

学校代码：10251

学 号：Y30161124

華東理工大學

硕士学位论文

论文题目 木质纤维素生物质中游离单糖的固态发酵

和重金属离子的富集研究

学科专业 发酵工程

研究方向 生物炼制

论文作者 董维涛

指导教师 鲍杰 教授

定稿日期：2019年05月29日

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：董维涛

指导老师签名：鲍杰

日期：2019年05月29日

日期：2019年05月29日

分类号: TQ353 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

学位论文

木质纤维素生物质中游离单糖的固态发酵
和重金属离子的富集研究

董维涛

指导教师姓名: 鲍杰 教授

华东理工大学 生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 发酵工程

论文定稿日期: 2019.05.29 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: 高旻天 教授

洪 枫 研究员

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：董维涛

指导教师签名：鲍杰

2019年05月29日

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

论文作者签名：董维涛

2019年 05 月 29 日

木质纤维素生物质中游离单糖的固态发酵和重金属离子的富集研究

摘要

木质纤维素生物质中含有较多的游离单糖和重金属离子。其中，游离单糖的存在会增加预处理过程中抑制物的生成量，降低纤维素乙醇的生产效率；重金属离子的存在会增加纤维素乙醇生产过后废水的处理难度与成本，甚至造成重金属的二次污染，降低植物修复的有效性。因此，必须降低木质纤维素生物质中游离单糖的含量，以期增加纤维素乙醇生产效率；避免纤维素乙醇生产过程中重金属离子的二次污染，以期实现重金属离子的进一步富集。本研究拟解决这两个问题，提出了预处理前木质纤维素生物质的固态发酵与含镉纤维素乙醇发酵残液的干燥固定与微生物转运。

本研究第一部分研究了预处理前玉米秸秆中水溶性游离单糖的转化对纤维素乙醇发酵的影响。结果表明，通过在预处理前采用黑曲霉固态有氧发酵方式将玉米秸秆中游离葡萄糖和果糖转化为柠檬酸，能够有效地降低预处理过程中酸催化剂的用量和 5-羟甲基糠醛生成量，缩短脱毒时间并提高纤维素乙醇的发酵效率。这一实验结果在纤维素乙醇的实际生产过程中具有重要借鉴意义。

本研究第二部分尝试采用纤维素乙醇干法生物炼制处理含镉木质纤维素生物质并对该过程中镉的富集情况进行了研究。含镉玉米秸秆和白杨木屑经干法生物炼制过程分别获得了 63.0 g/L 和 45.5 g/L 的纤维素乙醇。同时，在避免重金属镉二次污染的前提下，实现了重金属镉的有效富集（分别约为 5.2 倍和 4.5 倍），为植物修复土壤重金属镉污染后生物质的处理提供了一个方向。

本研究第三部分对麦秆水解液中重金属镉的微生物去除法进行了实验探究。采用三种微生物菌株对含镉麦秆水解液进行了生物去除实验。当麦秆水解液中初始镉含量为 0-10 mg/L 时，酿酒酵母和谷氨酸棒状杆菌对镉的去除能力较强（均高于 43.0%）；皮状丝孢酵母对镉的吸附去除能力较弱（低于 25.0%）。同时，酿酒酵母、皮状丝孢酵母和谷氨酸棒状杆菌对葡萄糖的消耗能力依次降低。该结果表明，谷氨酸棒状杆菌具有从木质纤维素水解液中去除重金属镉的潜力，也为进一步提高含镉木质纤维素生物质的处理效益提供了一个方向。

综上所述，本研究将玉米秸秆中游离葡萄糖和果糖在预处理前经固态发酵方式转化为柠檬酸有效地增加了纤维素乙醇发酵效率。同时，含镉木质纤维素乙醇生产过程中镉的完全保留和有效富集以及谷氨酸棒状杆菌对镉的高吸附能力的发现为含镉木质纤维素生物质的有效处理和镉的进一步富集提供了方向。

关键词：木质纤维素；游离单糖；羟甲基糠醛；重金属镉离子；纤维素乙醇

Study on Solid State Fermentation of Endogenous Monosaccharides and Enrichment of Heavy Metal Ions in Lignocellulose

Abstract

Lignocellulose contains a large amounts of endogenous monosaccharides and heavy metal ions. The endogenous monosaccharides increase inhibitors' formation during the pretreatment and reduce the following cellulosic ethanol fermentation efficiency. And heavy metal ions in lignocellulose may increase the difficulty and the cost of wastewater treatment after cellulosic ethanol fermentation, and even cause secondary pollution of heavy metal ions and reduce the effectiveness of phytoremediation. Therefore, it is necessary to reduce the content of endogenous monosaccharides in lignocellulose to increase the ethanol fermentation efficiency, and avoid the secondary pollution of heavy metal ions in the cellulosic ethanol fermentation to further enrich heavy metal ions. In order to solve these two problems, solid state fermentation in lignocellulose before pretreatment, drying of cellulosic ethanol fermentation residue and microbial transport were proposed.

The first part of this thesis focused on the effect of the removal of water soluble endogenous monosaccharides in corn stover before pretreatment on cellulosic ethanol fermentation. The results showed that converting water soluble glucose and fructose into citric acid by a solid state aerobic fermentation before pretreatment can significantly reduce the 5-hydroxymethylfurfural (HMF) generation and the usage of acid catalyst in pretreatment, thus reduce the detoxification intensity and improve the cellulosic ethanol fermentation efficiency. These results provide an important reference for the actual conversion process from biomass to ethanol.

The second part of this thesis focused on the utilization of lignocellulose containing cadmium by dry milling biorefinery process (DMBP) and the study of cadmium enrichment. 62.3 g/L and 45.5 g/L cellulosic ethanol was obtained from the corn stover and poplar wood chip containing cadmium by DMBP, respectively. In addition, the cadmium was enriched about 5.2 and 4.5 times from corn stover and poplar wood chip, respectively, without any loss of cadmium during the DMBP, which provide a feasible direction for the treatment of lignocellulose after phytoremediation of the soil polluted by cadmium.

The third part of this thesis tried to remove cadmium from wheat straw hydrolysate (WSH) by bioadsorption of three microbial strains. When the initial cadmium concentration in WSH was 0-10 mg/L, *Saccharomyces cerevisiae* and *Corynebacterium glutamicum* had stronger cadmium removal ability (higher than 43%) compared with *Trichosporon cutaneum* (lower than 25%). Meanwhile, the glucose consumption of *Saccharomyces cerevisiae*, *Trichosporon cutaneum* and *Corynebacterium glutamicum* decreased in turn. The potential of using *Corynebacterium glutamicum* to remove cadmium from lignocellulose hydrolysate was demonstrated, which also provide a direction for further reducing the treatment cost of lignocellulose containing cadmium.

Conclusively, this study improved cellulosic ethanol fermentation efficiency by converting endogenous glucose and fructose into citric acid before pretreatment. In addition, the complete retention and effective enrichment of cadmium in the process of cellulosic ethanol fermentation from lignocellulose containing cadmium and the discovery of *C. glutamate*'s high adsorption capacity for cadmium provide a direction for the effective treatment of lignocellulose containing cadmium and further enrichment of cadmium.

