

分类号: TQ921 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 学位论文

生物燃料和化学品的好氧生物炼制研究

侯伟亮

指导教师姓名: 鲍杰 教授

华东理工大学

申请学位级别: 博士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2019-04-01 论文答辩日期: 2019-05-28

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 钟建江 教授
评 阅 人: 潘仁明 研究员
金明杰 教授
曲音波 教授
方云明 教授
姜 岷 教授

学位论文使用授权声明

本学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权华东理工大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编学位论文。保密论文在解密后遵守此规定。

论文涉密情况：

不保密

保密，保密期（___年___月___日至___年___月___日）

学位论文作者签名： 侯伟亮

指导老师签名： 鲍杰

日期： 2019 年 05 月 29 日

日期： 2019 年 05 月 29 日

华东理工大学研究生学位论文提交要求

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

研究生学位论文全文电子版由档案馆按①（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

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

学位论文作者签名： 侯伟亮

2019 年 05 月 29 日

指导教师签名： 鲍杰

2019 年 05 月 29 日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作 者 声 明

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

论文作者签名： 侯伟亮

2019 年 05 月 29 日

生物燃料和化学品的好氧生物炼制研究

摘要

木质纤维素原料是一种分布广泛且价格低廉的可再生资源,经预处理、脱毒、糖化、发酵和分离纯化等步骤可以生产各种生物基化学品。当前的生物炼制发酵多以厌氧方式生产如乙醇和乳酸等少数几种产品。然而,作为生物柴油和航空燃油原料的微生物油脂,以及如糖酸和柠檬酸等众多化学品的生产均需好氧发酵。高固载量是生物炼制过程实现高产品指标和低生产成本产业化路径的必然选择。然而,目前高固体含量的好氧生物炼制发酵仍然存在重大技术障碍。高固载量会显著地降低发酵液中的传质效率,进而导致氧气传递限制和混合传质困难等问题。氧传递的限制和高固体含量下的高抑制物胁迫将会对菌株的发酵性能造成一定的影响。另外,大量固体颗粒的存在对产物的分离和纯化操作造成了极大的困扰。这些问题的存在严重地阻碍了好氧发酵的有效进行,限制了生物炼制技术生产更多化工产品的应用范围。

本研究拟解决上述问题,并探究好氧发酵生产生物燃料和多种化学品的应用潜力。研究首先解析了高固体含量木质纤维素体系的氧气传递规律,为高固高粘水解液中好氧发酵的充分氧气供给提供了解决方案,而后采用工艺优化、计算模拟、过程调控、长期驯化等策略解决了高固体含量下的传质、传热、菌种选育和产物分离等问题,实现了高水平纤维素糖酸、柠檬酸和微生物油脂的高效好氧发酵转化,为生物炼制工业提供了更多的产业化应用方案。

本文第一部分研究了高固体含量木质纤维素体系的氧气传递规律。研究首先分析了不同固体含量下的氧气传递情况,发现氧气传递速率随着固体含量的增加而显著地降低。对于典型的好氧发酵葡萄糖酸生产而言,其发酵速率显著受限于氧气传递速率。通过适当地调节酶解时间和转速等操作,可以显著地提高水解液中的氧气传递速率,进而实现了高固体含量下的高效葡萄糖酸发酵生产。研究建立了高固体含量水解液的流变学模型,采用计算流体力学模拟优化了生物反应器的设计,实现了葡萄糖酸生产的高效混合传质。

本文第二部分考察了木质纤维素全糖酸的好氧生物炼制发酵。研究发现氧化葡糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) 对木质纤维素来源所有糖类包括葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖和甘露糖都具有很好的利用能力,但多种糖类的协同利用效率相对较低,必须通过全细胞催化方式才能完全地转化所有的木质纤维素来源糖类。研究通过适应性进化的方式对菌株进行了长期驯化,并以常规发酵的方式完成了所有木质纤维素来源糖类到相应糖酸的转化。最终驯化菌种在高固体含量(35%, w/w)下利用玉米秸秆获得了接近 180 g/L 的糖酸,达到了淀粉原料的生产水平。技术经济性分析表明木质纤维素原料与淀粉原料相比,在糖酸的生产成本上具有一定的竞争性。糖酸最重要的应用是水泥缓凝剂,分析表明纤维素糖酸展现了优良的缓凝效果,因而具有很好的市场应用前景。

本文第三部分评估了柠檬酸的同步糖化与好氧发酵性能。研究表明黑曲霉菌丝的生长导致了高固体含量发酵液粘稠性的增加，这可能恶化了发酵液的氧气传递速率。但通过发酵过程调控，研究最终实现了高固体含量下的高指标纤维素柠檬酸生产。本研究利用玉米秸秆原料以同步糖化与好氧发酵方式获得了 136 g/L 的柠檬酸，相比于国际水平提高了 36% 的产量，因此具备了潜在的工业化应用前景。

本文第四部分探究了微生物油脂的同步糖化与好氧共发酵。基于高含油率细胞密度低的原理，研究提出了一种新型油脂酵母选育策略：超速离心筛选。此筛选方法对每次培养的细胞进行离心获取轻细胞，并逐代转接这种轻细胞用于下次培养以获得最轻的油脂细胞。结果表明这种超速离心筛选方法数倍地提升了皮状丝孢酵母 (*Trichosporon cutaneum*) ACCC 20271 的含油率。筛选菌株 *T. cutaneum* MS28 和 WL97 胞内油脂合成代谢路径中的关键前体 Acetyl-CoA 和辅酶 NADPH 含量均显著地增加，且具有更好的多糖利用效率。这些结果多角度地证实了筛选菌株的优良油脂生产性能。另外，筛选菌株的细胞体积逐渐变大且细胞壁显著变薄，细胞壁组分葡聚糖和甘露聚糖的含量也明显下降，这些形态学变化为油脂累积提供了更多的空间。研究也建立了超速离心筛选的数值模型并对筛选的机理进行了解析。此筛选方法不仅适用于轻的油脂细胞筛选，也可用于生产胞内多聚物等的重细胞筛选。

筛选菌株在 30% 固体含量下采用同步糖化与好氧共发酵的方式完全转化了木质纤维素来源的所有糖类生产了 38.6 g/L 油脂，而出发菌株仅可部分地利用葡萄糖故只生产了 7.5 g/L 油脂。最终，本研究通过同步糖化与好氧共发酵方式结合半连续发酵工艺获得了 46.7 g/L 纤维素油脂，相比于文献报道产量 (16.3 g/L) 提高了 2.9 倍，因此达到了国际领先水平。发酵液中超过 5.2% 体积比的油脂浓度 (油脂密度 $<900 \text{ kg/m}^3$) 意味着其已经超过了具有商业开采价值油田的最低油含量 (3%)，故具有良好的工业应用前景。利用发酵液中原有纤维素酶的水解作用实现了油脂细胞与木质纤维素发酵残渣的特异性分离，进而实现了油脂的高效分离提取。

本研究解决了高固高粘好氧生物炼制过程的关键性技术问题，实现了多种化学品和生物燃料的高水平发酵转化。研究分析了高固体含量木质纤维素体系的氧气传递规律，为高固高粘好氧发酵中的氧气充分供给提供了解决方案；采用过程优化、计算流体力学模拟、菌种驯化等策略解决了糖酸发酵过程中的混合传质及全糖利用菌种的选育问题实现了接近淀粉原料生产指标的纤维素糖酸生产；以同步糖化与好氧发酵方式首次实现了纤维素柠檬酸生产，相比过去研究提高了 36% 的柠檬酸产量；提出了一种超速离心筛选的油脂菌株选育策略实现了纤维素油脂生产水平的数倍提升，并解决了高固体含量体系油脂的分离与提取问题。这些生物基化学品的高效好氧发酵生产极大地拓展了生物炼制产业化的路径，为可再生资源的工业化应用奠定了坚实的技术基础。

关键词：木质纤维素；高固体含量；好氧发酵；糖酸；柠檬酸；油脂

Aerobic biorefining study of biofuels and chemicals

Abstract

Lignocellulosic biomass is widespread and cheap renewable resources and could be converted into kinds of bio-based chemicals by pretreatment, detoxification, hydrolysis, fermentation, separation and purification. Current biorefinery research mainly focuses on anaerobic production of few bulk chemicals (ethanol or lactic acid). However, aerobic fermentation is essential for producing microbial lipid as feedstock of biodiesel and aircraft fuel and chemicals (sugar acids or citric acid). High solids loading is inevitable choice for achieving high product titer and low process cost in lignocellulose biorefinery. However, high solid content aerobic fermentation still exists many key issues. High solids loading can significantly decrease mass transfer rate, hence leading to oxygen transfer limit and mixing difficulty. Oxygen transfer limit and high inhibitors stress at high solids loading can impact strain fermentability. Tons of solid particles can cause operation difficulty of separation and purification and low product recovery yield. These issues hinder efficient implementation of aerobic fermentation, hence restricting application category of lignocellulose biorefinery for producing more chemicals.

This study plans to break technical obstacles of aerobic biorefinery to achieve efficient production of various chemicals and biofuels by aerobic fermentation. The study firstly analyzes oxygen transfer characteristic of lignocellulose system at high solids loading for high product titer and proposes a solution for oxygen supply sufficiently in high solid content and high viscous lignocellulosic slurry, finally obtaining high titer of cellulosic sugar acids, citric acid and microbial lipid by technology optimization, process control and strain screening, which provides more application schemes for industrial biorefining technology.

The first part of the thesis focused on investigation of oxygen transfer characteristic of lignocellulosic hydrolysate slurry at high solids loading to propose a solution for aerobic fermentation in high viscous lignocellulosic system. Oxygen transfer performance was evaluated in lignocellulosic hydrolysate at different solids loadings and a decrease tendency in oxygen transfer rate was uncovered with increasing solids loading. However, oxygen transfer rate could be significantly improved by adjusting operation conditions such as hydrolysate time and agitation rate. Gluconic acid production by *Gluconobacter oxydans* is ultimately hampered in oxygen transfer rate, but it still could be efficiently achieved in high solid content lignocellulosic slurry (30%, w/w) at moderate operation conditions. Computational fluid dynamics model was established based on rheology of lignocellulose slurry for optimally designing aerobic bioreactor and then achieved mature gluconic acid fermentation at low mixing energy consumption.

The second part assessed aerobic fermentation for sugar acids production. *G. oxydans* could utilize all lignocellulose-derived sugars including glucose, xylose, arabinose, mannose and galactose, but cooperative utilization of these sugars only be enforced by whole cell

catalysis. A long term adaptive evolution of *G. oxydans* was carried out in this part for intensifying utilization efficiency of non-glucose sugars and tolerance for high inhibitors stress and achieved the conversion of all sugars to the corresponding sugar acids by aerobic fermentation. Evolved strain obtained about 180 g/L of sugar acids using corn stover at extremely high solids loading of 35%. Cellulosic sugar acids reached to similar yield with starch sugar acids production and could compete partly with starch-based product at process cost based on techno-economic analysis. Cellulosic sugar acids presented excellent retarding efficiency as cement additive, showing well application prospect in construction industry.

The third part attempted simultaneous saccharification and aerobic fermentation (SSF) for citric acid production. The mycelia of the filamentous *Aspergillus niger* fungus entangling with the rodlike corn stover fibers strongly intensified the viscosity of fermentation slurry, potentially worsening oxygen transfer performance. However, the SSF for citric acid production still could well be achieved by adjusting fermentation parameters. Finally, SSF produced 136 g/L of cellulosic citric acid, hence improved by 36 % comparing with current level, possessing the potential for industrialized application.

The fourth part investigated simultaneous saccharification and aerobic co-fermentation (SSCF) for microbial lipid production. Based on lower density of higher lipid content cell, this study proposed a new strain screening strategy for obtain high-yield oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*, ultra-centrifugal screening. This strategy is carried out by centrifugation for obtaining the lighter cells after culture as the seed for the next round culture. This study used this method improve by folds lipid content in cells, also induce cell morphology evolution. Screened strains (*T. cutaneum* MS28 and WL97) had more precursor Acetyl-CoA and coenzyme NADPH in lipid synthesis pathway than parental strain (*T. cutaneum* ACCC 20271) and better multiple sugars utilization. These results demonstrated excellent lipid accumulation of screened strains in different aspects. Screened strains had larger cell volume and thinner cell wall than parental strain, and lower glucan content and mannan content in cell wall composition. These changes on cell morphology provided more space for lipid accumulation. A hydrostatic model was established to represent ultra-centrifugal screening mechanism and demonstrated screening efficiency and universality. This strategy could be suitable for screening light oleaginous cells, also heavy cells producing polyhydroxyalkanoate.

Screened strain *T. cutaneum* WL97 could utilize all lignocellulose-derived sugars by SSCF to produce 41.6 g/L of lipid at solids loading of 30%, while parental strain only could partly consume glucose to generate 7.5 g/L of lipid. Finally, this study used screened strain by SSCF coupled with semi-continuous fermentation produce 46.7 g/L of lipid, which improved 2.9 folds than literature report, hence reaching to the leading level in the world. Almost 5% lipid content in fermentation slurry had exceeded the minimum threshold oil content (3%, w/w) of commercially recoverable oil field, with potential industrial implications. Special separation of oleaginous cells from fermented lignocellulose residual was achieved utilizing the hydrolysis of cellulase into fermentation slurry.

Overall, this study solved key issues of aerobic fermentation in high solids loading and high viscous lignocellulose slurry, and implemented high performance production of biofuels and chemicals. A solution was proposed for sufficiently oxygen supply of aerobic fermentation in high solid content and high viscous lignocellulose slurry by analyzing oxygen transfer characteristic. Cellulosic sugar acids production by aerobic fermentation was very close to starch-based one at extremely high solids loading. High titer of citric acid production by SSF was firstly achieved by *A. niger*, and improved 36% of citric acid yield than previous reports. World-class cellulosic lipid was implemented using excellent strain obtained by an ultra-centrifugal screening. These high target biochemical productions substantially expanded industrialization path of biorefining technology, and strongly established basis for commercial application of renewable resources.

Key words: Lignocellulose; high solids loading; aerobic fermentation; sugar acids; citric acid; lipid

目录

第 1 章 前言	1
1.1 生物炼制技术	1
1.2 好氧发酵过程的氧气传递	4
1.3 纤维素糖酸生产	7
1.4 纤维素柠檬酸生产	8
1.5 纤维素油脂生产	10
1.6 本论文的立题依据和主要研究内容	13
第 2 章 高固体含量好氧发酵过程的氧传递研究	15
2.1 引言	15
2.2 材料与方法	16
2.2.1 原料	16
2.2.2 酶与化学试剂	16
2.2.3 菌种和培养基	16
2.2.4 预处理、生物脱毒和水解操作	16
2.2.5 葡萄糖酸好氧发酵	16
2.2.6 分析糖类、葡萄糖酸和抑制物	17
2.2.7 流变性质测定	17
2.2.8 测定氧气传递速率 (k_{La})	17
2.2.9 CFD 模拟	17
2.3 结果与讨论	18
2.3.1 高固高粘木质纤维素水解液中的氧气传递速率测定	18
2.3.2 氧气传递速率对好氧发酵的影响	19
2.3.3 基于氧气传递速率评估好氧生物反应器的设计	23
2.4 本章小结	27
第 3 章 木质纤维素全糖酸的好氧生物炼制发酵	28
3.1 引言	28
3.2 材料与方法	29
3.2.1 原料、纤维素酶和试剂	29
3.2.2 菌种和培养基	29
3.2.3 预处理、生物脱毒和酶水解操作	29
3.2.4 <i>G. oxydans</i> 的适应性驯化	29
3.2.5 好氧发酵和全细胞催化	29
3.2.6 糖酸的水泥缓凝效果评价	30
3.2.7 糖类和糖酸分析	30

3.2.8 Aspen Plus 过程模拟及经济性分析.....	30
3.3 结果与讨论.....	31
3.3.1 串联糖化与发酵工艺高效转化纤维素糖酸.....	31
3.3.2 木质纤维素来源糖类到相应糖酸的完全转化.....	37
3.3.3 木质纤维素来源糖酸的水泥缓凝效果评价.....	40
3.4 本章小结.....	44
第 4 章 柠檬酸的同步糖化与好氧发酵.....	45
4.1 引言.....	45
4.2 材料与方法.....	45
4.2.1 原料、纤维素酶和试剂.....	45
4.2.2 菌株和培养基.....	45
4.2.3 预处理和生物脱毒操作.....	46
4.2.4 同步糖化与好氧柠檬酸发酵.....	46
4.2.5 柠檬酸得率计算.....	46
4.2.6 菌体形态观察.....	46
4.2.7 颗粒尺寸分布.....	46
4.2.8 流变性质测定.....	46
4.2.9 分析糖、柠檬酸和抑制物.....	46
4.2.10 Aspen Plus 模型和经济性分析方法.....	46
4.3 结果与讨论.....	47
4.3.1 同步糖化与好氧发酵生产柠檬酸的可行性分析.....	47
4.3.2 高指标纤维素柠檬酸生产.....	49
4.3.3 纤维素柠檬酸生产的技术经济性分析.....	50
4.4 本章小结.....	54
第 5 章 微生物油脂的同步糖化与好氧共发酵.....	55
5.1 引言.....	55
5.2 材料与方法.....	55
5.2.1 原料、纤维素酶和试剂.....	55
5.2.2 菌株和培养基.....	55
5.2.3 预处理、脱毒和水解液制备.....	56
5.2.4 油脂酵母超速离心筛选.....	56
5.2.5 微生物油脂的好氧发酵.....	56
5.2.6 油脂和其组分测定.....	56
5.2.7 细胞直径测定.....	57
5.2.8 透射电镜观察.....	57
5.2.9 细胞密度计算.....	57

5.2.10	离心过程数值模型.....	57
5.2.11	胞内 NADPH 和乙酰-CoA 含量测定.....	59
5.2.12	细胞壁组分测定.....	59
5.3	结果与讨论.....	59
5.3.1	超速离心筛选最轻及含油率最高油脂细胞.....	59
5.3.2	超速离心筛选的机理及其普适性.....	61
5.3.3	油脂细胞形态学及油脂合成代谢解析.....	62
5.3.4	筛选菌株纤维素油脂的好氧生产.....	65
5.4	本章小结.....	71
第 6 章	结论与展望.....	72
6.1	结论.....	72
6.2	创新点.....	73
6.3	展望.....	73
参考文献	74
学术成果	92
致谢	94

第 1 章 前言

1.1 生物炼制技术

石油是当前的主要能源来源，交通运输超过 90%以上原料供给来自石油产品。尽管石化资源用途广泛，一些科学家预测以当前的石化资源消耗速率，我们将在未来 50 年内用完所有的石油储备^[1,2]。石化资源的消耗也造成了严重的环境问题^[3]。最主要问题是石化资源燃烧极大地增加了地球大气层中 CO₂ 的浓度^[4]，诱导了温室效应的产生^[5]。国际能源署报告表明若温室效应增加全球温度的 3.6 °C^[6]，将会导致数百万物种面临灭亡及数百万人失去生命^[7]。另外，石油开采会导致地下水的污染。有研究表明采油区域地下饮用水中甲烷含量相比一般地下水增加了 6 倍^[8]。

由于石化资源的滥用及日益严重的环境问题，近些年来，可再生资源利用获得了越来越多的关注^[1]。木质纤维素原料是已知仅有的可以满足日益增加能耗需求及化学品需求的可再生资源^[9]。木质纤维素原料可以通过生物炼制技术转化为微生物油脂进而通过转酯化或者脱羧反应生成柴油和航空煤油等生物基燃料^[10]。根据美国自然资源保护协会预测到 2050 年利用木质纤维素原料每天可以生产相当于 790 万桶油的生物燃料，可替代一半的石化资源。并且生物燃料的利用每年将会降低 17 亿吨温室气体的排放^[11]。

木质纤维素原料由纤维素、半纤维素和木质素构成，此外还含有一些结构性的蛋白、脂类和灰分。木质纤维素的生物炼制步骤包括：预处理、脱毒、糖化、发酵和产品回收等^[13,14]。预处理过程可以改变木质纤维素的结构使其更易被转化为可发酵的糖类，进而更高效地生产各种能源及化工产品（图 1.1）^[12]。预处理主要作用为（1）溶解半纤维素和/或木质素；（2）修饰木质素结构；（3）破坏原料结构进而降低颗粒的尺寸；（4）降低纤维素的晶体度；或者（5）预水解纤维素为纤维素多聚物^[15]。过去数十年人们已经尝试了多种不同的预处理方式，然而，预处理仍然是工业化生物炼制中成本第二高的过程^[16]。当选择一种预处理方式时，应该考虑的重要因素主要包括：低操作成本、低能耗、少量抑制物产生、纤维素底物的高产率、高糖回收率、生产木质素作为共转化产物、适用于不同原料及可放大性^[17]。

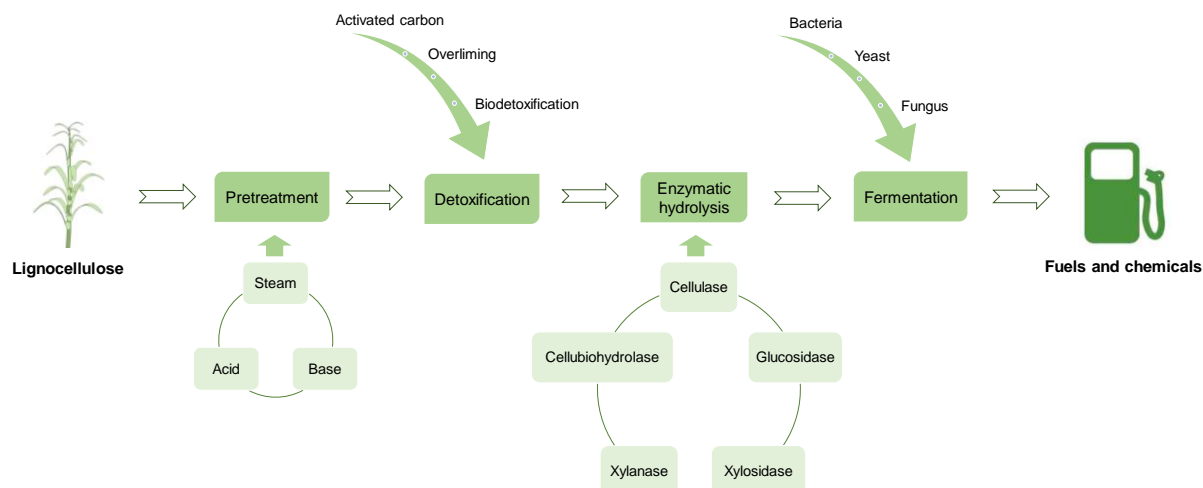


图 1.1 木质纤维素的生物炼制过程

Fig. 1.1 The whole process of lignocellulose bioconversion

最常用的预处理方式为热预处理、碱预处理和酸预处理（表 1.1）。热预处理把原料悬浮在高温水相中维持一定的时间。在此过程中，水合氢离子催化半纤维素的溶解及纤维素的水解，并重塑了原料表面的木质素层，增加了纤维孔径^[18]。这些变化增加了酶制剂接触原料的表面积，进而提升了纤维素的糖化得率。但此方法对半纤维素的水解效果有限，主要用于易降解木质纤维素原料的预处理。碱预处理通过碱催化半纤维素和木质素间连接酯键的皂化反应和纤维素的剥离反应，因而会移除大部分的木质素，解聚纤维素进而提高其酶解性能。有些工艺使用强碱进行预处理如 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 预处理、氨循环浸透预处理和液氨浸透预处理等，这些方法都是很有前景的应用技术^[19]。酸预处理使用稀酸与原料混合在大约 2% (w/w) 的酸用量，加热至 100-200 °C 左右进行短暂反应^[20]。稀酸预处理可以完全水解半纤维素至单糖、增加原料的结晶度、部分地水解木质素，进而显著提升纤维素的酶解性能^[21, 22]。尽管此方法对设备的设计要求较高，会形成副产物，但其高效性和技术可行性使其成为目前最具规模化应用的技术之一。

本实验室开创了一种干酸预处理技术，在极高固体含量 ($\geq 60\%$, w/w) 和极低水用量下进行预处理，预处理后物料的含水量低于 50% (w/w)，且不产生任何的游离水（废水）^[23-25]。相比于其他酸预处理技术，其环境影响更低，且可以进行高固体含量的发酵转化。采用此技术生产得到的乳酸和乙醇等均达到了世界领先水平^[26-28]。

预处理过程在提高木质纤维素原料的酶解效率同时，也会降解产生一些小分子的化合物，如有机酸、呋喃醛等^[29, 30]。这些小分子化合物会抑制后续酶解糖化中纤维素酶的活性和发酵过程中菌株的发酵性能，因此被统称为抑制物^[31, 32]。通过脱毒去除抑制物是缓解此问题的常用方法^[33]，比如：活性炭吸附法、过碱中和法和生物脱毒法等^[34, 35]。活性炭可以黏附或者螯合大部分的呋喃衍生物、乙酸和酚类物质^[34, 36]。最近研究表明活性炭吸附法可以使酚类含量从 132 AU 降低到 8 AU^[34]。但活性炭在移除抑制物的同时也会吸附可溶性糖类导致大量的糖损失。过碱中和法可以定量地移除糠醛和五羟甲基糠醛等，但碱的添加会改变预处理液的物性，这可能会对后续的糖化和发酵造成一定的影响^[37]。

表 1.1 常规预处理方法^[44]

Table 1.1 Overview of common pretreatment methods^[44]

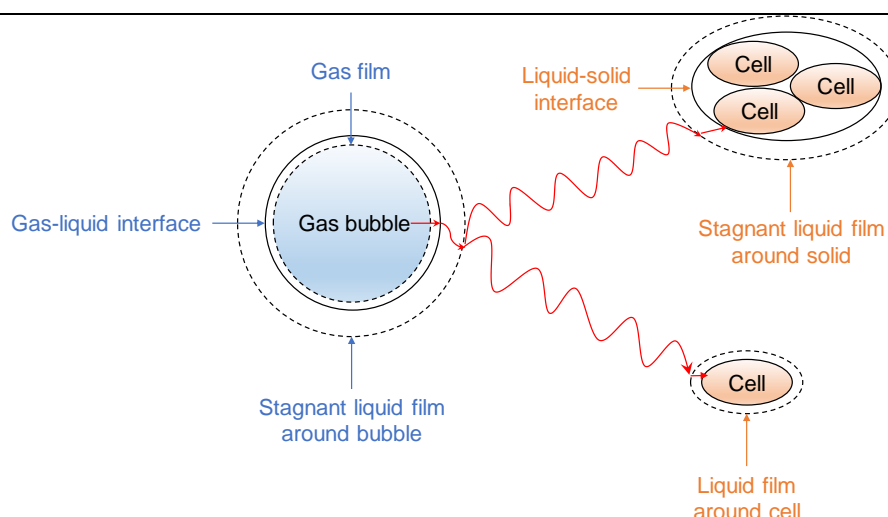
Methods	Typical temperature and reaction time	Chemicals	Effects on hemi-celluloses	Effects on lignin	Effects on cellulose	Examples of upscaling attempts	References
Hydrothermal pretreatment	~170-230 °C, 10-30 min	None	Partial solubilization	Slight removal	Slight increase in crystallinity	Inbicon (Denmark)	[18]
Hydrothermal pretreatment with dilute acid	~120-230 °C, from a few sec to ~ 1 h	H ₂ SO ₄ , HCl, H ₃ PO ₄ , organic acids	Complete hydrolysis	Disruption and redistribution, slight removal	Partial depolymerization, slight increase in crystallinity	Iogen-Raízen (Brazil), POET-DSM (USA), Iogen (Canada), Blue Sugars (USA)	[20-22]
Hydrothermal pretreatment with steam explosion	~160-230 °C, ~1-30 min	None, SO ₂ , H ₂ SO ₄ , H ₃ PO ₄ , NaOH	Partial to complete solubilization, deacetylation	Slight removal and modification	Slight increase in crystallinity	Sekab (Sweden), Abengoa (Spain), Beta Renewables (Italy), Verenium (USA)	[20, 22, 45]
Mild alkaline methods	~25-180 °C, from a few min to several weeks	NaOH, KOH, Ca(OH) ₂ , NH ₄ OH	Partial solubilization, deacetylation	Significant removal	Crystallinity decrease, depolymerization	DuPont Danisco (USA)	[19]
AFEX	40-100 °C, 5-45 min	NH ₃	Deacetylation	Structural changes	Crystallinity increase	DEINOVE-MBI (USA)	[19]
Chemical pulping (Kraft, sulfite, soda or organosolv)	90-250 °C, 30-60 min	Depends on process	Variable removal	Extensive removal	No removal, but degree of polymerization and crystallinity affected	Borregaard (Norway), Lignol (Canada), Chempolis (Finland)	[46, 47]
Oxidative methods	From room temperature to ~200 °C	O ₃ , O ₂ , H ₂ O ₂	Partial removal	Significant removal	Partial depolymerization, marginal increase in crystallinity	BioGasol (Denmark)	[20]
Ionic liquids	~80-130 °C	Ionic liquids	Solubilization	Solubilization	Decrystallization	-	[48-50]

生物法是最为温和且最适合工业化应用的脱毒方式。本实验室从生长于预处理物料菌群中筛选得到一株树脂枝孢霉 (*Amorphotheca resiniae*) ZN1, 发现其可以优先降解多种抑制物组分同时保留可发酵糖类如木糖等^[35, 38, 39]。目前, 采用此菌株脱毒后物料生产得到的纤维素乙醇产量已与淀粉原料的生产水平相当^[26]。

预处理及脱毒后物料可以酶解得到单糖用于后续的发酵转化。高固体含量 ($\geq 15\%$, w/w) 糖化可以增加糖浓度和发酵产品浓度, 进而降低后续的分选纯化成本和过程成本, 因此是生物炼制产业化的必然选择^[40]。然而高固体含量会导致水量少、混合操作困难、传质传热不足和高抑制物浓度等问题^[41, 42]。Zhang 等^[43]证实高固体含量显著增加了木质纤维素体系的粘稠性且极大影响了传质效果, 一般的浆叶不能实现很好的混合效果。一种高混合强度的螺带浆叶被发现可以满足此类高固高粘体系的混合需求, 且在 30% 固体含量下实现了很好的同步糖化与发酵转化, 因而解决了高固体含量下传质传热困难的问题。高固体含量生物炼制转化目前主要以厌氧发酵方式进行。Liu 等^[26]考察了高固体含量下纤维素乙醇的生产潜力, 使用小麦秸秆原料在 35% 固体含量下生产得到了创记录高的纤维素乙醇产量 (101.1 g/L)。Qiu 等^[28]通过代谢工程改造了乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*), 使其可以完全利用木质纤维素原料中的葡萄糖和木糖, 在 25% 固体含量下生产得到了 97.3 g/L 的 L-乳酸。由于不确定高固体含量对木质纤维素体系的氧供给影响, 高固体含量下的好氧发酵仅能对糖化液进行固液分离使用水解清液才能实现, 但这个过程会导致大量糖的损失因而增加了过程成本。

1.2 好氧发酵过程的氧气传递

好氧发酵是生物炼制的重要方式, 已广泛用于多种大宗化工产品的生产, 比如: 葡萄糖酸、柠檬酸、谷氨酸和微生物油脂等。过去研究大多采用分步糖化与发酵方式以木质纤维素水解清液为原料进行发酵转化, 但木质素残渣与水解清液的固液分离过程不可避免地会造成大量的糖损失, 因而发酵产品的产量均较低, 这极大限制了木质纤维素产业化应用的进程。同步糖化与发酵或者固液共发酵才能实现高效的好氧发酵转化。为了实现高指标的产物生产以降低后续的分选纯化成本, 高固体含量发酵是生物炼制工业的必然选择。但高固体含量可能会显著影响发酵液的氧气传递速率, 进而导致好氧发酵速率的降低甚至发酵失败。Freitas 等^[51]测定了三相气升式反应器中氧传递的情况, 发现固体含量的增加会显著地降低氧气的传递速率。Chen 等^[52]进一步发现在 10-30% 固体含量范围内固体的增加不仅降低了气液氧气传递速率, 也降低了气液交接面积和液相的质量传递系数。高固体含量增加了发酵液的粘度因而导致了气泡合并现象的增加而促使更多大气泡的形成, 这可能是氧气传递速率降低的原因之一^[53]。另外, 颗粒尺寸的差异也会对氧气传递速率产生一定的影响, 颗粒尺寸越大越不利于氧气的传递^[54]。木质纤维素物料的颗粒尺寸随着糖化时间的延长而降低, 但预糖化时间越长同步糖化的效果越弱, 越不利于高效的发酵转化进行, 故预糖化时间可能是影响同步糖化与好氧发酵转化效率的重要因素之一。

图 1.2 氧气从气泡传递到细胞步骤^[57]Fig. 1.2 Steps of oxygen transfer from gas bubble to cell^[57]

氧气传递速率会对菌株的发酵性能产生极大的影响。Ferreira 等^[55]发现随着氧气传递速率从 55 h^{-1} 降低到 7 h^{-1} ，耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 利用粗甘油生产柠檬酸的得率降低了 7.8 倍。Calik 等^[56]考察了氧气对黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) 生产谷氨酸的影响并发现谷氨酸的生产对氧气的供给情况非常地敏感: *B. flavum* 在低氧气传递速率条件下更倾向于产生副产物丙酮酸和乳酸，而在高氧气传递速率下又会产生大量的酮戊二酸和琥珀酸。因此为了实现良好的好氧发酵转化，必须对高固体含量体系的氧气传递速率进行精准地调控 (图 1.2)。不过，其前提条件是已知发酵液中的氧气传递速率，但过去鲜有研究考察高固高粘木质纤维素体系的氧传递情况。

氧气传递速率的测定目前已有多种方法^[58]。选择一种合适的测定方法必须考虑如下几个因素：(1) 通气情况和体系的均一性；(2) 生物反应器的形式和机械设计情况；(3) 发酵液的构成；(4) 微生物的潜在影响^[59]。在均一液相中的溶氧平衡可以表述为：

$$\frac{dC}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR} \quad (1-1)$$

其中 dC/dt 是液相的氧气富集速率，OTR 是氧气从气相到液相的传递速率，OUR 是微生物的氧气消耗速率。

大部分氧气传递速率的测定方法基于是否存在活性微生物而分类。在不存在微生物或存在不耗氧细胞时，生化反应不发生，此时 $\text{OUR}=0$ 。故公式 (1-1) 可简化为：

$$\frac{dC}{dt} = k_L a \cdot (C^* - C) \quad (1-2)$$

其中 C^* 是饱和溶氧， C 是 t 时刻的溶氧浓度。

此时氧传递测定的方法可以分为化学法和物理法。化学法是最先被人们广泛使用的方法，主要包括 Na_2SO_3 氧化法和 CO_2 吸附法。 Na_2SO_3 氧化法基于 Na_2SO_3 在催化剂作用下可以和溶解氧反应生成 Na_2SO_4 的原理进行测定^[60]。 Na_2SO_3 浓度在 0.04-1 N 范围内氧化反应的速率非常快，可以迅速把氧气耗尽，此时氧化反应的速率大于氧气传递的

速率。因此氧气传递速率控制着氧化反应速率，只需测定整个过程的氧化速率即可得到氧气的质量传递速率 ($k_L a$)。测定过程中首先在反应器中添加 1 N Na_2SO_3 和至少 10^{-3} M Cu^{2+} ，而后通气进行氧化反应数分钟，之后停止通气和搅拌并定期取样。使用过量标准碘溶剂与样品混合，而后采用标准 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 溶剂进行滴定以间接测定 SO_3^- 的残留量，进而获得 SO_3^- 的消耗速率，此时 $k_L a$ 可由公式 (1-3) 计算得到：

$$-\frac{dC_{\text{Na}_2\text{SO}_3}}{dt} = 2k_L a \cdot C^* \quad (1-3)$$

CO_2 吸附法通过测定碱性溶液中的 CO_2 吸附速率间接得到氧气传递速率。 CO_2 质量传递速率可由如下公式得到：

$$-\frac{1}{2} \frac{dC_{\text{CO}_2}}{dt} = k_L a \cdot C^* \sqrt{k \cdot C_{\text{CO}_2}} \quad (1-4)$$

其中 k 是速率常数在 20°C 时为 $5 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 。

氧气的气液传递速率 ($k_L a$) 可基于液膜理论换算得到：

$$\frac{k_L a|_{\text{O}_2}}{k_L a|_{\text{CO}_2}} = \frac{D_{\text{O}_2}}{D_{\text{CO}_2}} \quad (1-5)$$

由于化学试剂（亚硫酸钠或者碱）的添加会影响液相的物化性质，故化学法不被建议用于测定装备有空气分布器的生物反应器内的氧气传递速率。

物理测定法通过溶氧电极响应在解吸或者吸附氧气过程中的氧浓度变化以测定 $k_L a$ 值，这是目前氧气传递速率测定最常用的方法^[61-63]。动态氧吸附法通过注入氮气或者添加 Na_2SO_3 消除液相的溶氧，而后重新注入空气以监测溶氧随时间的回升进而得到 $k_L a$ 值^[64]。动态氧解吸法通过供给液相空气达到饱和溶氧，而后注入氮气以监测溶氧的降低。两种方法均可采用公式 (1-6) 计算 $k_L a$ 值：

$$\ln \frac{C^* - C_2}{C^* - C_1} = -k_L a \cdot (t_2 - t_1) \quad (1-6)$$

其中 C_1 是 t_1 时刻的溶氧浓度， C_2 是 t_2 时刻的溶氧浓度。

氧气传递速率是好氧发酵生物反应器规模化放大的重要基石。计算流体力学 (CFD) 模拟是当前实现生物反应器设计的主要途径，而 CFD 模拟结果的准确性极大地取决于氧气传递速率计算模型的选取^[65, 66]。对于类水相悬浮液体中的气液分散体系，Acien Fernandez 等^[67]和 Chisti^[68]采用如下公式计算气液传质模型：

$$k_L a = 3.378 \times 10^{-4} \left(\frac{g D_L \rho_l^2 \sigma}{\mu_l^3} \right)^{0.5} \alpha_g e^{-0.131 C_s} \quad (1-7)$$

其中 g 是重力加速度 (m/s^2)； D_L 是气相到液相的分子扩散系数 (m^2/s)； ρ_l 是液相密度 (kg/m^3)； σ 是表面张力 (N/m)； μ_l 是液相粘度 ($\text{kg}/(\text{m} \cdot \text{s})$)； α_g 气相体积分数 (%)； C_s 是悬浮液中固体浓度 (wt/vol%) 在气液体系为 0。

Bird 等^[69]1960 年推导出如下质量传递速率公式：

$$k_L a = \frac{12\alpha_g}{d_b} \sqrt{\frac{D_L U_{slip}}{3\pi d_b}} \quad (1-8)$$

其中 d_b 是气泡直径 (m); U_{slip} 是滑移速率 (m/s)。

Cockx 等^[70, 71]和 Talvy 等^[72]根据 Higbie^[73]的渗透理论提出了一种模型以评估局部的质量传递速率:

$$k_L a = \frac{12\alpha_g}{d_b} \sqrt{\frac{D_L U_{slip}}{\pi d_b}} \quad (1-9)$$

Xue 和 Yin^[74]根据 Boussinesq 假说和 Higbie^[73]渗透理论推导出如下质量传递公式:

$$k_L a = \sqrt{\frac{D_L}{\pi}} \left(\frac{\rho_l \varepsilon}{\mu_l} \right)^{1/4} \frac{12\alpha_g}{d_b} \quad (1-10)$$

其中 ε 是湍动能耗散速率 (m^2/s^3)。

Tobajas 等^[75]和 Wen 等^[76]基于 Higbie 理论和 Kolmogoroff 各向同性湍流理论建立了另一个质量传递速率表达式:

$$k_L a = \sqrt{\frac{D_L}{\pi}} \left(\frac{U_{slip} \rho_l g \alpha_g}{\mu_l} \right)^{1/4} \frac{12\alpha_g}{d_b} \quad (1-11)$$

如上所述, 目前有许多基于不同理论和假设的气液质量传递模型。然而, 并没有研究表明何种理论在生物反应器的氧传递模拟过程中更具有优势。因此对于特定反应器的设计必须对不同理论进行检验以确定最佳的 CFD 模拟方案^[77]。

1.3 纤维素糖酸生产

糖酸是单糖或寡糖直接氧化的产物, 如葡萄糖酸和木糖酸等 (图 1.3)。糖酸广泛应用于食品和建筑等行业^[78-80]。糖酸生产菌株主要为黑曲霉 (*Aspergillus niger*)^[81, 82]和氧化葡糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*)^[83-85]。*A. niger* 只能生产单一葡萄糖酸, 而 *G. oxydans* 则可利用自身细胞膜上独特的葡萄糖脱氢酶转化各种形式糖类到相应糖酸^[86, 87]。

