

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

干法生物炼制技术生产高浓度纤维素乙醇
的同步糖化与共发酵研究

张强

指导教师姓名: 鲍杰 教授

生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 发酵工程

论文定稿日期: 2017.04.10 论文答辩日期: 2017.05.16

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席:

评 阅 人:

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

干法生物炼制技术生产高浓度纤维素乙醇的同步糖化与共发酵研究

摘要

利用干法生物炼制技术 (DMBP) 生产纤维素乙醇具有低能耗、低水用量、低废水产生的优点, 能够实现木质纤维素生物炼制效率的最大化。干法生物炼制过程中每一步操作都是在高生物质固含量的条件下进行的, 具体来说 DMBP 技术首先是从高固含量的干式稀酸预处理 (DDAP) 开始, 70% (w/w) 固含量的初始木质纤维素原料经过干式稀酸预处理变成了固含量为 50% (w/w) 的物料, 在预处理过程中水 (蒸汽) 的消耗极低且无废水产生; 预处理后的木质纤维素物料进行下一步的干法生物脱毒技术以快速、完全的去掉主要抑制物, 在这一过程中无需水的输入也不会产生废水。然后利用经过干式稀酸预处理以及固态生物脱毒后的物料在高固含量的条件下 (25%-35%) 进行同步糖化与共发酵 (SSCF)。为了提高纤维素乙醇对于玉米乙醇的竞争力, 必须进一步提高乙醇的发酵浓度和得率, 并选择高性能、低成本的商业纤维素酶。

本文第一部分选取了五种不同来源的木质纤维素原料, 包括农业废弃物类型的玉米秸秆、小麦秸秆、水稻秸秆, 制糖工业废弃物类型的甘蔗渣, 林业废弃物意大利白杨木屑分别进行干法生物炼制生产纤维素乙醇。在最优的预处理和生物脱毒条件下, 以 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 为发酵菌株, 在 30% 固含量, 15 FPU/g DM (DM: 干物料) 的酶用量下五种原料玉米秸秆、水稻秸秆、小麦秸秆、甘蔗渣、木屑的乙醇产量为 56.8 g/L、58.5 g/L、65.4 g/L、64.5 g/L、54.7 g/L。这五种原料虽然存在着较大的不同但都能满足工业化应用过程中高浓度发酵的需要, 这为之后的商业化生产纤维素乙醇提供了广泛的原料来源以及地域范围。

本文第二部分研究以五种木质纤维素原料进行同步糖化与共发酵生产纤维素乙醇, 预处理后的物料中含有大量的木糖, *Saccharomyces cerevisiae* XH7 是一株能够利用木糖的菌株。最终通过优化发酵条件, 获得了超高的纤维素乙醇浓度: 经过预处理和生物脱毒后的麦秆在 35% (w/w) 固含量、15 mg protein/g cellulose 的酶用量下得到了 101.1 g/L (12.8% v/v) 的超高乙醇浓度, 且乙醇得率和木糖转化率分别为 74.8%, 73.9%; 预处理、脱毒完后的玉米秸秆在 30% (w/w) 固含量、10 mg protein/g cellulose 的低纤维素酶用量下得到了最具经济效益的乙醇浓度 85.1 g/L (10.8% v/v), 且达到了较高的乙醇得率和木糖转化率分别为 84.7%, 87.7%。

本文第三部分选取中国工业酶市场上三种主要的纤维素酶产品, 评估了它们作为生物炼制过程中木质纤维素转化为高浓度乙醇生物催化剂的能力。三种纤维素酶分别为诺维信 (北京) 的 Cellic CTec 2.0、蔚蓝 (青岛) LLC 4、#7 (购买自中国工业酶生产商), 运用标准的方法测定了三种纤维素酶的滤纸酶活、纤维二糖酶活、总蛋白含量。利用三

种纤维素酶在高固含量、低酶用量的条件下进行酶解和发酵，虽然不同的酶水解效率有较大差异但是三种纤维素酶在合适的酶用量下都能有较好的乙醇发酵结果，总的来说不同的酶具有不同的活力、纤维素水解得率、乙醇发酵能力，而这三种工业纤维素酶产品都能够应用于纤维素乙醇商业化生产过程中。

本论文通过上述研究，确定了干法生物炼制技术能够很好的以这五种木质纤维素原料进行纤维素乙醇的生产；此外通过同步糖化与共发酵达到了超高的纤维素乙醇浓度；确定了三种工业纤维素酶都能够应用于纤维素乙醇商业化的生产过程中。这些结果将为干法生物炼制技术生产纤维素乙醇产业化发展提供强有力的理论依据。

关键词：木质纤维素；纤维素乙醇；工业纤维素酶；干法生物炼制技术；同步糖化与共发酵

Simultaneous Saccharification and Co-fermentation for Production of High Titer Cellulosic Ethanol from Lignocellulose by Dry Milling Biorefinery Processing

Abstract

Dry milling biorefinery processing (DMBP) were applied into cellulosic ethanol production for the purpose of maximizing the biorefining efficiency of lignocellulose by minimizing energy consumption, fresh water input, and waste water generation. The biomass solids loading of the typical lignocellulose feedstocks is maximized at each step of the biorefining processes. The DMBP starts with the “dry” dilute acid pretreatment (DDAP) with the initial solids of 70% (w/w) and the pretreated solids of 50% (w/w) with minimum water (steam) input and zero wastewater generation. The pretreated lignocellulose is fed to the “dry” biodetoxification for the fast and complete removal of inhibitors with no water input and output. The “dry” pretreated and biodetoxified lignocellulose is consequently fed to the “dry” hydrolysis and fermentation by simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) with very high solids content (up to 25-35%). In addition, in order to improve the competitiveness of cellulosic ethanol for corn ethanol, must improve the titer and yield of cellulosic ethanol, and choose high performance, low cost industrial cellulase enzyme.

The first part of this thesis is selected five different lignocellulose feedstocks, including the agricultural waste type of corn stover, wheat straw, rice straw, sugar industry waste type of sugarcane bagasse, forestry waste of Italian poplar wood chip were carried out to produce cellulosic ethanol by DMBP. At the optimal pretreatment and biodetoxification conditions, use *Saccharomyces cerevisiae* DQ1, at the moderate cellulase dosage (15 FPU/g Dry Matter) and high solids loading (30%, w/w), the final ethanol titer was 56.8 g/L, 58.5 g/L, 65.4 g/L, 64.5 g/L, 54.7 g/L, for corn stover, rice straw, wheat straw, sugarcane bagasse, poplar wood chip, respectively. These five feedstocks all well met the high fermentation titer required for industrial applications although with observable differences, which provides a wider range of raw materials and geographical scope for commercial production of cellulosic ethanol.

The second part of this thesis is use five lignocellulose feedstocks to produce cellulosic ethanol by simultaneous saccharification and co-fermentation, pretreated material contains a large amount of xylose, *Saccharomyces cerevisiae* XH7 is a xylose utilizing yeast strain. Finally, by optimizing the fermentation conditions, the record high cellulosic ethanol performance was obtained: wheat straw feedstock achieved the maximum ethanol titer of 101.1 g/L or 12.8% (v/v) with the ethanol yield of 74.8% and the xylose conversion of 73.9% at the moderate cellulase dosage (15 mg proteins/g cellulose) and high solids loading (35%, w/w); corn stover

achieved the most economically beneficial ethanol titer of 85.1 g/L or 10.8% (v/v) with the overall conversion ratio of 84.7% and xylose conversion of 87.7% at the low cellulase dosage (10 mg protein /g cellulose) and high solids loading (30%, w/w).

The third part of this thesis is three major cellulase enzyme products available on the Chinese industrial enzyme market were selected and evaluated as the biocatalysts for the biorefining process of lignocellulose biomass into high titer ethanol. The cellulase enzymes included Cellic CTec 2.0 from Novozymes (Beijing), and LLC 4 from Vland (Qingdao), and # 7 (purchased from an industrial enzyme maker). The detailed assay on the filter paper activity, the cellobiase activity, and the total protein content of the enzymes were conducted according to the standard protocols. When the cellulase enzymes were applied to the practical hydrolysis and ethanol fermentation operation under the conditions of high solids and low range of cellulase dosage, the hydrolysis yield shows the significant difference and the difference was narrowed in the final ethanol yield. The commercially available cellulase enzymes showed the different performance in the activities, the cellulose hydrolysis yield, and the ethanol fermentation yield based on the protein dosage per gram of cellulose of corn stover. In general, the industrial cellulase products are satisfactory to be applied into the practical cellulosic ethanol production in commercial scale.

Conclusively, these five feedstocks all well met the high fermentation titer required for industrial applications although with observable differences, In addition, the high cellulosic ethanol performance was obtained by simultaneous saccharification and co-fermentation, the three industrial cellulase products are satisfactory to be applied into the practical cellulosic ethanol production in commercial scale. These results could provide a strong theoretical basis for the industrial development of cellulosic ethanol production by dry biorefining technologies.

Key words: lignocellulose, cellulosic ethanol, Industrial cellulase enzyme, dry biorefining technologies, simultaneous saccharification and co-fermentation

目录

第 1 章 绪论	1
1.1 前言	1
1.2 木质纤维素原料的性质与运用	2
1.2.1 木质纤维素的化学、物理性质	2
1.2.2 中国木质纤维素原料的分布	3
1.2.3 木质纤维素的预处理	4
1.2.4 纤维素乙醇与粮食乙醇的比较	6
1.3 干法生物炼制技术的建立	6
1.3.1 干式稀酸预处理的发展	6
1.3.2 抑制物干法生物脱毒技术	7
1.3.3 高固含量同步糖化与发酵 (SSF) 的实现	8
1.3.4 高固含量同步糖化与共发酵 (SSCF) 的研究	8
1.4 本文的研究目的及技术路线	9
第 2 章 利用不同木质纤维素原料同步糖化发酵(SSF)生产纤维素乙醇 ...	11
2.1 引言	11
2.2 材料与方法	12
2.2.1 原料和纤维素酶	12
2.2.2 菌种和培养基	13
2.2.3 干式稀酸预处理以及固态生物脱毒法	13
2.2.4 发酵种子液的培养	14
2.2.5 同步糖化与发酵 (SSF) 方法	14
2.2.6 乙醇得率的计算方法	14
2.2.7 高效液相色谱分析 (HPLC)	15
2.3 结果与讨论	15
2.3.1 原料组分测定	15
2.3.2 预处理后物料组分评价	16
2.3.3 不同物料静态脱毒实验	18
2.3.4 不同物料 SSF 结果	19
2.4 小结	20
第 3 章 利用不同木质纤维素原料同步糖化与共发酵 (SSCF) 生产高浓度 纤维素乙醇	22
3.1 引言	22
3.2 材料与方法	23
3.2.1 原料和纤维素酶	23
3.2.2 菌种和培养基	24
3.2.3 干式稀酸预处理以及快速生物脱毒法	24

3.2.4	发酵种子液的培养	25
3.2.5	同步糖化与共发酵方法	25
3.2.6	乙醇得率的计算方法	25
3.2.7	高效液相色谱分析 (HPLC)	26
3.3	结果与讨论	26
3.3.1	不同木质纤维素原料最优预处理条件的确定	26
3.3.2	以五种不同木质纤维素为原料进行 SSCF 的发酵性能	30
3.3.3	玉米秸秆、麦秆 30%固含量下不同酶用量的 SSCF	32
3.3.4	玉米秸秆不同固含量下的 SSCF 发酵性能	35
3.3.5	小麦秸秆不同固含量下的 SSCF 发酵性能	36
3.3.6	玉米秸秆、小麦秸秆在 50 L 发酵体系下的 SSCF 的发酵性能	38
3.4	小结	40
第 4 章 利用不同种类的纤维素酶进行 SSCF 生产纤维素乙醇		43
4.1	引言	43
4.2	材料与方法	44
4.2.1	原料和纤维素酶	44
4.2.2	菌种和培养基	44
4.2.3	干式稀酸预处理以及快速生物脱毒法	45
4.2.4	发酵种子液的培养	45
4.2.5	同步糖化与共发酵方法	45
4.2.6	乙醇得率的计算方法	45
4.2.7	高效液相色谱分析 (HPLC)	45
4.3	结果与讨论	46
4.3.1	不同纤维素酶在相同酶载量下的 SSCF	46
4.3.2	蔚蓝 LLC 4 不同酶用量 SSCF	48
4.3.3	# 7 不同酶用量 SSCF	49
4.3.4	三种纤维素酶 (CTec 2.0、LLC 4、# 7) 不同酶用量 SSCF 比较	51
4.4	结论	53
第 5 章 结论与展望		55
5.1	结论	55
5.2	展望	56
参考文献		57
附录 I 主要试剂		65
附录 II 主要仪器和设备		66
硕士期间学术成果		67
致谢		68

第 1 章 绪论

1.1 前言

目前在全球范围内能源问题成为各国发展和稳定的基础，能源问题与民生问题、环境问题、科技发展的进步息息相关；但是随着石油、天然气等不可再生资源的日益枯竭，以及由于燃烧化石燃料带来的大气环境问题（雾霾、温室化效应），促使国家和社会将能源发展和规划的重心放在了可再生能源的开发和利用上^[1]。燃料乙醇（体积浓度达到 99.5% 以上的无水乙醇）是一种高辛烷值、可再生性的液体燃料，本身可以作为一种优良的燃料，其次更为重要的是它可以作为汽油的改良剂，添加 10% 燃料乙醇能够提高汽油的内氧含量使汽油充分燃烧，降低一氧化碳和碳氢化合物的排放从而达到节能环保的目的^[2]。燃料乙醇主要分为第一代和第二代两种，一代燃料乙醇是以糖质和淀粉质作物为原料，二代燃料乙醇是以木质纤维素为原料生产的纤维素乙醇。一代乙醇的生产会出现与人、畜争粮的问题，在我国生产燃料乙醇的同时会得到相应补助以及免税政策，企业生产粮食乙醇的利润较大，除了利用陈粮之外玉米等当年收获的新粮也被用于燃料乙醇的生产，这样会导致国内玉米价格上涨使得养殖业所需要的饲料玉米成本上升，从而不利于国民经济的发展。所以近年来国家鼓励二代燃料乙醇的研究与发展，2016 年 12 月 5 日，国家能源局发布《生物质能发展“十三五”规划》，规划在加快生物液体燃料示范和推广建设重点中明确提出：推进燃料乙醇推广应用，大力发展纤维素乙醇；十三五期间生物液体燃料新增投资约 180 亿元，预计 2020 年生物质能合计可替代化石能源总量约 5800 万吨^[3]。《生物质能发展“十三五”规划》的出台，为纤维素乙醇在车用乙醇汽油和航空燃油等领域中的应用提供了指引。

木质纤维素主要是由纤维素、半纤维素、木质素组成，利用木质纤维素生产纤维素乙醇的主要步骤包括：木质纤维素的预处理、预处理后物料中抑制物的脱除、物料的酶解糖化、发酵、乙醇的分离和纯化。为了提高纤维素乙醇对于玉米乙醇的竞争力，不仅要实现纤维素乙醇有利可图的生产目标，更为重要的是要提高纤维素乙醇的生产技术，使得低能耗、低废水排放成为纤维素乙醇生产的风向标，这不仅关乎到降低成本的问题，更为重要的是要贯彻可持续发展的理念。所以纤维素乙醇的生产的每一步都至关重要，必须把低能耗、低废水排放作为技术开发的基调，这样才能真正的利用好我国是个农业大国、生物质分布密度大的优势来造福社会。

干法生物炼制技术是由本实验室开发的一种全程低能耗、低废水排放、高效率的纤维素乙醇生产技术，主要包括：干式稀酸预处理技术、生物脱毒技术、同步糖化与共发酵技术（SSCF）以及一些辅助的生产工艺流程；主要原理：在稀酸和高温、高压的催化下木质纤维素原料中半纤维素降解成可利用的木糖，半纤维素的降解使得木质

纤维素的结构变得松散，有利于后续纤维素酶与纤维素的结合使得糖化更加彻底；稀酸预处理后物料中影响发酵的抑制物通过生物脱毒法去除，得到的物料在螺旋式搅拌浆生物反应器中进行 SSCF。

干法生物炼制技术的开发已经基本完全，利用该项技术生产高浓度纤维素乙醇的技术则需要进一步的研究；玉米秸秆在干法生物炼制的研究中已经得到了较为成熟的结果，但生物质的多样性则要求生物炼制技术能够适应于多种木质纤维素原料，此外必须提高纤维素乙醇的发酵浓度来提高其相对于玉米秸秆的竞争力，这也是本文研究的两个主要内容。而本章内容对生物炼制技术以及纤维素乙醇生产技术进程展开综述。

1.2 木质纤维素原料的性质与运用

1.2.1 木质纤维素的化学、物理性质

木质纤维素是一种未被广泛利用的且最为丰富的生物质资源，木质纤维素原料是农业、林业、种植业的副产物，所以获取大量的木质纤维素原料不会改变原有的土地的种植方式。木质纤维素主要有纤维素、半纤维素、木质素以及其他的可溶性组分组成^[4]，对这三种组分有效的利用是提高纤维素乙醇商业化生产经济可行性的重要保证。在自然界中除了棉铃，大部分的木质纤维素的结构都是纤维素嵌入在半纤维素和木质素组成的规则聚合物的基质中。纤维素是葡萄糖通过 β -1,4-糖苷键连接在一起的线性间同立构聚合物，而纤维素聚合度是指纤维素分子中葡萄糖分子的数量^[5]；半纤维素是 D-木糖，L-阿拉伯糖，D-甘露糖，D-葡萄糖，D-半乳糖和 D-葡萄糖醛酸组成的支链杂聚物；木质素主要由香豆醇，松柏醇和芥子醇三种酚类物质聚合而成。在不同的植物，木材组织和细胞壁层中纤维素、半纤维素、木质素的比例是不同的。

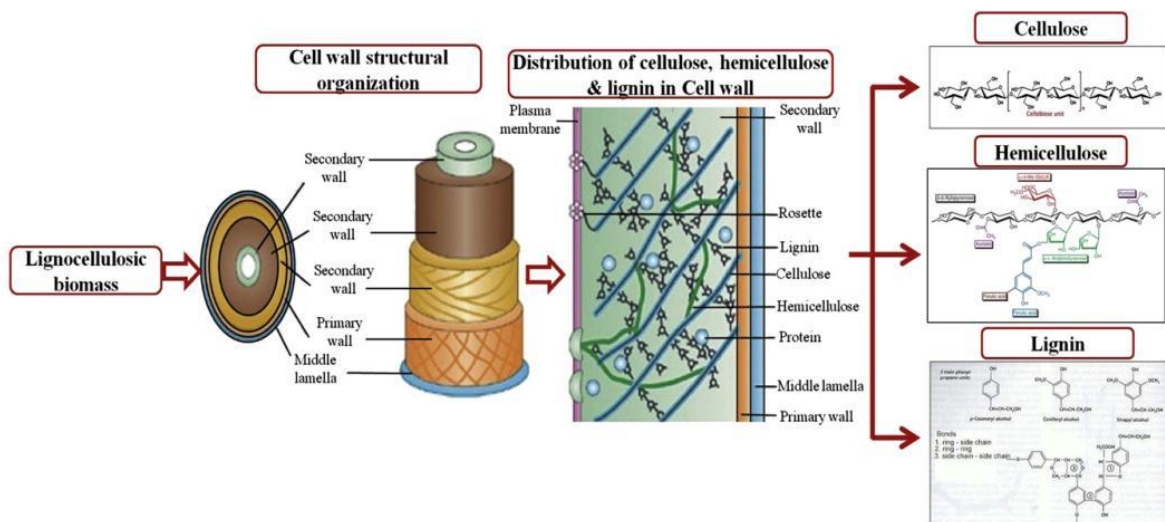


图 1.1 木质纤维素的结构说明^[6]

Fig1.1 Diagrammatic illustration of the framework of lignocellulose.

木质素具有复杂的疏水性是一种交联的芳香族聚合物，它的存在会干扰木质纤维素的水解反应。如图 1 所示是木质纤维素主要结构示意图，纤维素链被填充到通过氢键稳定的微原纤维中，这些微原纤维与半纤维素、不同糖的无定形聚合物以及其它聚合物（果胶）彼此连接并被木质素覆盖。存在于半纤维素-木质素基质中的纤维素微原纤维通常以束或大原纤维的形式结合。结晶纤维素中单个微原纤维的分子被如此紧密地包裹着，不仅是酶分子甚至是小分子物质如水都不能进入这复杂的晶体结构中，这就是纤维素的结晶度；微纤维的一些部分具有不规则的非晶体结构，称为非晶体区域^[7]，高分子量和有序的三级结构使天然木质纤维素不溶于水，纤维素的结晶区比无定形区更耐生物降解。具有低聚合度、低结晶度的纤维素将更容易受到纤维素酶的水解作用，纤维素的分离和降解是决定纤维素聚合度和结晶度的关键步骤^[8]。此外在木质纤维素酶解过程中，酶分子首先要扩散到底物表面或进入内部孔道才能发生作用；因此，底物的可接触表面积（包括内、外表面积）是影响酶解效率的一个关键因素。天然纤维素具有的高聚合度、高结晶度的结构特点，导致了在自然条件下木质纤维素很难较快的被降解利用，所以必须通过一些化学和物料的木质纤维素预处理手段才能够降低木质纤维素的聚合度、结晶度，从而增加纤维素的可接触面积，暴露出纤维素链的还原末端，使得纤维素酶更容易与纤维素结合，增强酶解效果。

1.2.2 中国木质纤维素原料的分布

中国是农业大国，主要的经济性作物种类多、分布广，玉米、水稻、小麦是我国的三大主要粮食作物，玉米在我国种植面积最大分布最广，主要分布在东北、华北和西南地区，种植面积达 37123.39 千公顷，年产量达 21564.63 万吨；水稻主要集中分布在我国东北地区、长江流域、珠江流域，种植面积达 30309.87 千公顷，粮食年产量达 20650.74 万吨；小麦主要分布在我国东北平原、华北平原，种植面积达 24069.42 千公顷，春小麦、冬小麦总年产量达 12620.84 万吨；其他的经济型作物如甘蔗，主要分布在我国台湾、广东、广西、福建、四川、云南六省，种植面积达 1760.45 千公顷，年产量达 12561.13 万吨；以上数据均来源于中华人民共和国国家统计局 2014 年农作物产量统计数据^[9]。

丰富的农产品的种植必然会导致农业废弃物的大量生产，包括各类秸秆以及棉花、大豆等植物的茎秆、榨糖之后的甘蔗渣等，玉米、水稻、小麦的草谷比（农作物废弃物与谷物颗粒的重量比）分别是 2.0、1.0、1.17^[10]，根据 2014 年这三种粮食作物的产量可以粗略估算出玉米秸秆的年产量 43129.26 万吨，水稻秸秆的年产量为 20650.74 万吨，小麦秸秆的年产量是 28161.22 万吨，这三种主要秸秆的总年产量理论可以达到 9 亿吨。对于秸秆以及其他木质纤维素的利用主要分为五个方面：秸秆可以用作动物的饲料、用秸秆燃烧发电、用于纸浆和造纸、用于菌菇的生长基质、直接在田地里焚烧、用于生产纤维素生物燃料、生物柴油等。

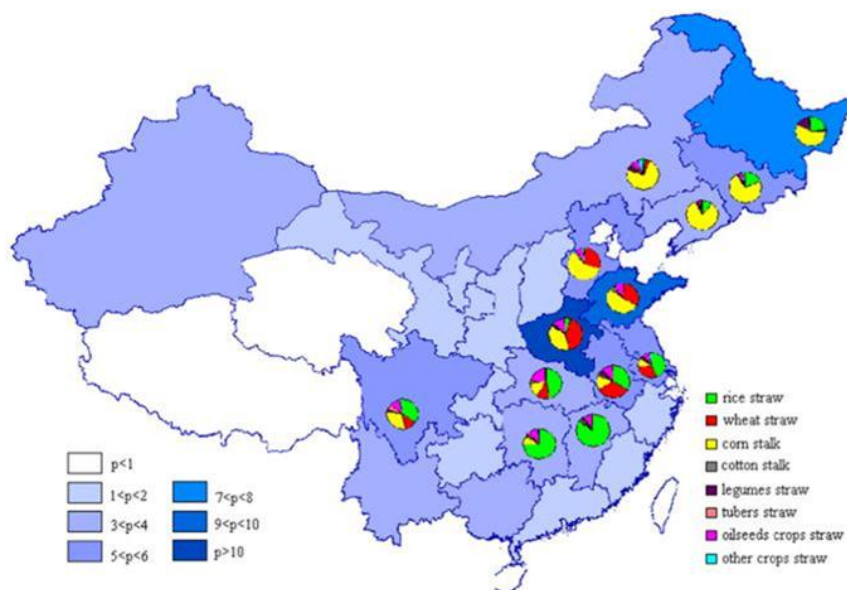


图 1.2 中国主要农作物秸秆的分布图^[10]

Fig.1.2 Map of total collectable output of agricultural crop residues in China.