Keywords: lignocellulose; endogenous monosaccharides; hydroxymethylfurfural; cadmium; cellulosic ethanol

目录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 木质纤维素生物质.....	1
1.2.1 木质纤维素生物质中游离单糖.....	2
1.2.2 木质纤维素生物质中重金属离子.....	2
1.3 干法生物炼制技术.....	5
1.3.1 干酸预处理.....	6
1.3.2 固态生物脱毒.....	7
1.3.3 糖化.....	8
1.3.4 发酵.....	9
1.4 纤维素乙醇.....	10
1.5 选题依据与研究内容.....	10
第 2 章 预处理前玉米秸秆中游离单糖的转化对纤维素乙醇发酵的影响. 12	
2.1 引言.....	12
2.2 材料与方法.....	13
2.2.1 原料.....	13
2.2.2 纤维素酶与试剂.....	13
2.2.3 菌株与培养基.....	13
2.2.4 预处理前柠檬酸固态有氧发酵.....	14
2.2.5 预处理、生物脱毒与同步糖化发酵.....	14
2.2.6 糖类、柠檬酸、乙醇和抑制物分析.....	16
2.2.7 乙醇得率计算.....	16
2.3 结果与讨论.....	16
2.3.1 玉米秸秆固态有氧发酵实验与预处理后物料组分测定.....	16
2.3.2 两种预处理后玉米秸秆的生物脱毒和纤维素乙醇发酵性能检测.....	18
2.4 本章小结.....	20
第 3 章 干法生物炼制含镉木质纤维素生物质为乙醇的可行性分析.....	21
3.1 引言.....	21
3.2 材料与方法.....	22
3.2.1 原料和纤维素酶.....	22
3.2.2 菌株与培养基.....	22

3.2.3 预处理、生物脱毒与同步糖化发酵.....	22
3.2.4 糖类、乙醇和抑制物分析.....	23
3.2.5 乙醇得率计算.....	23
3.2.6 乙醇发酵残液处理.....	23
3.2.7 重金属镉的添加与测定.....	24
3.3 结果与讨论.....	24
3.3.1 <i>S. cerevisiae</i> XH7 对重金属镉的耐受性能.....	24
3.3.2 同步糖化共发酵实验.....	26
3.3.3 物料衡算.....	30
3.4. 本章小结.....	30
第 4 章 三种微生物菌株对麦秆水解液中镉去除特性的研究.....	31
4.1 引言.....	31
4.2 材料与方法.....	32
4.2.1 原料和纤维素酶.....	32
4.2.2 菌株与培养基.....	32
4.2.3 预处理、生物脱毒与麦秆水解液的制备.....	32
4.2.4 重金属镉的添加与测定.....	33
4.2.5 糖类、乙醇和生物量分析.....	33
4.3 结果与讨论.....	33
4.3.1 <i>C. glutamicum</i> S9114 对麦秆水解液中镉的耐受性与去除性能.....	33
4.3.2 <i>S. cerevisiae</i> XH7 对麦秆水解液中镉的耐受性与去除性能.....	39
4.3.3 <i>T. cutaneum</i> ACCC 20271 对麦秆水解液中镉的耐受性与去除性能.....	39
4.4. 本章小结.....	41
第 5 章 结论与展望.....	42
5.1 结论.....	42
5.2 展望.....	43
参考文献.....	44
附录 I 主要试剂.....	55
附录 II 主要仪器和设备.....	56
硕士期间学术成果.....	57
致谢.....	58

第 1 章 绪论

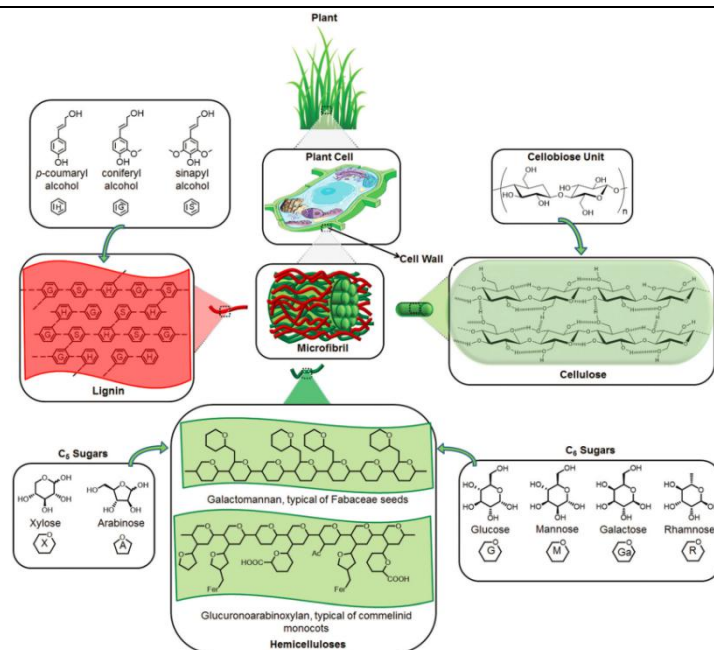
1.1 前言

近年来,随着社会的持续发展与人口数量的急剧膨胀,世界各国对粮食和能源的需求也在不断的加剧,再加上石油等不可再生能源的有限性,使得人类与自然环境之间的供需问题愈演愈烈。同时,随着可持续发展观念的不断推进,人们对于可再生资源的关注越来越大。将希望寄托于全球储量最为丰富且具有可再生性的木质纤维素生物质,并以该生物质为原料为人类的生活提供所需物品,从而实现人与自然的和谐相处。

木质纤维素生物质作为一种可循环使用的自然资源,来源广泛但却未被普遍应用的生物质,具有较好的生物转化性能,在很大程度上具有进一步开发与利用的价值与意义。该类生物质是指农业、林业等种植业的副产物及其经过加工后的废弃物等,例如麦秆、玉米秸秆、稻秆、软木、硬木和柳枝稷等等。因此可以在不需要改变原有种植产业的结构基础上大量获得且价格低廉,对当地种植产业的影响也是非常的小,甚至是无影响。然而,如果将这些生物质原料作为自然肥料或者是通过就地焚烧的方式进行利用就很有可能会在一定程度上对当地环境造成不小的负担。因此,通过生物炼制的方式将木质纤维素原料转变为乙醇、柴油等液体燃料或乳酸、柠檬酸等生物基化学品,可以在一定程度上缓解全球的粮食危机与环境压力^[1,2]。

1.2 木质纤维素生物质

如图 1.1 所示,木质纤维素生物质是由葡萄糖聚合物—纤维素、木糖等几种单糖类物质构成的异质多聚体—半纤维素、酚类聚合物—木质素以及游离单糖和重金属离子等其它可溶性组分构成,是地球上最为丰富的可循环利用的碳水化合物资源,是代替淀粉类物料进行生物转化的最佳物质^[3,4]。纤维素是由葡萄糖经 β -1,4-配糖键组合起来的大分子多糖类物质,具有水不溶性和一般有机介质不溶性的特性,其聚合度是指每个纤维素分子中所含有的葡萄糖残基的数目^[5];半纤维素是由戊糖(木糖、阿拉伯糖等)和己糖(半乳糖等)等几种不同类型的单糖构成的一类具有大分子量的多糖类物质的总称,具有亲水的特性^[6];木质素是普遍存在于植物体内的无定形的、由对羟苯基类等三种苯丙烷类组分通过共价键所组成的芳香性高聚物,主要存在于植物的木质部,负责从植物根部向叶肉细胞中对镁、锌、铁、钾、钠等矿物质和水分的运输工作^[7]。然而,当木质纤维素生物质的种类和来源不同时,纤维素、半纤维素、木质素、游离单糖和重金属离子等组分的所占比例具有一定的差异性^[8]。其中,研究较多的组分为纤维素、半纤维素和木质素。

图 1.1 木质纤维素生物质结构示意图^[9]Fig. 1.1 Schematic structure of lignocellulosic biomass^[9]

1.2.1 木质纤维素生物质中游离单糖

木质纤维素生物质中游离单糖主要由植株叶片、茎干中叶绿体的光合作用所合成，贮备的游离单糖主要用于维持谷物灌浆期淀粉合成的恒定速率^[10]。因此，不同品种、不同部位（茎、叶等）、不同成熟度（收获时间）的木质纤维素生物质中游离单糖含量均有所不同。此外，生物质收获后的晾晒方式及贮存方式对于游离单糖的保留也有很大影响^[11, 12]。