当前葡萄糖酸生产的主要原料是粮食作物, 但葡萄糖酸需求量的增长, 造成了与人争粮的不利局面, 因此使用可再生的木质纤维素原料代替传统粮食作物生产葡萄糖酸变得尤为重要^[88]。木质纤维素原料中的纤维素可通过预处理和酶水解过程转化为葡萄糖, 而半纤维素则可转化为木糖、甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖等可发酵单糖^[89-91], 这些糖类均可转化为相应的糖酸^[92-94]。Ikeda 等^[95]首次利用可再生的废弃办公用纸以 *A. niger* 为菌种采用分批补料方式实现了 80-100 g/L 的纤维素葡萄糖酸生产。Zhou 等^[96]使用浓缩的稀酸预处理玉米秸秆清液通过 *G. oxydans* 全细胞催化的方式生产了 143.9 g/L 的木糖酸。Zhang 等^[97]采用干酸预处理的玉米秸秆水解液利用 *G. oxydans* 菌株同时发酵转化了葡萄糖和木糖到相应糖酸, 生产了 132.5 g/L 的葡萄糖酸和 15.1 g/L 的木糖酸。

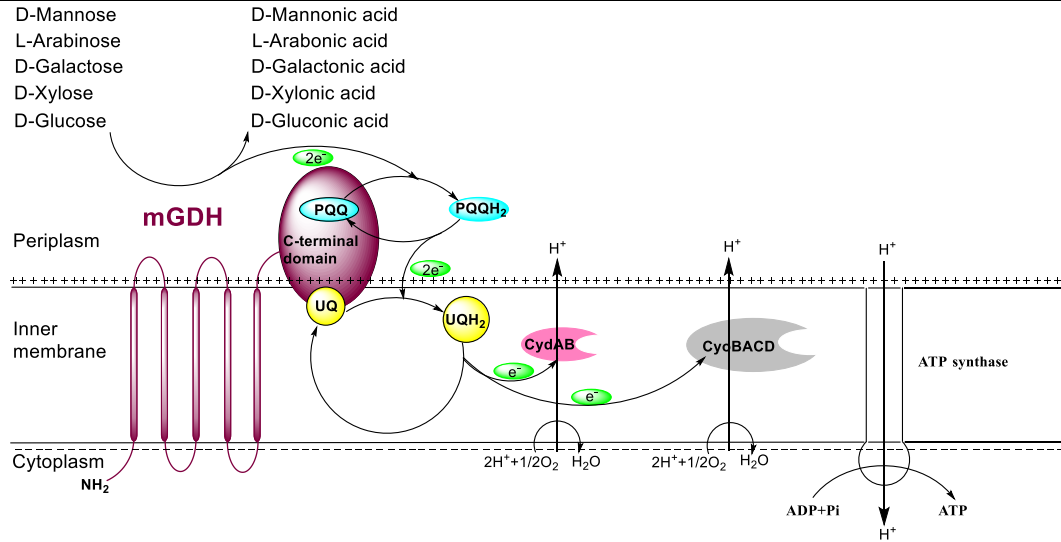


图 1.3 氧化葡萄糖杆菌的糖酸生产

Fig. 1.3 Sugar acids metabolism in *Gluconobacter oxydans*

目前通过发酵方式完全转化木质纤维素体系五种糖类到相应糖酸仍较为困难，但碳源的残留将会导致废水中 COD 含量的增加，进而增加污水的处理成本。为了降低废水中残留碳源的量，有研究利用酿酒酵母首先转化葡萄糖为乙醇而后采用 *G. oxydans* 转化木糖为木糖酸^[94, 98]，但这种发酵工艺不适宜大规模的工业化操作。故木质纤维素体系的全糖转化仍是糖酸高效生产的关键问题所在。

糖酸用途广泛，其中一个重要应用是作为水泥缓凝剂用于延迟水泥或混凝土的早期固化以利于水泥或混凝土的长距离运输及长时间放置^[100]。水泥缓凝剂是建筑行业不可或缺的原料之一，其需求量逐年增加。我国的水泥年消耗量大约为 25 亿吨，所需求的水泥缓凝剂产量至少为 100 万吨^[101]。葡萄糖酸作为缓凝剂已经广泛地应用于建筑行业，且与高效减水剂的复合使用对改善减水剂与水泥的适应性具有很好的效果^[102]。木糖酸不仅具有很好的缓凝效果还能够降低水用量作为减水剂使用^[103]。糖酸对水泥的缓凝作用主要体现在其中的羧基 (COO^-) 可以与水泥中 Ca^{2+} 形成络合物，进而增加 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的溶解度，延迟 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 的析晶及水化^[104-107]。而糖酸中的羟基 ($-\text{OH}$) 则易与富硅层中的 O^{2-} 形成氢键，进而在硅酸三钙和水之间形成保护膜延缓硅酸三钙的水化速率^[102, 105]。

1.4 纤维素柠檬酸生产

柠檬酸是一种最常见的有机酸，在食品和制药等工业具有广泛的应用^[108]。柠檬酸年产量超过 200 万吨并以每年接近 3.7% 的速率增长^[109]。柠檬酸最初生产方式来自于柑橘的萃取，但由于产率低下和柠檬酸需求量的增加，迫使人们寻求更为有效的柠檬酸生产方式。微生物发酵转化柠檬酸的生产周期短、操作易控、不受场地和气候的限制，因此日益受到人们的重视。当前全球超过 99% 的柠檬酸生产均来自微生物的发酵转化。

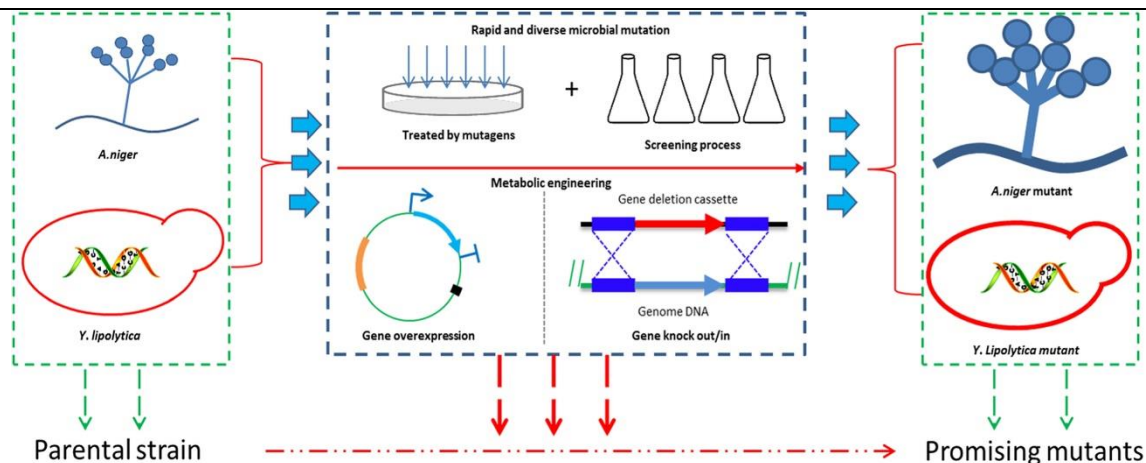


图 1.4 提高微生物菌株生产柠檬酸产量的策略^[114]

Fig. 1.4 Current strategies to enhance citric acid production by microbial strains^[114]

柠檬酸生产菌株主要包括曲霉、酵母和少量细菌^[110, 111]。*A. niger* 是一种性能非常优越的柠檬酸生产菌株，其优势如下：底物廉价、发酵易控和高柠檬酸得率^[112, 113]。使用酵母生产柠檬酸同样也具有一定的优势，比如：易培养、易分子改造和高底物耐受性。柠檬酸的生产效率显著关联于生产成本。为了降低柠檬酸生产成本，非常有必要采用代谢工程、高效突变和过程优化等生物技术提升发酵菌株的生产性能（图 1.4）。

代谢工程常用于提高 *A. niger* 生产柠檬酸的产量。为了考察几丁质合成酶基因 *chsC* 对菌体形态和柠檬酸合成的影响，Sun 等^[115]构建了一个 RNAi 系统沉默了 *chsC* 基因，因而提高了 42.6% 的柠檬酸生产得率。自然突变在微生物育种中并不非常有效^[116]，因此许多人为诱变已经大量用于提高微生物的突变频率以快速获取正向突变菌株。Zhang 等^[117]应用常温等离子突变法处理 *A. niger* 菌株，获得丹宁酸耐受性突变株 *A. niger* AA120，因而在利用含有单宁酸组分的橡子淀粉原料发酵时提高了 20.3% 柠檬酸产量。

发酵过程优化是提高柠檬酸产量的重要策略，已成功应用于不同生产工艺过程^[118-120]。柠檬酸产量直接关联于底物浓度。Xu 等^[121]发现蔗糖、葡萄糖、果糖和麦芽糖为底物在 10% 浓度时生产的柠檬酸产量最高，仅有葡萄糖在 7.5% 浓度时酸得率最高。Guilherme 等^[122]优化了柠檬酸发酵培养基中微量元素组成，发现最佳培养条件为 7 mg/L Fe^{3+} 和 6.5 mg/L Zn^{2+} 及无 Mn^{2+} 的添加。菌丝球尺寸和形式是影响黑曲霉合成柠檬酸的关键因素之一，当菌球尺寸小于 1 mm 时，更有利于柠檬酸生产^[123]。发酵液流变学特性关联于菌株形态和生物量^[124]，也决定了生物反应器内物料的传质速率^[125]。非牛顿流体行为是霉菌发酵体系的典型特征，低菌体浓度和小菌球形式更有利于形成低粘度流体特性，进而提高传质传热速率，增加柠檬酸生产效率^[126]。霉菌高供氧需求使得氧气传递速率成为柠檬酸生产的另一关键因素，而且是发酵过程中通气速率的变化也不利于柠檬酸累积^[127]。低氧气供给会抑制黑曲霉呼吸活性，进而阻断从细胞生长到柠檬酸合成的代谢途径。Kubicek 等^[128]发现在菌株分化期 20 min 通气暂停即会不可逆地破坏菌株合成柠檬酸的能力。但高氧气供给可能增加孢子形成而降低柠檬酸的生产性能^[129]。

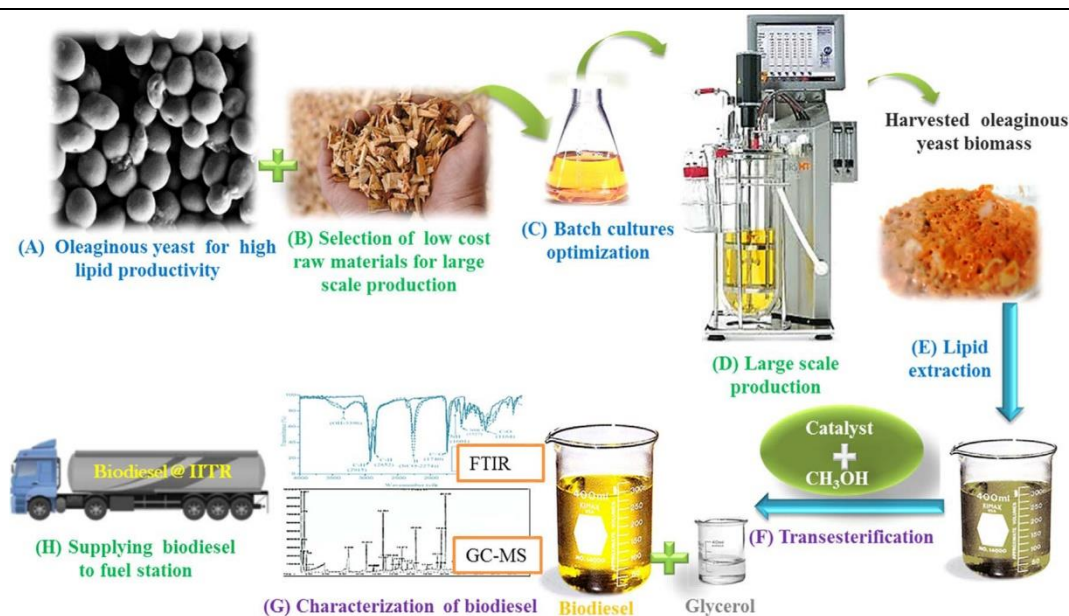
1.5 纤维素油脂生产

微生物油脂是微生物生长过程中积累的能量物质,主要组分是甘油三酯。自 1980 年起微生物油脂开始被用作可可油的替代物^[130]。研究者也聚焦于利用微生物油脂生产对人体健康有益的其他脂肪酸组分比如亚油酸和花生四烯酸等^[131, 132]。由于全球性的能源与环境危机,人们逐渐把微生物油脂利用方向转移到生产生物柴油和航空煤油领域(图 1.5)^[133-136]。过去研究已经证实来自油脂酵母生产的油脂经酯交换制备的生物柴油性能完全符合美国 ASTM (American Society for Testing and Materials)标准^[137]。

油脂微生物可以分为微藻、细菌、真菌和酵母。微藻是光驱动的细胞工厂可以转化 CO₂ 为生物燃料。微藻平均含油率在 1-70%之间,但特定条件下含油率可以达到 90%^[138, 139]。目前,微藻年产量超过 5000 吨干细胞量,产生大约 1.25×10⁹ 美元的经济价值^[140, 141]。尽管微藻是含油率较高的油脂微生物,但其相比于酵母和细菌而言,需要更大的培养面积和更长的培养周期^[135]。细菌培养简单且生长迅速,在油脂生产中具有一定的优势,一些细菌甚至可以富集 70%的含油率^[142]。然而,大部分细菌并不能生产油脂,仅有少数菌株可以生产一些复杂的类酯物质如聚羟基烷酸酯^[143]。酵母和真菌是研究最多也是最具潜力的油脂微生物^[144],一些菌株在限氮条件下可以生产超过 60%细胞干重的油脂产量,或者一些对人体有益的长碳链非饱和脂肪酸^[145]。

利用可再生资源生产微生物油脂越来越受到人们的重视^[146]。Yu 等^[147]以稀酸预处理及脱毒的小麦秸秆为原料考察了不同菌株的油脂生产性能,最终利用弯曲隐球菌 (*Cryptococcus curvatus*) 实现了最高 4.2 g/L 的油脂产量。Huang 等^[148]比较了稀酸预处理稻秆原料与纯糖生产油脂的性能,发现在木质纤维素体系发酵性丝孢酵母 (*Trichosporon fermentans*) 的发酵性能略有降低,但使用脱毒浓缩后的水稻秸秆水解液仍能获得较高的油脂产量 (11.5 g/L)。Ruan 等^[149]分析了深黄被孢霉 (*Mortierella isabelline*) 利用碱预处理和硫酸预处理玉米秸秆水解液的油脂生产性能,证实酸预处理秸秆的效果更好,油脂产量相比碱预处理提高了将近一倍。Chen 等^[150]考察了玉米芯水解液生产微生物油脂的性能并对其培养条件进行了优化,发现水解液自身可能存在一些有利于菌株生长的营养组分。Gao 等^[151]以提取木聚糖组分后的玉米芯残渣为原料分析了碳氮比对胞内油脂积累的影响,并最终实现了 12.3 g/L 的油脂生产。

油脂微生物的产油性能是限制油脂产量达标的重要影响因素,菌种筛选是获取高产菌株的有效途径,目前已发展出多种适用于油脂微生物选育的筛选方法^[152-154]。Tanimura 等^[155]采用油脂直接称重法从 500 株菌株中筛选得到了 31 株的油脂生产菌株,并获得了一株生产性能最为优良的菌株,藓类隐球菌 (*Cryptococcus music*) JCM 24512,其生产速率达到 0.37 g/L/day。Rostron 等^[156]发现尼罗红染色法适合于油脂酵母菌株的选育,可以快速筛选基因修饰的高产菌株。Tapia 等^[157]使用浅蓝菌素筛选紫外诱变的突变菌株,实现了相比野生菌株提高了 30.7%的油脂产量。Liu 等^[158]采用了一种快速进化的代谢工程法结合漂浮细胞法提高了 55%的油脂产量,进而利用耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 在合成培养基中生产了 39.1 g/L 的油脂。

图 1.5 微生物油脂生生产物柴油^[136]Fig. 1.5 Schematic diagram of biodiesel production from the oleaginous yeast^[136]

油脂是胞内产物必须进行细胞破碎才能释放出油脂获得产品。细胞破碎得率可通过测定代谢产物的释放、紫外吸收、浊度、颗粒尺寸和活细胞计数等进行定量地分析^[159]。但浊度测定可能会受到细胞碎片聚集的影响，如果破碎后细胞出现凝结现象，颗粒尺寸测定也会受到影响。由于水溶性组分的渗透，在低细胞浓度下蛋白和紫外吸收测定可能会过度估测细胞的破碎程度^[159]。活菌数可能是评估细胞破碎最精确的方法，但这些参数都是间接地评定细胞破碎。油脂回收率是评估细胞破碎的最直接方式。

一般的细胞破碎需要进行预处理：离心获得湿细胞；烘干脱水得到干细胞。而直接对湿细胞进行破碎可以消除高能耗的脱水过程^[160]。湿细胞的破碎方法主要包括物理破碎、化学破碎和酶解破碎（表 1.2）。物理法破碎处理速率较快，适合于规模化应用，对设备要求较低，但通常能耗较大^[161, 162]。高压均质法常用于日用品行业中分散牛奶中的油脂颗粒，若此方法的能耗能够降低到处理 1 kg 干油脂细胞量低于 26.9 MJ，则将会是生物油脂行业具有规模化应用潜力的方法^[163]。超声辅助细胞破碎可以提高微藻、酵母和真菌的油脂提取效率^[164-167]，但破碎效率显著关联于细胞的浓度。在高细胞浓度下此方法的油脂得率显著地下降，这是限制此方法应用的最大技术障碍。化学法如酸处理是目前效率最高且最常用的方法，但常需高温辅助破碎，对工业化设备要求较高。Kruger 等^[168]考察了各种破碎方法对酵母细胞油脂得率的影响，证实高温酸解的效果最佳，明显优于高压均质法、微波法及珠管研磨法。酶法破碎条件最为温和，更具有产业化应用的潜力，已成功应用于植物油的提取工艺^[169]。Cho 等^[170]证实使用纤维素酶酶解小球藻可以提高油脂萃取得率达到 70%。一般而言，几种酶的复合酶才能更有效地酶解细胞壁，但高昂的酶成本是限制其应用的重要瓶颈^[171, 172]。固定化酶尽管能够降低酶的成本，但也会影响酶与细胞壁间的质量传递效率而导致破壁效率的降低^[173]。

表 1.2 油脂提取的细胞破碎方法^[160]Table 1.2 Cell disruption methods in terms of lipid extraction^[160]

Methods	Species	Biomass	Conditions & scale	Energy (MJ/kg)	Analyses & outcome	References
Physical disruption	High-pressure homogenization	<i>Nannochloropsis</i> sp.	0.1-25% 10 L/h	0.2-144.5	Cell counting, 70-80%	[174]
	Bead mill	<i>Chlorella</i>	6.9-15.8% 3-62 kg/h	10.2-36.1	Cell counting, 85-99%	[175]
	Ultrasound	<i>S. limacinum</i>	4% 0.05 L	2	Ethanol:slurry=19:1 (v/v), 50%	[176]
	Pulsed electric field	<i>Scenedesmus</i>	0.5% 40 L	24	Hexane extraction, less than 50%	[177]
	Microwave	<i>Botryococcus</i>	0.5% 0.1 L/min	420	Bligh method	[163, 178]
	Subcritical water	<i>C. sorokiniana</i>	10% 0.1 L	6	No lipid extraction	[179]
Chemical disruption	HCl	<i>C. curvatus</i>	2.5-5% 0.17-0.3 M HCl, 78 °C 2 h, 0.02 L	4.4-8.8	Modified Bligh method, 87.5%	[166]
	H ₂ SO ₄	<i>Scenedesmus</i>	7.5% 2% H ₂ SO ₄ , 145 °C, 10 min, 0.005 L	6.7	Hexane extraction, 97%	[180]
	Poly-dimethylaminomethylstyrene	<i>Aurantiochytrium</i>	1.5% Poly-dimethylaminomethylstyrene membrane, 0.015 L	None	Hexane extraction, 25.6%	[182]
Enzymes	Cellulase	<i>C. vulgaris</i>	1% Cellulase, glucosidase, 50 °C, 72 h	10.4	Bligh method, 73.1%	[170]
	Glycomannanase	<i>R. toruloides</i>	12.8% Microwave 1 min, glycomannanase, 37 °C, 2 h, 0.01 L	8.4	Ethyl acetate extraction, 96.6%	[183]
	Pectinase, papain	<i>Mortierella alpina</i>	3% Pretreat at 80 °C 30 min, pectinase: papain (5:3, v/v) 60 °C, 6 h, 0.02 L	4.9	Hexane extraction 100%	[171]
	Cellulase, pectinase, hemicellulase	<i>Scenedesmus</i> sp.	0.3% Cellulase:pectinase:hemicellulase ratio of 1:1:1, 30 °C, 60 h, 0.03 L	8.4	Hexane extraction, 86.1%	[184]
Others	<i>Chlorella</i> sp	2%	TiO ₂ for harvest and then rupture cell by UV irradiation, 365 nm, 3 h, 0.2 L	40.5	Cell counting, 95%	[185]

1.6 本论文的立题依据和主要研究内容

木质纤维素原料是一种分布广泛且价格低廉的可再生资源，当前的生物炼制发酵多以厌氧方式生产如乙醇和乳酸等少数几种产品。然而，油脂、糖酸和柠檬酸等众多化学品的生产均需好氧发酵。高固载量是生物炼制产业化应用的必然选择。然而，目前高固体含量的好氧生物炼制发酵仍然存在诸多关键性的问题，如：氧气传递限制、混合传质困难、高抑制物胁迫、低菌株发酵性能和产品固液分离困难等。这些问题的存在严重地阻碍了好氧生物炼制的高效进行。本研究拟解决上述好氧发酵过程中的关键性问题，并探究多种化工产品（糖酸和柠檬酸）和微生物油脂生产的产业化应用潜力。本研究技术路线如下图所示：

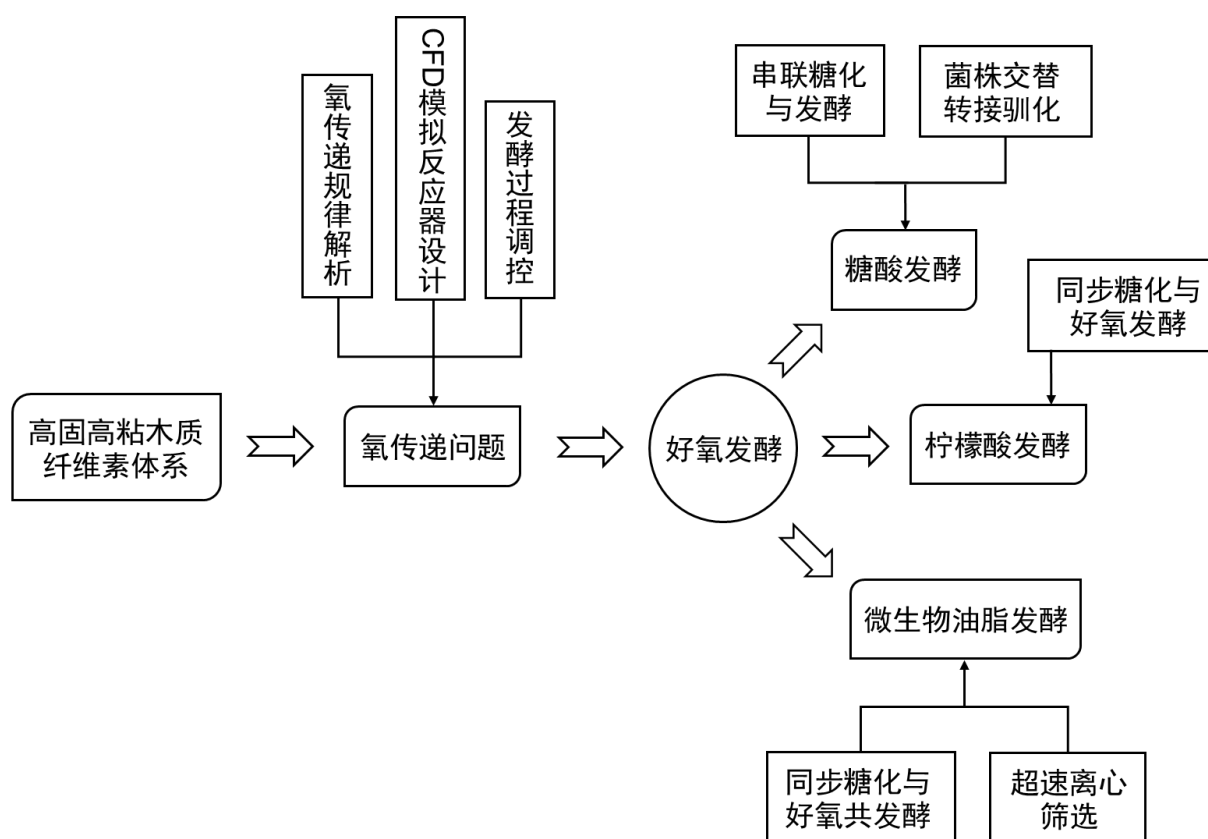


图 1.6 本研究技术路线图

Fig. 1.6 The technical flow sheet in this research

本研究具体内容包括如下几个方面：

- (1) 探究高固体含量下木质纤维素体系的氧传递特性，为高固体含量下好氧发酵的氧气充分供给提供解决方案。以 *G. oxydans* 生产葡萄糖酸发酵为例，考察不同氧气传递速率对好氧发酵过程的影响，进而选取合适的氧供给解决方案。基于发酵液的流变学特性，以氧气传递速率为依据，利用计算流体力学（CFD）模拟优化好氧发酵反应器的设计。
- (2) 考察木质纤维素全糖酸的好氧生物炼制发酵。利用菌株驯化和过程优化等策略，实现木质纤维素来源全部糖类发酵转为相应糖酸。通过发酵过程参数调整，优化 *G. oxydans* 发酵生产糖酸的工艺。在脱毒水解液和抑制物包含水解液中进行交替转接驯化 *G. oxydans* 菌株对木质纤维素体系的适应性和全糖利用性能。利用各种方法和检测手段，分析木质纤维素原料生产糖酸作为水泥缓凝剂添加是否符合国家的标准及满足实际的应用需求。
- (3) 探究柠檬酸的同步糖化与好氧发酵生产的可行性和产业化潜力。分析 *A. niger* 在高固体含量木质纤维素体系生产柠檬酸的性能，评估霉菌菌丝对发酵液的潜在影响，优化同步糖化与发酵生产柠檬酸的过程参数。利用 Aspen Plus 平台对纤维素柠檬酸生产的技术与经济性进行分析，探究其产业化的可行性。
- (4) 研究微生物油脂的同步糖化与好氧共发酵生产。基于高含油率细胞密度低的特性，采用一种超速离心筛选方式获取含油率最高最轻的油脂酵母菌株。建立超速离心筛选过程的流体静力学模型，探究其作用机理及普适性。考察超速离心筛选对胞内油脂代谢路径和细胞形态的影响。通过同步糖化与好氧共发酵方式，评估驯化菌株的油脂生产潜力，并探究发酵后油脂细胞与木质素残渣的特异性分离问题。

第 2 章 高固体含量好氧发酵过程的氧传递研究

2.1 引言

高产物浓度是降低发酵工艺下游分离纯化成本的重要举措。木质纤维素生物炼制过程中，酶水解和发酵阶段高木质纤维素载量是实现高产物浓度的必要条件^[186, 187]。当厌氧发酵应用于高固含量水解液中酿酒酵母乙醇生产或者乳酸菌乳酸生产时，少量酶液和种子液与高固木质纤维素水解液间的良好混合是非常必要的^[40, 43, 188]。当好氧发酵用于耶氏酵母油脂生产、黑曲霉菌柠檬酸生产、或者谷氨酸棒杆菌氨基酸生产时，良好混合和气液间的高氧气传递速率都是必不可少的。更重要的是，氧气传递速率是获取高产物浓度和生产速率的重要限制因素之一。当氧气在好氧发酵中同时作为转化底物时，比如：氧化葡萄糖杆菌^[97]或者黑曲霉菌^[93]转化葡萄糖到葡萄糖酸的发酵，氧供给需求进一步增强。

在高固体含量的木质纤维素水解液中，高粘稠性促使小气泡倾向于聚合成为大气泡并快速从水解液中逃逸^[51, 75, 189]。气泡的聚合和释放降低了高粘度和高固体含量水解液的总气含率、气液交接面积和界面能动性^[52]。这些现象相应地降低了氧气的传递速率和细胞的代谢活性^[190, 191]。一种提高氧气传递速率的方法是移除水解液中的固体颗粒^[192, 193]，然而水解液固液分离操作非常棘手：水解液的高固体含量使得离心在规模化应用上不可实现，其高粘稠性导致过滤极其困难^[194, 195]。而且，固液分离操作不可避免地会产生大量的糖损失和额外的电耗。在生物炼制过程中，采用同步糖化与发酵的部分原因就在于固液分离的困难和大量的糖损失。因此，采用包含固体颗粒的水解液不进行固液分离直接发酵是好氧发酵的必然选择。

高固高粘水解液中氧传递特性目前并未很好地表征，这极大地限制了生物炼制技术的发展。Mussatto 和 Roberto^[192]报道了水稻秸秆水解液的氧传递研究，但其所用水解液为固液分离后的清液。Sreenath 等^[196]考察了苜蓿纤维水解液的氧传递特性，但其固体含量较低（10%，w/w），故发酵产率并不理想。Liu 等^[197]研究了玉米秸秆水解液的溶氧变化和后续的油脂发酵，但所用固体含量仍很低，因此不能真正表征高粘木质纤维素体系中的氧传递一般性规律。

本章节首次考察了高固高粘水解液中的氧传递特性，并评估了其对典型好氧发酵（葡萄糖酸发酵）的发酵性能影响。在葡萄糖酸发酵中，发酵菌株氧化葡萄糖杆菌的细胞生长和葡萄糖酸生产均需要氧气，因此氧供给速率的轻微改变即会影响发酵速率。测定结果表明水解液的气液氧传递系数（ k_{La} ）随着固体含量的增加而显著地降低，但通过调节水解时间和搅拌转速仍可调控氧气传递速率以满足葡萄糖酸的发酵需求。基于测定的氧气传递速率和水解液流变学参数，研究建立了计算流体力学模型用于模拟反应器内的氧气传递速率分布并得到了实验验证。基于此模型，研究实现了规模化好氧发酵罐的优化设计。本研究为实现高固高粘木质纤维素体系中的高效好氧发酵提供了重要的参考依据和借鉴意义。

2.2 材料与方法

2.2.1 原料

玉米秸秆收获于 2014 年河南南阳秋季。收获的原料首先使用锤式粉碎机粉碎并过 10mm 网筛。清洗粉碎秸秆以移除灰尘、石子和金属碎片而后烘干保存。原始玉米秸秆含有 32.1% 的纤维素、20.6% 的半纤维素、26.5% 的木质素和 4.4% 的灰分。

2.2.2 酶与化学试剂

纤维素酶 LLC 购买自青岛蔚蓝生物股份有限公司(中国, 山东), 其滤纸酶活为 199 FPU/mL, 纤维二糖酶活为 5514 CBU/mL, 蛋白含量为 76 mg/mL 纤维素酶溶液。

葡萄糖内酯购于阿拉丁试剂有限公司(中国, 上海), 酵母提取物购自安琪酵母股份有限公司(中国, 湖北), 其余化学试剂购自上海凌峰化学试剂有限公司(中国, 上海)。

2.2.3 菌种和培养基

氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) DSM 2003 来自德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ), 其培养基包括 (1) 活化培养基: 40 g/L 山梨醇, 10 g/L 酵母提取物, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 1.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 20 g/L 琼脂; (2) 种子培养基: 80 g/L 山梨醇, 10 g/L 酵母提取物, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 1.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

脱毒菌株 *Amorphotheca resinae* ZN1 由本实验室筛选获得并保藏于中国微生物菌种保藏中心 (CGMCC)。 *A. resinae* ZN1 储存于 PDA 斜面, 其组成包括: 200 g/L 土豆, 20 g/L 葡萄糖, 20 g/L 琼脂。

2.2.4 预处理、生物脱毒和水解操作

玉米秸秆通过干酸方法进行预处理^[23, 24]。简单地说, 烘干玉米秸秆和稀酸在酸用量为 2.5% 和固液比 2:1 条件下一起加入螺带反应器在 175 °C 条件下反应 5 分钟。预处理后玉米秸秆含水量为 50% 左右, 并且无废水产生。通过 NREL 两步酸解方法^[198, 199]测定的预处理玉米秸秆包含 35.7% 纤维素和 24% 半纤维素。

预处理玉米秸秆通过使用 *A. resinae* ZN1 进行脱毒。简单地说, 预处理玉米秸秆使用 20% (w/w) $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 中和至 pH 5-6 而后通过盘磨去除长纤维以避免堵塞管道和阀门。*A. resinae* ZN1 固体种子以 10% 接种量接入新鲜预处理玉米秸秆固体中培养直到完全移除糠醛和 5-羟甲基糠醛。

预处理和生物脱毒的玉米秸秆在装备有螺带桨叶的 5 L 生物反应器中进行糖化。其酶用量为 6 mg 纤维素酶蛋白/g 干固体, 温度为 50 °C, pH 通过 5 M NaOH 控制在 4.8。糖化时间根据实验需求设定为 12 h 或者 48 h。

2.2.5 葡萄糖酸好氧发酵

糖化液使用灭菌烧杯快速转移到装备有平叶桨的发酵罐中进行葡萄糖酸发酵。2 mL 冻存的 *G. oxydans* 菌体接入种子培养基在 30 °C 和 220 rpm 条件下培养 15 h。而后种子液和 48 h 糖化后的水解液在 2% (v/v) 接种量下共同加入发酵罐中于 35 °C, pH 4.8 和 1.0

vvm 条件下发酵 36 h。样品定期从发酵液中取出在离心力为 $14,500\times g$ 下离心 5 min。

2.2.6 分析糖类、葡萄糖酸和抑制物

葡萄糖使用山东省科学院生物研究所的生物传感分析仪 SBA-40D 测定（中国，济南）。葡萄糖酸采用装备有 HPX-87H 型色谱柱的高效液相色谱进行测定。检测条件：流动相，5 mM H_2SO_4 ；流速，0.4 mL/min；柱温，55 °C。木糖、糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸使用 HPX-87H 型色谱柱测定，其检测条件：流动相，5 mM H_2SO_4 ；流速，0.6 mL/min；柱温，65 °C。

2.2.7 流变性质测定

水解液的流变性质使用博勒飞公司的装备有 SC4-16 转子的 DV2T 型粘度计（美国，马萨诸塞州）测定。表观粘度值在剪切速率 11.6-46.7 s^{-1} 范围内和 25 °C 条件下测定得到。幂律模型 $\eta_a = K_p \times \gamma^{n-1}$ 其中 K_p 是稠度系数 ($Pa \cdot s^n$)， n 为无量纲的幂律指数。 K_p 和 n 通过线性化的幂律模型计算得到：

$$\log_{10} \eta_a = \log_{10} K_p + (n-1) \log_{10} \gamma \quad (2-1)$$

2.2.8 测定氧气传递速率 ($k_L a$)

玉米秸秆水解液中的氧气传递速率使用动态氧解吸法测定^[200]。购买自梅特勒-托特多的溶氧电极用于监测溶解氧浓度 (DO) 的变化。饱和溶氧 (100%) 设定为 35 °C 和 1.0 vvm 条件下一定转速和固载量下的稳定溶氧值。测定 $k_L a$ 前需关闭通气开关并通入氮气以赶走氧气，使溶氧值低于 5% 的饱和溶氧值。而后，关闭氮气进气阀，重新打开通气开关，并每隔 10 s 迅速记录溶氧数值的变化，直到溶氧数值达到饱和溶氧。 $k_L a$ 值基于水解液中的氧质量平衡计算得到：

$$\frac{dC}{dt} = k_L a (C^* - C) \quad (2-2)$$

其中 C^* 是饱和溶氧浓度 (mol/L)， C 是实时测定的溶氧浓度 (mol/L)。

2.2.9 CFD 模拟

商用 CFD 软件 Ansys 公司的 ICEM 和 Fluent 分别用于反应器模型的三维网格生成和计算模拟。欧拉多相流模型用于模拟生物反应器内的气液质量传递情况。群体平衡模型 (PBM) 用于计算空气的气泡尺寸分布，其模型通过离散方法采用八组从 0.8-13.0 mm 大小的气泡群模拟气泡的合并与破裂。模型计算的边界条件是空气分布器为气体的速率进口边界，液面定义为脱气边界，桨叶、挡板和壁面定义为无滑移的标准壁面。桨叶部分采用动网格方法求解流场。整个模型采用隐式压力基求解，在非稳态下进行，计算时间步长为 0.02 s，并忽略化学反应。 $k_L a$ 值通过模拟气液交接面积 a 和液相质量传质系数 k_L 实现，其中 k_L 采用 Bird 方程计算^[69, 77]：

$$k_L = \frac{2}{\sqrt{3\pi}} \sqrt{\frac{D_L U_{slip}}{d_{32}}} \quad (2-3)$$

其中 D_L 是气相在液相中的分子扩散系数 (m^2/s), U_{slip} 是气液间的滑移速率 (m/s)。

气液交接面积 a 由 Sauter 平均气泡粒径 d_{32} 和气体体积分数 a_G 计算得到:

$$a = \frac{6a_G}{d_{32}} \quad (2-4)$$

2.3 结果与讨论

2.3.1 高固高粘木质纤维素水解液中的氧气传递速率测定

本研究实验性地测定了不同操作条件下高固体含量水解液中的氧传递系数 k_La (图 2.1)。水解液固体含量的增加导致了粘度增加并降低了 k_La 值, 尤其是当固体含量增加到 30% 时 k_La 值的降低更为显著 (图 2.1a)。但增加搅拌转速可以增强水解液的湍流强度, k_La 值随之增加。进一步研究发现延长酶水解时间降低了水解液的表现粘度值, k_La 值相应地增加 (图 2.1b)。水解时间的延长实现了木质纤维素颗粒的进一步水解, 进而降低了秸秆颗粒尺寸, 增加了糖化液的流动性并降低了其粘稠性, 这可能是 k_La 值增加的主要原因。在低固体含量时, k_La 值显著增加, 但此时测定数据可能存在一定的误差, 主要原因在于低固低粘水解液中存在严重的发泡现象容易干扰溶氧电极的测定, 因而导致了测定的 k_La 值相对较高但不精确。当搅拌转速增加时, 增强了湍流水平进而降低了泡沫的形成, k_La 值测定的精度随之提高。这些结果预示着高固体含量的确会显著地降低水解液中的氧气传递速率, 但增加混合强度和更彻底的水解可以一定程度上缓解氧供给的压力。

充足的氧供给是实现好氧发酵中快速细胞生长和高效产物转化的必要条件。过去少数研究涉及到发酵菌株所需的氧气传递速率^[201, 202]。Calik 等^[56]考察了氧供给对黄色短杆菌生产谷氨酸的影响, 发现低氧气传递速率有利于丙酮酸和乳酸的积累, 而高氧气传递速率则倾向于累积酮戊二酸和琥珀酸等副产物, 最适宜谷氨酸生产的条件为 k_La 值在 22 h^{-1} 。Ferreira 等^[55]证实了 k_La 是影响耶氏酵母利用粗甘油生产柠檬酸的关键因素。随着 k_La 值从 7 h^{-1} 增加到 55 h^{-1} , 柠檬酸产量增加了 7.8 倍, 其最佳 k_La 值在 30 h^{-1} 。尽管木质纤维素水解液中的氧气传递速率通常低于传统液体培养基或者木质纤维素水解清液^[51]。但图 2.1 表明在高固体含量水解液中的氧气传递速率仍然可以在温和操作条件下满足发酵所需的氧供给需求。这个结果预示着高固高粘木质纤维素体系应该可以很好地实现好氧发酵转化。

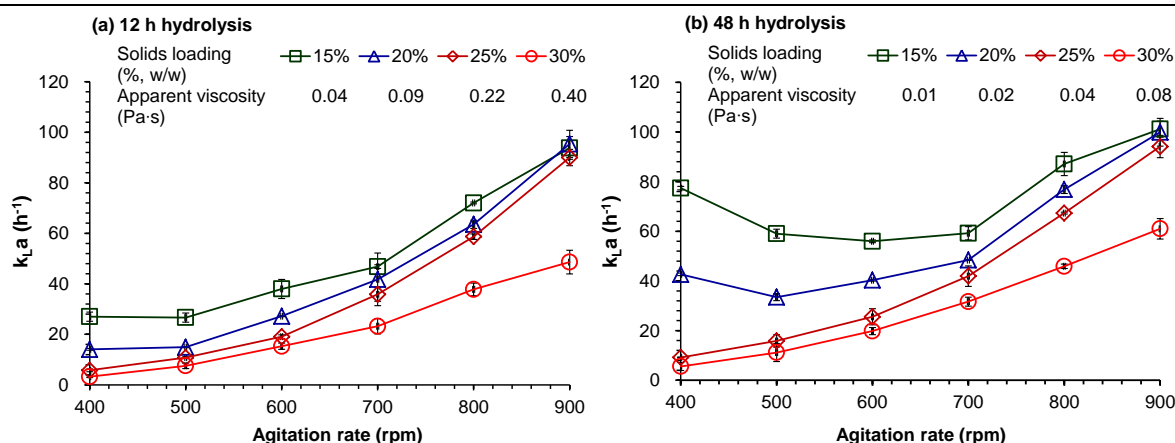


图 2.1 玉米秸秆水解液中氧气传递速率 k_{La} 的测定

Fig. 2.1 Measurement of oxygen transfer rate k_{La} in the corn stover hydrolysate slurry (a) 12 h 水解; (b) 48 h 水解。酶水解条件: 固体含量 30%, 6 mg 纤维素酶蛋白/g 干重, pH 4.8, 50 °C。氧气传递速率在 35 °C 和 1 vvm 下测定。

