

生物炼制中秸秆糖以及糖醇和糖酸的结晶分离

摘要

本文对生物炼制过程中的木质纤维素来源的秸秆糖（葡萄糖、木糖），以及菊芋和淀粉生物转化获得的葡萄糖酸钠和山梨醇混合体系进行了结晶分离研究。本文首先研究了玉米秸秆糖化液的精制和结晶。玉米秸秆在纤维素酶糖化作用后获得含有葡萄糖和木糖的糖化液，通过离心、活性炭脱色、离子交换、旋转蒸发对糖化液进行精制，进而再通过结晶、冷冻干燥后得到混合糖葡萄糖和木糖，用于接下来的裂解多元醇实验。然后对葡萄糖酸钠和山梨醇的结晶分离进行了研究。首先，通过在葡萄糖酸钠和山梨醇溶液中加入氯化钙，将溶解度较高的葡萄糖酸钠转化为溶解度较低的葡萄糖酸钙形式；然后，利用葡萄糖酸钙和山梨醇在水溶液中的溶解度不同进行结晶分离。对影响葡萄糖酸钙结晶的氯化钙加入量、助结晶剂乙醇加入量、晶种加入量、结晶温度、结晶时间等重要因素进行了研究，结果表明在最佳的结晶条件下，葡萄糖酸钙与山梨醇可以通过结晶的方式实现较好的分离，葡萄糖酸钙的结晶得率为 84.2%。通过对上述生物炼制体系的玉米秸秆水解体系和葡萄糖酸钙-山梨醇体系的结晶分离，对分离生物质来源的秸秆糖以及糖酸和糖醇提出了一个低成本结晶分离技术的方法和技术。

关键词：葡萄糖酸钙；山梨醇；结晶；活性炭脱色；离子交换

Crystallization Separation of Straw Sugar and Sugar Alcohol、 Sugar Acid in Biorefinery

Abstract

This article studied the crystallization separation of straw sugars(glucose、 xylose) produced from lignocellulose、 sorbitol and sodium gluconate produced from the bioconversion of Jurusalen artichoke and cassava starch in brorefinery. This article studied corn stalks saccharification solution obtained after saccharification by cellulase enzyme, and studied the crystallization of glucose and xylose. By centrifugation, Decolorization by activated carbon, ion-exchange, rotary evaporator to purify the saccharification solution, and then by crystallization and freeze- drying to obtain mixed sugars glucose and xylose used for the next cleavage experiment of the polyol.This article also focused on the separation of sorbitol and sodium gluconate by crystallization method. First, sodium gluconate was converted into calcium gluconate by addition of calcium chloride; then, calcium gluconate and sorbitol were separated in the way of crystallization taking advantage of solubility difference of two compounds. Several important factors including addition of calcium chloride, ethanol addition, seeds addition, temperature, time on the calcium gluconate crystallization yield were investigated. The results show that the two compounds could be separated by crystallization with the recovery yield of calcium gluconate at 84.2%. The results provided a practical way for separation of sodium (calcium) gluconate and sorbitol at low cost.

Keywords: calcium gluconate; sorbitoll; crystallization; decolored by actived carbon; ion exchange

目录

前言	1
第一章 文献综述	3
1.1 玉米秸秆糖化液的精制和结晶	4
1.1.1 秸秆资源及利用现状	4
1.1.2 秸秆预处理方法的研究	4
1.1.3 秸秆糖化的研究	5
1.1.4 葡萄糖和木糖的应用	6
1.2 葡萄糖酸盐和山梨醇的结晶分离	6
1.2.1 菊粉及木薯淀粉的性质	6
1.2.2 运动发酵单胞菌的生物特性及葡萄糖果糖氧化还原酶的性质	7
1.2.3 山梨醇和葡萄糖酸的生产及应用前景	9
1.2.4 葡萄糖酸和山梨醇的分离纯化方法	9
1.2.5 葡萄糖酸盐的结晶分离	10
1.3 本课题的研究内容与意义	10
第二章 材料与方法	12
2.1 实验材料与设备	12
2.1.1 实验材料与试剂	12
2.1.2 实验设备	12

2.2 分析方法.....	13
2.2.1 脱色后溶液中色素含量分析.....	13
2.2.2 溶液的电导分析.....	13
2.2.3 溶液的蛋白含量测定.....	14
2.2.4 高效液相色谱法测定组分含量.....	15
2.2.5 计算公式:	15
2.3 玉米秸秆糖化液的精制和结晶.....	15
2.3.1 秸秆的预处理和糖化.....	15
2.3.2 活性炭脱色.....	16
2.3.3 离子交换.....	16
2.3.4 旋转蒸发浓缩.....	17
2.3.5 结晶和干燥.....	17
2.4 葡萄糖酸钠与山梨醇的结晶分离.....	17
2.4.1 葡萄糖酸钙晶种的制备.....	17
2.4.2 单一的葡萄糖酸钠溶液的制备和结晶.....	17
2.4.3 葡萄糖酸钠和山梨醇混合溶液的结晶分离.....	17
2.4.4 菊芋和淀粉生物转化产品中葡萄糖酸钠与山梨醇溶液的制备和结晶.....	18
2.4.5 结晶溶液的分离收集.....	19
第三章 实验结果.....	20
3.1 玉米秸秆糖化液的精制和结晶.....	20

3.1.1	活性炭脱色.....	20
3.1.2	离子交换.....	21
3.1.3	旋转蒸发浓缩.....	25
3.2.4	结晶和干燥.....	26
3.2	葡萄糖酸钠与山梨醇的结晶分离.....	27
3.2.1	单一的葡萄糖酸钠溶液的结晶.....	27
3.2.2	葡萄糖酸钠和山梨醇混合液的结晶分离.....	30
3.2.3	菊芋生物转化产品中葡萄糖酸钠与山梨醇溶液的结晶分离.....	32
	第四章 结论与展望.....	34
4.1	玉米秸秆糖化液的精制和结晶.....	34
4.2	葡萄糖酸盐和山梨醇的结晶分离.....	34
	参考文献	36
	致谢.....	41

前言

我国的玉米秸秆产量很高，作为一种可再生的资源，其中蕴含着巨大的能量，利用空间巨大但是目前的利用极低，大多数都被随意堆砌和任意焚烧，浪费资源和造成环境的污染。本实验室将玉米秸秆经过酸法预处理，将玉米秸秆中的成分破坏，得到木质素、半纤维素和纤维素，然后再加入 7 FPU 的纤维素酶，水解 15% 固含量的预处理后的秸秆，使得其中的纤维素在纤维素酶的作用下糖化 72 h，得到包含有葡萄糖和木糖的秸秆糖化液。葡萄糖和木糖的混合晶体用途广泛，不仅可用于共发酵产乙醇，还可以用来作为裂解多元醇的原料。

本课题研究的目的是将玉米秸秆糖化液经过精制和结晶，得到葡萄糖和木糖的混合晶体。首先是糖化液的离心得到糖化清液，因为溶液颜色很深，会影响产品的质量，需要先经过活性炭脱色，得到颜色比较淡的糖化液；然后利用阴阳离子交换树脂除去溶液中的盐离子 Na^+ 、 SO_4^{2-} ，减少溶液中离子的存在，影响接下来的结晶溶液的稳定性；最后再用旋转蒸发浓缩糖化液，使溶液中葡萄糖和木糖的浓度达到过饱和，加入晶种，在一定温度下结晶数天，就可得到葡萄糖和木糖的混合固体，在冷冻干燥方法下，就可得到葡萄糖和木糖的混合晶体，用于接下来的裂解多元醇实验。

山梨醇是一种重要的化学中间体，可以用作甜味剂、调质剂、润湿剂和软化剂等，还是合成维生素 C 的前体材料；葡萄糖酸及其衍生物是重要的食品添加剂，葡萄糖酸还可作为生物炼油中间体和金属及其他材料的表面清洗剂。目前，葡萄糖酸盐和山梨醇的分离已有一定的研究，如通过洗脱剂 $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7/\text{H}_3\text{BO}_3$ 对葡萄糖酸和山梨醇在树脂上进行分离；使用有机溶剂甲醇和乙醇等的作为选择性沉淀剂将葡萄糖酸从溶液中沉淀出来，而山梨醇仍然留在溶液中；或者使用一个和生物反应器配套的电解体系，在葡萄糖酸产生的同时将其去除掉，山梨醇仍然留在溶液体系中。这些方法最终都能将葡萄糖酸和山梨醇分离开来，且得率很高，但是由于这些方法只适用于实验室规模，由于操作成本和其他因素不能用于工业上大规模的生产，需要寻找一种经济、低耗能、高效率和环境友好的使用于工业上大规模分离葡萄糖酸和山梨醇的方法。

本课题的研究意义在于寻找合适的葡萄糖酸和山梨醇的分离方法。本文考虑到葡萄糖酸盐和山梨醇在溶液中的溶解度都很高，采用了结晶方法分离葡萄糖酸盐和山梨醇，即在两种物质的混合溶液中加入氯化钙，会和葡萄糖酸盐发生反应生成溶解度较低的葡萄糖酸钙，加入无水乙醇后进一步降低葡萄糖酸钙的溶解度，再加入晶种后降温结晶，即可将葡萄糖酸钙结晶出来，山梨醇仍然留在溶液中，达到分离两种物质的目的。本文首先研究了只有葡萄糖酸盐单一溶质存在的溶液中影响结晶的因素，氯化钙加入量、降温条件；然后研究了葡萄糖酸盐和山梨醇的混合溶液，考察氯化钙加入量和降温条件对结晶的影响，同时发现加入无水乙醇后能更进一步提高葡萄糖酸钙结晶率。本文对提出的结晶分离方法对分离生物来源的葡萄糖酸钙和山梨醇的工业化应用提出了一个低

成本分离技术的概念。

第一章 文献综述

能源是维持人类赖以生存和发展的动力，同时也保证着人类社会的存在和发展。目前，我国主要利用的化石燃料资源包括煤炭、天然气和石油等，虽然我国储量丰富，但是人均占有资源有限，并且随着人口的不断增加和对能源的需求日渐增长，这些化石燃料因为其不可再生性资源，储量迅速减少。根据一些数据显示，根据现在人类利用能源的速度和能源的储量关系，煤炭最多只能开采 200 年，天然气和石油也将在 50-60 年内被开采殆尽，这将会严重影响人类社会的发展和进步。目前我国经济正蓬勃发展，随着工业化和城镇化的不断推进，对能源的需求也大，但是我国的能源分布不是十分合理（如图 1.1），煤炭为最主要的需求能源，但是煤炭的燃烧会产生一氧化碳、粉尘、二氧化碳和二氧化硫，这些有害气体的排放会引起温室效应和酸雨等，严重危害了环境和人民的身心健康，造成很多不利影响。我国使用的石油大多需要进口，但是现在随着油价的不断攀升和由于石油的远洋运输带来的恐怖威胁日渐增大，我们需要减少对进口石油的运输，同时能源紧缺是制约我国经济社会迅速发展的重要因素，我们迫切需要寻找其它的可再生的能源来替代石油化工燃料。

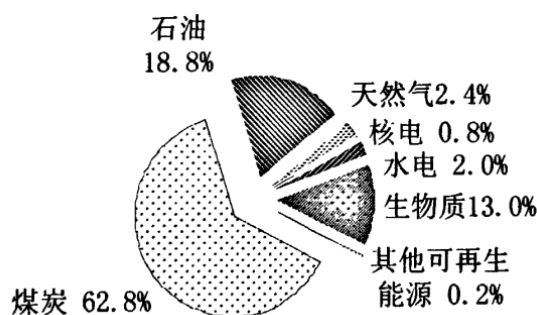


图 1.1 中国 2005 年能源需求总量

Fig. 1.1 Total primary energy demand of China in 2005

我国现在正努力发展对太阳能、风能和生物质能等一些可再生资源的利用，尤其重视对生物质能的开发和利用。生物质是我国现存的第四大燃料，仅次于石油、天然气和煤炭，是唯一被世界公认的可再生的碳源。生物质能是储存在生物质内部的能源，通过光合作用将太阳能转化为植物体内的化学能储存，因此具有取之不尽、用之不竭的特点。现在生物质能源因为其来源广泛和开发潜力巨大，并且具有可再生性和对环境友好性，越来越受到人类的关注，是代替石化燃料的最主要的能源。据估计，我国目前理论上的生物质能源储量约为 50 亿吨的标准煤，相当于中国总耗能的 4 倍。我国现在可利用的生物质能源主要是工业有机废水和废渣、薪柴、农作物秸秆、禽畜粪便和生活垃圾。就目前来说，在我国大力推广生物质能源的应用，对于保证各能源的可持续发展、减少环

境污染和改善生态破坏具有重大的意义。

1.1 玉米秸秆糖化液的精制和结晶

1.1.1 秸秆资源及利用现状

我国是一个农业大国，每年种植的秸秆产量为 7 亿吨^[1]。现在我国种植的三大最主要的农作物秸秆分别为稻草、小麦秸秆和玉米秸秆，其中玉米秸秆的产量占约秸秆总产量的 37.4%，主要分布在华北（如内蒙古、河北）和东北等一些地区的各省份，以及中南（如河南）和华东（如山东）的一些省份；小麦秸秆的产量占约秸秆总产量的 21.50%，主要分布在中南（如河南）和华东（如山东、江苏、安徽）以及华北（如河北）等一些地区；稻谷秸秆产量占约秸秆总产量的 18.55%，主要分布在华东地区（如江苏、浙江、江西和安徽等）和中南（如湖北、湖南、广西、广东）及西南的一些省份（如四川）^[2]。

玉米秸秆主要是由纤维素、半纤维素和木质素组成的，这三种组分约占总重量的 80%，纤维素是由 D-葡萄糖长链通过形成氢键的并列晶体结构再进一步形成的微纤维结构，这种结构因为比较稳固使得纤维素的水解变得十分的困难；半纤维素是由木糖、半乳糖和甘露糖等的形成的高聚物^[3]，它种类很多、结构为无定形，并且构成组分不明确，因此目前对半纤维素的研究利用很少^[4,5]；木质素的结构十分的复杂并且稳定，它是以苯丙烷结构为基本结构单元通过碳碳键或醚键相互连接起来的^[6]，没有糖。除了以上三种组分之外，秸秆中还含有其他的一些物质，比如脂类、果胶、蛋白质、灰分、水分、小分子碳水化合物等，其中灰分含量占 5%，主要是由二氧化硅组成^[2]。

现在我国秸秆年产量占生物质年总产量的 50% 以上，有巨大的利用空间，然而目前的利用率只有 35%，并且主要用在以下几种途径：1. 有机肥料，即将收获的秸秆直接放在农田中，这样做的好处就是简单省工且操作易行，腐烂的秸秆不仅可以有效的改善土壤结构，还能增加土壤中的氮、磷、钾等的养分并且抑制杂草的生长，但是这么做也会因为秸秆翻压量过大、秸秆中水分不够等妨碍农林耕作，严重的还可能会造成作物的减产；2. 作为饲料，收获的秸秆经过适当的处理之后提高了营养价值，可以作为蛋白饲料利用；3. 作为生产原料应用于编织和造纸行业，秸秆经过加工后可制作成不同形状的型材、板材或者吸附材料，应用价值广阔；4. 生产化工原料，利用生物技术的方法将秸秆发酵得到乙醇、丁酸、L-乳酸等，通过化学反应得到羧甲基纤维素等的改性纤维素，但是这些目标产物复杂、浓度低、进一步的分离困难。作为这些用途的秸秆量少，剩下的大量秸秆都没有得到很好地利用，被逐渐的堆积并且数量越来越大，高达每年 4 亿吨^[7]，这些秸秆大都被随意的堆积和任意的焚烧，造成了很大的社会、经济、生态问题，使得大气污染、交通阻塞、火灾事故频频发生^[8]。同时，作为一种可再生的能源，秸秆中蕴含着巨大的能量，如果利用新技术将秸秆转换成一种方便、洁净、高效的能源，不仅能够缓解因能源短缺造成的紧张，提高农村人民的生活质量，还可以解决因为秸秆随意丢弃产生的各类问题、减少对环境的有害影响^[9,10]。

1.1.2 秸秆预处理方法的研究

秸秆含有生物化学上很稳定的结构，半纤维素和木质素是以共价键的形式结合，纤维素分子被包埋在结构里边，使得纤维素分子不容易和外部加入的酶分子接触，因此很难被一般的微生物所分解^[11]。要解决这个问题的有效方法就是通过适当的预处理木质纤维素，尽可能的除去秸秆中的半纤维素和木质素，降低纤维素的结晶度，增加秸秆的孔隙率。预处理方法分为很多种，包括物理、化学、生物及三种方法的组合等^[12]。这些方法经济可行，可以促进纤维素降解成相应的还原糖，避免碳水化合物降解和避免有害副产物的生成^[13]。

