.00VVM 通气快速生物脱毒过程中菌体的生长情况。

Fig. 5.11 The growth of *A. resinae* during the rapid detoxification under 1.00 VVM aeration
 采用环境扫描电镜观察秸秆表面菌体的生长状况，环境扫描电镜放大 2000 倍。(a) *A. resinae* 种子；
 (b) 预处理秸秆；(c) 快速脱毒 0 h；(d) 快速脱毒 18 h；(e) 快速脱毒 36 h；(f) 快速脱毒 96 h。

图 5.11 分别列出了未经接种的预处理秸秆、*A. resinae* 在 PDA 斜面上的种子培养以及 1.00 VVM 通气量下快速脱毒过程中菌体的生长。与未接种脱毒菌的秸秆相比，接入 *A. resinae* 的秸秆 (0 h) 表面呈现毛绒状，并且可以观察到少量的菌丝体；而随着脱毒的进行至 18 h，秸秆表面的菌丝体数量有少量的增加，此时秸秆中的糠醛浓度降低至原浓度的一半左右；当脱毒继续进行到 36 h 后，菌丝体增加量变大，此时抑制物降解完全，并且菌体已经开始利用秸秆中游离的葡萄糖（图 5.5a）进行生长。当脱毒进行到 96 h 后，秸秆表面覆盖了浓密的菌丝体，并伴随着大量孢子的产生，此时木糖已经被消耗了

大约 40 mg/g DM (图 5.5b), 大量木糖的消耗成为了菌体生长的碳源。通过显微镜的观察发现, 菌体在快速脱毒过程中的生长规律与合成培养基中的类似, 即抑制物降解阶段, 菌体的生长量非常有限, 即使是在 1.00 VVM 下的高通气速率条件下。通过对于菌体在脱毒过程中生长情况的监测, 说明了在 *A. resinae* 在抑制物降解的过程中没有大量的生长, 证明通气作用主要促进了菌体对于抑制物的代谢。

5.3.6 脱毒过程中接种量对于快速脱毒的影响

表 5.1 不同接种量对于生物脱毒过程的影响

Table 5.1 The impact of inoculum on the rapid detoxification

抑制物	抑制物的降解速率 (mg/g DM/h)		
	<i>A. resinae</i> 接种量 (降解时间段)		
	5%	10%	20%
糠醛	0.086 (0~56 h)	0.204 (0~24 h)	0.206 (0~24 h)
5-羟甲基糠醛	0.033 (18~64 h)	0.080 (6~30 h)	0.086 (6~24 h)
乙酸	0.339 (36~72 h)	0.472 (6~36 h)	0.297 (0~30 h)
96 h 后糖类的总消耗量 (mg/g DM)			
葡萄糖	8.04	10.60	9.29
木糖	0	46.44	49.08

快速脱毒条件: 1.00 VVM 通气量、28 °C、pH 5.5, 过程中低速间歇搅拌用于混合

在液体培养基中的培养以及实际生物脱毒的过程中, 增加溶氧可以加快 *A. resinae* 转化糠醛, 但无法加速菌体在糠醛转化阶段的生长量, 因此本实验通过调整脱毒过程的接种量, 进一步测试在实际脱毒过程中菌体是否生长。表 5.1 为不同接种量对于 *A. resinae* ZN1 降解抑制物的影响。将接种量降低至 5% (w/w) 后, 糠醛的降解速率明显减慢, 而羟甲基糠醛转化速率亦随接种量的降低而减慢, 乙酸的降解速率基本相似。在通气脱毒的 96 h 中, 5% 接种量的实验中葡萄糖消耗量相比于 10% 和 20% 接种量要少, 木糖在过程中没有消耗, 说明降低接种量后霉菌受到糠醛强烈的抑制作用, 使得后续菌体对木糖消耗也基本处于停滞。

本实验中, 降低接种量至 5% 后, 抑制物和糖类的降解速率都大幅度的减慢, 而增加接种量至 20% 后, 过程中降解速率基本与 10% 接种量相类似, 说明脱毒过程中 10% 接种量下菌体量已经足够, 同时也说明了初始接种量在脱毒第一步糠醛降解过程中起到重要作用。降低接种量降低了菌体对糠醛的转化能力, 意味着脱毒过程中无法保证初始接入足够的菌体用于糠醛的转化, 即使在快速脱毒条件的高通气量 1.00 VVM 的辅助下,

也无法加速菌体对抑制物的降解。这从一个侧面说明了在抑制物降解的过程中, 菌体并没有大量的生长, 若菌体能够在抑制物降解的同时有所生长, 那么新生长的菌体就会弥补接种量不足造成的抑制物降解缓慢。而实验结果中, 脱毒接种量的降低, 极大程度地影响了脱毒的速率。这一点与增加糠醛浓度的实验结果相似, 催化糠醛过程中所需的酶量不足(菌体), 增加氧气的供给也无法加速糠醛转化为糠醇的过程, 再一次印证了氧气供给确实是促进糠醇向糠酸的转化过程, 而非糠醛向糠醇的转化过程。