2.3.2 氧气传递速率对好氧发酵的影响

为了评估高固体含量水解液的氧气传递速率对好氧发酵的影响, 本研究选用在细胞生长和氧化转化方面具有高供氧需求的 *G. oxydans* 葡萄糖酸发酵作为模式发酵。在此发酵过程中, 纤维素转化为葡萄糖而后转化为葡萄糖酸内酯, 接着一个同步水解反应把葡萄糖酸内酯转化为葡萄糖酸^[203, 204]。因为中间产物葡萄糖酸内酯是极强的纤维素酶抑制剂^[205, 206], 故发酵前需对水解液进行彻底的酶解, 以避免发酵中葡萄糖酸内酯对酶解效果的影响。简明地说, 预处理和生物脱毒的玉米秸秆固体首先在装备螺带桨叶的反应器中水解 48h 转化为单糖, 而后所有水解液不经固液分离直接转入装备 Rusthon 桨叶的反应器进行葡萄糖酸发酵。

本研究首先考察了不同固体含量下的氧气传递速率对纤维素基葡萄糖酸发酵的影响 (图 2.2)。当固体含量为 15-25%, 也即 k_{La} 值 9.2-77.4 h⁻¹ 时, 发酵过程的溶氧变化趋势相似且最低溶氧水平差异不大 (图 2.2a), 并且葡萄糖可以在 12 h 内完全转化为葡萄糖酸 (图 2.2b)。当固体含量进一步增加到 30%, k_{La} 值降低到 5.6 h⁻¹ 时, 溶氧在葡萄糖氧化转化中迅速耗尽并且葡萄糖酸的转化速率显著降低 (图 2.2c)。此结果预示着较低固体含量的葡萄糖酸发酵基本不存在氧供给的问题, 只有达到 30% 固体含量 k_{La} 值极低时, 才会出现氧气供给不足的问题。

为了实现高固体含量 (30%, w/w) 下葡萄糖酸的高效转化, 研究在适当范围内增加了搅拌转速以提升氧气传递速率 (图 2.3)。当搅拌转速从 400 rpm 增加到 500 rpm 时, k_{La} 值增加了一倍, 从 5.6 h⁻¹ 增加至 11.2 h⁻¹, 并且葡萄糖的转化速率达到最优。当进一步增加搅拌转速使 k_{La} 值增加到 45.9 h⁻¹ 时, 葡萄糖到葡萄糖酸的转化速率基本维持恒定。这一结果表明高固高粘水解液中葡萄糖酸发酵的氧供给可以通过调节操作参数比如搅拌转速等得到满足。

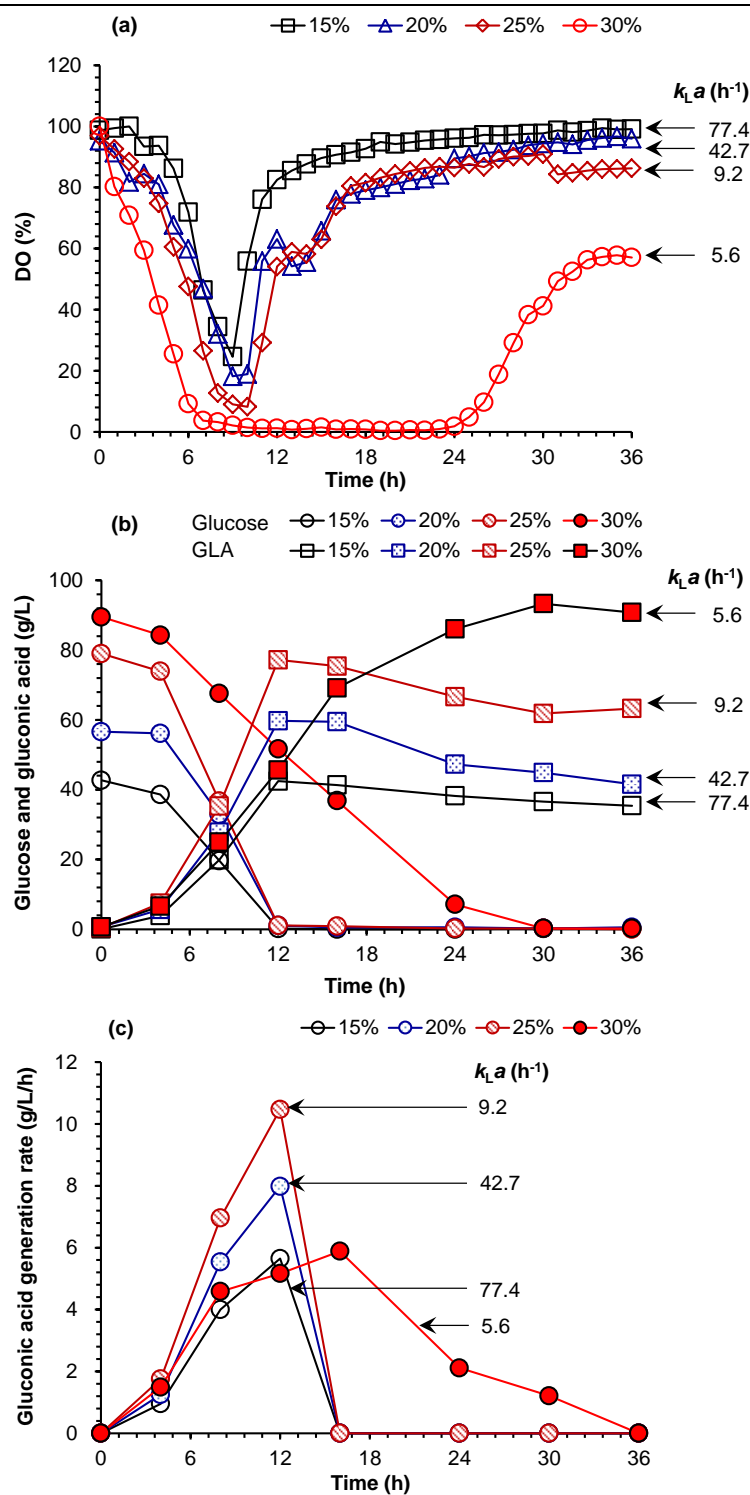


图 2.2 不同固体含量下的氧气传递速率和纤维素葡萄糖酸发酵

Fig. 2.2 Oxygen transfer rates and cellulose gluconic acid fermentation by varying solid contents
 (a) 溶氧; (b) 葡萄糖酸生产; (c) 葡萄糖酸生产速率。酶水解条件: 6 mg 纤维素酶蛋白/g 干重, 50 °C 和 pH 4.8。发酵条件: 2% 接种量, 400 rpm, 1 vvm, 35 °C 和 pH 4.8。

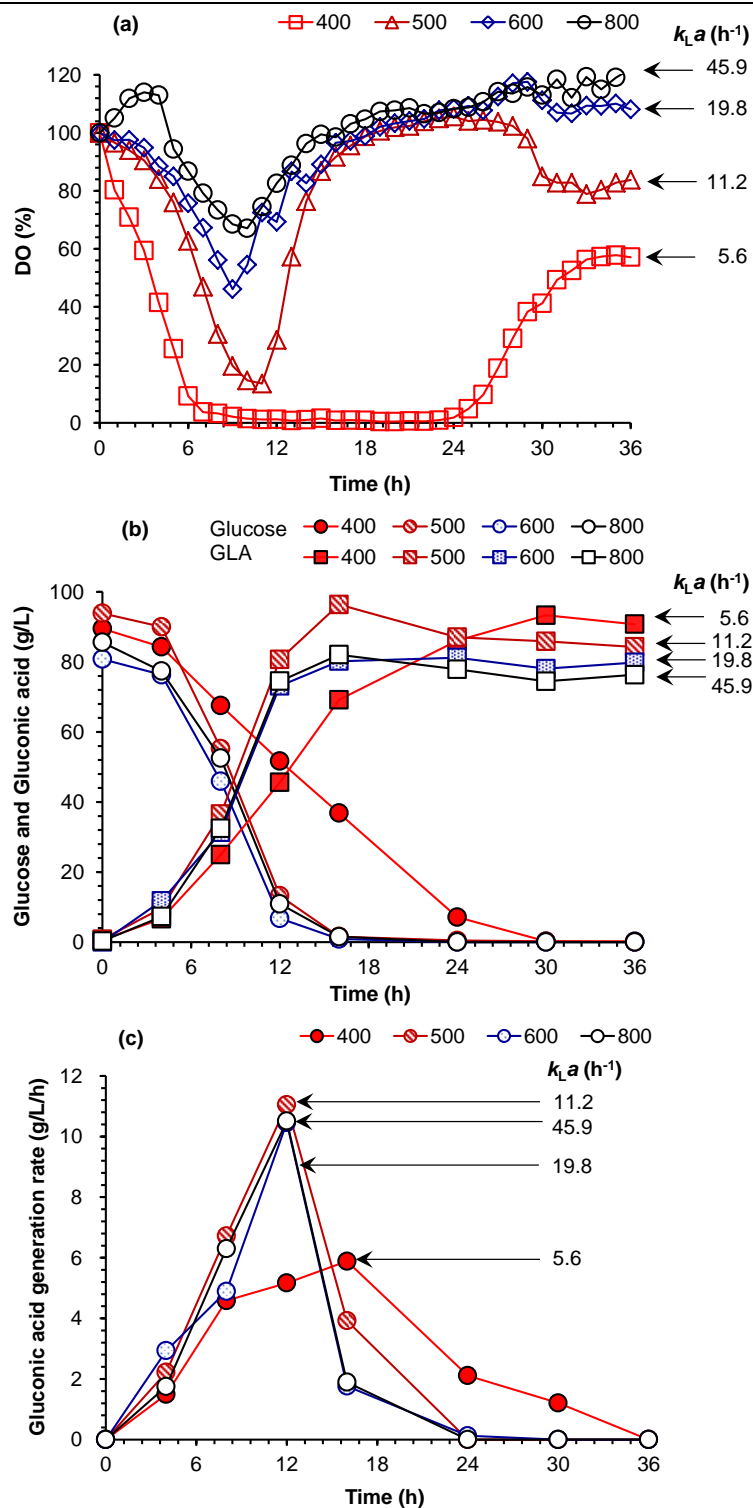


图 2.3 不同搅拌转速下的氧气传递速率和纤维素葡萄糖酸发酵

Fig. 2.3 Oxygen transfer rates and cellulose gluconic acid fermentation by varying agitation rates
 (a) 溶氧; (b) 葡萄糖酸生产; (c) 葡萄糖酸生产速率。酶水解条件: 固体含量 30%, 6 mg 纤维素酶蛋白/g 干重, 50 °C 和 pH 4.8。发酵条件: 2%接种量, 400 rpm, 1 vvm, 35 °C 和 pH 4.8。

图 2.4 比较了相似 k_{La} 值条件下的葡萄糖酸发酵性能, 发现当调节不同参数获得相似 k_{La} 值时 (25% 固体含量在 400 rpm, 30% 固体含量在 500 rpm), 葡萄糖酸的生产性能也保持一致。这个结果预示着无论如何改变发酵条件, 氧气传递速率才是影响纤维素好氧发酵性能的决定性因素。为了实现高效的好氧发酵, 氧气传递速率必须高于某个临界值。对于 *G. oxydans* 葡萄糖酸发酵而言, 这个 k_{La} 值应该在 10 h^{-1} 左右 (图 2.2 和图 2.3)。本研究通过实验证实尽管高固高粘木质纤维素水解液的氧气传递速率显著低于水解清液, 但对于一般的好氧发酵而言仍然是充足的。此结论将极大拓展生物炼制的应用范围, 促使人们从厌氧乙醇或者乳酸发酵生产转向产品类型更为丰富的好氧发酵生产 (如葡萄糖酸、柠檬酸和谷氨酸等生物基化工产品)。

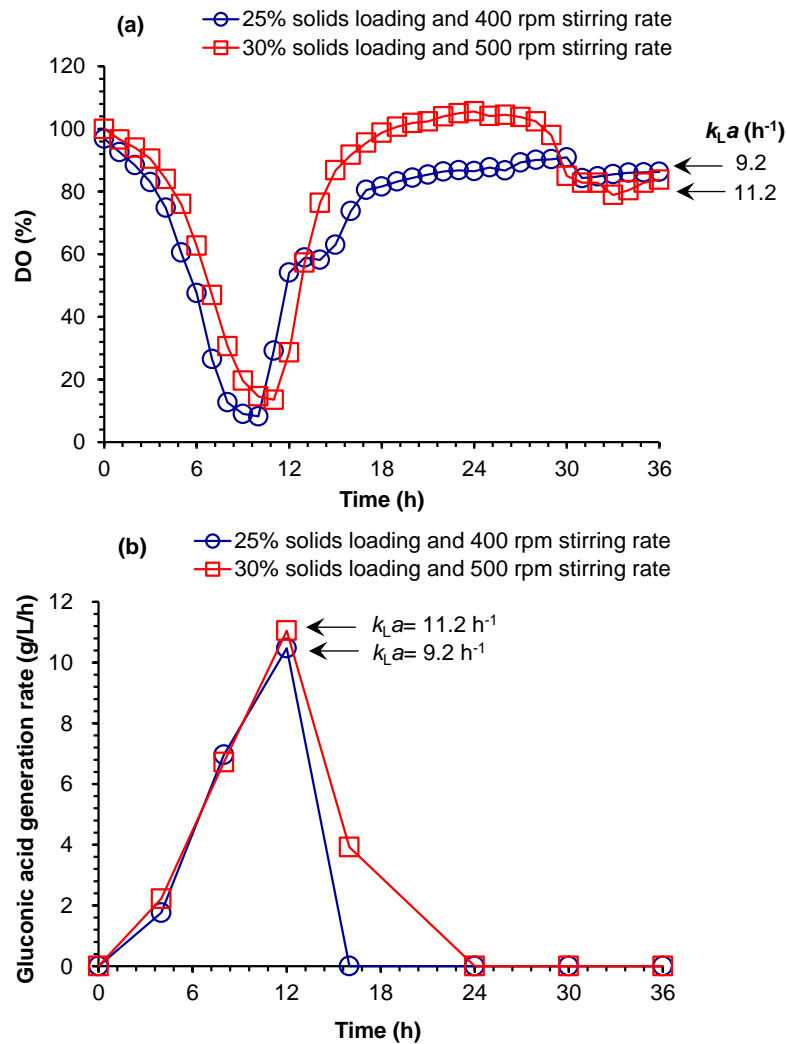


图 2.4 相似氧传递条件下的纤维素葡萄糖酸发酵

Fig. 2.4 Cellulosic gluconic acid fermentation under the similar oxygen transfer rate by different operation approaches

(a) 溶氧; (b) 葡萄糖酸生产速率。酶水解条件: 6 mg 纤维素酶蛋白/g 干重, 50 °C 和 pH 4.8。发酵条件: 2% 接种量, 1 vvm, 35 °C 和 pH 4.8。

2.3.3 基于氧气传递速率评估好氧生物反应器的设计

发酵液的流变参数是生物反应器模型建立的基础。葡萄糖酸发酵液的粘稠性（稠度系数， Kp ）随着发酵进行而显著地降低，并伴随着剪切稀化能力（幂律指数， n ）的增强（表 2.1）。

表 2.1 纤维素葡萄糖酸发酵过程的流变性质变化

Table 2.1 Rheology evolution of cellulosic gluconic acid fermentation

Time (h)	n (-)	Kp (Pa·s ⁿ)	Apparent viscosity (Pa·s)
0	0.19	2.81	0.18
12	0.18	2.12	0.13
24	0.16	1.56	0.09
36	0.15	1.28	0.07

酶水解条件：30% 固体含量，6 mg 纤维素酶蛋白/g 干重，50 °C 和 pH 4.8。发酵条件：2%接种量，1 vvm，35 °C 和 pH 4.8。

生物反应器混合功耗随着粘稠性的增强而急剧增加，因此研究使粘度最大时间点（发酵初始时刻）的流变参数建立了生物反应器的 CFD 模型以实现满足最大负荷的反应器设计。研究采用欧拉多相流模型以考察气液交互影响以模拟反应器内的流场和气液分布，利用群体平衡模型解析气泡的合并与破裂以模拟氧气传递速率的分布。研究首先分析了 CFD 模型模拟氧气传递速率的准确性，表 2.2 说明模拟值和实验值具有很好的一致性，其相对误差仅为 13.5%。此结果证实了所用 CFD 模型可以很好模拟高粘生物反应器内的氧气传递速率，这为后续生物反应器的优化设计建立了重要的基础。

表 2.2 高固高粘水解液中实验测定的 k_La 值与 CFD 模拟值比较

Table 2.2 Comparison of the CFD calculated k_La values with the experimentally measured values in the highly viscous lignocellulose hydrolysate slurry

Agitation rate (rpm)	Simulated k_{La} (h ⁻¹)	Experimental k_{La} (h ⁻¹)	Relative error (%)
400	4.8	5.6±1.6	-14.3
500	9.4	11.2±3.6	-16.1
600	16.9	19.8±1.4	-14.6
800	50.0	45.9±0.9	+9.0

酶水解条件：30%固体含量，6 mg 纤维素酶蛋白/g 干重，50 °C 和 pH 4.8，酶解 48 h。氧气传递速率测定条件：1 vvm 和 35 °C。

研究采用 CFD 模拟解析了不同搅拌转速下罐内的气含率分布和氧气传递速率分布（图 2.6）。随着搅拌转速从 400、600 rpm 增加到 800 rpm，体积平均气含率从 0.4、1.1%增加到了 2.3%（图 2.6a）。且搅拌强度的增强也增加了 k_La 值大于 10 h⁻¹ 区域范围，意味着罐内更多区域可以满足高效葡萄糖酸发酵的供氧需求。空气流迹线图表明随着搅拌转速的增加，气流倾向于聚集在反应器中心（图 2.6b）。这种气流的汇集在桨叶周围高湍流强度的作用下易破碎形成小气泡，这种小气泡增加了气液交接面积 a ，因而导致 k_La 值的增加。此模拟结果从微观层面解析了搅拌转速增加对 k_La 值的影响，加深了人们对 k_La 值调控的认知。

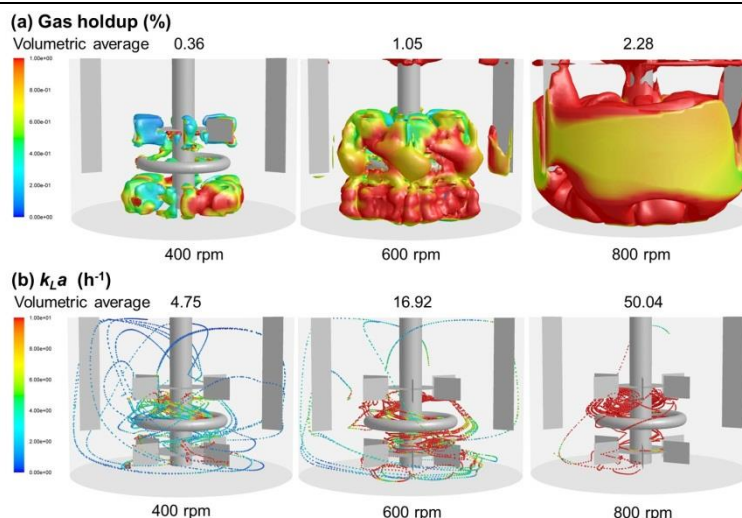


图 2.6 不同搅拌转速下的气含率和氧气传递速率

Fig. 2.6 CFD simulation of gas holdup and oxygen transfer rate of the high solids loading hydrolysate slurry at different agitation rates

(a) $k_L a$ 值为 10 h^{-1} 的等值面上的气含率分布；(b) 空气迹线流上的 $k_L a$ 分布。CFD 模拟采用欧拉多相流模型和群体平衡模型实现。

本研究接着利用已验证的 CFD 模型对不同规模尺寸的生物反应器进行了优化设计以实现最低功耗下的最佳传质效果，包括实验规模 5 L 罐（图 2.7）和工业规模 100 m^3 罐（图 2.8）。对于 5 L 罐而言，两层桨叶即可满足一般好氧发酵的混合强度需求。本研究分别考察几种不同桨叶结构在相同功耗条件下的混合性能差异。HBT 桨叶混合下罐内整体气含率偏低仅在桨叶和进气口附近氧气传递速率才能满足葡萄糖酸发酵需求（图 2.7a）。另外，空气迹线流主要集中于生物反应器的上部区域，这预示着大部分的空气会快速地从罐内释放出来，以至于不能很好地被利用。这个现象在一定程度上解释了 HBT 桨叶的低气含率和低氧气传递速率情况。PBTU 桨叶具有更好的轴向混合性能，因此其气含率和氧气传递速率均高于 HBT 桨叶。但这种轴向流一定程度上不利于气泡在罐内的聚集，相反，RT 桨叶可以把大部分气泡富集在发酵罐的中部和底部，这使得空气进入罐内后需要经过很长的路径才能从罐内释放出来，因此增加了气体在罐内的停留时间，故其溶解氧和氧气传递速率均相对较高。此结果表明对于 5 L 生物反应器，考虑到溶氧和氧供给速率 Rusthon 桨叶更适于高固高粘水解液的好氧发酵。

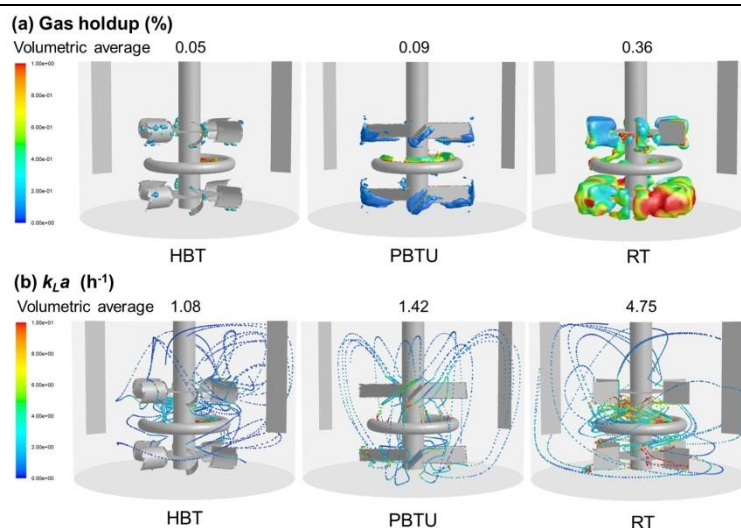


图 2.7 CFD 模拟优化设计 5L 规模的葡萄糖酸发酵罐

Fig. 2.7 CFD simulation of 5 L gluconic acid fermentor

(a) k_{La} 值为 $10 h^{-1}$ 的等值面上气含率分布；(b) 空气迹线流上 k_{La} 分布。CFD 模拟采用欧拉多相流模型和群体平衡模型实现。其中：HBT，半圆管圆盘涡轮桨叶；PBTU，折叶开启桨叶；RT，平直涡轮桨叶。

对于 $100 m^3$ 生物反应器设计，研究考察了两个主要耗能的参数：通气速率（图 2.8a）和桨叶形式（图 2.8b）。通气速率的增加显著提升了氧气传递速率、气含率和流场速率。更重要的是，氧气传递速率在罐内的分布更为均一化，因此更利于各个空间区域内菌体生产和代谢活动的一致性和高效性。对于葡萄糖酸发酵而言， $10 h^{-1}$ 的氧气传递速率即可满足菌体的代谢需求。图 2.8a 表明几种不同通气速率下 k_{La} 值均大于 $10 h^{-1}$ ，预示着即使 $0.125 vvm$ 通气速率下罐内的平均氧气传递速率仍是足够的。但此时高氧气传递速率仅集中在部分区域如通气口和桨叶周围，大部分区域的 k_{La} 值均低于 $10 h^{-1}$ 。只有当通气速率达到 $0.25 vvm$ 时，氧气传递速率的分布才变得更为均一化。此结果预示着 $0.25 vvm$ 对 $100 m^3$ 罐即是充足的，这比 5 L 罐通气速率降低了 75%。

大型好氧发酵罐需要非常强烈的搅拌以满足高固高粘发酵体系的混合和供氧需求，因此本研究为 $100 m^3$ 罐设计了四层桨叶配置。径向流 4RT 桨叶组合及其与轴向上推流相结合的 2WHu+2RT 和 3WHu+RT 桨叶组合的氧气传递速率均相对较低，且 k_{La} 值在罐内分布非常不均一（图 2.8b）。径向流桨叶及轴向下推流桨叶的组合

（2WHd+2RT 和 3WHd+RT）具有更高的氧气传递速率、更好的均一性、更高的气含率和流场速率。主要原因在于，下推式轴向流桨叶搅拌下的流场向下的轴向流动更为剧烈，底层流场速度更大，促使空气流在进入罐内有更剧烈地扰动，因此增加了空气的停留时间，导致气含率和氧气传递速率的增加。

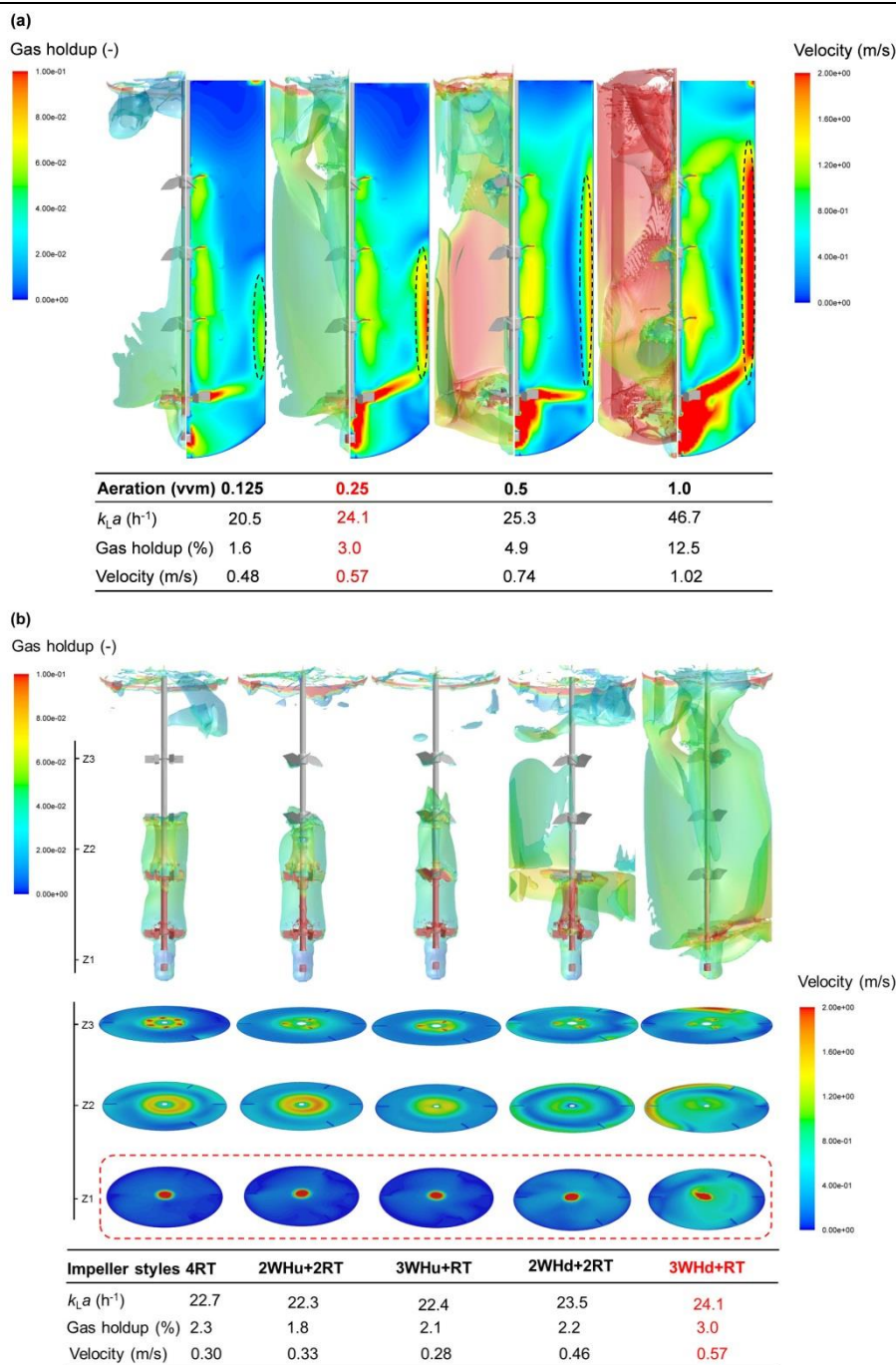


图 2.8 100 m³ 葡萄糖酸发酵罐的规模化放大

Fig. 2.8 Scale-up of 100 m³ gluconic acid fermentor

(a) 通气速率优化，左侧： $k_L a$ 值为 $10 h^{-1}$ 的等值面上气含率的分布，右侧：速度流场分布；
 (b) 桨叶形式优化， $k_L a$ 值为 $10 h^{-1}$ 的等值面上气含率分布和 Z1、Z2 及 Z3 平面上速度流场分布。
 CFD 模拟采用欧拉多相流模型和群体平衡模型完成。其中：4RT，四层平直涡轮桨叶；
 2WHu+2RT，两层三宽叶上推式桨叶加两层平直涡轮桨叶；3WHu+RT，三层三宽叶上推式桨叶加
 一层平直涡轮桨叶；2WHd+2RT，两层三宽叶下推式桨叶加两层平直涡轮桨叶；3WHd+RT，三层
 三宽叶下推式桨叶加一层平直涡轮桨叶。

两种规模下生物反应器的桨叶设计存在显著的不同，其原因在于：小型反应器（5 L）中空气的流速较低，采用径向流桨叶才能更好地实现空气的分布，利于空气在液相中的溶解；大型反应器（100 m³）中空气的流速较高，很易从罐内释放出来，因此采用更多轴向流桨叶可以增加空气在罐内的停留时间，进而增加了氧气传递速率。

2.4 本章小结

本章节首次考察了高固高粘水解液中的氧传递规律，提供了纤维素好氧发酵过程中氧气充分供给的解决方案，开辟了好氧生物炼制转化的新篇章，为后续生物燃料（如微生物油脂）和化学品（如糖酸和柠檬酸）的好氧转化奠定了坚实的技术基础。本章节主要结论如下：

- (1) 解析了高固高粘水解液中的氧气传递一般性规律，证实了固体含量增加显著地限制了氧气传递速率，但通过适当地延长酶水解时间或者增加搅拌强度可以很好地改善氧气供给情况。
- (2) 无论固体含量或者搅拌转速等操作条件如何改变，氧气传递速率都是实现高效好氧发酵转化的决定性因素之一。对于典型的好氧发酵 *G. oxydans* 生产葡萄糖酸而言，其临界 k_{La} 值须大于 10 h⁻¹ 才能实现高效的葡萄糖酸生产。
- (3) 高固体含量葡萄糖酸发酵的粘稠性随着发酵的进行而显著地降低并伴随着剪切稀化能力的增强。基于测定的流变性质，研究建立了一个模拟高固高粘生物反应器内氧气传递速率的 CFD 模型，并得到了很好的实验验证。
- (4) 利用 CFD 技术优化了实验室规模和工业规模好氧发酵罐的设计，证实了小型反应器更适宜装备径向流的 RT 桨叶，而大型反应器中轴向流和径向流结合的 3WHd+RT 桨叶则更适宜。

第 3 章 木质纤维素全糖酸的好氧生物炼制发酵

3.1 引言

糖酸是单糖经过简单氧化得到的有机酸。人们通常利用纤维素来源的葡萄糖转化生产葡萄糖酸，但木质纤维素生物质除了纤维素还含有大量的半纤维素组分。这些半纤维素是己糖（葡萄糖、半乳糖和甘露糖）、戊糖（木糖和阿拉伯糖）和一些糖酸的杂聚物，占据木质纤维素生物质中总碳水化合物的 40%。在玉米秸秆中，木聚糖、阿拉伯聚糖、甘露聚糖和半乳聚糖分别占据总碳水化合物的 34.1%、5.1%、0.5%和 2.7%^[207]。无定向的半纤维素结构可以在各种预处理过程中水解为单糖^[208]。很多研究并不能很好地利用这些糖类因而增加了污水处理负担。高效利用这些糖类是实现木质纤维素来源全糖转化生产糖酸和降低后续污水处理成本的关键问题所在。

大部分天然微生物仅可以利用葡萄糖作为单一碳源，因此各种工程操作已经用于改造微生物使其能够同时利用其它的碳源如木糖或者阿拉伯糖生产目标产物^[209, 210]。而氧化葡萄糖杆菌 *G. oxydans* 本身独特的氧化还原能力具备转化各种糖类到相应糖酸的潜力。过去研究表明 *G. oxydans* 细胞膜上的脱氢酶不仅能够转化葡萄糖到葡萄糖酸，也可以转化木糖到木糖酸、半乳糖到半乳糖酸。阿拉伯糖和甘露糖到相应糖酸的转化并未有报道，但仍有可能实现。

糖酸的重要用途是作为水泥缓凝剂延缓水泥的水化，其作用机理是糖酸中羟基和羧基基团对水泥中硅酸三钙、硅酸二钙和铝氧石等水化反应具有很好的延迟作用。Monosi 等^[211]使用热重分析法考察了三种化合物对铝氧石水化的影响，发现葡萄糖和木质素磺酸盐仅能轻微延缓铝氧石的水化，但葡萄糖酸的延缓效果非常显著。Chun 等^[103]考察了木糖酸作为水泥和混凝土外加剂的作用效果，证实木糖酸的缓凝效果几乎是木质素磺酸盐的两倍。由于木质纤维素原料在生物炼制过程中会产生一些副产物，因此木质纤维素原料生产的糖酸组分较为复杂，其作为水泥缓凝剂的效果可能会受到影响，必须通过实验测定进行验证。

第二章研究已经解决了高固体含量好氧发酵过程的氧气供给问题，并初步实现了高粘体系 *G. oxydans* 对单一葡萄糖酸的生产。本章将进一步探究 *G. oxydans* 对木质纤维素来源其他碳源的转化能力，进而实现木质纤维来源全部碳源的完全转化。研究主要通过发酵过程优化获得最佳的糖酸生产条件。采用长期适应性进化方式提升 *G. oxydans* 菌株对多种糖类的协同利用能力。评价木质纤维素原料生产糖酸的经济性和工业可行性。利用各种检测手段评估木质纤维素原料生产糖酸作为水泥缓凝剂的产品性能。本研究为纤维素糖酸好氧发酵的产业化应用建立了重要的技术基础。

3.2 材料与方法

3.2.1 原料、纤维素酶和试剂

玉米秸秆收获于 2015 年秋, 购买自内蒙古巴彦淖尔市。原料包含 35.4%纤维素, 24.6%半纤维素和 26.5%木质素。纤维素酶详见 2.2.2。

阿拉伯糖购自北京华威锐科化工有限公司(中国, 北京), 甘露糖购自九鼎化学科技有限公司(中国, 上海), 半乳糖购于上海麦克林生化科技有限公司(中国, 上海), 葡萄糖酸钠购于山东西王糖业有限公司(中国, 山东), 基准水泥购自山东鲁城水泥有限公司(中国, 山东), 聚羧酸酯 QS8020 购自上海齐硕实业有限公司(中国, 上海)。

3.2.2 菌种和培养基

G. oxydans DSM 2003 用于糖酸的发酵转化, 其种子培养基包括 80 g/L 山梨醇, 10 g/L 酵母提取物 (YE), 1.5 g/L KH_2PO_4 , 1.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。合成培养基包括 40 g/L 糖类(木糖, 阿拉伯糖, 甘露糖或者半乳糖), 10 g/L YE, 1.5 g/L KH_2PO_4 , 1.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。

脱毒菌种和培养基详见 2.2.3。

3.2.3 预处理、生物脱毒和酶水解操作

预处理和生物脱毒操作参见 2.2.4, 其中脱毒操作进行了适当调整: 固态脱毒种子及中和磨浆物料共同加入 15 L 生物反应器中在 28 °C 通气条件下快速脱毒 48 h 以去除抑制物并同时保留木糖。

用于糖酸发酵和 *G. oxydans* 菌株驯化的水解液制备操作详见 2.2.4。

3.2.4 *G. oxydans* 的适应性驯化

G. oxydans DSM 2003 培养于脱毒水解液和抑制物包含水解液中进行交替转接驯化。具体而言, *G. oxydans* 首先在 20 mL 抑制物包含水解液中于 30 °C 和 220 rpm 培养 24 h, 而后以 10%接种量转接到脱毒水解液中培养 24 h。这种交替转接一直持续进行 420 天, 在每次转接时添加 0.16 g CaCO_3 以维持 pH 在 5-6。前 34 代培养所用的抑制物包含水解液含有 54.4 g/L 葡萄糖, 23.5 g/L 木糖, 3.2 g/L 乙酸, 0.3 g/L 糠醛和 0.2 g/L 5-羟甲基糠醛。后续所用培养基包含 62.9 g/L 葡萄糖, 29.7 g/L 木糖, 6.1 g/L 乙酸, 0.2 g/L 糠醛和 0.2 g/L 5-羟甲基糠醛。脱毒水解液含有 67.2 g/L 葡萄糖, 21.8 g/L 木糖, 0.6 g/L 乙酸。

3.2.5 好氧发酵和全细胞催化

在摇瓶发酵中, 种子液以 10%接种量接入 45 mL 合成培养基于 30 °C 和 220 rpm 条件下发酵 72 h, 利用 5 M NaOH 每隔 6 h 调整一次 pH 到 5-6。

在发酵罐规模, 两种工艺用于糖酸发酵转化: 串联糖化与发酵 (CHF) 和分步糖化与发酵 (SHF)。在 CHF 中, 种子液以 5%接种量和未固液分离水解液一起在装备有通气装置和 Rushton 桨叶的反应器中在 35 °C, pH 4.8 和 1.0 vvm 条件下直接进行发酵。在 SHF 中, 水解液首先进行固液分离而后接入种子液进行糖酸转化。

当全细胞催化用于糖酸转化, 所用静息细胞的制备方法详见 Meyer 等^[212]。简单而言, 收集 OD₆₀₀ 值达到 5.0 的 1 L 种子液在 2500 × g 离心 20 min。离心后细胞使用 1 L 40 mM 磷酸盐缓冲液 (pH 6.0) 清洗两次后保持菌浓在 OD₆₀₀ 35。而后静息细胞悬浮液以 10% 接种量接入水解清液中在 35 °C, 2.5 vvm 和 pH 4.8 条件下进行细胞催化。

3.2.6 糖酸的水泥缓凝效果评价

木质纤维素来源糖酸仅通过简单地固液分离移除秸秆和菌体杂质并脱色后进行水泥缓凝效果的评价。水泥缓凝时间和安定性、流动性、抗折强度及抗压强度分别根据国标 GB/T 1346-2011、GB/T 2419-2005 和 GB/T17671-1999 进行测定。糖酸在水泥中添加剂量为 0.01-0.03% (w/w)。

环境扫描电镜、X 射线衍射及热重分析使用水化 8 h 或 24 h 的水泥块进行。简单地说, 基准水泥和糖酸溶液 (水与水泥比 0.5) 共同加入无锡市建工试验仪器设备有限公司的 NJ-160 型水泥净浆搅拌机在 285 rpm 混合 2 min, 而后倒入塑料瓶中密封并在水泥养护箱内 20 °C 及 95% 湿度条件下储存 8 h 或 24 h。而后捣碎为小碎片并在乙醇中浸泡 7 天再烘干后储存备用。干水泥碎片直接在日本电子株式会社的 JSM-6360 LV 型扫描电子显微镜 (日本, 东京) 下观察水泥的微观结构。另取一部分水泥碎片碾磨成粉末进行 X 射线衍射和热重分析。X 射线衍射仪器采用日本理学株式会社装备 CuK α 激发光的 D/Max 2550V 型仪器 (日本, 东京), 样品扫描电压为 40 kV (100 mA), 步长为 0.02°, 范围为 10-70°。热重分析采用梅特勒-托利多的装备有热重和同步热仪的 TGA/DSC1 1600HT 型仪器 (瑞士, 苏黎世) 测定。样品测定的升温速率为 10 °C/min, 温度范围为 25-1000 °C, 所用气体介质为氮气。

3.2.7 糖类和糖酸分析

葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖采用 HPX-87P 型色谱柱的 HPLC 进行测定。检测条件: 流动相, 无菌超纯水; 流速, 0.6 mL/min; 柱温, 80 °C。葡萄糖酸和木糖酸使用 HPX-87H 型色谱柱进行测定。检测条件: 流动相, 5 mM H₂SO₄; 流速, 0.4 mL/min; 柱温, 55 °C; 波长, 210 nm。甘露糖酸、半乳糖酸和阿拉伯糖酸通过安捷伦装备四级 LC-MS 6120 检测器及 Zorbax Eclipse XDB-C18 柱子的 1200 HPLC 检测。

