

学校代码: 10251
学 号 010110157

華東理工大學

博 士 学 位 论 文

| | |
|------|-----------------------------|
| 论文题目 | 生物炼制过程中木质纤维素解聚 与菌株抗逆性的研究 |
| 学科专业 | 生物化工 |
| 研究方向 | 生物能源 |
| 论文作者 | 顾翰琦 |
| 指导教师 | 鲍杰 教授 |

定稿日期: 2014 年 06 月 03 日

分类号: Q81 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

生物炼制过程中木质纤维素解聚 与菌株抗逆性的研究

顾翰琦

指导教师姓名: 鲍杰 教授

华东理工大学

申请学位级别: 博士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2015.06.03 论文答辩日期: 2015.06.02

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: 2015.06

答辩委员会主席: 钟建江 教授

评 阅 人: 曲音波 教授

孙润仓 教授

杨 晟 研究员

姜 岷 教授

李 春 教授

华东理工大学研究生学位论文提交要求

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

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

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

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

学位论文作者签名：

年 月 日

指导教师签名：

年 月 日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作 者 声 明

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

论文作者签名：

年 月 日

生物炼制过程中木质纤维素解聚与菌株抗逆性的研究

摘要

生物炼制技术的核心工艺是打开坚固的木质纤维素超分子结构,通过酶解的方式获得可发酵单糖,最终实现生物燃料和生物基化学品的发酵生产。本文对生物炼制过程中的木质纤维素拆分、糖化和抑制物耐受性关键问题进行了深入的挖掘和探索,提出了针对性的解决方案。首先尝试了一种新型木质纤维素拆分技术,用于秸秆纤维素和半纤维素的有效分离和利用;同时,对酶解过程中预处理秸秆底物粒径的一般性变化规律进行了深入探究。其次,发现工业玉米芯残渣存在大量水溶性较低的酚类抑制物,提出新的驯化策略显著改善了酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 对酚类抑制物的耐受性;同时,发现了运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* ZM4 对酚类抑制物具有高抗性,并对其耐受机理进行了初探。

本文第一部分,针对玉米芯生产木糖传统工艺中存在的原料种类限制和木糖得率低的问题,提出两步稀酸水解处理工艺对麦秆原料进行拆分。首先通过干式稀酸预处理破坏麦秆木质纤维素结构,并使半纤维素转化为可溶性木糖单糖和寡糖。木糖总回收率可达 95.7%,纤维素酶解得率为 79.1%,并且抑制物含量较低。然后通过稀酸“后水解”将预处理秸秆中木聚糖和寡糖全部转化为单糖。木糖得率为 71.2%,浓度 54.3 g/L。最后通过同步糖化发酵将原料中纤维素转化为乙醇,最终实现纤维素和半纤维素的拆分和综合利用,获得 33.1 g/L 乙醇和 41.5 g/L 木糖单糖。

第二部分在酶解预处理秸秆过程中发现平均粒径先快速降低然后基本保持在 20-30 μm 不变的现象。通过木质纤维素组分与结构形态分析,发现粒径迅速下降可能是由于颗粒外层纤维素含量较高的薄壁组织快速酶解所致;而随后粒径基本保持不变主要受微管纤维结构和预处理强度两方面因素共同影响所致。首先,预处理秸秆酶解过程中出现大量直径为 10-20 μm 且木质素含量高的微管纤维保持结构形态不变是导致颗粒平均粒径基本不变的主要原因。其次,酶解过程中预处理强度高的秸秆粒径趋向于更小的尺寸并保持不变。通过偏光显微镜观察发现高强度预处理使微管纤维上产生更多结构松散、易于酶解的“位错”区域,因此说明预处理强度对粒径所趋向的尺寸起决定作用。

第三部分利用木糖生产工业中产生的玉米芯残渣(CCR)为原料进行同步糖化和乙醇发酵(SSF),发现其含有大量水溶性较低的酚类物质(16.8 mg/g 干物料),主要包括 2-糠酸、愈创木酚、对羟基苯甲酸、对香豆酸和阿魏酸。这些酚类物质对酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 的发酵性能具有明显抑制作用,而且利用常规脱毒方法难以去除。本文提出了一种在玉米芯残渣水解液中进行梯度培养 *S. cerevisiae* DQ1 的短期驯化策略,有效缩短了发酵延滞期,提高了乙醇发酵性能。在 5 L 及 50 L 发酵工艺放大中,无需对玉米芯残渣进行任何处理,驯化后的 *S. cerevisiae* DQ1 发酵乙醇浓度均能超过 7.9%(v/v)。

第四部分,发现通常认为抗逆性较弱的乙醇发酵菌株 *Z. mobilis* 在利用富含酚类化合物的玉米芯残渣原料进行高固含量发酵时,其细胞生长和乙醇发酵性能均优于高抗逆

性的 *S. cerevisiae* DQ1。通过考察 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 对预处理原料中常见的 12 种酚类化合物的耐受性,发现 *Z. mobilis* ZM4 对酚酸类化合物,特别是玉米芯残渣中存在的酚酸具有很强的耐受性。生物降解、细胞形态变化和细胞膜渗透性等方面进一步探究表明, *Z. mobilis* ZM4 能够将酚醛化合物降解为毒性较低的酚醇化合物,而且其外膜的脂多糖层对酚酸化合物具有疏水性屏障作用。

本论文通过上述研究,实现了秸秆木质纤维素的有效拆分和综合利用,阐明了酶解过程中预处理秸秆底物粒径变化的一般性规律。另外,通过驯化策略改善菌种抗逆性或发掘固有抗性菌株能够有效的利用富含酚类抑制物的木质纤维素原料。这些结果将为木质纤维素原料生物炼制技术的深入研究以及产业化发展提供基础理论支持。

关键词: 木质纤维素拆分; 微管纤维; 驯化策略; 酚类抑制物耐受性; 运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* ZM4

Study on lignocellulose depolymerization and microbial inhibitor-tolerance in biorefinery processes

Abstract

The core steps of lignocellulose biorefinery processing are composed by breakdown of rigid lignocellulose supermolecular structure, enzymatic hydrolysis of cellulose and xylan to the fermentable monosaccharide, and fermentative production of biofuels and bio-based chemicals. In this thesis, several key issues in lignocellulose fractionation, saccharification and microbial tolerance to inhibitors were investigated and solutions to the problems were provided. First, a novel lignocellulose fractionation method was developed for efficient separation and utilization of cellulose and hemicellulose from wheat straw. An interesting phenomenon of particle size change during enzymatic hydrolysis of typical pretreated lignocellulose material was observed and the mechanism was investigated based on the fiber structure and pretreatment severity analysis. Then, plenty of phenolic compounds with low water solubility in the industrial corncob residue were found and strongly inhibited the fermenting microbes. An evolutionary adaptation method was developed for improving the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 to phenolic compounds. Finally, high tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* ZM4 to phenolic inhibitors was found and investigated.

In the first part of the thesis, a two-step dilute acid treatment method was developed for fractionating cellulose and hemicellulose of wheat straw and subsequently converting to ethanol and xylose, respectively. The effect of dry dilute acid pretreatment on xylose yield and inhibitors content were investigated. The total xylose recovery of 95.7% and the glucose yield from enzymatic hydrolysis of 79.1% were obtained with low inhibitors concentration. The whole slurry of pretreated wheat straw was post-hydrolyzed for converting the xylan and xylooligomers into xylose monomers. The high xylose monomers of 54.3 g/L, corresponding yield of 71.2% was achieved in the post-hydrolysis. Finally, the cellulose in the pretreated wheat straw was converted to ethanol by the simultaneous saccharification and fermentation, a high xylose concentration of 41.5 g/L and ethanol titer of 33.1 g/L was recovered.

In the second part, an interesting phenomenon of particle size change during enzymatic hydrolysis of typical pretreated lignocellulose was observed. The composition and morphology of lignocellulose particle were investigated during the enzymatic hydrolysis. The sharp size reduction during initial 1-3 h probably was caused by the hydrolysis of cellulose enriched parenchyma tissue. Then the particle size maintained at 20-30 μm approximately due

to the combined effects of micro-tubular fiber existence and severe pretreatment. The large amount of micro-tubular fibers with equivalent diameter of 10-20 μ m and its high lignin content played an important role on keeping particle at constant size during the enzymatic hydrolysis. Moreover, pretreatment severity decided the particle size distribution of micro-tubular fibers by producing easily hydrolyzed “dislocation” regions in long fibers.

In the third part, industrial waste corncob residues (CCR) were used as biomass for ethanol fermentation due to its high cellulose content and hydrolysis without pretreatment. However, the high level of water-insoluble phenolic compounds such as 2-furoic acid, ferulic acid, *p*-coumaric acid, guaiacol, and *p*-hydroxybenzoic acid were detected in CCR and inhibited the growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* DQ1. An evolutionary adaptation strategy was developed by culturing the *S. cerevisiae* DQ1 strain in a series of media with the gradual increase of CCR hydrolysate for shortening lag phase and improving ethanol fermentability. In both of 5 L and scale-up to 50 L bioreactors, more than 7.9% (v/v) of ethanol concentration was achieved by the fermentation of CCR using the adapted *S. cerevisiae* DQ1.

In the fourth part, *Z. mobilis* ZM4 was found to behave a better cell growth and ethanol fermentability than *S. cerevisiae* DQ1 when the phenolics enriched CCR was used as feedstock at high solids content. Then, 12 typical phenolic compounds produced from lignocellulose pretreatment were selected and used for testing the tolerance of *Z. mobilis* and *S. cerevisiae*. The results revealed that *Z. mobilis* did behave high tolerance to the phenolic acids, which was abundant in CCR. The tolerance mechanism was investigated by examining the responses of *Z. mobilis* on biodegradation, cell morphology and the cell membrane permeability to the phenolic compounds. The results reveal that *Z. mobilis* ZM4 has the capability for in situ detoxification of phenolic aldehydes, and the lipopolysaccharide aggregation on the cell outer membrane of *Z. mobilis* ZM4 provided the permeable barrier to the attack of phenolic acids.

Conclusively, the fractionation and comprehensive utilization of wheat straw lignocellulose were achieved, and the reason of particle size change during the enzymatic hydrolysis of pretreated stover was revealed. In addition, the evolutionary adaptation strategy and the inherently tolerant strain could be applied for the biorefinery process of the phenolic compound enriched lignocellulosic material. These results could provide a basic theoretical support for the further study and industrial development of lignocellulose biorefinery process.

Key words: lignocellulose fractionation, micro-tubular fiber, evolutionary adaptation strategy, tolerance to phenolic compound, *Zymomonas mobilis* ZM4

目录

| | |
|-------------------------------------|----|
| 第 1 章 文献综述..... | 1 |
| 1.1 木质纤维素原料资源与性质..... | 1 |
| 1.1.1 木质纤维素原料资源..... | 1 |
| 1.1.2 木质纤维素化学组成..... | 2 |
| 1.1.3 植物细胞壁结构多尺度分析..... | 4 |
| 1.1.4 木质纤维素结构性质..... | 6 |
| 1.2 木质纤维素预处理及组分拆分工艺..... | 6 |
| 1.2.1 传统预处理方法..... | 6 |
| 1.2.2 木质纤维素组分拆分工艺..... | 7 |
| 1.3 木质纤维素来源抑制物对微生物影响及应对策略..... | 9 |
| 1.3.1 抑制物形成及作用机理..... | 9 |
| 1.3.2 应对木质纤维素来源抑制物的策略..... | 12 |
| 1.4 微生物对抑制物的耐受性..... | 15 |
| 1.4.1 微生物对抑制物降解..... | 15 |
| 1.4.2 微生物对抑制物的外排..... | 16 |
| 1.4.3 细胞膜渗透性屏障..... | 16 |
| 1.5 论文主要研究内容..... | 16 |
| 第 2 章 两步干式稀酸处理拆分小麦秸秆木质纤维素组分..... | 18 |
| 2.1 引言..... | 18 |
| 2.2 材料与方法..... | 19 |
| 2.2.1 实验材料..... | 19 |
| 2.2.2 仪器设备..... | 19 |
| 2.2.3 实验方法..... | 20 |
| 2.2.4 分析方法..... | 22 |
| 2.3 结果与讨论..... | 25 |
| 2.3.1 确定拆分工艺中干式稀酸预处理条件..... | 25 |
| 2.3.2 稀酸“后水解”转化木糖寡糖和聚糖为单糖..... | 28 |
| 2.3.3 小麦秸秆拆分策略..... | 31 |
| 2.4 小结..... | 32 |
| 第 3 章 预处理后木质纤维素原料酶解过程中粒径分布变化规律..... | 34 |
| 3.1 引言..... | 34 |
| 3.2 材料与方法..... | 35 |
| 3.2.1 实验材料..... | 35 |
| 3.2.2 仪器设备..... | 35 |
| 3.2.3 实验方法..... | 35 |
| 3.2.4 分析方法..... | 36 |
| 3.3 结果与讨论..... | 36 |
| 3.3.1 秸秆木质纤维素原料酶解过程中粒径变化..... | 37 |
| 3.3.2 预处理原料中木质素组分对酶解过程粒径变化的影响..... | 40 |

| | |
|---|-----|
| 3.3.3 影响酶解过程微管状纤维尺寸的原因..... | 42 |
| 3.4 小结..... | 44 |
| 第 4 章 提高酿酒酵母酚类抑制物耐受性的驯化策略..... | 45 |
| 4.1 引言..... | 45 |
| 4.2 材料与方法..... | 45 |
| 4.2.1 实验材料..... | 45 |
| 4.2.2 仪器设备..... | 46 |
| 4.2.3 实验方法..... | 46 |
| 4.2.4 分析方法..... | 48 |
| 4.3 结果与讨论..... | 48 |
| 4.3.1 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 利用玉米芯残渣的发酵性能..... | 48 |
| 4.3.2 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 对玉米芯残渣中抑制物的耐受性..... | 50 |
| 4.3.3 驯化策略提高 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 对玉米芯残渣的发酵性能..... | 52 |
| 4.3.4 驯化的 <i>S. cerevisiae</i> DQ1 利用玉米芯残渣进行同步糖化与乙醇发酵..... | 53 |
| 4.4 小结..... | 57 |
| 第 5 章 <i>Zymomonas mobilis</i> 对玉米芯残渣酚类抑制物抗性机理研究... .. | 58 |
| 5.1 引言..... | 58 |
| 5.2 材料与方法..... | 58 |
| 5.2.1 实验材料..... | 58 |
| 5.2.2 仪器设备..... | 59 |
| 5.2.3 实验方法..... | 59 |
| 5.2.4 分析方法..... | 60 |
| 5.3 结果与讨论..... | 61 |
| 5.3.1 <i>Z. mobilis</i> 和 <i>S. cerevisiae</i> 发酵富含酚类化合物的玉米芯残渣生产乙醇..... | 61 |
| 5.3.2 <i>Z. mobilis</i> 和 <i>S. cerevisiae</i> 对酚类抑制物的耐受性..... | 65 |
| 5.3.3 <i>Z. mobilis</i> 和 <i>S. cerevisiae</i> 对酚类抑制物的生物降解作用..... | 68 |
| 5.3.4 细胞结构形态对菌体酚酸耐受性的影响..... | 72 |
| 5.4 小结..... | 74 |
| 第 6 章 结论与展望..... | 76 |
| 6.1 结论与创新点..... | 76 |
| 6.1.1 结论..... | 76 |
| 6.1.2 创新点..... | 77 |
| 6.2 展望..... | 77 |
| 参考文献..... | 79 |
| 附录 I 主要试剂..... | 91 |
| 附录 II 仪器设备..... | 92 |
| 附录 III 酚类化合物质谱图..... | 93 |
| 博士期间研究成果..... | 98 |
| 致谢..... | 100 |

第 1 章 文献综述

生物质是指有机生命体衍生得到的生物材料,具体指植物以及植物相关的木质纤维素生物质,其作为世界上最为丰富的可再生资源已受到广泛关注^[1]。生物炼制是指通过综合的生物质转化加工工艺将生物质资源转化为燃料、能源和化学品的过程。其主要包括对生物质的预处理、酶解糖化、对木质纤维素来源抑制物脱毒和微生物发酵等关键步骤。而目前在生物炼制过程中所面临的问题主要有木质纤维素原料预处理过程成本过高、纤维素酶解糖化效率较低以及木质纤维素经过预处理后产生的抑制物对发酵微生物的抑制作用。下面分别从木质纤维素原料的结构性质、预处理与拆分方法、木质纤维素来源抑制物形成与作用机理、以及对抑制物应对措施等几个方面进行综述,对木质纤维素生物炼制技术各工序在产业化应用进程中遇到的主要问题进行深入分析。

1.1 木质纤维素原料资源与性质

世界上绝大部分的植物细胞壁都是由木质纤维素构成。木质纤维素生物质是一种由纤维素、半纤维素和木质素组成的具有生物顽抗性的复合物,因其主要成分能够被转化为微生物可利用的糖类物质,而被视为一种潜在的可持续性资源。可以利用的木质纤维素生物质主要包括农业作物废弃物和林业废弃物等^[2]。本节将从木质纤维素原料的资源、化学组成及性质、物理结构特性等方面概述木质纤维素原料的特性。

1.1.1 木质纤维素原料资源

全球存在多种形式的生物质资源,其中最为丰富的、分布最为广泛的生物质资源主要是木材残渣和农业废弃物。其中,林业废弃物生物质主要包括软木和硬木材料加工过程产生的锯末和树皮残渣;农业废弃物则主要包括各种农作物秸秆、玉米芯、柳枝稷和苜蓿草等。全球的木质纤维素资源的产量可达 200×10^9 吨/年^[2],主要的农业废弃物木质纤维素资源分布如表 1.1 所示。另外,根据全球谷物和种子产量进行分析,玉米是产量最高的粮食作物,年产 8.2 亿吨,同时会产生相同质量的玉米芯及秸秆可作为原料用于生物炼制^[3]。根据总得作物耕种面积和产量比较得出世界范围内最主要的四种农业作物分别为玉米、小麦、水稻和甘蔗,因此主要的农业废弃物生物质主要来自于这些作物。在美国每年产生大量的木质纤维素生物质,其中有 30% 来自林业生物质^[4]。2014 年,美国农业木质纤维素生物质可达 1.2 亿吨,主要来自玉米秸秆、玉米芯,小麦、黑麦和大麦秸秆等,预计能够生产 50 亿加仑生物乙醇^[5]。巴西和印尼是甘蔗的主要产地,巴西的甘蔗产量占世界产量的 35%,甘蔗渣木质纤维素生物质产量接近 40 吨/公顷。我国作为农业大国,木质纤维素生物质资源十分丰富,据统计 2007 年产生的农作物废弃物可达 7.5 亿吨,主要分布在河北、河南、山东和黑龙江等农业大省。对于这些农业废弃物通常主要作为农田的肥料、造纸的原料、畜牧饲料利用或者作为燃料焚烧,仍有 50% 以上可以作为生物质资源用于生物炼制。根据第六次全国林业调查,我国拥有 174.9 百

万公顷的林业资源，森林覆盖率可达 18.2%。而在木材的采伐和加工过程中会产生大量的林业废弃物，估计这部分林业废弃物总量可达 24.5 亿吨/年，主要分布在我国西南部和东北地区^[6]。

表 1.1 世界农业废弃物木质纤维素资源分布^[7] (单位: 百万吨)

Table 1.1 Distribution of agricultural waste lignocellulosic resource in the world

| 木质纤维素 | 非洲 | 亚洲 | 欧洲 | 北美州 | 中美州 | 大洋洲 | 南美洲 |
|-------|------|-------|-------|-------|------|-----|------|
| 玉米秸秆 | 0 | 33.9 | 28.6 | 133.7 | 0 | 0.2 | 7.2 |
| 大麦秸秆 | 0 | 2.0 | 44.2 | 9.9 | 0.2 | 1.9 | 0.3 |
| 水稻秸秆 | 20.9 | 667.6 | 3.9 | 10.9 | 2.8 | 1.7 | 23.5 |
| 小麦秸秆 | 5.3 | 145.2 | 132.6 | 50.1 | 2.8 | 8.6 | 9.8 |
| 高粱秸秆 | 0 | 0 | 0.4 | 7.0 | 1.2 | 0.3 | 1.5 |
| 燕麦秸秆 | 0 | 0.3 | 6.8 | 2.8 | 0 | 0.5 | 0.2 |
| 甘蔗渣 | 11.7 | 74.9 | 0 | 4.6 | 19.2 | 6.5 | 63.8 |

1.1.2 木质纤维素化学组成

植物细胞壁主要由木质纤维素构成，其中纤维素(20-50%干重)、半纤维素(15-35%)和木质素(10-30%)是木质纤维素的主要组成成分，如图 1.1a 所示。木质纤维素生物质资源主要包括农业废弃物和林业废弃物，但是不同种类生物质原料的木质纤维素成分存在很大差异。典型的生物质原料及其主要化学成分如表 1.2 所示。一般，在木本生物质中纤维素和木质素比较丰富，而草本生物质中半纤维素含量相对较高。对于生物质的组成成分，纤维素、半纤维素和木质素是生物炼制过程的主要生产加工目标^[8]。

1.1.2.1 纤维素

纤维素是一种由 β -1,4 糖苷长链通过吡喃糖环堆叠产生的分子间和分子内氢键或范德华作用力连接形成的致密的大分子复合物。纤维素聚合度的变化取决于其来源，一般聚合度分布在 100-10000 之间^[9]。天然纤维素能够较快的被降解到长度接近 150 nm，但是超过这个范围则需要化学方法和酶处理实现进一步水解^[10]。目前已知的纤维素晶体形态已有七种： I_{α} 、 I_{β} 、II、 III_I 、 III_{II} 、 IV_I 、 IV_{II} (图 1.1b)。 I_{α} 型纤维素主要存在于微藻和细菌的纤维素。在高等植物中广泛存在的纤维素晶体形态为 I_{β} 型纤维素，这种类型的纤维素具有双链单斜晶胞结构^[11]。通过其他热化学处理能够将其转化为其他晶体形态，例如通过 NaOH 处理能得到 II 型纤维素，通过胺或氨处理能得到 III_I 型纤维素，甘油处理能够获得 IV 型纤维素。具有这些晶体形态的葡聚糖在糖化速率方面存在显著的差异，但是，对于不同晶体形态纤维素水解速率的差异在分子水平上的解释仍处于空白。

1.1.2.2 半纤维素

半纤维素是一类能够被强碱溶液溶解的非均相聚糖。这类聚糖的分子量一般在 70-200 之间，由多种短链基团取代的多糖构成 (图 1.1a)。它是由 β -1,4 木聚糖苷键连接而成，同时包含着戊糖、己糖和/或糖醛酸，其中还可能存在非常少量的 α -L-鼠李糖和

α -L-岩藻糖。另外，糖基团上羟基能够被乙酰基团部分取代。半纤维素与纤维素不同，它的组成多样性受到细胞组织和植物种类的影响，这种差异主要表现在糖苷键、侧链组成和聚合度等方面。由于植物种类不同，硬木生物质的半纤维素中存在 15-30% 的 O-乙酰基-4-O-甲基葡萄糖醛酸木聚糖成分，而软木生物质的半纤维素中主要含有 10-25% 的 O-乙酰基半乳甘露糖成分。在禾本科如谷物秸秆中，主要的半纤维素是阿拉伯木聚糖，其中木聚糖含量与硬木生物质原料的半纤维素中含量相同，只是阿拉伯糖含量较高一些。

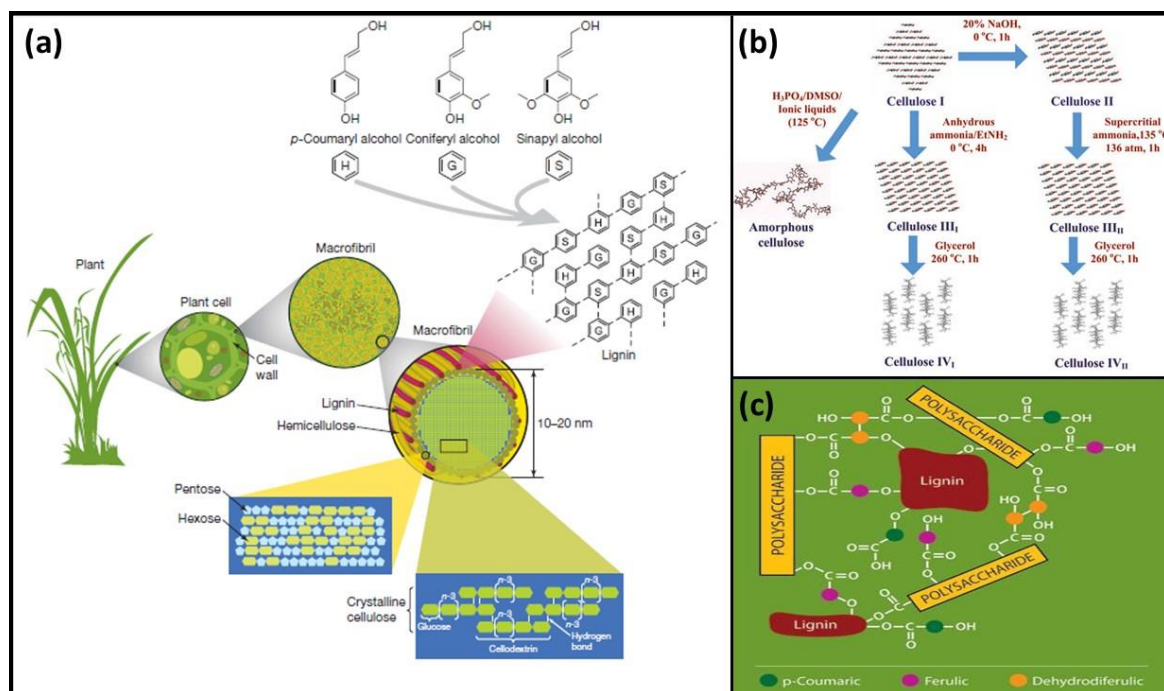


图 1.1 植物细胞壁木质纤维素组分示意图^[12-14]

(a)木质纤维素组分；(b)纤维素晶体形态；(c)木质素-半纤维素聚合物

Fig.1.1 Structure and composition of plant cell wall

(a) composition of lignocellulose; (b) cellulose crystalline; (c)lignin-hemicellulose polymer

1.1.2.3 木质素

木质素是自然界中芳香基团含量最丰富的物质，是由对羟基苯基(H)、愈创木基(G)和紫丁香基(S)三种苯丙烷衍生单元构成的复合物^[15]，其中三种衍生基团的含量随着植物种类和组织类型不同发生变化(图 1.1a)。目前有一种假设认为木质素结构是由细胞壁中氧化酶作用于苯氧自由基使其自由聚合而形成的，这种聚合物主要以 β -O-4 芳香基醚键相连^[16]。硬木植物的木质素中含有较多的 G 和 S 型木质素单元和非常少量的 H 单元，而软木植物的木质素则主要以 G 单元化合物组成。由于裸子植物木质素中缺乏 S 单元，结果导致木质素结构中产生大量的枝杈结构。而被子植物具有典型的富含 G/S 的木质素结构，其中基团之间通过 β -O-芳香基醚键与细胞壁多糖耦合连接，其中主要是阿魏酸化的木聚糖和木质素耦合结构(图 1.1c)^[14, 17]。传统生物炼制过程中，提取出的木质素主要用于燃烧产生热能。而目前对于木质素利用的相关研究趋向于将其进一步

转化为高附加值的产品，其中包括低成本碳纤维、工程塑料、热塑合成橡胶和聚合物膜材料等^[15]。

表 1.2 木质纤维素资源种类及组成^{[18, 19] [20]}

Table 1.2 Resource and composition of lignocellulose

| 木质纤维素生物质 | | 纤维素 | 半纤维素 | 木质素 |
|----------|------|-----------|-----------|-----------|
| 农业废弃物 | 玉米秸秆 | 35.1-39.5 | 20.7-24.6 | 11.0-19.1 |
| | 玉米芯 | 32.3-45.6 | 39.8 | 6.7-13.9 |
| | 小麦秸秆 | 35-39 | 22-30 | 12-16 |
| | 大麦秸秆 | 36-44 | 24-33 | 6.3-9.8 |
| | 水稻秸秆 | 29.2-34.7 | 23-25.9 | 17-19 |
| | 甘蔗渣 | 25-45 | 28-32 | 15-25 |
| | 柳枝稷 | 35-40 | 25-30 | 15-25 |
| 林业废弃物 | 软木树干 | 40-45 | 25-29 | 30-60 |
| | 硬木树干 | 40-55 | 24-40 | 18-25 |
| | 松树 | 42-49 | 13-25 | 23-29 |
| | 杨树 | 45-51 | 25-28 | 10-21 |
| | 花旗松 | 35-48 | 20-22 | 15-21 |

1.1.3 植物细胞壁结构多尺度分析

植物细胞壁的顽抗性是跨越几个数量级的多尺度现象，涉及宏观和微观屏障。宏观尺度下的影响因素主要指植物组织结构和组分的非均相性及其对传质的限制；微观尺度下的因素主要包括木质素-碳水化合物之间的耦合连接和纤维素的晶体结构^[21]。下面以玉米秸秆为模型，由秸秆的宏观组织结构到木质纤维素的超微结构对玉米秸秆木质纤维素进行从不同尺度分析，如图 1.2 所示。

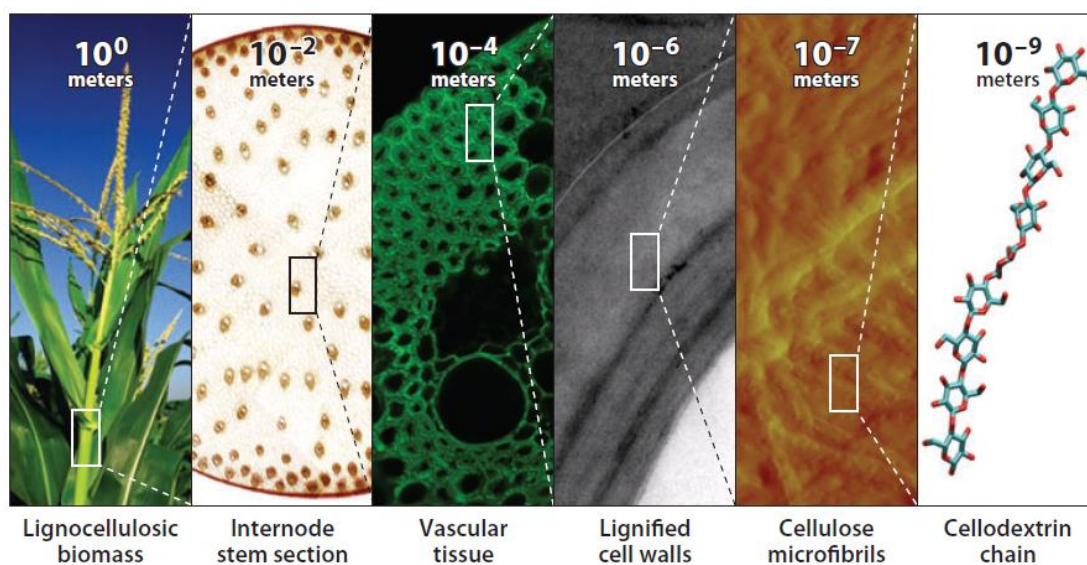


图 1.2 玉米秸秆细胞壁结构多尺度可视化分析^[22]

Fig. 1.2 Multiple-scale visual analysis of corn stover cell wall structure

玉米秸秆的宏观组织结构主要由最外层包被的表皮、随机分散的维管束鞘和其周围的薄壁组织构成（图 1.2）。其中维管束主要由维管束鞘结构、韧皮部和木质部组成。木质部主要作用是水分的运输，它又分为原生木质部和次生木质部。原生木质部中含有 1-2 个导管，在这些导管束的间隙中存在孔隙结构。在次生木质部中存在细长的管胞相互间隔分布，彼此相连的管胞通过孔纹相连。上述组织结构的尺度大约分布在 10^{-4} - 10^{-2} m 范围之内。

通常玉米秸秆组织中存在的细胞壁主要有三种典型的结构，它们分别是：初生壁（100 nm）、薄壁次生壁结构（1-2 μm ）、厚壁次生壁（5-10 μm ）^[23]。初生壁是玉米秸秆生长过程中产生的，在茎秆中分布广泛，一般厚度较薄、无木质化结构，具有较好的弹性和延展性。初生壁主要由三种类型的聚糖构成：纤维素、半纤维素和果胶，其中前两者占 90% 以上；次生壁是秸秆停止生长后在初生壁内侧形成的较厚的细胞壁层。一般较厚，呈管状坚硬结构，主要起到机械支撑和运输作用。除了含有初生壁中存在的多糖，次生壁中还有大量的木质素、蜡质和角质等成分。主要可以分为薄壁次生壁和厚壁次生壁。其中，薄壁次生壁主要出现在维管束鞘间的大量薄壁组织，这种结构能够发生延伸，且出现部分木质化现象。厚壁次生壁完全木质化并且在次生壁中延伸，而且在其内侧经常会覆盖一层类似木质素的多酚物质^[24]。

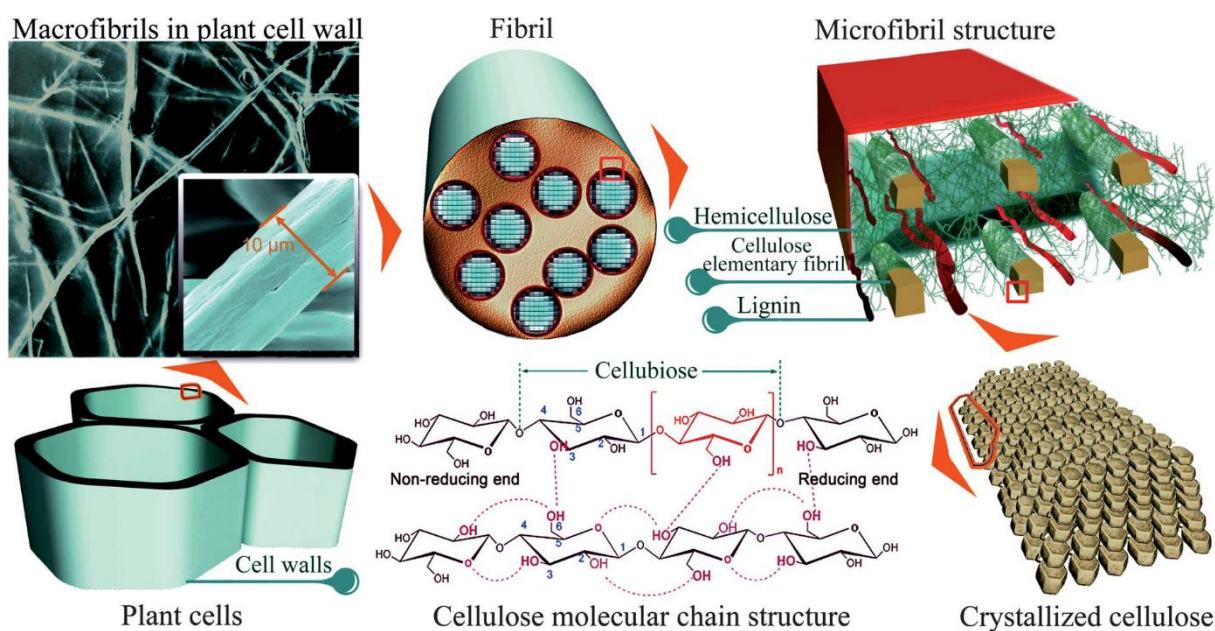


图 1.3 木质纤维素超微结构模型^[25]

Fig. 1.3 Model of lignocellulose ultrastructure

玉米秸秆细胞壁木质纤维素的微观结构包括巨纤维束（macrofibrils）、微纤维（microfibrils）和纤维素基础纤维（cellulose elementary fibrils）。如图 1.3 所示，巨纤维束结构包含一定量的纤维素基本纤维细丝，主要存在于初生壁和薄壁次生壁表面。微纤维由单独的纤维素基本纤维细丝和与其相连的半纤维素构成，主要存在于薄壁和厚壁次生

壁。通过原子力显微镜对上述微观结构进行扫描和定量分析得到纤维素基本纤维的横截面尺寸为：垂直方向 3.3 nm，水平方向 5.7 nm^[26]。目前通过对木质纤维素进行直观可视化的研究，建立了不同类型细胞壁中木质纤维素结构模型，进一步解释纤维素酶对不同类型细胞壁酶解的作用机制^[23]：由于初生壁（PW）中纤维素基本纤维的疏水面暴露在外面，因此容易被纤维素酶接触和降解。在薄壁次生壁（SW）中仅有少量巨纤维和微纤维表面是可接触的，大部分微纤维被木质素多酚复合物阻挡，从而限制酶的接触和水解效果。

1.1.4 木质纤维素结构性质

影响木质纤维素生物质在纤维素酶作用下水解效果的结构性质主要有纤维素的聚合度、结晶度、可接触面积和纤维束的“位错”部位（dislocation）。1）聚合度：纤维素聚合度是指构成纤维素长链中葡萄糖的数量。降低纤维素聚合度，能够使更多纤维素还原末端暴露出来，有利于外切纤维素酶进行吸附和催化，从而提高酶解效果^[27]。2）晶体结构：木质纤维素晶体结构通常可以通过 X 射线衍射仪和 C¹³ 固态核磁共振进行分析测定^[28]。纤维素的晶体结构是抑制其解聚的重要因素，特别对酶解初速度有重要影响。通过氨作用能将天然纤维素晶体形态 I_β 转化为 III_I，使得纤维素片层间的氢键数量减少，片层内的氢键增加，这种氢键网络的重排提高了纤维素水解速率^[29]。3）可接触表面积：由于木质纤维素的酶解过程属于非均相催化，纤维素酶需要与底物接触才能开始酶解。因此，底物的可接触表面积是限制纤维素酶水解效率的一个关键因素^[30]。但是，木质纤维素的表面积并不是孤立的因素，它受到粒度、孔隙率和孔容等因素的影响。4）“位错”结构：在植物细胞壁次生壁中经常出现一些被称为错位或滑移面的不规则区域^[31]。很多研究表明在酶解过程中纤维素酶偏好首先吸附在这种位错区域，同时开始水解作用^[32, 33]。通常可以通过偏光显微镜对植物细胞壁纤维结构进行观察，在正交的偏光下，位错区域会呈现比其他细胞壁更亮的结构。

1.2 木质纤维素预处理及组分拆分工艺

木质纤维素生物质的顽抗性是植物细胞壁化学组分和物理结构共同作用的产物，它的主要作用在于使木质纤维素难以被纤维素酶水解。因此，为了便于木质纤维素原料的利用，在纤维素酶水解前需要对其进行预处理^[13]。预处理的主要目的^[34, 35]：1）去除并分离半纤维素；2）破坏并去除木质素保护层，或者使细胞壁中木质素组分重新分布；3）去除乙酰基团解除其对纤维素酶识别纤维素产生的干扰；4）降低纤维素聚合度改变纤维素晶体形态；5）通过降低底物粒径和增加底物孔容来提高底物的比表面积。

1.2.1 传统预处理方法

常见的木质纤维素预处理方法可以分为：物理法、化学法、化学-物理法和生物法。

物理法是一种通过机械、微波和射线等物理手段对木质纤维素进行预处理的方法。其中，主要包括机械粉碎处理、微波超声波处理和辐射处理等^[36, 37]。球磨法是一种典型的物理预处理方法，这种方法首先能够有效的降低纤维原料的纤维颗粒尺寸，另外，长

时间的球磨处理能够进一步降低纤维素的结晶度和聚合度,从而增加底物的可接触表面积,在纤维素酶解过程中改善酶解效果,但是且处理过程需要能耗较高^[38]。微波和超声波处理^[39]主要是通过 300 MHz-300 GHz 频率范围的微波产生的热效应破坏木质纤维素的顽抗性,改善木质纤维素原料的酶解效果。

化学法是指通过酸、碱、强氧化剂和有机溶剂等化学试剂对木质纤维原料进行预处理的方法。主要的预处理工艺包括:稀酸预处理^[40]、碱预处理^[41]、亚硫酸盐预处理^[42]、过氧化物预处理^[43, 44]和有机溶剂预处理^[27, 45]。这些预处理工艺以稀酸和碱预处理的研究较多,其中稀酸预处理被认为是一种最有希望实现木质纤维素预处理工业化的方法。主要利用稀硫酸(0.5-4.0 wt%),在 100-200°C,固液比为 1:10-1:20 条件下对玉米秸秆、小麦秸秆、杨树、松树等木质纤维素原料进行预处理^[46-50]。稀酸预处理首先将半纤维素酸解成可溶性糖,进一步破坏木质素和半纤维素之间的化学键,使木质纤维素底物空隙增加,提高了底物的可接触表面积,从而改善木质纤维素的酶解效果^[51]。但稀酸预处理技术对木质素的脱除效果不佳,木质素容易在纤维素表面发生重新分布,这对纤维素的酶解作用有一定的限制,并且容易产生发酵抑制物,给后续的发酵过程增加了难度。

化学-物理法是指通过化学试剂和物理高温高压作用相结合对木质纤维素进行处理的方法。主要的预处理方法包括:蒸汽爆破预处理^[52]、氨纤维膨爆预处理(AFEX)^[53]和热水预处理^[54]等。蒸汽爆破法是一种非常具有产业化前景的预处理工艺,典型的操作方法是 在 160-260°C,对应的蒸汽压力 0.69-4.83 MPa 条件下停留几秒钟到几分钟,然后迅速释放压力到常压^[49, 55-57]。首先通过高压饱和蒸汽处理,然后经过快速释放压力使原料受到瞬间减压作用,从而使木质纤维素组分发生化学改性,使底物细胞壁结构发生变化。蒸汽爆破预处理可以视为一种热-机械-化学相结合的作用过程,该过程能够使糖苷键、木质素-碳水化合物复合物之间的 β -芳香基醚键发生断裂,同时使木质素和糖类物质发生化学改性,从而提高纤维素酶解效率^[58]。AFEX 预处理作为另一种非常有应用前景的物理-化学预处理工艺,主要操作工艺是将木质纤维素暴露于液氨中在高温高压条件下反应一段时间,然后突然释放压力^[59-62]。影响 AFEX 预处理效果的条件包括:氨用量、温度、压力和反应时间^[63]。AFEX 预处理的优点在于该过程不产生任何有毒物质、无需降低原料粒径、能够回收大约 99%的糖,以及在后续的发酵过程中无需添加氮源。

生物法主要是利用某些微生物可以降解纤维原料中的木质素的特性对木质纤维素进行预处理的方法^[64]。这些能够降解木质素的微生物大部分属于真菌,主要包括白腐真菌、褐腐菌和软腐菌^[65]。这些真菌能够产生木质素降解酶,具有降解植物细胞壁的作用。其中白腐真菌产生的木质素降解酶包括:木素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶^[66]。生物法预处理具有无污染、条件温和、能耗低等优点,但是操作时间较长,这些微生物在降解木质素的过程中也会消耗一些纤维素及半纤维素。

1.2.2 木质纤维素组分拆分工艺

在木质纤维素生物质应用过程中,另一种有助于降低和缓解生产成本的方法就是生产具有高附加值的产品。因此在生产高附加值产品前,对于木质纤维素生物质的主要成

分（纤维素、半纤维素和木质素）进行分离是十分必要的。从而提出了木质纤维素生物质拆分工艺的概念，并且将其作为生物炼制过程的第一步进行。木质纤维素组分拆分工艺是一种特殊的预处理方式，不仅能够有效的提高纤维素的酶解效果，而且能够将木质纤维素主要成分（纤维素、半纤维素和木质素）单独分离并用于其他高附加值产品的生产^[67]。通过木质纤维素组分的拆分实现木质纤维素原料的高效综合利用。通过多步预处理方法能够分步的将主要目的组分水解，并作为底物用于后续不同转化工艺。因此，在上游工艺中得到高纯度和高回收率的每种组分将有助于提高木质纤维素生物质的利用率。

利用纤维素溶剂和有机溶剂拆分木质纤维素的方法^[68, 69]，是将浓磷酸作为纤维素溶剂结合有机溶剂（丙酮或乙醇）在温和的反应条件下对木质纤维素进行组分的拆分。这种拆分方法的主要目的：1）分别回收半纤维素和木质素；2）破坏纤维素晶体结构，提高其酶解速率；3）温和的反应条件，减少糖的降解和抑制物形成。这种拆分方法已经被用于多种木质纤维素原料的拆分，包括：玉米秸秆、甘蔗、柳枝稷、竹子、狼牙根、芒草、芦苇、芦竹和杨树等^[70-73]。尽管这种拆分方法能够有效提高纤维素的酶解效果并分离回收木质素，但该工艺需要大量的浓磷酸和有机溶剂。

离子液体拆分木质纤维素组分的方法，是指当咪唑或吡啶阳离子与 Cl^- 、 CF_3SO_3^- 、 CF_3CO_2^- 、 CH_3CO_2^- 、 HCOO^- 和 R_2PO_4^- 阴离子配对形成离子液体能够通过断裂木质纤维素内的氢键有效的将其溶解^[74-77]。通过选择合适的反溶剂（水、丙酮和乙醇）能有效分离 80% 以上的木质素和半纤维素。根据大量的研究表明， $[\text{emim}][\text{CH}_3\text{COO}]$ 是一种最适合木质纤维素拆分的离子液体。这种离子液体被广泛用于硬木和软木原料的预处理和拆分。利用 $[\text{emim}][\text{CH}_3\text{COO}]$ 在 110°C 能够将 5 wt% 黄杨木溶解，最终能够回收得到 59% 的糖和 31% 的游离木质素^[75]。北京林业大学孙润仓^[78]课题组提出一种基于离子液体的木质纤维素拆分工艺，首先通过离子液体 $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ 将木质纤维素原料完全溶解，利用 9:1 的丙酮/水混合液分离木质素，最后利用 3% NaOH 溶液萃取半纤维素。在这个过程中 $[\text{C}_4\text{mim}]\text{Cl}$ 可以通过乙腈处理和浓缩后重复利用。通过这种方法拆分甘蔗渣可以得到 36.78% 的纤维素、26.04% 的半纤维素和 10.51% 木质素。尽管离子液体能够有效的溶解木质纤维素，最终实现木质素、纤维素和半纤维素的分离。但是，拆分过程利用大量离子液体，而且离子液体价格较高，在拆分过程中不宜回收。因此，离子液体的成本及回收工艺成为限制这种木质纤维素拆分工艺的主要因素。

其他木质纤维素组分拆分工艺。Mats 等^[79]提出的机械催化酸预处理工艺拆分木质纤维素原料方法，通过对寡糖的水解获得水溶性五碳和六碳糖溶液和无硫木质素。拆分工艺主要包括：硫酸乙酸乙酯溶剂预浸或无硫无液体的发烟 HCl 预浸。经固液分离将溶液回收，预浸后固体部分进行球磨处理能够形成大量“水可溶木质纤维素”。将上述原料再 140°C 处理 1 h，其中葡萄糖得率可达 88-92%，木糖得率可达 93-98%。Sefik Tunc 等^[80]以甲酸和乙醇进行两步拆分木质纤维素，首先利用 10 g/L 甲酸在 160°C 反应 90 min 使半纤维素充分水解，固液分离后，固体部分利用 50% (w/w) 乙醇在 80°C 反应 90 min