1.2.2 木质纤维素生物质中重金属离子

广义上来讲，重金属是指密度大于 5.0 g/mg^3 的金属，包括镉、铬、汞和铅等大约 45 种元素^[13]。然而，在环境污染方面，重金属一般是指镉、铬、汞、铅和类金属砷等对生物具有较大毒害作用的元素，以上五种重金属元素又称“五毒元素”^[14]。其中，镉（Cd）作为最具有危害性的重金属元素之一，备受国家与广大学者的关注与研究^[15-17]。

1.2.2.1 镉

镉是一种具有银白色光泽的稀有金属，在潮湿的空气中能够与氧气发生反应而失去原有光泽，其原子序数为 48，相对原子质量为 112.41。由于镉和锌具有较为相似的化学性质^[18]，因此在自然界中，镉常与锌共存于矿石中，并作为锌提取时的副产物获得。镉具有酸溶性，但是不具有碱溶性，因此可以用于一些金属表面的电镀，以盛放碱性物质。

1.2.2.2 镉的来源与危害

随着我国改革开放的持续推进以及经济的快速扩张，重金属尤其是镉及其化合物对土壤环境的破坏已经十分严重和普遍^[19-23]。镉污染的首次被关注是由于二十世纪五六十年代，日本因镉超标而出现的严重的痛痛病事件。我国广东地区也曾出现过痛痛病类似患者，因此我国国务院一致决定，2005 年至 2013 年对我国全国陆地土壤污染状况进行



图 1.2 我国部分省份土壤中镉含量示意图^[24]

Fig. 1.2 The content of cadmium in soils of some provinces in China^[24]

了严格的调查。该调查结果显示，土壤镉污染的超标率最高，约为 7.0 %^[25]，唤起了社会与国家对于镉污染的高度关注与研究。截止目前，我国有超过 2×10^7 hm² 的土地受到了镉的污染，约占耕种总面积的 1/6，共覆盖 11 个省市的 25 个地区^[26]。

土壤环境与农作物产品的质量与产量息息相关，例如，2013 年湖南省引起全国轰动的大量镉米出现事件以及 2017 年江西省九江市的稻米镉含量严重超标事件。近年来对土壤镉污染的研究结果表明，全国各地范围内土壤重金属镉污染程度并不一致，主要表现为从东南到西北、从西南到东北逐渐降低的趋势^[25]。其中，部分省份土壤中的镉含量情况如图 1.5 所示。该结果的出现可能是由于两方面因素导致：（1）土壤中重金属镉的来源不同；（2）由于我国国土面积广大，南方与北方、东部与西部的气候等环境条件相差较大导致各地土壤性质不同^[27]，各地区土壤性质的不同导致镉在土壤中的存在状态不同，同时不同物种的植物对镉的吸附性能不同导致其留存在土壤中的含量具有差异，进而导致不同地区土壤中重金属镉含量具有一定的差异性。例如，上海蚂蚁浜地区的土壤中镉含量为 21.5 mg/kg^[28]，酸性土质与长期含镉污水灌溉的广州老污灌区的土壤中镉含量为 228.0 mg/kg^[29]。

表 1.1 几种不同类型的母质中镉的含量^[30]

Table 1.1 The contents of cadmium in some parent materials^[30]

Rock types	Content (mg/kg)	Average (mg/kg)
Granite	0.001-0.6	0.12
Rhyolite	0.05-0.48	-
Syenite	0.04-0.32	0.15
Basalt	0.006-0.6	0.22
Oil shale	0.3-11.0	0.8
Bentonite	0.3-11.0	1.4
Marl	0.4-10.0	2.6
Grey gneiss	0.12-0.16	0.14

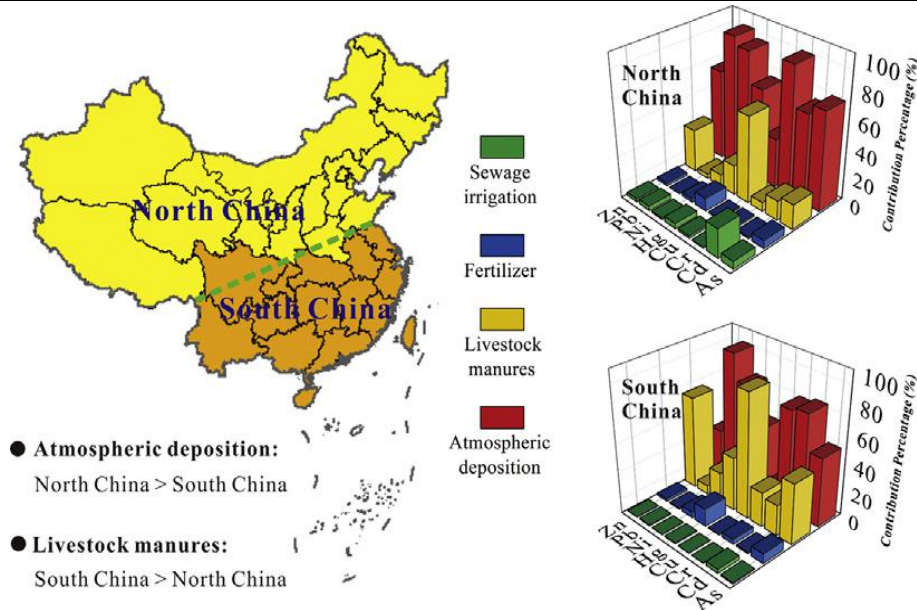


图 1.3 我国土壤中重金属的主要来源及不同方式的贡献比例^[23]

Fig. 1.3 Main sources of heavy metals in soil and its contribution ratio^[23]

土壤中镉元素来源较为广泛，主要分为两大类：（1）成土母质本身含有一定量的镉，但母质种类的不同导致其重金属镉含量也就有所不同（表 1.1 所示），即不同地区的土壤成分组成不同导致其镉的含量（背景值）有所不同^[31]，该浓度下的重金属一般不会对动植物造成较大危害作用；（2）通过农业堆肥、大气沉降、污水灌溉和固体废弃物堆积等人类活动导致土壤中重金属镉含量的增加。如图 1.3 所示，在不同的条件下，这几种不同的人类活动方式对土壤环境中重金属含量增加比例有所不同^[23]。对于我国南方地区而言，含有重金属元素的固体废弃物随意堆放对土壤中重金属含量的影响最大。然而，对于我国的北方地区而言，由于冬季煤炭的大量燃烧导致大气中金属含量的增加，从而使得通过大气沉降方式严重影响土壤中重金属含量^[32]。当然，如果长期采用含有铅、镉、锰、汞等多种重金属元素的废水对土壤进行浇灌以及采用含有重金属的肥料进行施肥，也会导致土壤中重金属的大量积累^[33-36]。因此，要想彻底解决重金属镉对土壤的污染问题，至少要从两方面做起：（1）严格控制镉向土壤环境中的排放量，国家有关部门应加大对乱排放单位的监管力度与惩治力度，从根源上杜绝镉污染问题；（2）寻找合理有效且对土壤结构影响最小的修复技术，对已经污染的土壤进行治理。

不同物种的生物对镉的耐受性不同，当某个生物的个体内重金属镉的含量超过其可承受范围时，就会展现出相应的毒性特征。对于植物而言，镉通过抑制植物叶肉的光合作用和根部细胞对钾、钠、酶等矿物质营养以及水分的吸收与供给，进而阻碍植物生长，甚至有可能导致植物死亡^[37, 38]。此外，镉的存在也会促使植物产生一些应激反应，例如植物体内氧化自由基的产生，对植物组织内某些生物大分子和抗氧化系统产生不利影响^[31, 39]。对于微生物而言，镉会造成土壤中其总体生物量的减少，并且通过阻碍细胞内某些关键酶的表达或者活性，造成土壤中微生物物种多样性的减少^[40, 41]，从而导致土壤中有机介质含量的增加和土壤可利用营养成分的减少，进而改变土壤原有结构。对于动

物而言, 镉主要存在于动物的肝、肾和生殖器官中, 与含有巯基、羟基等具有阴离子基团的蛋白分子结合, 从而间接或直接影响动物乃至人体内的生理生化过程, 甚至是导致机体的死亡^[42, 43]。