1.2.3 木质纤维素的预处理

合适的预处理技术是木质纤维素转化为纤维素乙醇的关键步骤，预处理主要的作用就是实现生物质主要组分的溶解或分离，从而打破木质纤维素的结构有利于后续的酶解；预处理的目的不单单是实现结构的破坏，应该更多的综合考虑原料的适应性问题，后续酶解和发酵的可行性问题，能耗和污染问题以及大规模操作的可行性以及成本问题。能够实现商业化的预处理技术应该具备的优势有：预处理过程的能耗和成本低，对环境以及大气污染小，原料的选择更为广泛，预处理的操作简便生产周期短，预处理的效果明显且产生的抑制物少、或者有对应的去除抑制物的方法；除了这些之外还可以考虑几个其他因素，包括预处理过程中高附加值副产品（如木质素和蛋白质）的回收，预处理催化剂的循环和废水、废气的处理^[11]。

木质纤维素主要的预处理方法包括生物法、机械法、化学法、以及各种方法的组合^[12, 13]；在大多数木质纤维素预处理过程中都需要通过机械的手段来减小生物质的颗粒尺寸。预处理过程运用到的机械法主要：球磨法^[14]、照射法（使用 γ 射线，电子束，微波辐射等）和挤压法，通过机械法可以降低纤维素的结晶度和生物质的聚合度以及纤维原料的粒度从而改善传质传热，增加纤维素的可接触表面积，促进纤维原料的酶解效应。机械法对于木质素含量高的硬木类原料处理效果差，且处理过程中所需的能耗高。

木质纤维素预处理所采用的化学法主要是利用稀酸、稀碱、以及一些强氧化剂（双氧水等）^[15]或者有机溶剂（异丙基苯磺酸钠 NaCS、二甲苯磺酸钠 Na-X 等）^[16]对木质纤维素结构中的某些组分进行溶解或分离；其中从经济可行性的角度考虑稀酸、稀碱的方法更具有实际意义。酸法预处理的主要机理是半纤维素在酸解的作用下降解

成单糖，从而半纤维素从生物质中脱除，纤维原料的晶体结构打破变得多孔疏松，使得纤维素酶能够与纤维素接触并降解成为葡萄糖^[17]。而稀碱预处理则利用的是木质素可以溶解于碱性溶液的特点，木质素的脱除，使得生物质结构膨胀增加内、外表面积从而促进酶水解反应^[18]。碱法预处理的优点在于反应条件温和、不易产生有毒抑制物，但是对木质纤维素结晶度破坏程度低，导致酶解效率偏低，而酸法预处理处理效果好，但木质素脱除效果差且容易产生抑制物影响发酵。

木质纤维素生物降解法主要运用白色，棕色，软腐真菌以及细菌来改变生物质的化学组成或者物理结构，使得生物质更易于纤维素酶的降解。白腐真菌被认为是生物分解木质纤维素最有前景的菌株，它能够降解木质素组分，分泌的木质素分解酶类主要有：木素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶^[19]。生物降解木质纤维素没有化学要求、能耗低、条件温和、环境友好^[20, 21]；但是也有较为明显的缺点：处理非常缓慢，需要大量的空间和条件控制，此外白腐真菌除了降解木质素之外还会进一步降解半纤维素和纤维素^[22]，所以生物降解法很难具有商业可行性。

较多的预处理技术都是采用化学和物理结合的方法；蒸汽爆破、氨纤维膨爆、热水预处理以及微波预处理技术。蒸汽爆破预处理主要原理是生物质在高温饱和蒸汽的条件下维持一段时间（160-260℃，0.69-4.83Mpa）然后突然降低压力使得生物质经历爆炸性减压的过程从而达到破坏木质纤维素的结构^[23-25]，此外在高温高压的条件下，半纤维素可以自产酸溶解自身的可溶性低聚物组分，实现半纤维素的降解^[26]。氨纤维膨爆（AFEX）也是一种蒸汽爆破预处理技术其主要原理是：木质纤维素在高温高压下暴露于液氨一段时间，然后突然降低压力；典型的 AFEX 条件是每公斤干物料需要 1-2kg 液氨，在 90℃ 下处理 30 分钟^[27]。经过 AFEX 处理后的木质纤维素，纤维素去晶体化，半纤维素的乙酰基的去除导致半纤维素的解聚，其次会引起木质素络合物的连接键（C-O-C）的断裂，从而达到木质纤维素的结构破坏利于酶解。AFEX 对于软木类木质纤维素有较好的处理效果，但是硬木类处理效果较差；AFEX 处理后的木质纤维素不会产生影响发酵的抑制物，所以物料不需要经过水洗直接可以用于发酵；预处理之后的氨必须实现循环利用以降低成本、保护环境，于是开发出了氨再循环渗透法（ARP）氨水（10-15%）在高温的条件下以一定的速率通过生物质，然后实现氨的回收利用^[28]；氨的价格以及氨的回收利用成本一直是 AFEX 成本较高的主要因素。

微波预处理的原理：在微波辅助离子液体（酸、碱、H₂O₂）预处理体系中，微波显著加强了纤维素在离子液体中的溶解性，同时也减小了纤维素的聚合度^[29]。热水预处理是利用在高压的条件下升高水的温度但始终保持液体状态的水来蒸煮木质纤维素原料，半纤维素在预处理过程中被降解成单糖存在于液体中，纤维素在后续的酶解过程中也可以达到较高的得率，并且热水预处理过程中产生很少的抑制物组分，对后续的发酵影响较小^[30]。热水预处理主要的缺点是产物浓度较低，大量的水输入会稀释戊

糖的浓度，增加物料的比重会降低预处理效果并且增加抑制物糠醛（Furfural）的含量。

1.2.4 纤维素乙醇与粮食乙醇的比较

纤维素乙醇是指利用自然界广泛存在的木质纤维素这种生物质原料，通过一定的预处理方法打破木质纤维素的结构，在酶的作用下将纤维素水解成可利用的糖类物质，然后在乙醇发酵菌株的作用下实现乙醇的生产。纤维素乙醇技术，是一种高端的清洁能源技术，因为它可以被用来替代传统的粮食乙醇技术，利用地球上广泛存在的纤维素质生物原料生产清洁的乙醇燃料，被寄予了很高的期望。纤维素乙醇目前只能够作为清洁燃料来代替部分化石燃料，并不能够食用。粮食乙醇主要是利用生物质中植物的果实部分进行乙醇的发酵和生产，植物的果实部分存在着天然的易被利用的糖类物质，主要包括淀粉类、多糖类物质，可以作为食用以及燃料乙醇使用。玉米乙醇是我国主要的燃料乙醇生产方式，主要生产流程包括：玉米粒经过粉碎后，再在液化酶的作用下进行蒸煮糊化，然后在糖化酶的作用下实现单糖的产生，使用耐受性高工业发酵菌株进行燃料乙醇的生产最后通过蒸馏得到高纯度的燃料乙醇。

纤维素乙醇和玉米乙醇存在一定的差异，首先是原料方面：木质纤维素成本低、易获得、储量大，但是堆积密度小；玉米粒成本较高，原料生产周期长，且存储成本较高，堆积密度大；其次是主要成本方面：纤维素乙醇主要的成本体现在木质纤维素的预处理步骤以及纤维素酶的使用成本；而玉米乙醇成本主要是原料，玉米粒是我国动物饲料的主要组成部分，利用玉米生产燃料乙醇会占用粮食资源，不利于可持续发展；从环境保护以及可持续发展方面考虑，不同的预处理方法会对纤维素乙醇的生产过程中环境产生不同影响，目前大部分的预处理方法存在着水耗大、污染较大的问题，为了实现可持续发展必须是在节能环保的前提下开展纤维素乙醇的生产，而玉米乙醇的生产技术较为成熟产生的污染小；从副产物方面比较，纤维素乙醇生产过程主要副产物是木质素可以进行高分子材料的合成、以及可以利用玉米芯生产木糖醇等，玉米乙醇生产过程中可以获得可使用的玉米油、以及酒糟用于动物饲料等，副产物价值高。

1.3 干法生物炼制技术的建立

1.3.1 干式稀酸预处理的发展

干法生物炼制技术主要包括干式稀酸预处理技术、生物脱毒技术、高固含量发酵技术；传统的稀酸预处理是利用稀酸溶液在较高的液固比的条件下（6:1~10:1）^[31]通过高温处理木质纤维素，来破坏原料的结构实现后续纤维素的较好酶解。半纤维素在稀酸的处理下能够降解为木糖，从而破坏生物质的结构，暴露更多的纤维素与酶的结合位点。多种稀酸溶液都可作为预处理的优良选择，硫酸价格低、效果好是较为合适的选择^[32]。虽然经过酸预处理的木质纤维素能够达到较好的效果，但是传统的预处理液

固比高，半纤维素生产的木糖大部分存在于液体中，回收较为困难，会造成大量的废水排放。所以需要实现高固含量的稀酸预处理技术^[33]。

干式稀酸预处理技术是本实验室开发的零废水、低能耗的预处理技术，干物料与硫酸溶液的比例为 2:1，预处理的方法是先加入物料然后加入酸液到装备有螺带式搅拌桨的预处理反应器中通入蒸汽在 175℃ 下处理 5 分钟；最后得到的物料含水率只有 45% 左右，物料呈蓬松干爽的颗粒纤维状；半纤维素的转化率能够达到 85% 左右，且分解得到的木糖也存在于预处理后的物料中，不会造成损失^[34]。高固含量的预处理技术操作简便，环境压力小，能耗、水耗低，此外更为重要的是为后续高固含量的发酵提供了可能。

1.3.2 抑制物干法生物脱毒技术

在稀酸预处理过程中，生物质的三种主要组分：纤维素、半纤维素、木质素在高温条件下由于稀酸过度催化的作用下生成不同种类的抑制物对后续的酶解、发酵产生影响。抑制物主要分为三类^[35,36]：第一类呋喃类抑制物是由半纤维素过度降解产生的糠醛、纤维素过度降解产生的 5-羟甲基糠醛（5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF），第二类是乙酰基水解产生的乙酸、糠醛、5-HMF 进一步反应生成的甲酸和乙酰丙酸等有机酸类，第三类是由木质素降解产生的酚醛、酚醇、酚酸类抑制物；产生的抑制物的浓度与原料的种类、自身的组分比例、以及预处理的强度有较大的关系。脱毒的步骤是必不可少的，脱毒的方法主要分为物理、化学、生物法；物理法是水洗、活性炭吸附^[37,38]；化学法石灰过碱化^[39]；生物法则是利用微生物代谢抑制物，以及酶降解抑制物的方法^[40]。许多微生物都能够利用预处理过后产生的抑制物组分，包括酵母、真菌、细菌；由于白腐真菌能够降解木质素，所以真菌类被较早的应用于生物脱毒的尝试中。里氏木霉菌在含有 2.6 g/L 乙酸、0.1 g/L 糠醛、0.2 g/L 羟甲基糠醛的水洗液发酵 6 天后将乙酸降解完全，而两种主要的呋喃类衍生物，只有 30% 的降解率，脱毒过程并不完全，但仍然对后续的乙醇发酵的产率和得率提高了 3 倍和 4 倍^[41]。其它一些酵母、细菌等都能在液体环境中对抑制物组分进行部分降解，但效果都不理想且周期长。本课题组通过在预处理秸秆中筛选得到一株煤油真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1^[42]，它能够在干式稀酸预处理后的高固含量的物料中生长并且实现对抑制物的降解；本实验室以该菌株为脱毒菌株开发出了两种脱毒方式一种是固态的静态脱毒法，另一种是固态的快速脱毒法^[43]，区别是后一种是在特定的生物脱毒反应器内进行，在通气的环境下实现脱毒过程的加速实现。*Amorphotheca resinae* 最早被用于降解航空煤油污染的菌种，有较强的烃类化合物的降解能力，使得糠醛、5-HMF、乙酸也能够进入该菌的中心碳代谢过程；此外在固态条件下菌体生长更为旺盛，菌体优先利用物料中呋喃类、有机酸类抑制物，利用快速生物脱毒法能够控制脱毒速率的加快，并保留大量的木糖以及可利用的糖类物质，为后续的生物转化提供更多的可利用的底物浓度。

1.3.3 高固含量同步糖化与发酵 (SSF) 的实现

木质纤维素在经过预处理以及脱毒步骤,可以用于各类的生物转化实验;主要发酵方式有:分步糖化与发酵 (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)、同步糖化与发酵 (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)、同步糖化与共发酵 (Simultaneous Saccharification and Co-fermentation, SSCF);分步糖化发酵是指物料的糖化与发酵分步进行,每个步骤都能在最优的条件下进行。例如 NREL 利用去乙酰基机械磨浆的方法对玉米秸秆进行预处理然后利用立式滚筒糖化罐对物料进行糖化,在 28% 的固含量条件下糖化 120 h 得到了 230 g/L 的总糖(纤维素、半纤维素的转化率都在 85% 左右),然后以能够利用葡萄糖、木糖、阿拉伯糖进行共发酵的菌株 *Zymomonas mobilis* 13-H-9-2 共发酵 50 h 得到 86 g/L 的乙醇^[44]。分步糖化存在的缺点是会造成机器占用场地的增加,此外高固含量的糖化会造成糖化底物对纤维素酶活力的抑制,以及发酵初始葡萄糖浓度过高也会对菌体的生长、耗糖以及乙醇的生产有抑制作用。为了节约生产空间以及解除糖抑制作用必须实现物料的糖化与发酵的一体化,同步糖化与发酵 (SSF) 指的是酶与物料的糖化以及发酵菌株将糖转化为乙醇这两步反应发生在同一生物反应器中。SSF 的实现需要考虑糖化和发酵各自最适温度、pH 的整合和控制。对于一些耐受高温的发酵菌株酶解与发酵都能够较好的进行,而一些发酵温度较低的菌株则可能会延长发酵时间以实现纤维素的高水解得率。此外高固含量的 SSF 则需要考虑的更多,超过 15% 固含量的 SSF 酶与底物的混合会成为最为关键的问题,一般的混合搅拌很难达到较好的糖化效果,而本实验室设计的新型螺带式搅拌桨生物反应器在 15%-30% 干式稀酸预处理的玉米秸秆条件下也能实现较好的糖化与发酵。在较高的固含量条件下 25%-30%, 本课题组采用预糖化的方法首先降低物料的粘度实现较好的传质传热,以及发酵初始葡萄糖浓度的提供,然后接入发酵菌株开始 SSF; 在 7、30FPU 每克干物料的酶用量下得到 40.0 g/L、64.6 g/L 的乙醇浓度^[45]。而本文研究的主要路线之一就是利用五种木质纤维素原料,以干法生物炼制技术为背景进行高固含量的纤维素乙醇发酵,探究不同原料的干式稀酸预处理效果以及生物脱毒的可行性,以及高固含量 SSF 的差异。

1.3.4 高固含量同步糖化与共发酵 (SSCF) 的研究

同步糖化与共发酵 (SSCF) 是利用富含木糖的木质纤维素原料生产乙醇的良好选择,能够利用葡萄糖、木糖、以及其它多种糖类的共发酵菌株是同步糖化的关键因素之一。而乙醇的野生型发酵菌株通常不具备利用木糖以及其它多种糖类的能力,所以需要通过遗传改造获得性能优良的共发酵菌株。木质纤维素预处理过程中产生的抑制物会影响共发酵菌株的生产和耗糖,而利用稀碱脱除乙酰基会有效避免乙酸的生成然后利用机械磨浆提高木质纤维素的表面积增加纤维素酶和半纤维素酶结合位点;处理后的物料葡萄糖酶解得率达到 78-84%,木糖 71-77%,共发酵菌株 *Z.mobilis* 8b 在 20% 固含量的糖化液中发酵,结果显示在前 20 h 几乎所有的糖都基本消耗完,乙醇浓度达到 70 g/L 得率为

90%^[46]。此外葡萄糖对于木糖的利用也会产生较大的抑制作用，主要归咎于木糖与葡萄糖之间的竞争性抑制作用，木糖的吸收也是依靠己糖转运家族^[47]。尤其是在高固含量的条件下，高浓度的葡萄糖会对木糖的利用产生很大抑制作用，所以需要通过对一些发酵策略的调整来促进木糖的吸收利用；在较低固含量下或者预处理过程中木糖存在于液体组分中采用木糖预发酵的方法使得木糖优先被利用然后将入纤维素酶使得菌体利用葡萄糖^[48]；此外分批补加物料、酶使得纤维素的糖化缓慢进行，从而降低葡萄糖的浓度使得木糖的利用抑制作用减弱^[49]；通过提高发酵菌体接种量的方法也能够提高木糖的利用率。本研究的主要路线之一也是通过发酵过程的优化，提高 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 同步糖化与共发酵的能力，以五种木质纤维素为原料生产高浓度纤维素乙醇。

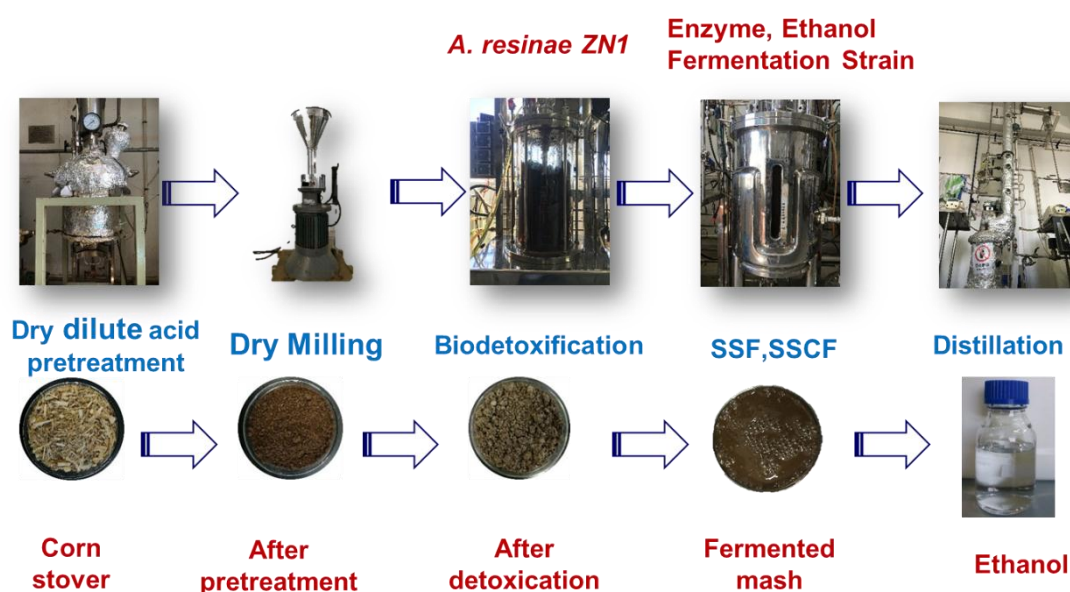


图 1.3 干法生物炼制主要技术流程

Fig.1.3 Main technical process of Dry Milling Biorefinery Processing.

1.4 本文的研究目的及技术路线

为了实现干法生物炼制生产高浓度纤维素乙醇的商业化，本文分别展开了如下研究：首先选取五种不同的木质纤维素原料：农业废弃物玉米秸秆、麦秆、水稻秸秆，制糖工业废弃物甘蔗渣，林业废弃物木屑分别进行干式稀酸预处理，探究干式稀酸预处理对于不同原料的适用性问题，此外进一步探究各种原料最优的预处理条件以利于后续的生物脱毒以及利用 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 的同步糖化与发酵（SSF），最终得出干法生物炼制技术对于不同原料是否具有普遍适用性。然后以共发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 利用五种预处理后且经过合适的快速脱毒的木质纤维素物料进行同步糖化与共发酵（SSCF）的研究，通过优化预处理条件、脱毒条件、以及发酵策略来提高菌株利用葡萄糖和木糖进行共发酵的能力，此外也通过提高固含量、提高菌株活性、提高酶用量等方法来提高最终纤维素乙醇的浓度，从而提高纤维素乙

醇对于玉米乙醇的竞争力。最后为了适应工业化生产的需要，测试不同来源的商品纤维素酶的酶活，以及纤维素酶糖化能力的差异，此外比较不同纤维素酶在 SSCF 过程中对纤维素的水解能力以及菌体生长和发酵能力的影响，以及比较不同酶用量下 SSCF 的差异，得出不同酶的 SSCF 过程中的最适的酶用量，以及各种商业酶糖化和发酵性能差异，为干法生物炼制技术生产高浓度纤维素乙醇商业化的实现提供可靠的技术支持和实际依据。

第 2 章 利用不同木质纤维素原料同步糖化与发酵(SSF)生产纤维素乙醇

2.1 引言

纤维素乙醇被认为是最有前途的生物燃料，但是在当前石油价格低的情势下，实现真正商业化需要纤维素乙醇的生产达到较高的收益，并且能够与玉米乙醇进行竞争以共享生物燃料乙醇的市场。然而，目前由于技术的不成熟以及生产成本高的原因，用于生产纤维素乙醇的生物炼制技术仍然处于起步阶段，仅有少数在美国和欧洲的工厂进行着纤维素乙醇的生产^[50-52]。一方面，基于纤维素的预处理、水解以及发酵的生物转化技术水平仍远低于玉米乙醇转化技术，目前生物炼制技术得到的纤维素乙醇的发酵浓度最大仅达到 10% (v/v)^[44]，与 10-15% (v/v) 玉米乙醇发酵浓度相比，仍比较低^[53,54]；另一方面，木质纤维素生物炼制技术过程中淡水的输入和废水的产生量要显著高于玉米乙醇的生产^[55,56]，此外木质纤维素生物炼制过程中能量输入也较高^[57-59]。

木质纤维素生物炼制工厂的生产规模与大规模生产可运输燃料的石油炼制工厂相似，但是又具有较大的差异。石油炼制工厂通常是能够保持能量与水高度守恒的化学过程综合体，但是不管是小规模还是大规模的生物炼制工厂却很难保持能量和水的守恒。当纤维素乙醇真正用作长期的汽油替代品时，每年的淡水使用量和废水产生量可达到 100 亿吨。这可能给发展中国家（如中国，巴西和印度）的生物炼制工业发展带来绝望的局面，虽然这些发展中国家农业比重大、生物质分布密度大，但供水、污水处理和能源供应的基本设施系统建设不足，使得纤维素乙醇很难在发展中国家实现商业化。能耗和水循环不仅是成本的问题，如果在发展中国家建设这些生物炼制工厂，那么由于当前生物炼制技术高能量消耗和废水产生多的问题，将会导致一系列严重的生态和社会问题。所以低能量消耗和低废水排放的要求应当作为纤维素乙醇生产工艺开发的基础，而不仅仅只考虑成本的问题。

目前的生物炼制普遍存在着能耗高、废水多、成本高的问题，而干法生物炼制技术是本实验室自主开发的一种低能量消耗、低废水产生、高效率的生物炼制技术；主要包括干式稀酸预处理技术、快速生物脱毒技术、高固含量同步糖化与发酵技术（SSF）以及一些辅助工艺流程。这些生产工艺流程的开发都是以低能量消耗、低废水排放为基础。首先是木质纤维素预处理过程中产生的废水问题，一般的稀酸或稀碱预处理都要在高的液固比条件下进行，从而导致后期的物料清洗需要耗费大量水资源并且增加了操作成本、降低生产效率；而干式稀酸预处理技术物料与稀硫酸溶液以 2:1 的固液比 (w/w) 混合加入到 20 L 的预处理反应器中进行，最终得到预处理后的物料固含量达到 50% 左右，没有废水产生且操作非常简便。此外，稀酸预处理过程中产生的抑制物如糠醛、5-HMF、乙酸、以及其他酚醛类抑制物，如果不将这些抑制物脱除或降低抑制物的浓度将极大的

影响菌株的生长,即使是能够耐受一定抑制物浓度的菌株也只能在较低的固含量条件下进行发酵,提高固含量相应的提高了抑制物的含量,从而影响菌株的生长及发酵,所以必须运用一定的方法脱除抑制物才能实现高固含量的发酵。固态生物脱毒技术是本实验室开发的生物脱毒技术,生物脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 首先利用预处理后物料中的糠醛,当糠醛降解大部分时然后菌株开始降解 5-HMF、乙酸以及其他酚醛类抑制物,然后才开始利用预处理后物料中的葡萄糖和木糖^[43];该种脱毒方法操作简便,效果好,而且能够保留大量的可利用糖类,提高乙醇的得率。在 SSF 过程中为了实现高固含量的发酵必须具备一个具有良好搅拌、传质传热的生物反应器,传统的高固含量的发酵采用的是分步糖化的方法降低物料的粘度然后才能采用平叶桨进行共发酵;本实验室采用螺带式搅拌桨能够实现糖化与发酵在同一个发酵罐内进行,螺带式搅拌桨能够在高达 30% 固含量的条件下对物料进行酶解,在之后的发酵中也起到了较好混合作用,即使在 35% 固含量的条件下也能够实现较好的酶解和发酵。

本实验主要选取了五种不同的木质纤维素原料,主要分为农业废弃物:玉米秸秆、水稻秸秆、麦秆;林业废弃物:意杨木屑;制糖工业废弃物:甘蔗渣;以这五种原料进行合适的干式稀酸预处理,得到的物料经过静态的生物脱毒除去其中的抑制物,然后利用经过预处理和脱毒后的五种原料以 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 为发酵菌株进行 30% 固含量下的同步糖化与发酵 (SSF)。实验目的主要是为了探究干式稀酸预处理技术以及生物脱毒和同步糖化与发酵技术对于不同物料的适应性问题,旨在得出干法生物炼制技术能够普遍适用多种木质纤维素原料。

2.2 材料与方法

2.2.1 原料和纤维素酶

玉米秸秆产自中国河南南阳(收获于 2014 年秋季),小麦秸秆产自河南省郸城县(收获于 2011 年秋季),水稻秸秆产自中国江苏省常州市(收获于 2014 年秋季),意大利白杨木屑产自江苏省盐城市(2015 年),甘蔗渣(2011 年)产自中国广西省北海市。玉米秸秆、水稻秸秆、麦秆都经过水洗除尘和烘干后,用孔径为 10-mm 锤式粉碎机粉碎,然后置于塑料袋中常温储存;甘蔗渣不需要清洗直接烘干后粉碎待用;白杨木屑不清洗不粉碎直接烘干待用。

木质纤维素原料的组分测定是依据 NREL 的测定方法^[60,61];原料组分测定的方法是称取 400 mg 烘干后的木质纤维素原料添加 4 mL 72% 浓硫酸,于 30℃ 恒温水槽中反应 1 h,并用玻璃棒不断搅拌。然后加 112 mL 去离子水将酸稀释至 4%,盖上塞子,纱布绑紧,上下颠倒数次混匀,于 121℃ 酸解 1 h。取出试管并混匀反应液,然后将两步酸水解后混合物进行抽滤,同时对抽滤得到的剩余物清洗洗去残留的可溶性组分,然后放置在 105℃ 下烘干,滤液用来测定其中葡萄糖和木糖的含量从而确定纤维素和半纤维素的含

量。烘干后的残渣可以认为是酸不溶性木质素和灰分的混合物，下一步将烘干后的残渣连同滤纸放入坩埚内在马弗炉中灼烧，以空白滤纸作对照烧掉的部分可以认为是木质素的含量，而灰分的测定是直接称取烘干后的原料放置在坩埚内在马弗炉中灼烧，剩余部分认为是灰分。

纤维素酶# 7 是由酶制剂有限公司提供的一种固体纤维素酶制剂，滤纸酶活为 63 FPU/g；固体酶中蛋白含为 46.7 mg/g；纤维二糖酶活为 99.89 CBU/g；滤纸酶活的测定方法分别依据 NREL LAP-006^[62]；纤维素二糖酶活测定方法依据 Ghose^[63]；蛋白含量的测定方法是利用考马斯亮蓝法（Bradford method）以牛血清蛋白（bovine serum albumin, BSA）为标准品^[64]；纤维素酶的添加量为 15 FPU/g DM（DM: dry matter, 干物料）。

2.2.2 菌种和培养基

发酵菌种 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1（CGMCC 2528）是从中国普通微生物菌种保藏管理中心获得的，是通过 Co60 辐射诱变获得的一株适用于高固含量纤维素乙醇发酵的突变菌株；菌种以 YPD 培养基培养至对数期然后分装在 2 mL 含有 30%（v/v）甘油的冻存管中-80℃超低温冰箱中保藏^[65]。

培养基：

（1）合成培养基：20 g/L 葡萄糖、2 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g/L MgSO_4 、1 g/L Yeast Extracts；

（2）二级短期种子驯化培养基：含有 25%（v/v）玉米秸秆水解液（15%固含量未脱毒玉米秸秆制备的水解液）、2 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g/L MgSO_4 、1 g/L Yeast Extracts；

（3）三级短期种子驯化培养基：含有 50%（v/v）玉米秸秆水解液（15%固含量未脱毒玉米秸秆制备的水解液）、2 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g/L MgSO_4 、1 g/L Yeast Extracts；

（4）种子培养基：60 g/L 葡萄糖、2 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g/L MgSO_4 、1 g/L Yeast Extracts；

（5）SSF 营养盐添加量：2 g/L KH_2PO_4 、1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g/L MgSO_4 、1 g/L Yeast Extracts；

二级和三级短期驯化种子液中葡萄糖浓度为 60 g/L；试剂 KH_2PO_4 ， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ， MgSO_4 ， H_2SO_4 购自中国上海市凌峰化工有限公司；酵母提取物来自中国湖北宜昌市安琪酵母有限公司；琼脂购自中国上海阿拉丁生化有限公司。

2.2.3 干式稀酸预处理以及固态生物脱毒法

五种不同的木质纤维素原料经过干式稀酸预处理（DDAP），在稀酸的催化下半纤维素被大量的降解为木糖，此外木质纤维素结构的打破有利于后续的纤维素酶水解，预处理方法依据 Zhang^[34, 66]。物料与稀硫酸溶液以 2:1 的固液比（w/w）混合加入到 20 L