用于分离木质素。最终剩下纤维素在 5 FPU 纤维素酶作用下水解 72 h，酶解得率可达 82%。

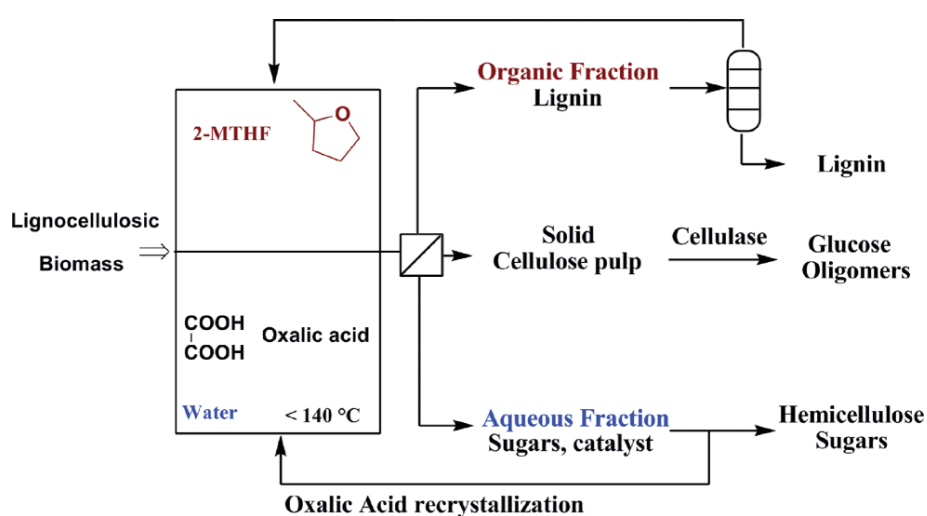


图 1.4 “一锅法”拆分木质纤维素组分

Fig. 1.4 “One-pot” process for lignocellulose fractionation

Stefano 等^[81]利用稀硫酸和有机溶剂相结合方法对大麻草本纤维进行拆分，获得纤维素、半纤维素和木质素等主要成分。在 165°C 、硫酸用量为 3%、甲醇浓度为 45% 条件下一步处理 20 min，半纤维素和木质素回收率均可达到 75% 以上，只有少部分损失。对处理后的固体残渣进行纤维素酶解，葡萄糖得率可达 60% 以上。Stein 等^[82]利用草酸作为催化剂在有机相（2-甲基四氢呋喃）和水相形成的两相体系中 140°C 条件下进行木质纤维素拆分。其中草酸作为二元有机酸能够选择性水解半纤维素，有机溶剂 2-甲基四氢呋喃能够有效萃取木质素。首先通过固液分离能够回收固体纤维素，然后液体通过静置有机相和水相分离，分别回收有机相中的木质素和水相中的木糖（图 1.4）。

1.3 木质纤维素来源抑制物对微生物影响及应对策略

1.3.1 抑制物形成及作用机理

在预处理过程中，伴随着处理强度的增加木质纤维素会产生大量对微生物生长发酵有抑制作用的毒性物质。这些有毒抑制物可以大致分为三大类^[83]：有机弱酸类、呋喃类衍生物和酚类（图 1.5）。

1.3.1.1 弱酸类抑制物

弱酸类抑制物主要包括：乙酸、甲酸和乙酰丙酸等。这类抑制物主要是在木质纤维素原料经过预处理过程和后续的糖化过程中产生的^[84]。其中，乙酸主要是由半纤维素中的主要组成部分乙酰木聚糖降解产生，其余的甲酸和乙酰丙酸主要是糖类物质进一步降解产生（图 1.5）。在木质纤维素原料水解液中一般乙酸的浓度最高，大约在 $1\text{--}10\text{ g/L}$ 之间，它的含量取决于原料的种类和预处理的方法。尽管甲酸在水解液中的浓度只有乙酸

浓度的 1/10，但是它对微生物的毒害作用远强于乙酸。这类不仅会抑制乙醇发酵菌的生长，而且显著的降低了乙醇的发酵速率和最终得率。

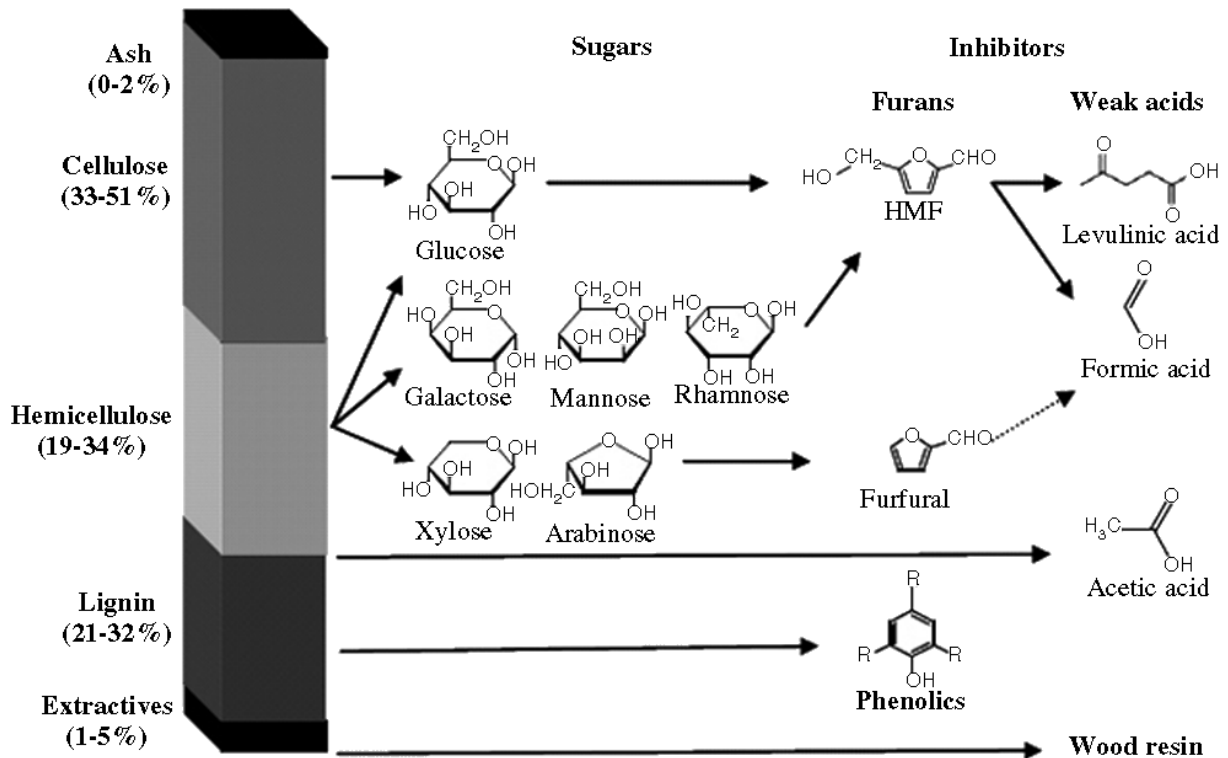


图 1.5 木质纤维素来源抑制物形成过程示意图^[85]

Fig.1.5 Schematic representation of lignocellulose derived inhibitors

有机弱酸类抑制物主要对细胞的生长有明显的抑制作用，而对发酵本身影响并不大。尽管弱酸类抑制物对微生物产生抑制作用机理尚不能明确阐明，但是它的抑制作用可能与解偶联作用和胞内阴离子积累有关^[86, 87]。弱酸在未解离形式存在时能够穿过细胞膜并且发生解离，从而释放阳离子和阴离子。由于阳离子可以在不需要 ATP 的条件下穿越细胞膜，因此这些解偶联剂会打破跨膜运输的 pH 平衡^[88]。细胞内自然 pH 接近 7，这远高于弱酸的解离常数，因此这些弱酸在细胞质中发生解离。随着弱酸在细胞内发生解离，使得胞内 pH 下降，从而对细胞生长产生抑制^[89]。此时胞外的 pH 对弱酸的毒性起着重要的影响作用，这主要表现在未解离弱酸的高浓度使其对细胞膜有较高的渗透作用。另外，阴离子对乙醇发酵菌也具有一定的抑制作用。当细胞内阴离子积累浓度过高时，将会影响细胞的膨胀压力^[90, 91]。上述抑制作用对微生物影响的主要表现：1) 破坏细胞膜完整性；2) 抑制细胞膜蛋白功能；2) 消耗大量 ATP (图 1.6)。

1.3.1.2 呋喃类衍生物

呋喃类衍生物主要是预处理过程中产生的糖类物质进一步降解的产物(图 1.5)。在木质纤维素水解液中主要出现的呋喃类衍生物包括糠醛和 5-羟甲基糠醛(HMF)。它们的浓度一般在 0-5 g/L 之间^[92]。稀酸预处理作为一种常用的预处理方法，在酸性作用下

会有一部分单糖发生脱水降解。半纤维素占木质纤维素原料的 25-35%，并且在预处理过程中容易转化为五碳糖，通过改进预处理工艺避免这些单糖进一步降解为糠醛和 HMF 是非常重要的。

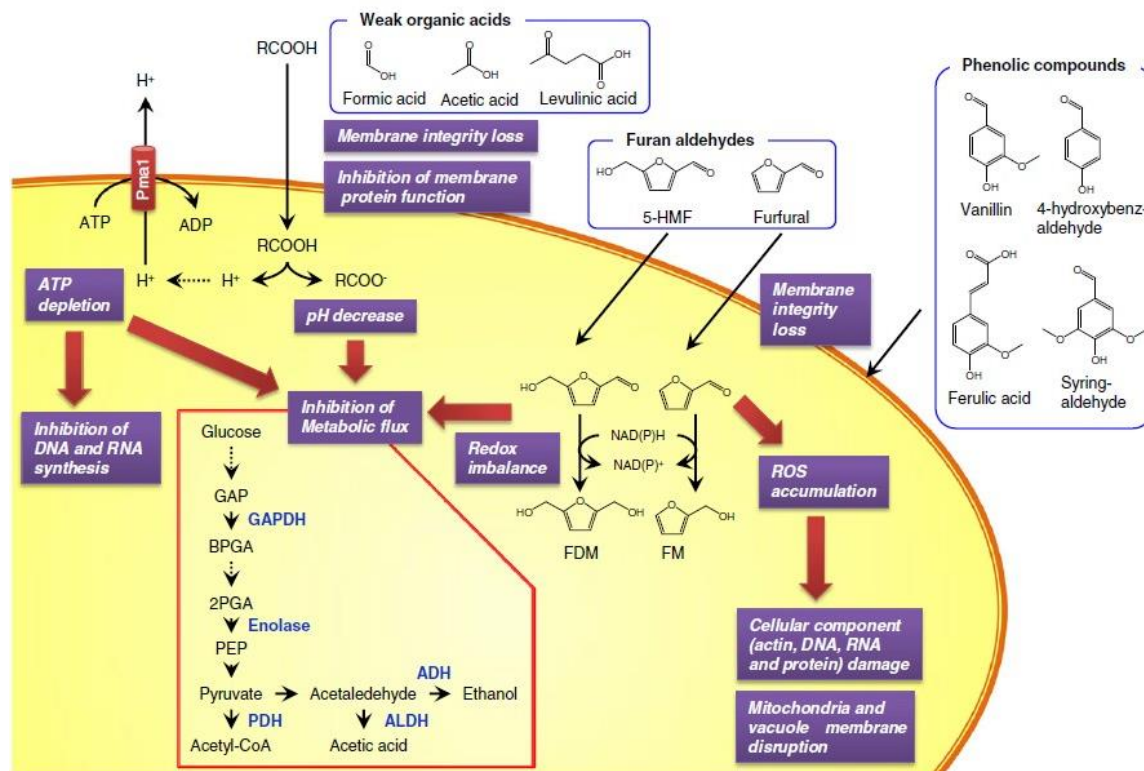


图 1.6 抑制物作用机理推测示意图^[86]

Fig. 1.6 Schematic representation of a presumed inhibition mechanism of inhibitors

呋喃类衍生物糠醛本身具有毒性并且能够与其他抑制物形成协同抑制作用，因此作为木质纤维素水解液中非常重要的抑制物受到广泛重视和深入的研究。呋喃醛类抑制物抑制作用机理可能是：1) 抑制微生物代谢过程关键酶的活性；2) 对 DNA 和 RNA 合成的影响；3) 微生物降解呋喃醛消耗大量还原力^[92]。在呋喃类抑制物存在下，通过对胞内酶活性分析，发现糠醛和 HMF 能够对糖酵解和乙醇发酵过程一些关键酶产生强烈的抑制作用，其中包括乙醇脱氢酶(ADH)，醛脱氢酶(ALDH)和丙酮酸脱氢酶(PDH)^[93-95]。对醇脱氢酶抑制作用，表明由醛转化为醇的依赖于 NAD(P)H 的还原过程是潜在的抑制位点^[95]。已经有研究表明糠醛和 HMF 在体外能够对乙醛向乙醇的转化过程产生抑制作用。糠醛是一种日常生活中存在的诱变剂，对于它能够直接作用于 DNA 的研究早有报道^[96]。在体外进行的糠醛与 DNA 双链的相互作用会导致单链发生断裂。随后，又用糠醛对质粒进行处理，发现由于插入、复制或删除作用导致质粒的大小发生变化^[97]。酵母及一些细菌微生物体内含有的非特异性醇脱氢酶和醛脱氢酶能够将呋喃醛类抑制物进一步降解为相应的醇类物质。但是在这个过程中消耗大量还原力 NADH 或 NADPH，从而导致微生物的生长以及乙醇发酵性能受到显著影响^[98, 99]。另外，糠醛和 HMF 能够导致活性氧自由基在细胞内积累，从而对线粒体和液泡膜产生破坏^[100]。

1.3.1.3 酚类化合物

不同木质纤维素原料的水解物中一般还有 30% 的木质素，而含有羧酸基、甲酰基或羟基官能团的酚类化合物主要是由木质素在预处理过程中降解产生。尽管酮类物质也能在预处理过程中产生，但是由于其浓度非常低并且能够通过多种脱毒处理部分或完全去除，因此一般不被视为主要的抑制物^[85]。预处理木质纤维素原料中常见的酚类化合物根据构成木质素的 H、G 和 S 基本单元可分为：H 族的对羟基苯甲醛、对羟基苯甲酸和对香豆酸，G 族的香草醛、松柏醛和阿魏酸以及 S 族的丁香醛和丁香酸等。大多数的木质素及其衍生物都是水不溶性物质，黄杨树原料经过稀酸预处理后，有不超过 15% 的木质素最终转化为可溶性成分。用稀酸清洗后的物料中芳香化合物单体的浓度一般在 0-3 g/L 之间，其中包括含羧基、醇羟基和醛基的酚类物质。由于存在大量的酚类化合物需要分析，给这类抑制物对乙醇发酵菌影响的研究带来一定难度，所以对于酚类抑制物的研究报道比较少。Klinke 等^[101]在碱性湿法氧化预处理的小麦秸秆水解液中检测到对羟基苯甲酸、香草酸、香草醛和丁香醛等多种酚类化合物单体，但含量很低。同时发现氧化酸性的预处理条件容易使木质纤维素产生苯丙烷衍生物，即酚类化合物。当木质素与半纤维素之间的酯键水解时会释放出对香豆酸和阿魏酸^[102]。尽管酚类抑制物由于其水溶性差导致其在水解液中的检测浓度低于其他抑制物，但是这类抑制物对乙醇发酵菌的抑制作用远强于其他类抑制物，因此对于酚类抑制物作用机理的研究不容忽视。

目前，已有研究分别考察了水解液中存在的含醛基、羧基和醇羟基的酚类物质对乙醇发酵菌 *E.coli* 的影响^[103]。一般认为，这类抑制物对乙醇发酵菌的毒性强弱主要与抑制物本身疏水性系数 (LogP) 的大小有关^[104]。在大部分关于抑制物的研究中，在含有相同官能团情况下，酚类化合物的毒性要强于脂肪烃类和呋喃类抑制物^[105]。通过上述研究总结发现，疏水性对细胞膜完整性有破坏作用的观点只适用于含醇羟基的酚类物质。对于芳香酸类抑制物只能导致细胞膜的部分缺失，而芳香醛类抑制物对细胞膜的完整性没有明显影响^[105-107]。并且酚类化合物也存在协同抑制作用，当香草醇与所有木质素衍生醇类物质分别结合加入培养基进行检测时，发现其毒性强于甲基儿茶酚和愈创木酚的协同抑制作用。香草醛作为一种酚醛类物质，具有抑菌作用和膜活性，能够导致 *E.coli* 的 K^+ 浓度梯度紊乱。利用香草醛以三倍最小抑制浓度的量对 *E.coli* 处理 1 h，有 29% 的细胞出现膜不稳定的情况，延长处理时间至生长过夜，只有 13% 的细胞具有完整形态。Franden 等发现香草醛和对羟基苯甲醛对运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 8b 的细胞生长有严重的抑制作用，在 20 mM 的浓度下便可以导致细胞生长受到完全抑制。Zaldivar 等^[105, 106]考察酚类化合物对乙醇发酵工程菌 *E. coli* LY01 的抑制作用，发现分别酚类抑制物对 *E. coli* LY01 的抑制作用强弱依次为酚醛、酚酸和酚醇化合物。

1.3.2 应对木质纤维素来源抑制物的策略

目前，已经有很多生物学方法能够使乙醇发酵菌在利用预处理后的木质纤维素发酵时克服羧酸类、呋喃类和酚类有毒物质的抑制作用。其中比较有希望的方法包括：生物脱毒策略、含抑制物水解液的驯化策略、基因和代谢工程应对手段。

1.3.2.1 生物脱毒策略

在乙醇生产过程中，人们已经尝试了很多方法来处理木质纤维素水解液。包括酵母、真菌和细菌在内的大量微生物本身都具有脱除抑制物毒性的功能，并且也已经用于乙醇发酵前的木质纤维素原料的脱除过程^[108]。Okuda^[109]等利用一种嗜热菌 *Ureibacillus thermosphaericus* 对废弃木质原料水解液进行生物脱毒。这种细菌生物能够与 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 过碱处理达到相同的脱毒效果。这种细菌对水解液中的糠醛、HMF 以及酚类抑制物具有明显的降解作用，并且生长速率快速，发酵糖消耗量少。Nichols^[110]等利用一种分离得到的真菌 *Coniochaeta ligniaria* 对玉米秸秆水解液中的糠醛、HMF、有机酸和一些酚醛物质进行降解。Zhang 等^[111]利用霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 对稀酸预处理后的玉米秸秆进行脱毒，能够有效的去除弱酸类（乙酸和甲酸）和呋喃类（糠醛和 HMF）抑制物。虽然利用微生物能够在较为温和的条件下有效的去除预处理产生的抑制物，但是生物脱毒周期较长，且微生物会消耗预处理产生的单糖。不仅真菌能够作为脱毒菌去除木质纤维素原料中抑制物，细菌同样也有脱毒的功能，Koopman 等^[112]发现革兰氏阴性菌 *Cupriavidus basilensis* HMF14 具有降解糠醛和 HMF 的新代谢路径。

1.3.2.2 进化适应（细胞驯化）策略

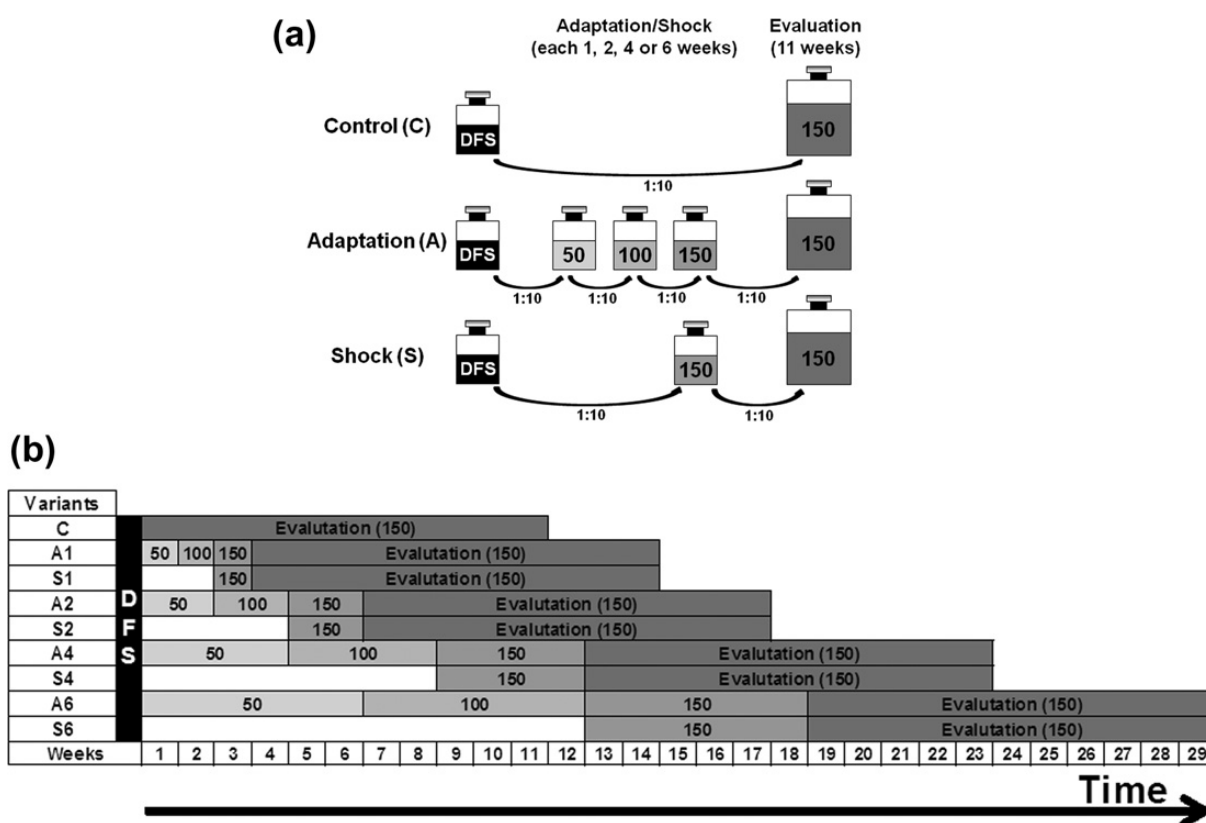


图 1.7 批次或连续培养的进化工程策略^[113]

Fig. 1.7 Evolution strategies in the batch and continual culture

利用木质纤维素水解液对乙醇发酵菌进行驯化，即进化工程策略，已经成为一种有效提高微生物对抑制物耐受性的方法^[114]。虽然，化学法、酶法和微生物法脱毒能够有

效提高水解液的可发酵性,但是,培养一种适应木质纤维素水解液的乙醇发酵菌有利于缩短或者完全免去脱毒过程。这些驯化后的微生物不仅能够降低脱毒成本,而且可以避免脱毒过程造成的可发酵糖损失^[115]。菌种驯化方法是将发酵菌株首先在含有低浓度抑制物的木质纤维素水解液中培养,然后根据菌株在水解液中的生长状况判断是否将其转接到更高抑制物浓度水解液中培养,这样逐渐提高抑制物浓度,使菌株慢慢适应含有抑制物的环境。

驯化策略可以分为:短期驯化和长期驯化。短期驯化优点在于方便快捷,在正式发酵前培养种子的过程中,伴随种子扩培同时既可以完成短期驯化过程。但是这驯化的菌种只能用于这一次木质纤维素原料的发酵,菌种对抑制物没有稳点可遗传的耐受性。另一方面,对于长期驯化而言,其优点在于通过驯化能够获得抑制物耐受性较强的突变株并且具有稳定的遗传性状,但是缺点在于整个驯化周期时间长,在驯化操作繁琐。酿酒酵母 *S.cerevisiae* 作为重要的乙醇发酵菌,本身对木质纤维素水解液中的一些抑制物具有耐受性,如呋喃类和酚类物质,因为它具有将这些抑制物代谢转化为一些毒害作用较小的物质^[85]。在有氧和无氧的条件下,酿酒酵母都能够将羟甲基糠醛(HMF)和糠醛分别还原为 2,5-二羟甲基呋喃和糠醇^[116]。同时,由于 *S.cerevisiae* 本身存在苯基丙烯酸脱羧酶,因此还具有代谢一些酚类化合物的能力。基于上述固有的代谢能力,可以通过批次或连续培养的方法(如图 1.7),将酵母菌暴露于具有亚致死浓度抑制物的水解液中进行驯化。通过这样短期或长期的驯化可能会使微生物进一步增加转化抑制物的能力^[117]。大量的酵母菌种经过驯化过程后,对抑制物的耐受能力明显增强,在木质纤维素水解液中生长良好,从而有效提高了发酵速率和乙醇得率。通过进化工程策略得到一种对发酵抑制物具有高耐受性的乙醇发酵菌,对于增加同步糖化和乙醇发酵体系中木质纤维素原料含量以达到提高乙醇发酵浓度的生产过程是一种简单有效的方法。

1.3.2.3 基因与代谢工程应对策略

通过基因和代谢工程手段改善发酵菌株对抑制物的耐受性主要是根据已经了解的抑制物毒性机制及微生物耐受机理,通过转录调控、转运子和酶的鉴定等手段对已知遗传因素进行直接操作,最终实现提高菌株抑制物耐受性的目的。具体方法包括^[118]:过表达某些基因来编码对特定抑制物有代谢作用的酶,以及改变酵母细胞中辅因子的平衡。从工程学角度在发酵过程中进行多尺度的脱毒和抑制物耐受性分析。发现菌体对糠醛耐受性主要与酿酒酵母 *S.cerevisiae* 的磷酸戊糖途径中 ZMF1、GND1、RPE1 和 TKL1 基因有关^[119]。另外,发现在 *S.cerevisiae* 和 *Z. mobilis* 菌体中存在依赖于 NAD(P)H 的醇脱氢酶、醛脱氢酶的编码基因 ADH7、ADH6、ADH1 和 ALD4 等在降解呋喃醛抑制物时呈现显著上调^[98]。通过在酵母中过表达还原酶、脱氢酶和一些磷酸戊糖途径中的基因来提高乙醇发酵菌对稀酸预处理后木质纤维素原料中抑制物的脱毒性能。尽管基因工程手段对于提高乙醇发酵菌对抑制物的耐受性是一种非常有效的方法,但是进行基因工程操作的成本投入过高,这也在一定程度上限制了它的应用。

1.4 微生物对抑制物的耐受性

微生物对于外界恶劣环境和有害物质会产生相应的应急表现。乙醇发酵微生物对木质纤维素来源抑制物的耐受性主要表现在对抑制物的降解、外排和膜渗透性屏障等方面 [120]。

1.4.1 微生物对抑制物降解

乙醇发酵菌对木质纤维素来源抑制物的耐受性主要表现为将抑制物降解或转化为无毒或低毒性的化合物。抑制物耐受型酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 能够将生物质预处理产生的典型抑制物糠醛和 HMF 转化为低毒性的糠醇和羟甲基糠醇同时进行正常的乙醇发酵。进一步通过分子水平研究发现 *S. cerevisiae* 含有还原活性的酶能够将呋喃醛（糠醛和 HMF）和酚醛类（对羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛、松柏醛和肉桂醛）抑制物降解为相应的低毒性的醇类化合物。这些具有还原性的酶主要包括^[98]：醇脱氢酶 *ADH7*、*ADH6* 和 *ADH1*，醛脱氢酶 *ALD4*，丙酮醛还原酶 *GRE2* 和 *GRE3*。这些酶在催化醛类抑制物发生还原时需要辅因子 NADH 或 NADPH 参与^[95]。尽管在降解抑制物过程中需要消耗大量还原力，但是 *S. cerevisiae* 表现出全细胞多层次的复合调控，降低抑制物降解过程对细胞生长的影响。*S. cerevisiae* 还具有酚酸脱羧酶，能将阿魏酸、肉桂酸、香豆酸等酚酸类抑制物降解，其中阿魏酸在有氧条件下的主要降解物为乙烯基愈创木酚，厌氧条件下产物为二氢阿魏酸。肉桂酸的代谢产物为苯乙烯和二氢肉桂酸。尽管 *S. cerevisiae* 能够将上述酚酸类抑制物降解，但是由于这类抑制物具有很强的毒性，仍然对 *S. cerevisiae* 的生长产生显著的抑制作用^[121]。另外，能够高效发酵生产乙醇的细菌 *Zymomonas mobilis* 也具有多种醇、醛脱氢酶，能够将呋喃醛和酚醛降解为相应的醇类化合物^[99]，但是可能由于细菌比酵母结构和代谢路径更为简单，不能对细胞代谢网络进行有效的调控，因此在降解抑制物的同时菌体生长会受到一定的抑制。

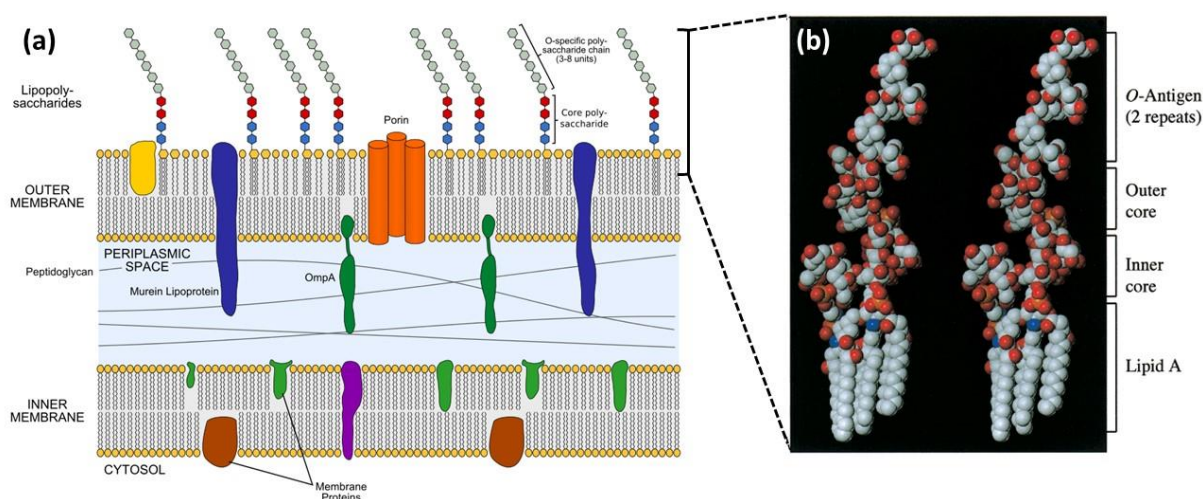


图 1.8 革兰氏阴性菌细胞膜结构示意图^[122]

(a)细胞膜结构；(b)脂多糖分子结构模型

Fig. 1.8 Schematic representation of Gram negative bacteria cell membrane

(a)Structure of cell membrane; (b) Model of the single lipopolysaccharide molecule

1.4.2 微生物对抑制物的外排

革兰氏阴性菌在含有抑制物的环境中生长时,能够通过外排系统将进入胞内的抑制物排出胞外。这种主动外排系统(外排泵)主要存在于革兰氏阴性菌活体细胞中,外排复合物在排毒过程中起主要作用,并且由内膜泵、周质空间衔接蛋白和外膜通道构成(图 1.8a)。Skerker 等^[123]利用生物信息学技术,通过 DNA 突变体库分别确定了 *Z. mobilis* 和 *S. cerevisiae* 对木质纤维素水解液起耐受作用的 44 个和 99 个编码基因,其中编码外排泵的 4 个基因操纵子(*ZMO1429-ZMO1432*)对木质纤维素水解液非常敏感,结果表明对于抑制物的外排是对革兰氏阴性菌对水解液耐受性的重要机制。Schwalbach 等^[124]将 *E. coli* 在玉米秸秆水解液中培养并进行转录组分析,同样发现编码外排泵的基因操纵子出现显著上调的现象。Yang 等^[88]发现乙酸钠耐受性突变株 *Z. mobilis* AcR 和 *S. cerevisiae* 都具有钠质子反向运输蛋白基因对乙酸钠表现出较强的耐受性。

1.4.3 细胞膜渗透性屏障

细胞外膜作为渗透性屏障主要存在于革兰氏阴性菌,这种渗透性屏障的特性主要取决于其表面堆积的特殊的脂多糖层。外膜磷脂双分子的外侧主要是由磷脂和脂多糖构成,脂多糖由脂质 A 核心、内外核心杂多糖链和顶端的 O 型抗原构成(图 1.8b)。其中亲水性杂多糖链向外凸出为细胞提供了亲水性表面,能有有效的屏蔽疏水性物质。对有机溶剂耐受性强的菌株表面脂多糖的含量要高于普通的菌株。*Z. mobilis* 作为一种革兰氏阴性菌具有外膜结构,Barrow 等^[125]分离并发现 *Z. mobilis* 存在一中结构特殊的新型脂多糖。尽管目前并没有关于革兰氏阴性菌的外膜对木质纤维素来源抑制物起到渗透性屏障作用的相关报道,但是 Amro 等^[122]发现 *E. coli* 在有机溶剂存在的条件下,细胞外膜表面会出现大量的小凸起,通过原子力显微镜观察和成分分析发现这些凸起是外膜表面脂多糖含量增加导致的。

1.5 论文主要研究内容

木质纤维素原料的生物炼制技术主要包括原料的预处理、纤维素的酶解糖化、对木质纤维素来源抑制物的脱除、抗抑制物发酵菌的开发和发酵生产燃料乙醇及大宗化学品。其中主要影响生物炼制技术产业化发展的技术瓶颈包括:传统预处理工艺成本高、木质纤维素组分不能得到充分利用、纤维素酶水解真实木质纤维素原料机理不明确,以及抑制物对发酵菌的细胞生长和发酵性能存在严重抑制作用等。本论文的主要研究内容便是围绕上述生物炼制技术中存在的问题展开的,主要包括以下几部分:

(1) 为了高效综合利用木质纤维素原料中的主要组成成分,开发一种干式稀酸预处理和稀酸“后水解”处理相结合的预处理拆分工艺,适用于秸秆这类资源丰富的木质纤维素原料,并且能够将这类原料中的纤维素和半纤维素有效分离,用于高附加值产品的生产。考察干式稀酸预处理对木糖回收、纤维素酶解得率和抑制物含量的影响;研究稀酸“后水解”处理对预处理秸秆中木聚糖和寡糖水解的影响;比较不同发酵和回收方式对最终产物乙醇和木糖浓度和得率的影响。

(2) 针对木质纤维素底物酶解过程中平均粒径分布变化呈现的特有规律：在酶解初始 1-3 h 纤维束的长度和宽度同时出现快速降低，然后纤维束的长度缓慢降低而宽度保持在 20-30 μm 保持不变的现象。分别从秸秆植物组织水平和纤维水平分析结构与组成变化对纤维束粒径分布规律的影响；然后考察酶解过程中微管纤维中木质素成分对粒径分布和结构形态变化的影响；从预处理方面考察粒径分布与预处理强度之间的变化关系，通过偏光显微镜观察不同预处理强度秸秆纤维结构变化，进一步解释酶解过程粒径分布规律产生的原因。

(3) 当选择一种纤维素含量很高的工业废弃物玉米芯残渣 (CCR) 作为木质纤维素原料进行同步糖化和乙醇发酵 (SSF) 时，发现酿酒酵母 *S. cerevisiae* 的生长和发酵性能受到抑制。首先对 CCR 中抑制物进行分析测定。进一步验证其中所含酚类化合物对 *S. cerevisiae* 的抑制作用。采取短期适应进化方法对 *S. cerevisiae* 进行驯化，考察驯化方式对 *S. cerevisiae* 菌体生长和发酵性能的影响。

(4) 当利用富含酚类抑制物的 CCR 作为原料，发现运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* ZM4 的生长和发酵性能均优于抑制物耐受菌 *S. cerevisiae*^[97, 111, 126]。首先考察 *Z. mobilis* ZM4 对 12 种常见酚类抑制物的生理应急表现，验证其对酚类抑制物的耐受性。进一步从生物降解、细胞形态变化和细胞膜渗透性等方面探究 *Z. mobilis* ZM4 对酚类化合物的耐受机理。

第 2 章 两步干式稀酸处理拆分小麦秸秆木质纤维素组分

2.1 引言

木糖及木糖醇作为木质纤维素来源的生物产品已被广泛应用于食品、医药和化工领域。由于玉米芯具有较高的木聚糖含量，因此被作为主要的原料用于稀酸水解法生产木糖。但是随着木糖需求量的增加，有限的玉米芯资源（2 千万吨/年）^[127]和较低的木糖得率（40%）^[128]将不能满足木糖的生产需要。此外，提取木糖后的玉米芯残渣含有大量的酚类抑制物，在不经处理的情况下，其中的纤维素难以被继续利用。因此，为了满足木糖生产对木质纤维素资源的需求和进一步高效综合利用木质纤维素主要组分，有必要开发一种拆分工艺能够适用于资源丰富的秸秆类木质纤维素原料，并且能够将这类原料中的纤维素和半纤维素有效分离，最终实现后续的木糖和纤维素乙醇的同步生产。

木质纤维素组分的拆分技术属于特殊的预处理工艺，因为这个过程不仅能够改善纤维素的水解效果而且能够实现纤维素、半纤维素和木质素各组分间的相互分离^[67]。木质纤维素组分的拆分一般是在酸催化剂（甲酸、草酸和磷酸）、有机溶剂（乙醇、丙酮、四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃和液氨）或离子液体作用下通过一锅法或多步操作实现木质纤维素组分的相互分离^[69, 82, 129-131]。目前拆分技术仍然面临以下问题和挑战：酸催化剂用量高、离子液体回收成本高、有机溶剂易燃，以及残留的离子液体或溶剂对后续糖化和发酵有抑制作用。对于开发一种简单易行的木质纤维素拆分工艺，预处理方法的选择和分离工艺的确定是非常重要的。

稀酸预处理不仅能够有效提高纤维素的酶水解效果，而且能够将半纤维素（主要是木聚糖）转化为可溶性的木糖单糖和寡糖。但是，产生的寡糖留在预处理后的原料上会对纤维素酶活性产生强烈的抑制作用^[132, 133]，另外，大部分微生物是不能利用这些寡糖的。通过稀酸“后水解”的方法能够将预处理后液体部分中的木寡糖有效转化为木糖^[134, 135]。为了能够回收得到更多的木糖，对预处理后的木质纤维素原料全浆液（固体和液体）直接进行稀酸“后水解”，能够同时将液体部分的寡糖和固体中残留的木聚糖进一步水解为木糖，但目前尚且没有对这种工艺主要影响因素的相关研究。因此，对稀酸“后水解”工艺的研究作为生物炼制生产木糖的关键，有助于从木质纤维素原料中最大限度的回收木糖。

在稀酸预处理过程中，高温和稀酸作用下木聚糖的水解和木糖的降解会分别产生乙酸和糠醛等抑制物，不仅造成了木糖的损失，而且还会影响后续的木糖回收和抑制纤维素的酶解和发酵。尽管生物脱毒能够有效的去除预处理产生的上述抑制物，但是脱毒微生物会同时消耗预处理产生的木糖和葡萄糖。将抑制物的含量作为判定预处理条件的重要因素，从而确定一个合适的预处理条件有助于后续纤维素乙醇生产工艺的顺利进行。

综合考虑上述影响木质纤维素组分拆分工艺的重要因素，提出一种从小麦秸秆木质纤维素原料中分离木糖和纤维素的拆分工艺用于木糖和纤维素乙醇的同步生产。主要

的研究内容和目标：1) 确定稀酸预处理条件提高纤维素酶解效果、降低木糖进一步降解和抑制物的形成；2) 对预处理原料的全浆液进行“后水解”，考察酸用量和固含量对木糖得率和抑制物含量的影响；3) 比较两种拆分策略对木糖回收和纤维素乙醇发酵的影响。策略 I：利用两步稀酸处理后的原料直接进行酶解和乙醇发酵，发酵结束后分别进行乙醇精馏和木糖回收；策略 II：对两步稀酸处理后的原料进行固液分离，向固体中加水至初始固含量，后续操作与策略 I 相同。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验材料

2.2.1.1 原料和纤维素酶：

小麦秸秆于 2011 年秋季收获自河南郸城。经过清洗除尘、105°C 烘干除水后，利用 SF-300 机械粉碎机降低颗粒尺寸，粉碎后的原料密封保存备用。小麦秸秆颗粒尺寸为 3-12 mm，含水量 89-95%，干物料组成成分 (w/w)：38.7% 纤维素、25.9% 半纤维素、14.9% 木质素和 5.2% 灰分。

纤维素酶 youtell#6 购自湖南尤特尔生物有限公司（中国，湖南），纤维素酶的滤纸酶活为 135 FPU/g 酶粉，纤维二糖酶活为 344 IU/g 酶粉，纤维素酶蛋白含量为 9% (w/w)。

2.2.1.2 主要试剂：

葡萄糖和木糖为分析纯购自国药集团化学试剂有限公司（中国，上海）；酵母提取物食品级购自安琪酵母股份有限公司（中国，湖北）； H_2SO_4 、 KH_2PO_4 、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 $(NH_4)_2SO_4$ 为分析纯购自上海凌峰化学试剂有限公司（中国，上海）；糠醛和 5-羟甲基糠醛 (HMF) 为分析纯购于阿拉丁试剂有限公司（中国，上海）。其余试剂见附录 I。

2.2.1.3 菌种和培养基：

菌种：*Saccharomyces cerevisiae* DQ1 (CGMCC 2528) 是通过 Co60 辐射诱变获得一种用于高固含量纤维素乙醇发酵的突变菌株，保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心。菌种分装在 2 ml 含有 30% (v/v) 甘油的冻存管中 -80°C 条件下冷冻保藏。

种子培养基：20 g/L 葡萄糖、2 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 、1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 1 g/L 酵母提取物。

发酵培养基：2 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $(NH_4)_2SO_4$ 、1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 1 g/L 酵母提取物。

2.2.2 仪器设备

2.2.2.1 螺带搅拌式预处理反应器^[136]：

螺带搅拌式预处理反应器如图 2.1 所示，反应器由不锈钢桶制成，反应器直径 260 mm、高度 400 mm，实际工作体积为 20 L。反应内部配有单螺带搅拌桨，通过电机磁力传动。搅拌转速可设置为 0-100 rpm。预处理反应器外部缠绕加热丝和保温棉以减少向外散热。蒸汽发生器与预处理反应器相连并提供持续的饱和蒸汽，保证预处理反应过程所需的温度。

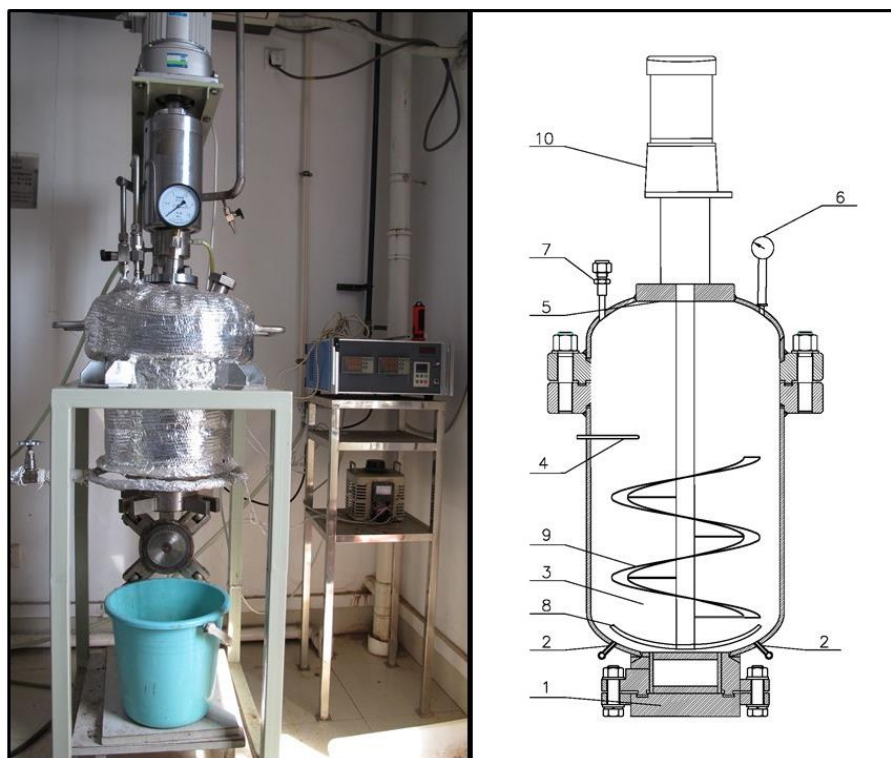


图 2.1 螺带搅拌式预处理反应器

1 出料口；2 蒸汽进口；3 预处理反应罐；4 热电偶；5 反应罐封头；6 压力表；7 排气阀；8 锚式搅拌桨；9 螺带式搅拌桨；10 电机。

Fig. 2.1 Pretreatment reactors with helix ribbon stirrer. 1-Product outlet; 2-Steam inlet; 3-Pretreatment vessel; 4-Thermocouple; 5-Cap of the reactor; 6-Pressure gage; 7-Inert air outlet; 8-Anchor stirrer; 9-Helical ribbon stirrer; 10-Electric motor.