1.2.2.3 木质纤维素生物质中镉的来源

由于重金属镉对生物具有严重的危害性, 有不少研究人员都在尝试着采用不同的方法将其从土壤中去掉或者降低其在土壤中的毒性和可迁移能力^[44, 45]。然而, 由于工程措施、电动修复、淋滤等传统的物理化学修复方法成本高、对土壤结构存在一定的破坏性且易造成重金属镉的二次污染等缺陷, 实际应用潜力具有局限性。相比之下, 植物修复法具有更大的可应用优势^[46], 该技术作为一种新兴土壤重金属镉污染原位修复技术, 即通过在重金属镉污染区域种植某种对镉具有较强的吸附性能与耐受性能的植物, 进而降低土壤中重金属镉含量或降低其生物活性的方法^[47], 含镉木质纤维素生物质也因此而来。

鉴于该技术的投入成本较低、修复效率较快、适用于大范围土壤修复、可避免重金属镉的二次污染、对土壤结构的破坏性较小以及修复后的生物质可用于生物燃料或生物基化学品的生产等优点而受到了广大学者的关注与研究^[48, 49]。此外, 有研究表明, 对修复土壤镉污染后植株进行焚烧, 产生的灰分可用于回收金属镉^[50]。然而, 植物修复技术也存在一些不足之处, 例如, 重金属镉超富集植物的生物量较小、生长缓慢、修复时间长以及后续含重金属植物的合理处理等问题^[51]。目前, 文献中报道的重金属镉超富集植物多为草本植物, 很难将其应用于实际环境中去解决土壤重金属镉污染^[53]。因此, 急需寻找生物量大、生长迅速且对土壤中重金属镉具有较强耐受性能和吸附性能的植物。针对这一关键性问题, 多位研究学者展开了广泛的研究。研究发现, 杨树、柳树等生物量大、根系发达、生长迅速的木本科植物对重金属镉具有较强的吸附性能且不参与食物链循环, 是一种非常好的土壤镉污染植物修复材料^[52]。此外, 也可以采用基因工程的手段将草本植物对重金属镉耐受性强或吸附性强的基因转移至生物量大、生长迅速的植物中, 从而实现镉污染高速化治理。

有研究表明, 植物对土壤中镉元素的吸附能力不仅受到植物本身性质的影响, 也在一定程度上受到土壤性质的影响。因此, 除了增加植物对重金属镉的吸附能力和耐受性能外, 也可以通过影响镉在土壤中的存在状态, 进而影响其迁移能力^[50]。迁移能力的不同使得其进入植物组织中的难易程度不同, 进而从宏观角度使植物表现出植物对重金属镉的不同吸附能力。因此可以通过外源添加某种物质改变土壤中重金属镉离子的存在形态来调控其进入植物的量, 如 EDTA^[53]。

1.3 干法生物炼制技术

生物炼制起源于化工行业的石油原油的提炼^[54], 但由于其资源的有限性以及环境污染的显现等, 作为可再生资源的木质纤维素原料得到了广泛的关注与研究。该原料的生物炼制主要分为干法与湿法两种方式^[54, 55], 其中对木质纤维素生物质的干法生物炼制技

术研究最为广泛。该技术是指麦秆、玉米秸秆和木屑等木质纤维素生物质通过预处理、脱毒、糖化、微生物转化的方法将纤维素、半纤维素甚至是木质素转化为油脂、乙醇等燃料或柠檬酸等生物基化学品，进而将产品与发酵醪液分离的一种资源节约型和环境友好型生物转化技术^[56, 57]。由于该过程将农业废弃物进行了有效地利用，降低了生物基化学品生产过程中粮食的消耗，具有十分广阔的应用前景。截至当前，该技术已经成功的应用于纤维素乙醇的生产，备受当今世界各大研究学者的关注与探究^[58]。木质纤维素生物质的干法生物炼制过程主要涵盖以下几步：干酸预处理、固态生物脱毒、酶解与转化、产物分离^[75]。

1.3.1 干酸预处理

由于木质纤维素生物质中三种主要组分之间形成了极其致密的抗性结构^[59]，使得微生物菌株无法直接对其进行生物转化作用，所以木质纤维素原料的使用必须将其结构进行有效地破坏，降低其相对分子质量，增加酶和菌株对其的可接触性，这也是木质纤维素生物转化的核心操作之一^[60]。如图 1.4 所示，木质纤维素原料经过预处理后，其结构被破坏，从而有利于增加酶对其的可接近性并将其水解为可发酵糖的高效性，保证微生物菌株对其进行利用与代谢。

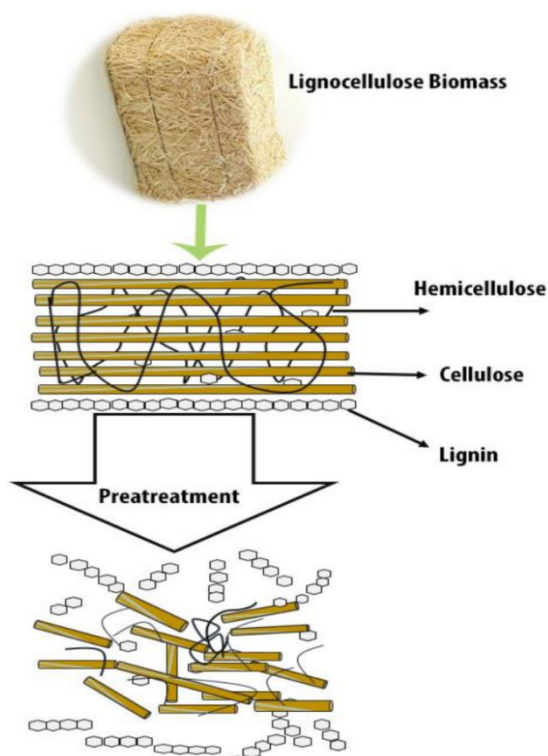


图 1.4 预处理破坏木质纤维素生物质结构^[61]

Fig. 1.4 Schematic of the damage of lignocellulosic structure by pretreatment ^[61]

目前，预处理的方法主要可以分为三大类，即物理化学法（气爆、高压处理、水热预处理），化学法（酸预处理、碱预处理、离子液体预处理），生物法（微生物预处理）^[6, 62]。其中，酸预处理法可以将 80 %-90 %的半纤维素转化为可发酵单糖^[63]和水溶性寡糖^[64]，且预处理后物料中纤维素更易被酶水解为葡萄糖^[65]，因此该技术应用也最为广泛。然而，该技术并非完美无瑕，也是存在一些缺陷，例如大量含酸废水的产生、可发酵单

糖的流失、前期投入成本较大等^[62]。为此, Zhang 等人对该预处理技术进行改良, 将原有 1:6-1:10^[66]的固液比提高到 2:1^[67], 同时, 反应器中螺带式搅拌桨的使用也大大增加了传质速率, 从而降低了预处理过程中蒸汽的使用量, 进而形成了独特的干式稀酸预处理技术^[68]。

1.3.2 固态生物脱毒

由于木质纤维素生物质中多种组分之间形成的致密结构导致其预处理通常需要在高温、低 pH 值等极端的条件下进行。然而, 这样恶劣的条件将会导致生物质中的游离单糖、纤维素、半纤维素以及木质素转化为对后续纤维素酶的水解作用和微生物菌株的发酵过程造成不利影响的物质, 即酚类、呋喃类和弱酸类等三种抑制物^[69-71] (图 1.5)。因此, 在预处理后生物质的糖化与发酵前, 应尽量减少物料中这些抑制物的含量, 进而增加纤维素乙醇等生物燃料或乳酸等生物基化学品的生产效率。该问题的解决可以从两个方面进行: 第一, 降低木质纤维素生物质中游离单糖含量, 进而降低预处理过程中抑制物的生成量; 第二, 对预处理后生物质进行脱毒步骤。

