

玉米芯工业残渣生产乙醇过程中纤维素酶的循环和高浓度纤维素乳酸发酵醪的固液分离

摘要

玉米芯工业残渣是在木糖（醇）生产过程中，将玉米芯中的半纤维素提取后剩余的工业残渣，其纤维素含量丰富、半纤维素含量低且不需预处理，是一种生产乙醇或其他高附加值产品的优良木质纤维素原料。然而，在同步糖化与发酵生产乙醇过程中，纤维素酶成本占到了 50% 左右。本研究在利用玉米芯工业残渣生产乙醇的过程中，通过间歇减压蒸馏和补充物料的方式，来实现纤维素酶的循环利用，进而降低乙醇生产过程中纤维素酶的用量。在 30% 固体含量玉米芯工业残渣同步糖化与发酵过程中，通过间歇减压蒸馏和补料的方式将纤维素酶用量从 15 FPU/g DM（dry material, DM）降低到 10 FPU/g DM，乙醇的得率高达 83.69%，比常规的在 10 FPU/g DM 酶量下的同步糖化与发酵过程乙醇得率高出 19.72%，是 15 FPU/g DM 酶量下乙醇得率的 0.934 倍。本研究提供了一种玉米芯工业残渣生产乙醇过程中纤维素酶的循环利用的方式，将利用高固体含量玉米芯工业残渣乙醇生产以及分离、纤维素酶循环利用和酵母细胞的循环利用相结合，为高固体含量下纤维乙醇的连续性或半连续性生产提供了一种切实可行的办法。

此外，本文还研究了高固体含量玉米秸秆乳酸发酵醪的固液分离，开发了一种简单高效的玉米秸秆乳酸发酵醪的固液分离方式，即将玉米秸秆乳酸发酵醪与壳聚糖溶液混合壳聚糖浓度为 0.74 g/L，并在 20–30 °C、pH 5.5 的条件下混合 10 秒，然后真空抽滤 15-25 分钟，即可得到澄清的乳酸发酵液，乳酸的收率为 64.48-68.68%。本方法为纤维素乳酸的大规模工业化生产提供了有效的技术储备。

关键词：玉米芯残渣；减压蒸馏；纤维素酶回收；絮凝；壳聚糖

**Studies on the cellulase recycling during ethanol production using
corn cob residues through vacuum distillation and solids/liquid separation
of lactic acid fermentation slurry using pretreated corn stover at high
solids loading**

Abstract

Corn cob residues were the industrial byproducts during xylose or xylitol production process, in which the most hemicellulose was separated. Due to the high cellulose content, low hemicellulose and no need to conduct pretreatment, corn cob residues were considered a suitable substrate for ethanol or other high-value chemical production. However, the cellulase cost accounts for nearly half of the cellulosic ethanol production cost during simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulose. The objective of this study was to recycle the cellulase and further decrease the cellulase dosage through intermittent vacuum distillation for ethanol separation and fresh substrate feeding during SSF of corn cob residues. The results showed that when the cellulase dosage was decreased from 15 FPU/g DM to 10 FPU/g DM through intermittent vacuum distillation and fresh substrate feeding, the final ethanol yield based on the theoretical ethanol production reached 83.69%, which was 19.72% higher than that conducted in the conventional SSF at 10 FPU/g DM, and could compete for that conducted in the conventional SSF at 15 FPU/g DM (0.934). This study provided a practical method for in-situ ethanol separation, ethanol condensation, cellulase and yeast cells recycling for efficient cellulosic ethanol production using lignocellulosic feedstock.

In addition, this study also investigated and developed a simple and efficient solids/liquid separation method for high concentration cellulosic lactic acid fermentation slurry. The chitosan was added into the lactic acid slurry to reach 0.74 g/L, then adjusted the pH value to 5.5 and mixed evenly for 10 seconds at 20-30 °C. After that the mixture was filtered under vacuum condition for 15-25 minutes and the clear lactic acid liquid without solid residues was obtained, in which the lactic acid recovery could reach 64.48-68.68%. This solids/liquid separation method was a useful technique reservoir for the large scale cellulosic lactic acid industrially production.

Key words: corn cob residues; vacuum distillation; cellulase recycling; flocculation; chitosan

目录

第一章 文献综述.....	1
1.1 木质纤维素生物炼制.....	1
1.1.1 生物质原料.....	1
1.1.2 生物炼制概述.....	2
1.1.3 木质纤维素生物炼制产品.....	4
1.2 纤维素乙醇.....	4
1.2.1 纤维素乙醇概述.....	5
1.2.3 玉米芯工业残渣生产乙醇.....	9
1.3 纤维素酶的循环利用.....	10
1.3.1 纤维素酶概述.....	10
1.3.2 纤维素酶降解纤维素的机理.....	10
1.4 木质纤维素同步糖化与发酵生产乳酸.....	13
1.4.1 乳酸概述.....	13
1.4.2 木质纤维素生产乳酸工艺.....	14
1.4.3 木质纤维素生产乳酸工艺中存在的问题.....	14
1.5 本课题研究的内容与意义.....	14
第二章 玉米芯工业残渣乙醇生产过程中纤维素酶循环利用研究.....	16
2.1 前言.....	16
2.2 材料和方法.....	17
2.2.1 原料.....	17
2.2.2 菌种.....	17
2.2.3 实验试剂和仪器.....	17
2.2.4 培养基和所需溶液.....	19
2.2.5 实验方法.....	20
2.2.6 分析方法.....	23
2.3 结果与讨论.....	25
2.3.1 玉米芯工业残渣中主要组分的测定.....	25
2.3.2 减压蒸馏温度对乙醇收率影响.....	25
2.3.3 减压蒸馏温度和乙醇对纤维素酶相对酶活的影响.....	29
2.3.3 减压蒸馏不同浓度乙醇对乙醇收率的影响.....	30
2.3.5 酵母菌在合成培养基和玉米芯工业残渣水解液中的发酵性能.....	32
2.3.6 玉米芯工业残渣 SSF 过程中进行纤维素酶的循环利用.....	35

删除的内

删除的内

2.4 小结	37
第三章 高浓度纤维素乳酸发酵醪的固液分离	39
3.1 前言	39
3.2 材料和方法	39
3.2.1 原料	39
3.2.2 实验试剂和设备	39
3.2.3 所需溶液	40
3.2.4 实验方法	40
3.2.5 分析方法	41
3.3 结果与讨论	41
3.3.1 玉米秸秆乳酸发酵醪粒径分布	41
3.3.2 不同絮凝剂对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响	42
3.3.3 搅拌时间对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响	45
3.3.4 温度对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响	46
3.3.5 pH 对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响	47
3.3.6 最优条件下的乳酸回收率	48
3.4 小结	48
第四章 结论与展望	49
4.1 结论	49
4.2 展望	49
参考文献	51

第一章 文献综述

随着世界工业化的快速进行,对石油、天然气等化石燃料的需求快速增长^[1]。化石燃料占总的能量消耗的 80%,其中有 50%属于交通运输燃料^[2]。但是化石燃料不可再生,储量有限;而且,化石燃料的使用造成了大量温室气体排放,导致气候变迁、全球变暖、海平面上升以及冰川退化等问题^[3,4,5,6]。此外,石油需求的增长导致原油价格的上涨,从而直接影响全球的经济^[7]。因此,众多不利因素促使人们寻求一种可再生的、可持续的、成本低廉的、高效的且不危害环境的燃料^[8,9]。

生物能源是由生物质加工得到,被视为环境友好型的替代能源。由于生物质生产过程吸收二氧化碳,使用生物质能源则是将二氧化碳释放的过程(虽然这种理念受到争议)。因此,人们普遍认为在生产生物质和使用生物质能源的过程中是一个碳吸收和释放平衡的过程。同时,采用生物质生产出来的各种液体和气体燃料产品将减少人们对石油的依赖,并有可能改变当前世界的政治格局。采用不同的加工方式,可以生产出不同的生物燃料,如乙醇、甲醇和生物柴油等^[10]。生物乙醇可取代汽油用于火花点火发动机,而生物柴油和绿色柴油可适用于压燃式发动机^[11]。因此,生物质能源的出现可视为一种能限制温室气体的排放和寻找新的能源策略的重要方式^[12]。

此外,由于全球经济的快速发展,乙醇、乳酸、多元醇等化学品的需求快速增长,但是石油等化石燃料日益减少,人们开始关注利用生物质经过生物炼制获得乳酸、丁醇等大宗化学品。虽然现在利用生物质进行生物炼制,还有许多关键技术亟待突破。但是,随着各国在生物炼制产业研究投入的不断增加和生物技术、化学工程技术等技术的不断进步,生物炼制生产乙醇、生物柴油等液体燃料和乳酸、多元醇等化学品一定会蓬勃发展,未来会在解决能源问题、环境问题、粮食问题等方面取得瞩目的成就。

1.1 木质纤维素生物炼制

1.1.1 生物质原料

生物质来源于林木、农林废弃物、草、花卉植物、水生植物、农作物等,它们种类众多且可再生(见图 1.1)。通过光合作用,植物将水和二氧化碳转化成初级和次级生化代谢产物,它们都是工业上重要的化学品。初级代谢产物是碳水化合物(单糖、纤维素、半纤维素、淀粉等)和木质素,它们之间形成高度致密的结构称为木质纤维素,大量存在植物中并且可以转化成生物质化学品。次级代谢产物是一些高附加值的化学品,如树胶、树脂、橡胶、蜡类萜烯、类固醇、甘油三酯、单宁、植物酸、生物碱等,它们在植物中占的比重较小^[13],可以作为食品风味剂、饲料添加剂、药物、功能性食品等。

增强生物质的利用需要开展新的生物炼制工艺,使之能与自然达到和谐并且能高效

的生产、转化和利用生物质原料^[14]。因此，很多科学家致力于生物质集成转化技术的研究，如 Huang^[14]等评估了利用木质纤维素生产生物乙醇和其他化学品的相关分离方法和技术。文章中探讨了现在和未来利用玉米生产乙醇的生物炼制技术、木质纤维素生产乙醇的生物炼制技术、整合木质素/林木的生物炼制技术、提取半纤维素和其他附加化学品（从玉米-乙醇工厂得到玉米胚芽、纤维素和面筋）以及乙醇产品的分离和提纯。对于未来的生物炼制，分离技术如萃取精馏、分子筛吸附以及生物基本吸附、纳滤、萃取-发酵、反应器中膜渗透蒸发、真空膜蒸馏等对未来的研究、发展以及运用具有很大潜力。

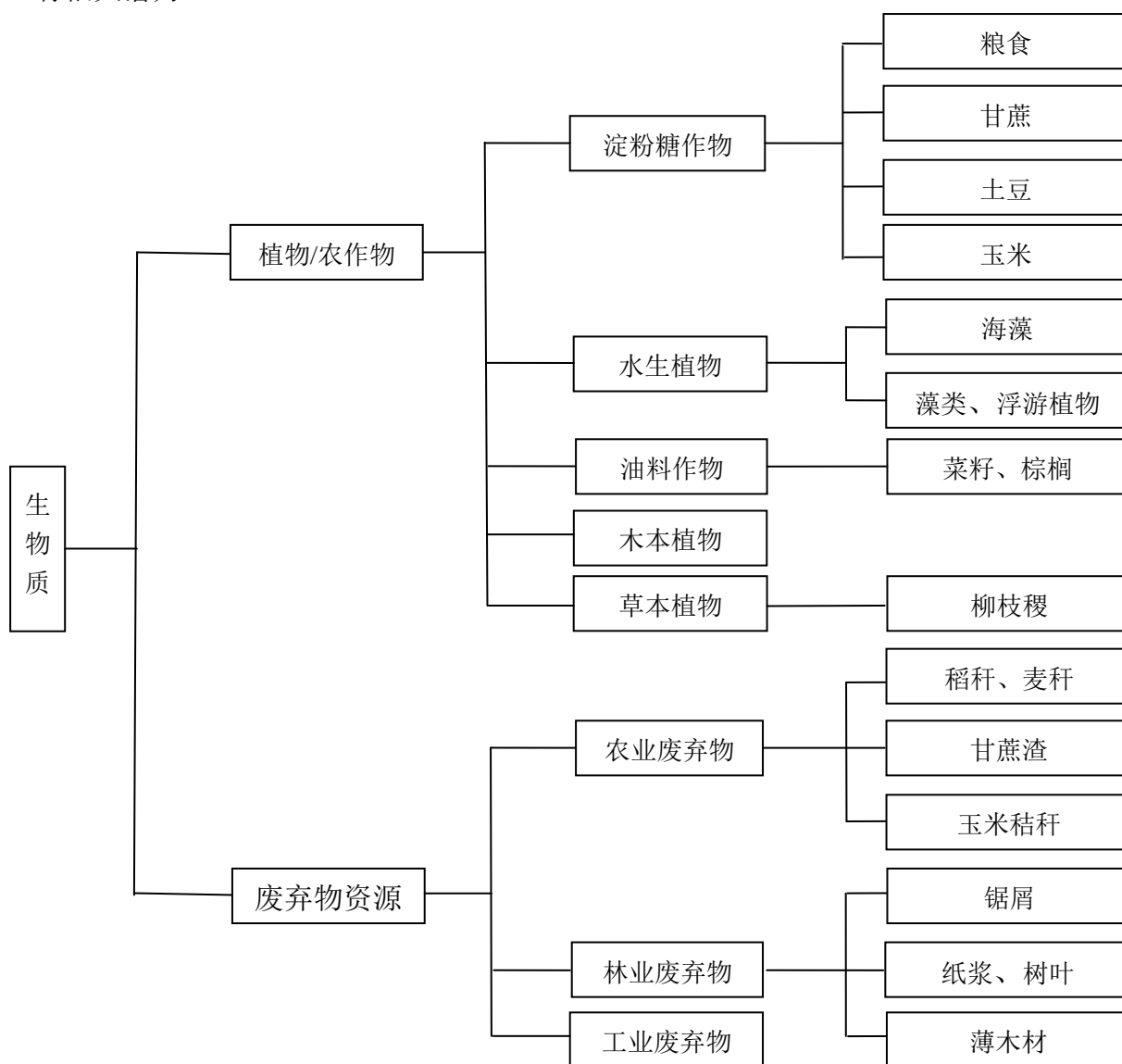


表 1.1 可再生的生物炼制原料

Fig. 1.1 Biomass as renewable feedstock to biorefineries

1.1.2 生物炼制概述

生物炼制是将生物质转化过程和机械设备相结合，然后从生物质中得到生物燃

料、化学品和能量的过程。生物炼制的目标就是利用生物或化学的技术和处理方式将生物质转化成化工产品。生物炼制需要深度理解生产工艺、化学、生物质的转化工艺以及经济学和环境相关的问题。



图 1.2 生物质的转化过程

Fig. 1.2 Biomass conversion process

生物炼制是基于生物质作为原料生产众多生物基化学品。生物炼制的基本概念是利用生物质生产生物燃料以及化学品的平台。生物炼制的主要方式有三种：热化学法、物理化学法以及生物化学法（见图 1.2）。物理化学法是将生物质压缩成型进行利

用的方法。热化学法是将生物质在高温下转化成其他形式的能量的方法，主要包括直接燃烧、气化、热解以及液化法四种方式。生物化学法是指生物质原料在微生物发酵作用下生产乙醇、沼气、生物柴油等能源产品以及乳酸等大宗化学品。目前，生物炼制主要集中在生物化学法，主要其具有以下优势：（1）微生物具有高效的合成能力，能合成大多数的有机化学品；（2）反应条件温和，产物的手型选择性高；（3）能够高效地制备替代石油化工原料的关键化合物以及生产各类大宗化学品；（4）具有污染少、能耗低等。

生物炼制，它不是简单的抄袭石油精炼，而是在一个高效的集成体系下生产各种不同的生物炼制产品。每一种生物炼制方法都能从相应生物质原料精炼和转化成多种有价值的产品。Clark^[16]等讲述利用绿色化学技术将低价值的废弃生物质转化成绿色化学品如蜡、乙醇等。Chew^[17]等讲述了几种不同的催化剂以及它们在生产标准棕榈油和精炼过程中所起的作用。生物炼制得到的产品不仅包括能从石油精炼获得产品还包括一些不能从石油精炼获得特殊化学品^[18]。为了得到更多的生物炼制产品，人们必须开发新的工艺如（1）木质纤维素原料的精炼，包括木质纤维素原料的预处理和木质素的分离；（2）发展新型的物理、化学和机械预处理方式；（3）发展生物处理方式；（4）组合转化方式，如生物技术和化学过程^[19]。

1.1.3 木质纤维素生物炼制产品

木质纤维素生物炼制产品是指用除粮食以外的秸秆等木质纤维素类农林废弃物为原料生产而得到化工产品和绿色能源，主要包括生物质制糖、燃料乙醇、乳酸、沼气、生物柴油、生物塑料以及生物多元醇等。由于化石燃料储量的减少，以及在燃烧过程会造成严重的环境问题，因而采用木质纤维素生产生物炼制产品具有广阔的前景。目前，我国政府高度重视生物炼制行业的发展，颁布了生物能源相关的法律和法规，大力推进可再生能源的发展，希望在 2020 年可再生能源的消费量占总能源消费量的 15%。与此同时，各地的企业家和科研机构先后建立了木质纤维素制糖、生产乙醇以及乳酸的中试项目。但是，在利用生物质原料生产生物炼制产品的过程中，有 3 个国际公认的需要解决的重要技术问题是：将木质纤维素降解为可发酵的葡萄糖等单糖；通过基因工程和微生物代谢工程的研究，将可发酵的糖进行微生物转化；简捷、高效的产物分离技术。由于木质纤维素结构致密对生物转化有较强的抗性，将大分子多糖降解为微生物可利用的单糖是目前最大的技术屏障。只有突破以上 3 个关键技术问题，才能经济地利用木质纤维素生产燃料乙醇及其它化学品，为生物炼制行业奠定坚实的基础。

目前，利用木质纤维素进行生物炼制的两个最主要的研究方向是生产纤维素乙醇来替代车用汽油和生产重要的大宗化学品，如可降解塑料聚乳酸的单体-L-乳酸。下面将对这两个方向的研究进展进行概述。

1.2 纤维素乙醇

1.2.1 纤维素乙醇概述

采用可再生的生物质原料生产得到的乙醇称之为生物乙醇，它是一种环境友好型可再生的能源^[20]，可直接用于改进的火花点火式发动机或与汽油混合后使用。与汽油相比，乙醇含有微量的硫，因此乙醇能改善燃料的燃烧效果，以及减少有害气体二氧化硫的排放。

在生物燃料市场中，生物乙醇主要是用淀粉类物料生产获得，一般是利用葡萄糖或淀粉发酵生成乙醇^[21]。但是，由于粮食资源的短缺，世界各国都在寻求利用生物质原料生产生物乙醇。然而采用生物质原料生产乙醇的工艺十分复杂^[21, 22]，是一种完全不同于利用淀粉生产乙醇的方式，主要原因在于木质纤维素原料有纤维素以及包围微纤维素的半纤维素、果胶和木质素，且对于不同的植物各种组分的含量都不同。因而要将木质纤维素进行发酵，必须进行预处理，破坏其致密的结构，才能使其被纤维素酶水解成为微生物可利用的糖，发酵生成乙醇。

目前，利用生物质生产乙醇研究最为广泛的技术是同步糖化与发酵技术。此方式是将木质纤维素的糖化与乙醇的发酵工艺整合在一起，操作简单，设备少，乙醇浓度高且不易染菌而备受关注。此外，有一些微生物如链孢霉菌、念珠菌等直接将纤维素发酵生成乙醇^[23]。将纤维素酶的生产、纤维素的水解、乙醇的发酵整合在一起是一个十分具有潜力的方法。将乙醇商业化的最大问题是整个过程中成本太高，要降低这些成本就需要发展高效的预处理方式、性能稳定的基因工程菌、降低纤维素酶的成本和乙醇的分离成本等^[24]。

1.2.2 木质纤维素生产乙醇的工艺

木质纤维素生产乙醇的步骤：原料的预处理、将木质纤维素糖化成发酵的糖、乙醇发酵以及乙醇分离和提纯等。

1.2.2.1 木质纤维素的预处理

由于各种生物质原料的性质不同，基本上没有通用的预处理方法。在最近几十年，人们研究了许多预处理方式。根据消耗的能量不同，它们可分为生物、物理、化学、物理-化学 4 种预处理方式。

生物预处理主要是利用褐色真菌、白腐菌和软腐菌等微生物降解木质素、半纤维素、少量木质素以及其他更加难以分解的组分^[25]。在白腐菌降解木质素过程中添加木质素降解酶如氧化物酶和漆酶等^[26]，可以更加有效地处理木质纤维素材料。这种预处理方式具有花费少、能耗低、不需要添加化学物质、环境条件温和，但是与其他预处理方式相比，最大的缺点是水解速率低^[27]，所以需要寻求一种能快速高效脱除木质素的担子真菌十分必要。

物理预处理包括机械粉碎和挤压。机械粉碎是将原料进行切片和研磨，来减小原料的尺寸和降低其结晶度，从而增大其表面积和降低聚合度^[27]。由于其能耗大，因而可行性比较低。挤压预处理是原料在通过挤压机，受到加热、混合和剪切的作用，引起物理和化学性质的改变，被认为是一种新颖和有前景的预处理方式。螺旋和套筒内的

高温能打乱木质纤维素的结构导致纤维素分离和降低纤维素尺寸，从而增加纤维素酶和碳水化合物的接触^[27]。

化学预处理主要包括碱处理、酸处理、臭氧处理、溶剂处理和离子溶液处理等方式，主要介绍一下碱处理和酸处理。在常温下，用碱处理生物质原料，需要几秒到几小时不等，能有效地溶解木质纤维素中的木质素，增加纤维素以及可溶性纤维素和半纤维素的分解^[29]。这种预处理方式对农业废弃物比较有利，但会造成可发酵糖的损失以及抑制物的生成。酸处理主要是利用酸溶解半纤维素，使得纤维素酶更容易接近纤维素。但是在酸处理过程中利用浓酸会产生抑制物、腐蚀设备以及回收十分困难，因而不可行。而稀酸预处理被广泛地运用于研究各种木质纤维素原料，似乎在工业上运用更加可行。采用稀硫酸处理木质纤维素原料得到很高的糖化得率被广泛的报道。当小麦秆用 0.75% (v/v) 硫酸在 121°C 条件下处理 1 小时，糖化得率高达 74%^[30]；橄榄树用 1.4% 稀硫酸在 210 °C 条件下处理水解得率达到 76.5%^[26]。

物理-化学预处理主要包括蒸汽爆破、液体热水处理、氨纤维气爆、湿法氧化、微波预处理、超声预处理和二氧化碳爆破等。在众多预处理方式中，蒸汽爆破是预处理生物质原料中运用最广泛的一种物理-化学预处理方式。在这个过程中，原料经受几秒到几分钟的高压蒸汽，然后突然减压，其处理的物料如白杨^[31]、橄榄残渣^[32]、玉米秸秆^[33]等都能用于乙醇的生产。由于水解了半纤维素中的乙酰基，因而这种方式结合了机械力和化学反应。高温时随着乙酰基生成乙酸，水解会自动发生，同时水在高温的条件下也可以作为一种酸。蒸汽爆破具有对环境影响较小，需要的固定投资较少，能量利用效率高，获得较高的糖化得率等优势^[34]。但是蒸汽爆破预处理也会产生较多的糠醛等有毒物质影响发酵以及造成部分半纤维素的降解而使木糖损失。