的预处理反应器中, 处理条件转速维持螺旋搅拌 50 rpm、175℃下维持 5 min, 不同的木质纤维素原料硫酸的用量不同。预处理后的物料含水量维持在 50%左右且物料呈蓬松干爽的颗粒状态, pH 维持在 2.0 左右, 预处理过程中没有废水产生。

预处理后的物料通过固态生物脱毒法进行静态脱毒, 方法依据 Zhang^[67]。生物脱毒菌株 *Amorpha resinae* ZN1 (CGMCC 7452, Chinese General Microorganisms Collection Center, Beijing, China) 用来去除预处理后物料中的抑制物。*A. resinae* ZN1 保存在马铃薯葡萄糖琼脂培养基 (PDA) 上, 培养基的制备方法是将 200 g 削皮、切片的马铃薯在 1 L 的去离子水中煮沸 30 分钟滤去固体残渣得到的液体组分定容至 1 L 后加入 15 g/L 的琼脂 20 g/L 的葡萄糖然后灭菌用于制备 *A. resinae* ZN1 生长的 PDA 斜面。*A. resinae* ZN1 接种于预处理后的物料后能够首先利用物料中的糠醛, 当糠醛降解大部分时然后菌株开始降解 5-羟甲基糠醛 (5-HMF)、乙酸以及其他酚醛类抑制物, 然后开始利用预处理后物料中的葡萄糖和木糖。静态脱毒的主要过程是首先用 20% (w/w) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 溶液调节物料的 pH 至 5.5, 然后接入 10% (w/w) 的脱毒种子, 脱毒种子是含有生长旺盛的 *A. resinae* ZN1 菌体的木质纤维素物料; 混合均匀后加入塑料盒子内进行静态脱毒, 室温维持 25℃, 脱毒时间为 7 天。

2.2.4 发酵种子液的培养

Saccharomyces cerevisiae DQ1 菌株保存在 -80℃ 超低温冰箱, SSF 种子的培养步骤如下, 取出的冻存管在 20 mL 的合成培养基中活化 18 h; 然后转接到含有未脱毒的玉米秸秆水解液培养基中进行短期的驯化以提高菌株耐受能力, 首先是 20 mL 二级短期种子驯化培养基驯化培养 15 h, 然后转接到 20 mL 三级短期种子驯化培养基驯化培养 15 h, 然后再转接与 30 mL 三级短期种子驯化培养基驯化培养 15 h, 最后转接于种子培养基中培养 12 h; 所有的转接的接种量为 10%, 种子培养的条件为 30℃、pH 5.5、150 rpm。

2.2.5 同步糖化与发酵 (SSF) 方法

SSF 是在具有螺带式搅拌桨 5 L 的生物反应器中进行^[66], 经过脱毒后的物料在 5 L 的螺带式搅拌桨生物反应器内开始预糖化, 预糖化的条件是: 30%固含量、50℃、pH 4.8、150 rpm、预糖化 7 h; 然后将 10%的 *S. cerevisiae* DQ1 种子液接入到发酵罐中进行 SSF, SSF 条件: 37℃、pH 5.5、静置培养 65 h, pH 用 5 M NaOH 调节, 取出的样品在 11167 ×g 条件下离心 5 min, 得到上清液进行高效液相色谱分析 (HPLC), 检测其中的葡萄糖、木糖、乙酸、乙醇、糠醛、5-HMF 的含量。

SSF 过程中细胞的生长趋势用平板菌落计数 (CFU) 进行检测^[68], *S. cerevisiae* DQ1 在发酵过程中的菌体活力用每 mL 发酵液的 CFU 进行表示, 将稀释了 10^5 - 10^6 的发酵液吸取 100 μL 涂布于 YPD 培养基中在 30℃下培养 30 h 后计算 CFU。

2.2.6 乙醇得率的计算方法

乙醇得率的计算方法是依据(Zhang and Bao, 2012)^[69]:

$$\text{Ethanol yield (\%)} = \frac{[\text{Ethanol}] \times W}{976.9 - 0.804 \times [\text{Ethanol}]} \times \frac{1}{0.511 \times [\text{Cellulose}] \times 1.111 \times [\text{Solids}] \times M} \times 100\%$$

[Ethanol] (g/L) 是发酵最终的乙醇浓度; W: SSCF 的总液体质量 (g); [Cellulose]: 预处理后物料的纤维素含量 (g/g); [Solids]: SSCF 初始时物料的固含量 (g/g); M: 物料的总质量 (g); [Xylose] 是预处理过后物料中含有的木单糖的含量 (g/g); 976.9 是乙醇校正系数 (g/L) 是用来校正质量浓度与体积浓度间的转化; 0.804 是无量纲因子用来计算 SSCF 过程中水分的丢失; 1.111 是纤维素转化为葡萄糖的系数; 0.511 是基于生化反应化学计量学酵母细胞糖转化为乙醇的系数。

2.2.7 高效液相色谱分析 (HPLC)

葡萄糖、木糖、乙醇、乙酸、糠醛、5-HMF 的浓度是通过 HPLC 进行定量分析。所使用的检测器是日本岛津公司生产的 RID-10A 型示差折光检测器, 高效液相色谱配备的色谱分析柱的型号是 HPX-87H (300 mm × 7.8 mm)。从发酵罐取出的样品在 11167 × g 条件下离心 5 min, 用去离子水稀释适当倍数通过孔径 0.22 μm 的一次性滤膜进行过滤。检测的条件是: 5 mmol/L 硫酸, 流速是 0.6 mL/min, 柱温维持在 65 °C, 进样量为 20 μL。

2.3 结果与讨论

2.3.1 原料组分测定

测定五种木质纤维素原料的成分, 并比较之间的差异; 如图 2.1 所示玉米秸秆产自中国河南南阳 (收获于 2014 年秋季), 纤维素含量 32.1%, 半纤维素含量 20.6%, 木质素 26.5%, 灰分 4.4%; 小麦秸秆产自河南省郸城县 (收获于 2011 年秋季), 纤维素 38.7%, 半纤维素含量 25.9%, 木质素 14.9%, 灰分 5.2%; 水稻秸秆产自中国江苏省常州市 (收获于 2014 年秋季), 纤维素 35.4%, 半纤维素含量 18.4%, 木质素 22.5%, 灰分 9.3%; 意大利白杨木屑产自江苏省盐城市 (2015 年), 纤维素 39.7%, 半纤维素含量 16.6%, 木质素 29.4%, 灰分 3.2%; 甘蔗渣 (2011 年) 产自中国广西省北海市, 纤维素 38.8%, 半纤维素含量 23.9%, 木质素 26.4%, 灰分 1.3%。

五种不同的木质纤维素原料的组分有着较明显的差异, 五种原料中意杨木屑和甘蔗渣的纤维素含量较高分别为 39.7%、38.8%; 玉米秸秆纤维素含量较低为 32.1%; 此外麦秆的半纤维素含量最高达到 25.9%, 其次是甘蔗渣 23.9%; 五种原料的木质素含量差别较小都维持在 25% 左右, 意杨木屑为木本类木质纤维素原料所以木质素含量较高为 29.4%; 灰分测定结果显示水稻秸秆灰分含量最高为 9.3%, 主要是由于其特殊的水生环境会提高植物对无机盐离子的吸收以及在生长过程中植物外表有较高的灰尘附集, 甘蔗渣灰分含量较低为 1.3%, 其他三种灰分含量相差不大维持在 4% 左右。组分的差异会对后续的干式稀酸预处理条件有所影响, 纤维素和半纤维素含量的不同也会对后续乙醇发

醇结果产生较大影响，在下文中会有相应的实验结果分析。

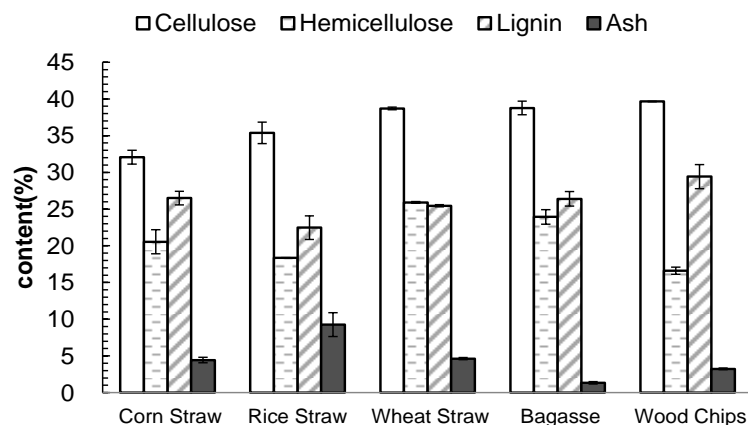


图 2.1 五种不同木质纤维素原料（玉米，水稻，小麦秸秆、甘蔗渣、木屑）组分测定

Fig.2.1 Determination the component of five different lignocellulose materials.

Cellulose: 纤维素; Hemicellulose: 半纤维素; Lignin: 木质素; Ash: 灰分

2.3.2 预处理后物料组分评价

对五种不同的木质纤维素原料进行干式稀酸预处理，首先预处理条件统一确定为：固体物料与酸液的比值为 2:1、2.5%的酸用量、预处理温度 175℃、处理时间 5 min、搅拌速度 50 rpm。对预处理后的物料进行组分测定，发现在相同的预处理条件下不同的木质纤维素原料预处理的效果有较大的差异；如表 2.1 所示三种粮食性作物秸秆预处理后的组分差异较小，纤维素和半纤维素以及抑制物的含量都维持在相似的水平，从抑制物含量分析可以看出小麦秸秆预处理过程中产生的糠醛（4.9 g/g DS, Dry Solid）和乙酸（12.5 g/g DS）含量较低有利于后续的脱毒步骤以及乙醇的发酵，预处理后的玉米秸秆和水稻秸秆物料抑制物含量也维持在一个较为适宜的水平；但甘蔗渣和杨树木屑在该预处理条件下却产生了较高浓度的抑制物，主要表现为糠醛（8 g/g DS）和 5-HMF（5 g/g DS）的浓度比秸秆类高出了一倍，而乙酸浓度也达到了 30 mg/g DS。高抑制物浓度的条件下很难进行后期物料的生物脱毒步骤也对后续发酵菌体的生长产生严重的抑制作用，尤其是在高固含量的发酵条件下。所以需要降低预处理的强度减少抑制物的产生；主要通过降硫酸用量由 2.5%降至 2%其它条件不变，重新对甘蔗渣和木屑进行干式稀酸预处理，预处理后发现 2% 酸用量条件下的甘蔗渣和木屑抑制物含量明显的下降，虽然还是略高于秸秆类木质纤维素产生的抑制物含量，但从后期的生物脱毒结果可以看出该强度下能够进行良好的生物脱毒步骤（如图 2.2 所示）。

比较预处理后物料的纤维素和半纤维素含量，2%酸用量的意杨木屑的纤维素含量最高为 46.7%，玉米秸秆最低为 36.6%；水稻秸秆半纤维素含量最高为 4.8%，2%酸用量的木屑最低为 0.3%。对比甘蔗渣和木屑两种酸用量预处理后的纤维素和半纤维素含量，2%酸用量木屑的纤维素含量有所上升；2%酸用量的甘蔗渣半纤维素也有所上升。

表 2.1 不同原料最优预处理条件下的组分测定、纤维素水解得率以及最优的脱毒时间

Table 2.1 Structural compositions and cellulose hydrolysis yield of dry dilute sulfuric acid pretreated lignocellulose materials and the Solid state biodetoxification time

Lignocellulose	Composition of the pretreatment material							72h Enzyme hydrolysis yield (% w/w)	Solid state Biodetoxification time(day)
	Cellulose (% w/w)	Hemicellulose (% w/w)	Furfural mg/g DS	Acetate mg/g DS	HMF mg/g DS	Glucose mg/g DS	Xylose mg/g DS		
Corn stover	36.6	2.9	5.0	19.4	4.7	34.8	117.1	88.9	7
Rice straw	40.7	4.8	4.7	16.3	4.9	35.9	115.7	98.1	7
Wheat straw	40.2	1.6	4.9	12.5	2.7	32.6	165.2	98.7	7
Bagasse (2.5%)	42.3	1.1	8.4	29.0	5.3	80.7	115.9	98.1	7
Bagasse (2%)	38.8	2.7	4.5	22.5	2.1	43.0	187.9	78.5	7
Wood chip (2.5%)	43.7	0.9	7.8	28.1	5.1	87.8	108.6	95.1	7
Wood chip (2%)	46.7	0.3	3.4	21.6	3.0	43.0	164.0	72.4	7

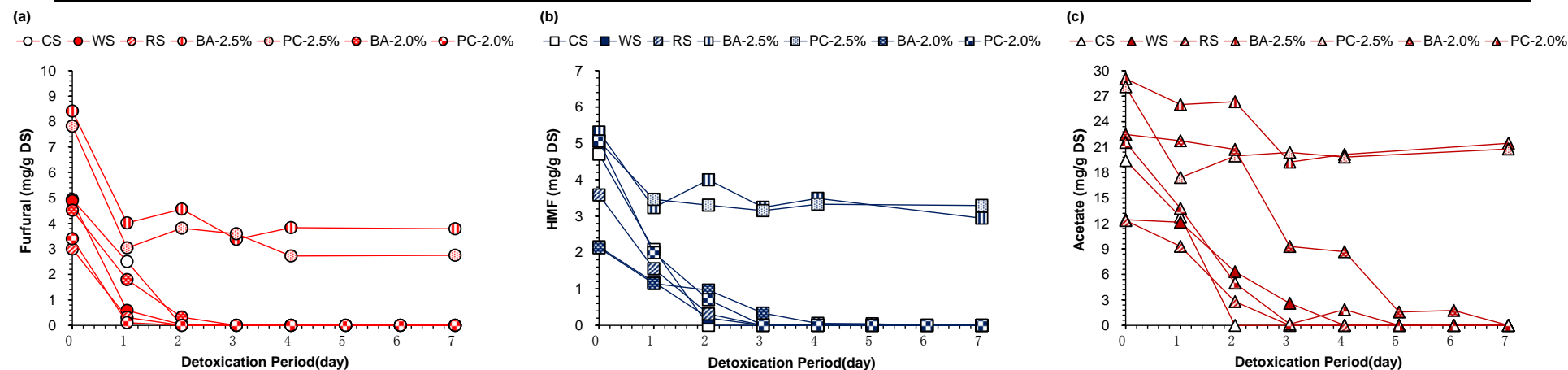


图 2.2 五种木质纤维素原料静态脱毒 7day 糠醛、5-HMF、乙酸的降解结果

Fig.2.2 Degradation the inhibitors of five different pretreated lignocellulosic feedstocks.

(a) 糠醛 (Furfural); (b) 5-羟甲基糠醛 (5-HMF); (c) 乙酸 (Acetate)

五种木质纤维素原料：玉米秸秆 (CS)、水稻秸秆 (RS)、小麦秸秆 (WS)、甘蔗渣 (BA)、白杨木屑 (PC)；固态生物脱毒方法：预处理后的物料用 20% 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节 pH 至 5.5，然后接入 10% (w/w) 的长满 *A. resinae* ZN1 的种子物料在塑料盒内进行密封的静态脱毒，期间无需额外添加营养成分。

Glucose: 预处理物料中葡萄糖的含量；Xylose: 预处理物料中木糖含量；72h Enzyme hydrolysis yield: 纤维素水解得率。

预处理后物料中单糖的含量也有较大差异, 2%酸用量的木屑木糖含量最高, 其次是麦秆和甘蔗渣; 2.5%酸用量的甘蔗渣和木屑的葡萄糖含量较高, 而降低酸用量后它们的葡单糖含量与其它物料相比较差别不大, 但降低酸用量后木屑和甘蔗渣的木糖含量都有较大幅度的上升, 主要是由于酸用量的下降会减少预处理产生的木糖进一步转化为 5-HMF 的量, 所以将酸用量由 2.5% 下调至 2.0% 表现为木糖含量的上升以及 5-HMF 含量的下降, 这也从侧面说明了 2.5% 酸用量对于甘蔗渣和木屑来说预处理强度过高。

测定五种物料的酶水解得率; 结果发现五种木质纤维素原料都能够达到较高的纤维素水解得率, 经过 72 h 的水解后取样测定各种物料的纤维素水解得率, 结果显示水稻秸秆的得率最高达到了 98.7%, 其次是 2.5% 酸用量麦秆(98.1%)、2.5% 酸用量的木屑(95.1%) 和 2.5% 酸用量的甘蔗渣(98.1%); 与玉米秸秆纤维素水解得率较低一些为 88.9%; 而由于 2.5% 酸用量的甘蔗渣和木屑预处理强度都较高, 不利于后续的脱毒与发酵, 于是降低酸用量以达到较合适的预处理强度; 2% 酸用量的木屑和甘蔗渣的酶水解得率较低, 测得最终的纤维素水解得率 72.4% 和 78.5%, 虽然水解得率降低, 但是抑制物含量的下降使得 2.0% 酸用量下的木屑、甘蔗渣更适合后续的 SSF。

对预处理后物料抑制物的含量测定发现水稻秸秆和麦秆的三种主要抑制物含量比玉米秸秆低, 2% 酸用量预处理后的木屑抑制物含量比 2.5% 酸用量条件下降低很多, 乙酸由 28.1 mg/g DS 下降到 21.6 mg/g DS、糠醛由 7.8 mg/g DS 下降到 3.4 mg/g DS、5-HMF 由 5.1 mg/g DS 下降到 3.0 mg/g DS。而甘蔗渣抑制物的含量下降也较为明显但乙酸含量由 29.0 mg/g DS 下降到 22.5 mg/g DS, 糠醛由 8.4 mg/g DS 下降到 4.5 mg/g DS、5-HMF 由 5.3 mg/g DS 下降到 2.1 mg/g DS。从抑制物含量分析来看, 2.5% 酸用量的玉米秸秆、水稻秸秆、麦秆物料以及 2% 酸用量的甘蔗渣和木屑物料的抑制物含量都维持在一个较为相似的水平, 可以通过生物脱毒在一定的时间内除去大部分抑制物。

2.3.3 不同物料静态脱毒实验

利用 *Amorpha thoeae* ZN1 脱毒菌株对 2.5% 酸用量预处理后的五种木质纤维素物料进行 7 天的静态脱毒并监测其中抑制物的降解情况, 如图 2.2 所示: 玉米秸秆物料在经过 3 天左右的静态脱毒能将三种抑制物都基本脱除干净, 其脱毒速度较快是由于预处理后的物料在常温下存储时间较长, 经过长期放置后乙酸、糠醛等抑制物的含量会因为挥发而有所降低。水稻秸秆和麦秆物料都能在 3 天内将糠醛和 5-HMF 脱除干净, 测量发现 4 天内乙酸也能基本脱除。但是 2.5% 酸用量预处理后的甘蔗渣和木屑生物脱毒比较困难, 测量脱毒 7 天后两种物料抑制物的变化情况, 2.5% 酸用量的甘蔗渣物料乙酸 25.2 mg/g DS、糠醛 3.8 mg/g DS、5-HMF 2.9 mg/g DS; 2.5% 酸用量的木屑乙酸 22.3 mg/g DS、糠醛 2.8 mg/g DS、5-HMF 3.3 mg/g DS; 此外经过 7 天的静态脱毒木屑、甘蔗渣物料中的单糖含量基本不变, 而三种秸秆类物料脱毒 7 天后物料中的单糖会被脱毒菌体大量利用, 综合以上结果可以判断 2.5% 酸用量预处理后的木屑、甘蔗渣预处理强度

过高,抑制物浓度对脱毒菌株的生长产生了严重的抑制作用,从而导致生物脱毒不能正常进行。于是考虑选择降低预处理强度来降低抑制物的生成;选择 2%的酸用量、175℃下处理 5 min 的预处理条件来对甘蔗渣和木屑重新进行预处理,如图 2.2 所示 2%酸用量预处理后的甘蔗渣在 4 天内将糠醛、5-HMF 基本脱除干净,而乙酸也能在 7 天内脱除;2%酸用量预处理后的木屑则更快一点,3 天内糠醛和 5-HMF 脱除干净,5 天内乙酸脱除干净。

由各种物料生物脱毒 7 天的单糖含量变化分析得出:当物料中抑制物的含量基本脱除时, *AmorpHotheca resiniae* ZN1 菌株开始利用物料中的单糖。所以为了较大程度的保留预处理后的物料中的单糖含量,可以将脱毒天数进行适当调整,2.5%酸用量预处理后的玉米秸秆、麦秆、水稻秸秆可以将脱毒天数改为 4 天;而 2%酸用量的甘蔗渣和木屑脱毒天数为 7 天;这样可以保留物料中的单糖为后续的同时糖化与发酵提供更多的碳源。

2.3.4 不同物料 SSF 结果

静态脱毒完成后首先对物料直接进行研磨处理,干法研磨处理会进一步降低物料颗粒的长度防止后续发酵过程中由于物料颗粒较长造成的发酵管道的堵塞,然后测定物料的含水量并且将研磨后的物料分装于塑料袋中在 115℃下灭菌 20 min 后用于后续的 SSF。对五种处理好后的木质纤维素物料进行相同条件下的 SSF,SSF 是在 5 L 具备螺带式搅拌桨的生物反应器中进行,该生物反应器能够实现高固含量下物料与纤维素酶快速混合达到较好的糖化效果;SSF 主要包括预糖化 7 h 然后接入发酵菌株开始 SSF;预糖化的条件是:30%固含量、50℃、pH 4.8、150 rpm,此外纤维素酶用量为 15 FPU/g DM;预糖化 7 h 后将温度降至 37℃同时加入发酵所需的营养盐后调节 pH 至 5.5,然后接入 10%的 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 发酵种子液;搅拌均匀后关闭搅拌开始静置发酵 65 h,静止发酵可以降低发酵过程所产生的能耗。取样前开启搅拌 5-10 分钟搅拌均匀后取样,取出发酵液后进行适当稀释后取 100 μL 稀释液于 YPD 培养基上生长,30℃下培养 30 h 后计算 CFU,从而测定 SSF 过程中酵母的生长活力。

分析五种预处理后的物料 SSF 的结果,从预糖化 7 h 后也就是 SSF 开始时初始葡萄糖的浓度可以看出,不同物料由于组分的不同以及预处理强度的差异导致五种原料在相同的酶添加量下有着不同的纤维素转化能力,如图 2.3 所示五种物料初始的葡萄糖浓度从低到高依次是:木屑 65.2 g/L、水稻秸秆 76.0 g/L、玉米秸秆 76.5 g/L、小麦秸秆 81.4 g/L、甘蔗渣 90.8 g/L;木屑初始葡萄糖浓度较低主要是由于预处理强度较低,可以通过增加酶用量或者延长预糖化时间来提高纤维素的水解得率,但不能通过提高预处理强度来提高纤维素的水解得率,因为在现有的预处理强度下抑制物的含量已经达到了较高的水平,如果单一的通过提高预处理强度来提高纤维素的水解得率势必同时会增加抑制物的含量,提高了生物脱毒的难度以及对后期乙醇发酵过程中菌体的生长产生抑制作用。

如图 2.3 所示接入发酵菌体后五种木质纤维素原料的糖耗速率和产醇速率基本相似;

杨树木屑较高一些，主要是由于其初始葡萄糖浓度较低，对菌体生长的抑制较小，菌体生长较好，提高了葡萄糖的消耗速率，从而增加了乙醇的产生速率；但由于其预处理强度较弱导致纤维素糖化得率较低，部分纤维素不能够水解成单糖被菌体利用，致使最终的乙醇浓度较低为 54.7 g/L；最终乙醇浓度最高的是甘蔗渣和麦秆分别为 65.4 g/L、64.5 g/L，主要是由于这两种纤维素原料中纤维素的含量较高，在合适的预处理条件下木质纤维素物料能够在纤维素酶的作用下达到较高的纤维素转化得率；玉米秸秆和水稻秸秆的最终乙醇浓度相似分别为 56.8 g/L、58.5 g/L。从纤维素乙醇的得率分析来看，最高的分别为麦秆 71.6%、甘蔗渣 71.1%、玉米秸秆 69.8%，其次是水稻秸秆 64.7%，最低的是木屑 54.6%；最终乙醇得率都不太高主要是由于固含量的提高增加了发酵液的粘度以及一些酚醛类抑制物对菌体的毒害作用，导致得率偏低；此外由于纤维素酶的酶活较低，导致纤维素的水解得率不高，降低了纤维素的转化率。

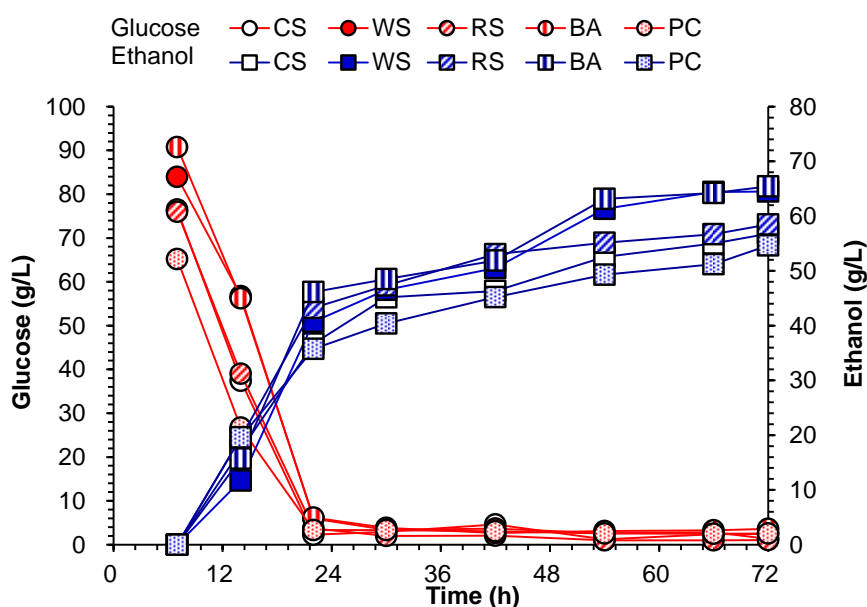


图 2.3 *S.cerevisiae*DQ1 以五种不同的木质纤维素原料进行 SSF 的发酵性能

Fig.2.3 Ethanol fermentability evaluation of different dry dilute sulfuric acid pretreated lignocellulose 五种木质纤维素原料：玉米秸秆（CS）、水稻秸秆（RS）、小麦秸秆（WS）、甘蔗渣（BA）、白杨木屑（PC）；发酵条件：30%固含量，纤维素酶用量：15FPU/g DM（#7）；10%（v/v）*S.cerevisiae* DQ1 种子液接种量；预糖化 7h 条件：50℃、pH 4.8、150 rpm；SSF 条件：37℃、pH 5.5、静止发酵不搅拌。

2.4 小结

从最终的乙醇浓度分析来看五种木质纤维素原料都能够正常的进行 SSF，并且达到了较高的纤维素乙醇浓度且远远大于 40 g/L，有利于后期纤维素乙醇工业化生产中乙醇蒸馏成本的降低。总得来说 2.0%酸用量预处理后的甘蔗渣物料以及 2.5%酸用量预处理

后的麦秆物料 SSF 最终的乙醇浓度和得率较高，其次是 2.5% 酸用量的玉米秸秆和水稻秸秆物料，最后是 2.0% 酸用量下的木屑物料，五种原料较好的 SSF 发酵结果可以说明，本实验室开发的干法生物炼制技术能够适应于很多不同来源的木质纤维素原料，此外高固含量 SSF 的顺利进行也进一步体现了螺带式搅拌桨生物反应器的优越性。