5.3.7 快速生物脱毒原理分析

在菌体生长的测定实验中, 无论是在成分简单的合成培养基还是实际的预处理秸秆中, 氧气并没有促进 *A. resinae* ZN1 降解糠醛过程中菌体的生长, 因此, 其作用机理在于促进糠醛还原为糠醇的酶反应过程。Ran 等^[95]结合现有报道的糠醛、羟甲基糠醛的代谢路径以及 *A. resinae* 代谢糠醛和羟甲基糠醛的实验结果, 分析了 *A. resinae* ZN1 在代谢糠醛和羟甲基糠醛的代谢路径。糠醛首先被还原为糠醇, 反应中需要消耗 NAD(P)H 作为醇脱氢酶或者醛还原酶参与糠醛还原反应的辅酶; 随后生成的糠醇又会被转化为低浓度的糠醛, 此时 NAD(P)H 又可以被重新生成, 使代谢过程存在一个氧化还原平衡; 糠醛氧化为糠酸的过程中, 氧气直接作为底物参与该反应, 过程中生成 NAD(P)H。根据不同通气量、糠醛初始浓度以及不同接种量的实验结果, 通气速率的增加并没有促进糠醛的还原过程, 而是促进了后续糠醇转化为糠酸的过程, 从而加速了 NAD(P)H 在过程中的再生, 直接供给糠醛的进一步还原反应, 使糠醛降解速率加快。另外, 糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸的生物转化都需要用到 NAD(P)H 作为辅酶^[142], 因此这个过程产生的足量 NAD(P)H 还可以供给后续 5-羟甲基糠醛的还原以及乙酸的降解过程, 从而脱毒过程得到了加速。类似现象亦可在液体培养基的培养过程中可见: 在糠醛为唯一碳源的实验中, 增加溶氧后, 糠醇生成量明显减少, 糠酸积累量亦减少, 说明在没有其他碳源支持菌体代谢的情况下, *A. resinae* 既需要糠醇转化为糠酸产生 NAD(P)H 支持糠醛的转化, 亦需要通过糠酸进一步进入 TCA 的过程, 产生更多的 ATP 支持菌体的生长; 而当糖类存在的培养过程中, 糠醇的降解和糠酸的生成被糖类的代谢所遏制, 因此为糠醛代谢提供 NAD(P)H 来源于糖类代谢, 增加溶氧后, 糖类代谢起点明显要早于静置培养的过程(图 5.10d 和 5.10f)。因此, 氧气促进糠醇向糠酸的转化, 是抑制物代谢加速的最主要原因。

5.4 本章小结

本章研究重点关注了由于缺乏传质、发酵调控而速率减慢的树脂枝孢霉固态生物脱毒技术, 以快速生物脱毒为目标展开研究。实验中将预处理物料的脱毒过程置于 5 L 螺旋带搅拌桨反应器中进行, 在增加氧气供给和搅拌混合后, 菌体降解糠醛、羟甲基糠醛和乙酸的速率得到了提升, 脱毒时间被缩短至原先固态脱毒的 1/3, 大幅增进了脱毒过程

的效率。在本章研究中得到如下结论：

- 1) 通过研究树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 对稀酸预处理秸秆固态脱毒过程的抑制物降解和乙醇生产情况，将脱毒终点定在糠醛、羟甲基糠醛和乙酸这三种含量最高的抑制物完全降解的时刻。在固态脱毒过程中，脱毒需要 4 天才能完成。
- 2) 将脱毒过程转移至螺带搅拌桨生物反应器中，增加过程中氧气供给，大幅加快了脱毒过程中 *A. resinae* ZN1 降解糠醛、羟甲基糠醛和乙酸的速率，在 1.00 VVM 通气速率下，脱毒过程在 36 h 完成，脱毒时间缩短至固态过程的 1/3。随后的乙醇发酵过程中，乙醇浓度与产率和固态脱毒 4 天的结果相似，实现了生物脱毒的加速。
- 3) 螺带搅拌的间歇低速搅拌可以充分改进固态脱毒体系中霉菌的分布，有效地避免了 *A. resinae* ZN1 在脱毒过程中的局部代谢效应，保留了预处理过程中产生的木糖，提高了脱毒效率。
- 4) 脱毒过程中增加溶氧可以加速糠醇到糠酸的转化，过程中生成了足量的抑制物代谢所需还原力，促进了糠醛、羟甲基糠醛以及乙酸的降解，从而加速了生物脱毒过程。
- 5) 在同一个生物反应器内将树脂枝孢霉 *A. resinae* ZN1 的快速脱毒过程与脱毒物料的同时糖化发酵过程相耦合，省去了从脱毒工段到发酵工段的物料传输和反应器设备的投入，更加适用于工业化生物炼制生产过程中的脱毒和发酵工序。

第 6 章 结论与展望

6.1 结论

干法生物炼制过程虽然拥有高固含量预处理过程中的各项优势，但是过程中干式稀酸预处理技术和固态生物脱毒技术缺乏有效的传质传热，成为了工业化过程中的瓶颈。本文的研究内容针对这个问题深入展开，分别在干式稀酸预处理和固态生物脱毒两方面进行深入研究和改进，对这两个过程在工业化生产中存在的传质传热、成本投入等问题提出了有效的解决方案。以下是本文研究中主要的结论与创新点：