所有的预处理方式都是为了让纤维素酶更容易与纤维素反应，但是影响纤维素酶水解最主要的因素是纤维素的结晶度、其可接近的表面积、木质素和半纤维素的脱除。在这些预处理方式中，化学处理和热处理是目前最有效和最可能实现工业化的预处理方法。此外，多种方式相结合的预处理方式由于能达到较高的葡萄糖得率，也是一种比较有前景的预处理方式。

1.2.2.2 糖化与发酵

木质纤维素乙醇发酵是采用纤维素酶水解预处理后的物料，然后利用酿酒酵母等微生物发酵得到乙醇产品的过程，按其水解和发酵是否同时进行分成两种方式：分步糖化与发酵 (Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF) 和同步糖化与发酵 (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)。

分步糖化与发酵生产是将预处理过的物料先用纤维素酶进行糖化离心得到糖化液，然后将微生物接入糖化液中进行发酵生产乙醇，这是乙醇发酵的传统方式。这种方式将水解过程和发酵过程分开进行，可以在各自的最优条件下进行，且反应时互相不影响，且得到的发酵产物容易分离。但是这种方式在纤维素酶水解时容易形成产物抑制以及发酵时底物抑制酿酒酵母的生长，此外还具有操作周期较长，工艺路线较繁琐，

容易染菌等不利条件。

同步糖化与发酵生产乙醇就是在反应器中利用纤维素酶水解预处理后的生物质原料的同时接入微生物进行发酵而得到乙醇。同步糖化与发酵是在同一个反应器中进行生物质的水解和发酵,纤维素酶水解过程中得到的糖类能迅速被微生物利用生成乙醇,使整个反应过程中糖浓度保持在较低的水平,减少对纤维素酶的抑制,提高水解速率,进而提高整个过程中的乙醇发酵速率,从而能得到较高的浓度的乙醇和较高的纤维素转化率。此外,这种发酵方式设备简单,操作方便,且整个反应过程在同一个反应器中进行,减小了染菌的风险。这种方法的缺陷在于糖化温度和发酵温度不同,需要寻求优良的菌种,而且得到的纤维素乙醇发酵醪是固体和液体混合物,分离困难。

1.2.2.3 乙醇的分离

采用分子筛多塔精馏是目前从发酵液中分离生产燃料乙醇的标准方法,乙醇在发酵液中能形成气液两相并达到平衡,乙醇等挥发性物质在气相中浓缩,然后将其移入精馏塔中再次浓缩,得到纯度较高的乙醇。这种方法具有许多优势^[35]:回收得到高浓度的乙醇—在精馏过程中在塔底部得到极低乙醇溶液,塔顶能得到 99%纯度的乙醇产品;在低浓度的乙醇溶液中容易达到气液两相平衡;在乙醇浓度高于 4%时,能够减少能量的消耗;容易放大;可以用化工软件模拟物料平衡,节约投入和时间等。但是,精馏也有许多不利方面:在没有其他分离操作时不能达到高纯度的产品;在乙醇浓度低于 4%时,需要消耗大量的能量;操作温度较高(除非真空),一般高于发酵时的温度,容易造成微生物的死亡和酶的失活;在小的反应器中热量和质量很难整合而不能缩小。对于木质纤维素乙醇发酵醪减压蒸馏时,需要先进行固相和液相的分离,否则由于固体残渣的存在,会造成整个精馏塔管路的堵塞,同时由于蒸馏时温度高,造成发酵醪在蒸馏塔塔釜结焦,从而降低了整个蒸馏设备的分离效率以及使用寿命。因此,开发新的纤维乙醇分离工艺来降低乙醇浓缩过程的能耗,对生物炼制行业有重要的作用。

现在人们研究了许多新的乙醇分离方法:渗透蒸发、蒸汽渗透、汽提、液-液萃取。这些技术可用于乙醇的回收和乙醇提纯。由于气提具有操作简单、可选择廉价的二氧化碳作为提取剂以及能在发酵温度下操作等优势,因此从发酵液中气提乙醇具有很大的吸引力^[36,37]。气提适合各种方式生产得到的乙醇,将气提得到的乙醇采用冷凝的方式得到,但是也可以采用膜分离或吸附等方式。汽提与气提相似,主要不同在于汽提采用的是水蒸气,汽提蒸汽虽然温度较高,但是汽提塔却处于负压和较低的温度,这种方式乙醇的回收率可以达到 95%,有的甚至高达 99%。在液-液萃取中,向发酵液加入一种萃取剂混合均匀后,乙醇将从发酵液中溶入萃取剂中,然采用一个多孔的膜将两相进行分离。为了重复利用萃取剂,乙醇必须从萃取剂中释放出来。选择一种合适的萃取剂十分重要,萃取剂的选择一般遵循以下原则^[38,39,40]:选择性高,高的平衡分配系数,互溶性高,能分离成两相,具有良好的界面张力以及价格低廉等。汽提和气提以及液-液萃取分别涉及蒸汽和液体萃取剂,物理吸附与之相似。在物理吸附过

程中，放入吸取剂的填料塔既可以作为吸附塔也可以作为解析塔，同时提取剂也不需要从塔中移除。因此，物理吸附是一个装载和卸载吸附剂的循环过程。与液-液萃取相比，固体吸附剂对于乙醇需要有高的吸附选择性和吸附平衡分布系数。此外，由于吸附剂是固体，需要在乙醇和水中几乎不溶。最常采用的是不溶于水的沸石，如 ZMS-5 硅-铝沸石等^[41, 42]。渗透蒸发是一个基本的膜过程，它是发酵液流过有孔或无孔的分子薄膜并与之接触。在薄膜的一侧形成真空，产生渗透蒸汽，然后让发酵液中的乙醇组分进入薄膜并分散通过薄膜，蒸发进入渗透蒸汽相。由于对于特定的薄膜材料，不同组分具有不同的吸附和分散特性，因而某一特定的组分可在渗透液中富集。关于渗透蒸发回收水和发酵液中乙醇有广泛的研究，但是渗透蒸发至今没有广泛的运用^[43]，主要原因在于提高乙醇-水的分离因子，热量的集成，减少渗透蒸发的成本等。

在乙醇发酵过程中存在产物抑制，而传统的乙醇发酵由于不能将乙醇及时地从发酵液中分离出来，造成严重的产物抑制作用，降低了乙醇的生产能力，提高了其生产成本。此外，还限制了发酵液中纤维素转化率的提高以及发酵醪中乙醇浓度的增高。为了消除发酵过程中乙醇的抑制作用，许多研究者提出了很多关于将乙醇的发酵以及分离工艺同时进行的乙醇生产工艺。乙醇发酵与分离过程的耦合工艺是解决问题的主要途径，也能有效地解决操作费用、设备费用以及能耗过高等问题。目前，人们研究的乙醇分离耦合工艺有真空发酵、膜分离发酵、吸附发酵、气提发酵、萃取发酵等。下面阐述一下真空发酵。

真空发酵是由 Ramalingha 等提出，其原理是在发酵罐内保持一定的真空度，让发酵液保持沸腾状态，使乙醇被蒸馏出来，进而消除乙醇的产物抑制作用。Ramalingha^[44]研究了常压和真空状态的发酵，发现其最大的比生长速率相同，在真空条件下对数期延长 2 小时，同时其最终细胞浓度是常压下的 2 倍，从而表明真空状态对细胞的发酵活力更为有利。Ishida^[45]等在闪蒸系统中采用新的间歇操作方式，得到乙醇的生产率为 12 g/(L h)，Aline 等设计了一个由发酵罐、闪蒸罐、离心机和处理罐组成的连续发酵系统，并模拟优化了这个操作过程，乙醇的生产率可达 23 g/(L h)^[46, 47]。但是真空发酵也有许多弊端：需要将发酵液中不断累积的不挥发性组分排出并定期加入纯氧，以保持细胞的生长活力；在发酵过程中生成的二氧化碳不易冷凝，要在常压下才能移走，能耗比较大；真空操作操作费用高、设备负荷大且易造成污染。其他乙醇发酵与分离过程的耦合的工艺的优点见表 1.1。

表 1.1 各种操作方法的比较

Table 1.1 Contrast of different operation methods

方法	能耗	成本	操作	缺点	应用前景
真空发酵	高	费用高	真空操作	CO ₂ 难排放, 易染菌	解决能耗问题, 可广泛应用于工业生产
吸附发酵	低	吸附剂成本低	容易	吸附剂容量小	效率低, 目前进展不大
膜分离发酵	低	膜的成本高	常温操作	膜阻力大, 易堵塞	效率低, 易堵塞, 实际应用不可观
萃取发酵	低	萃取剂成本高	操作简单	萃取剂的选择	关键在于解决萃取剂或萃取方法问题
气提发酵	低	CO ₂ 、N ₂ 价格较低	简单易行	系统效率低	解决效率问题是关键

1.2.3 玉米芯工业残渣生产乙醇

玉米工业芯残渣是一种木质纤维素的废弃物, 由于玉米芯含有丰富的木糖可用于生产木糖醇和糠醛, 在生产这些产品的过程中, 半纤维素被利用, 原料中只剩下木质素和纤维素^[48]。据估计生产 1 吨糠醛大约会产生 12–15 吨的玉米芯残渣, 我国每年大约有 2,300,000 吨玉米芯工业残渣可利用^[49]。玉米芯工业残渣通常作为一种废弃物, 只是简单的用于燃烧而没有被充分的利用。由于玉米芯工业残渣作为木质纤维素原料生产生物产品具有不须预处理, 纤维素含量丰富, 抑制物少等优势, 因而玉米芯工业残渣是一种生产乙醇或其他高附加值产品的优良废弃物。

玉米工业残渣生产乙醇已被人们广泛研究。2012 年, 山东龙力公司年产 5 万吨玉米芯工业残渣生产乙醇项目获得国家发改委的批准。公司秉承“用芯改变世界”的理念, 全力打造玉米芯产业链模式, 多层次的开发玉米芯, 实现了玉米芯吃干榨尽式的综合利用。先提取玉米芯中的半纤维素, 生产木糖和低聚木糖, 并对剩下的玉米芯工业残渣进行二次开发, 提取其中的纤维素, 发酵生产乙醇, 最后提取剩余废渣中的木质素, 生产新型的高分子材料。通过上游和下游的联动生产, 不仅降低了生产成本, 而且减少了固体废弃物的排放, 并实现了玉米芯的综合利用。Zhang^[50]等在采用酸和碱处理玉米芯, 移除非纤维素组分, 然后采用同步糖化与发酵工艺生产乙醇, 使得玉米芯中纤维素的转化率达到 81.2%; 采用分批补料的方式使玉米芯的固体含量达到 25% 时, 乙醇的浓度能达到 84.7 g/L, 玉米芯纤维素的转化率能达到 79%; Cheng^[51]等采用 5-10% 的亚硫酸盐处理玉米芯工业残渣, 能使其转化率达到 72.2%; Liu^[52]等采用一株产 β -葡萄糖苷酶的酵母以玉米芯工业残渣作为底物, 在 25% 固含量的条件下, 乙醇的浓度能达到 25 g/L。但是, 利用玉米芯工业残渣商业化生产乙醇过程中, 由玉米芯工业残

渣中半纤维素被水解,木质素含量高达 20%,在使用纤维素酶水解玉米工业芯残渣时,纤维素酶大量吸附在木质素上,严重影响了玉米芯工业残渣了水解,并增加了纤维素酶的成本,从而增加了玉米芯工业残渣生产乙醇的成本。因此,在利用玉米芯工业残渣生产乙醇,降低纤维素酶成本和改进其预处理方式是今后研究的重点。

1.3 纤维素酶的循环利用

木质纤维素转化生产纤维乙醇对于生产可再生、环境友好型生物能源具有十分诱人的前景。但是,水解过程中纤维素酶的成本是阻碍纤维素乙醇商业化的重要原因。必须将纤维素酶加入预处理过的原料,将其酶解转化成可发酵的葡萄糖或木糖,然而在此过程中大约占水解成本的 50%^[53]。因此,寻求一种可行的纤维素酶循环利用方式来降低整个乙醇生产过程的成本十分必要。

1.3.1 纤维素酶概述

纤维素酶是一种十分重要的酶制剂产品,是由多种酶制剂组成的复合酶,主要有由外切 β -葡聚糖酶、内切 β -葡聚糖酶以及 β -葡萄糖苷酶等组成,此外还具有很高活力的木聚糖酶。由于纤维素酶在饲料、食品和纺织等领域运用广泛,人们将其视为淀粉酶、糖化酶和蛋白酶又一种产业化的工业酶种。在中国,由于木质纤维素生物炼制行业的快速发展,纤维素酶可能成为中国的第一大酶种。

纤维素酶存在于自然界的许多生物中,细菌、真菌以及一些动物等都可以生产纤维素酶。生产纤维素酶的微生物主要来自于真菌,典型的真菌有曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)和青霉属(*Penicillium*)。由于生产纤维素酶的菌种很容易退化,会导致产酶能力严重下降,因此需要不断优化选育的产酶菌种。纤维素酶的生产方式主要有固体发酵和液体发酵两种方式,固体发酵主要是以玉米芯、麦麸、稻草粉等原料发酵得到。

由于纤维素酶具有广阔的前景,因而应该加强纤维素酶的研究与开发工作。应从以下几方面着手:(1)由于很难找到一种适合所有纤维素原料的纤维素酶,对其推广产生了很大限制,因此需要加强纤维素酶作用机理的研究;(2)目前纤维酶的活性以及产量不高,需选育出活性高和产酶量高的菌种,降低纤维素酶的生产成本;(3)纤维素酶的检测方法比较繁琐,且方法较多,需开发一种能快速准确检测纤维素酶酶活的方法。

1.3.2 纤维素酶降解纤维素的机理

纤维素酶的反应机理与其它的酶反应机理不同,其最大的区别是纤维素酶是由多种酶制剂组成的复合酶,而且底物具有极其复杂的结构。由于其底物具有不溶于水的特性,纤维素酶的吸附作用取代了酶与底物形成 ES 复合物的过程。纤维素酶能特异性地吸附于底物中的纤维素上,然后在几种不同酶的协同作用下将纤维素分解生成葡萄糖。

Reese 等提出了 C_1-C_x 的假说,他们认为必须在不同的酶之间相互协同作用下,

才能将纤维素原料彻底水解成葡萄糖。协同作用普遍认为：首先，内切葡聚糖酶(C_1 酶)进攻纤维素的非结晶区，形成 C_x 所需的新的游离末端，接着由 C_x 酶在多糖链的还原端或非还原端切下纤维二糖单元，再由 β -葡聚糖苷酶将纤维二糖水解为二个葡萄糖。但是，纤维素酶相互的协同作用顺序是可以调换的，有人研究发现， C_1 - C_x 和 β -葡聚糖苷酶一定要同时存在才可以将天然纤维素水解成葡萄糖。如果先用 C_1 酶去作用结晶纤维素，接着除掉 C_1 酶，加入 C_x 酶，这样的顺序进行纤维素的水解不能将结晶纤维素水解成葡萄糖。此外，在纤维素酶水解纤维素时，外切 β -葡聚糖酶和内切 β -葡聚糖酶将会吸附在底物和木质素上，而吸附在木质素上的酶将是不可逆吸附，因而造成纤维素酶的损失，但是纤维二糖酶会溶解于溶液中，几乎不会损失。

1.3.3 纤维素酶循环研究

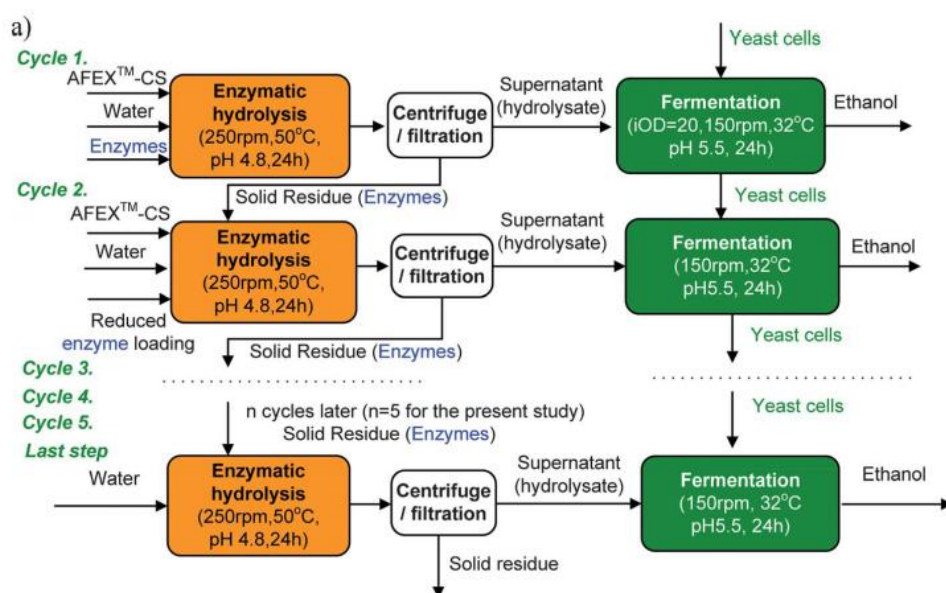
纤维素酶与木质素发生不可逆的结合，阻碍了纤维素酶与纤维素的结合，严重影响了酶解效率^[54, 55]。Deshpande 和 Eriksson^[56]等提出木质素不会使纤维酶失活，但是在完成玉米秸秆水解后将会有 40%的纤维素酶与木质素结合。人们提出一些减少木质素吸附纤维素酶的方法，如添加表面活性剂吐温-80^[57]、牛血清白蛋白^[58]或包被的纤维素酶^[59]。其它一些方式则是尝试通过添加有机溶剂^[60]、二甲亚砜^[61]或离子溶液^[62]将木质素溶解并移除。但是，这些方式的成本太高，因而实用性较低。此外，由于纤维素酶在高的温度和 pH 下稳定高^[63]，在从木质素上解吸附后将保留高达 88%的纤维素酶的酶活^[64]。一些学者提出通过添加新鲜的纤维素物料使纤维素酶再吸附的方式将纤维素酶回收^[65]，但是这种方式将会增加木质素的积累，最终将不利于回收的纤维素酶的水解新添加的底物^[57, 65, 66]。有些人提出碱处理是一种十分有效的方式，这种方式回收了 90%的纤维素酶，但是对于回收的纤维素酶的酶活力没有报道^[67]。目前，纤维素酶的回收的研究主要集中在低的固体含量下木质纤维素酶解过程纤维素酶回收^[64, 66]。其典型的纤维素酶回收方法^[68]：将纤维素酶水解木质纤维素原料得到的浆液分为液体部分和固体部分，然后将新的原料加入液体中使纤维素酶吸附到底物上，离心除去上清；将缓冲液加入到固体中，使纤维素酶从残渣上解吸附至溶液中，接着将固体残渣离心除去。最后，将溶解有纤维素酶的缓冲液加入吸附了纤维素酶的新的物料中，继续水解。虽然这种方式能高效地回收纤维素酶，但是吸附和离心操作频繁，过程繁杂、增加了染菌风险且只能在低固含量下操作。

在木质素纤维素原料同步糖化与发酵乙醇的生产工艺中，在固体含量比较高时，当发酵生成浓度较高的乙醇（大于 40 g/L）将会对酵母和纤维素酶造成一定的毒害作用^[69]。然而及时分离生成的乙醇，将会提高乙醇的生成速率和纤维素酶的酶解速率。目前对同步糖化与发酵过程中纤维素酶的循环利用研究很少。2012 年 Jin^[70]等开发了一种将乙醇的生产、纤维素酶循环利用以及细胞的循环利用整合生产生物乙醇的工艺，该实验以氨纤维气爆的玉米秸秆作为原料，其固含量为 6-8%之间，将分部糖化与发酵和同步糖化与共发酵分别循环 5 次，使得乙醇的产率提高 2 到 3 倍。操作具体的方式（如图 1.3）。

SHF: 采用纤维素酶对玉米秸秆酶解 24 小时, 离心将没有酶解的固体倒入下一个糖化罐; 上层清液在另一个罐中发酵 24 小时, 将发酵液离心, 除去上层清液, 保留菌体作为下次发酵的种子; 在下一个发酵罐中, 补加新的物料和水并减少纤维素酶的添加量, 共重复 5 次。

同步糖化与共发酵工艺 (**Simultaneous Saccharification and co-Fermentation, SSCF**): 采用纤维素酶对玉米秸秆酶解 24 小时, 接入酵母菌发酵 24 小时, 离心, 将上清液移除且含有菌体的玉米秸秆固体残渣倒入下一个同步糖化与共发酵罐, 并在该糖化罐中继续添加纤维素酶和水, 如此重复 5 次, 但最后一次循环不添加纤维素酶。

该操作方式都是在固含量较低的条件进行, 实现了 **SHF** 和 **SSCF** 纤维乙醇生产过程中, 纤维素酶的循环利用。然而这种方式具有得到的乙醇最终浓度比较低, 离心操作较多且染菌风险较大等缺点。此外, 至今还没有高的固体含量下木质纤维原料同步糖化与发酵工艺中纤维素酶循环利用的研究。



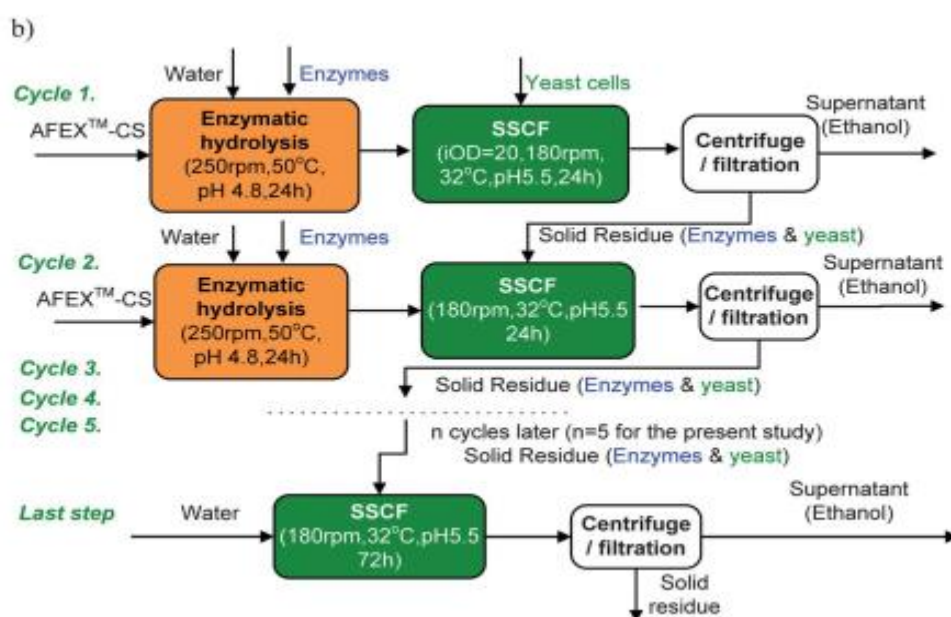


图 1.3 生物转化实验室工艺流程图 (a) SHF (b) SSCF

Fig 3.1 Flow chart of the Biomass Conversion Research Laboratory (BCRL). (a) SHF process, (b) SSCF process.