3.2.8 Aspen Plus 过程模拟及经济性分析

Aspen Plus 软件 (美国, 马萨诸塞) 用于对纤维素糖酸发酵工艺进行分析。我们采用 NREL 的基础模型进行设计^[207], 并在以下部分进行了适当的修改: 预处理方式从稀酸预处理改为干式稀酸预处理; 脱毒方式从过量氨中和改为生物脱毒; 糖化发酵方式从 20% 固体含量乙醇发酵改为 30% 固体含量葡萄糖酸和木糖酸共发酵; 产品回收方式从蒸发改为板框压滤、脱色和多效蒸发。整个工艺过程中的固体物流和废水在经济性核算中均进行了考量。发酵液板框压滤得到的木质素残渣用于焚烧发电, 脱色和三效蒸发过程产生的废水送入废水处理厂净化。整个工厂年处理能力为 30 万吨玉米秸秆。Aspen Plus 模型得到的物料和能量平衡数据用于决定生产过程中所需设备和化学品的种类与数量。

3.3 结果与讨论

3.3.1 串联糖化与发酵工艺高效转化纤维素糖酸

在好氧生物炼制发酵中人们通常称利用固液分离后水解清液的发酵为分步糖化与发酵工艺 (SHF)，而本研究直接采用未固液分离的水解液作为底物发酵，我们定义这种发酵方式为串联糖化与发酵 (CHF)。为了评估两种工艺的差异性，本研究以纤维素糖酸发酵为例对其进行了考察 (图 3.1)。在 CHF 工艺中，葡萄糖在 36 h 内即可完全转化为葡萄糖酸，而木糖转化相当缓慢但仍能够在 72 h 内完成木糖酸的生产，此工艺在 30% 固体含量下可以获得 106.2 g/L 葡萄糖酸和 47.9 g/L 木糖酸。此结果与 SHF 工艺相当，但由于固体颗粒的存在影响了气液传递速率，这在一定程度上限制了木糖的转化速率。

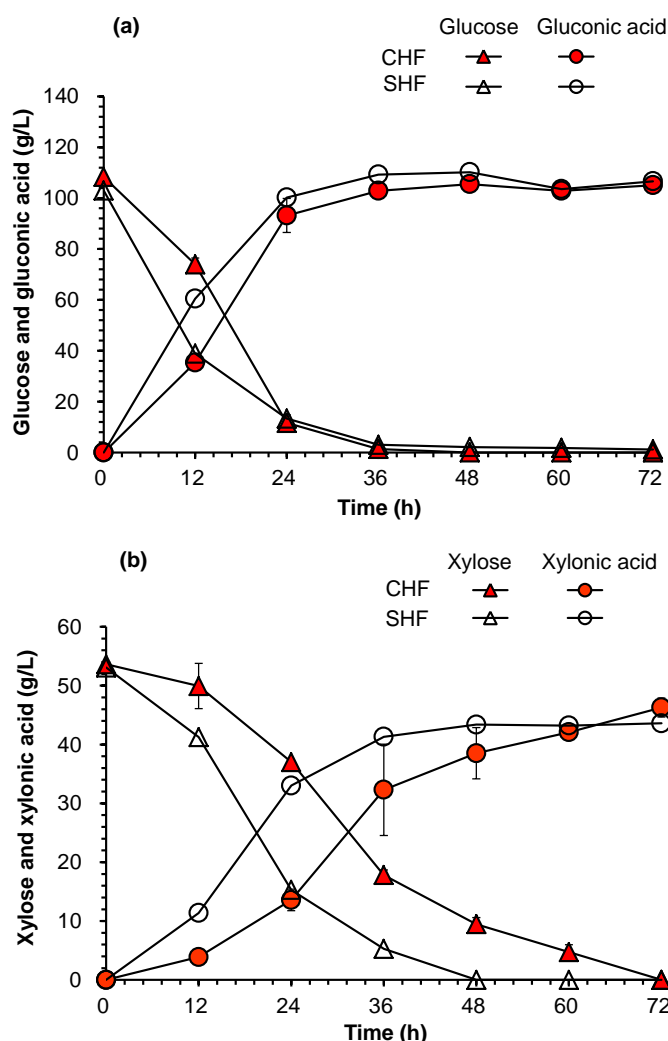


图 3.1 CHF 和 SHF 生产纤维素糖酸比较

Fig. 3.1 Comparison of CHF and SHF for gluconic and xylonic acids fermentation

(a) 葡萄糖酸; (b) 木糖酸。酶水解条件: 30% 固体含量, 4 mg 纤维素酶蛋白/g 干固, 50 °C, pH 4.8, 48 h 酶解。发酵条件: 5% 接种量, 35 °C, 500 rpm, pH 4.8, 1 vvm, 72 h 发酵。

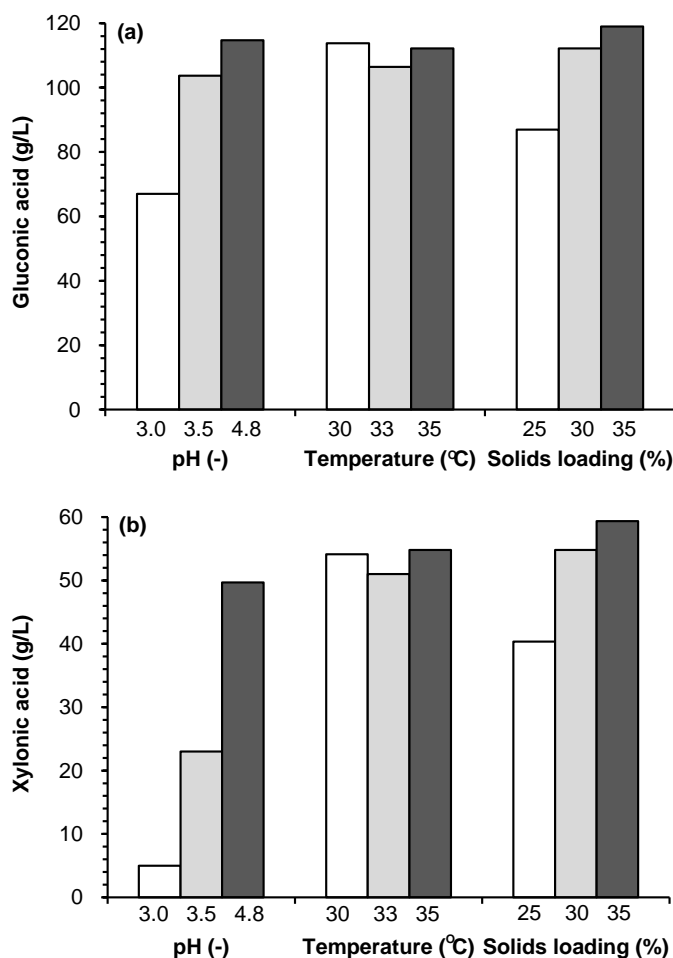


图 3.2 CHF 工艺的发酵过程优化

Fig. 3.2 CHF optimization for producing high titer gluconic and xyloonic acids

(a) 葡萄糖酸; (b) 木糖酸。酶水解条件: 4 mg 纤维素酶蛋白/g 干固, 50 °C, pH 4.8, 48 h 酶解。发酵条件: 5%接种量, 500 rpm, 1 vvm, 72 h 发酵。

为了获得高糖酸的发酵指标, 研究对 CHF 工艺相关过程参数进行了考察 (图 3.2)。低 pH 显著降低了糖酸转化效率, 其中木糖转化效率随着 pH 从 4.8 降至 3.0 而降低了 90%。这一结果预示着木糖等其他非葡萄糖碳源的转化相比于葡萄糖可能需要更多的氧化还原力, 因此环境条件的轻微改变都会影响其转化速率。适当的温度变化对发酵影响较小, 表明 *G. oxydans* 具有很好的温度适应性。随着固体含量的增加, 糖浓度显著增加因而提高了糖酸产量, 但固体含量从 30% 增加到 35%, 其糖酸产量增速较为缓慢, 可能原因在于高糖浓度限制了纤维素酶的活性, 另外高固体含量的高粘稠性一定程度上影响了气液间的氧气供给进而降低了糖到相应酸的转化效率。最终本研究在 35% 固体含量获得了创记录高的糖酸产量 (178.2 g/L) 包括 118.9 g/L 葡萄糖和 59.3 g/L 木糖酸, 相比过去研究至少提高了 20% (表 3.1)。

CHF 工艺进一步被放大到 50 L 体系以评估其规模化应用的可行性 (图 3.3)。在 50 L 罐中, 由于相对低的接种量和混合强度 (5% 接种量和 500 rpm 在 5 L 罐, 2% 接种量和 300 rpm 在 50 L 罐), 发酵过程出现了更长的延滞期。尽管如此, 其最终发酵产量仍达到了与 5 L 罐相当的水平, 这预示着 CHF 工艺具有工业化放大的潜力。

表 3.1 木质纤维素来源糖酸生产水平比较

Table 3.1 Comparison of sugar acids production from lignocellulose feedstock

Feedstock	Biorefining methods	Strains	Sugar acids yield (g/L)	Source
Corn stover	Dry acid pretreatment and biotreatment, CHF	<i>G. oxydans</i> DSM 2003	178.2	This study
Corn stover	Dry acid pretreatment and biotreatment, SHF	<i>G. oxydans</i> DSM 2003	147.6	[97]
Corn stover	Dry acid pretreatment and biotreatment, SHF	<i>A. niger</i> SIIM M276	76.7	[93]
Corn stover	Dilution acid pretreatment and base neutralization, whole-cell catalysis	<i>G. oxydans</i> NL71	96.8	[83]
Corn stover	Acid-Catalyzed Steam-Exploding, Whole Cell Catalysis	<i>G. oxydans</i> NL71	55.0	[94]
Waster office paper	SHF	<i>A. niger</i> IAM2094	80	[95]

研究也评估了两种工艺中主要固液分离过程的效率及其操作可行性（SHF 工艺中水解液的固液分离；CHF 工艺中发酵液的固液分离）。结果表明 CHF 工艺在固液分离操作方面比 SHF 具有更大的优势。SHF 工艺中水解液的固液分离受自身高粘稠性的影响实际操作更为困难，最终糖回收率仅为 76.0%。由于发酵过程中碱液的高度稀释及产物糖酸的高游离性，因此 CHF 工艺中的发酵液粘稠性更低，固液分离更易进行，最终其糖酸回收率达到了 85.5%。这结果预示着尽管 CHF 工艺在发酵性能上与 SHF 工艺相差不大，但其过程操作性更强，最终产品得率也更高。

基于以上过程研究，本研究采用 Aspen Plus 软件对两个工艺全流程的技术经济性进行了全面分析。并利用年处理 30 万吨玉米秸秆的工艺模型评估各自的优劣性。模型基于如下假设：两种工艺使用相同的原料，相同的干式预处理和生物脱毒方式，相同的酶水解得率和发酵得率。主要差异在于 CHF 工艺使用未固液分离的水解液进行发酵，而 SHF 使用固液分离后的水解清液。因此在 SHF 中需要两次固液分离，一次用于水解液中分离木质素残渣，一次用于发酵液中分离菌体，CHF 仅需在发酵后进行一次固液分离即实现木质素残渣和菌体的移除。

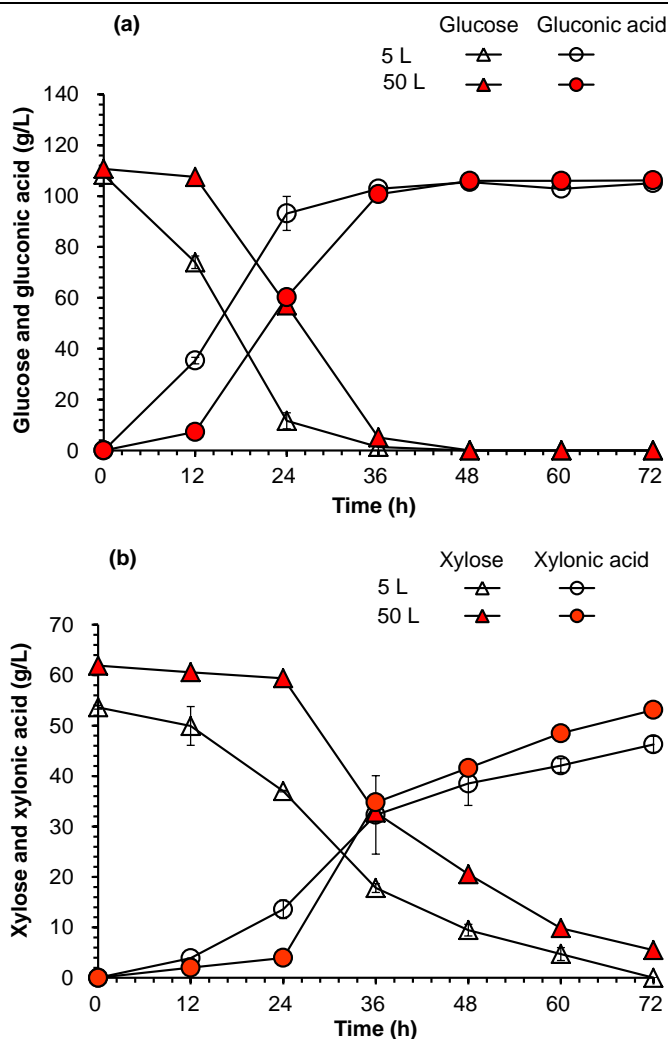
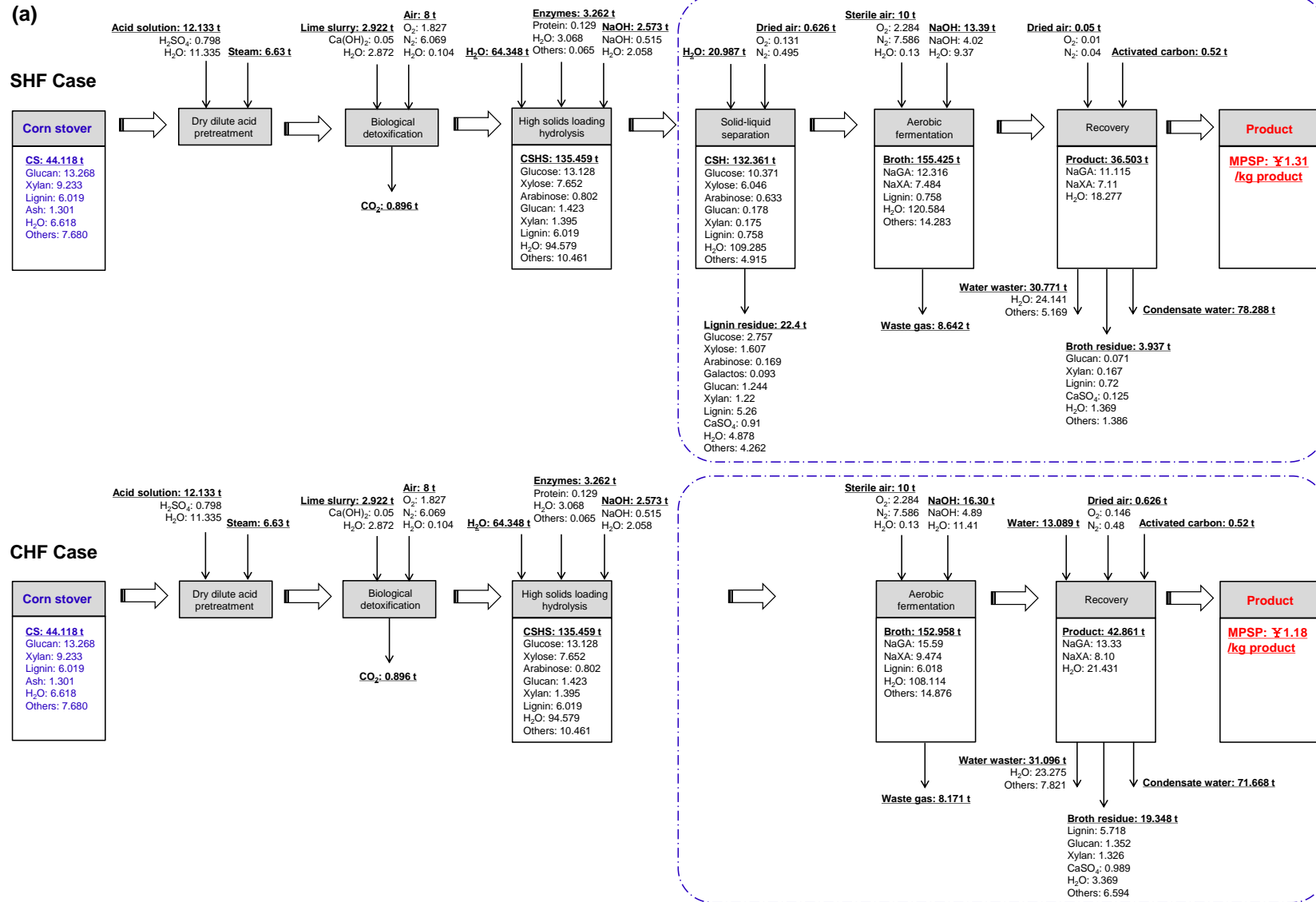


图 3.3 CHF 工艺规模放大生产糖酸

Fig. 3.3 Scale up of CHF for gluconic and xylic acids fermentation to 50 L

(a) 葡萄糖酸; (b) 木糖酸。酶水解条件: 30% 固体含量, 4 mg 纤维素酶蛋白/g 干固, 50 °C, pH 4.8, 48 h 酶解。3 L 罐发酵条件: 5% 接种量, 35 °C, 500 rpm, pH 4.8, 1 vvm, 72 h 发酵。50 L 罐发酵条件: 2% 接种量, 35 °C, 300 rpm, pH 4.8, 1 vvm, 72 h 发酵。

物料平衡表明 SHF 过程中固液分离造成了 21% 的总糖损失, 因而其糖酸产量相对较低 (图 3.4a)。低糖酸产量意味着生产每吨产品需要更多的水耗和能耗, 因此相比于 CHF 过程, SHF 过程的新鲜水用量高了 1.7 倍而电耗量高了 1.2 倍 (图 3.4b)。相应地, SHF 过程中生产的糖酸最低售价为 1.31 ¥/kg 产品, 而 CHF 过程售价仅为 1.18 ¥/kg 产品。因此 CHF 工艺生产纤维素糖酸更具经济可行性。



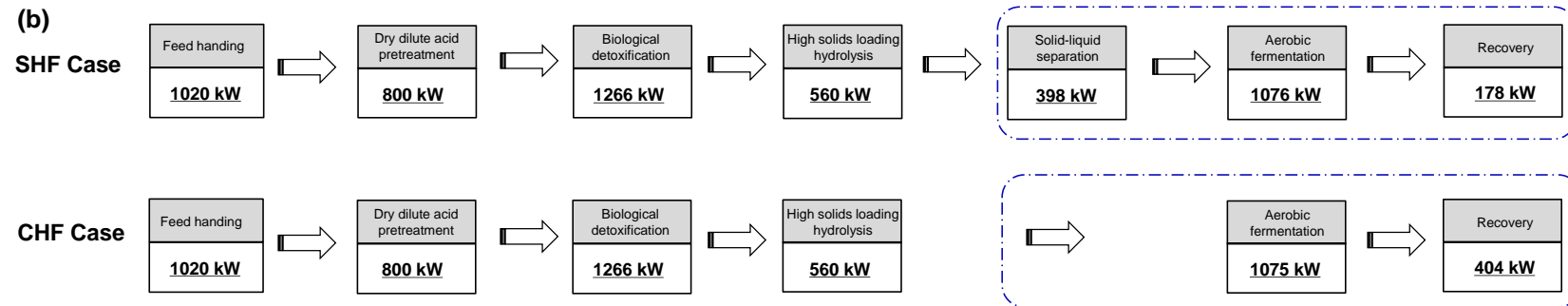


图 3.4 SHF 和 CHF 两种工艺生产纤维素糖酸在物流、能耗和成本上的差异性

Fig. 3.4 The comparison of materials, energy and cost balance of cellulosic sodium gluconate and xylonate production between SHF case and CHF case

(a) 物流和成本衡算；(b) 能量衡算。缩写：CS，玉米秸秆；CSH，玉米秸秆水解液；CSHS，玉米秸秆水解清液；NAGA，葡萄糖酸钠；NAXA，木糖酸钠；MPSP，最低产品售价

3.3.2 木质纤维素来源糖类到相应糖酸的完全转化

为了评估 *G. oxydans* 对木质纤维素来源所有可发酵糖类的利用情况, 研究考察了 *G. oxydans* 在添加不同碳源合成培养基中的菌体生长情况 (图 3.5)。相比于空白培养基, 在添加碳源培养基中菌体的生长状况更好, 同时糖浓度变化可以看出 *G. oxydans* 对所有木质纤维素来源碳源都具有很好的利用效果。液相结果表明添加单一碳源的培养基中均可检测出相应的糖酸, 此结果证实 *G. oxydans* 可以单一地转化木质纤维素来源所有糖类到相应糖酸。

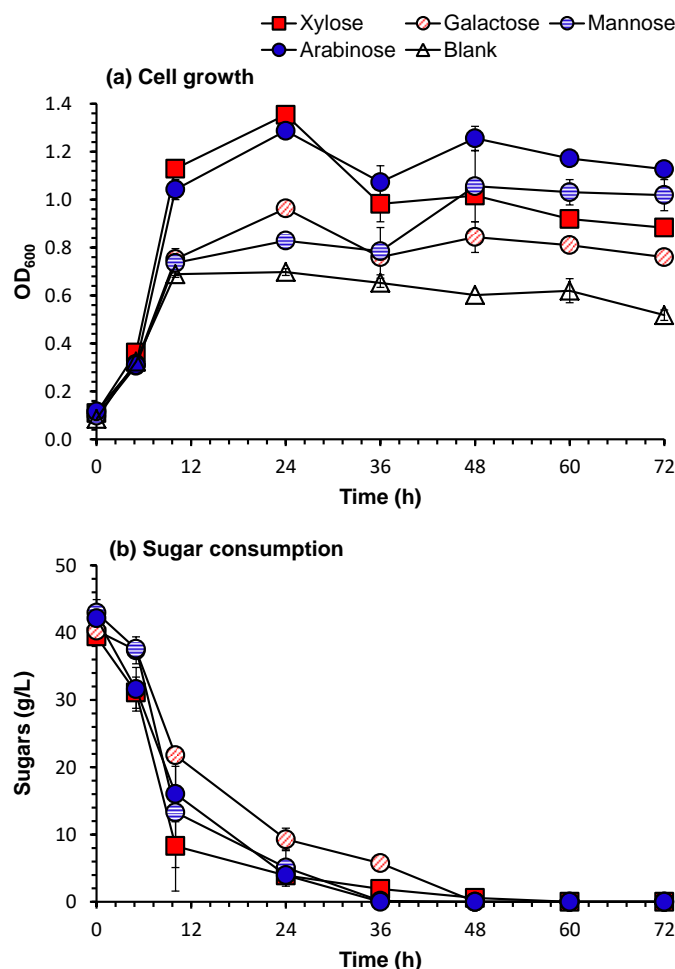


图 3.5 *G. oxydans* DSM 2003 细胞生长和对非葡萄糖碳源利用效率评价

Fig. 3.5 Cell growth and utilization of non-glucose sugars by *G. oxydans* DSM 2003

(a) 细胞生长; (b) 糖耗。摇瓶发酵条件: 合成培养基, 10%接种量, 30 °C, 220 rpm。空白意味着合成培养基中无任何糖类的添加。pH 维持在 5-6, 并使用 NaOH 每隔 6 h 调节一次。

研究进一步验证 *G. oxydans* 在真实水解液中对混合糖类的利用效率 (图 3.6)。结果表明 *G. oxydans* 可以在 72 h 内完全发酵转化葡萄糖、木糖、阿拉伯糖和甘露糖到相应的糖酸, 但几乎不能转化半乳糖 (图 3.6a)。在全细胞催化中, *G. oxydans* 对所有糖类的利用速率均显著增加, 并在 48 h 内完全转化了包括半乳糖在内的所有糖类到相应糖酸 (图 3.6b)。但全细胞催化需要非常高的细胞量, 因此工业规模的应用需要很高的细胞培养成本和细胞回收成本。

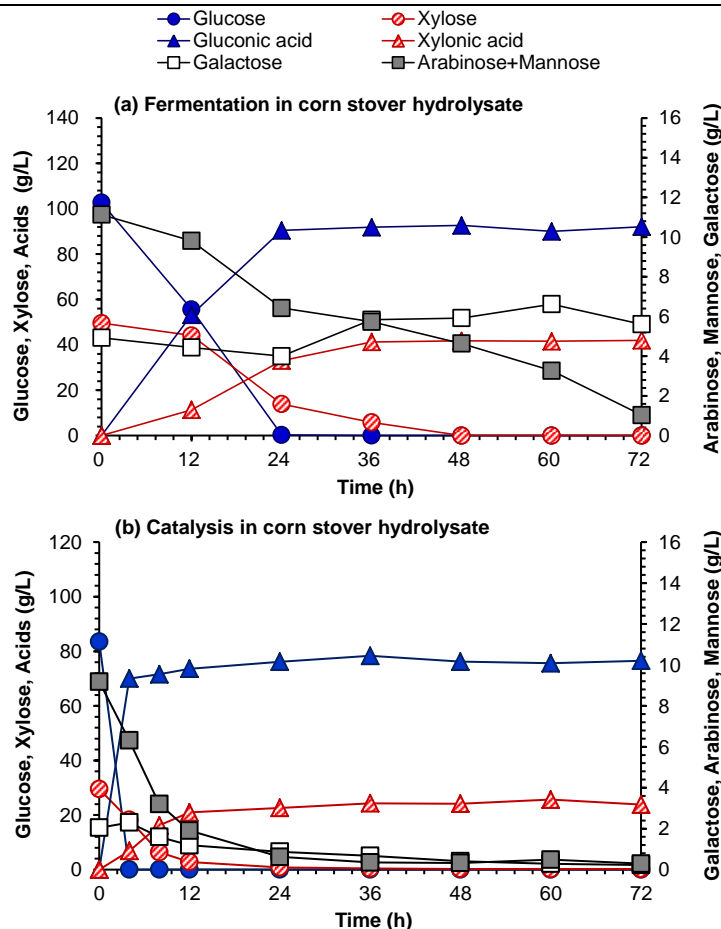


图 3.6 *G. oxydans* DSM 2003 对玉米秸秆水解液中非葡萄糖碳源的转化性能

Fig 3.6 Non-glucose sugar conversion by *G. oxydans* DSM 2003 in corn stover hydrolysate

(a) 发酵转化。发酵条件：3 L 罐发酵，10%接种量，pH 4.8，35 °C，700 rpm，2.5 vvm。(b) 全细胞催化。催化条件：初始细胞量为 1.8 g/L，3 L 罐发酵，pH 4.8，35 °C，700 rpm，2.5 vvm。

为了实现低成本纤维素糖酸生产，本研究尝试对 *G. oxydans* 菌株进行驯化以提高其对木质纤维素来源非葡萄糖碳源的利用效率。研究通过在抑制物包含水解液和脱毒水解液中交替转接培养 *G. oxydans* 以提高菌株性能（图 3.7）。在初代转接过程中，抑制物包含水解液中 *G. oxydans* 葡萄糖消耗速率和细胞量迅速降低，但随着转接进行菌株活力逐渐增强，且伴随着木糖转化速率的提升。经过 210 代转接后，细胞生长和各种糖酸生产性能达到稳定，获得菌株命名为 *G. oxydans* RM7。

我们对驯化菌株 *G. oxydans* RM7 在高固体量水解液中的发酵性能进行了评估（图 3.8）。相比于 *G. oxydans* DSM 2003，*G. oxydans* RM7 的葡萄糖转化速率轻微提升，而木糖转化速率在 36 h 发酵时间内显著增加了 4.1 倍（图 3.8a）。更重要的是，*G. oxydans* RM7 可以在 72 h 内完全转化阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖，但出发菌株 *G. oxydans* DSM 2003 仍然剩余 36% 的阿拉伯糖和甘露糖未能转化，且仅转化率 24% 的半乳糖（图 3.8b）。*G. oxydans* RM7 更高的活菌数可能有助于非葡萄糖碳源向相应糖酸的转化。这些结果表明这种交替转接驯化方法确实增加了非葡萄糖碳源的利用效率，并且驯化后的菌株可以采用常规发酵的方式实现所有木质纤维素来源糖类的完全转化。

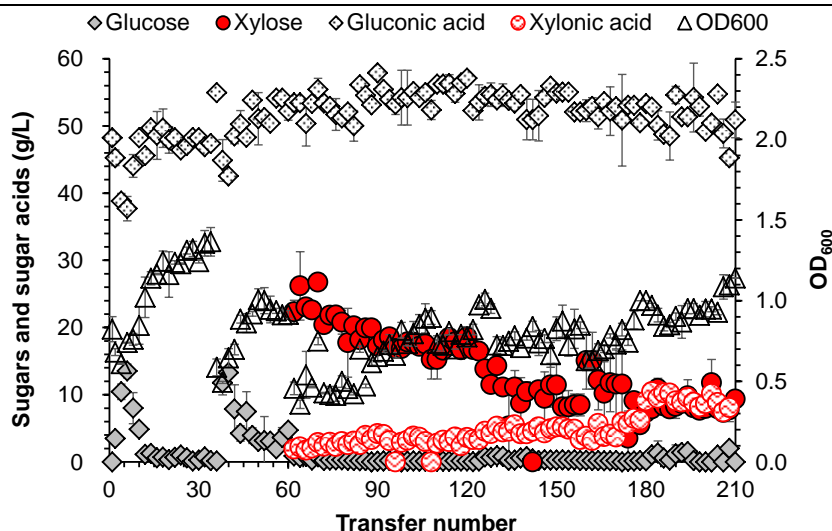


图 3.7 脱毒水解液和抑制物包含水解液中交替转接驯化 *G. oxydans*

Fig. 3.7 Time course profile of the evolutionary adaptation of *G. oxydans* by alternatively transferring every 24 h between inhibitors containing hydrolysate and inhibitors free hydrolysate
 每次转接培养初始时刻添加 0.16 g CaCO₃ 在 20 mL 水解液体系以维持 pH 值稳定。脱毒水解液包含 67.16 g/L 葡萄糖, 21.81 g/L 木糖和 0.57 g/L 乙酸。前 34 次转接使用抑制物包含水解液含有 54.49 g/L 葡萄糖, 23.53 g/L 木糖, 3.24 g/L 乙酸, 0.31 g/L 糠醛和 0.2 g/L 5-羟甲基糠醛。之后转接所用水解液包含 62.94 g/L 葡萄糖, 29.68 g/L 木糖, 6.07 g/L 乙酸, 0.15 g/L 糠醛和 0.24 g/L 5-羟甲基糠醛。其中还所有水解制备条件为 15% 固体含量, 4 mg 纤维素酶蛋白/g 干固, 50 °C, 48 h 酶解。

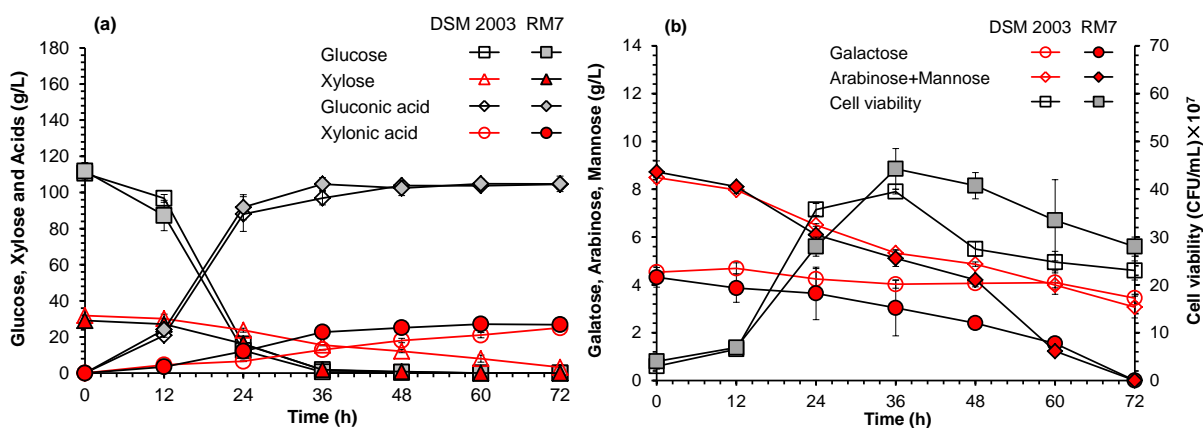


图 3.8 驯化菌株 *G. oxydans* RM7 在水解液中的发酵性能评价

Fig. 3.8 Fermentation performance evaluation of the evolved *G. oxydans* RM7 using corn stover hydrolysate in fermentor

(a) 葡萄糖和木糖转化; (b) 其他糖类转化和细胞生长。水解条件: 30% 固体含量, 4 mg 纤维素酶蛋白/g 干固, pH 4.8, 48 h 酶解。发酵条件: 5% 接种量, pH 4.8, 500 rpm, 35 °C, 1 vvm, 72 h 发酵。

3.3.3 木质纤维素来源糖酸的水泥缓凝效果评价

糖酸的主要用途是作为水泥外加剂使用，市场上生产的糖酸如葡萄糖酸，其产量的 70% 用于建筑行业作为水泥缓凝剂使用。木质纤维素来源的糖酸是多种酸的混合物，不同糖酸对水泥的缓凝效果可能存在差异，因此这种混合糖酸的水泥缓凝效果必须通过实验进行检测。研究分别考察了不同糖酸作为水泥缓凝剂添加时水泥的初凝时间和终凝时间，并发现各种糖酸均具有一定的缓凝效果（图 3.9）。其中葡萄糖酸的效果最为显著，其次是半乳糖酸、甘露糖酸、木糖酸和阿拉伯糖酸，而酮基葡萄糖酸水泥缓凝效果最弱。

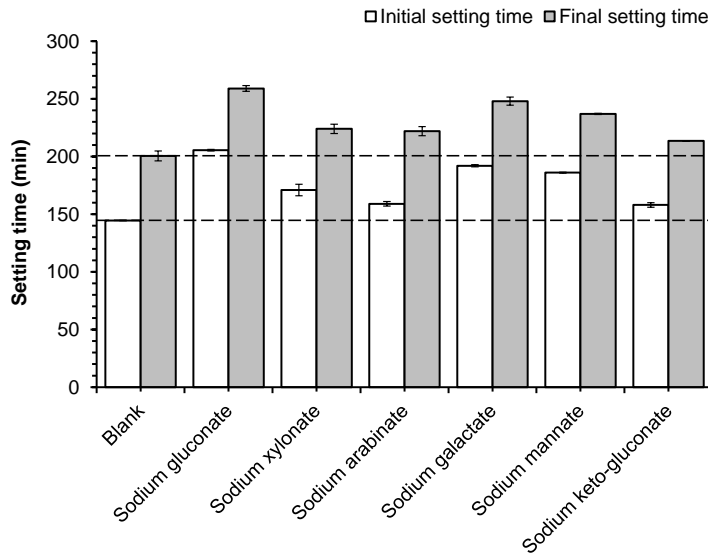


图 3.9 单一糖酸的水泥缓凝效果评价

Fig 3.9 Retard setting assay of individual sugar acid as cement retarding additive

糖酸添加到水泥中的质量比例为 0.03%。空白代表无糖酸外加剂添加水泥的凝固实验。

而后研究考察了真实木质纤维素原料生产糖酸的缓凝效果，并与商业购买葡萄糖酸的效果进行了比较（表 3.2）。添加纤维素糖酸的水泥缓凝时间随着添加剂量的增加而延长，其在 0.03% 添加剂量下相比于空白水泥在初凝时间和终凝时间上分别延长了 46% 和 29%，并达到了与商业购买糖酸相似的结果。添加纤维素糖酸的水泥流动性稍微高于商业对照，尤其是在 0.03% 添加剂量下，其流动性更是高出了对照 11%。因此纤维素糖酸具有良好的水泥缓凝效果。

更重要的是，水泥的抗压强度和抗折强度并未因纤维素糖酸的添加而削弱，这意味着纤维素糖酸并未影响水泥的坚固性和耐久性。安定性代表水泥抵御体积膨胀的能力。添加纤维素糖酸提高了水泥的安定性且展现了比商业对照更好的效果。水泥块体积膨胀主要来自于 CaO 的水化反应。随着糖酸添加剂量的增加而降低的膨胀性可能由于糖酸延缓了 CaO 的水化过程。另外，添加纤维素糖酸水泥块的膨胀性远低于国标 GB/T1346-2011 要求的 5 mm。因此纤维素糖酸添加也并未影响水泥的可靠性和稳定性。综上所述，木质纤维素来源糖酸具有良好的水泥缓凝效果，且它的添加并未影响到水泥的坚固性和稳定性等其他优良性能，这证实了其可用于建筑行业替代淀粉生产的糖酸。

表 3.2 评估木质纤维素来源混合糖酸作为水泥缓凝剂的效果

Table 3.2 Assay of lignocellulose-derived mixed sugar acids as cement retarder additives

Properties		Addition (%)	Cellulosic product	Commercial control	
Setting time (min)	Initial	0	161.5±4.5	161.5±4.5	
		0.01	184.5±2.5	178.5±0.5	
		0.02	207.1±2.0	206.5±1.5	
		0.03	236.2±6.1	228.5±3.5	
	Final	0.00	214.5±2.5	214.5±2.5	
		0.01	231.2±1.1	226.0±3.0	
		0.02	253.3±1.3	260.0±3.0	
		0.03	277.3±2.0	278.0±0.0	
		Fluidity (mm)		227.5±1.5	227.5±1.5
			0.01	225.5±1.5	231.5±2.5
0.02	238.0±4.0		219.5±0.5		
0.03	274.0±1.2		247.0±2.0		
Soundness (mm)		0.00	1.7±0.8	1.7±0.8	
	0.01	0.9±0.5	1.9±0.2		
	0.02	0.8±0.3	1.5±0.7		
	0.03	0.5±0.1	0.7±0.2		
Compressive strength (MPa)	3 days	0.00	25.6	25.6	
		0.01	25.8	22.2	
		0.02	24.8	23.0	
		0.03	24.8	24.7	
	7 days	0.00	33.9	33.9	
		0.01	33.3	32.2	
		0.02	33.0	31.9	
		0.03	32.2	30.3	
	28 days	0.00	44.8	44.8	
		0.01	45.9	44.4	
		0.02	46.6	44.2	
		0.03	44.4	44.8	
Flexural strength (MPa)	3 days	0.00	5.0	5.0	
		0.01	5.4	5.2	
		0.02	5.0	4.7	
		0.03	5.0	4.9	
	7 days	0.00	6.5	6.5	
		0.01	6.0	5.9	
		0.02	6.0	7.0	
		0.03	5.5	6.5	
	28 days	0.00	8.1	8.1	
		0.01	7.8	8.0	
		0.02	7.8	7.5	
		0.03	7.4	9.1	

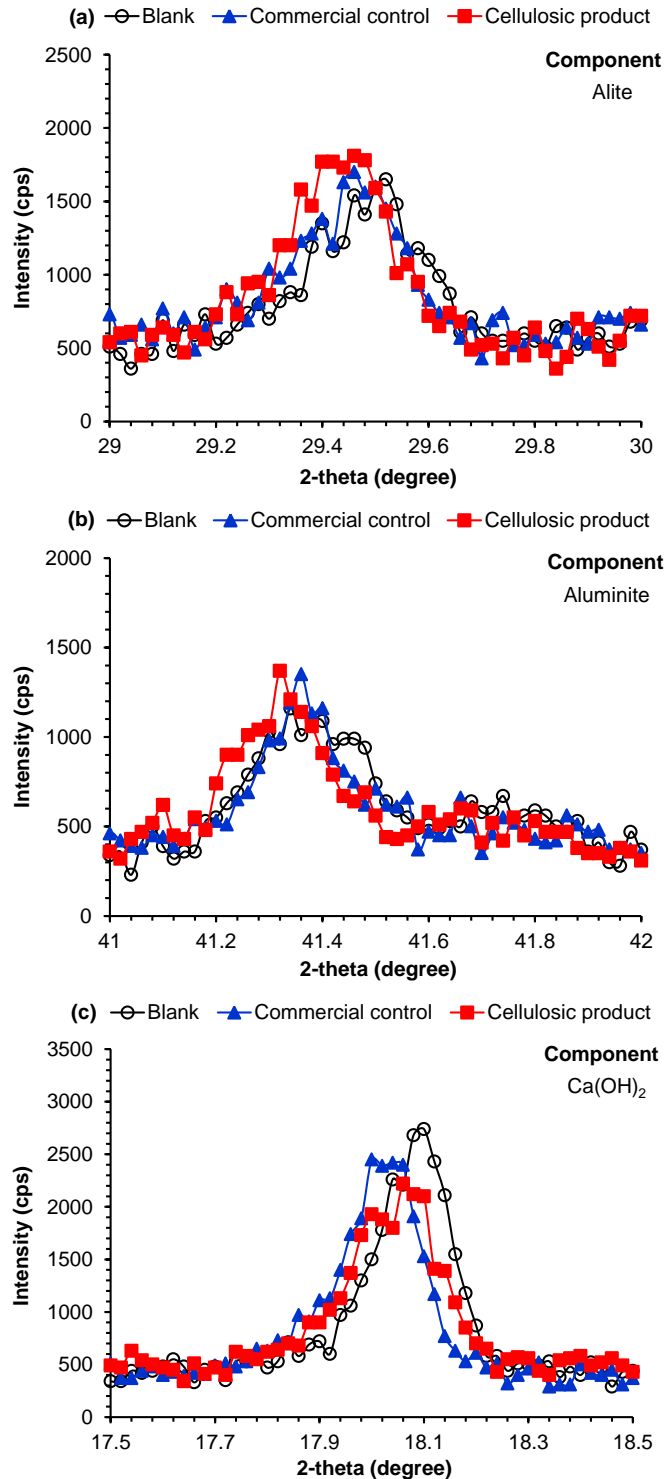


图 3.10 添加纤维素糖酸缓凝剂水泥的 X 射线衍射分析

Fig. 3.10 X-ray diffractograms of cement paste with cellulosic product as cement retarder additive (a) 硅酸三钙; (b) 铝酸三钙; (c) 氢氧化钙。糖酸剂量为 0.03% (w/w), 水化时间为 24 h。