- 1) 本实验中设计了一种适用于高固体含量预处理过程的新型螺带搅拌浆预处理反应器。该反应器能够处理干式预处理体系中（固含量 70% 左右）的固液混合传质，强化了预处理后物料的酶解糖化和乙醇发酵的性能，降低了预处理的温度和过程中抑制物的产生，改进了干式稀酸预处理在工业化生产中的实用性。该反应器在高固体含量预处理过程中表现出的高效混合作用，表现出了其在预处理工业化中的应用潜能，为工业化预处理提供了良好的反应器设计原型。
- 2) 带有螺带搅拌混合作用的预处理反应器实现了预浸步骤从预处理过程中的去除。螺带搅拌对固体物料和液体催化剂之间混合传质的强化，取代了长周期预浸过程，即使在干式稀酸预处理这样的超高固含量体系中，没有预浸步骤的预处理效率与预浸 12 h 的预处理效率基本一致。去除预浸步骤大幅简化了预处理放大生产中的操作过程，减少预浸所带来的物料储存、运输和反应器腐蚀等问题，为干法生物炼制过程在工业化应用提供了一个理想的生产模式。
- 3) 通过深入研究原料的灰分含量对预处理的影响，强调了去除灰分在预处理过程中的重要性。灰分中存在的大量无机离子会吸收预处理过程中加入的液体催化剂，从而降低其在预处理过程中的催化性能，影响预处理后物料的酶解糖化和发酵性能。因此，灰分必须作为一项评估预处理原料的重要指标，而除尘相比于预处理过程的改进，其对于预处理效果的促进作用更加明显。本研究为预处理原料前处理指标的制定提供了严格的科学依据。
- 4) *A. resinae* ZN1 快速生物脱毒可以通过增加固态培养过程中的氧气供给来实现。合适的通气速率能有效促进菌体对糠醛、羟甲基糠醛和乙酸的快速转化，缩短了脱毒周期，强化了干法生物炼制的效率。另一方面，脱毒过程中的间歇搅拌作用，使菌体在脱毒体系中的分布更加均匀，保留了大量木糖，提高脱毒效率。另一方面，同步糖化发酵和快速脱毒的在位耦合，可以减少工业化过程中的反应器和传输设备的成本投入，增强了快速脱毒过程在工业化应用中的实用性。
- 5) 结合无需预浸的螺带式搅拌预处理和快速生物脱毒过程，使干法生物炼制过程的周

期大幅缩短。螺带搅拌解决了干式预处理技术在工业化应用中存在的传质传热不足；氧气供给实现了生物脱毒过程的快速高效。另一方面，螺带搅拌作用降低了稀酸预处理过程中抑制物的产生，为快速生物脱毒过程提供了便利。通过将这两个过程进行研究和改进，为干法生物炼制在工业化生产中的应用提供了可靠的技术支持。

6.2 展望

本研究中的干法生物炼制过程，解决了传质传热不足造成的问题。在研究过程中，仍然存在一些可以继续改进之处，在此进行后续展望：

- 1) 增强预处理操作的连续性。可以在后续的研究中针对干式稀酸预处理过程，进一步改进反应器设计，实现干式稀酸预处理的连续操作，提高生产效率。
- 2) 预处理原料机械除尘后的预处理效率评价。本文提出了在工业化生物炼制过程中，采用机械除尘方法替代水洗除尘方法，但由于实验室研究条件受限，本文未能对机械除尘后的玉米秸秆进行预处理，并评价预处理后物料的酶解糖化和发酵性能。因此，可在后续的预处理研究中尝试用机械除尘替代水洗除尘，更加工业化生物炼制的工艺，为干法生物炼制的工业化提供更多可靠的数据支持。
- 3) 快速生物脱毒过程树脂枝孢霉耐受抑制物能力提高。在当前的预处理条件下，*A. resinae* ZN1 可以快速地转化预处理过程产生的抑制物，但菌体对于抑制物的耐受性仍然有待提高。为了应对更强的预处理条件，可以将菌体置于高抑制物含量环境中进行驯化，进一步增强脱毒性能。
- 4) 快速脱毒过程中种子培养的提速。目前在快速脱毒的过程中，脱毒种子的培养还是采用传统固态脱毒的方式进行，可以进一步研究种子培养过程的加速，对已有的快速脱毒过程进一步提速。
- 5) 酿酒酵母 DQ1 在位脱毒能力的增强。酿酒酵母 DQ1 也能够代谢糠醛、羟甲基糠醛等抑制物，但是由于缺乏将糠醇转化为糠酸的能力，使其耐受和代谢抑制物能力有限。树脂枝孢霉 *A. resinae* 可以有效地将糠醇转化为糠酸，进而促进其他抑制物的降解，因此可以考虑将树脂枝孢霉中糠醇糠酸转化的关键基因在酿酒酵母中进行表达，提高酿酒酵母在抑制物环境中的耐受性和代谢能力，实现酵母在发酵过程中的在位脱毒。

参考文献

1. Luo L, van der Voet E, Huppes G. Biorefining of lignocellulosic feedstock-Technical, economic and environmental considerations. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 5023-5032.
2. Kamm B, Kamm M. Principles of biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64: 137-145.
3. Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2008, 2: 26-40.
4. Bhatia L, Johri S, Ahmad R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. *AMB Express*. 2012, 2: 65.
5. Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 2000, 74: 17-24.
6. Chiamonti D, Prussi M, Ferrero S, et al. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass and Bioenergy*. 2012, 46: 25-35.
7. Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4851-4861.
8. 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.
9. Torget R, Werdene P, Himmel M, et al. Dilute acid pretreatment of short rotation woody and herbaceous crops. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1990, 24/25: 115-126.
10. Saha BC, Iten LB, Cotta MA, et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*. 2005, 40: 3693-3700.
11. Linde M, Jakobsson EL, Galbe M, et al. Steam pretreatment of dilute H₂SO₄-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2008, 32: 326-332.
12. Sassner P, Martensson CG, Galbe M, et al. Steam pretreatment of H₂SO₄-impregnated *Salix* for the production of bioethanol. *Bioresource Technology*. 2008, 99: 137-145.
13. Nichols NN, Dien BS, Cotta MA. Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 7445-7450.