物理方法主要有机械加工法、高温热解预处理法、微波预处理法、高能辐射处理法及蒸汽爆破法等。机械法就是用粉碎、研磨和削片等的方法将物料变成细小的颗粒^[14]，提高物料的比表面积^[15]；高温热解法包括高温促进纤维素的转化为糖^[16]和高温酸催化自解反应方法；微波预处理法是利用有穿透性的电磁波；高能辐射法使物质和电离辐射的相互作用下的物质发生变化^[17]；蒸汽爆破法是在压力 0.7-4.8 Mpa、温度 150-250℃下爆破几秒钟或者几分钟，再瞬间减压^[18]，这种方法不仅能耗低、容易调节，而且避免了高温预处理时由单糖变成乙醛抑制酶^[19,20]，是一种比较有效的方法。

化学方法是在酸、碱和有机溶剂等预处理剂的作用下，打破木质素和纤维素之间的连接，主要包括酸水解、碱水解和氨化法。酸水解法具有处理时间短、产糖量高和后续酶解程度高等的特点^[21-23]，浓酸处理虽然糖转化率高，但是危险性也相对较大，对设备的要求也很高，工艺流程更为复杂^[24,25]；稀酸处理后，能除去 80-95 % 的半纤维素，同时降低纤维素的聚合度，加强水解反应的能力^[26,27]。碱水解是在 OH⁻的作用下将木质素醚键断裂，同时增大木质纤维素的孔径，除去木质素并且使半纤维素溶解^[28,29]。氨化方法是利用氨水或尿素处理秸秆，这种方法下纤维素的降解明显。

生物方法是寻找有木质素降解功能的菌种，在其适宜的发酵条件下把秸秆中的木质纤维降解成其他的简单物质。这种方法无污染、条件温和、能耗低和操作简单，但是预处理产生很多有害的衍生物，能耐受这种有害衍生物的微生物很少，而需要进一步的研究^[30,31]。联合方法是不同预处理方法的组合，最常见的是先机械破碎，再物理、化学或生物方法进一步预处理。

1.1.3 秸秆糖化的研究

秸秆的糖化主要就是将预处理后的秸秆醪液在纤维素酶的作用下水解纤维素的 β -1,4 糖苷键生成葡萄糖的过程。纤维素酶是复合酶，来源非常的广泛，主要在细菌、真菌、放线菌等的微生物中产生，现阶段研究的最多的是真菌，包括绿色木霉、里氏木霉、根霉和黑曲霉等^[32]。纤维素酶主要包括 β -葡萄糖苷糖酶、内切- β -葡聚糖酶和外切- β -葡聚糖酶，在水解的时候三种酶相互协调作用，但是在不同的微生物生产的纤维素酶中的各个组分也有很大的差异。纤维素酶的酶解周期一般是在 72h 左右，水解作用受很多因素的影响，首先是底物因素，不同的预处理条件下，木质纤维素原料的空隙和比表面积会有不同的结果，因此纤维素酶接触到不同的底物的表面积也会不同，这种不同就会影响酶解的速度，除此之外，还有纤维素的结晶度和聚合度、底物浓度和木质素的含量

等影响因素；纤维素酶的性能也对酶解有很大影响，因为纤维素酶是从不同的微生物中发现的，对木质纤维素原料的水解能力也因微生物种类的不同表现出不同的能力，除此之外还有抑制物的耐受性、热稳定性、抗剪切失活能力等的也会产生不同；酶解作用还要依赖于一定的温度和 pH，在最适的温度和 pH 条件下，纤维素酶才能发挥出最大的酶反应速度，一般情况下，纤维素酶的最适 PH 值为 4.5-5.5，温度为 40-60℃；最后，反应溶液中一些和底物相类似的物质也会引起相应的竞争性抑制，如纤维二糖、花色素和酚及葡萄糖，当然在溶液中加入一些 CoCl_2 、 Mg^{2+} 和 Ca^{2+} 也会激活纤维素酶活性。

纤维素糖化的方式有很多种，比如同步糖化发酵、连续发酵、批次发酵。一般情况下是直接酶解糖化，就是把纤维素酶和预处理之后的秸秆纤维素放在一个容器中，由于纤维素酶的附着位点暴露，使得纤维素酶和物料能很容易结合，在适宜的温度和 PH 条件下进行酶解反应并且水解就能获得六碳糖，这种方法简单，但是反应以后的纤维素酶和底物残渣都不能够重复利用，造成了浪费，这种缺陷造成了酶法水解纤维素在商业上不能有效的利用，产生了应用的限制；一种方法是同步产酶和酶解，就是在一个容器中即能合成纤维素酶，同时又能酶解纤维素进行糖化反应，这种方法成本低，但是因为纤维素酶合成过程中有菌种的加入对设备无菌条件要求严格，造成了操作的复杂性；同步糖化发酵，就是把利用纤维素酶进行糖化和接下来的乙醇发酵在一个容器中进行，水解产生的葡萄糖能迅速的被菌种利用进而产生乙醇，这种方法减少了酶的用量，节约了时间，并且提高酶解速度和降低了产物抑制；还有一种是酶解-膜耦合，就是利用膜可渗透的原理，把酶的催化、产物的分离和浓缩以及酶的回收等的步骤结合在一起。

1.1.4 葡萄糖和木糖的应用

葡萄糖又叫玉米葡糖、玉蜀黎糖和葡糖，是自然界中分布最广并且最重要的一种多羟基单糖，在动物组织和血液、植物器官和组织、蜂蜜中都有广泛的分布，结构为 D-(+)-吡喃型葡萄糖，以游离或结合的形式存在，纯净的葡萄糖是无色的晶体。葡萄糖在果糖制造业、化工和医药领域都有着广泛的应用，同时还有大量的葡萄糖的衍生物被用作临床上治疗药物。

木糖是五碳糖，在工业上生产出的是 D-木糖，是细针状晶体，味甜。木糖虽然不能被人体吸收，但是有能增加肠道中的双歧杆菌、调整肠道的作用，可以作为木糖醇的原料。自然界中，除了竹笋还没有发现游离的木糖，大都是以多缩戊糖的木聚糖形式存在于自然界的植物中的半纤维素中的^[33]。现在木糖在食品行业的应用主要是作为无热量的甜味剂、肉类香精原料、风味改良剂和食品抗氧化剂。

葡萄糖和木糖双底物有很多应用，进行生物转化生产出 2,3-丁二醇、乙偶姻^[34,35]；还可以进行产氢、产乙醇^[36,37]。

1.2 葡萄糖酸盐和山梨醇的结晶分离

1.2.1 菊粉及木薯淀粉的性质

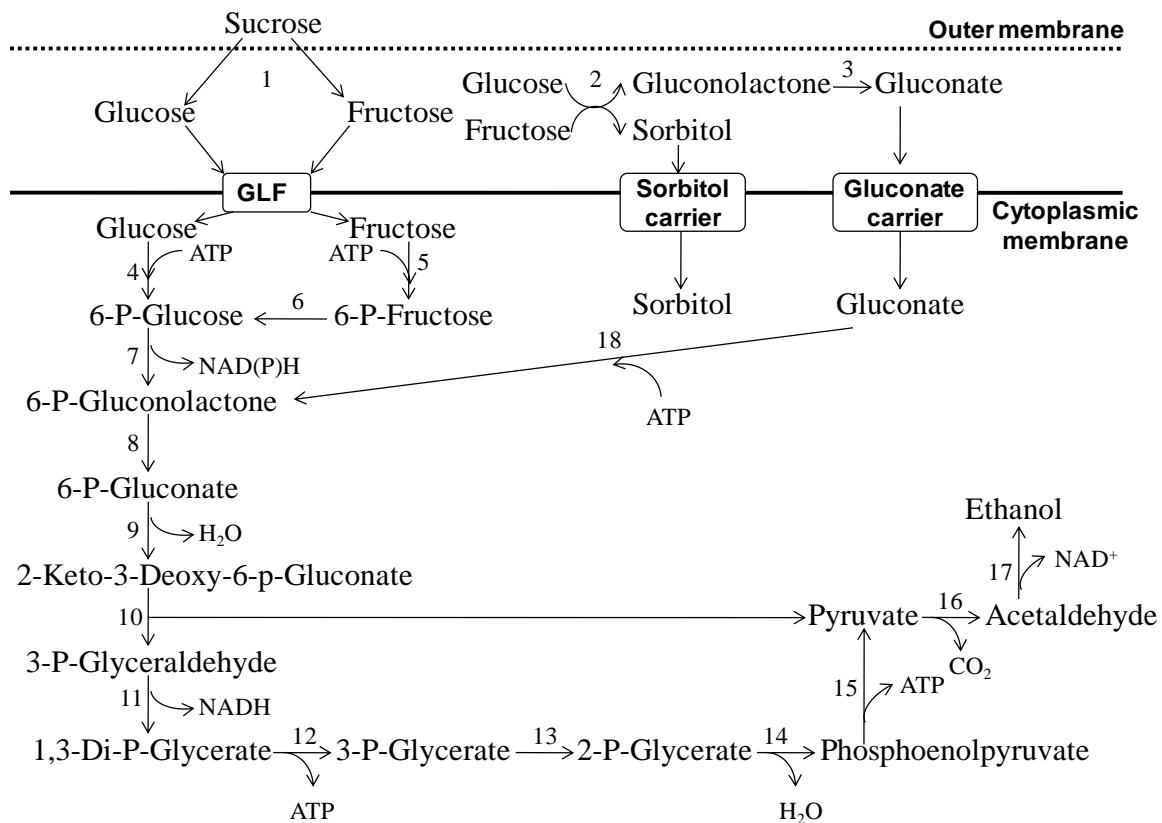
菊粉 (inulin) 又称菊糖，土木香粉，是一种生物多糖，存在于很多种的植物和蔬

菜中，尤其是以能量的形式大量存在于菊芋、菊苣等的菊科植物块根中^[38]。菊粉是由 D-呋喃果糖分子通过 β - (2,1) 糖苷键连接起来形成的果聚糖，聚合程度约为 2-60，平均为 10，单个的菊粉分子末端是葡萄糖残基以 α - (1-2) 糖苷键相连接。菊粉在自然界中的分布十分广泛，一些真菌和细菌中会含有菊粉，但主要还是存在于植物中。菊芋和菊苣是最主要的生产菊粉的原料，来源丰富，菊粉含量高及，约占两种植物块茎干重的 70% 以上^[39]。菊粉可以用作生产柠檬酸、果糖、单细胞油脂、单细胞蛋白、乙醇及其他生化产品，丰富廉价并且可再生。目前菊粉的水解主要使利用的菊粉酶，通过切断菊粉的 β -2, 1-糖苷键产生葡萄糖和果糖^[40]。

木薯淀粉主要是支链淀粉（约占 83%），是由木薯（Cassava）经过淀粉提取后脱水干燥而成的粉末。木薯耐水、耐旱、耐贫瘠，在荒山、荒坡等各种土壤中都能很好的生长，且适应性强。其含 30% 的淀粉，被誉为“淀粉之王”，是一种不与人争地、不与地争粮的作物，因此在我国被大面积的种植。木薯淀粉因其质具有细少杂质、分子中有活泼的羟基的特点而用来生产各种衍生物，在食品、纺织、医药、制糖、造纸、化工等的行业中都有着广泛的应用^[41]。目前木薯淀粉的水解是通过液化酶和糖化酶的共同作用，生成葡萄糖^[40]。

1.2.2 运动发酵单胞菌的生物特性及葡萄糖果糖氧化还原酶的性质

最初，运动发酵单胞菌（*Zymomonas mobilis*）是从龙舌兰属植物和甘蔗等一些植物的发酵液，及坏掉的苹果酒和啤酒中分离出来的。*Z.mobilis* 属于革兰氏阴性菌，是兼性厌氧的微生物。它在 25-31℃ 的无氧环境下生长是最好的，在有氧的条件下也可以存活^[42]。由于它特有的一些生化特性，其体内的代谢路径(Entner- Doudoroff pathway)得到了广泛的研究，见图 1.2。



注：GLF，葡萄糖运输载体。编号对应的酶为：1. 果聚糖蔗糖酶；2. 葡萄糖果糖氧化还原酶；3. 葡萄糖酸内酯酶；4. 葡萄糖激酶；5. 果糖激酶；6. 6-磷酸葡萄糖异构酶；7. 6-磷酸葡萄糖脱氢酶；8. 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶；9. 6-磷酸葡萄糖酸脱水酶；10. 2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸醛缩酶；11. 磷酸甘油醛脱氢酶；12. 磷酸甘油酸激酶；13. 磷酸甘油酸变位酶；14. 烯醇酶；15. 丙酮酸激酶；16. 丙酮酸脱羧酶；17. 乙醇脱氢酶；18. 葡糖酸激酶。

图 1.2 运动发酵单胞菌利用葡萄糖和果糖生成山梨醇、葡萄糖酸以及乙醇的代谢路径

Fig. 1.2 Mechanism of sorbitol, gluconate, and ethanol formation from glucose and fructose in *Z. mobilis*.

GLF, glucose facilitator. The enzyme code numbers are: 1. Levan sucrose; 2. Glucose-fructose oxidoreductase; 3. Gluconolactonase; 4. Glucokinase; 5. Fructokinase; 6. 6-P-Glucose isomerase; 7.

6-P-Glucose dehydrogenase; 8. 6-P-Gluconolactonase; 9. 6-P-Gluconate dehydratase; 10.

2-keto-3-deoxy-6-P-Gluconate aldolase; 11. 3-P-Glyceraldehyde dehydrogenase; 12. Phosphoglycerate kinase; 13. Phosphoglycerate mutase; 14. Enolase; 15. Pyruvate kinase; 16. Pyruvate decarboxylase; 17.

Alcohol dehydrogenase; and 18. Gluconate kinase.

Z. mobilis 在厌氧的条件下可以把 1 mol 的葡萄糖转化为 2 mol 的乙醇和 2 mol 的二氧化碳^[43,44]，消耗 1 mol 的 ATP，并且用作细胞自身生长的碳源只有 2% -5%^[42]。蔗糖是除葡萄糖和果糖之外唯一能被 *Z. mobilis* 利用的碳源。在果聚糖蔗糖酶作用下蔗糖被降解为果糖和葡萄糖，进而被 *Z. mobilis* 用来聚合形成果聚糖或者进一步的代谢^[45-50]。在无氧条件下，*Z. mobilis* 利用果糖、蔗糖和葡萄糖生成二氧化碳和乙醇；在有氧条件下，可以

生成少量的乳酸盐、醋酸盐、乙醛和乙偶姻^[51]。在厌氧条件下,培养基中同时含有果糖、葡萄糖时,*Z.mobilis* 可以生产葡萄糖酸、山梨醇,同时还有二氧化碳和乙醇的产生^[52]。

葡萄糖果糖氧化还原酶(Glucose-fructose oxidoreductase, GFOR)是 *Z.mobilis* 内的主要酶,存在于细胞的周质空间内,由四个相同的分子量为 40 000 Da 的亚基聚合而成,烟酰胺腺嘌呤核苷二磷酸(NADP)紧密连接在 GFOR 上作为辅酶,它的最适温度为 39℃,最适 PH 为 6.4^[53,54]。在 Hardman 和 Scopes 的文章中提到, GFOR 催化反应的机制是典型的乒乓机制,首先是把葡萄糖氧化为葡萄糖酸内酯,同时伴随着 NADPH 的生成,然后 GFOR 再将果糖转化为山梨醇,与此同时辅酶 NADPH 被氧化为 NADP^[53]。最后在葡萄糖酸内酯酶 (GL) 的作用下将葡萄糖酸内酯转化为葡萄糖酸。生成的葡萄糖酸和山梨醇再在各自的运输载体的作用下进入到细胞内部。

1.2.3 山梨醇和葡萄糖酸的生产及应用前景

山梨醇的生产主要是用工业方法,在镍的作用下 D-葡萄糖浆催化加氢得到;葡萄糖酸的生产方法有氧化法和生物法,其中生物法是在黑曲霉作用下将葡萄糖发酵为葡萄糖酸。目前,葡萄糖酸钠和山梨醇的生成一般是在 *Z.mobilis* 的 GFOR 酶作用下,以葡萄糖和果糖为底物产生的,但同时也乙醇的产生。为了提高产物的生成率,同时降低副产物的生成,本实验室的 Liu^[55]等使用基因工程改造的方法,将含有 *gfo* 基因的质粒 pHW20a-*gfo* 转入运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis* ZM4)中构建出了基因工程菌 *Zymomonas mobilis* ZM4(pHW20a-*gfo*),可以成功过表达 GFOR,其酶活性是野生菌的两倍多,并且在催化反应中加入了金属离子,提高了山梨醇和葡萄糖酸的产率并降低了副产物乙醇的生成。在安克红^[40]的研究中,考虑到两种底物葡萄糖和果糖的价格相对较高,就利用廉价的基质菊粉和木薯淀粉以及廉价的商业酶糖化,得到等摩尔的葡萄糖和果糖的混合水解液,再以基因工程菌 ZM4(pHW20a-*gfo*)为细胞催化剂,同时催化产生的山梨醇和葡萄糖酸钠浓度均在 200 g/L 以上,得率在 95%以上。