研究也从理化性质方面解析了纤维素糖酸优良水泥缓凝性能的作用机理。水泥的凝结主要来自于硅酸三钙 (C_3S) 和硅酸二钙 (C_2S) 水化形成 $Ca(OH)_2$ 及铝酸三钙 (C_3A) 水化作用^[107, 217]。水泥缓凝剂的主要作用是延缓水泥的水化反应。水泥的水化反应采用 X-射线衍射和热重仪分析。X-射线衍射用于表征水泥的组分构成。纤维素糖酸的添加轻微延迟了 C_3S 水化, 但显著延缓了 C_3A 水化和 $Ca(OH)_2$ 的形成 (图 3.10)。

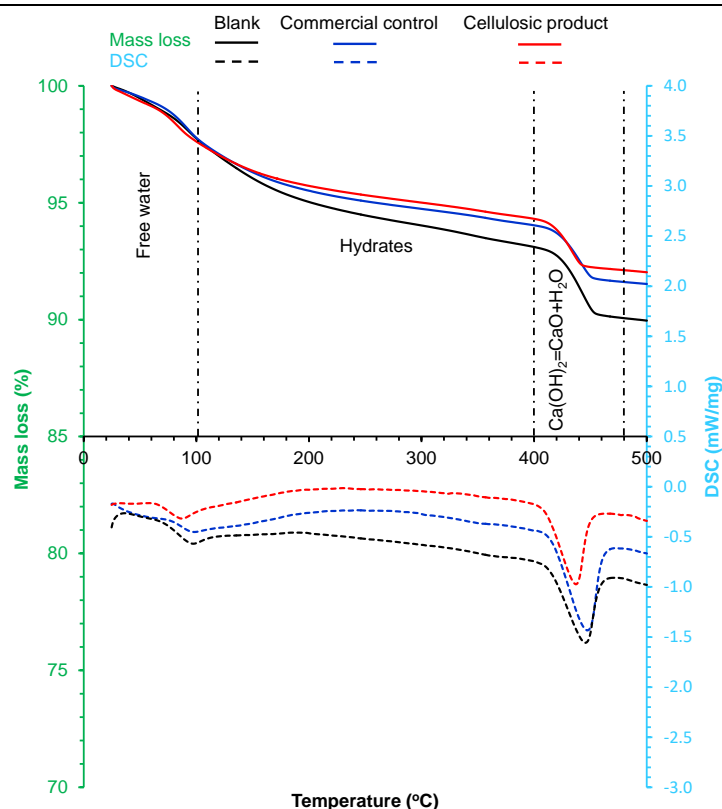


图 3.11 添加纤维素糖酸缓凝剂水泥的热重分析

Fig. 3.11 Thermogravimetric analysis (TG) and Differential Scanning Calorimetry (DSC) analysis of cement paste with cellulose product as cement retarder additive

糖酸添加剂量为 0.03% (w/w)，水泥水化时间为 24 h。

热重分析通过测定水化产物结合的自由水量进而间接测定水化的程度，主要原理是根据水化产物在裂解温度下的质量损失评价其化学结合的水量^[218-220]。水化产物 Ca(OH)_2 脱羟基化的质量损失发生在 400-500 °C 之间，而其他化学结合产物脱水的质量损失及非结合自由水蒸发的质量损失都发生在室温到 400 °C 之间（图 3.11）。实验结果表明添加纤维素糖酸水泥块中 Ca(OH)_2 脱羟基化的质量损失较空白对照和商业对照分别低了 25.8%和 9.1%，说明纤维素糖酸中含有更少的 Ca(OH)_2 。因而证实了纤维素糖酸很好地延缓了水化产物 Ca(OH)_2 的形成。质量损失总是伴随着热流量的变化，热流分析表明 Ca(OH)_2 脱羟基所导致的热流峰值在添加纤维素糖酸时相较于空白对照和商业对照分别减少了 19.8%和 2.1%。此结果印证了热重分析的结论。

铝酸三钙 (C_3A) 作为水泥重要的成分，在早期水化过程 (24 h) 中可形成钙矾石晶体^[221]，且可通过扫描电镜直接观察。在空白水泥中， C_3A 在 8 h 内快速水化为钙矾石并伴随大量细小针状晶体生成（图 3.12）。随着晶体进一步固化生长 (24 h 内)，水泥中形成更加致密堆积结构，此时仅可观察到少量晶体结构。当纤维素糖酸添加到水泥中，24 h 水化后仍可观察到大量针状晶体存在，且多于商业对照添加。此结果证实纤维素糖酸不仅可以抑制水泥中反应物的水化也可延缓水化中间产物的进一步水化。尽管单一糖酸相对于葡萄糖酸的缓凝效果较弱，但是木质纤维素来源混合糖酸达到了与商业葡萄糖酸相一致甚至更佳的缓凝性能，可能是不同糖酸间的协同作用所致。

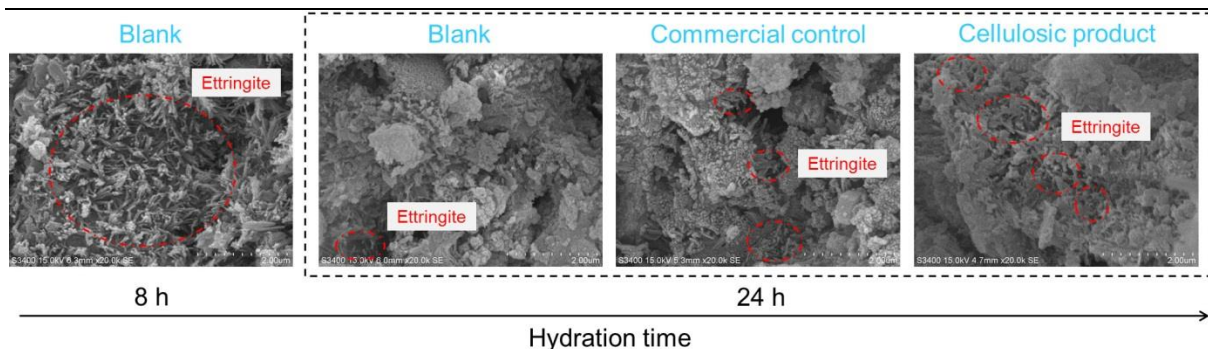


图 3.12 添加纤维素糖酸缓凝剂水泥的扫描电镜观察

Fig. 3.12 Scanning electron microscope micrographs (SEM) of cement paste with cellulosic product as cement retarder additive

糖酸添加剂量为 0.03% (w/w)。空白水泥块水化时间为 8 或者 24 h。木质纤维素来源糖酸和商业购买糖酸水化时间为 24 h。

3.4 本章小结

本章节考察了 *G. oxydans* 好氧发酵利用木质纤维素原料生产糖酸的潜力，并评价了纤维素糖酸生产的技术经济性和工艺可行性及糖酸的水泥缓凝性能。得出如下结论：

- (1) 提出了一种串联糖化与发酵工艺用于纤维素糖酸的生产，并证实其在糖产率、产品得率、固液分离收率、能耗、水耗和技术经济性等方面均比分步糖化与发酵工艺具有更大的技术优势。
- (2) 优化了串联糖化与发酵工艺，利用玉米秸秆实现了与淀粉原料生产水平相近的纤维素糖酸生产。
- (3) 基于 *G. oxydans* 对木质纤维素来源多种糖类协同利用性较弱的问题，提出了一种长期适应性驯化方法筛选优良菌株，进而显著提升了非葡萄糖碳源的利用效率，实现了所有木质纤维素来源糖类到相应糖酸的完全发酵转化。
- (4) 发现任一种木质纤维素来源的糖酸均具有一定的水泥缓凝效果。多角度全方位的实验解析表明木质纤维素来源糖酸具有和商业购买糖酸相当的水泥缓凝效果，且纤维素糖酸的添加并未影响水泥的安定性，耐用性和强度等性能，因此可用于建筑行业替代淀粉来源的糖酸。
- (5) 利用 Aspen Plus 技术平台分析了纤维素糖酸生产的经济可行性，表明纤维素糖酸的最低产品售价与市场售卖价格相比具有一定竞争力，证实纤维素糖酸具有良好应用前景。

第 4 章 柠檬酸的同步糖化与好氧发酵

4.1 引言

同步糖化与发酵 (SSF) 是木质纤维素生物炼制中实现高效纤维素酶利用的最有效操作方式^[222]。当 SSF 工艺应用于好氧发酵过程, 气相到高粘稠水解液间的氧气传递速率成为主要的限速步骤^[51, 52]。本文第二章已证实高固高粘水解液的氧气传递速率随着固体含量的增加而显著地降低, 但仍能够满足氧化葡糖杆菌 *G. oxydans* 生产葡萄糖酸的供氧需求^[223]。对于供氧需求更高的丝状真菌黑曲霉 *Aspergillus niger* 而言, 高粘稠物料中限制性的氧气供给可能会导致产物得率的降低甚至发酵转化的失败^[224]。

柠檬酸是一种重要的有机酸, 其全球年产量高达百万吨^[129]。木质纤维素原料来源广泛且价格低廉, 故可作为生产柠檬酸的重要原料来源。目前已有两种发酵方式用于转化木质纤维素原料生产柠檬酸: 固态发酵和分步糖化与发酵 (SHF)^[225-228]。固态发酵利用木质纤维素原料中自有的或者预处理后的可发酵糖类作为原料, 但其柠檬酸产率相对较低。采用预处理后的甘蔗渣原料进行固态发酵仅获得了 34 g/L 柠檬酸^[229]。而 SHF 工艺则可利用玉米秸秆水解液生产 100 g/L 柠檬酸^[214]。但 SHF 工艺的主要缺点在于低酶解效率、固液分离过程大量的可发酵糖类损失和高能耗^[230]。SSF 工艺最大的优势在于释放纤维素酶的底物抑制作用且无需固液分离操作, 这为高指标柠檬酸发酵奠定了重要的底物基础^[231-233]。在纤维素乙醇生产中, SSF 工艺使用干酸预处理和生物脱毒的小麦秸秆在低酶用量下实现了创记录高的乙醇产量 (101.4 g/L, 相当于 12.8% v/v)^[26]。

前两章证实串联糖化与好氧发酵模式在高固高粘木质纤维素体系的可实施性。本章节将以柠檬酸发酵为例评估好氧 SSF 工艺在高固体含量木质纤维素体系的可行性。研究分析了多种发酵参数如预糖化时间、固体含量和酶用量等对柠檬酸生产的影响, 并探究了霉菌菌丝与高固高粘发酵液的相互作用及其影响。最终, 本研究通过 SSF 工艺实现了高指标的纤维素糖酸生产并利用技术经济性分析证实了木质纤维素原料与淀粉原料在柠檬酸生产上具有一定的可比性。

4.2 材料与方法

4.2.1 原料、纤维素酶和试剂

本章中使用原料见 3.2.1; 本章所用纤维素酶和试剂详见 2.2.2。

4.2.2 菌株和培养基

黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 购买自上海工业微生物研究所 (中国, 上海)。活化菌种的 PDA 培养基包含 200 g/L 土豆, 20 g/L 葡萄糖和 20 g/L 琼脂。种子培养基包括: 70 g/L 葡萄糖, 2.5 g/L 氯化铵, 2.5 g/L 磷酸二氢钾, 0.25 g/L 七水硫酸镁, 0.24 mg/L 五水硫酸铜, 1.1 mg/L 七水硫酸锌, 6.4 mg/L 七水硫酸亚铁和 3.6 mg/L 氯化锰。脱毒菌株和培养基详见 2.2.3。

4.2.3 预处理和生物脱毒操作

具体操作详见 2.2.4。

4.2.4 同步糖化与好氧柠檬酸发酵

A. niger 从冻存管中取出后在 PDA 斜面上于 28 °C 下培养 72 h，而后使用无菌水清洗孢子于种子培养基中 28 °C 培养 36 h。种子培养基中孢子液浓度通过血球计数板计数并保持孢子浓度在 $2\text{-}3 \times 10^5$ 孢子/mL。

预处理和脱毒后玉米秸秆在 20-30% 固体含量、4 或 6 mg 纤维素酶蛋白/g 干物酶载量、50 °C 和 pH 4.8 条件下在糖化罐中预糖化 12-48 h。而后与种子培养基一起转入发酵罐中在 1 vvm 通气量下进行同步糖化与发酵。周期性取样并于 11167×g 离心力下离心 5 分钟获得上清用于分析糖类和柠檬酸。*A. niger* 活菌数通过涂布平板进行菌落计数。

4.2.5 柠檬酸得率计算

纤维素柠檬酸的转化得率定义为柠檬酸产量与纤维素理论可转化柠檬酸的比值：

$$\text{Citric acid yield} = \frac{[CA] \times M \times [Water] - [CA]_0 \times M_0 \times [Water]_0}{M_0 \times (1 - [Water]_0) \times [Cellulose] \times 1.111} \times \frac{M_{Glu}}{M_{CA}} \times 100\% \quad (4-1)$$

其中 [CA] 和 [CA]₀ 是发酵前和后发酵液中的柠檬酸浓度 (g/L), *M* 和 *M*₀ 是发酵前和后发酵液的总质量 (g), [Water] 和 [Water]₀ 是发酵前和后发酵液的含水量 (g/g), [Cellulose] 是干物料中的纤维素含量 (g/g), 1.111 是纤维素到葡萄糖酸的转化系数, *M*_{Glu}/*M*_{CA} (0.9375) 是葡萄糖到柠檬酸的转化系数^[214]。

4.2.6 菌体形态观察

发酵液使用去离子水稀释十倍后直接在 20 倍光学显微镜下观察菌体的形态。由于 *A. niger* 菌体为丝状缠绕菌球而玉米秸秆颗粒为杆状纤维，故 *A. niger* 菌体可以和木质纤维素原料区分开。

4.2.7 颗粒尺寸分布

发酵液的颗粒尺寸分布采用马尔文公司的 Mastersizer 2000 粒度仪（英国，伍斯特郡）测定，检测范围为 0.02-1000 μm。

4.2.8 流变性质测定

流变测定方法详见 2.2.7。

4.2.9 分析糖、柠檬酸和抑制物

测定方法详见 2.2.6。

4.2.10 Aspen Plus 模型和经济性分析方法

Aspen Plus 基础模型来自 NREL 设计报告^[207]，并做如下调整：预处理和脱毒方式改为干式稀酸预处理和生物脱毒；20% 固体含量 SHF 乙醇生产改为 25% 固体含量 SHF 或者 SSF 柠檬酸生产；产品回收方式由三效蒸发改为加热、固液分离、碱中和、酸化、脱色及蒸发结晶。

预处理过程输入参数包括 2%酸用量/干秸秆、固液比 2:1、175 °C 和 5 min。预处理中葡聚糖到葡萄糖得率为 4%，木聚糖到木糖得率为 40%，木聚糖到糠醛得率为 3.3%，乙酸得率为 60%。脱毒过程输入参数为温度 28 °C, 48 h。脱除得率为糠醛 100%、乙酸 70%、葡萄糖 5%。糖化、发酵及产品回收工段参数基于如下假设：(1) SHF 过程葡萄糖得率基于我们过去研究^[214]，而 SSF 过程得率基于与 SHF 过程葡萄糖到柠檬酸相同得率换算得到；(2) SHF 过程葡萄糖到柠檬酸得率引自我们过去文献且 SSF 过程得率与其相同^[214]；(3) 水解液和发酵液的固液分离得率、碱中和及酸化得率基于实验测定数值。

4.3 结果与讨论

4.3.1 同步糖化与好氧发酵生产柠檬酸的可行性分析

本章考察了 *A. niger* SIIM M288 利用木质纤维素原料在高固体含量下进行同步糖化与好氧发酵 (SSF) 生产纤维素柠檬酸的可行性。研究首先尝试了 25%固体含量的 SSF 情况，结果表明同步糖化可以快速生成葡萄糖并逐渐被菌株消耗到非常低的水平，同时柠檬酸逐渐积累并最终达到了较高的柠檬酸产量 (105.9 g/L) (图 4.1)。此结果证实了好氧 SSF 工艺可以用于柠檬酸的生产。发酵过程中溶氧迅速降低到大约 10%饱和溶氧而后逐渐增加，表明在此高固高粘发酵液中的氧气传递速率可以满足高好氧需求丝状真菌的菌体生长和代谢活动。高活菌数预示着固体颗粒的剪切作用并未负面影响菌株的生长。

我们也注意到黑曲霉好氧 SSF 过程与典型的厌氧 SSF 过程如乙醇^[26]或者乳酸^[27, 28]发酵稍有不同。在厌氧 SSF 中，主要限速步骤是酶水解速率。由于更快的乙醇或者乳酸形成速率，葡萄糖通常在 SSF 中快速消耗到接近零水平直到发酵结束。然而，在好氧 SSF 中，葡萄糖生成速率快于菌株代谢速率，故在 SSF 前期出现了葡萄糖累积的峰值 (图 4.1)。另外，黑曲霉菌株本身可以生产少量的纤维素水解酶可能也在一定程度促进了糖化的快速进行^[93]。

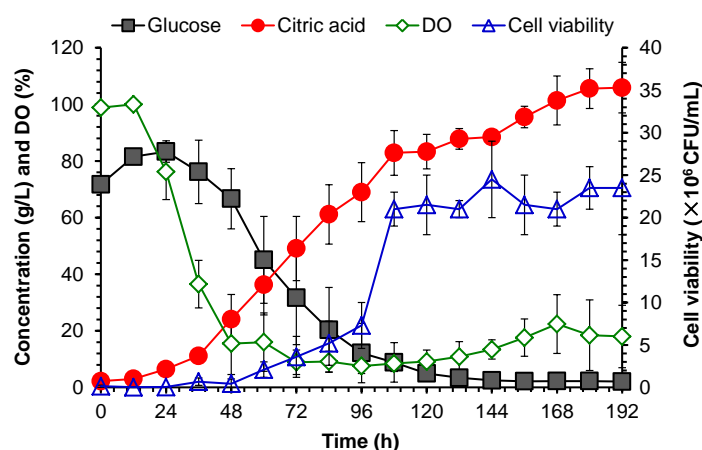


图 4.1 利用玉米秸秆原料同步糖化与好氧发酵生产纤维素柠檬酸

Fig. 4.1 SSF for cellulosic citric acid fermentation from corn stover feedstock

预糖化条件：25%固体含量，6 mg 纤维素酶蛋白/g 干固，50 °C，pH 4.8，12 h 预糖化时间。同步糖化与发酵条件：10% 接种量，1 vvm 通气量，33 °C，192 h 发酵时间。

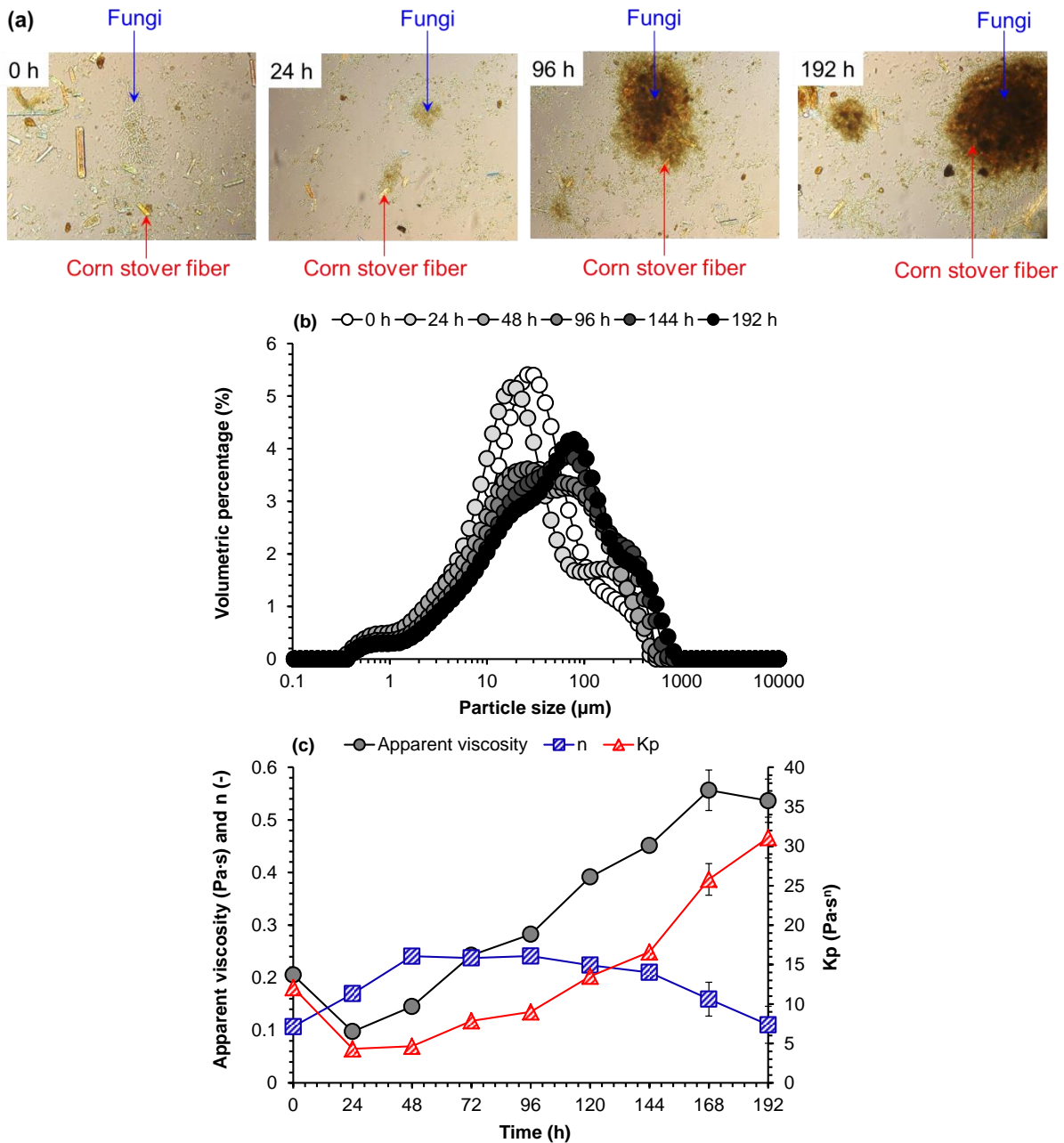


图 4.2 评估 SSF 过程中黑曲霉的菌体形态及发酵液的颗粒尺寸分布和流变学

Fig. 4.2 Evolution of strain morphology (a), particle size distribution (b) and rheology (c) in the SSF of corn stover by *A. niger*

预糖化条件: 25% 固体含量, 6 mg 纤维素酶蛋白/g 干固, 50 °C, pH 4.8, 12 h 预糖化时间。同步糖化与发酵条件: 10% 接种量, 1 vvm 通气量, 33 °C, 192 h 发酵时间。

在好氧 SSF 过程中, 我们也发现 *A. niger* 的菌丝和杆状玉米秸秆纤维强烈地纠缠在一起 (图 4.2a)。这种交联的菌丝-纤维球体的平均颗粒尺寸在 SSF 中首先从 59.2 μm 降低到 53.7 μm 而后迅速增加到 104.5 μm (图 4-2b), 同时也伴随着发酵液粘度从 0.2 Pa·s 降低到 0.1 Pa·s 而后增加到 0.5 Pa·s (图 4-2c)。SSF 前期降低的颗粒尺寸和发酵液粘度主要来自于纤维素酶的糖化作用, 而后随着菌体的生长, 菌量显著增加, 菌丝球逐渐变大及菌丝与秸秆纤维间交联的增强导致了发酵液颗粒尺寸的增加并最终增加了发酵液的粘稠性。发酵液的高粘度一定程度上减弱了氧气的传递速率, 这可能部分解

释了高固高粘体系中的柠檬酸生产相对于其他产物生产速率较低的原因。尽管如此, 菌丝-纤维球体的平均尺寸仍然小于 0.5 mm, 这是实现高效柠檬酸生产的必要条件 [234]。

我们也注意到霉菌 SSF 过程与酵母或者细菌 SSF 过程在流变学方面存在显著的不同。一般 SSF 过程中, 同步糖化过程会导致纤维颗粒尺寸的降低, 进而降低发酵液的粘度 [43, 235]。然而, 在本研究的 SSF 过程中, 由于发酵液中菌丝和秸秆纤维交缠为尺寸更大的颗粒, 因而导致了发酵液粘度的显著增加。这种高粘稠性会降低传质传热速率, 因此对规模化发酵罐的设计提出了更大的挑战。

4.3.2 高指标纤维素柠檬酸生产

为了实现高指标纤维素柠檬酸生产, 本研究考察了各种发酵参数对好氧 SSF 的影响 (图 4.3)。研究发现延长预糖化时间增加了初始葡萄糖浓度但同时也降低了糖耗速率, 不过最终柠檬酸的产率却大致相同 (图 4.3a)。酶水解最适温度为 50 °C, 但 *A. niger* 发酵最适温度范围为 25-30 °C [108]。为了实现更好的同步糖化效率, 我们尝试了更高温度下的 SSF (图 4.3b)。结果表明在 35 °C 条件下柠檬酸的产量达到了最大值为 122.7 g/L。纤维素酶载量是影响生物转化成本的关键因素, 研究尝试了更低纤维素酶载量的 SSF 过程生产柠檬酸 (图 4.3c)。但柠檬酸生产随着酶载量的降低而减弱, 且再次补加纤维素酶也并未提高柠檬酸的产量。因此低酶载量不适合 SSF 过程柠檬酸的生产, 可能原因在于酶解的不充分会导致高粘度进而减弱了氧供给速率而降低了柠檬酸得率。进一步研究表明增加固载量可以显著增加初始糖浓度及最终柠檬酸的产量 (图 4.3d), 但当固载量从 25% 增加到 30% 时, 柠檬酸产量增加并不显著, 纤维素到柠檬酸的转化得率也从 86.8% 降低到了 74.9%。通过工艺参数调整, 最终本研究在 30% 固载量、6 mg 纤维素酶蛋白/g 干固和 35 °C 条件下获得了最高的纤维素柠檬酸产量 (136.3 g/L)。但由于 25% 固体含量下柠檬酸产率最高, 故采用此固体含量进行 SSF 生产纤维素柠檬酸更为高效。

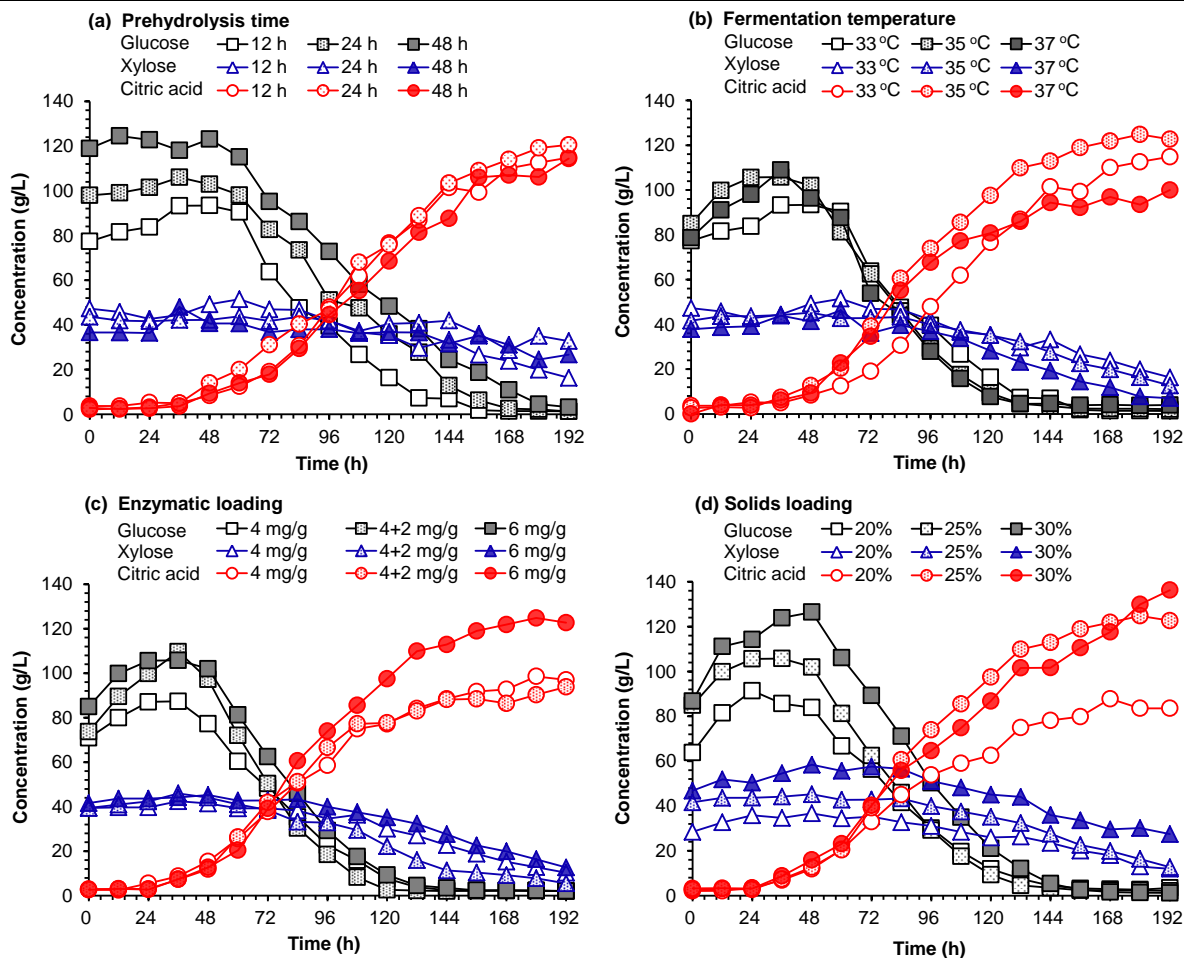


图 4.3 SSF 工艺生产纤维素柠檬酸的过程优化

Fig. 4.3 Process optimization of SSF by *A. niger* on cellulosic citric acid production

预糖化条件：50 °C 和 pH 4.8。同步糖化与发酵条件：10% 接种量，1 vvm 通气量和 192 h 发酵时间。(a) 预糖化时间。25% 固体含量，6 mg 纤维素酶蛋白/g 干固，35 °C 发酵温度。(b) 同步糖化与发酵温度。25% 固体含量，6 mg 纤维素蛋白/g 干固，12 h 预糖化时间。(c) 酶载量。4+2 mg/g 表明 4 mg 纤维素酶蛋白/g 干固在预糖化阶段添加另外 2 mg 纤维素酶蛋白/g 干固在发酵阶段添加，25% 固体含量，12 h 预糖化时间，35 °C 发酵温度。(d) 固载量。6 mg 纤维素蛋白/g 干固，12 h 预糖化时间，35 °C 发酵温度。搅拌转速在 20%，25%和 30%固体含量下分别为 400，500 和 600 rpm。

4.3.3 纤维素柠檬酸生产的技术经济性分析

本研究建立了每小时处理 37.5 吨秸秆的纤维素柠檬酸生产的 Aspen Plus 模型，并评估了两个案例分步糖化与发酵 (SHF) 和同步糖化与发酵 (SSF) 生产柠檬酸的差异性。SHF 案例引自我们过去的文献^[214]，具体操作为干酸预处理和生物脱毒玉米秸秆在 25%固体含量糖化 48 h，而后水解液进行固液分离并取水解清液用于柠檬酸发酵(表 4.1)。SSF 案例引自图 4.3b，具体操作为处理后秸秆经过短暂预糖化后不进行固液分离直接用于同步糖化与柠檬酸发酵。SSF 案例可以在 168 h 发酵时间内获得 120 g/L 的柠檬酸和 84.8%的得率，而 SHF 案例则需要更长的发酵时间 (240 h) 且柠檬酸产量 (100 g/L) 和转化得率 (62.3%) 均较低。

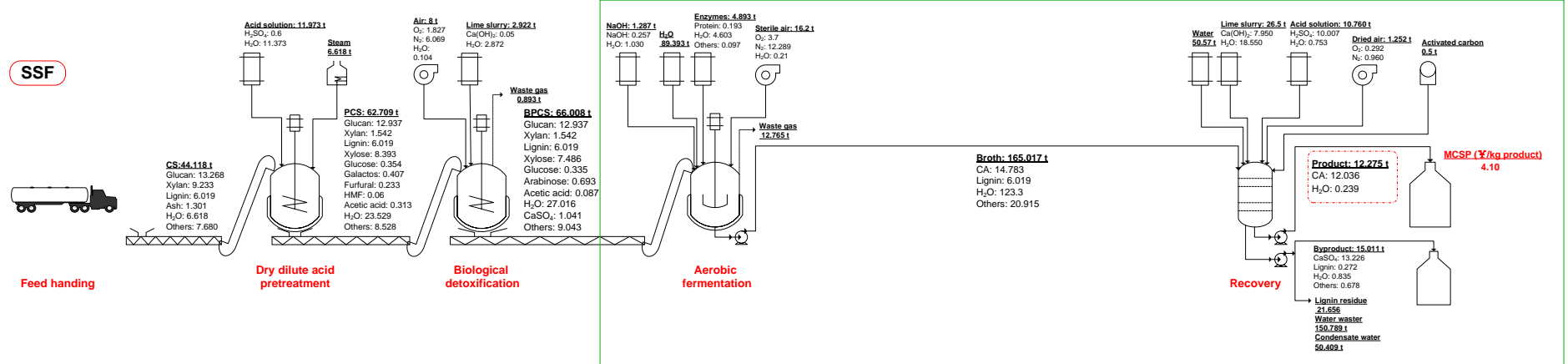
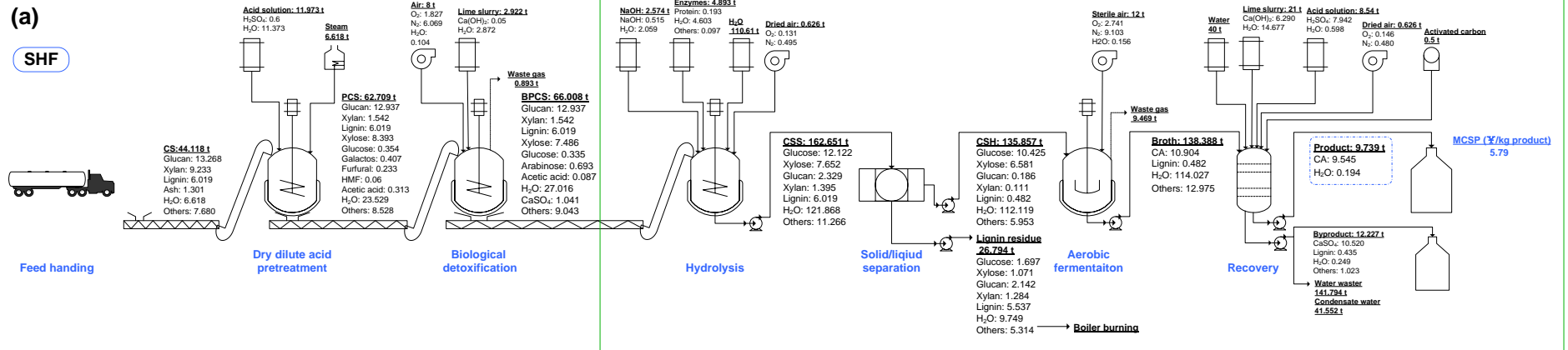
表 4.1 建立 Aspen plus 模型和成本计算的主要过程参数

Table 4.1 Main process input data for establishing the Aspen plus model and conversion costs

Parameters	SHF	SSF
Solids loading (%)	25	25
Cellulase dosage (mg protein/g dry feedstock)	6	6
Temperature for hydrolysis (°C)	50	50
Residence time for hydrolysis (h)	48	12
Temperature for fermentation (°C)	33	35
Residence time for fermentation (h)	192	156
Citric acid concentration (g/L)	100	120
MCSP (¥/kg citric acid product)	5.79	4.10
Feedstock	1.90	1.51
Enzyme	0.67	0.52
Non-enzyme conversion	3.22	2.07

两个案例的流程图见图 4.4。物流平衡表明在 SHF 中水解液的固液分离导致了大量的糖损失包括 1.697 ton/h 葡萄糖、1.071 ton/h 木糖和 3.426 ton/h 葡聚糖和木聚糖，而 SSF 过程中由于消除了固液分离步骤因而糖产量更高（图 4.4a）。SSF 过程每吨干秸秆可以生产 327 kg 柠檬酸（98%，w/w），而 SHF 过程仅能生产 260 kg。另外，SHF 过程生产一吨柠檬酸会产生 14.559 吨的废水，而 SSF 过程仅产生了 12.284 吨的废水。柠檬酸生产过程中废水的产生相比其他过程较多，主要原因在于其分离纯化过程需要碱中和和酸解步骤因而产生了大量的过程废水。SHF 过程多了一个固液分离操作且发酵操作的时间更长，这导致了其过程操作能耗比 SSF 过程高了 18.4%（图 4.4b）。

基于 Aspen Plus 模型建立的技术经济性分析结果表明 SHF 过程生产柠檬酸的最低售价为 5.79 ¥/kg，其中原料成本、酶成本和非酶转化成本分别为 1.90、0.67 和 3.22 ¥/kg（表 4.1）。柠檬酸生产转化中的非酶转化成本相对较高，主要原因在其高能耗、长发酵周期及繁琐的分离纯化操作。在 SSF 过程中，柠檬酸生产的最低售价为 4.10 ¥/kg，基本和柠檬酸市场售价相一致（4.63 ¥/kg，<https://www.1688.com>）。这一结果预示着好氧 SSF 工艺生产纤维素柠檬酸具有巨大的商业化应用潜力。



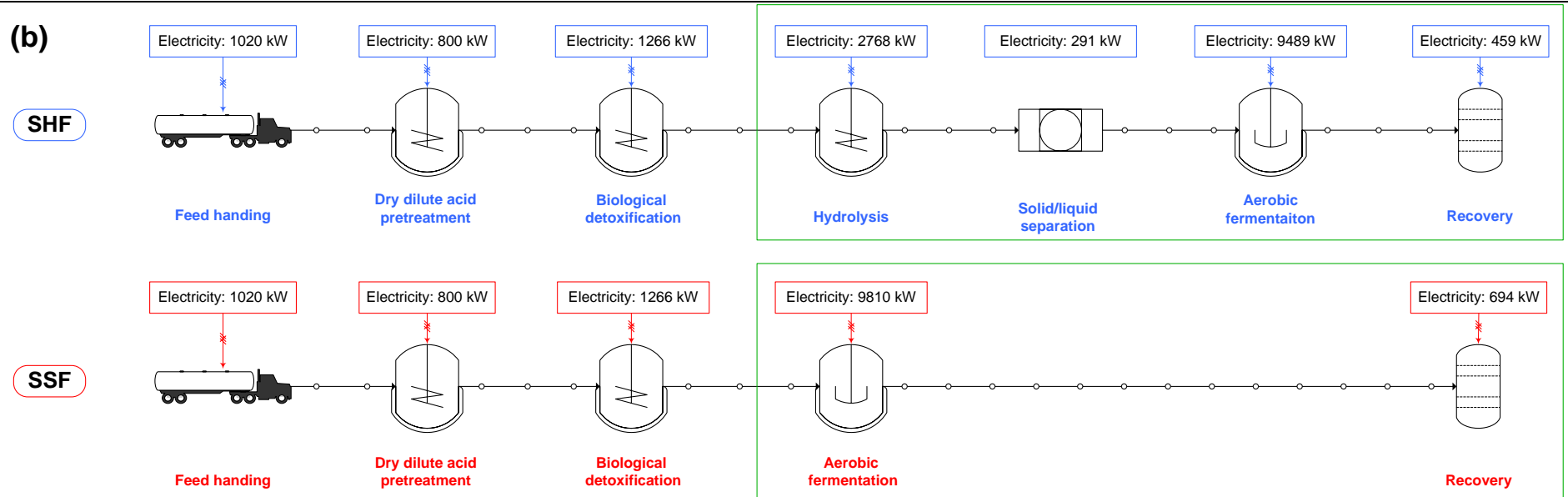


图 4.4 利用玉米秸秆进行纤维素柠檬酸生产的物料和能耗平衡 (ton/h)

