

## 木质纤维素原料生物转化生产纤维素乙醇过程的关键技术研究

### 摘要

利用丰富的、可再生的木质纤维素生物质生产纤维素燃料乙醇，是当前世界生物能源产业的主流技术路线，可以有效解决能源危机、温室效应和环境污染等问题。木质纤维素原料通过糖平台路线进行生物转化生产纤维素乙醇的加工工序主要包括原料预处理、预处理后的抑制物脱除（脱毒）、酶水解、乙醇发酵、以及乙醇的分离提纯等步骤。尽管目前在世界范围内已经建立起数十套利用木质纤维素原料生产乙醇的中试工厂或示范生产线，但纤维素乙醇高额的生产成本严重阻碍了其产业化进程。纤维素乙醇的高成本具体表现在预处理和精馏的高能耗，预处理废水、脱毒废水和发酵废水处理所导致的高额环境成本，纤维素酶的高价格，以及乙醇产品的低收率等方面。本论文对木质纤维素生物转化生产纤维素乙醇过程的各个加工工序进行了以过程节能和废水减排为目标的机理解析和过程创新研究，开发了一系列具有工业应用价值的过程关键技术，为未来纤维素乙醇产业的降低成本提供了一个新型、完整的木质纤维素加工技术路线和一种资源节约型研发理念。本论文的主要创新点简述如下：

首先，从预处理工序开始，通过对稀酸预处理过程中两个非常重要但在以往研究中被忽略的重要参数（预处理反应器物料装填率和预浸固液比）进行调控，在保证预处理效率的前提下压缩固液比至 1:1（即总用水量不超过木质纤维素干固体质量，稀酸用量和蒸汽消耗分别不超过干固体质量的一半），预处理后木质纤维素原料含水量低于 50% (w/w)，新鲜水用量和蒸汽用量比目前典型的稀酸预处理技术分别降低 80% 和 50% 以上，这一干式预处理过程基本不产生废水，实现了高温蒸汽的低用量和废水的极限低排放。

其次，在抑制物脱除（脱毒）工序，采用本论文筛选得到的木质纤维素依赖型煤油霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1，以固态发酵的方式对预处理后的物料进行生物脱毒，可以降解预处理过程中产生的各种抑制物，包括甲酸、乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛等，但不消耗木质纤维素中的纤维素和半纤维素组分。脱毒过程在常温静态的条件下进行，不使用耗水和耗能操作；煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 在后续的同时糖化与发酵过程中自然消亡，无需进行灭菌操作；脱毒后所获得的可发酵性原料固体含量高达 45% (w/w) 以上，可不经固液分离直接进入下一个工段。

再次，在同时糖化与发酵工序，采用本论文设计的独特的新型螺带搅拌浆生物反应器，对脱毒后的物料进行极限高固体含量的同时糖化与发酵，在较低纤维素酶用量的条件下获得不低于 8% (v/v) 的高浓度乙醇发酵液，纤维素的转化率可达 70%；极限高固体含量的同时糖化与发酵过程除加入液态的纤维素酶和发酵菌种外，不再有其它新鲜水耗；机械能消耗与常规生物反应器相比降低 80-90%。同时，高浓度乙醇发酵液的获得也大大降低了后续蒸馏过程的能耗。

最后，在乙醇分离工序，采用减压蒸馏的方法实现了 37 °C 下乙醇的有效分离，一

次性低温减压蒸馏的乙醇回收率可达 90% 以上，乙醇馏出液可浓缩至 180 g/L，体积浓度达 23%(v/v)；同时，蒸馏残液中保留了 80% 以上的纤维素酶酶活，降低了后续乙醇精馏中的能耗和同步糖化与发酵过程中纤维素酶的用量。减压蒸馏将为实现高固体底物含量下纤维素乙醇的连续性或半连续性生产提供一种切实可行的方法。

本论文所提出的资源节约型纤维素乙醇生物加工理念和关键过程技术，在保证目标产品得率和过程效率的前提下，实现了大幅度节能和废水减排的目标，大大降低了纤维素乙醇的生产成本，为纤维素乙醇的大规模商业化生产提供了有力的应用基础研究支持。

**关键词：**纤维素乙醇；干式稀酸预处理；生物脱毒；高固体含量同步糖化与发酵；减压蒸馏。

## Studies on the Key Technologies of Cellulosic Ethanol Production Processes Using Lignocellulosic Feedstock

### Abstract

Cellulosic ethanol production from abundant and renewable lignocellulosic biomass is the leading and dominant technology trend in the current global bioenergy industry. This technology provided a practical option for resolving energy crisis, global warming, and environmental pollution etc. The major processing steps in the bioconversion pathway from lignocellulose to ethanol through the sugar platform technology includes pretreatment, inhibitor removal (or detoxification), enzymatic hydrolysis, ethanol fermentation, and product recovery. Although numbers of cellulosic ethanol pilot or demonstration plants have been established in the world, the high cost of cellulosic ethanol is significantly blocking its commercialization steps. The high cost comes from various aspects, including the high energy consumption during pretreatment and distillation process; the massive environmental cost of waste water treatment from the pretreatment, detoxification and fermentation steps; the expensive cellulase cost and the low ethanol yield of bioconversion etc. In this PhD dissertation, the overall cellulosic ethanol processes were revolutionized by targeting the energy-saving and waste water reduction problems, and a key process technology strategy in the process was proposed with a novel resource-conservation concept. The major novelties and breakthroughs of the dissertation were summarized as follows:

Firstly, two very important but rarely concerned parameters, the feedstock filling ratio to the pretreatment reactor and the solid/liquid presoaking ratio were investigated during pretreatment. Based on maintaining the pretreatment efficiency at a satisfactory level, the solid/liquid ratio during pretreatment was reduced to 1:1 (the total water usage was less than the dry weight of the lignocellulose, and either the dilute-acid usage or the steam consumption was no more than half of the dry lignocellulose weight) by regulating the above two parameters and the water concentration of the materials after pretreatment was less than 50% (w/w). There was no free water released from the current pretreatment. Comparing with the conventional dilute-acid pretreatment, the fresh water usage and the steam consumption were decreased at least by 80% and 50%, respectively. This “dry” pretreatment process realized the low steam consumption and approximately zero waste water discharge.

Secondly, a newly isolated kerosene fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, was applied to the biot detoxification unit. During the solid-state biot detoxification, the toxic products in the pretreated lignocellulose, including formic acid, acetic acid, furfural and HMF etc. were degraded thoroughly and quickly without cellulose and hemicellulose degradation. The biot detoxification process was conducted at ambient temperature and static conditions, so there was no need for water and energy use. Furthermore, the water content of the detoxified materials was less than 45% (w/w) and the *A. resinae* ZN1 fungus ceased to growth spontaneously in the subsequent simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

process without a specific sterilization treatment.

Thirdly, a new helical stirring bioreactor was designed and operated for the simultaneous saccharification and fermentation of biodetoxified feedstock at an extremely high solid loading up to 40% (w/w). The fermentation slurry contained 8.0% (v/v) of ethanol and the cellulose conversion rate of 70% were obtained with relatively low cellulase dosage. No fresh-water was added into the extremely high solid loading SSF process besides the liquid cellulase and the yeast seeds. The stirring energy consumption of the helical stirring bioreactor during the SSF process was decreased by 80-90% comparing to the conventional bioreactor.

Finally, over 90% of the ethanol in the fermentation broth was recovered directly by a simple vacuum distillation at 37 °C and the ethanol was also concentrated by 2-3 folds to 23% (v/v) in the distillate, which was greater than that of starch or sugar-based ethanol. At the same time, over 80% of the cellulase activity in the distillation stillage was preserved. Both the high ethanol recovery and the high cellulase recovery could greatly decrease the subsequent distillation energy demand and the cellulase usage. The vacuum distillation provides a practical method for continuous or semi-continuous ethanol fermentation from lignocellulose at high solids loading.

Conclusively, in this dissertation, the resource-saving cellulosic ethanol production process proposed realized the goals of significantly energy-saving and waste water reduction while maintaining the ethanol yield and production efficiency. The cellulosic ethanol cost was significantly reduced using the proposed processing technology by cutting the energy consumption and waste water emission to a large extent and paved the way of fundamental and engineering researches for the future commercialization of cellulosic ethanol industry.

**Keywords:** Cellulosic ethanol; dry dilute acid pretreatment technology; biodetoxification; simultaneous saccharification and fermentation at high solids loading; vacuum distillation.

## 目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 世界需要纤维素乙醇.....	1
1.2 纤维素乙醇的产业化进展.....	2
1.2.1 国外纤维素乙醇的产业化进展.....	2
1.2.2 我国纤维素乙醇的产业化进展.....	4
1.3 纤维素乙醇的生产工艺.....	5
1.3.1 木质纤维素原料的预处理技术.....	6
1.3.2 预处理物料的脱毒处理.....	8
1.3.3 木质纤维素原料的糖化与发酵.....	9
1.3.4 乙醇的分离.....	11
1.4 纤维素乙醇生产中存在的问题.....	13
1.5 本论文主要研究内容.....	14
第 2 章 木质纤维素原料的干式稀硫酸预处理研究.....	16
2.1 前言.....	16
2.2 材料与方法.....	16
2.2.1 实验材料.....	16
2.2.2 实验方法.....	19
2.2.3 分析方法.....	21
2.3 结果与讨论.....	22
2.3.1 原料在预处理反应器中满载时可以显著降低预处理过程的能耗.....	22
2.3.2 预浸固液比对预处理过程能耗、水耗及预处理效果的影响.....	25
2.3.3 在预处理反应器满载及高的预浸固液比下对高温稀酸预处理的优化.....	26
2.3.4 干式稀酸预处理技术在不同木质纤维素原料上的应用及后续高固体含量下的同步糖化与发酵.....	30
2.4 小结.....	33
第 3 章 煤油霉菌 <i>Amorphotheca resinae</i> ZN1 对预处理后木质纤维素原料的固态生物脱毒.....	34
3.1 前言.....	34
3.2 材料与方法.....	35
3.2.1 实验材料.....	35

3.2.2 实验方法.....	35
3.2.3 分析方法.....	37
3.3 结果与讨论.....	37
3.3.1 生物脱毒菌株的筛选与鉴定.....	37
3.3.2 煤油霉菌 <i>A. resinae</i> ZN1 的碳源生长谱实验.....	40
3.3.3 煤油霉菌 <i>A. resinae</i> ZN1 的抑制物降解能力.....	42
3.3.4 生物脱毒后玉米秸秆在高固体含量下的同步糖化与乙醇发酵.....	47
3.3.5 不同木质纤维素原料的生物脱毒效果.....	48
3.4 小结.....	51
第 4 章 高固体含量下的同步糖化与高浓度乙醇发酵过程研究以及生物反应器设计.....	52
4.1 前言.....	52
4.2 材料与方法.....	53
4.2.1 实验材料.....	53
4.2.2 实验方法.....	53
4.2.3 分析方法.....	53
4.3 结果与讨论.....	55
4.3.1 螺带搅拌桨与 Rushton 搅拌桨在处理高固体含量秸秆 SSF 时的优劣.....	55
4.3.2 接种时间和接种量对高固体含量秸秆同步糖化与发酵的影响.....	58
4.3.3 不同固体含量对玉米秸秆同步糖化与发酵的影响.....	59
4.3.4 高固体含量下纤维素酶用量对秸秆同步糖化与发酵的影响.....	62
4.3.5 不同固体含量和酶用量对玉米秸秆同步糖化与发酵过程搅拌能耗的影响.....	63
4.3.6 超高固体含量下秸秆的同步糖化与发酵.....	66
4.4 小结.....	70
第 5 章 乙醇分离与纤维素酶-发酵菌体循环利用的过程耦合.....	71
5.1 前言.....	71
5.2 材料与方法.....	71
5.2.1 实验材料.....	71
5.2.2 仪器与设备.....	72
5.2.3 实验及分析方法.....	72
5.3 结果与讨论.....	73
5.3.1 合成发酵液的减压蒸馏.....	73
5.3.2 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪上清液的减压蒸馏.....	77
5.3.3 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后所得发酵醪全醪的减压蒸馏... 80	80

---

5.4 小结.....	83
第 6 章 结论与展望.....	85
6.1 结论与创新点.....	85
6.2 展望.....	85
参考文献.....	87
博士期间研究成果.....	103
致 谢.....	105



## 第 1 章 文献综述

### 1.1 世界需要纤维素乙醇

从上世纪 70 年代末至今,我国国民经济经历了 30 多年快速健康的发展,国内生产总值(GDP)已跃居世界第二。有效、安全的能源供给是国民经济发展的重要保障。但是,我国的一次性化石能源资源短缺,尤其是有着“国民经济血液”之称的石油资源严重不足。自 1993 年我国成为石油净进口国以来,2006 年石油消费对进口的依存度达到 47.3%,2008 年已超过 50%,据预测到 2020 年我国石油消费的对外依存度将会高达 60%-70%<sup>[1]</sup>。同时,化石燃料的大量使用严重恶化了环境。燃煤引起的城市大气污染和造成的酸雨面积已超过我国国土面积的三分之一;我国 CO<sub>2</sub> 排放量到 2007 年底已经达到 60 亿吨,占全球碳排放量的 21%,超过美国成为世界第一大 CO<sub>2</sub> 排放国<sup>[1-2]</sup>。能源问题已经严重影响到我国经济、社会和环境的可持续发展,乃至国家安全和外交战略。

在全球范围内,世界各国都面临着化石能源日渐枯竭、人口不断增长、温室效应日益突出、自然环境不断恶化的危机,寻找新的、可再生的清洁替代能源已成为全人类目前最紧迫的任务之一。从 1973 年爆发第一次石油危机,到 2001 年发生的“9.11 恐怖袭击事件”以及随后的美国入侵伊拉克战争,不断将国际石油价格推向新的高点。能源危机与政治危机之间的密切关系,使得能源对政治的依赖达到前所未有的高度,也使得世界各国对可再生替代能源的需求和期待不断加剧。

生物乙醇被认为是未来 20 年内最主要的可再生车用替代燃料,在巴西、美国及一些欧洲国家已经开始大规模使用<sup>[3]</sup>。生物乙醇具有其它燃料无可比拟的优点,如原料来源广泛,价格低廉,可与汽油以任意比互溶,提高汽油中氧含量从而促进汽油充分燃烧,无毒副作用且可便利的应用在目前的发动机上等。目前的生物乙醇主要是由玉米、小麦等淀粉质原料和蔗糖等糖质原料发酵而成,被称为第一代生物乙醇。我国的生物乙醇产量居世界第三位,仅次于美国和巴西(见表 1.1)。尽管第一代生物乙醇在生产成本上与汽油具有可比性,但其产量却远远不能满足当今世界的需求<sup>[4]</sup>;同时在原料供应上存在着“与人争粮”、“与粮争地”和“与畜争食”的问题,这与我国的能源发展战略相悖;在世界范围内,由于第一代生物乙醇所导致的玉米价格大幅上涨等市场因素,生物乙醇在液体车用燃料的份额也已经触顶;此外,第一代生物乙醇所形成的净能源(指扣除能源生产过程中的能量消耗后剩余的可供使用的能源)并不高(仅为乙醇所含能量的 20%左右),且使用第一代生物乙醇对温室气体的减排作用也被认为非常有限<sup>[5]</sup>。

木质纤维素是指各种植物来源的生物质,如农业废弃物(包括小麦秸秆、玉米秸秆、稻草等),林业废弃物(包括伐木产生的枝叶、废弃木头、木屑等),专门的能源作物(包括甜高粱、甘蔗、甜菜和柳枝稷等)和各种含纤维素的废弃物(包括城市固体垃圾、废纸、甘蔗渣、木薯渣等)等。木质纤维素也是世界上最为丰富的碳水化合物,据统计,

全球范围内的木质纤维素原料年产可达  $1 \times 10^{10}$  吨<sup>[1]</sup>。利用广泛存在的木质纤维素原料通过生物转化和生物炼制的路线生产生物乙醇（即纤维素乙醇），被称为第二代生物乙醇技术。纤维素乙醇不仅能够解决原材料不足的问题，不与粮食和动物饲料供给相冲突，净产能高（用玉米秸秆等农作物秸秆生产乙醇时，生产玉米等粮食的能耗不计入乙醇的生产能耗），还可以大大降低温室气体的排放量，有效缓解温室效应及环境污染。此外，纤维素乙醇产业在广大农业产区的大规模实施，对提升农村经济活力和产业水平具有举足轻重的作用<sup>[5]</sup>。

表 1.1 2009 年全球九大乙醇生产国

Table 1.1 Top nine global ethanol producers in 2009

Country	Ethanol (millions of gallons)
United States	10602
Brazil	6579
China	542
Canada	356
France	330
Germany	198
Spain	123
Thailand	106
India	92

Source: data from the Biofuels Platform.

([Http://www.biofuels-platform.ch/en/infos/production.php?id=bioethanol](http://www.biofuels-platform.ch/en/infos/production.php?id=bioethanol))

## 1.2 纤维素乙醇的产业化进展

### 1.2.1 国外纤维素乙醇的产业化进展

纤维素乙醇首先是由 Heinerch 等于 1910 年通过酸水解木材和发酵得到<sup>[6]</sup>，并且在美国和前苏联建有工厂<sup>[2]</sup>，但是该工艺随着以石油为原料合成酒精的大量生产而逐渐衰落。直至 20 世纪 70 年代，随着石油危机的加剧，世界各主要发达国家开始重新重视利用木质纤维素原料生产乙醇。从 20 世纪 90 年代开始，各国均通过加强立法、加大投资力度等措施加快推进纤维素乙醇的产业化进程，以保障本国能源安全<sup>[7]</sup>。

自 2000 年开始，美国先后提出了“生物质研究和发展法案” (Biomass R&D Act, 2000)、“发展和推进生物质产品和生物质能源”报告 (Developing and Promoting Biobased Products and Bioenergy, 2002) 和“生物质技术路线图” (Road Map of Biomass Technology, 2002)。2003 年发起的“生物质计划” (Biomass Program, 2003)，规划在 2020 年生物燃料占到全部市场的 10-20%，2050 年取代 1/3 的全部石油消费<sup>[4]</sup>。美国总统布什在 2006 和 2007 年连续两年的国情咨文中都对燃料乙醇等生物能源进行了高度的关注，提出了美国在未来 10 年内通过开发燃料乙醇等生物质替代能源将目前的汽油消耗量压缩 20%<sup>[8]</sup>。英国政府于 2007 年发布了能源白皮书 (UK Energy White Paper, 2007)，表明英国将支持低碳技术并为投资创造良好的环境。同时，英国贸工部和交通部发布“英国生物质战略”

(UK Biomass Strategy, 2007), 指出要通过立法鼓励生物质能源的生产和使用, 鼓励生物燃料领域的技术创新, 支持第二代生物燃料的开发<sup>[5]</sup>。将于 2008 年 4 月生效的英国“可再生运输燃料法”(Renewable Transport Fuel Obligation, 2007)规定, 到 2010 年, 生物燃料须占英国市场所有销售燃料的 5%<sup>[9]</sup>。德国政府在 2007 年 11 月公布了最新的生物燃料路线图(Biofuels Roadmap, 2007), 大幅度提高生物燃料发展目标: 到 2020 年, 生物燃料与汽油掺混的最高比例将从原来的 5%增至 20%, 这是欧盟 2020 年目标的两倍<sup>[10]</sup>。

美国为了实现 10 年内将汽油消耗量压缩 20%的目标, 2007 年投资 3.85 亿美元, 用于支持 6 个化工企业利用非传统原料生产纤维素乙醇的产业化运作<sup>[11]</sup>。位于爱荷华州的 Broin 公司、堪萨斯州的 Abengoa Bioenergy 公司和爱达华州的 Iogen Biorefinery 公司将分别利用玉米秸秆(包括玉米芯和玉米秸秆)和农业废弃物年产 3100 万加仑、1140 万加仑和 1800 万加仑的纤维素乙醇; 位于佛罗里达州的 BlueFire Ethanol 公司、加利福尼亚州南部的 Alico 公司和乔治亚州的 Range Fuels 公司将分别利用废弃的木材和能源作物年产 1900 万加仑、2000 万加仑和 5000 万加仑的乙醇<sup>[5, 7, 12]</sup>。

表 1.2 美国能源部资助的 6 家纤维素乙醇炼制企业<sup>[7]</sup>

Table 1.2 Six cellulosic-ethanol refineries sponsored by the US Department of Energy

Company	Location	Size (Million gallons per year)	Feedstock	Funds (Million \$)
Broin	Emmetsburg, Iowa	31	Corn stover (cobs and stalks)	80
BlueFire Ethanol	Southern California	19	Waste wood	40
Alico	LaBelle, Florida	20	Wood, agricultural waste	33
Abengoa Bioenergy	Colwich, Kansas	11.4	Corn stover, wheat straw, etc	76
Iogen Biorefinery	Shelley, Idaho	18	Agricultural waste	80
Range Fuels	Soperton, Georgia	50	Waste wood, energy crops	76

此外, 大量的民间资本和风险投资也纷纷涌向新兴的纤维素乙醇行业(2006 年的总投资额大约为 20 亿美元<sup>[13]</sup>)。一些跨国化工企业为了抢占新能源的制高点, 也纷纷对纤维素乙醇进行大规模投资, 用于攻克纤维素乙醇生产中的关键技术堡垒。Ceres 公司获得了孟山都公司 1.337 亿美元的资助, 用于开发能够自行酶解生成可发酵性糖的能源作物-柳枝稷; Edenspace Systems 公司得到美国能源部 75 万美元的资助, 用于改良纤维素乙醇的生产原料, 如柳枝稷等; 美国的杰能科公司得到美国可再生能源实验室(National Renewable Energy Laboratory, NREL) 1700 万美元的资助用于降低纤维素酶的生产成本, 而来自法国政府 120 万欧元的资助则被用于开发利用纸浆生产乙醇的工艺; 丹麦的诺维信公司得到了美国能源部 1500 万美元的资助用于开发低成本的纤维素酶; 德国的 Direvo

公司获得了 1900 万欧元的私人资助，采用定向进化的方法改造纤维素乙醇生产菌，以提高纤维素乙醇生产过程的经济性；瑞典的 SweTree 公司得到 320 万美元的资助，用于改进并提高 *Populus trichocarpa* 的乙醇生产效率；英国的 TMO Biotec 公司得到欧盟 600 万欧元的资助用于开发能够同时代谢五碳糖和六碳糖并且耐高温的乙醇生产菌；美国的 Celunol 公司获得了一批私募基金，资助其在现有纤维素乙醇中试设备的基础上建立更大规模的装置，同时开发能够代谢木质纤维素来源的各种糖分生产乙醇的 *E. coli* 工程菌；Mascoma 公司得到 400 万美元的私人资助，用于建立纤维素乙醇的中试工厂<sup>[13]</sup>。

### 1.2.2 我国纤维素乙醇的产业化进展

与美国等发达国家对纤维素乙醇的研发相比，我国对纤维素乙醇的研究起步相对较晚。近年来，政府高度重视生物质能的开发和利用，先后颁布了《可再生能源法》、《可再生能源产业发展指导目录》等法规条例，并制定了《可再生能源中长期发展规划》，大力发展可再生能源，力争在 2020 年使可再生能源消费量占到能源消费总量的 15%。国家发展和改革委员会也制定了到 2020 年生物质液体燃料的发展目标：将发展以非粮生物质为原料的液体燃料，到 2020 年，形成年替代 1000 万吨石油的能力<sup>[1]</sup>。

与此同时，先后有多家企业和研究机构建立了利用木质纤维素原料生产乙醇的中试生产装置。中粮集团的中粮生化能源（肇东）有限公司于 2006 年在黑龙江肇东建成年产 500 吨纤维素乙醇的实验装置。该项目的预理工段采用从加拿大 SunOpta 生物过程公司进口的连续汽爆装置，这也是在纤维素乙醇的中试生产中首次采用连续汽爆工艺。中科院过程所与山东泽生生物科技有限公司于 2006 年建成了年产 3000 吨秸秆发酵生产燃料乙醇的产业化示范工厂，其乙醇得率可达 0.15 吨乙醇/吨干秸秆以上，秸秆中的纤维素转化率在 70% 以上；河南天冠集团先后与山东大学、浙江大学、清华大学和河南农业大学等高校合作，于 2006 年底建成了年产 300 吨纤维乙醇的中试生产线，乙醇得率可达 18% 以上，即每 6 吨秸秆可以生产 1 吨乙醇，并于 2007 年底完成年产 3000 吨的纤维乙醇示范生产线；安徽丰原集团于 2009 年建成了利用玉米秸秆年产 5000 吨乙醇的示范项目，据报道，目前正在规划建设国内最大的 30000 吨/年秸秆乙醇示范项目。中国石油在吉林燃料乙醇有限公司投资的玉米秸秆年产 3000 吨纤维乙醇的示范项目正与加紧建设中。此外，还有大量研究机构和大学都在积极开展与纤维素乙醇有关的研究工作<sup>[14-16]</sup>。

在科研投入方面，我国政府也加大了对纤维素乙醇研发的投资力度。2007 年 12 月，中科院启动知识创新工程重大项目“纤维素乙醇的高温发酵和生物炼制”，针对木质纤维素生产燃料乙醇的关键技术瓶颈，分别从木质纤维素预处理技术研究，新型木质纤维素酶系的发现、改造与应用，高温乙醇菌的系统生物技术改造，纤维素乙醇发酵过程优化与控制等四个方面入手，开发具有自主知识产权与市场竞争力的重大创新技术。2008 年 6 月获得科技部批复的“十一五”国家科技支撑计划“秸秆乙醇关键技术研究及产业化示范项目”由河南天冠集团、浙江大学和郑州大学等单位共同承担。该计划将分别从秸秆乙醇产业化示范关键技术开发，秸秆降解微生物的构建及发酵工艺优化，秸秆乙醇

酶解发酵关键技术研发和秸秆乙醇工程放大及关键设备开发等 4 个方面入手，寻求秸秆生产乙醇工艺关键技术的突破<sup>[15]</sup>。2010 年 12 月启动的 973 计划项目“木质纤维素资源高效生物降解转化中的关键科学题目研究”由山东大学组织牵头，清华大学、华东理工大学、南京工业大学、以及中科院多个研究所参与，将分别从植物生物质抗生物降解屏障解析与破解途径探索，木质纤维素生物降解多样性、新降解因子及相关机理，真菌游离酶系纤维素降解机理、酶系合成调控与高效酶系重构，细菌酶复合体纤维素降解转化机理和纤维小体的解析、重构，纤维降解组分高效生物转化的代谢网络调控与改造和木质纤维素降解转化过程强化的工程学原理与方法等 6 个方面开展深入研究，取得的成果将为我国建立大规模利用木质纤维素资源转化液体燃料和大宗化学品的新型工业体系提供理论、信息和技术支撑。

### 1.3 纤维素乙醇的生产工艺

尽管目前世界上已有数十套利用木质纤维素原料生产乙醇的中试装置或示范生产线，它们各自采用的生产工艺也不尽相同，但最为主流的纤维素乙醇生产工艺包括原料的预处理、预处理后物料中抑制物的脱除（脱毒）、酶水解、乙醇发酵和分离提纯等步骤<sup>[17]</sup>（见图 1.1）。

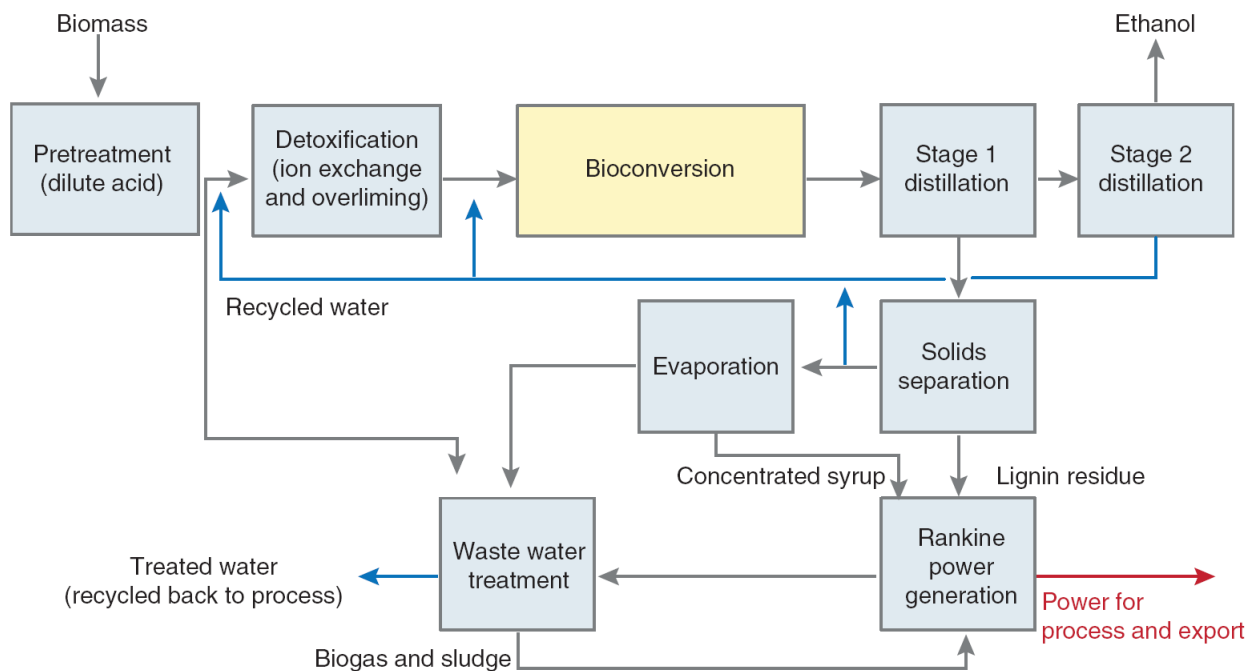


图 1.1 木质纤维素原料生物转化生产乙醇的主流工艺<sup>[17]</sup>

Fig. 1.1 The leading cellulosic ethanol production process via bioconversion of biomass. The feedstock biomass is pretreated with dilute sulfuric acid; pretreated material is mixed with lime to raise pH and remove compounds inhibitory to downstream bioconversion; ethanol is purified by two-column distillation and molecular sieve adsorption; residual solids are removed from the distillation bottoms liquid and fed to a power plant boiler; distillation bottoms liquid is concentrated by evaporation with the resulting syrup also being fed to the boiler; remaining wastewater is treated onsite by anaerobic digestion then recycled to the process.

### 1.3.1 木质纤维素原料的预处理技术

自然界中的植物在上亿年的进化过程中,形成了由纤维素、半纤维素和木质素以及少量的几丁质、蛋白质等组成的极其复杂的超分子结构,用来抵御各种病原微生物的入侵和动物的啃食<sup>[18-20]</sup>。木质纤维素原料对化学品和酶的生物抵抗性主要归结于以下几个方面<sup>[21]</sup>:(1) 植物体的表皮细胞,尤其是角质层和蜡质层;(2) 维管束的排列方式和密度;(3) 厚壁组织的相对含量;(4) 木质化程度<sup>[22]</sup>;(5) 异质结构和细胞的复杂性<sup>[23]</sup>;(6) 生物酶催化不溶性底物的难度<sup>[24]</sup>;(7) 细胞壁中天然存在的或在生物转化过程中形成的对后续发酵有抑制作用的化合物<sup>[25]</sup>。木质纤维素原料的这些结构和化学特性,严重影响了生物转化过程中液体的浸润、生物酶的接触及催化活性(对未进行预处理的玉米秸秆进行酶解,葡萄糖得率只有 23.3%<sup>[26]</sup>),乃至最终的生物加工成本。

因此,对原料的预处理是提高酶解得率的前提条件。在过去的几十年中,针对不同种类的纤维素原料已开发出数十种不同的预处理方法。尽管这些方法采取不同的策略来提高原料的酶解效果,但最根本的出发点都是去除或降低原料中半纤维素和木质素的含量,破坏其固有结构,增加纤维素的比表面积,降低结晶度<sup>[25, 27-30]</sup>。本节重点讨论几种已在中试规模取得应用或最有可能取得工业化的预处理技术,包括稀酸预处理和蒸汽膨爆预处理技术,碱性条件下的预处理技术以及溶剂萃取预处理技术。

#### 1.3.1.1 稀酸预处理和蒸汽膨爆预处理技术

稀酸预处理技术是被研究的最为深入的预处理方法之一。在稀酸预处理过程中,将木质纤维素原料、稀酸(通常是稀硫酸)和水混合均匀,用蒸汽加热到预定温度(一般为 160-220 °C)并保温几十秒到几分钟的时间,然后排出气体至常压<sup>[31-32]</sup>。约有 80%-90% 的半纤维素在预处理中降解生成了相应的单糖或寡糖;尽管溶解的木质素很少,但是其结构已被破坏,从而增加了后续酶解过程中纤维素的酶解性。这一技术已经应用在美国数家能源部资助的示范装置,包括在 2009 年开工的路易斯安那州 Jennings 市的年产 5000 吨纤维素乙醇工业示范装置(<http://www.diversa.com/cellulosic-ethanol.asp>)以及在美国田纳西州的丹尼斯克(杰能科母公司)与杜邦公司(DDCE)联合建设的纤维素乙醇示范工厂(<http://www.ddce.com>)。

蒸汽膨爆预处理技术已被造纸行业应用多年<sup>[33]</sup>,用来处理木材或者秸秆生产纸张。预处理时,用蒸汽将物料迅速加热到 180-210 °C,维持 1-10 分钟,并通过快速泄压以达到爆破的效果<sup>[31, 34]</sup>。在预处理过程中,半纤维素中的乙酰基在高温下裂解生成乙酸,乙酸又催化部分半纤维素降解生成单糖或者寡糖。一小部分木质素在预处理过程中被脱除,大部分则在高温下溶解,冷却时又通过聚合反应重新分散在纤维素表面。半纤维素的降解和木质素的部分脱除能够增加纤维素的暴露面积和空隙率,以及与纤维素酶接触的几率,促进纤维素的酶解<sup>[21, 35-38]</sup>。不加酸的蒸汽膨爆预处理常被用来处理农林废弃物,如稻草、玉米秸秆和硬木等。添加硫酸或在预处理前用二氧化硫(通常浓度为 0.3-3.0%(w/w))浸润物料的蒸汽膨爆预处理可以降低预处理的温度和时间,提高纤维素的收率,减少抑制物的生成,最终增加纤维素的酶解得率<sup>[39-41]</sup>。对于软木的预处理,加

酸是保证预处理效果的先决条件<sup>[31, 42-44]</sup>。

加酸的蒸汽膨爆预处理被认为是最接近商业化的预处理技术，而且对数十种不同的木质纤维素原料都有很好的预处理效果。目前，加酸的蒸汽膨爆预处理技术已被成功放大并应用到加拿大 Iogen 公司和西班牙萨拉曼卡 Abengoa 公司的中试工厂<sup>[19]</sup>。

蒸汽膨爆预处理与稀酸预处理是目前预处理技术的主流，也是仅有的两种在工业装置或工业示范装置上获得应用的预处理技术。一般而言，稀酸的加入大大提高了木质纤维素结构的解聚效率，但增加了木纤维素降解后抑制物的生成以及对反应器设备材料的腐蚀。同时，用于蒸汽膨爆预处理的物料含水量较低，而稀酸预处理物料的含水量可高达 95%；用于稀酸预处理的物料粒径较小，而蒸汽膨爆预处理则可使用尺寸较大的物料。但是，稀酸预处理时的温度及预处理时间较蒸汽膨爆预处理要低，能耗也远低于蒸汽膨爆预处理。另外，虽然蒸汽膨爆预处理对设备的化学腐蚀较弱，但对设备的机械精度要求和强度要求远远高于稀酸预处理。

### 1.3.1.2 碱性条件下的预处理技术

生石灰预处理、湿氧化法预处理和氨纤维膨爆预处理等在碱性条件下的预处理方法也已在实验室规模得到成功应用。与酸催化的预处理不同，碱法预处理主要是为了去除木质素，保留纤维素和大部分半纤维素在固体物料中。用生石灰或氢氧化钠进行预处理的温度较低（一般 85-150 °C），但时间很长，从 1 小时到数天不等<sup>[25, 29]</sup>。从过程经济性的角度考虑，长时间的预处理不是一种很有应用前景的方法，而且生石灰预处理目前也没有在中试规模得到应用。

湿氧化法预处理也已用于多种木质纤维素原料的预处理，如稻草，玉米秸秆，蔗渣和软木<sup>[45-48]</sup>。它是在添加氧化剂，如双氧水或超压氧气的条件下将物料加热到 180-200 °C 并维持 5-15 分钟。预处理物料的固体含量一般要求在 5-20%(w/w)；在预处理过程中通过添加碱性物质如碳酸钠将初始 pH 维持在碱性条件下，而酸性条件下的湿氧化预处理还没有取得较好的效果<sup>[45-46]</sup>。在湿氧化预处理中，部分木质素和半纤维素会被氧化成低分子量的羧酸、CO<sub>2</sub> 和水。同时，木质素和糖的降解产物，如酚酸类和呋喃类对发酵微生物有毒害作用的化合物，也会被进一步氧化成羧酸<sup>[49]</sup>。湿膨爆预处理是湿氧化法预处理的一种改进类型，它能够处理粒径较大、固体含量较高(30%, w/w)的木质纤维素颗粒。它与湿氧化预处理的主要不同在于：在湿膨爆预处理中，氧化剂是在物料保温一段时间之后才加入，而且预处理后迅速将压力降至常压，从而具有膨爆的效果<sup>[19]</sup>。

氨纤维膨爆被认为是一种最理想的预处理方法<sup>[17]</sup>，对玉米秸秆、稻草和柳枝稷都有很好的预处理效果<sup>[50-52]</sup>。在氨纤维膨爆预处理中，向木质纤维素原料中通入液氨，在相对较低的温度和压力条件下（90-100 °C、1.7-2.0 MPa）处理 5-10 分钟，然后迅速泄压，以达到膨爆效果。这种预处理方法的一个最显著特点就是能够处理高达 60% 固体含量的原料，且预处理后没有液体产生<sup>[53]</sup>。在预处理过程中，木质纤维素的复杂结构被破坏，但除了少量的纤维素和半纤维素降解外，基本没有固体损失<sup>[51]</sup>。因此，在氨纤维膨爆预处理中生成的抑制物很少<sup>[53]</sup>。由于液氨的回收非常困难且成本很高，目前还没有建立采

用氨纤维膨爆预处理的中试装置。

### 1.3.1.3 萃取预处理技术

萃取预处理是用 40-60% 的乙醇以 1:7-10(w/v) 的固液比在 160-200 °C 的条件下处理木质纤维素原料 30-60 分钟，将木质素从原料中萃取出来的过程<sup>[30, 54]</sup>。在此过程中，大部分半纤维素也被溶出，并有一小部分过度降解生成了糠醛<sup>[54]</sup>。通常，在萃取预处理过程中加入硫酸或氢氧化钠作为催化剂<sup>[55]</sup>。值得一提的是，在有机溶剂萃取过程中脱去的木质素具有较高的纯度，可以作为生物炼制的副产品，进而提高过程的经济性<sup>[30, 56]</sup>。

### 1.3.2 预处理物料的脱毒处理

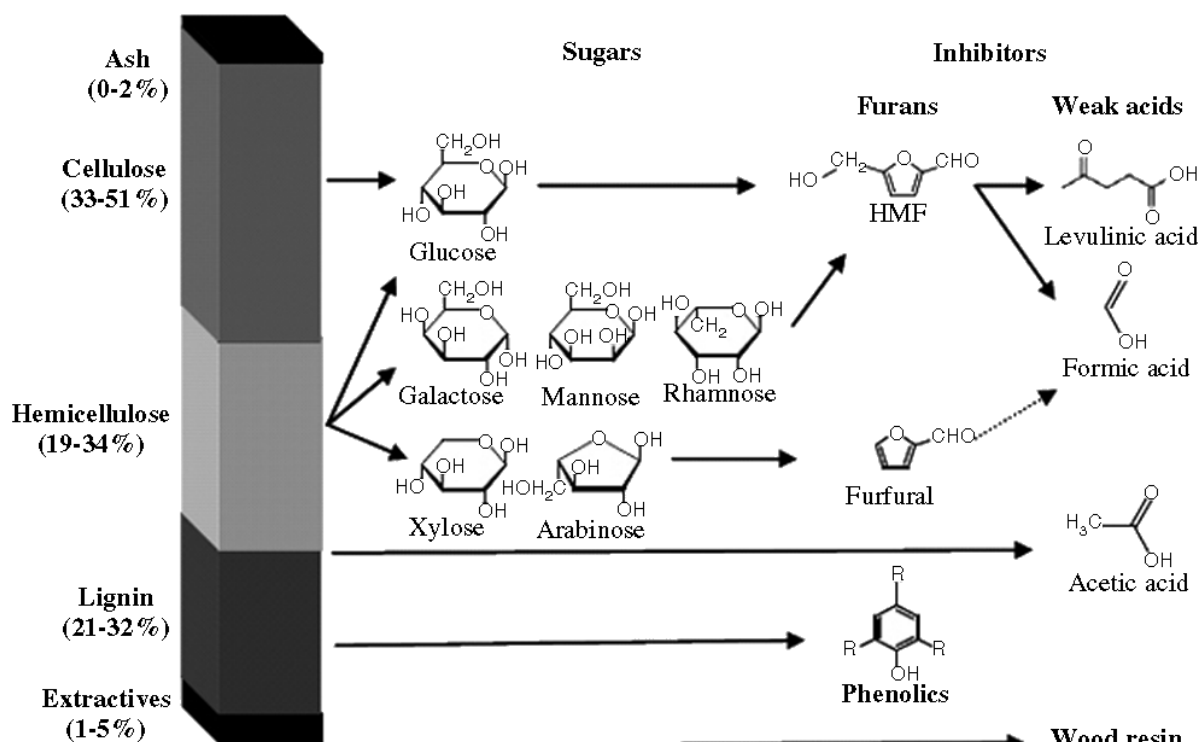


图 1.2 木质纤维素生物质的平均组分及主要的降解衍生产物<sup>[62]</sup>

Fig. 1.2 Average composition of lignocellulosic biomass and main derived hydrolysis products.