2.2.2.2 其他仪器设备：

其他仪器设备见附录 II 主要仪器设备。

2.2.3 实验方法

2.2.3.1 干式稀酸预处理^[97]：

预浸过程：取 1200 g 小麦秸秆（基于干重），按照固液比为 2:1（w/w）比例加入稀硫酸溶液，充分混合均匀，置于密封袋中预浸 12-18 h。其中，硫酸用量分别为 10、15、20 和 25 mg/g 干物料。

预处理过程：设定预处理反应器转速为 50 rpm，将预浸后的小麦秸秆加入到预处理反应器中。待蒸汽发生器提供的蒸汽压力达到 1.6 MPa 时，开始向反应器通入蒸汽。当反应温度达到 100℃ 时，开始计时，保证升温到预定温度的时间为 6-7 min。预定反应温度分别为 170、175、180 和 185℃，反应器中蒸汽压力保持在 1.15-1.2 MPa，预处理反应时间为 3 min。预处理反应结束后，打开排气阀使反应器中蒸汽压力迅速下降到常压，待气压下降的 0.1 MPa 以下，打开反应器底部排水阀，排出冷凝水，打开出料口，收集预处理后原料。取少量预处理后小麦秸秆原料用于葡萄糖和木糖（单糖和寡糖）得

率分析、抑制物含量测定和纤维素酶解效果评价，其余原料封装于塑料袋中-4℃ 冷冻保存备用。

2.2.3.2 稀酸“后水解”处理：

在预处理后小麦秸秆原料全浆液中添加硫酸，充分混合后，置于灭菌锅中 121℃ 条件下反应 1-2 h。其中，固体含量分别为 10、15 和 20%，酸溶液浓度分别为 0.5、1.0、2.0 和 2.5% (w/w)。经过稀酸“后水解”，取 1 ml 样品，在 11167×g 条件下离心 5 min 将原料进行固液分离，上清液用于单糖和寡糖得率分析和抑制物含量测定。每个实验条件进行两次平行试验，实验结果为两次实验的平均值。

2.2.3.3 小麦秸秆拆分策略：

拆分策略如图 2.2 所示，策略 I：先对预处理的小麦秸秆（固体和液体部分）进行稀酸“后水解”处理，然后对水解物（固体和液体部分）进行同步糖化和乙醇发酵。最后进行精馏获得乙醇，固液分离回收木糖单体。策略 II：先对预处理的小麦秸秆（固体和液体部分）进行稀酸“后水解”处理。然后对水解的原料进行压榨第一次固液分离，得到富含木糖的液体部分。向固体部分补水，水量与分离出的液体部分质量相同，然后进行同步糖化和乙醇发酵。发酵结束后进行精馏回收乙醇，再进行第二次固液分离，将两次得到的液体混合进行木糖回收精制。

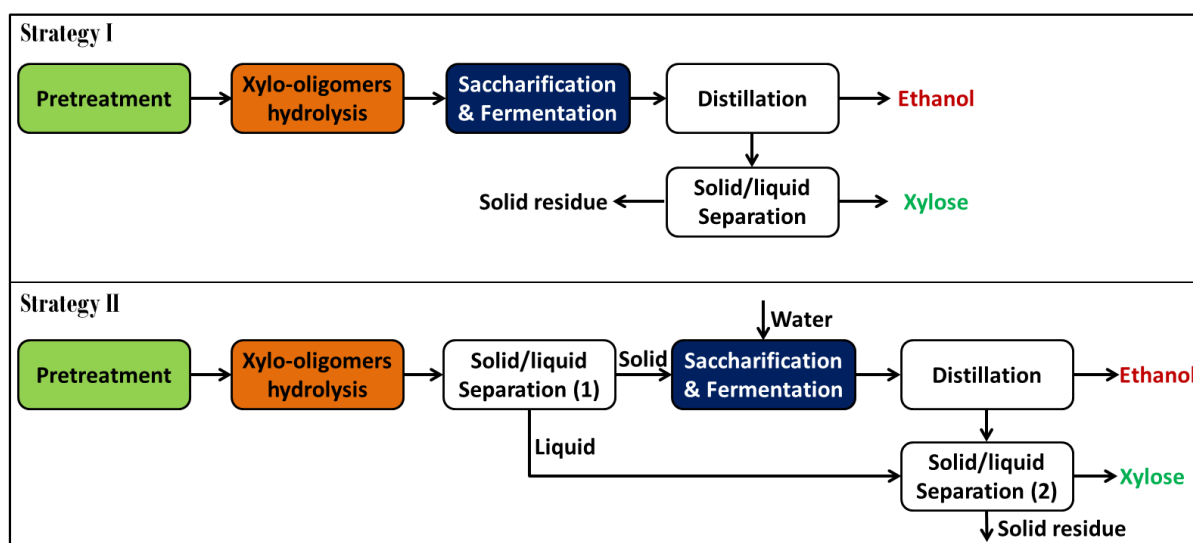


图 2.2 两步稀酸处理小麦秸秆拆分策略流程图

Fig. 2.2 Schematic diagram of wheat straw fractionation processing

2.2.3.4 纤维素酶解糖化：

将经过两步稀酸处理后的小麦秸秆原料加入到 100 ml 锥形瓶中，利用 5 M NaOH 溶液调节原料 pH 至 4.8。然后加入一定量的 0.1 M pH4.8 的柠檬酸盐缓冲溶液和 0.2 ml 四环素乙醇溶液（10 mg/ml），保证总的酶解体系质量为 50 g，固含量为 20% (w/w)，纤维素酶用量为 15 FPU/g 干物料。将锥形瓶置于水浴摇床中在 50℃，150 rpm 条件下

酶解 72 h。在设定的时间取 1 ml 酶解样品，在 11167×g 条件下离心 5 min 取上清液通过 HPLC 进行葡萄糖得率分析。每个实验条件进行两次平行试验，实验结果为两次实验的平均值。

2.2.3.5 酵母种子培养：

从-80°C 冰箱取出一支保藏 *S. cerevisiae* DQ1 的 2 ml 冻存管，将其在 37°C 快速复苏。在超净工作台中将其接入事先灭菌的装有 20 ml 种子培养基的 100 ml 摇瓶中，置于气浴摇床中，在 30°C、转速 150 rpm 条件下活化培养 18 h。然后将 20 ml 菌液转接到事先灭菌的 200 ml 种子培养基中在上述条件下培养 12 h，此时种子液 OD₆₀₀ 吸光值为 8.8-9.1。将培养好的种子液接入发酵罐进行同步糖化与乙醇发酵。

2.2.3.6 同步糖化与乙醇发酵 (SSF)：

SSF 过程分为两个阶段：1) 预糖化阶段：将经过两步稀酸处理后的小麦秸秆原料加入到 5 L 发酵罐中，调节发酵体系固含量为 20% (w/w)，利用 5 M NaOH 溶液调节发酵体系 pH 为 4.8。在纤维素酶用量为 15 FPU/g 干物料，50°C、搅拌浆转速为 150 rpm 条件下糖化预先设定时间。2) SSF 阶段：在接入菌种前 30 min 时，向发酵罐中加入事先灭菌的发酵培养基，并将发酵体系 pH 值调节至 5.5，温度降低至 37°C。以 10% (v/v) 接种量向发酵罐中接入种子液并进行乙醇发酵。在设定时间取 1 ml 样品，在 11167×g 条件下离心 5 min，取上清液通过 HPLC 进行葡萄糖和乙醇浓度测定。每个实验条件进行两次平行试验，实验结果为两次实验的平均值。

2.2.4 分析方法

2.2.4.1 木质纤维素原料固体含量 (DM) 和水不溶固体 (WIS) 含量测定：

1) 固体含量：将干净的培养皿置于烘箱中，在 105±5°C 条件下烘干至恒重 (M₁)，取一定量木质纤维素原料(M₂)加入培养皿中，置于在 105±5°C 烘箱中烘干至恒重(M₃)。

$$DM (\%) = (M_3 - M_1) / M_2 \times 100\% \quad (2-1)$$

2) 水不溶固体含量：将滤纸和干净的培养皿置于烘箱中，在 105±5°C 条件下烘干至恒重 (M₀)。取 5.0 g 样品和 45.0 g 去离子水加入到 100 ml 摇瓶中，盖好塞子置于气浴摇床中，在 30°C、150 rpm 条件下混合震荡 2-3 h。将样品浆液通过烘干的滤纸进行抽滤，并用去离子水 (至少 400 ml) 反复清洗固体。将固体和滤纸小心转移到培养皿中，置于 105±5°C 的烘箱烘干至恒重 (M)。

$$WIS (\%) = (M - M_0) / 5 \times 100\% \quad (2-2)$$

2.2.4.2 木质纤维素原料或预处理后固体部分主要成分测定

木质纤维素原料主要成分测定方法根据美国国家可再生能源实验室 (NREL) 的技术报告 NREL/TP-510-42618^[137]进行一定修改。具体操作步骤：1) 取 100.0 mg 木质纤维素 WIS 加入到具塞压力试管中并加入 1 ml 72% (w/w) 浓硫酸溶液，将试管置于 30°C 恒温水槽中反应 1 h，期间每隔 5-10 min 用玻璃棒搅动 30 次，使浓硫酸与木质纤维素原料充分混合。2) 反应结束后向试管中加入 28 ml 去离子水将硫酸浓度稀释至 4% (w/w)，盖好塞子，上下震荡混合均匀。为避免加热时塞子崩开，将盖子顶端绑上纱布固定，然

后置于灭菌锅中, 在 121°C 下反应 1 h。3) 为了消除该过程中葡萄糖和木糖进一步降解带来的误差, 选择一系列溶度范围的葡萄糖和木糖溶液在相同酸浓度和反应条件下进行水解, 绘制葡萄糖和木糖校正曲线。4) 将稀酸水解后的混合物利用孔径为 0.2 μm 的耐酸微孔滤膜 (提前烘干至恒重) 进行真空抽滤。液体部分加入碳酸钙中和至 pH7.0, 将混合液在 11167 \times g 条件下离心 5 min, 取 1 ml 上清液通过 HPLC 测定葡萄糖和木糖浓度。小心取下滤膜和固体部分置于 105 \pm 5°C 条件下烘干至恒重, 用于酸不溶性木质素含量计算。

木质纤维素原料中灰分含量测定方法根据美国国家可再生能源实验室 (NREL) 技术报告 NREL/TP-510-42622^[138]进行修改。具体操作步骤: 1) 将标记好的坩埚置于马弗炉中, 在 575 \pm 25°C 加热至少 4 h, 取出置于干燥器中冷却至室温称重。2) 取一定量干物料加入到标记好的坩埚中, 将装有样品的坩埚置于马弗炉, 在 575 \pm 25°C 条件下保持 24 h, 取出置于干燥器中冷却至室温称重。

木质纤维素组分含量计算:

$$\text{葡聚糖含量}(\% \text{基于干物料}) = \frac{C_g \times 0.029 \times f_g \times WIS}{1.11 \times 0.1 \times DM} \times 100\% \quad (2-3)$$

$$\text{木聚糖含量}(\% \text{基于干物料}) = \frac{C_x \times 0.029 \times f_x \times WIS}{1.36 \times 0.1 \times DM} \times 100\% \quad (2-4)$$

$$\text{酸不溶木质素含量}(\% \text{基于干物料}) = (m_3 - m_1) / m_2 \times 100\% \quad (2-5)$$

式中, C_g , C_x 分别为 HPLC 测得酸水解后液体中葡萄糖和木糖浓度, 单位 g/L; f_g , f_x 分别为葡萄糖和木糖在酸水解过程中的浓度校正因子; WIS 为水不溶固体含量; DM 为固体含量; m_1 为坩埚质量, 单位 g; m_2 为干物料质量, 单位 g; m_3 为坩埚和灰分质量, 单位 g。上述组分测定实验均进行两次, 实验结果为两次实验的平均值。

2.2.4.3 预处理后木质纤维素原料液体部分主要成分测定

预处理后木质纤维素原料液体部分主要成分测定方法根据美国国家可再生能源实验室 (NREL) 的技术报告 NREL/TP-510-42623^[139]进行一定修改。

1) 单糖和抑制物含量测定: 将 2.2.4.1 测定不容固体含量过程中抽滤分离的液体部分收集。取 1 ml 通过 HPLC 测定葡萄糖、木糖、糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸浓度。

2) 寡糖含量测定: 取 5 ml 上述回收的液体加入压力试管中, 加入 1 ml 浓度为 72% (w/w) 的硫酸溶液和 23 ml 去离子水, 盖好塞子上下震荡混合均匀, 置于灭菌锅中。为避免加热时塞子崩开, 将盖子顶端绑上纱布固定, 然后置于灭菌锅中, 在 121°C 下反应 1 h。

2.2.4.4 预处理预料总酚含量测定:

取木质纤维素材料 (约 200 mg) 加入 20 ml 95% 的甲醇后, 置于 100 ml 三角瓶中, 40°C 下 100 rpm 振荡过夜。13000 \times g 离心 5 min, 取 500 μl 上清液 (没食子酸标样或 95% 甲醇做对照) 置于干净的试管中, 再加入 1 ml 15% (v/v) 福林酚试剂, 充分振荡。最后加入 4 ml 700 mM Na_2CO_3 , 室温下反应 2 h。取上述样品 (标样或空白) 在 765 nm

可见光下测定吸光值。以没食子酸标准曲线计算总酚含量。

2.2.4.5 纤维素酶活和纤维二糖酶活测定:

1) 纤维素酶活测定是根据 NREL 的技术报告 NREL/TP-510-42628^[140]进行的。将纤维素酶配制成 5 个浓度梯度的酶溶液, 分别取 0.5 ml 上述酶液加入到已装有 50.0 mg 滤纸条 (Whatman No.1) 和 1 ml 0.5 M 柠檬酸盐缓冲溶液的试管中, 并且做底物空白和酶空白对照。同时将上述试管置于 50°C 水浴中反应 1 h。然后加入 3 ml DNS 试剂, 震荡混合均匀后置于沸水浴 5 min, 取出并放于冰浴迅速冷却。取 200 μ l 显色后的液体加入 2.5 ml 去离子水, 混合均匀后在 540 nm 可见光测定吸光度。根据吸光度和葡萄糖试剂盒测得的标准曲线, 计算产物葡萄糖浓度。纤维素酶活单位定义: 1 h 内将 50.0 mg 滤纸转化为 2.0 mg 葡萄糖所需的纤维素酶量为一个滤纸酶活单位 (FPU)。

2) 纤维二糖酶活测定根据 Ghost^[141]提出的测定方法进行的。将纤维素酶配制成 5 个浓度梯度的酶溶液, 在 5 支装有 1 ml 80 mM 纤维二糖溶液试管中, 分别加入 1 ml 不同浓度纤维素酶溶液, 并且做底物空白和酶空白对照。同时将上述试管置于 50°C 水浴中反应 10 min。然后置于沸水浴 5 min, 取出并放于冰浴迅速冷却。酶解过程产生的葡萄糖通过葡萄糖试剂盒进行计算。纤维二糖酶活单位定义: 1 min 内将 80 μ mol 纤维二糖转化为 2.0 μ mol 葡萄糖所需的纤维二糖酶量为一个纤维二糖酶活单位 (IU)。

2.2.4.6 纤维素酶水解评价:

纤维素酶解的体系总质量为 20.0 g, 取一定量预处理后小麦秸秆, 加水调节其固含量到 2.5% (w/w), 用 5 M NaOH 调节其 pH 至 4.8。添加 10 ml pH4.8 的 0.1 M 柠檬酸盐缓冲溶液。纤维素酶用量为 20 FPU/g 干物料。在 50°C 转速 150 rpm 条件下酶解 72 h。

2.2.4.6 扫描电镜分析(SEM)

预处理前后小麦秸秆表面形态利用日本 Hitachi 公司 S3400 N 型号 SEM 进行观察。首先, 样品经过真空冷冻干燥脱水, 然后样品经过固定和喷涂纳米金粉处理, 在 SEM 加速电压设置为 15 kV 条件下进行观察。

2.2.4.7 高效液相色谱分析 (HPLC)

葡萄糖、木糖、乙醇、乙酸、甲酸、糠醛和 HMF 浓度通过 HPLC 进行定量分析。采用日本岛津公司 RID-10A 型示差折光检测器 HPLC 配有 HPX-87H 型色谱柱(300 mm \times 7.8 mm)进行检测。样品 11167 \times g 条件下离心 5 min, 稀释适当倍数, 利用孔径 0.22 μ m 的滤膜过滤后进行检测。检测条件为: 流动相为 5 mmol/L 硫酸, 流速为 0.6 mL/min, 柱温 65°C, 进样量为 20 μ l。

2.2.4.8 得率计算:

葡萄糖、木糖、葡寡糖、木寡糖和乙醇得率的计算公式如下^[135, 142]:

$$\text{葡萄糖得率(\%)} = \frac{[\text{Glucose}] \times V}{1.111 \times [\text{Biomass}] \times d_g} \times 100\% \quad (2-6)$$

$$\text{木糖得率(\%)} = \frac{[\text{Xylose}] \times V}{1.136 \times [\text{Biomass}] \times d_x} \times 100\% \quad (2-7)$$

$$\text{葡寡糖得率(\%)} = \frac{([\text{Glucose}]_t - [\text{Glucose}]) \times V}{1.111 \times [\text{Biomass}] \times d_g} \times 100\% \quad (2-8)$$

$$\text{木寡糖得率(\%)} = \frac{([\text{Xylose}]_t - [\text{Xylose}]) \times V}{1.136 \times [\text{Biomass}] \times d_x} \times 100\% \quad (2-9)$$

$$\text{乙醇得率(\%)} = \frac{[\text{Ethanol}] \times W}{976.9 - 0.804 \times [\text{Ethanol}]} \times \frac{1}{0.51 \times d_g \times [\text{Biomass}] \times 1.111} \times 100\% \quad (2-10)$$

式中, $[\text{Glucose}]_t$ 、 $[\text{Glucose}]$ 、 $[\text{Xylose}]_t$ 和 $[\text{Xylose}]$ 分别为经过预处理或稀酸“后水解”的小麦秸秆可溶性水解物中的葡萄糖和木糖的总糖和单糖浓度, 单位 g/L; V 为可溶性水解物体积, 单位 L; d_g 和 d_x 分别为小麦秸秆中葡聚糖和木聚糖含量, 单位 wt%; $[\text{Biomass}]$ 为经过预处理或稀酸“后水解”的小麦秸秆干物质的质量, 单位 g; 1.111 和 1.136 分别为葡聚糖和木聚糖转化为葡萄糖和木糖的转化因子; $[\text{Ethanol}]$ 为发酵液中乙醇浓度, 单位 g/L; W 为发酵醪中水的质量, 单位 g; 0.51 为酿酒酵母利用葡萄糖转化为乙醇的转化因子。

2.3 结果与讨论

2.3.1 确定拆分工艺中干式稀酸预处理条件

2.3.1.1 干式稀酸预处理对小麦秸秆主要成分的影响

小麦秸秆原料的组成成分为: 38.7%纤维素、25.0%木聚糖、14.9%酸不溶木质素、5.2%灰分和 13.3%萃取物。小麦秸秆的微观结构在预处理前后发生明显变化, 相互结合紧密的木质纤维素巨纤维束在高温高压和稀酸作用下变得松散和扭曲(图 2.3)。首先考察了不同预处理条件对小麦秸秆的组成成分的影响。预处理后小麦秸秆的主要成分、干物料的回收率、可溶性水解物(soluble hydrolysate, SH)和水不溶固体(WIS)中葡聚糖和木聚糖回收率的变化如表 2.1 所示。

表 2.1 不同条件预处理小麦秸秆的组成成分

Table 2.1. Recovery of dry matter, glucan and xylan at different pretreatment conditions

| Conditions | Glucan (%) | Xylan (%) | Lignin (%) | Ash (%) | Dry matter recovery (%) | Glucan recovery (%) | | Xylan recovery (%) | |
|--|------------|-----------|------------|---------|-------------------------|---------------------|-------|--------------------|------|
| | | | | | | SH | WIS | SH | WIS |
| Changing temperature at H ₂ SO ₄ dosage of 15 mg/g dry wheat straw | | | | | | | | | |
| 170°C | 39.7 | 4.5 | 11.1 | 5.8 | 88.7 | 3.9 | 95.1 | 59.1 | 36.9 |
| 175°C | 43.0 | 9.0 | 20.0 | 5.9 | 86.9 | 3.4 | 99.8 | 63.5 | 32.2 |
| 180°C | 43.3 | 7.9 | 14.8 | 5.9 | 87.7 | 4.9 | 100.8 | 59.7 | 29.6 |
| 185°C | 43.8 | 4.1 | 18.5 | 6.6 | 78.1 | 5.9 | 85.9 | 64.6 | 13.0 |
| Changing H ₂ SO ₄ dosage in mg/g dry wheat straw at 175 °C | | | | | | | | | |
| 10 | 39.6 | 13.0 | 15.1 | 5.6 | 91.5 | 1.6 | 95.8 | 47.4 | 48.8 |
| 15 | 43.4 | 9.0 | 20.0 | 5.9 | 86.9 | 3.4 | 99.8 | 63.5 | 32.2 |
| 20 | 41.4 | 6.0 | 19.1 | 5.9 | 87.8 | 5.1 | 95.8 | 73.7 | 21.6 |
| 25 | 40.0 | 5.1 | 22.6 | 6.3 | 81.5 | 5.9 | 90.8 | 73.9 | 11.8 |

SH means the soluble hydrolysate and WIS means water insoluble solid.

随着预处理温度和硫酸用量提高, 预处理后小麦秸秆中葡聚糖和木质素含量相对增加, 而固体干物质的回收率和木聚糖含量显著降低, 葡聚糖含量在 SH 和 WIS 中的变化并不明显 (表 2.1)。虽然 SH 和 WIS 中葡聚糖回收率的总和超过了 100%, 但是这并不影响预处理条件对原料成分变化影响的比较, 这可能是由于小麦秸秆中存在一些葡聚糖成分被忽略了^[143]。上述结果表明, 干式稀酸处理主要作用于小麦秸秆木质纤维素组分中的半纤维素, 使木聚糖在硫酸作用下转化为可溶性单糖或寡糖。随着预处理条件的增强, 木聚糖在 WIS 中的含量显著下降, 从而导致预处理后小麦秸秆中干物质回收率显著下降, 而葡聚糖和木质素的含量相对增加。葡聚糖含量在预处理过程中变化并不明显, 与木聚糖的不定型结构相比, 这可能是由于纤维素的致密晶体结构对稀酸的作用相对并不敏感^[144]。

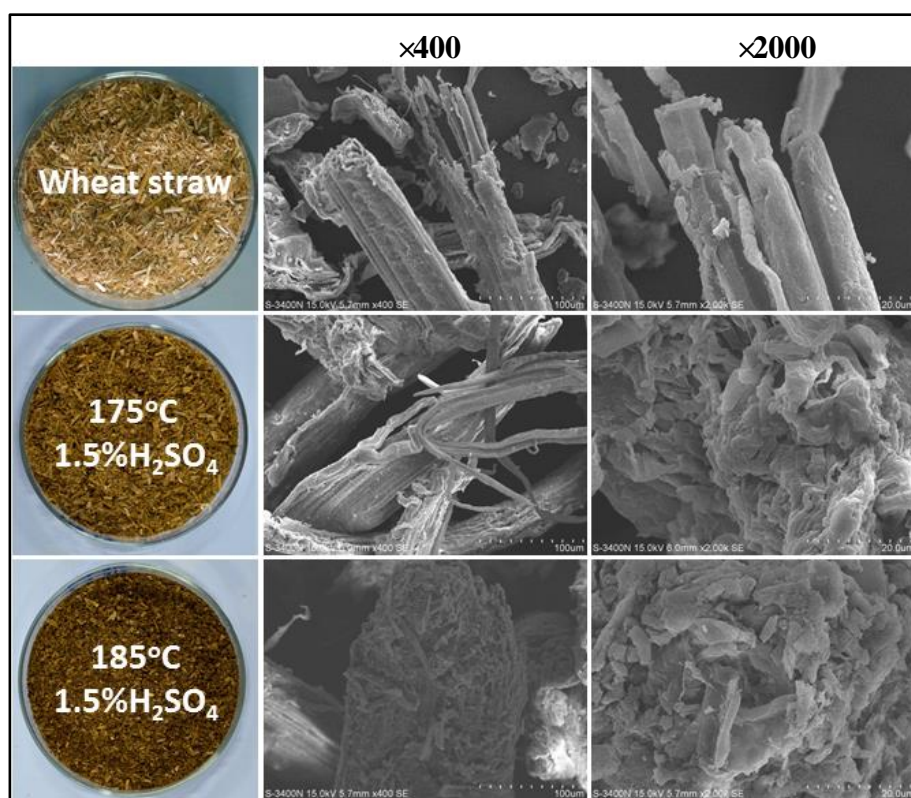


图 2.3 预处理前后小麦秸秆结构形态分析

Fig. 2.3 SEM images of wheat straw before and after pretreatment

2.3.1.2 干式稀酸预处理对木糖回收、抑制物含量和纤维素酶解的影响

为了确定小麦秸秆拆分工艺中干式稀酸预处理的条件, 考察了预处理条件对处理后物料的可溶性水解物中游离葡萄糖和木糖得率和抑制物含量变化的影响, 以及对不溶性固体中纤维素酶解效果的影响。

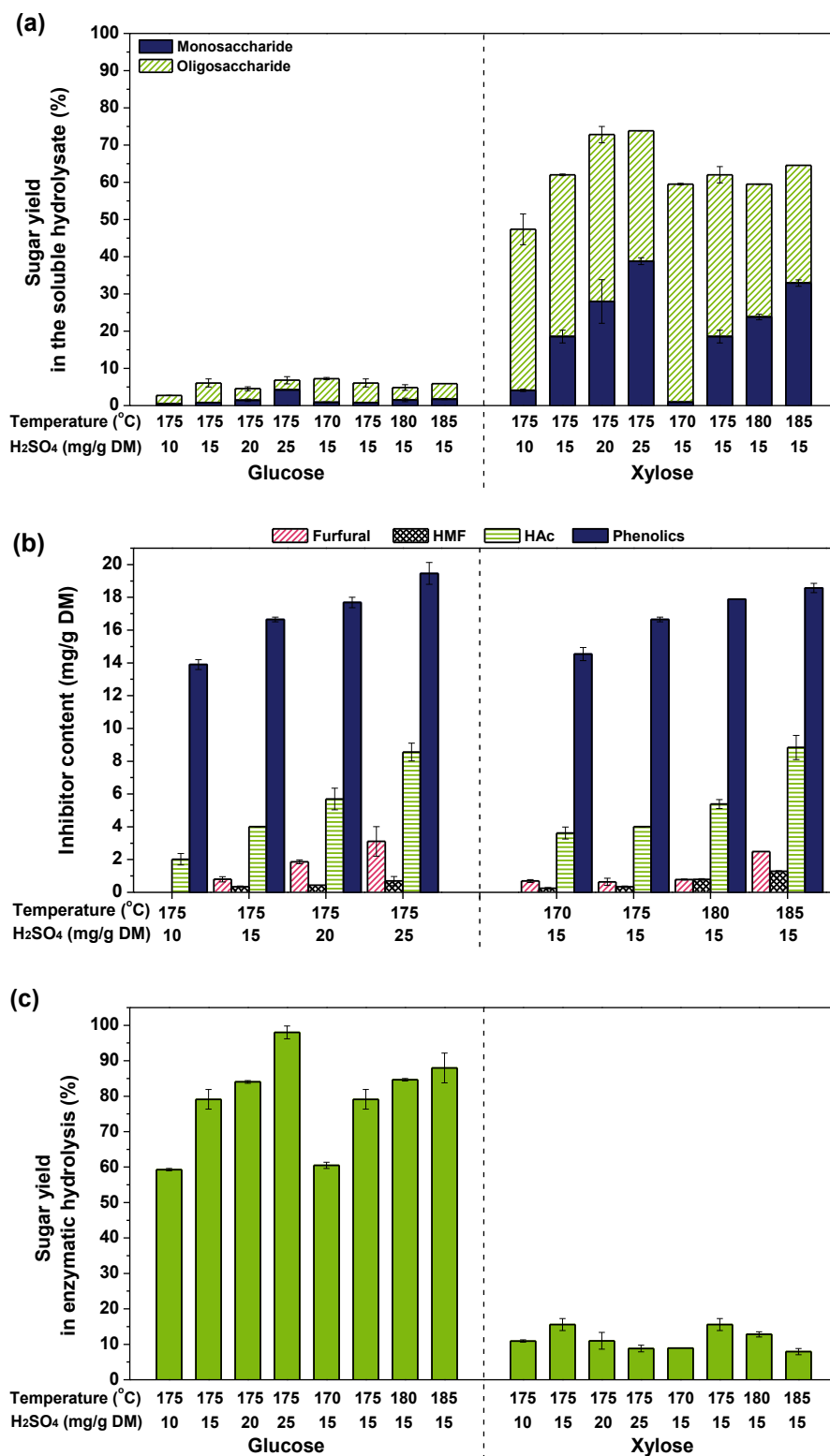


图 2.4 预处理条件对小麦秸秆组成和纤维素酶解的影响

(a), (b)分别为可溶性水解物中糖得率和抑制物含量；(c)不溶性固体酶水解

Fig. 2.4 Effect of pretreatment on the composition and enzymatic hydrolysis of pretreated wheat straw. (a), (b) Glucose, xylose yield and inhibitors in the soluble hydrolysate; (c) Enzymatic hydrolysis of WIS.

结果如图 2.4 所示，随着预处理酸用量和温度升高，预处理后可溶性水解物中的木

糖含量随之增加 (5-40%)，但葡萄糖单糖和寡糖含量接近 10%，且没有明显变化 (图 2.4a)。上述结果说明，干式稀酸预处理能够有效的将小麦秸秆中的半纤维素转化为可溶性的木寡糖和单糖。在稀酸水解半纤维素过程中酸浓度和温度对具有综合作用，水解过程一般分为三步进行^[145]：首先由木聚糖转化为低聚木糖，在这一步酸的浓度起主要作用；随后木寡糖进一步转化为单糖则存在无催化剂自发的过程，因此随着温度的提高这种自发过程进行更剧烈；最后则是单糖向糠醛、乙酰丙酸等抑制物的进一步降解，这一过程在随酸浓度增加时表现的更加显著。

预处理条件对预处理后小麦秸秆原料中产生抑制物成分的影响如图 2.4(b)所示。预处理温度和硫酸用量的增加，糠醛、乙酸和总酚含量明显升高，而 5-羟甲基糠醛(HMF)含量基本保持不变，最高分别达到 3.1、8.6、19.5 和 0.7 mg/g 干物料。上述结果说明，在干式稀酸预处理过程中，半纤维素明显降解为寡糖和单糖，并且半纤维素与木质素之间的乙酰酯基发生断裂。随预处理强度提高，半纤维素水解增加，乙酰基团转化为乙酸、木糖进一步降解为糠醛、木质素芳香醚酯键断裂释放酚类化合物明显增加。而 HMF 作为葡萄糖的降解产物在这个过程中没有明显变化^[146]。

对不同条件预处理后的小麦秸秆进行纤维素酶水解，酶水解的葡萄糖和木糖得率如图 2.4(c)所示。随着预处理温度和硫酸用量的增加，酶水解预处理小麦秸秆的葡萄糖得率随之显著提高，而木糖得率的变化并不明显。结果表明，随着预处理温度和硫酸用量的增加，小麦秸秆中大部分半纤维素已在预处理过程中被降解为木糖单糖和寡糖，在 WIS 中残留的半纤维素可能是没有处理到慢速水解半纤维素，这种半纤维素结构可能仍然分布在预处理没有作用到的纤维素之间^[145]，因此酶解过程纤维素酶不能接触到这部分半纤维素，导致木糖得率只有 10%左右。由于大部分半纤维素的降解去除，使得小麦秸秆纤维素的接触面积增加，因此酶水解过程中葡萄糖得率明显提高。

由于小麦秸秆拆分工艺的主要目的是实现半纤维素和纤维素的分离回收，并分别用于木糖生产和纤维素乙醇的发酵，因此在确定拆分工艺中干式稀酸预处理条件时需要综合考虑木糖的回收率、纤维素的糖化效率及可发酵性能。综上所述，确定预处理条件：硫酸用量为 15 mg/g DM，温度为 175 °C，此时，木糖总糖回收率较高，可达 95.7% (18.6% 单糖、43.4% 寡糖和 32.2% 聚糖)。抑制物含量基本低于对 *S. cerevisiae* 产生 50% 致死的浓度水平^[92]，乙酸、糠醛、HMF 和总酚含量分别为 4.0、0.8、0.34 和 16.7 mg/g DM。尽管纤维素酶解过程葡萄糖得率为 79.1%，但是稀酸“后水解”在转化木聚糖的同时也能进一步提高纤维素酶解效果。

2.3.2 稀酸“后水解”转化木糖寡糖和聚糖为单糖

对预处理小麦秸秆全浆液进行稀酸“后水解”处理，目的在于将残留于固体部分的木聚糖以及液体部分的木寡糖全部转化为单糖，实现木糖的最大限度的回收。在稀酸“后水解”处理操作中，影响木糖水解得率和抑制物形成的主要因素包括：酸的用量以及水解体系的固含量。

2.3.2.1 硫酸用量对稀酸“后水解”处理的影响

首先考察了硫酸在不同用量下对木糖得率和抑制物含量的影响。如图 2.5 所示，随着硫酸用量提高到 0.5%，木糖得率明显增加，而继续提高酸用量对木糖得率影响不大。在硫酸用量低于 0.5% 时，延长水解时间能够显著提高木糖总糖和单糖得率。葡萄糖得率在“后水解”过程中接近 10% 并且无显著变化（图 2.5a）。

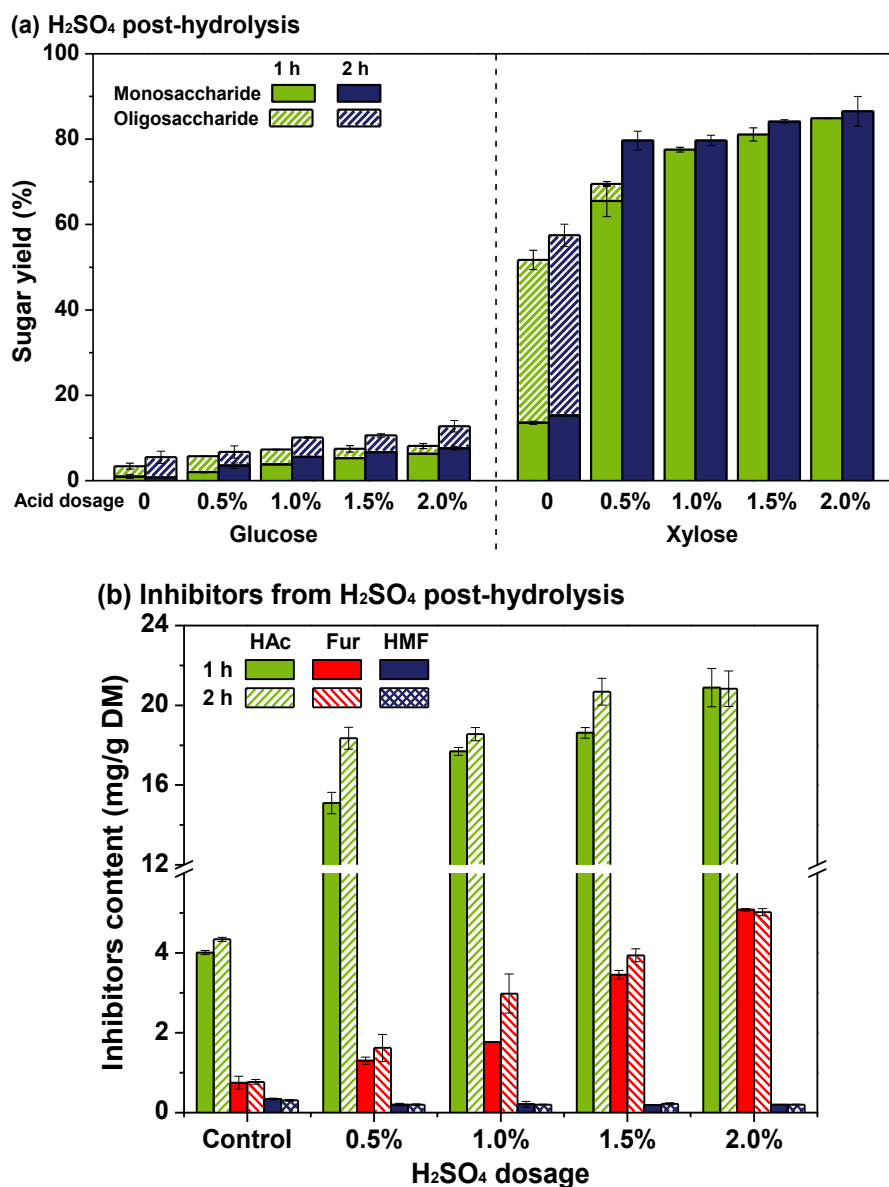


图 2.5 稀酸“后水解”处理对木糖回收的影响

(a)对糖得率的影响；(b)对抑制物含量的影响

Fig. 2.5 Effect of post-hydrolysis on the xylose yield and inhibitors formation. Post-hydrolysis was performed at solids loading of 10%, 121 °C for 1 and 2 h unless mentioned elsewhere. (a) Effect on the xylose yield; (b) Effect on the inhibitors formation.

“后水解”酸用量对抑制物含量变化的影响，乙酸和糠醛含量随“后水解”过程酸用量增加显著提高。其中乙酸含量的提高最为明显，由于乙酸是半纤维素及寡糖中乙酰基降解的产物，因此随着水解过程木糖得率的提高，乙酸浓度也随之明显提高。由于稀

酸催化葡萄糖进一步降解为 5-羟甲基糠醛(HMF)需要较高温, 因此 HMF 含量在“后水解”过程中变化不大(图 2.5b)。

基于上述结果, 确定稀酸“后水解”条件为硫酸用量 0.5%, 水解 2 h。此时, 木糖得率均可以达到 83.2%, 抑制物乙酸、糠醛和 HMF 含量可以分别控制在 16、1.5 和 0.5 mg/g DM。

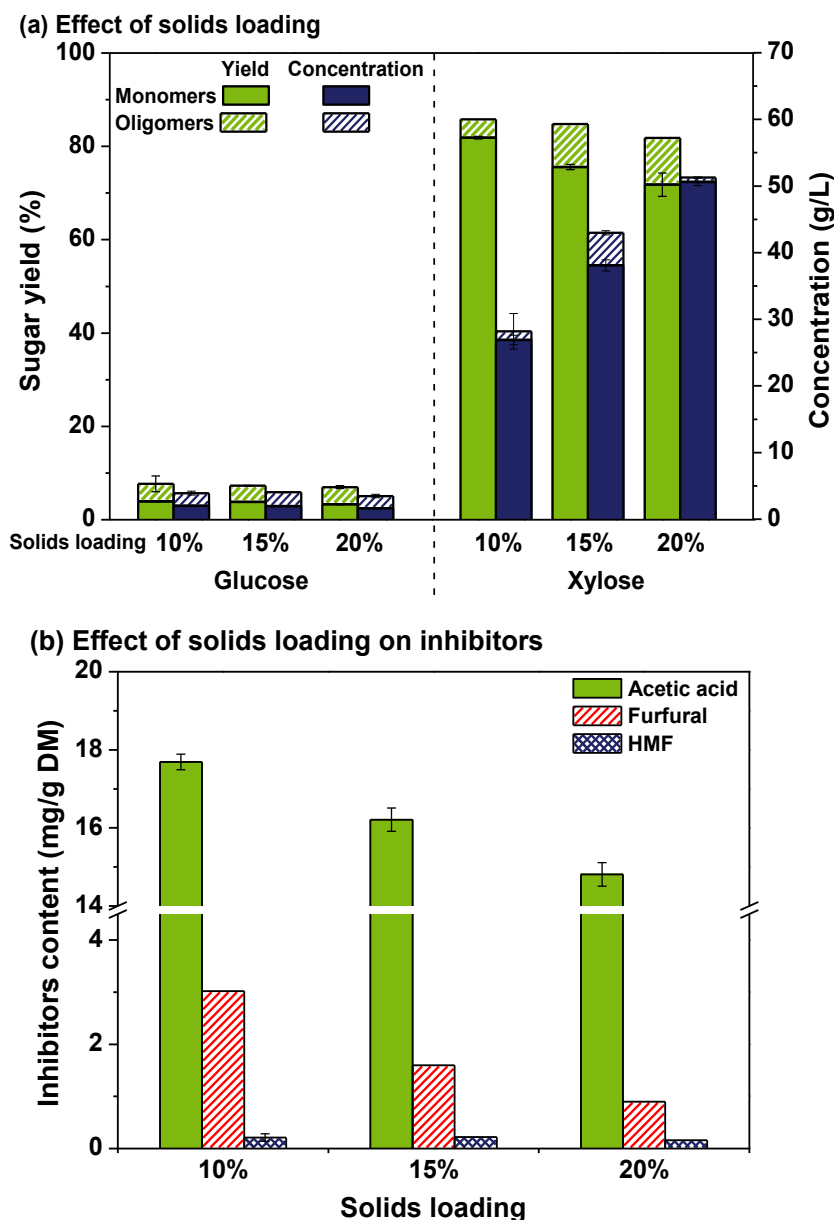


图 2.6 稀酸“后水解”处理的固含量对木糖回收和抑制物形成的影响

(a)对木糖得率和浓度的影响; (b)对抑制物形成的影响

Fig. 2.6 Effect of solids loading on the xylose recovery and inhibitors formation. Post-hydrolysis was performed at solids loading of 10, 15, 20% (w/w), respectively, 121 °C for 1 and 2 h unless mentioned elsewhere. (a) Effect on the xylose yield; (b) Effect on the inhibitors formation.

2.3.2.2 固含量对稀酸“后水解”处理的影响

稀酸“后水解”的固含量对木糖得率和浓度以及抑制物含量变化的影响如图 2.6。随固含量的提高，水解的木糖总糖和单糖得率均有所下降，同时抑制物含量也随之明显降低。可能是由于稀酸溶液浓度固定，随固体含量增加导致酸用量基于干物料的量相对降低。在 20%固含量时，硫酸水解的木糖总糖得率仍可以达到 80%以上，木糖浓度可达 54.3 g/L。尽管在 10%固含量时，硫酸水解的木糖得率已经接近 90%，但是木糖浓度 28.5 g/L（图 2.6a）。考虑到低浓度木糖会增加后续提纯精制过程的能耗，进一步增加木糖生产的成本，因此最终确定稀酸“后水解”操作的固含量为 20%（w/w）。

2.3.3 小麦秸秆拆分策略

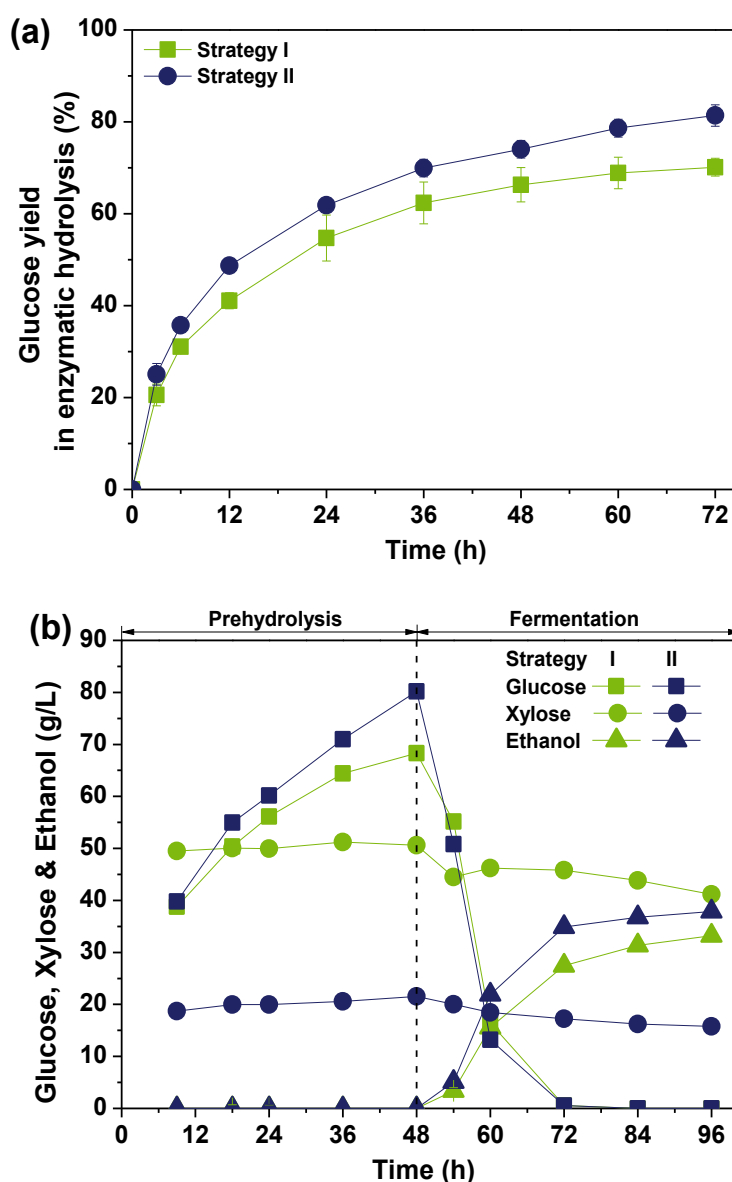


图 2.7 小麦秸秆拆分策略对纤维素酶解和乙醇发酵的影响

Fig. 2.7 Effect of fractionation strategies on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation. (a) Enzymatic hydrolysis: solids loading of 20% (w/w), 15 FPU/g DM, 50°C, pH4.8 for 72 h; (b) SSF: inoculum of 10% (v/v), 37 °C, pH5.5 for 48 h.

为了实现小麦秸秆的综合利用,将半纤维素和纤维素组分有效分离并用于后续木糖的回收和纤维素乙醇的发酵,提出了两种小麦秸秆拆分策略。策略 I: 利用两步稀酸处理后的原料直接进行酶解和乙醇发酵,发酵结束后分别进行乙醇精馏和木糖回收;策略 II: 对两步稀酸处理后的原料进行固液分离,向固体中加水至初始固含量,后续操作与策略 I 相同(图 2.2)。进一步比较两种拆分策略对木糖回收和纤维素乙醇发酵的影响。

结果如图 2.7 所示,在纤维素酶解的整个过程中,20%固含量条件下两种拆分策略所得底物的酶解速率比较缓慢,在酶解糖化 48 h 后,策略 I 和策略 II 所得底物的葡萄糖得率分别为 66.3%和 74.0%,继续延长时间葡萄糖得率变化不大,最终葡萄糖得率分别为 70.1%和 81.4% (图 2.7a)。由于两种拆分策略所得底物的酶解初速度比较缓慢,因此确定预糖化 48 h 后进行 SSF。最终策略 I 的乙醇浓度低于策略 II,而木糖浓度高于策略 II (图 2.7b 和表 2.2)。上述结果可能是由于策略 II 在酶解糖化前进行固液分离,不仅能够回收木糖,同时还可以去除一部分抑制物,从而降低了抑制物对纤维素酶和菌体的抑制作用。虽然,两种策略在乙醇和木糖回收与精制过程中所需的能耗没有明显的差异。但是,拆分策略 II 的水用量几乎是策略 I 的 2 倍,进一步产生大量酸性污水,从而额外增加废水处理的成本。

表 2.2 小麦秸秆拆分策略对木糖回收和乙醇发酵的影响

Table 2.2 Fractionation strategies for xylose recovery and ethanol fermentation from wheat straw

| | | Strategy I | Strategy II |
|------------|-----------------------|------------|-------------|
| Substrate | Initial glucose (g/L) | 72.3 | 80.2 |
| Inhibitors | Acetic acid (g/L) | 3.09 | 1.23 |
| | Furfural (g/L) | 0.41 | 0.12 |
| | HMF (g/L) | 0.40 | 0.13 |
| Products | Ethanol (g/L) | 33.2 | 37.9 |
| | Yield (%) | 73.6 | 84.2 |
| | Productivity (g/L/h) | 0.69 | 0.79 |
| | Xylose (g/L) | 41.5 | 33.2 |
| | Yield (%) | 58.5 | 46.8 |
| Water | Dosage (g/100 g DM) | 400 | 703 |

Initial concentrations of glucose and inhibitors were their concentration in the fermentation slurry after enzymatic hydrolysis for 48 h.