Fig. 4.4 Materials and energy balance of cellulosic citric acid production from corn stover on the hour basis (metric tons per hour)

(a) 物料平衡; (b) 能耗平衡。缩写: CS, 玉米秸秆; PCS, 预处理玉米秸秆; BPCS, 生物脱毒预处理玉米秸秆; CSS, 玉米秸秆水解液; CSH, 玉米秸秆水解清液; CA, 柠檬酸; MCSP, 最低柠檬酸售价。

4.4 本章小结

同步糖化与发酵是生物炼制过程最为高效的操作方式，但其在高固体含量好氧发酵转化中的应用鲜有研究。本章节考察了高固体含量的同步糖化与好氧发酵生产纤维素柠檬酸应用潜力，并优化了发酵过程参数，探究了其技术经济性。得出主要结论如下：

- (1) 证实了 *A.niger* 可以在高固体含量下以同步糖化与好氧发酵的方式生产柠檬酸。
- (2) *A.niger* 菌丝与秸秆纤维交联增加了发酵液的颗粒尺寸和粘稠性，并导致了发酵液的粘度随着发酵的进行而增加，这一现象明显不同于一般的发酵过程。这种高粘稠性可能间接地降低了气液间的氧气传递速率，因而导致了较低的柠檬酸生产速率。
- (3) 通过发酵过程调控，本研究在 30% 固体含量、6 mg 纤维素蛋白/g 干固、12 h 预糖化时间及 35 °C 发酵温度条件下实现同步糖化与发酵生产柠檬酸的最大产量（136.3 g/L），这是目前报道的纤维素柠檬酸最高产量。
- (4) Aspen Plus 技术经济性分析表明采用同步糖化与发酵在柠檬酸生产指标、技术指标、过程成本及废水排放等方面均显著优于分步糖化与发酵。此工艺生产的纤维素柠檬酸在生产成本上与淀粉原料生产柠檬酸相比具有一定的竞争力，因此拥有良好的产业化前景。

第 5 章 微生物油脂的同步糖化与好氧共发酵

5.1 引言

油脂是生产高密度燃料生物柴油或者航空煤油的重要前体^[236, 237]。目前美国年产生生物柴油约 1000 万吨，欧盟生物柴油市场占有率达 8-10%。我国生物柴油产能已经达到年产 600 万吨以上，生物柴油产业的相关标准已经出台。当前生产生物柴油的主要底物为来自大豆等的植物油脂。油脂生产需要稳定且供给充分的原料来源。根据美国农业部统计分析，2016 年全球油脂生产量为 1.8 亿吨，其中 40%用于生物柴油生产，然而其产量远不能达到替代石油的规模。生物油脂是微生物利用碳水化合物发酵转化生产的脂质。仅从产量规模而言，利用年产 10 万亿吨的木质纤维素原料生产油脂是生物柴油底物充分供给的仅有途径。

油脂酵母比如 *Trichosporon cutaneum*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodospiridium toruloides*, *Rhodotorula glutinis*, *Trichosporon fermentans*, *Yarrowia lipolytica* 可以富集超过自重 20% 的油脂达到植物油相当的油脂含量^[133, 135, 153]。然而并不是所有菌株能够耐受生物炼制过程的苛刻环境压力。Chen 等^[238]考察了五种油脂酵母并发现皮状丝孢酵母展现了独特的且仅有的对抑制物耐受性。另外，预处理木质纤维素原料中复杂的组分对油脂测定也会产生一定的影响，比色法因此而不精确，故质量测定法常用于木质纤维素体系的油脂测定^[153]。过去研究使用预处理原料生产的油脂产量普遍较低。Wang 等^[137]使用干酸预处理玉米秸秆水解获得了 8.1 g/L 油脂。Chen 等^[150]采用玉米芯水解液生产了 10.4 g/L 油脂。Sitepu 等^[239]利用 AFEX 预处理后玉米秸秆水解液实现了 15.5 g/L 油脂生产。

当采用木质纤维素原料生产油脂时，发酵菌株扮演着重要角色。优良菌株应该具有高油脂富集能力、高抑制物耐受性、多糖转化能力和高效发酵性能。然而，油脂是一种胞内产物，当采用诱变或者代谢手段筛选优良菌株时，追踪或者标记其代谢路径尤为困难。在木质纤维素生物炼制过程中，预处理中产生的抑制物、木质素颗粒和各种非葡萄糖碳源的存在进一步增加了油脂细胞筛选的困难。油脂酵母的筛选方法主要包括：浅蓝菌素染色法^[157]、直接油脂称重法^[155]、微型反应器法^[240]、漂浮细胞法^[158]等。本章节尝试了一种基于不同含油率细胞密度差异原理筛选高含油率细胞方法：超速离心筛选。研究采用此方法数倍提升了细胞的含油率，最终采用同步糖化与发酵方式完全利用了木质纤维素来源的五种糖类在无任何浓缩操作下实现了 46.7 g/L 的油脂生产。

5.2 材料与方法

5.2.1 原料、纤维素酶和试剂

玉米秸秆收获于 2015 年秋，购买自内蒙古通辽市。原料包含 31.2%纤维素和 22.6%半纤维素。本章所用纤维素酶和试剂详见 2.2.2。

5.2.2 菌株和培养基

Trichosporon cutaneum ACCC 20271 储存在中国农业微生物菌种保藏管理中心（中

国,北京)。种子培养基为 YPD (20 g/L 葡萄糖, 20 g/L 蛋白胨和 10 g/L 酵母提取物)。合成培养基为 60 g/L 葡萄糖, 1.0 g/L 磷酸二氢钾, 0.5 g/L 酵母提取物, 0.5 g/L 七水硫酸镁, 0.22 g/L 硫酸铵。脱毒菌株和培养基详见 2.2.3。

5.2.3 预处理、脱毒和水解液制备

预处理和脱毒操作详见 2.2.4。预处理和脱毒玉米秸秆在 15%或者 20%固体含量, 6 mg 蛋白/g 干固, 50 °C 和 pH 4.8 条件下糖化 48 h。而后通过固液分离, 灭菌及过滤获取水解液。15%水解液包含 64.7 g/L 葡萄糖和 19.4 g/L 木糖, 而 20%水解液包含 76.4 g/L 葡萄糖和 30.1 g/L 木糖。两种水解液均需添加营养盐, 包括: 1.0 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L YE, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.22 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

5.2.4 油脂酵母超速离心筛选

超速离心筛选通过离心培养于水解液中油脂细胞获得轻细胞, 并将其作为种子转入下代培养, 通过不断的转接培养最终获得密度最轻的油脂细胞。整个离心筛选分为两个阶段进行。在第一阶段, 出发菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 于 15%固体含量水解液中在 30 °C 和 180 rpm 下培养 72 h, 而后离心 2 min 获得轻细胞, 并通过移液枪以 10%接种量转接轻细胞进入下代培养。超速离心筛选过程中逐渐增加离心力从 1000 × g 到 12,000 × g, 直到油脂细胞密度低于发酵液。

在第二阶段, 通过无菌水稀释的作用降低发酵液密度以继续离心筛选过程。油脂细胞培养于 20%固体含量水解液中在 30 °C 和 180 rpm 下培养 48 h, 而后添加无菌水稀释发酵液再于 12,000 × g 下离心 5 min 获得轻细胞, 并转入下代培养。每次无菌水的稀释倍数从 0 逐渐增加到 2。

5.2.5 微生物油脂的好氧发酵

取 *T. cutaneum* 冻存管解冻并涂布于 YPD 琼脂平板于 30 °C 下培养 36 h, 而后挑取单菌落接入 20 mL YPD 培养基于 30 °C 和 180 rpm 下培养 24 h, 之后再次转入新的 YPD 培养基进行活化 12 h。

在分步糖化与发酵 (SHF) 中, 取 1 L 20%固体含量水解液在 3 L 罐接入 10%种子培养基于 30 °C, 600 rpm, 0.83 vvm 和 pH 4.8 条件下发酵 72 h。4 M HCl 用于维持 pH 的稳定。营养盐组分为: 1.0 g/L KH_2PO_4 , 0.5 g/L YE, 0.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.22 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

在同步糖化与共发酵 (SSCF) 中, 玉米秸秆在 30%固体含量, 6 mg 纤维素酶蛋白/g 干固和 pH 4.8 条件下预糖化 12 h。而后接入 10%种子液和营养盐在 1 vvm, pH 4.8, 30 °C 和 700 rpm 条件下发酵 96 h。4 M HCl 用于维持 pH 的稳定。

5.2.6 油脂和其组分测定

对于摇瓶发酵和 SHF 发酵而言, 发酵液经过离心、清洗和 60 °C 下烘干测定其细胞干重 (DCW), 而后油脂产量和胞内油脂含量通过氯仿甲醇法进行测定^[241]。

在 SSCF 过程中, 发酵液通过离心分离菌体和木质纤维素残渣, 而后烘干菌体提取

油脂。提取油脂中可溶性木质素的影响通过减去发酵初始时刻油脂产量消除误差。

脂肪酸组成采用气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 测定^[151]。

5.2.7 细胞直径测定

细胞形态采用奥林帕斯的 BX51 光学显微镜 (日本, 东京) 观察, Nano 粒径分析软件进行细胞直径测定。

5.2.8 透射电镜观察

T. cutaneum 细胞在 12000×g 离心 5 min, 而后把细胞重悬于 2.5%戊二醛并在 4 °C 储存 1 h。固定化后细胞进行包埋和切片后安装在铜片上使用 FEI 公司的 Tecnai G2 Spirit 型透射电子显微镜 (美国, 得克萨斯州) 进行细胞壁形态学观察。

5.2.9 细胞密度计算

取 20 g 发酵液在 12000×g 离心 30 min 以沉淀所有悬浮细胞^[242]。在此高离心力条件下细胞完整性并未丢失而湿细胞可以完全从发酵液中分离^[243]。离心后移出上清并测定细胞湿重。当离心后细胞仍不能沉淀时, 采用一定量水稀释发酵液后再进行离心, 而此时可通过 0.22 μm 滤头过滤发酵液去除菌体获取上清。

发酵液密度和上清密度采用安东帕公司的密度测定仪 DMA4500M 测定 (澳大利亚, 格拉茨)。离心后细胞间隙仍然存在少量发酵液, 此时可通过公式 (5-1) 计算此包含发酵液的细胞密度 (ρ_w , kg/m³):

$$\frac{0.02}{\rho_b} = \frac{w}{\rho_w} + \frac{0.02 - w}{\rho_1} \quad (5-1)$$

ρ_b —发酵液密度, kg/m³;

ρ_1 —上清密度, kg/m³;

0.02—发酵液质量, kg;

w —湿细胞质量, kg。

离心后细胞假设为紧密排列球体, 此时细胞间隙为 $\frac{\pi}{3\sqrt{2}}$ (0.74)^[244], 细胞密度 (ρ_c , kg/m³) 可以通过公式 (5-2) 计算:

$$\rho_1 \times 0.26 + \rho_c \times 0.74 = \rho_w \times 1 \quad (5-2)$$

5.2.10 离心过程数值模型

一个流体静力学模型用于计算离心过程中细胞位移 (r_s) 和速度 (dr_s/dt), 此模型建立基于如下假设:

(1) 在离心力作用下油脂细胞首先水平移动到离心管壁面而后沿壁面滑移到离心管底部, 此模型仅计算水平位移;

(2) 相比于离心力、重力和垂直方向浮力可以忽略不计, 因而模型忽略了细胞垂直方向位移;

(3) 离心后细胞看做为整齐排列球体, 球体间空隙率为 0.26^[244];

- (4) 离心过程中细胞形态维持不变;
- (5) 离心过程中细胞处于层流状态;
- (6) 忽略细胞间碰撞。

此模型中水平方向力包括离心力 (F_c), 摩擦力 (F_f) 和水平方向浮力 (F_b) (图 5.1)。根据斯托克斯定律建立细胞受力分析公式:

$$F_c - F_b - F_f = m_c \frac{d^2 r_s}{dt^2} \quad (5-3)$$

m_c —单个细胞质量, kg;

$$m_c = \rho_c V_c;$$

V_c —单个细胞体积, m^3 ;

$$V_c = \frac{4\pi R^3}{3};$$

R —单个细胞半径, m;

t —离心时间, s。

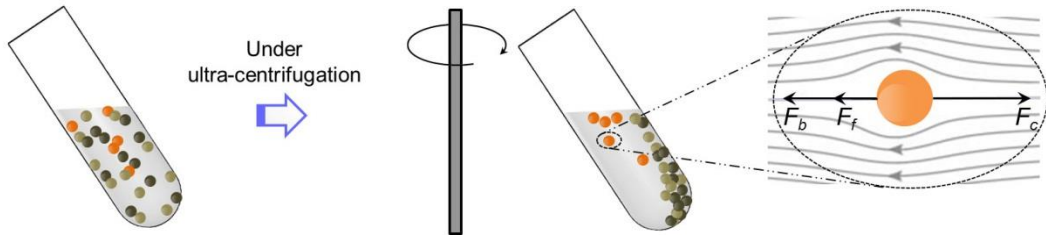


图 5.1 离心过程中油脂细胞受力分析

Fig. 5.1 Forces analysis of oleaginous cells during centrifugation

其中 F_b 是水平方向浮力, F_f 是摩擦力, F_c 是离心力。

离心力可表示为 $F_c = V_c \rho_c \omega^2 r_s$, 其中 ω 是离心角速度, s^{-1} ; n 是离心速率, rps。摩擦力可表示为 $F_f = 6\pi\eta R \frac{dr_s}{dt}$, η 是发酵清液粘度, m^2/s 。浮力可表示为 $F_b = V_c \rho_l \omega^2 r_s$ 。此时公式 (5-3) 可以转化为:

$$V_c \rho_c \omega^2 r_s - V_c \rho_l \omega^2 r_s - 6\pi\eta R \frac{dr_s}{dt} = V_c \rho_c \frac{d^2 r_s}{dt^2} \quad (5-4)$$

或者

$$\frac{d^2 r_s}{dt^2} + \frac{6\pi\eta R}{V_c \rho_c} \frac{dr_s}{dt} + \left(\frac{\rho_l}{\rho_c} - 1\right) \omega^2 r_s = 0 \quad (5-5)$$

初始条件为 $t=0, r_s=r_0, \frac{dr_s}{dt} = 0$; r_0 是细胞与离心轴间最小距离 (0.05, m)。公式 (5-5) 是典型的二阶常系数微分方程, r_s 和 dr_s/dt 的解析解可以分别表示为:

$$r_s = C_1 \exp(\lambda_1 t) + C_2 \exp(\lambda_2 t) \quad (5-6)$$

其中 $\lambda_1 = -\frac{3\pi\eta R}{V_c \rho_c} + \frac{1}{2} \sqrt{\left(\frac{6\pi\eta R}{V_c \rho_c}\right)^2 - 4\left(\frac{\rho_l}{\rho_c} - 1\right)\omega^2}$

$$\lambda_2 = -\frac{3\pi\eta R}{V_c\rho_c} - \frac{1}{2}\sqrt{\left(\frac{6\pi\eta R}{V_c\rho_c}\right)^2 - 4\left(\frac{\rho_l}{\rho_c} - 1\right)\omega^2}$$

$$C_1 = -\frac{r_0\lambda_2}{\lambda_1 - \lambda_2}$$

$$C_2 = \frac{r_0\lambda_1}{\lambda_1 - \lambda_2}$$

5.2.11 胞内 NADPH 和乙酰-CoA 含量测定

菌株在合成培养基中于 30 °C 和 180 rpm 条件下培养 24 h、48 h 及 72 h。取 10⁴ 细胞量进行离心而后采用宁波新芝生物科技股份有限公司的 JY92-II N 超声均质机（中国，宁波）进行破壁。胞内 NADPH 含量和乙酰-CoA 采用苏州科铭生物技术有限公司（中国，苏州）的辅酶 II NADP(H) 试剂盒和乙酰-CoA 分析试剂盒测定。

5.2.12 细胞壁组分测定

葡聚糖和甘露聚糖含量采用硫酸酸解法测定。取 80 mg 冷冻干燥细胞于具塞试管中添加 1 mL 72% 浓硫酸在 30 °C 水浴 1 h。而后添加 28 mL 超纯水稀释至酸浓度为 4% 在 121 °C 下酸解 1 h。酸解后样品添加 CaCO₃ 中和至中性。样品离心、稀释及过滤后采用 HPLC 定量测定葡萄糖和甘露糖的量进而换算得到胞内葡聚糖和甘露聚糖含量。

几丁质含量采用盐酸酸解法测定。取 50 mg 冷冻干燥细胞添加 6 N HCl 在 105 °C 下过夜水解为氨基葡萄糖而后通过旋转蒸发仪烘干，重悬于 5 mL 超纯水中。取 50 μL 重悬样品添加 50 μL 溶剂 A（1.5 N Na₂CO₃ 溶于 4% 乙酰丙酮）在 100 °C 培育 20 min。而后添加 350 μL 96% 乙醇和 50 μL 溶剂 B（1.6 g p-二甲氨基苯甲醛溶于 30 mL 浓 HCl 及 30 mL 乙醇）混匀后在 520 nm 波长下测定吸光值。通过测定不同浓度纯品氨基葡萄糖分解后吸光值绘制标准曲线，进而计算得到胞内几丁质含量。

5.3 结果与讨论

5.3.1 超速离心筛选最轻及含油率最高油脂细胞

菌株发酵性能是实现高产油脂的关键基础。基于高含油率细胞密度低的特点，研究采用了一种超速离心筛选的方法选育高产油脂酵母 *T. cutaneum*（图 5.2）。超速离心筛选通过离心培养于水解液中的油脂细胞以获得轻细胞，并转入下代培养。通过逐代转接轻细胞最终筛选得到密度最轻的油脂细胞。整个超速离心筛选分为两个阶段进行。

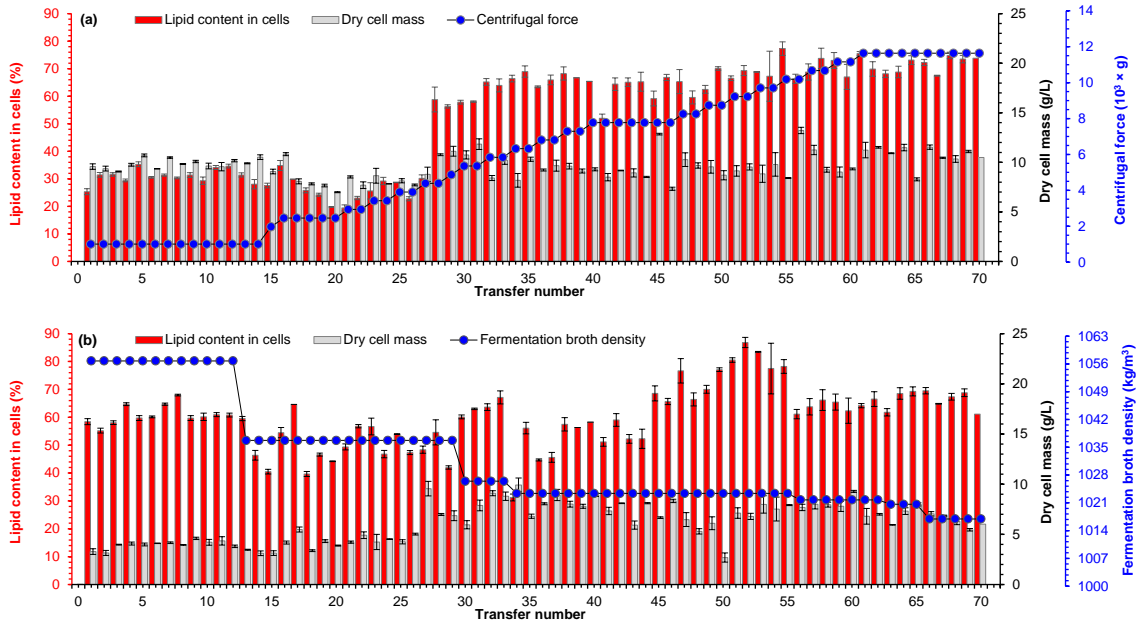


图 5.2 皮状丝孢酵母的超速离心筛选

Fig. 5.2 Ultra-centrifugation screening of *T. cutaneum*

(a) 第一阶段筛选；培养条件：15%固含量水解液，10%上层细胞接种量，30 °C，180 rpm，72 h 培养；筛选条件：高速离心 2 min。(b) 第二阶段筛选；培养条件：20%固含量水解液，10%漂浮细胞接种量，30 °C，180 rpm，48 h 培养；筛选条件：发酵液用水稀释后在 12000 × g 离心 5 min。

第一阶段，培养于水解液的亲本菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 离心 2 min 后吸取上层细胞作为种子转入下次培养，并在逐次转接中不断增加离心力以提升筛选强度（图 5.2a）。细胞含油率和菌体干重随着离心力的增加稳步提升。随着离心力从 1000 × g 增加到 4500 × g 和 12000 × g，含油率从最初的 25.3% 增加到 58.8% 和 77.3%。随后含油率一直维持在较高水平，而细胞干重仅从 9.6 g/L 增加到 10.5 g/L。此次筛选菌株命名为 *T. cutaneum* MS28。

第一阶段筛选离心力已经达到了非常高的水平，但离心后仍有大量细胞漂浮。为了进一步增加筛选强度，研究利用无菌水降低发酵液密度以促进相对重细胞的沉降，进而筛选更轻油脂细胞（图 5.2b）。随着无菌水稀释倍数增加，发酵液密度逐渐变小，上层漂浮细胞量明显减少，但含油率显著增加。转接过程中发酵性能略有波动，可能由于稀释倍数增加，接种量不稳定所导致。此筛选过程中细胞最高含油率达到了 86.8%。最终筛选菌株命名为 *T. cutaneum* WL97。

研究通过分步糖化与发酵方式对筛选菌株发酵性能进行了验证（图 5.3）。结果表明相比于亲本菌株，筛选菌株具有更高的细胞量、油脂产量和胞内含油率。首次筛选菌株 *T. cutaneum* MS28 促使油脂产量从 3.3 g/L 提高到了 14.9 g/L，而胞内油脂含量也从 17.1% 增加到了 44.5%。二次筛选菌株 *T. cutaneum* WL97 进一步提高油脂产量至 19.5 g/L，胞内油脂含量也增至 67.2%。这些结果表明，超速离心筛选是一种非常高效和操作简单的筛选方式，并极大地提高了菌株的油脂富集能力，进而实现了 5.9 倍油脂产量及 3.9 倍油脂含量的提高。

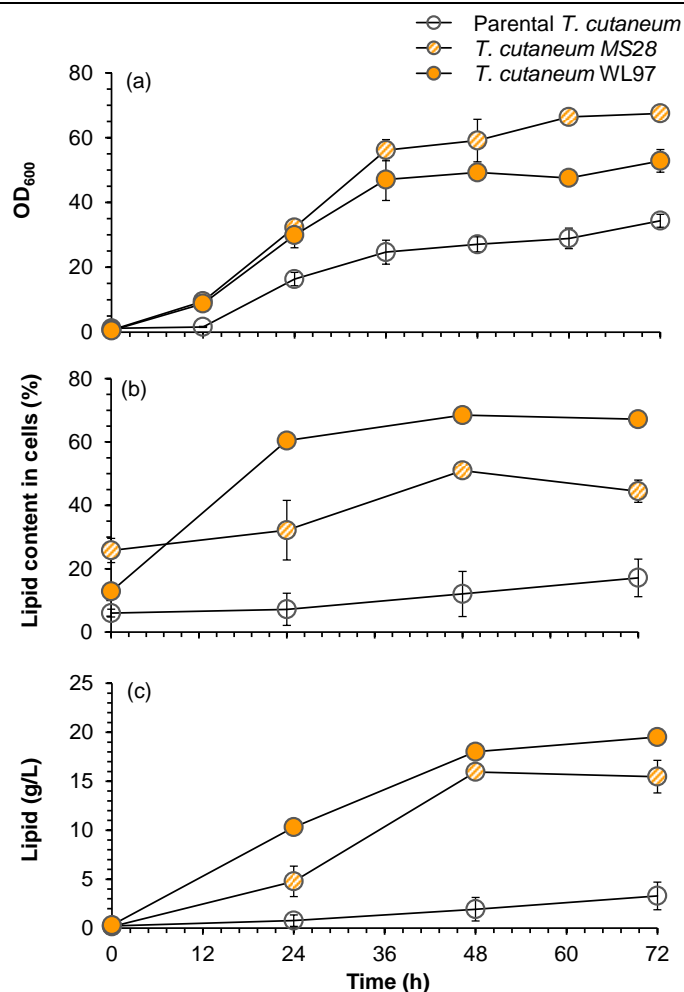


图 5.3 筛选菌株 *T. cutaneum* MS28 和 WL97 的发酵性能评价

Fig. 5.3 Fermentation performance of screened strains *T. cutaneum* MS28 and WL97 in hydrolysate
 水解条件: 20%固体含量, 6 mg 纤维素酶蛋白/g 干固, pH 4.8, 50 °C, 48 h 糖化; 发酵条件: 600 rpm, 1 vvm, 30 °C, pH 5.0, 3 L 罐, 72 h 发酵。

5.3.2 超速离心筛选的机理及其普适性

为了分析超速离心筛选机理, 研究建立了流体静力学模型并解析了相关物性参数 (表 5.1)。经过第一阶段离心筛选, 油脂细胞密度从 1124.0 kg/m³ (ACCC 20271) 降低到 1060.9 kg/m³ (MS28), 而平均细胞半径从 1.34 × 10⁻⁶ m 增加到 1.75 × 10⁻⁶ m。第二阶段筛选促使细胞密度进一步降低到 1034.2 kg/m³ (WL97)。此结果定量性表明离心筛选可以定向地诱导细胞密度的降低。

表 5.1 离心筛选过程中发酵液和油脂细胞物性参数

Physical parameters	Parental	MS28	WL97
Broth density with cells, ρ_b (kg/m ³)	1053.1	1054.7	1056.4
Broth density without cells, ρ_l (kg/m ³)	1051.1	1054.5	1056.9
Cell density, ρ_c (kg/m ³)	1124.0	1060.9	1034.2
Cell radius, R (m)	1.34×10^{-6}	1.75×10^{-6}	1.69×10^{-6}
Broth viscosity, η (kg/(m.s))	1.22×10^{-3}	1.28×10^{-3}	1.24×10^{-3}

发酵条件：500 mL 摇瓶，20%固体含量玉米秸秆水解液，30 °C，180 rpm，48 h 培养。

基于测定的物性参数，研究采用公式 (5-3)、(5-4) 及 (5-5) 计算得到细胞离心过程位移 (图 5.4)。在离心初始时刻，细胞与离心轴间距假设为 0.05 m (r_0)。在 $12000 \times g$ 离心力条件下，亲本菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 仅需 22 s 即可快速移动到离心管外壁 (r_1 , 0.036 m)，并在 48 s 内滑移到离心管底部 (r_2 , 0.022 m) (图 5.4a)。其中 r_2 计算基于水平方向受力沿壁面方向的分力求解得到。实验观察发现 120 s 离心后亲本菌株完全沉降于离心管底部，这一现象与计算结果相吻合。

首次筛选菌株 *T. cutaneum* MS28 经过 5 min 离心仅移动 0.025 mm，并未达到离心管外壁，因而展示了更好的悬浮特性，进而为简单吸取上层发酵液转接轻细胞提供了可行性。有趣的是，最终筛选菌株 *T. cutaneum* WL97 在离心过程中并未朝向离心管外壁方向移动，而是朝向离心机轴处移动，并最终贴附在离心管接近离心轴一侧的内壁上。实际离心后结果表明 *T. cutaneum* WL97 大多粘附在离心管上端，此结果与模型计算结果相一致，因而证实了建立的流体静力学模型可靠性。

当无菌水加入发酵液时，稀释了发酵液密度，因此在离心过程中促使密度相对重细胞的沉降，进而只有密度更低油脂含量更高的细胞才能漂浮在液面上层。随着添加水量增加，漂浮细胞逐渐减少，最终筛选得到最轻油脂细胞。

此离心筛选方法的成功运用不仅可以实现轻油脂细胞筛选，也适用于生产胞内蛋白、多聚物等重细胞的筛选。对于重细胞筛选，需要在筛选过程中不断降低离心力增加发酵液密度以获取最重细胞进而得到高产菌株。

5.3.3 油脂细胞形态学及油脂合成代谢解析

研究进一步考察了超速离心筛选对细胞形态学及油脂代谢的影响。透射电镜分析表明超速离心筛选前后油脂酵母的形态发生了巨大变化 (图 5.5)。在油脂快速积累时期 (24 h)，亲本菌株 *T. cutaneum* ACCC 20271 为近球状，而两筛选菌株均为椭球状，且 *T. cutaneum* MS28 相比于 *T. cutaneum* WL97 细胞形态更长。油脂发酵后期 (72 h)，三种菌株胞内油脂小体体积均增大，但两筛选菌株胞内油脂小体数量明显更多。而且 *T. cutaneum* WL97 细胞更为饱满，胞内充满油脂小体，并具有聚合成更大油脂小体的趋势。尽管发酵后期三株菌的细胞体积均有所缩小，但筛选菌株形态仍更大更长，且筛选菌株细胞壁厚度远薄于亲本菌株。

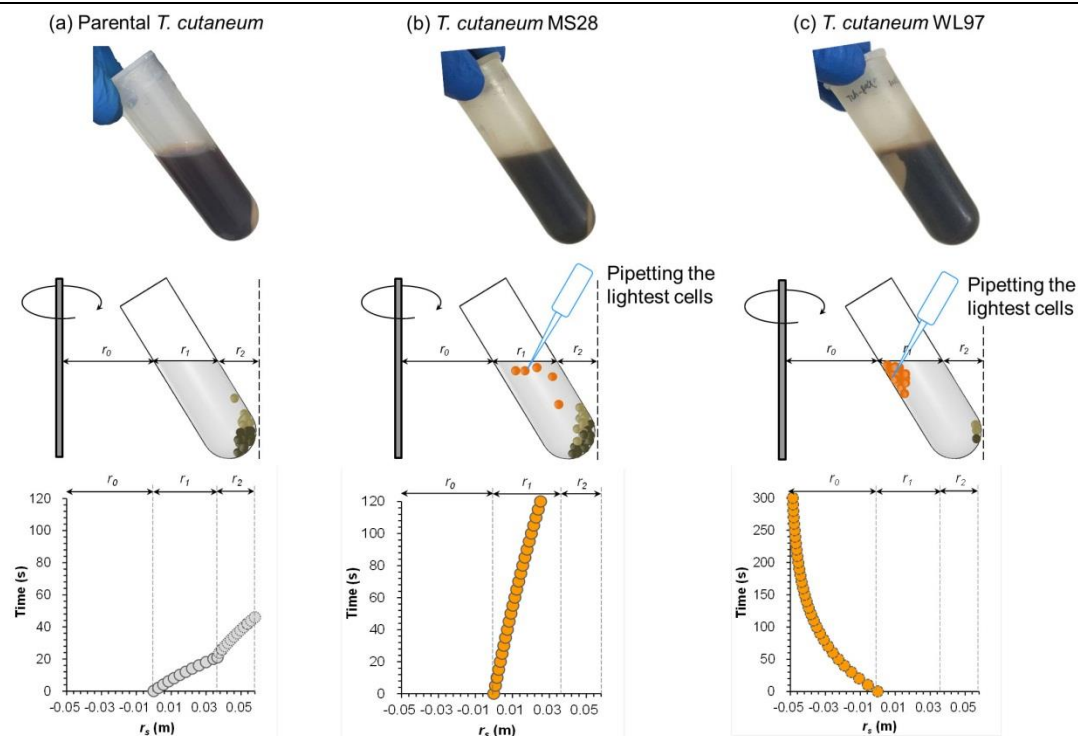


图 5.4 离心筛选模型验证

Fig. 5.4 Verification of centrifugal screening model

培养条件：20%固体含量水解液，30 °C，180 rpm，48 h 培养；离心力：12000 × g，离心时间：5 min。

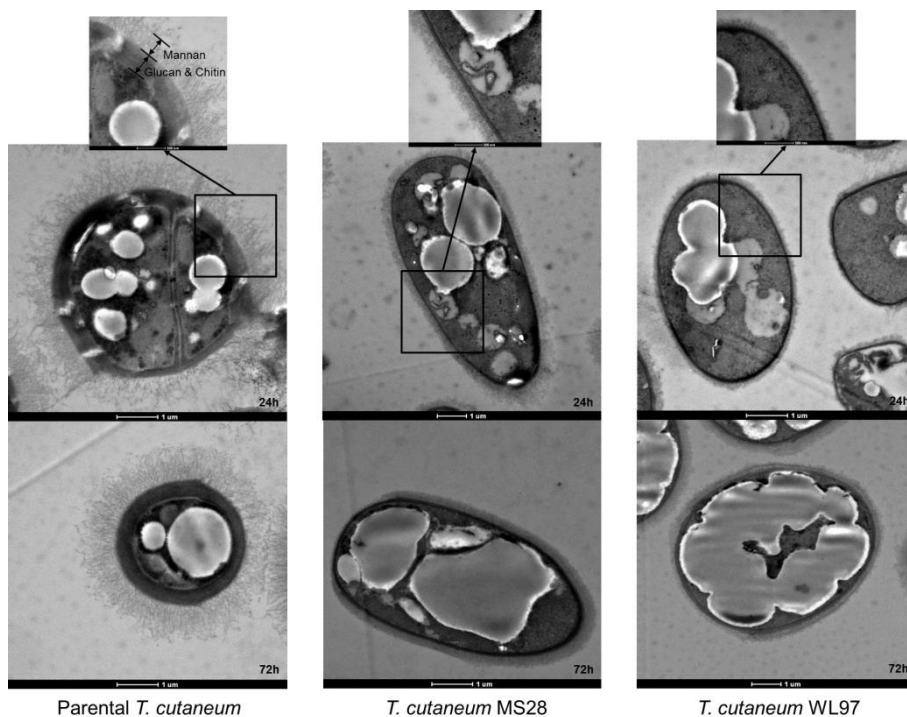


图 5.5 油脂酵母形态学差异

Fig. 5.5 Cell morphology of oleaginous yeast

细胞壁是保护细胞免受外部干扰的直接屏障，在抵抗环境压力、维持菌体形态等方面具有重要作用。酵母细胞壁主要由外层的甘露聚糖、中间的蛋白质、以及内层的

葡聚糖与几丁质组成。其中，甘露聚糖在控制细胞壁孔径等方面发挥作用而葡聚糖和几丁质主要影响细胞壁的强度和可塑性。葡聚糖主要由 β -1,3-葡聚糖以及少量的 β -1,6-葡聚糖构成。 β -1,3-葡聚糖是一种分枝状多聚物，其螺旋状结构赋予了细胞壁一定的弹性、灵活多变性以及良好拉伸强度。几丁质是 N-乙酰基-D-葡萄糖胺构成的直链多糖，它所形成的微纤维结构有利于细胞壁拉伸强度提高^[245]。透射电镜结果表明筛选菌株细胞外侧的丝状甘露聚糖层显著变薄（图 5.6）。我们定量计算了单个细胞的细胞壁组分含量并证实细胞壁单位表面积上甘露聚糖和葡聚糖含量的确显著降低，而几丁质含量并未明显变化（图 5.7）。细胞壁组分降低的原因可能在于胞内大量油脂累积所导致的膨胀作用。同时这种组分降低可能也增加了细胞壁的弹性，为油脂累积提供了更大的空间。这种细胞壁组分变化与油脂累积间的相互作用在超速离心筛选过程中促进了细胞含油率的逐步提升。

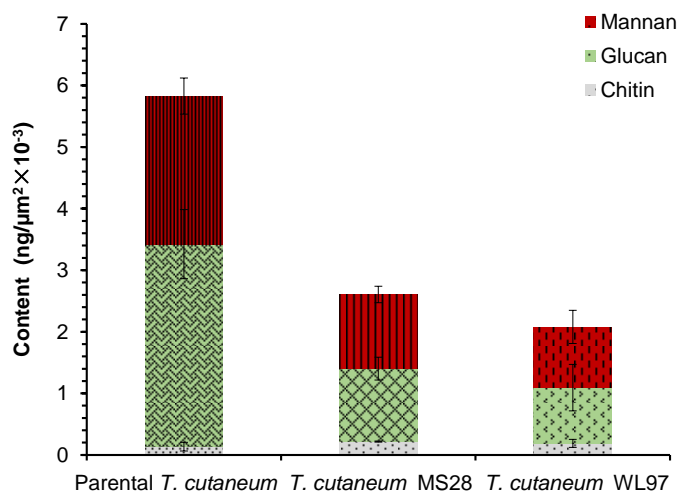


图 5.6 油脂酵母细胞壁组分差异

Fig 5.6 Cell wall compositions of oleaginous yeast

在皮状丝孢酵母 (*T. cutaneum*) 中，NADPH 是油脂合成的重要辅酶（图 5.7）。分析结果表明超速离心筛选后菌株胞内 NADPH 含量显著增加，含量最高的是 *T. cutaneum* WL97，其次是 *T. cutaneum* MS28（图 5.8）。乙酰-CoA 是油脂合成的前体物质，其在筛选菌株中含量更高，尤其在发酵后期。超速离心筛选菌株胞内 NADPH 和乙酰-CoA 含量的增加意味着胞内油脂合成路径代谢更为活跃，这与油脂产量增加的结果相一致。

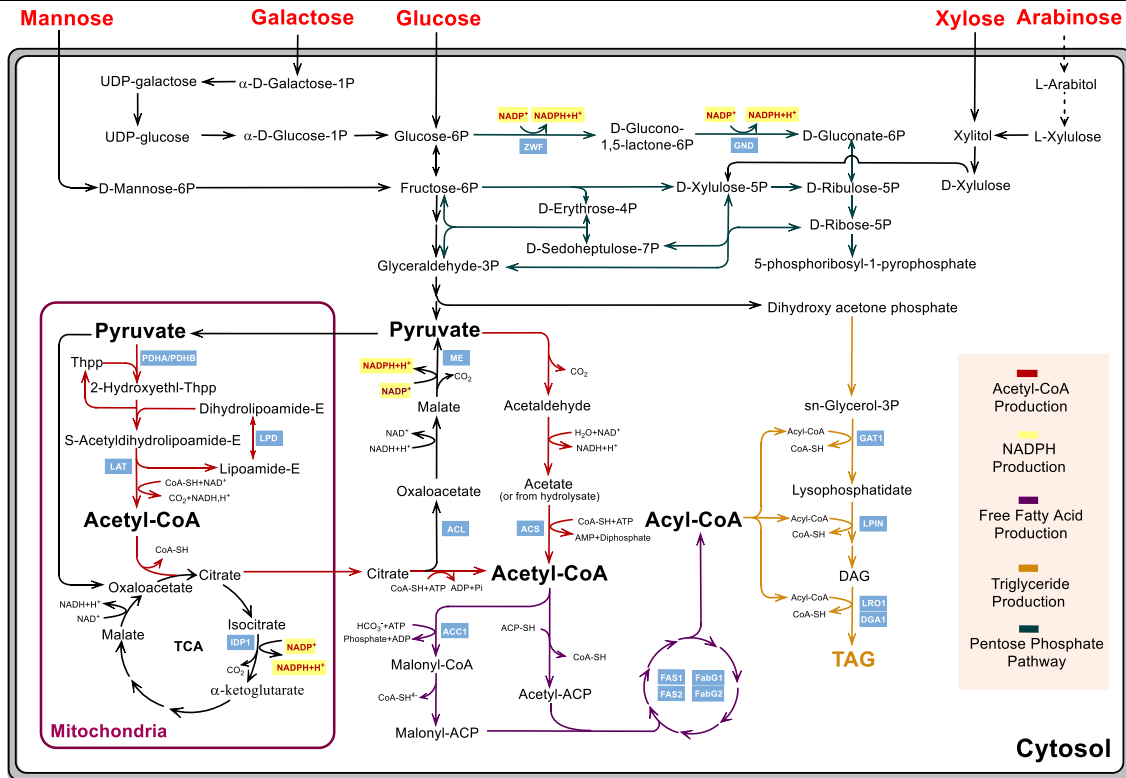


图 5.7 皮状丝孢酵母油脂累积代谢流

Fig. 5.7 Metabolic flow chart of lipid biosynthesis in *T. cutaneum*

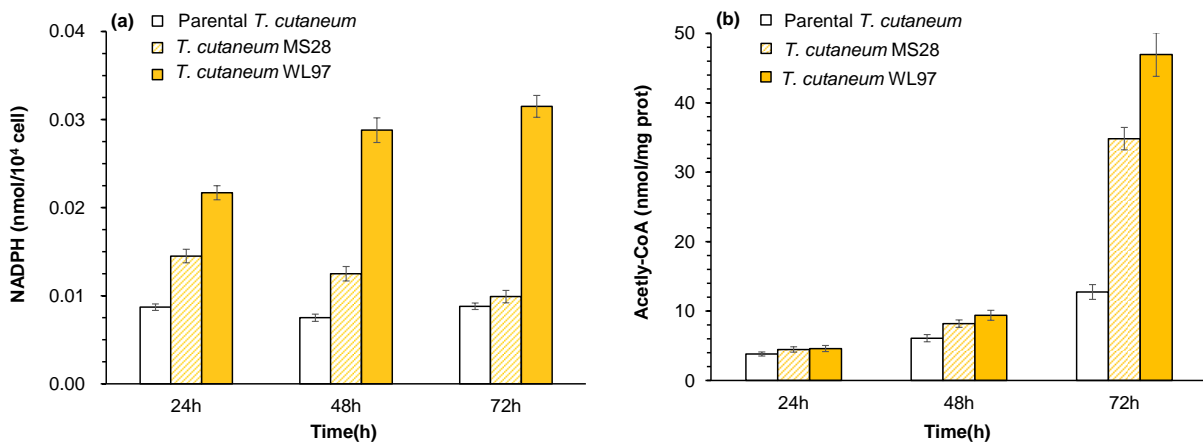


图 5.8 油脂酵母胞内 NADPH 和乙酰-CoA 含量差异

Fig. 5.8 Intracellular NADPH and acetyl-CoA content in oleaginous yeast

5.3.4 筛选菌株纤维素油脂的好氧生产

为了获得更高指标的纤维素油脂生产，本研究尝试了不同发酵策略，包括：同步糖化与共发酵（SSCF）及半连续发酵模式。在 SSCF 中，筛选菌株均可完全地利用木质纤维素来源的所有糖类转化为油脂，而亲本菌株仅可部分地利用葡萄糖（图 5.9）。经过 96 h 发酵，筛选菌株 *T. cutaneum* MS28 和 WL97 分别可以生产 34.4 g/L 和 38.6 g/L 油脂，而亲本菌株仅能获得 7.5 g/L 油脂。为了提高油脂产量，我们对玉米秸秆原料进行了清洗以移除灰分，而后再进行预处理等生物炼制操作。*T. cutaneum* WL97 采用水洗秸秆原料最终可以获得 41.6 g/L 油脂（图 5.10a）。为了最大化微生物油脂的生产，本研究尝试