从 SSF 实验结果分析来看，五种木质纤维素原料中存在着另一种丰富的糖类物质：木糖，从 SSF 木糖浓度分析看，五种原料在 30% 固含量条件下初始木糖浓度分别为：玉米秸秆：6.1 g/L、水稻秸秆 6.2 g/L、麦秆 26.1 g/L、甘蔗渣 64.8 g/L、木屑 40.8 g/L，即使经过了 7 天较长的静态生物脱毒，甘蔗渣和木屑在 SSF 初始的木糖浓度也达到了较高的水平，而玉米秸秆以及水稻秸秆和麦秆这三种粮食类作物秸秆由于脱毒时间较长，木糖大部分被脱毒菌株代谢利用，所以可以通过缩短脱毒时间来保留物料中的木糖。木糖作为一种丰富的碳源，在预处理后的物料中大量存在，野生型酵母不能够利用木糖来生产乙醇，可以通过基因改造的方法获得能够同时利用葡萄糖、木糖进行同步糖化与共发酵生产纤维素乙醇的发酵菌株，这样可以更好的提高乙醇浓度和得率，增加木质纤维素的利用率。

第 3 章 利用不同木质纤维素原料同步糖化与共发酵 (SSCF) 生产高浓度

纤维素乙醇

3.1 引言

干法生物炼制技术是一种低能耗、废水产生少的高效率纤维素利用技术，干法生物炼制技术主要包括干式稀酸预处理技术、快速生物脱毒技术、高固含量同步糖化与共发酵技术 (SSCF) 以及一些辅助工艺流程。这些生产工艺流程的开发都是以低能量消耗、低水用量、低废水排放为基础。利用干法生物炼制技术生产纤维素乙醇，能够实现多种原料下的糖化与发酵。为了提高纤维素乙醇对于玉米乙醇的市场竞争力，需要提高纤维素乙醇的发酵浓度；通过多种方法可以提高纤维素乙醇的浓度，主要有提高发酵的固含量、提高发酵的酶用量从而可以提高单位发酵体系中可利用葡萄糖的含量，但值得注意的是木质纤维素的组分结构中除纤维素之外还有部分的半纤维素，在稀酸预处理的条件下半纤维能够直接降解成可利用的木糖，在碱预处理以及蒸汽爆破等预处理条件下半纤维可以通过半纤维酶的水解作用降解成可利用的木糖，纤维素酶可以将预处理后物料中纤维素降解成为葡萄糖，从而即使不通过提高固含量也能够提高单位体系中可发酵糖类物质的浓度。木糖和葡萄糖都可以作为菌体发酵丰富的底物来源，但是一般的野生型酵母菌株或者其他乙醇发酵菌株（运动发酵单胞菌）都不能够利用木糖进行乙醇的发酵，所以必须通过分子改造的方法实现其对木糖以及木质纤维素中其他糖类的利用，从而提高乙醇的浓度。

近年来对于利用纤维素糖化液中葡萄糖、木糖以及其它糖类物质进行发酵生产纤维素乙醇的研究较多，例如通过两种菌株进行复合发酵的研究^[70]，将能够利用木糖的菌株和具有高抑制物耐受性的酵母菌株进行共培养，以未脱毒的干式稀酸预处理后的玉米秸秆为原料利用葡萄糖、木糖 SSCF 生产纤维素乙醇。该研究探讨了两种菌的不同接种比例对木糖利用和乙醇生产的影响，结果显示，木糖利用菌株和抑制物耐受菌株以 10:1 进行共培养发酵为最优方案，得到的乙醇浓度为 58.8 g/L。此外来自美国可再生能源实验室 (NREL) 2016 年发表的关于高浓度纤维素乙醇生产的文章，预处理的方法是去乙酰基机械磨浆^[44]，预处理后的玉米秸秆在 28% 的固含量条件下经过纤维素酶和半纤维素酶的水解作用下可以得到 230 g/L 的单糖(葡萄糖、木糖、阿拉伯糖)，以改造菌株 *Zymomonas mobilis* 13-H-9-2 为发酵菌株进行分步糖化共发酵 (SHCF)，在发酵 22 h 后乙醇浓度达到了 86 g/L，乙醇体积分数为 10.7% v/v。此外一些文章中探究了菌株在共发酵条件下木糖的利用情况以及影响木糖利用的因素，例如干式稀酸预处理后的物料中含有浓度较高的抑制物会影响菌体的生长和发酵，只有在 15% (w/w) 固含量的条件下才能实现菌体的正常发酵得到 29.5 g/L 的乙醇^[71]；此外葡萄糖浓度对于菌体利用木糖的影响也较大，

较低葡萄糖浓度以及合适的葡萄糖和木糖比例对于木糖的利用有较大的促进作用，为了降低葡萄糖浓度，可以通过分批补料的方式来实现纤维素的缓慢水解从而保持一个较低的葡萄糖浓度水平，以促进木糖的高效利用^[72, 73]；此外发酵菌体的活性对于木糖的利用以及乙醇的发酵具有较大影响，提高菌体的生物量是一种提高乙醇发酵，提高糖类物质转化率的切实可行的方法^[74, 75]。

本章节的主要研究内容是通过一系列“干法”生物炼制过程将木质纤维素转化为纤维素乙醇，以最大限度的减少生产过程中能源的消耗、淡水的投入以及废水的产生，同时保持较高的生物质转化效率。干法生物炼制技术首先从高固体含量（70%，w/w）的干式稀酸预处理（DDAP）开始，该过程具备零废水产生、极低蒸汽和水输入的特点；然后预处理后的固体木质纤维素原料通过一种独特的真菌（*Amorphotheca resinae* ZN1）进行生物的选择性降解抑制物，该过程废水产生量为零，几乎是零能量和水的输入；最后进行高固含量（30-35%）的同步糖化与共发酵（SSCF），将纤维素和木聚糖转化为高浓度的纤维素乙醇。使用典型的木质纤维素生物质原料（包括玉米秸秆，小麦秸秆，稻秆，甘蔗渣和杨树木锯屑）来实现高生物转化率的乙醇生产。最终实验结果获得了 101.1 g/L（相当于 12.7%，v/v）的破纪录的乙醇浓度，同时废水产生少、能量消耗低，类似于玉米乙醇的生产过程。研究重点是以五种木质纤维素为原料，以能够同步利用葡萄糖和木糖的工程改造菌株 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 进行高固含量下的 SSCF；葡萄糖和木糖共发酵过程中木糖的利用影响较大，所以需要优化该菌株的发酵条件（包括物料的脱毒时间、种子的培养方式、菌体的接种量、发酵过程的营养添加条件等）来提高菌体对于葡萄糖和木糖共发酵的能力；然后在优化后的发酵条件下进行不同物料、不同固含量、不同酶用量的 SSCF，研究发酵规律、提高乙醇的发酵浓度。

3.2 材料与方法

3.2.1 原料和纤维素酶

木质纤维素原料的组分测定是依据 NREL 的测定方法；玉米秸秆产自中国内蒙临河（收获于 2015 年秋季），纤维素 35.38%，半纤维素含量 24.62%，木质素 16.05%，灰分 3.47%；小麦秸秆产自河南省郸城县（收获于 2011 年秋季），纤维素 38.70%，半纤维素含量 25.90%，木质素 14.90%，灰分 5.20%；水稻秸秆产自中国江苏省常州市（收获于 2014 年秋季），纤维素 35.38%，半纤维素含量 18.36%，木质素 22.47%，灰分 9.26%；意大利白杨木屑产自江苏省盐城市（2015 年），纤维素 39.66%，半纤维素含量 16.60%，木质素 29.43%，灰分 3.24%；甘蔗渣（2011 年）产自中国广西省北海市，纤维素 38.77%，半纤维素含量 23.94%，木质素 26.39%，灰分 1.33%。玉米秸秆、水稻秸秆、麦秆都经过水洗除尘和烘干后，用孔径为 10-mm 锤式粉碎机粉碎，然后置于塑料袋中常温储存；甘蔗渣是不需要清洗直接烘干后粉碎待用；白杨木屑不清洗不粉碎直接烘干待用。

纤维素酶 Cellic CTec 2.0 由诺维信(中国)生物技术有限公司提供(Novozymes(China), Biotechnology Co.,Ltd.) 滤纸酶活 203.20 FPU/mL; 纤维素酶蛋白含量 87.31 mg/mL; 纤维二糖酶活 4900 CBU/mL (测定方法同 2.2.1.1)。纤维素酶的添加量以每克纤维素所需的蛋白量进行添加, 本篇研究探究了不同酶添加量对 SSCF 的影响, 主要选取了四种酶蛋白用量: 5、10、15、25 mg total protein/g cellulose。

3.2.2 菌种和培养基

发酵菌种 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 是来自于山东大学鲍晓明课题组, 能够高效的利用葡萄糖、木糖进行同步糖化与共发酵, 它是对野生型双倍体菌株 *Saccharomyces cerevisiae* BSIF 33 进行合理的分子改造设计和适应性驯化得到的^[76], 这株原始菌株是从泰国的热带水果中筛选出来的在目前的的研究中发现其有许多优点。主要改造步骤是将两个较为常见的基因, 木糖异构酶 (XI) -Ru-xylA 以及有效的木糖转运基因 MGT05196p (N360F) 导入到 BSIF, 过表达木酮糖激酶以及非氧化的 PPP 路径的一些基因, 并敲除 PHO13 (对硝基苯磷酸酶) 和 GRE3 基因^[77]。

培养基:

- (1) 一级种子培养基: 20 g/L Glucose, 20 g/L peptone, 10 g/L yeast extract;
- (2) 二级种子培养基: 5%快速脱毒后物料 (w/w), 2 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L MgSO_4 , 10 g/L YE, 纤维素酶用量: 10 mg total protein/g cellulose;
- (3) 三级种子培养基: 10%快速脱毒后物料(w/w), 2 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L MgSO_4 , 10 g/L YE, 纤维素酶用量: 10 mg total protein/g cellulose;
- (4) SSCF 营养盐添加量: 2 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L MgSO_4 , 10 g/L YE。

二级、三级种子培养基中以预处理、脱毒完后的玉米秸秆物料为唯一碳源, 通过接种同时添加的纤维素酶水解产生的葡萄糖以及预处理后产生的木糖为菌株的生长提供碳源, 从而除去除种子培养过程中纯品葡萄糖使用的成本。

3.2.3 干式稀酸预处理以及快速生物脱毒法

五种不同的木质纤维素原料都是经过干式稀酸预处理 (DDAP) 过程, (方法同 2.2.3)。物料与稀硫酸溶液以 2:1 的固液比 (w/w) 混合加入到 20 L 的预处理反应器中, 处理条件转速维持螺旋搅拌 50 rpm、175℃下维持 5min, 硫酸的用量依据不同的木质素原料决定的, 玉米秸秆、甘蔗渣、白杨木屑是每 100 g 干木质纤维素原料需要 2.0 g 的硫酸; 麦秆、水稻秸秆每 100 g 干木质纤维素原料需要 2.5 g 的硫酸。

预处理后的木质纤维素物料通过固态生物脱毒法进行快速脱毒, (脱毒方法同 2.2.3)。*Saccharomyces cerevisiae* XH7 可以同时利用葡萄糖和木糖共发酵生产乙醇, 所以需要保留物料中较多的木糖。快速脱毒是在适当的通气和良好的搅拌的条件下, Fur、5-HMF、Ace 以及典型的酚醛类抑制物都成倍的降解, 快速脱毒 36 h 的结果相当于静态脱毒 96 h, 由于 *A. resinae* ZN1 优先利用抑制物, 所以物料中木糖被大部分保

留。快速脱毒的主要过程是用 20% (w/w) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 调节物料的 pH 至 5.5, 然后接入 10% (w/w) 的脱毒种子, 脱毒种子是含有生长旺盛的 *Amorphotheca resinae* ZN1 的木质纤维素物料; 混合均匀后加入到 15 L 的有螺带式搅拌桨的生物脱毒反应器中进行快速脱毒, 温度维持 28℃、通气量维持 0.6 vvm。

3.2.4 发酵种子液的培养

Saccharomyces cerevisiae XH7 菌株保存在 -80℃ 超低温冰箱, SSCF 的种子的培养步骤如下, 取出的冻存管在 20 mL 的 YPD 培养基中进行活化 12 h; 然后转接到以木质纤维素为底物的种子培养基, 首先是二级种子培养基培养 12 h, 然后转接到三级种子培养基培养 12 h。所有的转接的接种量为 10%, 二级、三级种子培养的酶用量是 10 mg total protein/g cellulose, 种子培养的条件为 30℃、pH 5.5、200 rpm。

3.2.5 同步糖化与共发酵方法

SSCF 是在具有螺带式搅拌桨的 5 L 或 50 L 发酵罐中进行的, 经过脱毒后的木质纤维素原料在 50℃、pH 4.8、200 rpm 的条件下预水解 12 h, 然后将 *S. cerevisiae* XH7 的种子液接入到发酵罐中进行 SSCF 持续 108 h。pH 用 5M NaOH 调节维持在 5.5, 取出的样品在 11167 *g 离心 5 min, 得到上清液进行 HPLC 分析, 检测其中的葡萄糖、木糖、乙酸、甘油、乙醇、糠醛、5-HMF 的含量。

为了提高木糖的利用速率需要提高 SSCF 过程的酵母的细胞量, 通过浓缩种子液来提高接种时的细胞量, 具体方法是: 培养四份三级种子液, 每份种子液的液体质量占 SSCF 总液体质量的 10% (g/g); 其中三份种子液在 4000 rpm 的条件下离心 5 min, 去掉上清液保留剩下的包含固体和菌体的组分, 剩余的一份种子液用来回悬三份种子液剩余的固体和菌体部分, 得到浓缩种子液加入到 5 L 发酵罐内进行 SSCF。

通过浓缩种子液来提高 SSCF 的初始细胞量, 该步骤比较复杂需要离心, 不利于大规模实验 (50 L 规模) 的进行, 于是尝试改变种子液的培养方式。与之前主要的不同是将种子液的底物物料由快速脱毒替换为静态脱毒 5 day 的物料, 脱毒完全的物料抑制物含量较低使得酵母能够更好的生长。具体操作步骤是: 甘油管转接到 YPD 培养基培养 12 h, 然后再转接到含 5% 物料的培养基培养 12 h, 再转接到含 10% 物料的培养基培养 24 h。最后一步种子液的体积是发酵总体积的 20%, 为了保持接种量始终为发酵液体积的 10%, 于是从糖化阶段所添加的自由水中扣除总体系的 10%, 当预糖化 12h 后接入种子液后发酵固含量仍然是 30%, 而接种量的体积为 10%。

SSCF 过程中细胞的生长用平板菌落计数 (CFU) 进行检测 (方法同 2.2.5)

3.2.6 乙醇得率的计算方法

$$\text{Ethanol yield (\%)} = \frac{[\text{Ethanol}] \times W}{976.9 - 0.804 \times [\text{Ethanol}]} \times \frac{1}{0.511 \times ([\text{Cellulose}] \times 1.111 + [\text{Xylose}]) \times [\text{Solids}] \times M} \times 100\%$$

[Ethanol] (g/L) 是发酵最终的乙醇浓度; W: SSCF 的总液体质量 (g); [Cellulose]: 预处理后物料的纤维素含量 (g/g); [Solids]: SSCF 初始时物料的固含量 (g/g); M: 物料的总质量 (g); [Xylose] 是预处理过后物料中含有的木单糖的含量 (g/g); 976.9 是乙醇校正系数 (g/L) 是用来校正质量浓度与体积浓度间的转化; 0.804 是无量纲因子用来计算 SSCF 过程中水分的丢失; 1.111 是纤维素转化为葡萄糖的系数; 0.511 是基于生化反应化学计量学酵母细胞糖转化为乙醇的系数。

木糖利用率的计算是初始木糖的浓度减去发酵最终木糖的浓度的差值比上初始木糖浓度, 最终得到的百分比。

3.2.7 高效液相色谱分析 (HPLC)

葡萄糖、木糖、乙醇、乙酸、甘油、糠醛、和 HMF 的浓度是通过 HPLC 进行定量分析 (方法依据 2.2.7)。

3.3 结果与讨论

3.3.1 不同木质纤维素原料最优预处理条件的确定

原料的种类以及来源的不同都会影响干式稀酸预处理的效果, 不同的预处理强度主要会对纤维素晶体结构破坏程度、以及抑制物的含量产生影响, 从而对后续物料脱毒步骤、酶水解以及 SSCF 都会产生比较大的影响。预处理的强度主要与原料的特异性、稀硫酸的用量、预处理的温度、以及预处理的时间这四种因素密切相关, 从成本和操作过程的复杂性角度考虑主要通过改变硫酸用量来改变预处理的强度。当提高硫酸的用量时, 会增加纤维素晶体结构的破坏程度、提高半纤维素的还原量、利于后续纤维素酶对纤维素的水解作用, 但同时也会增加抑制物的含量导致生物脱毒速率的降低, 并对后续酵母的发酵产生较大的抑制作用; 反之降低稀硫酸的用量会降低抑制物的产生有利于酵母的生长, 但较低的预处理强度则会导致糖化效率的降低。综合物料的脱毒速率、酶水解得率、SSCF 结果这三个因素从而确定不同原料的最优预处理条件。

以玉米秸秆为例, 选取 1.5%、1.75%、2.0%、2.25%、2.5% 五种酸用量进行干式稀酸预处理, 预处理条件为 175℃、5 min; 对不同酸用量预处理后的玉米秸秆进行组分测定, 结果如表 3.1 所示: 随着预处理强度的增加未降解的半纤维素的含量逐渐降低, 由半纤维素降解生产的木糖含量升高; 此外抑制物的含量也随着酸用量的增加而增加。2.0% 酸用量处理后的玉米秸秆, 木单糖含量只比 2.5% 酸用量条件下的低了 1.1%, 而抑制物含量则有较大幅度的降低: 乙酸降低了 29.4%、糠醛降低了 18.4%、HMF 降低了 22.2%,

纤维素水解得率达到了 77.1% 与 2.5% 酸用量的 85.4% 相差不大；而低于 2.0% 酸用量的玉米秸秆预处理强度变弱，表现为未为降解的半纤维素较多导致木单糖含量的下降，这样的强度不利于后续的酶解与发酵。

选取 2.0%、2.25%、2.5% 酸用量预处理后的玉米秸秆进行快速生物脱毒速率的测定实验，2.5% 酸用量的玉米秸秆在快速脱毒 72 h 之后才能将糠醛和 5-HMF 基本降解完全，而 2.0% 和 2.25% 酸用量的玉米秸秆分别需要 12 h、24 h 就能将糠醛和 5-HMF 基本降解掉；从乙酸的降解程度来看，2.5% 酸用量的 CS 需要 96 h 才能降解至 3 mg/g DS 左右，而 2.0% 大概只需要 24 h 左右，2.25% 需要 48 h 左右。从实现工业化应用的角度来看，脱毒时间的缩短，有利于实现生产周期的快速循环，从而提高生产效率增加收益。

从后期的 SSCF 结果来看，如图 3.1 所示 2.0% 酸用量经过快速脱毒的物料在 30% 固含量，10 mg total protein/g cellulose 酶用量、SSCF 120 h 后的乙醇浓度为 81.7 g/L，2.5%、2.25% 酸用量的 SSCF 乙醇浓度分别为 78.9 g/L、80.9 g/L；而 2.0% 酸用量在 SSCF 过程中菌体对木糖的利用率达到了 85.0%，2.5%、2.25% 分别为 79.4%、73.3%。经过比较发现 2.0% 酸用量预处理后的玉米秸秆具有酶水解效率较高、抑制物产生较少、脱毒速率更快，更加有利于发酵菌株的 SSCF，所以选择 2.0% 酸用量、175℃、维持 5 min 为玉米秸秆的最优预处理条件。

其他木质纤维素原料也可以综合物料酶水解效率、抑制物脱毒速率、最终的 SSCF 结果来确定其最优预处理条件。例如甘蔗渣在 2.5% 的酸用量条件下虽然纤维素水解得率达到 90%，但是抑制物的含量却非常高：乙酸有 29.0 mg/g DS、糠醛有 8.4 mg/g DS、5-HMF 有 5.3 mg/g DS，较高的抑制物浓度导致脱毒菌株生长较为困难，所以需要降低预处理的强度。经过比较发现 2.0% 酸用量的甘蔗渣的纤维素的转化率降低至 78.5% 但抑制物的含量降低了很多，乙酸为 22.5 mg/g DS、糠醛为 4.5 mg/g DS、HMF 为 2.1 mg/g DS，抑制物含量的下降使得快速脱毒能够顺利的进行，经过快速脱毒 60 h 物料抑制物含量下降明显，乙酸剩余 2.5 mg/g DS、糠醛与 HMF 基本降解完全。脱毒完后的物料中抑制物含量较低有利于发酵菌株的生长和产醇。同样杨树木屑也与甘蔗渣有着相同的规律，2.5% 酸用量下物料抑制物含量较高乙酸 28.1 mg/g DS、糠醛 7.8 mg/g DS、HMF 5.1 mg/g DS，脱毒不能顺利进行不利于后续的 SSCF，所以选择合适的酸浓度，比较发现 2.0% 酸用量的木屑抑制物含量较低，乙酸 21.6 mg/g DS、糠醛 3.4 mg/g DS、HMF 5.3 mg/g DS，经过快速脱毒 60 h 后的物料中的抑制物含量对后续发酵菌体的生长抑制较小，有利于后续的 SSCF。而麦秆和水稻秸秆在 2.5% 的较高酸浓度下既能达到较高的酶水解得率分别为 98.7% 和 98.1%，抑制物的含量也较低，这两种秸秆即使在较高的酸用量下产生的抑制物也没有其他原料多，主要是因为这两种秸秆的灰分相对较多，在预处理过程中会中和一部分酸从而降低预处理强度，此外由于这两种秸秆在完全成熟过后植物产生的糖类物质主要集中在果实部而植物的茎秆中含有的糖类物质较少，所以在预处理过程

表 3.1 不同酸用量的玉米秸秆的组分测定、纤维素水解得率以及最优的脱毒时间

Table 3.1 Corn stover composition and cellulose hydrolysis yield after the different dosage of sulfuric acid pretreatment and the best Fast biodetoxification time

H ₂ SO ₄ dosage (%,w/w)	Structural compositions of dry dilute sulfuric acid pretreated lignocellulose materials							72h Enzyme hydrolysis yield ^a (%, w/w)	Biodetoxification time(h)
	Cellulose (%, w/w)	Hemicellulose (%, w/w)	Xylose mg/g DS	Glucose mg/g DS	Acetate mg/g DS	Furfural mg/g DS	HMF mg/g DS		
2.50%	36.5	4.5	155.1	29.7	21.7	4.0	3.6	85.4	96
2.25%	37.0	4.3	139.6	20.1	15.1	3.2	3.2	83.0	48
2.00%	37.6	4.4	138.0	22.1	15.3	3.3	2.8	77.1	36
1.75%	38.6	6.7	102.3	13.3	14.2	1.9	1.7	68.7	--
1.50%	39.0	8.0	73.3	9.9	11.3	1.2	1.1	53.8	--

表 3.2 不同原料最优预处理条件下的组分测定、纤维素水解得率以及最优的脱毒时间

Table 3.2 Structural compositions and cellulose hydrolysis yield of dry dilute sulfuric acid pretreated lignocellulose materials and the best Fast biodetoxification time

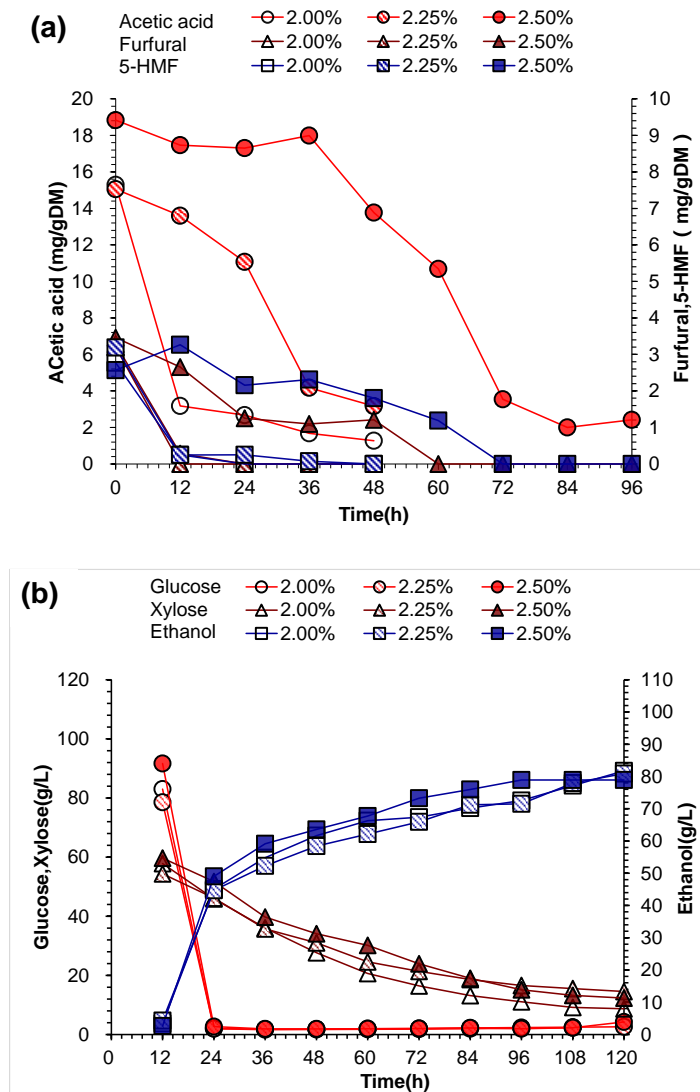
Lignocellulose	Structural compositions of dry dilute sulfuric acid pretreated lignocellulose materials							72h Enzyme hydrolysis yield (%, w/w)	Biodetoxification time(h)
	Cellulose (%, w/w)	Hemicellulose (%, w/w)	Xylose mg/g DS	Glucose mg/g DS	Acetate mg/g DS	Furfural mg/g DS	HMF mg/g DS		
Corn stover	37.6	4.4	138.0	22.1	15.3	4.0	3.6	77.1	48
Wheat straw	40.7	4.8	165.2	32.6	12.5	4.9	2.7	98.7	36
Rice straw	40.2	1.6	115.7	35.9	16.3	4.7	4.9	98.1	36
Bagasse	38.8	2.7	187.9	43.0	22.5	4.5	2.1	78.5	60
poplar wood chip	43.7	0.9	164.0	43.0	21.6	3.4	3.0	72.4	60

Glucose: 预处理物料中葡萄糖的含量; Xylose: 预处理物料中木糖含量。

^aEnzyme hydrolysis yield: 酶水解得率的条件是 2.5% (w/v) 固含量的物料在 20 FPU/g DM 的酶加量的条件经过 72 h 充分水解后纤维素的转化率 (w/w)。

中由游离糖类产生的抑制物较少。抑制物含量较低能够加快脱毒的速率也使得后续的菌株生长和发酵有较优异的表现。

如表 3.2 所示玉米秸秆最优预处理条件：2.0%酸用量、175℃、5 min，快速脱毒 48 h；水稻秸秆、麦秆：2.5%酸用量、175℃、5 min，快速脱毒时间 36 h；甘蔗渣、意杨木屑：2.0%酸用量、175℃、5 min，快速脱毒 60 h。预处理后物料评价如表 3.2 所示，预处理后的白杨木屑纤维素含量最高达到了 43.7%，甘蔗渣的木单糖含量最高达到了 187.9 mg/g DS；水稻秸秆的乙酸含量较低为 12.5 mg/g DS，而甘蔗渣和白杨木屑的乙酸含量明显高于其它三种秸秆类木质纤维素，所以后期需要延长脱毒时间。在 SSCF 过程中，酵母能够耐受一定的抑制物浓度，经过多次的实验总结发现当物料中初始乙酸含量维持在 2.0 mg/g DS 左右、糠醛和 5-HMF 基本脱除完全时酵母的发酵能够正常进行，若乙酸浓度过高或者糠醛、5-HMF 未脱除完全，则会影响菌体的生长，从而降低乙醇的生产。