综上所述,小麦秸秆拆分策略 I 工艺流程简单,用水量少,能够回收获得较高浓度的木糖,但是由于预处理和稀酸水解产生的抑制物对同步糖化和乙醇发酵过程中纤维素酶的活性有抑制作用,导致初始葡萄糖浓度降低,从而影响最终乙醇浓度。如果通过尝试其他种类纤维素酶能够有效改善抑制物对酶活的抑制作用,那么小麦秸秆拆分策略 I 则有希望成为一种环境友好的简单易操作的工业化生物炼制工艺。

2.4 小结

本章主要针对木糖传统工艺中存在的木质纤维素原料种类和资源的限制、木糖单糖

得率低, 以及木质纤维素其他组分难以利用等问题, 提出一种两步稀酸处理小麦秸秆综合利用木质纤维素组分的拆分工艺。该工艺不仅适用于资源丰富易得的秸秆类木质纤维素原料, 并能够有效分离纤维素和半纤维素组分用于木糖和纤维素乙醇同步生产。两步稀酸处理拆分工艺主要操作工序包括: 干式稀酸预处理、稀酸“后水解”处理和 SSF 生产纤维素乙醇与木糖回收。得到以下主要结论:

(1) 干式稀酸处理主要作用于小麦秸秆木质纤维素组分中的半纤维素, 使木聚糖在硫酸作用下转化为可溶性单糖或寡糖。综合考虑预处理原料木糖的回收率、纤维素的糖化效率及可发酵性能, 确定预处理条件: 硫酸用量为 15 mg/g 干物料, 温度为 175 °C。此时, 木糖总回收率可达 95.7%(18.6%单糖、43.4%寡糖和 32.2%聚糖); 抑制物乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛 (HMF) 和总酚含量分别为 4.0、0.8、0.34 和 16.7 mg/g 干物料, 纤维素酶解过程葡萄糖得率为 79.1%。

(2) 对预处理小麦秸秆全浆液进行稀酸“后水解”处理, 进一步将木聚糖和寡糖转化为单糖。考察硫酸用量和水解体系固含量对木糖得率影响, 确定稀酸“后水解”条件为硫酸用量 0.5%, 20%固含量, 水解 2 h。此时, 木糖得率为 71.2%, 浓度 54.3 g/L。抑制物乙酸、糠醛和 HMF 含量可以分别控制在 15.2、0.9 和 0.2 mg/g 干物料。

(3) 比较两种拆分策略对木糖回收和纤维素乙醇发酵的影响。尽管两种策略在回收乙醇和木糖浓度上略有差异, 但是拆分策略 II 的水用量几乎是策略 I 的 2 倍。其中, 拆分策略 I 工艺流程简单, 用水量少, 能够回收获得较高浓度的木糖 (41.5 g/L), 但是乙醇浓度略低 (33.1 g/L)。抑制物对同步糖化和乙醇发酵过程中纤维素酶解抑制作用可能是导致最终乙醇浓度略低的原因。如果通过尝试其他种类纤维素酶能够有效改善抑制物对酶活的抑制作用, 小麦秸秆拆分策略 I 则有希望成为一种环境友好的简单易操作的工业化生物炼制工艺。

第 3 章 预处理后木质纤维素原料酶解过程中粒径分布变化规律

3.1 引言

在以木质纤维素为原料通过微生物生产燃料乙醇或大宗化学品的生物加工过程中,将木质纤维素生物质原料水解为糖类物质的生物转化过程是非常重要的环节之一。纤维素被木质素和半纤维素部分紧密有序的包裹形成不溶性的微纤维结构,从而使木质纤维素原料对酶水解有抵抗性。通过有效的预处理方法能够去除那些阻碍纤维酶水解进行的非纤维素组分。通过了解纤维素酶与木质纤维素底物的作用机制以及深入了解木质纤维素原料在酶解过程中纤维结构的变化规律有助于提高纤维素的酶解效果并降低纤维素酶解过程的成本。

目前,关于纤维素酶解作用机制的研究大部分是以模式纤维素原料或是纯的微晶纤维素作为底物从纤维素的微观结构进行研究,而关于真实预处理木质纤维素原料的酶解作用机理的研究很少。从纤维和微纤维等超分子结构水平研究木质纤维素原料酶解机制的过程中,发现酶解初始阶段纤维束的长度和宽度均出现快速降低,然后纤维束的长度缓慢降低而宽度保持不变的颗粒尺寸分布现象,其中,纤维束的宽度集中分布在 10-30 μm 保持不变^[32, 147, 148]。这些研究仅从纤维素酶的“剪切”、“剥离”或“侵蚀”等作用模式的角度对木质纤维素酶解过程颗粒变化现象进行分析^[32],但是并没有从预处理后木质纤维素组织结构特性方面对上述酶解现象进行深入分析,而且对纤维颗粒粒径最终在 10-30 μm 保持不变的现象也没有给出明确的解释。

通常禾本植物秸秆组织结构是由表皮组织包围的薄壁组织和其中随机分布的维管束鞘组织构成。薄壁组织主要由较薄的初生壁构成,其无木质化结构、纤维素和半纤维素含量高;维管束鞘组织主要由较厚的次生壁构成,一般呈管状坚硬结构,直径大约分布在 10-30 μm ,主要起到机械支撑和运输作用,除了多糖外还有大量的木质素、蜡质和角质等成分^[23]。针对上述秸秆组织的成分组成和结构形态的特性,从底物组成和结构变化角度分析有助于进一步探究和解释酶解过程中木质纤维素颗粒粒径变化的现象。

一般认为纤维素的晶体结构和可触及性是影响纤维素酶解的主要因素。植物中天然纤维素主要以 I_{α} 和 I_{β} 型紧密有序排列的晶体结构存在。预处理作用能够改变纤维素致密的晶体结构,并且提高纤维素的可触及性。从而在木质纤维素超分子水平上会相应的出现一些独特的结构变化,例如在微管纤维的横界面上出现“位错”、滑移面或节点等不规则区域^[31, 32]。另外,在酶解过程中发现纤维素酶首先会选择性作用于纤维上的不规则区域,将纤维从该区域“剪断”^[31, 33]。因此,深入分析预处理对木质纤维素超分子结构变化的影响,对进一步解释酶解过程中木质纤维素颗粒粒径变化规律有重要作用。

本章主要对预处理秸秆在酶解过程中粒径分布变化规律从纤维尺度水平进行分析和研究。(1) 对不同酶解时间秸秆颗粒进行粒径分布检测、扫描电镜 (SEM) 观察和主要结构组分分析,从秸秆组织结构水平对酶解过程粒径分布规律进行解释;(2) 针对木

质素在秸秆次生细胞壁结构中可能起到的作用,考察脱木质素以后的原料在酶解过程中的粒径分布变化,并观察酶解过程中结构形态变化,对酶解过程中粒径分布保持恒定不变的现象进行解释;(3)针对未处理的秸秆酶解过程没有上述的粒径分布变化规律,对不同预处理条件的秸秆进行酶解,考察粒径分布做预处理强度的变化关系。(4)通过偏光显微镜观察不同预处理强度下秸秆纤维的位错结构变化,进一步解释酶解过程粒径分布规律产生的原因。

3.2 材料与方法

3.2.1 实验材料

3.2.1.1 木质纤维素原料与纤维素酶:

玉米秸秆、小麦秸秆于2011年收获自河南郸城,经清洗、干燥和粉碎后密封保存备用,干物质含量90-95%。预处理前后玉米秸秆和小麦秸秆主要成分如表3.1所示。纤维素酶活性参照2.2.1.1。

表 3.1 木质纤维素原料及预处理条件

Table 3.1 Pretreatment conditions and composition of the lignocellulosic materials

| Lignocellulosic material | Pretreatment condition | Glucan (%) | Xylan (%) | Lignin (%) | Ash (%) |
|--------------------------|---|------------|-----------|------------|---------|
| Corn stover | Without pretreatment | 35.4 | 27.8 | 11.4 | 9.8 |
| | 175 °C, 2.5% H ₂ SO ₄ , 5 min | 40.4 | 3.4 | 17.4 | 6.1 |
| Wheat straw | Without pretreatment | 38.7 | 25.9 | 14.9 | 5.2 |
| | 175 °C, 2.5% H ₂ SO ₄ , 5 min | 41.6 | 4.3 | 20.6 | 6.3 |
| | 175 °C, 2.5% H ₂ SO ₄ , 0 min | 41.2 | 3.4 | 19.2 | 5.5 |
| | 150 °C, 2.5% H ₂ SO ₄ , 0 min | 38.3 | 7.0 | 14.3 | 5.3 |

3.2.1.2 实验试剂

主要试剂见附录 I。

3.2.2 仪器设备

分样筛孔径大小分别为 100、200、400 和 600 目,分别对应 150、75、38 和 23 μm。水浴摇床及其他主要仪器设备见附录 II。

3.2.3 实验方法

3.2.3.1 预处理玉米秸秆和小麦秸秆:

干式稀酸预处理方法参照 2.2.3.1。玉米秸秆和小麦秸秆预处理条件如表 3.1 所示。

3.2.3.2 木质纤维素原料酶解糖化:

取相当于 2.5 g 干物料的上述木质纤维素原料(预处理的玉米秸秆和小麦秸秆,未处理的玉米秸秆和小麦秸秆)加入到 500 ml 锥形瓶中,利用 5 M NaOH 溶液调节原料 pH 至 4.8。然后加入一定量的 0.1 M pH4.8 的柠檬酸盐缓冲溶液和 0.4 ml 四环素乙醇溶液(10 mg/ml),保证总的酶解体系质量为 100 g,固含量 2.5% (w/w),纤维素酶用量

为 20 FPU/g 干物料。将锥形瓶置于水浴摇床中在 50°C, 150 rpm 条件下酶解 72 h。在设定的时间取 5 ml 酶解样品, 沸水浴 10 min 使纤维素酶失活, 在 11167×g 离心 5 min, 上清液通过 HPLC 检测糖浓度, 固体残渣用去离子水反复清洗离心 3 次, -4°C 冷冻保藏待测。

3.2.3.3 脱木质素处理:

对预处理后玉米秸秆和小麦秸秆进行脱除木质素处理^[23]。取一定质量的预处理秸秆加入到含有 10% 次氯酸钠的 0.1 M 盐酸溶液中, 保持体系固含量为 1% (w/w)。在 30°C, 150 rpm 条件下反应 8-12 h。减压真空抽滤, 固体部分用去离子水反复清洗至中性, -4°C 冷冻保藏待用。

3.2.3.4 筛分不同粒径范围的预处理小麦秸秆

利用标准筛对酶解 0 h, 3 h 和 12 h 的预处理小麦秸秆进行筛分。标准筛目数分别为 200、400 和 600 目, 对应孔径为 75、38 和 23 μm。分别得到粒径分布在小于 23 μm、23-38 μm、38-75 μm 和大于 75 μm 的预处理小麦秸秆颗粒, 在 105±5 °C 烘干至恒重, 测定纤维素、木质素和灰分含量。

3.2.4 分析方法

3.2.4.1 预处理前后木质纤维素主要组分测定:

参照 2.2.4.2

3.2.4.2 纤维素酶活和纤维二糖酶活测定:

参照 2.2.4.4

3.2.4.3 酶解过程中木质纤维素结构性质分析:

1) SEM 分析: 参照 2.2.4.6

2) 颗粒粒度分析:

纤维素酶解过程中木质纤维素原料粒度变化通过 Malvern 公司 Mastersizer 2000 型激光粒度分析仪 (英国, 伍斯特郡) 进行分析, 检测范围为 0.02-2000 μm。样品制备: 取 0.2 g 样品加入一定量去离子水中, 超声分散 2-5 min。检测条件: He-Ne 激光器, 633 nm 波长, 检测时间 20 s。每个样品进行两次分析测定, 结果为两次测量值的平均值。

3) 偏光显微分析:

将少量木质纤维素原料分散在去离子水中, 充分混合均匀, 取 100 μl 滴在载玻片上, 盖好盖玻片。利用 Carl Zeiss 公司 Axio Scope A1 pol 型偏光显微镜 (德国, 海登海姆) 进行观察。该偏光显微镜配有 2 个偏振片、旋转载物台和 Pixelink 数码相机。

3.2.4.4 HPLC 分析:

参照 2.2.4.7

3.2.4.5 得率计算:

参照 2.2.4.8

3.3 结果与讨论

3.3.1 秸秆木质纤维素原料酶解过程中粒径变化

预处理的小麦秸秆和玉米秸秆木质纤维素原料在纤维素酶水解过程中粒径的变化和酶解的效果如图 3.1 所示。其中酶解过程秸秆颗粒粒径分布变化采用体积加权平均值表示。在酶解初始 3 h 内，预处理的玉米秸秆和小麦秸秆平均粒径由 90-100 μm 迅速降低到 20-30 μm ，但是随着酶解时间延长（3-48 h）平均粒径不再发生明显变化。而未经预处理的小麦秸秆和玉米秸秆平均粒径在酶解过程中缓慢下降（图 3.1 a）。

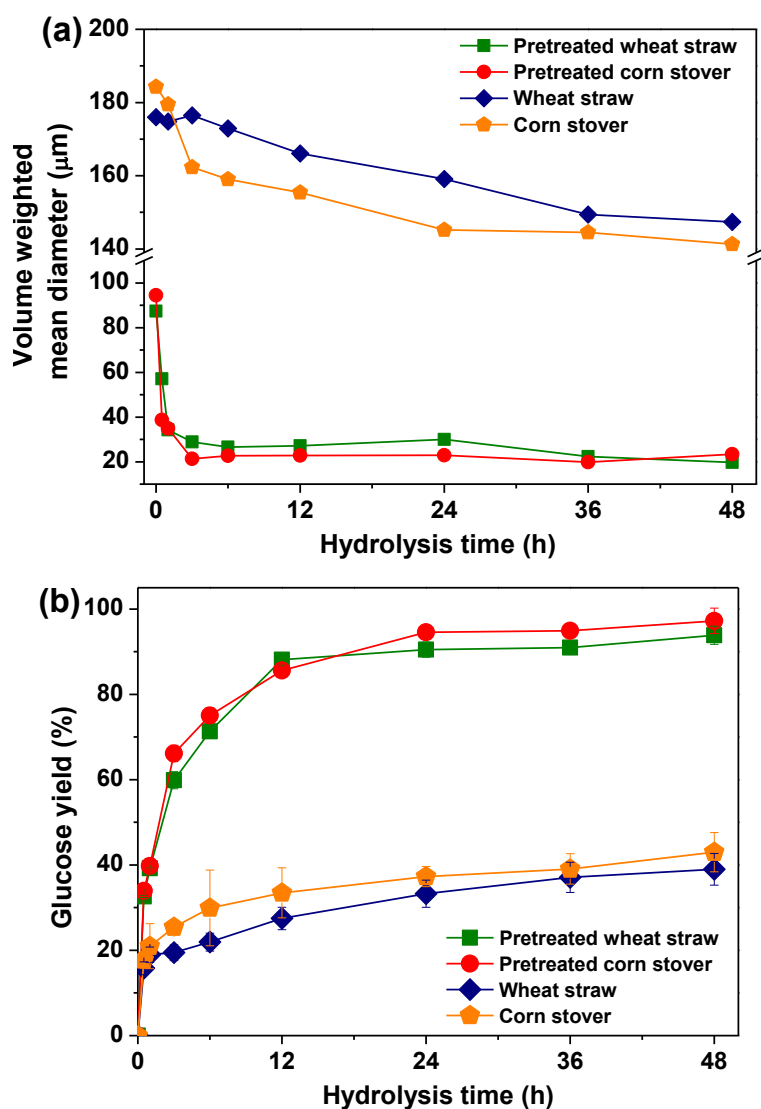


图 3.1 木质纤维素原料在酶水解过程中粒径和葡萄糖得率变化

(a)粒径变化；(b)葡萄糖得率的变化

Fig. 3.1 Particle size and glucose yield of lignocellulosic materials in enzymatic hydrolysis. (a) Change in particle size; (b) effect on the glucose yield. Enzymatic hydrolysis: solids loading at 2.5%, 20 FPU/g DM, 50°C, pH 4.8 for 48 h.

预处理玉米秸秆和小麦秸秆的酶解葡萄糖得率，在初始的 1-3 h 迅速提高，随后 6-24

h 缓慢增加, 最后 24-48 h 基本保持不变, 分别可达 96.7% 和 94.3%。未经预处理的两种秸秆底物, 其葡萄糖得率在酶解过程中缓慢增长 (图 3.1 b)。

由于预处理的小麦秸秆和玉米秸秆在酶解过程中的粒径变化显著, 因此进一步通过 SEM 对其微观形态变化进行观察。如图 3.2 所示, 未进行酶解前, 预处理的小麦秸秆和玉米秸秆主要呈现多个纤维束紧密聚集的大颗粒或由薄壁组织包围的维管束结构形成的大颗粒 (图 3.2a, 3.2e)。

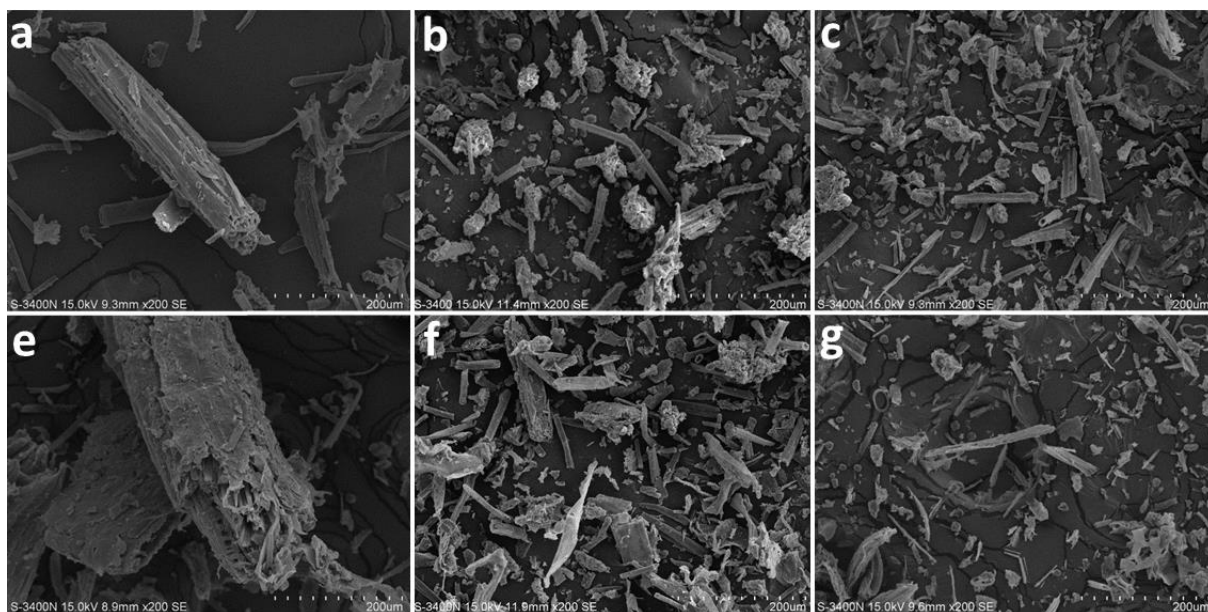


图 3.2 酶解过程中预处理木质纤维素原料的 SEM 图像

预处理的玉米秸秆 (a, b, c) 和小麦秸秆 (e, f, g) 在酶解 0、3 和 12 h 微观形态, 标尺 200 μm 。

Fig. 3.2 SEM images of pretreated lignocellulosic materials during hydrolysis. Microscopic morphology of the pretreated corn stover (a, b, c) and wheat straw (e, f, g) during enzymatic hydrolysis for 0, 3 and 12 h, respectively.

随着酶解进行, 这些颗粒尺寸从横向和纵向均有明显下降, 大颗粒迅速酶解为大量单独的纤维管状结构, 直径为 10-20 μm , 长度为 50-100 μm (图 3.2b, 3.2f)。酶解 12 h 后, 上述木质纤维素原料仍然呈现大量短小的单独存在的纤维结构 (图 3.2c, 3.2g)。尽管在上述 SEM 图像中仍然有少量长度在 100-200 μm 的大纤维出现, 但是其数量可能对粒径的加权平均值影响不大, 因此粒径平均值保持在 20-30 μm 左右 (图 3.1a)。上述秸秆 SEM 图像呈现的微观结构和形态变化与酶解过程中平均粒度变化基本一致, 而且在酶解 3 h 后大量存在直径为 10-20 μm 的纤维管状结构。

由于纤维素和木质素之间的相互作用对木质纤维素原料的酶解具有显著的影响, 因此进一步考察酶解过程中不同粒径分布范围内木质纤维素原料的木质素和纤维素含量变化与粒径变化规律之间的关系。结果如图 3.3 所示, 酶解 3 h 内, 不同粒径范围的底物纤维素和木质素含量发生显著变化, 随后 3-12 h 内木质素含量没有明显变化, 而纤维素含量仍然存在变化。粒径大于 75 μm 的大颗粒中纤维素含量较高, 在酶解初始 12 h

内快速水解。粒径小于 23 μm 的纤维管状颗粒中木质素含量较高，纤维素含量低，纤维素和木质素含量在酶解 3 h 后基本不再变化。尽管大于 75 μm 的大颗粒木质素含量与粒径小于 23 μm 的颗粒相接近，但两者可能来自不同秸秆组织。因为木质素主要存在于木质化的次生壁中，其中表皮组织和维管束组织含量最高，在大于 75 μm 的大颗粒中直观可观察到表皮，而粒径小于 23 μm 的纤维管状颗粒可能大部分来自维管束组织。

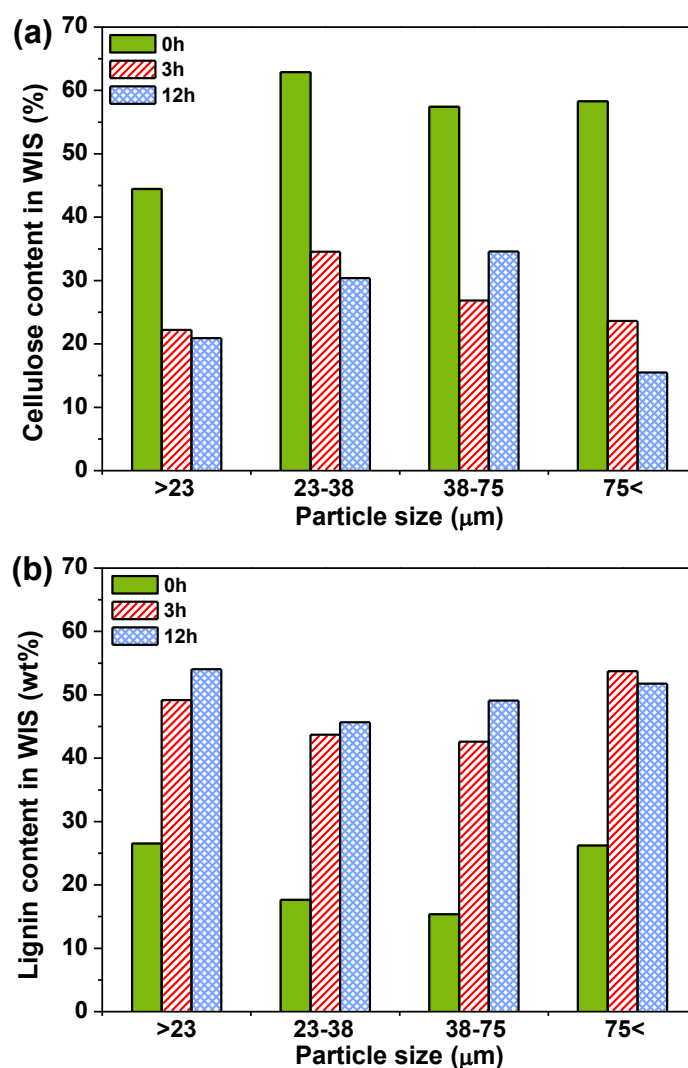


图 3.3 不同粒径范围内的预处理小麦秸秆在酶解过程中组分变化
(a)纤维素含量；(b)木质素含量

Fig. 3.3 Composition changes in the pretreated wheat straw at different particle size during hydrolysis. The pretreated wheat straw was taken from hydrolysate at 0 and 12 h, then was sieved in to 4 particle size groups (>75, 75–38, 38–23 and <25 μm)

上述结果表明，经过预处理的两种秸秆在酶解过程中平均粒径呈规律性变化，在酶解初始 3 h 内的粒径快速降低然后粒径在 20-30 μm 保持基本不变，这种粒径变化现象与 Arantes 等^[147]报道的结果一致。粒径快速降低阶段可能是由于秸秆大颗粒在酶解过程中快速水解所致。这部分大颗粒呈现薄壁组织包围维管束的形态，而且酶解过程中纤维

素含量下降速率快于其他范围的颗粒。由于薄壁组织主要由初生壁构成，壁薄、纤维素含量高，且容易被酶解^[23]，因此这部分颗粒在酶解初始阶段粒径迅速降低，从而将包裹在内部的维管束释放并形成大量单独的微管状纤维小颗粒。另外，酶解 3 h 后平均粒径在 20-30 μm 保持基本不变可能是由于这种微管状纤维小颗粒在酶解过程中保持结构基本不变（主要是直径保持在 10-20 μm ）所致。这种微管纤维颗粒形态与构成维管束组织的结构十分相似，且木质素含量较高、纤维素含量较低。由于木质素与纤维素结构的相互作用可能对其纤维素的酶解有一定抑制，因此在酶解 3 h 后结构形态以及纤维素和木质素含量基本保持不变。另一方面，在未经预处理的秸秆进行酶解过程中粒径分布变化没有出现上述显著的变化现象，进一步说明预处理作用对木质纤维素原料酶解过程的粒径分布和葡萄糖得率变化具有显著影响。

3.3.2 预处理原料中木质素组分对酶解过程粒径变化的影响

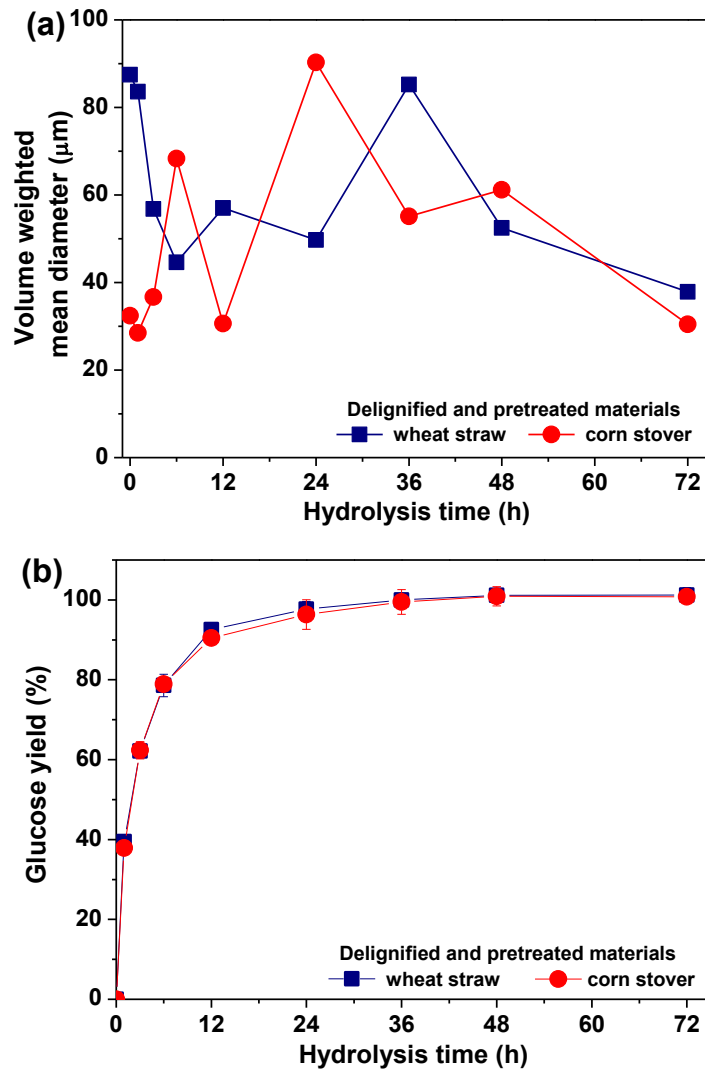


图 3.4 木质素对木质纤维素原料酶解糖化过程粒径变化和酶解效果的影响

(a)粒径变化; (b)葡萄糖得率变化

Fig. 3.4 Effect of lignin on the particle size change and glucose yield of pretreated lignocellulosic materials in enzymatic hydrolysis. (a) changes in particle size; (b) glucose yield of enzymatic hydrolysis.

因为木质素在植物细胞壁中主要起到维持细胞壁完整性和提供细胞壁刚性与强度

的作用^[16]。为了寻找导致酶解过程纤维管状颗粒结构和形态保持不变的原因。进一步分析预处理秸秆中木质素组分对酶解过程粒径变化和颗粒微观形态的影响,分别对预处理的玉米秸秆和小麦秸秆进行脱木质素处理,木质素含量(占 WIS)分别由 27.7% 和 29.9% 降为 1.48% 和 1.89%。结果如图 3.4 所示,经过脱木质素的预处理玉米秸秆和小麦秸秆在酶解过程中平均粒径分布呈现无规律的往复变化(图 3.4a),但葡萄糖得率在酶解初始 12 h 迅速升高,最终酶解得率接近 100% (图 3.4b)。与未脱木质素处理的底物酶解过程相比,粒径变化规律截然不同,而葡萄糖得率的变化趋势相似,酶解速率略快一些。

进一步通过 SEM 观察比较脱木质素处理前后底物在酶解过程中微观形态的变化。结果如图 3.5 所示,在脱木质素处理后玉米秸秆颗粒主要以纤维管状结构存在(图 3.5a),而小麦秸秆则呈现多纤维束紧密聚集的大颗粒以及单独的纤维管状结构颗粒(图 3.5b)。在酶解 72 h 后,纤维管状结构完全消失,玉米秸秆中主要出现直径小于 20 μm 的球状颗粒(图 3.5c),小麦秸秆中则主要呈现大量碎片和球状颗粒(图 3.5d)。而未脱木质素处理的两种底物在酶解 72 h 后仍有大量纤维管状结构颗粒存在(图 3.4e, f)。

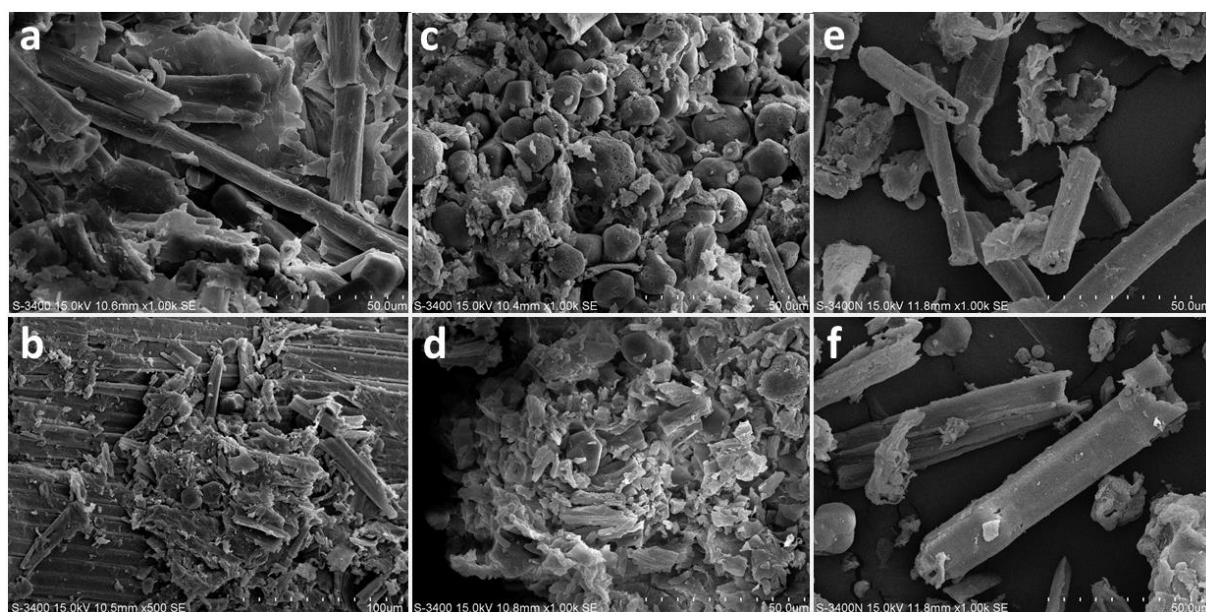


图 3.5 酶解过程中预处理木质纤维素原料的 SEM 图像

脱木质素的预处理玉米秸秆(a, c)和小麦秸秆(b, d)分别在酶解 0 h 和 72 h 的微观形态; (e, f) 分别为预处理玉米秸秆和小麦秸秆在酶解 72 h 的微观形态, (b)标尺 100 μm , 其他标尺为 50 μm 。

Fig. 3.5 SEM images of the pretreated and delignified lignocellulosic material in the enzymatic hydrolysis. The images of the delignified and pretreated corn stover (a, c) and wheat straw (b, d) at 0 h and 72 h. (e, f) Without delignified corn stover and wheat straw at 72 h. (b) 100 μm ; else bars: 50 μm .

上述结果说明木质素能够影响秸秆颗粒在酶解过程中的粒径变化规律。首先由于木质素在次生细胞壁中能够起到支撑和提供硬度和强度的作用;其次木质素与纤维素之间相互作用能够形成稳定的结构,从而减少纤维素酶与纤维素的接触。因此木质素的存在能够有效的维持纤维管状颗粒的结构形态。另外,纤维素酶只能将纤维管状颗粒表面可

接触的纤维素水解，从而在微管纤维颗粒表面形成侵蚀痕迹。

3.3.3 影响酶解过程微管状纤维尺寸的原因

预处理的目的在于破坏木质纤维素紧密的超分子结构，而且预处理前后秸秆原料在酶解过程中的平均粒径变化存在显著差异，为了进一步探究酶解过程中秸秆底物趋向于一个特定尺寸不变的原因，选择在不同预处理强度下处理的小麦秸秆作为原料，考察预处理强度对酶解过程颗粒粒径变化规律的影响。

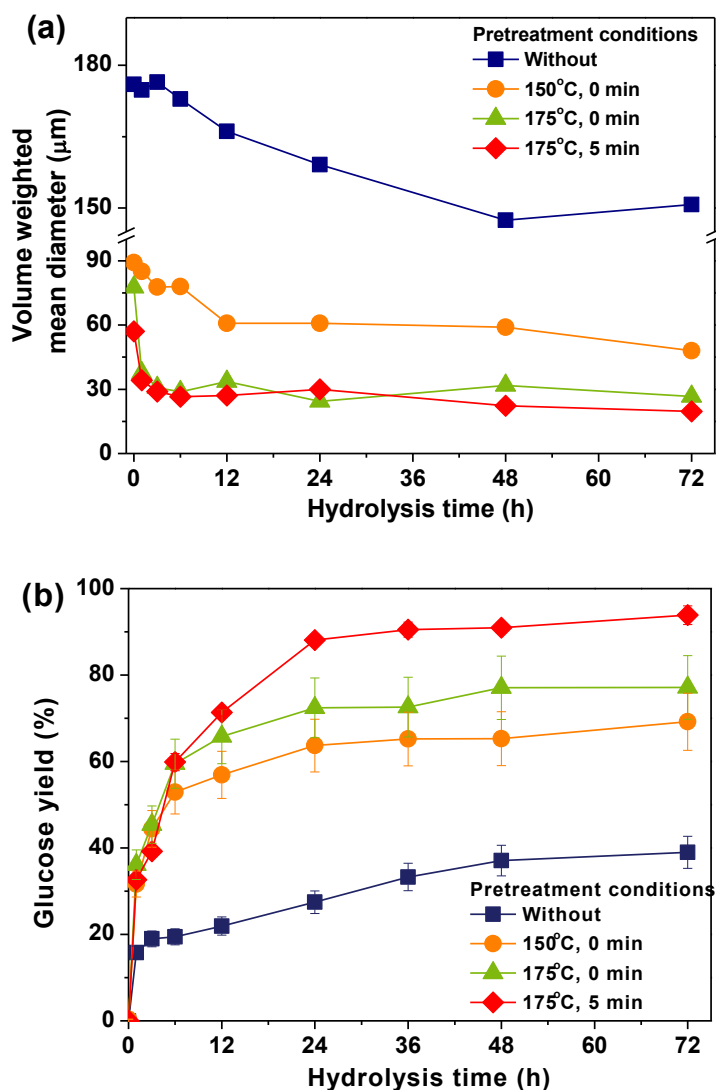


图 3.6 预处理条件对小麦秸秆酶解糖化过程粒径变化和酶解效果的影响

(a) 粒径变化; (b) 酶解葡萄糖得率

Fig. 3.6 Effect of pretreatment on the particle size and glucose yield in hydrolysis of wheat straw.

结果如图 3.6 所示，随预处理强度提高，小麦秸秆的初始平均粒径随之降低，酶解过程中平均粒径趋向的最小粒径范围也随之显著降低，而粒径降低的速率随之加快（图 3.6 a），相应的葡萄糖得率随之明显升高（图 3.6 b）。上述结果说明，预处理强度的提

高能够显著降低原料的平均粒径，加快酶解过程中颗粒平均粒径的下降速率。更显著的影响是随着预处理强度的增强，酶解过程中秸秆颗粒趋向不变的粒径范围随之明显下降。这可能是由于不同强度的预处理过程对秸秆纤维内部超分子结构造成的破坏程度不同所致。

秸秆次生壁纤维晶体结构具有光学双折射性，因此可以通过偏振光检测其纤维素晶体结构的变化。为了进一步了解预处理强度对秸秆内部纤维结构的影响，利用偏光显微镜对不同预处理强度下小麦秸秆的微管纤维进行观察。当微纤维的纵向方向与两个垂直交叉的偏振光方向中的任意一个方向平行时，微纤维出现全部变暗的消光现象。此时，如果微纤维上某个区域存在晶体结构变化，则会在微纤维的横向出现明亮的光带，这部分结构变化的区域被统称为“位错”区域^[33]。偏光显微镜结果如图 3.7 所示，随预处理强度增强，纤维长度逐渐变短，在纤维上产生的“位错”区域频率明显增加，位错区域的间隔由 87-135 μm 降低到 55-80 μm 。甚至在预处理强度最高的条件下，微管纤维上会进一步产生多处裂痕和完全断裂的区域。

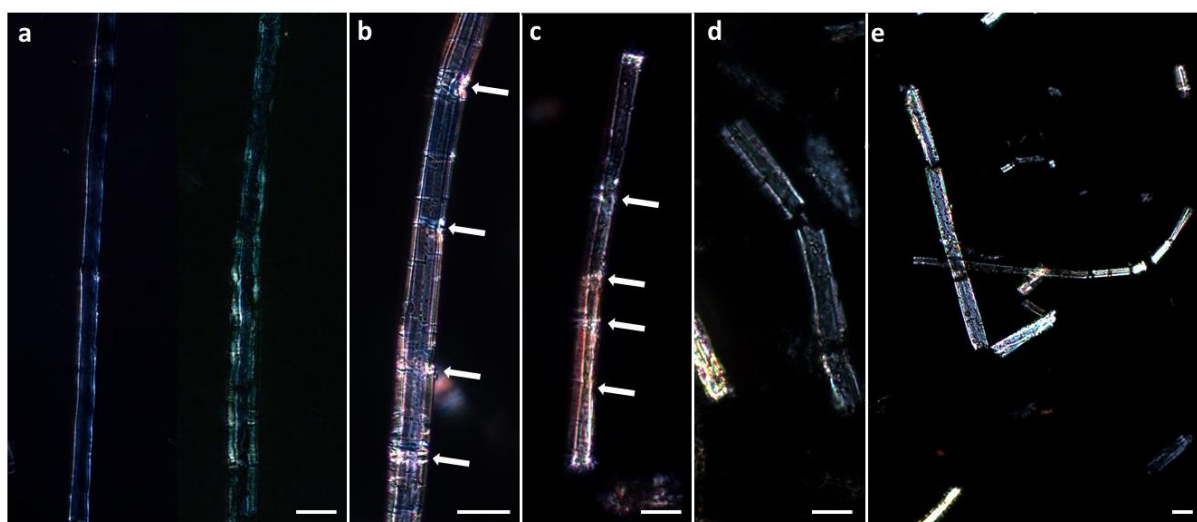


图 3.7 不同预处理强度下小麦秸秆纤维形态的偏光显微镜图像

(a) 未处理小麦秸秆；(b) 150°C 停留 0 min 预处理小麦秸秆；(c) 175°C 停留 0 min 预处理小麦秸秆；(d, e) 175°C 保持 5 min 预处理小麦秸秆。箭头指向位错区域。标尺：50 μm

Fig. 3.7 Polarizing microscope images of wheat straw fibers at various pretreatment severity. (a) without pretreatment; (b, c) were pretreated at 150°C and 175 °C, retention time 0 min, respectively; (d, e) pretreated at 175 °C, retention time 5 min. Bar: 50 μm

上述结果说明，预处理对秸秆次生壁微管纤维得纤维素晶体结构产生显著影响，从而使超分子结构发生明显变化。这可能是由于预处理过程中稀酸主要作用于纤维素内部维系其晶体结构的氢键，使其晶体结构发生部分变化，沿着微管纤维横向上产生局部扭曲。这不仅能够形成非晶体葡聚糖链，进而使纤维素晶体结构发生变化，产生具有不定

型纤维素结构的“位错”区域^[31]。另外，可能是由于这部分区域结构变得松散或纤维素结晶度下降，从而纤维素酶首先会选择性地作用于这些位错和裂痕区域，进而将长的纤维剪切成更短小的纤维管状颗粒^[32]。随预处理强度提高，在纤维上产生的位错区域更加密集，因此酶解过程中秸秆纤维颗粒最终趋向的最小粒径分布逐渐降低。

3.4 小结

本章研究发现预处理秸秆在酶解过程中平均粒径变化呈现特有的变化规律：酶解初始 3 h 内颗粒平均粒径迅速降低，随后粒径在 20-30 μm 基本保持不变的现象。粒径迅速下降可能是由于大颗粒外层的薄壁组织快速酶解所致；粒径在 20-30 μm 基本保持不变可能与预处理秸秆中微管状纤维颗粒和预处理作用强度两方面因素有关。综上所述，得到以下主要结论：

(1) 通过对预处理前后的玉米秸秆和小麦秸秆纤维素酶解过程中颗粒平均粒径分布和葡萄糖得率的分析，发现预处理秸秆在酶解过程中平均粒径变化呈现特有的变化规律：酶解初始 3 h 内颗粒平均粒径迅速降低，随后粒径在 20-30 μm 基本保持不变。

(2) 进一步观察酶解过程中预处理秸秆的微观形态，分析不同粒径范围内颗粒的成分组成变化，发现大颗粒底物呈现薄壁组织包裹微管束的结构形态，并且纤维素含量较高。在酶解过程中纤维素含量较高的薄壁组织迅速酶解可能是导致酶解初始过程平均粒径迅速下降的原因。

(3) 大颗粒发生快速酶解后出现大量微管状纤维颗粒，并且在后续酶解过程中结构形态（微管纤维直径保持在 10-20 μm ）和组分（纤维素和木质素含量）保持不变。这些直径为 10-20 μm 、木质素含量的微管状纤维与秸秆维管束组织中次生壁微管的特性一致。这种次生壁微管结构初步发生木质化，木质素含量较高，壁厚具有一定强度在秸秆中起支撑和运输作用。另外由于周围有薄壁组织包围，预处理可能不对这种结构破坏不彻底。因此这种微管状纤维结构可能是导致酶解过程中平均粒径趋于不变的原因。

(4) 进一步考察木质素对微管状纤维颗粒形态的影响，对脱木质素的预处理秸秆进行酶解。结果发现酶解过程中底物平均粒径分布出现无规律往复变化，而并不像上述粒径变化规律所呈现的最终趋向一个尺度保持不变。另外形态由初始的微管状变为碎片和球形颗粒。由此说明木质素对保持维管状纤维结构形态有重要作用，进一步证明上述木质素含量较高的微管纤维结构是导致平均粒径趋于不变的主要原因。

(5) 从秸秆木质纤维素超分子结构水平分析预处理强度对酶解过程秸秆颗粒晶体结构变化的影响，发现预处理强度越高，秸秆颗粒粒径所趋向的尺寸越小，并且在这一尺度保持不变。进一步通过偏光显微镜观察秸秆纤维晶体结构变化，发现高强度预处理使微管纤维上产生更多超分子结构“位错”区域。纤维素酶中的内切葡聚糖酶会选择性地作用于这些“位错”区域，并将其降解为更小的纤维管状颗粒。因此说明预处理强度对粒径所趋向的尺寸起决定作用。

第 4 章 提高酿酒酵母酚类抑制物耐受性的驯化策略

4.1 引言

目前,纤维素乙醇产业化发展所面临的最大的挑战任然是加工成本过高。其中一个主要原因在于利用木质纤维素原料进行乙醇生产时发酵液中乙醇浓度较低,导致精馏所需的能耗过高,从而增加生产成本。选择纤维素含量高的木质纤维素原料能够有效提高发酵体系中的纤维素含量,进一步提高乙醇的发酵浓度。目前,中国每年产生两千万吨玉米芯,由于其半纤维素含量较高而作为原料用于木糖醇或糠醛的生产,但是同时会产生接近 50 万吨的玉米芯固体废渣(CCR)^[149, 150]。由于生产木糖的过程中经过稀酸水解操作,已经有效的去除了半纤维素同时破坏了木质纤维素的顽抗结构,从而使 CCR 具有丰富的纤维素成分,而且在酶解时无需进行预处理。由于上述优点 CCR 已经成为一种非常有潜力的木质纤维素原料被用于纤维素乙醇发酵的研究^[151, 152]。

通过以前的研究报道发现当利用酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 发酵 CCR 生产乙醇时,菌种会出现显著的延滞期过长和发酵性能下降的现象^[153]。只有当木质纤维素原料中存在乙酸、甲酸、糠醛、5-羟甲基糠醛或酚类衍生物时才会出现上述现象。但是,在生产木糖的过程中经过多次水洗操作,水溶性的抑制物已经从 CCR 上去除。然而,有一类水溶性较差的或水不溶的酚类抑制物可能会沉淀并积累在 CCR 上。这类抑制物主要由木质素在酸水解过程中降解产生,随着酶解和发酵的进行,可能会从 CCR 固体残渣中释放出来并进入水解液中。因此,这些酚类化合物可能是导致菌种发酵 CCR 时出现生长和发酵变差的主要原因。另外,目前没有合适的方法能去除 CCR 上的水不溶酚类物质,因为通常的脱毒方法,如过碱处理、电化学处理和离子交换处理等只适用于液体体系^[154]。尽管生物脱毒能对固体物料起作用,但是由于水洗过程同时去除了 CCR 的营养成分使脱毒菌种不能良好生长^[111]。

本章主要研究目的是在发酵 CCR 生产乙醇过程中利用驯化策略提高乙醇发酵菌 *S. cerevisiae* DQ1 对抑制物的耐受性。具体研究内容包括:(1)分析 CCR 中主要抑制物成分,考察 *S. cerevisiae* DQ1 对这些抑制物的耐受性;(2)利用驯化策略提高 *S. cerevisiae* DQ1 对 CCR 发酵体系中抑制物的耐受性;(3)在高固含量 CCR 发酵体系下,考察发酵操作条件对 *S. cerevisiae* DQ1 进行同步糖化和乙醇发酵的影响;(4)进行发酵体系放大,并与其他利用 CCR 发酵生产乙醇的工艺进行比较。

4.2 材料与方法

4.2.1 实验材料

4.2.1.1 原料和纤维素酶

玉米芯残渣(CCR)由龙力生物技术有限公司(中国,山东)提供,含水量为 66.3%。葡聚糖和木聚糖基于干物质的含量分别为 56.5%和 2.6%。

纤维素酶参数信息参照 2.2.1.1。

4.2.1.2 主要试剂

酚类抑制物：2-糠酸、愈创木酚、对羟基苯甲酸、对香豆酸和阿魏酸均为分析纯，购自 Sigma-Aldrich（美国，密苏里州）。生化试剂及其他化学试剂参照附录 I。