在同步糖化与发酵同时进行半连续发酵以流加更高浓度的碳源实现油脂产量的提升。结果表明在 30% 固体含量下进行 SSCF，当 72 h 碳源耗尽时，补加 35% 固体含量的糖化液，最终经过 120 h 的补料发酵 *T. cutaneum* WL97 生产了 46.7 g/L 油脂（图 5.10b）。超过 5.2% 体积分数的油脂含量（油脂密度 $< 900 \text{ kg/m}^3$ ）已显著超过具有商业开采价值油矿的含油量（3%）。故本研究通过超速离心筛选数倍提升了油脂产量，促使纤维素油脂生产具备了工业应用潜力。

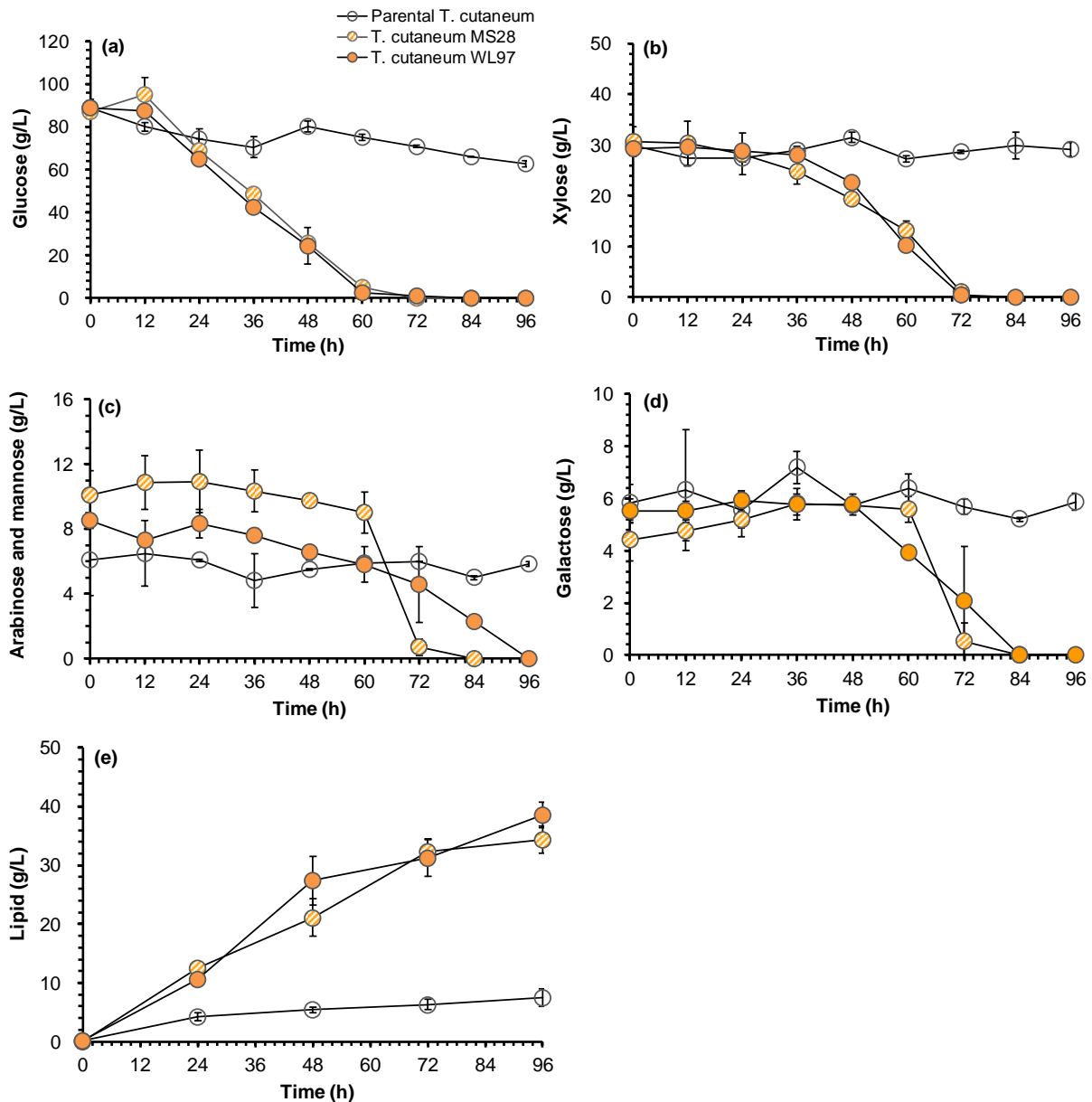


图 5.9 同步糖化与共发酵（所有糖类）生产微生物油脂

Fig. 5.9 Simultaneous saccharification and co-fermentation (all sugars) for microbial lipid production (a) 葡萄糖; (b) 木糖; (c) 阿拉伯糖和半乳糖; (d) 甘露糖; (e) 油脂。预糖化条件: 30% 固体含量玉米秸秆, 6 mg 纤维素酶蛋白/g 干固, 50 °C, pH 4.8, 150 rpm, 12 h 预糖化; 发酵条件: 30 °C, pH 5.0, 1 vvm, 10% 接种量, 700 rpm, 120 h 发酵。

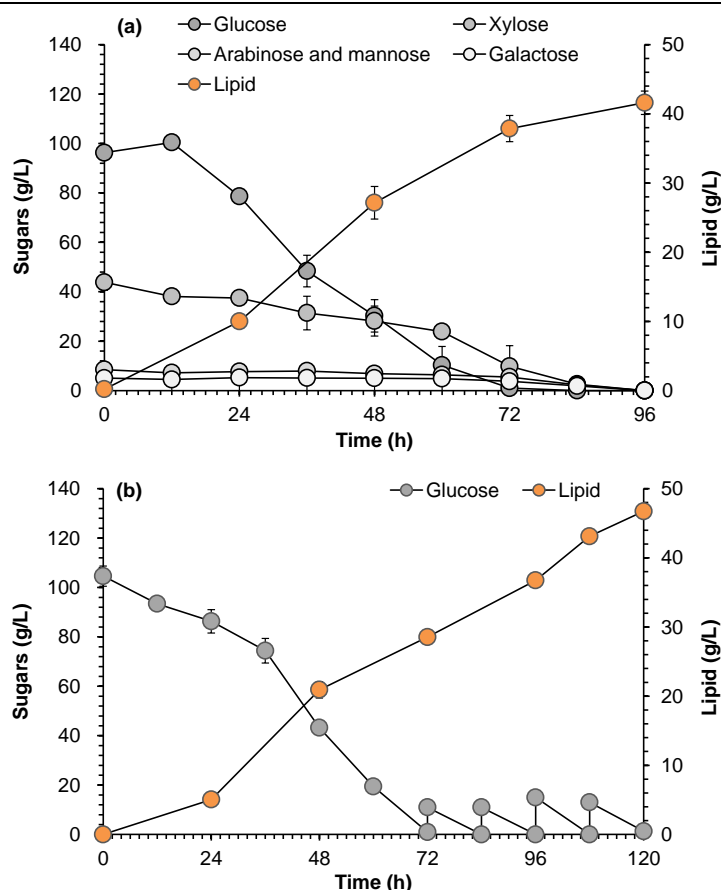


图 5.10 水洗秸秆的同步糖化与共发酵 (a) 和半连续发酵工艺 (b) 生产微生物油脂

Fig. 5.10 Simultaneous saccharification and co-fermentation and semi-continuous fermentation for lipid accumulation by *T. cutaneum* WL97 using washed corn stover

(a) 玉米秸秆首先清洗去除砂石、灰分等进行预处理和脱毒，之后在 30% 固体含量，6 mg 纤维素酶蛋白/g 干固，50 °C，pH 4.8 和 150 rpm 进行 12 h 预糖化，12 h 预糖化；而后在 10% 接种量，1 vvm，30 °C 和 pH 5.0 发酵 120 h。(b) 清洗玉米秸秆在 30% 固体含量，6 mg 纤维素酶蛋白/g 干固，50 °C，pH 4.8 和 150 rpm 进行 12 h 预糖化，而后在 10% 接种量，1 vvm，30 °C 和 pH 5.0 发酵 72 h。之后，每 12 h 流加 10% 体积比的 35% 固体含量完全糖化液，同时放出相同体积发酵液。

同步糖化与发酵在生物炼制工业具有巨大的技术优势，可以充分利用木质纤维素来源的碳源并降低过程成本。在纤维素乙醇发酵中，发酵后乙醇可以通过三效蒸发获得粗品乙醇。纤维素油脂生产中，油脂作为一种胞内产物必须对油脂细胞进行分离提取才能获得油脂产品。但 SSCF 发酵后油脂细胞与木质素残渣混杂在一起，这对后续的油脂提取操作造成了极大困扰。只有解决油脂细胞的分离问题，才能真正实现纤维素油脂的产业化应用。尽管油脂细胞密度较低，对发酵液进行离心后仍不能实现很好的分离。考虑到发酵液中纤维素酶可能对细胞壁组分如葡聚糖和甘露聚糖具有一定降解的作用，研究对发酵液加热至纤维素酶的最适温度 50 °C 进行酶解后再离心。可以看出油脂细胞层与木质素残渣间出现了分层，这意味着油脂细胞可以从发酵液中分离出来 (图 5.11)。透射电镜结果表明，加热酶解后的细胞壁厚度的确更薄，说明纤维素酶确实酶解了细胞壁组分。细胞壁组分含量的降低进一步降低了细胞密度，这是实现油脂细胞特异性分离的主要原因。

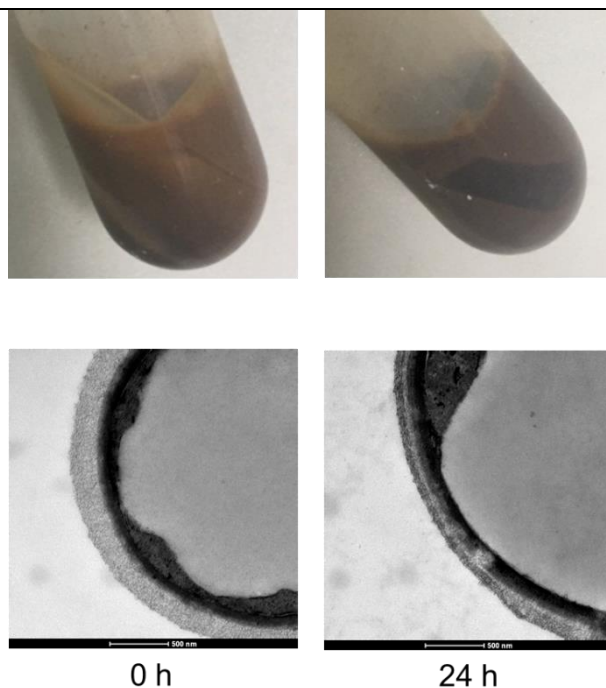


图 5.11 利用发酵液中原有纤维素酶的水解作用特异性地分离油脂细胞

Fig. 5.11 Specific separation of oleaginous cells from residual lignin by enzymatic hydrolysis of intrinsic cellulase in fermentation slurry

我们对本研究获得纤维素油脂的发酵结果与文献报道进行了比较（表 5.5）。由于比色法在复杂纤维素体系中油脂测定的不精确性^[239]，本研究仅引用了重量法测定的油脂产量。稀酸水解液发酵仅利用来自半纤维素水解的木糖为碳源，而损失了大部分纤维素组分故只获得了 10.4 g/L 油脂产量^[150]。分步糖化与发酵实现了最高 16.3 g/L 的油脂生产，但水解产物对纤维素酶的抑制作用及固液分离的高糖损失限制了油脂产量的进一步提高^[246]。同步糖化与发酵释放了纤维素酶的底物反馈抑制，然而，菌株发酵性能成为获得高产油脂的关键因素。由于所用菌株仅能利用葡萄糖，Gong 等^[247]采用同步糖化与发酵方法仅获得了 15.1 g/L 油脂。本研究采用同步糖化与共发酵的方式完全地转化木质纤维素来源的所有糖类实现了迄今为止最高油脂产量（46.7 g/L）、油脂含量（66.3%）、油脂生产速率（10.4 g/L/day）及油脂产率（0.22 g/g 总糖）。

研究也考察了油脂中脂肪酸的构成，发现油酸是主要的脂肪酸成分，其含量超过 70%，并显著高于其他菌株胞内含量（表 5.6）。高油酸含量意味着油脂具有更好的抗氧化性能及低温流动性，故其生产的生物柴油性能更为优越。

表 5.5 不同微生物利用木质纤维素原料的油脂发酵性能（仅列举无任何糖浓缩步骤发酵过程）

Table 5.5 Lipid fermentation performance with different microorganisms using lignocellulose feedstocks (ithout any concentrating steps)

Feedstock	Biorefining methods	Strains	Lipid content (%)	Lipid titer (g/L)	Lipid productivity (g/L/day)	Lipid yield (g/g total sugars ^a)	Sources
Corn stover	Dry acid pretreatment and biorefining, SSCF	<i>T. cutaneum</i> WL97	66.3	46.7	9.3	0.22	This study
Corn stover	Dry acid pretreatment and biorefining, SSCF	<i>T. cutaneum</i> MS28	61.0	34.4	8.6	0.21	This study
Corn stover	Dry acid pretreatment and biorefining, SHF	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271	27	8.1	1.1	0.06	[248]
Corn stover	AFEX pretreatment, SHF	<i>C. humicola</i> UCDFST 10-1004	40.0	15.5	N/A	0.12	[239]
Corn stover	Dilute acid pretreatment, SHF	<i>R. graminis</i> DBVPG 4620	34.0	16.3	5.4	0.08	[246]
Corn stover	Dilute acid pretreatment, SHF	<i>M. isabellina</i> ACCC 42613	34.5	4.8	1.2	0.15	[149]
Corn stover	Alkali pretreatment, water washing, SSF	<i>C. curvatus</i> ACCC 20509	N/A	15.1	4.7	0.18	[247]
Wheat straw	Dilute acid hydrolysate	<i>M. isabellina</i> NRRL 1757	36.3	4.4	0.7	0.07	[249]
Wheat straw	Dilute acid hydrolysate, overliming	<i>C. curvatus</i> ACCC 20509	33.5	5.8	0.8	0.07	[147]
Corn cob	Dilute acid hydrolysate overliming	<i>T. cutaneum</i> CH002	36.0	10.4	2.1	0.20 ^c	[150]
Corn cob	SHF	<i>T. dermatitis</i> CH007	40.1	9.8	1.4	0.16	[250]
Palm Empty	Alkaline pretreatment, dilute acid	<i>C. tropicalis</i> X37	40.0	2.7	0.9	0.14	[251]
Fruit Bunches	hydrolysate, activated carbon, overliming						

研究仅列举重量法测定油脂产量。重量测定法意味着胞内油脂采用有机溶剂萃取而后旋蒸以移除有机溶剂进而测定油脂质量。

^a 总糖包括纤维素，半纤维素和他们解聚的单糖。^b 计算引自 Dien 等^[252]。^c 原始玉米芯水解液得率引自 Chen 等^[253]。

表 5.6 不同微生物利用木质纤维素原料生产油脂的脂肪酸构成（仅列举无任何糖浓缩步骤发酵过程）

Table 5.6 Fatty acid profiles (%) of lipid produced by different microorganisms using lignocellulose feedstocks (using the directly hydrolyzed sugar streams without any concentrating steps)

Feedstocks	Yeast species	Palmitic acid	Palmitoleic acid	Stearic acid	Oleic acid	Linoleic acid	Others	Sources
		C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:2		
Corn stover	<i>T. cutaneum</i> WL97	17.0	-	8.6	74.4	-	-	This study
Corn stover	<i>T. cutaneum</i> MS28	16.1	-	7.8	76.1	-	-	This study
Corn stover	<i>T. cutaneum</i> ACCC 20271	19.4	10.7	6.0	42.11	4.3	17.5	[137]
Corn stover	<i>C. curvatus</i> ACCC 20509	25.3	0.6	14.6	51.1	5.9	0.6	[247]
Corn stover	<i>M. isabellina</i> ACCC 42613	24.6	2.5	3.8	54.5	10.6	4.1	[149]
Corn stover	<i>R. graminis</i> DBVPG 4620	20.5	-	7.2	42.1	17.2	13.0	[246]
Wheat straw	<i>M. isabellina</i> NRRL 1757	26.2	1.5	6.8	49.9	9.0	6.4	[249]
Wheat straw	<i>C. curvatus</i> ACCC 20509	25.9	-	15.2	47.7	6.4	4.8	[147]
Corn cob	<i>T. cutaneum</i> CH002	28.0	-	16.5	46.6	4.9	4.0	[150]
Corn cob	<i>T. dermatis</i> CH007	27.7	-	13.6	43.4	10	5.3	[250]
Palm empty fruit bunches	<i>C. tropicalis</i> X37	26.2	4.8	9.5	24.7	18.5	16.3	[251]

5.4 本章小结

本章节探究了超速离心筛选获取高产油脂酵母的效率,并结合流体静力学解析其筛选机制,同时考察了超速离心筛选对菌株形态学、油脂合成代谢及发酵性能的影响,主要得出如下结论:

- (1) 基于高含油率细胞密度低的特性,超速离心适应性进化可以有效筛选高产油脂酵母;在超速离心筛选过程中增加离心力及无菌水的稀释作用可以加速筛选进程,实现菌株发酵性能的快速提升。
- (2) 细胞物性参数表明,超速离心筛选在提升细胞含油率同时降低了细胞密度,增加了细胞体积;建立的流体静力学模型得到了很好地实验验证,可用于不同胞内产物生产菌株的筛选评估。
- (3) 离心筛选也增加了胞内油脂合成关键前体 Acetyl-CoA 和辅酶 NADPH 的含量,提升了 *T. cutaneum* 对木质纤维素来源多糖的利用效率。微观层面解析表明超速离心筛选不仅增加了细胞体积,而且降低了细胞壁厚度;定量分析证实筛选菌株细胞壁中主要降低组分为甘露聚糖和葡聚糖。这些形态学改变为油脂的大量积累创造了条件,是筛选菌株油脂生产能力大幅提升的重要原因之一。
- (4) 筛选菌株可以通过同步糖化与共发酵方式完全利用木质纤维素来源的全部糖类转化为油脂,而原始菌株仅能部分利用葡萄糖。在 30% 固体含量,筛选菌株可以生产 38.6 g/L 油脂,而原始菌株仅能生产 7.5 g/L。研究进一步采用半连续发酵方式,使用筛选菌株获得了 46.7 g/L 油脂。超过 5.2% 体积分数的油脂含量(油脂密度 $<900\text{ kg/m}^3$)极大超过了可开采油矿的最低含油率(3%),因此具有很好的应用前景。

第 6 章 结论与展望

6.1 结论

本研究聚焦于好氧生物炼制生产生物燃料和化学品（糖酸和柠檬酸）的工业化应用潜力。高固载量是生物炼制中实现高水平产物生产和低过程成本的必然选择。然而，高固体含量的好氧发酵目前仍存在很多关键性问题有待解决。大量固体颗粒存在可能会影响发酵液中的质量传递速率，导致氧气传递限制和混合传质困难等。高固体含量必然增加发酵液中抑制物浓度，增加对发酵菌株的胁迫作用，进而影响菌株发酵性能。同时，固体的存在也对发酵产物分离纯化造成了极大困扰。这些问题的存在严重地阻碍了生物炼制好氧发酵产业化的进程。

- (1) 本文首先研究了高固高粘木质纤维素体系的氧气传递特性，并为高固体含量下好氧发酵的充分供给氧气提供了解决方案。结果表明固体含量的增加显著地降低了氧气供给速率。但通过调节酶解时间等操作，可以提高氧气传递速率，实现高效的葡萄糖酸生产。研究进一步采用计算流体力学模拟优化了规模化生物反应器的设计，极大降低了发酵过程的通气和混合能耗。
- (2) 考察了纤维素糖酸的好氧发酵生产。氧化葡糖杆菌对木质纤维素来源的所有糖类都具有很好的利用能力，但其协同利用效率较低，必须通过全细胞催化方式才能实现完全转化。本研究通过菌株长期驯化，实现了以发酵方式完全转化所有糖类到相应糖酸。最终驯化菌株利用玉米秸秆获得超过 180 g/L 的糖酸产量，与淀粉原料生产糖酸产量持平。
- (3) 探究了同步糖化与好氧发酵方式生产柠檬酸的可行性。研究表明黑曲霉可以在高固高粘木质纤维素体系实现同步糖化与发酵生产柠檬酸，但其发酵速率相对其他产品生产较慢，可能原因在于霉菌菌丝与秸秆颗粒的交联增加了发酵液粘度进而减弱了氧气供给速率。研究通过发酵过程调控最终利用玉米秸秆原料生产了 136 g/L 的柠檬酸，相比国际水平提高了 36 % 的产量，具备潜在的工业化应用前景。
- (4) 评估了同步糖化与好氧共发酵生产微生物油脂的潜力。研究基于高含油率细胞密度低的原理开创了一种超速离心筛选方法选育高产油脂酵母。采用此策略数倍提升油脂酵母的含油率，并导致了细胞体积变大及细胞壁变薄。微观解析表明离心筛选增强了油脂合成前体 Acetyl-CoA 和关键辅酶 NADPH 合成，同时弱化了细胞壁中甘露聚糖和葡聚糖合成。细胞形态改变为油脂大量积累创造了条件，是筛选菌株油脂生产能力提升的重要原因。最终，筛选菌株以同步糖化与共发酵结合半连续发酵方式转化木质纤维素来源的所有糖类生产了 46.7 g/L 油脂，相比文献报道（16.3 g/L）提高了 3 倍产量。利用发酵液中原有纤维素酶的水解作用实现了油脂细胞与木质素残渣的特异性分离，解决了高固体含量发酵中油脂分离与提取问题。

6.2 创新点

- (1) 解析了高固高粘木质纤维素体系的氧气传递特性，发现了氧气传递速率随固体含量变化的一般性规律，证实了氧气传递速率对好氧发酵的关键性调控作用，给出了高固高粘体系氧气充分供给的解决方案。
- (2) 首次实现了高固体含量下的同步糖化与好氧发酵转化，通过发酵过程优化，获得了高水平纤维素柠檬酸生产。
- (3) 基于高含油率细胞密度低的原理，开创了一种超速离心筛选方法选育高产油脂酵母，显著提升了胞内含油率和纤维素油脂生产水平，实现了木质纤维素来源的全部糖类到油脂的特异性转化。

6.3 展望

本研究利用好氧发酵工艺高效实现了生物燃料和化学品的生产转化，极大地拓展了生物炼制产业化路径，为可再生资源的工业化应用奠定了坚实基础。但本研究中仍存在问题有待进一步研究。

- (1) 加速柠檬酸发酵速率。发酵速率是影响生产成本的重要因素之一。黑曲霉进行同步糖化与发酵生产柠檬酸需要 192 h 才能完成，将近是其他产品发酵时间的二倍。通过调控通气、混合或者接种量等方式提高发酵速率将是后续柠檬酸生产研究的重要方向之一。
- (2) *A. niger* 是柠檬酸生产常用菌株，已经广泛用于工业化生产。木质纤维素原料除了含有粮食作物相同的葡萄糖碳源外，还有其他四种单糖，但 *A. niger* 只能利用葡萄糖单一碳源。因此多糖共利用将成为 *A. niger* 利用木质纤维素原料生产柠檬酸的关键问题所在。通过代谢工程改造实现 *A. niger* 对多糖类的共利用将极大地推进纤维素柠檬酸的产业化应用进程。
- (3) 评估 *T. cutaneum* 形态相关基因对油脂合成的影响。本研究对超速离心筛选的作用机理、细胞形态和代谢路径等特性进行了深入考察，并发现离心筛选除了提升菌株的油脂合成能力外，另一个最显著影响是显著改变了菌株形态。今后研究可以着手调控细胞形态以评估其对油脂合成影响，进而开辟油脂合成调控的新途径。
- (4) 验证超速离心筛选方法的普适性。超速离心筛选方法已经成功应用于筛选高产 *T. cutaneum* 菌株，实现了含油率和油脂产量的数倍提升。从建立的流体静力学模型看，此方法适用于所有油脂酵母的菌种选育，但其普适性需要进一步验证和推广。
- (5) 纤维素油脂的产业化评估。本研究已经采用超速离心筛选方法获得了高产工程菌株并实现了纤维素油脂生产水平的国际领先。但其能否满足产业化需求，仍需对其进行技术经济性评估。

参考文献

- [1] Diwan B, Parkhey P, Gupta P. From agro-industrial wastes to single cell oils: a step towards prospective biorefinery. *Folia Microbiologica*. 2018, 63(5):547-568.
- [2] Soetaert W, Vandamme EJ. Biofuels in perspective. In: Soetaert W, Vandamme EJ, eds. *Biofuels*. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd., 2009:1-9.
- [3] Shields-Menard SA, Amirsadeghi M, French WT, Boopathy R. A review on microbial lipids as a potential biofuel. *Bioresource Technology*. 2018, 259:451-460.
- [4] Peters W, Jacobson AR, Sweeney C, Andrews AE, Conway TJ, Masarie K, Miller JB, Bruhwiler LMP, Petron G, Hirsch AI, Worthy DEJ, van der Werf GR, Randerson JT, Wennberg PO, Krol MC, Tans PP. An atmospheric perspective on North American carbon dioxide exchange: CarbonTracker. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007, 104(48):18925-18930.
- [5] Feldman DR, Collins WD, Gero PJ, Torn MS, Mlawer EJ, Shippert TR. Observational determination of surface radiative forcing by CO₂ from 2000 to 2010. *Nature*. 2015, 519(7543):339-343.
- [6] IEA. *World Energy Outlook 2014 Executive Summary*, 2014.
- [7] Ahmad AL, Yasin NHM, Derek CJC, Lim JK. Microalgae as a sustainable energy source for biodiesel production: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2011, 15(1):584-593.
- [8] Jackson RB, Vengosh A, Darrah TH, Warner NR, Down A, Poreda RJ, Osborn SG, Zhao KG, Karr JD. Increased stray gas abundance in a subset of drinking water wells near Marcellus shale gas extraction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2013, 110(28):11250-11255.
- [9] Wyman CE. *Aqueous pretreatment of plant biomass for biological and chemical conversion to fuels and chemicals*. John Wiley Sons. Ltd, 2013.
- [10] Amiri H, Karimi K. Pretreatment and hydrolysis of lignocellulosic wastes for butanol production: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*. 2018, 270:702-721.
- [11] Greene N. Growing energy. How biofuels can help end America's oil dependence. New York, USA: In: N.R.D. Council (Ed.), 2004:78.
- [12] Liu GD, Qu YB. Engineering of filamentous fungi for efficient conversion of lignocellulose: Tools, recent advances and prospects. *Biotechnology Advances*. 2019, <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.12.004>.
- [13] Huang RL, Su RX, Qi W, He ZM. Bioconversion of lignocellulose into bioethanol: Process intensification and mechanism research. *Bioenergy Research*. 2011, 4(4):225-245.
- [14] Orts WJ, McMahan CM. Biorefinery developments for advanced biofuels from a sustainable array of biomass feedstocks: Survey of recent biomass conversion research from agricultural research service. *Bioenergy Research*. 2016, 9(2):430-446.
- [15] Rajendran K, Drielak E, Varma VS, Muthusamy S, Kumar G. Updates on the pretreatment of lignocellulosic feedstocks for bioenergy production-a review. *Biomass Conversion and*

- Biorefinery. 2018, 8(2):471-483.
- [16] Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13):4851-61.
- [17] Yoo CP, X. Pretreatment of lignocellulosic feedstocks. In: Li YK, S.K., ed. *Bioenergy: principles and applications*. Blackwell, Hoboken: Wiley, 2016.
- [18] Ruiz HA, Rodriguez-Jasso RM, Fernandes BD, Vicente AA, Teixeira JA. Hydrothermal processing, as an alternative for upgrading agriculture residues and marine biomass according to the biorefinery concept: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2013, 21:35-51.
- [19] Kim JS, Lee YY, Kim TH. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2016, 199:42-48.
- [20] Zhao XB, Zhang LH, Liu DH. Biomass recalcitrance. Part II: Fundamentals of different pre-treatments to increase the enzymatic digestibility of lignocellulose. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*. 2012, 6(5):561-579.
- [21] Bhagia S, Kumar R, Wyman CE. Effects of dilute acid and flowthrough pretreatments and BSA supplementation on enzymatic deconstruction of poplar by cellulase and xylanase. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 157:1940-1948.
- [22] Silveira MHL, Morais ARC, Lopes AMD, Oleksyszyn DN, Bogel-Lukasik R, Andraus J, Ramos LP. Current pretreatment technologies for the development of cellulosic ethanol and biorefineries. *Chemsuschem*. 2015, 8(20):3366-3390.
- [23] Zhang JA, Wang XS, Chu DQ, He YQ, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6):4480-4488.
- [24] He YQ, Zhang LP, Zhang J, Bao J. Helically agitated mixing in dry dilute acid pretreatment enhances the bioconversion of corn stover into ethanol. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7.
- [25] He YQ, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation. *Bioresource Technology*. 2014, 158:360-364.
- [26] Liu G, Zhang Q, Li HX, Qureshi AS, Zhang J, Bao XM, Bao J. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018, 115(1):60-69.
- [27] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*. 2018, 249:9-15.
- [28] Qiu ZY, Gao QQ, Bao J. Constructing xylose-assimilating pathways in *Pediococcus acidilactici* for high titer D-lactic acid fermentation from corn stover feedstock. *Bioresource Technology*. 2017, 245:1369-1376.
- [29] Jonsson LJ, Martin C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 2016, 199:103-112.

- [30] Jonsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6.
- [31] Kim Y, Ximenes E, Mosier NS, Ladisch MR. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme and Microbial Technology*. 2011, 48(4-5):408-415.
- [32] Singh B, Kumar P, Yadav A, Datta S. Degradation of fermentation inhibitors from lignocellulosic hydrolysate liquor using immobilized bacterium, *Bordetella* sp. BTIITR. *Chemical Engineering Journal*. 2019, 361:1152-1160.
- [33] Pienkos PT, Zhang M. Role of pretreatment and conditioning processes on toxicity of lignocellulosic biomass hydrolysates. *Cellulose*. 2009, 16(4):743-762.
- [34] Kim D, Ximenes EA, Nichols NN, Cao GL, Frazer SE, Ladisch MR. Maleic acid treatment of biologically detoxified corn stover liquor. *Bioresource Technology*. 2016, 216:437-445.
- [35] He YQ, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9.
- [36] Kim Y, Kreke T, Hendrickson R, Parenti J, Ladisch MR. Fractionation of cellulase and fermentation inhibitors from steam pretreated mixed hardwood. *Bioresource Technology*. 2013, 135:30-38.
- [37] Dietrich K, Dumont MJ, Del Rio LF, Orsat V. Sustainable PHA production in integrated lignocellulose biorefineries. *New Biotechnology*. 2019, 49:161-168.
- [38] Zhang JA, Zhu ZN, Wang XF, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3.
- [39] Ran H, Zhang J, Gao QQ, Lin ZL, Bao J. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resiniae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7
- [40] Modenbach AA, Nokes SE. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings - A review. *Biomass & Bioenergy*. 2013, 56:526-544.
- [41] Viamajala S, McMillan JD, Schell DJ, Elander RT. Rheology of corn stover slurries at high solids concentrations - Effects of saccharification and particle size. *Bioresource Technology*. 2009, 100(2):925-934.
- [42] Dibble CJ, Shatova TA, Jorgenson JL, Stickel JJ. Particle morphology characterization and manipulation in biomass slurries and the effect on rheological properties and enzymatic conversion. *Biotechnology Progress*. 2011, 27(6):1751-1759.
- [43] Zhang J, Chu DQ, Huang J, Yu ZC, Dai GC, Bao J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105(4):718-728.
- [44] Gandla ML, Martin C, Jonsson LJ. Analytical enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass for conversion to biofuels and bio-based chemicals. *Energies*.

- 2018, 11.
- [45] Mosier N, Wyman C, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2005, 96(6):673-86.
- [46] Zhou HF, Zhu JY, Gleisner R, Qiu XQ, Horn E, Negron J. Pilot-scale demonstration of SPORL for bioconversion of lodgepole pine to bioethanol and lignosulfonate. *Holzforschung*. 2016, 70(1):21-30.
- [47] da Silva ARG, Errico M, Rong B. Techno-economic analysis of organosolv pretreatment process from lignocellulosic biomass. *Clean Technologies and Environmental Policy*. 2018, 20(7):1401-1412.
- [48] Wang Z, Grasvik J, Jonsson LJ, Winstrand S. Comparison of [HSO₄]⁻, [Cl]⁻ and [MeCO₂]⁻ as anions in pretreatment of aspen and spruce with imidazolium-based ionic liquids. *BMC Biotechnology*. 2017, 17(1):82.
- [49] Karatzos SK, Edye LA, Doherty WO. Sugarcane bagasse pretreatment using three imidazolium-based ionic liquids; mass balances and enzyme kinetics. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5(1):62.
- [50] Cao Y, Zhang R, Cheng T, Guo J, Xian M, Liu H. Imidazolium-based ionic liquids for cellulose pretreatment: recent progresses and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2017, 101(2):521-532.
- [51] Freitas C, Teixeira JA. Oxygen mass transfer in a high solids loading three-phase internal-loop airlift reactor. *Chemical Engineering Journal*. 2001, 84(1):57-61.
- [52] Chen Z, Liu HW, Zhang HT, Ying WY, Fang DY. Oxygen mass transfer coefficient in bubble column slurry reactor with ultrafine suspended particles and neural network prediction. *Canadian Journal of Chemical Engineering*. 2013, 91(3):532-541.
- [53] Tagawa A, Dohi N, Kawase Y. Volumetric gas-liquid mass transfer coefficient in aerated stirred tank reactors with dense floating solid particles. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2012, 51(4):1938-1948.
- [54] Baldwin SA, Cheng TC, Demopoulos GP. A contribution to the measurement of oxygen mass transfer in a laboratory pressure reactor. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2000, 75(8):665-672.
- [55] Ferreira P, Lopes M, Mota M, Belo I. Oxygen mass transfer impact on citric acid production by *Yarrowia lipolytica* from crude glycerol. *Biochemical Engineering Journal*. 2016, 110:35-42.
- [56] Calik G, Unlutabak F, Ozdamar TH. Product and byproduct distributions in glutamic acid fermentation by *Brevibacterium flavum*: effects of the oxygen transfer. *Biochemical Engineering Journal*. 2001, 9:91-101.
- [57] Garcia-Ochoa F, Gomez E. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*. 2009, 27(2):153-176.
- [58] Van't KR. Review of measuring methods and nonviscous gas-liquid mass transfer in stirred vessels. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*. 1979, 18:357-364.