1.4 木质纤维素同步糖化与发酵生产乳酸

1.4.1 乳酸概述

乳酸是一种重要的且具有众多功能的化学品，它可作为化学中间体用于酸化剂、风味增强剂、食品防腐剂、药物制剂、皮革制品和纺织品^[71]。乳酸用于生产聚乳酸引起了人们的广泛关注。由于乳酸具有两种光学异构体（D型和L型），而光学构型对于生产的聚乳酸的性质至关重要，因而生产纯的D-乳酸和L-乳酸是十分重要的目标。此外，由D-乳酸和L-乳酸构成的复合型聚合物具有很强的热塑性，它具有很高的熔点，比单一构型形成的聚乳酸大约要高50℃^[72]。人们需要两种不同构型的乳酸，但是由微生物代替化学合成的乳酸一般都是两种构型乳酸的混合物，寻求能生产单一构型的乳酸菌种十分重要。随着聚乳酸产品在各行各业的广泛运用，全球对乳酸的需求急剧增加。目前，全球对乳酸的需求量是13,000-15,000吨/年，但是全球乳酸的需求到2020年将达800,000吨甚至至950,000吨，所以乳酸的产量需急剧提高。

目前，工业上生产乳酸主要以玉米等淀粉类物质为原料，通过乳酸菌等微生物发酵得到乳酸。该工艺比较成熟，然而受到原料的限制（原料成本几乎占到生产成本的70%），难以满足人们对乳酸产量的需求。木质纤维素原料具有种植面积广、原料丰富、产品多样化、价格低廉等优势，因此利用木质纤维素生产乳酸成为世界各国寻求能源替代品和可持续发展的之路的重要研究课题。目前，全球经光合作用产生的物质1,730亿吨/年，包含的能量是全球能源消耗总量的10-20倍，其利用率还不到3%。我国的

生物质原料也十分丰富，林木资源就达到 900 百万吨/年，此外农林废弃物和城市废弃物总量也有 820 万吨/年，但以其进行生物炼制被利用还不到其总量的 1%。因此，如果能充分高效地利用木质纤维素原料，不仅能缓解世界范围的能源危机，而且能解决粮食危机，减少化石燃料造成的环境问题，实现资源的充分利用并走上可持续发展之路。

1.4.2 木质纤维素生产乳酸工艺

目前，木质纤维素乳酸发酵工艺与乙醇一样通常采用 SHF 和 SSF 两种工艺，主要的区别在于发酵时使用的菌种不同。由于 SSF 过程中糖化和发酵同时进行，不会形成底物抑制，且乳酸的得率高，染菌风险小，是目前普遍采用的乳酸发酵方式。但是，SSF 过程中生产的乳酸发酵醪，乳酸全部溶于发酵醪的液体中，且不挥发，因此分离十分困难。

1.4.3 木质纤维素生产乳酸工艺中存在的问题

常用的乳酸分离方法是将发酵得到的乳酸发酵液转化成乳酸钙，然后将硫酸加入乳酸钙中反应生成乳酸，再经过脱色和离子交换精炼而成。但是该工艺流程较长、固体废物处理难、操作条件差，更为重要的是乳酸钙溶解度较高、从而导致乳酸的回收率较低，只有 50% 左右。近几十年来，人们陆续开发出了一些新的乳酸分离方法，如电渗析法、吸附法、萃取法、离子交换树脂等方式，但是这些分离方式对淀粉类物质发酵以及糖类等固体物质较少的原料发酵生产乳酸比较有利。

木制纤维素发酵乳酸得到是乳酸的发酵醪，含有许多固体不溶物，采用传统的乳酸分离方式很难凑效。为此，首先需要得到澄清的液体，传统固液分离方法是压滤和离心。压滤由于乳酸发酵醪的粒径很小，放入压滤袋中，易堵塞压滤袋上小孔，难以将乳酸发酵醪分离；离心能有效地将乳酸发酵醪中固体和液体分开，但是能耗较大，设备制造困难，难以实现工业化。荷兰普拉克生化公司开发了一种采用絮凝的方式将乳酸从生物质中分离出来的方式，该方法首先将乳酸发酵醪碱化，然后加入一种或多种絮凝剂，接着通过过滤或沉淀的方式得到含乳酸盐/乳酸的透明溶液和生物质沉淀物，能回收大部分乳酸，然后可以采用传统的乳酸精炼方式得到乳酸。这种方式有一个缺陷，乳酸发酵醪在加入絮凝剂之前被碱化，这就造成得到澄清液含有大量的木质素磺酸盐，给后续的乳酸纯化造成困难。

1.5 本课题研究的内容与意义

本研究主要是在纤维乙醇同步糖化与发酵工艺中通过纤维素酶的循环利用，降低纤维素酶成本，提高纤维乙醇的得率和纤维素的转化率。本论文选用具有纤维素含量丰富、不须预处理且抑制物少等优势玉米芯工业残渣进行同步糖化与发酵生产纤维乙醇，以间歇减压蒸馏的方式实现纤维乙醇的分离，减少其对酿酒酵母的抑制并采用分批补料的方式，来降低纤维素酶的用量，实现纤维素酶的循环利用。本论文还研究了一种简单高效的分离玉米秸秆乳酸发酵醪中固体残渣和发酵产物的方法，由于高固

含的木质纤维素乳酸发酵醪固体含量高，采用离心能耗太大且难以实现工业化，而压榨容易堵塞压榨袋孔径，难以实现分离，因而本文采用添加絮凝剂的方式使其絮凝成较大的颗粒，采用抽滤的方式来实现固液分离。具体内容如下：

(1) 玉米芯工业残渣生产乙醇过程中纤维素酶的循环：

1) 考察在不同减压蒸馏温度和时间下对乙醇收率的影响；

2) 考察减压蒸馏过程中乙醇对纤维素酶的酶活的影响；

3) 考察不同浓度乙醇溶液的减压蒸馏收率；

4) 以间歇减压蒸馏和补糖的方式，分别考察在合成培养基和糖化液中酿酒酵母的发酵性能；

5) 以玉米芯工业残渣作为物料，分别在不同固体含量下进行同步糖化与发酵生产，考察间歇减压蒸馏并补料对乙醇发酵的影响。

(2) 高浓度乳酸发酵醪的固液分离

1) 考察不同絮凝剂对玉米秸秆乳酸发酵醪分离效果的影响；

2) 对有絮凝剂参与的乳酸发酵醪的固液分离过程进行优化。

本课题研究的意义在于：

在较高的固体含量进行 SSF 时，通过间歇减压蒸馏的方式，将乙醇生产以及分离、纤维素酶的循环利用和酵母菌的循环化利用耦合在一起，既减少乙醇对酿酒酵母和纤维素酶的毒害，提高了乙醇的得率和纤维素的转化率，也减少乙醇发酵过程中纤维素酶的用量，实现了纤维素酶的循环利用。

在保证玉米秸秆乳酸发酵醪中乳酸回收率的前提下，降低了固液分离的操作步骤，同时获得的发酵产物清液可进一步分离纯化，而固体残渣含有较高的木质素，可用于生产固体燃料和生产木质素，产生一定的经济效益和避免污染环境。

本研究进一步完善了生物转化木质纤维素生产乙醇和乳酸产品的生产流程，为木质纤维素生物炼制的产业化提供了技术储备。

第二章 玉米芯工业残渣乙醇生产过程中纤维素酶循环利用研究

2.1 前言

在利用木质纤维素料同步糖化与发酵生产乙醇的工艺中，纤维素酶成本占整个同步糖化与发酵工段成本的 50% 左右^[77]。若能在 SSF 过程中，实现纤维素酶的循环利用，将会使纤维乙醇的生产成本大幅降低。目前关于纤维素酶的回收的研究大部分集中在较低固含量原料的酶解过程。而对于木质纤维素原料 SSF 过程中，有关纤维素酶回收的报道很少。2012 年 Jin 等开发了一种将乙醇的生产、纤维素酶循环利用以细胞的循环利用整合生产生物乙醇的工艺，该实验以 6–8% 固含量氨纤维气爆的玉米秸秆作为原料，在 SHF 和 SSCF 过程中进行纤维素酶的循环利用。对于在较高固体含量下，由于受到粘度大，传质不佳等因素的影响，因此高固体含量下的木质纤维素 SSF 工艺几乎没有报道。

在工业生产中，精馏是最消耗能耗的单元操作之一^[75]，一般占到总能耗的 50%–90%。因而，降低乙醇分离能耗的投入，可以显著提高生产乙醇过程中的经济性^[76]。目前，许多新的节约能耗的技术在乙醇分离工艺中取得应用，如膜分离、汽提、萃取、渗透蒸发等。然而，这些新的分离方式很少能与木质纤维素生产乙醇的工艺相耦合。

传统的乙醇发酵不能将乙醇产物及时地从发酵液中分离出来，造成严重的产物抑制作用，降低了乙醇的生产能力，提高了其生产成本。此外，还限制了发酵液中糖浓度的提高以及发酵醪中乙醇浓度的增高。为了消除发酵过程中乙醇的抑制作用，许多研究者提出了很多关于将乙醇的发酵以及分离工艺同时进行的乙醇生产工艺。目前，人们研究的乙醇发酵分离耦合工艺有真空发酵、膜分离发酵、吸附发酵、气提发酵、萃取发酵等。但是，这些方式由于具有不同程度的缺点，在木质纤维素乙醇的同步糖化与发酵工艺中几乎很难实现工业化。

在分批 SSF 过程中，每次发酵都需要培养酿酒酵母，尤其是以木质素原料为底物时，酿酒酵母需要逐步循环培养，步骤繁琐且周期长。若能将酿酒酵母循环利用，将简化 SSF 的周期，并且节约酿酒酵母的用量。目前在微生物发酵中主要采用固定化的方式来实现细胞的循环，但对于含有大量固体的木质纤维素物料，其细胞的分离很难实现^[78, 79]。

若在纤维乙醇的 SSF 过程中，将乙醇的分离、纤维素酶的循环化利用以及酿酒酵母的循环化利用整合在一起，实现乙醇的连续生产，将会使乙醇生产过程中的经济性得到很大提高。在 1977 年，Cysewski 和 Wilke 已经研究了酵母菌利用葡萄糖生产乙醇过程中，采用减压蒸馏的方式分离乙醇，缓解乙醇对酵母菌的抑制，提高乙醇的发酵速

率;同时也保留了酵母菌的活性,实现其循环利用^[80]。1984年,Ghose等利用10%(w/w)固体含量的稻草生产乙醇时,采用减压蒸馏的方式实验了乙醇的在位分离。补加9次物料后,酵母菌和纤维素酶仍具有较高的活性。但是至今,在高固体含量的木质纤维素SSF过程中,还没有关于将纤维乙醇生产工艺中乙醇的生产和分离、纤维素酶的循环化利用以及酵母菌的细胞循环化利用相耦合的研究。

本文在高固体含量的玉米工业芯残渣SSF生产乙醇工艺中,采用间歇减压蒸馏的方式在较低的温度下,将发酵到一定浓度的乙醇进行间歇减压蒸馏,减小乙醇对发酵过程的抑制,通过分批补充新的物料继续发酵,来降低纤维素酶的用量,以期达到纤维素酶的循环利用。文章中主要研究了不同减压蒸馏的温度、时间对乙醇收率的影响以及减压蒸馏和乙醇对纤维素酶的酶活影响;在合成培养基和玉米芯工业残渣水解液中,考察酿酒酵母的发酵性能;在15%和30%固含量玉米芯工业残渣SSF生产乙醇过程中,通过间歇减压和分批补料的方式,进行纤维素酶的循环利用。

2.2 材料和方法

2.2.1 原料

本实验所采用的玉米芯工业残渣来自于山东龙力公司,将从公司购买的原料使用压榨机剂进行压榨,测定其含水量32.56%,然后装袋放入冰箱中冷冻储藏待用。

本实验所采用玉米秸秆来自于山东潍坊,用2.5%稀硫酸以2:1固液比预浸12小时后,使用实验室自行设计的预处理反应器在180℃条件下预处理3分钟,冷却后用12倍重量的去离子水洗去抑制物,然后压榨装袋,放入冰箱中冷冻储藏待用。

纤维素酶是由上海优特尔公司提供,其纤维素酶酶活为135 FPU/g。

2.2.2 菌种

本实验玉米工业芯残渣乙醇发酵所用菌种为实验室自行筛选得到的耐高温、耐抑制物的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1。

2.2.3 实验试剂和仪器

表 2.1 试剂

Table 2.1 Reagents

试剂名称	规格	生产厂家
98%浓硫酸	GR	上海菲达工贸有限公司
98%浓硫酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
乙酸	AR	上海润捷化学试剂有限公司
NaOH	AR	上海振兴化工厂
葡萄糖	食品级	秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司
葡萄糖	AR	中国惠兴生化试剂有限公司
乳酸钠	AR	中国惠兴生化试剂有限公司

壳聚糖	AR	国药集团化学试剂有限公司
聚丙烯酸钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
聚丙烯酰胺	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸铝	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
十二水合硫酸铝钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸铵	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸镁	AR	上海美兴化工有限公司
亚硫酸钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
酒石酸钾钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
柠檬酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
柠檬酸钠	AR	国药集团化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
3,5-二硝基水杨酸	AR	国药集团化学试剂有限公司
苯酚	AR	国药集团化学试剂有限公司
丙酮	AR	国药集团化学试剂有限公司
丙三醇	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
95%乙醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
酵母粉	AR	安琪酵母股份有限公司
蛋白胨	AR	上海化学试剂采购供应站中心化工厂
滤纸	AR	沃特曼公司
淀粉酶	AR	Genencor Internal,Rochester,NY,USA
纤维素酶	AR	上海尤特尔公司

表 2.2 实验设备

Table 2.2 Experiment equipments

仪器名称	规格	生产厂家
电子天平	BS423S	北京赛多利斯
立式压力蒸气灭菌器	YXQ-LS-75S II	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
超纯水纯化系统	Milli-Q	Millipore 公司
超声波脱气机	KWT-100A	科伟达
高效液相色谱	LC-20A	岛津
洁净工作台	100 级 SW-CJ-IBU	上海博迅公司
气浴恒温振荡器	SHZ-82	金坛亿通电子
落地恒温振荡摇床	HZ-9311K	太仓华利达
高速冷冻离心机	J-25	Beckman 公司
台式低速冷冻离心机	5415R	Eppendorf 公司

电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9203A	上海一恒科学仪器有限公司
恒温水槽	ZC	宁波天恒有限公司
pH 计	PHS-3C	上海精密仪器科学有限公司
分光光度计	DU-800	Beckman 公司
制冰机	XB100	GRANT 公司
冰箱	BCD-215KA	海尔公司
冰箱	SC-329GA	海尔公司
超低温冰箱	86C	Thermo 公司
旋涡混合仪	XW-80A	江苏海门市其林贝尔公司
5L 反应器	5L	上海保兴生物设备有限公司
四联发酵罐	BIOTECH-3BG	上海保兴生物设备有限公司
循环水真空泵	SHZ-DIII	上海大研仪器有限公司
低温冷却循环泵	DLSB-10/20 °C	上海鹰迪仪器设备有限公司

2.2.4 培养基和所需溶液

YPD培养基：葡萄糖20.0 g/L、酵母提取物10.0 g/L、蛋白胨20.0 g/L，并在115 °C条件下灭菌20分钟。

YPD-G50培养基：葡萄糖50.0 g/L、酵母提取物10.0 g/L、蛋白胨20.0 g/L，并在115 °C条件下灭菌20分钟。

种子培养基：葡萄糖20.0 g/L、KH₂PO₄ 2.0 g/L、MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L、(NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L、酵母粉1.0 g/L，并在115 °C条件下灭菌20分钟。

合成培养基-G100：葡萄糖100.0-110.0 g/L、KH₂PO₄ 2.0 g/L、MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L、(NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L、酵母粉10.0 g/L，并在115 °C条件下灭菌20分钟。

合成培养基-GC：在25%玉米芯工业残渣水解液中配置成KH₂PO₄ 2.0 g/L、MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L、(NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L、酵母粉10.0 g/L的溶液，并在115 °C条件下灭菌20分钟。

50%和75%的水解液培养基：将在15% (W/W) 固体含量条件酶解得到的玉米芯工业残渣水解液与去离子水分别以1:1和3:1 (V/V) 的比例混合，然后配制成KH₂PO₄ 2.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L, 酵母粉 1.0 g/L 的培养基，将pH调整至6.0，然后分装于三角瓶中20 ml/100 ml，并在115 °C下灭菌20分钟。

100%种子培养基：将在15% (W/W) 固体含量条件酶解得到的水解液配制成KH₂PO₄ 2.0 g/L, MgSO₄·7H₂O 1.0 g/L, (NH₄)₂SO₄ 1.0 g/L, 酵母粉 1.0 g/L 的培养基，将pH调整至6.0，然后分装于三角瓶中200 ml/500 ml，并在115 °C下灭菌20分钟。

柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液：将用容量瓶配制的100 mM柠檬酸和柠檬酸钠溶液以一定的比例混合，并用pH计进行标定，使其pH达到4.8，即可。

乙醇-水溶液：将乙醇和去离子水以一定的比例混合，配置成所需浓度的乙醇溶液。

乙醇-酶溶液：将乙醇、pH 4.8，100 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液和纤维素酶混合均匀得到乙醇 48 g/L，溶液的纤维素酶酶活为 5 FPU/ml。

15%玉米芯工业残渣水解液：在 50 ℃、150 rpm、纤维素酶量 15 FPU/g DM 的条件下，将灭菌的去离子水加入到实验室自行开发的 5 L 螺带浆生物反应器，然后以批次加料的方式将玉米芯工业残渣加入生物反应器中使其固含量达到 15% (W/W)，调节 pH 至 4.8，酶解 48 小时；将酶解得到的玉米芯工业残渣浆液在 8000 rpm 转速下离心 15 分钟，收集上清液并在 115 ℃ 下灭菌 20 分钟，然后放入带有滤纸的漏斗中过滤，收集滤液即得到 15% 固体含量的水解液，放入 4 ℃ 冰箱贮存待用。

25%玉米工业芯残渣水解液：在 50 ℃、150 rpm、纤维素酶量 15 FPU/g DM 的条件下，将灭菌的去离子水加入到实验室自行开发的 5 L 螺带浆生物反应器，然后以批次加料的方式将玉米芯工业残渣加入生物反应器中使其固含量达到 25% (W/W)，酶解 72 小时。其它与制备 15% 玉米芯工业残渣水解液相同。

2.2.5 实验方法

2.2.5.1 菌种保藏

将 2 ml 酿酒酵母接入 20 ml 种子培养基中，放置于 30 ℃，180 rpm 的气浴摇床中培养 18 小时后取出，然后再接入 200 ml 种子培养基在相同条件下培养 15 小时，再将其与 60% 甘油等体积混合分装于 2 ml 冻存管中，置于液氮中速冻 1 分钟，并保藏于 -80 ℃ 冰箱中。

2.2.5.2 种子培养

种子培养-1：将 2 ml 酿酒酵母接入 20 ml YPD 培养基中，放置于 30 ℃、180 rpm 的气浴摇床中培养 18 小时，然后将其接入 200 ml 100% 的 YPD-G50 培养基中培养 15 小时至 OD₆₀₀ 达到 20-22，即得到种子-1，待用。

种子培养-2：将 2 ml 酿酒酵母接入 20 ml 种子培养基中，放置于 30 ℃、180 rpm 的气浴摇床中培养 18 小时，接着取出 2 ml 接入 20 ml 50% 的水解液培养基培养 15 小时，取出 2 ml 接入 20 ml 75% 的水解液培养基培养 15 小时，然后将其接入 200 ml 100% 的水解液培养基中培养 15 小时至 OD₆₀₀ 达到 12-14，即得到种子-2，待用。

2.2.5.3 纤维素酶循环利用工艺流程图以及技术路线

在生物反应器中，将木质纤维素物料发酵生成的乙醇发酵醪加热，通过循环水真空泵将整个体系抽真空，生物反应器中溶液或发酵醪沸腾，然后形成的乙醇蒸汽在蛇形冷凝管中被冷凝收集到收集瓶中，在减压蒸馏结束后，将温度调低，然后向生物反应器中补加物料继续发酵，如此循环。

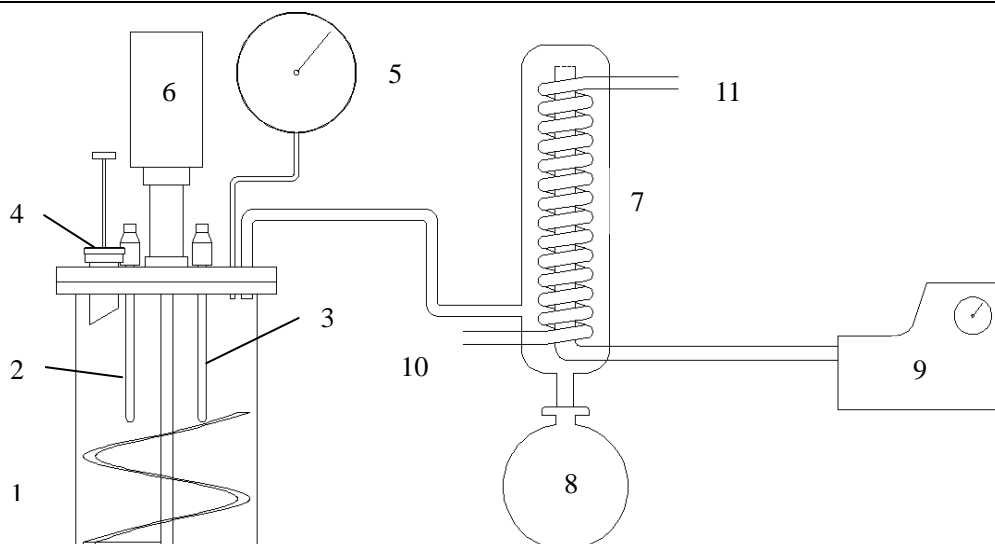


图 2.1 纤维素酶循环利用工艺流程图

Fig. 2.1 Flow chart of cellulase recycling process. 1. Helical impeller bioreactor developed by our laboratory, 2. Thermometer port, 3. pH-meter port, 4. Solid feeding inlet, 5. Vacuum meter, 6. Motor, 7. Graham condenser, 8. Receiving flask, 9. Circulating water vacuum pump, 10. Condensate inlet, 11. Condensate outlet.