4.2.1.3 菌种和培养基

菌种：酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 (CGMCC 2528) 菌种信息参照 2.2.1.3。细胞干重根据菌体干重和细胞 OD₆₀₀ 吸光值标准曲线计算，OD₆₀₀ 吸光值为 1 时对应 0.5 g/L 细胞干重。

培养基：

(1) 合成培养基参照 2.2.1.3。

(2) 抑制物培养基：二甲基亚砜 (DMSO) 作为助溶剂将 2-糠酸、愈创木酚、对羟基苯甲酸、对香豆酸和阿魏酸分别溶解制成母液，通过孔径为 0.22 μm 滤膜过滤除菌。取适量母液加入到合成培养基中，使各抑制物含量达到设定浓度，其中 DMSO 的浓度不超过 0.7% (v/v)。经验证该浓度的 DMSO 不会对 *S. cerevisiae* DQ1 产生影响（数据未列）。

(3) 驯化培养基：在 15% 固含量条件下制备玉米芯残渣 (CCR) 水解液，用去离子水将其稀释为 50% (CCR 水解液：去离子水=50:50, v/v)、75% (CCR 水解液：去离子水=75:25, v/v) 和 100% (不稀释的 CCR 水解液) 三个不同浓度梯度。其他营养盐浓度与合成培养基中相同。

(4) SSF 发酵培养基参照 2.2.1.3。

4.2.2 仪器设备

50 L 容量发酵罐配有螺带式搅拌桨，具体结构信息参考本课题组已发表论文^[155]。其他仪器设备参照附录 II。

4.2.3 实验方法

4.2.3.1 玉米芯残渣水解液制备：

在 5 L 发酵罐中分别加入 1150 g 含水量为 69% 的玉米芯残渣 (CCR) 和 1200 ml 灭菌后的去离子水，使酶解初始固含量为 15% (w/w)。利用 5 M NaOH 溶液调节糖化体系 pH 值为 4.8。纤维素酶用量为 15 FPU/g 干物料。在 50°C、150 rpm 条件下进行酶解糖化 48 h。在 16125×g 条件下离心 10 min 将上述 CCR 水解物固液分离。收集上清液在 115°C 条件下灭菌 20 min，然后在超净工作台中用滤纸将灭菌后产生的沉淀物滤除，4°C 保藏备用。

4.2.3.2 种子培养：

S. cerevisiae DQ1 种子培养具体方法参照 2.2.3.5。

4.2.3.3 抑制物条件下菌种培养：

取一支保藏 *S. cerevisiae* DQ1 的 2 ml 冻存管，在 37°C 快速复苏。在超净工作台中将其接入事先灭菌的装有 20 ml 种子培养基的 100 ml 摇瓶中，置于气浴摇床中，在 30°C、

转速 150 rpm 条件下活化培养 18 h。然后以 10% 的接种量将活化后菌液转接到事先灭菌的抑制物培养基中在上述条件下培养 24 h，在设定时间取 1 ml 样品在 $11167\times g$ 条件下离心 5 min。上清液用于 HPLC 分析葡萄糖和乙醇浓度，菌体稀释后在 OD_{600} 条件测定菌体浓度。每个抑制物浓度条件进行两次平行试验，实验结果为两次检测的平均值。

4.2.3.4 利用玉米芯残渣水解液驯化 *S. cerevisiae* DQ1:

参照 2.2.3.5 具体步骤活化 *S. cerevisiae* DQ1 菌体。

驯化步骤：将活化后的菌体在含有不同浓度梯度玉米芯残渣（CCR）水解液的驯化培养基中进行一系列转接和培养。具体五种驯化酵母菌种的方法如图 4.1 所示。

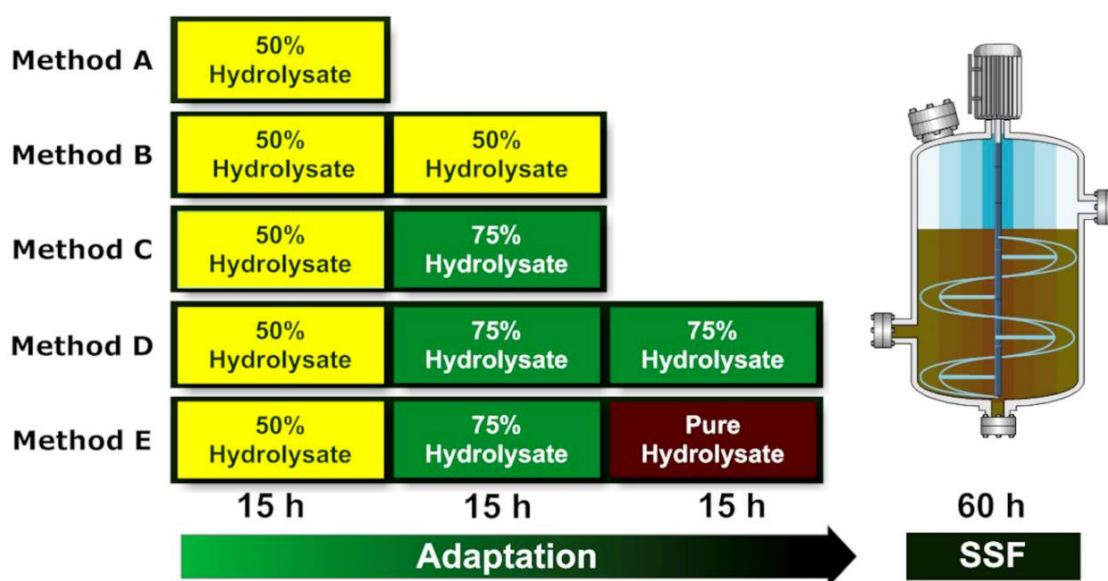


图 4.1 短期菌种驯化策略示意图

Fig. 4.1 Schematic illustration of the short term adaptation strategy

方法 A: 将活化后的酵母菌种转接到 200 ml 50% CCR 水解液的驯化培养基中培养；

方法 B: 第一步与方法 A 相同，然后将 50% CCR 水解液驯化培养基中培养的菌种再转接到 200 ml 50% CCR 水解液的驯化培养基中培养；

方法 C: 第一步与方法 A 相同，然后将 50% CCR 水解液驯化培养基中培养的菌种再转接到 200 ml 75% CCR 水解液的驯化培养基中培养；

方法 D: 前两步与方法 C 相同，然后将 75% CCR 水解液驯化培养基中培养的菌种再转接到 200 ml 75% CCR 水解液的驯化培养基中培养；

方法 E: 前两步与方法 C 相同，然后将 75% CCR 水解液驯化培养基中培养的菌种再转接到 200 ml 100% CCR 水解液的驯化培养基中培养。

上述驯化培养步骤都是以 10% (v/v) 接种量进行转接，在 30℃、pH 6.0 条件下培养 15 h。驯化后的菌种以 10% (v/v) 接种量转接到 CCR 固含量为 25% (w/w) 的发酵体系中进行同步糖化与乙醇发酵，考察不同驯化方法对 *S. cerevisiae* DQ1 在 CCR 中发酵性能的影响。

4.2.3.5 同步糖化与乙醇发酵 (SSF)

具体操作参照 2.2.3.6

4.2.4 分析方法

4.2.4.1 玉米芯残渣主要组分分析:

玉米芯残渣中葡聚糖和木聚糖含量测定方法参照 2.2.4.2。

4.2.4.2 总酚含量测定:

玉米芯残渣中总酚含量测定参照 2.2.4.4。

4.2.4.3 气相色谱法-质谱联用仪分析 (GC-MS):

玉米芯残渣水解液中酚类抑制物成分利用美国 Agilent Technologies 公司 Agilent 6890 型 GC-MS 进行定性分析。首先利用德国 CNW 公司 Poly-Sery PSD SPE 型 250 mg/3 ml 规格的固相萃取小柱对水解液中酚类抑制物进行选择萃取。然后利用 N,O-双(三甲硅烷基)三氟乙酰胺对萃取得到的样品进行硅烷化处理。最后将硅烷化的样品通过孔径为 0.22 μm 滤膜进行过滤, 在配有 HP-5 MS 型色谱柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μm) 的 GC-MS 上进行检测。程序升温条件: 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 速率由 80 $^{\circ}\text{C}$ 升至 280 $^{\circ}\text{C}$ 。进样量为 1 μl , 不分流。

4.2.4.4 HPLC 分析:

葡萄糖、木糖、乙醇、乙酸、甲酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛浓度测定参照 2.2.4.7。

对羟基苯甲醛、香草醛和丁香醛浓度利用配有日本岛津公司 SPD-20A 型 UV/Vis 检测器和日本 YMC 公司 YMC-Pack ODS-A 型色谱柱 (150 mm \times 4.6 mm) 的 HPLC 检测。紫外检测器波长为 270 nm, 柱温箱温度 35 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为水和乙腈以 70:30 (v/v) 混合, 流速 1.0 ml/min。所有样品都要在 11167 $\times\text{g}$ 条件下离心 5 min, 取上清液经孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤后进行 HPLC 检测。

4.2.4.5 得率计算:

乙醇得率计算参照 2.2.4.8。

4.3 结果与讨论

4.3.1 *S. cerevisiae* DQ1 利用玉米芯残渣的发酵性能

为了考察酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 在玉米芯残渣 (CCR) 发酵体系中的发酵性能, *S. cerevisiae* DQ1 利用 CCR 在 25% 固含量条件下进行同步糖化与乙醇发酵 (SSF)。结果如图 4.2 所示, *S. cerevisiae* DQ1 表现出很长的延滞期和较差的发酵性能。整个产生葡萄糖的过程包括初始的 12 h 预糖化阶段和后续 64 h 的 SSF 阶段。在初始 12 h 能够产生 78.98 g/L 葡萄糖。而 *S. cerevisiae* DQ1 将葡萄糖消耗完全需要 76 h。与通常酵母利用玉米秸秆、云杉和玉米芯作为原料进行乙醇发酵相比, 这个发酵时间比消耗相同量的葡萄糖所需要的时间要长 50 h。另外利用 CCR 为原料时, *S. cerevisiae* DQ1 在发酵初始 24 h 的乙醇生产速率只有 0.61 g/L/h。这比利用上述其他木质纤维素原料发酵生产乙醇的速率低 3-5 倍^[156-158]。

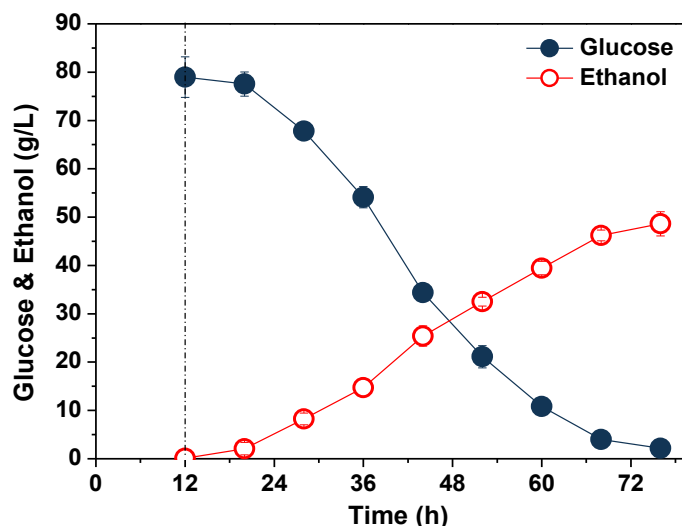


图 4.2 *S. cerevisiae* DQ1 利用玉米芯残渣为原料进行 SSF 的发酵性能

Fig. 4.2 Fermentation performance of *S. cerevisiae* DQ1 in SSF using CCR. Conditions: Prehydrolysis: 25% solids loading, cellulase 15 FPU/g DM, 50 °C and pH 4.8 for 12 h. SSF: at 37 °C and pH 5.5.

表 4.1 GC-MS 分析玉米芯残渣水解液中酚类化合物组成和结构

Table 4.1 GC-MS analysis of composition and structure of phenolics in hydrolysate of CCR

| Trimethylsilylatd (tms) compounds | Structure of compounds | RT (min) | MW | Quantification ions | Solubility* (g/100 ml) |
|-----------------------------------|------------------------|----------|-----|---------------------|------------------------|
| tms 2-furoic acid | | 7.88 | 169 | 95,125,169 | 2.71 ^a |
| tms guaiacol | | 9.78 | 196 | 166,181,196 | 1.70 ^b |
| tms <i>p</i> -hydroxybenzoic acid | | 16.53 | 282 | 223,267,282 | 0.50 ^b |
| tms <i>p</i> -coumaric acid | | 20.66 | 308 | 294,293,308 | 0.10 ^c |
| tms ferulic acid | | 22.50 | 338 | 293,323,338 | 0.59 ^d |

*Solubility of the original compounds without silylation in water at 25°C.

^a. Harrison, R. J., Moyle, M., 1956. 2-FUROIC ACID. Org. Synth., 36, 36

^b. Yalkowsky, S.H., He, Yan., 2003. An Extensive Compilation of Aqueous Solubility Data for Organic Compounds Extracted from the AQUASOL DATAbASE, in: Yalkowsky, S.H., He, Yan. (eds.), Handbook of Aqueous Solubility Data. CRC Press LLC, Boca Raton, FL., pp. 377-398

^c. Tetko, I.V., Tanchuk, V.Y., Kasheva, T.N., Villa, A.E., 2001. Estimation of aqueous solubility of chemical compounds using E-state indices. J. Chem. Inf. Comput. Sci., 41, 1488-1493

^d. US EPA; Estimation Program Interface (EPI) Suite. Ver.3.12. Nov 30, 2004. Available from, as of Oct 27, 2008: <http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedl.htm>

为了进一步找出导致 *S. cerevisiae* DQ1 生长和发酵性能变差的原因，对 25%固含量

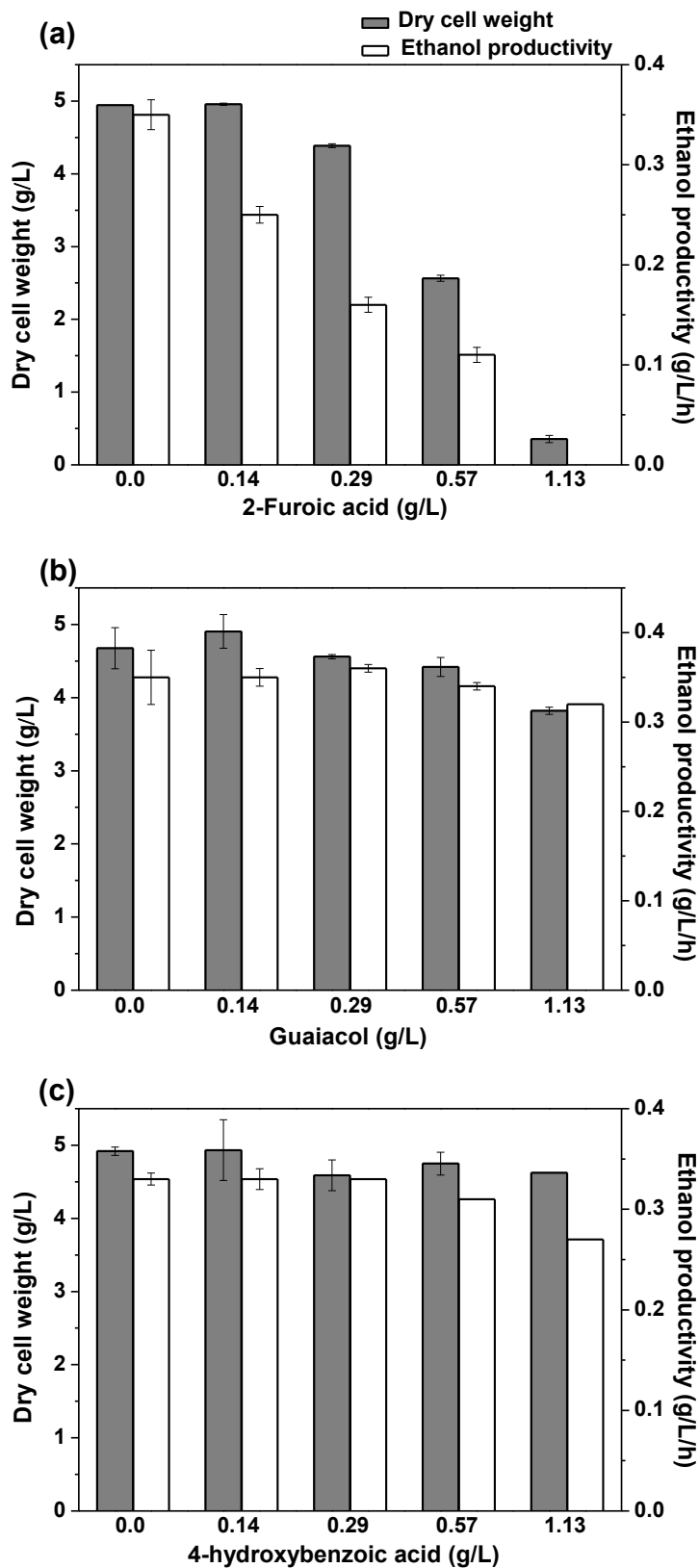
下制备的玉米芯残渣(CCR)水解液进行常规抑制物分析。但是结果出乎意料的是糠醛、5-羟甲基糠醛、甲酸、香草醛、丁香醛和对羟基苯甲醛等常见的木质纤维素来源抑制物浓度都低于 0.005 g/L, 含量较高的乙酸和乙酰丙酸浓度接近 0.20 g/L, 这些抑制物的含量并未达到对酵母发酵产生显著抑制的浓度^[92, 159]。

通过选择性萃取的手段对 CCR 水解液中低浓度的物质进一步筛选, 并利用 GC-MS 进行定性分析(谱图见附录 III)。结果如表 4.1 所示, CCR 水解液中含有五种酚类化合物, 分别为 2-糠酸、愈创木酚、对羟基苯甲酸、对香豆酸和阿魏酸, 值得注意的是这五种化合物大多数是水中溶解度较低的酚酸形式的木质素衍生物, 溶解度分别为 2.71、1.70、0.50、0.10 和 0.59 g/100 ml 水。因此, 说明这些酚类化合物可能是在稀酸水解过程中产生, 由于溶解度较低经过多次水洗也不能从 CCR 上去除。

4.3.2 *S. cerevisiae* DQ1 对玉米芯残渣中抑制物的耐受性

为了进一步说明这些酚类化合物可能是导致酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 利用玉米芯残渣(CCR)发酵乙醇时性能较差的原因, 分别考察了上述五种酚类化合物在合成培养基中对 *S. cerevisiae* DQ1 细胞生长和发酵性能的影响。结果如图 4.3 所示, 2-糠酸在最低浓度 0.14 g/L 条件时能够使 *S. cerevisiae* DQ1 的生长和乙醇生产速率受到显著抑制。对香豆酸和阿魏酸在较低的浓度(0.25 g/L)下对 *S. cerevisiae* DQ1 的菌体生长和乙醇发酵产生显著抑制。与其他酚类化合物对 *S. cerevisiae* 抑制作用的相关报道比较^[92], 上述结果表明 *S. cerevisiae* DQ1 的细胞生长和乙醇发酵对酚酸抑制物的存在非常敏感。上述 CCR 水解液中的酚类化合物对 *S. cerevisiae* DQ1 产生抑制作用的浓度都是低于它们在水中的溶解度的。由于上述酚类抑制物在水中溶解度较低, 而且主要积累或吸附在 CCR 上, 在同步糖化和乙醇发酵过程中会与酿酒酵母直接接触导致抑制作用。因此通过有机溶剂萃取方式对 25%固含量条件下制备的 CCR 水解物全浆液(固液混合物)进行总酚含量测定。结果表明 25%固含量的 CCR 水解物全浆液中总酚含量达到 5.59 g/L, 这个含量明显高于 CCR 水解液中酚类抑制物的浓度。

综上所述, 这些水溶性较低的酚类化合物在玉米芯残渣(CCR)水解物全浆液中浓度较高的原因可能是由于稀酸水解玉米芯生产木糖后经过多次水洗操作而使其在 CCR 上发生积累所致。而在酶解和同步糖化发酵过程中这些酚类化合物能够从固体中释放出来进入液体部分^[160], 使液体中酚类物质浓度保持一个恒定的浓度, 从而对 *S. cerevisiae* DQ1 的细胞生长和乙醇发酵产生抑制作用。因此尽管这些酚类化合物浓度较低, 但能够导致 *S. cerevisiae* DQ1 在利用 CCR 时出现细胞生长和乙醇发酵性能变差的现象。



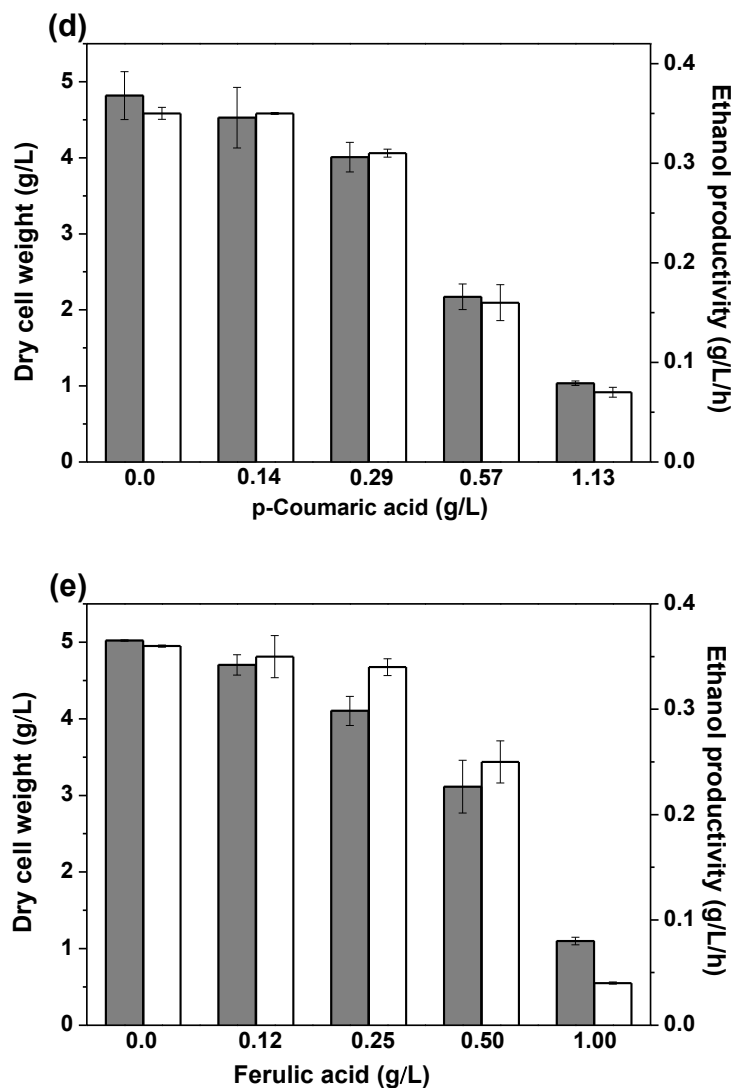


图 4.3 玉米芯残渣中酚类抑制物对 *S. cerevisiae* DQ1 的抑制作用

(a) 2-糠酸; (b) 愈创木酚; (c) 对羟基苯甲酸; (d) 对香豆酸; (e) 阿魏酸

Fig. 4.3 Inhibition of phenolic compounds in CCR on *S. cerevisiae* DQ1. Conditions: 250 mL flask containing 40 mL of the synthetic medium with the individual inhibitors at various concentration, 10% (v/v) inoculation ratio, at 30°C for 24 h. All experiments were performed in duplicate. The phenolic monomers include: (a) 2-furoic acid, (b) guaiacol, (c) *p*-hydroxybenzoic acid, (d) *p*-coumaric acid, (e) ferulic acid.

4.3.3 驯化策略提高 *S. cerevisiae* DQ1 对玉米芯残渣的发酵性能

适应进化的方法能够有效提高酵母细胞对木质纤维素来源抑制物的耐受性, 并且改善其在木质纤维素原料中的发酵性能。本章提出一种逐步驯化酵母的策略, 将菌体在含有玉米芯残渣 (CCR) 水解液的驯化培养基中连续转接培养, 在这个过程中 CCR 水解液的浓度梯度逐渐提高。通过将驯化后的菌种转接到 25% 固含量的 CCR 发酵体系进行同步糖化与乙醇发酵考察五种不同的驯化方式对菌种发酵性能的影响。

结果如图 4.4 和表 4.2 所示, 经过一步驯化的菌种 (方法 A) 在同步糖化与乙醇发酵 (SSF) 初始 12 h 内葡萄糖消耗速率和乙醇生产速率分别为 0.27 和 0.35 g/L/h, 而且

在 SSF 发酵结束时仍然可以检测到葡萄糖残糖；两步驯化方法 B 能够有效将菌种的糖耗速率和乙醇生产速率提高到 1.28 和 0.75 g/L/h，方法 C 也表现同样的发酵性能（糖耗速率和乙醇生产速率分别为 1.27 和 0.68 g/L/h）。

表 4.2 驯化方式对 *S. cerevisiae* DQ1 乙醇发酵性能的影响

Table. 4.2 Adaptation methods on ethanol fermentability of *S. cerevisiae* DQ1

| Adaptation process | Productivity (g/L/h) * | Ethanol titer (g/L) | Yield (%) |
|--------------------|------------------------|---------------------|-----------|
| Method A | 0.35 | 48.60 | 63.1 |
| Method B | 0.75 | 52.90 | 68.9 |
| Method C | 0.68 | 51.76 | 67.4 |
| Method D | 1.23 | 53.32 | 69.5 |
| Method E | 1.50 | 53.62 | 69.9 |

* Productivity was calculated for the initial 12 h after inoculation.

三步驯化对菌种发酵性能的改善更为明显，方法 D 和 E 的乙醇生产速率分别提高到 1.23 和 1.50 g/L/h，发酵 36 h 后已经没有剩余的葡萄糖出现。经过三步驯化（方法 E）后的菌种进行 SSF 能得到最高的乙醇浓度和相应得率，分别为 53.62 g/L 和 69.9%。上述结果表明三步驯化方式能够有效缩短 *S. cerevisiae* DQ1 在利用玉米芯残渣进行同步糖化和乙醇发酵过程的延滞期，并提高其乙醇发酵性能。

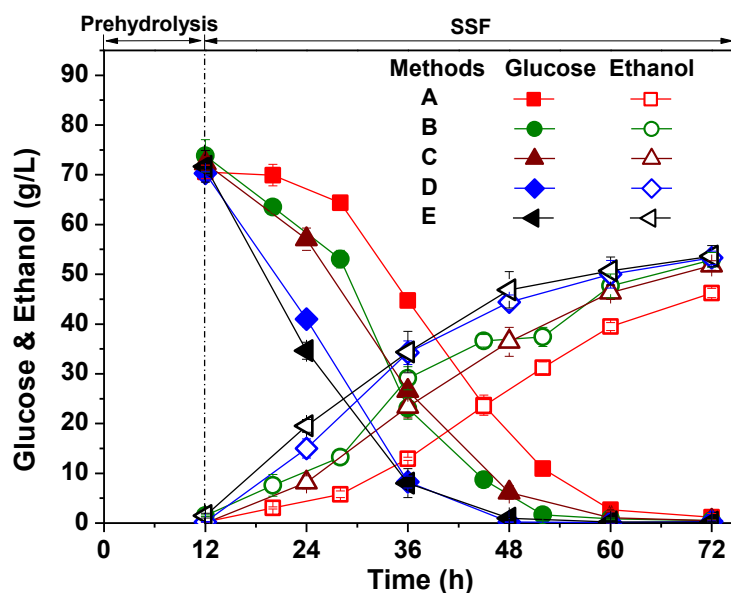
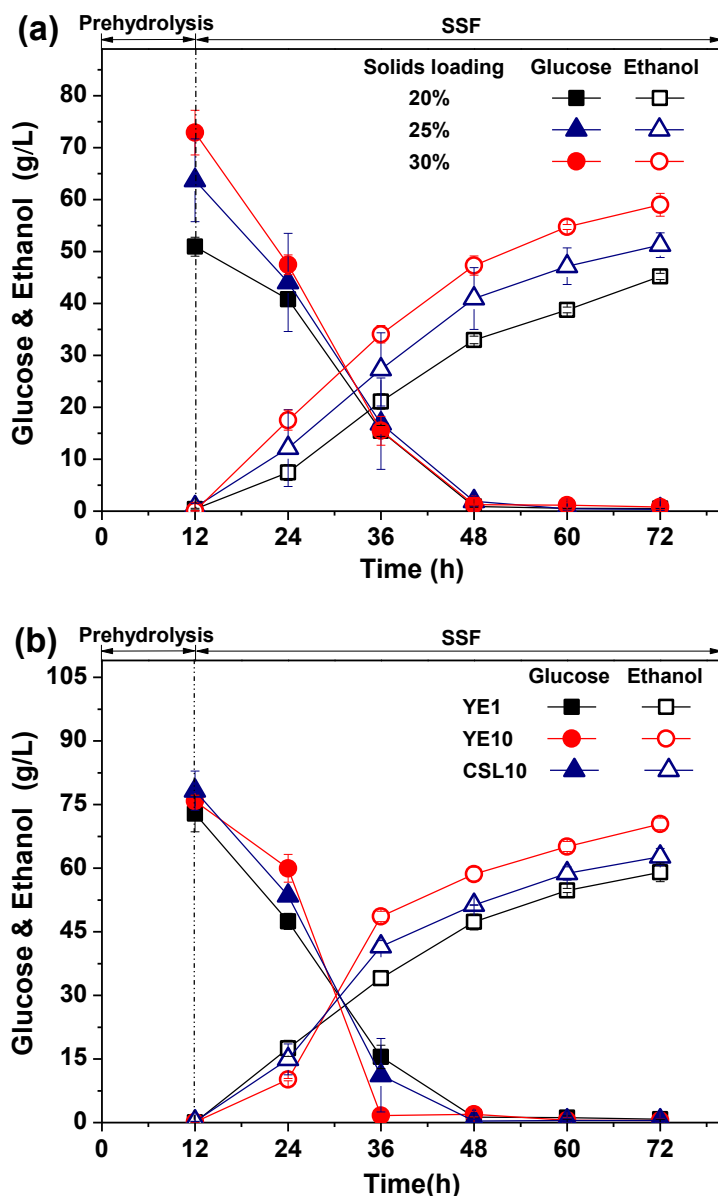


图 4.4 驯化方式对 *S. cerevisiae* DQ1 利用玉米芯残渣进行同步糖化与乙醇发酵的影响

Fig. 4.4 Adaptation on fermentability of *S. cerevisiae* DQ1 during SSF. Conditions: Solids loading at 25% (w/w). Prehydrolysis stage: the enzyme dosage of 15 FPU/g DM, 50°C and pH 4.8 for 12 h. SSF stage: each of the adapted yeast seeds underwent different adaptation methods were inoculated after prehydrolysis stage and cultured at 37°C and pH 5.5.

4.3.4 驯化的 *S. cerevisiae* DQ1 利用玉米芯残渣进行同步糖化与乙醇发酵

利用经过三步驯化的菌种作为发酵种子考察其他发酵条件对高固含量玉米芯残渣 (CCR) 进行同步糖化和乙醇发酵 (SSF) 的影响。结果如图 4.5 所示, 随着固含量由 20% 提高到 30%, 乙醇浓度明显由 44.2 g/L 增加到 59.0 g/L, 但是当固含量超过 30% 时, 乙醇得率明显由 65.8% 下降到 52.3% (图 4.5a), 这可能是高固含量导致纤维素酶水解性能下降所致; 随着营养成分酵母提取物添加量的增加, SSF 产乙醇的浓度和得率均有显著提高, 这可能是由于酵母提取物中含有丰富的营养成分, 在含有抑制物的环境中能够提高酵母细胞的活性。利用价格比较低廉的玉米浆 (\$0.18 每千克) 替代比较昂贵的酵母提取物 (\$9.2 每千克), 在添加相同浓度时 *S. cerevisiae* DQ1 同样也能表现出相似发酵性能 (图 4.5b); 随纤维素酶用量由 7.5 提高到 30 FPU/g 干物料, 在预糖化阶段葡聚糖酶解速率明显提高。当酶用量由 7.5 提高到 15 FPU/g 干物料时, 乙醇浓度由 35.4 显著提高到 62.7 g/L, 但是进一步提高酶用量, 乙醇浓度只有微弱提高 (图 4.5c)。随后将发酵体系由 5 L 提高到 50 L 发酵罐, 在上述优化的发酵条件下利用 CCR 为原料进行 SSF。



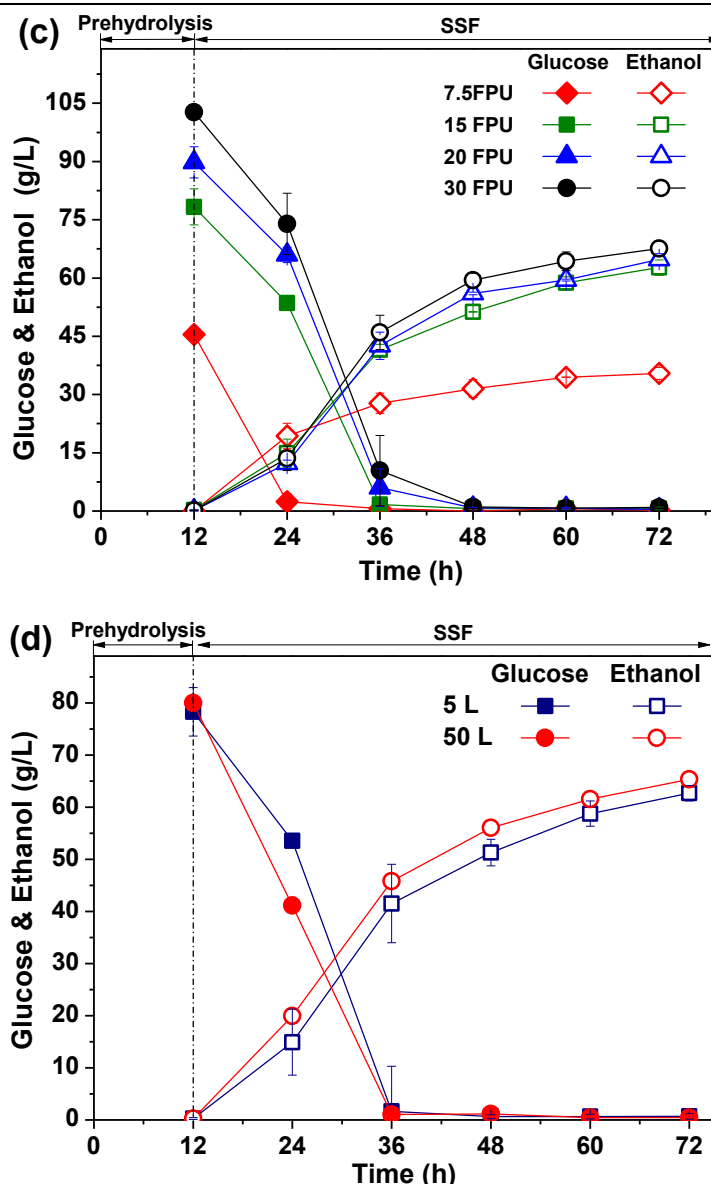


图 4.5 发酵条件对 *S. cerevisiae* DQ1 利用玉米芯残渣进行同步糖化与乙醇发酵

(a)固含量；(b) 营养成分；(c) 纤维素酶用量；(d) 5 L 和 50 L 发酵罐体系

Fig. 4.5 SSF of CCR at different fermentation parameters. Conditions: Prehydrolysis stage: 50°C and pH 4.8 for 12 h; SSF stage: the three-step adapted yeast seeds were inoculated after prehydrolysis stage and cultured at 37°C and pH 5.5. (a) Effect of solids loading on SSF, condition: cellulase dosage of 15 FPU/g DM, yeast extract of 1 g/L; (b) Effect of nutrients on SSF, condition: solids loading of 30% (w/w), cellulase dosage of 15 FPU/g DM, YE1 and YE10 mean yeast extract of 1 g/L and 10 g/L, CSL10 means corn steep liquor of 10 g/L; (c) Effect of cellulase dosage on SSF, condition: solids loading of 30% (w/w), corn steep liquor of 10 g/L; (d) SSF at high solids loading in 5 L and 50 L bioreactor, condition: solids loading of 30% (w/w), corn steep liquor of 10 g/L, cellulase dosage of 15 FPU/g DM.

在 50 L 发酵罐体系中乙醇浓度和得率分别可达 65.3 g/L 和 58.2%，这甚至比 5L 发酵罐中的结果略有提高。上述结果说明在相同的发酵条件下发酵体系的放大并没有对传质和传热造成严重的影响。

表 4.3 比较利用玉米芯残渣为原料进行同步糖化与乙醇发酵的工艺

Table 4.3 Comparison of SSF for ethanol production from CCR

| Strains | Solids loading (%) | Delignin | Lignin content (% w/w) | Fermentation time (h) | Ethanol titer (g/L) | Yield (%) | Productivity (g/L/h) | Sources |
|----------------------------------|--------------------|---|------------------------|-----------------------|---------------------|-----------|----------------------|------------|
| <i>S. cerevisiae</i> CICC 31014 | 19.5 | Yes (Sulfite) | 12.6 | 72 | 60.8 | 72.2 | 0.84 | [161] |
| <i>S. cerevisiae</i> (dry yeast) | 15 | Yes (Alkali) | 3.2 | 142 | 57.2 | 85.2 | 0.40 | [162] |
| <i>S. cerevisiae</i> (dry yeast) | 5 | Yes (Alkaline/H ₂ O ₂) | 13.2 | 36 | 16.9 | 44.0 | 0.47 | [163] |
| <i>S. cerevisiae</i> DQ1 | 30 | No | 22.1 | 60 | 62.7 | 55.7 | 1.04 | This study |

目前,已经有一些利用玉米芯残渣(CCR)作为原料进行同步糖化和乙醇发酵(SSF)的研究,尽管都是以 CCR 作为原料,但是在工艺和操作条件方面仍然存在很多差异,具体比较如表 4.3 所示。这些工艺与本章研究的主要差异在于他们利用的 CCR 原料均经过了脱木质素处理,其中包括碱处理、碱性过氧化氢处理以及亚硫酸处理等。通过上述方法能够有效的去除 CCR 中的木质素,从而使纤维素的含量增加,进一步提高 CCR 的生物转化效率,但这些处理步骤不仅增加了加工成本而且产生了大量废水。另外,虽然在这些工艺中 CCR 的木质素含量已经被去除到 15% 以下,但由于 CCR 中存在酚类抑制物,在 SSF 发酵过程中仍然会出现较长的发酵延滞期,以及较低的乙醇浓度和生产速率等现象。与表 4.3 中的工艺相比,本章利用驯化后 *S. cerevisiae* DQ1 作为发酵菌,无需对 CCR 原料进行任何处理,在高固含量条件下进行 SSF 能够获得较高的乙醇浓度和生产速率,分别为 62.6 g/L 和 1.04 g/L/h。综上所述,本章提出了一种高效可行的乙醇生产工艺,主要通过进化适应手段提高酿酒酵母菌在工业玉米芯残渣原料中发酵性能。

4.4 小结

本章研究主要针对酿酒酵母在利用玉米芯残渣(CCR)作为原料进行同步糖化与乙醇发酵(SSF)过程中表现出生长和发酵性能下降的问题,具体对玉米芯残渣中抑制物组分进行了定性分析,并进一步考察了抑制物对 *S. cerevisiae* DQ1 生长和发酵的影响。提出了通过进化适应方法提高 *S. cerevisiae* DQ1 在 CCR 原料中发酵性能的策略。得到以下主要结论:

(1) 通过 GC-MS 对 CCR 水解液进行定性分析,发现含有溶解度较低的五种酚类化合物: 2-糠酸、愈创木酚、对羟基苯甲酸、对香豆酸和阿魏酸。其中酚酸类化合物对 *S. cerevisiae* DQ1 细胞生长和乙醇发酵性能有显著抑制作用。说明 CCR 中的酚类化合物可能是导致 *S. cerevisiae* DQ1 在玉米芯残渣原料中发酵性能下降的原因。

(2) 通过将 *S. cerevisiae* DQ1 在逐渐提高 CCR 水解液浓度梯度的驯化培养基中连续转接和培养,使菌种逐渐适应含有抑制物的 CCR 水解液环境,从而改善菌种的发酵性能。对五种短期驯化方式进行比较,发现三步驯化方法能够有效提高能够有效缩短 *S. cerevisiae* DQ1 在利用 CCR 进行 SSF 过程的延滞期,并提高其乙醇发酵性能。

(3) 利用驯化后的 *S. cerevisiae* DQ1 作为发酵菌,CCR 为原料,考察不同发酵条件对高固含量 SSF 生产乙醇的影响。结果表明在 5 L 和 50 L 发酵罐中,固含量为 30%、纤维素酶用量为 15 FPU/g 干物料、10 g/L 玉米浆作为营养物时,驯化后的 *S. cerevisiae* DQ1 均能够获得 62.7 g/L (7.9%v/v) 的乙醇浓度。

第 5 章 *Zymomonas mobilis* 对玉米芯残渣酚类抑制物抗性机理研究

5.1 引言

木质纤维素原料经过预处理会产生对发酵微生物存在抑制作用的三类有毒化合物,包括呋喃类(糠醛、5-羟甲基糠醛)、有机弱酸类(乙酸、甲酸和乙酰丙酸)以及酚类化合物^[146]。在这些抑制物中,由于呋喃类衍生物和有机弱酸在预处理后的原料中含量相对较高,因此成为公认的典型抑制物。而酚类化合物由木质素降解产生,主要包括酚醛、酚醇和酚酸等种类复杂的化合物,如对羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛、松柏醛、愈创木酚、阿魏酸和对香豆酸等^[92]。这类化合物对发酵微生物的抑制作用远强于呋喃类和弱酸类,但是由于在水解液中浓度相对较低而没有受到应有的重视。

有一些特殊的生物炼制处理过程会产生富含酚类化合物的木质纤维素原料,例如在利用玉米芯原料生产木糖的过程中会产生一种酚类化合物高度富集的玉米芯残渣(CCR)。在生产木糖过程中,由于有效的去除了玉米芯中的半纤维素,从而使得产生的 CCR 纤维素含量很高且易于酶解,因此成为一种很有希望的木质纤维素原料被用于纤维素乙醇研究。但是由于 CCR 中酚类化合物对发酵菌有很强的抑制作用,并且目前没有十分有效酚类脱毒方法适用于 CCR。尽管通过驯化手段能够短期提高酵母对酚类抑制物的耐受性,但若想使其具有长期的耐受性则需要获得一株稳定的抑制物耐受性突变菌株^[164]。因此,如果能够发现一株对酚类化合物具有耐受性的菌种,将能够有效的利用那些富含酚类抑制物的木质纤维素原料。

运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* 由于具有很高的葡萄糖转化率、乙醇得率和发酵速率等优点,已经成为一种广泛关注的乙醇发酵菌,并用于纤维素乙醇发酵的研究。尽管 *Z. mobilis* 表现出上述乙醇发酵优势,但是由于对抑制物耐受性差而很少用于高抑制物含量的纤维素乙醇发酵体系。目前,*Z. mobilis* 对呋喃类和弱酸类抑制物的耐受性已经被广泛研究,但是关于其对酚类抑制物耐受性的研究却很少。Frandsen 等^[99]发现 *Z. mobilis* 8b 能够将酚醛抑制物降解,但其对酚类抑制物的耐受机理尚不清楚。

本章在利用 *Z. mobilis* 发酵富含酚类抑制物的 CCR 生产乙醇过程中,发现其细胞生长和乙醇发酵性能均优于 *S. cerevisiae*。分别从以下几点开展工作阐述其耐受机制:(1)选择了木质纤维素降解产生的 12 种典型酚类化合物用于研究和比较 *Z. mobilis* 和 *S. cerevisiae* 对酚类抑制物的耐受性;(2)对 *Z. mobilis* 和 *S. cerevisiae* 降解酚类抑制物的过程进行定性定量分析,同时对降解动力学参数进行计算和比较;(3)利用 SEM、TEM 和荧光探针等手段从细胞形态和膜渗透性的角度分析和研究 *Z. mobilis* 对酚类抑制物的耐受性机理。

5.2 材料与方法

5.2.1 实验材料

5.2.1.1 原料与纤维素酶

玉米芯残渣（CCR）木质纤维素组分及含量参照 4.2.1.1。其总酚含量 16.8 mg/g 干物料，主要酚类抑制物：愈创木酚、2-糠酸、对香豆酸、对羟基苯甲酸和阿魏酸。纤维素酶活性相关数据参照 2.2.1.1。

5.2.1.2 实验试剂

酚类化合物：2-糠酸、香草醇、对羟基苯甲醇、丁香醇、松柏醇、香草醛、对羟基苯甲醛、丁香醛、愈创木酚、松柏醛、香草酸、对羟基苯甲酸、丁香酸、对香豆酸、肉桂酸和阿魏酸均为分析纯购自 Sigma-Aldrich（美国，密苏里州）。其余生化试剂和化学试剂参照附录 I。

5.2.1.3 菌种和培养基

运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* ZM4 (ATCC 31821) 购自美国菌种保藏中心（美国，弗吉尼亚州）。*S.cerevisiae* DQ1 信息参照 2.2.1.3。菌种分装在 2 ml 含有 30% (v/v) 甘油的冻存管中 -80°C 条件下冷冻保藏。

培养基：

(1) RM 培养基：用于 *Z. mobilis* ZM4 种子培养，20 g/L 葡萄糖、10 g/L 酵母提取物和 2 g/L KH_2PO_4 ；

(2) *Z. mobilis* ZM4 发酵培养基：10 g/L 酵母提取物和 2 g/L KH_2PO_4 ；

(3) *S.cerevisiae* DQ1 的种子培养基和发酵培养基参照 2.2.1.3；

(4) 抑制物培养基制备方法参照 4.2.1.3。

5.2.2 仪器设备

所用主要仪器设备参照附录 II

5.2.3 实验方法

5.2.3.1 种子培养：

Z. mobilis ZM4 种子培养：取一支保藏 *Z. mobilis* ZM4 的 2 ml 冻存管，在 37°C 快速复苏。在超净工作台中将其接入事先灭菌的装有 20 ml RM 培养基的 100 ml 摇瓶中，置于恒温培养箱，在 30°C、静置培养 20 h。以 10% (v/v) 接种量将上述菌液转接到 200 ml RM 培养基中，在 30°C、静置培养 12 h。

S. cerevisiae DQ1 种子培养具体方法参照 2.2.3.5。

5.2.3.2 同步糖化与乙醇发酵（SSF）

SSF 过程具体操作步骤参照 2.2.3.6。

5.2.3.3 抑制物条件下菌种培养：

通过将 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 分别在添加单一酚类抑制物的 RM 培养基和合成培养基中培养，考察两种菌对酚类化合物的耐受性。酚类抑制物主要分为酚醛和酚酸抑制物，其中酚醛抑制物：香草醛、对羟基苯甲醛、丁香醛、愈创木酚和松柏醛；酚酸抑制物：香草酸、对羟基苯甲酸、丁香酸、对香豆酸、肉桂酸和阿魏酸。抑制物母液配制方法参照 4.2.3.3。