对木质纤维素原料进行预处理，主要是为了破坏木质纤维素的结构，提高纤维素的酶解效率，但是不可避免的发生了许多副反应<sup>[57]</sup>（见图 1.2），如半纤维素降解生成木糖、半乳糖、乙酸、甘露糖和葡萄糖等，部分纤维素水解生成葡萄糖，木质素裂解成酚酸类物质（如香兰素、香草醛和 4-羟基苯甲酸等）等。如果反应条件过于剧烈，木糖会进一步降解生成糠醛，六碳糖如葡萄糖等会继续降解生成 5-羟甲基糠醛，而糠醛和 5-羟甲基糠醛也会进一步裂解成甲酸和乙酰丙酸等<sup>[58]</sup>。这些化合物中的一部分，如乙酸、甲酸、乙酰丙酸、呋喃类物质和木质素的降解产物等，都会对纤维素酶及发酵微生物产生强烈的抑制作用，影响木质纤维素的转化和最终的乙醇得率<sup>[20, 49, 59-61]</sup>。因此，在酶解和发酵前必须去除这些具有抑制作用的化合物，即进行脱毒处理。到目前为止，针对不同的抑制物，已开发出多种不同的脱毒方法，主要包括物理法、化学法和生物法等。

### 1.3.2.1 物理脱毒法

真空蒸发是一种比较有效的脱毒方法,能够去除预处理液或水解液中的大部分挥发性抑制物,如糠醛、香兰素等,但同时也浓缩了其它不易挥发的物质,如乙酸及木质素的降解物等<sup>[63-67]</sup>。用活性炭、硅藻土或离子交换树脂对抑制物进行选择性的吸附,能够脱除有机酸和酚酸类物质,但是脱毒效果受到 pH、脱毒时间、温度及活性炭用量的影响<sup>[68-69]</sup>。用二乙氧基甲烷或油醇也能够去除水解液中的大部分乙酸、几乎全部的糠醛、香兰素和 4-羟甲基苯甲酸,从而大大提高水解液的发酵效率<sup>[70-71]</sup>。此外,用大量的新鲜水对预处理过的木质纤维素原料进行彻底清洗也是一种非常有效的脱毒方法<sup>[72]</sup>。

### 1.3.2.2 化学脱毒法

过碱化调节(Overliming)是目前应用最多,也最廉价的脱毒方法<sup>[73]</sup>。一般在 50-60 °C 的条件下用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  将预处理液或水解液的 pH 调整到 9-10 并维持 30-60 分钟,再用  $\text{H}_2\text{SO}_4$  重新调整到 5.5。在这一过程中,部分有毒物质会生成钙盐沉淀下来,pH 值的升高也会使一些有毒物质变得不稳定。在脱毒后的水解液中,糠醛和 5-羟甲基糠醛完全被除去,乙酸却不受影响。用脱毒后的水解液进行发酵,乙醇的生产速率得到较大幅度提高。用 NaOH 或 KOH 代替  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节 pH,也可以达到脱毒的目的,但效果没有用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  好<sup>[60, 64, 74]</sup>。

### 1.3.2.3 生物脱毒法

生物脱毒法主要是针对预处理液或者预处理原料酶解后的水解液,通过特殊的酶制剂或微生物分泌的酶液,有选择性的去除对发酵微生物产生抑制作用的化合物。如用白腐真菌 *Trametes versicolor* 产生的漆酶和过氧化物酶处理木屑的水解液,可以除去部分有机酸和酚类物质,加快葡萄糖的代谢和乙醇的生成速率<sup>[75]</sup>。用真菌 *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616 可以代谢水解液中的糠醛、5-羟甲基糠醛、芳香酸、脂肪酸和一些醛类,缩短发酵时的延滞期,提高乙醇得率<sup>[76-79]</sup>;用细菌 *Cupriavidus basilensis* 对小麦秸秆的水解液进行生物脱毒,可以除去糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸、甲酸以及一些芳环化合物,而且该细菌不消耗水解液中的葡萄糖、木糖和阿拉伯糖<sup>[80]</sup>。此外,用不同浓度的木质纤维素预处理液或水解液对发酵菌种进行逐级驯化或者通过代谢工程的方法改造发酵菌种,提高其对抑制物的耐受性或者使其具有代谢抑制物的能力,也被视为一种生物脱毒的方法<sup>[81-83]</sup>。

## 1.3.3 木质纤维素原料的糖化与发酵

### 1.3.3.1 单独的糖化与发酵工艺(separate hydrolysis and fermentation, SHF)和同步糖化与发酵工艺(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

预处理后的木质纤维素原料在纤维素酶的催化作用下酶解生成葡萄糖,然后由发酵微生物代谢生成乙醇。发酵结束时发酵醪中的乙醇浓度决定了乙醇分离过程的能耗,甚至影响整个乙醇生产过程的经济性。发酵醪中的乙醇浓度越高,蒸馏过程的能耗就越低<sup>[84]</sup>(见图 1.3)。一般的,蒸馏单元进料中乙醇浓度高于 4% (w/w)时,蒸馏才具有实际意义,否则过高的精馏能耗使得整个过程失去工业应用价值<sup>[85]</sup>。要提高发酵醪中的乙醇

浓度, 必须提高酶解结束时体系的葡萄糖浓度, 进而提高酶解体系的固体含量。在分步的糖化与发酵工艺中, 原料的糖化与葡萄糖的发酵是单独进行的<sup>[86-90]</sup>。随着固体含量以及酶解结束时葡萄糖浓度的提高, 葡萄糖对纤维二糖酶的产物抑制作用逐渐增强, 从而大大降低木质纤维素原料的酶解效率。而同步糖化与发酵工艺是将纤维素的酶解与微生物的发酵两个有先后顺序的工段整合成一个同步的过程, 即在同一个反应器中, 木质纤维素原料在纤维素酶的催化下酶解生成葡萄糖的同时, 立即被发酵微生物直接转化成终产物乙醇。尽管乙醇对纤维二糖酶也会产生抑制作用, 但比葡萄糖产生的产物抑制作用要小的多。这种工艺是目前最常用的木质纤维素原料加工工艺, 它不仅有效解除了葡萄糖对纤维二糖酶的抑制, 而且提高了反应器的利用效率和整个过程的效率。但是, 由于纤维素酶的作用温度一般为 45-55 °C, 发酵微生物的最适生长和发酵温度为 30-37 °C, 因此, 同步糖化与发酵时采用的温度是一个折中的温度: 35-37 °C。在此温度下, 纤维素酶的催化活性会有所降低<sup>[91-93]</sup>。

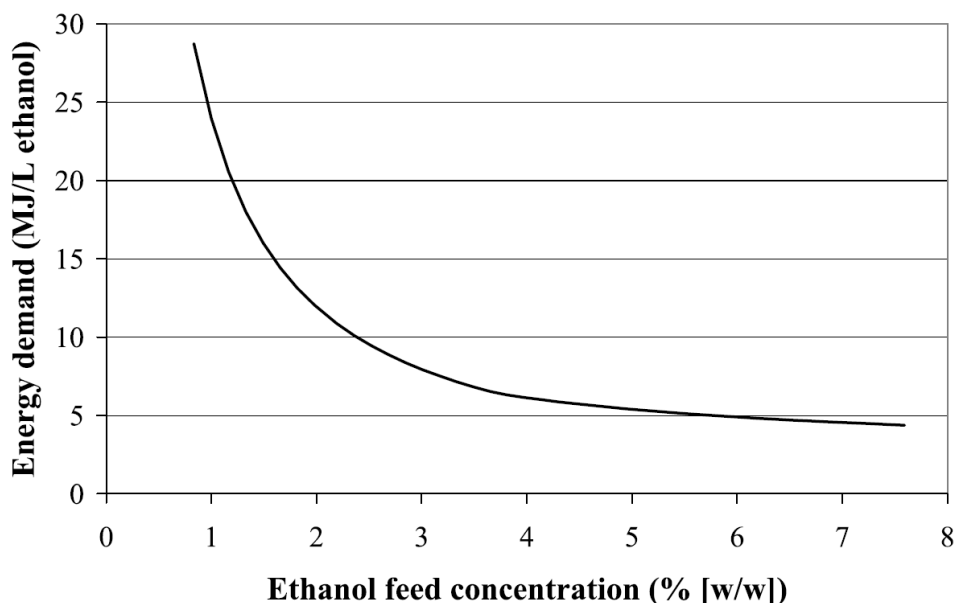


图 1.3 乙醇蒸馏过程的能耗<sup>[84]</sup> (乙醇浓度蒸馏至 94%)

Fig. 1.3 Energy demand in the distillation step, where ethanol is concentrated to 94%, as a function of the ethanol feed concentration. The step was assumed to consist of two stripper columns (25 trays each) and a rectification column (35 trays) heat integrated by operating at different pressures. The inlet feed temperature was increased from 80 °C to the boiling temperature before entering each stripper column.

### 1.3.3.2 高固体含量下木质纤维素原料的同步糖化与发酵

只有提高同步糖化与发酵过程木质纤维素原料的固体含量, 才能提高发酵结束时的乙醇浓度, 减少发酵过程的用水量, 降低蒸馏过程的能耗, 进而提高整个乙醇生产工艺的经济性。发酵结束时要达到 5%(w/w)以上的乙醇浓度, 固体含量至少要在 25%(w/w)以上<sup>[94-95]</sup> (假定木质纤维素原料中纤维素含量为 34%(w/w), 纤维素至乙醇的转化率是理论转化率的 70%)。在实验室水平, 10-15%(w/w)固体含量时的物料所具有的初始粘度

已经很高, 导致反应器内的混合困难及能耗增大<sup>[94, 96-97]</sup>; 在中试规模, 15-20%(w/w)的固体含量已经是常规搅拌反应器能够处理的极限<sup>[98]</sup>。另一方面, 随着固体含量的增加, 体系中积累的抑制物水平也大幅提高, 从而严重影响纤维素酶的催化活性和微生物的发酵性能<sup>[99-100]</sup>。

尽管采取补料或增大酶量的方法可以缓解反应器中的搅拌限制<sup>[92, 101-105]</sup>, 但是最根本的问题是开发节能、高效且能够处理高固体含量的反应器。Mohagheghi 等人 1992 年开发了一种利用球磨水平旋转来带动塑料瓶中秸秆混合的装置, 最高可以处理 24.4%(w/w)固体含量的秸秆进行同步糖化与发酵, 发酵结束时乙醇浓度为 55-57 g/L<sup>[97]</sup>。De Bari 等人对蒸汽膨爆预处理后的白杨木生产乙醇的工艺进行了放大, 分别在 250 ml 摇瓶、10 L 和 50 L 带有螺带桨的反应器中进行了 0.20 g/g 固液比的同步糖化与发酵(螺带桨由 Braun Biotechn International 公司提供), 最终乙醇得率分别为 85% 和 75%<sup>[106]</sup>(10L 和 50L 反应器中的乙醇得率相当, 均为 75%)。Fan 等开发了一个半连续的固体补料反应器, 最高可以处理 30%(w/w)固体含量的纸浆进行同步糖化与发酵, 乙醇浓度达到 47 g/L<sup>[94]</sup>。Jorgensen 等人开发了一种利用重力自由下落进行混合的反应器, 它具有 5 个独立的腔体, 每个腔体内的水平搅拌轴上固定了 3 个桨叶, 转动的方向在顺时针与逆时针之间变换。这种反应器可以处理高达 40%(w/w)固体含量的秸秆进行同步糖化与发酵, 但是乙醇得率随着固体含量的增加而降低<sup>[85]</sup>。Roche 等人深入研究了这种反应器在处理高固体含量秸秆糖化时的规律, 并建立了关于糖化体系中固体颗粒含量和屈服应力与纤维素转化率之间的动力学模型<sup>[107]</sup>。此外, 这种反应器已经在丹麦的 Dong Energy 公司放大到 11 m<sup>3</sup> 的规模<sup>[108]</sup>。

#### 1.3.4 乙醇的分离

传统的乙醇分离采用蒸馏的方法, 即先用汽提塔将乙醇与其它非挥发性成分分开, 然后在精馏塔中将乙醇浓缩至其共沸点, 分离得到较高纯度的乙醇。这一过程(包括对发酵醪的预热)是整个乙醇生产过程中最耗能的工段<sup>[84, 109]</sup>(见图 1.4, 黑色线条代表该过程总的热负荷, 即以锅炉蒸汽形式表示的总的能量需求)。而且, 在对木质纤维素原料的发酵醪进行蒸馏时, 尤其是在高固体含量下, 需要先进行液固分离, 否则由于大量固体残渣的存在, 会导致管线堵塞, 釜底严重结焦, 从而大大降低蒸馏塔的分离效率和使用寿命, 加速设备损耗。因此, 开发新的乙醇分离技术来降低乙醇生产过程的能耗, 对整个生物炼制行业都有积极的推动作用。

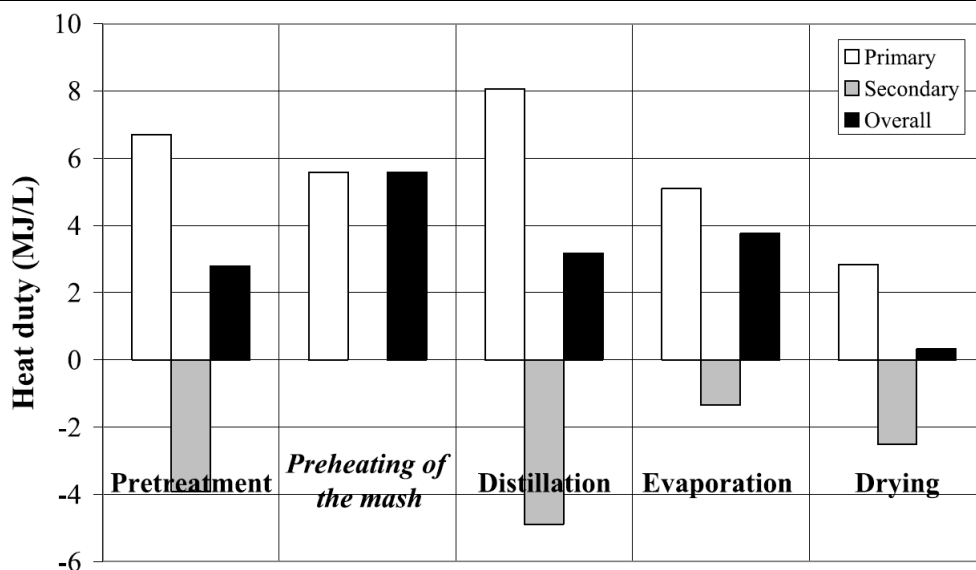


图 1.4 乙醇生产过程中各工段的热负荷<sup>[84]</sup>

Fig. 1.4 Heat duty of energy-demanding process steps in ethanol production from biomass. The white bars represent the primary steam demand while the gray bars represent the amount of secondary steam that is generated. The black bars are the difference between the primary steam demand and the generated secondary steam. The sum of the black bars is equal to the overall process heat duty.

### 1.3.5 同步糖化与发酵过程中纤维素酶的回收及发酵菌种的循环利用

在木质纤维素原料同步糖化与发酵生产乙醇的过程中，尤其是当固体含量较高时，发酵生成的高浓度乙醇（40 g/L 以上）对纤维素酶和酵母会产生一定的毒害作用<sup>[97]</sup>。如果将生成的乙醇及时分离出去，将会大大促进木质纤维素的酶解和乙醇的生成速率。此外，纤维素酶和发酵菌种的成本在同步糖化与发酵过程中也占了相当的比例<sup>[92]</sup>。目前，对纤维素酶的回收主要针对低固体含量木质纤维素的酶解过程<sup>[111-113]</sup>。图 1.5 描述了一种典型的纤维素酶回收方法。首先将酶解后的液浆分为两部分：液体部分和固体部分，然后向液体中加入新的物料让纤维素酶重新吸附到物料上，再离心除去上清；固体部分则通过加入新的缓冲液，使吸附在残渣上的纤维素酶解吸到溶液中，再离心除去固体残渣。最后，将重新吸附了纤维素酶的新鲜物料和溶解有纤维素酶的缓冲液进行混合，开始新一轮的酶解<sup>[110]</sup>。也有报道称加入表面活性剂后，如聚乙二醇，纤维素酶的回收率更高<sup>[114]</sup>。这种纤维素酶的回收方法虽然高效（进行三个酶解循环后，纤维素转化率基本不变），但是离心和吸附操作过多，过程繁琐且染菌的风险较大<sup>[114-118]</sup>。更重要的是，只能处理固体含量较低的物料。而对高固体含量酶解或同步糖化发酵过程中的纤维素酶进行回收，还没有相关报道。至于木质纤维素同步糖化与发酵过程中菌种的循环，常规的细胞固定化的方法必定行不通，因为酶解过程中产生的细小纤维素颗粒会堵塞固定化材料，阻碍细胞与可发酵性糖的有效接触，降低发酵效率<sup>[119-120]</sup>。

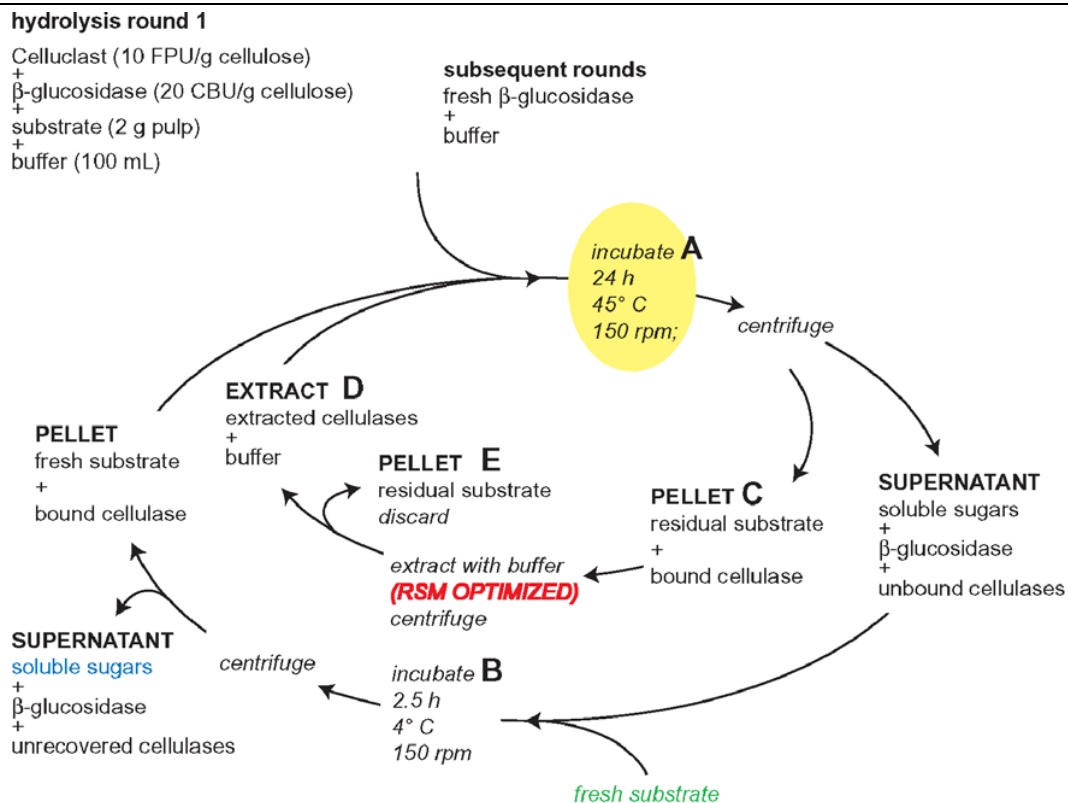


图 1.5 2% (w/w) 固体含量秸秆酶解体系中纤维素酶的回收策略<sup>[110]</sup>

Fig. 1.5 The cellulase recovery strategy for the corn stover enzymatic systems at 2% (w/w) solids loading

### 1.4 纤维素乙醇生产中存在的问题

尽管生物转化木质纤维素原料生产纤维素乙醇的工艺已经打通，而且建立了数十套中试装置或示范生产线，但是过高的生产成本严重阻碍了纤维素乙醇的产业化步伐。纤维素乙醇的高成本具体表现在纤维素酶价格昂贵、木质纤维素乙醇收率低、预处理和精馏过程的能耗高、以及大量废水处理所导致的环境成本<sup>[84]</sup>。在以往和正在进行的研究中，大量注意力都放在了降低纤维素酶成本和提高乙醇收率等物耗所导致的成本问题上，而对高能耗和大量废水排放这类只有在大规模工业装置和长周期运转情况下才得以充分显现的成本问题则较少关注。

从能耗角度进行分析，生物转化木质纤维素生产乙醇过程的能耗直接表现在预处理过程的蒸汽消耗和低浓度乙醇发酵液的精馏能耗上<sup>[84-85]</sup>。从预处理角度考虑能耗时，降低高温蒸汽的用量是降低能耗的主要手段。为了保证木质纤维素原料的糖化效率，预处理过程必须维持足够强度；在保证预处理效率的前提下，减少预处理高温蒸汽的用量是减少预处理能耗的主要手段。从精馏的角度考虑能耗时，问题则更为复杂和突出。一般而言，精馏是工业生产中能耗最大的单元操作之一，经常占到工厂总能耗的 50-90%。乙醇精馏能耗与发酵液中的乙醇浓度直接相关，乙醇浓度每提高一个百分点精馏能耗都会明显下降<sup>[84]</sup>。以木质纤维素为原料的纤维素乙醇发酵，发酵液中乙醇一般只能达到 3-5%(v/v)的“啤酒”浓度，而当乙醇浓度低于 6%(v/v)时，精馏能耗过高，以至于一般认为不具备工业应用价值。只有达到 10-12%(v/v)的“葡萄酒”浓度，乙醇精馏操作能

耗才能达到工业应用许可的范围。达到较高乙醇浓度的先决条件是在起始的转化体系中加入尽可能多的木质纤维素固体原料和尽可能少的水,经过预处理和酶水解之后才能获得尽可能高浓度的可发酵单糖,进而在发酵后获得较高浓度的乙醇<sup>[92]</sup>。然而,原料固体含量的提高会产生诸多生物反应器设计和生物过程操作上的工程问题:固体含量的提高使已有气-液-固多相发酵体系的粘度急剧增加,系统混合、传质和传热效率急剧下降;传统酶反应器和发酵罐的搅拌系统不适用于高固体含量的混合与传递,能耗很高且搅拌效率差;预处理后的木质纤维素原料中抑制物含量由于高固体物料的投放而维持在较高水平,严重抑制了酶水解(糖化)和乙醇发酵效率,在某些情况下乙醇发酵菌种甚至被完全抑制,使发酵不能进行;此外,常规预处理过程所获得的木质纤维素原料含水量较高,无法达到高固体含量的生物加工要求。

从降低废水排放的角度分析,生物转化木质纤维素生产乙醇过程的废水排放主要集中在预处理废水、脱毒废水和发酵废水三个方面。目前世界上已经或正在实施的纤维乙醇工业示范项目,预处理过程含酸废水的排放量一般都是木质纤维素固体质量的 6-10 倍,而且在预处理步骤就有大量富含木质纤维素降解产物的含酸废水产生;预处理后的木质纤维素物料均需经过一定形式的脱毒处理(水洗、过碱化调节)后方可进入后续的同时糖化与发酵工序,不可避免的伴随着大量富含复杂抑制物组分的废水产生;发酵过程的废水排放是发酵工业的常态,低浓度纤维素乙醇生产过程的废水排放则更为可观。一般来讲,在目前技术水平的纤维素乙醇生产中,每吨燃料乙醇至少会产生 25-35 吨甚至更多的富含多种木质纤维素降解产物和无机盐成分的废水<sup>[21, 25, 121]</sup>。考虑到未来纤维素乙醇产业的工厂都地处生物质资源丰富的农村地区,加之运输半径限制所导致的生产规模较小,废水处理系统完善程度差,废水排放所带来的环境问题更为严重和难以控制,因此在研发阶段形成废水极限低量的排放对未来产业化的正常运作和可持续发展有着特别重要的意义。为了降低废水排放所带来的高昂成本,在生物转化木质纤维素生产纤维素乙醇过程的每一步骤都使用极限低量的新鲜水和蒸汽,使每一步骤的固体含量都达到极限高值,是降低过程废水排放的必需手段。而且,高固体含量加工不仅可以提高发酵液的乙醇浓度,也可以有效降低精馏能耗。而极限低水策略所导致的过程转化效率降低与能耗增加之间的矛盾,则是生物转化木质纤维素生产乙醇过程降低废水排放的关键所在。

此外,由于纤维素乙醇生产过程中的纤维素酶都是一次性使用,导致纤维素酶的成本约占纤维素乙醇生产成本的 40%-50%<sup>[1]</sup>。目前,大多数针对纤维素酶回收的研究都是关于低固体含量原料的酶解过程,而对于同步糖化与发酵过程中纤维素酶的回收,尤其是在较高的固体含量条件下,还缺乏行之有效的办法。

## 1.5 本论文主要研究内容

本论文针对纤维素乙醇生产成本高的问题,展开对纤维素乙醇生产过程的研究,包括预处理、脱毒、高固体含量下原料的同时糖化与发酵以及纤维素酶的回收等工序,旨

在降低纤维素乙醇生产过程的能耗、水耗和废水排放，实现纤维素酶的有效回收，最终降低生产成本，建立一条具有显著创新意义的节能和废水减排的资源节约型木质纤维素原料生产高浓度乙醇的生产线。

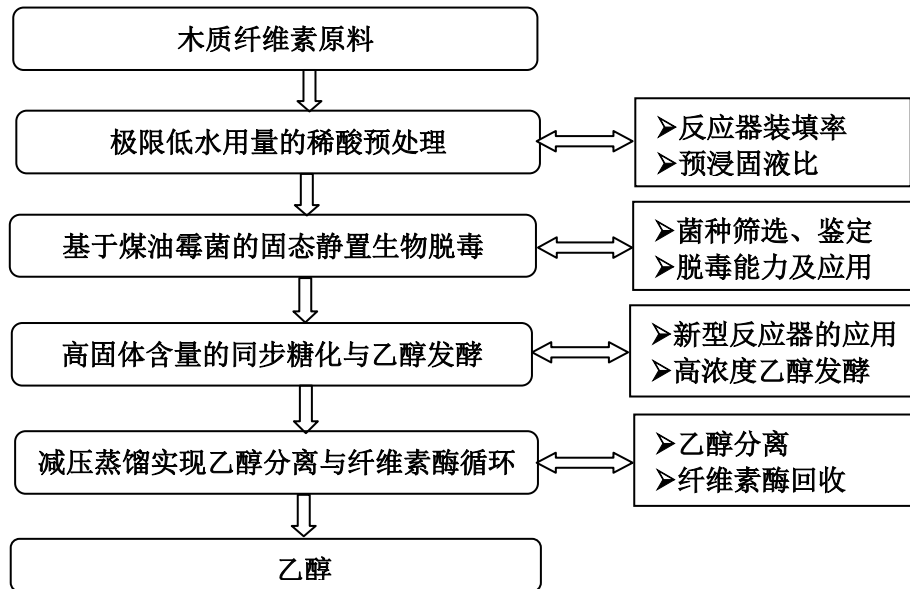


图 1.6 本文的研究主线

Fig. 1.6 The research core thread of this dissertation

在节水、节能约束的条件下进行木质纤维素原料的生物转化生产高浓度乙醇是本论文的主线。为此，本论文主要在以下几个方面开展了较为深入的研究：

(1) 针对稀酸预处理过程原料含水量高且过程能耗高的问题，发现并深入研究了预处理反应器物料装填率和预浸固液比对预处理过程能耗、水耗及预处理效果的影响，提出了节水节能的干式稀酸预处理技术，并探讨了将该技术应用于不同木质纤维素原料的可行性；

(2) 筛选了一株独特的煤油霉菌，研究了该菌的生理学特性和对抑制物的降解能力，开发了一种基于该菌的对预处理后木质纤维素原料进行固态生物脱毒的新技术；

(3) 设计开发了一种新型螺带搅拌桨生物反应器，最高可以处理 40% (w/w) 固体含量的秸秆进行同步糖化与发酵。通过对乙醇发酵性能、搅拌能耗及反应器内流型三方面的分析表明其在处理高固体含量秸秆同步糖化与发酵生产乙醇时较普通 Rushton 搅拌桨反应器具有优势；研究了此反应器在不同固体含量和不同酶量下进行同步糖化与发酵秸秆生产乙醇时的性能；探讨了采取其它措施进一步提高发酵醪中乙醇浓度的可行性；

(4) 探讨了通过减压蒸馏来实现木质纤维素原料在高固体含量进行同步糖化发酵与乙醇分离过程相耦合的可行性，分别研究了减压蒸馏对合成发酵液、40% (w/w) 固体含量下所得秸秆发酵醪上清液和 40% (w/w) 固体含量下所得秸秆发酵醪全醪中乙醇的分离效果、纤维素酶酶活及抑制物的影响，为实现高固体含量下纤维素乙醇的连续化或半连续化生产奠定了坚实的基础。

## 第 2 章 木质纤维素原料的干式稀硫酸预处理研究

### 2.1 前言

在利用木质纤维素原料生产纤维素乙醇的工艺中,预处理是提高原料酶解性能的先决条件;而且,由于预处理能够影响到整个生物转化过程的各个工段(包括原料前处理、酶解、发酵、产物分离、废物处理和副产物的生成等)而被认为是木质纤维素原料生物加工过程的核心工艺<sup>[26]</sup>。目前,虽有多种预处理方法付诸实践,包括物理法、化学法、物化法及生物法等,但是只有化学试剂参与的预处理方法才能最大程度的破坏木质纤维素的固有结构,提高原料的转化效率和乙醇得率<sup>[25, 122]</sup>。

稀硫酸预处理是目前主流的预处理方法之一,也是极有潜力在将来的纤维素乙醇工业中取得应用的技术<sup>[25, 32, 123-128]</sup>。而且,稀硫酸预处理已应用于多种不同的木质纤维素原料生产乙醇的工艺中<sup>[124-126, 129-135]</sup>。但是,常规的稀硫酸预处理存在如下缺点,导致其成本居高不下:(1)相当大的新鲜水耗(稀酸溶液与木质纤维素原料的质量比一般为 6-10:1)和大量酸性废水的排放;(2)相当大的能耗(用热的蒸汽或电加热来维持预处理反应体系的温度在 200 °C 左右);(3)大量抑制物的产生,包括有机酸类(乙酸,甲酸,乙酰丙酸和阿魏酸),呋喃类(糠醛和 5-羟甲基糠醛),酚酸类(如香兰素,愈创木酚和 4-羟基苯甲醛)和腐蚀性的金属离子等。因此,降低预处理过程的水耗和能耗,减少废水排放及抑制物的产生,对于提高预处理过程的经济性,降低纤维素乙醇的生产成本,推动纤维素乙醇的工业化具有重要意义。

以往对稀酸预处理的研究主要集中在通过优化常规的预处理条件(如预处理温度、时间和稀酸浓度)来提高葡萄糖得率,减少预处理过程产生的抑制物,进而提高预处理过程的经济性<sup>[3, 25-26, 135]</sup>。本章则另辟蹊径,深入研究了两个极其重要而又极易被忽略的预处理条件(预处理反应器的物料装填率和预浸固液比)对降低预处理过程能耗、水耗和对预处理效果的影响,建立了一种低能耗和低水耗的“干式”稀硫酸预处理方法,并将这种干式预处理技术推广应用到多种不同的木质纤维素原料上,进一步考察了经过固态生物脱毒后的物料在高固体含量条件下的同步糖化与发酵性能<sup>[136]</sup>。

### 2.2 材料与方法

#### 2.2.1 实验材料

##### 2.2.1.1 木质纤维素原料和沙子

实验中所用的木质纤维素原料都产自中国的农业大省,如吉林、河南、山东等,具有广泛的代表性,其具体产地见表 2.1 所示。除吉林的玉米秸秆收获于 2007 年秋,其它产地的原料均收获于 2008 年秋。上述原料收获后,用 SF-300 型粉碎机粉碎并过筛至粒径为 5-10 mm。筛分后的秸秆经水洗除去沙土,105 °C 烘至恒重后密封于塑料袋中备用。

用于冷模实验的沙子为普通的建筑用黄沙,平均粒径为 0.3-1.7 mm。105 °C 烘干后

用去离子水以 10:1 的固液比(w/w)进行混匀后备用。混匀后沙子的表观密度为 1120 kg/m<sup>3</sup>。预处理反应器满载时沙子的重量约为 10 kg。

表 2.1 各种木质纤维素原料及其产地

Materials	Origin place (province)
Corn stover I (CS-I)	Jilin
Corn stover II (CS- II)	Shandong
Corn stover III (CS- III)	Henan
Wheat straw I (WS-I)	Shandong
Wheat straw II (WS-II)	Henan
Rice straw (RiceS)	Jiangxi
Cotton straw (CottonS)	Henan
Rape straw (RapeS)	Henan

#### 2.2.1.2 纤维素酶及菌种

预处理后木质纤维素原料的酶解用纤维素酶 Accellerase 1000(购自杰能科国际有限公司, Genencor International), 其纤维素酶和纤维二糖酶酶活分别为 65.8 FPU/ml 和 152.0 IU/ml<sup>[136]</sup>。

生物脱毒所用菌种为本实验室自行筛选到的煤油霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1<sup>[137-138]</sup>, 能够降解预处理过程中产生的大部分抑制物, 包括有机酸、呋喃类、酚酸类物质等, 其筛选方法及详细的生理学特性参见第 3 章。

乙醇发酵所用菌种为本实验室诱变筛选得到的耐高温、耐抑制物的酿酒酵母菌 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1, 可以在 37 °C 进行正常的生长和发酵。

#### 2.2.1.3 主要试剂及溶液的配制

##### (1) 主要试剂

四环素购自比利时 Acros Organics 化学公司。

放线菌酮购自美国 Amresco 公司。

硫酸购自上海凌锋化学试剂有限公司。

##### (2) 主要溶液的配制

0.1 mol/L、pH4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液: 分别配好 0.1 mol/L 的柠檬酸和柠檬酸钠溶液, 然后将柠檬酸溶液缓缓加入到柠檬酸钠溶液中并搅拌均匀, 用 pH 计测定至其 pH 值达到 4.8。

10 mg/ml 四环素溶液: 称取四环素 0.1000 g 于 10 ml 容量瓶中, 加入 75%(v/v)的乙醇溶解并定容, 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后保存于-20°C 冰箱中备用。

10 mg/ml 放线菌酮溶液: 称量 0.1000 g 四环素于 10 ml 容量瓶中, 加入超纯水溶解并定容, 用 0.22 μm 滤膜过滤除菌后于 4 °C 冰箱备用。

#### 2.2.1.4 培养基

PDA 培养基：取去皮马铃薯 200 g，切成小块，加水 1 L，煮沸 1 h，用 8 层纱布过滤，然后补水至 1 L，并添加葡萄糖 20 g，琼脂粉 20 g，pH 自然。

合成培养基： $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g/L，酵母粉 1.0 g/L，葡萄糖 20.0 g/L，pH 自然，分装于三角瓶中 20 mL/100 mL。

25% 和 50% 的水解液培养基：将 30.0% (w/w) 固体含量下酶解得到的水解液与合成培养基分别以 1:3 和 1:1 (v/v) 的比例混合，pH 调整至 5.0，即可得到 25% 和 50% 的水解液培养基，分装于三角瓶中 20 mL/100 mL。30.0% (w/w) 固体含量下水解液的制备见本章 2.2.2.5。

种子培养基：成分同 50% 的水解液培养基。

上述培养基经 115 °C、20 分钟灭菌后备用。

此外，在进行同步糖化与发酵操作时，发酵体系中营养盐的浓度为： $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.0 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0 g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0 g/L，酵母粉 1.0 g/L。

### 2.2.1.5 主要实验仪器及设备

#### (1) 高温稀酸预处理反应器



图 2.1 高温稀酸预处理反应器

Fig. 2.1 The self-made reactor for dilute sulfuric acid pretreatment

用于高温稀酸预处理的反应器为自行设计的圆柱形不锈钢反应器（见图 2.1），其体积约 10 L（内径约 180 mm，高约 400 mm）。预处理反应器筒体的顶部和底部均用法兰

密封，在顶部法兰上安装有一个压力表、两个排气孔及一个伸入反应器内部约 150 mm 的热电偶；靠近底部法兰的上方有一个环形气体分布器，与蒸汽发生器相连；底部法兰上安装有排液阀。筒体的外壁绕了一圈加热带，加热带外用绝缘石棉包裹，以降低预处理时的热量损失。同时，在外壁和加热带之间也安装有一个热电偶，预处理时可同时监测反应器内、外温度。通常，反应器内温度比器壁温度高约 5-10 °C，但以反应器内温度为准<sup>[139]</sup>。

(2) 新型螺带桨生物反应器（用于秸秆高固体含量下的同步糖化与发酵操作）：

其结构及具体特性详见第 4 章。

(3) 其它实验仪器

Thermo scientific Forma -86C 超低温冰箱	美国 Thermo scientific 有限公司
HZ-9212S 型恒温水浴振荡器	江苏华利达实验设备厂
YXQ-LS-SII 型立式压力蒸汽灭菌器	上海博讯实业有限公司医疗设备厂
DHG-9140A 型电热恒温鼓风干燥箱	上海一恒科学仪器有限公司
SF-300 型粉碎机	上海科太粉碎设备厂
AL104 型电子天平	瑞士梅特勒托利多仪器有限公司
PL602-L 型电子天平	瑞士梅特勒托利多仪器有限公司
BIOTECH-5L 生物反应器	上海保兴生物设备工程有限公司
5415D 小型高速离心机	德国 Eppendorf 公司
Avanti J-26 型高速冷冻离心机	美国 Backman Coulter 有限公司
Milli-Q 超纯水纯化系统	美国 Millipore 公司
高效液相色谱仪（Bio-Rad HPX-87H 色谱柱，RID-10A 示差折光检测器）	日本岛津公司

## 2.2.2 实验方法

### 2.2.2.1 高温稀酸预处理

木质纤维素原料的高温稀酸预处理主要分为两个步骤：原料的预浸和预处理。首先称取一定量的干基原料，按一定固液比(w/w)加入特定浓度的稀 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 溶液，预浸 12-16 小时。然后将预浸好的原料装入一个不锈钢圆柱形网套（网套直径略小于预处理反应器内径）中，接着将网套放入预处理反应器中，密封好顶部和底部法兰并开始通入压力为 3.0 MPa 的高温蒸汽。当反应器内温度达到 100 °C 时，迅速依次微开顶部排气阀和底部排液阀约 5 秒钟，排出不凝气体。关闭排气阀和排液阀，继续通入蒸汽至设定温度后，开始计时并维持一段时间。保温结束后，完全打开预处理反应器顶部的排气阀，使压力迅速降至常压。取出圆柱形网套，将预处理后的物料转移至不锈钢容器中冷却至室温，盛入塑料袋中，4 °C 保存备用。为减少预处理过程的热能损耗，尽量缩短两批预处理之间的时间间隔。此外，在进行第一批预处理实验之前，对预处理反应器进行预热（不加入木质纤维素原料）<sup>[139]</sup>。

### 2.2.2.2 预处理后木质纤维素原料的生物脱毒

从保存煤油霉菌 *A. resiniae* ZN1 的斜面接一环孢子于 PDA 培养基斜面, 25 °C 静置培养 3 天进行活化, 然后用 20 mL 无菌水将斜面上的孢子洗出, 接入盛有 200 g 稀酸预处理过且用 20%(w/w)的  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  将 pH 调整至 5.0 左右的秸秆的生物反应器中, 维持 25 °C、50-60%的含水量进行菌种扩培 3 天。然后将 200 g 扩培好的含煤油霉菌的物料接入 2 kg、pH 调整至 5.0 左右、含水量约 50%(w/w)的预处理后的秸秆中, 混合均匀, 于 25 °C、50-60%的含水量下进行生物脱毒 7 天, 脱毒后的物料保存于 -20 °C 冰箱中备用<sup>[137]</sup>。

#### 2.2.2.3 木质纤维素原料预处理效果的评价

通常, 稀硫酸预处理的强度可以用“强度因子”来表征<sup>[32]</sup>, 但是在本研究的预处理实验中, 没有产生预处理液(原料预处理后固体含量约为 50%(w/w), 没有游离水), 故不能用“强度因子”来表征。用原料预处理后和酶解后的糖得率(包括葡萄糖得率和木糖得率)及预处理过程产生的抑制物浓度也可表征原料的预处理强度和效果。

对预处理后木质纤维素原料的酶解参照美国可再生能源实验室(NREL)的 LAP-009<sup>[140]</sup>, 具体步骤如下: 在 100 ml 的三角瓶中依次加入 1.0 g 预处理后的物料和 10 ml 0.1 M、pH4.8 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液, 然后加入去离子水将体系的固体含量调整至 5.0%(w/w), 并将 pH 重新调至 4.8, 同时加入 0.06 ml 四环素(10 mg/ml)和 0.08 ml 放线菌酮(10 mg/ml), 并加入纤维素酶 Accellerase 1000, 使体系的酶量达 15.0 FPU/g DM。然后将三角瓶置于水浴摇床上, 50 °C、180 rpm 酶解 72 小时。酶解结束后, 取 1 ml 样品, 10000 rpm 离心 10 分钟, 对上清液进行 HPLC 分析。每个实验两个平行, 报告数据为其平均值。

#### 2.2.2.4 酵母菌的驯化

为保证同步糖化与发酵实验的平行性, 酿酒酵母(*S. cerevisiae* DQ1)在合成培养基中培养至  $\text{OD}_{600}$  为 4 左右与甘油以 7:3 的比例混匀后分装入 2.0 ml 冻存管中, -70 °C 冻存。每次使用取出一支, 接种至 20 ml 的合成培养基中, 30 °C, 150 rpm 培养 18 小时。然后以 10%(v/v)的接种量接种至 25%的水解液中, 30 °C, 150 rpm 培养 15 小时。然后转接至 50%的水解液中, 相同的条件下培养 15 小时, 接着将驯化好的酵母菌转接至种子培养基并在同样的条件下培养 12 小时。最后, 将经过驯化的酵母菌接种至已经预酶解 12 小时的同步糖化与发酵体系中, 开始进行同步糖化与发酵操作。

#### 2.2.2.5 木质纤维素原料在 30.0%(w/w)固体含量下的同步糖化与发酵

30.0%(w/w)固体含量下的同步糖化与发酵操作在本实验室自行研发的螺带浆生物反应器中进行。根据温度的不同可将同步糖化与发酵过程分为两个阶段, 即预酶解阶段和同步糖化与发酵阶段。预酶解阶段的条件为 50 °C、150 rpm, 15.0 FPU/g DM 的纤维素酶量, 以补料的方式在 12 小时内加入稀酸预处理且经生物脱毒后的木质纤维素原料, 至固体含量达 30.0%(w/w)。然后调整反应器温度至 37 °C、pH 5.0, 以 10%(v/v)的接种量接入驯化过的酵母菌, 开始进行同步糖化与发酵操作, 该阶段持续 48 或 60 或 72 小时。在整个同步糖化与发酵过程中, 体系的 pH 值用 20%(w/w)的  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  控制在 5.0 左右。每隔 8 小时取样, 10000 rpm 离心 5 分钟, 取上清进行 HPLC 分析。

30.0%(w/w)固体含量水解液的制备：方法与同步糖化与发酵过程中预酶解阶段的操作相同，但制备水解液的原料不经过生物脱毒，且整个过程持续 48 小时。然后将酶解后的液浆在 8000 rpm 的条件下离心 10 分钟，收集上清液即得到 30.0%(w/w)固体含量下的水解液。

### 2.2.3 分析方法

#### 2.2.3.1 纤维素酶和纤维二糖酶酶活的测定方法

纤维素酶活的测定方法参照美国可再生能源实验室(NREL)的 LAP-006, 将 1 小时内催化 50.0 mg Whatman 滤纸生成 2.0 mg 还原糖的纤维素酶量定义为 1 个滤纸酶活单位(one unit of filter paper cellulase, FPU)。首先, 将纤维素酶稀释合适的倍数, 取 0.5 ml 加入含有 1.0 ml 50 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和 50.0 mg Whatman 滤纸的试管, 50 °C 水浴反应 1 小时, 反应后体系的还原糖浓度用 DNS 法测定<sup>[141]</sup>。

纤维二糖酶活的测定方法：向 1.0 ml 80 mM 的纤维二糖溶液（用 pH 4.8、50 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配制）中加入 1.0 ml 稀释至合适倍数的纤维素酶液, 50 °C 水浴反应 10 分钟, 然后于沸水浴中煮沸 2 分钟终止反应, 反应中产生的葡萄糖用葡萄糖试剂盒测定。将 1 分钟内催化 80 μmol 纤维二糖生成 2.0 μmol 葡萄糖的纤维二糖酶量定义为一个纤维二糖酶活单位<sup>[142]</sup>(one unit of cellobiase activity, CBU)。

#### 2.2.3.2 纤维素、半纤维素含量的测定

木质纤维素原料中纤维素和半纤维素含量的测定参照美国可再生能源实验室的两步硫酸酸解法<sup>[143]</sup>。具体步骤如下：首先称量 100 mg 完全洗净（即用大量的去离子水（约原料重量的 50-100 倍）洗去木质纤维素表面附着的可溶性组分）并烘干的原料装入耐高温的具塞试管中, 加入 1 ml 72%(w/w)的硫酸, 将具塞试管置于 30 °C 水浴中反应 1 小时。在此过程中, 用玻璃棒不停搅拌使硫酸与秸秆充分混合。然后, 打开具塞试管, 加入 28 ml 去离子水, 塞紧塞子并摇匀, 于 121 °C 反应 1 小时。用 CaCO<sub>3</sub> 粉末中和反应后的混合物至 pH 呈中性, 10000 rpm 离心 10 分钟后, 取上清液进行 HPLC 分析葡萄糖和木糖浓度。同时, 用葡萄糖和木糖作为对照, 计算整个过程葡萄糖和木糖的损失率, 并对数据进行校正。

#### 2.2.3.3 预处理后物料/脱毒后物料中抑制物及寡糖含量的测定

木质纤维素原料经过预处理后或生物脱毒后其固体含量约 50%(w/w)左右, 没有游离水存在。对其所含的抑制物测定方法如下：首先精确测定预处理后木质纤维素原料的含水量, 然后称量 5.0 g 预处理后或脱毒后的原料, 加入 45 ml 去离子水, 于 30 °C、150 rpm 的条件下振荡 2 小时。取出混合物, 10000 rpm 离心 5 分钟, 取上清液进行 HPLC 分析。根据预处理后木质纤维素原料的含水量, 反算出单位重量原料中各种组分的含量。

物料中寡糖含量的测定参照美国可再生能源实验室的“液相组分中糖、副产物及降解产物的测定方法”<sup>[144]</sup>。

#### 2.2.3.4 葡萄糖、木糖、纤维二糖、乙醇及抑制物组分的测定

葡萄糖、木糖、纤维二糖、乙醇、乙酸、乙酰丙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛通过高效

液相色谱仪测定。条件为：Bio-Rad HPX-87H 柱，流动相为 5 mmol/L 的硫酸，流速为 0.6 mL/min，柱温 65 °C，示差折光检测器(RID-10A)检测。样品稀释合适的倍数并用 0.22 μm 的滤膜过滤，进样量为 20 μL。

### 2.2.3.5 预浸固液比、物料装填率、稀硫酸浓度、水耗及能耗的定义

预浸固液比是指预浸过程中干基原料的质量与所用稀硫酸溶液质量之比(w/w)；物料装填率指在预处理过程中，预处理反应器所装入物料与其自身体积之比(v/v, %)；预处理条件中稀硫酸的浓度是指原料用硫酸溶液预浸后体系硫酸的质量与干物料质量之比(w/w, %)。预处理过程的能耗指预处理后物料的总质量与预浸后物料的总质量之差，即在预处理过程中物料所吸收高温蒸汽的质量。预处理过程的水耗是指预处理后物料的总质量减去预浸时加入的干物料的质量，包括预浸过程的用水量和预处理过程冷凝的水量。

### 2.2.3.6 木糖、葡萄糖和乙醇得率的计算

木糖、葡萄糖及乙醇得率的计算分别参照文献 128, 136 和 137<sup>[128, 136-137]</sup>。

$$\text{木糖得率} = ([\text{xylose}]) / (1.136 f \times [\text{biomass}]) \times 100\%$$

$$\text{葡萄糖得率} = ([\text{glucose}] + 1.053 \times [\text{cellobiose}]) / (1.111 f \times [\text{biomass}]) \times 100\%$$

$$\text{乙醇得率} = ([\text{EtOH}]_f - [\text{EtOH}]_0) / (0.51 f \times [\text{biomass}] \times 1.111) \times 100\%$$

[xylose]、[glucose]和[cellobiose]分别指木质纤维素原料预处理/酶解后体系的木糖、葡萄糖和纤维二糖浓度，g/L；f 指木质纤维素原料中的纤维素含量，g/g；[biomass]指体系初始的固体含量，g/L；[EtOH]<sub>f</sub>和[EtOH]<sub>0</sub>分别指发酵结束和发酵开始时体系的乙醇浓度，g/L。1.136 是半纤维素转化为木糖的系数；1.053 是纤维二糖转化为葡萄糖的系数，1.111 是纤维素转化为葡萄糖的系数。

## 2.3 结果与讨论

### 2.3.1 原料在预处理反应器中满载时可以显著降低预处理过程的能耗

在木质纤维素原料的高温稀酸预处理过程中，预处理反应器的物料装填率对预处理过程水耗、能耗和预处理效果的影响一直是一个被忽略的方面，本节将重点探讨这个问题。

#### 2.3.1.1 相同的预处理条件下，物料装填率对预处理过程能耗和水耗的影响

首先，在同一预处理条件下（预浸固液比为 2.0，2.5%(w/w)的硫酸浓度，190 °C 处理 3 分钟），考察不同的物料装填率对预处理过程能耗和水耗的影响（见图 2.2）。从图 2.2 分析可知，在预处理过程中，随着物料装填率的增加（从 12.5%到 100%(v/v)），单位质量干秸秆(100 g)的水耗和能耗都随之急剧降低。与此同时，预处理过程水耗的降低也导致预处理后玉米秸秆中固体含量的大幅增加（从 27.1%增加到 50.1%(w/w)）。

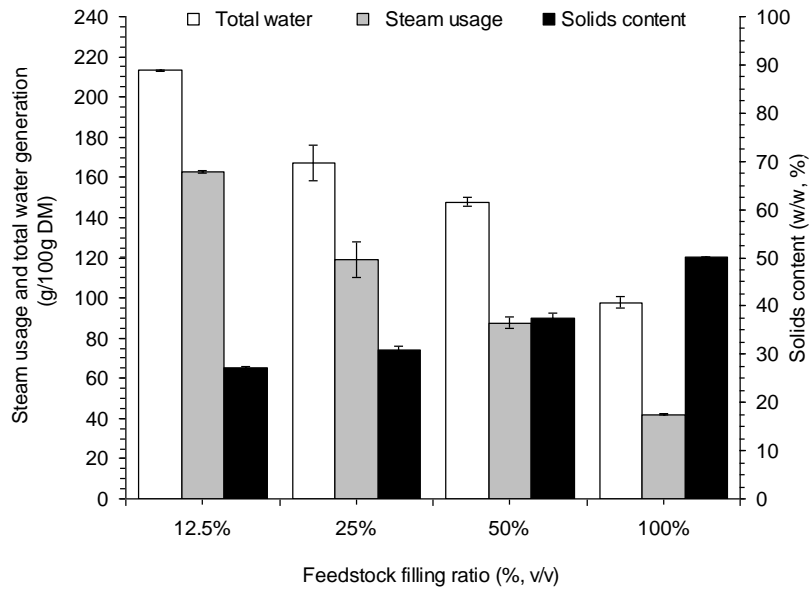


图 2.2 物料装填率对预处理过程水耗和能耗的影响

Fig. 2.2 Effect of the feedstock filling ratio on the steam consumption and waste water generation. The feedstock was CS with the solids/liquid presoaking ratio of 2.0. The pretreatment conditions were 2.5% (w/w) dilute sulfuric acid, 190 °C for 3 minutes.