在 5 L 发酵罐中，将玉米芯工业残渣在 50 °C、150 rpm、pH 4.8 条件下预糖化 12 小时，降温至 37 °C，pH 调至 5.5 接入酿酒酵母进行同步糖化与发酵，待发酵到一定阶段，然后升高温度至 50 °C，在 15 mm 汞柱压力的条件下，减压蒸馏 30 分钟，然后迅速降温至 37 °C，并将减压蒸馏的乙醇以等质量的无菌水补回，并补加新的物料和营养盐，继续发酵，如此循环下去。若无特殊说明，以下实验的糖化条件：50 °C、150 rpm、pH 4.8；发酵条件：37 °C、150 rpm、pH 5；减压蒸馏条件：50 °C、150 rpm、冷凝温度-10 °C、pH 5.5、减压蒸馏压力 15 mm 汞柱压力、减压蒸馏时间 30 分钟。

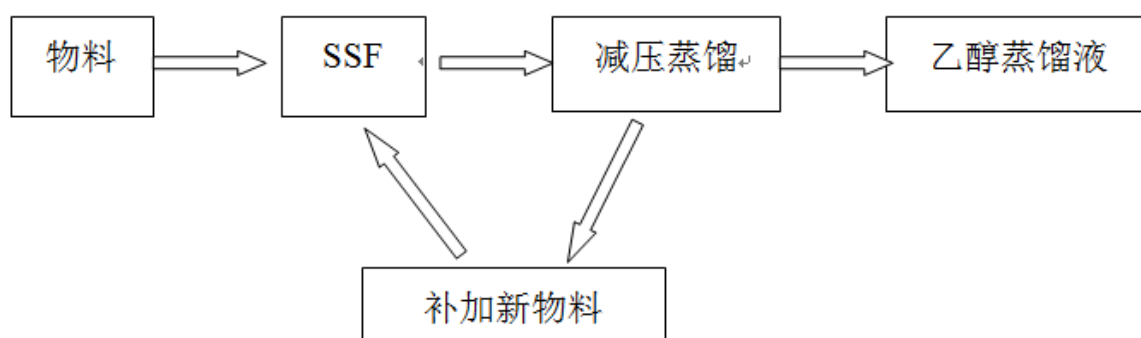


图 2.2 玉米芯残渣纤维素酶循环利用技术路线图

Fig. 2.2 Technology roadmap of cellulase recycling using corn cob residue

2.2.5.4 减压蒸馏温度对乙醇收率影响

将 56 g/L 的乙醇溶液倒入 5 L 螺带桨生物反应器中，分别加热至 37 °C，40 °C，

45 °C, 50 °C, 55 °C; 在搅拌转速 150 rpm、冷凝水温度为-10 °C、减压蒸馏压力 15mm 汞柱条件下, 将其分别减压蒸馏 15 分钟, 30 分钟, 45 分钟, 测定其蒸馏出乙醇的体积和浓度以及发酵罐中的液体体积和乙醇浓度。

2.2.5.5 减压蒸馏温度和乙醇对纤维素酶活的影响

将乙醇-酶溶液加入 5L 螺带桨生物反应器中, 加热至 55 °C 和 50 °C, 在搅拌转速 150 rpm、冷凝水温度为-10 °C、15 mm 汞柱条件下, 分别减压蒸馏 15 分钟, 30 分钟, 45 分钟, 然后将釜液回补缓冲液到原体积, 取一定量的液体测试其对玉米秸秆的酶解能力, 并计算相对酶活。

将不含乙醇的 5 FPU/ml 酶溶液在搅拌转速 150 rpm、50 °C、减压蒸馏压力 15 mm 汞柱条件下, 分别减压蒸馏 15 分钟, 30 分钟, 45 分钟, 然后将釜液回补缓冲液到原体积, 取一定量的液体做糖化, 测定其糖浓度。

减压蒸馏酶液对玉米秸秆的酶解能力测试: 称量 0.64 g (固含量 62.43%) 12 倍水洗预处理玉米秸秆, 加入 9.26 ml 去离子水, 调节 pH 至 4.8 左右, 加入 9 ml 0.1M 柠檬酸缓冲液 (空白 10 ml), 再加入 100 μ l 氨苄, 然后加入 1 ml 减压蒸馏酶液 (4000 rpm/min 离心 3 分钟), 空白不加酶液。

2.2.5.6 减压蒸馏不同浓度乙醇溶液对乙醇收率的影响

将不同浓度乙醇溶液倒入 5 L 螺带桨生物反应器中, 在 50 °C、搅拌转速 150 rpm、冷凝温度-10 °C、减压蒸馏压力 15 mm 汞柱条件下, 将其减压蒸馏 15 分钟, 30 分钟, 45 分钟, 测定其蒸馏出乙醇的体积和浓度。

3.1.5.7 采用间歇减压蒸馏和补加葡萄糖的方式, 考察酵母菌在合成培养基和玉米芯工业残渣水解液中的发酵性能

将酿酒酵母培养得到的种子-1 以 10% 的接种量接入合成培养基-G100 发酵 12 小时, 然后进行减压蒸馏, 接着加入 350 ml 营养盐和 234 g 葡萄糖, 继续发酵 12 小时, 进行减压蒸馏, 总共重复 4 次。

将酿酒酵母培养得到的种子-2 以 10% 接入量接入合成培养基-GC 发酵 18 小时, 进行减压蒸馏, 接着加入 350 ml 25% 玉米芯工业残渣水解液配制的营养盐和 234 g 葡萄糖, 继续发酵 18 小时 (最后一次 24 小时), 进行减压蒸馏, 共重复 3 次。

2.2.5.8 玉米芯工业残渣进行 30% 和 15% 固含量 SSF, 通过间歇减压蒸馏和分批补料, 进行纤维素酶的循环利用

将酿酒酵母培养得到的种子-2 以 10% 接种量接入在纤维素酶量 15 FPU/g DM 的条件下预酶解 12 小时的 15% 固含量玉米芯工业残渣中进行同步糖化与发酵发酵 36 小时, 进行减压蒸馏 30 分钟, 并补水及营养盐和物料, 继续进行发酵, 如此重复 1 次。二次加料量主要依据纤维酶酶量的减少量来计算。第一次基于总物料酶量: 15 FPU/g DW; 第三次基于总物料酶量: 10 FPU/g DW。记为 15-12-10 FPU 纤维素酶循环实验。此外, 进行 15% 固含量玉米芯工业残渣 15 FPU/g 和 10 FPU/g DM 的同步糖化与发酵实验。

将酿酒酵母培养得到的种子-2 以 10%接种量接入在纤维素酶量 15 FPU/g DM 的条件下预酶解 12 小时的 30%固含量玉米芯工业残渣, 进行同步糖化与发酵 48 小时, 进行减压蒸馏 30 分钟, 并补水及营养盐和物料, 继续进行发酵, 如此重复两次。三次加料量主要依据纤维酶酶量的减少量来计算。第一次基于总物料酶量: 15 FPU/g DW; 第二次基于总物料酶量: 12 FPU/g DW; 第三次基于总物料酶量: 10 FPU/gDW。记为 15-12-10 FPU 纤维素酶循环实验。此外, 进行 30%固含量玉米芯工业残渣 15 FPU/g 和 10 FPU/g DM 的同步糖化与发酵实验。

2.2.6 分析方法

2.2.6.1 玉米芯工业残渣纤维素和半纤维素的测定

测定玉米芯残渣中纤维素和半纤维素的方法采用范式 (Van Soest) 洗涤纤维分析测定纤维素以及半纤维素和木质素的含量。

2.2.6.2 玉米芯残渣含水量的测定

选用 3 个或 3 个以上表面皿, 洗净, 放入 105 °C 烘箱中烘 2-3 小时至恒重, 并记录其重量 M_0 , 然后加入玉米芯残渣, 记录其质量 M_1 , 放入 105 °C 烘箱中烘 6~8 小时至恒重, 记录其质量 M_2 , 则物料的固体含量为:

$$Sc = (M_2 - M_0) / (M_1 - M_0) \times 100\% \quad (2-1)$$

则物料的含水量为:

$$Wc = [1 - (M_2 - M_0) / (M_1 - M_0)] \times 100\% \quad (2-2)$$

2.2.6.3 纤维素酶酶活的测定

纤维素滤纸酶活的测定方法参考美国可再生能源实验室 (NREL) 的方法和步骤。1 个滤纸酶活单位 (one unit of filter paper cellulose, FPU) 的定义是 1 小时催化 50 mg Whatman 滤纸生产 2.0 mg 还原糖的纤维素酶量。首先, 将固体纤维素酶配制成一定浓度的酶溶液并稀释至合适的倍数, 然后向含有 50 mg Whatman 滤纸的试管和 1.0 ml 50 mM 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲溶液中加入 0.5 ml 酶液, 在 50 °C 的水浴中反应 1 小时, 然后用 DNS 法测定还原糖的浓度。

2.2.6.4 纤维素酶相对酶活活力的测定

将减压蒸馏的酶液补回至原体积做糖化测得的葡萄糖以及纤维二糖总量与不含乙醇没有进行减压蒸馏相同酶量进行糖化得到葡萄糖以及纤维二糖总量相比, 即得到纤维素酶相对酶活活力。

$$\text{纤维素酶相对酶活} = \frac{[C_{11} + 1.05 \times C_{12}] - [C_{01} + 1.05 \times C_{02}]}{[C_1 + 1.05 \times C_2] - [C_{01} + 1.05 \times C_{02}]} \quad (2-3)$$

其中,

C_{11} 是减压蒸馏酶液糖化测得的葡萄糖浓度, 单位: g/L;

C_{12} 是减压蒸馏酶液糖化测得的纤维二糖浓度, 单位: g/L;

C_{01} 是空白对照中葡萄糖浓度，单位：g/L；

C_{02} 是空白对照中纤维二糖浓度，单位：g/L；

C_1 不含乙醇且没有减压蒸馏的酶液糖化测得的葡萄糖浓度，单位：g/L；

C_2 不含乙醇且没有减压蒸馏的酶液糖化测得的纤维二糖浓度，单位：g/L。

2.2.6.5 葡萄糖、纤维二糖、乙醇、乳酸和乙酸浓度测定

实验中葡萄糖、纤维二糖、乙醇、乳酸和乙酸的浓度测定采用高效液相色谱 (HPLC) 获得，检测器为 RID-10A 示差检测器，色谱柱为 Bio-rad Aminex HPX-87H 柱，柱温 65 °C。流动相为 5 mM H₂SO₄，流速为 0.6 mL/min。先将各物质的分析纯样品分别用超纯水配置成梯度浓度的水溶液，以加入 HPLC 进样器 20 μL 样品中，根据图谱中的出峰时间，可确定各物质在色谱柱中的出峰时间，再根据峰面积与浓度梯度的线性关系，确定各物质标准曲线。待测定的样品，稀释至标准曲线浓度范围采用 0.22 μm 滤纸过滤后测定，根据检测报告获得样品中所需物质的出峰时间和峰面积，计算出待测样品中各组分的浓度。

2.2.6.6 菌体浓度的测定

菌体浓度使用分光光度法间接测定。取 1 ml 所需测定的样品在 13200 rpm 离心 5 分钟，然后移去上清液，菌体中加入 1 ml 去离子水震荡悬浮后离心，如此重复两次，最后加入 1 ml 去离子水使菌体悬浮。以去离子水为空白对照，使用 DU800 在 600 nm 下测得吸光值 (OD)。

3.1.6.7 乙醇得率的计算

乙醇得率是基于实验室优化的适合于高的木质纤维素固体含量和高浓度乙醇的方法进行计算的 (无减压蒸馏不计算减压蒸馏乙醇质量)^[81]。计算公式为

$$\text{乙醇得率 (\%)} = \left\{ \frac{[C_1] \times W}{976.9 - 0.804 \times [C_1]} \cdot \frac{1}{0.511 \times f \times [\text{Biomass}] \times m} + [C] \times V \right\} \times 100\% \quad (2-4)$$

其中，

$[C_1]$ 是发酵结束后发酵醪上清液中乙醇的浓度，单位：g/L；

$[C]$ 是减压蒸馏是乙醇的浓度，单位：g/L；

V 是减压蒸馏得到乙醇的体积，单位：L；

W 是在整个发酵过程中水的总质量，单位：g；

f 是每克干玉米芯残渣中所含的总还原糖的克数，单位：g/g；

$[\text{Biomass}]$ 是在发酵前整个体系的固体含量，单位：g/g；

m 是在发酵前整个体系的总重量，单位：g。

2.3 结果与讨论

2.3.1 玉米芯工业残渣中主要组分的测定

表 2.3 玉米芯工业残渣中各组分的含量（基于干物料）

Table 2.3 Content of different component in corncob residue (Based on dry material)

	纤维素	半纤维素	不溶性木质素	灰分
含量 (%)	56.5	2.5	15.7	5.7

从表 2.3 中可以看出，玉米芯工业残渣中纤维素含量高达 56.5%，半纤维素含量为 2.5%。由于提取木糖的过程中，玉米芯经过稀酸处理，半纤维素几乎全部降解，使得纤维素含量显著提高，因而可以作为一种优良的生物炼制原料。但是由于半纤维素被降解，同时导致原料中木质素含量升高，在酶解的过程中会与纤维素酶产生不可逆吸附，严重影响玉米芯工业残渣的水解速率以及其纤维素的转化率。因此，若能将木质素完全去除，将会增强其于水解效果，提高其水解效率及得率。

2.3.2 减压蒸馏温度对乙醇收率影响

在玉米芯工业残渣生产乙醇的纤维素酶循环化利用过程中，实验设计是希望通过减压蒸馏将高浓度乙醇移除，减少对发酵过程中酿酒酵母的抑制，因而先考察在不同的减压蒸馏温度以及时间下乙醇的回收率的影响。由于实验采用的发酵罐是 5 L，考虑到高的纤维素固含量下乙醇发酵过程中由于二氧化碳的大量产生会引起发酵罐充罐的危险以及需要预留一定的空间用于补料，因而将发酵罐的装液量设计在 2.5 L 左右。此外，在乙醇发酵过程中乙醇浓度达到 40–60 g/L 时，会对酵母菌的发酵以及纤维素酶的酶解过程产生一定的毒害作用，因而将乙醇的浓度选择在 50 g/L 左右。

从图 2.3 可知，在相同的温度下，随着减压蒸馏时间的增加，发酵罐中乙醇浓度逐渐下降，同时减压蒸馏温度的越高，乙醇浓度下降的越快，甚至在 50 °C 和 55 °C 时减压蒸馏 45 分钟，乙醇浓度分别只有 5 g/L 和 3.1 g/L。由于随着减压蒸馏的不断进行，乙醇不断被蒸馏出来，因而发酵罐中乙醇浓度不断减少；同时温度越高乙醇越容易被蒸出，因而温度越高，发酵罐中乙醇浓度越低。

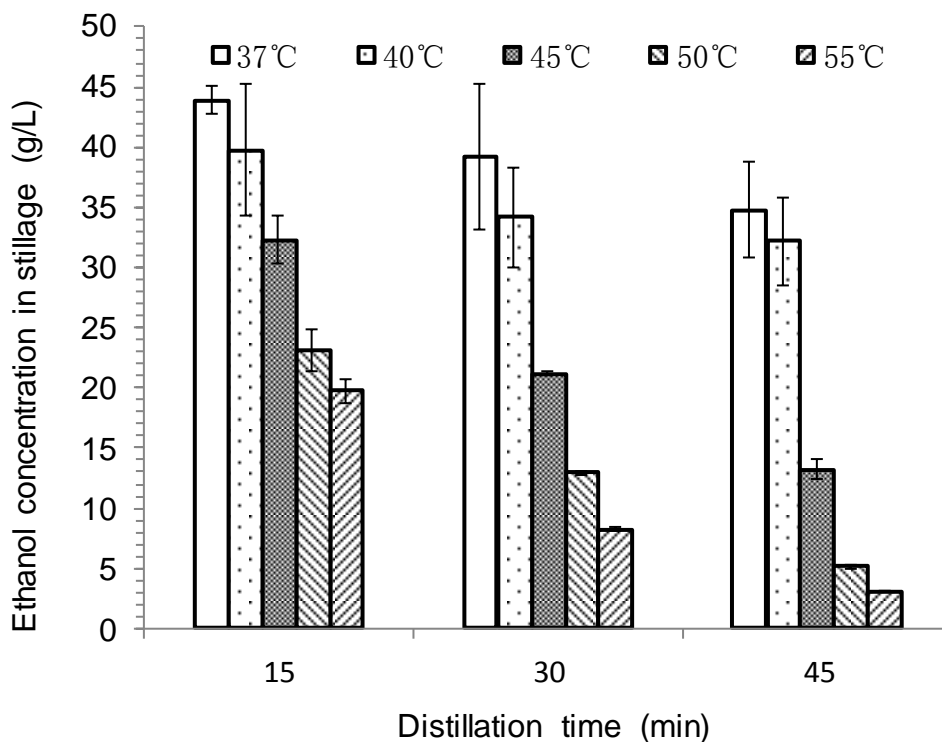


图 2.3 在不同减压蒸馏温度下对发酵罐中乙醇浓度的影响

Fig. 2.3 Effect of the ethanol concentration in fermenter under different vacuum distillation temperature. Operating conditions: pressure 15 mm mercury column, speed of stirring 150 rpm, condensing temperature -10°C .

从图 2.4 可知，在相同的温度下，随着减压蒸馏时间的增加，蒸馏液中乙醇浓度不断降低，主要原因在于随着减压蒸馏的进行，发酵罐中乙醇不断减少，蒸馏出来的蒸汽中水越来越多，造成蒸馏液中含量减少，因而乙醇浓度不断下降。在减压蒸馏温度越高越显著，这种现象越明显。在 50°C 减压蒸馏时，蒸馏液中乙醇的浓度从减压蒸馏 15 分钟时 218.2 g/L 下降到减压 45 分钟时 144.3 g/L 。而在较低温度下，蒸馏液中浓度变化较小，主要是由于在较低温度下，减压蒸馏蒸出的液体体积较少，从而导致其浓度降低但降低幅度较小。

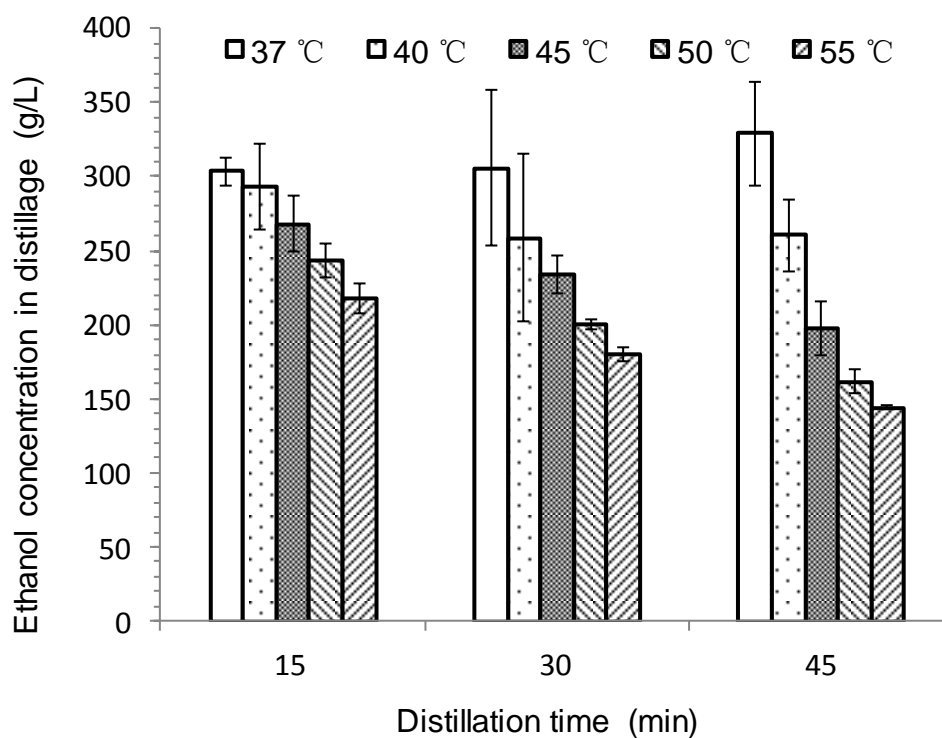


图 2.4 在不同减压蒸馏温度下对蒸馏液中乙醇浓度的影响

Fig. 2.4 Effect of the ethanol concentration in distillate under different vacuum distillation temperature. Operating conditions: pressure 15 mm mercury column, speed of stirring 150 rpm, condensing temperature -10°C .

从图 2.5 可知，在不同温度下，减压蒸馏得到蒸馏液的体积随着减压蒸馏时间的增加，蒸馏液的体积几乎呈线性的增加，温度越高，线性增加关系越明显，主要是由于在溶液中乙醇占的比重较小。在不同减压蒸馏温度下，减压蒸馏过程中蒸馏液中水占主导，乙醇的比例较小，体积的增加主要是蒸馏出去的水，因而随着时间的增加蒸馏液体积呈线性增长。

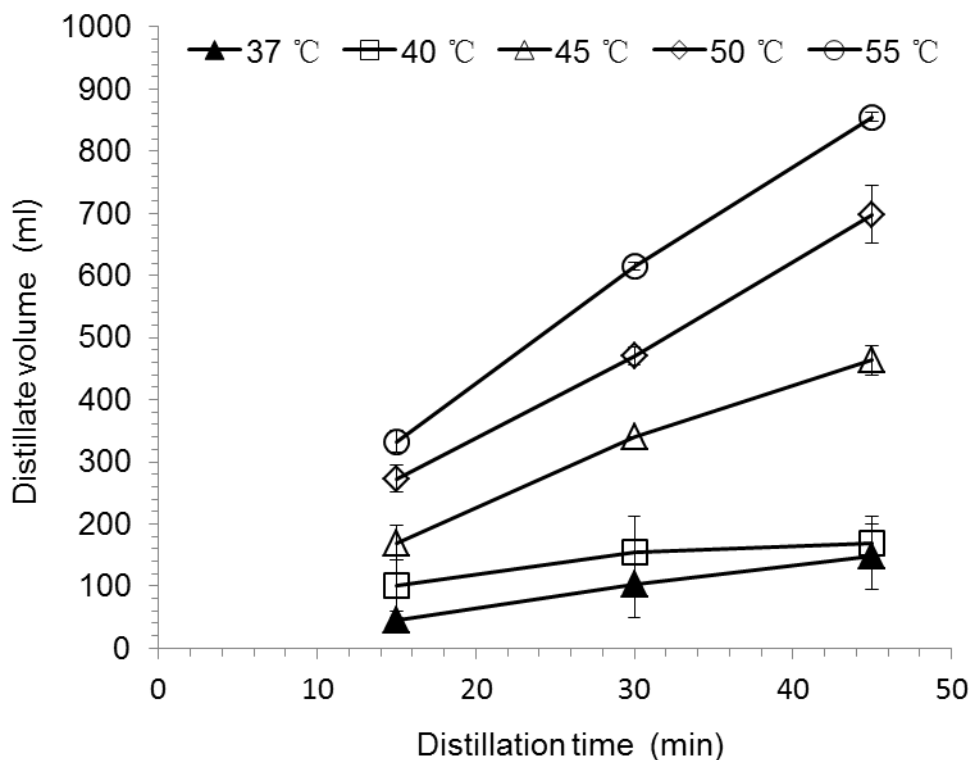


图 2.5 在不同减压蒸馏温度下对蒸馏液体积的影响

Fig. 2.5 Effect of the distillate volume under different vacuum distillation temperature. Operating conditions: pressure 15 mm mercury column, speed of stirring 150 rpm, condensing temperature -10°C .