在 250 ml 摇瓶中添加 40 ml 灭菌的 RM 培养基或合成培养基（RM 培养基用于 *Z.*

mobilis ZM4 培养; 合成培养基用于 *S. cerevisiae* DQ1 培养), 然后添加一定量的酚类抑制物母液, 使培养基中酚类抑制物含量达到设定浓度。以 10% (v/v) 接种量将活化的 *Z. mobilis* ZM4 或 *S. cerevisiae* DQ1 菌种转接入 RM 培养基或合成培养基。在 30°C 条件下培养 24 h。 *Z. mobilis* ZM4 静置培养, *S. cerevisiae* DQ1 在 150 rpm 震荡培养。

在设定时间取 1 ml 样品在 11167×g 条件下离心 5 min。上清液用于 HPLC 分析葡萄糖、乙醇和酚类抑制物浓度, 菌体稀释后在 OD₆₀₀ 条件测定菌体浓度。每个抑制物浓度条件进行两次平行试验, 实验结果为两次检测的平均值。

5.2.4 分析方法

5.2.4.1 同步糖化与乙醇发酵 (SSF) 体系活菌个数测定:

由于 SSF 体系中含有大量木质纤维素固体物质, 会影响吸光度测定菌体浓度的方法。因此, 在 SSF 体系中 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 的细胞生长状况通过测定每毫升发酵醪液中菌落形成单位 (CFU) 来间接表示。在设定时间从发酵罐中取 1 ml 发酵醪, 稀释 10⁵-10⁶ 倍。然后取 100 μl 稀释的发酵醪样品分别涂布在 RM 培养基或合成培养基平板上。在 30°C 条件下培养 48 h 后, 统计平板上 CFU 数量。细胞生长状况的结果为三次平行实验的平均值。

5.2.4.2 比生长速率计算:

在抑制物培养基中, *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 的细胞生长状况通过比生长速率表示。比生长速率计算公式^[165]如 (4-1) 所示:

$$\mu = \ln(x_t/x_c) / t \quad (4-1)$$

式中 μ 为对数生长期最大比生长速率, 单位 h⁻¹; x_t , x_c 分别为 t 和 0 时刻菌体细胞生物量, 单位 g/L; t 为时间菌体生物量 x_c 到 x_t 的间隔时间, 单位 h。 *Z. mobilis* ZM4 菌体生物量换算关系为 OD₆₀₀ 吸光值 1 对于 0.31 g/L 细胞干重。 *S. cerevisiae* DQ1 菌体生物量换算关系参照 4.2.1.3。

5.2.4.3 HPLC 分析:

葡萄糖、乙醇、乙酸、甲酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛浓度测定参照 2.2.4.7。

5.2.4.4 酚类抑制物降解产物分析:

Z. mobilis ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 降解酚类抑制物得到的产物通过 GC-MS 和 HPLC 进行定性定量分析。GC-MS 检测方法参照 4.2.4.3。

对羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛和松柏醛及其降解产物羟基苯甲醇、香草醇、丁香醇和松柏醇浓度利用配有日本岛津公司 SPD-20A 型 UV/Vis 检测器和日本 YMC 公司 YMC-Pack ODS-A 型色谱柱 (150 mm × 4.6 mm) 的 HPLC 检测。检测条件^[166]: 检测波长为 270 nm, 柱温箱温度 35°C, 流动相洗脱液 A 为 0.1% 甲酸水溶液, 洗脱液 B 为乙腈, 流速 1.0 ml/min。梯度洗脱程序: 洗脱液 B 在 4 min 内由 10% 升至 35%, 在 35% 保持 11 min, 然后在 5 min 内由 35% 升至 10%, 在 10% 保持 10 min。所有样品都要在 11167×g 条件下离心 5 min, 取上清液经孔径为 0.22 μm 的滤膜过滤后进行稀释, 进样量 20 μL。

5.2.4.5 酚类抑制物降解动力学参数计算:

Z. mobilis ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 降解酚类抑制物的生物降解反应符合一级反应动力学方程 (4-2):

$$r = -\frac{d[C]}{dt} = k[C] \quad (4-2)$$

进一步整理转化形式得方程 (4-3):

$$\ln[C] = -kt + \ln[C]_0 \quad (4-3)$$

式中 r 为降解速率, 单位 mM/s ; $[C], [C]_0$ 分别为 t 和 0 时刻酚类抑制物的浓度, 单位 mM ; k 为一级速率常数, 单位 s^{-1} ; t 反应时间, 单位 s 。

5.2.4.6 菌体形态分析:

Z. mobilis ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 的菌体细胞形态分别利用扫描电子显微镜 (SEM) 和透射电子显微镜 (TEM) 进行观察。

SEM: 菌体细胞在抑制物培养基或对照培养基中培养 8 h, 取样在 $5000\times g$ 条件下离心 10 min。用 $0.05 \text{ M pH}7.0$ 磷酸盐缓冲溶液将菌体细胞重新悬浮, 用 2% 的戊二醛固定 30 min。然后将固定的细胞依次置于乙醇浓度梯度溶液进行脱水 (乙醇浓度分别为 10%、20%、50%、75%、95% 和 100% (v/v) 乙醇溶液)。在每一个乙醇浓度下脱水 30 min。然后将脱水后的细胞在室温下自然干燥, 喷金处理。SEM 操作条件参照 2.2.4.6。

TEM: 第一次细胞固定处理方法基本与 SEM 的样品制备方法相似, 然后将经过戊二醛固定的样品在 2% 的四氧化锇中进行后固定处理 1 h。然后利用乙醇浓度梯度法对样品进行脱水。接下来分别对细胞样品进行包埋和切片。用微小的铜网装置将样品切片固定, 干燥环境下保存待测。菌体细胞样品超薄切片利用日本日立公司 Hitachi H-7650 型 TEM 进行观察, 加速电压为 80 kV。

5.2.4.7 外膜渗透性分析:

外膜渗透性测定方法基于细胞对荧光染料 N-苯基- α -萘胺的摄入量进行检测^[167]。*Z. mobilis* ZM4 细胞分别在含有阿魏酸的 RM 培养基和对照 RM 培养基中培养 8 h。取 1 ml 菌液在 $7000\times g$ 条件下离心 5 min。菌体用 $0.05 \text{ M pH}7.0$ 的磷酸盐缓冲液重新悬浮, 稀释菌体浓度至 OD_{600} 为 0.5。用丙酮将荧光染料 N-苯基- α -萘胺溶解, 加入到 1 ml 上述菌体悬浊液中, 保证待测溶液中 N-苯基- α -萘胺的浓度为 10 mM。取 100 μl 上述样品加入 96 孔板, 利用美国 BioTek Instruments 公司 Synergy H1 型多功能酶标仪测定样品荧光强度。激发和发射波长分别为 350 和 420 nm。所有外膜渗透性检测结果均为三次平行实验的平均值。

5.2.4.8 乙醇得率计算

发酵过程中乙醇得率的计算参照 2.2.4.8。

5.3 结果与讨论

5.3.1 *Z. mobilis* 和 *S. cerevisiae* 发酵富含酚类化合物的玉米芯残渣生产乙醇

玉米芯残渣 (CCR) 中含有大量酚类化合物, 总酚含量可达 16.8 mg/g 干物料, 这些酚类化合物大部分为一些微溶于水或不溶于水的酚类物质, 包括愈创木酚、2-糠酸、

对香豆酸、对羟基苯甲酸和阿魏酸^[164]。当这些纤维素含量较高的 CCR 作为原料用于乙醇发酵时，典型乙醇发酵菌酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 的乙醇生产速率受到明显抑制降低到 0.61 g/L/h，这仅能达到以预处理玉米秸秆为原料时乙醇生产速率的 1/3^[164]。因此，有必要寻找其他的乙醇发酵菌尝试利用这类含有酚类抑制物的木质纤维素原料发酵生产乙醇。

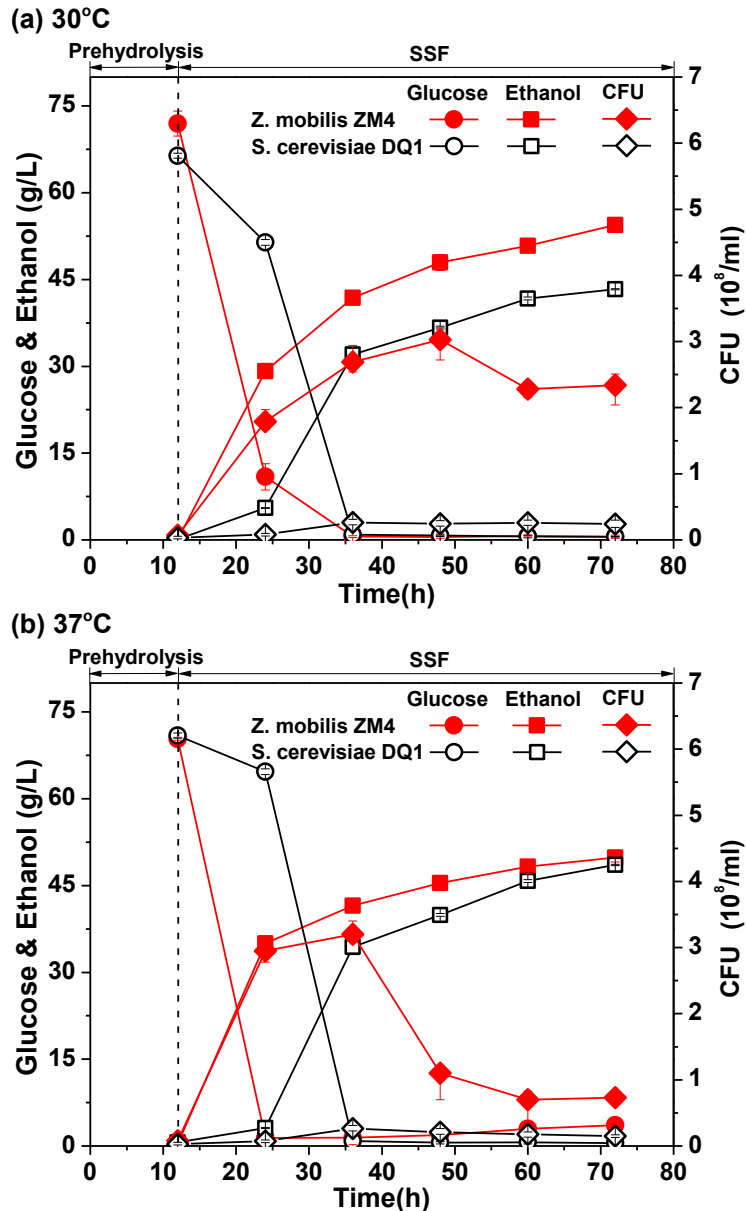


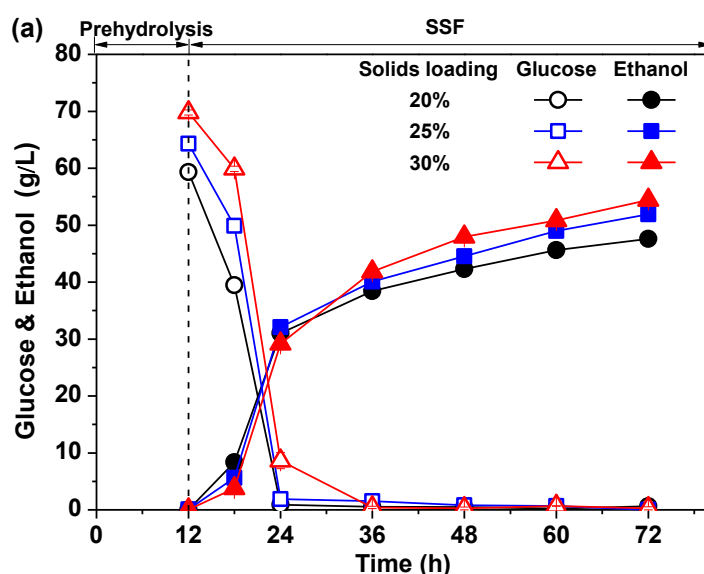
图5.1 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 利用 CCR 进行高固含量 SSF

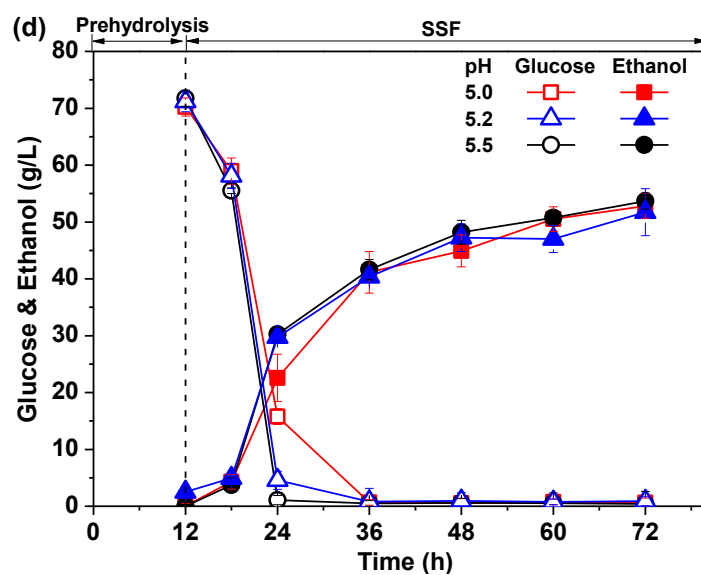
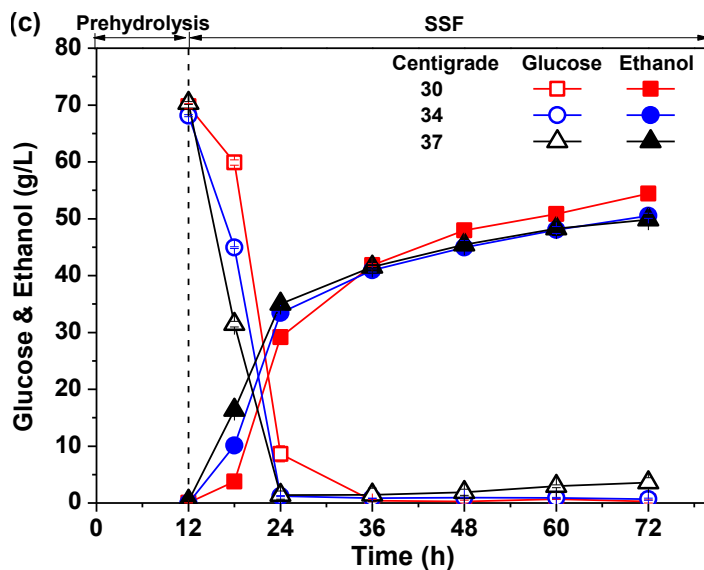
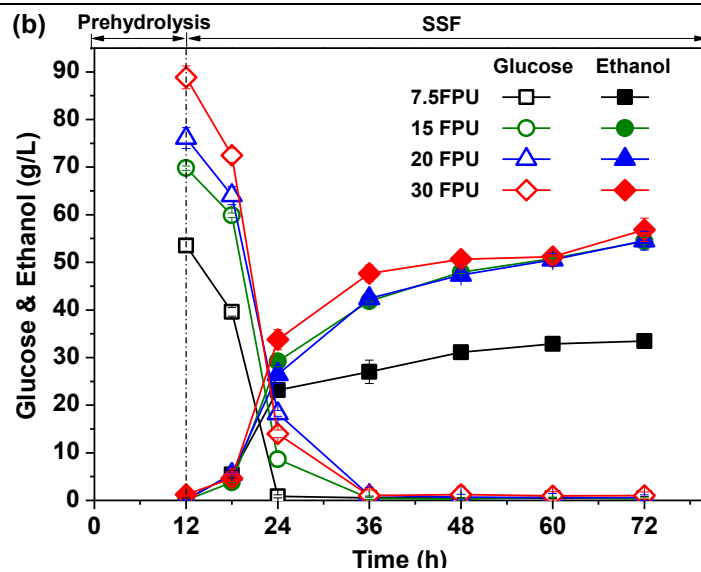
Fig. 5.1 SSF of corncob residue by *Z. mobilis* ZM4 and *S. cerevisiae* DQ1 at high solids loading. (a) 30°C; (b) 37°C. The solids loading was 30% (w/w), the enzyme dosage was 15 FPU/g DM. The prehydrolysis was performed at 50°C and pH 4.8 for 12 h, then SSF was initiated at 30°C or 37°C at pH 5.5. The cell growth was represented by the colony-forming units (CFU) of the strains on petri dishes.

利用工业玉米芯残渣作为原料在 30% 固含量条件下进行同步糖化和乙醇发酵 (SSF)，比较运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* ZM4 和酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 在发酵过程中细胞生

长状况和发酵性能差异。结果如图 5.1 所示, *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 分别在 30°C 和 37°C 条件下获得最高的乙醇浓度, 分别为 54.4 g/L 和 48.6 g/L (图 5.1 a, b)。同步糖化和乙醇发酵 (SSF) 初始 12 h, *Z. mobilis* ZM4 在 30°C 和 37°C 分别达到 2.43 和 2.92 g/L/h 的乙醇生产速率, 然而此时 *S. cerevisiae* DQ1 的乙醇生产速率只有 0.46 和 0.31 g/L/h。两种菌株在 SSF 过程中的细胞生长情况由菌落形成单位 (CFU) 表示, *Z. mobilis* ZM4 的 CFU 在开始发酵很短时间内就能够达到 3×10^8 左右, 这几乎比 *S. cerevisiae* DQ1 的 CFU 数量多一个数量级。如图 5.1b 所示, 在 30°C 条件下进行 SSF 时, *Z. mobilis* ZM4 的细胞活性约为 $2.5\text{-}3.0 \times 10^8$ CFU, 而在在 37°C 条件下, 细胞活性会在发酵 48 h 后迅速下降到 1.0×10^8 CFU, 这可能是由于 *Z. mobilis* ZM4 对较高的温度缺乏耐受性。当 Zhang 和 Lynd^[168]利用 *Z. mobilis* 8b 在 37°C 进行 SSF 时同样出现菌体活性降低的现象。另一方面, 无论是在 30°C 还是在 37°C 条件下, *S. cerevisiae* DQ1 细胞活性都会在发酵 36 h 后出现迅速下降的现象, 活菌数由 3.0×10^7 下降到 1.5×10^7 , 这有可能是由于 *S. cerevisiae* DQ1 受到酚类化合物抑制作用所致。

在利用玉米芯残渣作为原料进行同步糖化和乙醇发酵过程中, 其他发酵条件对 *Z. mobilis* ZM4 乙醇发酵性能的影响如图 5.2 所示。随着固含量由 20% 提高到 30% (w/w), 乙醇得率浓度显著提高, 而乙醇得率略有下降 (图 5.2a)。当纤维素酶用量由 7.5 提高的 15 FPU/g 干物料时, 乙醇浓度随之明显提高, 由 30.5 提高到 51.3 g/L, 但是继续提高到 30 FPU/g 干物料时, 乙醇浓度提高并不明显 (图 5.2b)。在 30°C 条件下乙醇的得率比 37°C 时略高一些, 这可能是由于在 30°C 条件下 *Z. mobilis* ZM4 菌体活性较高 (图 5.2c, 图 5.1b)。当 pH 控制在 5.0-5.5 条件下, 乙醇的得率并没有发生明显的变化, 这可能是由于 *Z. mobilis* ZM4 对略现酸性的 pH 条件有比较广泛的适应性 (图 5.2d)。当预糖化时间分别为 3、12 和 24 h, 初始葡萄糖浓度显著提高, 分别为 47.8、69.8 和 87.4 g/L, 但是预糖化时间为 3 和 24 h 的两组在发酵结束时乙醇浓度没有明显变化, 分别为 48.2 和 47.7 g/L (图 5.2e)。





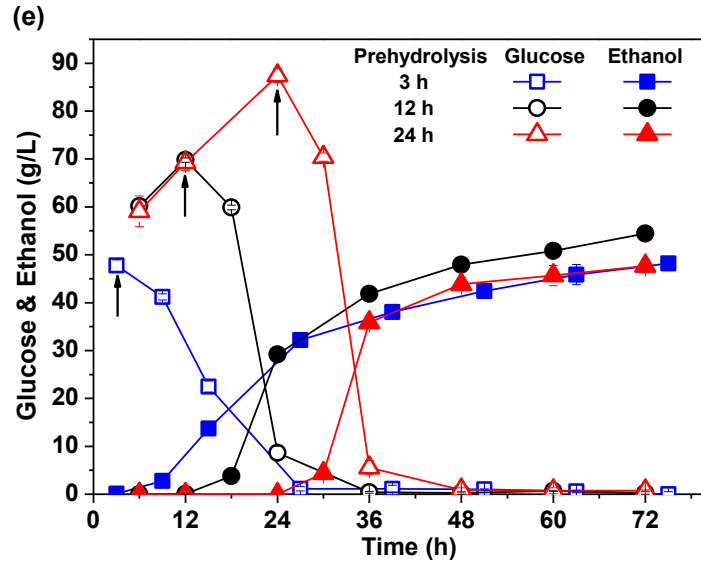


图5.2 *Z. mobilis* ZM4在不同条件下利用玉米芯残渣进行同步糖化和乙醇发酵

(a) 固含量; (b) 酶用量; (c) 温度; (d) pH; (e) 预糖化时间

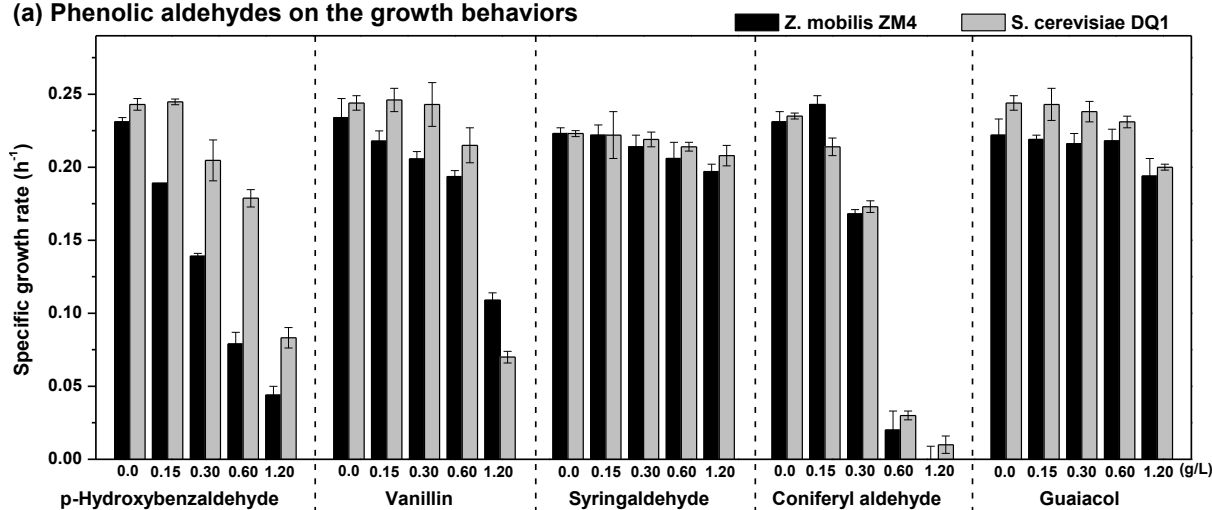
Fig. 5.2 SSF operation of corncob residue by *Z. mobilis* ZM4 at different fermentation parameters. The prehydrolysis was at 50°C and pH 4.8 for 12 h unless mentioned elsewhere. (a) Effect of solids loading. Solids loading of 20%, 25% and 30% (w/w), cellulase dosage of 15 FPU/g DM, 30°C, pH 5.5; (b) Effect of cellulase dosage. Cellulase dosage of 7.5, 15, 20, and 30 FPU/g DM. Solids loading of 30% (w/w), 30°C, pH 5.5; (c) Effect of SSF temperature. SSF at 30, 34, and 37°C. Solids loading of 30% (w/w), cellulase dosage of 15 FPU/g DM, pH 5.5; (d) Effect of pH. pH at 5.0, 5.2, and 5.5. Solids loading of 30% (w/w), cellulase dosage of 15 FPU/g DM, 30°C. (e) Effect of prehydrolysis time. Prehydrolysis for 3, 12, and 24 h. Solids loading of 30%, cellulase dosage of 15 FPU/g DM, 30°C, pH 5.5.

因为相同固含量下工业玉米芯残渣能够糖化得到的葡萄糖总量是一定的, 尽管初始葡萄糖浓度随预糖化时间延长存在显著提高, 但是在 SSF 阶段能够被水解的葡萄糖量将会减少。因此三种不同预糖化时间条件最终得到的乙醇浓度比较接近。利用 *S. cerevisiae* 在不同预糖化时间条件下进行 SSF 时也会出现同样的现象^[155]。综上所述, *Z. mobilis* ZM4 可以作为一个很好的选择用于发酵富含酚类化合物的木质纤维素原料生产纤维素乙醇。

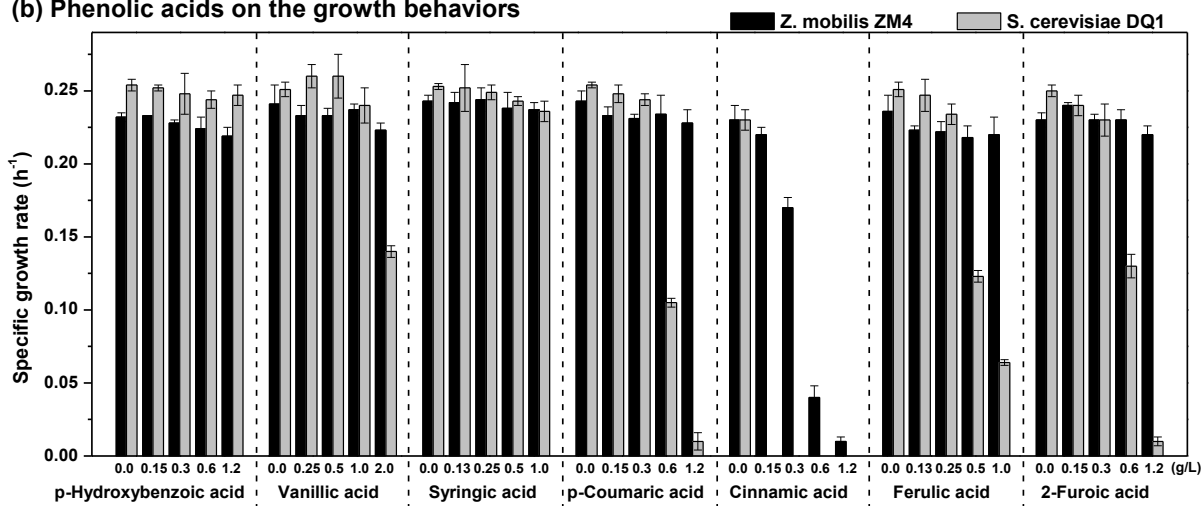
5.3.2 *Z. mobilis* 和 *S. cerevisiae* 对酚类抑制物的耐受性

上述发酵结果说明 *Z. mobilis* ZM4 比 *S. cerevisiae* DQ1 更适应于工业玉米芯残渣这种富含酚类抑制物的木质纤维素原料。为了挖掘导致这一现象的原因, 进一步将 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 分别在含有单一酚类化合物的抑制物培养基中培养, 考察和比较两菌种对酚类化合物的生理反应。选择 12 种在预处理过程中由木质素降解产生的常见酚类化合物作为模式酚类化合物, 其中包括 5 种酚醛(对羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛、松柏醛和愈创木酚)及 7 种酚酸(对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸、肉桂酸和 2-糠酸)^[92, 146]。

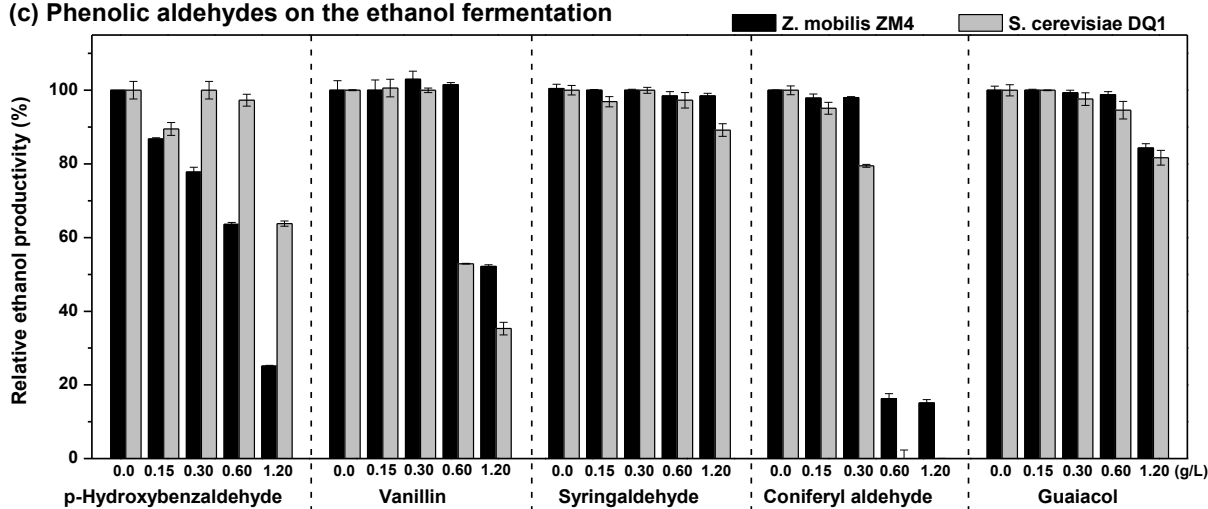
(a) Phenolic aldehydes on the growth behaviors



(b) Phenolic acids on the growth behaviors



(c) Phenolic aldehydes on the ethanol fermentation



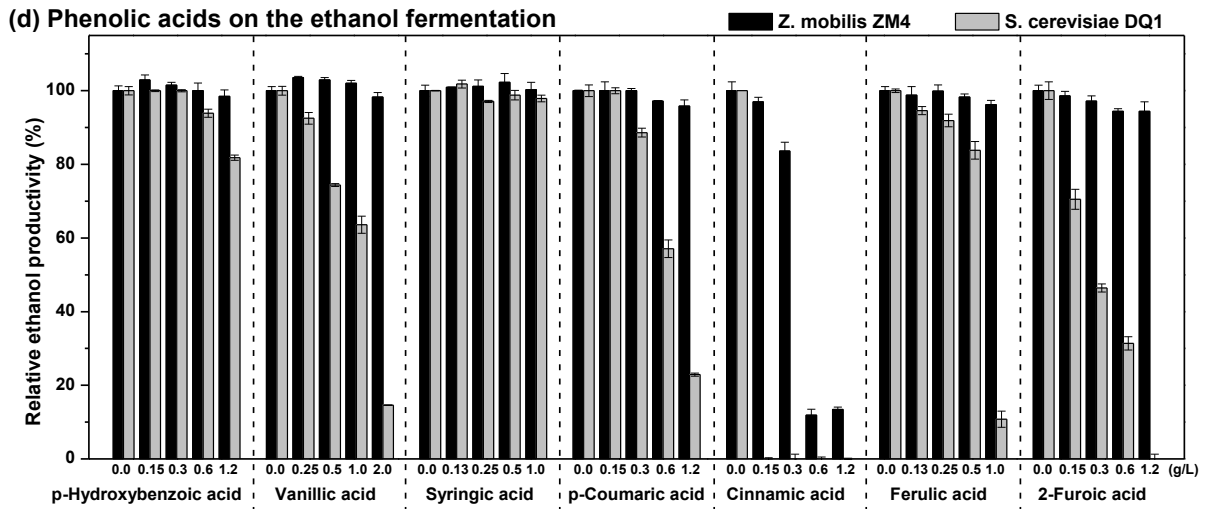


图 5.3 酚类化合物对 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 生长和发酵的抑制作用

(a, b) 分别为酚醛和酚酸对菌体生长的影响；(c, d) 分别为酚醛和酚酸对发酵性能的影响
 Fig. 5.3 Inhibition of phenolics on the growth behaviors and the ethanol fermentation of *Z. mobilis* ZM4 and *S. cerevisiae* DQ1. (a) phenolic aldehydes on the growth behaviors; (b) phenolic acids on the growth behaviors; (c) phenolic aldehydes on the ethanol fermentation; (d) phenolic acids on the ethanol The data were the mean and standard deviation of the twice independent experiments.

这些酚类抑制物对 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 的比生长速率的影响如图 5.3a 和 5.3b 所示。对于酚醛类抑制物，当对羟基苯甲醛、香草醛、愈创木酚、丁香醛和松柏醛浓度分别为 0、0、0.6、1.2 和 0.15 g/L 时，*Z. mobilis* ZM4 的比生长速率受到抑制作用，由对照组的 0.23 h^{-1} 分别下降至 0.19、0.21、0.19、0.21 和 0.17 h^{-1} ；而 *S. cerevisiae* DQ1 则在上述酚醛抑制物浓度分别为 0.15、0.3、0.15、1.2 和 0.15 g/L 时受到明显抑制作用，其比生长速率由对照组的 0.25 h^{-1} 分别下降到 0.20、0.21、0.20、0.21 和 0.20 h^{-1} (图 5.3a)。结果说明，与 *S. cerevisiae* DQ1 相比，*Z. mobilis* ZM4 对愈创木酚耐受性较强，而对香草醛和对羟基苯甲醛的耐受性较弱，两菌株对丁香醛和松柏醛的耐受性基本相似。对于酚酸类化合物，*Z. mobilis* ZM4 对所有考察的酚酸类抑制物的耐受性均强于 *S. cerevisiae* DQ1。当对羟基苯甲酸、香草酸、丁香酸、对香豆酸、阿魏酸和 2-糠酸为最高浓度时，*Z. mobilis* ZM4 的比生长速率几乎没有受到抑制作用。只有当肉桂酸浓度为 0.3 g/L 时，*Z. mobilis* ZM4 的比生长速率才会受到明显的抑制物，最终由 0.23 下降到 0.17 h^{-1} 。然而当香草酸、对香豆酸、肉桂酸、阿魏酸和 2-糠酸浓度为分别为 1.0、0.3、0.15、0.25 和 0.3 g/L 时，*S. cerevisiae* DQ1 的生长受到显著抑制作用，比生长速率由 0.25 h^{-1} 分别下降到 0.13、0.10、0.0、0.13 和 0.12 h^{-1} (图 5.3b)。

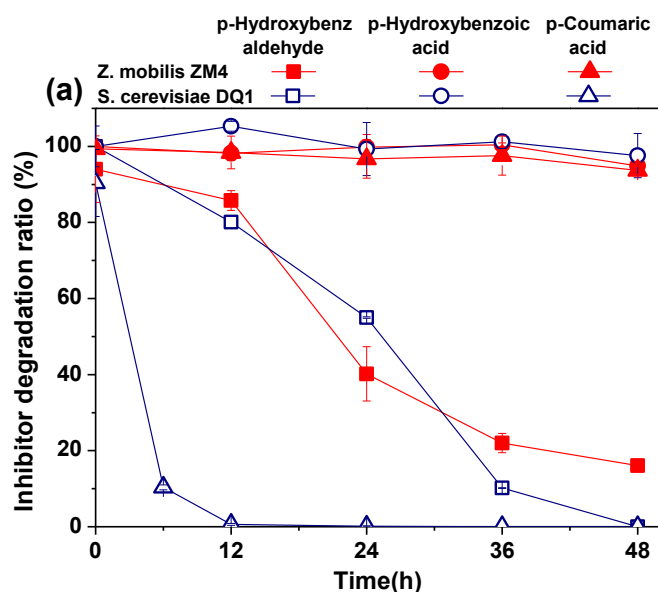
酚类抑制物对 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 的乙醇生产速率的影响如图 5.3c 和 5.3d 所示。在酚醛类化合物存在条件下 *Z. mobilis* ZM4 乙醇生产速率比 *S. cerevisiae* DQ1 略高。当香草醛、丁香醛、松柏醛和愈创木酚浓度分别为 0.6、1.2、0.3 和 0.6 g/L 时，对 *Z. mobilis* ZM4 乙醇生产速率并没有明显的抑制作用，而此时 *S. cerevisiae* DQ1

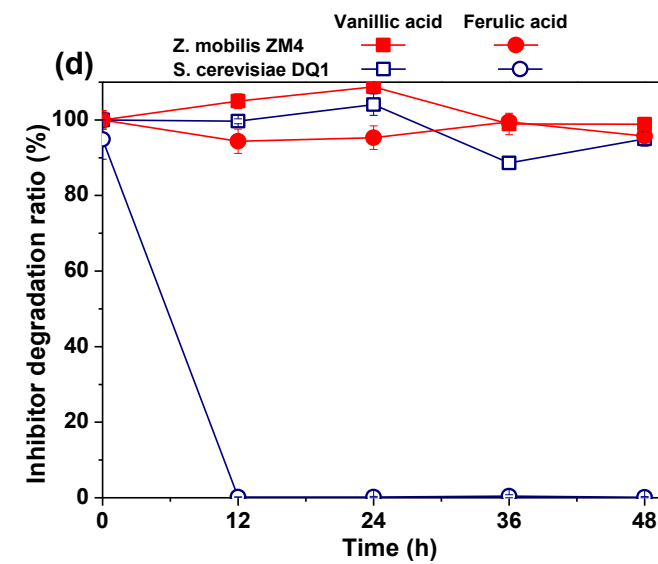
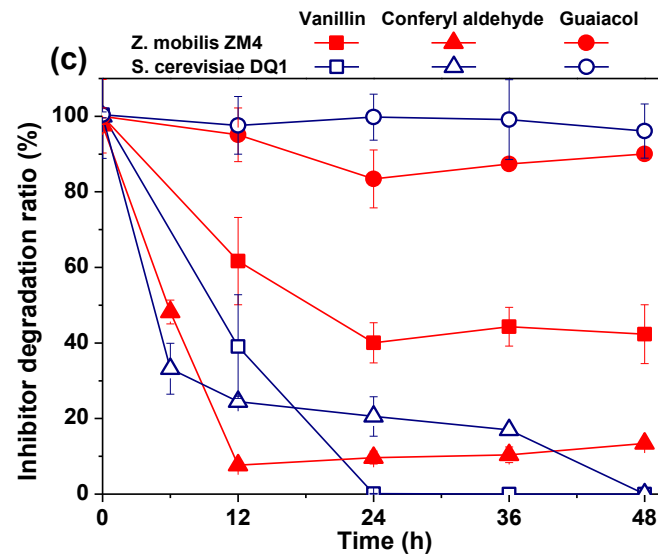
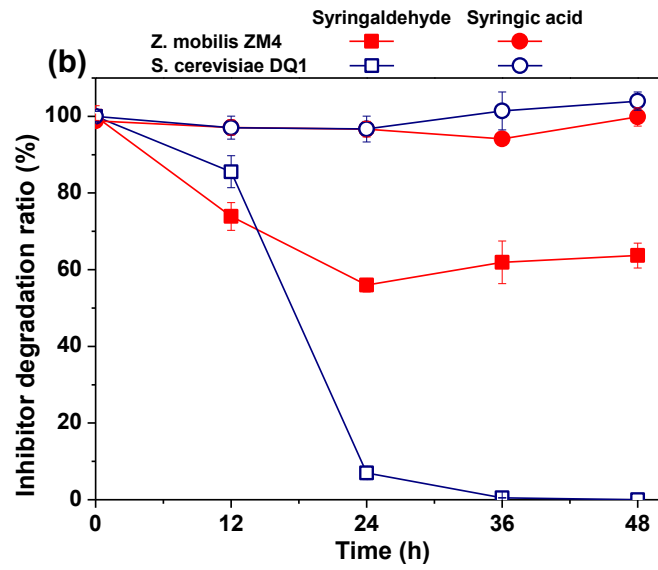
的乙醇发酵性能受到抑制,乙醇相对生产速率分别下降到 53.6%、88.7%、79.0%和 94.3%。只有当对羟基苯甲醛浓度为 0.6 g/L 时, *Z. mobilis* ZM4 乙醇发酵性能受到显著抑制,而对 *S. cerevisiae* DQ1 没有影响(图 5.3c)。对于酚酸类化合物, *Z. mobilis* ZM4 乙醇发酵性能对所有考察的酚酸类抑制物的耐受性都强于 *S. cerevisiae* DQ1。当对羟基苯甲酸、香草酸、对香豆酸、肉桂酸、阿魏酸和 2-糠酸浓度分别为 0.6、0.25、0.3、0.15、0.13 和 0.15 g/L 时, *Z. mobilis* ZM4 乙醇发酵性能没有受到任何影响,而此时 *S. cerevisiae* DQ1 的乙醇相对生产速率分别下降到 94.3%、92.1%、88.4%、0、93.9% 和 69.7%。其中肉桂酸是一个非常典型的例子,当其浓度达到 0.6 g/L 时才会对 *Z. mobilis* ZM4 乙醇发酵性能产生抑制作用,而对于 *S. cerevisiae* DQ1,最低的浓度的肉桂酸便使其乙醇发酵受到完全抑制。丁香酸在 0-1.0 g/L 浓度范围几乎对两菌种没有抑制作用(图 5.3d)。

上述结果表明,尽管两菌株对酚醛类抑制物的耐受性几乎相似,但是 *Z. mobilis* ZM4 对酚酸类抑制物的耐受性明显强于 *S. cerevisiae* DQ1。由于玉米芯残渣中检测到的酚类化合物以酚酸为主,其中包括愈创木酚、2-糠酸、对香豆酸、对羟基苯甲酸和阿魏酸。因此,能够进一步解释 *Z. mobilis* ZM4 在利用工业玉米芯残渣为原料时,其生长状况和发酵性能均强于 *S. cerevisiae* DQ1 的现象。

5.3.3 *Z. mobilis* 和 *S. cerevisiae* 对酚类抑制物的生物降解作用

一般认为微生物对抑制物的耐受性主要来自于其对抑制物的降解能力,即能够将毒性较强的抑制物降解为没有毒性或是毒性很弱的代谢产物^[98]。因此,分别考察 *Z. mobilis* 和 *S. cerevisiae* 对上述 12 种模式酚类化合物的生物降解作用。结果如图 5.4 所示, *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 将 5 种酚醛化合物中的 4 种降解,只有愈创木酚不能被降解。对于酚酸化合物, *Z. mobilis* ZM4 对所有的 7 种酚酸都没有降解能力,而 *S. cerevisiae* DQ1 能够将阿魏酸和对香豆酸降解。





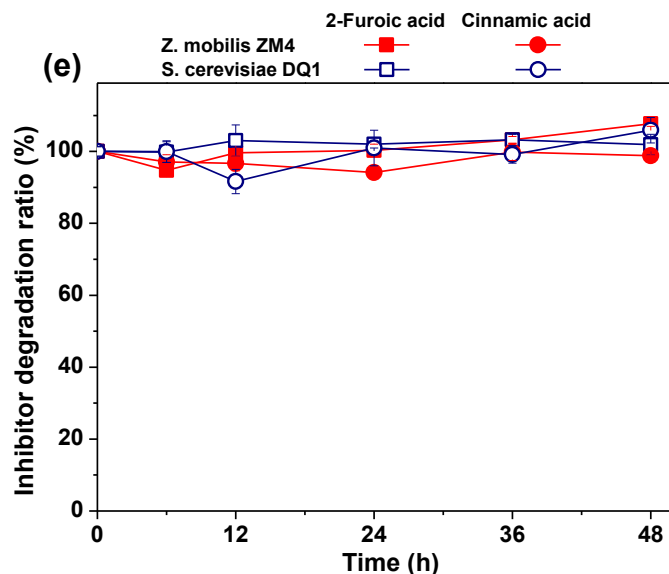


图 5.4 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 对酚类化合物的生物降解

(a) 羟基苯基化合物；(b) 丁香基化合物；(c, d, e) 愈创木基化合物

Fig. 5.4 Biodegradation profiles of phenolic compounds by *Z. mobilis* ZM4 and *S. cerevisiae* DQ1. *p*-Hydroxyphenyl compounds (H group): (a) *p*-hydroxybenzaldehyde, *p*-hydroxybenzoic acid and *p*-coumaric acid; Syringyl compounds (S group): (b) syringaldehyde and syringic acid; Guaiacyl compounds (G group): (c) vanillin, coniferyl aldehyde, guaiacol, and (d) vanillic acid, ferulic acid; Other aromatic acids: (e) cinnamic acid and 2-furoic acid.

进一步通过 GC-MS 和 HPLC 对 *Z. mobilis* ZM4 降解酚醛化合物的代谢产物进行定性定量分析。结果表明 *Z. mobilis* ZM4 能够在初始 12-24 h 内将对羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛和松柏醛降解为相应的酚醇类化合物（表 5.2 相应的谱图见附录 III 附图 3）。

表 5.1 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 的酚类化合物生物降解反应参数

Table 5.1 Biodegradation of phenolic compounds by *Z. mobilis* ZM4 and *S. cerevisiae* DQ1.

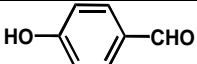
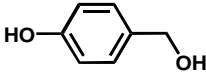
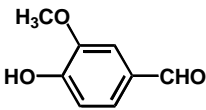
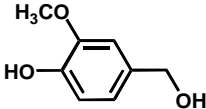
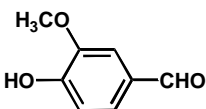
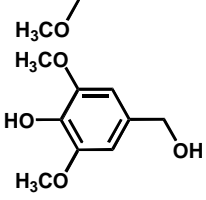
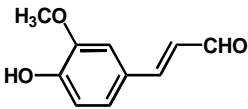
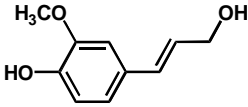
| Phenolic compounds | Concentration (mM) | Rate constant <i>k</i> of phenolic biodegradation (1/s) | |
|----------------------------------|--------------------|---|--------------------------|
| | | <i>Z. mobilis</i> ZM4 | <i>S. cerevisiae</i> DQ1 |
| Phenolic aldehydes | | | |
| <i>p</i> -hydroxybenzyl aldehyde | 4.62 | 1.17×10^{-5} | 2.65×10^{-5} |
| vanillin | 3.96 | 1.26×10^{-5} | 7.79×10^{-5} |
| coniferyl aldehyde | 1.64 | 5.95×10^{-5} | 5.85×10^{-5} |
| guaiacol | 12.10 | - | - |
| syringaldehyde | 4.91 | 0.63×10^{-5} | 5.54×10^{-5} |
| Phenolic acids | | | |
| <i>p</i> -hydroxybenzoic acid | 9.35 | - | - |
| <i>p</i> -coumaric acid | 2.94 | - | 1.17×10^{-4} |
| vanillic acid | 5.95 | - | - |
| ferulic acid | 2.49 | - | 2.91×10^{-4} |
| syringic acid | 2.99 | - | - |
| cinnamic acid | 1.01 | - | - |
| 2-furoic acid | 5.54 | - | - |

-: not detected.