葡萄糖酸钠和山梨醇有广泛的应用。山梨醇 (D-Sorbitol) 存在于各种水果如苹果 (0.20-1.01 g / 100 g)、黑葡萄(0.20 g / 100 g)、梨子(1.20-2.80 g / 100 g)、桃子(0.50-1.25 g / 100 g)、李子(0.60-2.01 g / 100 g)、樱桃(1.40 g / 100 g)、浆果等^[56,57]中,甜度是蔗糖的 60%。可以作为口香糖、糖果、冰激凌、甜点、糖尿病患者食品等中的甜味剂使用,还可以用作软化剂、增湿剂、质地构成剂等^[56, 58, 59];同时山梨醇也是维生素 C 的前体材料,每年大约有产量的 1/4 都用于合成维生素。山梨醇还可以作为生物炼油中间体,合成很多化学品如丙二醇、乳酸、甘油、聚山梨醇脂肪酸酯、异山梨醇、多聚糖等可替代石油化学品的衍生物。葡萄糖酸是一种无毒、无腐蚀性、无挥发性的温和型有机酸,是除抗生素、氨基酸之外第三大发酵类产品,在工业上主要用作缓冲剂、固化剂和高级表面清洗剂。以葡萄糖酸为生物炼油中间体可以生产很多很重要的可取代石油的化学品和材料。在食品方面,葡萄糖酸及其衍生物还是重要的食品添加剂,葡萄糖酸钙是很好的补钙营养品,极容易被人体吸收且毒副作用小。

1.2.4 葡萄糖酸和山梨醇的分离纯化方法

Chun 和 Rogers 通过强碱性阴离子交换树脂, 在 PH 9.0 的条件下, 利用洗脱剂 0.11 $\text{MNa}_2\text{B}_4\text{O}_7$ / 0.11 MH_3BO_3 将山梨醇和葡萄糖酸分离, 这种分离方法有效, 但是这种方法只适用于小规模实验, 由于操作成本太高的因素, 无法应用于工业上大规模分离^[60]。Jonas 和 Silveira 利用有机溶剂沉淀法, 使用甲醇、乙醇等选择性沉淀剂, 把葡萄糖酸沉淀出来, 山梨醇仍然留在溶液中, 达到很好的分离葡萄糖酸和山梨醇的目的, 葡萄糖酸的纯度达 99%, 同时甲醇也可以回收利用^[61]。Ferraz 等人利用电渗析法, 在生物反应器中安装一个与之相配套的电解体系, 可以在葡萄糖酸催化产生的同时将其移除, 而山梨醇留在溶液体系中, 同样达到分离两种物质的目的^[62]。

尽管这些方法可以很好的分离葡萄糖酸钠和山梨醇, 但是只限于实验室的规模, 因为环境和成本等一些限制因素不能应用于工业上大规模的生产, 需要寻找一种经济、有效、环境友好的适用于工业上大规模生产的葡萄糖酸钠和山梨醇的分离方法。

1.2.5 葡萄糖酸盐的结晶分离

结晶方法分为蒸发结晶和降温结晶。蒸发结晶是不断的蒸发溶剂, 使溶液从不饱和的状态变为饱和的状态, 这样溶液中过剩的溶质就会以晶体的形式析出; 降温结晶, 就是将溶液的温度降低, 这样溶液中溶质的溶解度也会随着降低, 溶液因此达到过饱和状态, 多余的不能溶解的溶质就会以固体的形式析出。结晶过程受到很多因素的影响, 如结晶温度、搅拌速度、溶剂的选择、晶种加入量、结晶时间等, 都会对最终的溶质结晶率产生影响。

结晶分离是一种常用的工业分离方法, 在相关的葡萄糖酸盐结晶研究报道中, 张小昊^[63]对黑曲霉利用葡萄糖发酵生产的葡萄糖酸盐进行了结晶分离, 发酵液葡萄糖酸钠浓度约为 260 g/L, 通过加入乙醇, 降低葡萄糖酸钠的溶解度, 间接提高溶液过饱和度, 然后真空蒸发结晶出葡萄糖酸钠。韦传宝等^[64]在黑曲霉发酵糖化液产生的葡萄糖酸钠溶液中加入碳酸钙, 生成葡萄糖酸钙, 然后浓缩至葡萄糖酸钙 200 g/L, 降温结晶析出葡萄糖酸钙。

1.3 本课题的研究内容与意义

玉米秸秆中蕴含着巨大的能量, 在中国产量很高, 但是利用极低, 大多用作焚烧秸秆, 浪费资源。本实验室将玉米秸秆经过酸法预处理, 将玉米秸秆中的成分破坏, 得到木质素、半纤维素和纤维素, 然后再加入 7 FPU 的纤维素酶, 水解 15% 固含量的预处理后的秸秆, 使得其中的纤维素在纤维素酶的作用下糖化 72 h, 得到包含有葡萄糖和木糖的秸秆糖化液。葡萄糖和木糖的混合晶体用途广泛, 不仅可用于共发酵产乙醇, 还可以用来作为裂解多元醇的原料。

本课题研究的目的是将玉米秸秆糖化液经过精制和结晶, 得到葡萄糖和木糖的混合晶体。首先是糖化液的离心得到糖化清液, 因为溶液颜色很深, 会影响产品的质量, 需要先经过活性炭脱色, 得到颜色比较淡的糖化液; 然后利用阴阳离子交换树脂除去溶液中的盐离子 Na^+ 、 SO_4^{2-} , 减少溶液中离子的存在, 影响接下来的结晶溶液的稳定性;

最后再用旋转蒸发浓缩糖化液，使溶液中葡萄糖和木糖的浓度达到过饱和，加入晶种，在一定温度下结晶数天，就可得到葡萄糖和木糖的混合固体，在冷冻干燥方法下，就可得到葡萄糖和木糖的混合晶体，用于接下来的裂解多元醇实验。

山梨醇是一种重要的化学中间体，可以用作甜味剂、调质剂、润湿剂和软化剂等，还是合成维生素 C 的前体材料；葡萄糖酸及其衍生物是重要的食品添加剂，葡萄糖酸还可作为生物炼油中间体和金属及其他材料的表面清洗剂。目前，葡萄糖酸盐和山梨醇的分离已有一定的研究，且最终都能将葡萄糖酸和山梨醇分离开来，得率很高，但是由于这些方法只适用于实验室规模，由于操作成本和其他因素不能用于工业上大规模的生产，需要寻找一种经济、低耗能、高效率和环境友好的使用于工业上大规模分离葡萄糖酸和山梨醇的方法。

本课题的研究意义在于寻找合适的葡萄糖酸和山梨醇的分离方法。本文考虑到葡萄糖酸盐和山梨醇在溶液中的溶解度都很高，采用了结晶方法分离葡萄糖酸盐和山梨醇，即在两种物质的混合溶液中加入氯化钙，会和葡萄糖酸盐发生反应生成溶解度较低的葡萄糖酸钙，加入无水乙醇后进一步降低葡萄糖酸钙的溶解度，再加入晶种后降温结晶，即可将葡萄糖酸钙结晶出来，山梨醇仍然留在溶液中，达到分离两种物质的目的。本文首先研究了只有葡萄糖酸盐单一溶质存在的溶液中影响结晶的因素，氯化钙加入量、降温条件；然后研究了葡萄糖酸盐和山梨醇的混合溶液，考察氯化钙加入量和降温条件对结晶的影响，同时发现加入无水乙醇后能更进一步提高葡萄糖酸钙结晶率。本文对提出的结晶分离方法对分离生物质来源的葡萄糖酸钙和山梨醇的工业化应用提出了一个低成本分离技术的概念。

第二章 材料与方法

2.1 实验材料与设备

2.1.1 实验材料与试剂

实验研究过程中使用到的主要材料与试剂见表 2.1.

表 2.1 实验材料与试剂

Table 2.1 Experimental reagent

试剂名称	规格	生产厂家
菊粉		上海郎瑞精细化学品有限公司
木薯淀粉		琼中奔鹿淀粉有限公司
淀粉酶 HTAA		苏州杰能科生物有限公司
糖化酶 GA-L NEW		苏州杰能科生物有限公司
Sodium Gluconate	AR	Amresco Inc.
Sorbitol	AR	Amresco Inc.
Glucose.H ₂ O	AR	国药集团化学试剂有限公司
KH ₂ PO ₄	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
(NH ₄) ₂ SO ₄	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
CaCl ₂	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
无水乙醇	AR	国药集团化学试剂有限公司
盐酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
NaOH	AR	上海振兴化工工厂
Calcium Gluconate	AR	阿拉丁试剂有限公司
玉米秸秆		河南郸城
纤维素酶		上海尤特尔生化有限公司
活性炭	AR	国药集团化学试剂有限公司
732 树脂		华东理工大学华昌聚合物有限公司
D315 树脂		华东理工大学华昌聚合物有限公司
Glucose	AR	生工生物工程有限公司

2.1.2 实验设备

实验研究过程中使用到的主要仪器见表 2.2

表 2.2 实验仪器

Table 2.2 Experimental instrument

仪器名称	型号	生产厂家
电子天平	BS223S	梅特勒 (上海)有限公司
自动电位滴定仪	ZD-2	上海雷磁仪器厂
自动高温灭菌锅	YXQ-1S-75S II	上海博迅实业有限公司
立式振荡培养箱	HZ-9311K	太仓华利达有限公司
超声波清洗机	KWT-100A	科伟达超声波设备有限公司
Eppendorf 台式离心机	5415R	Eppendorf 公司
移液器	Research	Eppendorf 公司
Beckman 大型超速离心机	J-26	Beckman
电热鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科技有限公司
制冰机	XB-70	宁波新芝生物科技有限公司
-80 °C 冰箱	Forma-86C	Thermo 公司
冰箱	BCD-239VC	海尔公司
pH 计	PHS-3C	上海精密科学仪器有限公司
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化设备有限公司
高效液相色谱仪	1C-20AD	岛津公司
超纯水机	Milli-Q Synthesis	Millipore 公司
四联发酵罐	Biotech-4BG	保兴生物设备工程有限公司
5l 反应器	5l	保兴生物设备工程有限公司
超级恒温水槽	ZC-18Q	宁波天恒仪器厂
DU-800 核酸蛋白分析仪	722N	上海精科实业有限公司
不锈钢多层过滤器		上海大张环保设备有限公司
雷磁电导率仪	DDS-307A	上海精密科学仪器有限公司
层析柱	600 mm*20 mm	上海卫程科学仪器有限公司
旋转蒸发仪	RE-201D	上海科兴仪器有限公司
Longer-Pump	YZ 1515x	保定格兰恒流泵有限公司
低温冷却循环泵	DLSB	上海鹰迪仪器设备有限公司

2.2 分析方法

2.2.1 脱色后溶液中色素含量分析

利用 DU-800 核酸蛋白分析仪进行全波长扫描^[65]。实验前先将仪器打开预热 5-10min, 然后选择波长范围 400-800nm, 测定不同活性炭用量下溶液的吸光值, 对比不同活性炭用量下的溶液脱色效果。

2.2.2 溶液的电导分析

利用雷磁电导率仪测定溶液的电导。实验前先将仪器打开预热 20-30min, 再将脱色

后的取样溶液稀释 100 倍，稀释时用去离子水，以减少不必要的离子的引入，影响实验结果的准确性。然后用电导仪测定溶液的电导三次，取平均值，做出曲线图分析溶液电导变化趋势。

2.2.3 溶液的蛋白含量测定

玉米秸秆糖化液是在纤维素酶作用下糖化所得，之后的纤维素酶没有回收，因此溶液中会含有蛋白质成分，需要测定其含量，分析对后续实验的影响。首先是绘制蛋白质标准曲线，通过 Bradford 法在 595nm 下测定溶液的吸光值，见表 2.3。

表 2.3 蛋白质的标准曲线测定

Table 2.3 The determine system of protein standard curve

BAS (μg)	K-MES buffer (μL)	Bradford (mL)	A_{595}
0	200	2	0
10	190	2	0.207
15	185	2	0.300
20	180	2	0.385
25	175	2	0.481
30	170	2	0.548

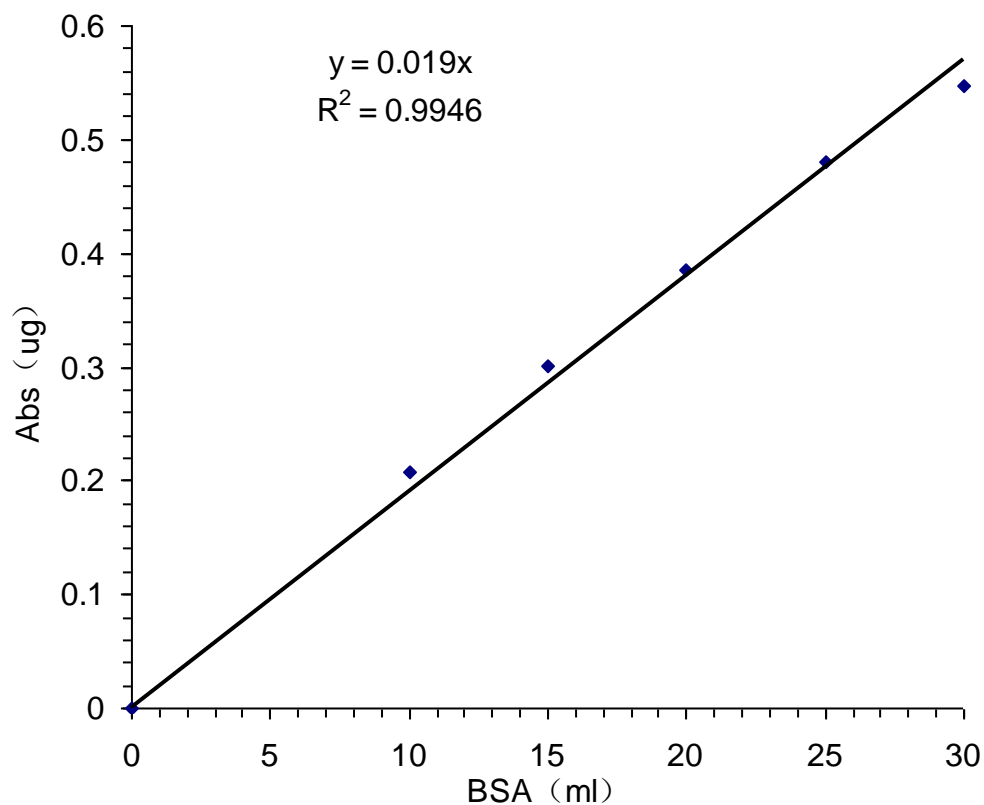


图 2.1 蛋白质含量标准曲线

Fig. 2.1 Standard curve of protein

溶液中纤维素酶含量测定方法：取脱色后的糖化液 200 μL ，加入 2 mL 的 Bradford 工作液，振荡混合均匀后在 595 nm 下测定溶液的吸光值。

2.2.4 高效液相色谱法测定组分含量

本实验研究过程中，葡萄糖、葡萄糖酸、果糖、山梨醇、木糖、乙酸、乙酰丙酸、5-羟甲基糠醛、糠醛的测定采用高效液相色谱仪。高效液相色谱仪的仪器型号为日本岛津的 LC-20AD，RID-10A 的示差检测器，色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H。检测过程的检测条件：柱温 65 $^{\circ}\text{C}$ ，流动相是 0.005 mol/L 硫酸，流速为 0.6 ml/min。

测定时首先做出样品的标准曲线。样品用前在 80 $^{\circ}\text{C}$ 烘 12h，然后用超纯水配制已知浓度的标准品，梯度稀释 2、4、8、16、32、64 倍后进样，根据显示的液相色谱图得出该物质的出峰时间和峰面积，作出做出相应的曲线图。

实验中样品组分含量的测定过程与标准品做法相似，首先对样品进行适当倍数的稀释，然后通过 0.22 μm 的微孔滤膜过滤后进样，根据峰面积计算出样品中所需组分的含量。

2.2.5 计算公式：

$$\text{葡萄糖酸钙的结晶率} = S_1 / (S_0 \times 430 / 218.14 \times 2) \times 100\% \quad (2-1)$$

S_1 : 抽滤后固体的干重 (g)

S_0 : 开始加入葡萄糖酸钠质量 (g)

430: 葡萄糖酸钙相对分子质量

218.14: 葡萄糖酸钠相对分子质量

$$\text{山梨醇的析出率} = (1 - (C_1 \times V_1 \times 182.17) / R_1) \times 100\% \quad (2-2)$$

C_1 : 结晶后溶液中山梨醇浓度 (g/L)

V_1 : 结晶后溶液总体积 (mL)

R_1 : 结晶前溶液中山梨醇质量 (g)