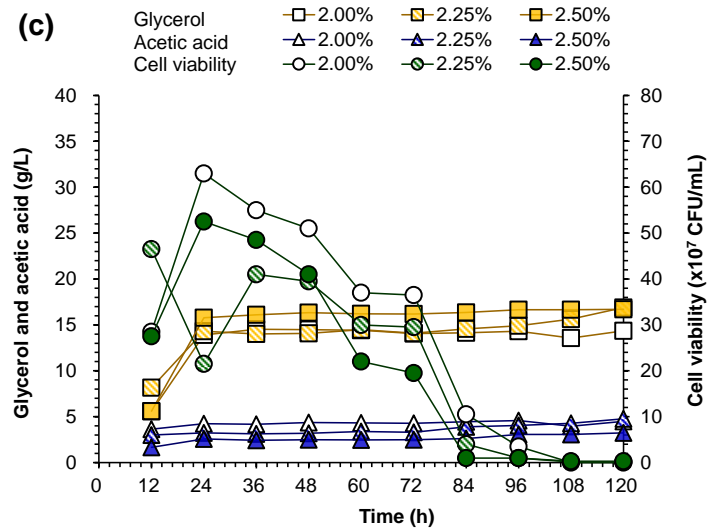


图 3.1 *S.cerevisiae* XH7 以不同酸用量预处理后的玉米秸秆进行 SSCF 的发酵性能

Fig.3.1 Ethanol fermentability evaluation of dry dilute sulfuric acid pretreated corn stover with different dosage of sulfuric acid at pretreatment

(a) 不同物料抑制物脱除速率; (b) SSCF 过程中葡萄糖、木糖、乙醇的变化;

(c) SSCF 过程中 甘油、乙酸、CFU 的变化

酸用量: 选取三种酸浓度: 2.0%、2.25%、2.5% (w/w); 发酵条件: 30%固含量, 纤维素酶用量: 10 mg total protein/g cellulose (Novozymes Cellic CTec 2.0); 10% (v/v) *S. cerevisiae* XH7 种子液接种量; 预糖化 12 h 条件: 50°C、pH 4.8、200 rpm; SSCF 条件: 30°C、pH 5.5、200 rpm、SSCF108 h。

3.3.2 以五种不同木质纤维素为原料进行 SSCF 的发酵性能

不同原料经过合适的预处理以及较适宜的快速脱毒过程后, 物料能够保留大部分的木糖为乙醇的生产提供另外一种丰富的碳源, 而物料中少量的抑制物对后续发酵菌体生长与产醇影响较小。利用这五种处理好的原料以葡萄糖、木糖共发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 在 30%固含量、15 mg total protein/g cellulose 酶蛋白添加量下进行 SSCF。发酵过程种子液的培养也采用 SSCF 的方法, 以物料为底物在纤维素酶的水解作用下为发酵种子的生长提供碳源, 为了提高发酵过程菌体的活力采用浓缩种子液的方法提高菌体量, 预糖化 12 h 后接入浓缩种子液开始 SSCF。

在相同的发酵条件下不同的木质纤维素原料的 SSCF 具有一定的差异性; 首先是预糖化 12 h 后葡萄糖和木糖的浓度, 在较高的酶用量条件下五种原料的纤维素都能达到较好的水解效果, 预糖化 12 h 麦秆、玉米秸秆、甘蔗渣、水稻秸秆、木屑这五种物料在 30%固含量条件下葡萄糖的浓度分别为 93.3 g/L、92.4 g/L、83.3 g/L、91.8 g/L、86.0 g/L; 五种原料初始木糖浓度有较大的差异, 主要是由于原料的本身组分的差异性; 初始木糖浓度分别为 60.3 g/L、50.8 g/L、57.8 g/L、36.3 g/L、65.9 g/L。*S.cerevisiae* XH7 对于不同原料中的木糖都能达到较高的利用率, 甘蔗渣、麦秆、水稻秸秆都能达到 90%的木糖利用率, 木屑和玉米秸秆较低分别为 82.3%、78.4%; 说明虽然这五种原料存在着差异

性,但经过合适的预处理强度以及恰当的快速脱毒步骤都能使不同木质纤维素原料转化为纤维素乙醇生产的合适底物。如图 3.2 所示五种木质纤维素原料 SSCF120 h 后都能达到较高的乙醇浓度,麦秆乙醇浓度最高达到了 88.6 g/L,是因为麦秆原料中纤维素和半纤维素组分高且生成的抑制物较少;玉米秸秆、木屑、甘蔗渣、水稻秸秆乙醇浓度分别为 81.7 g/L、81.1 g/L、79.6 g/L、73.4 g/L。从乙醇得率分析来看,麦秆和玉米秸秆最高达到了 80.5%和 81.8%,其次是水稻秸秆 74.9%,甘蔗渣和木屑较低分别为 71.5%、70.8%,主要是因为为了降低甘蔗渣和木屑在预处理过程中产生的抑制物,需要减弱预处理强度,强度的降低会导致预处理后物料的糖化得率变低,从而导致部分糖还是以聚糖的形式存在降低了乙醇的得率。高乙醇浓度和得率的实现会降低纤维素乙醇工业化生产的成本,浓度越高后期蒸馏所需的成本也就越低,五种木质素原料获得的较好的发酵结果说明本实验室开发 DDAP 技术、生物脱毒技术以及 SSCF 技术能够适应大部分的木质纤维素原料生产高浓度的纤维素乙醇。

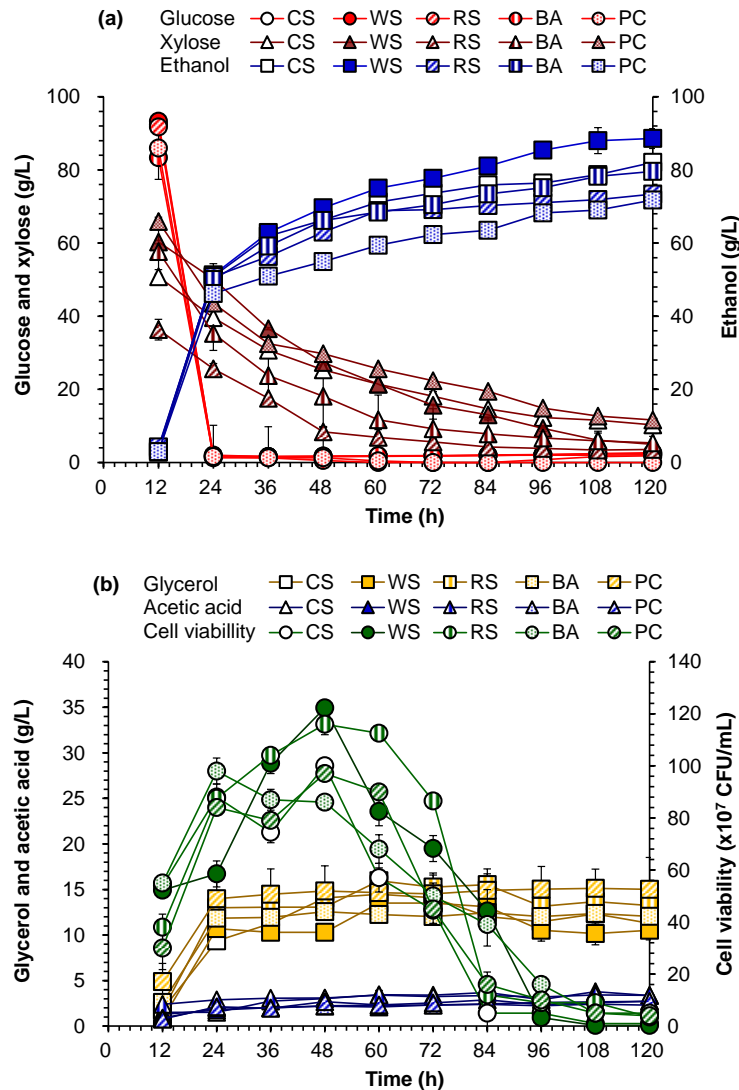


图 3.2 *S.cerevisiae* XH7 以五种不同的木质纤维素原料进行 SSCF 的发酵性能

Fig.3.2 Ethanol fermentability evaluation of different dry dilute sulfuric acid pretreated lignocellulose

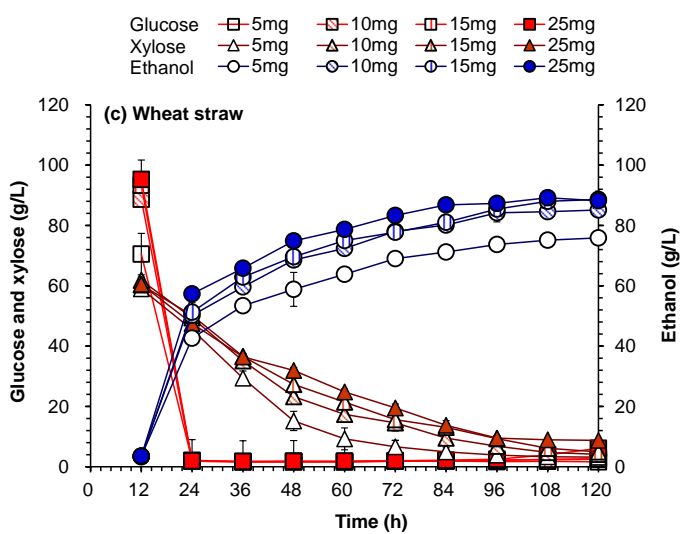
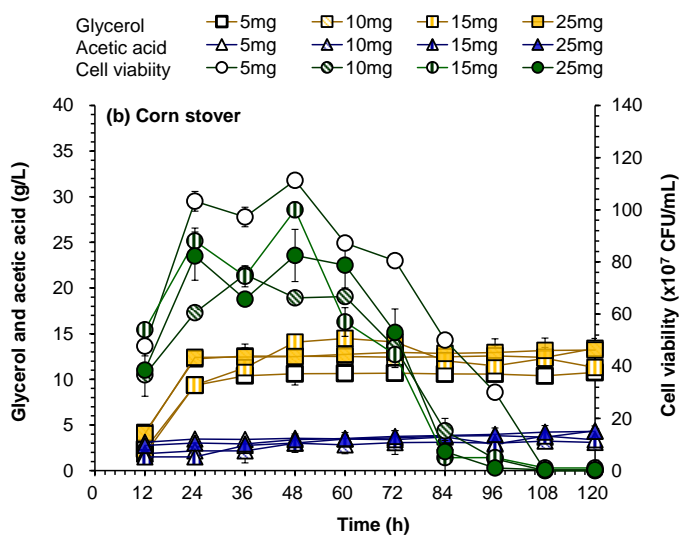
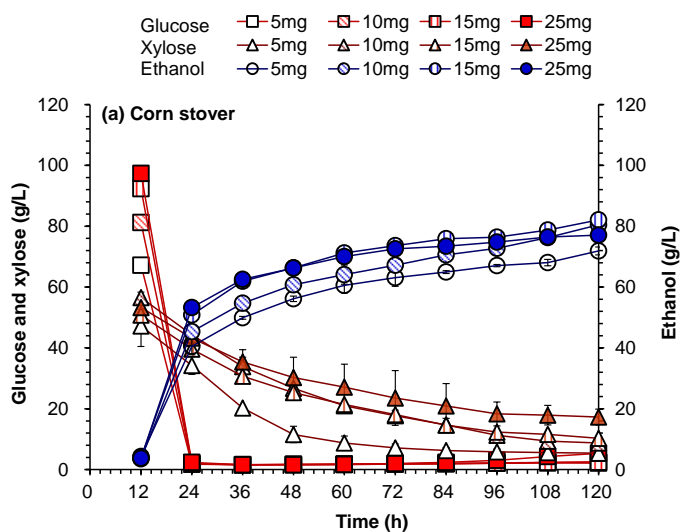
(a) SSCF 过程中葡萄糖、木糖、乙醇的变化; (b) SSCF 过程中甘油、乙酸、CFU 的变化; 玉米秸秆 (CS)、小麦秸秆 (WS)、水稻秸秆 (RS)、甘蔗渣 (BA)、木屑 (PC); 发酵条件: 30% 固含量, 纤维素酶用量: 10 mg total protein/g cellulose (Novozymes Cellic CTec 2.0); 10% (v/v) *S. cerevisiae* XH7 种子液接种量; 预糖化 12 h 条件: 50°C、pH 4.8、200 rpm; SSCF 条件: 30°C、pH 5.5、200 rpm、SSCF108 h。

3.3.3 玉米秸秆、麦秆 30% 固含量下不同酶用量的 SSCF

选取四种酶用量: 5、10、15、25 mg total protein/g cellulose, 以处理好的玉米秸秆和麦秆原料为底物, 以葡萄糖、木糖共发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 在 30% 固含量下进行 SSCF, 探究不同酶用量下 SSCF 规律, 主要包括纤维素的水解、菌体的生长、木糖的利用与酶用量之间的关系。发酵过程种子液的培养也采用 SSCF 的方法, 以物料为底物在纤维素酶的水解作用下为发酵种子的生长提供碳源, 为了提高发酵过程菌体的活力采用浓缩种子液的方法提高菌体量, 预糖化 12 h 后接入浓缩种子液开始 SSCF。

不同酶用量对于纤维素的水解有着特定的规律, 如图 3.3 (a) 所示 30% 固含量的玉米秸秆预糖化 12 h 后 5、10、15、25 mg total protein/g cellulose 酶添加量下葡萄糖的浓度分别为 67.3 g/L、83.0 g/L、91.3 g/L、97.3 g/L, 12 h 的纤维素酶解得率分别为: 41.8%、51.6%、56.7%、60.5%; 如图 (c) 所示麦秆物料预糖化 12 h 后葡萄糖的浓度分别为 70.5 g/L、88.6 g/L、93.3g/L、95.2 g/L, 12 h 的纤维素酶解得率分别为: 41.4%、52.0%、54.7%、54.8%; 纤维素的水解得率随着酶添加量的增加而增加, 当酶用量大于 15 mg total protein/g cellulose 时纤维素的水解得率受酶解产物抑制的影响而增加缓慢。麦秆预糖化 12 h 木糖浓度维持在 60 g/L 左右, 玉米秸秆维持在 55 g/L 左右; 发酵液中木糖的浓度不会随着酶用量的增加而增加, 主要原因是经过 DDAP 的原料中半纤维素大部分被水解成单糖和寡糖, 并且所添加的纤维素酶不具备水解木聚糖的能力。

如图 3.3 (a)、(c) 所示 *S.cerevisiae* XH7 具有较快的葡萄糖利用速率, 在接菌 12 h 后葡萄糖浓度快速下降到 2 g/L 左右, 从乙醇的生产速率来看, 提高酶用量会提高乙醇的浓度和生产速率, 这是由于酶用量的提高增加了纤维素水解成可利用葡萄糖的速率。SSCF120 h 麦秆 25、15、10、5 mg total protein/g cellulose 酶添加量下乙醇浓度分别为: 88.2 g/L、88.6 g/L、85.1 g/L、75.9 g/L, 得率分别为 80.1%、80.5%、77.0%、65.6%; SSCF 120 h 玉米秸秆不同酶用量条件下乙醇浓度分别为: 77.0 g/L、82.1 g/L、80.4 g/L、71.9 g/L, 得率分别为 77.6%、82.1%、77.9%、70.4%; 10 mg、15 mg、25 mg total protein/g cellulose 的 SSCF 乙醇浓度相差不大, 主要原因是纤维素酶水解作用会受到水解产物的抑制, 以及当初始葡萄糖浓度较高时菌体会利用一部分葡萄糖生产甘油维持自身渗透压平衡, 降低了乙醇的得率; 麦秆和玉米秸秆在 5 mg total protein/g cellulose 的酶添加量下分别产生了 12、10 g/L 左右的甘油, 10、15、25 mg total protein/g cellulose 的酶添加量下分别产生了 16、13 g/L 左右的甘油, 从而导致乙醇浓度和得率的降低。



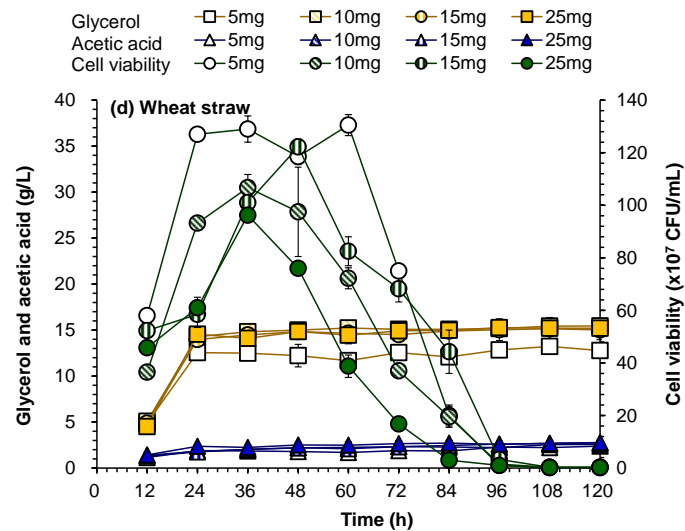


图 3.3 *S.cerevisiae* XH7 以玉米、小麦秸秆为原料进行不同酶用量 SSCF 的发酵性能

Fig. 3.3 Ethanol fermentability evaluation of dry dilute sulfuric acid pretreated corn stover and wheat straw with different enzyme loading.

(a)、(c) 玉米、小麦秸秆 SSCF 葡萄糖、木糖、乙醇的变化;

(b)、(d) 玉米、小麦秸秆 SSCF 甘油、乙酸、CFU 的变化

发酵条件: 30%固含量, 纤维素酶用量: 5、10、15、25 mg total protein/g cellulose (Novozymes Cellic CTec 2.0); 10% (v/v) *S. cerevisiae* XH7 种子液接种量; 预糖化 12 h 条件: 50°C、pH 4.8、200 rpm; SSCF 条件: 30°C、pH 5.5、200 rpm、SSCF108 h。

从木糖的利用趋势来看, 酶添加量的不同会影响木糖的利用速率。因为木糖的利用会受到葡萄糖的竞争性抑制作用的影响, 葡萄糖浓度会随着酶用量的增加而增加; 此外葡萄糖浓度过高也会导致菌体的生长受到抑制, 从而也会影响木糖的利用。以麦秆为例在较低酶用量(5 mg total protein/g cellulose)的条件下, 酶水解产生的葡萄糖浓度较低、菌体生长较好, 有利于菌体对于木糖的利用, 在接菌 48 h 后木糖的利用就由初始的 59.2 g/L 下降到 6.7 g/L, 平均利用速率达到 1 g/L/h, 比其他酶用量条件下的木糖利用速率都高。5、10、15、25 mg total protein/g cellulose 酶添加量下麦秆 SSCF120 h 后木糖利用率分别为 85.5%、91.8%、93.3%、94.7%, 玉米秸秆为 67.6%、78.8%、85.0%、88.6%; 木糖利用率随着酶用量的提高而下降。玉米秸秆和麦秆的木糖利用率存在着一定的差异, 麦秆的利用率要比玉米秸秆高, 主要原因是由于不同的木质纤维素原料在预处理过程中产生的抑制物的浓度不同, 即使在经过快速脱毒后也很难保持一致, 在发酵过程中测得 30%固含量条件下麦秆 SSCF 过程中乙酸的浓度维持在 2.5 g/L 左右, 而玉米秸秆则维持在 4.5 g/L 左右; 乙酸浓度的不同以及一些其它复杂的抑制物存在会影响菌体的生长从而会影响木糖的利用。

不同酶用量条件下, 麦秆的最高乙醇浓度在 15 mg total protein/g cellulose 条件下获得 88.6 g/L; 玉米秸秆的最高乙醇浓度在 15 mg total protein/g cellulose 条件下获得 82.1

g/L; 麦秆发酵结果要优于玉米秸秆, 主要原因是麦秆的纤维素和半纤维素含量高于玉米秸秆, 以及在发酵过程中麦秆的抑制物浓度比玉米秸秆低。从生产成本的角度考虑, 选择适当的酶用量有利于降低成本、提高收益; 对比发现 10 mg total protein/g cellulose 与 15 mg total protein/g cellulose 酶添加量条件下的 SSCF 结果相差不大, 10 mg total protein/g cellulose 酶添加量条件下麦秆和玉米秸秆的 SSCF120 h 乙醇浓度分别为 85.1 g/L、80.4 g/L; 所以选择 10 mg total protein/g cellulose 的酶添加量即降低成本, 也能够达到较高的乙醇浓度和得率。

3.3.4 玉米秸秆不同固含量下的 SSCF 发酵性能

本实验室用到的是装备有螺带式搅拌桨的生物反应器, 这种搅拌桨是针对于干式稀酸预处理技术特别设计的, 能够进行高固含量条件下的同步糖化与共发酵。选取三种固含量 25%、30%、35%, 以处理好的玉米秸秆和麦秆原料为底物, 以葡萄糖、木糖共发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 在 15 mg total protein/g cellulose 酶用量条件下进行 SSCF, 探究不同固含量条件下 SSCF 规律, 主要包括纤维素的水解、菌体的生长、木糖的利用与发酵固含量之间的关系。发酵过程种子液的培养也采用 SSCF 的方法, 以物料为底物在纤维素酶的水解作用下为发酵种子的生长提供碳源, 为了提高发酵过程菌体的活力采用浓缩种子液的方法提高菌体量, 预糖化 12 h 后接入浓缩种子液开始 SSCF。

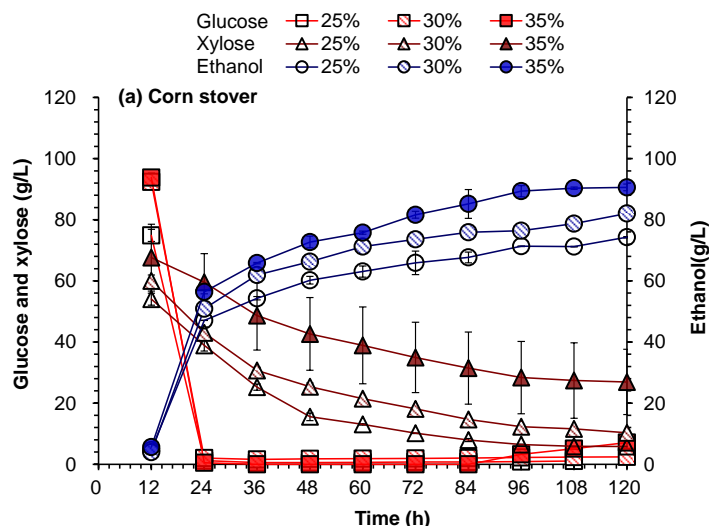
玉米秸秆在 35% 固含量条件下, 首先尝试了将 15 mg total protein/g cellulose 的酶在糖化开始阶段就一次性加入, 从结果分析来看, 最终的乙醇浓度为 81.2 g/L、得率为 67.9%、木糖利用率为 46.0%, 发酵结果与 30% 固含量几乎无差别; 分析原因主要是当固含量提高后, 预糖化 12 h 的葡萄糖浓度和木糖浓度会相应的提高, 而较高的葡萄糖浓度会对菌体的生长产生较强的抑制作用, 从 CFU 的变化趋势来看, 菌体接入发酵罐内, 并没有明显的增长趋势; 菌体生长较差直接影响了产醇的速率和最终的浓度; 此外固含量的提高也会提高发酵体系抑制物的含量, 这也会影响菌体的生长。于是将所需的酶用量分批添加, 即在预糖化初始的时候添加 10 mg total protein/g cellulose 然后在预糖化 12h 后接入发酵种子时加入剩余的 5 mg total protein/g cellulose; 此外为了降低 35% 发酵体系的抑制物的含量, 延长玉米秸秆的生物脱毒时间, 将之前的 48 h 快速脱毒延长至 72 h。结果显示在经过改进方法之后的 SSCF 能够取得很好的发酵结果如图 3.4 (a) 所示, 从初始糖浓度来看, 分批加酶使得预糖化 12 h 后的葡萄糖浓度由 103.6 g/L 下降到 92.8 g/L, 而木糖由于延长脱毒时间被脱毒真菌消耗了一部分, 由 64.4 g/L 下降到 59.9 g/L; 这样的糖浓度对菌体还是会产生抑制作用, 但从 CFU 的变化趋势来看菌体在发酵期间能够维持较好的生长; 脱毒 72 h 后物料的抑制物浓度也有所下降, 初始 12 h 的乙酸浓度由 3.2 g/L 下降到 2.2 g/L, 较低的抑制物浓度也有利于菌体的生长。发酵结果显示, 分批加酶乙醇的生产速率和木糖的消耗速率都高于之前的发酵结果, 最终乙醇浓度达到了 91.4 g/L、得率 72.0%、木糖利用率达到了 67.7%; 乙醇的体积分数达到了 11.6%, 在发酵 84

h 后 CFU 值迅速下降, 主要原因是菌体不能耐受高乙醇浓度而大量的死亡。总的来说通过分批加酶以及延长脱毒时间可以在 35% 固含量的条件下得到较好发酵结果。

在 25% 固含量条件下, 由于抑制物的降低, 以及粘度的下降, 菌体的生长要远远优于 30%、35% 固含量; 所以选择较低的 2 倍酵母种子接种量。在 25% 固含量条件下 SSCF 结果为: 乙醇浓度达到了 74.3 g/L, 得率达到了 94.9% ; 随着固含量的提高木糖利用率、乙醇得率会下降, 主要原因是葡萄糖浓度越高对木糖的吸收和利用抑制越明显, 以及随着固含量的提高, 抑制物浓度、发酵体系的粘度的提高都会对菌体的生长产生抑制作用; 在 25%、30%、35% 固含量条件下菌体最终分别产生了 12、14、20 g/L 的甘油, 这也降低了乙醇得率。

3.3.5 小麦秸秆不同固含量下的 SSCF 发酵性能

小麦秸秆相对于玉米秸秆来说具有更好的 SSCF 优势, 纤维素、半纤维素含量高、抑制物含量少。分别进行了 35%、30%、25% 固含量条件下的 SSCF。与玉米秸秆一样 35% 固含量条件下采用分批加酶的策略来克服初始糖浓度过高对菌体的抑制, 实验结果显示分批加酶乙醇的生产速率和木糖的消耗速率都高于纤维素酶一次性全部加入的发酵结果, 如图 3.4 (c) 所示 35% 固含量下 SSCF108 h 乙醇浓度达到了 101.1 g/L、得率 74.8%、木糖利用率达到了 74.7%; 乙醇的体积分数达到了 12.7% (v/v), 在发酵 84 h 后 CFU 值迅速下降, 主要原因是菌体不能耐受高乙醇浓度而大量的死亡。总的来说通过分批加酶可以在 35% 固含量的条件下得到较好发酵结果, 且能够获得超高纪录的纤维素乙醇浓度, 提高了纤维素乙醇对于玉米乙醇的市场竞争力, 有利于纤维素乙醇的工业化发展。而在 30%、25% 固含量条件下, 以麦秆为原料进行 SSCF 都能够得到高的乙醇浓度和得率以及木糖利用率。30% 固含量条件下乙醇浓度达到了 88.6 g/L、得率 80.5%、木糖利用率 91.8%; 25% 固含量条件下乙醇浓度 79.9 g/L、得率: 87.2%、木糖利用率 96.0%。在 25%、30%、35% 固含量条件下菌体最终分别产生了 14、16、21 g/L 的甘油, 这也降低了乙醇得率。



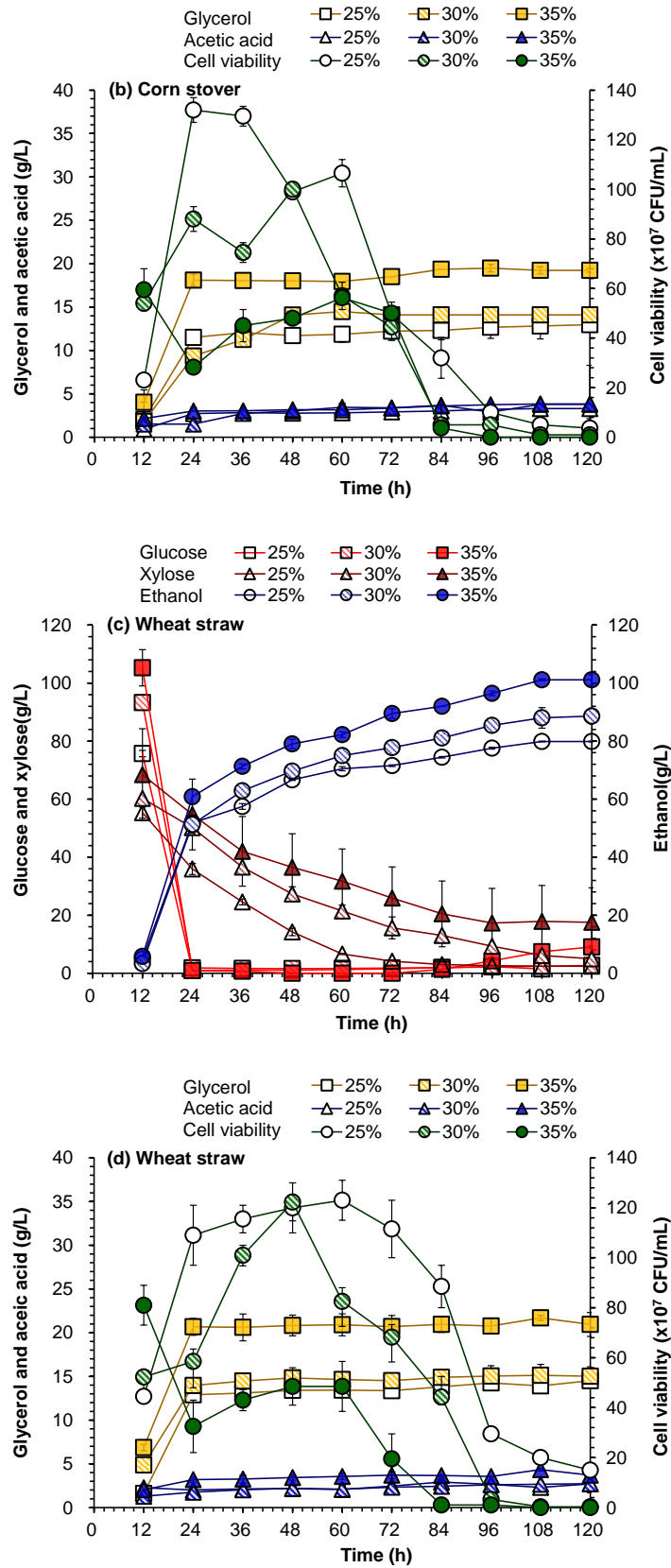


图 3.4 *S.cerevisiae* XH7 以玉米、小麦秸秆为原料进行不同固含量 SSCF 的发酵性能

Fig.3.4 Ethanol fermentability evaluation of dry dilute sulfuric acid pretreated corn stover and wheat straw at different solid loading.