- [59] Novak M, Klekner V. Comparison of various methods of K_{La} estimation in cultures of filamentous microorganisms. *Biotechnology Techniques*. 1988, 2(4):243-248.
- [60] Liu YS, Wu HY, Ho KP. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochemical Engineering Journal*. 2006, 27(3):331-335.
- [61] Puthli MS, Rathod VK, Pandit AB. Gas-liquid mass transfer studies with triple impeller system on a laboratory scale bioreactor. *Biochemical Engineering Journal*. 2005, 23(1):25-30.
- [62] Clarke KG, William PC, Smit MS, Harrison STL. Enhancement and repression of the volumetric oxygen transfer coefficient through hydrocarbon addition and its influence on oxygen transfer rate in stirred tank bioreactors. *Biochemical Engineering Journal*. 2006, 28(3):237-242.
- [63] Zhang TW, Wang TF, Wang JF. Analysis and measurement of mass transfer in airlift loop reactors. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2006, 14(5):604-610.
- [64] Clarke KG, Manyuchi MM. Methodology for advanced measurement accuracy of the overall volumetric oxygen transfer coefficient with application to hydrocarbon-aqueous dispersions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2012, 87(11):1615-1618.
- [65] Moraveji MK, Sajjadi B, Jafarkhani M, Davarnejad R. Experimental investigation and CFD simulation of turbulence effect on hydrodynamic and mass transfer in a packed bed airlift internal loop reactor. *International Communications in Heat and Mass Transfer*. 2011, 38(4):518-524.
- [66] Ranganathan P, Sivaraman S. Investigations on hydrodynamics and mass transfer in gas-liquid stirred reactor using computational fluid dynamics. *Chemical Engineering Science*. 2011, 66(14):3108-3124.
- [67] Fernandez FGA, Sevilla JMF, Perez JAS, Grima EM, Chisti Y. Airlift-driven external-loop tubular photobioreactors for outdoor production of microalgae: assessment of design and performance. *Chemical Engineering Science*. 2001, 56(8):2721-2732.
- [68] Chisti MY. *Airlift Bioreactors*. London: Elsevier, 1989.
- [69] Bird RB, Stewart WE, Lightfoot EN. *Transport Phenomena*. 1960.
- [70] Cockx A, Do-Quang Z, Audic JM, Line A, Roustan M. Global and local mass transfer coefficients in waste water treatment process by computational fluid dynamics. *Chemical Engineering and Processing*. 2001, 40(2):187-194.
- [71] Cockx A, Do-Quang Z, Line A, Roustan M. Use of computational fluid dynamics for simulating hydrodynamics and mass transfer in industrial ozonation towers. *Chemical Engineering Science*. 1999, 54(21):5085-5090.
- [72] Talvy S, Cockx A, Line A. Modeling of oxygen mass transfer in a gas-liquid airlift reactor. *Aiche Journal*. 2007, 53(2):316-326.
- [73] Higbie R. The rate of absorption of a pure gas into a still liquid during short periods of exposure. *Transactions of the American Institute of Chemical Engineers*. 1935, 35:365-389.
- [74] Xue SW, Yin, X. Numerical simulation of flow behavior and mass transfer in internal

- airlift-loop reactor. *Chemical Engineering (China)*. 2006, 34:23-27.
- [75] Tobajas M, Garcia-Calvo E, Siegel MH, Aplitz SE. Hydrodynamics and mass transfer prediction in a three-phase airlift reactor for marine sediment biotreatment. *Chemical Engineering Science*. 1999, 54(21):5347-5354.
- [76] Wen JP, Jia XQ, Feng W. Hydrodynamic and mass transfer of gas-liquid-solid three-phase internal loop airlift reactors with nanometer solid particles. *Chemical Engineering & Technology*. 2005, 28(1):53-60.
- [77] Huang QS, Yang C, Yu GZ, Mao ZS. CFD simulation of hydrodynamics and mass transfer in an internal airlift loop reactor using a steady two-fluid model. *Chemical Engineering Science*. 2010, 65(20):5527-5536.
- [78] Wu ZL, Huang YJ, Zhang CH, Zhu DY, Bian Z, Ding MX, Gao LX, Yang ZH. A simple and efficient way to synthesize optically active polyamides by solution polycondensation of Di-O-Methyl-L-Tartaryl Chloride with diamines. *Journal of Applied Polymer Science*. 2010, 117(6):3558-3567.
- [79] Junicke H, Kluge R, Steinborn D. Synthesis and characterization of novel platinum(IV) complexes with non-functionalized acetylated carbohydrates. *Journal of Inorganic Biochemistry*. 2000, 81(1-2):43-48.
- [80] Sauer M, Porro D, Mattanovich D, Branduardi P. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in Biotechnology*. 2008, 26(2):100-108.
- [81] Ajala EO, Ajala MA, Ogunniyi DS, Sunmonu MO. Kinetics of gluconic acid production and cell growth in a batch bioreactor by *Aspergillus niger* using breadfruit hydrolysate. *Journal of Food Process Engineering*. 2017, 40.
- [82] Fiedurek J. Production of gluconic acid by immobilized in pumice stones mycelium of *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture. *Biotechnology Letters*. 2001, 23(21):1789-1792.
- [83] Zhou XL, Zhou X, Huang L, Cao R, Xu Y. Efficient coproduction of gluconic acid and xylonic acid from lignocellulosic hydrolysate by Zn(II)-selective inhibition on whole-cell catalysis by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*. 2017, 243:855-859.
- [84] Elfari M, Ha SW, Bremus C, Merfort M, V K, Herrmann U, Sahn H, Gorisch H. A *Gluconobacter oxydans* mutant converting glucose almost quantitatively to 5-keto-D-gluconic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005, 66(6):668-674.
- [85] Gupta A, Felder M, Verma V, Cullum J, Qazi GN. A mutant of *Gluconobacter oxydans* deficient in gluconic acid dehydrogenase. *Fems Microbiology Letters*. 1999, 179(2):501-506.
- [86] Li KF, Mao XL, Liu L, Lin JP, Sun M, Wei DZ, Yang SL. Overexpression of membrane-bound gluconate-2-dehydrogenase to enhance the production of 2-keto-D-gluconic acid by *Gluconobacter oxydans*. *Microbial Cell Factories*. 2016, 15.
- [87] Yuan JF, Wu MB, Lin JP, Yang LR. Combinatorial metabolic engineering of industrial *Gluconobacter oxydans* DSM2343 for boosting 5-keto-D-gluconic acid accumulation. *BMC Biotechnology*. 2016, 16.
- [88] Adkins J, Pugh S, McKenna R, Nielsen DR. Engineering microbial chemical factories to

- produce renewable "biomonomers". *Frontiers in Microbiology*. 2012, 3.
- [89] Khoo HH. Review of bio-conversion pathways of lignocellulose-to-ethanol: Sustainability assessment based on land footprint projections. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2015, 46:100-119.
- [90] Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energy Conversion and Management*. 2011, 52(2):858-875.
- [91] Paulova L, Patakova P, Branska B, Rychtera M, Melzoch K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances*. 2015, 33(6):1091-1107.
- [92] Qi PY, Chen SS, Chen J, Zheng JW, Zheng XL, Yuan YZ. Catalysis and reactivation of ordered mesoporous carbon-supported gold nanoparticles for the base-free oxidation of glucose to gluconic acid. *ACS Catalysis*. 2015, 5(4):2659-2670.
- [93] Zhang HS, Zhang J, Bao J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource Technology*. 2016, 203:211-219.
- [94] Zhu JJ, Rong YY, Yang JL, Zhou X, Xu Y, Zhang LL, Chen JH, Yong Q, Yu SY. Integrated production of xylonic acid and bioethanol from acid-catalyzed steam-exploded corn stover. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015, 176(5):1370-1381.
- [95] Ikeda Y, Park EY, Okuda N. Bioconversion of waste office paper to gluconic acid in a turbine blade reactor by the filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 2006, 97(8):1030-1035.
- [96] Zhou X, Lu SS, Xu Y, Mo YX, Yu SY. Improving the performance of cell biocatalysis and the productivity of xylonic acid using a compressed oxygen supply. *Biochemical Engineering Journal*. 2015, 93:196-199.
- [97] Zhang HS, Liu G, Zhang J, Bao J. Fermentative production of high titer gluconic and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. *Bioresource Technology*. 2016, 219:123-131.
- [98] Zhang HS, Han XS, Wei CX, Bao J. Oxidative production of xylonic acid using xylose in distillation stillage of cellulosic ethanol fermentation broth by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*. 2017, 224:573-580.
- [99] Canete-Rodriguez AM, Santos-Duenas IM, Jimenez-Hornero JE, Ehrenreich A, Liebl W, Garcia-Garcia I. Gluconic acid: Properties, production methods and applications An excellent opportunity for agro-industrial by-products and waste bio-valorization. *Process Biochemistry*. 2016, 51(12):1891-1903.
- [100] Nalet C, Nonat A. Effects of functionality and stereochemistry of small organic molecules on the hydration of tricalcium silicate. *Cement and Concrete Research*. 2016, 87:97-104.
- [101] Li N, Ma D, Chen WY. Projection of cement demand and analysis of the impacts of carbon tax on cement industry in China. *Clean, Efficient and Affordable Energy for a Sustainable Future*. 2015, 75:1766-1771.
- [102] Ma BG, Tan HB, Xu YH, Li L, Zhang M. Cement hydration process of sodium gluconate. *Journal of Wuhan University of Technology*. 2008, 30(11):51-53.

- [103] Chun BW, Dair B, Macuch PJ, Wiebe D, Porteneuve C, Jeknavorian A. The development of cement and concrete additive. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2006, 131(1-3):645-658.
- [104] Wu JG, Wang PM. Mechanism of regulation set of sucrose in portland cement. *Journal of the Chinese ceramic society*. 1998, 26(2):164-170.
- [105] 陈建奎. 混凝土外加剂原理与应用 北京: 中国计划出版社, 2004.
- [106] Milestone NB. Hydration of tricalcium silicate in the presence of lignosulfonates, glucose, and sodium gluconate. *Journal of the American Ceramic Society*. 1979, 62(7-8):321-324.
- [107] Paria S, Yuet PK. Solidification-stabilization of organic and inorganic contaminants using portland cement: a literature review. *Environmental Reviews*. 2006, 14(4):217-255.
- [108] Angumeenal AR, Venkappayya D. An overview of citric acid production. *LWT-Food Science and Technology*. 2013, 50(2):367-370.
- [109] Cavallo E, Charreau H, Cerrutti P, Foresti ML. *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production. *Fems Yeast Research*. 2017, 17.
- [110] Lofty WA, Ghanem KM, El-Helow ER. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresource Technology*. 2007, 98(18):3470-3477.
- [111] Tan QL, Wen ZG, Chen JN. Goal and technology path of CO₂ mitigation in China's cement industry: from the perspective of co-benefit. *Journal of Cleaner Production*. 2016, 114:299-313.
- [112] Show PL, Oladele KO, Siew QY, Zakry FAA, Lan JCW, Ling TC. Overview of citric acid production from *Aspergillus niger*. *Frontiers in Life Science*. 2015, 8(3):271-283.
- [113] Themelis DG, Tzanavaras PD. Reagent-injection spectrophotometric determination of citric acid in beverages and pharmaceutical formulations based on its inhibitory effect on the iron(III) catalytic oxidation of 2,4-diaminophenol by hydrogen peroxide. *Analytica Chimica Acta*. 2001, 428(1):23-30.
- [114] Hu W, Li WJ, Yang HQ, Chen JH. Current strategies and future prospects for enhancing microbial production of citric acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103(1):201-209.
- [115] Sun XW, Wu HF, Zhao GH, Li ZM, Wu XH, Liu H, Zheng ZM. Morphological regulation of *Aspergillus niger* to improve citric acid production by chsC gene silencing. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2018, 41(7):1029-1038.
- [116] Drake JW. The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes. *Molecular Strategies in Biological Evolution*. 1999, 870:100-107.
- [117] Zhang N, Jian JC, Yang J, Wei M, Zhao J, Xu H, Xie JC, Tong YJ, Yu L. Citric acid production from acorn starch by tannin tolerance mutant *Aspergillus niger* AA120. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2018, <https://doi.org/10.1007/s12010-018-2902-4>.
- [118] Barrington S, Kim JS, Wang L, Kim JW. Optimization of citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in a column bioreactor. *Korean Journal of Chemical*

- Engineering. 2009, 26(2):422-427.
- [119] Ferreira P, Lopes M, Mota M, Belo I. Oxygen transfer rate and pH as major operating parameters of citric acid production from glycerol by *Yarrowia lipolytica* W29 and CBS 2073. *Chemical Papers*. 2016, 70(7):869-876.
- [120] Liu XY, Xu JX, Xia J, Lv JS, Wu Z, Deng YF. Improved production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* using oleic acid as the oxygen-vector and co-substrate. *Engineering in Life Sciences*. 2016, 16(5):424-431.
- [121] Xu DB, Madrid CP, Rohr M, Kubicek CP. The influence of type and concentration of the carbon source on production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1989, 30:553-558.
- [122] Guilherme AA, Pinto GAS, Rodrigues S. Optimization of trace metals concentration on citric acid production by *Aspergillus niger* NRRL 2001. *Food and Bioprocess Technology*. 2008, 1(3):246-253.
- [123] Magnuson JK, Lasure LL. Organic acid production by filamentous fungi. In: Tkacz JS, Lange L, eds. *Advances in fungal biotechnology for industry, agriculture, and medicine*. New York: Kluwer, 2004:307-340.
- [124] Sinha J, Bae JT, Park JP, Song CH, Yun JW. Effect of substrate concentration on broth rheology and fungal morphology during exo-biopolymer production by *Paecilomyces japonica* in a batch bioreactor. *Enzyme and Microbial Technology*. 2001, 29(6-7):392-399.
- [125] Gehrig I, Bart HJ, Anke T, Germerdonk R. Influence of morphology and rheology on the production characteristics of the basidiomycete *Cyathus striatus*. *Biotechnology and Bioengineering*. 1998, 59:525-533.
- [126] Berovic M, Cimerman A. Redox potential in submerged citric acid on beet molasses substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1982, 16:185.
- [127] Grewal H, Kalra K. Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances*. 1995, 13:209-234.
- [128] Kubicek CP, Zehentgruber O, El-Kalak H, Rohr M. Regulation of citric acid production by oxygen: effect of dissolved oxygen tension on adenylate levels and respiration in *Aspergillus niger*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 1980, 9:101-115.
- [129] Soccol CR, Vandenberghe LPS, Rodrigues C, Pandey A. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, 44(2):141-149.
- [130] Ward OP, Singh A. Omega-3/6 fatty acids: Alternative sources of production. *Process Biochemistry*. 2005, 40(12):3627-3652.
- [131] SanGiovanni JP, Chew EY. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2005, 24(1):87-138.
- [132] Huang C, Chen XF, Xiong L, Chen XD, Ma LL, Chen Y. Single cell oil production from low-cost substrates: The possibility and potential of its industrialization. *Biotechnology Advances*. 2013, 31(2):129-139.
- [133] Sitepu IR, Garay LA, Sestric R, Levin D, Block DE, German JB, Boundy-Mills KL.

- Oleaginous yeasts for biodiesel: Current and future trends in biology and production. *Biotechnology Advances*. 2014, 32(7):1336-1360.
- [134] Tanimura A, Takashima M, Sugita T, Endoh R, Kikukawa M, Yamaguchi S, Sakuradani E, Ogawa J, Ohkuma M, Shima J. *Cryptococcus terricola* is a promising oleaginous yeast for biodiesel production from starch through consolidated bioprocessing. *Scientific Reports*. 2014, 4.
- [135] Meng X, Yang JM, Xu X, Zhang L, Nie QJ, Xian M. Biodiesel production from oleaginous microorganisms. *Renewable Energy*. 2009, 34(1):1-5.
- [136] Patel A, Arora N, Mehtani J, Pruthi V, Pruthi PA. Assessment of fuel properties on the basis of fatty acid profiles of oleaginous yeast for potential biodiesel production. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2017, 77:604-616.
- [137] Wang J, Gao QQ, Zhang HZ, Bao J. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. *Bioresource Technology*. 2016, 218:892-901.
- [138] Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006, 101:87-96.
- [139] Anderson RA. Diversity of eukaryotic algae. *Biodiversity and Conservation*. 1992, 1:267-292.
- [140] Pulz O, Gross W. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 65(6):635-648.
- [141] DeMello JA, Carmichael CA, Peacock EE, Nelson RK, Arey JS, Reddy CM. Biodegradation and environmental behavior of biodiesel mixtures in the sea: An initial study. *Marine Pollution Bulletin*. 2007, 54(7):894-904.
- [142] Alvarez HM, Steinbuchel A. Triacylglycerols in prokaryotic microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002, 60(4):367-376.
- [143] Steinbuchel AF, B. Bacterial and other biological systems for polyester production. *Trends in Biotechnology*. 1998, 16:419-427.
- [144] Bharathiraja B, Sridharan S, Sowmya V, Yuvaraj D, Praveenkumar R. Microbial oil - A plausible alternate resource for food and fuel application. *Bioresource Technology*. 2017, 233:423-432.
- [145] Beligon V, Christophe G, Fontanille P, Larroche C. Microbial lipids as potential source to food supplements. *Current Opinion in Food Science*. 2016, 7:35-42.
- [146] Leiva-Candia DE, Pinzi S, Redel-Macias MD, Koutinas A, Webb C, Dorado MP. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel. *Fuel*. 2014, 123:33-42.
- [147] Yu XC, Zheng YB, Dorgan KM, Chen SL. Oil production by oleaginous yeasts using the hydrolysate from pretreatment of wheat straw with dilute sulfuric acid. *Bioresource Technology*. 2011, 102(10):6134-6140.
- [148] Huang C, Zong MH, Wu H, Liu QP. Microbial oil production from rice straw hydrolysate by *Trichosporon fermentans*. *Bioresource Technology*. 2009, 100(19):4535-4538.
- [149] Ruan ZH, Zanotti M, Wang XQ, Ducey C, Liu Y. Evaluation of lipid accumulation from

- lignocellulosic sugars by *Mortierella isabellina* for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2012, 110:198-205.
- [150] Chen XF, Huang C, Yang XY, Xiong L, Chen XD, Ma LL. Evaluating the effect of medium composition and fermentation condition on the microbial oil production by *Trichosporon cutaneum* on corncob acid hydrolysate. *Bioresource Technology*. 2013, 143:18-24.
- [151] Gao QQ, Cui ZY, Zhang J, Bao J. Lipid fermentation of corncob residues hydrolysate by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2014, 152:552-556.
- [152] Wang JF, Li RM, Lu D, Ma S, Yan YP, Li WJ. A quick isolation method for mutants with high lipid yield in oleaginous yeast. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2009, 25(5):921-925.
- [153] Sitepu I, Selby T, Lin T, Zhu S, Boundy-Mills K. Carbon source utilization and inhibitor tolerance of 45 oleaginous yeast species. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2014, 41(7):1061-1070.
- [154] Li RM, Wang JF, Ma S, Yan YP, Li WJ. Selection of yeast high in lipids-yield by fatty acid synthetase inhibitor and phosphoric acid-vanillin reaction. *Microbiology*. 2008, 35(4):545-549.
- [155] Tanimura A, Takashima M, Sugita T, Endoh R, Kikukawa M, Yamaguchi S, Sakuradani E, Ogawa J, Shima J. Selection of oleaginous yeasts with high lipid productivity for practical biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2014, 153:230-235.
- [156] Rostron KA, Rolph CE, Lawrence CL. Nile red fluorescence screening facilitating neutral lipid phenotype determination in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, and the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of General and Molecular Microbiology*. 2015, 108(1):97-106.
- [157] Tapia EV, Anschau A, Coradini ALV, Franco TT, Deckmann AC. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. *Amb Express*. 2012, 2.
- [158] Liu L, Pan A, Spofford C, Zhou N, Alper HS. An evolutionary metabolic engineering approach for enhancing lipogenesis in *Yarrowia lipolytica*. *Metabolic Engineering*. 2015, 29:36-45.
- [159] Spiden EM, Yap BHJ, Hill DRA, Kentish SE, Scales PJ, Martin GJO. Quantitative evaluation of the ease of rupture of industrially promising microalgae by high pressure homogenization. *Bioresource Technology*. 2013, 140:165-171.
- [160] Dong T, Knoshaug EP, Pienkos PT, Laurens LML. Lipid recovery from wet oleaginous microbial biomass for biofuel production: A critical review. *Applied Energy*. 2016, 177:879-895.
- [161] Yi EC, Hackett M. Rapid isolation method for lipopolysaccharide and lipid A from Gram-negative bacteria. *Analyst*. 2000, 125(4):651-656.
- [162] Lee HS, Lee H, Im S, Lee YS, Lee KY, Choi YJ. Comparison of various detection methods of *Mycobacterium* species in formalin-fixed paraffin-embedded tissue with chronic granulomatous inflammation. *Korean Journal of Pathology*. 2010, 44(3):259-266.

- [163] Lee AK, Lewis DM, Ashman PJ. Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass & Bioenergy*. 2012, 46:89-101.
- [164] Keris-Sen UD, Sen U, Soydemir G, Gurol MD. An investigation of ultrasound effect on microalgal cell integrity and lipid extraction efficiency. *Bioresource Technology*. 2014, 152:407-413.
- [165] Wang M, Yuan WQ, Jiang XN, Jing Y, Wang ZC. Disruption of microalgal cells using high-frequency focused ultrasound. *Bioresource Technology*. 2014, 153:315-321.
- [166] Yu XC, Dong T, Zheng YB, Miao C, Chen SL. Investigations on cell disruption of oleaginous microorganisms: Hydrochloric acid digestion is an effective method for lipid extraction. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 2015, 117(5):730-737.
- [167] Zhang XL, Yan S, Tyagi RD, Drogui P, Surampalli RY. Ultrasonication assisted lipid extraction from oleaginous microorganisms. *Bioresource Technology*. 2014, 158:253-261.
- [168] Kruger JS, Cleveland NS, Yeap RY, Dong T, Ramirez KJ, Nagle NJ, Lowell AC, Beckham GT, McMillan JD, Bidy MJ. Recovery of fuel-precursor lipids from oleaginous yeast. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018, 6(3):2921-2931.
- [169] Shah S, Sharma A, Gupta MN. Extraction of oil from *Jatropha curcas* L. seed kernels by enzyme assisted three phase partitioning. *Industrial Crops and Products*. 2004, 20(3):275-279.
- [170] Cho HS, Oh YK, Park SC, Lee JW, Park JY. Effects of enzymatic hydrolysis on lipid extraction from *Chlorella vulgaris*. *Renewable Energy*. 2013, 54:156-160.
- [171] You JY, Peng C, Liu X, Ji XJ, Lu JM, Tong QQ, Wei P, Cong LL, Li ZY, Huang H. Enzymatic hydrolysis and extraction of arachidonic acid rich lipids from *Mortierella alpina*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(10):6088-6094.
- [172] Gerken HG, Donohoe B, Knoshaug EP. Enzymatic cell wall degradation of *Chlorella vulgaris* and other microalgae for biofuels production. *Planta*. 2013, 237(1):239-253.
- [173] Fu CC, Hung TC, Chen JY, Su CH, Wu WT. Hydrolysis of microalgae cell walls for production of reducing sugar and lipid extraction. *Bioresource Technology*. 2010, 101(22):8750-8754.
- [174] Yap BHJ, Dumsday GJ, Scales PJ, Martin GJO. Energy evaluation of algal cell disruption by high pressure homogenisation. *Bioresource Technology*. 2015, 184:280-285.
- [175] Doucha J, Livansky K. Influence of processing parameters on disintegration of *Chlorella* cells in various types of homogenizers. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 81(3):431-440.
- [176] Gerde JA, Montalbo-Lomboy M, Yao LX, Grewell D, Wang T. Evaluation of microalgae cell disruption by ultrasonic treatment. *Bioresource Technology*. 2012, 125:175-181.
- [177] Lai YS, Parameswaran P, Li A, Baez M, Rittmann BE. Effects of pulsed electric field treatment on enhancing lipid recovery from the microalga, *Scenedesmus*. *Bioresource Technology*. 2014, 173:457-461.
- [178] Lee JY, Yoo C, Jun SY, Ahn CY, Oh HM. Comparison of several methods for effective lipid extraction from microalgae. *Bioresource Technology*. 2010, 101:S75-S77.

- [179] Miao C, Chakraborty M, Chen SL. Impact of reaction conditions on the simultaneous production of polysaccharides and bio-oil from heterotrophically grown *Chlorella sorokiniana* by a unique sequential hydrothermal liquefaction process. *Bioresource Technology*. 2012, 110:617-627.
- [180] Laurens LML, Nagle N, Davis R, Sweeney N, Van Wychen S, Lowell A, Pienkos PT. Acid-catalyzed algal biomass pretreatment for integrated lipid and carbohydrate-based biofuels production. *Green Chemistry*. 2015, 17(2):1145-1158.
- [181] Kim DY, Oh YK, Park JY, Kim B, Choi SA, Han JI. An integrated process for microalgae harvesting and cell disruption by the use of ferric ions. *Bioresource Technology*. 2015, 191:469-474.
- [182] Yoo G, Yoo Y, Kwon JH, Darpito C, Mishra SK, Pak K, Park MS, Im SG, Yang JW. An effective, cost-efficient extraction method of biomass from wet microalgae with a functional polymeric membrane. *Green Chemistry*. 2014, 16(1):312-319.
- [183] Jin GJ, Yang F, Hu CM, Shen HW, Zhao ZBK. Enzyme-assisted extraction of lipids directly from the culture of the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides*. *Bioresource Technology*. 2012, 111:378-382.
- [184] Huo SH, Wang ZM, Cui FJ, Zou B, Zhao PX, Yuan ZH. Enzyme-Assisted Extraction of Oil from Wet Microalgae *Scenedesmus sp* G4. *Energies*. 2015, 8(8):8165-8174.
- [185] Lee YC, Lee HU, Lee K, Kim B, Lee SY, Choi MH, Farooq W, Choi JS, Park JY, Lee J, Oh YK, Huh YS. Aminoclay-conjugated TiO₂ synthesis for simultaneous harvesting and wet-disruption of oleaginous *Chlorella sp*. *Chemical Engineering Journal*. 2014, 245:143-149.
- [186] Galbe M, Sassner P, Wingren A, Zacchi G. Process engineering economics of bioethanol production. *Biofuels*. 2007, 108:303-327.
- [187] Larsen J, Petersen MO, Thirup L, Li HW, Iversen FK. The IBUS process - Lignocellulosic bioethanol close to a commercial reality. *Chemical Engineering & Technology*. 2008, 31(5):765-772.
- [188] Jorgensen H, Vibe-Pedersen J, Larsen J, Felby C. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*. 2007, 96(5):862-870.
- [189] Sivaiah M, Majumder SK. Mass transfer and mixing in an ejector-induced downflow slurry bubble column. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2013, 52(35):12661-12671.
- [190] Su YK, Willis LB, Jeffries TW. Effects of aeration on growth, ethanol and polyol accumulation by *Spathaspora passalidarum* NRRL Y-27907 and *Scheffersomyces stipitis* NRRL Y-7124. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112(3):457-469.
- [191] Shu CH, Liao CC. Optimization of L-phenylalanine production of *Corynebacterium glutamicum* under product feedback inhibition by elevated oxygen transfer rate. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002, 77(2):131-141.
- [192] Mussatto SI, Roberto IC. Kinetic behavior of *Candida guilliermondii* yeast during xylitol production from highly concentrated hydrolysate. *Process Biochemistry*. 2004, 39(11):1433-1439.

- [193] Bellido C, Gonzalez-Benito G, Coca M, Lucas S, Garcia-Cubero MT. Influence of aeration on bioethanol production from ozonized wheat straw hydrolysates using *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*. 2013, 133:51-58.
- [194] Kinnarinen T, Golmaei M, Hakkinen A. Use of filter aids to improve the filterability of enzymatically hydrolyzed biomass suspensions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2013, 52(42):14955-14964.
- [195] Sievers DA, Lischeske JJ, Biddy MJ, Stickel JJ. A low-cost solid-liquid separation process for enzymatically hydrolyzed corn stover slurries. *Bioresource Technology*. 2015, 187:37-42.
- [196] Sreenath HK, Moldes AB, Koegel RG, Straub RJ. Lactic acid production from agriculture residues. *Biotechnology Letters*. 2001, 23(3):179-184.
- [197] Liu W, Wang YM, Yu ZC, Bao J. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2012, 118:13-18.
- [198] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, al e. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples, Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL: Golden, CO,. 2008.
- [199] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, al e. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, Laboratory Analytical Procedure (LAP). NREL: Golden, CO. 2012.
- [200] Shuler ML, Kargi F. *Bioprocess Engineering*. 2002.
- [201] Luchterhand B, Fischoder T, Grimm AR, Wewetzer S, Wunderlich M, Schleputz T, Buechs J. Quantifying the sensitivity of *G-oxydans* ATCC 621H and DSM 3504 to osmotic stress triggered by soluble buffers. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2015, 42(4):585-600.
- [202] Silberbach M, Maier B, Zimmermann M, Buchs J. Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*: characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003, 62(1):92-98.
- [203] Krajewski V, Simic P, Mouncey NJ, Bringer S, Sahm H, Bott M. Metabolic engineering of *Gluconobacter oxydans* for improved growth rate and growth yield on glucose by elimination of gluconate formation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76(13):4369-4376.
- [204] Shinagawa E, Ano Y, Yakushi T, Adachi O, Matsushita K. Solubilization, purification, and properties of membrane-bound D-glucono-delta-lactone hydrolase from *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*. 2009, 73(1):241-244.
- [205] Cannella D, Hsieh CWC, Felby C, Jorgensen H. Production and effect of aldonic acids during enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high dry matter content. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5.
- [206] Kim M, Day DF. Use of cellulase inhibitors to produce cellobiose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 162(5):1379-1390.
- [207] Humbird DD, R. Tao, L. Kinchin, C. Hsu, D. Aden, A. Schoen, P. Lukas, J. Olthof, B. Worley, M. Sexton, D. Dudgeon, D. Process design and economics for biochemical

- conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. NREL/TP-5100-47764. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2011, August 25.
- [208] Sun Y, Cheng JJ. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*. 2005, 96(14):1599-1606.
- [209] Peng BY, Shen Y, Li XW, Chen X, Hou J, Bao XM. Improvement of xylose fermentation in respiratory-deficient xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*. 2012, 14(1):9-18.
- [210] Sedlak M, Ho NWY. Production of ethanol from cellulosic biomass hydrolysates using genetically engineered *Saccharomyces* yeast capable of cofermenting glucose and xylose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004, 113:403-416.
- [211] Monosi S, Moriconi G, Pauri M, Collepari M. Influence of lignosulphonate, glucose and gluconate on the C₃A hydration. *Cement and Concrete Research*. 1983, 13:568-574.
- [212] Meyer M, Schweiger P, Deppenmeier U. Effects of membrane-bound glucose dehydrogenase overproduction on the respiratory chain of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013, 97(8):3457-3466.
- [213] Zhao K, Qiao QG, Chu DQ, Gu HQ, Dao TH, Zhang J, Bao J. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*. 2013, 135:481-489.
- [214] Zhou PP, Meng J, Bao J. Fermentative production of high titer citric acid from corn stover feedstock after dry dilute acid pretreatment and biodetoxification. *Bioresource Technology*. 2017, 224:563-572.
- [215] Brummer V, Skryja P, Jurena T, Hlavacek V, Stehlik P. Suitable technological conditions for enzymatic hydrolysis of waste paper by NovozymesA (R) enzymes NS50013 and NS50010. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014, 174(4):1299-1308.
- [216] Liu K, Zhang J, Bao J. Two stage hydrolysis of corn stover at high solids content for mixing power saving and scale-up applications. *Bioresource Technology*. 2015, 196:716-720.
- [217] Glasser FP. Fundamental aspects of cement solidification and stabilization. *Journal of Hazardous Materials*. 1997, 52:151-170.
- [218] Alonso C, Fernandez L. Dehydration and rehydration processes of cement paste exposed to high temperature environments. *Journal of Materials Science*. 2004, 39(9):3015-3024.
- [219] Anjos MAS, Martinelli AE, Melo DMA, Renovato T, Souza PDP, Freitas JC. Hydration of oil well cement containing sugarcane biomass waste as a function of curing temperature and pressure. *Journal of Petroleum Science and Engineering*. 2013, 109:291-297.
- [220] Giergiczny Z. The hydraulic activity of high calcium fly ash. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2006, 83(1):227-232.
- [221] Jamsawang P, Nuansrithong N, Voottipruex P, Songpiriyakij S, Jongpradist P. Laboratory investigations on the swelling behavior of composite expansive clays stabilized with shallow and deep clay-cement mixing methods. *Applied Clay Science*. 2017, 148:83-94.
- [222] Balat. M BH, Oz, C. Progress in bioethanol processing. *Progress in Energy and*

- Combustion Science. 2008, 34(5):551-573.
- [223] Hou WL, Li L, Bao J. Oxygen transfer in high solids loading and highly viscous lignocellulose hydrolysates. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2017, 5(12):11395-11402.
- [224] Li X, Zhou J, Ouyang SP, Ouyang J, Yong Q. Fumaric acid production from alkali-pretreated corncob by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation combined with separated hydrolysis and fermentation at high solids loading. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2017, 181(2):573-583.
- [225] Hang YD, Woodams EE. Production of citric acid from corncobs by *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*. 1998, 65:251-253.
- [226] Liu XY, Lv JS, Zhang T, Deng YF. Direct conversion of pretreated straw cellulose into citric acid by co-cultures of *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b and immobilized *Trichoderma reesei* mycelium. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014, 173(2):501-509.
- [227] Liu XY, Lv JS, Zhang T, Deng YF. Citric acid production from hydrolysate of pretreated straw cellulose by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using batch and fed-batch cultivation. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*. 2015, 45(8):825-835.
- [228] Yang L, Lubeck M, Souroullas K, Lubeck PS. Co-consumption of glucose and xylose for organic acid production by *Aspergillus carbonarius* cultivated in wheat straw hydrolysate. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*. 2016, 32.
- [229] Khosravi-Darani K, Zoghi A. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane baggase: Experimental design for citric acid production. *Bioresource Technology*. 2008, 99(15):6986-6993.
- [230] Olofsson K, Bertilsson M, Liden G. A short review on SSF - an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. 2008, 1.
- [231] Jin MJ, Sarks C, Bals BD, Posawatz N, Gunawan C, Dale BE, Balan V. Toward high solids loading process for lignocellulosic biofuel production at a low cost. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017, 114(5):980-989.
- [232] Kawaguchi H, Hasunuma T, Ogino C, Kondo A. Bioprocessing of bio-based chemicals produced from lignocellulosic feedstocks. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016, 42:30-39.
- [233] Ohgren K, Rudolf A, Galbe M, Zacchi G. Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass & Bioenergy*. 2006, 30(10):863-869.
- [234] Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*. 2007, 25(3):244-263.
- [235] Hou WL, An RX, Zhang J, Bao J. On-site measurement and modeling of rheological property of corn stover hydrolysate at high solids content. *Biochemical Engineering Journal*. 2016, 107:61-65.
- [236] Varatharajan K, Cheralathan M. Influence of fuel properties and composition on NOx

- emissions from biodiesel powered diesel engines: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2012, 16(6):3702-3710.
- [237] Hoekman SK, Broch A, Robbins C, Cenicerros E, Natarajan M. Review of biodiesel composition, properties, and specifications. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2012, 16(1):143-169.
- [238] Chen X, Li ZH, Zhang XX, Hu FX, Ryu DDY, Bao J. Screening of oleaginous yeast strains tolerant to lignocellulose degradation compounds. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 159(3):591-604.
- [239] Sitepu IR, Jin MJ, Fernandez JE, Sousa LD, Balan V, Boundy-Mills KL. Identification of oleaginous yeast strains able to accumulate high intracellular lipids when cultivated in alkaline pretreated corn stover. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, 98(17):7645-7657.
- [240] Back A, Rossignol T, Krier F, Nicaud JM, Dhulster P. High-throughput fermentation screening for the yeast *Yarrowia lipolytica* with real-time monitoring of biomass and lipid production. *Microbial Cell Factories*. 2016, 15.
- [241] Huang X, Wang YM, Liu W, Bao J. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(20):9705-9709.
- [242] Fu ZB, Verderame TD, Leighton JM, Sampey BP, Appelbaum ER, Patel PS, Aon JC. Exometabolome analysis reveals hypoxia at the up-scaling of a *Saccharomyces cerevisiae* high-cell density fed-batch biopharmaceutical process. *Microbial Cell Factories*. 2014, 13.
- [243] Delahaye M, Lawrence K, Ward SJ, Hoare M. An ultra scale-down analysis of the recovery by dead-end centrifugation of human cells for therapy. *Biotechnology and Bioengineering*. 2015, 112(5):997-1011.
- [244] Conway JH, Sloane NJA. Sphere packings, lattices, and groups. New York: Springer, 1993.
- [245] Schmidt M. Survival and cytokinesis of *Saccharomyces cerevisiae* in the absence of chitin. *Microbiology-Sgm*. 2004, 150:3253-3260.
- [246] Galafassi S, Cucchetti D, Pizza F, Franzosi G, Bianchi D, Compagno C. Lipid production for second generation biodiesel by the oleaginous yeast *Rhodotorula graminis*. *Bioresource Technology*. 2012, 111:398-403.
- [247] Gong ZW, Shen HW, Yang XB, Wang Q, Xie HB, Zhao ZBK. Lipid production from corn stover by the oleaginous yeast *Cryptococcus curvatus*. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7.
- [248] Wang J, Gao QQ, Bao J. Genome sequence of *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271: An oleaginous yeast with excellent lignocellulose derived inhibitor tolerance. *Journal of Biotechnology*. 2016, 228:50-51.
- [249] Zeng JJ, Zheng YB, Yu XC, Yu L, Gao DF, Chen SL. Lignocellulosic biomass as a carbohydrate source for lipid production by *Mortierella isabellina*. *Bioresource Technology*. 2013, 128:385-391.
- [250] Huang C, Chen XF, Xiong L, Chen XD, Ma LL. Oil production by the yeast *Trichosporon dermatis* cultured in enzymatic hydrolysates of corncobs. *Bioresource Technology*. 2012,

110:711-714.

- [251] Tampitak S, Louhasakul Y, Cheirsilp B, Prasertsan P. Lipid production from hemicellulose and holocellulose hydrolysate of palm empty fruit bunches by newly isolated oleaginous yeasts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015, 176(6):1801-1814.
- [252] Dien BS, O'Bryan PJ, Hector RE, Iten LB, Mitchell RB, Qureshi N, Sarath G, Vogel KP, Cotta MA. Conversion of switchgrass to ethanol using dilute ammonium hydroxide pretreatment: influence of ecotype and harvest maturity. *Environmental Technology*. 2013, 34(13-14):1837-1848.
- [253] Chen XD, Xiong L, Luo CR, Ding F, Pan W, Xu ZB. One method of low-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass by micro-units infiltration bed. Volume CN 102260754 B. Chinese, 2012.

学术成果

已发表论文:

1. **Weiliang Hou**, Lang Li, Jie Bao*. Oxygen transfer in high solids loading and highly viscous lignocellulose hydrolysates. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. 2017, 5: 11395-11402. (IF=6.140) (对应本论文第二章)
2. **Weiliang Hou**¹, Jialun Kan¹, Jie Bao*. Rheology evolution of high solids content and highly viscous lignocellulose system in biorefinery fermentations for production of biofuels and biochemicals. **Fuel**. (IF=4.908) (已接收) (对应本论文第二章)
3. Ruimiao Yao¹, **Weiliang Hou**¹, Jie Bao*. Complete oxidative conversion of lignocellulose derived non-glucose sugars to sugar acids by *Gluconobacter oxydans*. **Bioresource Technology**. 2017, 244: 1188-1192. (IF=5.807) (对应本论文第三章)
4. **Weiliang Hou**, Maofeng Zhang, Jie Bao*. Cascade hydrolysis and fermentation of corn stover for production of high titer gluconic and xylonic acids. **Bioresource Technology**. 2018, 264: 395-399. (IF=5.807) (对应本论文第三章)
5. **Weiliang Hou**, Jie Bao*. Evaluation of cement retarding performance of cellulosic sugar acids. **Construction and Building Materials**. 2019, 202: 522-527. (IF=3.485) (对应本论文第三章)
6. **Weiliang Hou**, Jie Bao*. Simultaneous saccharification and aerobic fermentation of high titer cellulosic citric acid by filamentous fungus *Aspergillus niger*. **Bioresource Technology**. 2018, 253: 72-78. (IF=5.807) (对应本论文第四章)
7. Shuai Shao, Jian Zhang, **Weiliang Hou**, Abdul Sattar Qureshi, Jie Bao. Lower pressure heating steam is practical for the distributed dry dilute sulfuric acid pretreatment. **Bioresource Technology**. 2017, 238: 744-748. (IF=5.807)

已发表书籍:

8. **Weiliang Hou**, Jie Bao*. Book Chapter. Fungal cellulolytic enzymes. Rheology characterization of lignocellulose feedstock during high solids content pretreatment and hydrolysis. **Springer**. 2018. (对应本论文第二章)

待发表论文:

9. **Weiliang Hou**¹, Ci Jin¹, Ruimiao Yao¹, Pingping Zhou, Hongsen Zhang, Jie Bao*. Long term adaptive evolution of *Gluconobacter oxydans* improves the conversion rate of non-glucose sugars derived from lignocellulose biomass. **Bioresource Technology**. (IF=5.807) (小修) (对应本论文第三章)

-
10. **Weiliang Hou**¹, Liao Zhao¹, Mingshan Hu¹, Jie Bao*. Precise and whole-throughput screening of the lightest oleaginous yeast cells for high titer cellulosic lipid production. In preparation. (对应本论文第五章)

学术会议论文:

11. **Weiliang Hou**, Jialun Kan, Hongsen Zhang, Jie Bao. Oxygen mass transfer in highly viscous corn stover slurry for facilitation of aerobic fermentations. Biotechnology International Congress (BIC) "Biomass energy and its refinery". 2016, Bangkok, Thailand.

申请专利:

12. 鲍杰, **侯伟亮**, 姚瑞苗, 张宏森, 金慈, 张建。一株高效利用非葡萄糖碳源的氧化葡糖杆菌适应性进化方法及其应用。专利申请号: 201811308621.0。
13. 鲍杰, 赵瞭, **侯伟亮**, 胡明珊, 张建。一种离心筛选具有高含油率油脂酵母菌株的方法及其应用。专利申请号: 201910186710.0。

致谢

光阴似箭，岁月如梭，转眼间已至毕业之际。回首几年博士生涯，艰辛与收获并存，友谊与亲情同在。你们的陪伴是我莫大的欣慰，特此敬上衷心谢意。

首先感谢我敬爱的导师鲍杰教授。鲍老师为人和善，治学严谨，心无旁骛，专注于学术科研事业。我本身的学术底子比较薄弱，是鲍老师手把手教会我如何写好一篇优秀学术论文和如何进行科技创新。还记得我写第一篇 SCI 论文时，鲍老师不厌其烦地一句话一句话帮我修改，甚至连标点符号都没放过，最终改了 20-30 遍才最终定稿。鲍老师不仅是我开启了我的学术生涯，更培养了我解决问题的能力 and 对待生活的态度。在此毕业之际，向鲍老师表示衷心感谢和热忱敬意！

其次感谢张建老师、高秋强老师和刘刚老师。他们把大部分精力放在了科研上，起到了很好的模范带头作用，鼓舞着我们前行。感谢张老师在葡萄糖酸发酵方面的指导性意见和平时对我的科研与生活的关心与支持，特别感谢张老师无私地帮我找了住房。感谢高老师在油脂发酵研究方面的指导及日常的帮助。非常感谢刘刚老师在 Aspen Plus 流程模拟计算方面的教导及平日的关心。

此外感谢生物炼制课题组关心和帮助我的所有同学。感谢安瑞鑫师姐和张龙平师兄，是你们一步步教会了我实验操作、CFD 相关软件的使用、流变建模和计算模拟。感谢何燕青师兄在科研和论文写作上提供的重要帮助。感谢张宏森师兄在葡萄糖酸发酵相关研究方面的建议和交流。感谢我们同届几位同学的帮助与陪伴：周平平在柠檬酸发酵方面的指导建议、邵帅在预处理相关研究上交流及邱忠洋在油脂细胞分子层面解析的建议。感谢韩响身和温经柏在科研和生活上交流与分享。感谢胡明珊在油脂酵母菌株筛选方面的极大贡献和建设性意见。感谢周奇圣在葡萄糖酸发酵液产物分离方面的交流与帮助。感谢阚家伦在发酵流变研究方面的突出贡献。感谢金慈在葡萄糖酸驯化菌株分子水平解析方面的工作与贡献。感谢赵瞭在油脂细胞解析方面的大量工作。另外感谢课题组其他帮助过我的同学，包括：魏成香、谌泽宇、董维涛、李莉、柳云龙、颜钊、卢敏萍、李园园、方纯、黄振、郑理想、韩涛、苏雷等其他师兄师姐及师弟师妹。

另外感谢河南工业大学王平诸教授和李浪老师。王平诸教授教会了生物反应器的三维建模和设计，是我科研事业的启蒙老师。李浪老师耐心细致地指导了我的本科毕业设计，并无私地把我带入 CFD 领域，极大激励了我的科研兴趣。

最后感谢我的家人。感谢父母养育之恩，及给予我的莫大关心、理解与支持。没有你们作为强大后盾，我不可能坚持到今天。感谢我的爱人王玉勤女士，是你在我没车、没房和存款时嫁给了我，是你给予了我前进的动力、温暖的港湾。

侯伟亮

2019 年 3 月 4 日 于上海

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 玖拾肆 页

立卷人_____

检查人_____

立卷时间_____