182.17: 山梨醇相对分子质量

$$\text{质量守恒} = (m_1 + m_2) / (M_1 + M_2) \quad (2-3)$$

m_1 : 结晶结束后离心固体的干重 (g)

m_2 : 结晶结束后离心液体干重 (g)

M_1 : 开始溶液中溶质的总质量 (g)

M_2 : 加入 CaCl_2 质量 (g)

2.3 玉米秸秆糖化液的精制和结晶

2.3.1 秸秆的预处理和糖化

购买的玉米秸秆是经过粗粉碎过的，会含有一定量的尘土、沙石等的杂质，会对接下来的各个生物炼制过程产生不利影响，需要先清洗除去杂质，后放于 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干 12h，再利用实验室粉碎机将烘干的秸秆再次粉碎，粒度在 1 cm 以下。然后用稀酸预

处理, 条件为: 酸用量 5%、预浸固液比 2:1、预浸 12 h, 再用高温 190°C、3 min 预处理。预处理完的物料放于 -20°C 冰箱中保存备用。

糖化反应实验是在 5 L 反应器中进行, 15% 固含量、7 FPU 的酶用量 (纤维素酶酶活为 145 FPU/g)。糖化条件为 pH 4.8、50°C、150 rpm, 用 5 mol/L NaOH 调节 PH。试验中所用的去离子水和 NaOH 溶液预先进行灭菌, 条件为 115°C、20 min。反应 72h 后, 糖化溶液经过 Beckman 大型超速离心机离心 7800 rpm、15 min, 收集上清液 4°C 冷冻备用。

2.3.2 活性炭脱色

取玉米秸秆糖化清液, 放在 80°C 水浴环境下, 加入质量比分别为 0%、1%、2%、3%、4%、6%、10% 的活性炭 (活性炭在使用前, 首先要进行活化, 将活性炭放入 105°C 的烘箱内活化 2 h, 后取出密封保存, 备用^[67]), 搅拌约 25-30 min, 用板框压滤机 (板框压滤机使用前清洗干净, 放两层滤布) 过滤溶液, 使溶液在板框中循环多次, 除去活性炭, 最后收集清液 4°C 冰箱保存备用。同时用全波长扫描法测定板框压滤后脱色溶液的吸光值, 高效液相法测定溶液中总糖和抑制物浓度, 电导仪测定溶液中电导, 核酸蛋白分析仪测定溶液中纤维素酶含量。

2.3.3 离子交换

脱色完后的糖化液中含有大量的离子, 有预处理过程中加入的 H_2SO_4 电离产生的 SO_4^{2-} , 和糖化过程中加 NaOH 调节 PH 值引入的 Na^+ 。本实验室用 732 型强酸性阳离子交换树脂和 D315 型弱碱性阴离子交换树脂。

树脂用前要先进行预处理。732 树脂先用蒸馏水冲洗以除去杂质, 然后用 2 mol/L 的 NaOH 浸泡, 用蒸馏水洗至中性, 然后再用 2 mol / L 的 HCl 浸泡, 用去离子水洗至中性, 在 80°C 烘箱内烘 12 h 后置干燥器中备用^[68]。D315 树脂先用 40°C 热水反复漂洗至无泡沫, 再用 5% HCl 浸泡 4 h, 去离子水冲洗至中性, 再用 5% NaOH 浸泡 4 h, 去离子水冲洗至 PH 8.0 左右, 备用^[69]。

处理完之后的树脂要进行装柱。本实验室用的离子交换柱规格是 600 mm*20 mm, 可以装 180mL 湿树脂, 将树脂倒入柱中注意避免气泡的引入, 直至到达 180mL 刻度线, 然后将树脂柱固定在铁架台上, 用铅垂线调整树脂柱方向, 使其与桌面垂直, 然后调整树脂柱下端开关和泵开关, 使上下两个开关进出液体流速相同, 以一定流速泵入去离子水到树脂柱中, 冲洗树脂并使树脂沉降, 然后将树脂柱上下开关关闭备用。

离子交换过程分为两步。首先用 732 型强酸性阳离子交换树脂除去溶液中的 Na^+ 。将预处理后的 732 树脂倒入柱中, 柱中树脂总体积约为 180 mL, 然后调整溶液流速, 以 12、30、52 mL/min 的流速将经过 3% 活性炭脱色后的溶液泵入离子交换柱中。交换的糖化溶液总体积为 1200 mL, 每隔一定时间取样一次, 用电导仪测溶液电导, 同时用高效液相测溶液中葡萄糖和木糖浓度。收集经过 732 树脂后有效交换的糖化液, 放于 4°C 备用。其次用 D315 型弱碱性阴离子交换树脂除去溶液中的 SO_4^{2-} 。将预处理后的 D315 树脂倒入柱中, 柱中树脂总体积约为 180 mL, 然后调整溶液流速, 以 18、25 mL/min

的流速将已经通过 732 柱交换后收集的溶液通过 D315 交换柱。交换的溶液总体积为 4 L, 每隔一定时间取样一次, 用电导仪测溶液电导, 同时用高效液相测溶液中葡萄糖和木糖浓度。

2.3.4 旋转蒸发浓缩

经过两种树脂交换完之后的糖液, 溶液中 Na^+ 和 SO_4^{2-} 浓度明显降低, 通过旋转蒸发浓缩溶液, 提高溶液中葡萄糖和木糖浓度, 旋转蒸发条件为 -0.095 MPa 、 7 rpm ($0-10 \text{ rpm}$), 旋转蒸发前糖液体积为 500 mL , 温度分别为 50 、 60°C , 时间 80 min , 每隔 20 min 测定旋转蒸发出溶液的体积。

2.3.5 结晶和干燥

旋转蒸发之后的糖化液, 溶液中葡萄糖和木糖浓度显著提高, 达到过饱和的状态, 可以进行结晶实验。结晶时的温度为 20°C , 加入晶种葡萄糖 1% (g/g) 并轻微搅拌混合均匀, 结晶 $10-12 \text{ d}$ 。

结晶完之后的溶液需要经过冷冻干燥方能得到葡萄糖和木糖的混合固体。首先将结晶之后的溶液倾倒在培养皿中, 均匀铺开, 用薄膜封口放在 -80°C 冰箱中冻干 24 h , 然后放在冷冻干燥设备中 48 h , 即可得到葡萄糖和木糖的混合固体。

取混合固体 0.2230 g 用去离子水溶解, 然后定容到 25 mL , 然后进行 HPLC 测定溶液所含的物质及其浓度。

2.4 葡萄糖酸钠与山梨醇的结晶分离

2.4.1 葡萄糖酸钙晶种的制备

取一定量的葡萄糖酸钙固体, 用干净的研钵碾碎之后用标准筛过滤, 收集 $60-80$ 目之间的固体颗粒, 作为葡萄糖酸钙晶种备用。

2.4.2 单一的葡萄糖酸钠溶液的制备和结晶

制备葡萄糖酸钠溶液: 称取一定量的葡萄糖酸钠于玻璃烧杯中, 加入去离子水, 两者比例为 $1.0:2.5$ (w/w), 在 40°C 水浴锅中用玻璃棒不断搅拌溶解。此时葡萄糖酸钠溶液浓度约为 300 g/L , 然后放在 4°C 冰箱中备用。

CaCl₂ 加入量对结晶影响: 将配制好的葡萄糖酸钠溶液在 40°C 溶解, 加入氯化钙, 使得氯化钙:4 葡萄糖酸钠(g/g) 分别为 $0.0:1.0$ 、 $0.9:1.0$ 、 $1.0:1.0$ 、 $1.1:1.0$ 、 $1.2:1.0$ (g/g), 之后不断搅拌使氯化钙充分溶解, 然后将水浴锅温度调到 20°C , 待溶液温度降至 20°C 后, 加入 0.1% 的葡萄糖酸钙晶种, 轻微搅拌使晶种分散均匀, 最后密封结晶 12 h 。

降温条件对结晶影响: 将配制好的葡萄糖酸钠溶液在 40°C 溶解, 加入氯化钙: 4 葡萄糖酸钠为 $1.0:1.0$ (g/g), 不断搅拌使氯化钙充分溶解后, 将水浴锅温度分别降到 30°C 、 20°C 、 10°C 、 0°C , 待溶液降至相应温度后加入 0.1% 的葡萄糖酸钙晶种, 轻微搅拌使晶种分散均匀, 最后密封结晶 12 h 。

2.4.3 葡萄糖酸钠和山梨醇混合溶液的结晶分离

制备葡萄糖酸钠和山梨醇混合溶液: 称取等摩尔的葡萄糖酸钠和山梨醇于玻璃烧杯

中, 加入去离子水, 葡萄糖酸钠和去离子水比例为 1.0:2.2 (w/w), 在 40℃水浴中用玻璃棒不断搅拌溶解。此时溶液中葡萄糖酸钠浓度约 300 g/L, 山梨醇浓度约 240 g/L, 然后放在 4℃冰箱中密封备用。

乙醇加入量对结晶影响: 将配制好的葡萄糖酸钠和山梨醇混合液在 40℃溶解, 加入氯化钙: 4 葡萄糖酸钠为 1.0: 1.0 (g/g), 不断搅拌溶解后将水浴锅温度调到 10℃, 待溶液降至 10℃后加入乙醇比例分别为 0%、30%、40%、50%、60%(V/V), 再加入 1% 的葡萄糖酸钙晶种, 轻微搅拌使晶种分散均匀, 密封结晶 12 h。

CaCl₂ 加入量对结晶影响: 将配制好的葡萄糖酸钠和山梨醇混合液在 40℃溶解, 加入氯化钙: 4 葡萄糖酸钠分别为 0.0:1.0、1.0: 1.0、1.2: 1.0、1.5:1.0 (g/g), 不断搅拌溶解后将水浴锅温度调至 10℃, 待溶液温度降至 10℃后, 加入乙醇 50% (V/V), 再加入 1% 的葡萄糖酸钙晶种, 轻微搅拌使晶种分散均匀, 密封结晶 12 h。

2.4.4 菊芋和淀粉生物转化产品中葡萄糖酸钠与山梨醇溶液的制备和结晶

菊粉和木薯淀粉的液化和糖化: 首先菊粉 (50%w/w) 在 5 L 发酵罐中进行水解, 60℃、pH 4.0、糖化酶酶量 1 U/g inulin, 水解 48 h; 其次, 木薯淀粉 (50%w/w) 在 90℃、液化酶酶量 11 WU/g starch、pH 6.0 条件下液化 1 h, 然后降温并调整 pH 至 4.0。最后, 将液化后的淀粉溶液加入到菊粉溶液中, 60℃、pH 4.0, 继续水解 12 h, 获得水解液用于催化实验。其中菊粉和木薯淀粉的质量比为 1:0.63, 糖化过程中用 2mol/L NaOH 调节 PH 值。

重组运动发酵单胞菌 ZM4(pHW20a-*gfo*) 为本实验室所构建^{[18][66]}, 先经过培养。种子培养基组成为 10 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 1 g/L KH₂PO₄, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O (pH 6.0)。种子细胞培养前加入 20 μg/mL 的四环素, 以避免质粒丢失。发酵罐培养 *Z. mobilis* 细胞的培养基组成为 100 g/L glucose, 5 g/L yeast extract, 1 g/L KH₂PO₄, 5 g/L (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/L MgSO₄·7H₂O (pH 6.0)。2 mol/L 的 NaOH 控制 pH; 葡萄糖和培养基的其他组分分开灭菌。以上各培养基灭菌条件为 115℃, 20min。

试验中菌种的保存采用甘油冻存法, 将生长到对数中期的细胞与 60% 的甘油 (115℃, 20min 灭菌) 进行 1: 1 的混合, 用液氮速冻后放于 -80℃ 超低温冰箱中保存。*Z. mobilis* 培养过程中, 从超低温冰箱中取出冻存的菌种, 接入种子培养基中, 培养条件为 30℃, 150 rpm。当菌体生长至对数中后期 (约 20 h) 时, 以 10%(v/v) 的接种量接入 3 L 发酵罐中, 培养条件为 30℃, 150 rpm, pH 6.0。待培养 16-18 h 后将 ZM4(pHW20a-*gfo*) 菌体离心 8000 rpm, 5 min, 倒去上清, 放在 4℃ 冰箱中备用。

催化反应实验是在 3 L 反应器中进行, 500 mL 的菊粉和木薯淀粉水解液, 然后再用少量去离子水将菌体混匀后接入发酵罐中, 菌体浓度为 20 g/L 干重。催化条件为 pH 6.4、39℃、150 rpm, 用 14mol/L NaOH 调 PH, 进行反应 8 h, 催化完之后的溶液经过离心 (8000 rpm, 5 min) 取上清液, 获得葡萄糖酸钠和山梨醇混合溶液, 放在 4℃ 冰箱中备用。

CaCl₂ 加入量对结晶影响: 将催化获得的葡萄糖酸钠和山梨醇混合液在 40℃溶解, 加入氯化钙: 4 葡萄糖酸钠比例分别为 1.0: 1.0、1.5: 1.0、2.0:1.0 (g/g), 不断搅拌溶

解后将水浴锅调至 10℃，待温度降到 10℃，加入乙醇 50% (V/V)，再加入 1% 的葡萄糖酸钙晶种，轻微搅拌使晶种分散均匀，密封结晶 12 h、24 h。

降温条件对结晶影响：将催化获得的葡萄糖酸钠和山梨醇混合液在 40℃ 溶解，加入氯化钙:4 葡萄糖酸钠比例为 1.0: 1.0 (g/g)，不断搅拌溶解后将水浴锅调至 10℃，待温度降到 10℃，加入乙醇 50% (V/V)，再加入 1% 的葡萄糖酸钙晶种，轻微搅拌使晶种分散均匀，密封结晶 12 h，然后降温到 0℃，继续结晶到 24 h。

2.4.5 结晶溶液的分离收集

结晶后的溶液离心 (8000 rpm, 5 min)，收集离心固体用 50% 乙醇清洗多次，以除去固体中含有的山梨醇，然后放在 80℃ 烘箱中烘至恒重，称取结晶产物的重量。

葡萄糖酸钙的结晶率是结晶后实际生成的葡萄糖酸钙干重，与结晶前溶液中含有的葡萄糖酸钠理论上可以生成葡萄糖酸钙干重的比值；

山梨醇的析出率是结晶后随着葡萄糖酸钙结晶而析出的山梨醇固体干重，与结晶前溶液中含有的山梨醇干重的比值；

质量守恒是结晶后离心的固体部分和液体溶质部分的总干重，与结晶前溶液中溶质总干重和加入氯化钙质量总和的比值；表征着溶液结晶实验前后质量的损失。

第三章 实验结果

3.1 玉米秸秆糖化液的精制和结晶

3.1.1 活性炭脱色

玉米秸秆糖化液经过离心，溶液颜色深，不利于下序实验，需要先对溶液脱色。试验中用不同质量分数的活性炭 0%、1%、2%、3%、4%、6%、10% 对溶液进行脱色，再通过全波长扫描和 HPLC 测溶液各物质浓度，核酸蛋白分析仪测定溶液中纤维素酶含量，对比不同活性炭用量下的脱色效果，结果分别见图 3.1、图 3.2。

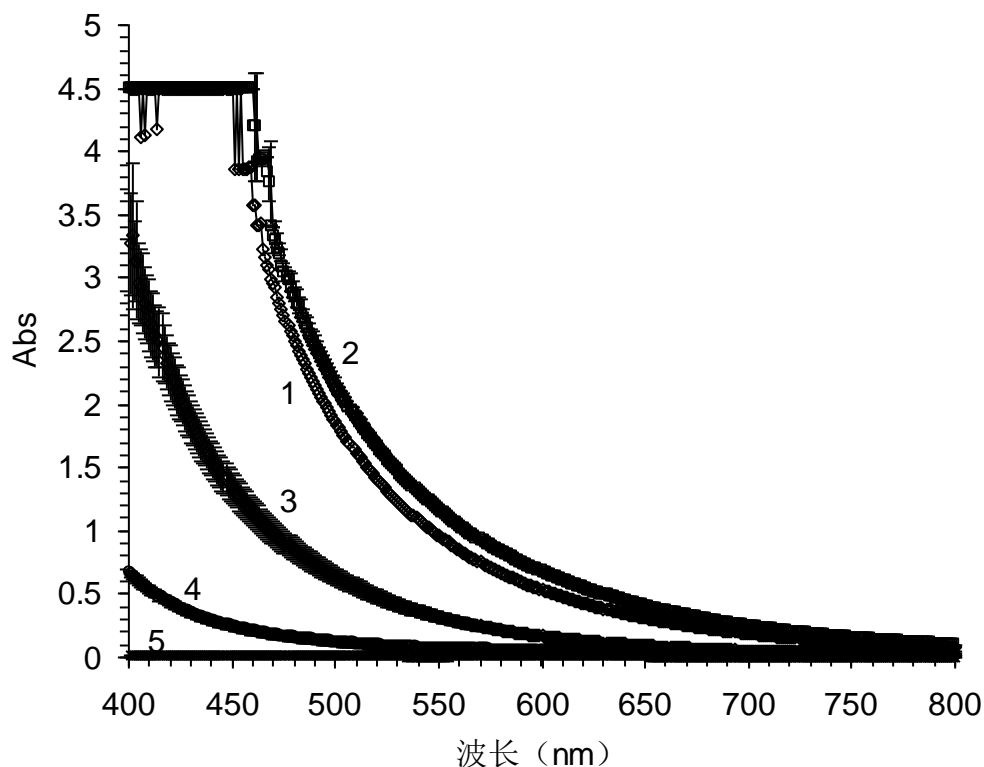


图 3.1 活性炭的脱色效果

1.原液；2.经质量分数 0% 的活性炭处理后；3.经质量分数 1% 的活性炭处理后；4. 经质量分数 2% 的活性炭处理后；5. 经质量分数 3%、4%、6%、10% 的活性炭处理后