2.3.1.2 不同预处理条件下，物料装填率对预处理过程能耗、水耗及预处理效果的影响

接着，又考察了在不同的预处理条件下（预处理条件见图 2.3），两个不同的物料装填率（400 g 干秸秆（相当于半载，即物料装填率为 50%(v/v)）和 800 g 干秸秆（相当于满载））对预处理过程能耗、水耗（见图 2.3）及预处理效果（见表 2.2）的影响。

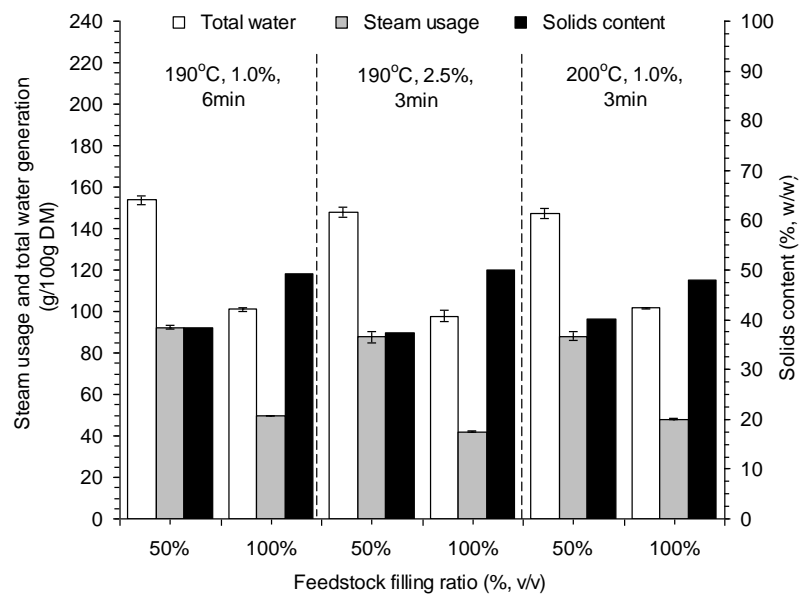


图 2.3 不同预处理条件下物料装填率对能耗和水耗的影响

Fig. 2.3 Effect of the feedstock filling ratio on the steam consumption and waste water generation at the different pretreatment conditions. The pretreatment conditions on the figure legend indicate temperature, sulfuric acid concentration, and time.

图 2.3 的结果与图 2.2 类似，即在预处理过程中，单位质量干秸秆(100 g)的能耗和水耗都随着物料装填率的增加而降低，而预处理后物料的固体含量随之升高（从半载时的 40%(w/w)升高到满载时的 50%(w/w)）。从表 2.2 分析可知，两种装填率下，预处理后玉米秸秆中的纤维素含量差别不大；酶解后玉米秸秆的葡萄糖和木糖得率都只随着预处理温度、时间和稀硫酸浓度的变化而变化，而不随着物料装填率的变化与改变。同样的，预处理液中的葡萄糖、木糖、寡聚葡萄糖和寡聚木糖以及一些抑制物组分（如乙酸，糠醛和羟甲基糠醛）随装填率的变化也不大。从上述分析可知，在预处理过程中，高的装填率不但不影响物料的预处理效果，而且能大大降低过程的能耗和水耗，提高预处理后物料的固体含量。

从以上的实验结果可以发现一个有趣的现象：在预处理过程中，蒸汽的消耗随着物料装填率的增加而降低，即满载时反应器中的秸秆重量是半载时的两倍，但单位重量的秸秆消耗的蒸汽却是半载时的一半，这似乎不合常理。

一种可能的解释是预处理过程中的热损耗（指高温蒸汽遇到反应器壁冷凝所消耗的蒸汽）所致，即装填率越小，反应器中自由空间越大，蒸汽冷凝几率增加，热损耗也越大。为此，专门用沙子代替玉米秸秆，在相同的预处理条件下（预浸固液比为 10.0，无硫酸加入，190 °C 处理 3 分钟）进行冷模，考察不同装填率（25%到 100%(v/v)）对过程能耗的影响（见表 2.3）。分析表 2.3 可知，不同的装填率对预处理前后沙子的重量基本没有影响，表明预处理过程中因蒸汽而冷凝的热损耗很少（即预处理反应过程的保温措施较好），基本可以忽略。

表 2.3 装填率对冷模过程能耗和水耗的影响

Table 2.3 Steam and water consumption in the mock-up pretreatment using sand as the feedstock

Feedstock filling ratio (%, v/v)	Sand before pretreatment (kg)	Sand after pretreatment (kg)
25%	2.60 ± 0.05	2.62 ± 0.04
50%	5.47 ± 0.0	5.45 ± 0.01
100%	10.01 ± 0.0	9.82 ± 0.30

The conditions for the mock-up pretreatment were at 190 °C for 3 minutes at the pressure of 1.2 MPa. The sand before mock-up experiment was presoaked with water at a solids/liquid presoaking ratio of 10.0 (w/w).

另一种解释则是：木质纤维素原料具有极强的吸水性和蒸汽吸收性，可以快速的吸收相当于其自身重量 10 倍以上的水分。在预处理过程中，当原料没有装满预处理反应器时，物料上方留有较大的自由空间可供热的蒸汽填充，这时秸秆原料特殊的蒸汽吸收性能就体现出来，秸秆不断的吸收蒸汽，使体系压力降低，就需要通入更多的蒸汽来维持体系压力和温度。这一循环将会一直持续到预处理反应结束，从而造成高的蒸汽消耗；当预处理反应器满载时，通入的高温蒸汽只用来加热秸秆原料和预浸所用的酸液到所需温度，没有多余的自由空间留给蒸汽。只要达到所需的预处理温度，便只需通入较少的蒸汽来维持反应体系处于所需状态。综上所述，木质纤维素原料自身特殊的吸水特性，

是引起预处理过程能耗和水耗随装填率特殊变化的主要原因。因此，在预处理过程中，保持反应器处于满载状态，避免给蒸汽留有自由空间，既可保证理想的预处理效果，又能提高反应器的使用效率，降低预处理过程的能耗和水耗，强化预处理过程的经济性。

### 2.3.2 预浸固液比对预处理过程能耗、水耗及预处理效果的影响

在高温稀硫酸预处理过程中，首先需要用稀硫酸溶液对原料进行预浸处理。增加预浸固液比（干秸秆与稀硫酸溶液的质量比），可以显著降低预处理过程的水耗，但可能会导致秸秆因浸润不充分而增加预处理过程的蒸汽消耗，甚至会影响预处理效果。本节着重考察预浸固液比对预处理过程能耗、水耗及预处理效果的影响（见图 2.4 和表 2.4）。

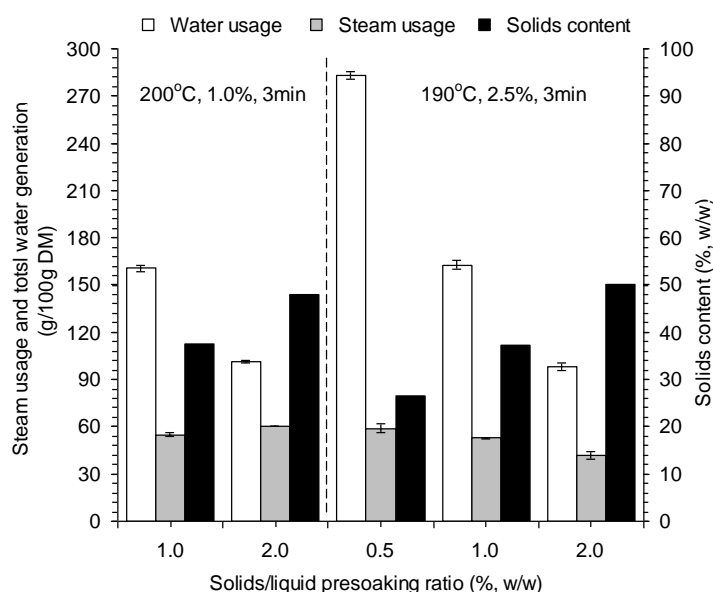


图 2.4 不同预处理条件下预浸固液比对预处理过程能耗和水耗的影响

Fig. 2.4 Effect of the solids/liquid presoaking ratio on the steam consumption and waste water generation at the different pretreatment conditions. The feedstock was CS with the filling ratio to the pretreatment reactor of 100% (v/v). The pretreatment conditions on the figure legend indicate temperature, sulfuric acid concentration, and time and were listed detailedly in Table 2.4.

分析图 2.4 可知，与之前的预测相反，当预处理条件为 200 °C，1.0%，3 分钟时，单位质量干秸秆(100 g)的蒸汽消耗随着预浸固液比的增加基本不变；当预处理条件为 190 °C，2.5%，3 分钟时，单位质量干秸秆的蒸汽消耗反而略有降低。由于预浸时液体用量大大减少，导致预处理后物料中固体含量的大幅提高。从表 2.4 的数据可以看出，预处理后玉米秸秆的葡萄糖得率基本维持在同一水平，木糖得率则随着预浸固液比的增加有所降低。这一结果与 Ferreira 等人的研究结果不尽一致，主要是由于预处理条件（相对低的固液比，1.5-3.0/10 (w/v)，较低的预处理温度和长的预处理时间）和物料性质的不同所致<sup>[131]</sup>。在预处理液中，随着预浸固液比的增加，葡萄糖和各种抑制物的浓度都呈增加趋势，而木糖和寡糖的浓度则随之降低。也就是说，从纤维素到葡萄糖的转化不受预浸固液比的影响，而从半纤维素到木糖的转化却受到了较大影响。另一方面，随着

预浸固液比的增加,抑制物(如乙酸,糠醛和羟甲基糠醛)的生成速率也明显加快。

通常,预浸过程的稀酸用量为固体质量的 3-10 倍,甚至有用稀酸溶液完全浸泡木质纤维素原料的报道。而高的稀酸用量有两方面作用,一方面使酸液与固体原料充分浸润,来强化预处理效果;另一方面,避免由于原料强的吸水性而造成预处理过程消耗过多的蒸汽。但是,本节的实验结果却表明蒸汽消耗并不随着预浸固液比的增加而升高。导致这种现象的原因仍然与物料的吸水性有关。在预处理操作中,当预浸后的木质纤维素原料装入反应器后,其体积随着蒸汽的通入而迅速减少,一般可降至原体积的 70%-80%。预浸固液比越高,减少的体积越少。这样,反应器上方的自由空间又被热的蒸汽填充,便又重新回到了 2.3.1 中阐述的原因。

从上述实验结果可知,在稀酸预处理过程中,与预浸固液比相比,蒸汽的消耗更大程度上取决于预处理反应器中物料的装填率。因此,进一步降低预处理过程的能耗,可以通过压实反应器中装填的物料来减少通入蒸汽后所导致的体积变化,但是物料填充过于密实,势必会引起预处理过程传热和传质的问题,反而会影响物料的预处理效果。

高预浸固液比下的干式稀酸预处理技术也给其它预处理方法(如亚硫酸盐预处理和蒸汽膨爆预处理等)提供了一些可借鉴之处,尤其是在降低过程能耗,提高预处理后物料固体含量和废水减排方面<sup>[122]</sup>。

除此之外,对预处理反应器的强腐蚀性也是稀酸预处理的一大特点。很多报道都谈及预处理反应器高昂的制造成本及酸液对反应器的强腐蚀性<sup>[145]</sup>。但是,本文所用的预处理反应器使用两年后仍看不出酸液侵蚀的痕迹,很大可能是预处理过程中没有强腐蚀性的酸性预处理液产生(与采用二氧化硫气体浸润的蒸汽预处理方法相似),而其它报道中的预处理都可分离出酸性液体。

综上所述,在高温稀酸预处理过程中,高的预浸固液比可以在维持预处理效率基本不变的前提下,大大降低预处理过程的水耗和能耗;而且预处理后物料的固体含量高达 50%(w/w),没有酸性预处理液产生(即零废水排放)。

### 2.3.3 在预处理反应器满载及高的预浸固液比下对高温稀酸预处理的优化

为了在满载及高预浸固液比的条件下获得较好的物料酶解性能及低的抑制物含量,本节对一些常规的稀酸预处理条件进行了优化,实验结果如表 2.5 和图 2.5 所示。

从表 2.5 可知,预处理过程的能耗随着预处理时间和温度的增加而增加,而不随硫酸浓度的变化而改变。在不同的预处理条件下,纤维素含量在预处理前后的变化稳定在  $\pm 1-2\%$ ,表明预处理条件的改变对纤维素含量的影响不大,但半纤维素含量和木糖得率却随着硫酸浓度的增加而大幅升高。预处理液中大部分的木质纤维素降解产物(如葡萄糖,木糖,乙酸,糠醛和羟甲基糠醛)都随着预处理温度、时间和硫酸浓度的增加而增加,而寡糖的浓度却随之降低。上述结果表明,预处理强度随着预处理条件(如温度、时间和硫酸浓度)的加强而增加。

表 2.2 物料装填率对预处理效果的影响

Table 2.2 Effect of the feedstock filling ratio on the pretreatment efficiency

Parameters	Filling ratio (%)	Cellulose (% w/w)	Hemicellulose (% w/w)	Glucose yield (%)	Xylose yield (%)	Composition of pretreatment liquor						
						Glucose	Xylose	Acetate	HMF	Furfural	O-Cel	O-Xyl
190°C; 1.0%; 6min	50%	33.32	6.75	60.4	57.0	0.46	2.74	0.71	0.07	0.18	2.08	11.6
	100%	32.38	8.54	62.0	58.2	0.41	1.76	0.58	0.11	0.17	2.21	9.91
190°C; 2.5%; 3min	50%	36.62	3.19	89.3	54.3	1.67	8.17	1.37	0.33	0.66	0.87	3.21
	100%	33.72	3.70	85.1	51.5	1.58	8.02	1.20	0.21	0.90	1.57	4.29
200°C; 1.0%; 3min	50%	35.37	5.48	73.9	60.8	0.49	3.54	0.88	0.11	0.36	2.33	10.8
	100%	32.73	7.44	72.3	58.4	0.44	2.27	0.67	0.06	0.18	1.74	7.44

Data in the parameters column indicate the temperature, sulfuric acid concentration, and time; the solids/liquid presoaking ratio was 2.0; The calculation of the cellulose and hemicellulose was based on the dry solids matter (DM). The enzymatic hydrolysis conditions were: 5.0% (w/w) solids loading (without washing), pH 4.8 adjusted with 100 mM citrate acid buffer (pH 4.8), 15.0 FPU/g DM, 50 °C, 150 rpm in a water-bath shaking incubator. All the tests were performed twice and averaged.

表 2.4 预浸固液比对预处理效果的影响

Table 2.4 Effect of the solids/liquid presoaking ratio on the pretreatment efficiency

Parameters	Solids/liquid ratio	Glucose yield (%)	Xylose yield (%)	Composition of pretreatment liquor						
				Glucose	Xylose	Acetate	HMF	Furfural	O-Cel	O-Xyl
200°C; 1.0%; 3min	1.0	75.54	65.75	0.36	2.17	0.44	0.05	0.07	2.4	12.8
	2.0	72.34	58.45	0.44	2.14	0.67	0.06	0.18	2.2	11.7
190°C; 2.5%; 3min	0.5	82.74	68.35	2.20	19.3	1.84	0.31	0.54	4.2	13.6
	1.0	83.07	59.42	1.29	8.99	0.86	0.24	0.52	2.0	5.4
	2.0	84.50	49.74	1.57	8.13	1.20	0.37	0.82	1.5	4.4

Data in the parameters column indicate the temperature, sulfuric acid concentration, and time; the feedstock filling ratio to the pretreatment reactor was 100% (v/v). The enzymatic hydrolysis conditions for different pretreated CS were: 5.0% (w/w) solids loading (without washing), pH 4.8 adjusted with 100 mM citrate acid buffer (pH 4.8), 15.0 FPU/g DM, 50 °C, 150 rpm in a water-bath shaking incubator. All the tests were performed twice and averaged.

表 2.5 基于能耗和水耗对预处理条件的优化

Table 2.5 Optimization of pretreatment parameters on the steam consumption and waste water generation

Parameters	Consumption		Composition of pretreated CS			Composition of pretreatment liquor						
	Total Water	Steam	Solids content	Cellulose content	Hemi-cellulose	Glucose	Xylose	Acetate	HMF	Furfural	O-Cel	O-Xyl
	(g/100g DM)		(% , w/w)			(g/100g DM)						
190°C; 0.75%; 6min	107.3	54.1	46.8	32.36	9.08	0.29	1.30	0.54	0.07	0.12	2.21	10.41
190°C; 1.0 %; 6min	101.0	49.9	49.2	32.38	8.54	0.41	1.76	0.58	0.11	0.17	2.21	9.91
190°C; 1.25%; 6min	100.6	47.7	48.4	34.54	6.84	0.49	3.03	0.70	0.11	0.25	2.12	9.07
190°C; 1.5 %; 6min	103.2	49.8	47.6	31.34	4.74	0.79	4.94	1.00	0.23	0.56	1.90	6.34
190°C; 1.75%; 3min	98.9	44.7	48.3	32.01	7.80	0.51	2.94	0.49	0.12	0.22	2.21	9.91
190°C; 2.0 %; 3min	95.4	44.0	50.5	33.39	5.56	0.88	5.88	0.77	0.25	0.50	2.27	7.55
190°C; 2.5 %; 3min	97.8	41.9	50.1	33.72	3.70	1.58	8.02	1.20	0.21	0.90	1.57	4.29
190°C; 3.0 %; 3min	97.3	44.0	49.0	33.89	1.91	3.96	10.71	2.36	0.41	1.12	0.97	1.88
200°C; 0.75%; 3min	109.4	55.9	46.2	32.50	8.11	0.30	1.54	0.67	0.05	0.15	1.74	7.18
200°C; 1.0 %; 3min	101.5	47.9	47.9	32.73	7.44	0.44	2.27	0.67	0.06	0.18	1.74	7.44

Data in the parameters column indicate the temperature, sulfuric acid concentration, and time; the feedstock was filling into the pretreatment reactor fully 100% (v/v) and the solids/liquid presoaking ratio was 2.0; The calculation of the cellulose and hemicellulose was based on the dry solids matter (DM). The enzymatic hydrolysis conditions for different pretreated CS were: 5.0% (w/w) solids loading (without washing), pH 4.8 adjusted with 100 mM citrate acid buffer (pH 4.8), 15.0 FPU/g DM, 50 °C, 150 rpm in a water-bath shaking incubator. All the tests were performed twice and averaged.

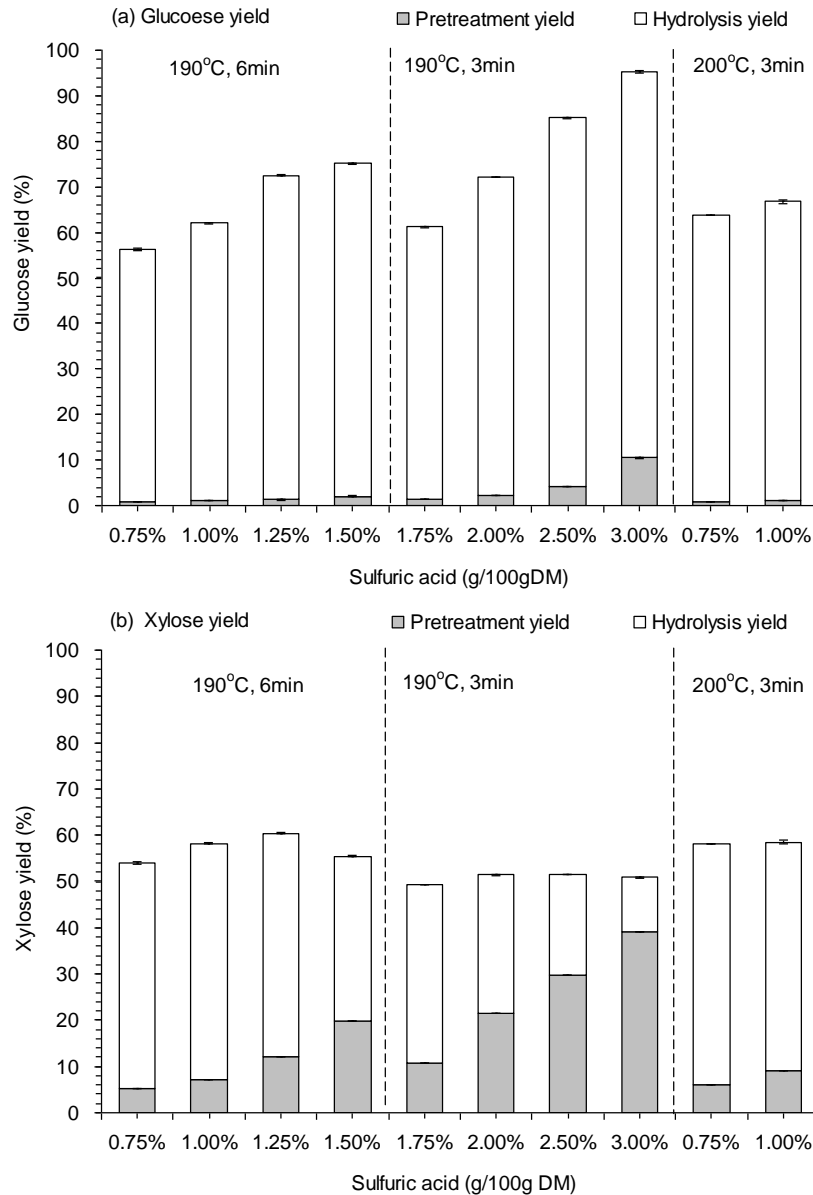


图 2.5 在预处理及酶解阶段的葡萄糖和木糖得率 (a) 葡萄糖得率 (b) 木糖得率

Fig. 2.5 Glucose and xylose yields of CS in the pretreatment and hydrolysis steps. (a) glucose yield; (b) xylose yield. The pretreatment and enzymatic hydrolysis conditions were listed in Table 2.5.

从图 2.5(a)可知，纤维素的降解主要发生在酶解阶段，而在预处理过程中降解的纤维素很少。在硫酸浓度为 0.75%-3.0%(w/w)的范围内，葡萄糖得率随着硫酸浓度的增加而增加，但是预处理温度和时间也对葡萄糖得率产生了复杂的影响，使葡萄糖得率不是简单的随预处理温度和时间增加而增加。从图 2.5(b)可知，木糖得率均处于较低的水平（低于 60%）。与纤维素的降解不同，半纤维素的降解主要发生在预处理阶段，尤其是在较高的硫酸浓度条件下。

结合上述实验结果可知，最佳的稀硫酸预处理条件是：预处理反应器满载，预浸固液比为 2:1，使用 2.5%(w/w)的硫酸浓度，在 190 °C 的条件下处理 3 分钟。预处理后玉米秸秆（未经水洗脱毒）的葡萄糖得率和木糖得率（预处理和酶解两阶段之和）分别为

85.2%和 50.9%；固体含量为 50.1%(w/w)；预处理后玉米秸秆中乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛的浓度分别为 1.20、0.90 和 0.21 g/100 g 干秸秆；预处理后玉米秸秆中的纤维素和半纤维素含量分别为 33.9%和 3.7%(w/w)。

### 2.3.4 干式稀酸预处理技术在不同木质纤维素原料上的应用及后续高固体含量下的同步糖化与发酵

本节通过考察干式稀酸预处理技术对不同木质纤维素原料的预处理效果，来评价其广适性。用本章 2.3.3 中得到的最佳预处理条件分别对不同产地的玉米秸秆、麦秆、稻草、棉秆和油菜秆（见表 2.1）进行了预处理，其过程能耗、水耗及预处理效果见图 2.6 和表 2.6。从图 2.6 可知，在预处理过程中，除了处理油菜秆时能耗有 15%的增加外，处理其它原料时的能耗和水耗都稳定在同一水平，而预处理后各种物料的固体含量都接近 50%(w/w)。

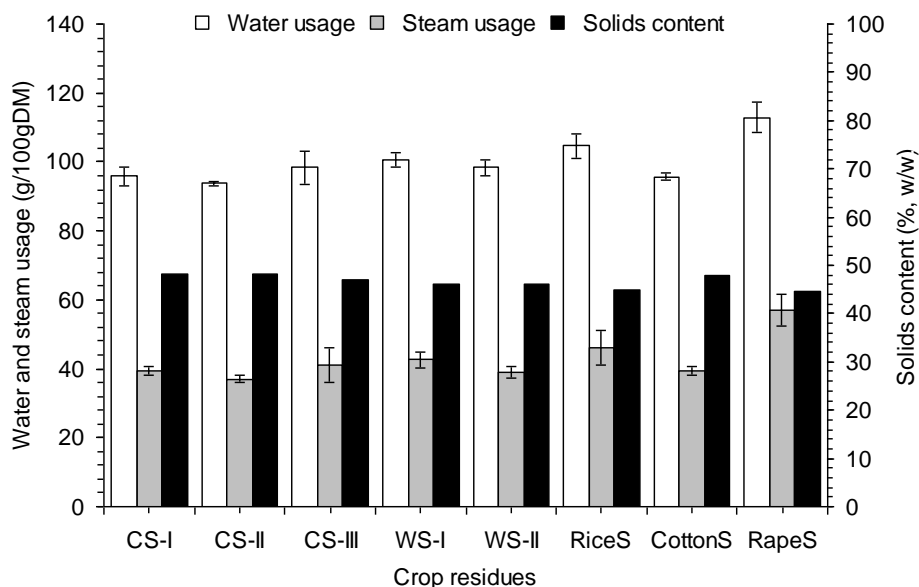


图 2.6 不同原料预处理过程中能耗和水耗变化

Fig. 2.6 Steam consumption and waste water generation during different feedstocks pretreatment. The abbreviation of the feedstocks and the pretreatment conditions were listed in Tables 2.1 and 2.6.

表 2.6 反映了各种原料在预处理前后成分的变化。分析表 2.6 可知，各种木质纤维素原料中的纤维素含量在预处理前后基本不变，而半纤维素含量则降至预处理前的 1/5-1/10。对同一种原料来说，尽管产地不同，但预处理液中各组分的浓度大致相同，但是不同种原料的预处理液成分差别很大。两种非粮作物的秸秆，棉秆和油菜秆的预处理液中，各种降解产物的浓度都远低于粮食作物秸秆。不同原料的葡萄糖得率也呈现出与预处理液组分变化相似的规律：同种但不同产地的原料具有近乎相同的葡萄糖得率，不同种的原料葡萄糖得率相差甚大。需要特别指出的是，小麦秆和稻草的葡萄糖得率相当高（95%以上），但是两种非粮作物秸秆的葡萄糖得率却相当低（低于 50%），这可能与不同种原料的自身结构及预处理强度有关。

表 2.6 不同木质纤维素原料预处理前后组分的变化

Table 2.6 Compositions of the feedstock and the pretreatment liquors of the different lignocellulose materials

Feedstocks	Cellulose		Hemicellulose		Glucose	Xylose	Composition of pretreatment liquor						
	(% , w/w)		(% , w/w)		yield	yield	Glucose	Xylose	Acetate	HMF	Furfural	O-Cel	O-Xyl
	Before	After	Before	After	(%)	(%)	(g/100g DM)						
CS-I	34.1	33.7	24.6	3.7	85.1	51.5	1.58	8.02	1.20	0.21	0.90	1.57	4.29
CS-II	35.4	37.4	23.5	5.2	74.7	60.8	1.55	8.50	1.46	0.32	0.38	0.76	5.23
CS-III	36.3	36.3	21.5	4.7	72.9	64.5	1.82	8.35	1.48	0.35	0.37	0.65	4.13
WS-I	33.4	33.0	26.5	4.3	94.6	65.3	1.09	12.5	1.26	0.23	0.33	1.01	5.56
WS-II	31.7	32.7	23.2	3.5	95.7	73.2	1.86	13.3	2.01	0.47	0.40	0.88	4.19
RiceS	35.4	36.5	22.8	4.7	99.5	67.3	0.93	8.08	0.65	0.12	0.19	1.31	5.34
CottonS	38.2	31.0	18.8	4.5	41.5	57.5	0.52	4.15	1.04	0.07	0.10	0.48	6.08
RapeS	33.9	33.0	19.9	7.1	43.3	62.8	0.65	4.58	0.83	0.08	0.15	0.69	8.89

The calculation of the cellulose and hemicellulose was based on the dry solids matter (DM). CS-I, CS-II and CS-III: Corn stover from Jilin, Shandong, and Henan, China, respectively; WS-I and WS- II: Wheat straw from Shandong and Henan, China, respectively; RiceS: Rice straw from Jiangxi, China; CottonS: Cotton stalk from Hubei, China; RapeS: Rape straw from Henan, China. The pretreatment was carried out at the full feedstock filling ratio and the solids/liquid presoaking ratio of 2.0. The enzymatic hydrolysis were carried out at 5.0% (w/w) solids loading (without washing), pH 4.8 adjusted with 100 mM citrate acid buffer (pH 4.8), 15.0 FPU/g DM, 50 °C, 150 rpm in a water-bath shaking incubator. All the tests were performed twice and averaged.

为了进一步考察干式稀酸预处理的效果，我们对预处理后的各种木质纤维素原料进行了生物脱毒处理，并在 30.0%(w/w)固体含量下实施了同步糖化与发酵操作，其结果如图 2.7 所示。分析图 2.7 可知，三种粮食作物的秸秆，玉米秸秆、稻草和小麦秸秆，预酶解 12 小时后体系的葡萄糖浓度、发酵过程中葡萄糖的消耗速率、乙醇的生成速率、乙醇的最终浓度及乙醇得率都远远高于两种非粮食作物的秸秆（棉秆和油菜秆），这种现象与表 2.6 中各种原料的酶解数据相吻合，即酶解效果差的原料发酵性能也差。

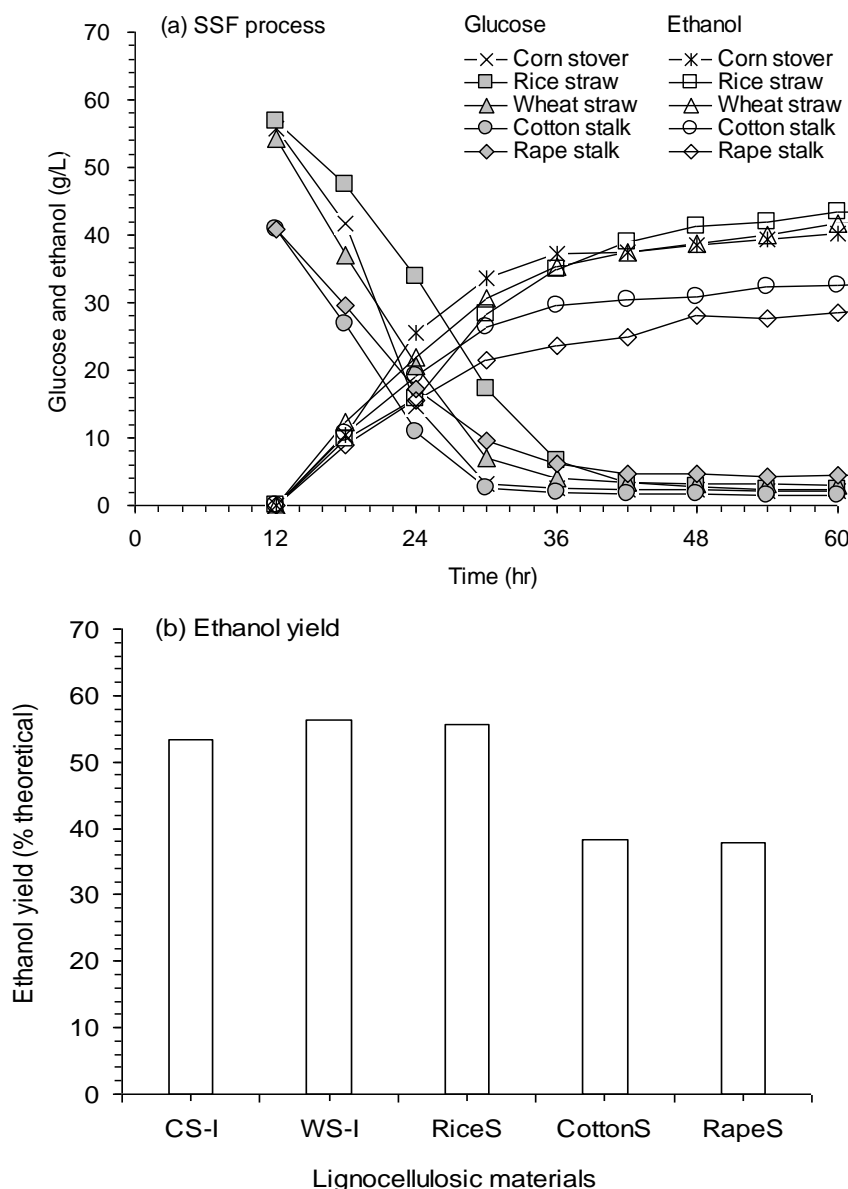


图 2.7 不同木质纤维素原料在 30.0%(w/w)固体含量下的同步糖化与发酵

Fig. 2.7 Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of different pretreated lignocellulose feedstocks at the high solids loading. (a) SSF process; (b) ethanol yield. Conditions: 30.0% (w/w) solids loading, 15.0 FPU/g DM, pH 5.0 in the helical stirring bioreactor at 150 rpm. The abbreviation of the feedstocks were listed in Table 5. The ethanol yield was based on the % of the theoretical ethanol yield.

综合上述所有结果可得,与其它预处理方法相比,干式稀酸预处理技术具有以下几个方面的优点:(1)大大降低了预处理过程中热蒸汽的消耗量,从而降低了预处理过程的能耗;(2)整个预处理过程没有酸性预处理液产生,减轻了污水处理的负担,降低了预处理过程对反应器的腐蚀性,延长了反应器的使用寿命;(3)预处理后物料的固体含量高达 50%(w/w),使预处理过程名副其实的成为一个从“干秸秆”到“干预处理物料”的过程;(4)预处理后得到的高固体含量的物料保证了随后的同步糖化与发酵操作可以在较高的固体含量(30.0%(w/w)及以上)下进行。同时,高固体含量的同步糖化与发酵操作可以生成较高浓度的乙醇,能够进一步降低乙醇分离工段的能耗。

Lynd 等人在 2008 年提出两种最有前景的利用木质纤维素原料生物转化生产乙醇的方案,第一种即采用稀酸预处理(见图 1.1)工艺,并把终产物乙醇的理想浓度定在 7%(w/w)<sup>[17]</sup>。本研究所开发的干式稀酸预处理技术将为这一目标的实现提供切实可行的技术保障。

## 2.4 小结

本章重点关注了两个对预处理过程水耗和能耗影响较大的因素,即预处理反应器的物料装填率和预浸固液比,提出了基于反应器满载和预浸固液比为 2:1 条件下的节水节能型干式稀酸预处理技术。在保证预处理效率的同时,整个预处理过程的总用水量不大于干基木质纤维素原料的质量,蒸汽用量较常规稀酸预处理降低了 50%,预处理后物料的固体含量高于 50%(w/w),为后续的固态生物脱毒及高固体含量下的同步糖化与发酵操作创造了条件。本章得到的主要结论如下:

(1)在木质纤维素原料的稀酸预处理过程中,随着预处理反应器物料装填率和预浸固液比的增加,预处理效果维持不变,而能耗和水耗随之急剧降低,预处理后的物料固体含量随之升高,这与木质纤维素原料特有的吸水性能有关。

(2)基于预处理过程高的物料装填率和高预浸固液比,对稀酸预处理过程进行了优化并得到了最佳预处理条件,即在 100%(v/v)的物料装填率和预浸固液比为 2:1 的条件下,使用 2.5%(w/w)的硫酸浓度,在 190 °C 的条件下对木质纤维素原料处理 3 分钟。预处理后玉米秸秆(未经水洗脱毒)的葡萄糖和木糖得率(预处理和酶解两阶段之和)分别为 85.2%和 50.9%;固体含量为 50.1%(w/w);预处理后玉米秸秆中乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛的浓度分别为 1.20、0.90 和 0.21 g/100 g 干秸秆;预处理后玉米秸秆中的纤维素和半纤维素含量分别为 33.9%和 3.7%(w/w)。

(3)将干式稀酸预处理成功应用到多种不同的木质纤维素原料上,包括玉米秸秆、稻草、小麦秆、棉秆和油菜秆等,预处理后物料的固体含量都在 50%(w/w)左右,并依次进行了生物脱毒和 30.0%(w/w)固体含量下的同步糖化与发酵。粮食作物的秸秆,如玉米秸秆、稻草和小麦秆,发酵后乙醇浓度都在 40 g/L 以上;经济作物的秸秆,如棉秆和油菜秆,发酵后乙醇浓度偏低,约为 30 g/L 左右。

### 第 3 章 煤油霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 对预处理后木质纤维素原料的固态生物脱毒

#### 3.1 前言

如第 2 章所述,对木质纤维素原料进行预处理,是生产纤维素乙醇的先决条件<sup>[17]</sup>。但是,预处理在破坏木质纤维素自身结构,提高原料酶解性能的同时,剧烈的反应条件也诱发了一系列的副反应,生成了多种复杂的化合物,主要包括呋喃类物质(如糠醛和 5-羟甲基糠醛等),有机酸类物质(如甲酸,乙酸和阿魏酸等)和木质素的衍生物(如香兰素,对羟基苯甲醛,愈创木酚和苯酚等)等<sup>[19, 62, 99, 146]</sup>。这些物质会对后续的糖化与发酵产生很强的抑制作用<sup>[19, 59]</sup>。因此,要保证预处理后木质纤维素原料能进行正常的酶解与发酵,必须去除这些抑制物,即需要对预处理后的物料进行“脱毒”处理。

目前,已有多种脱毒方法在实验室得到成功应用,如水洗、过碱化调节、闪蒸和离子交换吸附等<sup>[64, 146]</sup>。但是,这些脱毒方法存在着诸多负面效应,包括大量的新鲜水耗和废水排放,木质纤维素固体颗粒和可发酵性糖分的损失及抑制物脱除不完全等<sup>[147]</sup>。就应用最为广泛的水洗脱毒来说,在固液分离的过程中损失了大约 20%(w/w)的纤维素固体,直接导致最终乙醇得率的降低。而且,大量的废水排放也给整个乙醇的生产带来了巨大的污水处理压力。

另外一种可供选择的、不会产生上述负面效应的脱毒方法是“生物脱毒”,即利用微生物自身分泌的酶液来降解抑制物<sup>[77, 80, 148-149]</sup>。生物脱毒的主要优点有:无纤维素固体损失,大幅减少脱毒过程的水耗且保持脱毒后物料具有较高的固体含量等。但是,当前的生物脱毒方法主要是针对木质纤维素糖化液中的抑制物。在糖化液中进行生物脱毒有以下不利因素:(1)抑制物的浓度被稀释,导致生物脱毒速率的降低;(2)脱毒只改善了发酵微生物的发酵条件,而对木质纤维素的糖化过程没有帮助(在糖化过程中,纤维素酶因抑制物的抑制作用,催化效率会大大降低);(3)在糖化液中,单糖(如葡萄糖和木糖)的浓度较高,脱毒微生物一般以糖类作为首选碳源,这样就不可避免的导致最终乙醇得率的降低;(4)液态的生物脱毒过程一般是耗氧过程,需要供氧与搅拌,增加了生物脱毒过程的能耗和成本;(5)脱毒后的糖化液需要进行灭菌操作,以消除脱毒菌种可能对发酵微生物产生的抑制作用。因此,针对木质纤维素糖化液的生物脱毒技术限制了其在实际生产中的应用。到目前为止,还没有直接对预处理后物料进行生物脱毒,进而生产乙醇的研究。

为克服生物脱毒方法的上述缺点,提高生物脱毒技术的实用性,本实验室筛选到一株新的生物脱毒菌种,分别对其进行了分子生物学鉴定和基本的生理特性研究,采用固态培养的方式对预处理后的物料直接进行生物脱毒,并对脱毒后的物料进行高固体含量下的酶解和发酵以评价其脱毒效果。此外,还考察了将此生物脱毒方法应用到多种不同

木质纤维素原料上的可行性。

## 3.2 材料与方法

### 3.2.1 实验材料

除初筛培养基外,其它实验材料参照 2.2.1。初筛培养基:在 PDA 培养基中添加 6.0 g/L 的乙酸,1.0 g/L 的糠醛和 1.5 g/L 的 5-羟甲基糠醛。

### 3.2.2 实验方法

#### 3.2.2.1 原料的预处理

木质纤维素原料的高温稀硫酸预处理条件为:预处理反应器满载,预浸固液比为 2:1,使用 2.5%(w/w)的硫酸浓度,在 190 °C 的条件下处理 3 分钟。详细预处理步骤参照 2.2.2.1。此外,有两批不同的蒸汽膨爆预处理的玉米秸秆(steam explosion pretreated corn stover, SEPCS)。一批为中科院过程所制备(SEPCS1),预处理条件为:用高温蒸汽将秸秆加热到 210 °C, 2.2 MPa 的条件下维持 4 分钟,然后迅速释放反应器中的压力。预处理后玉米秸秆的固体含量约为 50%(w/w);另一批为中国石油吉林燃料乙醇有限公司制备(SEPCS2),预处理条件为:用高温蒸汽将秸秆加热到 200 °C, 2.0 MPa 的条件下维持 4 分钟,然后迅速释放反应器中的压力。预处理后玉米秸秆的固体含量约为 50%(w/w)。

#### 3.2.2.2 生物脱毒菌株的筛选

SEPCS2 暴露于空气中约 2 周后,才被收集起来并密封保存于 4 °C 冰箱中数月,然后从吉林运送到上海。使用时,发现秸秆上有霉菌生长的迹象。生物脱毒菌株正是从这批原料上,经以下三个步骤筛选得到。