14. Taherzadeh MJ, Karimi K. Enzyme-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*. 2007, 2:707-738.
15. Modenbach AA, Nokes SE. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment—a review. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, 109: 1430-1442.
16. Hodge DB, Karim MN, Schell DJ, et al. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresource Technology*. 2008, 99: 8940-8948.
17. Roche CM, Dibble CJ, Knutsen JS, et al. Particle concentration and yield stress of biomass slurries during enzymatic hydrolysis at high-solids loadings. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009, 104: 290-300.
18. Stickel JJ, Knutsen JS, Liberatore MW, et al. Rheology measurements of a biomass slurry: an inter-laboratory study. *Rheologica Acta*. 2009, 48: 1005-1015.
19. Mohagheghi A, Schell DJ. Impact of recycling stillage on conversion of dilute sulfuric acid pretreated corn stover to ethanol. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105: 992-996.
20. Jorgensen H. Effect of nutrients on fermentation of pretreated wheat straw at very high dry matter content by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 153: 44-57.
21. Kristensen JB, Felby C, Jorgensen H. Yield-determining factors in high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnology for Biofuels*. 2009, 2:11.
22. 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.
23. Jorgensen H, Kristensen JB, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: Challenges and opportunities. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2007, 1:119-134.
24. Llamas P, Dominguez T, Vargas JM, et al. A novel viscosity reducer for kraft process black liquors with a high dry solids content. *Chemical Engineering and Processing*. 2007, 46: 193-197.
25. Jorgensen H, Vibe-Pedersen J, Larsen J, et al. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, 96: 862-870.
26. Allen SG, Schulman D, Lichwa J, et al. A comparison between hot liquid water and steam fractionation of corn fiber. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 2001, 40: 2934-2941.

27. Zhu YM, Lee YY, Elander RT. Dilute-acid pretreatment of corn stover using a high-solids percolation reactor. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004, 117(2): 103-114.
28. Kootstra AMJ, Beeftink HH, Scott EL, et al. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, 46: 126-131.
29. Petersen MO, Larsen J, Thomsen MH. Optimization of hydrothermal pretreatment of wheat straw for production of bioethanol at low water consumption without addition of chemicals. *Biomass Bioenergy*. 2009, 33: 834-840.
30. Lu XB, Zhang YM, Angelidaki I. Optimization of H₂SO₄-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: Focusing on pretreatment at high solids content. *Bioresource Technology*. 2009, 100: 3048-3053.
31. Luterbacher JS, Tester JW, Walker LP. High-solids biphasic CO₂-H₂O pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 107: 451-460.
32. Zhu JY, Pan XJ, Wang GS, et al. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine. *Bioresource Technology*. 2009, 100: 2411-2418.
33. Teymouri F, Laureano-Perez L, Alizadeh H, et al. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresource Technology*. 2005, 96: 2014-2018.
34. Kim Y, Ximenes E, Mosier NS, et al. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme Microbial and Technology*. 2011, 48: 408-415.
35. Humbird D, Davis R, Tao L, et al. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Technical report NREL/TP-5100-47764. Golden, Colorado: NREL, 2011.
36. Chen X, Tao L, Shekiri J, et al. Improved ethanol yield and reduced Minimum Ethanol Selling Price (MESP) by modifying low severity dilute acid pretreatment with deacetylation and mechanical refining: 1) Experimental. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5: 60.
37. Zhang J, Hou W, Bao J. Reactors for high solid loading pretreatment of lignocellulosic biomass. *Advance in Biochemical Engineering/Biotechnology*. DOI 10.1007/10_2015_307.
38. 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.
39. Mussatto SI, Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic

- hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresource Technology*. 2004, 93: 1-10.
40. Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Review in Biotechnology*. 2011, 31: 20-31.
 41. Almeida JRM, Modig T, Petersson A. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, 82: 340-349.
 42. 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.
 43. Li H, Chen H. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process Biochemistry*. 2008, 43: 1447-1451.
 44. Lu Y, Chu J, Zhuang Y, 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.
 45. Wu D, Li Q, Wang D, et al. Enzymatic hydrolysis and succinic acid fermentation from steam-exploded corn stalk at high solid concentration by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013, 170: 1942-1949.
 46. 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.
 47. Converti A, Dominguez JM, Perego P, et al. Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production. *Chemical Engineering and Technology*. 2000, 23: 1013-1020.
 48. Mussatto SI, Roberto IC. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters*. 2001. 23: 1681-1684.
 49. Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*. 2007, 98: 1947-1950.
 50. 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
 51. 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.
52. 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.
53. 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.
54. Gyalai-Korpos M, Mangel R, Alvira P, et al. Cellulase production using different streams of wheat grain- and wheat straw-based ethanol processes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011, 38: 791-802.
55. Nilvebrant NO, Reimann A, Larsson S, et al. Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2001, 91/93: 35-49.
56. Zhuang J, Liu Y, Wu Z, et al. Hydrolysis of wheat straw hemicellulose and detoxification of the hydrolysate for xylitol production. *BioResources*. 2009, 4: 674-686.
57. Zhu JY, Zhu W, Obryan PE, et al. Ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine: preliminary evaluation of mass balance and process energy efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 86: 1355-1365.
58. Chandel AK, da Silva SS, Singh OV. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. *Bioenergy Research*. 2013, 6: 388-401.
59. Dong H, Bao J. Biofuel via biodetoxification. *Nature Chemical Biology*. 2010, 6: 316-318.
60. Jonsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, et al. Detoxification of wood hydrolysate with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *T. versicolor*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998, 49: 691-697.
61. Hoshida H, Fujita T, Murata K, et al. 2005. Copper-dependent production of a *Pycnoporus coccineus* extracellular laccase in *Aspergillus oryzae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2005, 69: 1090-1097.
62. Necochea R, Valderrama B, Diaz-Sandoval S, et al. Phylogenetic and biochemical characterisation of a recombinant laccase from *Trametes versicolor*. *FEMS Microbiology Letters* 244: 235-241.
63. Piscitelli A, Giardina P, Mazzoni C, et al. Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology*

- and Biotechnology. 2005, 69: 428-439.
64. Taherzadeh MJ, Gustafsson L, Niklasson C, et al. Conversion of furfural in aerobic and anaerobic batch fermentation of glucose by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 1999, 87: 169-174.
 65. Liu ZL, Slininger PJ, Gorsich SW. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2005, 121-124: 451-460.
 66. Liu ZL, Moon J, Andersh BJ. Multiple gene-mediated NAD(P)H-dependent aldehyde reduction is a mechanism of in situ detoxification of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2008, 81: 743-753.
 67. Heer D, Heine D, Sauer U. Resistance of *Saccharomyces cerevisiae* to high concentrations of furfural is based on NADPH-dependent reduction by at least two oxidoreductases. Applied and Environmental Microbiology. 2009, 75: 7631-7638.
 68. Park SE, Koo HM, Park YK, et al. Expression of aldehyde dehydrogenase 6 reduces inhibitory effect of furan derivatives on cell growth and ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology. 2011, 102: 6033-6038.
 69. Fujitomi K, Sanda T, Hasunuma T, et al. Deletion of the PHO13 gene in *Saccharomyces cerevisiae* improves ethanol production from lignocellulosic hydrolysate in the presence of acetic and formic acids, and furfural. Bioresource Technology. 2012, 11: 161-162.
 70. Gutierrez T, Ingram LO, Preston JF. Purification and characterization of a furfural reductase (FFR) from *Escherichia coli* strain LY01—An enzyme important in the detoxification of furfural during ethanol production. Journal of Biotechnology. 2006, 121: 154-164.
 71. Zheng H, Wang X, Yomano LP, et al. Increase in furfural tolerance in Ethanologenic *Escherichia coli* LY180 by plasmid-based expression of *thyA*. Applied and Environmental Microbiology. 2012, 78: 4346-4352.
 72. Wang X, Yomano LP, Lee JY., et al. Engineering furfural tolerance in *Escherichia coli* improves the fermentation of lignocellulosic sugars into renewable chemicals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2013, 110: 4021-4026.
 73. 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.

74. Franden MA, Pienkos PT, Zhang M. Development of a high-throughput method to evaluate the impact of inhibitory compounds from lignocellulosic hydrolysates on the growth of *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*. 2009, 144: 259-267.
75. Yang S, Pelletier DA, Lu TYS, et al. The *Zymomonas mobilis* regulator *hfq* contributes to tolerance against multiple lignocellulosic pretreatment inhibitors. *BMC Microbiology*. 2010, 10: 135.
76. Dong H, Fan L, Luo Z, et al. Improvement of ethanol productivity and energy efficiency by degradation of inhibitors using recombinant *Zymomonas mobilis* (pHW20a-*fdh*). *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 110: 2395-2404.
77. Tsuge Y, Hori Y, Kudou M, et al. Detoxification of furfural in *Corynebacterium glutamicum* under aerobic and anaerobic conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, 98:8675-8683.
78. Hunter WJ, Manter DK. Pre-treatment step with *Leuconostoc mesenteroides* or *L. pseudomesenteroides* strains removes furfural from *Zymomonas mobilis* ethanolic fermentation broth. *Bioresource Technology*. 2014, 169: 162-168.
79. Choi SY, Gong G, Park HS, et al. Extreme furfural tolerance of a soil bacterium *Enterobacter cloacae* GGT036. *Journal of Biotechnology*. 2015, 193: 11-13.
80. Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B, Szengyel Z, et al. Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*. 1997, 20: 286-293.
81. Okuda N, Soneura M, Ninomiya K, et al. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008, 106: 128-133.
82. 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.
83. Saha BC, Nichols NN, Cotta MA. 2011. Ethanol production from wheat straw by recombinant *Escherichia coli* strain FBR5 at high solid loading. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 10892-10897.
84. Nichols NN, Hector RE, Saha BC, et al. Biological abatement of inhibitors in rice hull hydrolyzate and fermentation to ethanol using conventional and engineered microbes. *Biomass and Bioenergy*. 2014, 67: 79-88.
85. Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the

- consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26.
86. 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.
87. Fonseca BG, Moutta RO, Ferraz FO, et al. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2011, 38: 199-207.
88. Yu Y, Feng Y, Xu C, et al. Onsite bio-detoxification of steam-exploded corn stover for cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 5123-5128.
89. Zhang D, Ong Y L, Li Z, et al. Biological detoxification of furfural and 5-hydroxyl methyl furfural in hydrolysate of oil palm empty fruit bunch by *Enterobacter* sp. FDS8. *Biochemical Engineering Journal*. 2013, 72: 77-82.
90. Ra CH, Jeong G T, 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.
91. Koppram R, Albers E, Olsson L. Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5: 32.
92. Wallace-Salinas V, Gorwa-Grauslund MF. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6: 151.
93. Almario MP, Reyes LH, Kao KC. Evolutionary engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for enhanced tolerance to hydrolysates of lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 110: 2616-2623.
94. Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, et al. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008, 42: 624-630.
95. Ran H, Zhang J, Gao Q, et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7: 51.
96. Koopman F, Wierckx N, de Winde JH, et al. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, 107: 4919-4924.

97. Almeida JRM, Modig T, Roder A, et al. *Pichia stipitis* xylose reductase helps detoxifying lignocellulosic hydrolysate by reducing 5-hydroxymethyl-furfural (HMF). *Biotechnology for Biofuels*. 2009, 1: 12.
98. Zhang Y, Han B, Ezeji TC. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. *New Biotechnology*. 2012, 29: 345-351.
99. Parbery DG. *Amophotheca resiniae* GEN. NOV., SP. NOV.: The perfect state of *Cladosporium resiniae*. *Australian Journal of Biotechnology*. 1969, 17: 331-357.
100. The JS, Lee KH. Utilization of n-Alkanes by *Cladosporium resiniae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1973, 25: 454-457.
101. Walker JD, Cooney JJ. Pathway of n-alkane oxidation in *Cladosporium resiniae*. *Journal of Bacteriology*. 1973, 115: 635-639.
102. Guo L, Zhang J, Hu F, et al. Consolidated bioprocessing of highly concentrated Jerusalem artichoke tubers for simultaneous saccharification and ethanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 110: 2606-2615.
103. Dao TH, Zhang J, Bao J. Characterization of inulin hydrolyzing enzyme(s) in commercial glucoamylases and its application in lactic acid production from Jerusalem artichoke tubers (Jat). *Bioresource Technology*. 2013, 148: 157-162.
104. Zhang J, Fang Z, Deng H, et al. Cost analysis of cassava cellulose utilization scenarios for ethanol production on flowsheet simulation platform. *Bioresource Technology*. 2013, 134: 298-306.
105. Gu H, Zhang J, Bao J. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues. *Bioresource Technology*. 2014, 157: 6-13.
106. Lei C, Zhang J, Xiao L, et al. An alternative feedstock of corn meal for industrial fuel ethanol production: Delignified corncob residue. *Bioresource Technology*. 2014, 167: 555-559.
107. Zhao K, Qiao Q, Chu D, et al. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 481-489.
108. Wyman CE, Dale BE, Elander RT, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96: 1959-1966.
109. Zhu JY, Pan XJ, Zalesny RS Jr. Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology. 2010, 87: 847-857.
110. Galbe M, Zacchi G. Pretreatment: the key to efficient utilization of lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*. 2012, 46: 70-78.
 111. Hsu TC, Guo GL, Chen WH, et al. Effect of dilute acid pretreatment of rice straw on structural properties and enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4907-4913.
 112. Liu W, Wang Y, Yu Z, et al. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2012, 118: 13-18.
 113. Chu D, Zhang J, Bao J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of corn stover at high temperature and high solids loading by a thermotolerant strain *Saccharomyces cerevisiae* DQ1. *Bioenergy Research*. 2012, 5: 1020-1026.
 114. Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities, laboratory analytical procedure (LAP). LAP-006. Golden Colorado: NREL, 1996.
 115. Sharma S, Sandhu DK, Bagga PS. Physical characterization of isozymes of endo-beta-1,4-glucanase and beta-1,4-glucosidase from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiology Letters*. 1991, 63: 99-104.
 116. Brown L, Torget R. Enzymatic Saccharification of lignocellulosic biomass, laboratory analytical procedure (LAP). LAP-009. Golden Colorado: NREL, 1996.
 117. 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.
 118. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, laboratory analytical procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42618. Golden, Colorado: NREL, 2008.
 119. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples, laboratory analytical procedure (LAP). Technical Report NREL/TP-510-42623. Golden, Colorado: NREL, 2008.
 120. Jensen JR, Morinelly JE, Gossen KR, et al. Effects of dilute acid pretreatment conditions on enzymatic hydrolysis monomer and oligomer sugar yields for aspen, balsam, and switchgrass. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 2317-2325.
 121. Jung YH, Kim IJ, Kim HK, et al. Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2013, 132: 109-114.
 122. Redding AP, Wang ZY, Keshwani RD, et al. High temperature dilute acid pretreatment