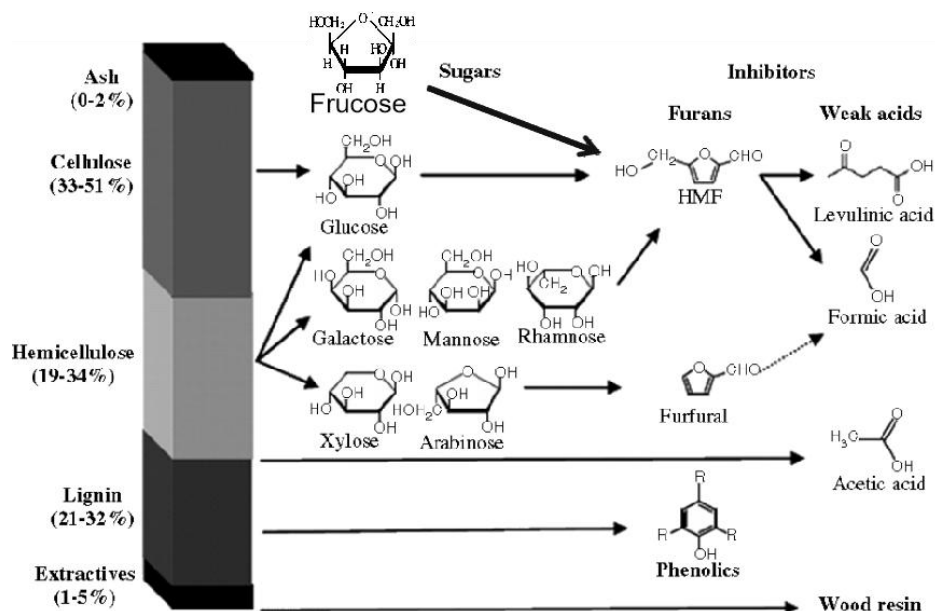


图 1.5 木质纤维素的组成及其结构破坏时抑制物的生成^[71]

Fig. 1.5 Composition of lignocellulose and its hydrolysis products^[71]

由于植物的多样性与环境条件的复杂性, 来源不同的木质纤维素原料的不同, 尤其是其水溶性单糖和三种主要成分, 而这些组分又正好是抑制物产生的根源^[69, 70], 例如, 木糖等五碳糖转变为糠醛^[72, 73], 葡萄糖和果糖等六碳糖转变为羟甲基糠醛^[74-76], 木质素降解转化为丁香醛等酚类抑制物^[77]。在不同的预处理条件下, 物料中乙酸、糠醛等抑制物的产生情况也会有所不同。Zhang 等人^[68]发现预处理过程中抑制物的生成量与该过程中硫酸用量、温度以及预处理时间呈正比。因此, 合适预处理条件与低含量能够产生抑制物的组分是降低预处理过程中抑制物含量的关键因素之一。

预处理后生物质的脱毒方法主要包括水洗法^[78-81]等物理法、活性炭法^[82-84]等化学法以及酶法^[85]和微生物降解法^[86]等生物法。水洗法会造成大量废水, 且易造成可发酵糖分

的流失。活性炭吸附法存在固液分离步骤,较为繁琐且成本较高,同时也易造成糖分的流失。相比之下,生物降解法因所需条件温和、步骤简单易行、成本低、无需额外水耗以及对抑制物的去除能力强等优点而备受广大学者的关注。

生物脱毒法是指通过细菌或者真菌的代谢或者其细胞内酶的催化作用将对发酵菌株有毒的糠醛等抑制物转化为低毒性或者无毒性物质的过程^[86]。在该脱毒过程中,酶催化脱毒与微生物转化脱毒的本质相同,均为漆酶或者过氧化酶将糠醛等抑制物降解转化为低毒或者无毒的物质。由于微生物可以在预处理后生物质中生长繁殖,从而加速对抑制物的脱除效率,因此两者相比而言,微生物降解法更具有实际应用潜力。

目前,虽然人们发现酵母等很多种微生物对来源于木质纤维素的糖化液中的糠醛等抑制物具有较强的降解能力,但都存在一定的缺陷,例如所需脱毒时间较长、抑制物脱毒不彻底、可发酵单糖的消耗、在固态体系中生长较差等等,使得该方法不能得到广泛地应用。为克服其缺陷,增强微生物脱毒手段的应用潜力,Zhang 等人^[87]从预处理后的固体生物质中选育出一株对糠醛、羟甲基糠醛等抑制物具有优良去除能力的霉菌,即树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1。首先,该菌株的发现突破了传统意义上生物脱毒必须在液体中进行的限制,实现了真正意义上的固态式的生物脱毒,为后续高固体含量的糖化与发酵奠定了基础。其次,该菌株可以通过自身代谢产生的漆酶或过氧化物酶将抑制物优先应用于自身生长所需,进而降低预处理后生物质中抑制物含量。在固态生物脱毒的基础上,He 等人^[88]以该菌株为出发菌株,探讨了其在有无氧气供应时的脱毒效率与可发酵单糖的保留情况。结果表明,该菌株在无氧气供应时,对抑制物的降解转化速率较慢,也会消耗部分预处理过程中产生的木单糖;在有氧气供应时,该菌株对抑制物的降解转化速率较快,且可以保留大部分的可发酵单糖,为后续微生物发酵提供更多的底物。

1.3.3 糖化

由于预处理过程只是破坏了木质纤维素几种组分之间所形成的致密结构,而并未将它的三种主要组分完全降解为葡萄糖、木糖、阿拉伯糖等可发酵单糖。因此预处理后生物质或者是经过固态生物脱毒后生物质需要被继续降解为可发酵单糖供微生物转化利用,即木质纤维素的水解(糖化)过程。这个过程可以通过化学催化剂^[89,90]催化或纤维素酶等生物催化剂^[91,92]催化来实现。在这个催化过程中,纤维素将会被水解为葡萄糖单体^[5];半纤维素也同样会被水解为木糖等单体组分^[93];然而,木质素几乎不被水解,仍旧以木质素残渣的形式留存至发酵醪残渣中,可用于火力发电^[94]。酸水解等化学水解过程可能会造成可发酵单糖的进一步降解为抑制物,例如木糖等五碳糖降解为糠醛^[71,72],葡萄糖等六碳糖降解为羟甲基糠醛^[74-76]。

与酸、碱等化学催化剂相比,生物催化剂更具有优势,例如所需条件较为温和、催化活性较高、水解特异性较强。因而能够将木质纤维素原料高效水解为可发酵单糖,并且可以有效地避免可发酵单糖的进一步降解,即糠醛等微生物发酵菌株抑制物的生成。在之前的研究中,人们已经发现了一些对木质纤维素原料具有高度专一性的酶,由纤维

素到葡萄糖几乎可以实现完全转化,这是酸水解技术难以企及的转化率^[95]。但是,木质纤维素的酶水解技术也存在一定的缺陷,例如,酸水解在几十分钟甚至是几分钟内即可完成,而酶水解则需要几个小时甚至是几天。此外,酶水解技术投入成本较高,这主要是由于酶制剂的成本较高。自然界中存在的大部分酶为蛋白质,极少数酶为 Ribonucleic Acid,因此能够导致蛋白质变性的因素基本上都能够影响酶的活性。采用酶法制备木质纤维素糖化液的限制因素为:(1)原料的物理性质,例如原料的三种主要组分之间的交联程度、底物颗粒的大小等;(2)酶的情况,例如高浓度的反馈抑制、酶的活性等^[96-98]。

当前,在木质纤维素糖化液制备阶段应用最为普遍的商业化酶制剂由瑞氏木霉 (*Trichoderma reesei*)通过深层液态发酵法获得^[99]。*T. reesei* 纤维素降解酶系是一种复合型酶,其核心成员由三大类酶组成^[100]。如图 1.4 所示,在三类酶的协同作用下将木质纤维素生物质转化为可发酵单糖^[97, 101]。在纤维素水解过程中,*T. reesei* 酶不会发生变化,只是将纤维素转化为了葡萄糖,半纤维素转化为了木糖等五碳糖,供应微生物发酵菌株的生长与代谢^[102]。