##### (1) 菌株分离

称量 10 g 上述发霉秸秆样品,溶于 90 ml 无菌水中,30 °C、180 rpm 的条件下温育 2 小时,得 10 倍稀释样品,并将样品依次稀释  $10^2$  倍、 $10^3$  倍和  $10^4$  倍。然后将稀释  $10^4$  倍的样品涂布于 PDA 平板,于 25 °C 进行富集培养。5 天后,根据 PDA 平板上微生物的菌落形态和颜色再次涂布 PDA 平板。经 3-5 天培养后,即可得到单菌落。将得到的单菌落在 PDA 平板上进行传代实验,传代 5 次后,即可认为分离得到纯的单菌落。

##### (2) 初筛

将第(1)步分离到的单菌落涂布于初筛培养基平板上,25 °C 静置培养 5 天,根据菌落形态及大小判断是否对此菌株进行下一步的筛选。

##### (3) 脱毒筛选

为了验证第(2)步筛选到的菌株具有脱毒能力,将第(2)步分离到的菌株接种到蒸汽膨爆的玉米秸秆上(SEPCS1)进行脱毒处理。具体操作如下:称量 10 g SEPCS1(将秸秆 pH 调整到 5.0 左右)置于 250 ml 三角瓶中,接种 1 ml 初筛菌株的孢子悬液(约  $1 \times 10^6$  个/ml),用硅胶塞密封后于 25 °C 培养 4 天。然后,向三角瓶中依次加入 44 ml pH 4.8、100 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和 1.25 ml 纤维素酶 Accellerase 1000,使体系的固体含量达到 10.0% (w/w),酶量为 15.0 FPU/g DM。将三角瓶置于 50 °C、150 rpm 的水浴

摇床中振荡酶解 12 小时。酶解结束后，取样分析体系的葡萄糖浓度和抑制物含量。同时，用未接菌的 SEPCS1 作为空白对照。根据实验结果，选取抑制物降解能力强的菌株进行下一步的实验。

### 3.2.2.3 分离菌株的分子生物学鉴定

收集 8 mg 上述分离到菌株的干菌丝体，用“Qiagen DNeasy Tissue Kit” (Qiagen, Valencia, CA, USA) 抽提基因组 DNA，并参照试剂盒中附带的“酵母基因组 DNA 纯化方法”纯化 DNA。然后用真菌核糖体基因转录间隔区 (Internal transcribed spacer, ITS) 通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTAGATATGC-3') 扩增出分离菌株的 18S rDNA 的 ITS 序列，对扩增的序列进行纯化并测序。接着用 Bioedit 软件分析 ITS 序列的同源性，在 NCBI (National Center for Biotechnology Information database) 上进行 BLAST 比对后，利用 Mega 4 软件中的邻接法 (Neighbor-joining method) 构建聚类分析树状图 (Phylogenetic trees)，进而判断分离菌株的种属。

### 3.2.2.4 分离菌株的生长条件实验

通过平板计数法来考察分离菌株在不同 pH 和温度条件下，以蒸汽膨爆预处理后的玉米秸秆 (SEPCS1) 为培养基质的生长情况。具体步骤如下：取 1 ml 分离菌株的孢子悬液 (约  $1 \times 10^6$  个/ml) 接种到 10 g SEPCS1 上，25 °C 静置培养 3 天。然后，加入 90 ml 无菌水，25 °C、180 rpm 振荡 2 小时，并用无菌水将混合物稀释  $10^3$  和  $10^4$  倍。取 0.1 ml 菌悬液涂布 PDA 平板，25 °C 培养 4 天后，进行平板计数。同时，也分析了两种不同溶氧水平下菌种的生长情况，一种用氮气排出三角瓶中空气，并用橡胶塞密封瓶口；另外一种则直接用棉塞封口。

### 3.2.2.5 分离菌株的碳源生长谱实验

通过考察分离菌株以不同化合物为唯一碳源的生长情况，确定其碳源生长谱。具体方法如下：将 SEPCS1 用去离子水彻底冲洗干净 (至洗出液中的抑制物浓度小于 0.01 g/L)，然后烘干。称量 3 g 烘干后的玉米秸秆与不同种类的化合物 (化合物先溶于去离子水中) 混合均匀，然后接入 2 ml 分离菌株的孢子悬液 ( $1 \times 10^6$  个/ml)，在 25 °C 的条件下培养 9 天，定期观察并记录菌株的生长情况。

### 3.2.2.6 分离菌株的脱毒实验

通过向水洗并烘干后的秸秆中添加额外的抑制物，来测试分离菌株的脱毒能力。具体步骤如下：称量 5 g 干秸秆与抑制物混合，加入 8 ml 无菌水并搅拌均匀。接着，接入 1 ml 分离菌株的孢子悬液 ( $1 \times 10^6$  个/ml)，25 °C 培养 5 天后，加入 pH 4.8、100 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和纤维素酶使体系的 pH 为 4.8，固体含量达 10% (w/w)，酶量为 15.0 FPU/g DM，于 50 °C、150 rpm 的水浴摇床中酶解 12 小时，然后将温度降至 37 °C 并以 10% (w/w) 的接种量接入驯化后的酿酒酵母 DQ1，在 150 rpm 的条件下同步糖化与发酵 12 小时。每隔 12 小时取样，并分析样品中的抑制物、葡萄糖和乙醇含量。实验中添加的抑制物包括乙酸、甲酸、乙酰丙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛。首先考察分离菌株对单一抑制物的降解能力，然后测试对多个抑制物的混合物的降解能力。

## 3.2.2.7 生物脱毒后木质纤维素原料在高固体含量下的同步糖化与发酵

参照 2.2.2.5。

## 3.2.3 分析方法

参照 2.2.3。

## 3.3 结果与讨论

## 3.3.1 生物脱毒菌株的筛选与鉴定

从 SEPCS2 上共分离到 14 株不同表型的菌株，依次命名为 ZN1-ZN14，然后将这 14 株菌进行初筛实验。

由于乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛是玉米秸秆预处理过程中产生的三种最主要的抑制物，而且它们对发酵微生物的抑制作用最强<sup>[146, 150]</sup>，因此，在初筛培养基中添加上述 3 种抑制物，可以作为判断分离株对抑制物耐受性的一个重要指标。表 3.1 列出了 14 株分离菌在 PDA 平板和筛选培养基平板上的生长情况。分析表 3.1 可知，ZN1、ZN2 和 ZN3 三株菌在筛选培养基平板上的生长明显优于其它 11 株菌，因此将这三株菌继续进行脱毒筛选。这三株菌在 PDA 平板上的菌落形态见图 3.1。ZN1 的菌落正面呈咖啡色，绒毛状，反面呈墨绿色。显微镜下可观察到有隔菌丝和螺旋状卷曲的子囊体，子囊体下部菌丝包裹形成子囊果，具有不整子囊菌纲真菌的形态特征；ZN2 的菌落最初呈白色，一周后菌落中心变为绿色，并布满整个菌落，菌落比较平整，中心外凸。显微镜下可观察到带有横隔的菌丝，分生孢子梗也带有横隔，具有青霉的形态特征；ZN3 的颜色较淡，菌落透明且较薄。延长培养时间，可看到带有褶皱的粉末状表面，反面可看到绿色斑点。

表 3.1 14 株分离菌在 PDA 培养基和筛选培养基上的生长情况

Table 3.1 Growth behaviors of the 14 isolates on the PDA medium and the screening medium

Isolates	Growth on PDA medium	Growth on screening medium
ZN1	+++	+++
ZN2	+++	++
ZN3	+++	+++
ZN4	+++	+
ZN5	+++	-
ZN6	+++	-
ZN7	++	-
ZN8	++	+
ZN9	+++	-
ZN10	++	-
ZN11	+++	-
ZN12	+++	+
ZN13	+++	+
ZN14	++	-

- indicates there is no mycelium growth on the CS, + indicates the fungal mycelium was observable but minimum; ++ indicates the fungal mycelium grew fast and covered the surface of the solids medium of the flask; +++ indicates the fungal mycelium grew vigorously and full of the flask. Culture conditions: The PDA plates with inocula suspension were cultured at 25 °C for 5 days in the static incubator.



图 3.1 三株分离菌的表型特征

Fig. 3.1 Morphology of the isolates with toxins degradation property. Culture conditions: 25 °C for 5 days in the static incubator.

在脱毒筛选中，将分离菌株 ZN1、ZN2 和 ZN3 的孢子悬液直接接种到 SEPCS1 上进行 4 天的固态培养。然后，将脱毒后的秸秆在 50 °C、150 rpm 的水浴中酶解 12 小时，分析水解液中的抑制物和葡萄糖浓度。同时，用未接菌的 SEPCS1 作为对照（结果见表 3.2）。从表 3.2 可知，菌株 ZN1 对抑制物的降解能力明显优于 ZN2 和 ZN3；酶解后，与对照相比，用 ZN1 脱毒的秸秆葡萄糖得率增加了 53.7%，而用 ZN2 和 ZN3 脱毒的秸秆分别增加了 28.0% 和 34.6%。同时还发现，ZN1 的生长速率远远快于 ZN2 和 ZN3（当 ZN1、ZN2 和 ZN3 以等量混合后接种于 SEPCS1 上培养 1 天后，只能观察到 ZN1 的生长，而另外两株菌则观察不到明显的生长）。基于 ZN1 优越的脱毒性能和快速的生长能力，确定 ZN1 为最适合进行生物脱毒的菌株。

表 3.2 三株分离菌对玉米秸秆中抑制物的降解能力及对后续酶解过程的影响

Table 3.2 Glucose yield and toxins derived from the pretreated CS detoxified by the three isolates

Fungal strains	Acetic acid (g/L)	Levulinic acid (g/L)	Furfural (g/L)	HMF (g/L)	Glucose Yield (%)
Control	2.5±0.2	3.0±0.3	0.6±0.1	0.9±0.0	21.4±0.8
ZN1	0.6±0.1	0.6±0.1	0	0	32.9±1.2
ZN2	1.8±0.2	1.8±0.1	0.6±0.1	0.9±0.0	27.6±1.3
ZN3	1.4±0.1	1.4±0.1	0.1±0.0	0.4±0.0	28.8±1.0

Conditions: Biodetoxification was carried out in flasks at 25 °C for 4 days in the static incubator. Enzymatic hydrolysis: 10.0% (w/w) solids loading, 15.0 FPU/g DM enzyme dosage, 50 °C, 150 rpm in the water-bath shaking incubator for 12 hours. FPU, unit of filter paper cellulase.

接着，又对三株菌进行了分子生物学的鉴定，其 ITS 序列见表 3.3。初步分析结果表明：ZN1 与 *Amorphotheca resinae* AY251067.1（又被称为 *Hormoconis resinae* 和 *Cladosporium resinae*）和 *Cladosporium breviramsum* AF39684.2 具有 98% 的序列同源性。而 *A. resinae* 是一种真菌，又被称为煤油霉菌，具有降解石油和煤油的特性<sup>[151]</sup>。ZN2 与 *Penicillium polonicum* 具有 98% 的序列同源性<sup>[152]</sup>，ZN3 与 *Eupenicillium baarnense* AY213679 具有 99% 的序列同源性<sup>[153]</sup>。经过比对菌落表型特征、构建聚类树和分析序列

距离后,我们将三个分离株分别命名为 *Amorphotheca resiniae* ZN1, *Penicillium polonicum* ZN2 和 *Eupenicillium baarnense* ZN3。

表 3.3 3 个分离菌株的 ITS 序列

Table 3.3 ITS sequences of the three isolates

<i>Amorphotheca resiniae</i> ZN1	GGCTCGGAGTCTGCCTTACGGGTAGATCTCCCACCCTGTGC CATCGTTACCTTTGTTGCTTTGGCGGGCCGCCTTCGGCCGCC GGCTCACGCTGGCGCGCGCCCGCCAGAGGACCTCAACTCTT GTTTTTTAGTGTCTGCTGAGTACTATAACAATCGTTAAACTTT CAACAACGGATCTCTTGGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCA GCGAAATGCGATAAGTAATGCGAATTGCAGAATTCAGTGAG TCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTGTGGTATTCCG CAGGGCATGCCTGTTGAGCGTCATTTCAACCCTCAAGCTCT GCTTGGTGTGGGCCCTGCCCGTCGCGGCCGGCCCTAAAAT CAGTGGCGGTGCCGCTGGGCTCTGAGCGTAGTACATCTCTC GCTCCAGCGCCCCGCGGTGGCTTGCCAGAACCCCAACTTCT GTGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTA AGCATATCTAA
<i>Penicillium polonicum</i> ZN2	ACGAGCGAGGGGCTTTGGGTCCACCTCCCACCCGTGTTTAT TTTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTTACTGGCCGCCG GGGGGCTCACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACC CCCGAACTCTGTCTGAAGATTGAAGTCTGAGTGAAAATATA AATTATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCA TCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATT GCAAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGC CCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGC TGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCTCCGAT TCCGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTC CGGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGG CCCGGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGT TGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATA TCTAAGCGGAGGAATTA
<i>Eupenicillium baarnense</i> ZN3	CATTCAGTGAAGCCTCTGGGTCCACCTCCCACCCGTGTTTAT TGTACCTTGTGCTTCGGCGGGCCCGCCTTTATGGCCGCCGG GGGGCTCACGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACACCT CGAACTCTGTCTGAAGATTGTAGTCTGAGTGAAAATATAAAT TATTTAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCG ATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCA GAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCC CCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTG CCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCCGTCCTCCGATTC CGGGGGACGGGCCCGAAAGGCAGCGGCGGCACCGCGTCCG GTCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACCCGCTCTGTAGGCC GGCCGGCGCTTGCCGATCAACCCAAATTTTATCCAGGTTGA CCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCT AAGCGGAAGA

### 3.3.2 煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 的碳源生长谱实验

#### 3.3.2.1 煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 以秸秆为支撑物进行固态培养的依据

在微生物的固态培养中，需要有理想的材料作为支撑物。对于煤油霉菌 *A. resinae* ZN1，通过两个对照实验来考察秸秆作为其支撑物进行固态培养的可行性。首先，考察了煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 在脱毒过程中对玉米秸秆中纤维素含量的影响。结果表明，脱毒前后秸秆中纤维素的含量分别为  $33.4 \pm 1.4\%$  和  $32.6 \pm 1.1\%$ ，即在脱毒过程中煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 并不降解纤维素，可能原因是它并不分泌降解纤维素的酶系。其次，考察了煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 能否在彻底清洗的玉米秸秆上进行生长。结果表明，在彻底清洗的玉米秸秆上培养 9 天后，观察不到 *A. resinae* ZN1 的菌丝生长。因此，在研究 *A. resinae* ZN1 的碳源生长谱和脱毒性能时可以利用彻底清洗的玉米秸秆作为支撑载体进行固态培养。

#### 3.3.2.2 *A. resinae* ZN1 以预处理过程产生的单糖为唯一碳源的生长情况

葡萄糖、木糖、半乳糖、甘露糖和阿拉伯糖是木质纤维素原料在预处理过程产生的最主要的单糖。从表 3.4 可以看出，*A. resinae* ZN1 可以利用所有测试的单糖作为唯一碳源生长。特别值得注意的是，*A. resinae* ZN1 首先利用预处理过程中生成量最多的两种单糖，葡萄糖和木糖，而对阿拉伯糖，半乳糖和甘露糖的同化能力稍差。

表 3.4 煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 以预处理过程产生的单糖为唯一碳源的生长情况

Table 3.4 Growth behaviors of *A. resinae* ZN1 using lignocellulose derived sugars as the sole carbon sources<sup>a</sup>

Time (day)	Glucose	Xylose	Mannose	Arabinose	Galactose
1	-	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-
3	++	+	+	+	-
4	++	++	+	+	+
5	+++	+++	++	++	+
7	+++	+++	+++	++	+
9	+++	+++	+++	++	+

<sup>a</sup>All the sugars were set at 160 mg/g DM. - indicates there is no mycelium growth on the CS, + indicates the fungal mycelium was observable but minimum; ++ indicates the fungal mycelium grew fast and covered the surface of the solids medium of the flask. Culture conditions: The thoroughly washed dilute-acid pretreated CS with fungal inocula in the flasks were cultured at 25 °C for 9 days in the static incubator.

#### 3.3.2.3 *A. resinae* ZN1 以预处理过程产生的抑制物为唯一碳源的生长情况

在预处理过程中，木质纤维素原料可以降解生成糠醛、5-羟甲基糠醛，乙酸、甲酸、阿魏酸和水杨酸，香兰素、芝麻酚、4-羟基苯甲醛、愈创木酚和苯酚等化合物。本节着重考察 *A. resinae* ZN1 以这些抑制物组分为唯一碳源的生长情况（见表 3.5，3.6，3.7）。从表 3.5 可以看出，*A. resinae* ZN1 以两种主要的酵母生长抑制剂—木糖降解生成的糠醛和葡萄糖降解生成的 5-羟甲基糠醛为唯一碳源时生长良好。分析表 3.6 可知，*A. resinae*

ZN1 也可以很好的利用木质纤维素预处理过程中产生的有机酸作为唯一碳源，包括乙酸，甲酸，阿魏酸和水杨酸。从表 3.7 可知，*A. resiniae* ZN1 可以在一个较为宽泛的浓度范围利用木质素降解产生的化合物为唯一碳源，包括香兰素、芝麻酚、4-羟基苯甲醛、愈创木酚和苯酚。而且，实验中测试的抑制物浓度已经远远超过预处理过程中产生的抑制物浓度。

表 3.5 *A. resiniae* ZN1 以呋喃衍生物为唯一碳源的生长情况

Table 3.5 Growth behaviors of *Amorphotheca resiniae* ZN1 using furan-derivative toxins as sole carbon sources<sup>a</sup>

Time (days)	Furfural			HMF		
	3.9	11.6	19.3	16.7	33.3	66.7
1	-	-	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-
3	+	+	-	+	-	-
4	++	++	-	+	+	-
5	+++	++	+	++	+	+
7	+++	+++	+	+++	++	+
9	+++	+++	++	+++	++	+

<sup>a</sup>Substrate loading units are mg/g DM. - indicates no mycelium growth on the CS; + indicates fungal mycelium was observable but minimal; ++ indicates the fungal mycelium grew quickly and covered the surface of solids medium of the flask. Thoroughly washed dilute acid-pretreated CS with fungal inocula in the flasks were cultured at 25 °C for 9 days in the static incubator.

表 3.6 *A. resiniae* ZN1 以有机酸类抑制物为唯一碳源的生长情况

Table 3.6 Growth behaviors of *Amorphotheca resiniae* ZN1 using organic acid toxins as the sole carbon sources<sup>a</sup>

Time (days)	Acetate acid			Formic acid			Ferulic acid			Salicylic acid	
	34.7	52.0	69.3	36.3	72.7	109.0	5.0	20.0	40.0	1.7	3.3
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
4	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+
5	+	-	-	+	-	-	+	+	-	++	+
7	++	+	+	++	+	-	+	+	+	+++	++
9	+++	++	+	+++	+	-	++	+	+	+++	++

<sup>a</sup>Substrate loading units are mg/g DM.- indicates no mycelium growth on the CS; + indicates the fungal mycelium was observable but minimal; ++ indicates the fungal mycelium grew quickly and covered the surface of the solids medium of the flask. Thoroughly washed dilute acid-pretreated CS with fungal inocula in the flasks was cultured at 25 °C for 9 days in the static incubator.

表 3.7 *A. resiniae* ZN1 以木质素降解产物为唯一碳源的生长情况Table 3.7 Growth behaviors of *Amorphotheca resiniae* ZN1 using lignin derivative toxins as the sole carbon sources<sup>a</sup>

Time (days)	Vanillin			Sesamol		4-hydroxybenzaldehyde		Guaiacol		Phenol	
	1.7	3.3	5.0	1.7	3.3	1.7	3.3	1.9	3.7	1.7	3.3
1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	++	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+
7	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++
9	+++	++	+	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++

<sup>a</sup>Substrate loading unit: mg/g DM. - indicates no mycelium growth on the CS; + indicates the fungal mycelium was observable but minimal; ++ indicates the fungal mycelium grew quickly and covered the surface of the solids medium of the flask. Thoroughly washed dilute acid-pretreated CS with fungal inocula in the flasks was cultured at 25 °C for 9 days in the static incubator.

### 3.3.2.4 *A. resiniae* ZN1 分别以煤油和十二烷为唯一碳源的生长情况

能够利用煤油为唯一碳源生长是煤油霉菌的特性，因此本节考察了 *A. resiniae* ZN1 分别以煤油和十二烷为唯一碳源的生长情况（见表 3.8）。结果再次证明了煤油霉菌的特有属性，即能够以煤油和十二烷为唯一碳源生长；这也是除 18S rDNA 外又一个证明此菌株为煤油霉菌的生物学证据<sup>[151]</sup>。

表 3.8 *A. resiniae* ZN1 分别以煤油和十二烷为唯一碳源的生长情况Table 3.8 Growth behaviors of *Amorphotheca resiniae* ZN1 using hydrocarbons as the sole carbon sources<sup>a</sup>

Time (days)	Kerosene		Dodecane (C12 alkane)		
	267	247	494	741	
1	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-
4	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-
7	+	+	+	-	-
9	++	+	+	+	+

<sup>a</sup>Substrate loading unit: mg/g DM. - indicates no mycelium growth on the CS; + indicates the fungal mycelium was observable but minimal; ++ indicates the fungal mycelium grew quickly and covered the surface of the solids medium of the flask. Thoroughly washed dilute acid-pretreated CS with fungal inocula in the flasks was cultured at 25 °C for 9 days in the static incubator.

### 3.3.3 煤油霉菌 *A. resiniae* ZN1 的抑制物降解能力

#### 3.3.3.1 培养条件对煤油霉菌 *A. resiniae* ZN1 的影响

培养条件对微生物的生长及代谢非常重要。因此，首先考察了不同的温度、pH 和溶氧水平对 *A. resiniae* ZN1 进行固态培养的影响（见图 3.2）。从图 3.2 可知，*A. resiniae* ZN1

的生长温度范围在 20-32 °C，最适生长温度与大部分真菌相同，为 25-28 °C。同样的，*A. resiniae* ZN1 也可以在一个较为宽泛的 pH 范围内生长良好，最适生长 pH 为 4-6。不同的溶氧水平对 *A. resiniae* ZN1 的生长影响不大，但从图 3.2(c)可以看出，*A. resiniae* ZN1 的生长似乎更偏向于耗氧生长。

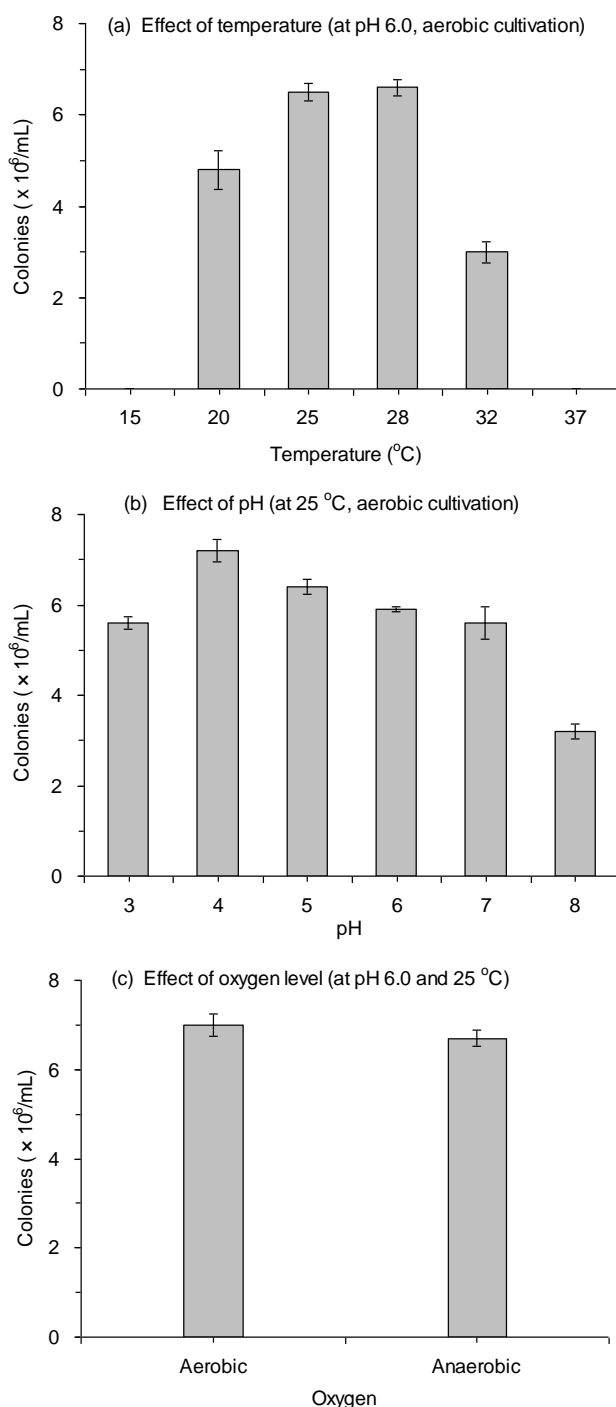
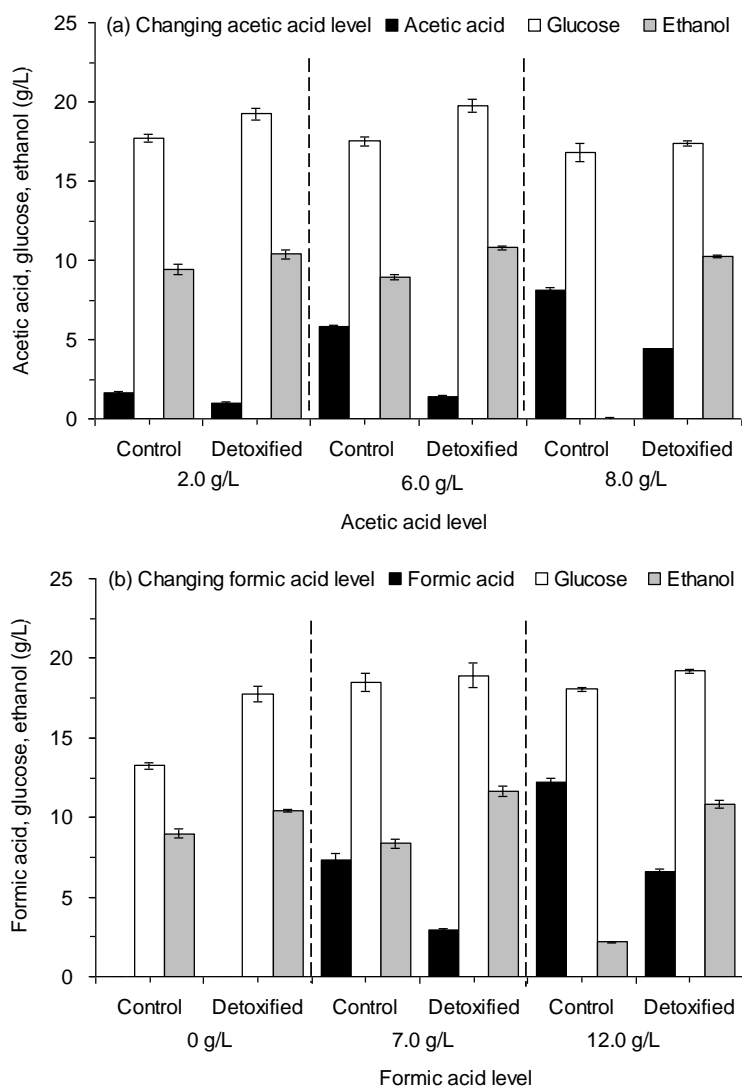


图 3.2 培养条件对 *A. resiniae* ZN1 生长的影响

Fig. 3.2 Effect of culture conditions on the growth of *Amorphotheca resiniae* ZN1. (a) Effect of temperature (b) pH (c) Oxygen level. Growth conditions on pretreated corn stover (CS) material: The solid content of the pretreated CS was 40% (w/w), and the culture lasted for 3 days in the static incubator. Culture conditions on potato-dextrose-agar (PDA) plates: 25 °C for 4 days in the static incubator.

### 3.3.3.2 煤油霉菌 *A. resiniae* ZN1 对单一抑制物的降解能力及对后续同步糖化与发酵的影响

将单一的抑制物（包括乙酸、甲酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛）添加到彻底清洗的玉米秸秆上，来考察 *A. resiniae* ZN1 对单一抑制物的降解能力，接着对脱毒后的玉米秸秆进行同步糖化与发酵，结果见图 3.3。从图 3.3(a)可以得出，在不同的乙酸浓度梯度下，与对照相比，生物脱毒后秸秆中的乙酸浓度大大降低，随之而来的是葡萄糖和乙醇浓度的大幅提高。特别是在秸秆中乙酸浓度达到 8.0 g/L 时，利用 *A. resiniae* ZN1 对玉米秸秆进行脱毒已成为必不可少的步骤，因为未经脱毒的秸秆中乙醇浓度几乎为 0，即乙酸完全抑制了酵母菌的生长和发酵。同样的，图 3.3(b)、(c)和(d)分别表明 *A. resiniae* ZN1 对甲酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛的高效降解能力以及对乙醇生成的促进作用。尤其是在抑制物浓度较高的条件下，用 *A. resiniae* ZN1 对玉米秸秆进行脱毒可以极大的促进乙醇的生成。



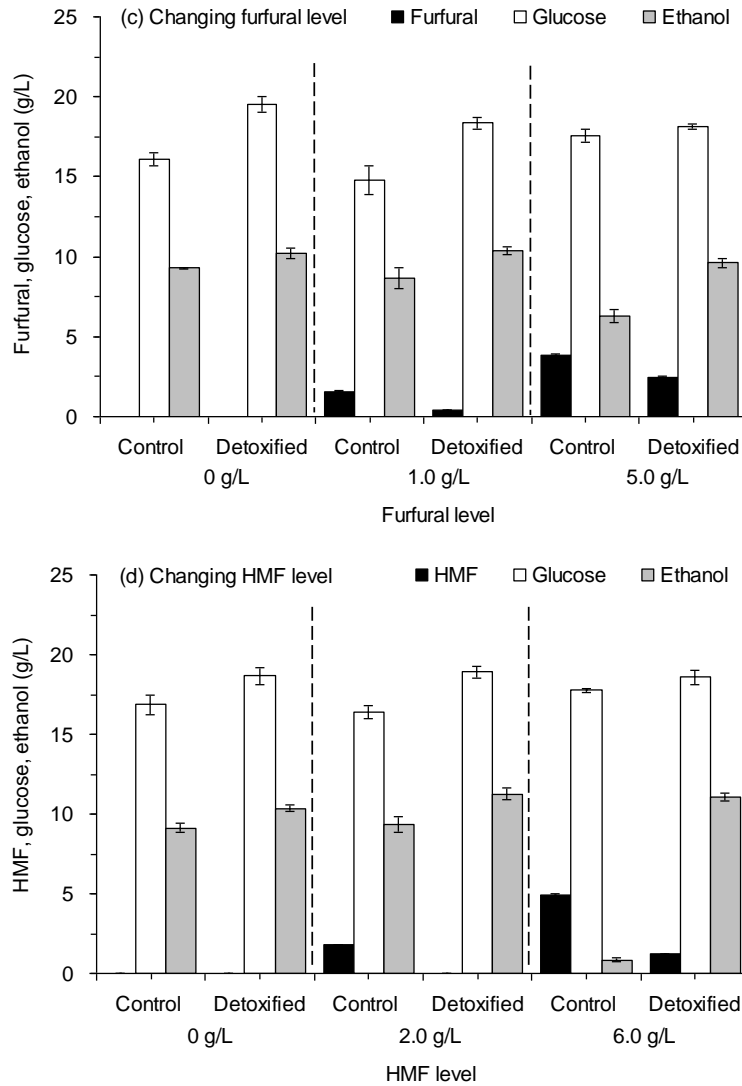


图 3.3 煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 对单一抑制物的降解能力及对后续同步糖化与发酵的影响

Fig. 3.3 Degradation of single toxin with changing concentrations on the pretreated CS by *A. resinae* ZN1 and the effect on the consequent simultaneous saccharification and ethanol fermentation (SSF). (a) Changing acetic acid level. (b) Changing formic acid level. (c) Changing furfural level. (d) Changing 5-hydromethylfurfural (HMF) level. Degradation conditions were 5 days at 25 °C in the static incubator. SSF conditions were 10% (wt/wt) of the solid loading, 15.0 FPU/g dry solid matter (DM), at pH 5.0, 50 °C at the first 12-h prehydrolysis stage and 37 °C at the sequential SSF stage, 150 rpm, 50 ml/250 ml flask, incubated in the water bath shaking incubator. FPU, unit of filter paper cellulase.

### 3.3.3.3 煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 对混合抑制物的降解能力及对后续同步糖化与发酵的影响

在预处理后的玉米秸秆中，乙酸、甲酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛是同时存在的。因此，又考察了分别向彻底洗净的玉米秸秆中添加不同的混合抑制物后，*A. resinae* ZN1 的降解能力以及对后续同步糖化与发酵的影响(见图 3.4)。图 3.4(a)、(b)、(c)分别表示 *A. resinae* ZN1 对乙酸和糠醛、乙酸和 5-羟甲基糠醛及乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛 3 组不同混合物的降解能力。结果表明，*A. resinae* ZN1 可以有效的降解各种不同的混合抑制物。其对

抑制物的降解次序为糠醛居首，接着是 5-羟甲基糠醛，最后才开始降解乙酸。同时，在各组实验中，随着生物脱毒的进行，抑制物浓度逐渐降低，乙醇浓度随之提高。

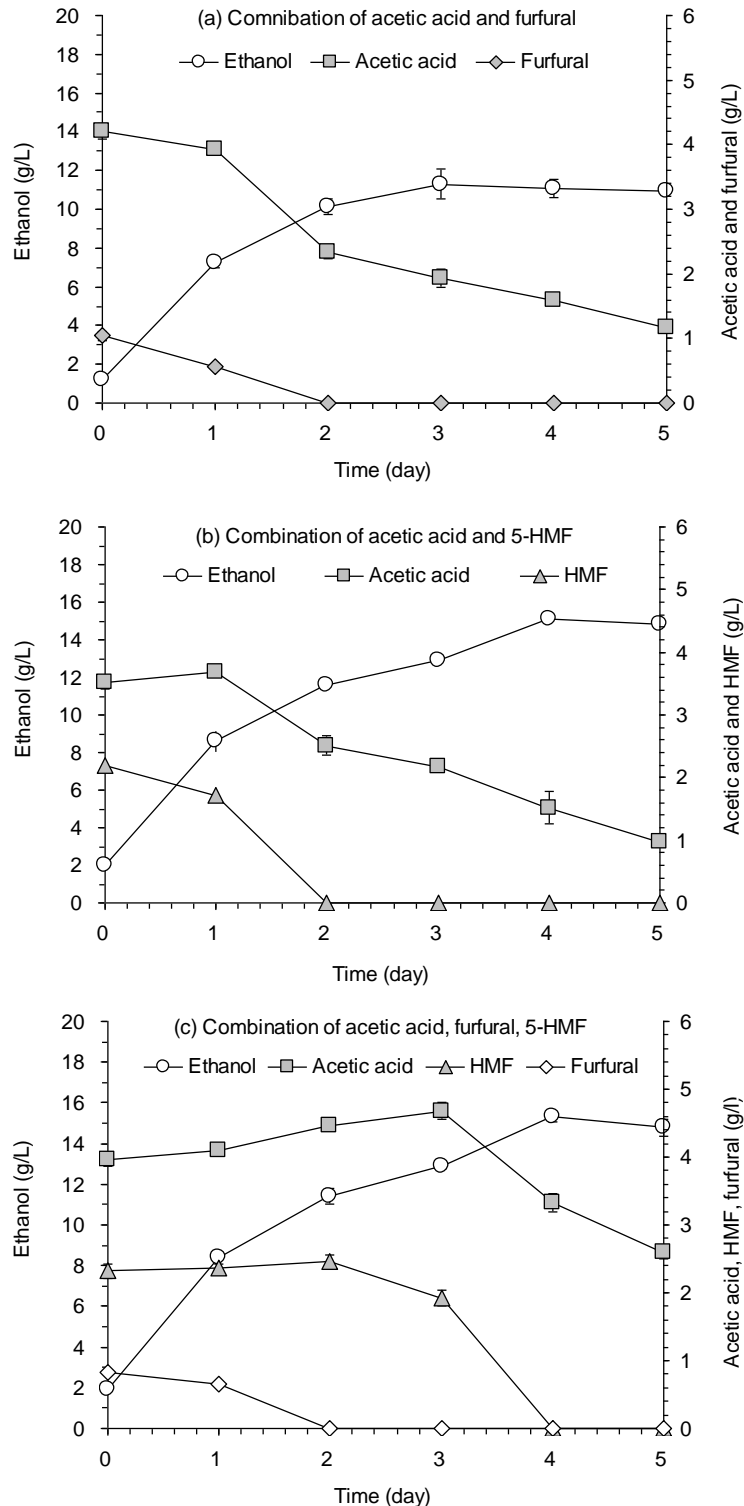
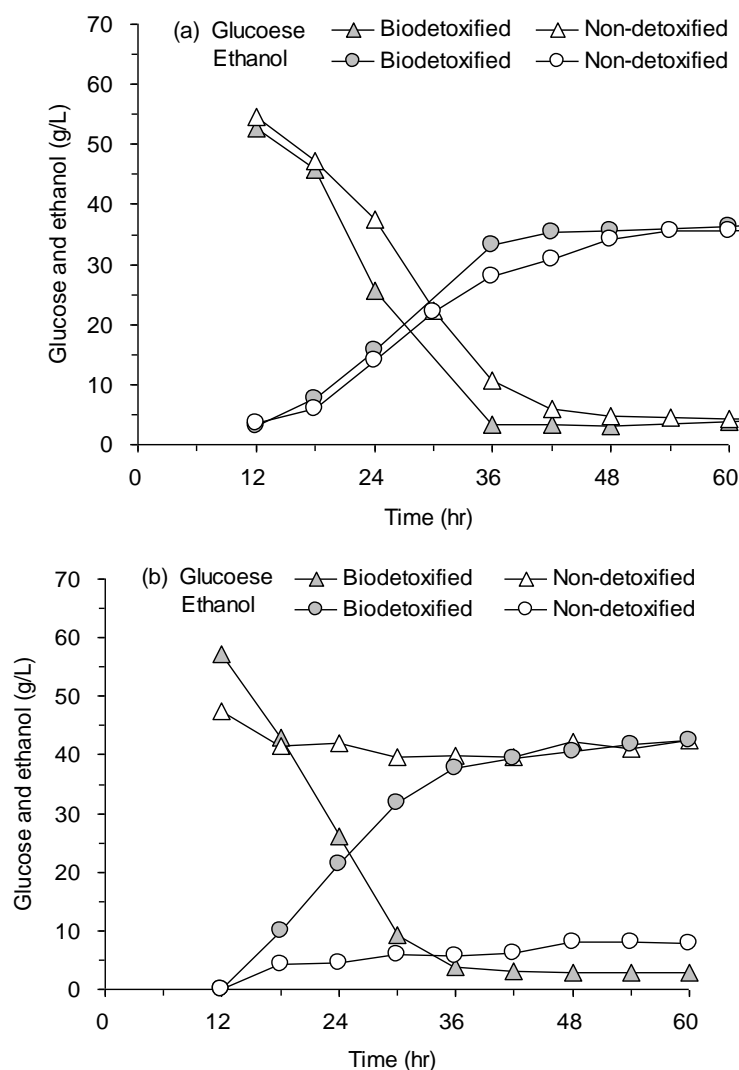


图 3.4 煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 对混合抑制物的降解能力及对后续同步糖化与发酵的影响

Fig. 3.4 Degradation of complex toxins on the pretreated CS by *A. resinae* ZN1 and the effect on the consequent SSF. (a) Acetic acid and furfural. (b) Acetic acid and HMF. (c) Acetic acid, furfural, and HMF. Degradation conditions: 5 days at 25 °C in the static incubator. SSF conditions: 10% (wt/wt) of the solids (DM) loading, 15.0 FPU/g DM, at pH 5.0, 50 °C at the first 12-h prehydrolysis stage and 37 °C at the sequential SSF stage, 150 rpm, 50 ml/250 ml flask, incubated in the water bath shaking incubator.

### 3.3.4 生物脱毒后玉米秸秆在高固体含量下的同步糖化与乙醇发酵

为了考察煤油霉菌 *A. resinae* ZN1 对不同预处理后玉米秸秆中抑制物的降解能力，本节考察了两种不同预处理后的玉米秸秆，即稀酸预处理(DAPCS)和蒸汽膨爆预处理后(SEPCS1)的秸秆原料，经 *A. resinae* ZN1 进行 4 天的生物脱毒，然后进行 30.0%(w/w)固体含量的同步糖化与发酵（结果见图 3.5）。从图 3.5(a)可以看出，对于蒸汽爆破预处理后的玉米秸秆，尽管脱毒与未脱毒的秸秆同步糖化与发酵 60 小时后体系的乙醇浓度维持在同一水平，但就葡萄糖的消耗和乙醇的生成速率来说，前者远远高于后者，即生物脱毒后的秸秆在 36 小时内就可完成同步糖化与发酵过程，而对照则至少需要 54 小时。这是因为在生物脱毒的玉米秸秆中，由于大部分抑制物被煤油霉菌所降解，从而解除了抑制物对纤维素酶和酵母的抑制作用，促进了乙醇的生成。从图 3.5(b)可以看出，对于稀酸预处理的玉米秸秆，生物脱毒后秸秆的同步糖化与发酵周期在 36-48 小时，而未脱毒的秸秆则不能进行正常的同步糖化与发酵。上述结果表明利用 *A. resinae* ZN1 对蒸汽膨爆预处理和稀酸预处理后的玉米秸秆都能进行有效的固态生物脱毒。同时，在对脱毒后的玉米秸秆进行同步糖化与发酵时，定期取样并涂布 PDA 平板。实验结果表明，在乙醇的厌氧发酵过程中，没有 *A. resinae* ZN1 的生长。



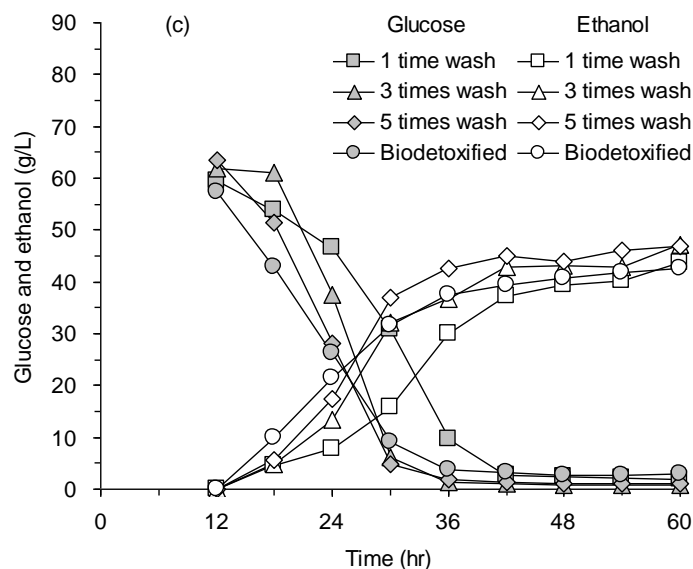


图 3.5 不同预处理的玉米秸秆脱毒后的同步糖化与发酵

Fig. 3.5 SSF of different pretreated CS materials. (a) Steam explosion-pretreated CS after 4 days of biodetoxification<sup>a</sup>. (b) Dilute sulfuric acid-pretreated CS after 4 days of biodetoxification. (c) Dilute sulfuric acid-pretreated CS after water-washing detoxification at different liquid-to-solids ratios. Biodetoxification conditions for different pretreated CS: 4 days at 25 °C in the static incubator. The detailed water-washing detoxification procedure was listed in Table 3.9. SSF conditions: 30.0% (wt/wt) solids loading, 15.0 FPU/g DM, pH 5.0, in the helical stirring bioreactor at 150 rpm. FPU, unit of filter paper.