(a)、(c) 玉米、小麦秸秆 SSCF 葡萄糖、木糖、乙醇的变化;

(b)、(d) 玉米、小麦秸秆 SSCF 甘油、乙酸、CFU 的变化

发酵条件: 25%、30%、35%固含量, 纤维素酶用量: 15 mg total protein/g cellulose (Novozymes Cellic CTec 2.0); 10% (v/v) *S. cerevisiae* XH7 种子液接种量; 预糖化 12 h 条件: 50°C、pH 4.8、200 rpm; SSCF 条件: 30°C、pH 5.5、200 rpm、SSCF108 h。

3.3.6 玉米秸秆、小麦秸秆在 50 L 发酵体系下的 SSCF 的发酵性能

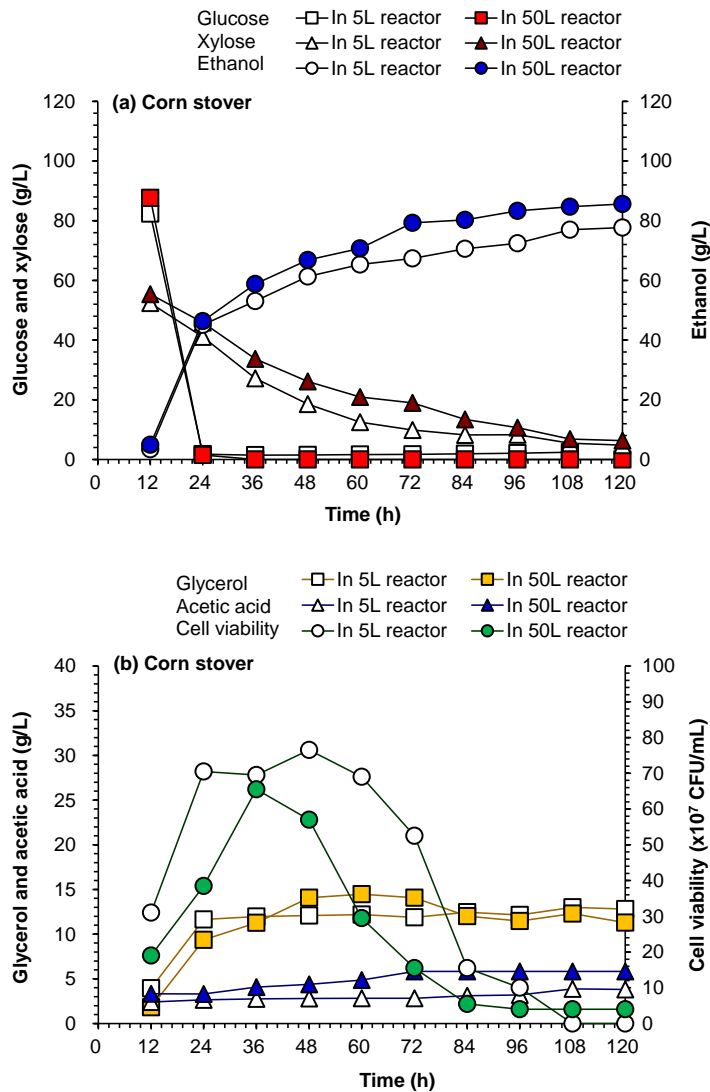
之前所有的发酵实验都是在 5 L 的生物反应器内进行的, 为了实现工业化的应用需要进行发酵规模的放大实验从而验证干法生物炼制技术生产纤维素乙醇能够实现放大化生产。将乙醇的 SSCF 放大 50 L 的规模, 以处理好的玉米秸秆和麦秆原料为底物, 以葡萄糖、木糖共发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 在 30% 固含量、10 mg total protein/g cellulose 酶用量条件下进行 SSCF。之前通过浓缩种子液来提高 SSCF 的初始细胞量, 该步骤比较复杂需要离心, 不利于进行大规模的实验或生产, 于是尝试改变种子液的培养方式。与之前主要的不同是将种子液的底物物料由快速脱毒替换为静态脱毒 5 day 的物料, 脱毒完全的物料抑制物含量较低使得酵母能够更好的生长。具体操作步骤是: 甘油管转接到 YPD 培养基培养 10 h, 然后再转接到含 5% CS 的培养基培养 12 h, 再转接到含 10%CS 的培养基培养 24 h。最后一步种子液的体积是发酵总体积的 20%, 为了保持接种量始终为发酵液体积的 10%, 于是从糖化阶段所添加的自由水中扣除总体积的 10%, 当预糖化 12 h 后接入种子液后糖化的固含量仍然是 30%, 而接种量的体积为 10%。

在 5 L 的生物反应器中运用新的种子培养方法进行 SSCF 实验, 发酵结果显示新的种子培养方式也能够得到较好的结果, 与之前相同发酵条件的发酵数据比较, 新种子培养方法的玉米秸秆的乙醇浓度达到了 78.5 g/L、得率为 76.0%、木糖利用率达到了 90.8%; 旧种子培养方法的玉米秸秆乙醇浓度 80.4 g/L、得率 77.7%、木糖利用率 85.0%; 结果显示两种方法得到的 SSCF 结果相似, 说明新的种子培养方法能够适用于 50 L 规模的放大实验。

于是尝试在 50 L 的生物反应器中进行 SSCF, 50 L 生物反应器的实际发酵体积大约为 28 L。发酵结果如图 3.5 所示 SSCF 120 h 玉米秸秆乙醇浓度: 86.0 g/L; 乙醇得率: 85.6%; 木糖利用率: 88.7%; 而麦秆 SSCF 120 h 乙醇浓度为 90.0 g/L, 乙醇得率: 85.8 g/L, 木糖利用率: 95.9%。玉米秸秆、麦秆 50 L 体系下乙醇浓度比 5L 发酵体系更高一些; 由于玉米秸秆 5 L 发酵体系的三级种子液是在摇瓶条件下进行的而 50 L 的三级种子液是在 5 L 反应器中进行的, 摇瓶条件下的溶氧要优于 5 L 的反应器, 所以导致 50 LSSCF 的初始菌体量比 5 L 的少了接近 40%; 后期进行麦秆的 50 L 罐 SSCF 时, 将所需的种子液平分在两个 5 L 罐内培养, 由于装液量的降低提高了溶氧, 所以麦秆的 50 L 罐的初始接种量要比摇瓶条件下高出一倍, 这也说明了种子培养过程中溶氧对于菌体的

生长比较重要。初始接种量的提高主要影响了木糖的消耗速率，菌体量越多，木糖利用速率越快。此外比较玉米秸秆、麦秆发酵过程中甘油的产量发现，麦秆比玉米秸秆高一些，分别为 15 g/L、13 g/L，主要是由于麦秆的发酵体系中糖浓度更高一些，提高渗透压促使菌体产生更多的甘油。

总的来说，利用玉米秸秆、麦秆在 30%固含量、10 mg total protein/g cellulose 酶用量、50 L 的发酵体系的下都能够进行较好的 SSCF 生产纤维素乙醇，最终乙醇浓度分别达到了 86.0 g/L、90.0 g/L。高乙醇浓度和得率的实现，提高了生产效率，降低了后期乙醇蒸馏的成本，增加经济收益，有利于实现工业化的放大生产。



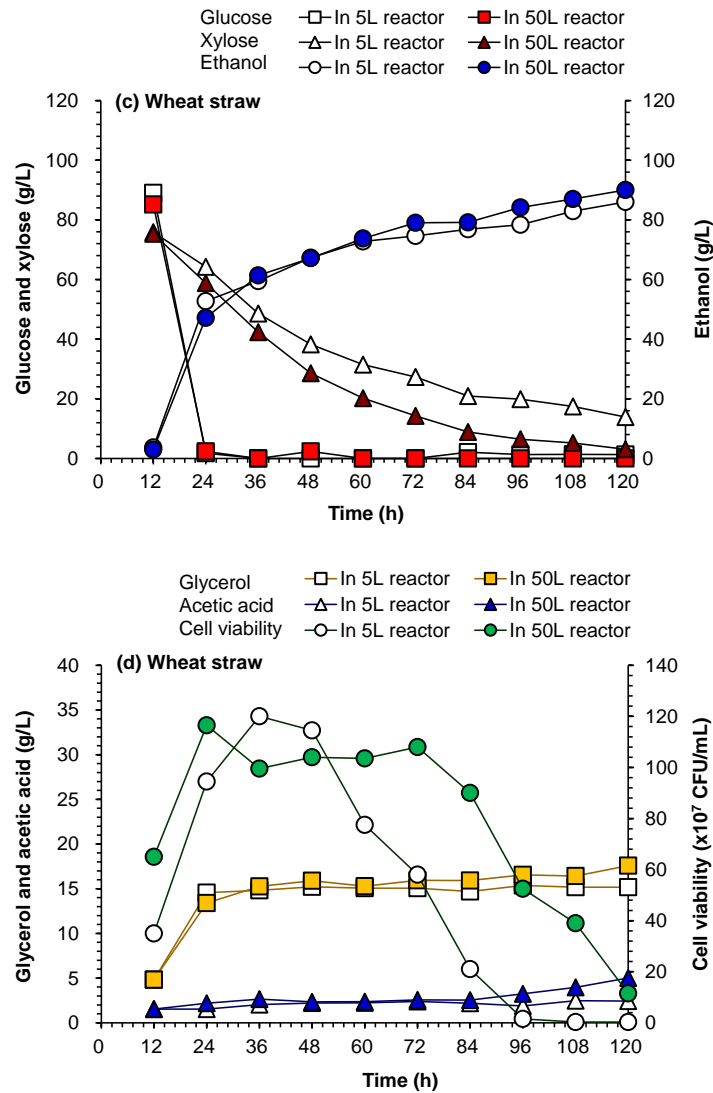


图 3.5 *S.cerevisiae* XH7 以玉米、小麦秸秆为原料进行 50 L 发酵体系的 SSCF 的发酵性能

Fig.3.5 Ethanol fermentability evaluation of dry dilute sulfuric acid pretreated corn stover and wheat straw at the 5 L scale, 50 L enlarged scale.

(a)、(c) 玉米、小麦秸秆 SSCF 葡萄糖、木糖、乙醇的变化;

(b)、(d) 玉米、小麦秸秆 SSCF 甘油、乙酸、CFU 的变化;

发酵条件: 30%固含量, 纤维素酶用量: 10 mg total protein/g cellulose (Novozymes Cellic CTec 2.0); 10% (v/v) *S. cerevisiae* XH7 种子液接种量; 预糖化 12 h 条件: 50°C、pH 4.8、200 rpm; SSCF 条件: 30°C、pH 5.5、200 rpm、SSCF108 h。

3.4 小结

近年来利用木质纤维素原料以工程改造菌进行葡萄糖、木糖共发酵生产乙醇的研究比较多, 但能够得到较高的乙醇浓度以及木糖利用率的结果却非常少, 主要存在着多方面的技术障碍。

首先是合适的木质纤维素预处理技术, 预处理方法大致可以分为非酸预处理与酸

预处理两种，目前的研究中大都数预处理技术都存在固含量低的问题，这样会导致预处理过程中产生的可溶性糖大量的存在于液体组分中，提高了糖回收的难度，此外许多预处理过程中都需要用清水清洗固体以洗去抑制物组分，造成大量的废水产生增加了环境压力，高能耗、操作繁琐的预处理过程也会增加工厂化生产的困难。而本实验采用的干式稀酸预处理技术无需预浸，直接将物料与酸液混合（液固比 2:1）在 175℃ 下蒸汽处理 5 min，半纤维素能够大部分的降解成为游离的木糖；预处理后的物料蓬松干爽无需进行固液分离直接进行固态快速生物脱毒，快速生物脱毒过程也无需水和营养盐的添加，经过生物脱毒后的物料能够将预处理过程中产生的主要抑制物基本降解完全且保留了物料中大部分的木单糖，这样得到的物料含水量在 50% 左右、抑制物含量较低、大部分的木糖得到了保留，更加的有利于后续的 SSCF。

其次是合适的生物反应器对于进行高固含量的 SSCF 非常必要，只有在高固含量的条件下发酵才有可能达到高的乙醇发酵浓度。在生物反应器中木质纤维素物料与纤维素酶的混合是非常重要的，以往的 SSCF 研究中，由于反应器本身搅拌的限制导致发酵的固含量较低，从而导致最终的乙醇浓度不高，实现高固含量的发酵成为了工业化应用的瓶颈；例如 NREL（美国可再生能源部）开发的去乙酰基机械磨浆生物炼制技术，它采用的是分步糖化与发酵的方法，糖化使用的是 9 L 的装备有叶片的不锈钢滚筒反应器，平均转速是 19 rpm，每次装载量为 1000 g 物料，物料固含量根据需要用水和酶进行调节，大致为 20-30%；所以单位糖化罐可以处理的物料量为 22.2 kg-33.3 kg DM/m³，然后将糖化 120 h 的糖化液转入到发酵罐内进行 50 h 的发酵。而本实验室运用的生物反应器装备有螺带式搅拌桨，能够在高固含量的条件下将物料与酶进行充分的混合，即使在 35% 固含量的条件下物料的糖化也完全没问题；经过 12 h 的预糖化，后续的发酵也是在同一个发酵罐内进行，实现了糖化和发酵的一体化，5 L 发酵罐的平均转速 200 rpm，每次装载量为 2.2 kg 物料，物料含水量大致为 50%，所以单位糖化罐可以处理的物料量为 220 kg DM/m³。放大到 50 L 的反应器，实际发酵体积可以达到 30 L，按照 30% 固含量计算，单位糖化罐处理处理量达到 360 kg DM/m³；合适的生物反应器为进行高固含量的 SSCF 提供了可能，高乙醇浓度的实现为后续蒸馏降低了成本。

同时高性能的共发酵菌株也是进行高固含量 SSCF 的关键，以木质纤维素为原料进行 SSCF 发酵的环境比较复杂，比如影响菌株生长发酵的抑制物、高固含量下导致的高粘度、以及共发酵菌株利用木糖的能力不高，菌株在 SSCF 过程中正常的生长以及高效率的利用木质纤维素是获得高乙醇浓度和得率的关键。本篇论文获得的共发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 具有较好葡萄糖和木糖共发酵能力，初始木糖即使达到 60 g/L 也能在 SSCF 过程中基本消耗；此外该菌株对于发酵体系的环境也具有良好的适应性，少量抑制物的存在对菌体的生长影响较小。

从最终的乙醇浓度比较可以发现，利用干法生物炼制技术能够获得较好的纤维素乙醇发酵结果，玉米秸秆、麦秆、木屑、甘蔗渣、水稻秸秆等五种不同种类的原料在 30% 固含量、15mg total protein/g cellulose 的条件下，获得了 82.1 g/L、88.6 g/L、81.1 g/L、79.6 g/L、72.4 g/L 的乙醇；玉米秸秆、麦秆在 50 L 的放大体系下乙醇浓度为 86.0 g/L、90.0 g/L；在 35% 的超高固含量条件下玉米秸秆和麦秆能够获得 91.4 g/L、101.1 g/L 的世界纪录纤维素乙醇浓度。比较 NREL 的去乙酰基机械磨浆生物炼制技术的乙醇秸秆：在 20 mg total protein/g cellulose 的酶添加量，22.5 wt%、25 wt%、26.5 wt%、28 wt% 固含量下乙醇浓度为 81, 78, 78, 81 g/L；10 mg total protein/g cellulose 的酶添加量，22.5 wt%、25 wt% 固含量条件下乙醇浓度为 76、83 g/L。从结果比较而言，本实验室进行的纤维素乙醇生产浓度已经接近玉米乙醇的浓度，完全具备纤维素乙醇商业化的可行性。

第 4 章 利用不同种类的纤维素酶进行 SSCF 生产纤维素乙醇

4.1 引言

目前,美国、欧洲、中国等国家正在扩大纤维素乙醇商业化的生产规模,杜邦(DuPont)生物燃料有限公司利用玉米秸秆和柳枝稷等农业生物质每年能够生产 89600 吨的生物乙醇,阿文戈亚(Abengoa)生物能源有限公司利用玉米秸秆以及非饲料性能源植物每年能够生产 74900 吨生物乙醇,帝斯曼(Poet-DSM)利用玉米芯残渣每年能够生产 59700 吨生物乙醇^[78]。贝塔可再生能源有限公司是世界上率先实现生物质转向乙醇的先锋企业(工厂坐落于意大利的克雷申蒂诺)每年能够将 20 万吨的生物质原料转化为 4 万吨的生物乙醇^[79]。中国作为一个快速发展的农业大国,在纤维素乙醇的商业化中也取得了较大的进展,山东龙力利用生产木糖醇后的玉米芯残渣每年可以生产 5 万吨的乙醇^[80]。随着纤维素乙醇的商业化,选择水解能力强且价格低廉的商业纤维素酶是实现纤维素乙醇商业化过程中降低生产成本的重要保障。

不同方式预处理后的木质纤维素都需要在纤维素酶的作用下才能降解成发酵菌体可利用的单糖,纤维素酶是一大类复杂酶系的总称,大都数纤维素酶都具有三种主要的酶分别是:外切- β -1,4-葡聚糖酶(exo- β -1,4-glucanases, EC 3.2.1.91),简称为外切酶(CBH),又称为纤维二糖水解酶(Cellobiohydrolases);内切- β -1,4-葡聚糖酶(endo- β -1,4-glucanases, EC3.2.1.4),简称为内切酶(EG); β -葡萄糖苷酶(β -1,4-glucosidases, EC 3.2.1.21)。外切酶(CBH I)从结晶区的纤维素链的还原端或(CBH II)非还原端开始持续水解,释放纤维二糖;内切葡聚糖主要作用于纤维素的非结晶区,随机水解纤维素链中的糖苷键,把纤维素长链切断,转化成为大量不同聚合度的短链纤维素,使得木质纤维素的聚合度降低,为外切酶提供更多的纤维素链末端; β -葡萄糖苷酶则主要将纤维二糖和可溶性纤维寡糖降解成可利用的葡萄糖^[81]。

利用木质纤维素生物炼制过程生产纤维素乙醇,纤维素酶占据了很大一部分的成本^[82,83]。在过去的几年里,全球工业酶的生产取得了巨大的发展,许多具有优良表现的纤维素酶被投入了市场并且用于纤维素乙醇的生产。最近市场出现的商业纤维素酶主要有诺维信(Novozymes, 丹麦)生产的CTec系列包括Cellic CTec 2.0、CTec 3.0、以及HTec 3.0等^[44];杰能科(现以部分被杜邦收购)生产的Accellerase系列纤维素酶,包括Accellerase1500等^[84]。中国工业酶的市场也出现了许多本土的纤维素酶例如尤特尔生物化学有限公司生产的Youtell系列的纤维素酶例如Youtell 6、Youtell 7^[65,85];蔚蓝生物技术有限公司(原康地恩)生产的Vland系列,主要有L-10、LLC 4等^[86]。

纤维素酶以及相关水解酶是将木质纤维素转化为菌体可利用糖类然后用于生物燃料以及其他化学品生产的关键成本^[87]。选用具有对预处理过程中产生的抑制物耐受性高、

与木质素的不可逆结合较弱、产物抑制较小的纤维素酶能够实现预处理后物料的高度水解^[88]。不同的商品纤维素酶对于纤维素具有不同的水解能力,有些酶制剂具有高效、低用量、高稳定性的优点,而有些则酶活较低、稳定性差、纤维素水解能力较弱的缺点;所以选择一种合适的纤维素酶是实现木质纤维素生产纤维素乙醇工业化关键考察因素之一。

本篇文章中,我们选取了中国的工业酶市场上出现的三种主要的纤维素酶,主要包括了来自诺维信(北京)的 Cellic CTec 2.0,来自蔚蓝生物技术(青岛)的 LLC 4 作为玉米秸秆糖化酶、以及由酶制剂公司提供的# 7 纤维素酶。玉米秸秆经过干式稀酸预处理技术(DDAP)然后通过生物脱毒去除其中的抑制物;然后利用经过预处理且脱毒后的玉米秸秆在 30%固含量的条件下水解糖化;利用一株能够同时利用葡萄糖、木糖共发酵的工程改造菌株生产高浓度高得率的纤维素乙醇。从发酵的结果显示三种商业酶在发酵过程中都有较好的发酵表现,说明这三种酶都能够应用于纤维素乙醇商业化的进程中。

4.2 材料与方法

4.2.1 原料和纤维素酶

玉米秸秆的组分测定是依据 NREL 的测定方法;玉米秸秆产自中国内蒙临河(收获于 2015 年秋季),纤维素 35.4%,半纤维素含量 24.6%,木质素 16.1%,灰分 3.5%;经过水洗除尘和烘干后,用孔径为 10-mm 锤式粉碎机粉碎,然后置于塑料袋中常温储存。

选取四种不同来源的纤维素酶,分别是诺维信 CTec 2.0 是由诺维信(中国)生物技术有限公司提供(Novozymes(China), Biotechnology Co.,Ltd.);蔚蓝 LLC 4 购买于由青岛蔚蓝生物集团;# 7 (由工业酶制造商提供);此外还有山东大学课题组自主生产的纤维素酶粗酶液。同步糖化与共发酵(SSCF)过程中纤维素酶的添加量以每克纤维素(g cellulose)所需的蛋白量进行添加,本篇研究探究了不同种类的纤维素酶的不同添加量对 SSCF 的影响,主要选取了四种酶蛋白用量:5、10、15、25 mg total protein/g cellulose。

4.2.2 菌种和培养基

发酵菌种 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 是一株能够高效的利用葡萄糖、木糖进行共发酵的工程改造菌株,菌株具体改造方法和信息参照 3.2.2。

培养基:

- (1) 一级种子培养基: 20 g/L Glucose, 20 g/L peptone, 10 g/L yeast extract;
- (2) 二级种子培养基: 5% 静态脱毒 5 天后的玉米秸秆(w/w), 2 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L MgSO_4 , 10 g/L YE, 纤维素酶用量: 10 mg total protein/g cellulose;
- (3) 三级种子培养基: 10% 静态脱毒 5 天后的玉米秸秆(w/w), 2 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L MgSO_4 , 10 g/L YE, 纤维素酶用量: 10 mg total protein/g cellulose。
- (4) SSCF 营养盐添加量: 2 g/L KH_2PO_4 , 2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1 g/L MgSO_4 , 10 g/L

YE。

4.2.3 干式稀酸预处理以及快速生物脱毒法

玉米秸秆经过干式稀酸预处理(方法同 2.2.3)。物料与稀硫酸溶液以 2:1 的固液比 (w/w) 混合加入到 20L 的预处理反应器中, 处理条件转速维持螺旋搅拌 50 rpm、175℃下维持 5min, 硫酸用量为 2.0% (w/w); 预处理后的玉米秸秆通过固态生物脱毒法进行快速脱毒, 方法参照 3.2.3。

4.2.4 发酵种子液的培养

SSCF 发酵种子液的培养首先从超低温冰箱中取出后接入合成培养基中活化, 然后在依次转接到二级、三级培养基中培养, 最后接入到发酵罐内进行 SSCF (具体方法参照 3.2.4)。

4.2.5 同步糖化与共发酵方法

SSCF 是在具有螺带式搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行的, 预糖化 12 h 后接入种子液, 开始 SSCF 108 h (具体方法参照 3.2.5)。