以纤维素乙醇为例,在木质纤维素生物质实际转化生产过程中,为了增加发酵产量与发酵效益,需要提高发酵体系中葡萄糖等可发酵糖的浓度并且严格控制木质纤维素原料成本、纤维酶成本、产品分离成本等发酵投入成本与发酵效率。其中,纤维素酶成本所占比例较大,因此在保证可以产生足够的可发酵糖的前提下,尽量减少纤维素酶的添加量可以有效地增加生物燃料或生物基化学品的可行性与经济性^[102]。除水解产物—葡萄糖对酶的反馈抑制之外,体系中总糖浓度的增加意味着该体系初始底物含量的增加。该情况的出现可能会导致糖化过程中一些传质和传热问题的出现,影响纤维素酶的活性,进而影响糖化结束时,葡萄糖等可发酵单糖的浓度。针对这一关键性问题,本课题组对原有生物反应器进行改进,以螺带式搅拌桨代替原有搅拌桨,实现了在高固体含量下的糖化过程^[103, 104]。

1.3.4 发酵

在生物炼制过程中,由木质纤维素转变而来的水溶性可发酵单糖通常需要经过微生物的进一步转化或者说酶催化过程才能产生所需要的乙醇等燃料或者乳酸、柠檬酸等生物基化学品。该过程可以通过两种方式进行:(1)先将预处理脱毒后木质纤维素原料转化为含有葡萄糖等可发酵单糖的水解液,再通过发酵菌株将水溶性单糖转化为所需产品,即分步糖化与发酵 (SHF) ^[105-109]; (2)将预处理脱毒后木质纤维素原料向可发酵单糖的转化过程与发酵菌株生产目标产物的代谢过程相整合,即同步糖化与发酵 (SSF) ^[106-111]。这两种生物质转化方式各有优势与不足。对于 SHF 来说,每一个步骤都可以在最有利的条件下进行,然而,每一个步骤都需要分开进行会增加设备和场地的投入成本,高浓度可发酵单糖的产生不仅会对纤维素酶造成反馈抑制,也会对产生目标产物的微生物菌株的生长和代谢造成抑制作用^[108]。对于 SSF 来说,两个步骤在同一个生物反应器中进行,可以降低对设备和场地的投入成本,提高产物生成速率^[110]。然而,对每个过程中媒介(纤维素酶和发酵菌株)的要求较高,但可以避免产物对酶的反馈抑制和发酵

菌株的抑制^[111]。在目标产物的实际生产过程中，应当综合考察这两种发酵方式，实现产物生成最优化与企业效益最大化，为公司的可持续发展奠定坚实的基础。

在木质纤维素生物炼制过程中，某种发酵微生物菌株的使用对该技术的经济实用性也是至关重要的。由于木质纤维素发酵体系的特殊性，例如某些微生物抑制剂的存在、多种重金属离子的协同抑制作用等等，这些外界环境因素存在都使得微生物应具有较强的耐受性。同时，为提高目标产物的生成速率和可发酵单糖的转化得率，进而提高该技术的经济可行性，微生物菌株必须具有较强的目标产物转化性能和对多种糖的利用能力。有的研究表明，可同时利用葡萄糖和木糖运动发酵单胞菌（*Zymomonas mobilis* 8b）在 20 h 内就可以将 20 % 固体载量的木质纤维素水解液中所有可利用单糖几乎消耗完全（总糖浓度超过 150.0 g/L），获得 70.0-72.0 g/L 的乙醇，乙醇得率为 90.0-92.0 %^[112]。由于葡萄糖阻遏作用的存在，大部分微生物菌株对葡萄糖的利用具有优先性，再利用其它碳源^[113]。当发酵体系中生物质含量较高时，葡萄糖、木糖、阿拉伯糖等可发酵糖的浓度也会相应的提高，因此，需要改变发酵策略提高除葡萄糖外可发酵糖的利用速率^[114-117]。

1.4 纤维素乙醇

纤维素乙醇是指将木质纤维素生物质转变为葡萄糖等可发酵单糖，再通过微生物转化的方法将这些单糖转变为乙醇，这是一种非常有应用前景的可持续性生物燃料，有望代替粮食乙醇添加在石油中以减轻环境污染问题，且纤维素乙醇生产技术具有十分广阔的应用潜力。据有关文献报道，2016 年乙醇汽油的使用使得二氧化碳的排放量减少了 4350 万吨，这相当于 930 万辆家用汽车以石油为燃料正常行驶一整年的二氧化碳的排放量^[118]。同时，生物乙醇的使用进一步减少了美国对原油的依赖（原油主要依靠海外进口），增加了能源安全，促使能源供应方式多样化，促进了农民就业与农村经济的发展^[119, 120]。然而到目前为止，纤维素乙醇仅停留在作为燃料使用阶段。

生物乙醇最早起源于美洲（巴西和美国），分别以甘蔗汁（特别是蔗糖）和玉米淀粉为主要原料。虽然在一定程度上缓解了石油等不可再生能源的枯竭问题和温室气体排放问题，但是却出现了粮食问题，不利于人类的持续健康发展。因此，燃料乙醇的获取技术需要得到进一步的改进，即二代纤维素乙醇生产技术的问世，也就是以木质纤维素生物质为起始底物生产燃料乙醇。利用该技术生产燃料乙醇的得率和转化率取决于生物质的组分，当生物质中纤维素和半纤维素含量较高而木质素含量较低时，乙醇的得率和转化率较高^[121]。此外，对抑制物耐受性较高且具有优良乙醇生产性能菌株的选育也会有利于纤维素乙醇的生产。例如，耗糖速率快且可利用葡萄糖和木糖的 *Saccharomyces cerevisiae* XH7。

1.5 选题依据与研究内容

目前鲜有文献对木质纤维素生物质中水溶性游离单糖的转化利用以及植物修复土

壤重金属镉污染后生物质的有效处理加以研究和报道。如果能够在预处理前将原料中的水溶性单糖直接通过微生物催化的方法转化为乳酸、柠檬酸等有机酸类生物基化学品，不仅可以为生物基化学品的生产提供一个新的思路，还可以增加木质纤维素生物质的利用率，具有重要的应用研究价值。同时，土壤重金属镉污染植物修复技术作为一种资源节约型、环境友好型技术，具有十分广阔的应用潜力，但是如何在避免重金属镉二次污染的前提下，将含镉木质纤维素生物质进行有效地处理是一个非常值得关注的问题。

本文研究了预处理前木质纤维素生物质中水溶性游离单糖的转化利用和采用干法生物炼制技术处理含镉木质纤维素生物质可行性。这主要有两个问题：（1）如何降低木质纤维素原料中水溶性碳水化合物的含量，进而降低干酸预处理过程中羟甲基糠醛的生成量，提高后续乙醇生产效率；（2）在有效地避免镉二次污染的前提下，如何将土壤镉污染植物修复技术与干法生物炼制乙醇生产相整合，进而提高植物修复土壤重金属镉污染的可行性与经济性。

针对以上两个问题，本文从以下几个方面进行了研究：

（1）探究了预处理前固体玉米秸秆中水溶性葡萄糖和果糖的转化利用对预处理后物料中羟甲基糠醛的生成量以及后续生物脱毒和乙醇生产效率的影响。

（2）在含镉木质纤维素生物质（白杨木屑和玉米秸秆）与干法生物炼制纤维素乙醇生产相结合时，探究了重金属镉的存在对乙醇生产的影响以及整个过程中重金属镉的富集情况。

（3）探究了 *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271、*Saccharomyces cerevisiae* XH7 和 *Corynebacterium glutamicum* S9114 对麦秆水解液中重金属镉的耐受性与去除能力。