Fig. 3.1 Decolorization result of activated carbon

1.Original solution; 2.treated with activated carbon of mass fraction 0%; 3.treated with activated carbon of mass fraction 1%; 4.treated with activated carbon of mass fraction 2%; 5.treated with activated carbon of mass fraction 3%、4%、6%、10%

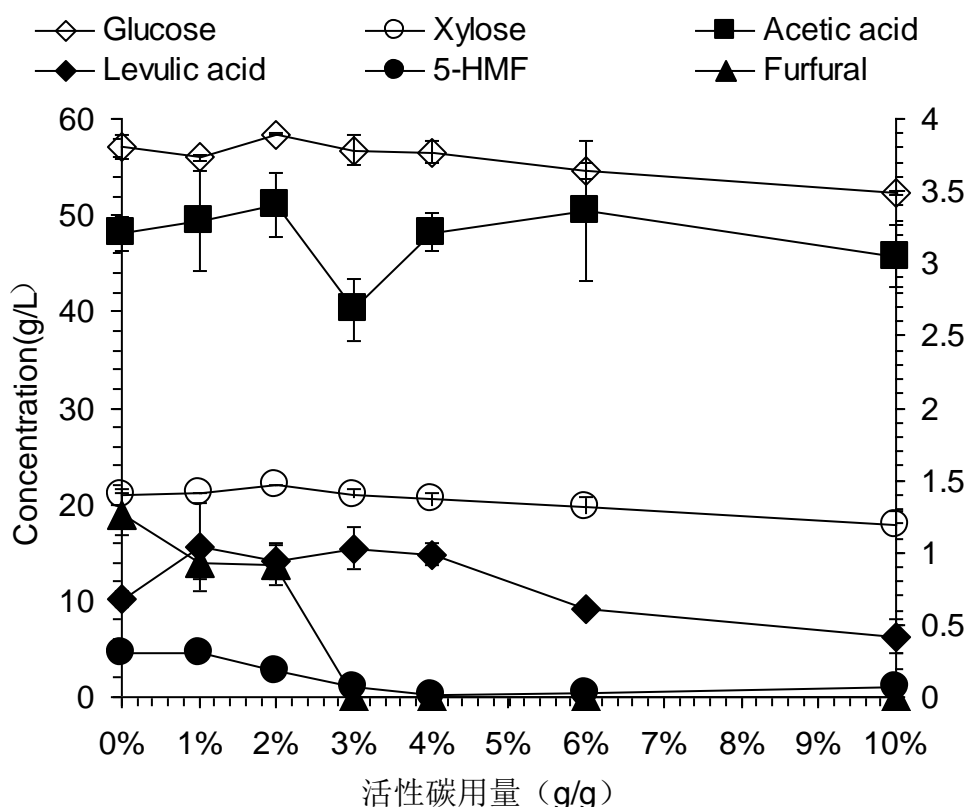


图 3.2 脱色后溶液中各物质浓度变化

Fig. 3.2 Concentration of solution after decolorization by activated carbon

玉米秸秆糖化液经过离心后还有较深的颜色，需要进一步脱色纯化。活性炭是黑色粉末，无毒、无臭、无味，具有多孔结构，能吸附糖液中色素物质，有脱色效果。从图 3.1 看出，加入活性炭后溶液脱色效果明显，溶液吸光值明显降低，且随着活性炭用量增加，脱色效果也增强，加入活性炭质量分数 3% 以上，溶液吸光值 < 0.2 ，可认为脱色完全。活性炭不仅具有吸附脱色作用，同时也会吸附掉部分多糖，可能造成多糖组分的损失，从图 3.2 看出，随着活性炭用量增加，多糖有一定量的吸附，但是吸附量很低，可忽略不计；同时活性炭对溶液中的抑制物也有一定的吸附，乙酸和乙酰丙酸有吸附，但是吸附量同样很低，可忽略不计；糠醛和 5-羟甲基糠醛也有吸附，而且吸附量与活性炭的用量成正比，活性炭用量越大，溶液中糠醛和 5-羟甲基糠醛含量越低，在活性炭用量高于 3% 时，溶液中两种物质浓度可忽略不计。同时测定的溶液中纤维素酶含量，其蛋白含量吸光值 $< 0.05 < (0.2-0.8)$ 准确区，可以认为无蛋白，即脱色后的溶液中无纤维素酶存在，不会对后续的结晶实验产生影响。

综上所述，用不同量的活性炭 0%、1%、2%、3%、4%、6%、10% 进行脱色，从活性炭用量成本和脱色后效果（溶液吸光值、溶液中各物质浓度变化等）综合考虑，3% 活性炭用量最好。

3.1.2 离子交换

用 3% 活性炭脱色后的溶液，电导约为 30000 us/cm，远远大于去离子水电导 3.89us/cm。溶液中过量的离子会影响结晶时溶液的稳定性，不易形成晶体，因此需要先对脱色后溶液进行离子交换，除去溶液中存在的 Na^+ 、 SO_4^{2-} 离子。

首先用 732 型强酸性阳离子交换树脂除去 Na^+ 。考察不同流速下，溶液的电导（如图 3.3 (a)）和总糖浓度变化（如图 3.3(b)），及不同流速下溶液交换性质变化（如表 3.1）。

表 3.1 不同流速下溶液在 732 树脂上的交换性质

Table 3.1 Exchange ability of solution in the 732 resin under different flow rates

Flow rate (mL/min)	Wet volume (mL)	Exchange volume (mL)	Exchange capacity(mL)	Effective exchange time (min)	Exchange time(min)
12	180	1200	800	66.7	100
30	180	1200	800	26.7	40
52	180	1200	800	15.4	23

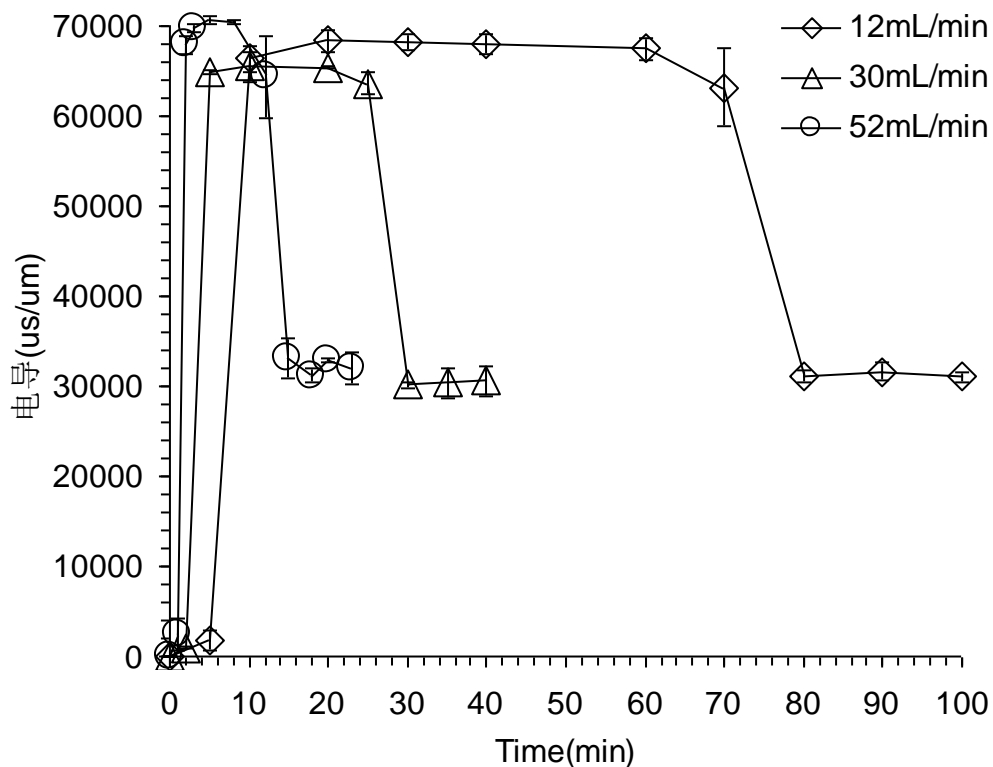


图 3.3(a) 732 树脂交换过程中溶液电导变化

Fig. 3.3(a) Conductivity of solution in the 732 resin

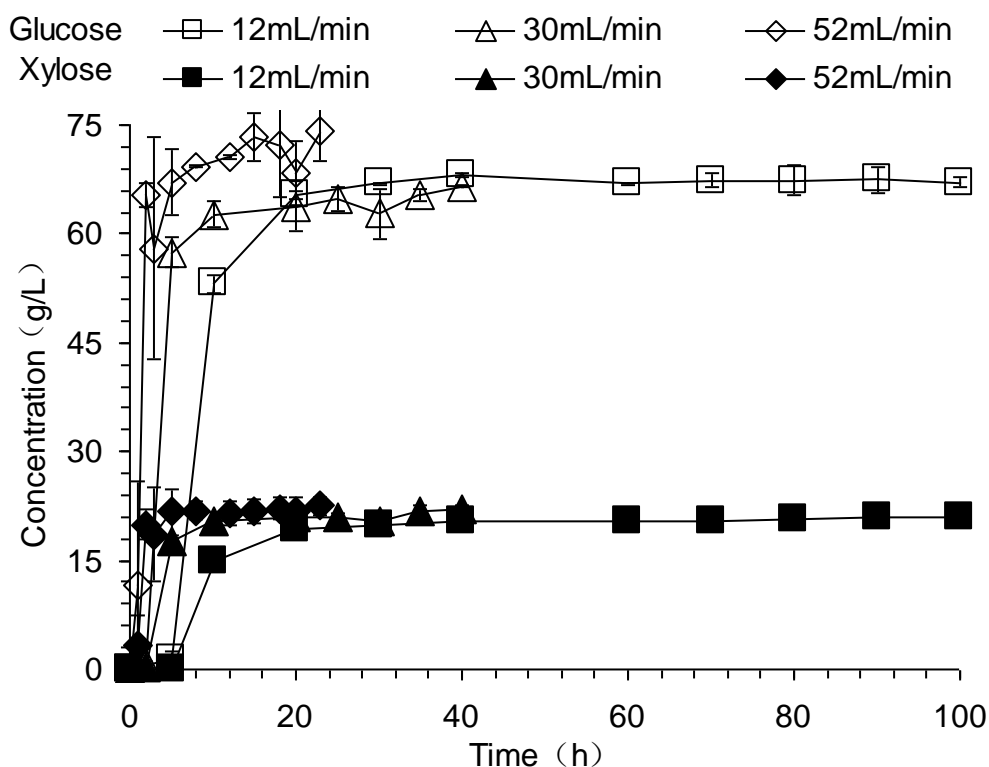


图 3.3(b) 732 树脂交换过程中溶液总糖浓度变化

Fig. 3.3(b) Concentration of glucose and xylose in the 732 resin

由上图 3.3(b)看出，溶液交换过程中，在不同的交换流速下，溶液中的总糖浓度基本不变，说明在交换过程中 732 树脂对总糖基本没有吸附，可以用作有效除 Na^+ 树脂。由图 3.3(a)看出，在离子交换过程中，溶液电导开始较低，因为树脂中含有水，将溶液稀释，一定时间后，树脂中充满糖化液，开始进行离子交换，溶液的电导迅速上升到约 70000 us/cm ，表明此时树脂和溶液中的 Na^+ 进行有效交换，溶液电导在 70000 us/cm 维持一段时间后迅速降到 30000 us/cm ，表明此时已达到了树脂的有效交换容量，树脂已达到饱和，不能再进行交换，交换完成。溶液电导维持在 70000 us/cm 左右的一段时间内离子交换柱中流出的糖液，是有效交换 Na^+ 之后的溶液，收集用作接下来 D315 离子树脂交换的溶液。由表 3.1 看出，以不同流速进行离子交换，固定的湿树脂体积 180 mL，糖液的交换容量一定，只是交换时间发生变化，流速越高，交换效率越高。试验中 52 mL/min 流速下交换 Na^+ 效果最好。

其次用 D315 型弱碱性阴离子交换树脂除去 SO_4^{2-} 。考察不同流速下，溶液电导（如图 3.4 (a)）和总糖浓度变化（如图 3.4 (b)），同时对不同流速下溶液交换性质进行对比（如表 3.2）。

表 3.2 不同流速下溶液在 D315 树脂上交换性质

Table 3.2 Exchange ability of solution in the D315 resin under different flow rates

Flow rate (mL/min)	Wet volume (mL)	Exchange volume (mL)	Exchange capacity (mL)	Effective exchange time (min)	Exchange time(min)
18	180	2200	1260	70	120
25	180	4000	1250	50	180