根据一级降解速率动力学模型对上述酚类化合物降解反应进行了动力参数计算。结果如表 5.1 所示，与 *S. cerevisiae* DQ1 相比，*Z. mobilis* ZM4 对香草醛和丁香醛的降解速率较慢，*Z. mobilis* ZM4 对香草醛和丁香醛的降解速率常数分别为 1.26×10^{-5} 和 $0.63 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ，而 *S. cerevisiae* DQ1 降解这两种抑制物的速率常数分别为 7.79×10^{-5} 和 $5.54 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 。另外两菌对松柏醛和对羟基苯甲醛的降解速率基本相似，*Z. mobilis* ZM4 对松柏醛和对羟基苯甲醛的降解速率常数分别为 5.95×10^{-5} 和 $1.17 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ ，*S. cerevisiae* DQ1 降解这两种抑制物的速率常数分别为 5.85×10^{-5} 和 $2.65 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 。

表 5.2 GC-MS 对酚醛类化合物生物降解产物进行定性分析

Table 5.2 GC-MS analysis of phenolic compounds from biodegradation by *Z. mobilis* ZM4.

| Phenolic compounds | Structures | Trimethylsilylated phenolic compounds | | |
|----------------------------------|---|---------------------------------------|-----|---------------------|
| | | RT (min) | MW | Quantification ions |
| <i>p</i> -Hydroxybenzyl aldehyde |  | 12.44 | 194 | 89,121,151,179,194 |
| <i>p</i> -Hydroxybenzyl alcohol |  | 14.64 | 268 | 73,147,179,208,268 |
| Vanillin |  | 15.14 | 224 | 73,91,151,194,224 |
| Vanillyl alcohol |  | 16.72 | 298 | 147,179,209,268,298 |
| Syringaldehyde |  | 17.59 | 254 | 96,153,181,224,254 |
| Syringyl alcohol |  | 18.64 | 328 | 147,209,239,298,328 |
| Coniferyl aldehyde |  | 19.48 | 250 | 102,166,192,220,250 |
| Coniferyl alcohol |  | 20.69 | 324 | 131,204,235,294,324 |

*RT-retention time, MW-molecular weight

上述结果表明，*Z. mobilis* ZM4 具有原位脱毒的能力，能够将酚醛类化合物降解为毒性较低的相应的酚醇类化合物，这可能是由于 *Z. mobilis* ZM4 体内具有 NAD(P)H 依赖型的醇脱氢酶能够将酚醛化合物还原为相应的酚醇化合物^[169]，但不能将玉米芯残渣中含有的酚酸类化合物降解。因此，*Z. mobilis* ZM4 的生物降解能力只能说明其具有对酚醛类化合物的耐受性，而并不能解释其在含有酚酸类抑制物的培养基中或工业玉米芯

残渣中所表现出的优异发酵性能。

5.3.4 细胞结构形态对菌体酚酸耐受性的影响

革兰氏阴性菌的外膜结构在有害化合物存在下能够起到选择性屏障的作用^[170]。为了寻找 *Z. mobilis* ZM4 对酚酸类化合物具有很强耐受性的原因，于是通过扫描电子显微镜 (SEM) 和透射电子显微镜 (TEM) 对 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 在有无酚酸作用下的细胞表面形态和细胞膜微观结构形态进行观察。尽管上述两菌株对肉桂酸耐受性的差异最为明显，但肉桂酸并不像阿魏酸那样广泛存在于植物细胞壁中，在化学或生物预处理过程中释放出来，因此选择阿魏酸作为一种模式酚酸类化合物用于上述研究。

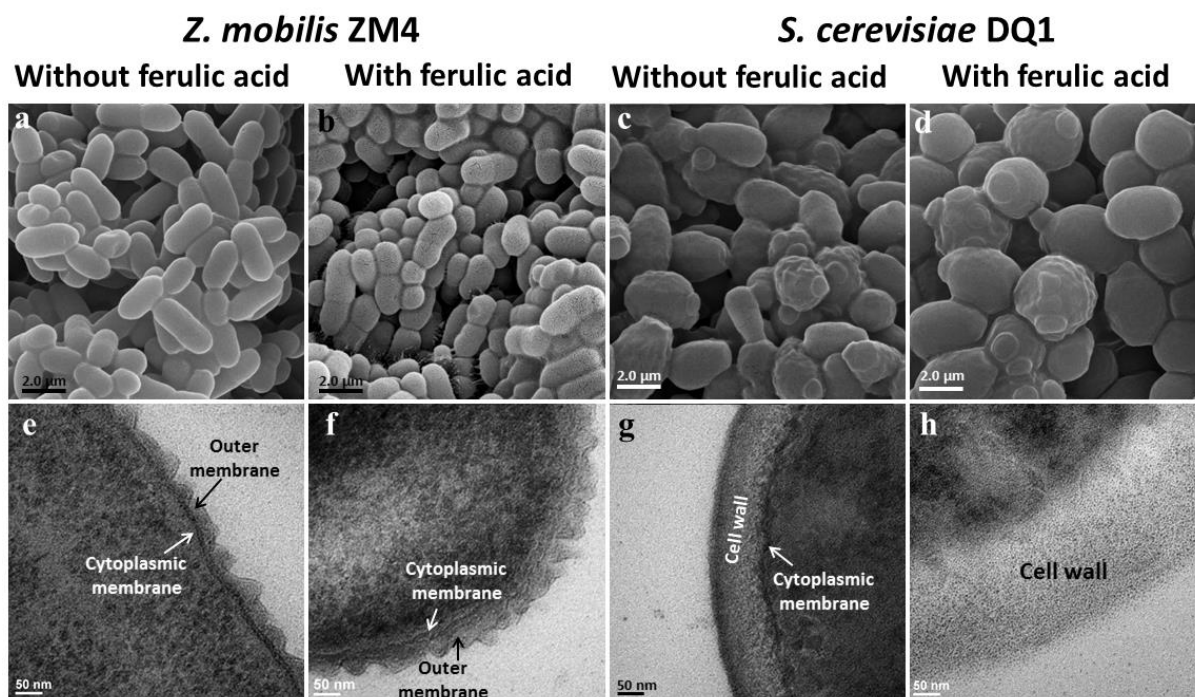


图 5.5 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 在有无阿魏酸作用下的 SEM 和 TEM 图像

Fig. 5.5 SEM and TEM images of *Z. mobilis* ZM4 and *S. cerevisiae* DQ1. (a-d) SEM images of *Z. mobilis* ZM4 and *S. cerevisiae* DQ1 with and without ferulic acid, respectively; (e-h) TEM images of *Z. mobilis* ZM4 and *S. cerevisiae* DQ1 with and without ferulic acid.

结果如图 5.5 所示，*Z. mobilis* ZM4 的 SEM 图像表明在没有阿魏酸胁迫下，细胞呈现正常的细胞大小和光滑的表面结构形态（图 5.5a）。当 *Z. mobilis* ZM4 在含有阿魏酸培养基中培养后，细胞之间出现明显的粘联并且细胞表面变得粗糙伴有大量的细小凸起（图 5.5b）。另一方面，对于 *S. cerevisiae* DQ1 的 SEM 结果，在有无阿魏酸存在的条件下 *S. cerevisiae* DQ1 的细胞外观形态没有明显变化（图 5.5c, d）。

对于 TEM 观察，与没有阿魏酸胁迫作用下的 *Z. mobilis* ZM4 细胞相比，在含有阿魏酸的培养基中生长的细胞外表面明显变得更加粗糙，外膜厚度显著增加，由 30-35 nm 增加到 50-55 nm，结构更加紧密，外膜上小的凸起变得更加密集突出（图 5.5 e, f）。而对于 *S. cerevisiae* DQ1，在没有阿魏酸作用下生长的酵母细胞中能够明显的观察到细胞

壁和细胞膜结构，其中细胞壁结构紧密，厚度在 105-107 nm。而在阿魏酸胁迫下的酵母细胞中最明显的变化是细胞膜消失，细胞壁变得膨胀松散，厚度为 167 nm(图 5.5 g, h)。

上述结果表明，*Z. mobilis* ZM4 在阿魏酸作用下细胞表面和外膜结构发生了明显的变化，对于阿魏酸这类疏水性分子，这些变化可能为细胞提供了有效的渗透性屏障作用以及保持细胞外膜结构稳定的作用^[170]。在 *Z. mobilis* ZM4 细胞表面明显增多的小凸起可能是脂多糖在细胞外膜上积累所致^[122, 125, 171]。脂多糖是革兰氏阴性菌特有细胞外膜的主要组成部分，当细胞外界存在化学胁迫环境时，这些脂多糖形成的凸起会明显增加并且变得比较紧密^[122]。而对于 *S. cerevisiae* DQ1 在阿魏酸胁迫作用下，细胞壁变得松散和细胞膜消失等胞内微观结构的变化可能是由于酚酸类化合物对酵母细胞壁有渗透作用，并且能够破坏细胞膜的完整性，最终导致胞内质子梯度紊乱从而影响细胞的正常生长^[106, 172]。*S. cerevisiae* DQ1 在含有酚酸类化合物的抑制物培养基和工业玉米芯残渣发酵体系中表现出生长和发酵性能变差的原因可能是由于其细胞形态和结构发生了显著变化所导致。

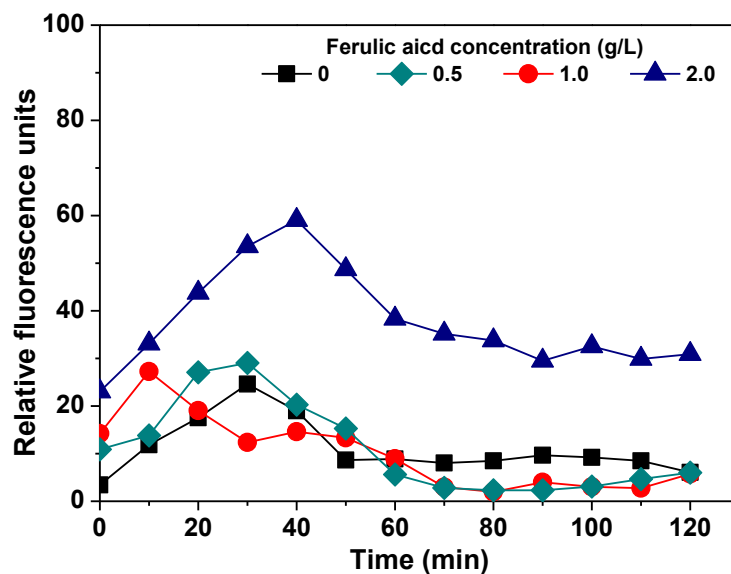


图 5.6 阿魏酸对 *Z. mobilis* ZM4 外膜渗透性的影响

Fig. 5.6 Effect of ferulic acid on the outer membrane permeability of *Z. mobilis* ZM4. Condition: 250 mL flask containing 40 mL of the rich medium with 0.5, 1.0, and 2.0 g/L of ferulic acid, 10% (v/v) inoculation ratio, at 30°C for 8 h. The cells were harvested, rinsed, and resuspended in 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 7.0) to an OD₆₀₀ of 0.5. NPN was added to the cell suspension, and then the fluorescence of sample was monitored at 420 nm for 120 min. Each value represented the mean of triplicate measurements, and the deviation from the mean was below 5%.

为了考察在阿魏酸存在的环境中 *Z. mobilis* ZM4 细胞外膜的渗透性屏障功能，以荧光染料 N-苯基- α -萘胺作为探针通过分析细胞摄入染料后产生的荧光强度分析评价菌体细胞外膜渗透性的差异。由于 N-苯基- α -萘胺在水相溶液中具有很低的荧光量子产量，而当其进入细胞生物膜的疏水性环境中则会产生很高的荧光强度。因此，根据染料进入

细胞后产生的荧光强度和增加速率来反映细胞外膜渗透性的变化^[167]。结果如图 5.6 所示, 在含有 0.5 和 1.0 g/L 阿魏酸的抑制物培养基中培养 8 h 的 *Z. mobilis* ZM4 细胞表现出很低的荧光强度, 基本与未添加阿魏酸的对照组相似, 这说明细胞外膜在上述酚酸环境中保持着很低的渗透性。然后当 *Z. mobilis* ZM4 在培养基中阿魏酸浓度为 2.0 g/L 条件下培养 8 h 后, 其细胞外膜渗透性出现明显提高。上述结果表明较低浓度的阿魏酸 (低于 1.0 g/L) 不会对 *Z. mobilis* ZM4 细胞外膜渗透性造成明显的影响, 而当较高浓度的阿魏酸存在时可能会对其外膜的完整性造成破坏。因此, *Z. mobilis* ZM4 细胞外膜结构对酚酸类化合物起到的渗透屏障作用可以进一步解释 *Z. mobilis* ZM4 对酚酸类化合物具有较强耐受性的表现, 而且提供一种强大的非常有潜力的乙醇发酵菌, 能够利用含有酚类抑制物的木质纤维素原料生产纤维素乙醇。

5.4 小结

本章研究发现利用含有酚类化合物的玉米芯残渣作为原料进行高固含量同步糖化与乙醇发酵时, 运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* ZM4 的细胞生长和乙醇发酵性能均强于酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1。为进一步验证此现象, 选择预处理过程中木质素降解产生的 12 种常见酚类抑制物作为模式化合物考察 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 对酚类化合物的耐受性。结果表明 *Z. mobilis* ZM4 对酚醛类化合物的耐受性与 *S. cerevisiae* DQ1 相似, 但是对酚酸类化合物, 特别是玉米芯残渣中存在的酚酸具有很强的耐受性。为了深入探究其对酚类化合物耐受性的机理, 分别考察了 *Z. mobilis* ZM4 对酚类化合物的生物降解能力和细胞膜渗透屏障功能。结果表明 *Z. mobilis* ZM4 对酚类化合物的耐受机理主要在于能够将酚醛类化合物原位生物降解以及对酚酸类化合物的疏水性屏障作用 (图 5.7)。

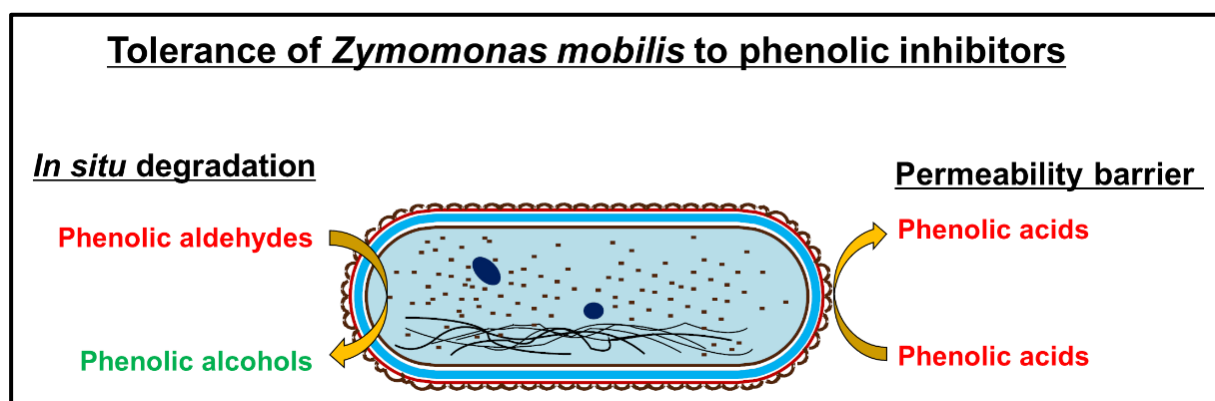


图 5.7 *Z. mobilis* ZM4 对酚类化合物的耐受机理示意图

Fig. 5.7 Schematic diagram of tolerance to phenolic compounds by *Z. mobilis* ZM4

本章主要结论如下:

(1) 利用富含酚类化合物的工业玉米芯残渣作为原料在 30% (w/w) 固含量条件下进行 SSF, *Z. mobilis* ZM4 的细胞生长 (2.8×10^8 CFU/ml) 和乙醇发酵性能 (54.42 g/L) 均强于 *S. cerevisiae* DQ1 (细胞生长状况为 2.9×10^7 CFU/ml, 乙醇浓度 48.6 g/L)。

(2) 考察其他发酵条件对 *Z. mobilis* ZM4 利用工业玉米芯残渣进行 SSF 的影响, 在固含量为 30% (w/w), 纤维素酶用量为 15 FPU/g 干物料, 温度 30°C, pH5.5, 预糖化时间为 12 h 条件下, 得到较好的乙醇发酵结果。此时乙醇浓度为 54.4 g/L, 相应得率为 47.7%。

(3) *Z. mobilis* ZM4 的细胞生长状况和乙醇发酵性能对酚醛类化合物 (对羟基苯甲醛、香草醛、丁香醛、松柏醛和愈创木酚) 的耐受性与 *S. cerevisiae* DQ1 基本相似。*Z. mobilis* ZM4 的细胞生长状况和乙醇发酵性能所有 7 种酚酸类化合物除了肉桂酸外均有很强的耐受性, 特别是对工业玉米芯残渣中存在的 2-糠酸、对羟基苯甲酸、对香豆酸和阿魏酸有很强的耐受性, 而 *S. cerevisiae* DQ1 对大部分酚酸化合物耐受性差。

(4) 通过 GC-MS 检测发现, *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 能够将 4 种酚醛化合物, 对羟基苯甲醛、香草醛、松柏醛和丁香醛降解为毒性相对较弱的相应的酚醇化合物, 相对于的降解反应速率常数分别为 1.17、1.26、5.95 和 0.63×10^{-5} 。说明 *Z. mobilis* ZM4 可能存在非特异性 NAD(P)H 依赖型醇脱氢酶能够将酚类化合物还原为酚醇。

(5) 通过 SEM 和 TEM 观察发现在含有阿魏酸的环境中生长的 *Z. mobilis* ZM4 细胞表面会变得比较粗糙, 伴有大量的小突起, 而且细胞之间出现粘附现象, 而 *S. cerevisiae* DQ1 的细胞膜消失, 细胞壁变得膨胀松散。*Z. mobilis* ZM4 外膜上大量的凸起是脂多糖在外膜上大量积累产生的, 它对疏水性物质起到渗透屏障的作用。

(6) 通过荧光染料 N-苯基- α -萘胺作为探针分析阿魏酸对 *Z. mobilis* ZM4 细胞外膜屏障功能的影响, 发现较低浓度的阿魏酸 (低于 1.0 g/L) 不会对 *Z. mobilis* ZM4 细胞外膜渗透性造成明显的影响, 而当较高浓度的阿魏酸存在时可能会对其外膜的完整性造成破坏。

第 6 章 结论与展望

6.1 结论与创新点

通过生物炼制技术将木质纤维素为原料转化为燃料乙醇及其他大宗化学品的过程与传统糖基平台发酵工艺存在三个本质的差异，分别是木质纤维素原料的预处理、纤维素酶解糖化以及发酵微生物对木质纤维素来源抑制物的耐受性。本论文针对木质纤维素生物炼制技术中纤维素糖化和抑制物耐受性展开以下研究工作：首先，通过两步稀酸处理工艺对木质纤维素原料进行预处理和拆分实现纤维素和半纤维素的综合利用；其次，分别从预处理秸秆组织结构和超分子结构水平对酶解过程中木质纤维素颗粒分布变化规律进行了探究；再次，利用玉米芯工业残渣为原料生产纤维素乙醇时，发现其中含有水溶性较低的酚类抑制物，并通过进化适应策略提高酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 对酚类抑制物的耐受性；最后，发现一种对酚类化合物具有很强耐受性的运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis* ZM4，并对耐受性机理进行了初探。

6.1.1 结论

(1) 通过干式稀酸预处理和稀酸“后水解”处理相结合的工艺，对小麦秸秆木质纤维素组分进行拆分和综合利用，能够将半纤维素和纤维素分别转化为木糖和乙醇，进而分别回收。通过干式稀酸预处理能够有效的破坏小麦秸秆木质纤维素结构，并使半纤维素转化为可溶性木糖寡糖和单糖；稀酸“后水解”处理能够将预处理浆液中剩余的木聚糖和寡糖进一步转化为单糖，不仅实现木糖的充分转化，而且降低木寡糖对纤维素酶的抑制；通过同步糖化和发酵将纤维素转化为乙醇，依次对乙醇和木糖进行分离，从而实现纤维素和半纤维素的综合利用。

(2) 发现预处理秸秆在酶解过程中平均粒径分布变化呈现特有的规律：酶解初始阶段粒径迅速下降，随后保持在 20-30 μm 基本不变。从秸秆组织结构形态和组成分析，粒径迅速下降可能是由于大颗粒外层的薄壁组织快速酶解和内部维管束被酶切断所致；粒径基本保持不变阶段可能是由于大颗粒酶解后产生的大量微管状纤维颗粒在酶解过程中保持结构形态和组分不变所致。其中粒径分布趋于 20-30 μm 基本不变的现象与木质素含量较高的微管纤维结构有关，木质素不仅能够阻碍纤维素的降解，而且能够起到支撑作用，在酶解过程中保持微管结构的完整。另外预处理强度能够显著影响这种结构的颗粒尺寸。预处理能够使微管纤维横截面产生结构松散的“位错”区域，随着预处理强度增强产生“位错”部位的间隔缩小，而纤维素酶会首先选择这种区域将长纤维束切断成短小的纤维管状颗粒。

(3) 发现一种非常有潜力的木质纤维素原料玉米芯工业残渣，其纤维素含量很高，且酶解前无需预处理。但是这种原料含有大量水溶性差的酚类化合物，主要包括：2-糠酸、阿魏酸、对香豆酸、愈创木酚和对羟基苯甲酸，并且对酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 的细胞生长和乙醇发酵性能有很强的抑制作用。开发了一种进化适应策略，通过将 *S.*

cerevisiae DQ1 在玉米芯残渣水解液的浓度梯度培养基中进行一系列培养提高其对抑制物的耐受性。利用高固含量的玉米芯工业残渣进行同步糖化与乙醇发酵时，经过进化适应策略培养的 *S. cerevisiae* DQ1 表现出优异的细胞生长状况和乙醇发酵性能，最终在 5 L 和 50 L 发酵体系中均能够得到超过 7% (v/v) 的乙醇浓度，相应得率可达 55.7%。能够大大降低后续的乙醇精馏成本。

(4) 利用含有酚类化合物的玉米芯工业残渣作为原料进行高固含量同步糖化和乙醇发酵时，发现运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* ZM4 的细胞生长和乙醇发酵性能明显强于 *S. cerevisiae* DQ1。进一步比较 *Z. mobilis* ZM4 和 *S. cerevisiae* DQ1 对 12 种常见酚类化合物的耐受性，发现 *Z. mobilis* ZM4 对酚醛类化合物的耐受性与 *S. cerevisiae* DQ1 基本相似，但是对酚酸类化合物，特别是玉米芯工业残渣中存在的酚酸类物质具有很强的耐受性。分别从抑制物降解和细胞膜屏障两方面分析发现，*Z. mobilis* ZM4 对酚类化合物的耐受机理在于能够通过原位脱毒将酚醛类化合物转化为低毒性的酚醇化合物，其独特的细胞外膜结构对酚酸类化合物具有疏水性屏障作用。

6.1.2 创新点

(1) 开发了一种新型的木纤维素拆分工艺，适用于资源丰富的秸秆类木质纤维素原料。通过两步干式稀酸处理不仅能够利用纤维素组分进行酶解糖化发酵乙醇，而且能够有效的将半纤维素转化为木糖并回收。实现了木质纤维素多组分向高附加值产品转化的综合利用，避免了传统生物炼制工艺中半纤维素组分的浪费。

(2) 发现预处理秸秆在酶解过程中颗粒平均粒径变化存在普遍性规律。分别从秸秆植物组织结构及成分和木质纤维素超分子结构进行多尺度分析产生酶解过程粒径变化规律原因。探究了木质素成分对维持微管纤维结构的作用，首次发现干式稀酸预处理能够使微管纤维产生结构松散、容易酶解的“位错”区域。

(3) 利用一种纤维素含量高且无需预处理的木质纤维素原料玉米芯残渣进行同步糖化与乙醇发酵。首次对玉米芯工业残渣中含有的酚类化合物进行了定性分析，进一步阐述了这些的微溶于水或不溶于水的酚类化合物积累的原因，并考察了其对酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 的抑制作用。开发了一种简单便捷的短期驯化菌种的策略，能够有效的提高 *S. cerevisiae* 对抑制物的耐受性。在发酵前无需对玉米芯工业残渣原料进行脱毒处理，菌种也能够保持很好的活性和乙醇发酵性能。

(4) 运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 普遍被认为是一种抑制物耐受性差的乙醇发酵菌，但是本论文发现 *Z. mobilis* ZM4 自身对酚类抑制物具有独特的耐受作用，特别对酚酸类抑制物有很强的耐受性。发现了 *Z. mobilis* ZM4 具有的原位脱毒能力，并对其生物降解反应动力参数进行计算分析。利用扫描和透射电子显微镜等直观可视化手段对菌体细胞微观形态分析，发现了 *Z. mobilis* ZM 外膜的脂多糖层结构的应激变化。利用荧光探针方法考察了酚酸抑制物对 *Z. mobilis* ZM 外膜渗透性的影响，进一步揭示了 *Z. mobilis* ZM4 对酚类抑制物的耐受机理。

6.2 展望

本论文分别从木质纤维素原料预处理和拆分、纤维素酶解过程粒径分布变化规律以及对木质纤维素来源酚类抑制物的应对策略等生物炼制技术中的关键问题进行了分析研究。提出了一些新的工艺策略、发现了一些新的现象、解决了一些问题，并且对一些现象和机理进行了合理的解释。但是上述研究仍然存在一些工作有待于进一步展开研究。

(1) 在木质纤维素原料组分拆分过程中，如何通过合理的处理方法和控制条件实现纤维素结构的破坏和抑制物水平的有效控制。以及如何降低水解产生的木糖在整个拆分过程中的损失。本论文的拆分方法只对木质纤维素中的纤维素和半纤维素组分进行了有效利用，而对于木质素的分离和回收还有待于进一步的研究。

(2) 预处理后的秸秆在酶解后产生大量的直径为 10-20 μm ，长度为 20-30 μm 的微管纤维。这些微管纤维中木质素含量较高，有一定的刚性和强度，另外由于纤维素酶的作用使其表面层次丰富。具有作为催化剂载体的潜在特性。可以从生物材料方面进一步展开研究。

(3) 尽管经过短期的三步驯化策略能够有效的提高 *S. cerevisiae* 对抑制物的耐受性，但是每次发酵前都需要对菌种进行驯化操作，由于短期的进化适应策略并不能获得对抑制物耐受性稳定遗传的基因脱变株。因此有必要尝试通过长期的反复驯化和筛选获得一株遗传性状稳定的抑制物耐受性突变株。

(4) 目前对于玉米芯残渣中存在的酚类化合物种类只能进行定性分析，而定量分析只能做到总酚含量的测定。由于酚类化合物在水中溶解度较低，所以水解液中检测到的酚类化合物的浓度并不能反映同步糖化和乙醇发酵体系中各种酚类化合物的真实浓度。因此需要进一步开发一种有效的分析方法用于检测发酵体系中各种酚类化合物的浓度。这将对木质纤维素原料中酚类抑制物的分析以及抗性菌的研究有重要作用。

(5) 本论文仅从微生物对酚类抑制物的生理应激、代谢产物和细胞膜结构形态等方面揭示了 *Z. mobilis* ZM4 对酚类抑制物的耐受机理。有待于从抑制物代谢路径、相关酶的调控机制以及细胞膜组分变化等方面进行深入探讨。

参考文献

- [1] What is biomass?2012, <http://www.biomassenergycentre.org.uk>
- [2] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 69(6): 627-642.
- [3] Somerville C, Youngs H, Taylor C, et al. Feedstocks for Lignocellulosic Biofuels. *Science*, 2010, 329(5993): 790-792.
- [4] Perlack R D, Wright L L, Turhollow A F, et al.: Oak Ridge National Lab TN, 2005.
- [5] Kim T H, Kim T H. Overview of technical barriers and implementation of cellulosic ethanol in the U.S. *Energy*, 2014, 66(0): 13-19.
- [6] Tan T, Shang F, Zhang X. Current development of biorefinery in China. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(5): 543-555.
- [7] Kim S, Dale B E. Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 2004, 26(4): 361-375.
- [8] Zhao X, Zhang L, Liu D. Biomass recalcitrance. Part I: the chemical compositions and physical structures affecting the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012, 6(4): 465-482.
- [9] Somerville C, Bauer S, Brininstool G, et al. Toward a Systems Approach to Understanding Plant Cell Walls. *Science*, 2004, 306(5705): 2206-2211.
- [10] Zhou W, Hao Z, Xu Y, et al. Cellulose hydrolysis in evolving substrate morphologies II: Numerical results and analysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(2): 275-289.
- [11] Wada M, Ike M, Tokuyasu K. Enzymatic hydrolysis of cellulose I is greatly accelerated via its conversion to the cellulose II hydrate form. *Polymer Degradation and Stability*, 2010, 95(4): 543-548.
- [12] Rubin E M. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 2008, 454(7206): 841-845.
- [13] Zhao X, Zhang L, Liu D. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012, 6(5): 561-579.
- [14] Brandt A, Grasvik J, Hallett J P, et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids. *Green Chemistry*, 2013, 15(3): 550-583.
- [15] Ragauskas A J, Beckham G T, Biddy M J, et al. Lignin Valorization: Improving Lignin Processing in the Biorefinery. *Science*, 2014, 344(6185): 1246843.
- [16] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin Biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*, 2003, 54(1): 519-546.
- [17] Yuan T-Q, Xu F, Sun R-C. Role of lignin in a biorefinery: separation characterization and valorization. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2013, 88(3): 346-352.
- [18] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review.

- Bioresource Technology, 2002, 83(1): 1-11.
- [19] Sarkar N, Ghosh S K, Bannerjee S, et al. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. *Renewable Energy*, 2012, 37(1): 19-27.
- [20] Limayem A, Ricke S C. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: Current perspectives, potential issues and future prospects. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2012, 38(4): 449-467.
- [21] Chundawat S P S, Donohoe B S, da Costa Sousa L, et al. Multi-scale visualization and characterization of lignocellulosic plant cell wall deconstruction during thermochemical pretreatment. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4(3): 973-984.
- [22] Chundawat S P S, Beckham G T, Himmel M E, et al. Deconstruction of Lignocellulosic Biomass to Fuels and Chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, 2011, 2(1): 121-145.
- [23] Ding S-Y, Liu Y-S, Zeng Y, et al. How Does Plant Cell Wall Nanoscale Architecture Correlate with Enzymatic Digestibility? *Science*, 2012, 338(6110): 1055-1060.
- [24] Jansen S, Smets E, Baas P. Vestures in woody plants: a review. *IAWA journal*, 1998, 19(4): 347-382.
- [25] Lu Y, Sun Q, Yang D, et al. Fabrication of mesoporous lignocellulose aerogels from wood via cyclic liquid nitrogen freezing-thawing in ionic liquid solution. *Journal of Materials Chemistry*, 2012, 22(27): 13548-13557.
- [26] Ding S-Y, Himmel M E. The Maize Primary Cell Wall Microfibril: A New Model Derived from Direct Visualization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2006, 54(3): 597-606.
- [27] Cateto C, Hu G, Ragauskas A. Enzymatic hydrolysis of organosolv Kanlow switchgrass and its impact on cellulose crystallinity and degree of polymerization. *Energy & Environmental Science*, 2011, 4(4): 1516-1521.
- [28] Zhang Y H P, Ding S Y, Mielenz J R, et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(2): 214-223.
- [29] Chundawat S P S, Bellesia G, Uppugundla N, et al. Restructuring the Crystalline Cellulose Hydrogen Bond Network Enhances Its Depolymerization Rate. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133(29): 11163-11174.
- [30] Chandra R P, Bura R, Mabee W E, et al. Substrate Pretreatment: The Key to Effective Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosics?//Olsson L. *Biofuels*. Springer Berlin Heidelberg, 2007: 67-93.
- [31] Hidayat B, Felby C, Johansen K, et al. Cellulose is not just cellulose: a review of dislocations as reactive sites in the enzymatic hydrolysis of cellulose microfibrils. *Cellulose*, 2012, 19(5): 1481-1493.
- [32] Thygesen L, Hidayat B, Johansen K, et al. Role of supramolecular cellulose structures in enzymatic hydrolysis of plant cell walls. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38(8): 975-983.
- [33] Clarke K, Li X, Li K. The mechanism of fiber cutting during enzymatic hydrolysis of wood biomass. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35(9): 3943-3950.

- [34] Pingali S V, Urban V S, Heller W T, et al. Breakdown of Cell Wall Nanostructure in Dilute Acid Pretreated Biomass. *Biomacromolecules*, 2010, 11(9): 2329-2335.
- [35] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 2005, 96(6): 673-686.
- [36] Barakat A, de Vries H, Rouau X. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. *Bioresource Technology*, 2013, 134: 362-373.
- [37] Bussemaker M J, Zhang D. Effect of Ultrasound on Lignocellulosic Biomass as a Pretreatment for Biorefinery and Biofuel Applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, 52(10): 3563-3580.
- [38] Zhu J Y, Wang G S, Pan X J, et al. Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification. *Chemical Engineering Science*, 2009, 64(3): 474-485.
- [39] Sasmal S, Goud V V, Mohanty K. Ultrasound Assisted Lime Pretreatment of Lignocellulosic Biomass toward Bioethanol Production. *Energy & Fuels*, 2012, 26(6): 3777-3784.
- [40] Wei W, Wu S, Liu L. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 302-307.
- [41] Garc á J C, D áz M J, Garcia M T, et al. Search for optimum conditions of wheat straw hemicelluloses cold alkaline extraction process. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 71(0): 127-133.
- [42] Zhu J Y, Pan X, Zalesny R, Jr. Pretreatment of woody biomass for biofuel production: energy efficiency, technologies, and recalcitrance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 87(3): 847-857.
- [43] Garc á-Cubero M T, Gonz ález-Benito G, Indacochea I, et al. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology*, 2009, 100(4): 1608-1613.
- [44] Strong P J, McDonald B, Gapes D J. Combined thermochemical and fermentative destruction of municipal biosolids: A comparison between thermal hydrolysis and wet oxidative pre-treatment. *Bioresource Technology*, 2011, 102(9): 5520-5527.
- [45] Hallac B B, Sannigrahi P, Pu Y, et al. Effect of Ethanol Organosolv Pretreatment on Enzymatic Hydrolysis of *Buddleja davidii* Stem Biomass. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2010, 49(4): 1467-1472.
- [46] Jung Y H, Kim I J, Kim H K, et al. Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. *Bioresource Technology*, 2013, 132: 109-114.
- [47] Rajan K, Carrier D J. Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*, 2014, 62(0): 222-227.
- [48] Yang M, Kuittinen S, Zhang J, et al. Effect of dilute acid pretreatment on the conversion of barley straw with grains to fermentable sugars. *Bioresource Technology*, 2013, 146: 444-450.

- [49] Zheng Y, Lee C, Yu C, et al. Dilute acid pretreatment and fermentation of sugar beet pulp to ethanol. *Applied Energy*, 2013, 105(0): 1-7.
- [50] Chen W-H, Pen B-L, Yu C-T, et al. Pretreatment efficiency and structural characterization of rice straw by an integrated process of dilute-acid and steam explosion for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 2916-2924.
- [51] Cao S, Pu Y, Studer M, et al. Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment. *RSC Advances*, 2012, 2(29): 10925-10936.
- [52] Asada C, Sasaki C, Uto Y, et al. Effect of steam explosion pretreatment with ultra-high temperature and pressure on effective utilization of softwood biomass. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, 60(0): 25-29.
- [53] Li B-Z, Balan V, Yuan Y-J, et al. Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. *Bioresource Technology*, 2010, 101(4): 1285-1292.
- [54] Nitsos C K, Matis K A, Triantafyllidis K S. Optimization of Hydrothermal Pretreatment of Lignocellulosic Biomass in the Bioethanol Production Process. *ChemSusChem*, 2013, 6(1): 110-122.
- [55] Liu Z-H, Qin L, Pang F, et al. Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover. *Industrial Crops and Products*, 2013, 44(0): 176-184.
- [56] Zhao X, Moates G K, Wilson D R, et al. Steam explosion pretreatment and enzymatic saccharification of duckweed (*Lemna minor*) biomass. *Biomass and Bioenergy*, 2015, 72(0): 206-215.
- [57] Vivekanand V, Olsen E F, Eijsink V G H, et al. Effect of different steam explosion conditions on methane potential and enzymatic saccharification of birch. *Bioresource Technology*, 2013, 127: 343-349.
- [58] Oliveira F M V, Pinheiro I O, Souto-Maior A M, et al. Industrial-scale steam explosion pretreatment of sugarcane straw for enzymatic hydrolysis of cellulose for production of second generation ethanol and value-added products. *Bioresource Technology*, 2013, 130: 168-173.
- [59] Isci A, Himmelsbach J, Pometto A, III, et al. Aqueous Ammonia Soaking of Switchgrass Followed by Simultaneous Saccharification and Fermentation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 144(1): 69-77.
- [60] Bals B, Wedding C, Balan V, et al. Evaluating the impact of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment conditions on the cost of ethanol production. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 1277-1283.
- [61] Gao D, Chundawat S P S, Uppugundla N, et al. Binding characteristics of *Trichoderma reesei* cellulases on untreated, ammonia fiber expansion (AFEX), and dilute-acid pretreated lignocellulosic biomass. *Biotechnology and Bioengineering*, 2011, 108(8): 1788-1800.
- [62] Lau M W, Dale B E. Effect of primary degradation-reaction products from Ammonia Fiber Expansion (AFEX)-treated corn stover on the growth and fermentation of

- Escherichia coli* KO11. *Bioresource Technology*, 2010, 101(20): 7849-7855.
- [63] Teymouri F, Laureano-Pérez L, Alizadeh H, et al. Ammonia fiber explosion treatment of corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, 2004, 115(1-3): 951-963.
- [64] Bak J S, Ko J K, Choi I-G, et al. Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(3): 471-482.
- [65] Dashtban M, Schraft H, Qin W. Fungal Bioconversion of Lignocellulosic Residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*, 2009, 5(6): 578-595.
- [66] Tian X-f, Fang Z, Guo F. Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2012, 6(3): 335-350.
- [67] FitzPatrick M, Champagne P, Cunningham M F, et al. A biorefinery processing perspective: Treatment of lignocellulosic materials for the production of value-added products. *Bioresource Technology*, 2010, 101(23): 8915-8922.
- [68] Sathitsuksanoh N, Zhu Z, Zhang Y H P. Cellulose solvent- and organic solvent-based lignocellulose fractionation enabled efficient sugar release from a variety of lignocellulosic feedstocks. *Bioresource Technology*, 2012, 117: 228-233.
- [69] Zhang Y-H P, Ding S-Y, Mielenz J R, et al. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(2): 214-223.
- [70] Sathitsuksanoh N, Zhu Z, Ho T-J, et al. Bamboo saccharification through cellulose solvent-based biomass pretreatment followed by enzymatic hydrolysis at ultra-low cellulase loadings. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4926-4929.
- [71] Sathitsuksanoh N, Zhu Z, Templeton N, et al. Saccharification of a Potential Bioenergy Crop, *Phragmites australis* (Common Reed), by Lignocellulose Fractionation Followed by Enzymatic Hydrolysis at Decreased Cellulase Loadings. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2009, 48(13): 6441-6447.
- [72] Zhu Z, Sathitsuksanoh N, Vinzant T, et al. Comparative study of corn stover pretreated by dilute acid and cellulose solvent-based lignocellulose fractionation: Enzymatic hydrolysis, supramolecular structure, and substrate accessibility. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 103(4): 715-724.
- [73] Conte P, Maccotta A, De Pasquale C, et al. Dissolution Mechanism of Crystalline Cellulose in H₃PO₄ As Assessed by High-Field NMR Spectroscopy and Fast Field Cycling NMR Relaxometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2009, 57(19): 8748-8752.
- [74] Verdia P, Brandt A, Hallett J P, et al. Fractionation of lignocellulosic biomass with the ionic liquid 1-butylimidazolium hydrogen sulfate. *Green Chemistry*, 2014, 16(3): 1617-1627.
- [75] Sun N, Rahman M, Qin Y, et al. Complete dissolution and partial delignification of wood in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium acetate. *Green Chemistry*, 2009,

- 11(5): 646-655.
- [76] Lee S H, Doherty T V, Linhardt R J, et al. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(5): 1368-1376.
- [77] da Costa Lopes A, Jo ão K, Morais A, et al. Ionic liquids as a tool for lignocellulosic biomass fractionation. *Sustainable Chemical Processes*, 2013, 1(1): 1-31.
- [78] Lan W, Liu C-F, Sun R-C. Fractionation of Bagasse into Cellulose, Hemicelluloses, and Lignin with Ionic Liquid Treatment Followed by Alkaline Extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59(16): 8691-8701.
- [79] Kaldstrom M, Meine N, Fares C, et al. Deciphering 'water-soluble lignocellulose' obtained by mechanocatalysis: new insights into the chemical processes leading to deep depolymerization. *Green Chemistry*, 2014, 16(7): 3528-3538.
- [80] Tunc M S, Chheda J, van der Heide E, et al. Two-Stage Fractionation and Fiber Production of Lignocellulosic Biomass for Liquid Fuels and Chemicals. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2013, 52(36): 13209-13216.
- [81] Gandolfi S, Ottolina G, Consonni R, et al. Fractionation of Hemp Hurds by Organosolv Pretreatment and its Effect on Production of Lignin and Sugars. *ChemSusChem*, 2014, 7(7): 1991-1999.
- [82] vom Stein T, Grande P M, Kayser H, et al. From biomass to feedstock: one-step fractionation of lignocellulose components by the selective organic acid-catalyzed depolymerization of hemicellulose in a biphasic system. *Green Chemistry*, 2011, 13(7): 1772-1777.
- [83] Olsson L, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18(5): 312-331.
- [84] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 2000, 74(1): 25-33.
- [85] Almeida J R M, Modig T, Petersson A, et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of chemical technology and biotechnology*, 2007, 82(4): 340-349.
- [86] Hasunuma T, Kondo A. Development of yeast cell factories for consolidated bioprocessing of lignocellulose to bioethanol through cell surface engineering. *Biotechnology Advances*, 2012, 30(6): 1207-1218.
- [87] Kim I, Barrow K, Rogers P. Nuclear magnetic resonance studies of acetic acid inhibition of *Zymomonas mobilis* ZM4(pZB5). *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2000, 84-86(1-9): 357-370.
- [88] Yang S, Land M L, Klingeman D M, et al. Paradigm for industrial strain improvement identifies sodium acetate tolerance loci in *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(23): 10395-10400.
- [89] 林贝, 赵心清, 葛旭萌. 玉米秸秆酸解副产物对重组酿酒酵母 6508-127 发酵的影

- 响. 中国生物工程杂志, 2007, 27(7): 61-67.
- [90] Roe A J, McLaggan D, Davidson I, et al. Perturbation of anion balance during inhibition of growth of *Escherichia coli* by weak acids. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(4): 767-772.
- [91] Mira N P, Teixeira M C, Sá-Correia I. Adaptive Response and Tolerance to Weak Acids in *Saccharomyces cerevisiae*: A Genome-Wide View. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 2010, 14(5): 525-540.
- [92] Klinke H B, Thomsen A B, Ahring B K. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 66(1): 10-26.
- [93] Jordan D B, Braker J D, Bowman M J, et al. Kinetic mechanism of an aldehyde reductase of *Saccharomyces cerevisiae* that relieves toxicity of furfural and 5-hydroxymethylfurfural. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2011, 1814(12): 1686-1694.
- [94] Ma M G, Liu Z L. Comparative transcriptome profiling analyses during the lag phase uncover YAP1, PDR1, PDR3, RPN4, and HSF1 as key regulatory genes in genomic adaptation to the lignocellulose derived inhibitor HMF for *Saccharomyces cerevisiae*. *Bmc Genomics*, 2010, 11(1): 660.
- [95] Liu Z L, Moon J. A novel NADPH-dependent aldehyde reductase gene from *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632 involved in the detoxification of aldehyde inhibitors derived from lignocellulosic biomass conversion. *Gene*, 2009, 446(1): 1-10.
- [96] Hadi S M, Shahabuddin, Rehman A. Specificity of the interaction of furfural with DNA. *Mutation Research Letters*, 1989, 225(3): 101-106.
- [97] Zhang J, Wang X, Chu D, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4480-4488.
- [98] Liu Z L. Molecular mechanisms of yeast tolerance and in situ detoxification of lignocellulose hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90(3): 809-825.
- [99] Franden M A, Pilath H M, Mohagheghi A, et al. Inhibition of growth of *Zymomonas mobilis* by model compounds found in lignocellulosic hydrolysates. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 99.
- [100] Allen S, Clark W, McCaffery J M, et al. Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3(1): 2.
- [101] Klinke H B, Ahring B K, Schmidt A S, et al. Characterization of degradation products from alkaline wet oxidation of wheat straw. *Bioresource Technology*, 2002, 82(1): 15-26.
- [102] Lawther J M, Sun R, Banks W B. Fractional characterization of alkali-labile lignin and alkali-insoluble lignin from wheat straw. *Industrial Crops and Products*, 1996, 5(4):

- 291-300.
- [103] Cortez D V, Roberto I C. Individual and interaction effects of vanillin and syringaldehyde on the xylitol formation by *Candida guilliermondii*. *Bioresource Technology*, 2010, 101(6): 1858-1865.
- [104] Guo T, Tang Y, Zhang Q-y, et al. *Clostridium beijerinckii* mutant with high inhibitor tolerance obtained by low-energy ion implantation. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(3): 401-407.
- [105] Zaldivar J, Martinez A, Ingram L O. Effect of alcohol compounds found in hemicellulose hydrolysate on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 68(5): 524-530.
- [106] Zaldivar J, Ingram L O. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 66(4): 203-210.
- [107] Zhang J, Geng A, Yao C, et al. Effects of lignin-derived phenolic compounds on xylitol production and key enzyme activities by a xylose utilizing yeast *Candida athensensis* SB18. *Bioresource Technology*, 2012, 121: 369-378.
- [108] Cho D, Lee Y, Um Y, et al. Detoxification of model phenolic compounds in lignocellulosic hydrolysates with peroxidase for butanol production from *Clostridium beijerinckii*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83(6): 1035-1043.
- [109] Okuda N, Soneura M, Ninomiya K, et al. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2008, 106(2): 128-133.
- [110] Nichols N N, Sharma L N, Mowery R A, et al. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 42(7): 624-630.
- [111] Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3(1): 26.
- [112] Koopman F, Wierckx N, de Winde J H, et al. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(11): 4919-4924.
- [113] Lins P, Reitschuler C, Illmer P. Development and evaluation of inocula combating high acetate concentrations during the start-up of an anaerobic digestion. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 167-173.
- [114] Hawkins G M, Doran-Peterson J. A strain of *Saccharomyces cerevisiae* evolved for fermentation of lignocellulosic biomass displays improved growth and fermentative ability in high solids concentrations and in the presence of inhibitory compounds. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4: 49.
- [115] Mart n C, Marcet M, Almaz n O, et al. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology*, 2007, 98(9): 1767-1773.