第 2 章 预处理前玉米秸秆中游离单糖的转化对纤维素乙醇发酵的影响

2.1 引言

农业废弃物或能源植物如玉米秸秆、柳枝稷、麦秆和稻草等用于生物燃料和生物基化学品生产的木质纤维素生物质均含有一定量的水溶性碳水化合物（主要为葡萄糖和果糖）^[122]，其中以玉米秸秆的水溶性游离单糖含量最高，约占整个植株干重的 4-12 %^[122-124]。这些游离单糖主要通过植物体的光合作用合成，对茎秆中纤维素和半纤维素的合成具有促进作用^[125]。因此，玉米秸秆中水溶性糖含量的多少主要取决于玉米秸秆的生长环境（土壤条件、温度、湿度等条件）、收获时间、作物品种以及收获后的晾晒方式与贮存方式等因素^[122, 126]。

尽管玉米秸秆中含有相当比例的水溶性葡萄糖和果糖，但是目前几乎没有文献对玉米秸秆中水溶性单糖的转化利用进行研究报道，其主要原因在于木质纤维素原料的水洗除尘过程使得这部分水溶性碳水化合物被移除或在木质纤维素预处理过程中被降解。由于木质纤维素多种组分之间所构成的致密结构，使得其难以被纤维素酶或微生物菌株直接利用进行生物转化，因此纤维素乙醇等生物燃料或乳酸、柠檬酸等生物基化学品的获得需要通过预处理、脱毒、酶解、发酵等几个关键工序才能实现^[56, 57]。然而，为了能够将木质纤维素的致密结构进行有效地破坏，一般需要在高温、低 pH 等极端条件下进行预处理，才能有利于后续的糖化与发酵操作。在这样的预处理条件下，玉米秸秆中水溶性葡萄糖和果糖（尤其是果糖）往往在预处理过程中被转变为对后续纤维素向可发酵单糖的转化过程和微生物的生长代谢过程有毒副作用的 5-羟甲基糠醛（5-HMF）^[74-76]。该物质对纤维素的酶解过程和微生物的代谢过程产生不利影响，从而阻碍发酵菌株的生长和发酵速率的大幅度下降^[87]。

不管是预处理过程中的降解转化作用，还是水洗除尘过程中的溶解作用，都在一定程度上造成了玉米秸秆中水溶性单糖的损失，又在一定范围内阻碍了后续的生物脱毒和纤维素乙醇生产过程。因此，在干酸预处理前，将玉米秸秆中水溶性单糖进行有效地脱除对提高后续生物脱毒效率和纤维素乙醇发酵效率具有重要意义。

本研究主要是将玉米秸秆原料中水溶性碳水化合物在预处理前通过黑曲霉固态有氧发酵的方式转化为柠檬酸，以避免干酸预处理过程中 5-HMF 的产生。同时，柠檬酸的产生可作为酸催化剂，代替部分硫酸为玉米秸秆预处理过程提供一定的酸性环境，从而降低预处理过程中的硫酸用量。与此同时，在相同预处理、生物脱毒和纤维素乙醇发酵条件下，对比了原始玉米秸秆物料和水溶性碳水化合物转化为柠檬酸后玉米秸秆物料的乙醇发酵性能。本方法是一种环境友好型、资源节约型的生物炼制工艺，对纤维素乙醇生产的工业化实际应用具有重要价值。

2.2 材料与方法

2.2.1 原料

玉米秸秆收获于中国内蒙古通辽地区（2016 年秋季）。用粉碎机将物料粉碎至直径为 10-mm 左右后装入一次性塑料密封袋中，并于常温状态下密封储存以供实验所需。采用美国国家可再生能源实验室（National Renewable Energy Laboratory, NREL）的两步硫酸水解法测定玉米秸秆的成分组成^[127,128]。基于原料干重，玉米秸秆包含 33.2 % 的纤维素、24.9 % 的半纤维素、20.8 % 的木质素、6.2 % 的灰分和 6.3 % 的水溶性碳水化合物（其中葡萄糖 3.3 %，果糖 3.0 %）。

2.2.2 纤维素酶与试剂

商业诺维信纤维素酶 Cellic CTec 2 购买自诺维信（中国）生物技术有限公司。根据 NREL 的 LAP-006 方法测定其滤纸酶活为 203.2 FPU/mL^[129]，根据 Ghose 法测定其纤维二糖酶活为 4900 CBU/mL^[130]，根据 Bradford 法测定其蛋白含量为 87.3 mg/mL^[131]。

本研究中所用酵母提取物（YE）和蛋白胨（Peptone）来自英国汉普郡贝辛斯托克的 Oxoid 公司，其余常见的试剂均为分析纯，购买自国内化学试剂提供商（详见附录 I），所用常见仪器设备见附录 II。

2.2.3 菌株与培养基

固态有氧发酵菌株 *Aspergillus niger* M288 菌株选购于中国上海工业微生物研究所（Shanghai Industrial Institute of Microorganism, SIIM），主要用于将固态玉米秸秆原料中的水溶性单糖转化为柠檬酸。该菌株的孢子液保藏在体积分数为 30 % (v/v) 甘油中，并于 -80 °C 冰箱中保种。

由本实验室自主发现并分离得到的树脂枝孢霉 *A. resiniae* ZN1 是一株优先利用抑制物的丝状霉菌^[84]。保藏在中国微生物菌种保藏中心（China General Microorganism Collection Center, CGMCC, <http://www.cgmcc.net/>），注册号为 7452。在本实验室中，该菌株的保藏方式同 *A. niger* M288。

固态有氧发酵使用的培养基包括：

（1）用于 *A. resiniae* ZN1 和 *A. niger* M288 的马铃薯葡萄糖琼脂（Potato Dextrose Agar, PDA）固体培养基，该培养基含有 200 g/L 马铃薯提取物、20 g/L glucose 和 20 g/L 琼脂；

（2）*A. niger* M288 种子活化培养基含有 70 g/L glucose、2.5 g/L NH₄Cl、2.5 g/L KH₂PO₄、0.25 g/L MgSO₄·7H₂O、2.36 × 10⁻⁴ g/L CuSO₄·5H₂O、1.1 × 10⁻³ g/L ZnSO₄·7H₂O、6.45 × 10⁻³ g/L FeSO₄·7H₂O 和 3.6 × 10⁻³ g/L MnCl₂·4H₂O。

本实验所用纤维素乙醇发酵菌株—酿酒酵母（*S. cerevisiae* XH7）是野生型 *S. cerevisiae* BSIF 经过基因工程分子改造和木质纤维素体系驯化得到的一种工程菌株，也是一株可利用葡萄糖和木糖且具有良好乙醇生产性能的菌株^[132]。培养条件为 30 °C，200 rpm；保藏方式与 *A. niger* M288 相似。

纤维素乙醇同步糖化共发酵 (Synchronized Saccharification and Co-fermentation, SSCF) 过程中使用的培养基包括:

- (1) 一级活化培养基: 20 g/L glucose、20 g/L peptone 和 10 g/L yeast extract (YE);
- (2) 二级短期适应性培养基: 5% (w/w) 预处理脱毒后物料、纤维素酶 CTec 2 的用量为 15 mg 总蛋白/g 纤维素、2 g/L KH_2PO_4 、2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2.05 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 10 g/L YE;
- (3) 三级乙醇发酵培养基: 10% (w/w) 预处理脱毒后物料、纤维素酶 CTec 2 的用量为 15 mg 总蛋白/g 纤维素、2 g/L KH_2PO_4 、2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2.05 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 10 g/L YE。

在 *S. cerevisiae* XH7 种子培养过程中, 预处理脱毒后玉米秸秆 (经过酶水解后可产生足够的可利用单糖) 的使用代替了纯品葡萄糖的使用, 降低了乙醇生产投入成本, 进而增加了以木质纤维素为底物生产乙醇的经济性与适用性。