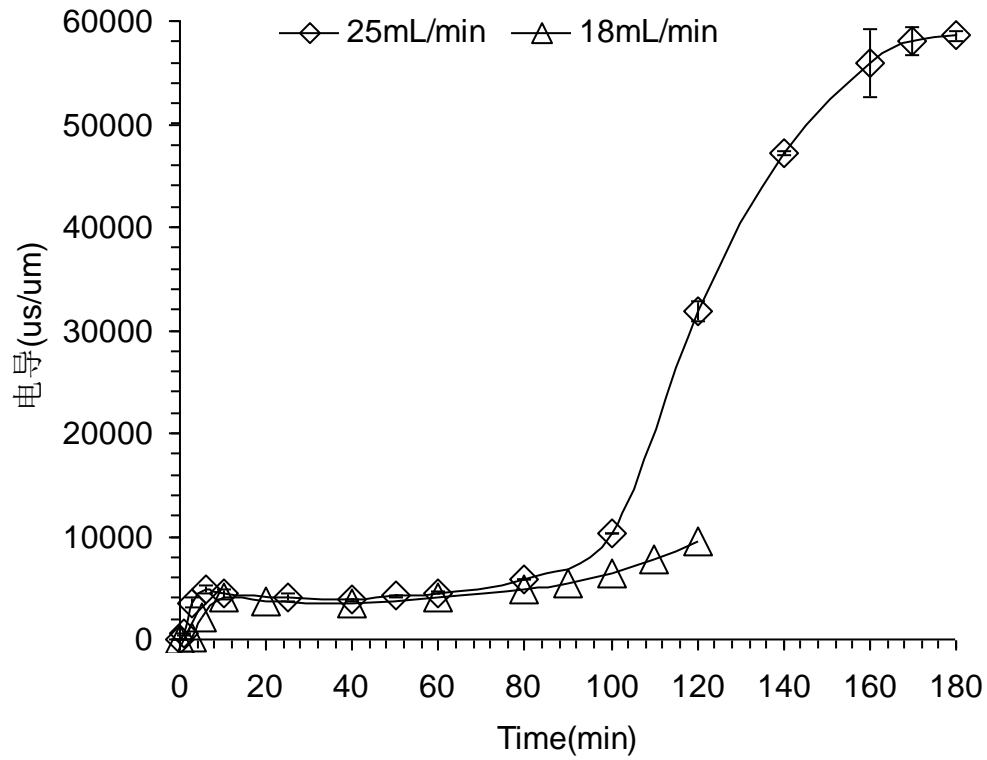


图 3.4 (a) D315 树脂交换过程中溶液电导变化

Fig. 3.4 (a) Conductivity of solution in the D315 resin

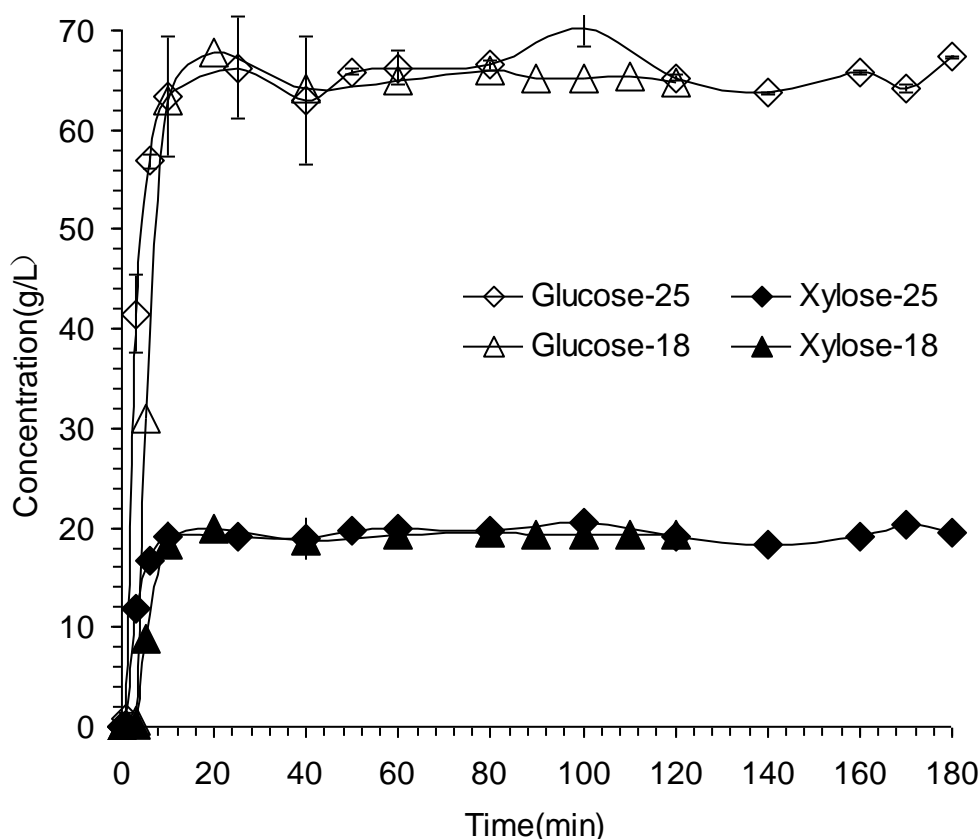


图 3.4 (b) D315 树脂交换过程中溶液总糖浓度变化

Fig. 3.4 (b) Concentration of glucose and xylose in the D315 resin

由图 3.4 (b) 看出，溶液交换过程中，总糖浓度基本不变，说明 D315 树脂对其基本没有吸附，可以选作有效交换 SO_4^{2-} 树脂。由图 3.4 (a) 看出，在离子交换过程中，溶液电导开始较低，因为树脂中含有水，将溶液稀释，一定时间后，树脂中充满糖化液，开始进行离子交换，后迅速升到约 4000 us/cm，表明此时树脂和溶液中的 SO_4^{2-} 进行了有效离子交换，溶液电导维持在 4000 us/cm 一段时间后开始变化，缓慢的上升，直到 70000 us/cm，表明此时已达到了树脂的有效交换容量，树脂已达到饱和，交换完成。收集溶液电导维持在 4000 us/cm 左右的一段时间内的交换糖液，可以用作接下来旋转蒸发浓缩的溶液。由表 3.2 看出，以不同流速进行离子交换，固定的湿树脂体积 180 mL，糖液的交换容量一定，只是交换时间发生变化，流速越高，交换效率越高。试验中 25 mL/min 流速下交换 SO_4^{2-} 效果最好。

3.1.3 旋转蒸发浓缩

经过两种树脂交换完后的糖液中离子浓度降低了很多，可以进行旋转蒸发浓缩提高总糖浓度，进而进行结晶实验。溶液旋转蒸发结果如图 3.5 和表 3.3。

表 3.3 旋转蒸发前后溶液性质变化

Table 3.3 Changes in the solution properties before and after rotary evaporator

	Concentration (g/L)		Volume (mL)	Conductivity (us/cm)
	Glucose	Xylose		
Before rotary evaporator	64.8	19.4	500	4140
After rotary evaporator	641 ± 48	200 ± 7	50 ± 4.0	46700 ± 2687
evaporator	702 ± 106	217 ± 21	35 ± 7.1	47650 ± 4455

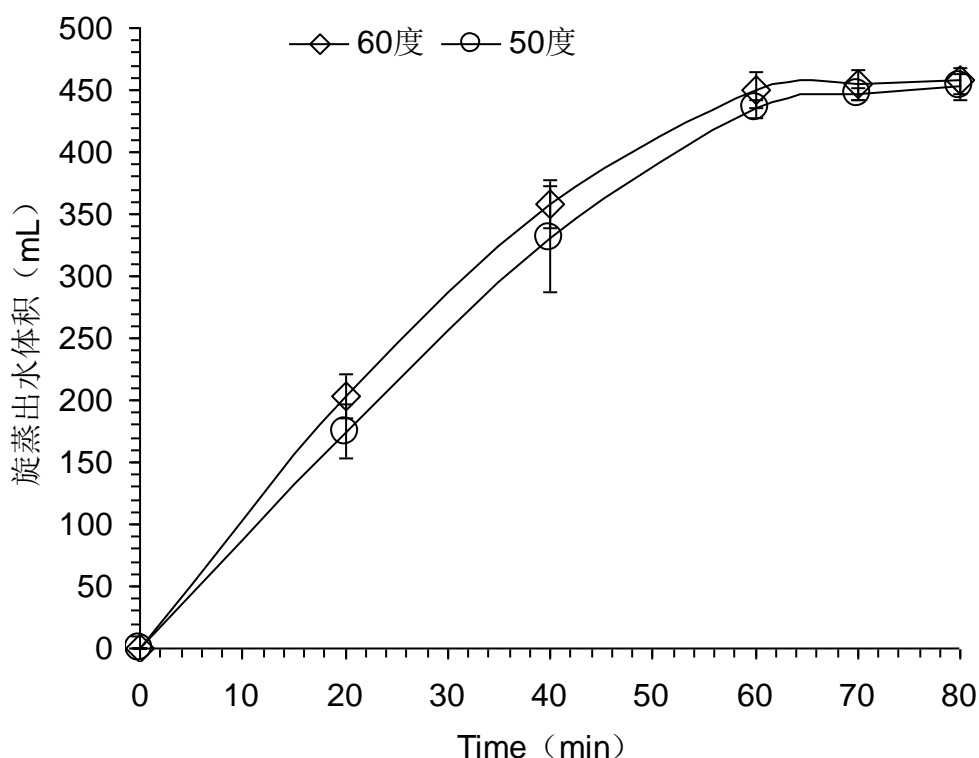


图 3.5 温度对旋转蒸发出液体体积的影响

Fig. 3.5 Effect of temperature on volume of liquid under rotary evaporator

由图 3.5 看出, 随着时间延长, 旋转蒸发浓缩出的液体体积也在增加, 并在 60 min 左右达到最大值, 之后随时间增加, 旋转蒸发出液体体积没有明显增加。考察的两个温度 50、60℃, 旋转蒸发效果基本相同。由表 3.3 看出, 旋转蒸发后, 糖化液体积约为原来的 1/10, 同时总糖浓度有显著提高, 约为原来糖液浓度的 10 倍。糖化液得到了有效的浓缩, 可以用于接下来的结晶实验。

3.2.4 结晶和干燥

旋转蒸发之后的糖化液总糖浓度提高, 加入 1% 晶种后, 在 20℃ 下开始结晶。随着时间的延长, 晶体体积逐渐增加, 在 10-12 d 糖液结晶完成。在结晶整个过程中, 溶液中总糖浓度并不变, 可能的原因是葡萄糖在结晶时带走了一分子结晶水。结晶完后的溶液经过冷冻干燥, 即可得葡萄糖和木糖的混合固体。用 HPLC 测定溶液中所含物质及其

浓度，结果见图 3.6 和表 3.4

表 3.4 晶体中各物质的比例

Table 3.4 Composition of each substance in crystal

substance	Glucose	Xylose	Glucose.H ₂ O
Quality (g)	0.1512	0.0506	0.1663
Proportion (%)	67.8	22.7	74.6

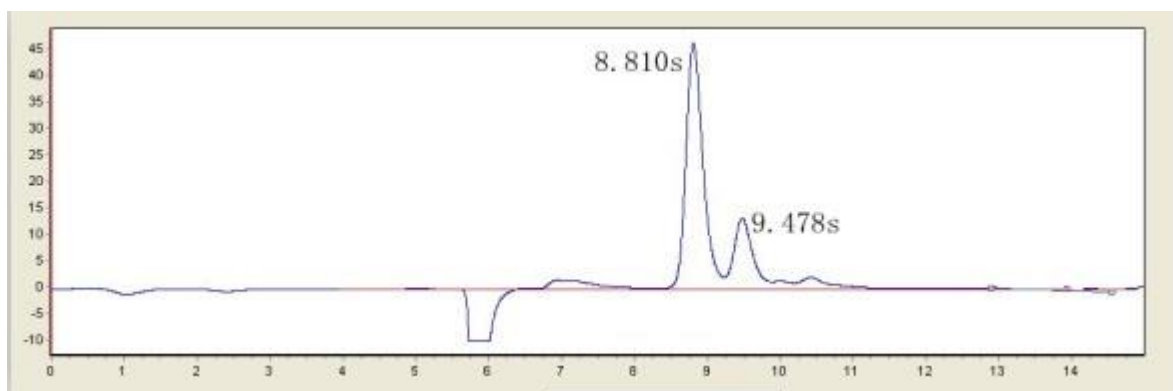


图 3.6 HPLC 测定晶体的组成

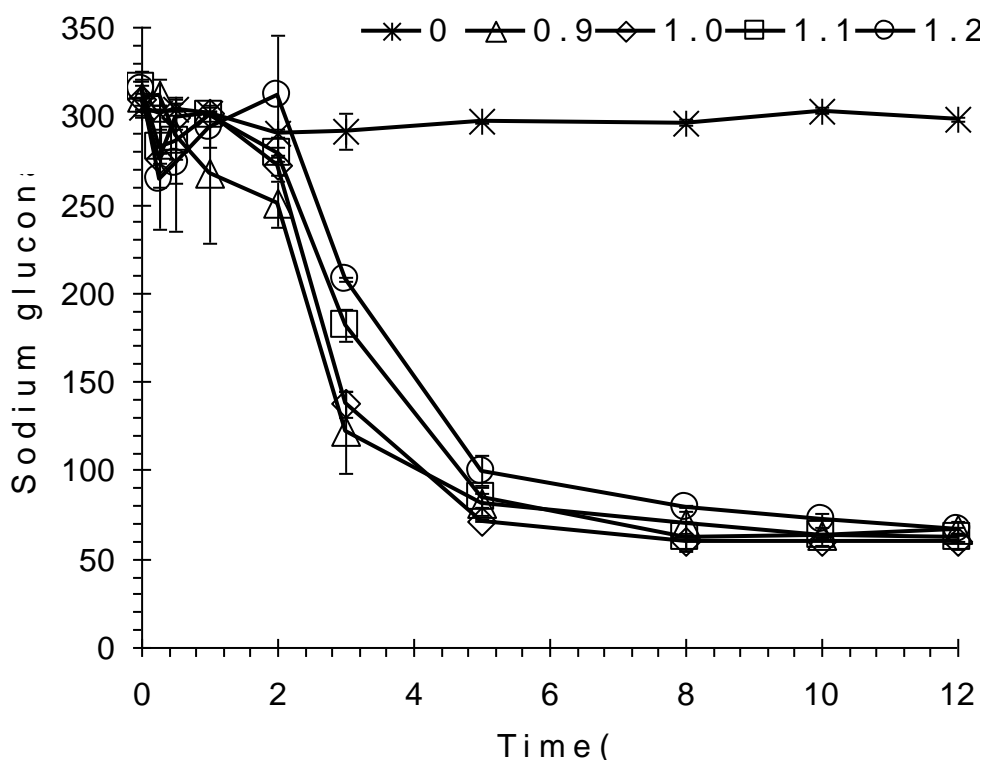
Fig. 3.6 composition of crystal by HPLC

如图 3.6 看出，冷冻干燥后的固体经过溶解后测定 HPLC，没有杂质峰，只出现了两个比较清晰的峰，分别为 8.810 s 出现的葡萄糖峰和 9.476 s 出现的木糖峰，由此可以确定结晶出来的固体为比较纯净的葡萄糖和木糖的混合物，同时由表 3.4 看出，由 HPLC 测定出的两种物质的峰面积乘以相应的系数，折合出的葡萄糖和木糖所占的比例约为 90.5%，考虑到葡萄糖较容易形成水合晶体，因此结晶出的可能为一水合葡萄糖，这样两者所占的比例约为 97.3%。所以，用结晶和冷冻干燥的方法可以得到比较纯净的一水合葡萄糖和木糖的混合晶体，可以用于接下来的裂解多元醇的实验。

3.2 葡萄糖酸钠与山梨醇的结晶分离

3.2.1 单一的葡萄糖酸钠溶液的结晶

在单一葡萄糖酸钠溶液中加入 CaCl_2 ，会生成溶解度较低的葡萄糖酸钙，降低溶液温度，葡萄糖酸钙达到过饱和度，会结晶析出。结晶条件不同，葡萄糖酸钙在溶液中的结晶率也会不同。首先考虑 CaCl_2 加入量对葡萄糖酸钙的结晶率的影响，结果见图 3.6。



calcium chloride:4 sodium gluconate(g/g)	calcium gluconate(g)	crystal ratio(%)	mass conservation(%)
0.0	0.77	1.9 ± 0.1	100.0
0.9	32.78	83.2 ± 0.0	99.2
1.0	33.12	84.0 ± 0.3	99.8
1.1	32.46	82.3 ± 0.2	101.4
1.2	31.78	80.6 ± 0.3	100.7

图 3.7 不同 CaCl_2 加入量下溶液中葡萄糖酸钠的浓度变化

结晶条件为温度从 40°C 降温到 20°C ，晶种 0.1%，结晶 12h 时，不同 CaCl_2 加入量下的葡萄糖酸钙的结晶

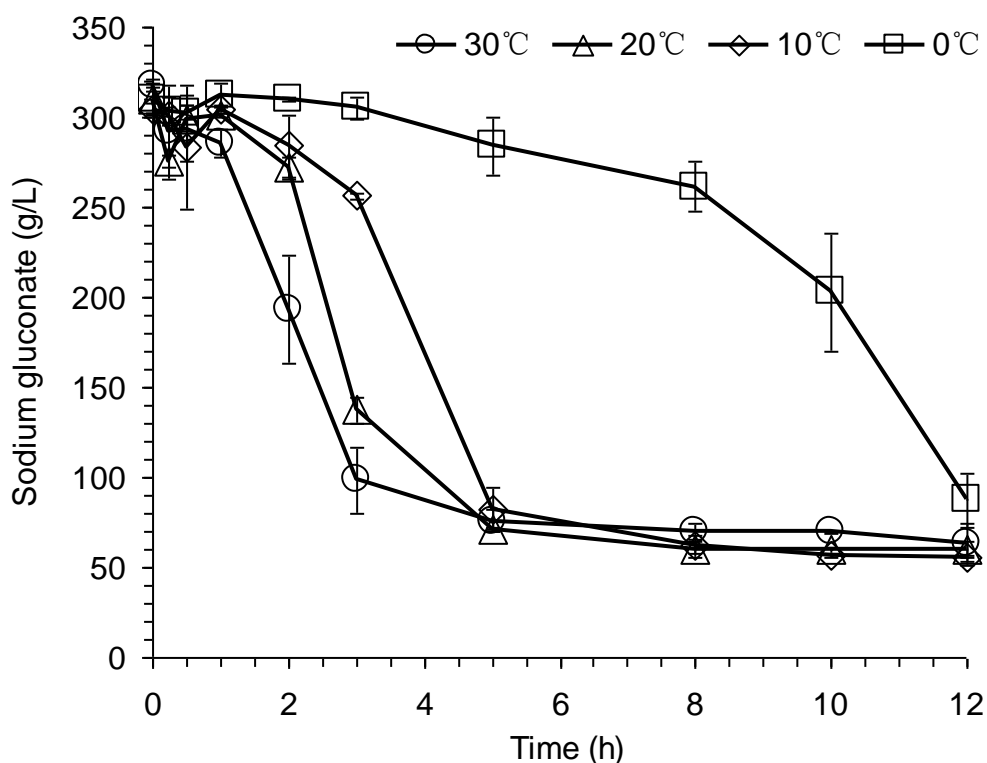
Fig. 3.7 Concentration of sodium gluconate under various dosage of CaCl_2

Crystallization conditions: temperature from 40°C to 20°C , seed of 0.1%, crystallization of calcium gluconate under various dosage of CaCl_2 for 12 h

由图 3.7 看出，葡萄糖酸钠本身在水中溶解度很大，简单的降温很难达到结晶目的，图 3.7 中加入 CaCl_2 加入量为 0 倍时，结晶曲线平滑，无法达到结晶目的；而在葡萄糖酸钠溶液中加入 CaCl_2 ，发生反应生成溶解度较低的葡萄糖酸钙，同时降低温度到 20°C ，结晶现象明显，葡萄糖酸钙在溶液中的浓度随时间显著降低，在 0-8 h 成显著的坡线，从 8-12 h 曲线坡度降低，但仍有晶体析出。表格中生成葡萄糖酸钙 (g) 表示结晶完成后生成的葡萄糖酸钙晶体的干重，从数据看出 CaCl_2 加入量不同，葡萄糖酸钙的结晶率也不同，在 CaCl_2 加入量逐渐增加时，葡萄糖酸钙的结晶率先增加后降低。这种原因产生是因为在溶液中 CaCl_2 加入量少时，葡萄糖酸钠不能完全转化为葡萄糖酸钙，促使结晶率较低；而在 CaCl_2 量较多时，虽然溶液中的葡萄糖酸能完全转化为葡萄糖酸钙，但