图 3.5(c)和表 3.9 对比了水洗脱毒和生物脱毒两种脱毒方法的优劣。从图 3.5(c)可以看出,在 SSF 过程中,生物脱毒秸秆中的葡萄糖消耗和乙醇生成速率及最终乙醇浓度与水洗脱毒的秸秆相当。从表 3.9 可以看出,虽然水洗脱毒洗去了大部分的抑制物,但是,也损失了相当多的纤维素固体,产生了大量的酸性废水。如果考虑水洗过程中纤维素固体的损失,那么生物脱毒秸秆的乙醇得率比最佳的水洗脱毒方法高了近 8%。

综上所述,与在玉米秸秆酶解液中进行生物脱毒相比,煤油霉菌 *A. resiniae* ZN1 在预处理后玉米秸秆上进行固态脱毒是一种更好的选择,主要原因有以下几点:(1) 预处理后玉米秸秆中高的抑制物含量加速了抑制物的降解;(2) 固态培养过程中糖分的损失少(与秸秆的酶解液相比,预处理后秸秆中单糖的浓度较低,尤其是葡萄糖,所以被煤油霉菌消耗的就少);(3) 固态培养过程中没有明显的纤维素的降解;(4) 预处理后玉米秸秆中的抑制物浓度被煤油霉菌所降解,解除了在后续酶解过程中抑制物对纤维素酶的抑制作用。

### 3.3.5 不同木质纤维素原料的生物脱毒效果

为了将固态生物脱毒技术推广应用到其它木质纤维素原料上,对五种不同的木质纤维素原料(包括三种粮食作物的秸秆:玉米秸秆、小麦秸秆和稻草及两种经济作物的秸秆:油菜秆和棉秆)分别进行了干式稀酸预处理,然后用煤油霉菌 *A. resiniae* ZN1 进行生物脱毒并在 30.0%(w/w)固体含量下进行同步糖化与发酵(结果见图 3.6)。未经过生物脱毒的各种木质纤维素原料的同步糖化与发酵结果类似图 3.5(b)中未脱毒的玉米秸秆,

即几乎没有乙醇生成。从图 3.6 可以得出，三种粮食作物秸秆在同步糖化与发酵结束时，乙醇浓度都高于 40 g/L，而两种经济作物秸秆的乙醇得率比粮食作物秸秆低了约 30%，但是依然能够正常的进行同步糖化与发酵操作。经济作物秸秆较低的乙醇得率可能与原料自身的结构及预处理强度有关。

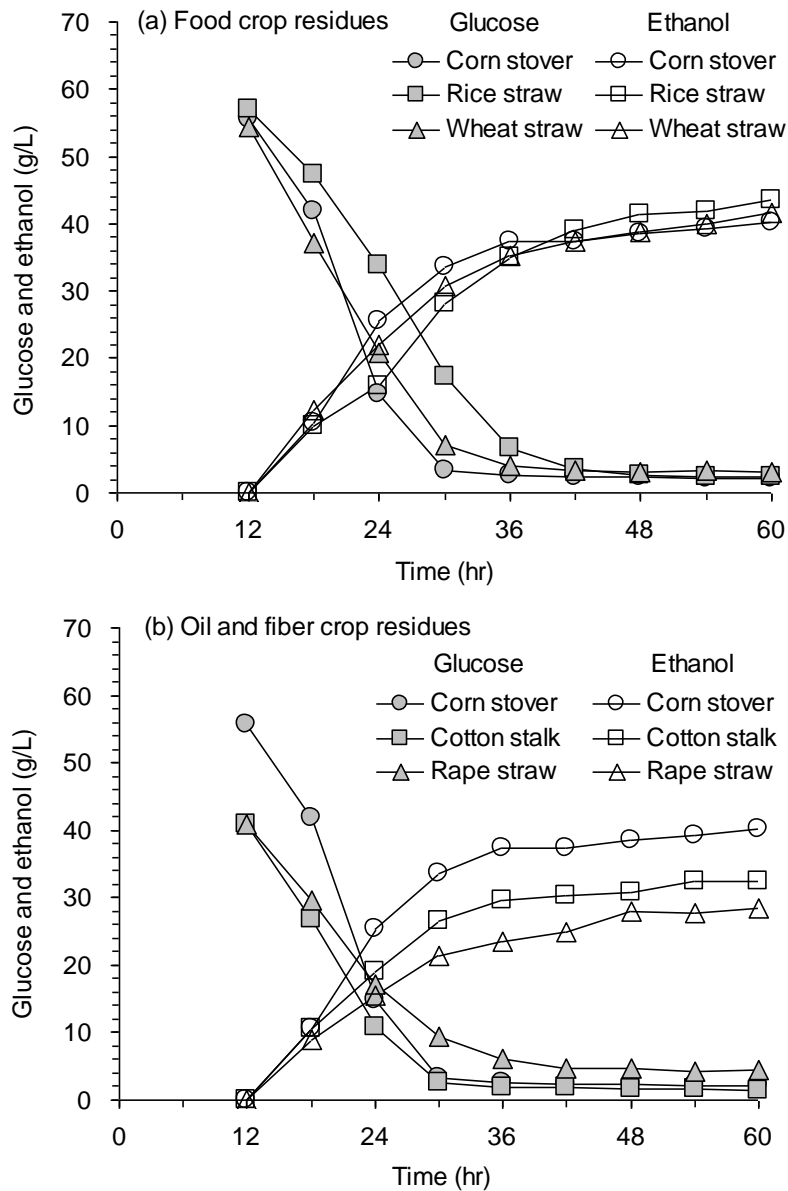


图 3.6 固态生物脱毒在不同木质纤维素原料上的应用

Fig. 3.6 Application of the biotodetoxification method to various lignocellulose feedstocks. (a) Food crop residues. (b) Oil and fiber crop residues. Biotodetoxification conditions for various lignocellulose feedstocks: 3 days at 25 °C in the static incubator. SSF conditions: 30.0% (wt/wt) solids loading, 15.0 FPU/g DM, pH 5.0, in the helical stirring bioreactor at 150 rpm. FPU, unit of filter paper cellulase.

表 3.9 对比生物脱毒和水洗脱毒两种方法对稀酸预处理后玉米秸秆的脱毒效果

Table 3.9 Comparison of the two detoxification methods for pretreated CS

	Glucose	Xylose	Acetic acid (mg/g DM)	Levulinic acid	HMF	Furfural	DM loss (%)	Ethanol yield (%, w/w)	Water usage (kg/kg DM)
Original	10.7	52.6	12.3	2.2	4.1	6.2	0.0	10.3	0.0
Biodetoxified	4.0	22.1	0.1	0.6	3.4	0.0	0.0	56.5	0.0
Water washing									
L/S ratio 1:1	3.1	15.3	3.3	0.6	0.8	1.1	18.5	47.4	2.0
L/S ratio 3:1	2.0	7.6	2.1	0.5	0.7	0.9	21.3	49.3	6.0
L/S ratio 5:1	1.2	6.1	1.4	0.2	0.4	0.8	27.2	45.9	10.0

L/S ratio indicates the fresh water usage vs. the weight of the pretreated CS (w/w) during the washing step. Conditions for biodetoxification: 25 °C for 4 days in a static incubator; Water-washing detoxification was operated as follows. First, different amounts of tap water were added to the DAPCS and stirred for 1 hour at 25 °C. Then squeezed out of the slurry until the solid content rose to 50% (w/w, dry base) by a hydraulic press machine at 15 MPa for SSF use. Conditions for SSF: 30.0% (w/w) solids loading, 15.0 FPU/g DM, pH 5.0, in the helical stirring bioreactor at 150 rpm.

### 3.4 小结

本章筛选到一株煤油霉菌，可以通过固态培养的方式快速、高效地降解预处理过程产生的抑制物。整个生物脱毒过程无需耗能和耗水操作，无纤维素固体的损失，脱毒后物料的固体含量为 45%(w/w)左右，而且煤油霉菌在后续的不同步糖化与发酵过程中自然消亡，无需灭菌操作。本章得到的主要结论如下：

(1) 从长有霉菌的蒸汽膨爆后的玉米秸秆上分离到一株具有乙酸、甲酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛等抑制物降解能力的霉菌，通过分子生物学、菌落特征比对、构建聚类树等生物学方法鉴定为煤油霉菌，并命名为 *Amorphotheca resiniae* ZN1。

(2) *A.resiniae* ZN1 的最佳固态培养条件为：25-28 °C，pH 5-6，有氧；*A.resiniae* ZN1 在固态培养时可以以葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸、甲酸、阿魏酸、水杨酸、香兰素、芝麻酚、4-羟基苯甲醛、愈创木酚、苯酚、十二烷和煤油等化合物为唯一碳源进行生长。

(3) *A.resiniae* ZN1 可以代谢乙酸、甲酸、糠醛、5-羟甲基糠醛等抑制物中的一种或几种；当乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛三种抑制物同时存在时，其降解次序为糠醛最先，5-羟甲基糠醛其次，最后是乙酸。

(4) *A.resiniae* ZN1 可以分别对稀酸预处理后和蒸汽膨爆预处理后的玉米秸秆进行固态生物脱毒，能够完全降解预处理过程产生的各种抑制物，包括糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸等。该固态生物脱毒过程不需耗水和耗能操作，脱毒后的物料固体含量为 45%(w/w)左右，且不需灭菌操作即可进行 30.0%(w/w)固体含量下的同步糖化与发酵，乙醇生成速率和最终的乙醇浓度较未脱毒物料有大幅度的提高。

(5) 利用 *A.resiniae* ZN1 对干式稀酸预处理后的多种木质纤维素原料（包括玉米秸秆、小麦秆、稻草、棉秆和油菜秆）进行固态生物脱毒，并进行 30.0%(w/w)固体含量下的同步糖化与发酵，发酵结束时乙醇浓度和乙醇得率都有较大幅度的提高。

## 第 4 章 高固体含量下的同步糖化与高浓度乙醇发酵过程研究以及生物反应器设计

### 4.1 前言

在利用木质纤维素原料生产乙醇的过程中,提高发酵醪中的乙醇浓度,进而提高蒸馏时进料中的乙醇浓度,对于降低蒸馏工段的能耗,乃至整个纤维素乙醇的生产成本都十分重要<sup>[84, 108]</sup>。只有当蒸馏进料中的乙醇浓度高于 4%(w/w),整个乙醇的生产工艺才具有经济性<sup>[94-95]</sup>。而要得到高的乙醇浓度,必须提高发酵时底物的固体含量。在以淀粉为基质的乙醇生产中,底物固体含量高于 30%(w/w)、发酵醪中乙醇浓度达到 8-10%(w/w)的工艺要求很容易达到。而在以木质纤维素为基质的乙醇生产过程中,要达到 5-8%(w/w)的乙醇浓度,底物的固体含量至少要达到 30%(w/w)以上<sup>[154]</sup>。此外,提高底物的固体含量,还可以减少过程的用水量<sup>[121]</sup>。

但是,在同步糖化与发酵生产乙醇(simultaneous saccharification and fermentation, SSF)的过程中,木质纤维素原料中的不溶性固体(主要包括纤维素和半纤维素)在纤维素酶的催化作用下逐步液化和糖化为含单糖、寡糖和不溶性固体的液浆状物质。一旦固体含量超过 15%(w/w),就会产生很多问题<sup>[98]</sup>,纤维素固体颗粒与液态纤维素酶的混合将会变得越来越困难。特别是当所有的物料全部加入反应器后,体系的表现粘度最大,固液相的混合最差。而且,随着发酵的开始和二氧化碳的生成,整个同步糖化与发酵体系形成了一个气-液-固三相的、类似气溶胶的复杂体系,混合的不足导致传质与传热状况的恶化,并最终导致纤维素转化率和乙醇得率的降低。此外,出于成本的考虑,同步糖化与发酵过程中较低的纤维素酶用量和菌体接种量,使这一状况进一步恶化。因此,在高固体含量下,同步糖化与发酵木质纤维素原料生产高浓度乙醇,多相体系之间的混合是最主要的障碍。而良好的搅拌性能、低的能耗以及对酶和微生物细胞的低剪切损伤作用是设计处理木质纤维素原料反应器的关键因素。

目前有很多关于利用木质纤维素原料生产乙醇的报道,但是关于反应器的开发以及发酵过程搅拌能耗的报道很少。Mohagheghi 等人 1992 年开发了一个简单的、水平旋转的反应器,可利用稀酸预处理后且经水洗脱毒的小麦秆在 24.4%(w/w)的固体含量下进行同步糖化与发酵操作<sup>[97]</sup>; De Bari 等人 2002 年提出了一个最高可在 16%(w/w)固体含量下利用杨木生产乙醇的工艺流程,实验所用的白杨木是经过蒸汽膨爆预处理和水洗脱毒的<sup>[155]</sup>; Jorgensen 等人 2007 年报道了一个可利用自身重力进行混合的反应器,能够处理高达 40%(w/w)初始固体含量的木质纤维素原料进行同步糖化与发酵生产乙醇,而且此种反应器已经放大到 11 m<sup>3</sup> 的规模<sup>[85]</sup>。

为解决传统生物反应器在处理高固体含量原料 SSF 时存在的传质、混合与高能耗问题,本章针对性的开发了一种新型螺带桨式生物反应器。首先,对比了螺带桨反应器与

普通的 Rushton 搅拌桨反应器在处理 30.0%(w/w)固体含量底物时的搅拌能耗、SSF 性能及流型等方面的优劣；接着研究了在新型螺带桨反应器中进行不同固体含量和酶量的 SSF 时，过程的粘度、搅拌能耗及发酵性能的变化；最后，在此新型螺带桨反应器中，探讨了采取其它策略，进一步提高发酵醪中乙醇浓度的可行性。

## 4.2 材料与方法

### 4.2.1 实验材料

除测定秸秆同步糖化与发酵体系粘度的流变仪外，其它实验材料参照 2.2.1。

ARES 高级流变扩展系统                      美国 TA 仪器公司

### 4.2.2 实验方法

#### 4.2.2.1 玉米秸秆的预处理

玉米秸秆的高温稀酸预处理参照 3.2.2.1；玉米秸秆的蒸汽膨爆预处理参照 3.2.2.1 中 SEPCS2 的预处理方法，如无特殊说明，本章所用秸秆原料均为 SEPCS2。

#### 4.2.2.2 稀酸预处理后玉米秸秆的生物脱毒

参照 2.2.2.2。

#### 4.2.2.3 新型螺带桨生物反应器与高固体含量的同步糖化与发酵操作

生物脱毒后玉米秸秆的同步糖化与发酵实验在一个安装有螺带桨的 5 L 生物反应器（见图 4.1）中进行<sup>[136]</sup>。螺带桨主要由一个搅拌轴，一个螺带，一个涡轮/翼型桨和一个刮底桨组成。螺带通过支撑杆固定在搅拌轴上，并自上而下盘旋在搅拌轴周边，构成框体；涡轮/翼型搅拌桨安装于螺带形成的框体内；底桨固定在搅拌轴的下端，紧贴罐体底部。当使用 Rushton 搅拌桨时，用图 1(b)中的 Rushton 搅拌桨代替图 1(a)中的部件 9、10 和 11。同时，马达上安装有功率测定仪，可实时监测 SSF 过程的搅拌功率变化。论文中报道的功率是减去反应器空载后的功率值。

玉米秸秆的同步糖化与发酵过程分为两个阶段，即预酶解阶段和真正的同步糖化与发酵阶段。在预酶解阶段，以 7.0-30.0 FPU/g DM 的酶量向反应器中加入纤维素酶 Accellerase 1000，并在随后的 12 个小时内将玉米秸秆以半连续的方式补入反应器。补料速率根据反应器内物料的液化情况进行调整，原则是要保证反应器内的物料处于液体状态。在预酶解阶段，将温度维持在 50 °C。预酶解结束后，将温度调整到 37 °C，接入驯化好的 *S. cerevisiae* DQ1，同步糖化与发酵阶段开始。同步糖化与发酵阶段持续 48、60 或 72 小时不等，在 SSF 过程中定期取样，10000 rpm 离心 5 分钟，用 HPLC 分析上清中的糖、醇和抑制物含量。同时，用 5 M 的 NaOH 溶液维持 SSF 过程中的 pH 稳定在 5.0 左右。

### 4.2.3 分析方法

#### 4.2.3.1 玉米秸秆中纤维素、半纤维素含量的测定

参照 2.2.3.1。

#### 4.2.3.2 糖、醇、抑制物含量测定及葡萄糖和乙醇得率的计算

分别参照 2.2.3.3 和 2.2.3.5。

#### 4.2.3.3 同步糖化与发酵过程中体系粘度的测定

在玉米秸秆的同步糖化与发酵过程中，不同时刻体系的表观粘度通过 ARES 高级流变扩展系统测定。将样品置于两个直径为 25 mm 的圆板之间，温度控制在 37 °C，剪切速率的范围在 0.01~250 s<sup>-1</sup>。体系的平均粘度通过 Metzner 和 Otto 提出的计算方法得到 [156]：

$$\dot{\gamma} = K_s N$$

$\dot{\gamma}_{avg}$  是平均剪切速率(s<sup>-1</sup>)， $K_s$  是由搅拌桨类型决定的常数， $N$  是搅拌转速(rev/s)。对于单螺带搅拌桨，其  $K_s$  常数通常取 33<sup>[157]</sup>。然后根据反应器中的实际转速，计算出反应器中的实际剪切速率，进而计算出体系的实际粘度  $\mu_a$  (Pa s)。

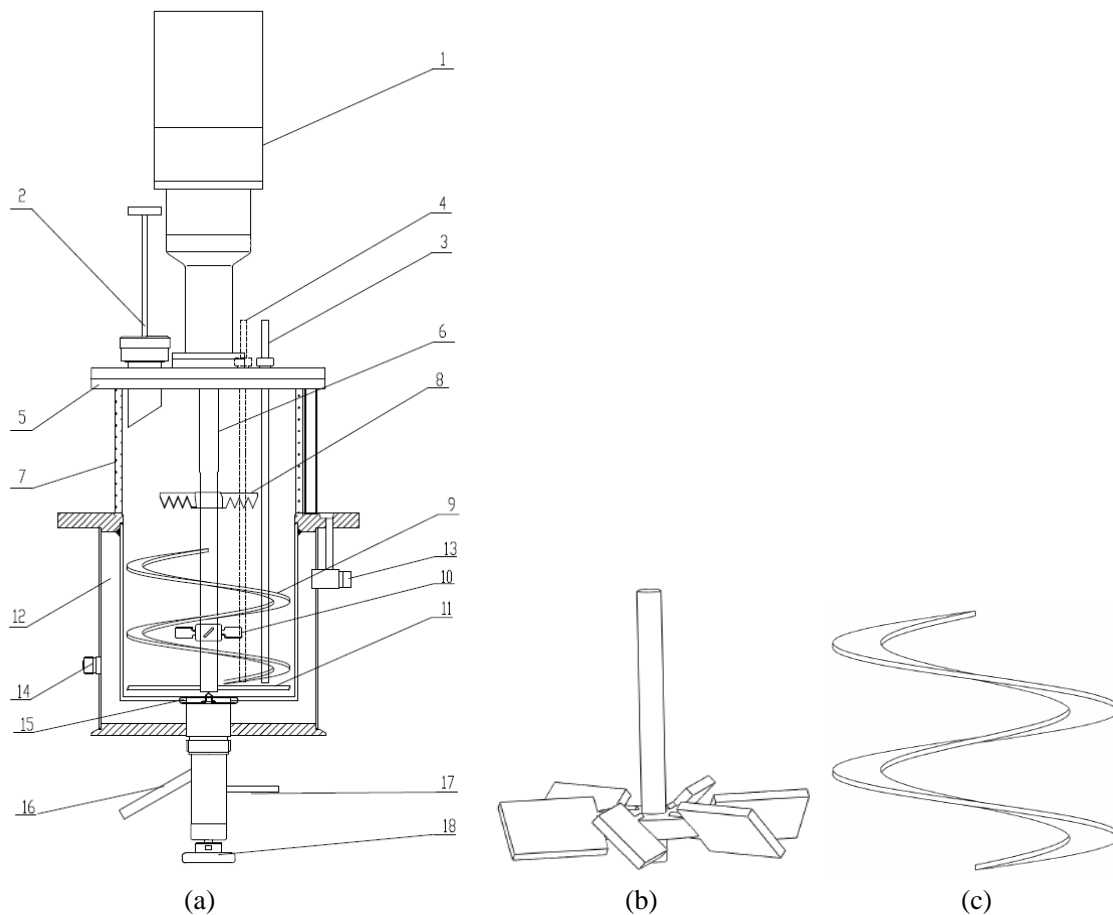


图 4.1 适用于高固体含量物料同步糖化与发酵的生物反应器

Fig. 4.1 Bioreactor for SSF operation at high solids loading. Bioreactor description: (a) Diagram of the bioreactor with the helical impeller system, (b) Rushton impeller, and (c) Helical impeller. The bioreactor includes (1) Motor; (2) Solid feeding inlet; (3) Thermometer port; (4) pH-meter port; (5) Tank cap; (6) Drive shaft; (7) Tank wall; (8) Antifoaming impeller; (9) Helical impeller; (10) Turbine/aerofoil impeller; (11) Bottom impeller; (12) Water-bath jacket; (13) Water-bath jacket outlet; (14) Water-bath jacket inlet; (15) Gas disperser; (16) Discharge head; (17) Gas inlet; (18) Stop valve.

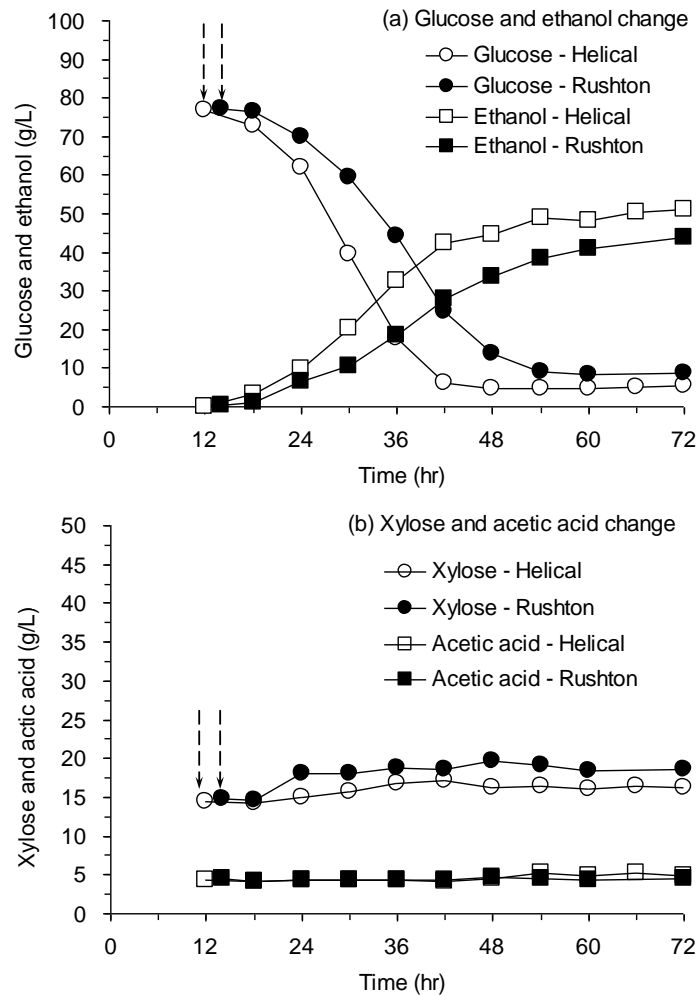
4.2.3.4 计算流体力学模型(Computational fluid dynamics, CFD)的建立

通过商业计算流体力学软件 CFX 11.0(ANSYS Inc., Canonsbury, PA)建立高固体含量秸秆 SSF 时的 CFD 模型。在建立 CFD 模型时,将秸秆的同步糖化与发酵体系简化为粘度一致的牛顿流体,忽略了不溶性的玉米秸秆颗粒和 CO<sub>2</sub> 气泡对反应器中流型的影响。

4.3 结果与讨论

4.3.1 螺带搅拌桨与 Rushton 搅拌桨在处理高固体含量秸秆 SSF 时的优劣

本节对比了两种不同形式的搅拌桨在处理高固体含量秸秆 SSF 时的优劣。图 4.1(a)是新开发的螺带桨反应器;图 4.1(b)是一种在处理较低粘度的牛顿流体混合时最常用的 Rushton 搅拌桨;图 4.1(c)是在处理高粘度非牛顿流体时常用的一种螺带桨。



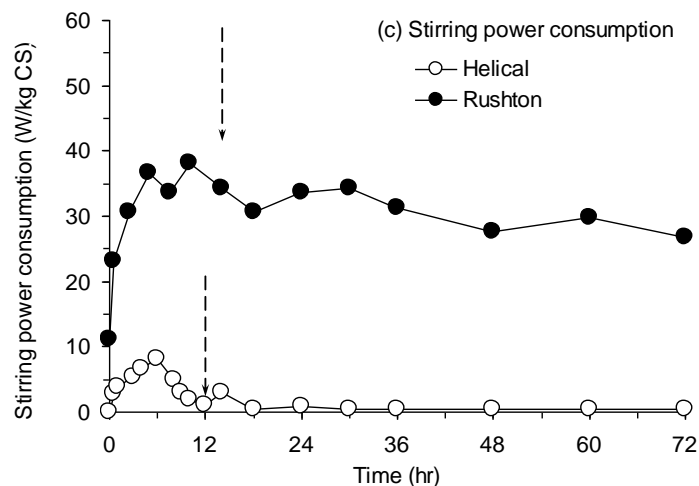
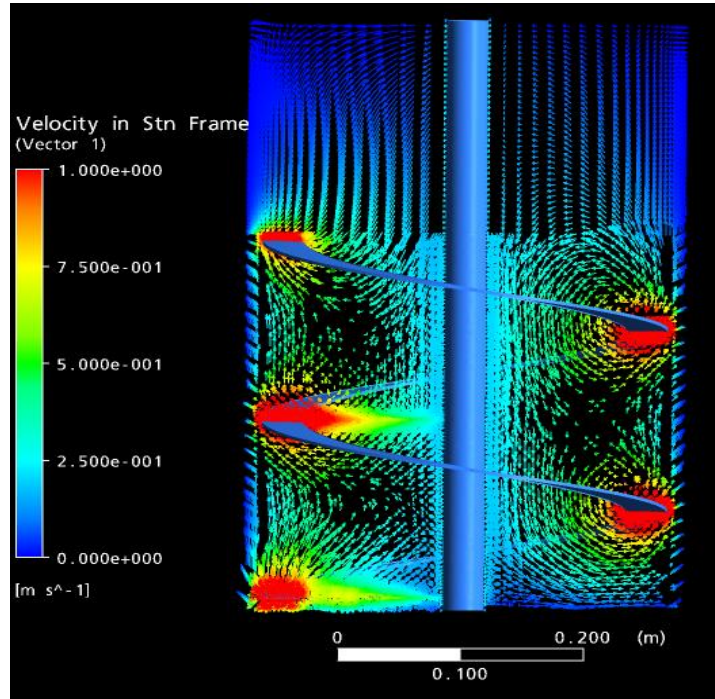


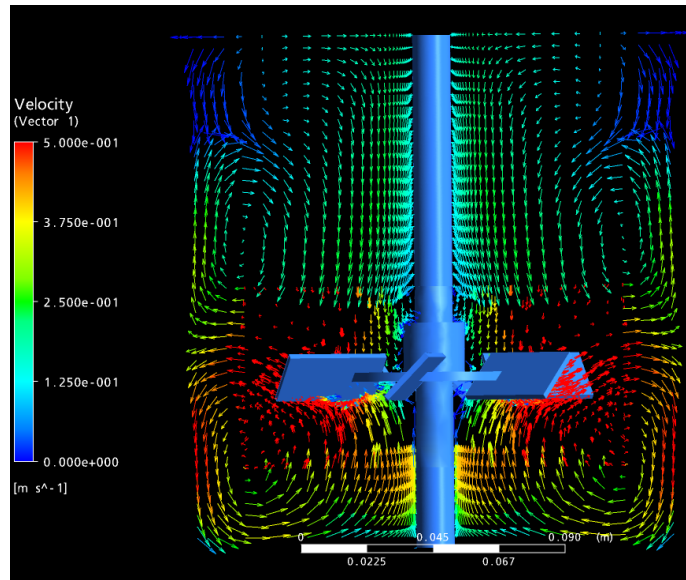
图 4.2 不同搅拌桨对高固体含量秸秆同步糖化与发酵生产乙醇的影响

Fig. 4.2 Simultaneous saccharification and fermentation at high pretreated CS (corn stover) loading using different stirring impellers. (a) Glucose consumption and ethanol production with helical and Rushton impellers; (b) Xylose and acetic acid formation with helical and Rushton impellers; (c) Stirring energy consumption using helical and Rushton impellers. Dotted arrows indicate inoculation time. Conditions: Pretreated CS at 30.0% DM (w/w), Accellerase 1000 dosage 15.0 FPU/g DM, inoculation ratio of 10% (v/v), 50 °C for prehydrolysis (before inoculation) and 37 °C for SSF (after inoculation), 120 rpm stirring rate for helical and 200 rpm for Rushton.

分析图 4.2(a)可知，用螺带桨进行高固含量的 SSF 时，加料时间（指将秸秆全部加入反应器，使固体含量达到所需固体含量的时间）比用 Rushton 搅拌桨缩短了两个小时。因为物料的补加是在保证反应器内物料已经液化的前提下进行的，所以加料时间的缩短就意味着螺带桨反应器中秸秆的液化速率要高于 Rushton 搅拌桨反应器。而在高固体含量秸秆的同步糖化与发酵过程中，尤其是在预酶解过程中，固体秸秆的液化速率是衡量反应器混合效率的一个重要参数。此外，使用螺带桨反应器时，葡萄糖的消耗速率和乙醇的生成速率都要高于使用 Rushton 搅拌桨。预酶解结束时，由于产物葡萄糖对纤维素酶的抑制作用，致使两种搅拌体系中的葡萄糖浓度相当（螺带桨和 Rushton 搅拌桨中分别为 76.7 g/L 和 77.3 g/L）；但是当发酵结束后，发酵醪中乙醇的浓度分别为 51.0 g/L 和 43.9 g/L，即使用螺带桨反应器可以更有效的促进秸秆的酶解和酵母的发酵。分析图 4.2(b)可知，在同步糖化与发酵过程中，由于木糖不被酵母菌代谢，所以木糖浓度在两种体系中都处于同一水平（稍低于 20.0 g/L）；两种体系中乙酸的浓度虽已达到 5.3 g/L，但还不足以影响到酵母菌的正常生长与乙醇的生成。从图 4.2(c)可知，在高固体含量秸秆的同步糖化与发酵过程中，使用螺带桨时的搅拌功率远远低于使用 Rushton 搅拌桨（最高搅拌功率仅为 Rushton 搅拌桨的 1/4）。上述结果表明，使用螺带搅拌桨进行高固体含量的同步糖化与发酵，可以促进秸秆与纤维素酶和酵母菌的混合，在乙醇得率、乙醇产率及搅拌功率等方面都远优于使用 Rushton 搅拌桨。



(a) Helical imperller



(b) Rushton impeller

图 4.3 不同搅拌桨反应器中的流型分布

Fig. 4.3 Fluid field distribution of bioreactors with helical impeller and Rushton impeller using CFD software. (a) Fluid field distribution with helical impeller; (b) Fluid field distribution with Rushton impeller.

为了进一步了解螺带桨反应器和 Rushton 搅拌桨反应器中的混合状况，利用计算流体力学软件 CFX 对两种反应器中的流型分布进行了模拟（见图 4.3）。分析图 4.3 可知，使用螺带桨时，物料在整个反应器内形成了一个大的循环，即随着螺带桨的旋转，底部物料沿着螺带的方向从反应器外周盘旋而上，到达螺带的顶部后沿着搅拌轴落下；同时，反应器内形成了无数小的循环，即在螺带与罐壁交界处部分物料形成了二次绕流，这也是反应器中剪切最强的部位，它们促进了整个反应体系的混合与传质。对于 Rushton

搅拌桨反应器，在搅拌桨的作用范围内剪切较强，其它区域则很弱。此外，搅拌桨能够混合的区域只有整个反应器的三分之一。结果表明，在处理高粘度的物系时，螺带桨反应器中的流型及剪切强度更有利于体系的混合。

#### 4.3.2 接种时间和接种量对高固体含量秸秆同步糖化与发酵的影响

根据纤维素酶的最佳作用温度(50 °C)和酵母菌发酵温度(30-37 °C)之间的差异将高固体含量秸秆的同步糖化与发酵过程分为两个阶段，即 50 °C 下的预酶解阶段和 37 °C 下的同步糖化与发酵阶段。预酶解阶段的长短可能会影响高固体含量下秸秆的 SSF 性能（见图 4.4(a)）。

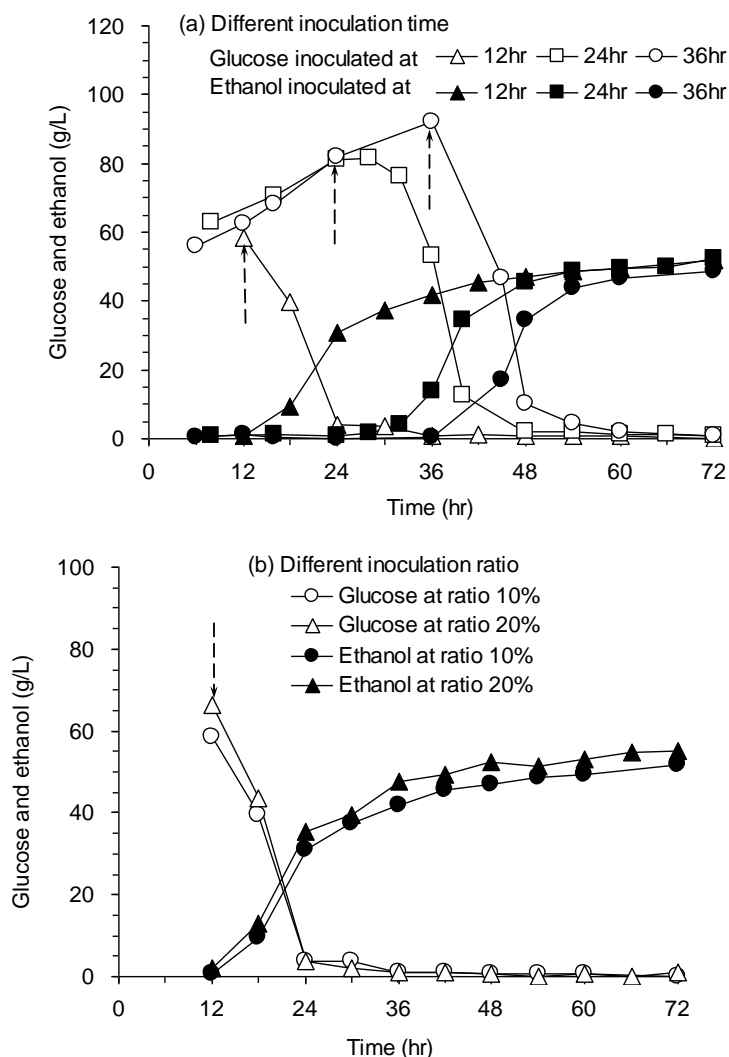


图 4.4 接种时间和接种量对高固体含量秸秆 SSF 的影响

Fig. 4.4 Effect of inoculation time and ratio on SSF performance at high pretreated CS loading at (a) different inoculation time, and (b) different inoculation ratio. Dotted arrows indicate inoculation time. Conditions: Pretreated CS loading at 29.0% DM (w/w), Accellerase 1000 dosage 15.0 FPU/g DM, 50 °C for prehydrolysis (before inoculation) and 37 °C for SSF (after inoculation), 120 rpm stirring rate.

分析图 4.4(a)可知, 在 29.0%(w/w)的固体含量下进行秸秆的同步糖化与发酵生产乙醇, 预酶解结束时葡萄糖的浓度随着预酶解时间的延长而增加, 但是随着酵母的加入, 葡萄糖被迅速代谢成为乙醇。当预酶解时间分别为 12 和 24 小时, 预酶解结束时葡萄糖的浓度相差较大 (分别为 58.5 g/L 和 81.0 g/L), 但发酵 60 小时后发酵醪中的乙醇浓度基本持平 (分别为 51.8 g/L 和 52.1 g/L)。进一步将预酶解时间延长至 36 小时, 葡萄糖的浓度也随之增加到 92.2 g/L, 但是发酵结束后乙醇的浓度只有 48.6 g/L。综合考虑乙醇的生产效率及预酶解过程的能耗, 预酶解 12 小时是最佳选择。

SSF 过程中接种量的多少也会影响到乙醇的产率和得率。分析图 4.4(b)可知, 当 SSF 过程的接种量从 10%(v/v)增加到 20%(v/v)时, 发酵结束后乙醇的浓度从 51.2 g/L 增加到 55.1 g/L, 表明接种量的增加有利于提高发酵醪中的乙醇浓度。但考虑到菌种的生产成本, 10%(v/v)的接种量是一个较为合适的选择。所以, 在随后的 SSF 实验中, 都采用 10%(v/v)的接种量。

#### 4.3.3 不同固体含量对玉米秸秆同步糖化与发酵的影响

螺带浆反应器是专门为处理高固体含量秸秆的 SSF 而设计的, 因此, 首先考察了在螺带浆反应器中, 不同固体含量 (从 15.0-30.0%(w/w)) 对秸秆 SSF 性能的影响 (见表 4.1、表 4.2 和图 4.5)。

表 4.1 不同固体含量下 SSF 体系的组成

Table 4.1 Materials feeding in the SSF operations at different pretreated CS loadings

Required solids loading (% w/w)	15.0	20.0	25.0	30.0
Total pretreated CS (g) (A1)	1000.0	1300.0	1800.0	2000.0
Moisture of the pretreated CS (% w/w) (A2)	64.8	63.9	65.4	65.6
Deionized water (ml) (A3)	1280.0	970.0	600.0	200.0
Enzyme dosage (FPU/g DM)	7.0	7.0	7.0	7.0
Enzyme (ml) (A4)	38.0	50.0	67.0	74.0
Inoculum (ml) (A5)	20.0	20.0	20.0	20.0
True solids loading (% w/w)	15.1	20.1	24.9	30.0

Solids loading calculation:  $A1 \times (1 - A2/100) / (A1 + A3 + A4 + A5) \times 100\%$ . For instance, the solids loading 30.0% was calculated by  $2000.0 \times (1 - 65.6/100) / (2000.0 + 200.0 + 74.0 + 20.0) = 30.0\%$ .

在预酶解阶段, 由于有固体秸秆颗粒的存在, 反应器的搅拌功率远远大于后面的 SSF 阶段。同时, 为了保证秸秆固体和液态纤维素酶的充分接触, 预酶解阶段的补料速率应保持在一个合理的范围。如果加料速率过快, 固体物料就会结成团状, 并随着搅拌轴的旋转而滚动。这种情形不但会阻碍固体物料和液态纤维素酶之间的接触, 而且导致搅拌功率的大幅增加。因此, 预酶解阶段必须保证反应器内的物料处于液浆状。如此说来, 加料速率直接反映了反应器中的混合效率。表 4.2 列出了在不同固体含量下进行 SSF 时所需的加料时间。分析表 4.2 可知, 在较低的纤维素酶量下 (7.0 FPU/g DM), 加料时间随着固体含量的增加而急剧上升。特别是当固体含量从 25.0%增加到 30.0%(w/w)时, 反应器中的搅拌变得非常困难, 加料时间则有大幅增加。

表 4.2 不同固体含量下进行 SSF 时的加料时间

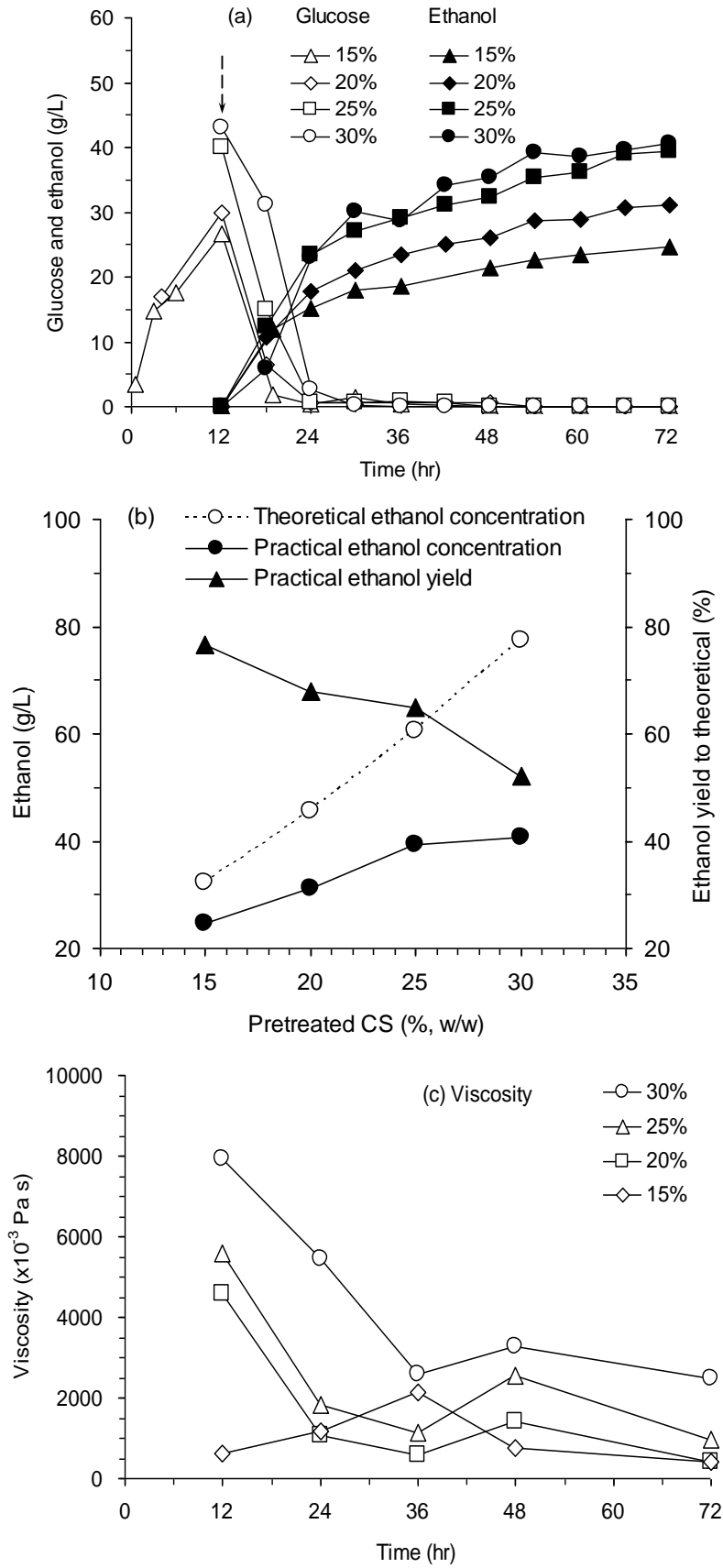
Table 4.2 Feeding time of pretreated CS at different CS loadings.

Solid CS loading (% w/w)	15.0	20.0	25.0	30.0
Feeding time (hours)	0.5	2.0	5.0	10.0

Conditions: Accellerase 1000 dosage 7.0 FPU/g DM, 50 °C for prehydrolysis (before inoculation) and 37 °C for SSF (after inoculation), 120 rpm stirring rate.

在螺带桨反应器中，不同固体含量下秸秆的 SSF 性能见图 4.5。由于在物料全部加入反应器后（避免引起单位秸秆所加酶量的变化）才开始取样，所以在 25.0% 和 30.0% 的固体含量下，前 12 小时没有相关的数据点。分析图 4.5(a)可知，当预酶解结束时，体系的葡萄糖浓度（分别为 26.6, 29.8, 39.9 和 43.1 g/L）随着固体含量（分别为 15.0%，20.0%，25.0% 和 30.0%）的增加而增加。接入酵母菌后，预酶解阶段积累的葡萄糖迅速被代谢生成乙醇，而且在随后的 SSF 过程一直保持在较低的浓度。结果表明，在利用木质纤维素原料进行高固体含量同步糖化与发酵生产乙醇的过程中，限速步骤为纤维素固体的酶解，而不是酵母菌的发酵。从图 4.5(b)可以看出，在 7.0 FPU/g DM 的酶量下进行 SSF，当固体含量从 15.0% 分别增加到 20.0%，25.0% 和 30.0%(w/w)时，发酵醪中的乙醇浓度则从 24.7 g/L 分别增加到 31.0, 39.3 和 40.6 g/L，乙醇得率却从 76.5% 分别降低到 68.0%，64.8% 和 52.1%。乙醇得率随着固体含量的增加而降低，表明秸秆中纤维素的转化效率在降低，主要原因可能是秸秆的酶解速率随着固体含量的增加而降低。

在不同的固体含量下，SSF 体系的粘度变化见图 4.5(c)。从图 4.5(c)可以看出，尽管体系的粘度有所波动（很大原因是由于样品中的不溶性固体颗粒和灰分造成的），但随着固体含量的增加，体系的粘度呈整体增加趋势，尤其是在预酶解阶段；同时，随着发酵的开始，粘度急剧降低。图 4.5(d)表示在不同的固体含量下，体系搅拌功率的变化。从图中可以看出，搅拌功率的变化与体系的粘度变化趋势类似，即随着固体含量的增加，搅拌功率急剧增加；随着 SSF 过程的开始和进行，搅拌功率急剧降低。从搅拌功率与粘度变化的一致性推断可知，在 SSF 过程中，搅拌的阻碍主要是源自体系的粘度。固体秸秆的快速酶解必将迅速降低体系的粘度和搅拌功率。



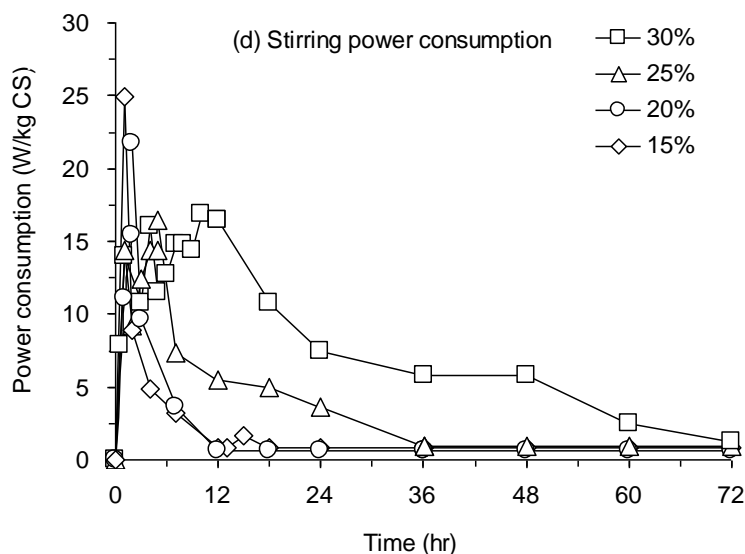


图 4.5 螺旋桨反应器中不同固体含量下秸秆的 SSF 性能

Fig. 4.5 SSF at different pretreated CS loading. (a) Time courses of glucose consumption and ethanol yield; (b) Ethanol concentration and yield change with pretreated CS; (c) Time courses of the viscosity at the real SSF shear rate; (d) Time courses of the stirring power consumption. Dotted arrows indicate inoculation time. Conditions: Accellerase 1000 dosage 7.0 FPU/g DM, 50 °C for prehydrolysis (before inoculation) and 37 °C for SSF (after inoculation), 120 rpm stirring rate. The material feeding and the solids loading calculation were shown in Table 4.1.