- of coastal Bermuda grass for enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 1415-1424.
123. Viamajala S, Selig MJ, Todd B, et al. Catalyst transport in corn stover internodes. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2006, 129-132: 527-545.
124. Sorensen A, Teller P J, Hilstrom T, et al. Hydrolysis of *Miscanthus* for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pre-treatment and enzymatic treatment. *Bioresource Technology*. 2008, 99: 6602-6607.
125. Kumar L, Chandra R, Saddler J. Influence of steam pretreatment severity on post-treatments used to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwoods at low enzyme loadings. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011. 108: 2300-2311.
126. Shao QJ, Cheng C, Ong RG, et al. Hydrogen peroxide presoaking of bamboo prior to AFEX pretreatment and impact on enzymatic conversion to fermentable sugars. *Bioresource Technology*. 2013, 142: 26-31.
127. Murnen HK, Balan V, Chundawat SPS, et al. Optimization of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus x giganteus* to fermentable sugars. *Biotechnology Progress*. 2007. 23: 846-850.
128. Rudolf A, Baude H, Zacchi G, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated bagasse using *Saccharomyces cerevisiae* TMB3400 and *Pichia stipitis* CBS6054. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, 99: 783-790.
129. Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of ash in biomass, laboratory analytical procedure. Technical Report NREL/TP-510-42622. Golden, Colorado: NREL, 2005.
130. Sluiter A, Sluiter J. 2011. Summative mass closure, laboratory analytical procedure. Technical Report NREL/TP-510-48087. Golden, Colorado: NREL, 2011.
131. Zhu S, Wu Y, Yu Z, et al. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis. *Process Biochemistry*. 2005, 40: 3082-3086.
132. Yu B, Chen H. Effect of the ash on enzymatic hydrolysis of steam-exploded rice straw. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 9114-9119.
133. Qiu W, Chen H. Enhanced the enzymatic hydrolysis efficiency of wheat straw after combined steam explosion and laccase pretreatment. *Bioresource Technology*. 2012, 118: 8-12.
134. Chen Y, Stevens MA, Zhu Y, et al. Reducing acid in dilute acid pretreatment and the impact on enzymatic saccharification. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2012, 39: 691-700.

135. Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Applied Chemistry*. 1987, 59: 257-268.
136. Dien BS., Jung HJG, Vogel K P, et al. Chemical composition and response to dilute-acid pretreatment and enzymatic saccharification of alfalfa, reed canarygrass, and switchgrass. *Biomass and Bioenergy*. 2006, 30: 880-891.
137. Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, et al. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochemistry*. 2004, 39: 1533-1542.
138. Li H, Chen H. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process Biochemistry*. 2008, 43: 1447-1451.
139. Zhang J, Ren X, Chen W, et al. Biological pretreatment of corn stover by solid state fermentation of *Phanerochaete chrysosporium*. *Frontiers of Chemical Science and Engineering*. 2012, 6: 146-151.
140. Kim JH, Ryu DDY. Cellulase production by a solid state culture system. *Biotechnology and Bioengineering*. 1985, 27: 1445-1450.
141. Chahal PS, Chahal DS, Le GBB. Production of cellulase in solid-state fermentation with *Trichoderma reesei* MCG 80 on sheat straw. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1996, 57/58: 433-442.
142. Wei N, Quarterman J, Kim SR, et al. Enhanced biofuel production through coupled acetic acid and xylose consumption by engineered yeast. *Nature communications*. 2013, 4: 2580.

附录 I 主要实验试剂与仪器和设备

主要试剂

试剂	规格	生产厂家
葡萄糖	食品级	秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司
磷酸二氢钾	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
无水氯化钙	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
氢氧化钙	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
七水合硫酸镁	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
酵母粉	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
柠檬酸	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
柠檬酸钠	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
木糖	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
3,5-二硝基水杨酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
酒石酸钾钠	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
苯酚	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
无水亚硫酸钠	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
糠醛	分析纯	上海德默医药科技有限公司
糠醇	化学纯	国药集团化学试剂有限公司
糠酸	化学纯	国药集团化学试剂有限公司
5-羟甲基糠醛	分析纯	上海德默医药科技有限公司
2,5-呋喃二甲醇	分析纯	上海德默医药科技有限公司
5-羟甲基糠酸	分析纯	百灵威科技有限公司
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
葡萄糖液体试剂盒	分析试剂	上海科欣生物技术研究所