为了提高发酵的速率需要提高菌体的生物量, 具体方法是甘油管转接到 YPD 培养基培养 12 h, 然后再转接到含 5% 物料的培养基培养 12 h, 再转接到含 10% 物料的培养基培养 24 h; 然后预糖化结束后转接至 5 L 发酵罐中, 每一步的转接量为 10%, 为了提高菌体的生物量, 最后一步种子液的体积是预糖化总液体体积的 20%, 为了保持接种量始终为预糖化总液体的 10%, 于是从糖化阶段所添加的自由水中扣除 10%, 当预糖化 12 h 后接入发酵种子液, 此时的接种量的体积实际是预糖化过程总液体的 10%。

4.2.6 乙醇得率的计算方法

$$\text{Ethanol yield (\%)} = \frac{[\text{Ethanol}] \times W}{976.9 - 0.804 \times [\text{Ethanol}]} \times \frac{1}{0.511 \times ([\text{Cellulose}] \times 1.111 + [\text{Xylose}]) \times [\text{Solids}] \times M} \times 100\%$$

[Ethanol] (g/L) 是发酵最终的乙醇浓度; W: SSCF 的总液体质量 (g); [Cellulose]: 预处理后物料的纤维素含量 (g/g); [Solids]: SSCF 初始时物料的固含量 (g/g); M: 物料的总质量 (g); [Xylose] 是预处理过后物料中含有的木单糖的含量 (g/g); 976.9 是乙醇校正系数 (g/L) 是用来校正质量浓度与体积浓度间的转化; 0.804 是无量纲因子用来计算 SSCF 过程中水分的丢失; 1.111 是纤维素转化为葡萄糖的系数; 0.511 是基于生化反应化学计量学酵母细胞糖转化为乙醇的系数。

木糖利用率的计算是初始木糖的浓度减去发酵最终木糖的浓度的差值比上初始木糖浓度, 最终得到的百分比。

4.2.7 高效液相色谱分析 (HPLC)

葡萄糖、木糖、乙醇、乙酸、甘油、糠醛、和 HMF 的浓度是通过 HPLC 进行定量分

析（具体方法参照 2.2.7）。

4.3 结果与讨论

4.3.1 不同纤维素酶在相同酶载量下的 SSCF

选取四种纤维素酶测定其滤纸酶活、蛋白含量、以及 β -葡萄糖苷酶活，结果如表 4.1 所示；来自诺维信的 Cellic CTec 2.0、青岛蔚蓝生物集团的 LLC 4 这两种液体纤维素酶所有指标基本相似，具有较高的滤纸酶活和 β -葡萄糖苷酶；#7 是一种固体纤维素酶其酶蛋白依附在麦麸表面，该酶的 β -葡萄糖苷酶酶活非常低，滤纸酶活和蛋白含量是 CTec 2.0 的一半；而来自山东大学课题组生产的液体粗酶液其蛋白含量和滤纸酶活比较低。

表 4.1 四种纤维素酶的滤纸酶活、纤维素二糖酶活、以及蛋白含量比较

Table 4.1 The filter paper activity and cellobiose activity and protein content about cellulase

酶种类	滤纸酶活	蛋白量	β -葡萄糖苷酶活
诺维信 CTec 2.0	203.2 FPU/mL	87.3 mg /mL	4900.0 CBU/mL
蔚蓝 LLC 4	199.4 FPU/mL	75.9 mg /mL	5500.0 CBU/mL
#7	63.0 FPU/g	46.7 mg /g	99.9 CBU/g
山大	9.1 FPU/mL	4.1 mg /mL	400.0 CBU/mL

利用四种不同来源的纤维素酶以预处理后快速脱毒 2 天后的玉米秸秆为原料在 30% 的固含量条件下进行 SSCF，酶用量为 10 mg total protein/g cellulose，如图 4.1 所示，四种纤维素酶在相同的蛋白添加量的条件下进行 SSCF，但发酵最终的乙醇产量和得率以及木糖利用率和发酵过程中菌体的生长都有不同的表现。

首先从纤维素酶的水解能力比较不同酶的差异，预糖化 12 h 后四种纤维酶 LLC 4、CTec 2.0、#7、SD 水解产生的葡萄糖浓度分别为：74.3、82.4、63.6、77.5 g/L，从这可以说明在相同的酶用量下 CTec 2.0 具有更强的纤维素糖化能力，LLC 4、SD 的纤维素糖化能力相似，固体酶#7 较差一些。此外四种纤维素酶进行的 SSCF 最终的木糖利用率分别为 86.3%、90.9%、90.1%、62.8%，CTec 2.0、#7 发酵最终的木糖利用率相似，LLC 4 略低一些，而 SD 最低；从 SSCF 过程菌体的生长可以发现使用 SD 纤维素酶的菌体生长较差且无对数生长期，菌体在 SSCF 过程中没能够进行有效的增殖生长，菌体活力较差主要原因是该纤维素酶液中含有的复杂成分会抑制菌体的生长，菌体量的下降会使得乙醇浓度和得率的降低，同时也会降低木糖的利用率。而固体酶#7 在 SSCF 菌体生长最好，主要由于其酶活略低，预糖化 12 h 后葡萄糖浓度较低，较低的葡萄糖浓度对菌体的生长抑制也较小，从而使得菌体的生长更有利。所以不同的纤维素酶由于其成分的不同、以及纤维素酶水解能力的不同会导致菌体的生长受到较大影响，菌体活力会影响到木糖利用率以及乙醇得率。从最终的甘油产量也可以看出，SD 纤维素酶会使细胞产生更多的甘油，从而进一步降低乙醇得率，SD 纤维素酶在

30%固含量条件下能够产生 20 g/L 的甘油，而其他三种纤维素酶只有 12 g/L 的甘油产量；过高的甘油产量说明发酵的液体环境对菌体的生长产生迫害，葡萄糖用来产生更多的甘油来维持渗透压平衡从而降低乙醇得率。

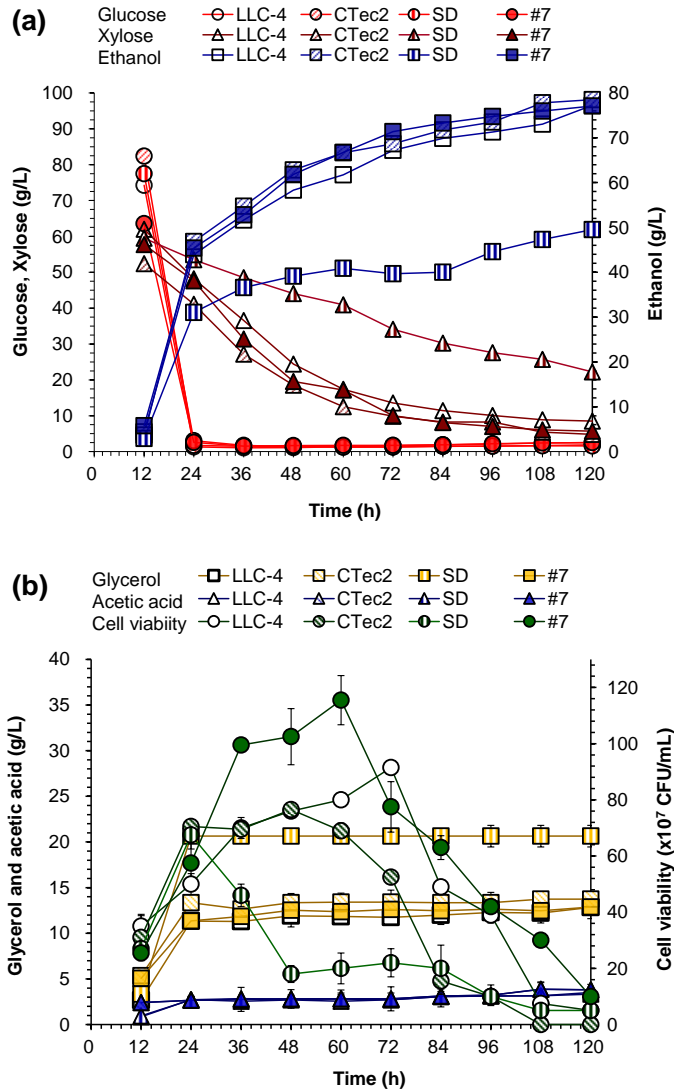


图 4.1 *S.cerevisiae* XH7 以玉米秸秆为原料利用不同种类纤维素酶进行 SSCF 的发酵性能

Fig.4.1 Ethanol fermentability evaluation of dry dilute sulfuric acid pretreated corn stover with four different cellulase.

(a)、SSCF 过程中葡萄糖、木糖、乙醇的变化；(b) SSCF 过程中甘油、乙酸、CFU 的变化
 发酵条件：30%固含量，纤维素酶用量：10 mg total protein/g cellulose (Novozymes Cellic CTec 2.0、LLC 4、#7、SD)；10% (v/v) *S. cerevisiae* XH7 种子液接种量；预糖化 12h 条件：50℃、pH 4.8、200 rpm；SSCF 条件：30℃、pH 5.5、200 rpm、SSCF108 h。

四种纤维素酶 LLC 4、CTec 2.0、#7、SD 最终的乙醇浓度分别为 77.3、78.5、77.1、49.5 g/L；乙醇得率分别为 78.3%、77.7%、77.6%、48.3%。比较而言在 10 mg total protein/g cellulose 的添加量下 LLC 4、CTec 2.0、#7 具有相似的乙醇浓度和得率；从菌

体生长的趋势看, #7 更利于菌体的生长, 主要是由于固体酶制剂中包含的对于发酵抑制作用的物质较少; 此外从 SSCF 过程中甘油的产量可以看出高葡萄糖浓度对于菌体的生长产生较强的胁迫作用, 迫使菌体产生更多的甘油以实验较好的生长。从纤维素酶的用量来看 LLC 4、CTec 2.0 能够在较小的用量下达到较高的乙醇指标, 而#7 这种固体酶由于酶活低所需的酶用量较大。而 SD 纤维素酶酶活更低属于粗酶液需要添加大量的液体才能达到相同的蛋白添加量, 这需要后期对酶液进行浓缩; 此外由于纤维素酶液体中的一些特殊组分而导致菌体的生长会受到严重抑制从而影响了 SSCF 的表现, 降低了木糖利用率、最终的乙醇浓度和得率。

纤维素酶制剂中可能会含有一些可溶性碳水化合物^[89], 经过测定发现三种工业纤维素酶 CTec 2.0, LLC 4 和#7 分别含有 277.1 mg/mL, 13.4 mg/mL, 12.9 mg/g 的葡萄糖和 36.2 mg/mL, 4.4 mg/mL, 0.9 mg/g 的木糖。在 SSCF 的过程中, 酶溶液中的碳水化合物增加了乙醇发酵的底物浓度。例如在 30% 固体负载量下, 纤维素酶用量为 10 mg total protein/g cellulose, 三种酶 CTec 2.0, LLC 4 和#7 分别可以提高 4.9 g/L, 0.3 g/L, 0.4 g/L 的碳水化合物浓度, 主要包括葡萄糖和木糖; 同时理论上可以产生 2.5 g/L, 0.2 g/L, 0.2 g/L 的乙醇, 从酶中可溶性的糖浓度比较可以发现 CTec 2.0 可以为乙醇发酵提供更多的底物, 但是相对于高浓度的纤维素乙醇发酵结果来看, 酶制剂中存在的可溶性糖发酵得到的乙醇只是很小的一部分, 此外也很难准确计算出其在实际发酵体系的产生乙醇的量, 所以在本篇文章中并没有考虑纤维素酶中的可溶性糖对发酵的影响。

4.3.2 蔚蓝 LLC 4 不同酶用量 SSCF

选取四种酶用量: 5、10、15、25 mg total protein/g cellulose, 利用快速脱毒 2 day 的玉米秸秆为底物在 30% 固含量的条件下进行 SSCF。如图 4.2 所示, 酶的添加量对预处理后物料的糖化效率和 SSCF 会产生较明显的影响, 30% 固含量预糖化 12 h 后的葡萄糖的浓度分别为 63.3 g/L、74.3 g/L、83.3 g/L、91.3 g/L, 从这可以看出 LLC 4 添加量的增加对于纤维素的水解具有较明显的促进作用。

从乙醇的生产速率来看, 提高酶用量会提高乙醇的浓度和生产速率, 5、10、15、25 mg total protein/g cellulose 酶用量下, 接入发酵菌液 12 h 后乙醇浓度分别为 33.4 g/L、43.9 g/L、50.5 g/L、48.8 g/L, 这是由于酶用量的提高增加了纤维素水解成可利用葡萄糖的速率; 从而提高了乙醇的生产速率。

SSCF120 h 后 25、15、10、5 mg total protein/g cellulose 酶用量条件下乙醇浓度分别为: 80.4 g/L、80.2 g/L、77.3 g/L、69.1 g/L, 得率分别为 81.5%、85.2%、78.3%、69.6%; 10、15、25 mg total protein/g cellulose 酶用量下的 SSCF 最终的乙醇浓度和得率相差不大, 主要原因是随着酶用量的提高纤维素的水解速率也随之提高, 从而导致葡萄糖浓度的增加抑制菌体的生长, 从 SSCF 过程中菌体的细胞量(菌落单位数(CFU))可以看出

在 25 mg total protein/g cellulose 的酶添加量下，菌体生长明显受到了抑制，几乎没有明显的生长趋势，此外甘油的产量也明显提高达到了 15 g/L。

总的来说，蔚蓝 LLC 4 这种纤维素酶能够作为纤维素乙醇工业化生产的商品酶供应商；在较低酶用量下：10 mg total protein/g cellulose 酶添加量下，乙醇浓度也能够达到 77.3 g/L，合适的酶用量下得到较高的乙醇浓度提高工业化纤维素乙醇的生产效益。

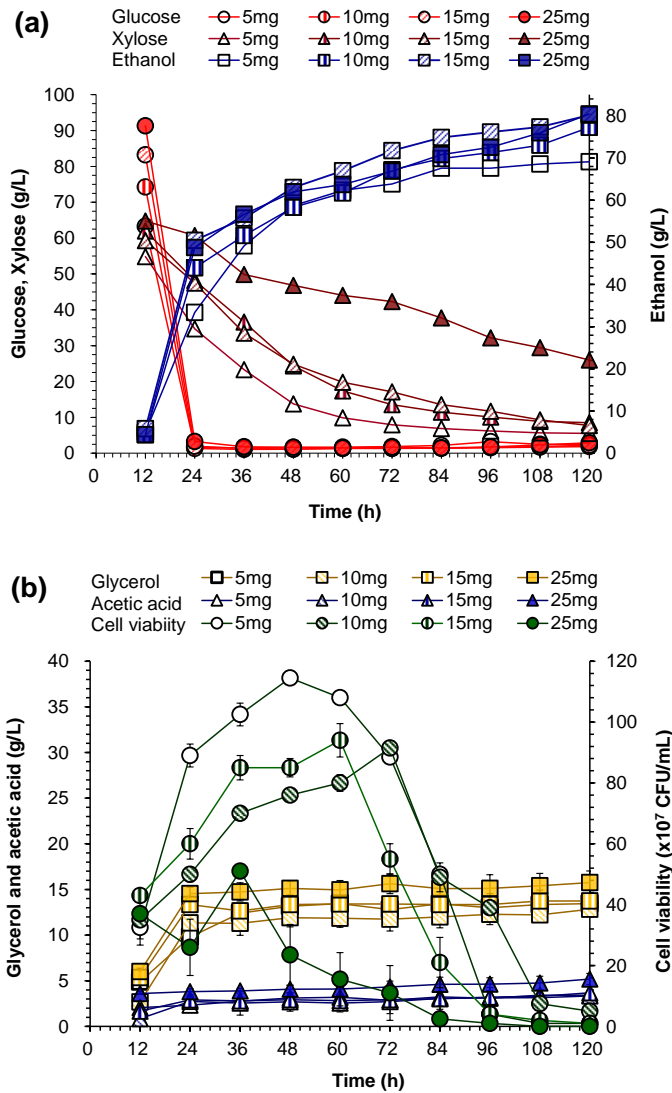


图 4.2 *S.cerevisiae* XH7 以玉米秸秆为原料利用蔚蓝 LLC 4 进行不同酶用量下的 SSCF

Fig. 4.2 Ethanol fermentability evaluation of dry dilute sulfuric acid pretreated corn stover with different enzyme loading.

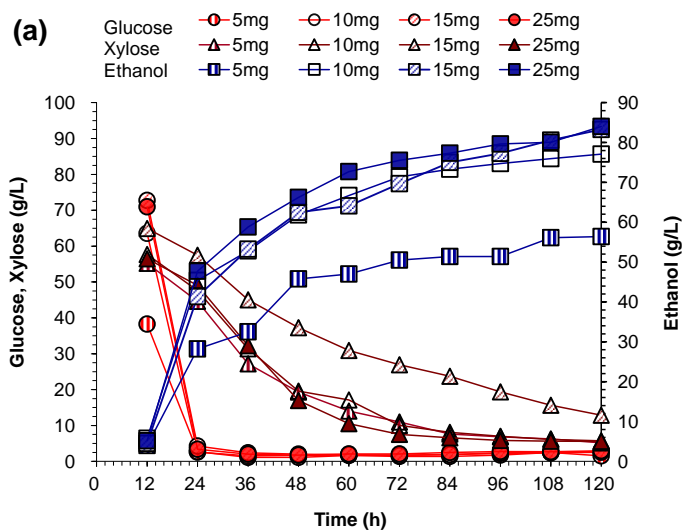
(a)、SSCF 过程中葡萄糖、木糖、乙醇的变化；(b) SSCF 过程中甘油、乙酸、CFU 的变化
 发酵条件：30%固含量，纤维素酶用量：5、10、15、25 mg total protein/g cellulose (LLC 4)；10%
 (v/v) *S. cerevisiae* XH7 种子液接种量；预糖化 12 h 条件：50℃、pH 4.8、200 rpm；SSCF 条件：
 30℃、pH 5.5、200 rpm、SSCF108 h。

4.3.3 # 7 不同酶用量 SSCF

同样选取四种酶用量：5、10、15、25 mg total protein/g cellulose，利用快速脱毒 2 day 的玉米秸秆为底物在 30% 固含量的条件下进行 SSCF。如图 4.3 所示，酶的添加量对预处理后物料的糖化效率和 SSCF 会产生较明显的影响，30% 固含量预糖化 12 h 后的葡萄糖的浓度分别为 38.3 g/L、63.6 g/L、72.8 g/L、71.0 g/L，从这可以看出#7 添加量的增加对于纤维素的水解具有较明显的促进作用，但当纤维素酶用量大于 15 mg total protein/g cellulose 时酶促进纤维素的水解作用降低，主要是由于水解产生的葡萄糖浓度较高对纤维素的水解能力产生了抑制作用。

从乙醇的生产速率来看，提高酶用量会提高乙醇的浓度和生产速率，这是由于随着酶用量的提高纤维素水解成可利用葡萄糖的得率的增加。SSCF120 h 后 5、10、15、25 mg total protein/g cellulose 酶用量条件下乙醇浓度分别为：56.4 g/L、77.1 g/L、83.3 g/L、84.0 g/L，得率分别为 50.1%、77.6%、84.8%、84.0%；15、25 mg total protein/g cellulose 的 SSCF 乙醇浓度相差不大；主要原因是酶用量达到一定程度后再增加酶的添加量对于纤维素的水解能力促进作用较小，酶的水解能力达到一定程度的饱和，所以发酵结果相似。但在酶用量较低的情况下，酶的添加量会很大程度的影响纤维素的水解得率，从而影响最终的乙醇浓度和得率。从菌体的生长来看#7 这种纤维素酶对菌体的生长影响较小，所有酶加量的条件下测得的 CFU 值基本相似，由于#7 这种纤维素酶活略低，酶的添加量较多，在较高酶添加量的条件下菌体也能够进行较好的生长和产醇，说明该纤维素酶对于菌体的生长不会产生影响。

总的来说，#7 这种纤维素酶能够作为纤维素乙醇工业化生产的商品酶供应商；在较低酶用量下：10 mg total protein/g cellulose 酶添加量下，乙醇浓度也能够达到 77.1 g/L，此外在高酶用量的条件下，该固体酶还具有菌体生长抑制小的优点，可以作为一些生长敏感的发醇菌株进行 SSCF 的纤维素酶的选择。



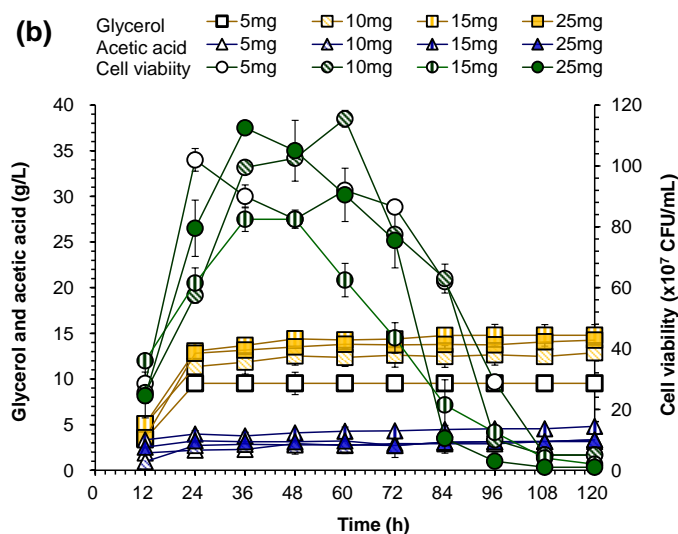


图 4.3 *S.cerevisiae* XH7 以玉米秸秆为原料利用# 7 进行不同酶用量下的 SSCF

Fig. 4.3 Ethanol fermentability evaluation of dry dilute sulfuric acid pretreated corn stover with different enzyme loading.

(a)、SSCF 过程中葡萄糖、木糖、乙醇的变化；(b) SSCF 过程中甘油、乙酸、CFU 的变化
 发酵条件：30%固含量，纤维素酶用量：5、10、15、25 mg total protein/g cellulose (# 7)；10% (v/v) *S. cerevisiae* XH7 种子液接种量；预糖化 12 h 条件：50℃、pH 4.8、200 rpm；SSCF 条件：30℃、pH 5.5、200 rpm、SSCF108 h。

4.3.4 三种纤维素酶 (CTec 2.0、LLC 4、# 7) 不同酶用量 SSCF 比较

本章节主要选取了四种纤维素酶分别是诺维信 CTec 2.0、青岛蔚蓝生物集团 LLC 4、# 7、山东大学合作实验室生产的液体粗酶液；对于这四种酶进行了 SSCF 实验，由于 SD 为粗酶液其纤维素酶活较低，即使在进行 30%固含量的条件下，所添加的自由水全部为粗酶液其纤维素酶的添加量只能维持在 10 mg total protein/g cellulose 左右，所以无法进行不同酶用量的比较实验；所以选取其他三种纤维素酶进行了 5、10、15、25 mg total protein/g cellulose 不同酶用量的比较实验。

比较三种纤维素酶在不同酶用量条件下预糖化 12 h 后葡萄糖浓度，发现在不同酶用量的条件下，三种纤维素酶都呈现相同的规律；如图 4.4 (a) 所示首先无论在哪种酶用量条件下，三种酶的水解能力从强到弱依次是 CTec 2.0、LLC 4、# 7，其次是随着酶用量的提高预糖化 12 h 后纤维素水解产生的葡萄糖的量也随之增加，不同的是随着酶用量的增加，不同纤维素酶纤维素水解能力增加的比例不同，# 7 酶用量从 5 mg total protein/g cellulose 增加到 10 mg total protein/g cellulose 时葡萄糖浓度增加了 66%，而 CTec 2.0 和 LLC 4 分别增加了 21%、17%；酶用量由 10 mg total protein/g cellulose 增加到 15 mg total protein/g cellulose 时# 7 葡萄糖浓度增加了 14%，而 CTec 2.0 和 LLC 4 分别增加了 11%、12%；酶用量由 15 mg total protein/g cellulose 增加到 25 mg total protein/g cellulose 时# 7 葡萄糖浓度不增加，而 CTec 2.0 和 LLC 4 分别增加了 7%、10%；从这可以看出在

较低酶用量的条件下增加纤维素酶的添加量能够明显促进纤维素的水解效率，表现尤为强烈的是# 7，而随着酶用量的增加其对于纤维素的水解促进作用变弱，主要是由于水解产物葡萄糖对纤维素酶的水解抑制作用。

分析木糖的利用率，如图 4.4 (b) 三种纤维素酶有着一定的差异性，CTec 2.0 以及 LLC 4 有着相同的规律，随着酶用量的增加，木糖利用率会降低，尤其在最高酶用量条件下 CTec 2.0 和 LLC 4 的木糖利用率分别为 67.6%、59.8%；这主要是由于菌体生长受到了影响，从而影响木糖的代谢，而影响菌体生长的因素主要有：酶用量过高导致初始葡萄糖浓度过高对菌体产生抑制；然而固体酶# 7 在四种酶用量条件下都能够达到较完全的木糖利用率维持在 90%左右，主要原因是较低的初始葡萄糖浓度对菌体的生长抑制较小。

从最终的乙醇浓度和得率分析，如图 (c)、(d) 所示在 10、15、25 mg total protein/g cellulose 的酶用量下三种纤维素酶的乙醇浓度和得率相差不大，结果最高的是# 7 在 25 mg total protein/g cellulose 酶用量下乙醇浓度为 84 g/L 得率为 84.0%；而在较低酶用量 5 mg total protein/g cellulose 条件下三种纤维素酶 SSCF 后最终的乙醇浓度和得率差异较大，# 7 分别为 56.4 g/L、50%，CTec 2.0 分别为 71.9 g/L、70.4%，LLC 4 分别为 69.1 g/L、69.6%，从这可以看出两种液体酶即使在较低酶用量的情况下也能够达到很好的乙醇发酵结果，# 7 是一种固体酶，其主要的酶载体麦麸中也含有一部分的植物蛋白，所以若是以测定的蛋白含量为发酵时酶用量的添加指标，则在相同的添加量下，# 7 实际的酶蛋白含量要小于其他两种液体酶制剂，所以在低酶用量的条件下，# 7 水解能力的差别则更加明显，导致纤维素的水解得率低，从而使得乙醇的浓度和得率低。如图.f 所示等量蛋白含量的添加条件下三种纤维素酶所对应的滤纸酶活差别较大，也证实了# 7 测定的固体酶中的蛋白含量并非都是纤维素酶蛋白这一结论。

三种酶都能够达到较好的 SSCF 结果，以 10 mg total protein/g cellulose 的发酵结果计算，每生产 1 公斤的纤维素乙醇需要 21.6 g 的 CTec 2.0 中的酶蛋白，折合实际加入酶的质量则需要消耗 247 g 的酶液，同样的需要 20.9 g 的 LLC 4 中的酶蛋白，折合实际加入酶的质量为 275 g，需要 21.3 g 的# 7 中的酶蛋白，折合所需的实际固体酶的质量为 457 g。假设每公斤液体或固体的纤维素酶的销售价格是相同的，则对比发现 CTec 2.0 更具有优势因为等质量的纤维素酶条件下，CTec 2.0 能够生产更多的乙醇；然而纤维素酶的价格若按实际所含的纤维素酶蛋白量进行销售，则三种纤维素酶的价格成相似的水平且依据更为合理。

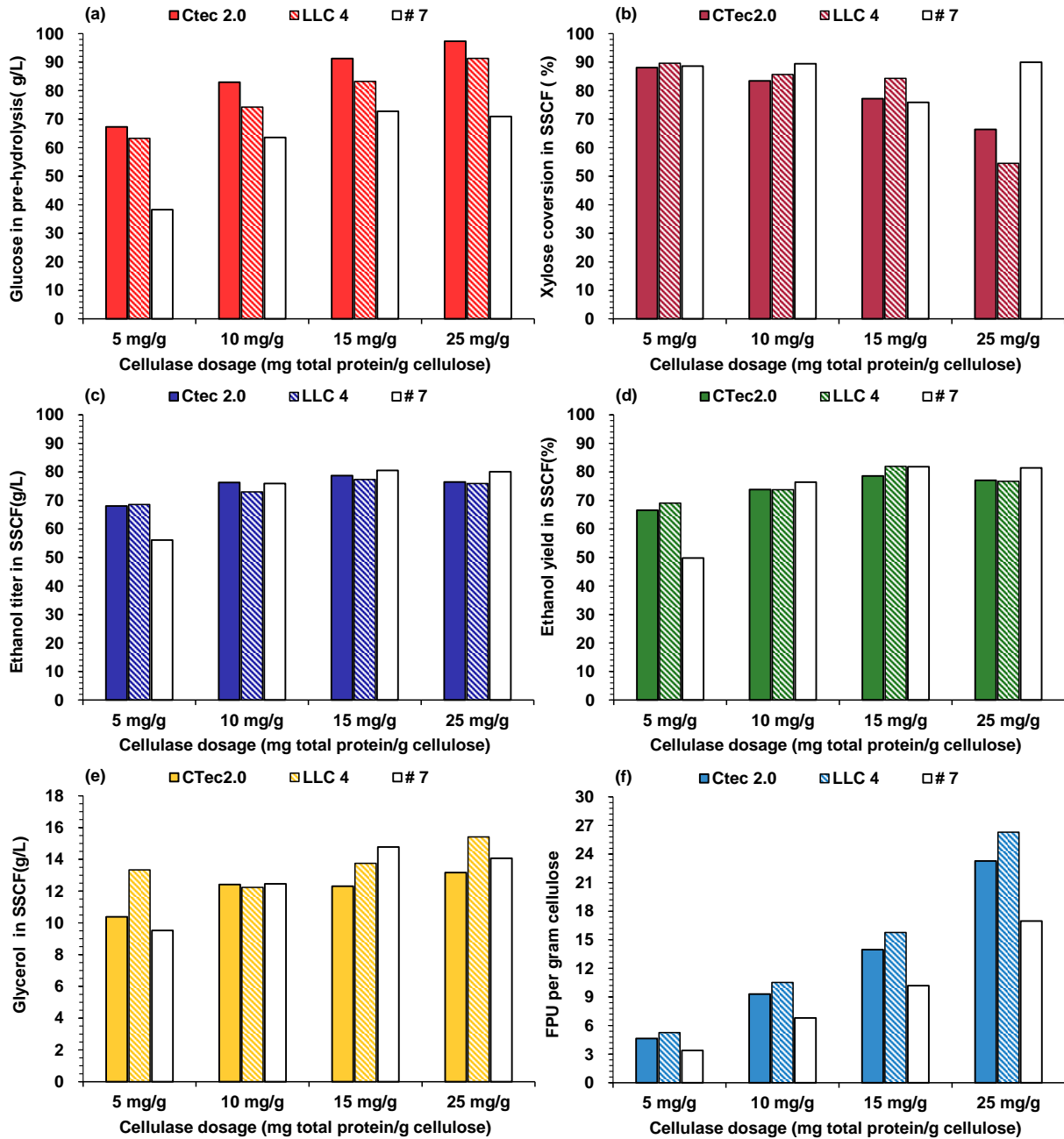


图 4.4 三种纤维素酶在不同酶用量下 SSCF 结果比较

Fig.4.4 Ethanol fermentability evaluation of dry dilute sulfuric acid pretreated corn stover with three different cellulase.