是溶液中还有过量的 CaCl_2 离子存在，离子浓度的增加影响了结晶的稳定进行环境，结晶率反而降低。当加入量氯化钙:葡萄糖酸钠 (g/g) 为 1.0 时，溶液中的葡萄糖酸钠和 CaCl_2 能完全反应生成葡萄糖酸钙并且溶液中没有多余离子存在，结晶率最高为 84.0%。因此 CaCl_2 加入量是影响结晶的重要条件，能显著降低溶液中葡萄糖酸钙的溶解度，提高结晶率。同时表格中质量守恒表征着溶液结晶实验前后质量的损失，需要在一定的误差范围内。

葡萄糖酸钠溶液的结晶不仅受 CaCl_2 加入量的影响，不同的降温条件也会对生成的葡萄糖酸钙结晶产生影响。根据已有的研究，葡萄糖酸钙的溶解度随着温度的降低而降低^[70]。溶液中的葡萄糖酸钠在加入 CaCl_2 后，生成葡萄糖酸钙，当葡萄糖酸钙达到过饱和度后，葡萄糖酸钙结晶析出。不同的降温条件下，葡萄糖酸钙的结晶率也不同，结果见图 3.8。



temperature (°C)	calcium gluconate (g)	crystal ratio of calcium gluconate (%)	mass conservation (%)
30	32.86	83.3 ± 1.0	100.0
20	33.12	84.0 ± 0.3	99.8
10	33.49	84.9 ± 0.4	99.2
0	29.19	74.0 ± 3.0	97.5

图 3.8 不同降温条件下的葡萄糖酸钙结晶曲线

结晶条件为加入量氯化钙:4 葡萄糖酸钠 (g/g) 1.0, 晶种 0.1%, 结晶 12h 时, 不同降温条件下的葡萄糖酸钙的结晶

Fig 3.8 Crystallization curve of calcium gluconate under various temperature

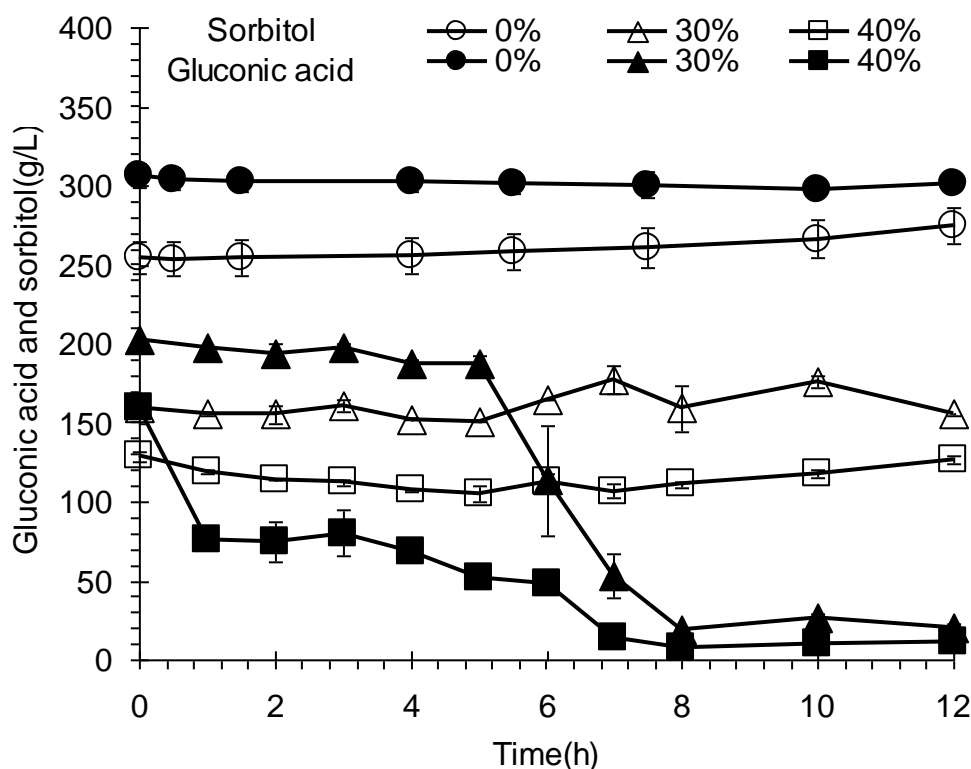
Crystallization conditions: calcium chloride: 4 sodium gluconate of 1.0, seed of 0.1%, crystallization of calcium gluconate under various temperature for 12 h

由上图 3.8 看出,降低溶液温度,葡萄糖酸钙在溶液中达到过饱和,浓度随时间显著降低。表格中生成葡萄糖酸钙(g)表示结晶完成后溶液中生成的葡萄糖酸钙晶体的干重,降温条件不同,葡萄糖酸钙的结晶率也不同,在温度降低过程中,葡萄糖酸钙的结晶率先增加后降低。这种原因产生是因为在溶液温度逐渐降低过程中,葡萄糖酸钙过饱和度增加,结晶出的量会提高;而当温度降低过大时,虽然溶液中葡萄糖酸钙过饱和度大,同时由于溶液温度过低,离子流动速率慢,溶液粘度相对增加,结晶率反而降低。降温条件为 10℃,葡萄糖酸钙的结晶率最高,为 84.9%。因此降温条件也是影响结晶的重要条件,能显著降低溶液中葡萄糖酸钙的溶解度,提高结晶率。

综上所述,单一的葡萄糖酸钠溶液结晶中,不同的 CaCl_2 加入量和降温条件都是影响结晶的显著条件,可以降低生成的葡萄糖酸钙在溶液中的溶解度,提高结晶率。最佳结晶条件为加入量 CaCl_2 : 4 葡萄糖酸钠 (g/g) 1.0, 晶种 0.1%, 结晶温度 10℃, 时间 12 h, 结晶率最高为 84.9%。

3.2.2 葡萄糖酸钠和山梨醇混合液的结晶分离

在对单一的葡萄糖酸钠溶液结晶条件进行研究后,发现不同的 CaCl_2 加入量和降温条件对结晶影响很大。再进一步在葡萄糖酸钠溶液中加入山梨醇,考察其对葡萄糖酸钙结晶率的影响。结果见图 3.9。



level of athanol (%, v/v)	crystal ratio of calcium gluconate (%)	crystal ratio of sorbitol (%)	mass conservation (%)
------------------------------	---	-------------------------------	-----------------------------

0	8.6 ± 1.8	2.1 ± 2.3	98.7
30	93.7 ± 0.6	50.8 ± 2.1	103.9
40	94.3 ± 1.3	28.1 ± 1.5	104.9
50	95.7 ± 0.2	31.5 ± 3.1	102.5
60	94.3 ± 2.7	50.3 ± 3.0	101.9

图 3.9 不同乙醇加入量条件下的葡萄糖酸钙结晶曲线

结晶条件为加入量氯化钙:葡萄糖酸钠 (g/g) 1.0, 结晶温度从 40℃降到 10℃, 晶种 1%, 结晶 12h 时, 不同乙醇加入量条件下的葡萄糖酸钙的结晶

Fig 3.9 Crystallization curve of calcium gluconate under various level of ethanol

Crystallization conditions: calcium chloride : sodium gluconate of 1.0 , temperature from 40℃ to 10℃, seed of 1%, crystallization of calcium gluconate under various level of ethanol for 12 h

从图 3.9 看出, 未加入乙醇时, 单纯的葡萄糖酸钙和山梨醇的结晶曲线随时间没有显著变化, 可能是因为加入山梨醇以后增大了葡萄糖酸钙的溶解度, 降温无法达到结晶目的。在混合溶液中加入乙醇后, 开始溶液体积因乙醇的加入而增大, 葡萄糖酸钠和山梨醇浓度降低, 但是乙醇加入也显著降低了葡萄糖酸钙在水中溶解度, 因此随着时间推进, 其浓度显著降低。表格数据表明, 随着溶液中无水乙醇加入比例增加, 葡萄糖酸钙的结晶率先增加, 后降低, 在无水乙醇加入比例为 50% 时, 葡萄糖酸钠结晶率最高为 95.7%, 同时山梨醇也因乙醇的加入, 溶解度降低而有部分析出。因为随着乙醇加入体积增加, 葡萄糖酸钠和山梨醇混合溶液中加入的乙醇产生分层, 无法得出葡萄糖酸钙结晶曲线, 因此图中只有加入乙醇体积比例 30%、40% 的曲线。

以上对单一葡萄糖酸钠溶液结晶研究中, 得出 CaCl₂ 加入量影响葡萄糖酸钙结晶率。再在溶液中加入山梨醇后, 溶液特性发生变化, 结晶效果见表 3.5。

表 3.5 不同 CaCl₂ 加入量对结晶率影响

Table 3.5 Effect of various dosage of CaCl₂ on crystallization rate

calcium chloride : 4sodium gluconate (g/g)	level of ethanol (%, v/v)	crystal ratio of calcium gluconate (%)	crystal ratio of sorbitol (%)
0	50	78.9 ± 4.8	19.7 ± 10.7
1.0	50	95.7 ± 0.2	31.5 ± 3.0
1.2	50	84.5 ± 1.9	23.6 ± 2.5
1.5	50	77.0 ± 1.3	25.7 ± 3.4

结晶条件温度从 40℃降温到 10℃, 乙醇加入量 50%, 晶种 1%, 结晶 12h 时, 不同 CaCl₂ 加入量下的葡萄糖酸钙的结晶

Crystallization conditions: temperature from 40℃ to 10℃, ethanol of 50%, seed of 1%, crystallization of calcium gluconate under various dosage of CaCl₂ for 12 h

从表 3.5 数据看出, CaCl₂ 的加入量对葡萄糖酸钙的结晶率影响显著。不加 CaCl₂ 时, 溶液主要为葡萄糖酸钠和山梨醇, 结晶产生是因为加入了乙醇后, 葡萄糖酸钠在水中溶解度下降, 降低温度进而结晶析出; 当加入 CaCl₂ 后, 溶液中的葡萄糖酸钠转化为葡萄糖酸钙, 溶解度显著降低, 结晶现象明显, 和考察的单一葡萄糖酸钙溶液结晶现象类似, 但是结晶率比单一的葡萄糖酸钙要高, 因为乙醇的加入进一步降低了葡萄糖酸钙的溶解度。从表看出, 当 CaCl₂ 加入量高于 1.0 时, 溶液中还有剩余的 Ca²⁺, Cl⁻, 大量

游离的离子存在,使结晶环境很不稳定,不容易形成结晶,结晶率反而下降。表 3.1 结果表明, CaCl_2 加入量为 1.0, 即加入的 CaCl_2 能与溶液中的葡萄糖酸钠完全反应生成葡萄糖酸钙量最好, 此时葡萄糖酸钠结晶率为 95.7%, 同时有 31.52% 山梨醇析出。

综上所述, 在葡萄糖酸钠溶液中加入山梨醇之后的混合溶液结晶中, 不同的 CaCl_2 加入量和降温条件是影响结晶的显著条件, 同时在混合液中加入一定量的乙醇可以进一步降低葡萄糖酸钙在溶液中的溶解度, 提高结晶率。最佳结晶条件为加入量氯化钙: 4 葡萄糖酸钠 (g/g) 1.0, 乙醇加入量 50% (v/v), 晶种 1%, 结晶温度从 40℃ 降到 10℃, 时间 12 h, 结晶率最高为 95.7%, 同时有 31.52% 山梨醇析出。

3.2.3 菊芋生物转化产品中葡萄糖酸钠与山梨醇溶液的结晶分离

本文研究的主要是菊粉和木薯碳源的葡萄糖酸钠和山梨醇的结晶分离。菊粉和木薯淀粉是比较廉价的原料, 经过液化和糖化后, 会产生等摩尔的葡萄糖和果糖, 在运动发酵单胞菌催化下, 生成等摩尔的葡萄糖酸钠和山梨醇。然后对催化液进行离心 8000 rpm, 5 min, 取上清液放在 4℃ 冰箱中备用。此时催化生成的葡萄糖酸钠浓度约 248.6 g/L, 山梨醇浓度约 213.7 g/L, 然后在一定条件下结晶, 结果见表 3.5。

表 3.6 不同 CaCl_2 加入量下对葡萄糖酸钙结晶的影响

Table 3.6 Effect of various dosage of CaCl_2 on calcium gluconate crystallization

calcium chloride : 4 sodium gluconate (g/g)	time (h)	crystal ratio of sorbitol (%)	crystal ratio of calcium gluconate (%)
1.0	12	28.3 ± 0.5	84.2 ± 2.6
	24	27.4 ± 1.8	85.6 ± 1.0
1.5	12	45.0 ± 0.7	82.0 ± 0.5
	24	48.6 ± 3.9	86.8 ± 3.9
2.0	12	33.6 ± 6.5	67.0 ± 1.3
	24	41.8 ± 4.2	74.8 ± 3.8

结晶条件为温度从 40℃ 降温到 10℃, 乙醇加入量 50%, 晶种 1%, 结晶 12h、24h 时, 不同 CaCl_2 加入量下的葡萄糖酸钙的结晶。

Crystallization conditions: temperature from 40℃ to 10℃, ethanol of 50%, seed of 1%, crystallization of calcium gluconate under various dosage of CaCl_2 for 12 h and 24 h

从表 3.6 看出, 在混合液中加入不同比例的 CaCl_2 , 同时考察结晶时间分别为 12 h、24 h 时, 葡萄糖酸钙的结晶率基本不变, 说明 12 h 结晶过程就可以进行完全, 同时从表中看出, 加入 CaCl_2 量为 1.0:1.0 时, 结晶效果最好, CaCl_2 加入量过高后, 溶液中还有剩余的 Ca^{2+} , Cl^- , 大量游离的离子存在, 使结晶环境很不稳定, 不容易形成结晶, 结晶率反而下降。因此最好的结晶条件是 CaCl_2 : 葡萄糖酸钠 (g/g) 1.0, 结晶 12 h, 此时葡萄糖酸钠结晶率为 84.2%, 山梨醇的析出率为 28.3%。同时催化液中葡萄糖酸钙的结晶率比单纯配制的葡萄糖酸钠和山梨醇溶液中的结晶率 95.7% 低。这可能的原因是菊粉和木薯碳源的葡萄糖酸钠和山梨醇的混合液更复杂, 有很多杂质的存在, 影响了葡萄糖酸钙的结晶。因此进一步考察结晶温度变化对结晶效果的影响。温度是影响结晶的重要因

素, 为了进一步提高菊粉和木薯碳源的葡萄糖酸钠和山梨醇的混合液中葡萄糖酸钙的结晶率, 采用了初步降温的方法, 结果见表 3.7。

表 3.7 不同降温条件下的结晶率

Table 3.7 Effect of various temperature on crystal ratio

temperature (°C)	time (h)	crystal ratio of sorbitol (%)	crystal ratio of calcium gluconate (%)
10	12	28.3 ± 0.5	84.2 ± 2.6
0	24	26.3 ± 0.3	84.5 ± 0.6

结晶条件为加入量氯化钙:4 葡萄糖酸钠 (g/g) 1.0, 乙醇加入量 50%, 晶种 1%, 结晶 24 h 时, 不同降温条件下的葡萄糖酸钙的结晶

Crystallization conditions: calcium chloride :4 sodium gluconate of 1.0, ethanol of 50%, seed of 1%, crystallization of calcium gluconate under various temperature for 24 h

从表 3.7 中看出, 不同的结晶温度对结晶有一定影响, 在 12 h 将温度从 10°C 调至 0°C 结晶 24 h 时, 葡萄糖酸钙的结晶率有稍微的提高到 84.5%, 同时山梨醇的析出率也有稍微降低到 26.3%, 因此可以将此时的结晶条件作为菊粉和木薯碳源的葡萄糖酸钠和山梨醇的结晶分离的最佳条件。

结晶之后的溶液经过离心, 固体部分用 50% 乙醇多次清洗, 除去含有的山梨醇, 然后放在 80°C 烘箱中烘至恒重后即得纯的葡萄糖酸钙晶体。

第四章 结论与展望

4.1 玉米秸秆糖化液的精制和结晶

本文还研究了玉米秸秆糖化液的精制和结晶。玉米秸秆在中国产量丰富，但是利用率极低，大多被焚烧，不仅造成了污染还浪费资源，本文中玉米秸秆经过预处理和糖化后，可以得到含葡萄糖和木糖的糖化液，对其进行精制和结晶后，用途广泛。