- [116] Liu Z L, Slininger P, Gorsich S. Enhanced biotransformation of furfural and hydroxymethylfurfural by newly developed ethanogenic yeast strains. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 121(1-3): 451-460.
- [117] Almeida J R M, Bertilsson M, Gorwa-Grauslund M F, et al. Metabolic effects of furaldehydes and impacts on biotechnological processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(4): 625-638.
- [118] Yang S, Keller M, Brown S. Genomics on Pretreatment Inhibitor Tolerance of *Zymomonas mobilis*//Liu Z L. *Microbial Stress Tolerance for Biofuels*. Springer Berlin Heidelberg. 2012: 161-175.
- [119] Gorsich S W, Dien B S, Nichols N N, et al. Tolerance to furfural-induced stress is associated with pentose phosphate pathway genes ZWF1, GND1, RPE1, and TKL1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(3): 339-349.
- [120] Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barriers and active efflux. *Science*, 1994, 264(5157): 382-388.
- [121] Larsson S, Nilvebrant N, Jönsson L. Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Pad1p on the resistance to phenylacrylic acids and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57(1-2): 167-174.
- [122] Amro N A, Kotra L P, Wadu-Mesthrige K, et al. High-Resolution Atomic Force Microscopy Studies of the *Escherichia coli* Outer Membrane: Structural Basis for Permeability. *Langmuir*, 2000, 16(6): 2789-2796.
- [123] Skerker J M, Leon D, Price M N, et al. Dissecting a complex chemical stress: chemogenomic profiling of plant hydrolysates. 2013.
- [124] Schwalbach M S, Keating D H, Tremaine M, et al. Complex Physiology and Compound Stress Responses during Fermentation of Alkali-Pretreated Corn Stover Hydrolysate by an *Escherichia coli* Ethanologen. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(9): 3442-3457.
- [125] Barrow K D, Collins J G, Rogers P L, et al. The structure of a novel polysaccharide isolated from *Zymomonas mobilis* determined by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *European Journal of Biochemistry*, 1984, 145(1): 173-179.
- [126] Chu D, Zhang J, Bao J. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation of Corn Stover at High Temperature and High Solids Loading by a Thermotolerant Strain *Saccharomyces cerevisiae* DQ1. *BioEnergy Research*, 2012, 5(4): 1020-1026.
- [127] Bai D-M, Li S-Z, Liu Z L, et al. Enhanced l -(+)-Lactic Acid Production by an Adapted Strain of *Rhizopus oryzae* using Corn cob Hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 144(1): 79-85.
- [128] 刘学梅, 刘传富. 挤压膨化玉米芯酸水解制备木糖的研究. *农产品加工: 学刊 (下)*, 2014, (2): 1-4.
- [129] Cai C M, Zhang T, Kumar R, et al. THF co-solvent enhances hydrocarbon fuel

- precursor yields from lignocellulosic biomass. *Green Chemistry*, 2013, 15(11): 3140-3145.
- [130] Cui X, Zhao X, Zeng J, et al. Robust enzymatic hydrolysis of Formiline-pretreated oil palm empty fruit bunches (EFB) for efficient conversion of polysaccharide to sugars and ethanol. *Bioresource Technology*, 2014, 166: 584-591.
- [131] da Costa Lopes A M, Jo ão K G, Rubik D F, et al. Pre-treatment of lignocellulosic biomass using ionic liquids: Wheat straw fractionation. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 198-208.
- [132] Kumar R, Wyman C E. Effect of enzyme supplementation at moderate cellulase loadings on initial glucose and xylose release from corn stover solids pretreated by leading technologies. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 102(2): 457-467.
- [133] Kumar R, Wyman C E. Strong cellulase inhibition by Mannan polysaccharides in cellulose conversion to sugars. *Biotechnology and Bioengineering*, 2014, 111(7): 1341-1353.
- [134] Qing Q, Yang B, Wyman C E. Xylooligomers are strong inhibitors of cellulose hydrolysis by enzymes. *Bioresource Technology*, 2010, 101(24): 9624-9630.
- [135] Zhang T, Kumar R, Tsai Y-D, et al. Xylose yields and relationship to combined severity for dilute acid post-hydrolysis of xylooligomers from hydrothermal pretreatment of corn stover. *Green Chemistry*, 2015, 17(1): 394-403.
- [136] He Y, Zhang L, Zhang J, et al. Helically agitated mixing in dry dilute acid pretreatment enhances the bioconversion of corn stover into ethanol. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 1.
- [137] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al., Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, NREL/TP-510-42618. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2011.
- [138] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al., Determination of Ash in Biomass, NREL/TP-510-42622. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2008.
- [139] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al., Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples, NREL/TP-510-42623. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2008.
- [140] Adney B, Baker J, Measurement of Cellulase Activities, NREL/TP-510-42628. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory, 2008.
- [141] Ghose T. Measurement of cellulase activities. *Pure and applied Chemistry*, 1987, 59(2): 257-268.
- [142] Zhang J, Bao J. A modified method for calculating practical ethanol yield at high lignocellulosic solids content and high ethanol titer. *Bioresource Technology*, 2012, 116: 74-79.
- [143] Bondesson P-M, Galbe M, Zacchi G. Ethanol and biogas production after steam pretreatment of corn stover with or without the addition of sulphuric acid. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 11.
- [144] Xiang Q, Lee Y, Torget R. Kinetics of Glucose Decomposition During Dilute-Acid

- Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass//Finkelstein M, McMillan J, Davison B, et al. Proceedings of the Twenty-Fifth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals Held May 4–7, 2003, in Breckenridge, CO. Humana Press. 2004: 1127-1138.
- [145] Morinelly J E, Jensen J R, Browne M, et al. Kinetic Characterization of Xylose Monomer and Oligomer Concentrations during Dilute Acid Pretreatment of Lignocellulosic Biomass from Forests and Switchgrass. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2009, 48(22): 9877-9884.
- [146] Jonsson L, Alriksson B, Nilvebrant N-O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 16.
- [147] Arantes V, Gourlay K, Saddler J. The enzymatic hydrolysis of pretreated pulp fibers predominantly involves "peeling/erosion" modes of action. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 87.
- [148] Kinnarinen T, Häkkinen A. Influence of enzyme loading on enzymatic hydrolysis of cardboard waste and size distribution of the resulting fiber residue. *Bioresource Technology*, 2014, 159(0): 136-142.
- [149] Bu L, Tang Y, Gao Y, et al. Comparative characterization of milled wood lignin from furfural residues and corncob. *Chemical Engineering Journal*, 2011, 175(0): 176-184.
- [150] Tang Y, Zhao D, Cristhian C, et al. Simultaneous saccharification and cofermentation of lignocellulosic residues from commercial furfural production and corn kernels using different nutrient media. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4(1): 22.
- [151] Liu K, Lin X, Yue J, et al. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4952-4958.
- [152] Lewis Liu Z, Weber S A, Cotta M A, et al. A new β -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, 2012, 104(0): 410-416.
- [153] Cheng K-K, Wang W, Zhang J-A, et al. Statistical optimization of sulfite pretreatment of corncob residues for high concentration ethanol production. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 3014-3019.
- [154] Zhang W L, Liu Z Y, Liu Z, et al. Butanol production from corncob residue using *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052. *Letters in Applied Microbiology*, 2012, 55(3): 240-246.
- [155] Zhang J, Chu D, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105(4): 718-728.
- [156] Hoyer K, Galbe M, Zacchi G. The effect of prehydrolysis and improved mixing on high-solids batch simultaneous saccharification and fermentation of spruce to ethanol. *Process Biochemistry*, 2013, 48(2): 289-293.
- [157] Jin M, Sarks C, Gunawan C, et al. Phenotypic selection of a wild *Saccharomyces cerevisiae* strain for simultaneous saccharification and co-fermentation of AFEXTM pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 108.

- [158] Zhang M, Wang F, Su R, et al. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4959-4964.
- [159] Palmqvist E, Grage H, Meinander N Q, et al. Main and interaction effects of acetic acid, furfural, and p- hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 63(1): 46-55.
- [160] Thomsen M, Thygesen A, Thomsen A. Identification and characterization of fermentation inhibitors formed during hydrothermal treatment and following SSF of wheat straw. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 83(3): 447-455.
- [161] Cheng K K, Wang W, Zhang J A, et al. Statistical optimization of sulfite pretreatment of corncob residues for high concentration ethanol production. *Bioresour Technol*, 2011, 102(3): 3014-3019.
- [162] Liu K, Lin X, Yue J, et al. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. *Bioresour Technol*, 2010, 101(13): 4952-4958.
- [163] Wang K, Yang H, Chen Q, et al. Influence of delignification efficiency with alkaline peroxide on the digestibility of furfural residues for bioethanol production. *Bioresour Technol*, 2013, 146(0): 208-214.
- [164] Gu H, Zhang J, Bao J. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues. *Bioresour Technol*, 2014, 157: 6-13.
- [165] Ask M, Mapelli V, Hock H, et al. Engineering glutathione biosynthesis of *Saccharomyces cerevisiae* increases robustness to inhibitors in pretreated lignocellulosic materials. *Microbial Cell Factories*, 2013, 12(1): 87.
- [166] Khoddami A, Wilkes M, Roberts T. Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds. *Molecules*, 2013, 18(2): 2328-2375.
- [167] Loh B, Grant C, Hancock R E. Use of the fluorescent probe 1-N-phenylnaphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1984, 26(4): 546-551.
- [168] Zhang J, Lynd L R. Ethanol production from paper sludge by simultaneous saccharification and co-fermentation using recombinant xylose-fermenting microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 107(2): 235-244.
- [169] He M-x, Wu B, Shui Z-x, et al. Transcriptome profiling of *Zymomonas mobilis* under furfural stress. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95(1): 189-199.
- [170] Nikaido H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003, 67(4): 593-656.
- [171] Kotra L P, Golemi D, Amro N A, et al. Dynamics of the Lipopolysaccharide Assembly on the Surface of *Escherichia coli*. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(38): 8707-8711.
- [172] Mills T Y, Sandoval N R, Gill R T. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2: 26-26.

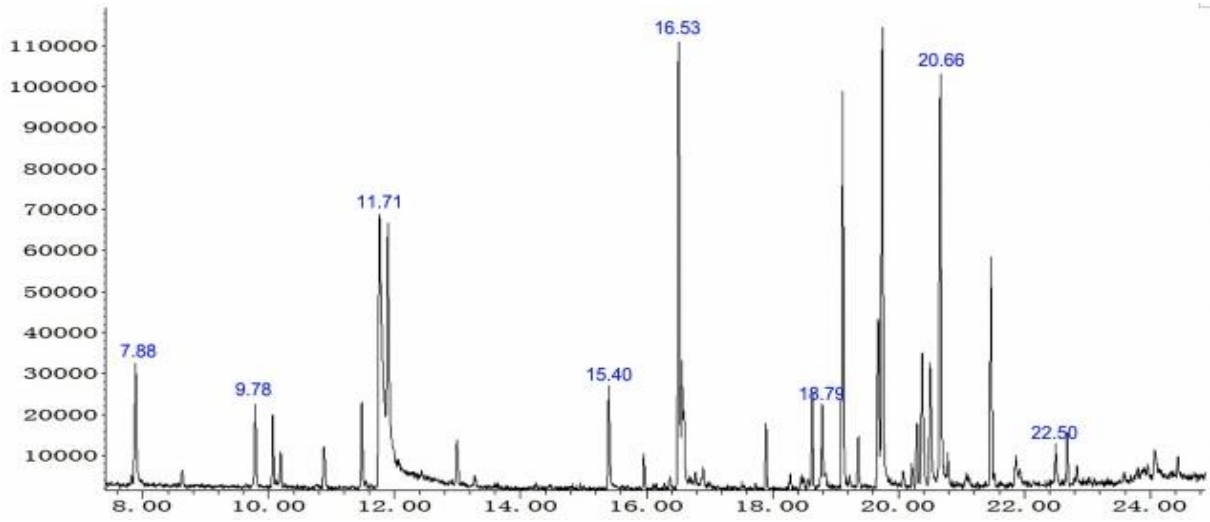
附录 I 主要试剂

| 试剂 | 规格 | 生产厂家 |
|---------------|------|--------------------|
| 酵母提取物 | 生化试剂 | 安琪酵母股份有限公司 |
| 酵母提取物 | 生化试剂 | 牛津公司 (OXOID LID) |
| 硫酸 | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 氢氧化钠 | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 磷酸氢二钾 | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 七水合硫酸镁 | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 硫酸铵 | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 碳酸钙 | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 柠檬酸 | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 柠檬酸钠 | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 二甲基亚砷 | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 甲酸 | 分析纯 | 上海凌峰化学试剂有限公司 |
| 马来酸 | 分析纯 | 阿拉丁试剂有限公司 (上海) |
| 双(三甲基硅烷)三氟乙酰胺 | 分析纯 | 美国 REGIS 科技公司 |
| 葡萄糖 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 木糖 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 无水乙醇 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 甘油 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 糠醛 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 5-羟甲基糠醛 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 2-糠酸 | 分析纯 | 国药集团化学试剂有限公司 |
| 香草醇 | 分析纯 | 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司 |
| 对羟基苯甲醇 | 分析纯 | 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司 |
| 丁香醇 | 分析纯 | 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司 |
| 松柏醇 | 分析纯 | 梯希爱(上海)化成工业发展有限公司 |
| 香草醛 | 分析纯 | Sigma-Aldrich (美国) |
| 对羟基苯甲醛 | 分析纯 | Sigma-Aldrich (美国) |
| 丁香醛 | 分析纯 | Sigma-Aldrich (美国) |
| 愈创木酚 | 分析纯 | Sigma-Aldrich (美国) |
| 松柏醛 | 分析纯 | Sigma-Aldrich (美国) |
| 香草酸 | 分析纯 | Sigma-Aldrich (美国) |
| 对羟基苯甲酸 | 分析纯 | Sigma-Aldrich (美国) |
| 丁香酸 | 分析纯 | Sigma-Aldrich (美国) |
| 对香豆酸 | 分析纯 | Sigma-Aldrich (美国) |
| 肉桂酸 | 分析纯 | Sigma-Aldrich (美国) |
| 阿魏酸 | 分析纯 | Sigma-Aldrich (美国) |

附录 II 仪器设备

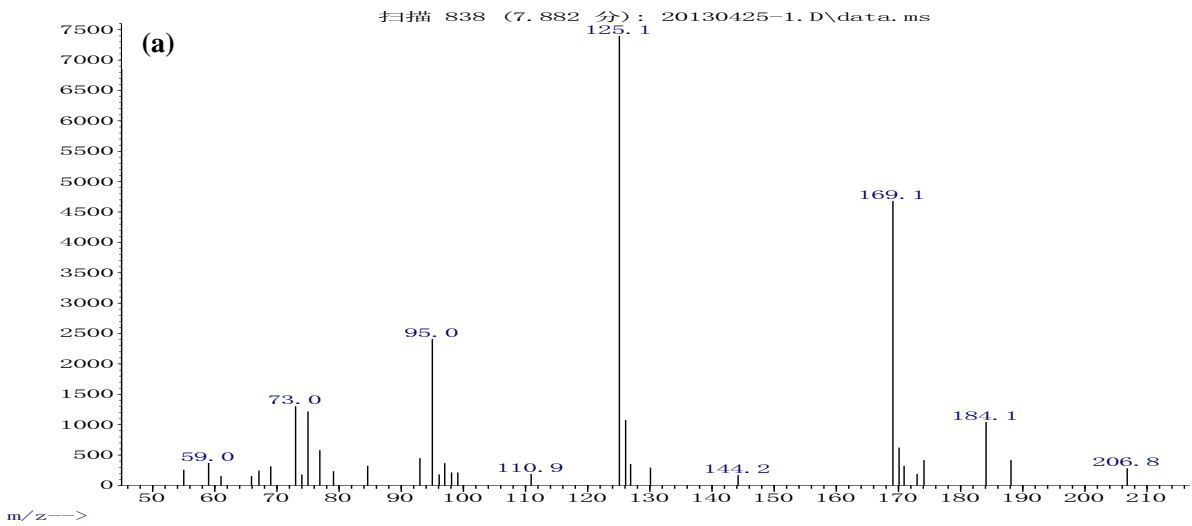
| 仪器名称 | 型号 | 生产厂家 |
|-------------|-------------------|--------------------------------|
| 核酸蛋白质分析仪 | DU-800 | 美国 Beckman Coulter 有限公司 |
| 超纯水机 | Milli-Q Synthesis | 德国 Merck Millipore (美国) 公司 |
| 超净工作台 | SW-CJ-1FD | 苏州苏洁净化 |
| 隔水式恒温培养箱 | DK-8D | 上海一恒科学仪器 |
| 气浴摇床 | SDC-6 | 宁波新芝生物科技有限公司 |
| 高效液相色谱 | LC-20AT 紫外检测器 | 日本岛津公司 |
| 高效液相色谱 | LC-20AD 示差检测器 | 日本岛津公司 |
| 台式离心机 | 5415R | 德国 Eppendorf 公司 |
| 三联发酵罐 | BIOTECH-3BG-5L | 上海保兴生物设备工程有限公司 |
| 50L 发酵罐 | 50 L | 上海保兴生物设备工程有限公司 |
| 压榨机 | 无型号 | 上海大张环保设备有限公司 |
| 预处理蒸汽发生器 | HX-36D-2.5 | 上海华征特种锅炉制造有限公司 |
| 螺带搅拌式预处理反应器 | PCF20-1.6 | 烟台科立化工设备有限公司 |
| 磨浆机 | DSX-32S | 江苏启东市东盛化工机械厂 |
| 旋转蒸发仪 | N-1001 | 上海大研仪器有限公司 |
| 马弗炉 | SX2-2.5-10 | 上海博迅实业有限公司医疗设备厂 |
| 低温冷却循环泵 | DLSB-10/20 | 上海鹰迪仪器设备有限公司 |
| 超高速离心机 | J-26 | 美国 Beckman Coulter 有限公司 |
| 超低温冰箱 | Forma-86C | 美国 Thermo Fisher Scientific 公司 |
| pH 计 | PHS-3C | 上海仪电科学仪器股份有限公司 |
| 真空干燥箱 | DZF-6050B | 上海一恒科学仪器 |
| 水浴恒温摇床 | HZ-9212S | 江苏华利达 |
| 粉碎机 | SF | 上海科太粉碎设备厂 |
| 分样筛 | 20-600 目 | 上海丰行筛网制造有限公司 |
| 自动灭菌锅 | YXQ-LS-75SII | 上海博迅实业有限公司 |

附录 III 酚类化合物质谱图

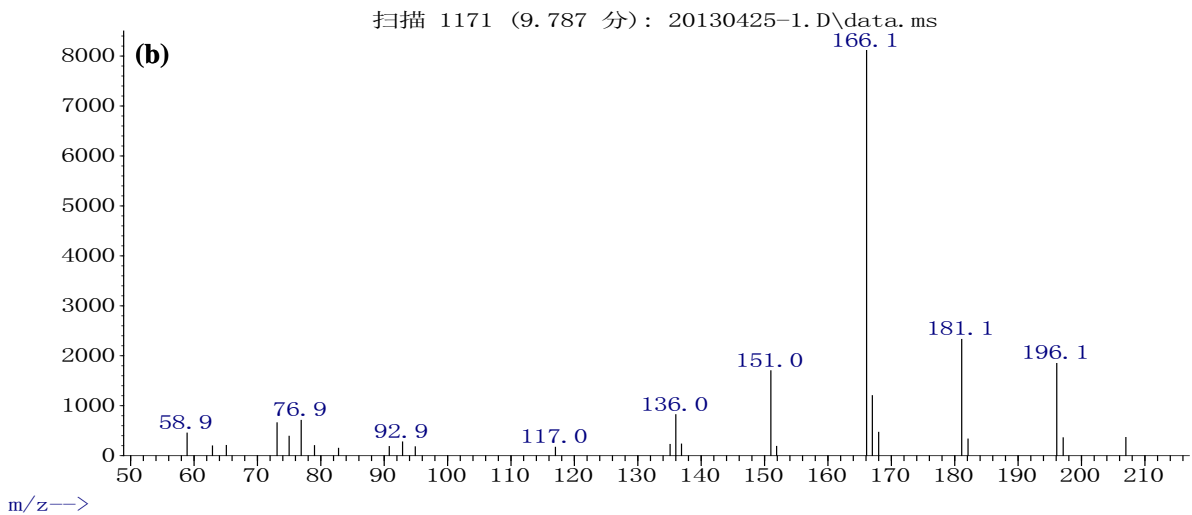


附图 1 玉米芯残渣水解液 GC-MS 总离子色谱图

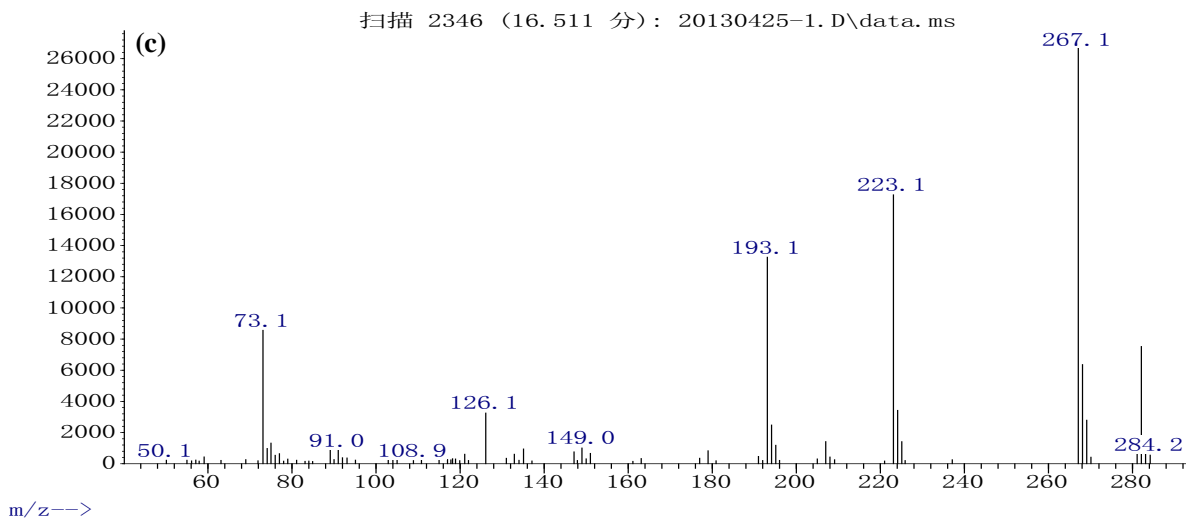
丰度



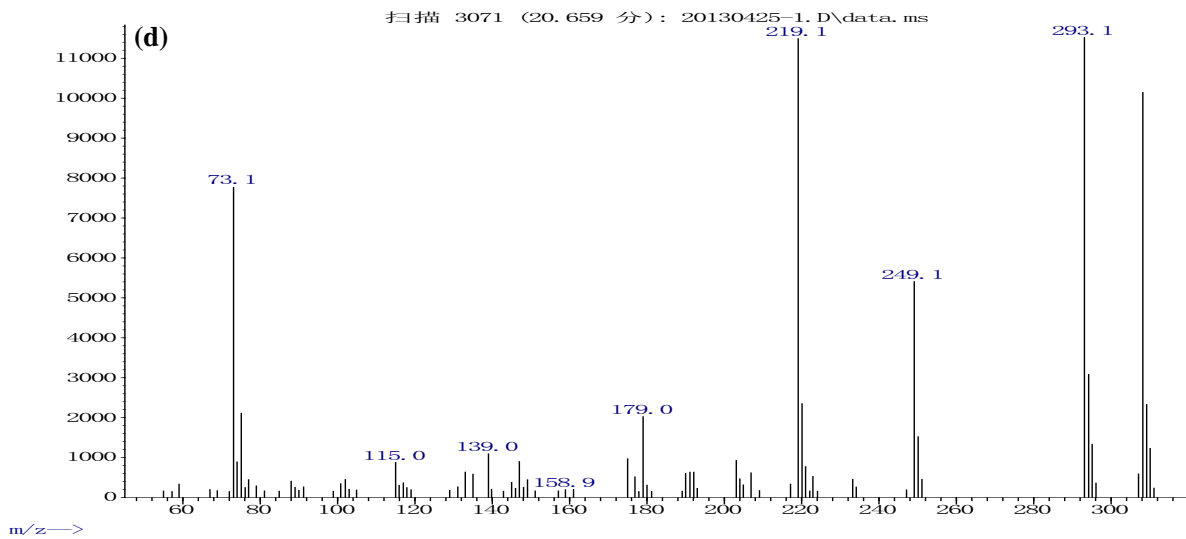
丰度



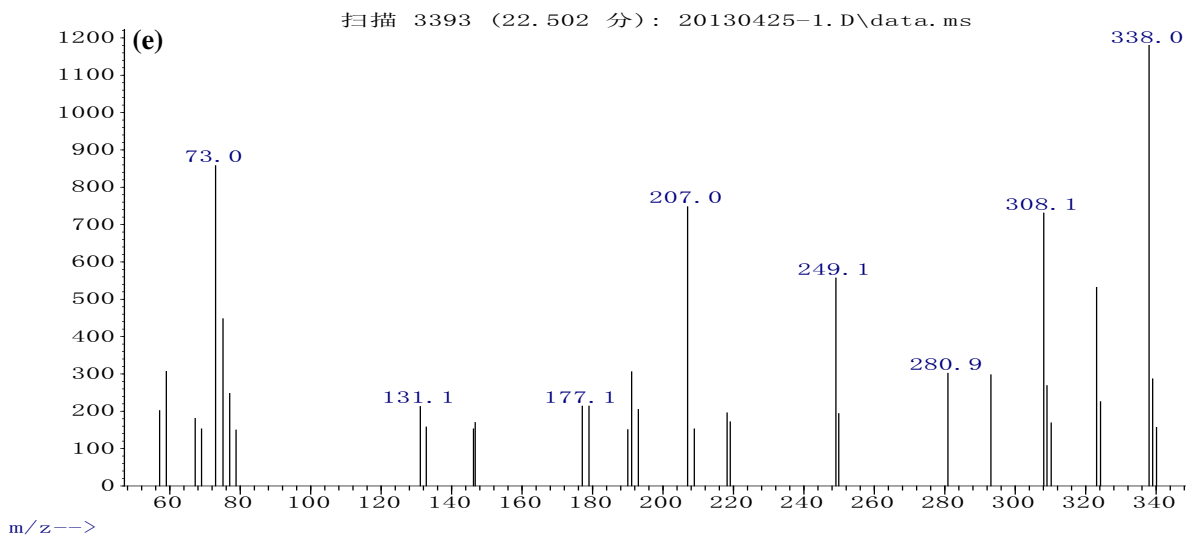
丰度



丰度



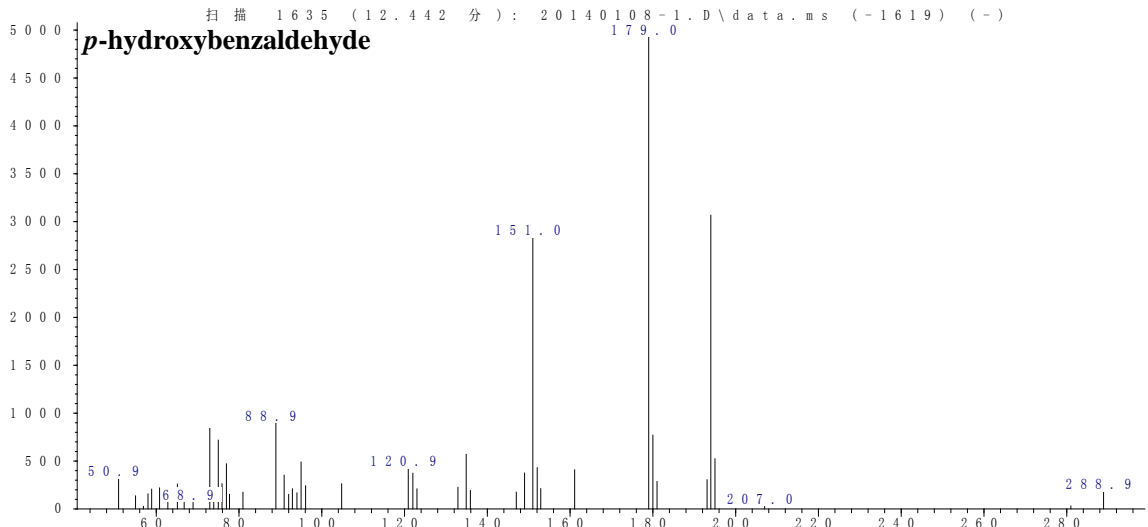
丰度



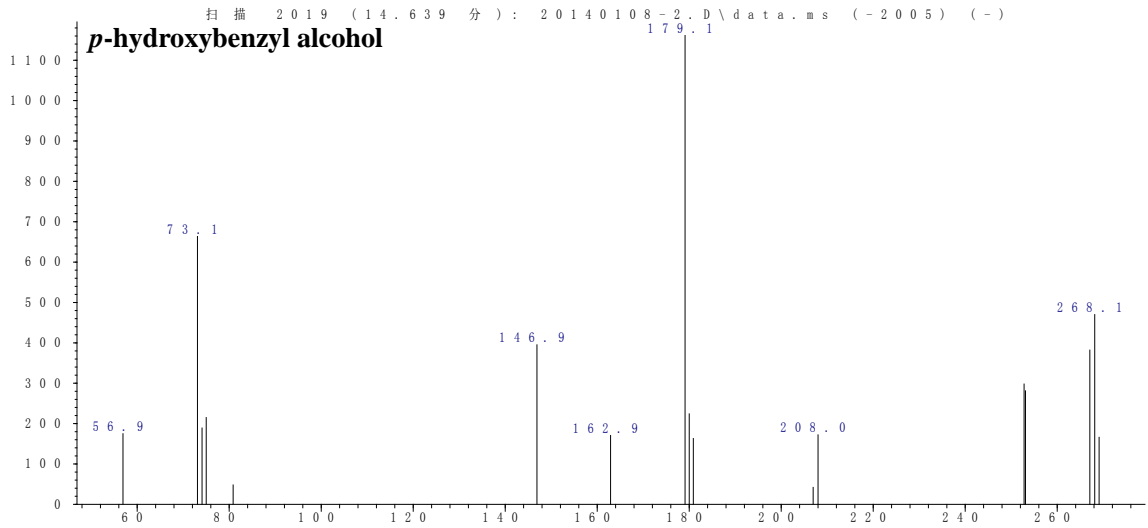
附图 2. 玉米芯残渣中酚类化合物质谱图

(a) 2-糠酸; (b) 愈创木酚; (c) 对羟基苯甲酸; (d) 对香豆酸; (e) 阿魏酸

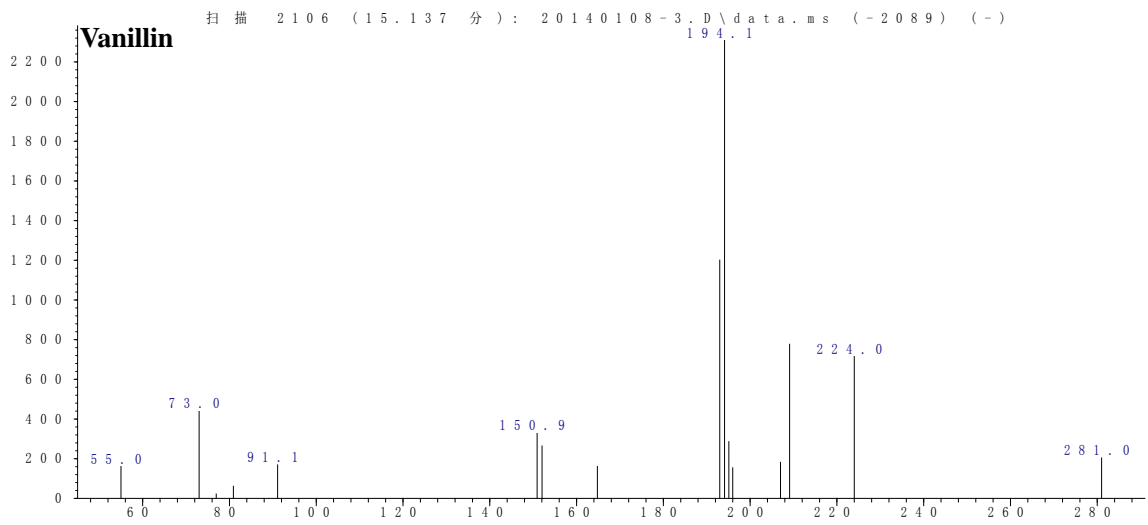
丰度



m/z -->
丰度

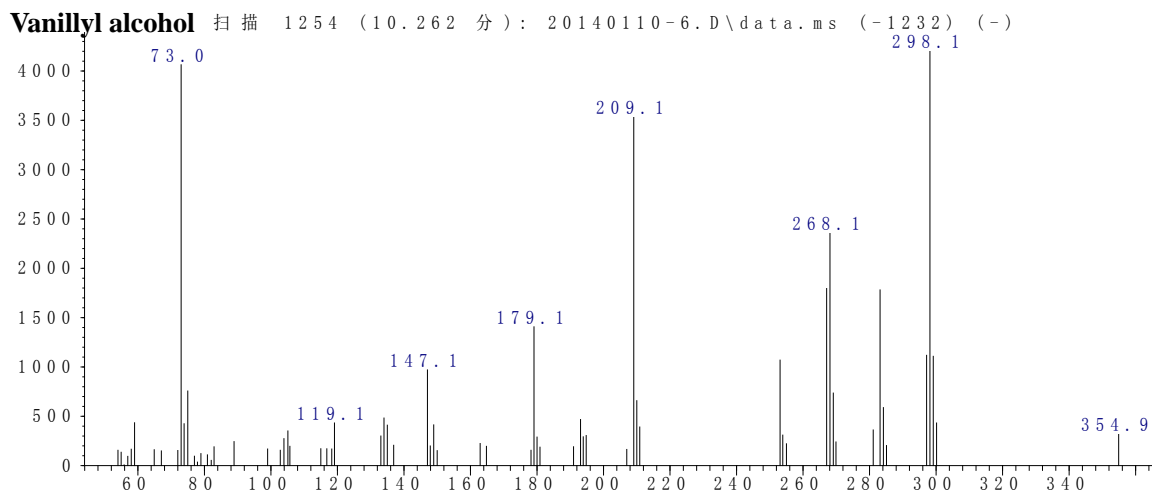


m/z -->
丰度

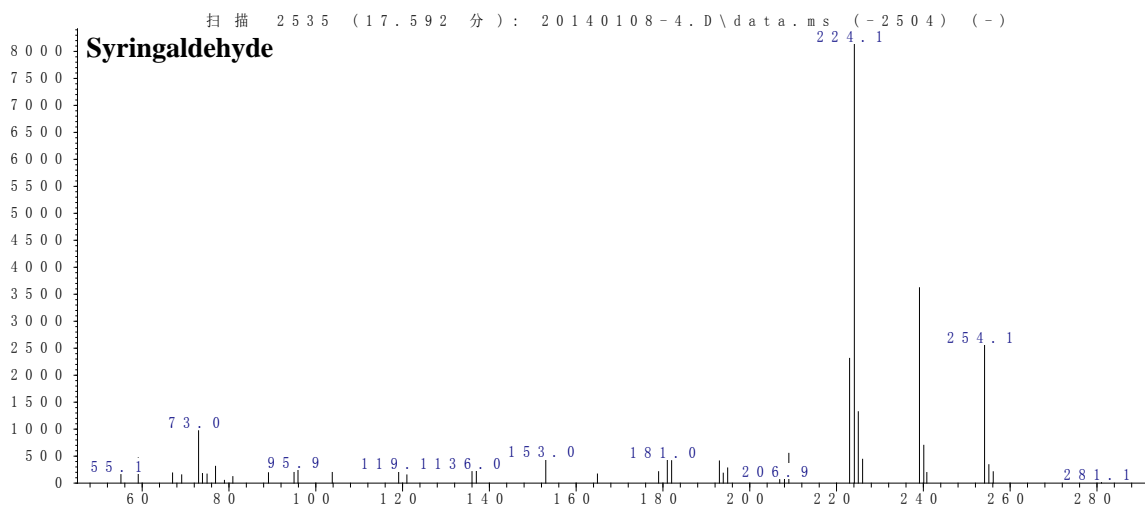


m/z -->

丰度



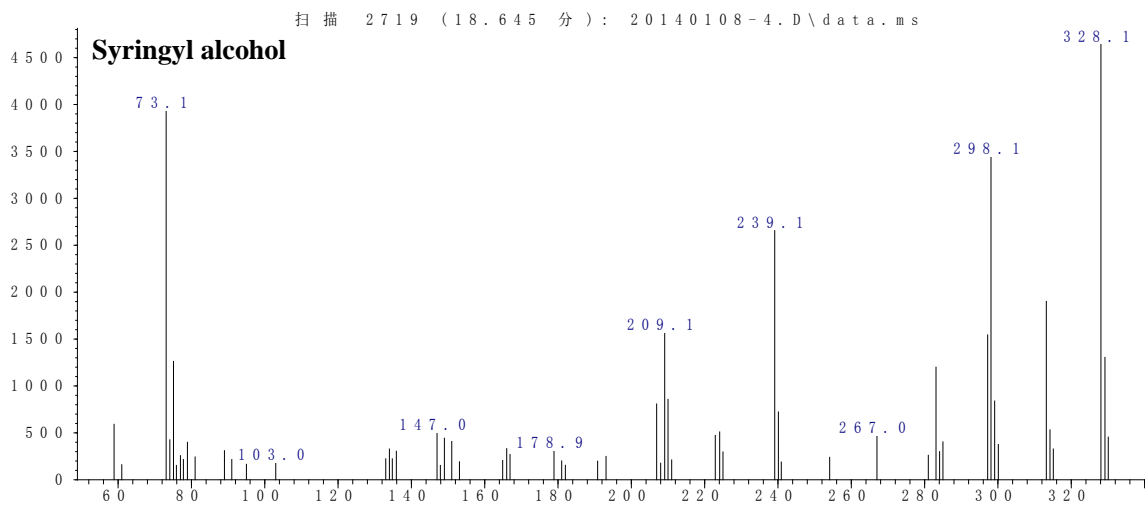
m/z -->
丰度



m/z -->

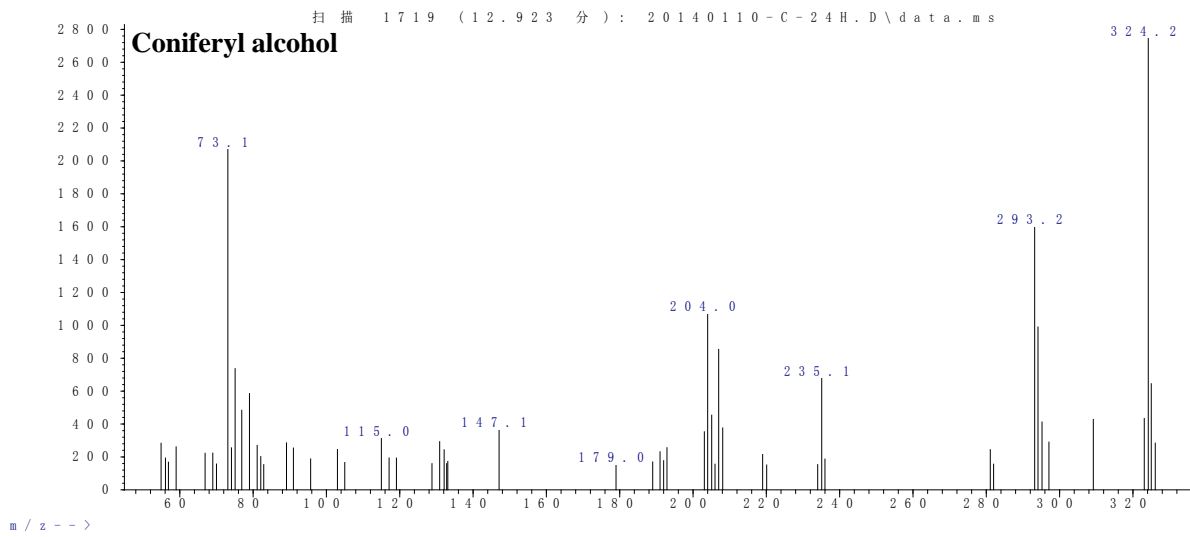
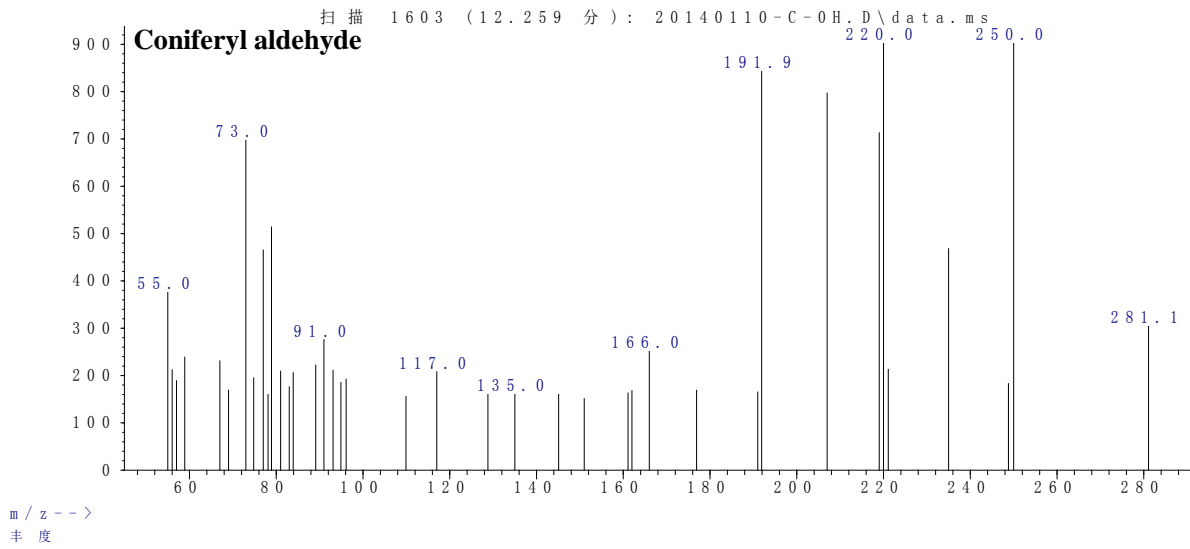
Syringaldehyde

丰度



m/z -->

丰度



附图 3. 酚类化合物降解产物硅烷化处理后的 GC-MS 图谱

博士期间研究成果

已发表的论文:

1. **Hanqi Gu**, Jian Zhang, Jie Bao*. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste corncob residues. *Bioresource Technology* 2014, 157:6-13. (SCI IF: 5.04 对应本论文第四章)
2. **Hanqi Gu**, Jian Zhang, Jie Bao*. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corncob residue. *Biotechnology and Bioengineering* 2015. DOI: 10.1002/bit.25603 (SCI IF: 4.16 对应本论文第五章)
3. Kai Zhao, Qingan Qiao, Deqiang Chu, **Hanqi Gu**, Thai Ha Dao, Jian Zhang, Jie Bao*. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology* 2013, 135:481-489. (IF: 5.04)
4. Hanjie Li, Chenlin Ye, Ke Liu, **Hanqi Gu**, Weitao Du, Jie Bao*. Analysis of particle size reduction on overall surface area and enzymatic hydrolysis yield of corn stover. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 2015, 38(1):149-54. (SCI IF:1.82 对应本论文第三章)

准备发表的研究论文:

1. **Hanqi Gu**, Jian Zhang, Jie Bao*. Fractionation of wheat straw for recovery of xylose and glucose by dry dilute acid pretreatment with post-hydrolysis. *Bioresource Technology* (对应本论文第二章)
2. **Hanqi Gu**, Jian Zhang, Jie Bao*. Understanding general variation of lignocellulose particle size during enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated stovers. *ChemSusChem* (对应本论文第三章)
3. Xia Yi, **Hanqi Gu**, Qiuqiang Gao, Z. Lewis Liu*, Jie Bao*. Transcriptome analysis reveals the mechanisms of tolerance and detoxification of *Zymomonas mobilis* to phenolic aldehyde inhibitors. *Biotechnology and Bioengineering* (对应本论文第五章)

学术会议论文:

1. **Hanqi Gu**, Jian Zhang, Jie Bao*. Fractionation of wheat straw for xylose recovery accompanied by ethanol production. *AFOB Bioenergy and Biorefinery Division Annual Meeting and Bioenergy and Biorefinery Summit*. 2014, Jinan, China. (Oral presentation)
2. **Hanqi Gu**, Jie Bao*. Dry dilute acid pretreatment of lignocellulose with extremely low water usage and hot alkali neutralization for cellulosic ethanol production. *The 9th World Congress of Chemical Engineering*. 2013, Seoul, Korea. (Poster)
3. **Hanqi Gu**, Jian Zhang, Jie Bao*. Adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an improved growth and fermentative performance in high solid loadings of corncob residues for

ethanol fermentation. *International Conference on Biomass-Energy Technologies*. 2012, Nanjing, China. (Oral presentation)

申请专利：

张建、顾翰琦、鲍杰，一种强化木质纤维素原料预处理效果的磨浆后处理方法（专利公开号：CN103849664A，公开日期：2014.06.11）

参与科研项目与课题：

973 项目 “木质纤维素降解转化过程强化的工程学原理与方法”；

973 项目 “微生物抗纤维素水解物抑制元器件的构建与性能评估”；

863 项目 “农作物秸秆制备生物化工醇产业化示范”；

863 项目 “极限低水稀酸预处理技术体系研究”

致谢

在本论文撰写完成之际，向那些曾经给予帮助、支持和鼓励的老师、同学和朋友们敬上我衷心的感谢。

首先，非常感谢我的导师鲍杰教授，本论文的全部研究工作得以顺利完成与他的悉心指导密不可分。从论文的选题、实验的设计、问题的解决，到论文的每个章节内容的撰写、修改和发表都凝聚着他的辛劳和汗水。鲍老师治学严谨，待人热情和善。他渊博的学识、开阔的研究视野和活跃的思维方式使我受益匪浅；他孜孜不倦的敬业精神和实事求是的科研作风令我终生难忘。这些科研素养和能力是我学习的榜样，将一直激励我在今后的科研工作中不断前进。谨在此论文完成之际，向尊敬的鲍老师致以感激和敬意。

其次，要感谢的是张建和高秋强两位老师，他们在科研和生活中给我很多帮助和支持。当我在实验中遇到问题时，他们能够提出很多的宝贵意见。另外，要感谢易霞博士，我们的实验课题存在一些交集，在与她讨论时总能获得一些新的启发和帮助。还要特别感谢我的室友王高磊博士，虽然我们不是一个专业，但在涉及有机化学方面的问题上总能给我提出很多有效的建议。在此一并表示感谢。

此外，要感谢生物炼制课题组中关心和帮助我的所有同学，包括博士研究生罗紫臣、何燕青、王霞、张宏森、王娟、刘刚、高小创、邵帅和韩昀身；硕士研究生包艳文、崔振阳、方镇宏、涂毅、安瑞鑫、刘阳、孟佼、冉红、吴倩、肖雁秋、张龙平、雷成、刘克、孙娇娥、张鹏、周平平、刘婷和邱忠洋，以及其他师弟师妹们。其中特别感谢何燕青、赵凯、国立浩和王玉梅在我刚进入实验室接触发酵操作时给予的耐心帮助和指导。在此感谢你们陪伴我度过这四年的博士学习生活。

最后我要感谢我的家人，没有你们的支持和无私的奉献就没有我今天的一切。

顾翰琦

2015. 4. 20

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共

页

立卷人 _____

检查人 _____

立卷时间 _____