#### 4.3.4 高固体含量下纤维素酶用量对秸秆同步糖化与发酵的影响

减少秸秆 SSF 过程的纤维素酶用量，对于降低纤维素乙醇的生产成本意义重大。因此，本节重点考察了秸秆的 SSF 性能随着纤维素酶用量的变化规律（见表 4.4 和图 4.6）。在不同纤维素酶加量下秸秆 SSF 体系的组成见表 4.3。

表 4.3 不同纤维素酶用量下 SSF 体系的组成

Table 4.3 Material feeding during the SSF operations at different enzyme dosages

Required enzyme dosage (FPU/g DM)	7.0	15.0	30.0
Required Solids loading (% , w/w)	30.0	30.0	30.0
Total pretreated CS (g) (A1)	2000.0	2000.0	2000.0
Moisture of the pretreated CS (% , w/w) (A2)	65.6	64.0	63.7
Deionized water (ml) (A3)	200.0	210.0	57.0
Enzyme (ml) (A4)	74.0	165.0	300.0
Inoculum (ml) (A5)	20.0	20.0	20.0
True solids loading (% , w/w)	30.0	30.0	30.6

Solids loading calculation was same to Table 4.1.

表 4.4 列出了在不同纤维素酶量下进行 SSF 时的加料时间。从表中可以看出，随着纤维素酶用量的增加（从 7.0 增加到 15.0 和 30.0 FPU/g DM），加料时间逐渐缩短（从 10.0 缩短到 8.5 和 7.0 小时）。结果表明，高的纤维素酶用量大大提高了秸秆的酶解速率，进而缩短了加料时间。

表 4.4 不同酶加量下进行 SSF 时的加料时间

Table 4.4 Feeding time of pretreated CS at different Accellerase 1000 enzyme dosages.

Accellerase 1000 enzyme dosage (FPU/g DM)	7.0	15.0	30.0
Feeding time (hours)	10.0	8.5	7.0

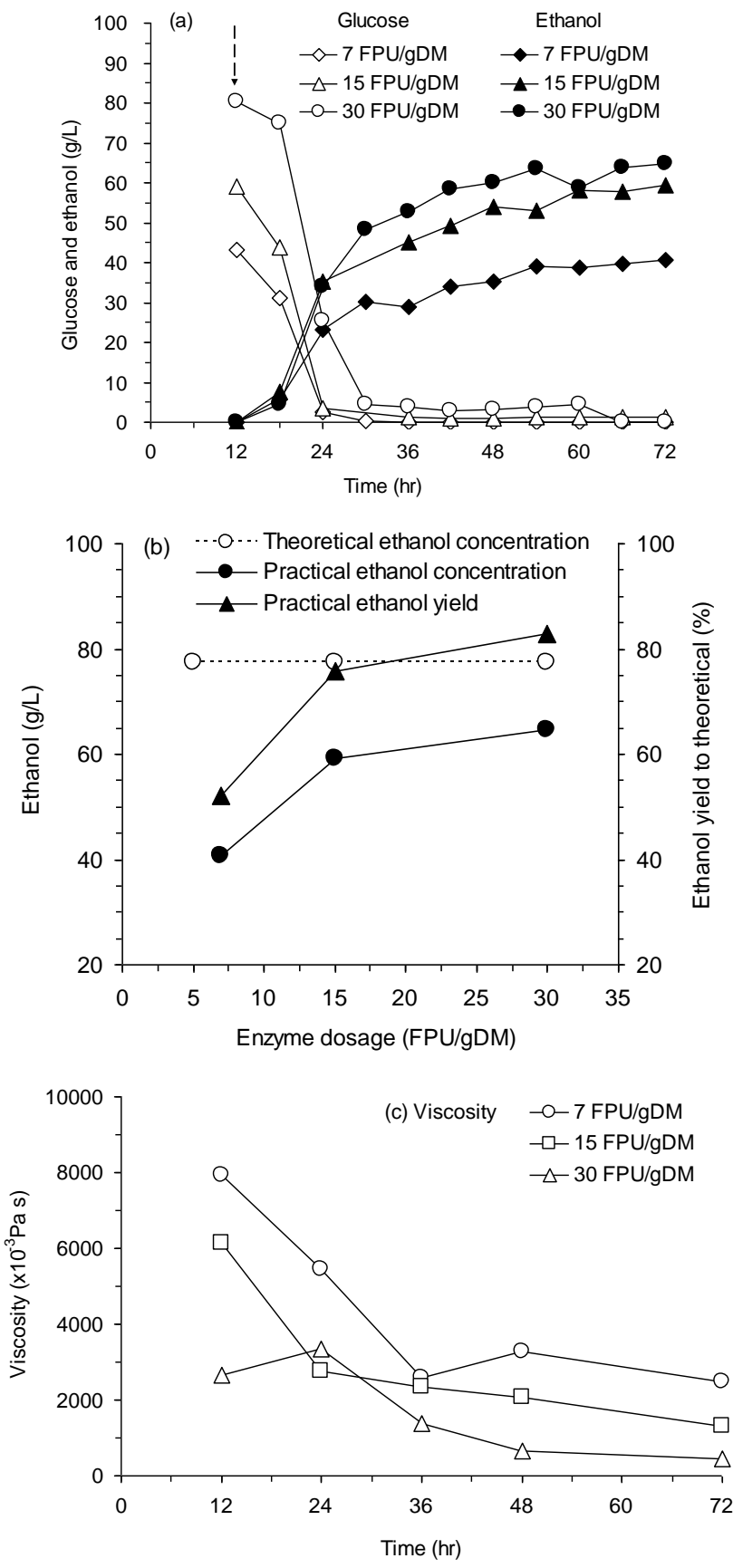
Conditions: Pretreated CS loading 30.0% (w/w), 50 °C for prehydrolysis (before inoculation) and 37 °C for SSF (after inoculation), 120 rpm stirring rate.

图 4.6 表示在 30.0%(w/w)的固体含量下, 秸秆在不同酶用量时的 SSF 性能。分析图 4.6(a)可知, 随着纤维素酶用量从 7.0 FPU/g DM 增加到 15.0 和 30.0 FPU/g DM, 预酶解结束时体系的葡萄糖浓度也从 43.1 g/L 提高到 59.1 g/L 和 80.4 g/L。但是随着发酵的开始, 预酶解阶段积累的葡萄糖在 18 小时内即被全部转化生成乙醇, 随后一直保持在较低的浓度。从图 4.6(b)可以看出, 当纤维素酶用量从 7.0 FPU/g DM 增加到 15.0 FPU/g DM 时, 发酵结束时乙醇浓度和乙醇得率分别从 40.6 g/L 增加到 59.3 g/L 和 52.1% 增加到 75.9%; 但是进一步增加纤维素酶的用量到 30.0 FPU/g DM, 发酵结束时乙醇浓度和乙醇得率的增加幅度很小 (分别从 59.3 g/L 提高到 64.6 g/L 和 75.9% 增加到 82.8%)。综合考虑乙醇得率和纤维素酶的成本, 在 30.0%(w/w)的固体含量下进行 SSF, 酶的最适用量在 15.0 FPU/g DM 左右。

分析图 4.6(c)和(d)可知, 秸秆 SSF 体系的粘度随着酶用量的增加而降低; 搅拌功率也随着酶用量的增加和 SSF 过程的进行而急剧减低。在高固体含量下进行 SSF, 提高纤维素酶用量, 可以增加纤维素酶与秸秆固体接触的机会, 促进固液混合, 进而降低过程的搅拌功率, 提高秸秆的酶解效率和乙醇得率。

#### 4.3.5 不同固体含量和酶用量对玉米秸秆同步糖化与发酵过程搅拌能耗的影响

在高固体含量下进行秸秆的 SSF, 搅拌能耗是评价该工艺是否具有实用性的重要指标。为了估算不同固体含量和酶用量下 SSF 过程的搅拌能耗, 我们将图 4.5 和 4.6 中的搅拌功率和乙醇浓度等数据换算成了过程的搅拌能耗(E1)和输出能量 (即乙醇的燃烧热 (见表 4.5 和 4.6))。分析表 4.5 可知, 当固体含量从 15.0% 提高到 30.0%(w/w)时, SSF 过程的搅拌能耗增加了一个数量级 (固体含量从 15.0% 增加到 20.0%, 25.0% 和 30.0%(w/w), 搅拌能耗则分别从 79.5 增加到 113.6, 340.5 和 1009.2 MJ/t 液浆)。另一方面, 输出能量则从 854.9 分别提高到 1150.8, 1551.3 和 1723.2 MJ/t 液浆。同时, 搅拌能耗占输出能量的比例也呈指数级的增加 (分别从 9.3% 增加到 9.9%, 21.9% 和 58.6%)。从能量的角度考虑, 在较低的纤维素酶量下 (如 7.0 FPU/g DM), 由于搅拌能耗随着固体含量的提高增加过快, 所以不宜进行过高固体含量的 SSF 操作。



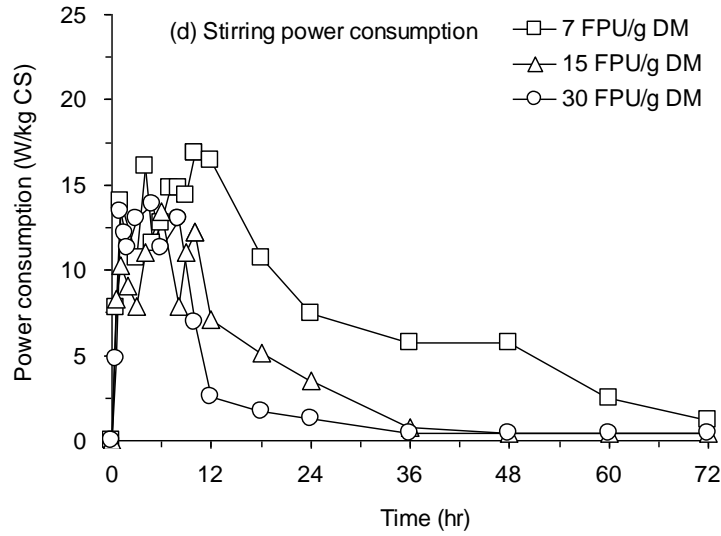


图 4.6 螺旋带浆反应器中不同纤维素酶用量下秸秆的 SSF 性能

Fig. 4.6 SSF at different Accellerase 1000 enzyme dosage. (a) Time courses of glucose consumption and ethanol yield; (b) Ethanol concentration and yield change with enzyme dosage; (c) Time courses of the viscosity at the real SSF shear rate; (d) Time courses of the stirring power consumption. Dotted arrows indicate inoculation time. Conditions: Pretreated CS loading 30.0% (w/w), 50 °C for prehydrolysis (before inoculation) and 37 °C for SSF (after inoculation), 120 rpm stirring rate. The material feeding and the solids loading calculation were shown in Table 4.3.

表 4.5 不同固体含量下 SSF 过程的搅拌能耗

Table 4.5 Mixing energy consumption during the SSF operations at different solids loadings

Solids loading (%, w/w)	Mixing energy consumption (E1) (MJ/ton slurry)	Thermal energy in the ethanol produced (E2) (MJ/ton slurry)	E1 / E2 (%)
15.0	79.5	854.9	9.3
20.0	113.6	1150.8	9.9
25.0	340.5	1551.3	21.9
30.0	1009.2	1723.2	58.6

The material feeding and the SSF operation conditions referred to Table 4.1 and Fig. 4.5. The unit MJ/ton slurry here refers to the energy per ton of SSF slurry used. The HHV (higher heating value) for ethanol is 23.4 MJ/liter, and the ethanol density (average) is 790 kg/liter.

表 4.6 不同酶量下 SSF 过程的搅拌能耗

Table 4.6 Mixing energy consumption during the SSF operations at different enzyme dosage

Enzyme dosage (FPU/g DM)	Mixing energy consumption (E1) (MJ/ton slurry)	Thermal energy in the ethanol produced (E2) (MJ/ton slurry)	E1 / E2 (%)
7.0	1009.2	1723.2	58.6
15.0	424.7	2511.5	17.0
30.0	347.0	2738.2	12.7

The material feeding and the SSF operation conditions referred to Table 4.3 and Fig. 4.6. The unit MJ/ton slurry here refers to the energy per ton of the SSF slurry used. The HHV (higher heating value) for ethanol is 23.4 MJ/liter, and the ethanol density (average) is 789 kg/liter.

尽管在较低酶量下不宜进行过高固体含量的 SSF 操作,但是搅拌能耗随着酶量的变化规律又给我们另外一种启示(见表 4.6)。分析表 4.6 可知,在 30.0%(w/w)固体含量下进行 SSF 操作,当酶量从 7.0 FPU/g DM 增加到 15.0 和 30.0 FPU/g DM 时,过程的搅拌能耗占输出能量的比例从 58.6%分别降低至 17.0%和 12.7%。结果表明,在高固体含量秸秆的 SSF 过程中,增加纤维素酶用量,不仅可以提高最终的乙醇得率,而且能够大大降低过程的搅拌能耗。此结果也从另外一个角度诠释了降低纤维素酶的成本对于纤维素乙醇生产的重要性。

#### 4.3.6 超高固体含量下秸秆的同步糖化与发酵

##### 4.3.6.1 进一步提高固体含量至 40.0%(w/w)对秸秆同步糖化与发酵的影响

为了进一步提高发酵醪中的乙醇浓度,在将酶用量提高到 15.0 FPU/g DM 的前提下,尝试了进一步提高固体含量对秸秆 SSF 性能的影响,结果见图 4.7 和表 4.7。分析图 4.7 可知,随着固体含量的进一步提高,尤其是从 35.0%(w/w)提高到 40.0%(w/w)时,秸秆的加料时间从 12 小时延长到 14 小时,但是预酶解结束时体系的葡萄糖浓度并没有明显的增加(从 85.3 g/L 提高到 88.5 g/L)。随着酵母的加入和 SSF 阶段的开始,葡萄糖迅速转化成乙醇并且在随后的过程中一直保持在较低的浓度。分析表 4.7 可知,当固体含量从 30.0%(w/w)提高到 35.0%(w/w)时,发酵结束时发酵醪中的乙醇浓度增幅很大,从 53.4 g/L 提高到 65.3 g/L;再进一步提高固体含量至 40.0%(w/w),乙醇浓度略有增加(68.1 g/L)。而乙醇得率则随着固体含量的提高逐步降低,尤其是当固体含量从 35.0%(w/w)提高到 40.0%(w/w)时,乙醇得率从 69.2%降低到 60.3%。考虑到发酵醪中的乙醇浓度和最终的乙醇得率,在 15.0 FPU/g DM 的条件下进行高固体含量的 SSF,35.0%(w/w)是较为合适的固体含量。

表 4.7 超高固体含量下玉米秸秆的发酵参数

Table 4.7 Fermentation performance<sup>a</sup> of CS at very high solids loading

Solids loading (% w/w)	Final ethanol concentration (g/L)	Ethanol yield (% of theoretical ethanol yield)
30.0	53.4	71.1
35.0	65.3	69.2
40.0	68.1	60.3

<sup>a</sup>The SSF conditions were listed in the Fig. 4.7.

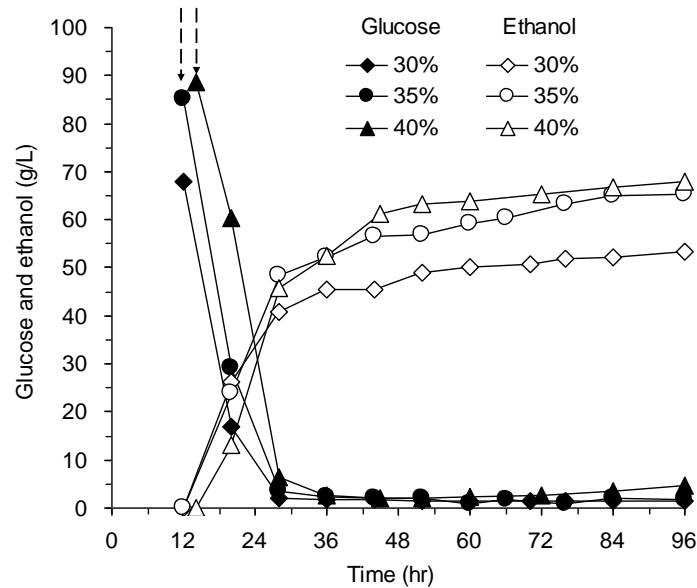


图 4.7 超高固体含量下玉米秸秆的同步糖化与发酵

Fig. 4.7 Effect of extremely high solids loading CS on the SSF performance. Dotted arrows indicate inoculation time. Conditions: Pretreated CS loading 30.0%, 35.0 and 40.0% (w/w), 15.0 FPU/g DM cellulase, 50 °C for prehydrolysis (before inoculation) and 37 °C for SSF (after inoculation), 150 rpm stirring rate. The CS was pretreated by the “dry” dilute-acid pretreatment and detoxified for 7 days.

#### 4.3.5.2 底物和纤维素酶的补加方式对超高固含量下秸秆同步糖化与发酵的影响

在高固体含量秸秆的 SSF 过程中,底物和纤维素酶的补加方式对秸秆的发酵性能影响较大<sup>[101, 103-105]</sup>。本节重点考察了在 35.0%(w/w)的固体含量下,4 种不同的底物和纤维素酶的补加方式对秸秆发酵性能的影响。Case 1 的补加方式为:初始加入全部纤维素酶,在 12 个小时内补加完玉米秸秆,使固体含量达到 35.0%(w/w); Case 2 的补加方式为:初始加入一半纤维素酶,在 12 小时内补加物料至固体含量达 30.0%(w/w),然后在随后的 18 小时内,每隔 4.5 小时加一次物料(每次加入剩余物料重量的 1/4),同时补加 1/16(v/v)的纤维素酶。此外,在第 36 和 48 小时分别补加 1/8(v/v)的纤维素酶; Case 3 的补加方式为:初始加入一半纤维素酶,然后在第 36 和 48 小时分别补入 1/4(v/v)的纤维素酶,物料的补加方式同 Case 2; Case 4 的补加方式为:初始加入一半纤维素酶,14 小时内补加完物料至固含量达到 35.0% (w/w, 预酶解时间为 14 小时),同时,在第 24、36 和 48 小时分别补加 1/6(v/v)的纤维素酶。分析图 4.8 和表 4.8 可知,在常规的纤维素酶和物料补加模式下(即 Case 1),预酶解结束时体系的葡萄糖浓度最高(达 85.3 g/L);而在有物料或纤维素酶补加的 SSF 过程中,预酶解结束时体系的葡萄糖浓度只有 70 g/L 左右。同时,留一部分纤维素酶在 SSF 阶段补加,有助于提高发酵后期乙醇的生成速率。尤其是在 Case 3 中,在 SSF 阶段中期补加大量的纤维素酶,有效促进了 SSF 后期乙醇的生成速率,增加了最终的乙醇浓度和得率。在木质纤维素原料的 SSF 过程中,木质素会吸附部分纤维素酶,从而导致纤维素酶的活性损失或钝化;同时,由于剪切及其它原因,可能导致纤维素酶的钝化或失活。因此,在高固体含量秸秆的 SSF 过程中,适时的

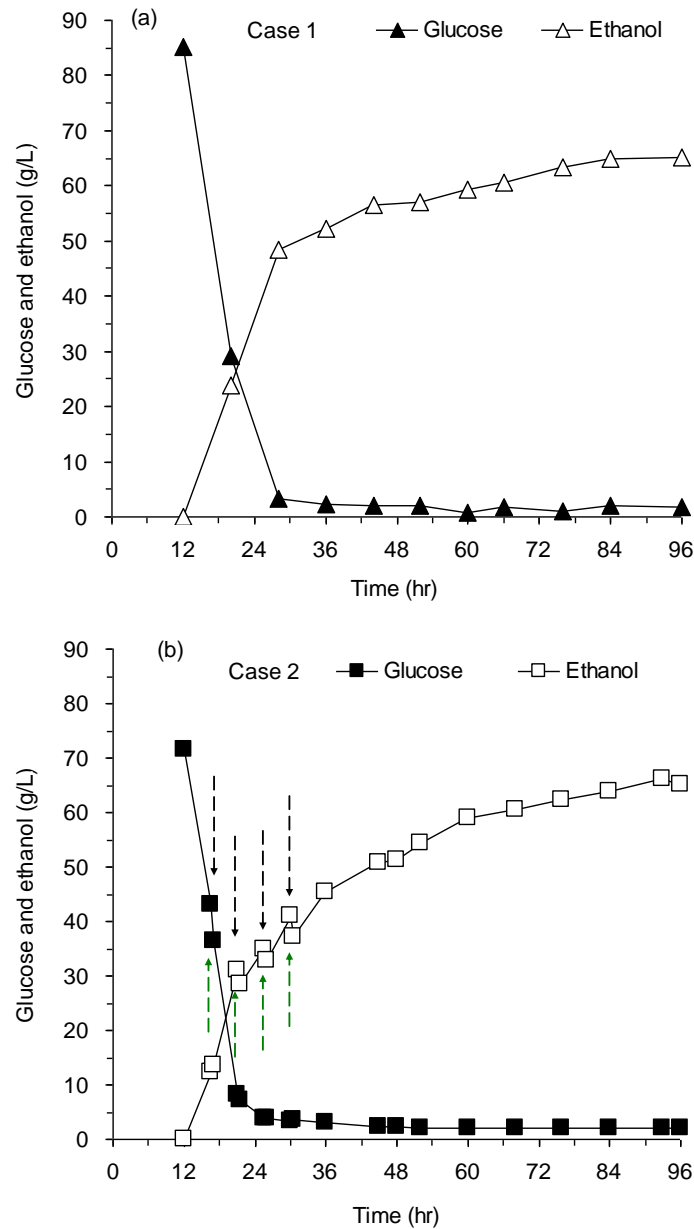
补加纤维素酶，对于提高秸秆的酶解效率及乙醇的生成作用明显；但是在发酵过程中补加底物和纤维素酶的操作，也增加了大规模生产时过程的操作难度及染菌的风险。

表 4.8 不同物料和纤维素酶的补加方式对玉米秸秆发酵性能的影响

Table 4.8 Effect of different CS and cellulase feeding modes<sup>a</sup> on the SSF performance at 35% (w/w) solids loading.

Case	Final ethanol concentration (g/L)	Ethanol yield (% of theoretical ethanol yield)
1	65.3	69.2
2	66.1	70.2
3	69.1	73.5
4	67.0	71.1

<sup>a</sup>The detailed feeding modes and the SSF conditions were listed in the Fig. 4.8.



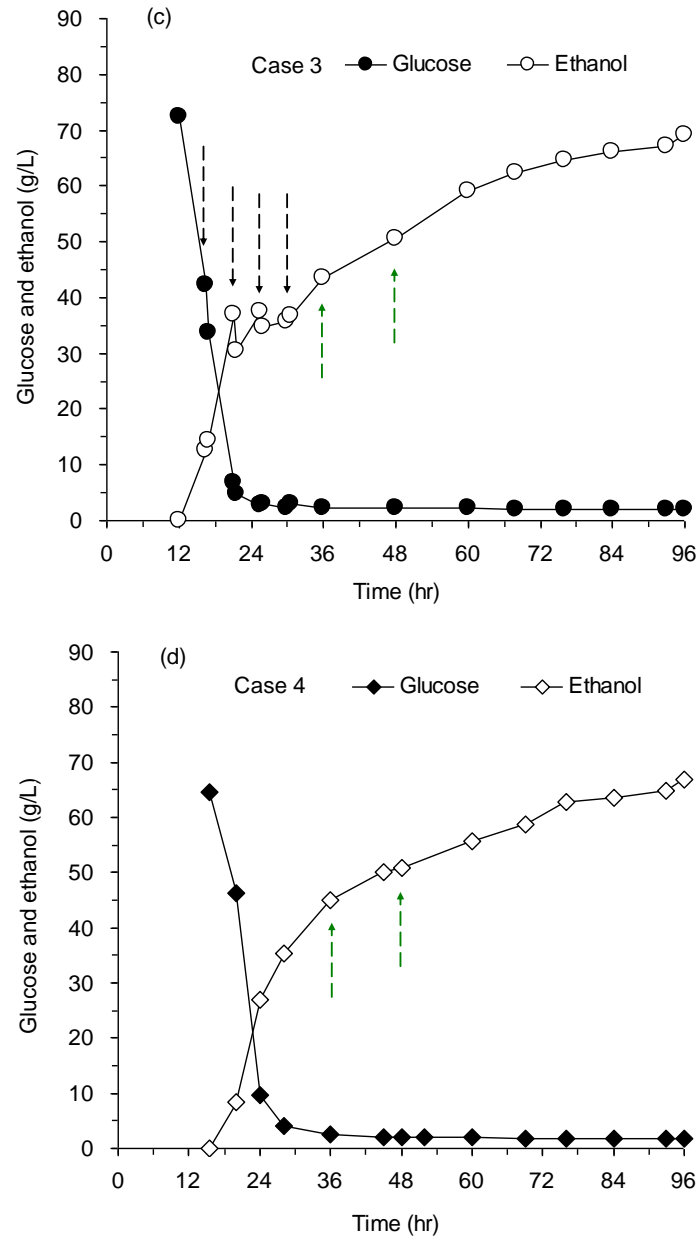


图 4.8 不同物料和纤维素酶的补加方式对 35.0%(w/w)固体含量下秸秆 SSF 的影响

Fig. 4.8 Effect of different CS and cellulase feeding modes on the SSF performance at 35.0% (w/w) solids loading. (a) Case 1: cellulase was totally put into the bioreactor before CS feeding, and the CS was fed into the bioreactor to reach 35% (w/w) within 12 hours; (b) Case 2: Half of the cellulase dosage was fed before CS feeding, then CS was fed to 30.0% (w/w) within 12 hours; the remaining CS was fed four times in the next 18 hours (every 4.5 hours), and 1/16 (v/v) of the cellulase dosage was fed following each CS feeding. In addition, 1/8 (v/v) of the cellulase dosage was fed at 36th hour and 48th hour, respectively. (c) Case 3: Half of the cellulase dosage was fed before CS feeding, and the other half was fed at 36th hour and 48th with 1/4 (v/v) of the cellulase dosage, respectively; the CS feeding mode was same as that in Case 2. (d) Case 4: Half of the cellulase dosage was fed before CS feeding, and CS was fed to 35.0% (w/w) within 14 hours; the other cellulase was fed at 24th, 36th, and 48th hour with 1/6 (v/v) of the cellulase dosage every time, respectively. Black dotted arrows indicated the CS feeding time and the green dotted arrows indicated the cellulase feeding time. Conditions: CS solids loading 35.0% (w/w), 15.0 FPU/g DM cellulase, 50 °C for prehydrolysis (before inoculation) and 37 °C for SSF (after inoculation), 150 rpm stirring rate. The CS was pretreated by the “dry” dilute-acid pretreatment method and biodetoxified for 7 days.

#### 4.4 小结

本章开发了一种新型的螺带桨生物反应器,可以处理高达 40.0%(w/w)固体含量的秸秆进行同步糖化与发酵,且搅拌能耗较常规的 Rushton 搅拌桨反应器降低了约 80-90%。至此,从木质纤维素原料到乙醇的生产过程,可以概括为从干的木质纤维素原料-50%(w/w)固体含量的预处理原料-生物脱毒后约 45%(w/w)固体含量的物料到 40.0%(w/w)固体含量下的同步糖化与发酵生成 69 g/L 乙醇。整个过程除了液态的纤维素酶和发酵菌种外,只有在预处理过程消耗了相当于原料干重的新鲜水,且无废水产生。本章的主要结论如下:

(1) 开发了一种能够处理高固体含量秸秆 SSF 生产乙醇的新型螺带桨反应器,通过与普通的 Rushton 搅拌桨反应器对比,新型螺带桨反应器在处理高固体含量秸秆 SSF 时具有混合充分、搅拌能耗低、有利于乙醇生成等优点。

(2) 在 29.0%(w/w)的固体含量、15.0 FPU/g DM 的条件下进行秸秆的 SSF,最佳接种时间点为预酶解 12 小时,接种量为 10%(v/v)。

(3) 在 7.0 FPU/g DM 的酶量下进行秸秆的 SSF,发酵结束时乙醇浓度随着固体含量(从 15.0%增加到 30.0%(w/w))的增加而增加,但乙醇得率却逐渐降低,体系的粘度及搅拌功率都随之增大。

(4) 在 30.0%(w/w)的固体含量下进行秸秆的 SSF,发酵结束时乙醇浓度和乙醇得率都随着酶量的增加(从 7.0 增加到 30.0 FPU/g DM)而增加,体系粘度及搅拌功率则随之降低。

(5) 在 15.0 FPU/g DM 的酶量下,进一步提高 SSF 体系的固体含量从 30.0%至 35.0%和 40.0%(w/w),发酵结束时乙醇浓度逐渐增加,乙醇得率反而降低。综合考虑乙醇浓度和乙醇得率,在 15.0 FPU/g DM 的酶量下,SSF 体系的固体含量应选 35.0%较为合适。

(6) 在 15.0 FPU/g DM 的酶量下进行 35.0%(w/w)固体含量的 SSF,可以采取补加物料和纤维素酶的方法来提高发酵结束时体系的乙醇浓度和最终的乙醇得率。尤其是在发酵中期(第 36 小时和 48 小时)补加一半的纤维素酶,可以较为明显的提高发酵结束时的乙醇浓度(从 65.3 g/L 提高到 69.1 g/L)。

## 第 5 章 乙醇分离与纤维素酶-发酵菌体循环利用的过程耦合

### 5.1 前言

一般而言,精馏是工业生产中能耗最大的单元操作之一<sup>[84]</sup>,通常占到工厂总能耗的 50-90%。降低乙醇分离的能量投入,可以明显提高乙醇生产过程的经济性<sup>[120, 158-159]</sup>。目前,已有多种新的节能技术在乙醇分离中取得应用,如汽提、膜分离、渗透汽化、萃取等<sup>[119, 160-167]</sup>。但是,这些新的方法很少能与以木质纤维素原料为基质生产乙醇的工艺耦合起来,尤其是当原料的固体含量较高时。

在利用木质纤维素原料,采用同步糖化与发酵工艺生产乙醇的过程中,纤维素酶的成本占同步糖化与发酵工段总成本的 50%左右<sup>[168]</sup>。回收 SSF 过程的纤维素酶或实现纤维素酶的循环利用,将大大降低纤维素乙醇的生产成本。目前有关纤维素酶回收的研究主要集中在原料的酶解过程,而且是在较低的固体含量下<sup>[110, 169-170]</sup>。而在木质纤维素原料的 SSF 过程中,尤其是在高固体含量条件下,对纤维素酶的回收还没有相关文献报道。

此外,在批式的 SSF 过程中,每批都需要重新培养酵母菌,尤其是在以木质纤维素基质为底物时,需要对酵母菌进行驯化培养,周期长且繁琐。实现酵母菌的循环利用,也将大大简化 SSF 操作。目前微生物细胞的循环主要采用固定化的方法来实现,但是在含有大量木质纤维素原料固体的体系中,实现细胞与固体的分离难度很大<sup>[119-120]</sup>。

如果在纤维素乙醇的生产过程中,能将乙醇分离、纤维素酶-酵母菌的循环整合在同步糖化与发酵工艺中,实现纤维素乙醇的连续性生产,将会提高整个乙醇生产过程的经济性。早在 1977 年, Cysewski 和 Wilke 就研究了在酵母菌发酵葡萄糖生产乙醇的过程中,通过减压蒸馏的方法分离乙醇,缓解产物对酵母发酵的抑制,从而促进乙醇的快速发酵;同时,较低的蒸馏温度也保留了酵母的发酵活性,实现了酵母的循环<sup>[160]</sup>。1984 年, Ghose 等人在利用稻草生产乙醇的过程中(10%(w/w)固体含量),通过减压蒸馏的方法实现了乙醇的实时分离。在补加 9 次底物后,纤维素酶和酵母菌仍然保持较高的活性<sup>[171]</sup>。但是迄今为止,在高固体含量下进行的 SSF 过程中,还没有关于乙醇分离与纤维素酶-酵母菌循环相耦合过程的研究。

本章采用减压蒸馏的方法,重点考察了在较高固体含量下进行的 SSF 过程中,实现乙醇分离、纤维素酶-酵母菌循环耦合工艺的可能性。为此,主要研究了在合成发酵液中、在 40.0%(w/w)固体含量下玉米秸秆同步糖化与发酵后的发酵醪上清液和在 40.0%(w/w)固体含量下玉米秸秆同步糖化与发酵后的发酵醪全醪中,不同减压蒸馏条件对乙醇分离效率和纤维素酶活性的影响。

### 5.2 材料与方法

#### 5.2.1 实验材料

实验材料参照 2.2.1。

## 5.2.2 仪器与设备

除旋转蒸发仪外，其它仪器与设备参照 2.2.1.5。

大颜 R 系列旋转蒸发仪（上海大颜仪器设备有限公司，SHANGHAI DAYAN EQUIPMENT CO. LTD）由循环水式真空泵、低温冷却循环泵、冷凝器、控温水浴槽和旋转器 5 部分构成。循环水式真空泵不停的排出气体，使旋转蒸发体系处于一定的真空度下。低温冷却循环泵内制冷液体为乙醇，可控制冷凝器内温度最低至 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，从而有效冷凝蒸馏出的乙醇。控温水浴槽可维持蒸馏烧瓶内温度在 $30\text{-}80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。而旋转器使蒸馏烧瓶以一定转速旋转，保证受热更加均匀，防止暴沸。

## 5.2.3 实验及分析方法

### 5.2.3.1 实验方法

#### 5.2.3.1.1 秸秆的稀酸预处理、生物脱毒及高固体含量下的同步糖化与发酵

参照 2.2.2。

#### 5.2.3.1.2 合成发酵液的减压蒸馏

合成发酵液的减压蒸馏条件为：250 ml 的蒸馏烧瓶内装有 100 ml 合成发酵液，蒸馏烧瓶转速为 100 rpm，温度为 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  和  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  的条件下分别蒸馏 3、5、10、15、20 和 30 分钟，蒸馏时烧瓶内接近真空状态。

#### 5.2.3.1.3 40.0%(w/w)固体含量下玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪上清液和发酵醪全醪的减压蒸馏

40.0%(w/w)固体含量下玉米秸秆同步糖化与发酵后的发酵醪上清液及发酵醪全醪的减压蒸馏：1000 ml 的蒸馏烧瓶内装有 100 ml 的发酵醪上清液或发酵醪，分别加入 1 ml 或 2 ml 植物油以防止暴沸。蒸馏烧瓶转速为 100 rpm，在 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  的蒸馏温度下分别蒸馏 3、5、7.5、10 和 15 分钟。蒸馏时烧瓶内接近完全真空。

### 5.2.3.2 分析方法

除蒸馏残液中纤维素酶酶解能力的测定方法外，其它分析方法参照 2.2.3。

蒸馏残液中纤维素酶对 Whatman 滤纸的酶解能力：将合成发酵液减压蒸馏后的残液还原至原体积 100 ml，然后用 pH4.8、100 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液稀释 50 倍，取 0.5 ml 稀释后的蒸馏残液加入盛有 50 mg Whatman 滤纸和 1 ml 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液的玻璃试管中，置于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  水浴中反应 60 分钟，取出后立即用冰水混合物冷却以终止反应。然后 10000 rpm 离心 10 分钟，上清液进行 HPLC 分析葡萄糖浓度。在测定发酵醪上清液蒸馏后对滤纸酶解能力时不用还原到原体积，直接稀释 20 倍后进行酶解即可。同时，分别用未蒸馏的合成发酵液和发酵醪上清液作为对照测定其催化滤纸生成的葡萄糖量。蒸馏不同时间所得残液中纤维素酶酶解滤纸所产生的葡萄糖量与未蒸馏的发酵液（或发酵醪上清液）酶解滤纸产生的葡萄糖量的比值即为蒸馏残液中纤维素酶对 Whatman 滤纸的酶解能力。

蒸馏残液中纤维素酶对稀酸预处理后玉米秸秆的降解能力：将合成发酵液减压蒸馏后的残液还原至原体积 100 ml，并用柠檬酸缓冲液稀释 20 倍后分装至 20 ml/100 ml 三

角瓶中，同时加入稀酸预处理并经 12 倍（玉米秸秆干基质量的 12 倍）清水冲洗脱毒后的玉米秸秆，使固体含量达到 5.0%(w/w)，同时每个三角瓶加入 100  $\mu\text{l}$  10 mg/ml 的四环素防止酶解过程染菌（酶解体系的四环素浓度为 50  $\mu\text{g/ml}$ ）。每个样品两个平行，置于 50  $^{\circ}\text{C}$ 、150 rpm 的水浴恒温摇床中酶解 72 小时。酶解结束后，取样于 10000 rpm 离心 10 min，将上清放入 -20  $^{\circ}\text{C}$  冻存，待 HPLC 分析用。测定发酵醪上清液和发酵醪蒸馏后残液中纤维素酶对玉米秸秆的酶解能力时不做体积还原，不进行稀释，直接测定即可。蒸馏不同时间釜残液中纤维素酶酶解秸秆产生的葡萄糖量与未蒸馏的合成发酵液（或 7.0 FPU/g DM（与 40%(w/w)发酵醪上清液对应）或 15.0 FPU/g DM（与 40%(w/w)发酵醪对应）酶量下）酶解秸秆生成的葡萄糖的比值即为残余纤维素酶对秸秆的酶解能力。

### 5.3 结果与讨论

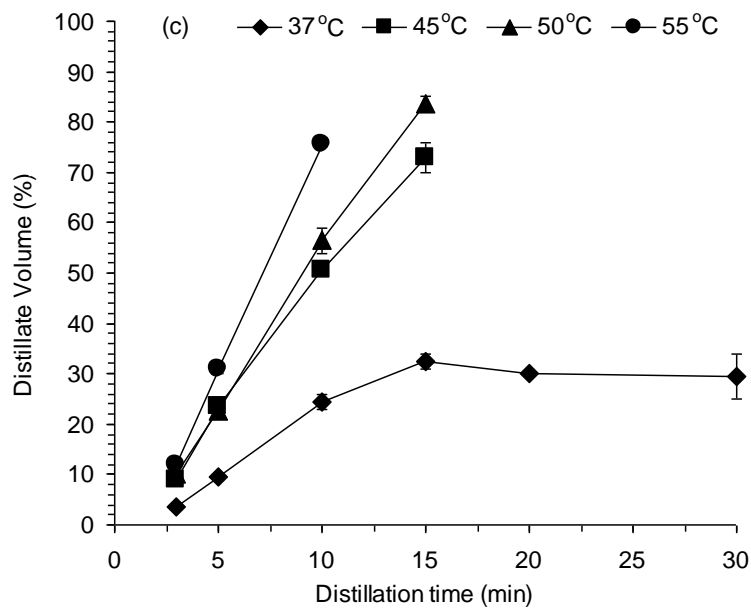
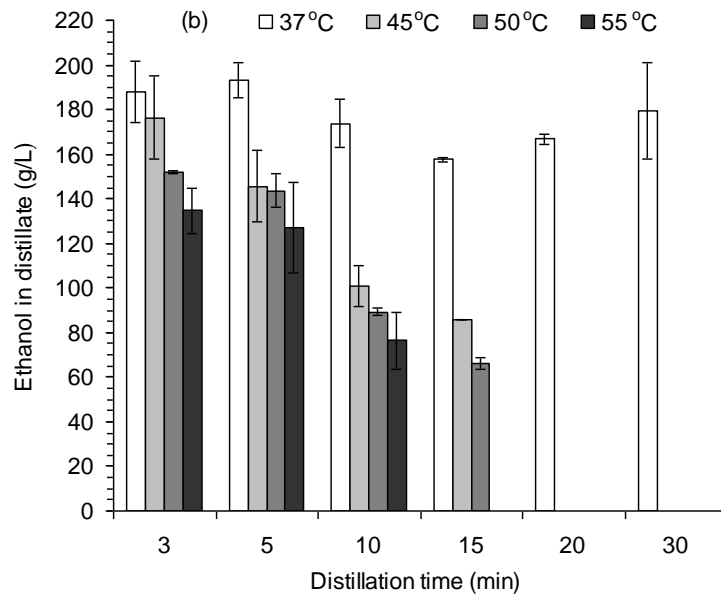
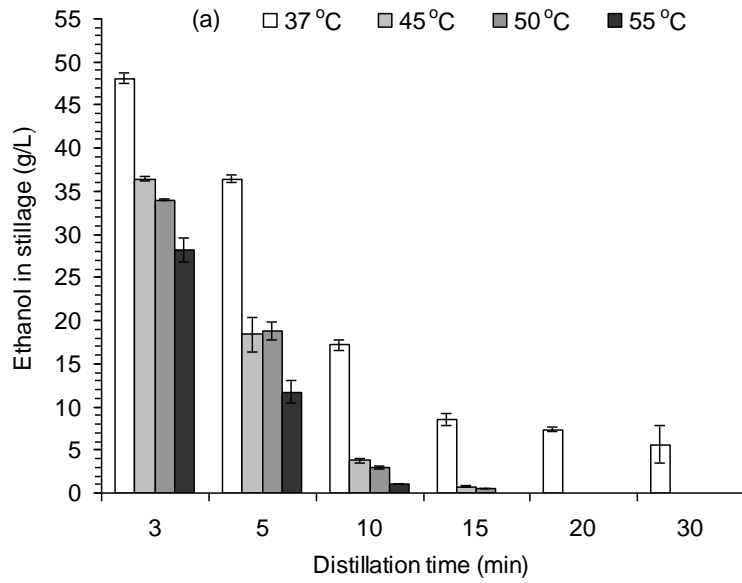
#### 5.3.1 合成发酵液的减压蒸馏

为了考察减压蒸馏对乙醇的分离效果及对纤维素酶酶活的影响，首先用合成发酵液来模拟真实的发酵醪，以测试减压蒸馏的效果。

合成发酵液是根据 40.0%(w/w)固体含量下玉米秸秆同步糖化与发酵后得到的发酵醪中的组分合成的。具体成分如下：62.2 g/L 的乙醇，纤维素酶 Accellerase 1000 的酶量为 7.5 FPU/ml，整个体系用 pH 4.8、100 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液配成。

分别在 37、45、50 和 55  $^{\circ}\text{C}$ ，接近绝对真空的条件下，对装有 100 ml 合成发酵液/250 ml 的蒸馏烧瓶分别蒸馏 3、5、10、15、20 和 30 分钟，考察馏出液和釜残液中的乙醇浓度和乙醇的收率（见图 5.1）。

从图 5.1 可以看出，在各蒸馏温度下，随着蒸馏时间的延长，釜残液中的乙醇浓度逐渐降低，馏出液中的乙醇浓度也逐渐降低；同时，相同的蒸馏时间，温度越高，蒸馏效率越高，即釜残液中的乙醇浓度越低，馏出液的体积分率越大，但馏出液中的乙醇浓度却随着蒸馏温度的升高而降低。值得注意的是，在 37  $^{\circ}\text{C}$  的条件下进行 15 分钟的减压蒸馏后，釜残液中的乙醇浓度就不再变化；而馏出液中的乙醇浓度变化不大，一直维持在 180 g/L 左右；同时馏出液的体积分率也不再随时间的延长而变化。在 45  $^{\circ}\text{C}$ 、50  $^{\circ}\text{C}$  和 55  $^{\circ}\text{C}$  的条件下，随着蒸馏时间的延长，馏出液的体积分率直线升高。而减压蒸馏温度的升高则加剧了这一趋势。乙醇的收率随着蒸馏时间的延长迅速增加，当蒸馏时间达 10 分钟时，在 45  $^{\circ}\text{C}$ 、50  $^{\circ}\text{C}$  和 55  $^{\circ}\text{C}$  的减压蒸馏条件下，乙醇收率即可达 90% 以上。在 37  $^{\circ}\text{C}$  的条件下进行减压蒸馏时效率稍低，需要 15 分钟才能达到 90% 以上。此外，从图 5.1(b)和(c)还可以看出，减压蒸馏对合成发酵液中乙醇的浓缩作用明显。



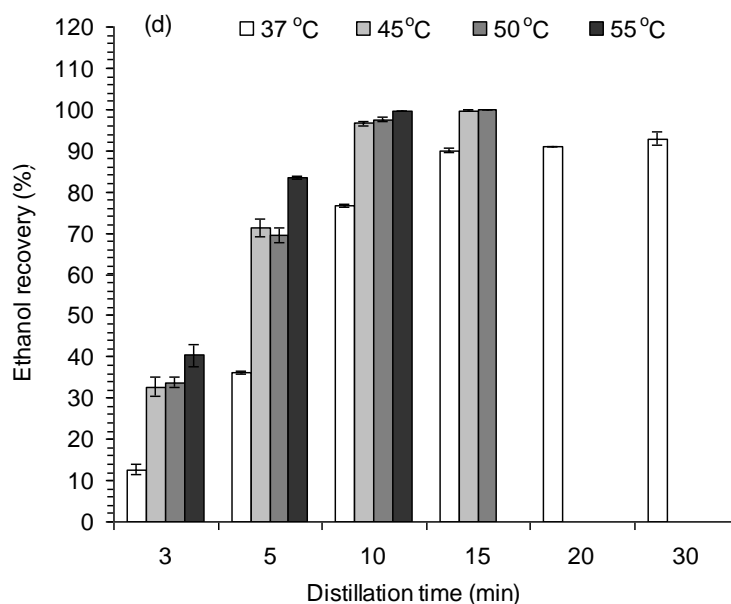


图 5.1 减压蒸馏对合成发酵液中乙醇分离效果的影响 (a) 釜残液中的乙醇浓度 (b) 馏出液中的乙醇浓度 (c) 馏出液的体积分数 (d) 乙醇的收率

Fig. 5.1 Effect of vacuum distillation conditions on the ethanol separation of the synthetic fermentation liquid (a) ethanol in the stillage (b) ethanol in the distillate (c) volume fraction of the distillate (d) ethanol recovery. The distillation conditions were: the water-bath temperature were 37, 45, 50 and 55 °C for heating the distillation flasks, and the distillation time was 3, 5, 10, 15, 20 and 30 min respectively, at the approximate absolute vacuum conditions.