糖化液首先经过离心 8000 rpm、5 min 除去固体杂质，得到糖化清液；

糖化清液的颜色很深，影响了产品的质量，需要先用活性炭进行脱色。在不同的活性炭用量下，糖化液的脱色程度不同，还因为活性炭的吸附作用，溶液中的物质的浓度也会发生变化，通过测定脱色后溶液的吸光值和 HPLC 测定溶液中物质的浓度，发现用质量分数为 3% 的活性炭进行脱色，不仅活性炭用量相对较少，而且溶液的吸光值明显降低，溶液中因预处理产生的抑制物也被活性炭完全吸附，而葡萄糖和木糖的浓度则基本不发生变化；

经过脱色完后的溶液还含有大量的离子，有预处理时加入的 SO_4^{2-} ，还有糖化调 PH 值时加的 Na^+ ，因此需要先进行离子交换除去溶液中的离子，首先用 732 型强酸性阳离子交换树脂在 52 mL/min 流速下除去 Na^+ ，再用 D315 型弱碱性阴离子交换树脂在 25 mL/min 流速下除去 SO_4^{2-} ；

经过离子交换后的糖化液离子浓度显著降低，降低了对结晶的影响，再经过旋转蒸发浓缩提高总体糖液中葡萄糖和木糖的浓度，结晶就可得到成品总糖葡萄糖和木糖，最后利用冷冻干燥的方法获得干燥的总糖固体，可以用作接下来的裂解多元醇实验。

4.2 葡萄糖酸盐和山梨醇的结晶分离

本文研究了菊芋和木薯碳源的葡萄糖酸钠和山梨醇的结晶分离试验。和其它葡萄糖酸盐结晶实验不同的是，作为原料的菊芋和木薯淀粉具有丰富、廉价、可再生等优点，催化产物葡萄糖酸钠和山梨醇应用广泛，有巨大的市场前景。

在两种生物质葡萄糖酸盐和山梨醇的混合液中加入氯化钙，在水中溶解度很高的葡萄糖酸盐会和氯化钙发生反应生成葡萄糖酸钙，葡萄糖酸钙在水中的溶解度很低，再在溶液中加入一定比例的无水乙醇后，乙醇会与水溶剂形成缔合体，进一步降低葡萄糖酸钙的溶解度，然后在通过降温结晶的方法析出葡萄糖酸钙，使葡萄糖酸盐从催化液中分离出来。

研究表明，在葡萄糖酸钠和山梨醇的等摩尔混合溶液中加入量 CaCl_2 ：葡萄糖酸钠 (g/g) 为 1.0，发生化学反应生成低溶解度的葡萄糖酸钙，加入 50% 体积比例的乙醇和 1% 的葡萄糖酸钙晶种，同时降低温度到 10°C 进行结晶 12 h，葡萄糖酸钙的结晶率可达 84.2%，同时山梨醇也析出了 28.3%，然后用 50% 乙醇多次洗抽滤之后的固体部分，可以将杂质山梨醇洗去，得到纯净的葡萄糖酸钙晶体，达到将葡萄糖酸钠和山梨醇的基

本分离的目的。

参考文献

- [1] 何荣玉,闫志英,刘晓风等. 秸秆干发酵沼气增产研究[J].应用与环境生物学报.2007,13(4): 583-585.
- [2] 边义.玉米秸秆干发酵制取沼气的试验研究[D].沈阳: 沈阳农业大学. 2007.
- [3] Mohan D, Pittman C.U., Steel RH. Pyrolysis of wood / biomass for bio-oil: a critical review[J]. Energy Fuels. 2006, V20: 848-889.
- [4] Foyle T, Jennings L, Mulcahy P. Compositional analysis of lignocellulosic materials: Evaluation of methods used for sugar analysis of waste paper and straw. Bioresource Technology. 2007, 98: 3026-3036.
- [5] Sun RC, Sun XF, Yomkinson J. Hemicelluloses and Their Derivatives. ACS SymposiumSeries 864[C]. Hemicelluloses: Science and Technology. 2004.
- [6] Sun Y.Enzymatic Hydrolysis of Rye Straw and Berrnudagrass for Ethanol Production[D]. Raleigh: North Carolina State University. 2002.
- [7] 杨世基. 重视农村秸秆的能源利用[J].农村能源.1994,58(6): 18-20.
- [8] 董佑福,侯方安.重新认识秸秆发展秸秆循环经济[J].当代农机.2007(9): 14-15.
- [9] 孙振钧,孙永明.我国农业废弃物资源化与农村生物质能源利用的现状与发展[J].中国农业科技导报.2006, 8(1): 6-13.
- [10] 张明,袁益超,刘幸拯.生物质直接燃烧技术的发展研究[J].能源研究与信息.2005,21(1): 15-20.
- [11] 杨董艳.生物与化学预处理对玉米秸秆生物气产量的影响研究[D].北京: 北京化工大学,2004.
- [12] 赵律.质纤维素原料的优化处理及 O₃ 催化氧化技术的应用研究[D].长沙.湖南农业大学.2008.
- [13] 梁莹.玉米秸秆稀硫酸预处理工艺研究[D].天津: 天津大学, 2007.
- [14] 王许涛.生物纤维原料气爆预处理技术与应用研究[D].郑州: 河南农业大学, 2008.
- [15] SunY, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production. a review[J]. BioresoureeTechnology. 2002, 83: 1-11.
- [16] Shafizadeh F, Lai Y Z. Thermal degradation of 2-deoxy-Darabino-hexonic acid and 3-deoxy-D-ribo-hexono-1, 4-lactone[J]. Carbohydr. Res. 1975, (42): 39-53.
- [17] 谷洪春,顾永宝,蓝李桥等.电子束辐射加工研究进展[J].原子核物理评论.1997, 14(3): 185-188.
- [18] Wright J D. Ethnol from biomass by enzymatic hydrolysis[J]. Chem EngProg. 1998, 84(8): 62-74.
- [19] 罗鹏,刘忠.蒸汽爆破法预处理木质纤维原料的研究[J].林业科技, 2005, 30(3): 53-56.

- [20] Chaogang Liu, Charles E. Wyman. Partial flow of compressed-hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresource Technology*. 2005, 96: 1978-1985.
- [21] Mosier N., Wyllan C., Dale B., et al. Feasibility of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresour. Technol.* 2005, (96): 673-86.
- [22] Esteghlalian A., Hashimoto A.G, Fenske J.J., et al. Modeling and optimization of the dilute-sulphuric-acid pretreatment of corn stover, poplar and switchgrass[J]. *Bioresour. Technol.* 1997, (59): 129-136.
- [23] Lee Y.J. Oxidation of sugarcane Bagasse using a combination of hypochlorite and peroxide[D]. New Orleans: Louisiana State University and Agriculture and Mechanical College. 2005.
- [24] Kadam K L, Wooley R J, Aden A, et al. Softwood forest thinnings as a biomass source for ethanol production: a feasibility study for California[J]. *Biotechnol Prog.* 2000, (16): 947-957.
- [25] Siverson M V, Zacchi G. A techno-economical comparison of three processes for the production of ethanol from pine[J]. *Bioresource Technology*. 1995, (51): 43-52.
- [26] Bada J C, Saha, Loren B, Iten, Michael A, Cotta, Y. Victor Wu. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*. 2005, 40: 3693-3700
- [27] T. V. Ojumu, O. A. Ogunkunle. production of glucose from lignocellulosic under extremely low acid and high temperature in batch process, auto-hydrolysis approach[J]. *Journal of Applied Sciences*. 2005, 5(1): 15-17.
- [28] 张雪松, 朱建良. 纤维素类物质预处理效果的影响因素分析[J]. *纤维素科学与技术*, 2005, 13(2): 45-49.
- [29] Chang V.S, Holtzapfel M.T. Fundamental factors affecting biomass enzymatic reactivity[J]. *Applied biochemistry and Biotechnology*. 2000, 84: 5-37.
- [30] Hamelinck C. N., van Hooijdonk G, Faaij A.P.C. Ethanol from lignocellulosic biomass: techno-economic performance in short-middle and long-term[J]. *Biomass Bioenergy*, 2005, V28: 384-410.
- [31] Hamelinck C.N., van Hooijdonk G, Faaij A.P.C, Prospects for ethanol from Lignocellulosic biomass: techno-economic performance as development progresses[A]. Scientific report-NWS-E-2003-55, Utrecht, Netherlands, 2003.
- [32] Pierre, B., and Jean, P. A. The biological degradation of cellulose. *FEMS. Microbiol. Rev.* 1994, 13(1): 25-58.
- [33] 尤新, 朱路甲. 无热量甜味剂-结晶木糖的性质功能和应用前景[J]. *中国食品添加剂*. 2009, 1: 52-56.

- [34] 马成伟,孙亚琴,修志龙.葡萄糖和木糖双底物生物转化生产2,3-丁二醇和氢气的代谢计量分析[J].生物加工过程. 2006, 3 : 44-50.
- [35] 张燎原,洪欲强,陈双等.以葡萄糖和木糖为底物生物合成乙偶姻的条件优化[J].化学与生物工程. 2012, 7 : 30-35.
- [36] 任云利,汪同嘉,王健吉.葡萄糖和木糖共发酵的产氢特性[J].化工学报. 2011, 62(9) : 2629-2634.
- [37] 杨恣,张金鑫,田沈.稳定代谢葡萄糖和木糖产乙醇的重组酿酒酵母工程菌初步构建[J].应用与环境生物学报. 2008, 15(2) : 258-261.
- [38] 彭英云,郑清,张涛.菊粉的功能与利用[J].食品研究与开发. 2012, 10(33) : 236-240.
- [39] 饶志娟,郑建仙,贾呈祥.功能性食品基料-菊粉的研究进展[J].中国甜菜糖业. 2002, 4 : 26-30.
- [40] 安克红.利用菊粉和木薯淀粉生产山梨醇和葡萄糖酸的生物技术[D].上海:华东理工大学. 2012.
- [41] 王彦超,郝再彬,李子院等.直、支链木薯淀粉的分离纯化及检测[J].东北农业大学学报. 2009, 3(44): 47-51.
- [42] Swings, J. and De ley, J. The biology of *Zymomonas*. Bacteriol. Rev. 1977, 41: 1-46.
- [43] McGill, D. J. and Dawes, E. A. Glucose and fructose metabolism in *Zymomonas anaerobia*. Biochem. J. 1971, 125: 1059-1068.
- [44] McGill, D. J., Dawes, E. A. and Ribbons, D. W. Carbohydrate metabolism and growth yield coefficients of *Zymomonas anaerobia*. Biochem. J. 1965, 97: 44-45.
- [45] Doelle, H. W., Kirk, L., Crittenden, R., and Toh, H. *Zymomonas mobilis*-science and industrial application. Crit. Rev. Biotechnol. 1993, 13: 57-98.
- [46] Ait-Abdelkader, N., De Caro, A., Guzzo, J., Michel, G. P. F. and Baratti, J. C. The intracellular sucrase (SacA) of *Zymomonas mobilis* is not involved in sucrose assimilation. Biotechnol. Lett. 2000, 22: 461-467.
- [47] Bekers, M., Linde, R., Danilevich, A., Kaminska, E., Upite, D., Vigants, A. and Scherbaka, R. Sugar beet diffusion juice and syrup as media for ethanol and levan production by *Zymomonas mobilis*. Food Biotechnol. 1999, 13: 107-119.
- [48] Bekers, M., Ventina, E., Lankevics, J., Kaminska, E., Upite, D. and Vigants, A. Levan production by *Zymomonas mobilis* cells attached to plaited spheres. Acta Biotechnol. 1997, 17: 265-275.
- [49] Kannan, T. R., Sangiliyandi, G. and Gunasekaran, P. Influence of intra- and extracellular sucraes of *Zymomonas mobilis* on ethanol production and by-product formation. Biotechnol. Lett. 1997,19: 661-664.
- [50] Kannan, T. R., Sangiliyandi, G. and Gunasekaran, P. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucraes in immobilized cell fermentation.

Enzyme Microb. Technol. 1998, 22: 179-184.

[51] Shihui, Y., Timothy, J., Tschaplinski, Nancy, L.E., Sue, L.C., Stanton, L.M., Brian, H.D., Anthony, V.P., Miguel, R.J. and Steven, D.B. Transcriptomic and metabolomic profiling of *Zymomonas mobilis* during aerobic and anaerobic fermentations. BMC Genomics. 2009, 34: 1-16.

[52] Viikari, L. Formation of sorbitol by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1984, 20: 118-123.

[53] Zachariou, M. and Scopes, R.K. Glucose-fructose oxidoreductase, a new enzyme isolated from *Zymomonas mobilis* that is responsible for sorbitol production. J. Bacteriol. 1986, 167: 863-869.

[54] Loos, H., Voller, M., Rehr, B., Stierhof, Y.D., Sahm, H. and Sprenger, G.A. Localization of the glucose-fructose oxidoreductase in wild type and overproducing strains of *Zymomonas mobilis*. FEMS Microbiol. Lett. 1991, 84: 211-216.

[55] Liu, C., Dong, H., Zhong, J., Ryu, D.D.Y., Bao, J.. Sorbitol production using recombinant *Zymomonas mobilis* strain. J. Biotechnol. 2010, 148: 105-112.

[56] Budavari, S., O'Neil, M. J., Smith, A., Heckelman, P. E. and Kinneary, J. F., eds. The Merck Index: An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals, 12th ed., Merck & Co., Whitehouse Station, NJ, 1996, pp: 1490-1491.

[57] Wrolstad, R. E. and Shallenberger, R. S. Free sugars and sorbitol in fruits-a compilation from the literature. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64: 91-103.

[58] Albert, R., Strätz, A. and Vollheim, G. Die katalytische Herstellung von Zuckeralkoholen und deren Verwendung. Chem. Eng. Technol. 1980, 52: 582-587.

[59] Vogel, R. Sorbitol In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 6th ed., Wiley-VCH, Weinheim. 2003, 34: 492-498.

[60] Chun, U.H. and Rogers, P.L. The simultaneous production of sorbitol from fructose and gluconic acid from glucose using an oxidoreductase of *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988, 29: 19-24.

[61] Silveira, M.M. and Jonas, R. Sorbitol can be produced not only chemically but also biotechnologically. Appl. Biochem. Biotechnol. 2004, 118: 321-336.

[62] Ferraz H.C., Alves T.L.M. and Borges C.P. Coupling of an electrodialysis unit to a hollow fiber bioreactor for separation of gluconic acid from sorbitol produced by *Zymomonas mobilis* permeabilized cells. J. Membrane Sci. 2001, 191: 43-51.

[63] 张小昊.葡萄糖酸钠的发酵动力学及其结晶工艺研究[D].无锡:江南大学. 2011: 11-30.

[64] 韦传宝,孙春艳,刘昌利.葡萄糖酸钙结晶后母液成分分析及利用[J].皖西学院学报. 2009, 25 (2).

- [65] 朱越雄,石亮,曹广力等.野生树舌多糖的脱色和脱蛋白[J].氨基酸和生物资源. 2005, 27(3) : 1-3.
- [66] Dong, H.W., Bao, J., Ryu, D.D.Y., Zhong, J.J.. Design and construction of improved new vectors for *Zymomonas mobilis* recombinants. *Biotechnol. Bioeng.* 2011, 108: 1616-1627.
- [67] 李锋,李建科,霍树春等.山梨醇溶液脱色工艺的研究[J].中国食品添加剂. 2007, 2:1006-2513.
- [68] 刘静霞,王中来,张苗等.L-酪氨酸和L-苯丙氨酸在732树脂上的吸附平衡[J].福建轻纺. 2006, 11: 83-94.
- [69] 王远风, 金征宇.D315树脂分离茶多糖工艺的研究[J].农业工程学报. 2005, 21(10): 147-150.
- [70] Bao J, Koumatsu K, Arimatsu Y, et al. A kinetic study on crystallization of calcium gluconate in external loop airlift column and stirred tank for an immobilized glucose oxidase reaction with crystallization[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2003, 15: 177-184.

致谢

本篇文章是在鲍杰导师的耐心指导下完成的。鲍老师知识渊博、科学态度严肃、治学严谨、思维敏锐、对待工作精益求精，这种敬业的精神让我感到由衷的敬佩，并受益匪浅。在实验中，鲍老师给予了我实验研究思路和方法上的引导、实验研究中的多方支持，在论文的撰写和修改当中也给予了我耐心细致的指导。非常感谢鲍老师在研究生三年当中给予我的帮助和指导。

鲍杰教授，胡凤仙、张建老师在试验中给予了我耐心的指导和帮助，在此表示衷心的感谢！

在此还要特别感谢我的家人和亲朋好友，谢谢他们对我的一直以来的支持、理解还有无微不至的关心，他们是我的坚强的后盾。

最后向给予我实验无私帮助的同学、师弟师妹们表示最真挚的感谢！