从图 2.6 中可知，在相同的减压蒸馏温度下，随着减压蒸馏时间的增加，乙醇的回收率不断增加，主要是由于发酵罐中乙醇随着减压蒸馏的进行，不断被蒸出，从而使得其回收率不断增加。在较高的温度下，乙醇蒸出更容易，因而高温下减压蒸馏乙醇的回收率要更高。在减压蒸馏温度 50°C 和 55°C 条件下，减压蒸馏 30 分钟以上，蒸馏液中乙醇的回收率达到 70 % 以上，蒸馏液中乙醇的浓度高达 150 g/L ，基本可以达到乙醇回收的要求。因此，选择减压蒸馏温度 50°C 和 55°C 作为考察减压蒸馏对纤维素酶酶活的影响条件。

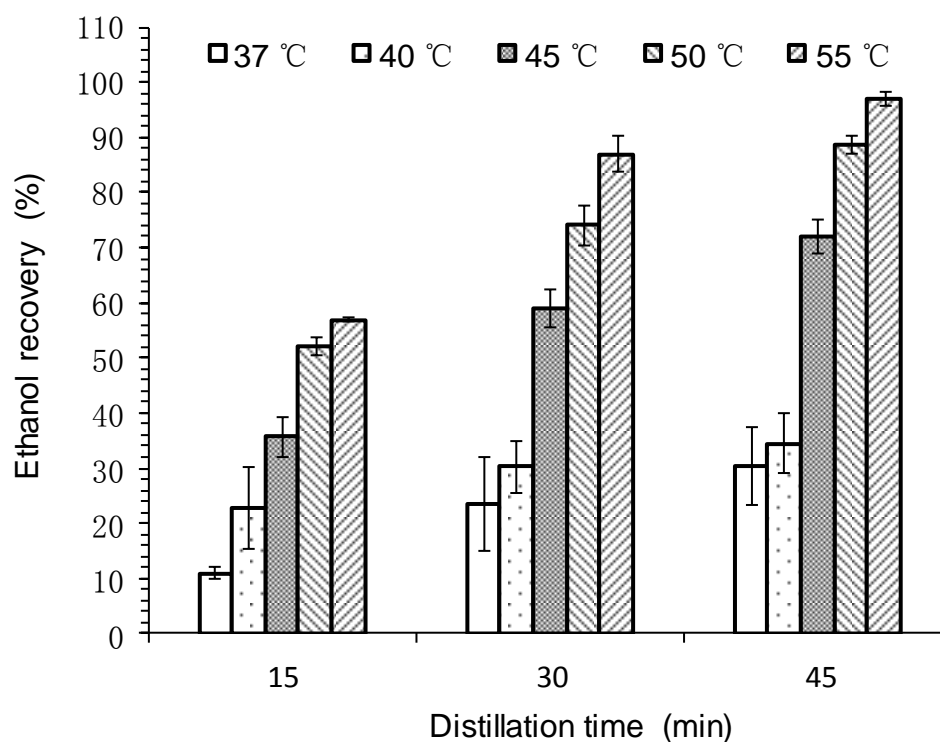


图 2.6 在不同减压蒸馏温度下对乙醇回收率影响

Fig. 2.6 Effect of the ethanol recovery in distillate under different vacuum distillation temperature. Operating conditions: pressure 15 mm mercury column, speed of stirring 150 rpm, condensing temperature -10°C .

2.3.3 减压蒸馏温度和乙醇对纤维素酶相对酶活的影响

从图 2.7 可以看出, 在含有乙醇的酶溶液中, 随着减压蒸馏时间的延长, 纤维素酶的相对酶活都有所降低, 但下降不严重, 基本都保留了 90% 的酶活。对比 50°C 和 55°C , 55°C 时纤维素酶的相对酶活要下降要多一些, 可能由于纤维素酶的最适酶活温度是 50°C , 55°C 要高于纤维素酶的最适温度, 会导致纤维酶的少量失活, 因而 55°C 时纤维素酶的相对酶活下降的更多一些。

接着, 考察有无乙醇对纤维素酶的相对酶活是否有影响, 从图 2.7 中, 看出在 50°C 条件下, 有无乙醇对纤维素酶的相对酶活基本没有下降, 说明在低于 50 g/L 的乙醇溶液中, 不会对纤维素酶的相对酶活造成影响。

因此, 有无乙醇和减压蒸馏操作对纤维素酶相对酶活几乎没有影响, 但是减压蒸馏时间增加会造成纤维素酶的相对酶活下降, 且高温也会影响其相对酶活, 因此综合实验 2.3.2 和 2.3.3 的结果, 选择减压蒸馏温度 50°C , 减压蒸馏时间 30 分钟。

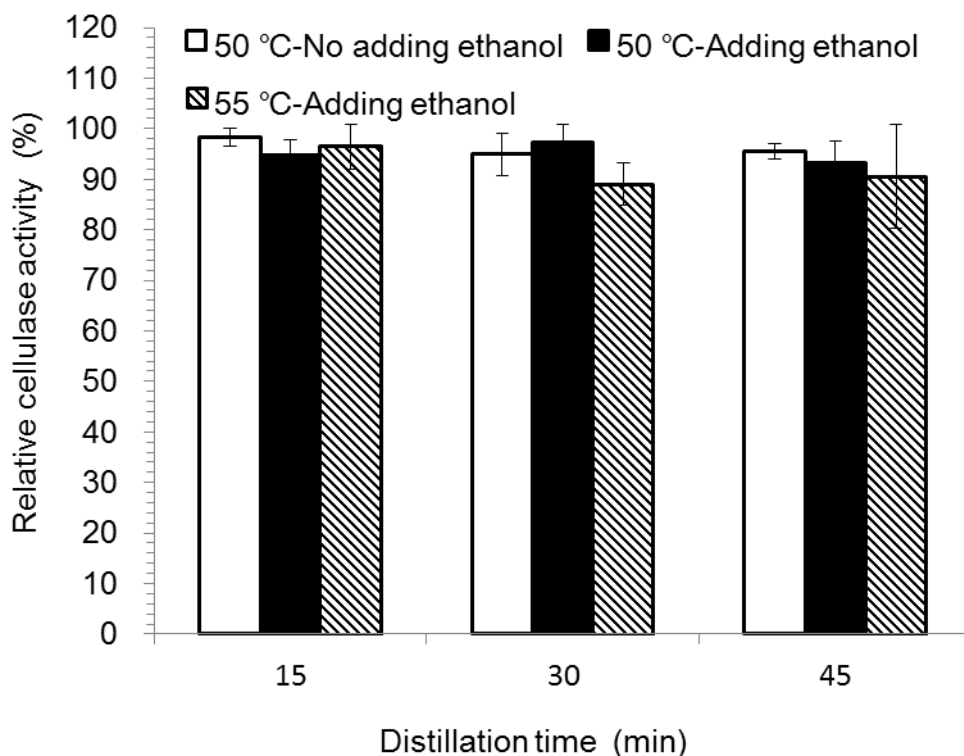


图 2.7 减压蒸馏温度和乙醇对纤维素酶相对酶活的影响

Fig. 2.7 Effect of relative cellulase activity under different vacuum distillation temperature and ethanol. Operating conditions: pressure 15 mm mercury column, speed of stirring 150 rpm, condensing temperature -10°C .

2.3.3 减压蒸馏不同浓度乙醇对乙醇收率的影响

由于前面确定了减压蒸馏的温度和时间，接着考察了在此条件下，对不同浓度乙醇溶液中乙醇的回收率的影响，为后续的玉米芯工业残渣生产乙醇在乙醇达到何浓度时进行减压蒸馏提供依据。从图 2.8 (a) 中可以看出，随着乙醇溶液浓度的增加，蒸馏液中乙醇浓度不断升高，在 82 g/L 乙醇溶液进行减压蒸馏时，蒸馏液中乙醇浓度能达到 281 g/L，可以看出，浓度越高得到的减压蒸馏乙醇浓度越高，对后续的乙醇提纯越有利。然而从图 2.8 (b) 乙醇回收率并没有随着乙醇浓度的升高而增加，而是几乎保持不变的，保持在 70% 左右。总的来说，在相同的温度，减压蒸馏相同的时间，乙醇的回收率几乎不变，但是乙醇溶液浓度越高，得到乙醇的蒸馏液浓度越高，对后续精馏提纯乙醇越有利。

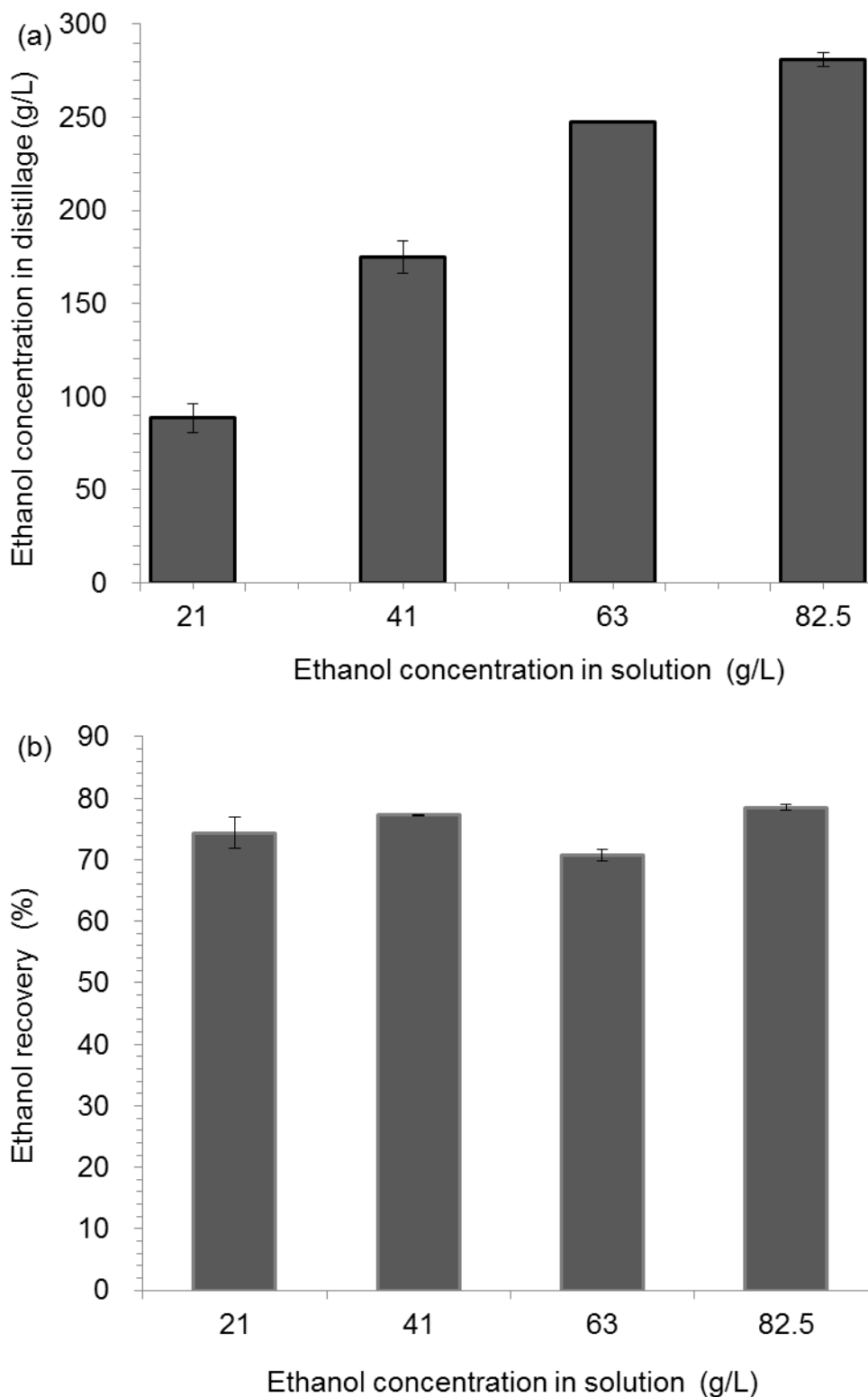


图 2.8 减压蒸馏不同浓度的乙醇对乙醇浓度和乙醇回收率的影响 (a) 在蒸馏液中乙醇浓度 (b) 乙醇回收率

Fig. 2.8 Effect of the ethanol concentration and ethanol recovery at different concentration of ethanol solution under vacuum distillation process. (a) Ethanol concentration in distillate, (b) Ethanol recovery. Operating conditions: heating temperature 50 °C , pressure 15 mm mercury column, speed of stirring 150

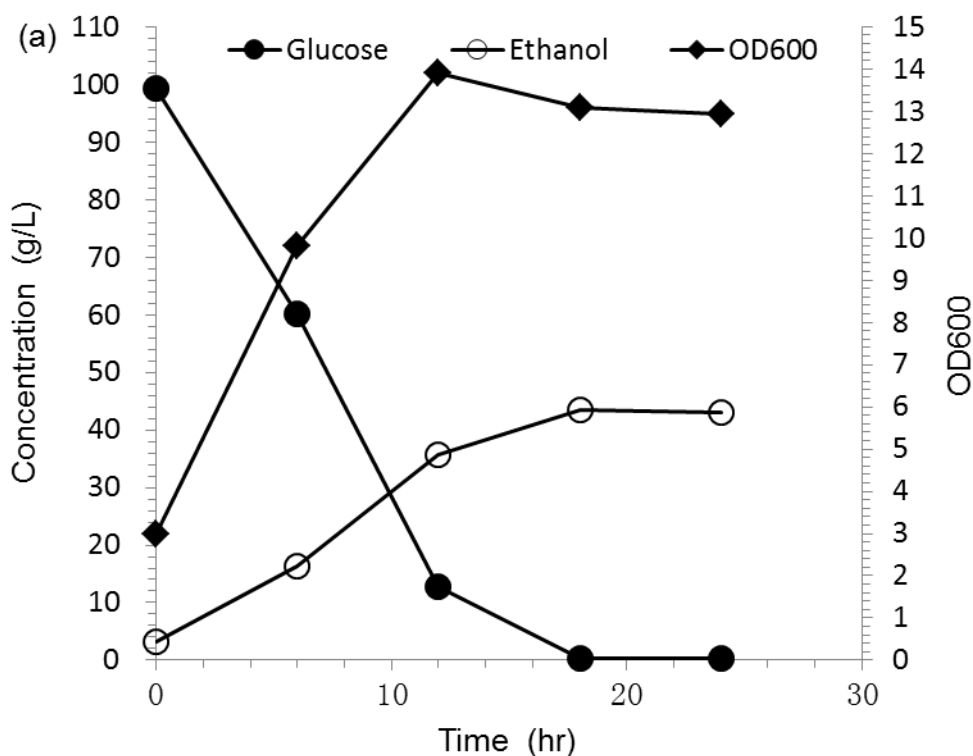
rpm, condensing temperature -10°C .

2.3.5 酵母菌在合成培养基和玉米芯工业残渣水解液中的发酵性能

之前已经研究了减压蒸馏过程中乙醇的回收率以及对纤维素酶酶活的影响，但对在减压蒸馏过程中酿酒酵母的发酵性能还没研究，因而，下面进行了采用间歇减压蒸馏和补充葡萄糖的方式，考察酿酒酵母在合成培养基和玉米芯工业残渣水解液中的发酵性能。

2.3.5.1 采用减压蒸馏和补糖的方式，考察酿酒酵母在合成培养基中的发酵性能

从图 2.9 (a) 中可以看出，在含 100 g/L 的葡萄糖合成培养基中，酿酒酵母在 12 小时将葡萄糖几乎消耗完全，而此时酿酒酵母的 OD_{600} 达到最大，此后酿酒酵母的 OD_{600} 开始下降，说明酿酒酵母 12 小时后由于葡萄糖消耗殆尽，开始进入衰亡期，因此在图 2.9 (b) 中选择 12 小时时进行减压蒸馏，这样可以保持酵母菌较高的活性，然后补充葡萄糖后能继续保持高效的发酵速率。从图 2.9 (b) 中可以看出，酿酒酵母每个批次都具有较高的发酵性能，每隔 12 小时，乙醇浓度都能达到一致，且没有残余的葡萄糖存在，此外由于整个发酵过程中，营养充足，酿酒酵母在整个过程中 OD_{600} 持续增加，但后面 4 个批次，酿酒酵母菌体有个先增加后减少的过程，说明在这个过程中有部分菌体解体，但是总的来说，酿酒酵母在合成培养基中，经过 4 次减压蒸馏和补充葡萄糖，能够保持良好的活性，实现酿酒酵母的循环利用。



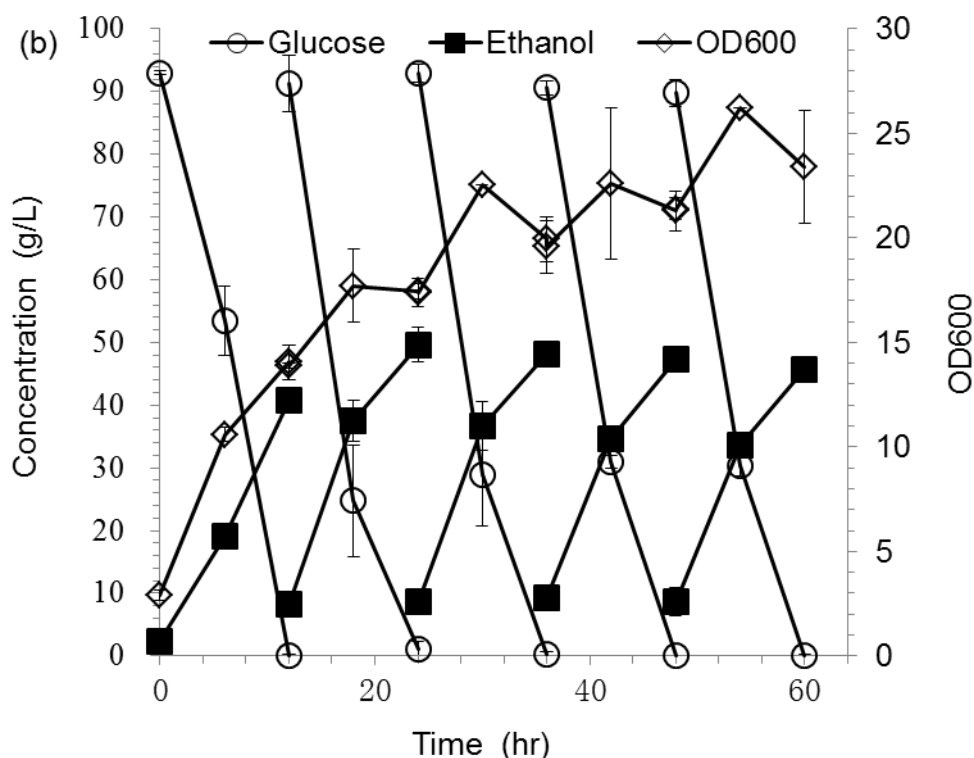


图 2.9 酿酒酵母在合成培养基中发酵 (a) 没有减压蒸馏和补葡萄糖 (b) 减压蒸馏和补充葡萄糖
 Fig. 2.9 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 fermentation in synthetic medium. (a) No vacuum distillation and glucose supplement, (b) Vacuum distillation and glucose supplement.

2.3.5.2 采用间歇减压蒸馏和补糖的方式，考察酿酒酵母在玉米芯工业残渣水解液中的发酵性能

在合成培养基中，采用间歇减压蒸馏和补充葡萄糖的方式，酿酒酵母能保持良好的发酵性能，进而考虑在玉米工业芯残渣水解液中能否保持良好的发酵性能，为了验证能否在玉米芯工业残渣中直接进行乙醇生产进行验证。

从图 2.10 (a) 中可以看出，在含有 100 g/L 的葡萄糖的玉米芯工业残渣水解液中酿酒酵母在 18 小时将近消耗完全，而此时酵母菌的 OD_{600} 达到最大，并保持一段时间的平稳期后开始下降，说明酿酒酵母 18 小时后由于葡萄糖消耗殆尽，保持一段时间的稳定期后进入衰亡期，因此在图 2.10 (b) 中选择 18 小时时进行减压蒸馏，这样可以保持酿酒酵母较高的活性，然后补充葡萄糖，继续进行高效的发酵。但是与在合成培养基中发酵情况相比，发酵时间延长了 6 小时，原因可能在于开始接入的酿酒酵母的菌体量低或玉米芯工业残渣水解液中存在抑制物，抑制了酿酒酵母的生长和发酵。

从图 2.10 (b) 中可以看出，酵母菌每个批次都具有较高的发酵性能，每隔 18 小时，乙醇浓度都能达到一致，但是随着发酵批次的进行，每次补充葡萄糖 18 小时后，剩余葡萄糖的浓度都会增加，且在第四批次发酵时，18 小时时剩余葡萄糖浓度升值达到了 20 g/L，主要原因在于采用玉米芯工业残渣水解液发酵时，有乙酸产生，且随着批次发酵的进行，乙酸浓度不断增加，抑制了酵母菌的发酵。但是，总的来说，酵母

菌在玉米芯工业残渣水解中, 经过 3 次间歇减压蒸馏和补充葡萄糖, 虽然有剩余葡萄糖存在, 然而每个批次乙醇的生成速率基本保持不变, 因而在玉米芯工业残渣水解液中酿酒酵母能够保持的良好活性, 实现酿酒酵母的循环利用, 为酿酒酵母在玉米芯工业残渣生产乙醇过程中进行纤维素酶的循环利用提供了有力的支持。

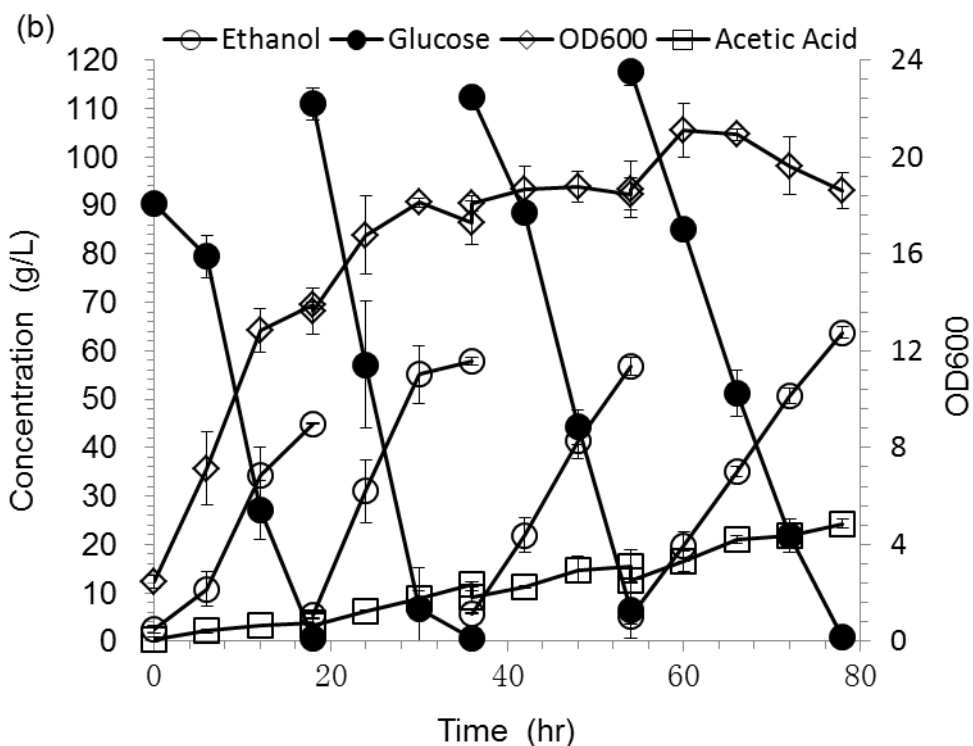
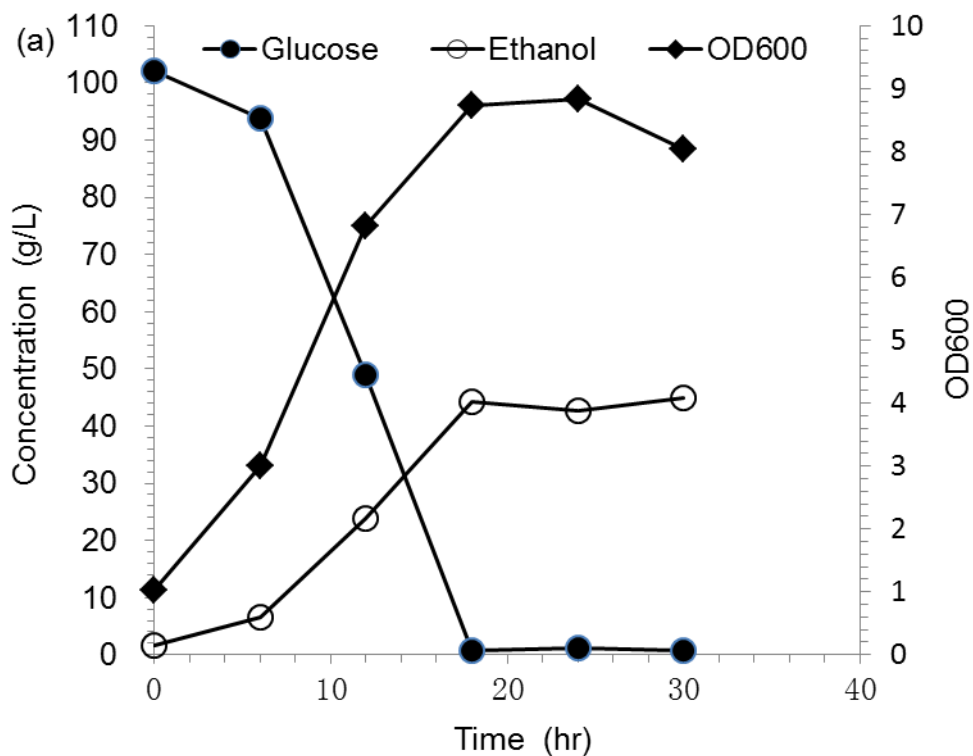


图 2.10 酿酒酵母在玉米芯工业残渣水解液中发酵 (a) 没有减压蒸馏和补葡萄糖 (b) 减压蒸馏和补充葡萄糖

Fig. 2.10 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 fermentation in the hydrolysate of corncob residue.(a) no vacuum distillation and glucose supplement, (b) vacuum distillation and glucose supplement.