对于乙醇与水组成的二元恒沸系统，当压力降低时，其恒沸点降低。在接近绝对真空的条件下，此二元系的恒沸点较低（低于 37 °C）。而蒸馏温度越接近恒沸点，其馏出液中的乙醇浓度就会越高。随着减压蒸馏的进行，釜残液中乙醇浓度逐渐降低，随之而来的是馏出液中乙醇浓度的降低。同时，恒沸体系组分的变化，也会改变体系的恒沸点，即体系乙醇浓度越低，恒沸点越高。所以，随着蒸馏时间的延长，一旦恒沸点超过 37 °C 时，体系将不会沸腾，即不能有效的分离出乙醇，这可能就是在 37 °C 的条件下蒸馏 15 分钟后，馏出液体积分数不再变化的原因<sup>[172]</sup>。

在考察减压蒸馏对乙醇分离效果的同时，研究了其对合成发酵液中纤维素酶酶活的影响（见图 5.2）。从图 5.2 可以看出，随着减压蒸馏时间的延长，合成发酵液中残余的纤维素酶对 Whatman 滤纸的酶解能力有所降低，而且蒸馏温度越高，酶活降低的越明显。尽管减压蒸馏的温度和时间不同，但残液中的纤维素酶对滤纸的酶解能力活都保持在 80% 以上。此外，蒸馏残液中的纤维素酶对玉米秸秆的酶解能力也都在 90% 以上。

上述实验结果表明，在较低的温度下对合成发酵液进行减压蒸馏，可以实现乙醇的有效分离，并且对分离出的乙醇有 2-3 倍的浓缩作用；同时保存了发酵液中 80-90% 的纤维素酶酶活。本研究之所以选择 37、45、50 和 55 °C 作为减压蒸馏的温度，是因为纤维素酶 Accellerase 1000 的最高耐受温度为 55 °C。此外，考虑到要将乙醇的分离与纤维素酶和酵母的循环耦合起来，而酵母菌的最高耐受温度在 37 °C，所以选择 37 °C

作为后续减压蒸馏研究中的蒸馏温度。

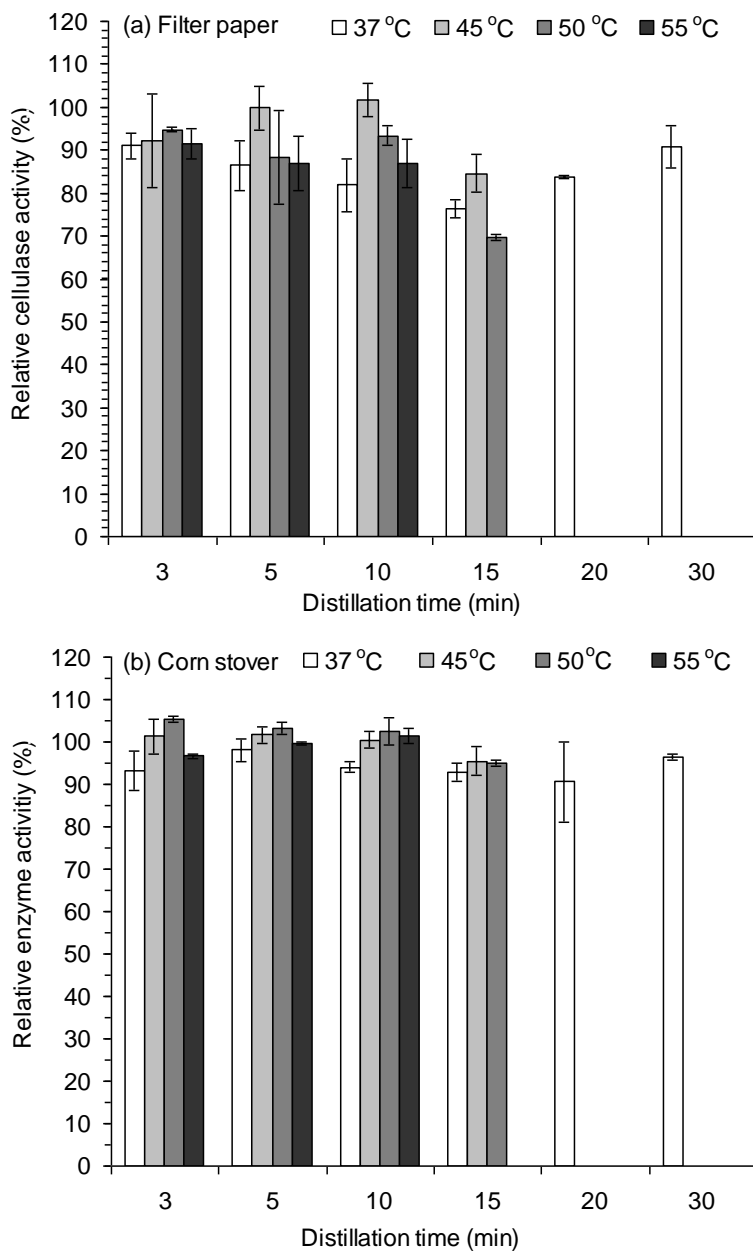


图 5.2 减压蒸馏对合成发酵液中纤维素酶酶活的影响 (a) 对 Whatman 滤纸的酶解能力 (b) 对玉米秸秆的酶解能力

Fig. 5.2 Effect of vacuum distillation on the cellulase activity in the synthetic fermentation liquid (a) the digestibility for the Whatman filter paper of the remaining cellulase in distillate; (b) the digestibility for the CS of the remaining cellulase in the distillate at 5% solids loading. The vacuum distillation conditions were listed in Fig. 5.1. The CS used here were pretreated at the optimum “dry” pretreatment conditions discussed in section 2.3.3. And the CS after pretreatment were water-washed at a liquid to CS solids ratio of 12:1 (w/w), then squeezed out of the water with the final water content of 60% (w/w).

### 5.3.2 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪上清液的减压蒸馏

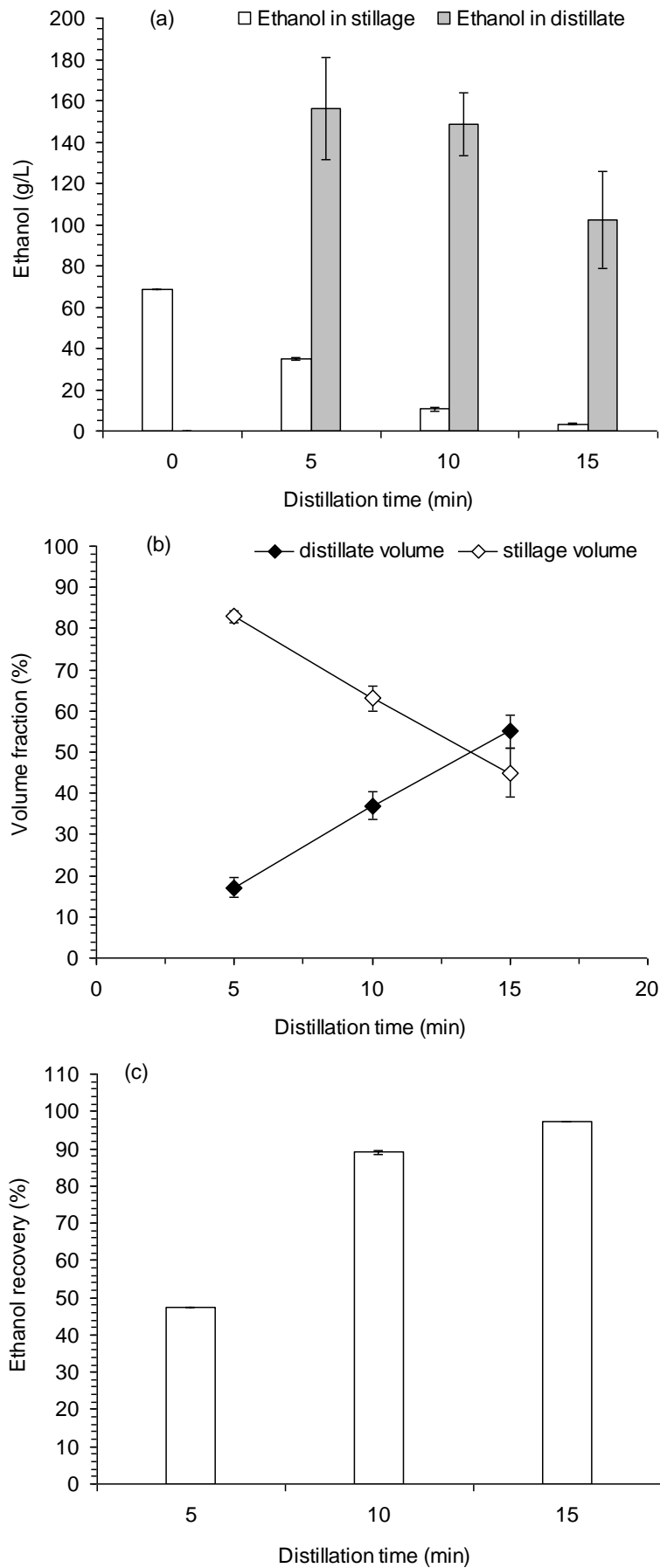
#### 5.3.2.1 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪上清液的制备

最佳干式预处理后的玉米秸秆经生物脱毒 7 天后, 在 40.0%(w/w)固体含量、15.0 FPU/g DM 的条件下同步糖化与发酵 96 小时后, 将发酵醪在 3800 rpm 的条件下离心 10 分钟, 取出上清液, 即获得 40.0%(w/w)固含量下玉米秸秆同步糖化与发酵后的发酵醪上清液。经 HPLC 分析, 上清液中的主要成分为: 68.5 g/L 的乙醇, 5.5 g/L 的葡萄糖, 10.2 g/L 木糖和 4.7 g/L 的乙酸。

#### 5.3.2.2 减压蒸馏对 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪上清液中乙醇分离效果的影响

为了实现减压蒸馏对发酵醪上清液中乙醇的有效分离, 在 37 °C 的条件下, 分别对发酵醪上清液进行 5、10 和 15 分钟的减压蒸馏, 考察乙醇的分离效果。

从图 5.3(a)可以看出, 随着蒸馏时间的延长, 残液中的乙醇浓度快速降低, 馏出液中的乙醇浓度也有较为明显的降低, 但被浓缩了约 2-3 倍。图 5.3(b)则显示了馏出液的体积随着蒸馏时间的延长而增加, 釜残液的体积随着时间的延长而减少。这与合成发酵液中 37 °C 下蒸馏的结果不同, 可能是由于发酵液中的糖分或离子强度的差异造成的。同时, 乙醇的收率随着蒸馏时间的延长而提高, 蒸馏 10 分钟后, 乙醇的收率即可达到 90%。值得注意的是, 随着蒸馏时间的延长, 釜残液中的乙酸也得到了浓缩。蒸馏 15 分钟后, 乙酸被浓缩了将近 2 倍, 达到 10 g/L, 这将对纤维素酶的催化活性和酵母菌的生长及发酵性能产生较强的抑制作用。



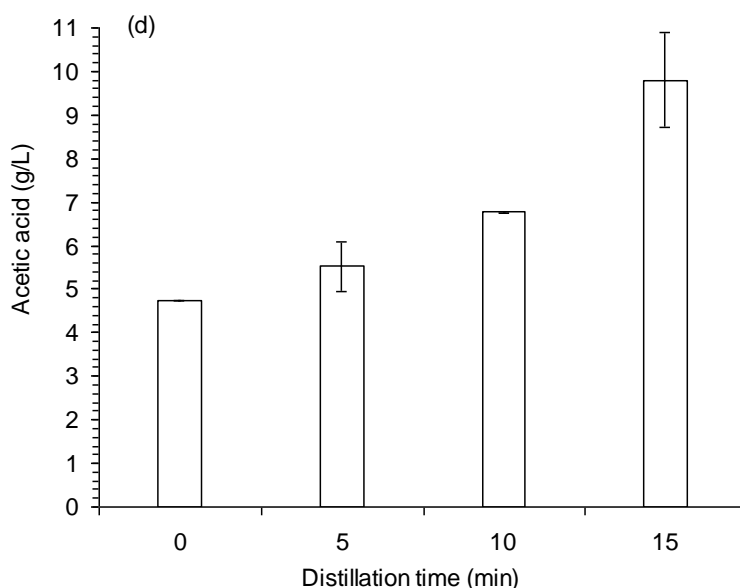


图 5.3 减压蒸馏对 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪上清液中乙醇分离效果的影响 (a) 釜残液和馏出液中乙醇浓度 (b) 馏出液体积分数 (c) 乙醇收率 (d) 残液中乙酸浓度

Fig. 5.3 Effect of vacuum distillation on ethanol separation in the fermentation slurry liquid after SSF for 96 hours at 40.0% (w/w) solids loading (a) ethanol concentration in the stillage and distillate; (b) distillate volume fraction; (c) ethanol recovery; (d) acetic acid in the stillage. The distillation conditions were: the water-bath temperature were 37 °C for heating the distillation flasks, and the distillation time was 5, 10 and 15 min respectively, at the approximate absolute vacuum conditions.

### 5.3.2.3 减压蒸馏对 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪上清液中纤维素酶酶活的影响

发酵醪上清液经减压蒸馏后，釜残液中的纤维素酶对 Whatman 滤纸和玉米秸秆的酶解性能见图 5.4。

从图 5.4 可以看出，40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪上清液中的纤维素酶酶活非常有限，在 5.0%(w/w)的固体含量下酶解秸秆，酶量仅仅为 7.0 FPU/g DM 的一半。同时，在较短的时间内酶解滤纸（1 小时），酶活相当于 Accellerase 1000 的 5%左右。随着减压蒸馏的进行，纤维素酶得到适当浓缩。减压蒸馏 15 分钟时，纤维素酶约被浓缩了 2 倍左右。

综上所述，减压蒸馏能够很好的分离并浓缩发酵醪上清液中的乙醇，同时保存并浓缩了上清液中残存的纤维素酶酶活。但是，在秸秆的同步糖化与发酵过程中，吸附在固体上的纤维素酶有 50-60%，甚至更多。我们的实验结果也表明，上清液中残存的酶活相当低。因此，有必要进一步研究减压蒸馏对发酵醪全醪中乙醇的分离效率和纤维素酶酶活的影响。

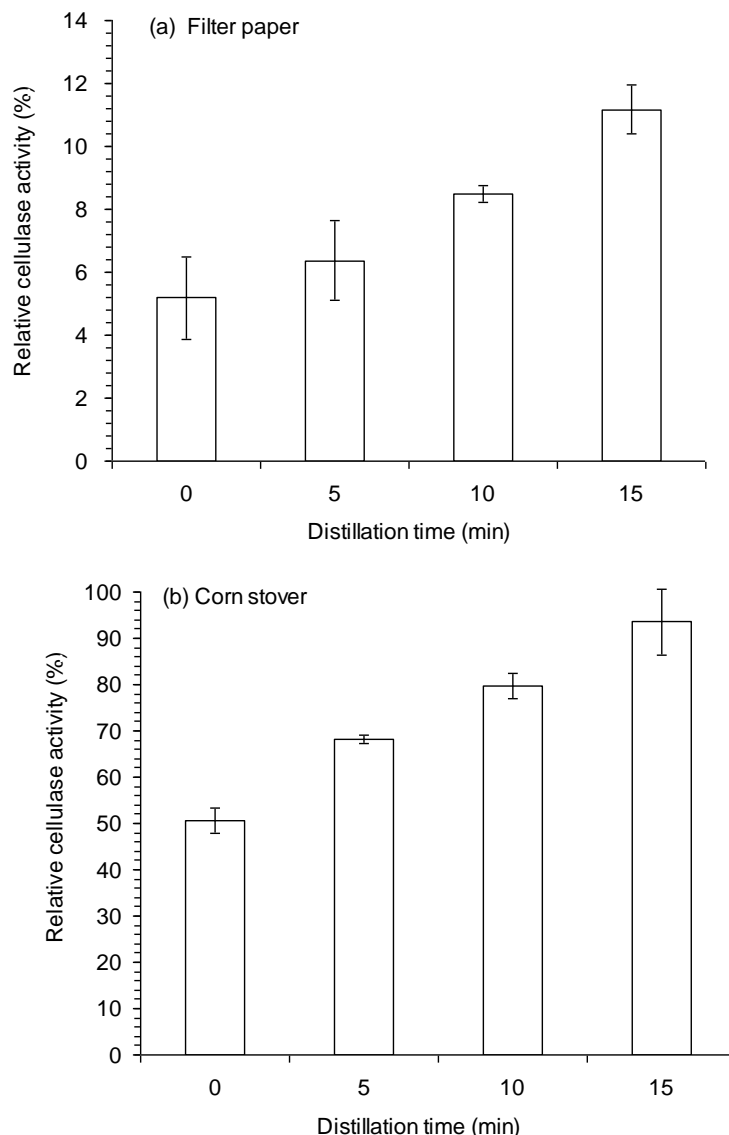


图 5.4 减压蒸馏对 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪上清液中纤维素酶酶活的影响 (a) 对 Whatman 滤纸的酶解能力 (b) 对玉米秸秆的酶解能力

Fig. 5.4 Effect of vacuum distillation on cellulase activity in the fermentation slurry liquid after SSF for 96 hours at 40.0% (w/w) solids loading (a) digestibility of the remaining cellulase in distillate for the Whatman filter paper; (b) digestibility of the remaining cellulase in distillate for the CS at 5% solids loading. The distillation conditions were listed in Fig. 5.3. Control in Fig. 5.4(a) was the glucose released after enzymatic hydrolysis of the Whatman filter paper catalyzed by Accellerase 1000 with 50 folds dilution. Control in Fig. 5.4(b) was the glucose released after enzymatic hydrolysis of the CS at a dosage of 7.0 FPU/g DM.

### 5.3.3 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后所得发酵醪全醪的减压蒸馏

#### 5.3.3.1 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪的制备

最佳干式预处理后的玉米秸秆经生物脱毒 7 天后, 在 40.0%(w/w)固体含量、15.0 FPU/g DM 的条件下同步糖化与发酵 96 小时后, 即获得 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后的发酵醪。经 HPLC 分析, 发酵醪中的主要成分为: 68.1 g/L 的乙醇,

4.5 g/L 的葡萄糖, 9.4 g/L 的木糖和 4.5 g/L 的乙酸。此批发酵醪与 5.3.2.1 中所述并非同一批, 故成分有所差别。

### 5.3.3.2 减压蒸馏对 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪中乙醇分离效果的影响

首先, 考察了在 37 °C 下减压蒸馏对 40.0%(w/w)固体含量下玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪中乙醇分离的影响 (见图 5.5)。由于发酵醪非常粘稠, 其固体含量约为 10% 左右, 蒸馏 10 分钟后釜残液中就基本没有液体了, 所以蒸馏时间分别为 5、7.5 和 10 分钟。从图 5.5 可以看出, 随着蒸馏时间的延长, 馏出液中的乙醇浓度都维持在 160 g/L 以上, 较发酵醪原液中的乙醇浓度提高了 1 倍以上。而蒸馏残液中的乙醇浓度维持在 10 g/L 的水平。而且, 乙醇的收率在蒸馏 10 分钟时已经达到了 90%。同样的, 与发酵醪上清液的蒸馏结果相同, 釜残液中的乙酸浓度也随着蒸馏时间的延长而得到浓缩。

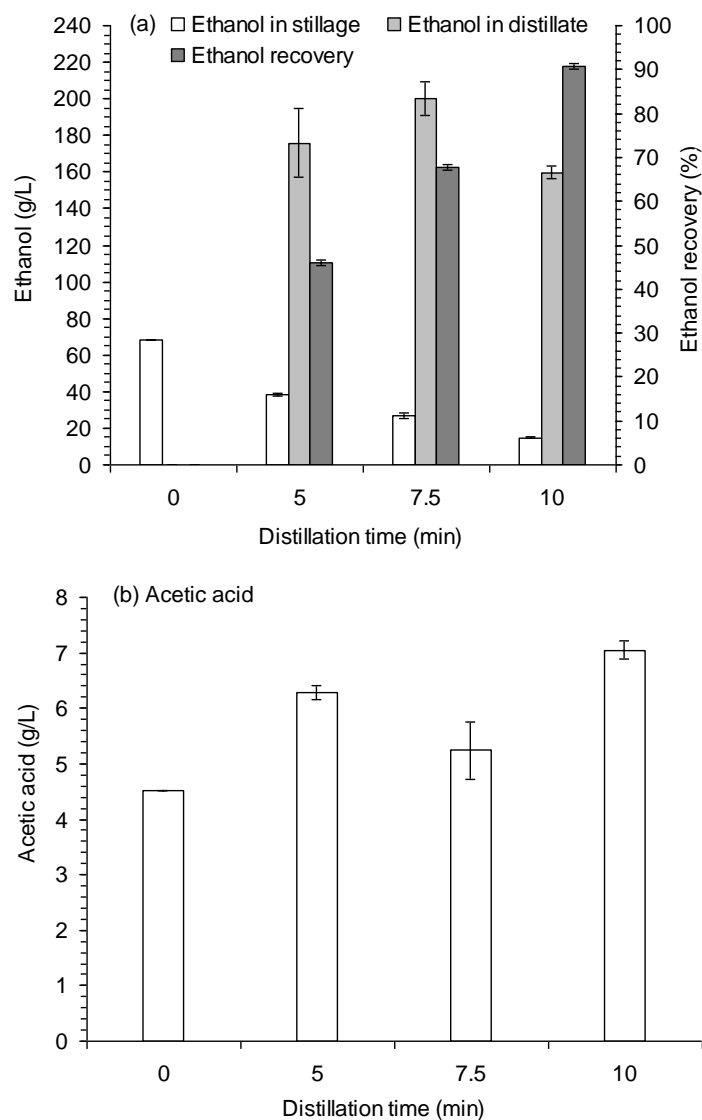


图 5.5 减压蒸馏对 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪全醪中乙醇分离的影响  
(a)釜残液和馏出液中乙醇浓度及乙醇收率 (b) 釜残液中乙酸浓度

Fig. 5.5 Effect of vacuum distillation on ethanol separation in the fermentation slurry after SSF for 96 hours at 40.0% (w/w) solids loading (a) ethanol concentration in the stillage and distillate and the ethanol recovery; (b) acetic acid in the stillage. The distillation conditions were: the water-bath temperature were 37 °C for heating the distillation flasks, and the distillation time was 5, 7.5 and 10 min respectively, with the approximate absolute vacuum.

### 5.3.3.3 减压蒸馏对 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪全醪中纤维素酶的影响

由于发酵醪减压蒸馏后非常粘稠，固体含量仍然较高，残余秸秆会对滤纸酶活的测定产生相当大的干扰，所以只测定了釜残液中纤维素酶对玉米秸秆的酶解效果（见图 5.6）。

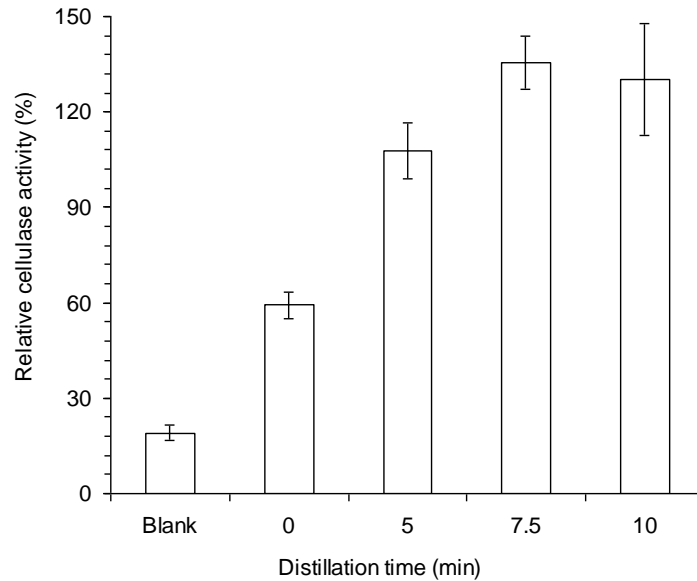


图 5.6 减压蒸馏对 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后发酵醪中纤维素酶酶解玉米秸秆能力的影响

Fig. 5.6 Effect of vacuum distillation on the cellulase digestibility for the CS in the fermentation slurry liquid after SSF for 96 hours at 40.0% (w/w) solids loading. Distillation conditions were listed in the Fig. 5.5. The control was the glucose released after enzymatic hydrolysis of the CS at the enzyme dosage of 15.0 FPU/g DM and at 5% solids loading. The blank was the glucose released after enzymatic hydrolysis of the remaining CS by the cellulase in the stillage before vacuum distillation without addition of fresh CS. The stillage after 10 min' distillation was diluted to 2 folds due to the high viscosity of the slurry.

在图 5.5 中, 对照是用 15.0 FPU/g DM 的酶量酶解玉米秸秆 72 小时; 空白是用原始的发醇醪, 未加入秸秆, 继续酶解 72 小时。分析图 5.5 可知, 未减压蒸馏的发醇醪中的纤维素酶对秸秆的酶解能力大概是对照的 60%, 远远高于发醇醪上清液中的纤维素酶对秸秆的酶解能力, 即发醇醪中所含的纤维素酶活要高于上清液, 这也证明了许多研究者关于木质纤维素固体上吸附的纤维素酶高于上清液中的推论。更令人惊讶的是, 随着减压蒸馏时间的延长, 特别是减压蒸馏 7.5 分钟和 10 分钟后, 釜残液酶解秸秆的能力居然超过了对照, 即高于 5.0%(w/w)固体含量秸秆所能产生的理论葡萄糖量 (20 g/L 左右)。可能的原因是: (1) 减压蒸馏对纤维素酶的浓缩, 大大提高了蒸馏残液中的纤维素酶酶活; (2) 发醇醪中未酶解的秸秆上吸附的纤维素酶重新解吸下来, 从而有更多的纤维素酶在酶解过程中起催化作用; (3) 此外, 残余的纤维素酶不仅降解了新加入的秸秆, 而且继续酶解了发醇醪中残余的秸秆, 所以生成的葡萄糖量远远超过了对照。

实验结果表明, 在 37 °C 下减压蒸馏 7-10 min 即可有效的分离并浓缩发醇醪中的乙醇, 且减压蒸馏对釜残液中纤维素酶活的影响也不大; 此外, 发醇醪中的酶活要远远高于其上清液中的纤维素酶酶活。所以, 对全醪液中的维素酶进行回收意义更大。

#### 5.4 小结

本章采用减压蒸馏的方法, 实现了高固体含量秸秆同步糖化与发酵后发醇醪中纤维

素酶的有效保存；同时，将蒸馏出的乙醇浓缩了 2-3 倍，达 180 g/L，从而大大降低了后续精馏过程的能耗和整个乙醇生产过程所用纤维素酶的成本，为实现高固体含量秸秆半连续性或连续性生产纤维素乙醇打下了坚实的基础。本章所得主要结论如下：

(1) 对合成发酵液进行减压蒸馏，可以有效分离乙醇，并对分离出的乙醇具有 2-3 倍的浓缩作用，得到的乙醇浓度在 23%(v/v)左右；同时，釜残液中的纤维素酶对 Whatman 滤纸和水洗后的玉米秸秆仍保留有 80%以上的酶解能力。

(2) 对 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后所得发酵醪的上清液进行减压蒸馏，可以在有效分离乙醇的同时，保留釜残液中大部分的纤维素酶活。但是由于发酵醪液经过了固液分离，上清液中的纤维素酶酶量很少，所以发酵后釜残液中的纤维素酶对 Whatman 滤纸和玉米秸秆的酶解能力较差。此外，减压蒸馏对釜残液中的乙酸也有一定程度的浓缩作用。

(3) 对 40.0%(w/w)固体含量玉米秸秆同步糖化与发酵后所得发酵醪全醪进行减压蒸馏，可以有效分离乙醇，得到被浓缩 2-3 倍的乙醇；同时，釜残液中的纤维素酶对水洗后秸秆的酶解能力远远高于其上清液减压蒸馏后对秸秆的酶解能力，即可以回收绝大部分纤维素酶，为实现纤维素酶的循环奠定了基础。

## 第 6 章 结论与展望

### 6.1 结论与创新点

本论文针对造成纤维素乙醇生产成本高的原因，即纤维素酶价格昂贵、纤维素乙醇收率低、预处理和精馏过程的能耗高，以及大量废水处理所导致的巨额环境成本，分别从预处理、脱毒、同步糖化与发酵和乙醇的回收及纤维素酶的循环等方面开展了卓有成效的研究，建立了一条节水、节能的资源节约型纤维素乙醇生产线，主要结论和创新点如下：

(1) 通过对两个非常重要但在以往预处理研究中忽视的重要参数（预处理反应器物料装填率和预浸固液比）进行调控，在保证预处理效率的前提下压缩固液比至1:1（总用水量不超过木质纤维素干固体质量，稀酸用量和蒸汽消耗分别不超过固体质量的0.5倍），预处理后木质纤维素原料含水量不超过50%(w/w)，新鲜水用量和蒸汽用量比目前典型的稀酸预处理技术指标分别降低80%和50%，预处理过程不产生废水，实现了预处理过程高温蒸汽的低用量和废水的极限低排放。

(2) 筛选到一株独特的煤油霉菌*Amorphotheca resinae* ZN1，可以以固态发酵的方式降解预处理过程中产生的各种抑制物。脱毒过程不使用耗水和耗能的操作，而且煤油霉菌*A. resinae* ZN1在后续的同时糖化与发酵过程中自然消亡，无需进行灭菌操作，预处理过程所获得的可发酵性原料不经固液分离即可直接进入同步糖化与发酵工序。

(3) 开发了一种新型螺带搅拌桨生物反应器，可以处理高达40%(w/w)固体含量的秸秆进行同步糖化与发酵操作，在较低纤维素酶用量的条件下(15 FPU/g DM)发酵获得高于8%(v/v)乙醇浓度的发酵液；极限高固体含量的同步糖化与发酵过程除加入液态的纤维素酶和发酵菌种外，不再有其它新鲜水耗；机械能消耗与常规生物反应器相比降低80-90%。

(4) 采用减压蒸馏的方法实现了40%(w/w)固体含量发酵醪中乙醇的有效分离和纤维素酶的高效回收，减压蒸馏分离出的乙醇浓度在23%(v/v)以上，大大降低了后续乙醇精馏过程的能耗；纤维素酶的有效回收又进一步降低了纤维素乙醇的生产成本。减压蒸馏为实现高固体含量下纤维素乙醇的连续性生产提供了技术支持。

### 6.2 展望

本论文建立了一条节水节能的资源节约型纤维素乙醇生产线，如果该节水节能策略能够在更大尺度上得以实现，并在工业示范装置上成功应用，则可为未来的纤维素乙醇产业化提供重要的工程科学基础依据。但是，在放大过程中应着重解决以下几方面的问题：

(1) 干式稀酸预处理过程中木质纤维素原料的可控制解聚与放大尺度下的传递强化

尽管干式稀酸预处理技术实现了实验室尺度的节能减排，但是在预处理过程中仍然

生成了相当多的抑制物，因此，建立节水节能预处理技术与抑制物生成弱化之间的定量关联，即在达到过程节能减排目标的同时，实现木质纤维素的可控制解聚，而非过度降解十分必要。此外，木质纤维素原料具有强烈、快速的吸水特性。在进行干式稀酸预处理时，特别是在较大的预处理反应器中，颗粒状的木质纤维素固体、稀酸液体、高温蒸汽三者之间的传热、传质和混合成为影响预处理效率的关键因素。考虑在预处理反应器的放大尺度上引入螺带式搅拌桨的混合方式，强化固、液、气三相之间的混合和传递，必将进一步降低该过程的水耗和能耗，提高木质纤维素原料的预处理效果。

#### (2) 生物脱毒的机制解析与放大尺度下抑制物的快速生物降解

采用煤油霉菌 *A. resiniae* ZN1 可以实现在实验室规模对含有大量抑制物的木质纤维素原料进行零能耗和零水耗的固态生物脱毒，但是生物脱毒的进程（4 天以上）与预处理相比较为缓慢，是生物脱毒技术在实际应用中的主要技术障碍。深入研究煤油霉菌代谢抑制物的路径，并通过代谢工程的手段对该菌进行针对性的改造，使其更有效、更快速的代谢抑制物，而不消耗可发酵性糖，如木糖等；此外，在生物脱毒技术放大过程中对 *A. resiniae* ZN1 生物脱毒速率的限制性因素进行解析和测试，如脱毒方式和生长特性等进行研究，确立生物脱毒反应器的设计和放大准则，使木质纤维素原料中的抑制物能够快速、高效降解是生物脱毒技术急需解决的问题。

#### (3) 超高固体含量下同步糖化与发酵体系的工程放大

实现高固体含量下秸秆的糖化与发酵生产高浓度的乙醇，是纤维素乙醇研究的一个重要方向。本论文开发的能够处理 40.0% (w/w) 固体含量秸秆进行同步糖化与发酵的生物反应器，成功实现了实验室规模生产含 8.0% (v/v) 乙醇浓度发酵醪的目标。但是，对螺带桨反应器和高粘度多相反应体系的放大，并没有现成的经验可以借鉴。因此，在不同尺度对螺带式搅拌生物反应器在超高固体含量下的行为进行过程效率的定量表征和强化，并建立设计螺带式搅拌生物反应器的放大准则，在逐级放大中进行实验验证是实现对该过程成功放大的基础。

#### (4) 超高固体含量下木质纤维素原料同步糖化发酵过程与乙醇分离的过程耦合

通过减压蒸馏的方法有望实现高固体含量下秸秆的同步糖化发酵与乙醇分离过程的耦合。但是减压蒸馏在浓缩乙醇的同时，也大大提高了体系的抑制物浓度，势必会影响纤维素酶和酵母在连续发酵过程中的活性。因此，研究间歇减压蒸馏的方式、物料的补加方式及发酵醪的出料方式对于实现高固体含量下纤维素乙醇的连续或半连续性生产具有积极意义。此外，对该过程在工程角度上进行能量衡算，也是表征该过程对于节能减排意义的一种有效方式。

如果能将上述木质纤维素生物转化工程科学问题解决，在大的过程尺度甚至在工业生产过程尺度下达到与实验室规模相同的节能减排指标，将为工业生产规模的纤维素乙醇成本的大幅降低乃至赢利性生产运行提供重要的工程科学依据。

## 参考文献

- [1] 中国科学院生物质资源战略研究组. 中国至 2050 年生物质资源科技发展路线图. 2009. 北京: 科学出版社
- [2] 史济春, 曹湘洪. 生物燃料与可持续发展. 2007. 北京: 中国石化出版社
- [3] Galbe M and Zacchi G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007, 108: 4851-4861
- [4] Herrera S. Bonkers about biofuels. *Nat Biotechnol.* 2006, 24: 755-760
- [5] 曲音波. 纤维乙醇产业化. *化学进展.* 2007, 19: 1098-1108
- [6] 陈洪章. 纤维素生物技术. 2005. 北京: 化学工业出版社
- [7] Service RF. Biofuel researchers prepare to reap a new harvest. *Science.* 2007, 315: 1488-1491
- [8] U.S. Department of Energy. Breaking the biological barriers to cellulosic ethanol: A joint research agenda. 2006
- [9] U.K. Department for Environment & Food and Rural Affairs. UK biomass strategy. 2007
- [10] Germany Federal Agriculture Ministry & Federal Environment Ministry. Roadmap Biofuels. 2007
- [11] 赵向东. 美国纤维素乙醇产业化发展概况. *全球科技经济瞭望.* 2009, 24: 34-38
- [12] 段黎萍. 纤维素乙醇的商业化现状及经济分析. *化工进展.* 2008, 27: 867-877
- [13] Schubert C. Can biofuels finally take center stage? *Nat Biotechnol.* 2006, 24: 777-784
- [14] 中国国家发展和改革委员会能源研究所. 中国生物质能技术路线图研究. 2010. 北京: 科学出版社
- [15] 钱伯章. 我国纤维素乙醇开发进展. *化工新型材料.* 2009, 37: 41-43
- [16] 张杰, 李岩, 许海朋, 张晓东, 孙立. 纤维素乙醇发展现状. *山东科学.* 2008, 21: 39-42
- [17] Lynd LR, Laser MS, Dale BE, Davison B, Hamilton R, Himmel M, Keller M, McMillan JD, Sheehan J and Wyman CE. How biotech can transform biofuels. *Nat Biotechnol.* 2008, 26: 169-172
- [18] Carpita N, Tierney M and Campbell M. Molecular biology of the plant cell wall: searching for the genes that define structure, architecture and dynamics. *Plant Mol Biol.* 2001, 47: 1-5
- [19] Jorgensen H, Kristensen JB and Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioprod Bior.* 2007, 1: 119-134
- [20] Kuhad RC, Singh A and Eriksson K-EL. Microorganisms and enzymes involved in the degradation of plant fiber cell walls. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 1997, 57: 45-125
- [21] Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW and Foust TD.

- Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*. 2007, 315: 804-807
- [22] Cosgrove DJ. Growth of the plant cell wall. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005, 6: 850-861
- [23] Liyama K, Lam TB-T and Stone BA. Covalent cross-links in the cell wall. *Plant Physiol*. 1994, 104: 315-320
- [24] Himmel ME, Ruth MF and Wyman CE. Cellulase for commodity products from cellulosic biomass. *Curr Opin Biotechnol*. 1999, 10: 358-364
- [25] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR and Lee YY. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol*. 2005, 96: 1959-1966
- [26] Yang B and Wyman CE. Pretreatment: the key to unlock low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod Bior*. 2008, 2: 26-40
- [27] Chang VS and Holtzapple MT. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity. *Appl Biochem Biotechnol*. 2000, 84-86: 5-37
- [28] Kim TH, Kim JS, Sunwoo C and Lee YY. Pretreatment of corn stover by aqueous ammonia. *Bioresour Technol*. 2003, 90: 39-47
- [29] Mosier N, Wyman CE, Dale BE, Elander R, Lee YY, Holtzapple M and Ladisch MR. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*. 2005, 96: 673-686
- [30] Pan X, Arato C, Gilkes N, Gregg D, Mabee W, Pye K, Xiao Z, Zhang X and Saddler J. Biorefining of softwoods using ethanol organosolv pulping: Preliminary evaluation of process streams for manufacture of fuel-grade ethanol and co-products. *Biotechnol Bioengin*. 2005, 90: 473-481
- [31] Duff SJB and Murray WD. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review. *Bioresour Technol*. 1996, 55: 1-33
- [32] Lloyd TA and Wyman CE. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresour Technol*. 2005, 96: 1967-1977
- [33] Montane D, Farriol X, Salvado J, Jollez P and Chornet E. Application of steam explosion to the fractionation and rapid vapor-phase alkaline pulping of wheat straw. *Biomass Bioenergy*. 1998, 14: 261-276
- [34] Galbe M and Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2002, 59: 618-628
- [35] Donaldson LA, Wong KKY and Mackie KL. Ultrastructure of steam-exploded wood. *Wood Sci Technol*. 1988, 22: 103-114
- [36] Kabel MA, Bos G, Zeevalking J, Voragen AGJ and Schols HA. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresour Technol*. 2007, 98: 2034-2042
- [37] Li J, Henriksson G and Gellerstedt G. Lignin depolymerization/repolymerization and its critical role for delignification of aspen wood by steam explosion. *Bioresour Technol*. 2007, 98: 3061-3068

- [38] Porter SE, Donohoe BS, Berry KE, Xu Q, Ding S-Y, Vinzant TB, Abbas CA and Himmel ME. Microscopic analysis of corn fiber using starch- and cellulose-specific molecular probes. *Biotechnol Bioengin.* 2007, 98: 123-131
- [39] Ballesteros I, Negro MJ, Oliva JM, Cabanas A, Manzanares P and Ballesteros M. Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw. *Appl Biochem Biotechnol.* 2006, 130: 496-508
- [40] Sassner P, Galbe M and Zacchi G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated salix at high dry-matter content. *Enzyme Microb Technol.* 2006, 39: 756-762
- [41] Verga E, Reczey K and Zacchi G. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Appl Biochem Biotechnol.* 2004, 114: 509-523
- [42] Clark TA, Mackie KL, Dare PH and McDonald AG. Steam explosion of the softwood *Pinus Radiata* with sulphur dioxide addition. II. Process characterisation. *J Wood Chem Technol.* 1989, 9: 135-166
- [43] Stenberg K, Tengborg C, Galbe M and Zacchi G. Optimisation of steam pretreatment of SO<sub>2</sub>-impregnated mixed softwoods for ethanol production. *J Chem Technol Biotechnol.* 1998, 71: 299-308
- [44] Tengborg C, Stenberg K, Galbe M, Zacchi G, Larsson S, Palmqvist E and Hahn-Hagerdal B. Comparison of SO<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> impregnation of softwood prior to steam pretreatment on ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol.* 1998, 70-72: 3-15
- [45] Martin C, Gonzalez Y, Fernandez T and Thomsen AB. Investigation of cellulose convertibility and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. *J Chem Technol Biotechnol.* 2006, 81: 1699-1677
- [46] Palonen H, Thomsen AB, Tenkanen M, Schmidt AS and Viikari L. Evaluation of wet oxidation pretreatment for enzymatic hydrolysis of softwood. *Appl Biochem Biotechnol.* 2004, 117: 1-17
- [47] Schmidt AS and Thomsen AB. Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. *Bioresour Technol.* 1998, 64: 139-151
- [48] Verga E, Klinke HB, Reczey K and Thomsen AB. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. *Biotechnol Bioengin.* 2004, 88: 567-574
- [49] Klinke HB, Ahring BK, Schmidt AS and Thomsen AB. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresour Technol.* 2002, 82: 15-26
- [50] Alizadeh H, Teymouri F, Gilbert TI and Dale BE. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Appl Biochem Biotechnol.* 2005, 124: 1133-1141
- [51] Chundawat SP, Venkatesh B and Dale BE. Effect of particle size based separation of milled corn stover on AFEX pretreated and enzymatic digestibility. *Biotechnol Bioengin.* 2007, 96: 219-231
- [52] Gollapalli LE, Dale BE and Rivers DM. Predicting digestibility of ammonia fiber

- explosion (AFEX)-treated rice straw. *Appl Biochem Biotechnol.* 2002, 98-100: 23-35
- [53] Teymouri F, Laureano-Perez L, Alizadeh H and Dale BE. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour Technol.* 2005, 96: 2014-2018
- [54] Pan X, Gilkes N, Kadla J, Pye K, Saka S, Gregg D, Ehara K, Xie D, Lam D and Saddler JN. Bioconversion of hybrid poplar to ethanol and co-products using an organosolv fractionation process: Optimization of process yields. *Biotechnol Bioengin.* 2006, 94: 851-861
- [55] Holtzapfle MT and Humphrey AE. The effects of organosolv pretreatment on the enzymatic hydrolysis of poplar. *Biotechnol Bioengin.* 1984, 26: 670-676
- [56] Kurabi A, Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Bura R, Robinson J, Markov A, Skomarovsky A, Gusakov A and Okunev O. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas-Fir by novel and commercial fungal cellulases. *Appl Biochem Biotechnol.* 2005, 121: 219-230
- [57] Palmqvist E and Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol.* 2000, 74: 25-33
- [58] Ulbricht RJ, Northup SJ and Thomas JA. A review of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundam Appl Toxicol.* 1984, 4: 843-853
- [59] Jing X, Zhang X and Bao J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol.* 2009, 159: 696-707
- [60] Mussatto SI and Roberto IC. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: a review. *Bioresour Technol.* 2004, 93: 1-10
- [61] Talebnia F and Taherzadeh MJ. In situ detoxification and continuous cultivation of dilute-acid hydrolyzate to ethanol by encapsulated *S. cerevisiae*. *J Biotechnol.* 2006, 125: 377-384
- [62] Almeida JR, Modig T, Petersson A, Hahn-Hagerdal B, Liden G and Gorwa-Grauslund MF. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol.* 2007, 82: 340-349
- [63] Converti A, Dominguez JM, Erego P, Silva SSD and Zilli M. Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production. *Chem Eng Technol.* 2000, 23: 1013-1020
- [64] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant N-O and Jonsson LJ. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Appl Biochem Biotechnol.* 1999, 77: 91-103
- [65] Parajo JC, Dominguez H and Dominguez JM. Improved xylitol production with *Debaryomyces hansenii* Y-7426 from raw or detoxified wood hydrolysates. *Enzyme Microb Technol.* 1997, 21: 18-24
- [66] Rodrigues RCLB, Felipe MGA, Silva JBAE, Vitolo M and Gomez PV. The influence of pH, temperature and hydrolyzate concentration on the removal of volatile and