主要仪器和设备

名称	型号	生产厂家
核酸蛋白质分析仪	DU-800	德国 Beckman 公司
立式振荡培养箱	HZ-2111KB	江苏华利达
超声波脱气机	SB-5200D	宁波新芝生物科技
台式小型高速离心机	5415D	德国 Eppendorf 公司
超低温冰箱	Forma-86C	美国 Thermo scientific 有限公司
超纯水纯化系统	Milli-Q Synthesis	德国默克密理博公司
稀酸酸预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工设备有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器有限公司
高速冷冻离心机	Avanti J-26	美国 Beckman Coulter 有限公司
电子天平	BS223S	瑞士梅特勒托利多仪器有限公司
电子天平	BS224S	瑞士梅特勒托利多仪器有限公司
高压蒸汽发生器	DZFF4.5C	上海蒸源机电有限公司
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
高效液相色谱	LC-20AD 、 LC-20AT	日本岛津公司
紫外检测器	SPD-20A	日本岛津公司
示差检测器	RID-10A	日本岛津公司
色谱柱	HPX-87H	Bio-rad Aminex
色谱柱	YMC-Pack-ODS-C18	日本 YMC 公司
恒温水浴振荡器	HZ-9212S	江苏华利达实验设备厂
粉碎机	SF-300	上海科太粉碎设备厂
电子计重器	YP150001	上海圣科仪器设备有限公司
生物反应器	BIOTECH-5L	上海保兴生物设备工程有限公司
四联发酵罐	BIOTECH-5BG	上海保兴生物设备工程有限公司
pH 计	PHS-3C	上海雷磁仪器厂
恒温水浴槽	ZC-18Q	宁波天恒仪器厂
压榨机	P-204	上海大张环保设备有限公司
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器
环境扫描显微镜	Quanta 250	美国 FEI 公司
小型气浴摇床	SHZ-82	江苏华利达
移液枪	0.1-5 mL	德国 Eppendorf 公司
扫描电镜	JSM-6360LV	日本 Joel 公司
能谱仪	Falcon	美国 Edax 公司

学术成果

发表论文:

1. 何燕青, 张龙平, 张建, 鲍杰*. 螺带搅拌在木质纤维素稀酸预处理反应器中的应用. 生物加工过程. 2014, 12(1): 8-12. (中文核心, 对应本文第二章内容)
2. Yanqing He, Longping Zhang, Jian Zhang*, Jie Bao*. Helically agitated mixing in dry dilute acid pretreatment enhances the bioconversion of corn stover into ethanol. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7:1. (SCI IF=6.22, 对应本文第二章内容)
3. Yanqing He, Jian Zhang, Jie Bao*. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation. *Bioresource Technology*. 2014. 158: 360-364. (SCI IF=5.04, 对应本文第三章内容)
4. Yanqing He[#], Zhenhong Fang[#], Jian Zhang, Xinliang Li, Jie Bao*. De-ashing treatment of corn stover improves the efficiency of enzymatic hydrolysis and consequent ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2014, 169: 552-558. (SCI IF=5.04, 对应本文第四章内容)
5. Jian Zhang[#], Xiusheng Wang[#], Deqiang Chu, Yanqing He, Jie Bao*. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 4480-4488.

投稿中论文:

1. Yanqing He, Jian Zhang, Jie Bao*. Rapid biot detoxification of inhibitors generated from pretreated corn stover by *Amorphotheca resiniae* ZN1 and consequent simultaneous saccharification and ethanol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. In preparation. (对应本文第五章内容)

申请专利:

1. 鲍杰, 何燕青, 张建. 一种无需预浸的木质纤维素原料预处理方法. 申请号: 201410035237.3
2. 鲍杰, 何燕青, 张建. 一种对预处理后木质纤维素原料中抑制物快速脱毒的方法. 申请号: 201410768035.X

学术会议论文:

1. Yanqing He, Jian Zhang, Jie Bao. 2012. Rapid degradation of furan derivatives from dilute-acid pretreated corn stover by *Amorphotheca resiniae* ZN1. **The 18th Symposium of Young Asian Biochemical Engineer's Community (YABEC**

-
- 2012). Tokushima, Japan. **(Poster)**
2. 何燕青, 张龙平, 张建, 鲍杰. 2013. 螺带桨搅拌预处理反应器在玉米秸秆干式稀酸预处理过程中的应用. 上海市研究生学术论坛生物化工专场.
 3. Yanqing He, Jian Zhang, Jie Bao. 2013. Co-current feeding of dilute acid and corn stover in helically agitated dry pretreatment reactor. **International Symposium on Biocatalysis and Biosynthetic Engineering 2013 (ISBBE 2013)**. Shanghai, China. **(Oral Presentation)**
 4. Yanqing He, Jian Zhang, Jie Bao. 2014. On-site biological detoxification of dilute acid pretreated corn stover by *Amorphotheca resinae* ZN1 for bioethanol production. **Asia Federation of Biotechnology (AFOB) Bioenergy and Biorefinery Division**. Jinan, China. **(Oral Presentation)**
 5. 何燕青, 张建, 鲍杰. 2014. Helically agitated mixing in dry dilute acid pretreatment enhances the bioconversion of corn stover into ethanol. 华东理工大学第 18 届研究生论文年会. (获得优胜奖)

致谢

本论文是在导师鲍杰教授的精心指导下完成的，在研究过程始终得到了鲍老师的悉心教诲和孜孜不倦的指导，鲍老师严谨求实的治学态度，创新拼搏的科研精神，勤奋忘我的工作作风以及诲人不倦的教导方式使我受益匪浅。在此，衷心感谢导师鲍杰教授！

感谢实验室张建讲师、高秋强讲师、胡凤仙副研究员在科研和学习上的指导和帮助，感谢实验室的楚德强师兄、方镇宏、张龙平、顾翰琦、涂毅、王霞、张宏森、邵帅以及其他实验室同学在实验中给予的帮助和建议。同时还要感谢我的好友宁晨曦博士、路飞博士、张鑫涛博士、徐敏博士对我学习和生活上的帮助和启示。

特别感谢我的父母和家人在我求学路上一直以来给予的关爱和支持！