2.3.6 玉米芯工业残渣 SSF 过程中进行纤维素酶的循环利用

前面已经对减压蒸馏的温度、时间、以及减压蒸馏对纤维素酶的活性进行了研究, 此外还通过酿酒酵母在玉米芯工业残渣水解液中的发酵, 以及进行间歇减压蒸馏和补充葡萄糖, 考察其发酵性能, 表明在减压蒸馏过程中, 酿酒酵母具有良好的发酵性能, 为在玉米芯工业残渣SSF生产乙醇进行纤维素酶的循环利用提供了支持, 因而, 下面进行在玉米芯工业残渣进行SSF生产乙醇, 实现纤维素酶的循环利用的研究。

在玉米芯工业残渣SSF生产乙醇进行纤维素酶循环利用时, 首先进行的15%固含量玉米芯工业残渣SSF生产乙醇, 将15%固含量的玉米芯工业残渣在15 FPU/g DW的条件下预糖化12小时, 然后发酵60小时。从图2.11 (a) 中, 预糖化得到初始糖浓度为43.2 g/L, 在24小时时几乎没有葡萄糖剩余, 在36小时时乙醇的生成速率下降, 说明此时糖化速率下降, 因而选择此时作为15%固含量的玉米芯工业残渣乙醇生产中纤维素酶循环利用实验中减压蒸馏的节点, 将乙醇蒸馏出来, 然后补加新的物料以及部分营养盐, 且不添加纤维素酶, 新的物料将吸附在木质素上纤维素酶解吸附下来, 继续酶解新的物料, 使其能保持较高的酶解速率继续发酵, 从而将纤维素酶酶量的降低, 实现纤维素酶的循环利用。在15%固含量的玉米芯工业残渣乙醇生产中纤维素酶循环利用中, 减压蒸馏后乙醇能继续生成, 但乙醇的生成速率下降, 且60小时后由于有乳酸的生成。此外, 15%固含量的玉米芯工业残渣在10 FPU/g DW 条件下进行SSF作为对照。

在 30%固含量玉米芯工业残渣 SSF 生产乙醇进行纤维素酶循环利用时, 首先进行的 30%固含量玉米芯工业残渣 SSF 生产乙醇, 将 30%固含量的玉米芯工业残渣在 15 FPU/g DW 的条件下预糖化 12 小时, 然后发酵 120 小时。从图 2.11 (a) 中, 预糖化得到初始糖浓度为 73.2 g/L, 在 36 小时时几乎没有葡萄糖剩余, 且从 48 小时开始乙醇的生成速率下降, 此时糖化速率下降, 说明纤维素酶大部分已与木质素结合, 影响纤维素酶的糖化, 而此时乙醇的浓度达到 56.8 g/L, 会对酿酒酵母的发酵产生抑制作用并对纤维素酶产生毒害作用, 因而选择此时作为 30%固含量的玉米芯工业残渣乙醇生产中纤维素酶循环利用实验中减压蒸馏的节点, 将乙醇蒸馏出来, 然后补加新的物料以及部分营养盐, 而不添加纤维素酶, 将吸附在木质素上纤维素酶解吸附下来, 继续酶解新的物料, 并继续发酵, 从而将纤维素酶的酶量的降低, 实现纤维素酶的循环利用。

在 30%固含量的玉米芯工业残渣乙醇生产中纤维素酶循环利用中, 在每次减压蒸馏结束并补充新的物料后, 乙醇浓度都有增加, 但在第二次减压蒸馏结束后, 乙醇浓度增加缓慢, 且在 72 小时时有乳酸生成。主要由于纤维素酶随着发酵时间的延长活性

降低以及木质素的大量积累且与纤维素酶不可逆的吸附，造成释放糖的速率下降和酿酒酵母的生长状况不佳，进而影响乙醇的生产速率。此外由于操作条件较开放，引起乳酸菌的污染，产生乳酸使得乙醇生成速率减慢。

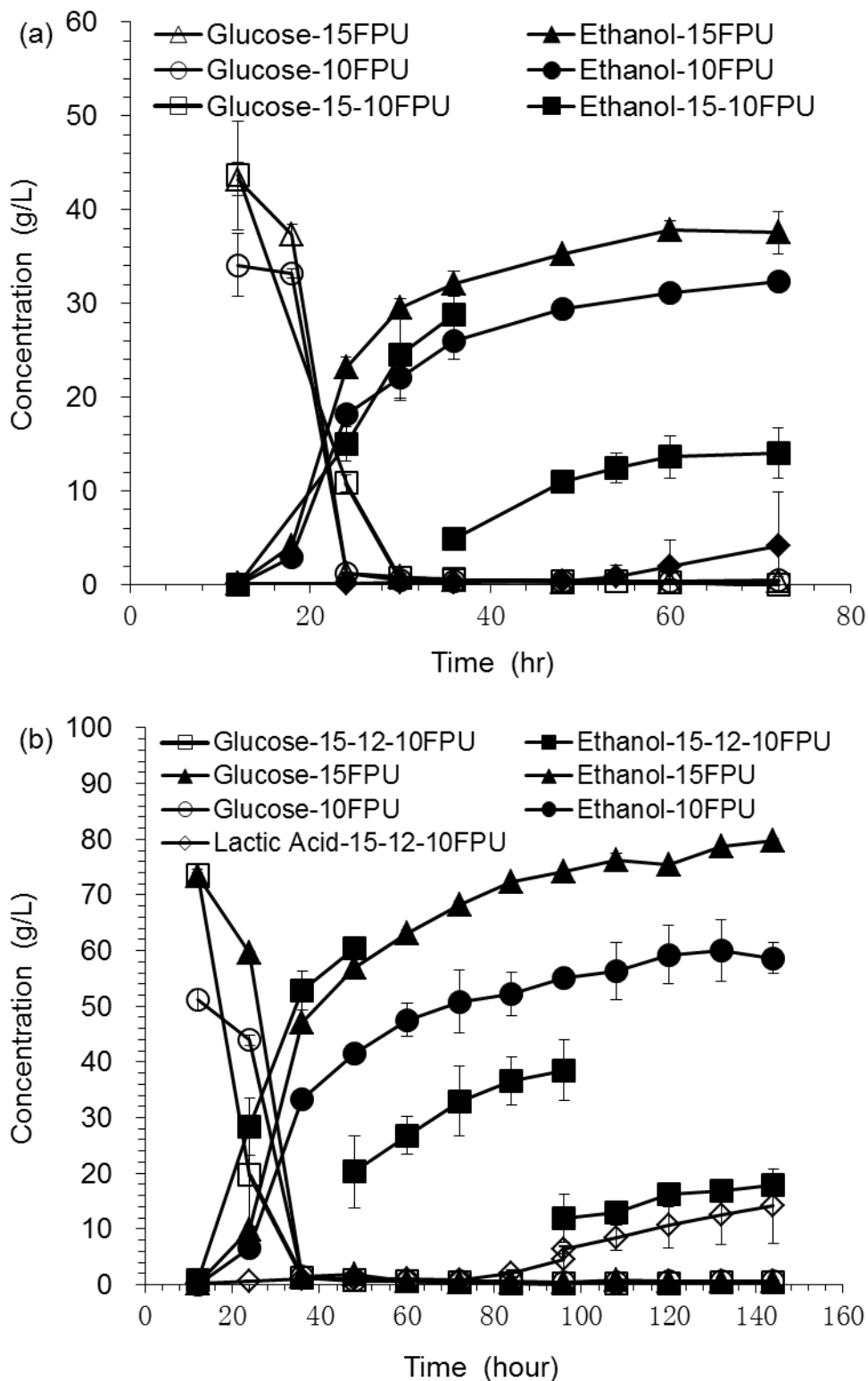


图 2.11 不同固含量玉米芯工业残渣 SSF 生产乙醇中纤维素酶的循环利用 (a) 15% 固含量 (b) 30% 固含量

Fig. 2.11 Cellulase enzyme recycling for SSF operation at different solids corn cob residue producing

ethanol under vacuum distillation and fed-batch. (a)15% solids loading, (b) 30% solids loading.

从表2.4可以看出，纤维素酶循环利用实验乙醇的得率要比10 FPU酶用量乙醇得率高，但是比15 FPU酶用量乙醇得率要低，尤其在30%固体含量玉米芯工业残渣同步糖化与发酵过程中，通过减压蒸馏和补料的方式将纤维素酶用量从15FPU/g DM降低到10 FPU/g DM，乙醇的得率高达83.69%，比常规的在10 FPU/g DM酶量下的同步糖化与发酵过程乙醇得率高出19.72%，是15 FPU/g DM酶量下乙醇得率的0.934倍。主要原因在高的固体含量下，乙醇浓度高会对酿酒酵母的发酵产生抑制作用，抑制乙醇的生产，及时将乙醇移除，有利于酿酒酵母的发酵，因此乙醇的得率更高且与15 FPU酶用量乙醇得率接近。因而，玉米芯工业残渣生产乙醇过程中纤维素酶循环利用在高固体含量下更为有效，若能将玉米芯工业残渣中的木质素完全除去，将会对纤维素酶的循环利用更为有利。

在玉米芯工业残渣SSF生产乙醇过程，采用间歇减压蒸馏和分批补料的方式，能降低纤维素酶的用量，实现纤维素酶的循环利用。在高固含量下，纤维素酶循环利用实验得到乙醇得率更高，且与节约了三分一酶用量的乙醇得率接近，这样为高固含量下乙醇生产过程中纤维素酶循环利用提供了支持。文中采用间歇减压蒸馏，避免了实验过程中减压蒸馏能耗过大以及二氧化碳不凝气体难以排出的问题，同时减压蒸馏得到的乙醇浓度高，为乙醇提纯节约了能耗。

表 2.4 玉米芯工业残渣 10FPU、15FPU 酶用量和纤维素酶循环利用的乙醇得率

Table 2.4 Yield of the ethanol at the cellulase of 10FPU, 15FPU and the cellulase recycling in fermenting corncob residue

	15%固含量	30%固含量
10 FPU酶用量乙醇得率	66.30	69.90
15 FPU酶用量乙醇得率	76.07	89.56
纤维素酶循环利用乙醇得率	67.80	83.69

2.4 小结

本论文研究了主要研究了在减压蒸馏的条件下，减压蒸馏温度对乙醇收率的影响以及乙醇对纤维素酶活力的影响，选择了减压蒸馏的时间和温度，然后在相同减压蒸馏温度和时间内，考察了对不同浓度乙醇溶液中乙醇回收率的影响，进而采用间歇减压蒸馏和补充葡萄糖方式，考察酿酒酵母在合成培养基和玉米芯工业残渣水解液中的发酵性能，验证了酿酒酵母采用间歇减压蒸馏方式进行发酵的可行性，最后在15%和30%玉米芯工业残渣发酵中，通过减压蒸馏减少乙醇对酵母菌的抑制，以及补充新的物料，降低纤维素酶的用量，从而进行纤维素酶循环利用，并提高了纤维素的转化率。

(1) 在乙醇溶液中，在不同的减压蒸馏时间和温度对乙醇回收率及纤维素酶的酶活的影响，选择减压蒸馏的温度 50 °C 和减压蒸馏时间 30 分钟。

(2) 在 50 °C 减压蒸馏温度下, 对不同浓度的乙醇溶液中乙醇收率没有影响, 都在 70% 左右。

(3) 在减压蒸馏和补充葡萄糖的条件, 对酿酒酵母在合成培养基和玉米芯工业残渣水解液中发酵性能的研究, 表明酿酒酵母在两种培养基中, 都具有很好的发酵性能, 但在玉米芯工业残渣水解液中, 发酵速率要慢, 每个批次发酵的时间要更长。

(4) 在玉米芯残渣同步与糖化生产乙醇进行纤维素酶循环利用中, 在 30% 固体含量玉米芯工业残渣同步糖化与发酵过程中, 通过减压蒸馏和补料的方式将纤维素酶用量从 15 FPU/g DM (dry material, DM) 降低到 10 FPU/g DM, 乙醇的得率高达 83.69%, 比常规的在 10 FPU/g DM 酶量下的同步糖化与发酵过程乙醇得率高出 19.72%, 是 15 FPU/g DM 酶量下乙醇得率的 0.934 倍。

第三章 高浓度纤维素乳酸发酵醪的固液分离

3.1 前言

乳酸是生产众多化学品的中间体，具有广泛的运用前景。由于化石燃料的大量开采和使用使人类面临着传统能源枯竭的危机，同时也引发了日益严重的环境问题。人们将乳酸的生产逐渐转向丰富的、可再生的木质纤维素原料。

在木质纤维素原料转化为乳酸时，一般采用同步糖化与发酵工艺，这中工艺既可以增加糖化速率，减少对发酵过程的底物抑制，同时也能得到较高浓度的发酵产物，减少分离成本。为了得到高浓度的发酵产物，降低分离的成本，需要在高固体含量的条件下进行同步糖化与发酵，但是由于发酵结束后，固体含量高，实现产物的有效分离是一大难点。目前人们常用的方法有离心、板框压滤等。然而，离心耗能大，而且设备昂贵；压滤由于发酵醪粒径小，易堵塞压滤袋上的孔径，压力较大，易造成压滤袋破损，难以实现发酵液和固体残渣的分离。因而，寻找一种新的经济实用的木质纤维素乳酸发酵醪固液分离的方法具有重要意义。

荷兰普拉克生化公司开发了一种采用絮凝的方式将乳酸从生物质中分离出来的方式，该方法首先将乳酸发酵醪碱化，然后加入一种或多种絮凝剂，接着通过过滤或离心的方式得到含乳酸盐/乳酸的透明溶液和生物质沉淀物，能回收大部分乳酸，然后可以采用传统的乳酸精炼方式得到乳酸。但是，乳酸发酵醪在加入絮凝剂之前被碱化，这就造成得到澄清液含有大量的木质素磺酸盐，使得后续的乳酸纯化造成困难。因而，能寻找一种直接絮凝且不需对玉米秸秆乳酸发酵醪进行处理的絮凝剂十分重要。

本研究是基于本实验室自行发酵生产的高固含量玉米秸秆乳酸发酵醪，由于其分离困难，因而为了实现玉米秸秆乳酸发酵醪分离，实现中直接向玉米秸秆乳酸发酵醪中添加絮凝剂，然后采用循环水真空循环泵将絮凝的玉米秸秆乳酸发酵醪以抽滤的方式实现固液分离。本文研究了玉米秸秆乳酸发酵醪的粒径，最佳絮凝剂的选择和用量以及在最佳絮凝剂的条件下，考察了搅拌时间，温度，pH 对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝结果的影响并确定其最优絮凝条件以及在这种条件下乳酸的回收率。

3.2 材料和方法

3.2.1 原料

实验所用的木质纤维素乳酸发酵醪是采用乳酸片球菌 *P.acidilactic* DQ2 进行 25% 固含量脱毒玉米秸秆同步糖化与发酵得到乳酸发酵醪。

3.2.2 实验试剂和设备

见 2.2.3。

3.2.3 所需溶液

壳聚糖溶液：将壳聚糖加入去离子水中，并加入 1% 的乙酸，待其完全溶解后倒入容量瓶中定容，得到 10 g/L 的壳聚糖溶液。

硫酸铝溶液：将其固体直接融入去离子水中，然后在容量瓶中定容，得到所需浓度的溶液。硫酸铝钾、聚丙烯酸钠和聚丙烯酰胺的溶液配制方法相同。

3.2.1 实验方法

3.2.4.1 玉米秸秆乳酸发酵醪固液分离工艺流程图

将与絮凝剂混合好的玉米秸秆乳酸发酵液倒入带有滤纸的布氏漏斗中，然后开启循环水真空泵，记录抽滤瓶不同时刻抽滤液的体积，用于判断絮凝效果的好坏。

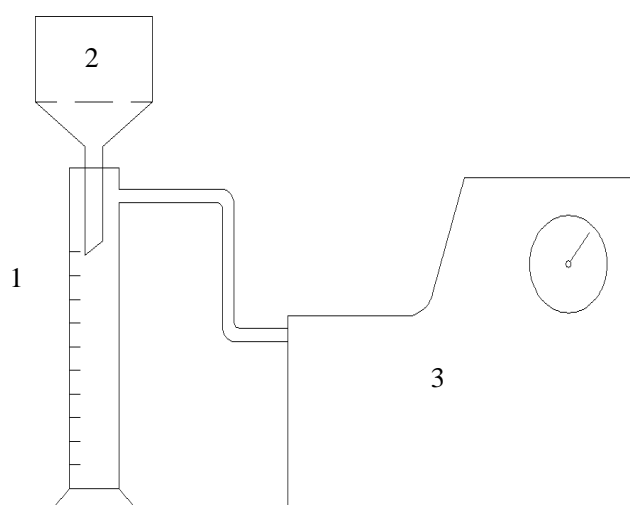


图 3.1 玉米秸秆乳酸发酵醪固液分离工艺流程图

Fig. 3.1 Flow chart of solids/liquid separation in lactic acid fermented slurry. 1. Suction flask with scale, 2. Buchner funnel, 3. Circulating water vacuum pump.

3.2.4.2 玉米秸秆乳酸发酵醪粒径分布的测定

粒度的测定采用马尔文激光粒度仪-2000 测定。

3.2.4.3 玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝实验

测定玉米秸秆乳酸发酵醪含水量，然后用量筒量取 100 ml，并电子天平称取其质量，将其倒入 150 ml 烧杯中；在室温条件下，加入絮凝剂溶液，用玻璃棒搅拌 5 分钟，使其混合均匀；将混合液全部转入到带有单层定性滤纸的布氏漏斗中，布氏漏斗下面连接带有刻度的抽滤瓶，开启循环真空泵使其压力达到 15 mm 汞柱，抽滤，记录不同时刻抽滤瓶中乳酸清液的体积并测定其最终浓度。

3.2.4.4 搅拌时间对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响

向玉米秸秆乳酸发酵醪中加入壳聚糖溶液 8 ml，在室温下分别搅拌 0 秒、5 秒、10 秒、15 秒和 30 秒，将混合液全部转入到带有单层定性滤纸的布氏漏斗中，布氏漏

斗下面连接带有刻度的抽滤瓶，开启循环真空泵使其压力达到 15 mm 汞柱，抽滤，记录不同时刻抽滤瓶中乳酸清液的体积。

3.2.4.5 温度对玉米秸秆乳酸发酵絮凝的影响

将玉米秸秆乳酸发酵醪调至 10 °C、20 °C、27.8 °C、30 °C 和 40 °C，分别加入壳聚糖溶液 8 mL，搅拌 10 秒，其他操作同 3.2.4.3。

3.2.4.6 pH 对玉米秸秆乳酸发酵絮凝的影响

将玉米秸秆乳酸发酵醪 pH 调至 3、4、5.5、6、8 和 10，然后加入壳聚糖溶液 8 ml，在室温下搅拌 10 秒，其他操作同 3.2.4.3。

3.2.5 分析方法

3.2.5.1 乳酸浓度的测定

参照 2.2.6.4。

3.2.5.2 玉米秸秆乳酸发酵醪中乳酸回收率的计算

玉米秸秆乳酸发酵醪中乳酸回收率计算公式为：

$$\text{乳酸回收率 (\%)} = \frac{V_1 \times [C_1]}{W_c \times M \times [C_0]} \times 100\% \quad (3-1)$$

其中，

$[C_0]$ 是玉米秸秆乳酸发酵醪中乳酸浓度，单位：g/L；

M 是添加絮凝剂前玉米秸秆乳酸发酵醪的质量，单位：g；

W_c 是添加絮凝剂前玉米秸秆乳酸发酵醪的含水量，单位：%；

$[C_1]$ 是抽滤后抽滤液中乳酸浓度，单位：g/L；

V_1 是抽滤后抽滤液的体积，单位：L；

3.3 结果与讨论

3.3.1 玉米秸秆乳酸发酵醪粒径分布

从图 3.2 中可以看出，玉米秸秆乳酸发酵醪液中颗粒的粒径大部分集中在 0.399 μm 到 320.536 μm，在 0.2 μm- 1 mm 范围内，属于悬浮液与悬浊液体系，这种体系属于动力学不稳定体系，借重力等作用最终能沉淀下来。但是，玉米秸秆乳酸发酵醪颗粒较小沉降缓慢，且固体和液体难以分离，因而考虑采用絮凝剂使其絮凝成较大颗粒，从而容易沉降和分离。