- nonvolatile compounds from sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate treated with activated charcoal before or after vacuum evaporation. *Barz J Chem Eng.* 2001, 18: 299-311
- [67] Silva CJSM and Roberto IEC. Statistical screening method for selection of important variables on xylitol biosynthesis from rice straw hydrolysate by *Candida guilliermondii* FTI 20037. *Bioresour Technol.* 1999, 13: 743-747
- [68] Lee WG, Lee JS, Shin CS, Park SC, Chang HN and Chang YK. Ethanol production using concentrated oak wood hydrolysates and methods to detoxify. *Appl Biochem Biotechnol.* 1999, 78: 547-559
- [69] Mussatto SE and Roberto IEC. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnol L.* 2001, 23: 1681-1684
- [70] Wilson JJ, Deschatelets L and Nishikawa NK. Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1989, 31: 592-596
- [71] Zautsen RRM, Maugeri-Filho F, Vaz-Rossell CE, Straathof AJJ, Wielen LAMvd and Bont JAMd. Liquid-liquid extraction of fermentation inhibiting compounds in lignocellulose hydrolysate. *Biotechnol Bioengin.* 2009, 102: 1354-1360
- [72] Cantarella M, Cantarella L, Gallifuoco A, Spera A and Alfani F. Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF. *Process Biochem.* 2004, 39: 1533-1542
- [73] Martinez A, Rodriguez M, York SW, Preston JF and Ingram LO. Effects of Ca(OH)<sub>2</sub> treatments ("Overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnol Bioengin.* 2000, 69: 526-536
- [74] Hodge DB, Andersson C, Berglund KA and Rova U. Detoxification requirements for bioconversion of softwood dilute acid hydrolyzates to succinic acid. *Enzyme Microb Technol.* 2009, 44: 309-316
- [75] Jonsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO and Hahn-Hagerdal B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 1998, 49: 691-697
- [76] Koopman F, Wierckx N, Winde JHd and Ruijssenaars HJ. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl) furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010, 107: 4919-4924
- [77] Nichols NN, Dien BS and Cotta MA. Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors. *Bioresour Technol.* 2010, 101: 7545-7550
- [78] Nichols NN, Dien BS, Guisado GM and Lopez MJ. Bioabatement to remove inhibitors from biomass-derived sugar hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol.* 2005, 121-124: 379-390
- [79] Nichols NN, Sharma LN, Mowery RA, Chambliss CK, Walsum GPv, Dien BS and Iten LB. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme Microb Technol.* 2008, 42: 624-630

- [80] Wierckx N, Koopman F, Bandounas L, Winde JHd and Ruijsenaars HJ. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microb Biotechnol.* 2010, 3: 336-343
- [81] Lau MW, Dale BE and Balan V. Ethanolic fermentation of hydrolysates from ammonia fiber expansion (AFEX) treated corn stover and distillers grain without detoxification and external nutrient supplementation. *Biotechnol Bioengin.* 2008, 99: 530-539
- [82] Liu ZL. Genomic adaptation of ethanologenic yeast to biomass conversion inhibitors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006, 73: 27-36
- [83] Liu ZL, Slininger PJ and Gorsich SW. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanologenic yeast strains. *Appl Biochem Biotechnol.* 2005, 121-124: 451-460
- [84] Galbe M, Sassner P, Wingren A and Zacchi G. Process engineering economics of bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007, 108: 303-327
- [85] Jorgensen H, Vibe-Pedersen J, Larsen J and Felby C. Liquifaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnol Bioengin.* 2007, 96: 862-870
- [86] Decker CH, Visser J and Schreier P.  $\beta$ -glucosidases from five black *Aspergillus* species: study of their physico-chemical and biocatalytic properties. *J Agric Food Chem.* 2000, 48: 4929-4936
- [87] Holtzapple M, Cognata M, Shu Y and Hendrickson C. Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents. *Biotechnol Bioengin.* 1990, 36: 275-287
- [88] Tolan JS and Foody B. Cellulase from submerged fermentation. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 1999, 65: 41-67
- [89] Xiao ZZ, Zhang X, Gregg DJ and Saddler JN. Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Appl Biochem Biotechnol.* 2004, 113-116: 1115-1126
- [90] Yun S, Jeong C, Chung D and Choi H. Purification and some properties of a beta-glucosidase from *Trichoderma harzianum* type C-4. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2001, 65: 2028-2032
- [91] Krishna SH and Chowdary GV. Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from lignocellulosic biomass. *J Agric Food Chem.* 2000, 48: 1971-1976
- [92] Olofsson K, Bertilsson M and Liden G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels.* 2008, 1: 7
- [93] Rudolf A, Alkasrawi M, Zacchi G and Liden G. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce. *Enzyme Microb Technol.* 2005, 37: 195-204
- [94] Fan Z, South C, Lyford K, Munsie J, Walsum Pv and Lynd LR. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2003, 26: 93-101
- [95] Wingren A, Galbe M and Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol

- from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol Prog.* 2003, 19: 1109-1117
- [96] Fan Z and Lynd LR. Conversion of paper sludge to ethanol. I: Impact of feeding frequency and mixing energy characterization. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2007, 30: 27-34
- [97] Mohagheghi A, Tucher M, Grohmann K and Wyman C. High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol.* 1992, 33: 67-81
- [98] Tolan JS. Iogen's process for producing ethanol from cellulosic biomass. *Clean Techn Environ Policy.* 2002, 3: 339-345
- [99] Klinke HB, Thomsen AB and Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pretreatment of biomass. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004, 66: 10-26
- [100] Palmqvist E, Grage H, Meinander NQ and Hahn-Hagerdal B. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p-hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnol Bioeng.* 1999, 63: 46-55
- [101] Hoyer K, Galbe M and Zacchi G. Effects of enzyme feeding strategy on ethanol yield in fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce at high dry matter. *Biotechnol Biofuels.* 2010, 3: 14
- [102] Lu Y, Wang Y, Xu G, Chu J, Zhuang Y and Zhang S. Influence of high solid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Appl Biochem Biotechnol.* 2009, 160: 360-369
- [103] Olofsson K, Palmqvist B and Liden G. Improving simultaneous saccharification and co-fermentation of pretreated wheat straw using both enzyme and substrate feeding. *Biotechnol Biofuels.* 2010, 3: 17
- [104] Olofsson K, Rudolf A and Liden G. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol.* 2008, 134: 112-120
- [105] Olofsson K, Wiman M and Liden G. Controlled feeding of cellulases improves conversion of xylose in simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production. *J Biotechnol.* 2010, 145: 168-175
- [106] Bari ID, Viola E, Barisano D, Cardinale M, Nanna F, Zimbardi F, Cardinale G and Braccio G. Ethanol production at flask and pilot scale from concentrated slurries of steam-exploded aspen. *Ind Eng Chem Res.* 2002, 41: 1745-1753
- [107] Roche CM, Dibble CJ, Knutsen JS, Stickel JJ and Liberatore MW. Particle concentration and yield stress of biomass slurries during enzymatic hydrolysis at high-solids loadings. *Biotechnol Bioengin.* 2009, 104: 290-300
- [108] Larsen J, Petersen MO, Thirup I, Li HW and Iversen FK. The IBUS process-lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality. *Chem Eng Technol.* 2008, 31: 765-772
- [109] Olsson L (曲音波译). *Biofuels.* 2009. 北京: 化学工业出版社

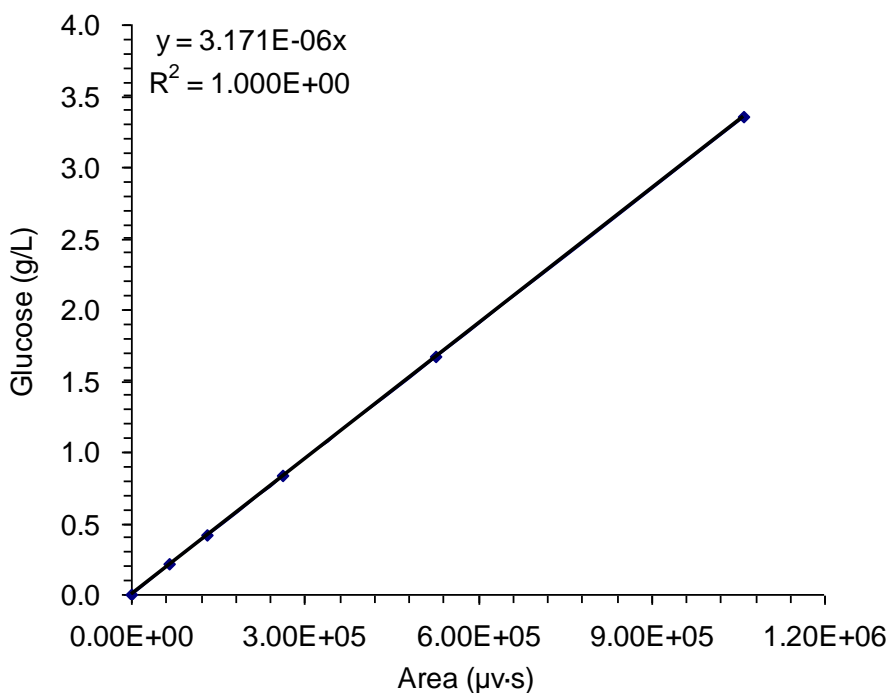
- [110] Tu M, Zhang X, Paice M, MacFarlane P and Saddler JN. The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of a mixed softwood feedstock. *Bioresour Technol.* 2009, 100: 6407-6415
- [111] Gregg DJ and Saddler JN. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnol Bioengin.* 1996, 51: 375-383
- [112] Qi B, Chen X, Su Y and Wan Y. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Bioresour Technol.* 2011, 102: 2881-2889
- [113] Tu M, Chandra RP and Saddler JN. Recycling cellulases during the hydrolysis of steam exploded and ethanol pretreated lodgepole pine. *Biotechnol Prog.* 2007, 23: 1130-1137
- [114] Jackson LS, Joyce TW, Heitmann JA and Giesbrecht FG. Enzyme activity recovery from secondary fiber treated with cellulase and xylanase. *J Biotechnol.* 1996, 45: 33-44
- [115] Hu G, Jr JAH, Rojas OJ, Pawlak JJ and Argyropoulos DS. Monitoring cellulase protein adsorption and recovery using SDS-PAGE. *Ind Eng Chem Res.* 2010, 49: 8333-8338
- [116] Kumar R and Wyman CE. An improved method to directly estimate cellulase adsorption on biomass solids. *Enzyme Microb Technol.* 2008, 42: 426-433
- [117] Palonen H, Tjerneld F, Zacchi G and Tenkanen M. Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin. *J Biotechnol.* 2004, 107: 65-72
- [118] Tu M, Pan X and Saddler JN. Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignin from lodgepole pine. *J Agric Food Chem.* 2009, 57: 7771-7778
- [119] Ding W-W, Wu Y-T, Tang X-Y, Yuan L and Xiao Z-Y. Continuous ethanol fermentation in a closed-circulating system using an immobilized cell coupled with PDMS membrane pervaporation. *J Chem Technol Biotechnol.* 2011, 86: 82-87
- [120] Sanchez OJ and Cardona CA. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol.* 2008, 99: 5270-5295
- [121] Gerbens-Leenes PW, Hoekstra AY and Meer Tvd. The water footprint of energy from biomass: A quantitative assessment and consequent of an increasing share of bio-energy in energy supply. *Ecol Econ.* 2009, 68: 1052-1060
- [122] Zhu JY and Pan XJ. Woody biomass pretreatment for cellulosic ethanol production: Technology and energy consumption evaluation. *Bioresour Technol.* 2010, 101: 4992-5002
- [123] Wooley R, Ruth M, Sheehan J, Ibsen K, Majdeski H and Galvez A. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis current and futuristic scenarios. 1999. National Renewable Energy Laboratory
- [124] Torget R, Werdene P, Himmel M and Grohmann K. Dilute acid pretreatment of short rotation woody and herbaceous crops. *Appl Biochem Biotechnol.* 1990, 24/25: 115-126

- [125] Torget R, Walter P, Himmel M and Grohmann K. Dilute-acid pretreatment of corn residues and short-rotation woody crops. *Appl Biochem Biotechnol.* 1991, 28/29: 75-86
- [126] Torget R, Himmel M and Grohmann K. Dilute-acid pretreatment of two short-rotation herbaceous crops. *Appl Biochem Biotechnol.* 1992, 34/35: 115-123
- [127] Saha BC, Iten LB, Cotta MA and Wu YV. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochem.* 2005, 40: 3693-3700
- [128] Aden A, Ruth M, Lbsen K, Jechura J, Neeves K, Sheehan J, Wallace B, Montague L, Slayton A and Lukas J. Lignocellulosic biomass to ethanol process design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. 2002. National Renewable Energy Laboratory
- [129] Cara G, Ruiz E, Oliva JM, Saez F and Castro E. Conversion of olive tree biomass into fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresour Technol.* 2008, 99: 1869-1876
- [130] Ewanick SM, Bura R and Saddler JN. Acid-catalyzed steam pretreatment of lodgepole pine and subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation to ethanol. *Biotechnol Bioengin.* 2007, 98: 737-746
- [131] Ferreira S, Gil N, Queiroz JA, Duarte AP and Domingues FC. Bioethanol from the Portuguese forest residue *Pterospartum tridentatum*-An evaluation of pretreatment strategy for enzymatic saccharification and sugars fermentation. *Bioresour Technol.* 2010, 101: 7797-7803
- [132] Guo GL, Chen W-H, Chen W-H, Men L-C and Hwang W-S. Characterization of dilute acid pretreatment of silvergrass for ethanol production. *Bioresour Technol.* 2008, 99: 6046-6053
- [133] Kreuger E, Sipos B, Zacchi G, Svensson S-E and Björnsson L. Bioconversion of industrial hemp to ethanol and methane: The benefits of steam pretreatment and co-production. *Bioresour Technol.* 2011, 102: 3457-3465
- [134] Linde M, Jakobsson E-L, Galbe M and Zacchi G. Steam pretreatment of dilute H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-impregnated wheat straw and SSF with low yeast and enzyme loadings for bioethanol production. *Biomass Bioenergy.* 2008, 32: 326-332
- [135] Sipos B, Kreuger E, Svensson S-E, Reczey K, Björnsson L and Zacchi G. Steam pretreatment of dry and ensiled industrial hemp for ethanol production. *Biomass Bioenergy.* 2010, 34: 1721-1731
- [136] Zhang J, Chu D, Huang J, Yu Z, Dai G and Bao J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnol Bioengin.* 2010, 105: 718-728
- [137] Zhang J, Zhu Z, Wang X, Wang N, Wang W and Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnol Biofuels.* 2010, 3:26

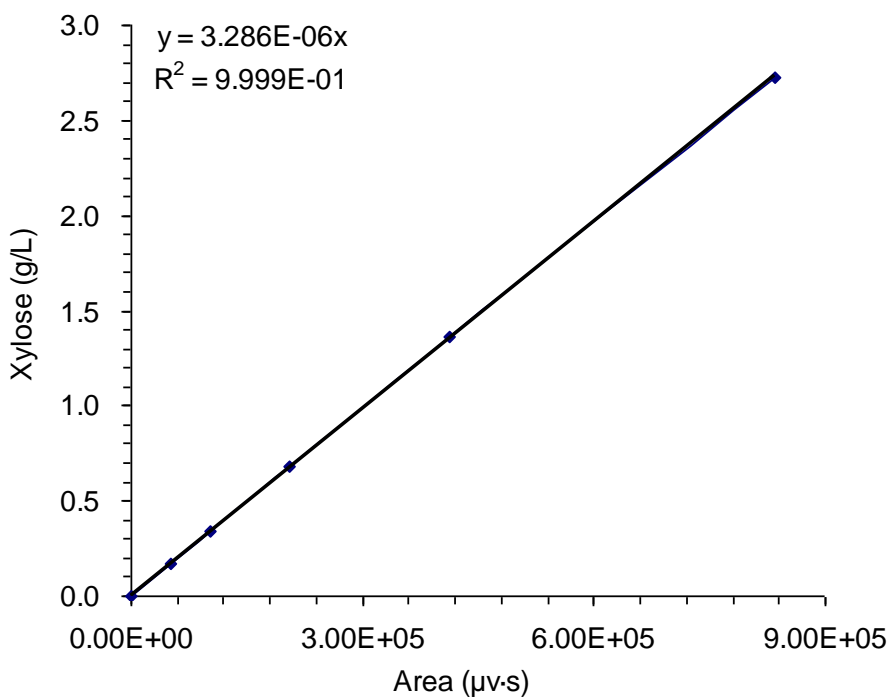
- [138] 张建, 楚德强, 于占春, 张小希, 邓红波, 王修胜, 朱智楠, 张怀庆, 戴干策, 鲍杰. 低水用量约束下的高固体含量纤维乙醇生物加工技术策略. 生物工程学报. 2010, 26: 950-959
- [139] Zhang J, Wang X, Chu D, He Y and Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresour Technol.* 2011, 102: 4480-4488
- [140] Brown L and Torget R. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. 1996. National Renewable Energy Laboratory
- [141] Adney B and Baker J. Measurement of cellulase activities. 1996. National Renewable Energy Laboratory
- [142] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem.* 1987, 59: 257-268
- [143] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D and Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. 2008. National Renewable Energy Laboratory
- [144] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J and Templeton D. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. 2008. National Renewable Energy Laboratory
- [145] Hinman ND, Schell DJ, Riley CJ, Bergeron PW and Walter PJ. Preliminary estimate of the cost of ethanol production for SSF technology. *Appl Biochem Biotechnol.* 1992, 34/35: 639-649
- [146] Palmqvist E and Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresour Technol.* 2000, 74: 17-24
- [147] Dong H and Bao J. Biofuel via biodetoxification. *Nat Chem Biol.* 2010, 6: 316-318
- [148] Lopez MJ, Nichols NN, Dien BS, Moreno J and Bothast RJ. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004, 64: 125-131
- [149] Yu J and Stahl H. Microbial utilization and biopolyester synthesis of bagasse hydrolysates. *Bioresour Technol.* 2008, 99: 8042-8048
- [150] Li BZ and Yuan YJ. Transcriptome shifts in response to furfural and acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010, 86: 1915-1924
- [151] Sheridan JE, Tan YL and Nelson J. Studies on the 'kerosene fungus' *Cladosporium resinae* (Lindau) de Vries-Part III. Morphology, taxonomy and physiology. 1972, 19: 130-165
- [152] Zalessky KM. Die pflanzenassoziationen der pinen. *Bulletin International de L'Academie Polonaise des Science et des letters, serie B* 1927, 445
- [153] Stolk AC and Scott DB. Studies on the genus *Eupenicillium* Ludwig. I. Taxonomy and nomenclature of Penicillia in relation to their sclerotoid ascocarpic states. *Persoonia.* 1967, 4: 391-405
- [154] Bayrock D and Ingledew WM. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *J Ind*

- Microbiol Biotechnol. 2001, 27: 87-93
- [155] Bari ID, Viola E, Barisano D, Cardinale M, Nanna F, Zimbardi F, Cardinale G and Braccio G. Ethanol production at flask and pilot scale from concentrated slurries of steam-explosion aspen. *Ind Eng Chem Res.* 2002, 41: 1745-1753
- [156] Metzner AB and Otto RE. Agitation of non-Newtonian fluids. *AIChE J.* 1957, 3: 3-10
- [157] Tanguy PA, Thibault F, Fuente EB-DL, Espinsa-Solares T and Tecante A. Mixing performance induced by coaxial flat blade-helical ribbon impellers rotating at different speeds. *Chem Eng Sci.* 1997, 52: 1733-1741
- [158] Sassner P, Galbe M and Zacchi G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from the different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy.* 2008, 32: 422-430
- [159] Cardona CA and Sanchez OJ. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresour Tehcnol.* 2007, 98: 2415-2457
- [160] Cysewski GR and Wilke CR. Rapid ethanol fermentation using vacuum and cell recycle. *Biotechnol Bioengin.* 1977, 19: 3020-3026
- [161] Choudhury JP, Ghosh P and Guha BK. Ethanol separation from molasses based fermentation broth by reverse osmosis. *Biotechnol Lett.* 1986, 8: 731-734
- [162] Vane LM. Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuels Bioprod Bioref.* 2008, 2: 553-588
- [163] Roychoudhury PK, Ghose TK and Ghosh P. Operational strategies in vacuum-coupled SSF for conversion of lignocellulose to ethanol. *Enzyme Microb Technol.* 1992, 14: 581-585
- [164] Borole AP. Improving energy efficiency and enabling water recycling in biorefineries using bioelectrochemical systems. *Biofuels Bioprod Bioref.* 2011, 5: 28-36
- [165] Hashi M, Tezel FH and Thibault J. Ethanol recovery from fermentation broth via carbon dioxide stripping and adsorption. *Energy Fuels.* 2010, 24: 4628-4637
- [166] Hashi M, Thibault J and Tezel FH. Recovery of ethanol from carbon dioxide stripped vapor mixture: Adsorption prediction and modeling. *Ind Eng Chem Res.* 2010, 49: 8733-8740
- [167] Taylor M and Wankat PC. Increasing the energy efficiency of extractive distillation. *Sep Sci Technol.* 2004, 39: 1-17
- [168] Galve M and Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002, 59: 618-628
- [169] Qing Q, Yang B and Wyman C. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresour Technol.* 2010, 100: 6406-6415
- [170] Brethauer S and Wyman CE. Review: Continuous hydrolysis and fermentation for cellulosic ethanol production. *Bioresour Technol.* 2010, 101: 4862-4874
- [171] Ghose TK, Roychoudhury PK and Ghosh P. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosics to ethanol under vacuum cecling and step feeding. *Biotechnol Bioengin.* 1984, 26: 377-381
- [172] 胡英, 吕瑞东, 刘国杰, 黑恩成. 物理化学. 2007. 北京: 高等教育出版社

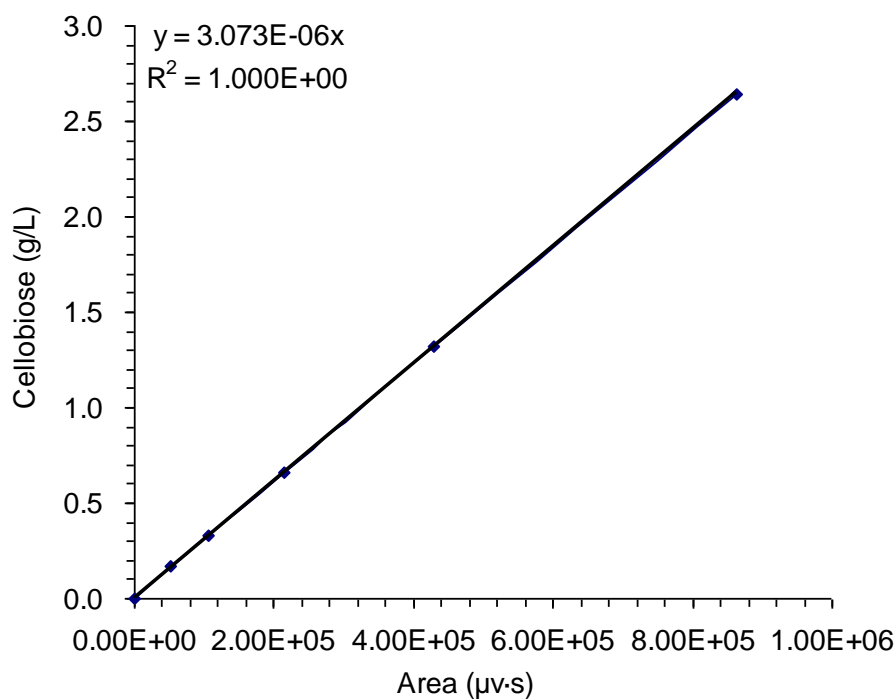
附 图



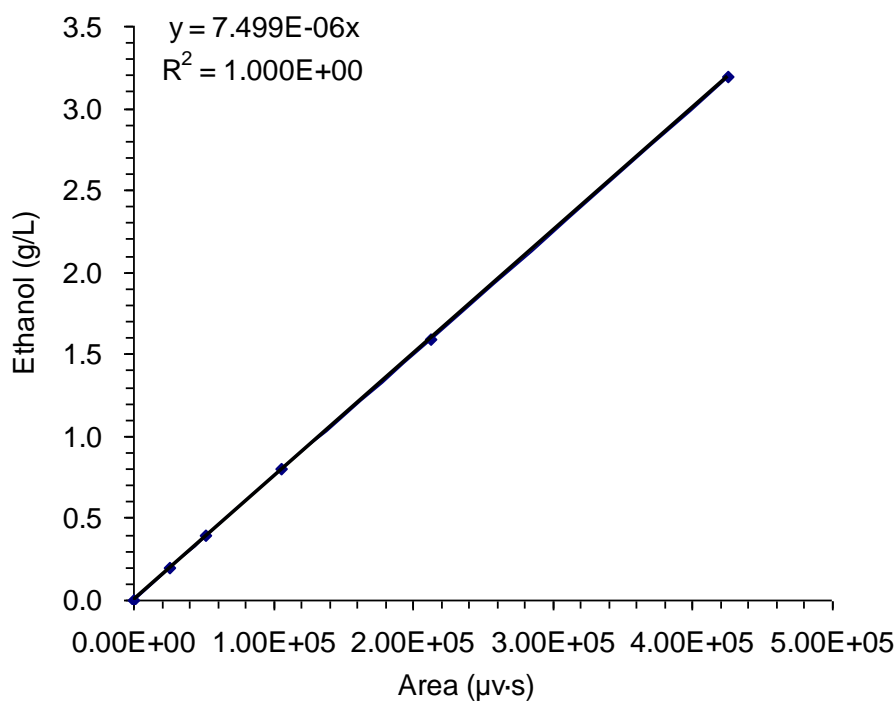
附图 1-1 葡萄糖高效液相色谱标准曲线  
Appendix Fig. 1-1 HPLC standard curve of glucose



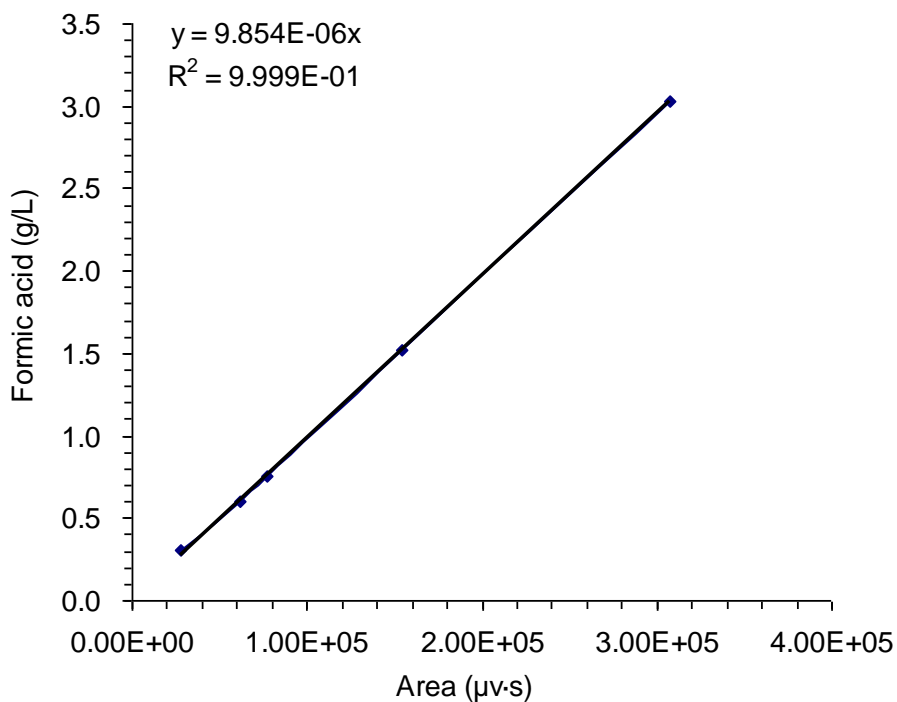
附图 1-2 木糖高效液相色谱标准曲线  
Appendix Fig. 1-2 HPLC standard curve of xylose



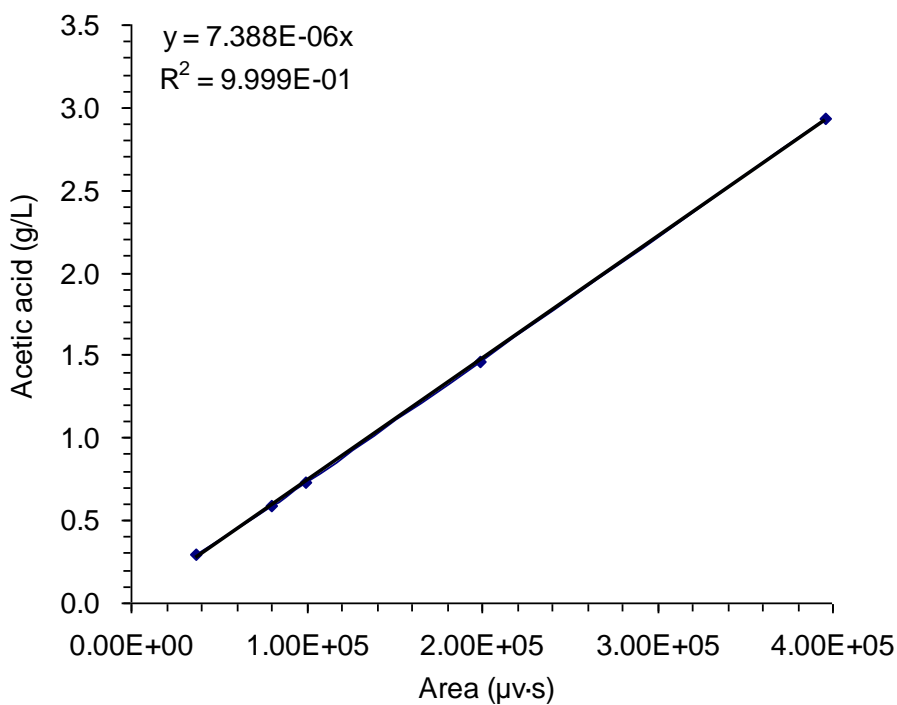
附图 1-3 纤维二糖高效液相色谱标准曲线  
Appendix Fig. 1-3 HPLC standard curve of cellobiose



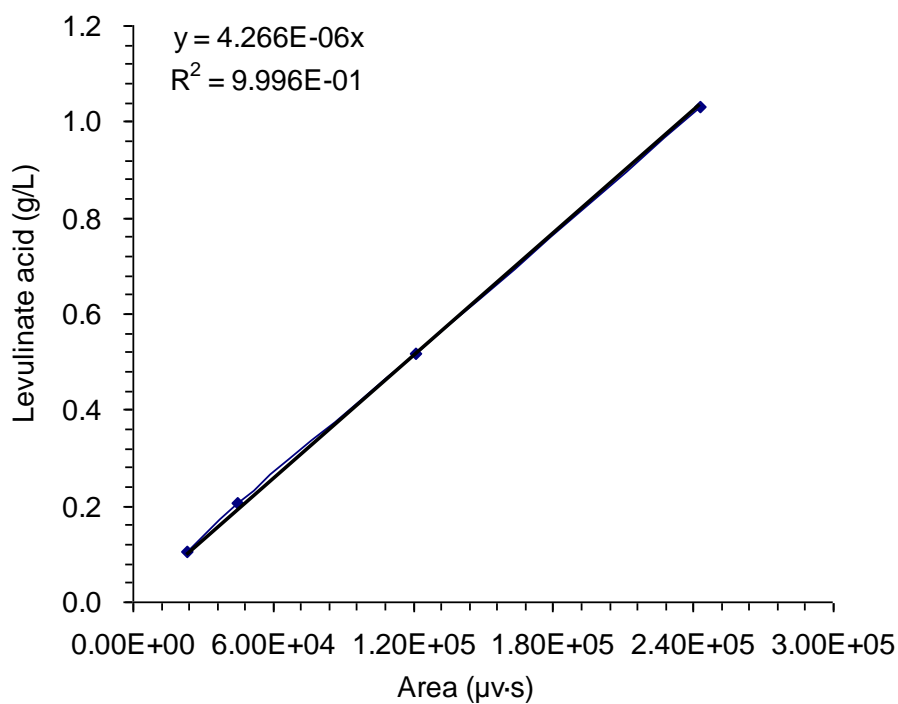
附图 1-4 乙醇高效液相色谱标准曲线  
Appendix Fig. 1-4 HPLC standard curve of ethanol



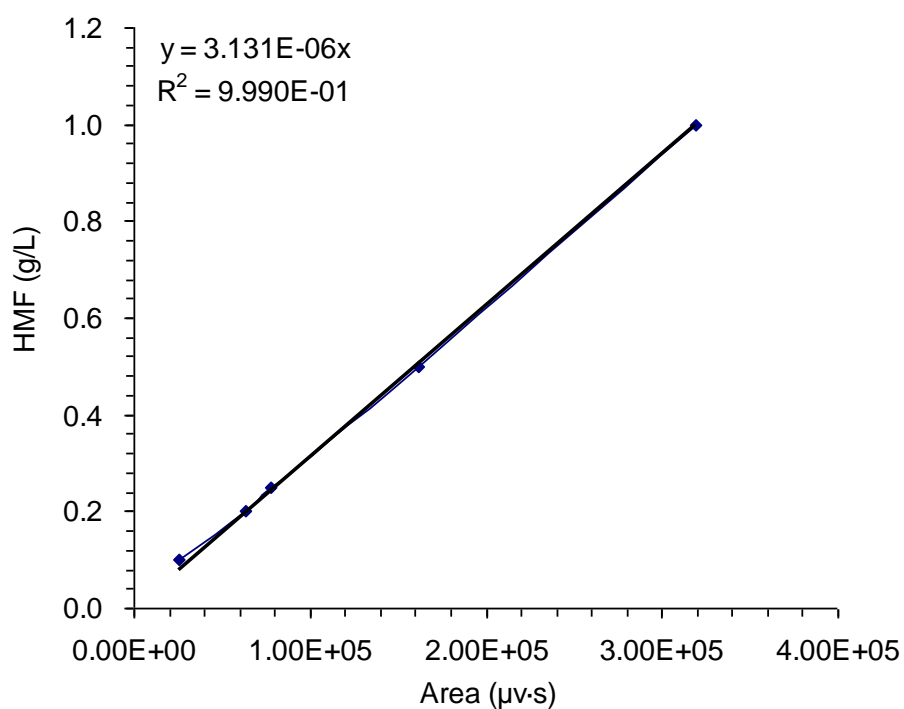
附图 1-5 甲酸高效液相色谱标准曲线  
Appendix Fig. 1-5 HPLC standard curve of formic acid



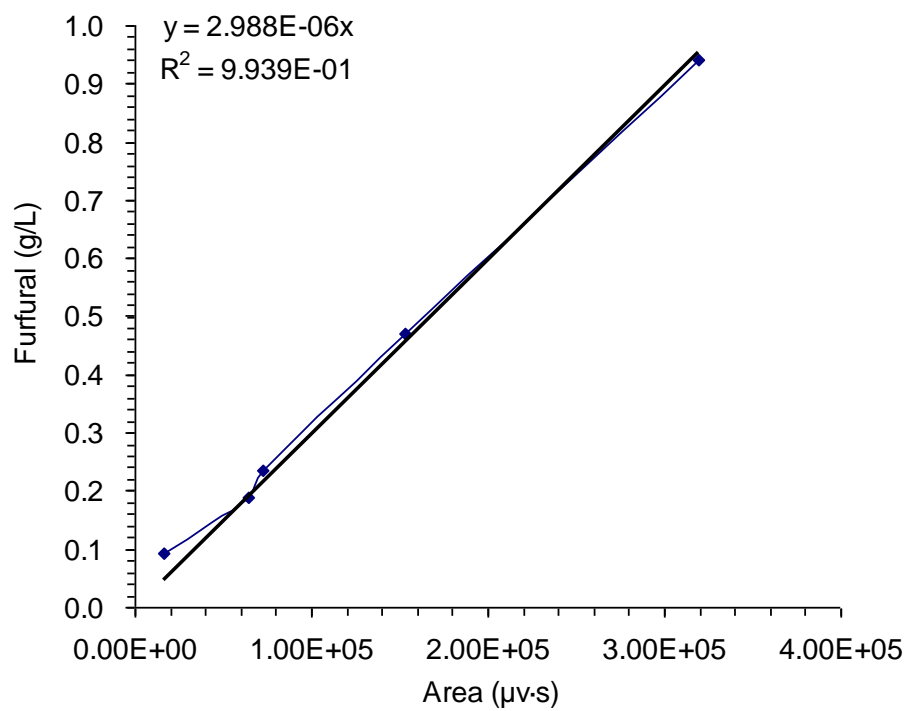
附图 1-6 乙酸高效液相色谱标准曲线  
Appendix Fig. 1-6 HPLC standard curve of acetic acid



附图 1-7 乙酰丙酸高效液相色谱标准曲线  
Appendix Fig. 1-7 HPLC standard curve of levulinic acid



附图 1-8 5-羟甲基糠醛高效液相色谱标准曲线  
Appendix Fig. 1-8 HPLC standard curve of HMF



附图 1-9 糠醛高效液相色谱标准曲线  
Appendix Fig. 1-9 HPLC standard curve of furfural

## 博士期间研究成果

### 已发表的研究论文:

1. **Jian Zhang**, Xiusheng Wang, Deqiang Chu, Yanqing He, Jie Bao. 2011. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology* 102:4480-4488. (SCI, IF 4.253, 本博士论文第2章内容)
2. **Jian Zhang**, Zhinan Zhu, Xiaofeng Wang, Nan Wang, Wei Wang, Jie Bao. 2010. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus *Amorphotheca resinae* ZN1 and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels* 3:26. (SCI, IF 4.120, 本博士论文第3章内容)
3. **Jian Zhang**, Deqiang Chu, Juan Huang, Zhanchun Yu, Gance Dai, Jie Bao. 2010. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 105:718-728. (SCI, IF 3.377, 本博士论文第4章内容)
4. Dexi Bi, Deqiang Chu, Pei Zhu, Chenyang Lu, Chao Fan, **Jian Zhang**, Jie Bao. 2011. Utilization of dry distiller's grain and soluble as nutrient supplement in the simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high solids loading of corn stover. *Biotechnology Letter* 33:273-276. (SCI, IF 1.636)
5. 张建, 楚德强, 于占春, 张小希, 邓红波, 王修胜, 朱智楠, 张怀庆, 戴干策, 鲍杰. 2010. 低水用量约束下的高固体含量纤维乙醇生物加工技术策略. *生物工程学报* 26:950-959. (中文核心期刊, 本博士论文第2、3、4章内容)

### 投稿中的研究论文:

6. **Jian Zhang**, Jianfei Shen, Yanqing He, Deqiang Chu, Jie Bao. 2011. Improving the inhibitor tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* by pH shift in simultaneous saccharification and ethanol fermentation of corn stover. Submitted to *Applied Biochemistry and Biotechnology*. (本博士论文第4章部分内容)
7. **Jian Zhang**, Yanqing He, Lei Jin, Shu Fang, Jie Bao. 2011. Semi-continuous operation of *in-situ* ethanol separation and ethanol fermentation of corn stover via intermittent vacuum distillation. To be submitted to *Biotechnology and Bioengineering*. In preparation. (本博士论文第5章内容)
8. **Jian Zhang**, Yanqing He, Lei Jin, Jie Bao. 2011. Extremely high titer ethanol production from dilute-acid pretreated corn stover by substrate/enzyme feeding and fermentation strategy control. To be submitted to *Biotechnology and Bioengineering*. In preparation. (本博士论文第4章部分内容)
9. **Jian Zhang**, Deqiang Chu, Yanqing He, Xiusheng Wang, Zhinan Zhu, Huaiqing Zhang, Jie Bao. Integrated dry processing of lignocellulose for production of ethanol with

significant energy and water reduction. To be submitted to *Biotechnology Advances*. In preparation. (本博士学位论文第2、3、4、5章内容)

#### 申请专利:

1. 鲍杰, 张建, 戴干策, 张家庭, 楚德强, 黄娟: 新型高固体含量木质纤维素原料发酵生产乙醇反应器。公开日: 2010.11.17。公开号: CN101886038A。
2. 鲍杰, 张建, 楚德强, 毕德玺, 朱培, 芦晨阳, 范超: 一种改进的木质纤维素原料的预处理方法。公开日: 2010.09.15。公开号: CN101824436A。
3. 鲍杰, 张建, 王修胜, 楚德强, 张怀庆: 一种极限低水用量的木质纤维素原料高温稀酸预处理方法。申请日: 2010.09.21。申请号: 20101028651.7。
4. 鲍杰, 朱智楠, 张建: 一种对预处理后木质纤维素生物质进行生物脱毒的方法。申请日: 2010.3.18。申请号: 201010128362。
5. 鲍杰, 楚德强, 张建: 一种酿酒酵母菌株及其发酵秸秆生产乙醇的方法。公开日: 2009.05.20。公开号: CN101434913A。
6. 鲍杰, 楚德强, 张建, 毕德玺, 朱培, 芦晨阳, 范超: 一种以固体秸秆为碳源发酵种子液的方法。公开日: 2010.09.15。公开号: CN101824395A。
7. 鲍杰, 楚德强, 张建, 毕德玺, 朱培, 芦晨阳, 范超: 一种以 DDGS 作为营养物用于纤维乙醇发酵的方法。公开日: 2010.11.27。公开号: CN101886092A。

#### 学术会议论文:

1. **Jian Zhang**, Zhinan Zhu, Xiaofeng Wang, Nan Wang, Wei Wang, Jie Bao. 2011. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation through biodetoxification on lignocellulose inhibitors using *Amorphotheca resinae* ZN1. **Asian Congress on Biotechnology 2011**. Shanghai, China. (Poster)
2. 张建, 楚德强, 黄娟, 于占春, 戴干策, 鲍杰. 2010. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. 华东理工大学第14届研究生论文年会. (获得一等奖)
3. **Jian Zhang**, Deqiang Chu, Juan Huang, Zhanchun Yu, Gance Dai, Jie Bao. 2009. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. **The 15<sup>th</sup> Symposium of Yong Asian Biochemical Engineer's Community (YABEC 2009)**. Xiamen, China. (Poster)
4. **Jian Zhang**, Deqiang Chu, Juan Huang, Zhanchun Yu, Gance Dai, Jie Bao. 2009. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of corn stover at high solids loading. **The 3<sup>rd</sup> Myongji-ECUST International Conference**. Shanghai, China. (Oral presentation)
5. 张建, 楚德强, 于占春, 张小希, 邓红波, 王修胜, 朱智楠, 张怀庆, 戴干策, 鲍杰. 2010. 低水用量约束下的高固体含量纤维乙醇生物加工技术策略. 第三届长三角生物技术研究生学术论坛, 上海. (口头报告/海报, 获得优秀论文奖)

## 致 谢

本博士论文是在导师鲍杰教授的悉心指导下完成的，整篇论文从选题、可行性论证、实验设计、方案实施到论文的撰写无不凝聚着导师的心血。四年求学期间，鲍老师渊博的学识、严谨的治学态度、忘我的工作作风和对学术孜孜不倦的追求精神时刻激励着我前行，并使我受益终生。此外，鲍老师在生活上也给予了我极大的关心与帮助！藉此论文完成之际，谨向我的导师鲍杰教授致以最衷心的感谢和最崇高的敬意！

其次，生物质能源实验室的辛秀娟副教授、胡凤仙副教授和段梅莉副教授和生物工程学院的王伟教授以及化工学院的戴干策教授、张家庭高级工程师在学习和生活上也给予了很大的帮助，在此一并表示感谢！还要感谢我的室友牛红星博士，在学习与生活上的帮助和启示。

在生物质能源实验室有幸认识了博士董宏伟、楚德强、罗紫臣、陶泰河、葛娟和硕士荆新云、任佳、陈曦、刘长俊、黄潇、刘建明、张怀庆、赵凯、国立浩、刘威、王玉梅、王晓凤、王远、安克红、崔振阳、方镇宏、李昆、涂毅、张瑶、孟佼等诸多天南海北的朋友，感谢大家在学习和生活中所给的许多帮助，祝愿大家前程似锦！

特别感谢硕士生王修胜、朱智楠、邢恒维、李传航、包艳文和博士何燕青、宗原、李光、黄娟及本科生沈佳飞、金磊、方树等同学，在实验中所给予的极大帮助！

最后，感谢我的爱人雷鸣女士和我的父母及家人，你们的关心、理解与支持，是我能够完成学业的巨大动力，你们的恩情我终生难忘！

张建

2011年3月