(a) 预糖化 12 h 葡萄糖浓度; (b) 最终木糖利用率; (c) 最终乙醇浓度; (d) 最终乙醇得率; (e) 最终甘油含量; (f) 三种不同纤维素酶不同酶用量所对应的滤纸酶活

发酵条件: 30%固含量, 纤维素酶用量: 5、10、15、25 mg total protein/g cellulose (Novozymes Cellic CTec 2.0、LLC 4、#7、SD); 10% (v/v) *S. cerevisiae* XH7 种子液接种量; 预糖化 12 h 条件: 50°C、pH 4.8、200 rpm; SSCF 条件: 30°C、pH 5.5、200 rpm、SSCF108 h。

4.4 结论

不同来源的酶会对 SSCF 产生不同的影响，经过对这四种酶的 SSCF 结果进行比较得出一些结论：1、CTec 2.0 具有较强的纤维素水解能力，特别是在较低酶用量的条件下优势更明显，其次是 LLC 4 然后是 SD 最后是# 7；2、# 7 对菌体的生长影响较小，不同酶用量下菌体生长差别不大，从而有利于乙醇的生产；其次是 CTec 2.0、LLC 4 添加量较大时会抑制菌体的生长，主要原因是葡萄糖浓度提高增加到一定程度会影响菌体的生长，菌体生长最差的是 SD 酶液几乎没有进行有效的对数期生长；3、由于蛋白含量的不同，导致在相同蛋白添加量的条件下不同纤维素酶的加量也不同，CTec 2.0 能够在较低酶加量下达到较好发酵结果；4、虽然不同的纤维素酶在纤维素水解方面表现的差异比较明显，但在相同酶蛋白添加条件下得到的最终的乙醇浓度和得率均相差不大。总的来说，市场上出现的这三种具有代表性的纤维素酶都能够积极的应用于纤维素乙醇商业化进程的步伐中。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

之前的研究中对于玉米秸秆干法生物炼制生产纤维素乙醇的研究已经实现了较完整的技术路径,无论是干式稀酸预处理技术,还是生物脱毒技术,以及高固含量的 SSF 技术都能够适应于商业化纤维素生产纤维素乙醇的要求。生产过程的低水用量、低能耗、高效率、低废水的特点完全体现了可持续发展的理念。但还是有许多方面是需要进一步完善与提高的,例如干法生物炼制技术对于不同的木质纤维素原料的适应性问题,以及如何进一步提高纤维素乙醇最终发酵浓度和得率,此外探究了不同来源的纤维素酶进行纤维素乙醇发酵的差异。以下本研究中的主要结论和创新点:

- 1) 选取了五种不同来源的木质纤维素原料,有农业废弃物:玉米秸秆、小麦秸秆、水稻秸秆,以及制糖工业废弃物:甘蔗渣,林业废弃物木屑进行干法生物炼制生产纤维素乙醇的尝试。通过对不同来源的木质纤维素的前处理的调整、干式稀酸预处理步骤的优化、预处理后物料脱毒速率的评测、以及最终物料 SSF 的表现等方面综合权衡得出了五种木质纤维素原料的最优的干法生物炼制条件。以 *S. cerevisiae* DQ1 为发酵菌株,在 30% 固含量, 15 FPU/g DM 的酶用量下五种原料玉米秸秆、水稻秸秆、小麦秸秆、甘蔗渣、木屑的乙醇产量为 56.77 g/L、58.48 g/L、65.43 g/L、64.48 g/L、54.67 g/L。通过实验可以发现不同木质纤维素原料通过一些简单的调整与优化都能够作为干法生物炼制生产纤维素乙醇的较适宜的原料,这为之后的商业化生产纤维素乙醇提供更广泛的原料来源以及地域范围。
- 2) 为了提高纤维素乙醇相对于玉米乙醇的市场竞争力,必须在合适的干法生物炼制技术的支持下进一步提高最终乙醇的发酵浓度。干式稀酸预处理能够将半纤维素中的木聚糖大部分的降解成为木糖,它可以全部存在于预处理后蓬松的物料中,此外脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 利用木糖的滞后性使得即使经过生物脱毒的物料也能够保留大部分木糖;利用经过工程改造的 *S. cerevisiae* XH7 菌株能够时实现葡萄糖和木糖的同步糖化与共发酵 (SSCF),本研究通过对物料脱毒时间、发酵种子活力的提高、物料预糖化时间的调整、以及测试不同固含量和酶用量下的 SSCF,最终得到了极高的纤维素乙醇浓度:在 35% 的超高固含量条件下玉米秸秆和麦秆能够获得 91.36 g/L (11.5% v/v)、101.12 g/L (12.8%) 的世界纪录纤维素乙醇浓度。与玉米乙醇生产相似的乙醇浓度以及低废水、低能耗、低成本的实现使得干法生物炼制生产纤维素乙醇更具有市场竞争力以及商业化的巨大潜力。
- 3) 为了进一步为干法生物炼制生产纤维素乙醇技术商业化提供更有用的技术支撑,本研究选择不同来源的商品纤维素酶: Cellic CTec 2.0, Vland LLC 4, # 7 进行 SSCF

的比较。通过比较发现市场销售的这些主流纤维素酶都能够作为干法生物炼制生产纤维素乙醇的商品酶的主要提供商，三种纤维素酶虽然具有不同的纤维素水解能力，但是从最终的乙醇发酵结果来看都能够达到相似的乙醇浓度；此外通过不同酶用量下三种纤维素酶的乙醇发酵结果可以得出在较低的酶用量添加条件下乙醇浓度也能够达到较高的水平，在 30% 固含量的 SSCF 条件下，三种纤维素酶的最适酶用量都为 10 mg protein /g cellulose。

5.2 展望

本研究围绕干法生物炼制生产纤维素乙醇做了一系列的研究，扩大了原料的选取种类、提高了纤维素乙醇的生产浓度、为纤维素乙醇的商业化进程提供了强有力的技术支撑。在研究的过程中，仍然有许多方面存在着进一步改进和深入研究的必要，在此进行后续的展望：

- 1) 预处理原料无需除尘步骤的干法生物炼制技术评价。本研究所使用的预处理原料如玉米秸秆需要经过一定的除尘步骤（水洗）然后应用于后续的干式稀酸预处理中，除尘步骤无论是机械除尘或者是水洗除尘都会增加纤维素乙醇的生产成本。是否可以考虑将从田地收集的木质纤维素原料直接进行预处理而摒弃除尘步骤，通过一些简单的工业优化实现同样的预处理效果，进一步促进干法生物炼制技术的工业化。
- 2) 乙醇发酵菌株各项能力的提高。预处理后的物料中除了含有丰富的葡萄糖和木糖之外，还含有许多可利用的可溶性糖类物质，如阿拉伯糖、半乳糖、果糖等，增加乙醇发酵菌株利用各种糖类的能力，能够进一步提高木质纤维素的利用率以及最终乙醇的浓度和得率；此外通过驯化以及各种分子改造技术进一步提高菌株耐受高温以及抑制物的能力，发酵温度的提高会显著的提高同步糖化与共发酵的速率；而菌株对抑制物的耐受能力增强又可以提高发酵水平。
- 3) 进一步拓宽木质纤维素原料的选择范围，本研究选取了农业废弃物以及其他软木类的木质纤维素原料进行干法生物炼制生产纤维素乙醇，其他质地较为坚硬的木质纤维素原料是否也可以进行不同干式稀酸预处理强度的尝试，从而进一步提高对环境中废弃木质纤维素原料的广泛利用。

参考文献

- [1] Zhang T, Zhu M J. Enhanced bioethanol production by fed-batch simultaneous saccharification and co-fermentation at high solid loading of Fenton reaction and sodium hydroxide sequentially pretreated sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 2017, 229: 204-210.
- [2] Ribeiro B E, Quintanilla M A. Transitions in biofuel technologies: An appraisal of the social impacts of cellulosic ethanol using the Delphi method, *Technological Forecasting & Social Change*. 2015, 92: 53-68.
- [3] 栗鸿源. 《生物质能发展“十三五”规划》公布. *中国矿业报*, 2016-12-06(002).
- [4] Knauf M, Moniruzzaman M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. *International Sugar Journal*, 2004, 106(1263): 147-150.
- [5] 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.
- [6] Arantes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3(1): 4.
- [7] Hallac BB, Ragauskas AJ. Analyzing cellulose degree of polymerization and its relevancy to cellulosic ethanol. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2011, 5(2): 215-225.
- [8] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2012, 38(4): 522-550.
- [9] 中华人民共和国国家统计局. *中国统计年鉴*. 中国统计出版社, 2014, 33.
- [10] Ji L Q. An assessment of agricultural residue resources for liquid biofuel production in China. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2015, 44: 561-575.
- [11] Banerjee S, Mudliar S, Sen R, et al. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 2010, 4(1): 77-93.
- [12] Himmel M E, Baker J O, Overend R P. Enzymatic conversion of biomass for fuels production. *Fuel Science and Technology International*, 1996, 14(1): 339-339.
- [13] Wyman C E, Dale B E, Elander R T, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 1999, 96(18): 1959-1966.
- [14] 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.

- [15] Romero I, Delgado Y, Cara C, et al. Ethanol production from rape straw by a two-stage pretreatment under mild conditions. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2015, 38(8): 1469-1478.
- [16] Devendra L P, Pandey A. Hydrotropic pretreatment on rice straw for bioethanol production. *Renewable Energy*, 2016, 98: 2-8.
- [17] Cao S, Pu Y, Studer M, et al. Chemical transformations of *Populus trichocarpa* during dilute acid pretreatment. *Royal Society of Chemistry Advances*, 2012, 2(29): 10925-10936.
- [18] Chen F, Dixon R A. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuel production. *Nature Biotechnology*, 2007, 25(7): 759-761.
- [19] 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): 471-82.
- [20] Kurakake M, Ide N, Komaki T. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. *Current Microbiology*, 2007, 54(6): 424.
- [21] Salvachúa D, Prieto A, López-Abelairas M, et al. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technology*, 2011, 102(16): 7500-6.
- [22] Eggeman T, Elander R T. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology*, 2005, 96(18): 2019-25.
- [23] Varga E, Réczey K, Zacchi G. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, 114(1): 509-523.
- [24] Ruiz E, Cara C, Ballesteros M, et al. Ethanol production from pretreated olive tree wood and sunflower stalks by an SSF process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 132(1): 631-643.
- [25] Kurabi A, Berlin A, Gilkes N, et al. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas-Fir by novel and commercial fungal cellulases. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 124(1): 219-230.
- [26] Hendriks A T W M, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 2009, 100(1): 10-8.
- [27] Yi Z, Pan Z L, Zhang R H. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2008, 2(3): 51-68.
- [28] Galbe M, Zacchi G. Pretreatment of Lignocellulosic Materials for Efficient Bioethanol Production. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 2007, 108(108): 41-65.

- [29]Zhu S, Wu Y, Yu Z, et al. Comparison of Three Microwave/Chemical Pretreatment Processes for Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw. *Biosystems Engineering*, 2006, 93(3): 279-283.
- [30]Kim Y, Mosier N S, Ladisch M R. Enzymatic digestion of liquid hot water pretreated hybrid poplar. *Biotechnology Progress*, 2009, 25(2): 340-348.
- [31]Lloyd T A, Wyman C E. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*, 2006, 96(18): 1967-1977.
- [32]Alvira P, Tomáspejón E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4851-61.
- [33]Modenbach A A, Nokes S E. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment - a review. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(6): 1430.
- [34]Jian Z, Wang X S, Chu D Q, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4480-8.
- [35]Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 2000, 74(1): 25-33.
- [36]Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011, 31(1): 20.
- [37]Larsson S, Reimann A, Nilvebrant N O, et al. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, 77(1): 91-103.
- [38]Li H, Chen H. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process Biochemistry*, 2008, 43(12): 1447-1451.
- [39]Martinez A, Rodriguez M E, York S W, et al. Effects of Ca(OH)₂ treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering*, 2000, 69(5): 526-536.
- [40]Chandel A K, Silva S S D, Singh O V. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology. *Bioenergy Research*, 2013, 6(1): 388-401.
- [41]Eva Palmqvist, Båbel Hahn-Hägerdal, Zsolt Szengyel, Guido Zacchi, Kati Raczey. Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates

- obtained after steam pretreatment. *Enzyme and Microbial Technology*, 1997, 20:286-293.
- [42] Jian Z, 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.
- [43] He Y Q, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 1-13.
- [44] Chen X W, Kuhn E, Jennings E W, Nelson R, Tao L, & Zhang M. DMR (deacetylation and mechanical refining) processing of corn stover achieves high monomeric sugar concentrations (230 g/L) during enzymatic hydrolysis and high ethanol concentrations (>10% v/v) during fermentation without hydrolysate purification or concentration. *Energy and Environmental Science*, 2016, 9: 1237-1245.
- [45] 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.
- [46] Chen X, Shekiri J, Pschorn T, et al. A highly efficient dilute alkali deacetylation and mechanical (disc) refining process for the conversion of renewable biomass to lower cost sugars. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 1-12.
- [47] Thorsten S, Eckhard B. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 14.
- [48] Nielsen F, Zacchi G, Galbe M, et al. Prefermentation improves ethanol yield in separate hydrolysis and cofermentation of steam-pretreated wheat straw. *Sustainable Chemical Processes*, 2016, 4(1): 1-12.
- [49] Wang R F, Unrean P, Franzén C J. Model-based optimization and scale-up of multi-feed simultaneous saccharification and co-fermentation of steam pre-treated lignocellulose enables high gravity ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*, 2016, 9(1): 1-13.
- [50] Balan V, Chiamonti D, Kumar S. Review of US and EU initiatives towards development, demonstration and commercialization of lignocellulosic biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2013, 7(6): 732-759.
- [51] Chovau S, Degrauwe D, Bruggen B V D. Critical analysis of techno-economic estimates for the production cost of lignocellulosic bio-ethanol. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013, 26(10): 307-321.
- [52] Littlewood J, Guo M, Boerjan W, Murphy J. Bioethanol from poplar: a commercially viable

- alternative to fossil fuel in the European Union. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7:113.
- [53]Koppram R, Tom áspej ó E, Xiros C, et al. Lignocellulosic ethanol production at high-gravity: challenges and perspectives. *Trends in Biotechnology*, 2014, 32(1): 46.
- [54]Basso LC, Rosa CA. Sugar cane for potable and fuel ethanol, *Worldwide Distilled Spirits Conference – New Horizons: energy, environment and enlightenment*. Nottingham University Press, 2010.
- [55]Mcaloon A, Taylor F, Yee W, et al. Determining the Cost of Producing Ethanol from Corn Starch and Lignocellulosic Feedstocks. *Energy Conservation Consumption and Utilization*, 2000.
- [56]Ahmetović E, Martín M, Grossmann I E. Optimization of Energy and Water Consumption in Corn-Based Ethanol Plants. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 2010, 49(17): 7972-7982.
- [57]Mart ín M, Grossmann I E. Energy optimization of bioethanol production via hydrolysis of switchgrass. *Aiche Journal*, 2011, 57(57): 3408-3428.
- [58]Sassner P, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass and Bioenergy*, 2008, 32(5): 422-430.
- [59]Wingreini A, Galbe M, Roslander C, et al. Effect of Reduction in Yeast and Enzyme Concentrations in a Simultaneous-Saccharification-and-Fermentation-Based Bioethanol Process. *Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Humana Press, 2005, 485-499.
- [60]Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. NREL/TP-510-42623. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO, 2008.
- [61]Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D, Crocker D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO, 2002.
- [62]Adney B, Baker J. Measurement of Cellulase Activities. AP-006. NREL. Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO, 1996.
- [63]Ghose T K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59: 257-268.
- [64]Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [65]Zhang J, Shao S, Bao J. Long term storage of dilute acid pretreated corn stover feedstock

- and ethanol fermentability evaluation. *Bioresource Technology*, 2015, 201: 355-359.
- [66] He Y, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation. *Bioresource Technology*, 2014, 158: 360-364.
- [67] Zhang J, Zhu Z, Wang X, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus *Amorphotheca resinae* ZN1 and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3: 26.
- [68] Gu H Q, Zhang J, Bao J. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corncob residue. *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, 112: 1770-1782.
- [69] 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.
- [70] Zhu J Q, Li X, Qin L, Li W C, Li H Z, & Li B Z, et al. In situ detoxification of dry dilute acid pretreated corn stover by co-culture of xylose-utilizing and inhibitor-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* increases ethanol production. *Bioresource Technology*, 2016, 218: 380-387.
- [71] Zhu J Q, Lei Q, Li W C, Jian Z, Jie B, & Huang Y D, et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of dry diluted acid pretreated corn stover at high dry matter loading: overcoming the inhibitors by non-tolerant yeast. *Bioresource Technology*, 2015, 198: 39-46.
- [72] Zhu J Q, Qin L, Li B Z, & Yuan Y J. Simultaneous saccharification and co-fermentation of aqueous ammonia pretreated corn stover with an engineered *Saccharomyces cerevisiae* sybe005. *Bioresource Technology*, 2014, 169(5): 9-18.
- [73] Erdei B, Frankó B, Galbe M, & Zacchi G. Separate hydrolysis and co-fermentation for improved xylose utilization in integrated ethanol production from wheat meal and wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5(1): 12.
- [74] Koppram R, & Olsson L. Combined substrate, enzyme and yeast feed in simultaneous saccharification and fermentation allow bioethanol production from pretreated spruce biomass at high solids loadings. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7(1): 54.
- [75] Tom ás-Pejó E, Ballesteros M, Oliva J M, & Olsson L. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae*, f12 for improving ethanol production in different fed-batch ssf processes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2010, 37(11): 1211.

- [76]Li H, Wu M, Xu L, Jin H, Guo T, Bao X. Evaluation of industrial *saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. *Microbial Biotechnology*, 2015, 82: 66.
- [77]Li H, Shen Y, Wu M, Hou J, Jiao C, Li Z, Liu X, Bao X. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae*, strain for second-generation bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*, 2016, 3(1):51.
- [78]Chiaromonti D, Balan V, Kumar S. Review of US and EU initiatives toward development, demonstration, and commercialization of lignocellulosic biofuels. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2013, 7: 732-759.
- [79]Ramesh D. World's first commercial-scale cellulosic biofuels plant opens. *Chemical Week*, 2013, 175: 39.
- [80]Lei C, Zhang J, Xiao L, Bao J. An alternative feedstock of corn meal for industrial fuel ethanol production: delignified corncob residue. *Bioresource Technology*, 2014, 167: 555-559.
- [81]Sanchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*, 2009, 27: 185-194.
- [82]Klein-Marcuschamer D, Oleskiewicz-Popiel P, Simmons BA, Blanch HW. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109: 1083-1087.
- [83]Gang L, Jian Z, Jie B. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous aspen plus modeling. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 39: 133-140.
- [84]Marcos M, González-Benito G, Coca M, Bolado S, Lucas S. Optimization of the enzymatic hydrolysis conditions of steam-exploded wheat straw for maximum glucose and xylose recovery. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2013, 88: 237-246.
- [85]Zhang H, Han X, Wei, C, Bao, J. Oxidative production of xylonic acid using xylose in distillation stillage of cellulosic ethanol fermentation broth by *gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*, 2016, 224: 573-580.
- [86]Liu S, Wang Q. Response surface optimization of enzymatic hydrolysis process of wet oxidation pretreated wood pulp waste. *Cellulose Chemistry and Technology*, 2014, 50: 803-809.
- [87]McMillan et al. Comparative performance of precommercial cellulases hydrolyzing pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4: 29.
- [88]Agrawal R, Satlewal A, Gaur R, et al. Pilot scale pretreatment of wheat straw and

comparative evaluation of commercial enzyme preparations for biomass saccharification and fermentation. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 102: 54-61.

[89]Zhang Y, Schell D, Mcmillan J. Methodological analysis for determination of enzymatic digestibility of cellulosic materials. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 96: 188-194.

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
蛋白胨	生化试剂	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
琼脂	生化试剂	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
硫酸	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
氢氧化钙	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
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
葡萄糖	食品级	秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司
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
纤维二糖	分析纯	上海源聚生物科技有限公司
牛血清蛋白	生化试剂	美国 Biosharp 公司
葡萄糖液体试剂盒	分析试剂	上海科欣生物技术研究

附录 II 主要仪器和设备

名称	型号	生产厂家
核酸蛋白分析仪	DU-800	德国 Backman 公司
立式震荡培养箱	HZ-2111KB	江苏华利达实验设备厂
超声波脱气机	SB-5200D	宁波新芝生物科技
台式小型高速离心机	5415D	德国 Eppendorf 公司
超低温冰箱	Forma-86C	美国 Thermo Scientific 有限公司
超纯水纯化系统	Milli-Q Synthesis	德国默克密理博公司
稀酸预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工设备有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器有限公司
高速冷冻离心机	Avanti J-26	美国 Backman Coulter 有限公司
电子天平	BS223S	瑞士梅特勒利多仪器有限公司
高压蒸汽发生器	DZFZ4.5C	上海蒸源机电有限公司
预处理蒸汽发生器	HX-36D-2.5	上海华征特种锅炉制造有限公司
高效液相色谱	LC-20AD、LC-20AT	日本岛津公司
紫外检测器	SPD-20A	日本岛津公司
示差检测器	RID-10A	日本岛津公司
色谱柱	HPX-87H	Bio-rad Aminex
恒温水浴振荡器	HZ-9212S	江苏华利达实验设备厂
粉碎机	SF-300	上海科太粉碎设备厂
生物反应器	BIOTECH-5L	上海保兴生物设备工程有限公司
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器
pH 电极	G301K	苏州汉星分析传感器有限公司

硕士期间学术成果

发表论文:

Qiang Zhang, Jie Bao*. Industrial cellulase performance in the simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of corn stover for high titer ethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*, 2017,4:17. (对应本论文第三章)

准备发表论文:

Gang Liu, **Qiang Zhang**, Abdul Sattar Qureshi, Jian Zhang, Wanghui Xu, Xiaoming Bao*, Jie Bao*. Maximizing cellulosic ethanol potentials by minimizing energy input and wastewater generation of lignocellulose biorefining. *Energy & Environmental Science*. (对应本论文第二章)

学术会议论文:

张强, 张建, 鲍杰. 2016. 干法生物炼制生产高浓度纤维素乙醇. 第十届全国研究生生物质能研讨会.

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，向那些曾经给予我帮助的老师 and 同学，以及我的家人、朋友送上我真诚的感谢。

首先我要对我的导师鲍杰教授表达我最诚挚的感谢，在我硕士三年期间他的指导和鼓励是我能够顺利进行科研工作和学习的保障。无论是从论文的选题，还是关于实验的设计以及问题的解决，鲍老师都付出了许多时间和精力。鲍老师治学严谨，为人正直而不失友善，他在专业领域杰出的成就以及不断创新进取的科研态度令我钦佩不已，此外勤奋忘我的工作态度以及实事求是的科研作风是我工作和学习的榜样。在此，我向尊敬的鲍老师致以我的感激和敬意。

其次，要感谢的是张建和高秋强两位老师，他们对我实验和生活中的遇到的问题总能给予耐心的指导和关怀，尤其是张建老师对我的实验提出了很多的宝贵意见。另外还要感谢邵帅、侯伟亮和刘刚三位博士在我实验具体进行过程中给予的帮助，他们端正的学习态度、务实的科研作风是我学习的榜样。

此外，要感谢生物炼制课题组中关心我的所有同学，包括博士研究生王霞、张宏森、王娟、何燕青、顾翰琦、易霞、萨塔、高小创、周平平、邱忠洋、韩昫身、温经柏；硕士研究生：胡明珊、魏成香、谌泽宇、周奇圣、姚瑞苗、阚家伦以及其他师弟师妹们。其中特别感谢的是王霞、易霞、张宏森、王娟博士对我在实验室接触实验的具体操作中给予的耐心指导。

最后我要感谢我的父母，是你们辛劳的付出和无微不至的照顾支持着我走到了今天，这些年你们辛苦了，我只有在工作学习中不断的努力才能够回报你们的付出，愿你们身体健康，平安幸福！

张强

2017.4.10