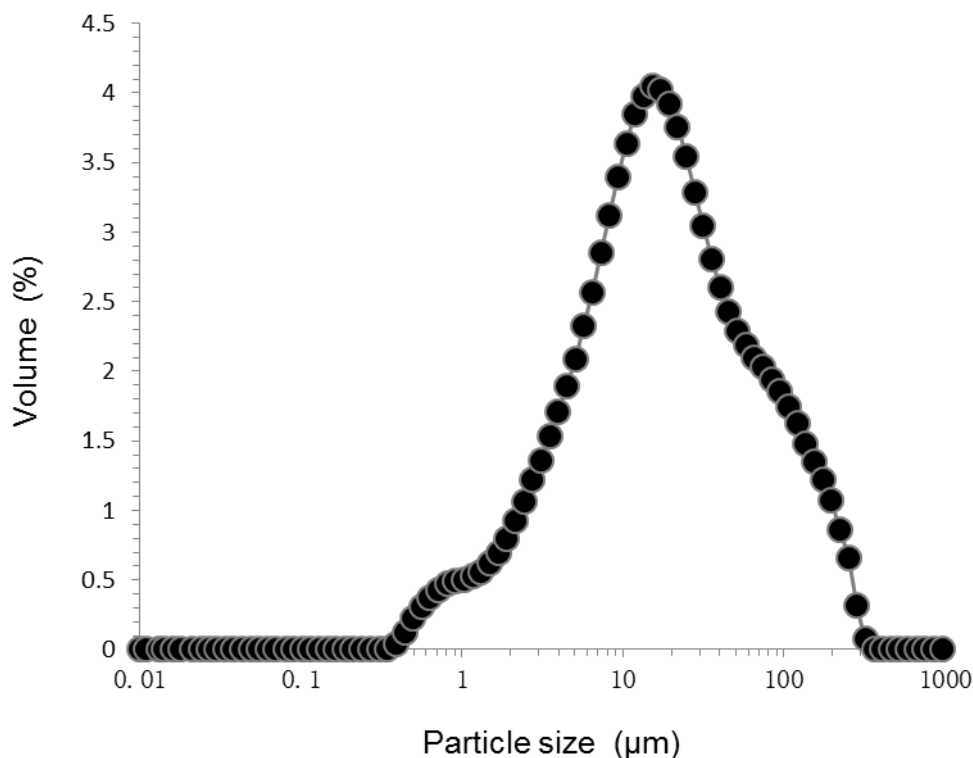


图 3.2 玉米秸秆乳酸发酵醪粒径分布

Fig. 3.2 Testing the particle size distribution of lactic acid fermented slurry

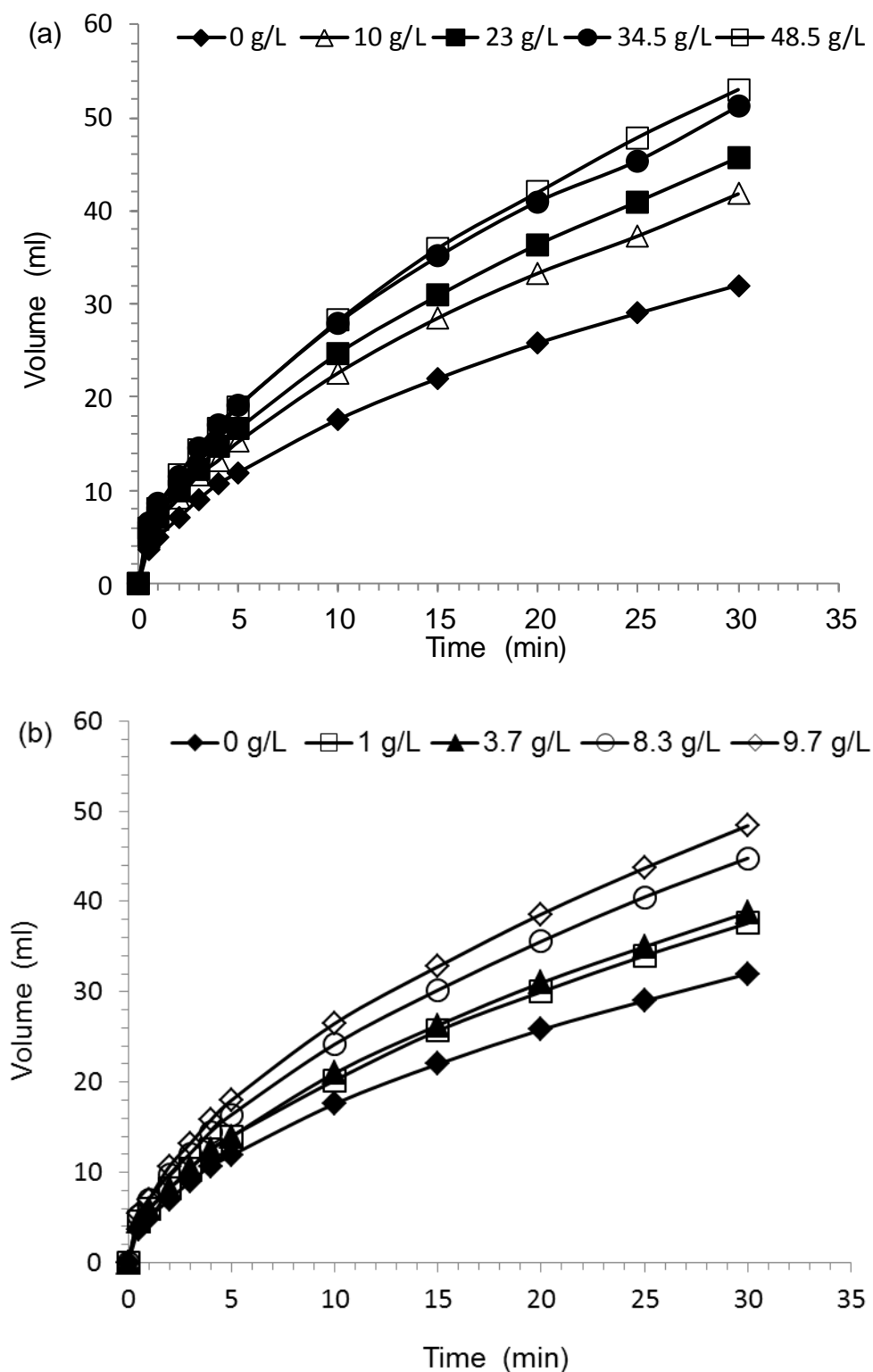
3.3.2 不同絮凝剂对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响

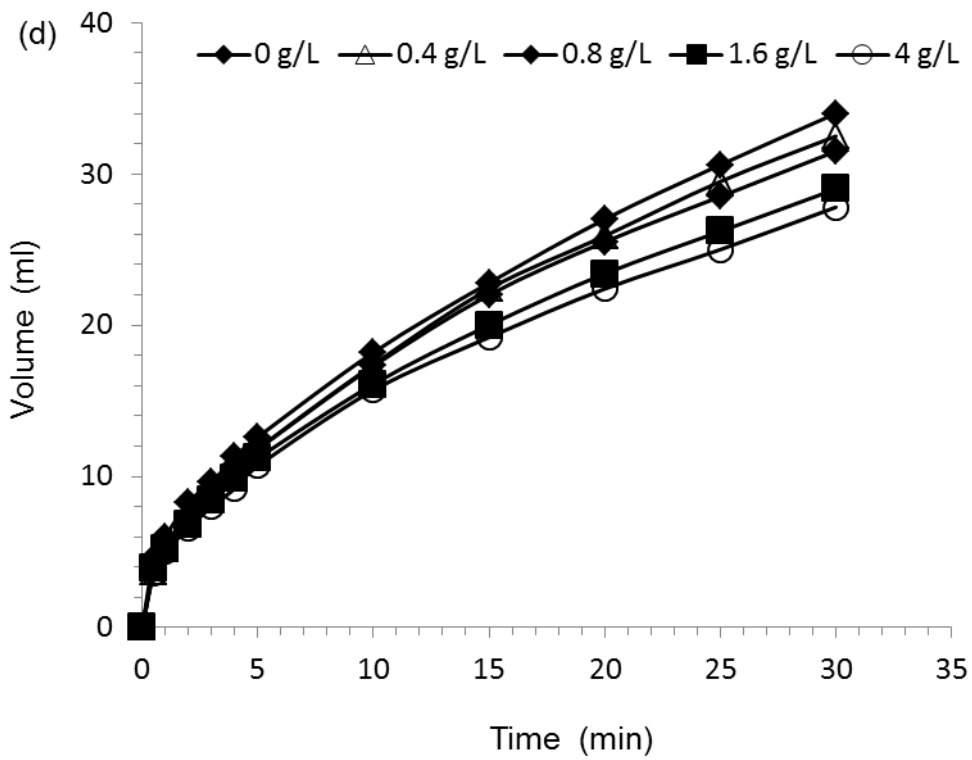
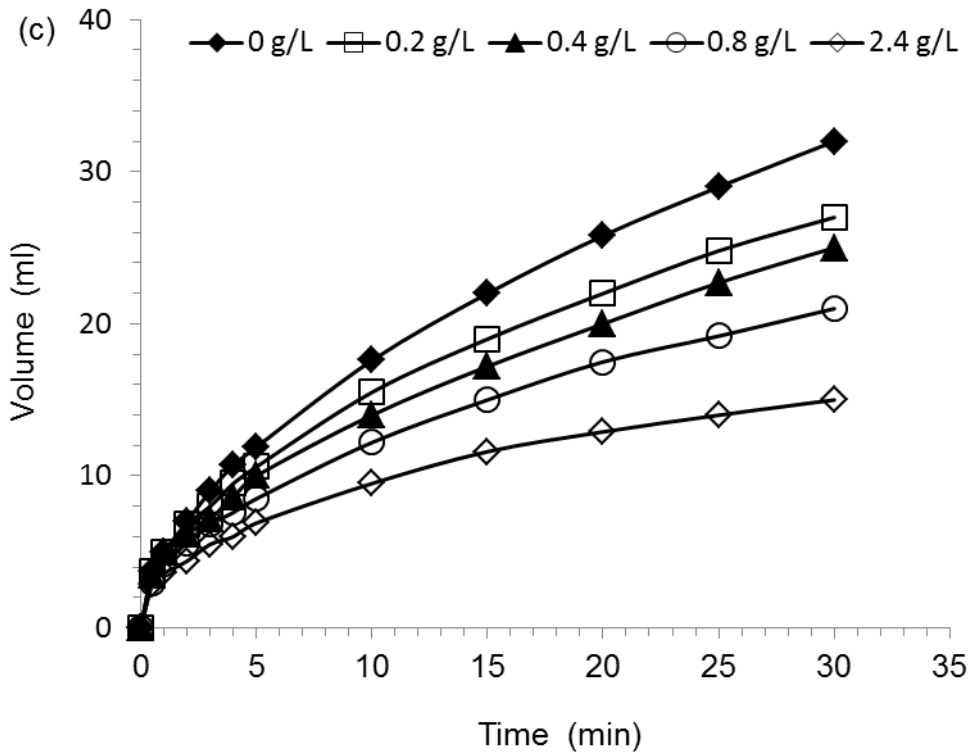
由于玉米芯乳酸发酵醪的粒径比较小，压滤会堵塞压滤袋的孔径，造成其难以固液分离；采用离心能耗较大，且在工业上运用比较困难，因此采用添加絮凝剂的方式，使其絮凝成较大的颗粒，但是采用自然沉降其分离速度慢，且分离得到的液体少，所以将絮凝后的发酵醪置于带有滤纸的布置漏斗中采用循环水真空泵抽滤的方式快速实现固液分离。

从图 3.3 中可以看出，在相同的抽滤时间下，随着 Al_2SO_4 、 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 以及壳聚糖浓度的增加，抽滤液的体积也不断增加；在同种絮凝剂中，随着絮凝剂浓度的增加，抽滤液的体积增加的速率也加快。但是聚丙烯酸钠和聚丙烯酰胺随着浓度的增加，减压抽滤得到的抽滤液体积反而减少，在同种絮凝剂中，随着絮凝剂浓度的增加，抽滤液的体积增加的速率不断减小，可能的原因是玉米芯乳酸发酵醪是一种阴离子型的溶液。而 Al_2SO_4 、 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 以及壳聚糖是阳离子型絮凝剂，聚丙烯酸钠和聚丙烯酰胺是阴离子型絮凝剂。阳离子絮凝剂能与玉米芯乳酸发酵醪发生絮凝反应，在一定范围内，浓度越高越有利于絮凝反应；阴离子絮凝剂不能与玉米芯乳酸发酵醪发生絮凝反应，反而与其中的水作用，阻碍其分离。

Al_2SO_4 、 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 以及壳聚糖都能与玉米芯乳酸发酵醪发生絮凝反应，但是由于 Al_2SO_4 添加量太大，造成抽滤液中杂质离子较多不利用后续的分选且 $\text{KAl}(\text{SO}_4)_2$ 的抽滤速率太慢不如壳聚糖得到相同体积的抽滤液速率快，此外，壳聚糖还具有絮凝细胞

的作用，这也可能是其絮凝更快的原因，因而选择壳聚糖溶液作为玉米秸秆乳酸发酵醪的絮凝剂，且壳聚糖在浓度为 0.74 g/L 时 15 分钟能分离得到 61.5 ml 的乳酸清液，但随着壳聚糖浓度的继续增加，抽滤液体积的增加量很少。因而，壳聚糖的最是浓度为 0.74 g/L。然后在 0.74 g/L 壳聚糖的玉米秸秆乳酸发酵醪中，研究搅拌时间、温度和 pH 对其絮凝结果的影响。





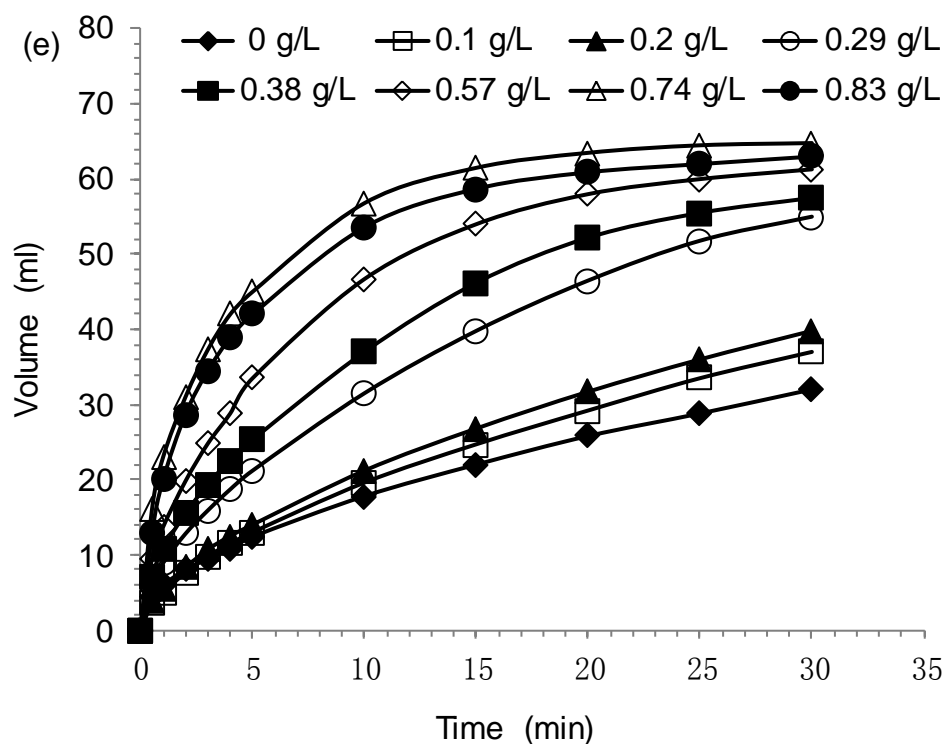


图 3.3 不同絮凝剂对玉米秸秆乳酸发酵醪的絮凝效果：(a) 硫酸铝；(b)硫酸铝钾；(c) 聚丙烯酸钠；(d) 聚丙烯酰胺；(e)壳聚糖

Fig. 3.3 Effect of flocculation in lactic acid fermented slurry at different flocculants: (a) Al_2SO_4 , (b) $KAl(SO_4)_2$, (c)Sodium Polyacrylate, (d)PAM, (e)chitosan

3.3.3 搅拌时间对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响

从图 3.4 可以看出，在添加壳聚糖溶液后，只需搅拌 10 秒，就能达到很好的絮凝效果，此后搅拌时间随着搅拌时间的延长，不会再对絮凝结果产生影响，说明壳聚糖能迅速与絮凝剂发生反应，产生絮凝效果。

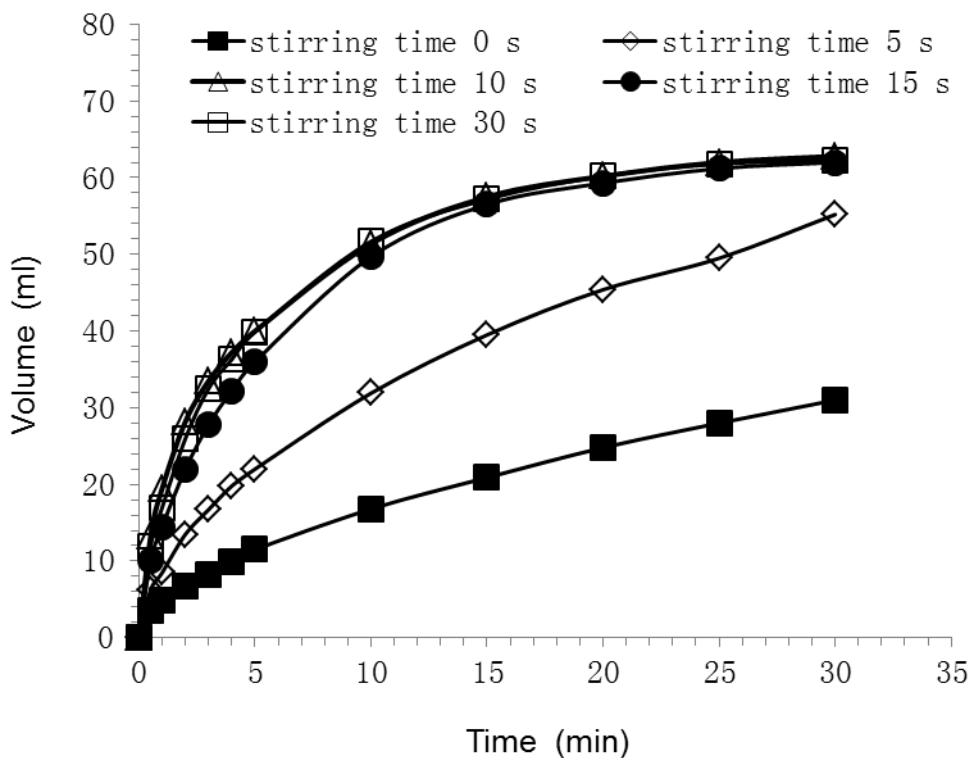


图 3.4 搅拌时间对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响

Fig. 3.4 Effect of solids/liquid separation at different stirring time on adding Chitosan

3.3.4 温度对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响

从图 3.5 可以看出，温度对絮凝结果基本没有什么影响，但温度超过 40 °C 或低于 10 °C 将会在影响抽滤的初始速率，因而将壳聚糖对玉米秸秆乳酸发酵醪的絮凝温度选择在 20–30 °C 较佳。

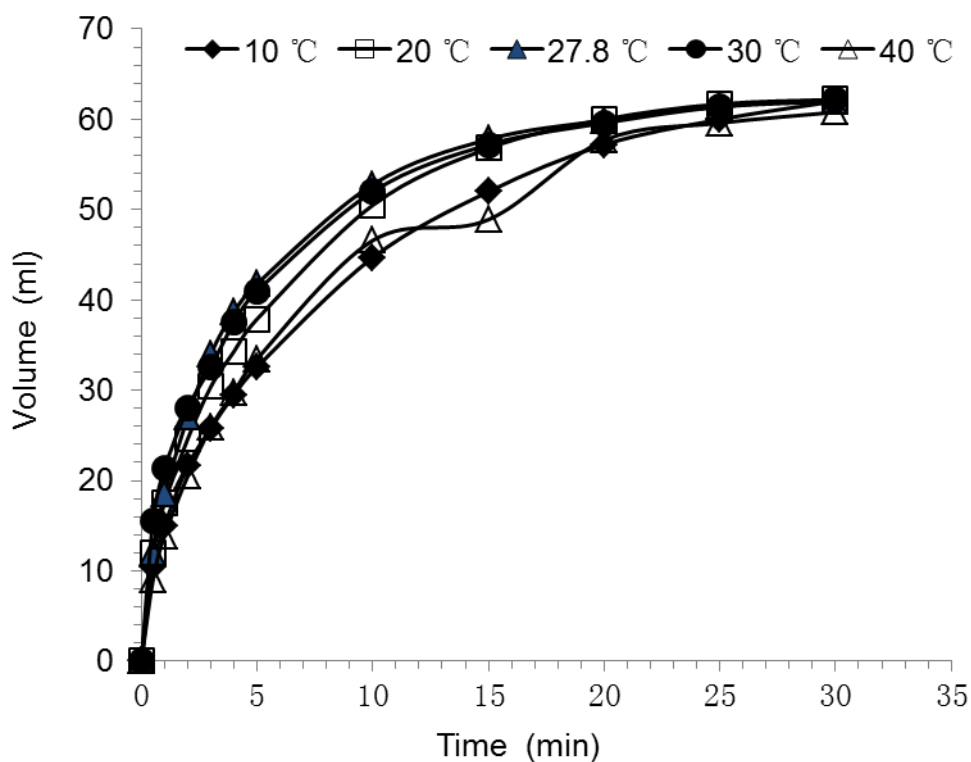


图 3.5 温度对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响

Fig. 3.5 Effect of solids/liquid separation at different temperature on adding Chitosan

3.3.5 pH 对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响

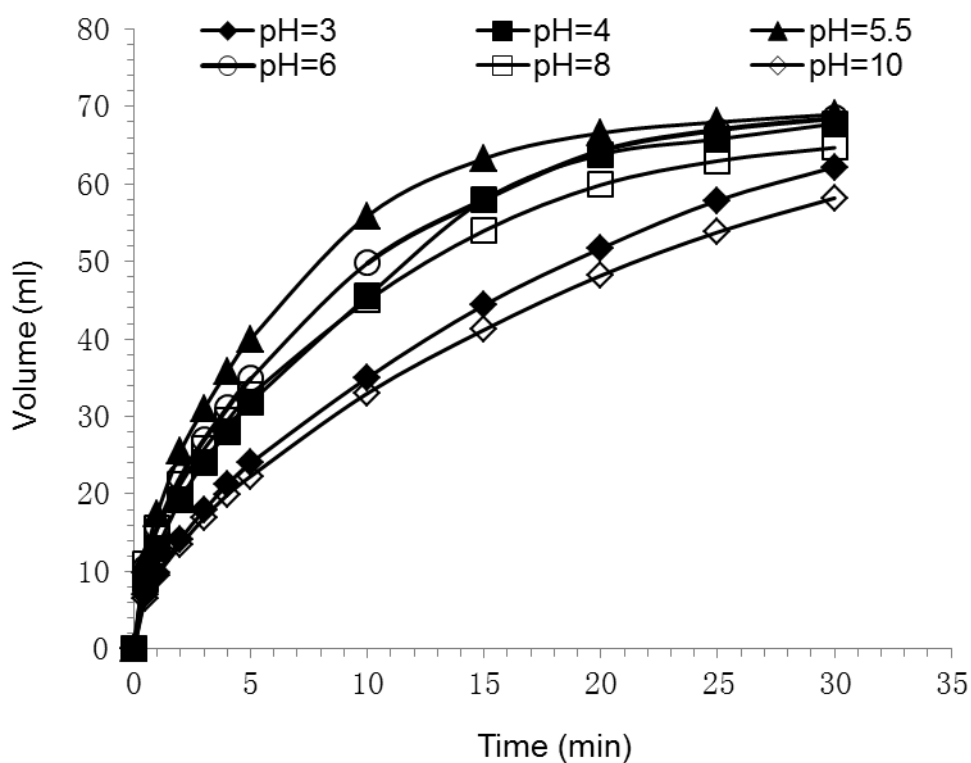


图 3.6 pH 对玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝的影响

Fig. 3.6 Effect of solids/liquid separation at different pH on adding Chitosan

从图 3.6 可以看出, pH 过高或过低都会对絮凝产生不利影响, 降低抽滤液体积的得到速率。pH 过高会溶解玉米秸秆乳酸发酵醪中的木质素, 会改变玉米秸秆乳酸发酵醪的性质, 对絮凝结果产生影响; pH 过低会造成可能会改变溶液的极性, 进而影响絮凝结果。pH 从 4 到 6 的絮凝结果基本相同, 而玉米秸秆乳酸发酵醪的 pH 为 5.5, 因此, 在絮凝过程将 pH 选为 5.5, 且不用消耗酸碱。

3.3.6 最优条件下的乳酸回收率

从上述实验得到玉米秸秆乳酸发酵醪采用壳聚糖的作为絮凝剂的最佳条件: 搅拌时间 10 秒、温度 20–30 °C、pH 为 5.5。在最佳条件下, 15 分钟乳酸的回收率 64.48%, 25 分钟乳酸的回收率达到 68.68%, 这种方式能回收玉米秸秆乳酸发酵醪中大部分乳酸, 且操作简单, 不需添加有毒絮凝剂以及增加絮凝后得到清夜中离子浓度, 不会增加后续乳酸精炼的困难, 但是对于乳酸的回收率仍然偏低, 因此这种方式有待进一步研究。

表 3.1 在最优条件下玉米秸秆乳酸发酵醪中乳酸回收率

Table 3.1 Recovery of lactic acid in lactic acid fermented slurry at optimum condition

发酵醪含水 量 (%)	发酵醪中乳 酸浓度 (g/L)	100 ml 发酵 醪的质量 (g)	15 分钟抽滤 液体积 (g/L)	15 分钟抽滤 液体积 (g/L)	15 分钟乳酸 回收率 (%)	25 分钟乳酸 回收率 (%)
58.75±0.96	67.28±0.03	110.7±0.3	59.2±0.4	63.3±0.4	64.48±0.21	68.68±0.31

3.4 小结

本论文还研究了使用絮凝剂实现玉米芯秸秆乳酸发酵醪的固液体分离, 通过不同絮凝剂对玉米秸秆乳酸发酵醪的分离结果, 确定最佳的絮凝剂, 进而对选择的絮凝剂进行搅拌时间、温度、pH 的研究, 确定絮凝的最佳条件以及此条件下的回收率。

1. 本文采用壳聚糖絮凝玉米秸秆乳酸发酵醪, 能达到很好的絮凝效果, 且最适浓度为 0.74 g/L。

2. 在对壳聚糖的最佳絮凝条件研究, 得到最佳絮凝条件为混合时间 10 秒、温度 20–30 °C、pH 为 5.5, 且在 15 分钟和 25 分钟时, 乳酸的回收率分别为 64.48% 和 68.68%。

3. 本研究开发了一种简单可行的玉米秸秆乳酸发酵醪到的分离方法, 实现玉米芯秸秆乳酸发酵醪的固液体分离。

第四章 结论与展望

4.1 结论

本论文研究了主要研究了在木质纤维素乙醇生产过程中纤维酶成本过高问题。本文玉米芯工业残渣作为原料，在玉米芯工业残渣 SSF 过程中，通过间歇减压蒸馏减少乙醇对酵母菌的抑制，以及分批补加新的物料，降低纤维素酶的用量，从而进行纤维素酶循环利用，并提高了纤维素的转化率。本论文还研究了高固含量的玉米芯秸秆乳酸发酵醪的固液体分离，开发了一种简单高效的玉米秸秆乳酸发酵醪固液分离方法。得到的结论如下：

(1) 在乙醇溶液中，考察减压蒸馏时间和温度对乙醇回收率及纤维素酶酶活的影响的结果，选择减压蒸馏的温度 50 °C 和减压蒸馏时间 30 分钟。

(2) 在减压蒸馏和补充葡萄糖的条件，对酿酒酵母在合成培养基和玉米芯残渣水解液培养基发酵性能的研究，表明在两种培养基中酿酒酵母都具有很好的发酵性能，为在玉米芯工业残渣生产乙醇进行纤维素酶循环利用提供了依据。

(3) 在 30% 固体含量玉米芯工业残渣同步糖化与发酵过程中，通过减压蒸馏和补料的方式将纤维素酶用量从 15 FPU/g DM 降低到 10 FPU/g DM, 乙醇的得率高达 83.69%，比常规的在 10 FPU/g DM 酶量下的同步糖化与发酵过程乙醇得率高出 19.72%，是 15 FPU/g DM 酶量下乙醇得率的 0.934 倍

(4) 在玉米芯工业残渣生产纤维乙醇进行纤维素酶循环利用中，将纤维素酶的循环利用、乙醇的生产和分离以及细胞的循环利用相耦合，降低了纤维素酶的成本，减少乙醇对酵母菌的抑制，实现了酿酒酵母的循环利用，提高了纤维素的转化率，为木质纤维素乙醇的连续化生产提供了有力地技术支持。

(5) 确定了玉米秸秆乳酸发酵醪的最佳絮凝剂为壳聚糖，其最适浓度为 0.74 g/L。最佳絮凝条件为混合时间 10 秒、温度 20–30 °C、pH 为 5.5，且在 15 分钟和 25 分钟时，乳酸的回收率分别为 64.48% 和 68.68 %，实现了高固含量下玉米秸乳酸发酵醪的固液分离。

4.2 展望

本课题中研究了玉米芯残渣生产乙醇过程中纤维素酶的循环利用，以及采用絮凝的方式实现玉米秸秆乳酸发酵醪的固液分离，整个研究围绕着降低木质纤维素生物炼制成本，虽然基本实现了纤维素酶的循环利用，降低了纤维素酶用量以及实现玉米秸秆乳酸发酵醪的固液分离，可以生物炼制产业的发展提供指导作用，但是对于其在工业上的运用应着重解决以下问题：

(1) 改进玉米芯残渣生产过程的预处理方式，能将其中的木质素完全除去，这样提高

的纤维素酶的转化率，减少纤维素酶与木质素的无效吸附，节约纤维素酶用量，并开发连续生产的循环发酵和分离模式，这样既可以实现纤维素酶的循环利用，提高乙醇的产率，节约细胞用量和减少染菌的风险。

(2) 加强纤维素酶方面的研究，筛选高产菌种，提高纤维素酶的产量和性能，降低纤维素酶的成本。

(3) 通过减压蒸馏实现了高固体含量下玉米芯残渣同步糖化与发酵和乙醇分离的耦合，采用间歇减压蒸馏，实现乙醇浓缩的同时也降低发酵过程中产物的抑制，但同时也是体系中抑制物浓度造成提高，影响后续发酵，有关如何降低该过程抑制物浓缩的问题有待进一步研究。

(4) 采用絮凝剂将玉米秸秆乳酸发酵醪絮凝，并用循环水真空泵抽滤，是一种十分简单的分离方式，但对于提高其分离效率和降低能耗，仍需进一步研究，以实现工业上分离木质纤维素乳酸发酵醪。

参考文献

- [1] Agrawal, A. K. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Prog Energy Combustion Sci.* 2007, 33: 233-271.
- [2] Escobar, J. C., Lora, E. S., Venturini, O. J., et al. Biofuels: Environment, technology and food security. *Renew Sustain Energy Rev.* 2009, 13: 1275-1287.
- [3] Zhao, R., Bean, S. R., Wang, D., et al. Small-scale mashing procedure for predicting ethanol yield of sorghum grain. *J Cereal Sci.* 2009, 49(2): 230-238.
- [4] Singh, A., Pant, D., Korres, N. E., et al. Key issues in life cycle assessment of ethanol production from lignocellulosic biomass: Challenges and perspectives. *Bioresour Technol.* 2010, 101(13): 5003-5012.
- [5] Prasad, S., Singh, A., Jain, N., et al. Ethanol Production from Sweet Sorghum Syrup for Utilization as Automotive Fuel in India. *Energy Fuel.* 2007, 21(4): 2415-2420.
- [6] Gullison, R. E., Frumhoff, P. C., Canadell, J. G., et al. Tropical Forests and Climate Policy Science. 2007, 316: 985-986.
- [7] Chakraborty, S., Aggarwal, A., Mukherjee, D., et al. Biomass to biofuel: a review on production technology. *J Chem Eng.* 2012, 7(Suppl. 3): 254-262.
- [8] Singh, A., Smyth, J. G., Murphy, J. D. Renewable fuels from algae: An answer to debatable land based fuels. *Renew Sustain Energy Rev.* 2010, 14(1): 277-288.
- [9] Prasad, S., Singh, A., Joshi, H. C. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour Conserv Recycling.* 2007, 50: 1-39.
- [10] Demirbas, A. Biofuels securing the planet's future energy needs. *Energy Convers Manage.* 2008, 49: 125-130.
- [11] Larson E. D. Biofuel production technologies: status, prospects and implications for trade and development. United Nations Conference on Trade and Development, New York and Geneva, 2008.
- [12] Delfort, B., Durand, I., Hillion, G., et al. Glycerin for New Biodiesel Formulation Formulation d'un nouveau bio-carburant Diesel à base de glycérol. *Oil Gas Sci Technol-Rev IFP.* 2008, 63 (4): 395-404.
- [13] Clark, J. H. Green chemistry for the second generation biorefinery-sustainable chemical manufacturing based on biomass. *J Chem Technol Biotechnol.* 2007, 82: 603-609.
- [14] Osamu, K., Carl, H. W. Biomass Handbook, Gordon Breach Science Publisher: New York, 1989.
- [15] Haung, H. J., Ramaswamy, S., Tschirner, U. W., et al. A review of separation

- technologies in current and future biorefineries. *Sep Purif Technol.* 2008, 62: 1-21.
- [16] Clark, J. H., Buldarni, V., Deswarte, F. I. E. Green chemistry and the biorefinery: a partnership for a sustainable future. *Green Chem*, 2006, 8: 853-860.
- [17] Chew, T. L., Bhatia, S. Catalytic processes towards the production of biofuels in a palm oil and oil palm biomass-based biorefinery. *Bioresour Technol.* 2008, 99: 7911-7922.
- [18] Kamm, B., Kamm, M. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004, 64: 137-145.
- [19] Kamm, B., Gruber, P. R., Kamm, M. Biorefinery industrial processes and products. Status and future direction vols.1 and 2 Wiley-Verlay Gmbtt and Co KGaA Weinheim. 2006.
- [20] Johnston, J. Climate Change Confusion and the Supreme Court: The Misguided Regulation of Greenhouse Gas Emissions under the Clean Air Act. *Energy Law.* 2008, 86: 10-14.
- [21] Verma G, Nigam P, Singh D, et al. Bio-conversion of starch to ethanol in a single step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour Technol.* 2000, 72: 261-266.
- [22] Singh, D., Dahiya, J.S., Nigam, P. Simultaneous raw starch hydrolysis and ethanol fermentation by glucoamylase from *Rhizoctonia solani* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Basic Microbiol.* 1995, 35: 117-121.
- [23] Lynd, L. R., Zyl, W. H.V., McBride, J. E., et al. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Curr Opin Biotechnol.* 2005, 16: 577-583.
- [24] Saxena, A., Garg, S. K., Verma, J. Simultaneous saccharification and fermentation of waste newspaper to ethanol. *Bioresour Technol.* 1992, 39: 13-15.
- [25] Sánchez, C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnol Adv.* 2009, 27: 185-194.
- [26] Kumar, R., Wyman, C.E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol Prog.* 2009, 25: 302-314.
- [27] Sun, Y., Cheng, J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol.* 2002, 83: 1-11.
- [28] Karunanithy, C., Muthukumarappan, K. Optimization of switch grass and extruder parameters for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Ind Crop Prod.* 2011, 33 (1): 188-199.
- [29] Carvalheiro, F., Duarte, L.C., Góio, F.M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *J Sci Ind Res.* 2008, 67: 849-864.
- [30] Cara, C., Ruiz, E., Oliva, J.M., et al. Conversion of olive tree biomass into fermentable

- sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification. *Bioresour Technol.* 2008, 99: 1869-1876.
- [31] Oliva, J.M., Sáez, F., Ballesteros, I., et al. Effect of lignocellulosic degradation compounds from steam explosion pretreatment on ethanol fermentation by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003, 105: 141-154.
- [32] Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Process Biochem.* 2006, 41: 42-429.
- [33] Varga, E., Reczey, K., Zacchi, G. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Appl Biochem. Biotechnol.* 2004, 113-116: 509-523.
- [34] Avellar, B.K., Glasser, W.G. Steam-assisted biomass fractionation I. Process considerations and economic evaluation. *Biomass Bioenergy.* 1998, 4: 205-218.
- [35] Leland, M. Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuels Bioprod Bioref.* 2008, 2: 553-588.
- [36] Maddox, IS., Qureshi, N., Roberts-Thomson, K. Production of acetone-butanol-ethanol from concentrated substrates using *Clostridium acetobutylicum* in an integrated fermentation-product removal process. *Proc Biochem.* 1995, 30: 209-215.
- [37] Gapes, J.R., Nimcevic, D., Friedl, A. Long-term continuous cultivation of *clostridium beijerinckii* in a two-stage chemostat with on-line solvent removal. *Appl Environ Microbiol.* 1996, 62: 3210-3219.
- [38] Offeman, R.D., Stephenson, S. K., Robertson, G. H., et al. Solvent extraction of ethanol from aqueous solutions. I. Screening methodology for solvents. *Ind Eng Chem Res.* 2005, 44: 6789-6796.
- [39] Munson, C. L., King, C.J. Factors influencing solvent selection for extraction of ethanol from aqueous solutions. *Ind Eng Chem Proc Res Dev.* 1984, 23: 109-115.
- [40] Dadgar, A. M., Foutch, G. L. Evaluation of solvents for the recovery of *Clostridium* fermentation products by liquid-liquid extraction. *Biotechnol Bioeng Symp.* 1985, 15: 611-620.
- [41] Bowen, T. C., Vane, L. M. Ethanol, acetic acid, and water adsorption from binary and ternary liquid mixtures on high-silica zeolites. *Langmuir.* 2006, 22: 3721-3727.
- [42] Oumi, Y., Miyajima, A., Miyamoto, J., et al. Binary mixture adsorption of water and ethanol on silicalite. *Stud Surf Sci Catal.* 2002, 142: 1595-1602.
- [43] Vane, L. M. A review of pervaporation for product recovery from biomass fermentation processes. *J Chem Technol Biotechnol.* 2005,80: 603-629.
- [44] Ramalingham, A. Vacuum Alcohol Fermentation. *Biotechno Bioeng.* 1977, 19:

- 583-589.
- [45] Ishida, K., Shimizu, K. Novel repeated batch operation for flash fermentation system: experimental data and mathematical modeling. *Chem Tech Biotechnol.* 1996, 66: 340-346.
- [46] Aline, C. C., Daniel, I.P., Atala, F. M., et al. Factorial design and simulation for the optimization and determination of control structures for an extractive alcoholic fermentation. *Process Biochemistry.* 2001, 37: 125-137.
- [47] Flavio, L. H. D. S., Maria, I. R., Francisco, M. Dynamic modeling simulation and optimization of an extractive continuous alcoholic fermentation process. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 1999, 74: 176-182.
- [48] Bu, L. X., Tang, Y., Gao, Y. X., et al. Comparative characterization of milled wood lignin from furfural residues and corncob. *Chem Eng J.* 2011, 175 (15): 176-184.
- [49] Sun, R., Song, X. L., Sun, R. C., et al. Effect of lignin content on enzymatic hydrolysis of furfural residues. *Bioresources.* 2011, 6 (1): 317-328.
- [50] Zhang, M. J., Wang, F., Su, R. X., et al. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. *Bioresour Technol.* 2010, 101: 4959-4964.
- [51] Cheng, K. K., Wang, W., Zhang, J. A., et al. Statistical optimization of sulfite pretreatment of corncob residues for high concentration ethanol production. *Bioresour Technol.* 2010, 102: 3014-3019.
- [52] Liu, Z. L., Weber, S. A., Cotta, M. A., et al. A new β -glucosidase producing yeast for lower-cost cellulosic ethanol production from xylose-extracted corncob residues by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresour Technol.* 2012, 104: 410-416.
- [53] Wingren, A., Galbe, M., Zacchi, G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol Prog.* 2003, 19: 1109-1117.
- [54] Schevechenko, S. M., Chang, K., Dick, D. G., et al. Structure and properties of lignin in softwoods after SO_2 -catalyzed steam explosion and enzymatic hydrolysis. *Cellul Chem Technol.* 2001, 35: 487-502.
- [55] Eriksson, T., Borjesson, J., Tjerneld, F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocelluloses. *Enzyme Microb Technol.* 2002, 31: 353-364.
- [56] Deshpande, M. V., Eriksson, K. E. Reutilization of enzymes for saccharification of lignocellulosic materials. *Enzyme Microb Technol.* 1984, 6 (8): 338-340.
- [57] Tu, M., Chandra, R. P., Saddler, J. N. Recycling cellulases during the hydrolysis of steam exploded and ethanol pretreated lodgepole pine. *Biotechnol Prog.* 2007, 23:

1130-1137.

- [58] Yang, B., Wayman, C. E. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnol Bioeng.* 2006, 94: 611-617.
- [59] Li, J., Jiang, Z., Wu, H., et al. Improving the recycling and storage stability of enzyme by encapsulation in mesoporous CaCO₃-alginate composite gel. *Compos Sci Technol.* 2008, 69: 539-544.
- [60] Zhao, X., Cheng, K., Liu, D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009, 82 (5): 815-827.
- [61] Fasching, M., Schröder, P., Wollboldt, R. P., et al. A new and facile method for isolation of lignin from wood based on complete wood dissolution. *Holzforschung.* 2008, 62: 15-23.
- [62] Tan, S. S. Y., MacFarlane, D. R., Upfal, J., et al. Extraction of lignin from lignocelluloses at atmospheric pressure using alkylbenzenesulfonate ionic liquid. *Green Chem.* 2009, 11: 339-345.
- [63] Bajaj, B., Pangotra, H., Wani, M., et al. Partial purification and characterization of highly thermostable and pH stable endoglucanase from a newly isolated *Bacillus* strain M-9. *Indian J Chem Technol.* 2009, 16: 287-382.
- [64] Tu, M., Chandra, R. P., Saddler, J. N. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnol Prog.* 2007, 23: 398-406.
- [65] Lee, D., Yu, A.H.C., Saddler, J.N. Evaluation of cellulase recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnol Bioeng.* 1995, 45: 328-336.
- [66] Qi, B., Chen, X., Su, Y., et al. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocelluloses. *Bioresour Technol.* 2011, 102 (3): 2881-2889.
- [67] Zhu, Z., Sathitsuksanoh, N., Zhang, Y. H. P. Direct quantitative determination of adsorbed cellulase on lignocellulosic biomass with its application to study cellulase desorption for potential recycling. *Analyst.* 2009, 134: 2267-2272.
- [68] Tu, M., Paiceb, M., MacFarlanec, P., et al. The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of a mixed softwood feedstock. *Bioresour Technol.* 2009, 100 (24): 6407-6415.
- [69] Mohagheghi, A., Tucher, M, Grohmann, k., et al. High solids simultaneous saccharification and fermentation of pretreated wheat straw to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol.* 1992, 33: 67-81.
- [70] Jin, M. J., Gunawan, C., Uppugundla, N., et al. A novel integrated biological process for cellulosic ethanol production featuring high ethanol productivity, enzyme recycling and yeast cells reuse. *Energy Environ Sci.* 2012, 5: 7168-7175.

- [71] Hofvendahl, K., Hahn-Hägerdal, B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb Technol.* 2000, 26: 87-107.
- [72] Ikada, Y., Jamshidi, K., Tsuji, H., et al. Stereocomplex formation between enantiomeric poly (lactides). *Macromolecules.* 1987, 20: 904-906.
- [73] Wee, Y. J., Kim, J. N., Ryu, H. W. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technol Biotechnol.* 2006, 44: 163-172.
- [74] 彼得·约翰内斯·马里·贝茨, 恩斯特·罗伯特·科尔登霍夫. 通过絮凝从含有乳酸的发酵产物中分离生物质. 国际专利: 1729296A, 2004-05-06.
- [75] Galbe, M., Sassner, P., Wingren, A., et al. Process Engineering Economics of Bioethanol Production. *Adv Biochem Biotechnol.* 2007, 108: 303-327.
- [76] Sassner, P., Galbe, M., Zacchi, G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy.* 2008, 32: 422-430.
- [77] Galve, M., Zacchi, G. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002, 56: 618-628.
- [78] Ding, W. W., Wu, Y. T., Tang, X. Y., et al. Continuous ethanol fermentation in a closed-circulating system using an immobilized cell coupled with PDMS membrane pervaporation. *J Chem Technol Biotechnol.* 2011, 86: 82-87.
- [79] Sanchez, O. J., Cardona, C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour Technol.* 2008, 99: 5270-5295.
- [80] Cysewski, G. R., Wilke, C. R. Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. *Biotechnol Bioeng.* 1977, 19: 3020-3026.
- [81] Jiang, Z., Jie, B. A modified method for calculating practical ethanol yield at high lignocellulosic solids content and high ethanol titer. *Bioresour Technol.* 2012, 116: 74-79.

攻读硕士期间的研究成果

会议论文:

1. Yanwen Bao, Jian Zhang, Jie Bao. 2012. An efficient solids/liquid separation of fermentation slurry for lactic acid production from corn stover. International Conference on Biomass-Energy Technologies Technologies 2012. Nanjing, China. (Oral presentation)

申请专利:

1. 鲍杰, 包艳文, 张建. 一种高效分离木质纤维素发酵醪中固体残渣和产物的方法。
申请号: 2011110355486.7

致谢

本硕士学位论文是在导师鲍杰教授的悉心指导下完成的，他治学严谨求实，工作兢兢业业，为我的课题研究和论文的完成付出了很多心血并在日常生活中给予我极大的帮助。在此特向鲍老师表达我真挚的谢意！

感谢胡凤仙副教授对我实验和生活方面的帮助。

感谢董宏伟师兄、楚德强师兄、张怀庆师兄、罗紫臣师兄、李传航师兄、邢恒维师兄、国立浩师兄、刘威师兄、赵凯师兄、王玉梅师姐、安克红师姐、王远师姐、王晓凤师姐在实验中对我的建议和帮助，感谢何燕青、崔振阳、方镇宏、涂毅、李昆、张瑶、顾翰琦、安瑞鑫、冉红、肖雁秋、孟娇、王霞、张龙平、张宏森、王娟等实验室其他同学在实验中给予的帮助。

特别感谢张建老师对我实验的指导和帮助，以及协助我一起完成实验雷成、林媛媛，同时特别感谢我的父母对我的养育之恩，以及一直以来对我的鼓励和帮助，使我顺利完成学业。

此外，还要向所有关心我的老师、同学、亲戚、朋友表示由衷的感谢！