2.2.4 预处理前柠檬酸固态有氧发酵

由于玉米秸秆原料一直存放在开放环境中, 可能会存在很多的不确定因素。因此, 在固态有氧发酵前, 固态玉米秸秆物料需要经过以下步骤处理: (1) 用离子水将玉米秸秆原料的含水量调至 33.3%; (2) 用高压灭菌锅将该玉米秸秆物料在 115 °C 下灭菌 20 min。

将 1700 g (干重) 玉米秸秆 (灭菌后) 放入收纳盒中, 然后将含有 *A. niger* M288 孢子的种子活化培养基按 10% (种子液体积: 玉米秸秆干重, v/w) 接种量接种至玉米秸秆原料。随后, 将玉米秸秆与发酵种子液充分混合后装入密封袋 (34 cm × 26 cm) 中, 每个密封袋装填玉米秸秆约 650 g (湿重), 于 28 °C 条件下发酵 10 天。定时取样并检测该生物转化过程中物料的各种组分含量以及 pH 值的变化。具体操作如下: 将从发酵体系中提取出的固体样品与去离子水按固液比 1:20 混合, 在 30 °C 和 180 rpm 下用 250 mL 三角瓶振荡 2-3 h, 并用 pH 计测定浆液的 pH 值。收集浸提液的上清液用来分析玉米秸秆中葡萄糖、果糖和柠檬酸含量的变化。

2.2.5 预处理、生物脱毒与同步糖化发酵

采用基本 pH 值的方法^[133]测定了原始玉米秸秆和固态有氧发酵后玉米秸秆在预处理过程中所需硫酸用量。简而言之, 向 250 mL 摇瓶中加入 2 g 干玉米秸秆原料和 100 mL 去离子水, 并在 180 rpm 和 30 °C 条件下振荡混匀 30 min, 然后用 pH 计检测浆液的 pH 值。接着, 用质量分数为 4% (w/w) 硫酸对该浆液 pH 值进行调整, 当该浆液的 pH 值降低至 2.3 左右时停止加入硫酸, 并计算该过程中这两种玉米秸秆原料的硫酸用量。

采用干酸预处理法^[67]对两种玉米秸秆原料进行预处理。简而言之, 在物料干重基础上, 原始玉米秸秆和水溶性游离单糖转化为柠檬酸后玉米秸秆的硫酸用量分别为 3.8% 和 3.5% (w/w), 即每 100 g 干玉米秸秆物料中加入 3.8 g 和 3.5 g 硫酸。将玉米秸秆与稀硫酸溶液按照固液质量比 3:2 同时加至预处理反应器 (20 L) 中, 并在 50 rpm 下搅拌 3 min, 使得玉米秸秆原料和稀硫酸液充分混合, 增加预处理效果的一致性。待混合结

束后，正式开始进行预处理。预处理条件为 175 °C 和 5 min。两种预处理后玉米秸秆的固含量约为 45 %，并且没有废水产生。为了进一步增加纤维素酶对预处理后物料的可接触性能以及从玉米秸秆原料到可发酵单糖的转化率，对预处理后物料进行简单的圆盘研磨，以去除较大的纤维素颗粒。

对两种预处理后玉米秸秆的组分进行了检测，其测定方法与原始物料中的组分测定方法相似。同时，采用 NREL 的 LAP-09 方法对该预处理过程的效率进行酶水解评价^[134]。简单来说，将 0.5 g（干重）预处理后玉米秸秆、一定量的去离子水和 10 mL 的 0.1 mM 柠檬酸缓冲液（pH 4.80）加入 100mL 的三角瓶中，使浆料的固体载量为 2.5 %（w/w）。通过加入 5 mM NaOH 溶液调节浆料 pH 值至 4.8。加入 0.08 mL 盐酸四环素乙醇溶液（10 mg/mL）以避免微生物污染。在纤维素酶载量为 20 FPU/g DM、50 °C 和 150 rpm 条件下的水浴摇床中持续 72 h。

在容积为 15 L 的生物反应器中对两种预处理后物料进行抑制物脱除步骤^[98, 99]。具体操作为：采用 20 %（w/w）Ca(OH)₂ 溶液将物料 pH 调节至 5.5，再将预处理后物料与含有 *A. resiniae* ZN1 的种子按照质量比 9:1 充分混合后转移至反应器，在 28 °C、通气量为 0.8 vvm ($V_{\text{气}}/(V_{\text{物料}} \cdot \text{min}) = 0.8$) 下反应 30 h。

在 30 °C、200 rpm、pH 5.5、酶载量 15 mg 总蛋白/g 纤维素和接种量为 10 %（v/v）条件下，以预处理脱毒后玉米秸秆代替纯葡萄糖作为培养乙醇发酵菌株的唯一碳源，采用两步短期适应法制备乙醇发酵种子液。具体操作步骤如下：（1）将冻存管（贮存于 -80 °C 冰箱）中 *S. cerevisiae* XH7 菌液（2 mL）转接至种子活化培养基（20 mL）中活化 12 h；（2）取部分活化后种子转接到含有 5 %（w/w）预处理脱毒后玉米秸秆的适应培养基中短期驯化培养 12 h；（3）取部分该种子液转接到含有 10 %（w/w）预处理脱毒后玉米秸秆的乙醇发酵培养基中短期驯化培养，24 h 后，该种子液可作为乙醇发酵种子接种至发酵体系。为使种子液中 *S. cerevisiae* XH7 的生物量足够大，生物活性足够好，我们根据菌体兼性厌氧的生长特性，采用有氧发酵的方式（用透气性能较好的八层纱布代替透气性能较差的橡胶塞）对其进行培养。

在 5 L 发酵罐（配备有螺带式搅拌桨）^[135]中，经过 12 h 的酶解过程（酶解条件为：50 °C、pH 4.8 和纤维素酶载量 10 mg 总蛋白/g 纤维素），将预处理脱毒后玉米秸秆转化成只含有水溶性葡萄糖和木糖及其低聚糖的液体浆料。然后将糖化条件调节至发酵条件，即温度为 30 °C、pH 5.5 和搅拌转速为 200 rpm。接着，再将经过短期适应性驯化后的纤维素乙醇生产菌株 *S. cerevisiae* XH7 按照体积比 20 %（v/v）的接种量接种到该液体浆料（固体载量为 30 %，w/w）中持续发酵 108 h，将预处理脱毒的玉米秸秆经纤维素酶水解后所得的液体浆料中的葡萄糖和木糖转化为乙醇。在整个纤维素乙醇发酵过程中，添加的营养成分包括 2 g/L KH₂PO₄、2 g/L (NH₄)₂SO₄、2 g/L MgSO₄·7H₂O 和 10 g/L YE。由于发酵过程中木聚糖的水解会导致部分乙酸的产生，发酵体系会出现 pH 值略微下降的现象，因此采用 5 M NaOH 溶液将发酵过程中的 pH 值维持在 5.5。为表征乙醇生产效果，每隔 12 h 取样一次，经过离心（10,000 rpm, 5 min）后，上清液用于监测发酵

过程的参数变化。

2.2.6 糖类、柠檬酸、乙醇和抑制物分析

在色谱柱的柱温为 65 °C、进样量为 20 mL 和流动相（5 mM 的 H₂SO₄ 溶液）的流速为 0.6 mL/min 下，用配备有 Bio-Rad Amiex HPX-8H 色谱分析柱（300 mm×7.8 mm, Bio-Rad, Hercules, CA, 美国）的 HPLC（LC-20AD 高压输送泵，RID-10A 检测器，岛津，京都，日本）测定样品中的葡萄糖、果糖、木糖、乙醇、柠檬酸、乙酸、糠醛和 5-HMF 浓度。由于样品中含有较多杂质颗粒，易对 HPLC 检测系统造成不利影响，因此样品测定前需采用 0.22 μm 的滤膜对样品进行过滤除菌。

2.2.7 乙醇得率计算

根据纤维素酶解过程中水的流失和发酵过程中乙醇的形成、木糖的利用，在原有基础上改进乙醇得率的计算方法^[136]。

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

其中 [Ethanol] 是发酵终点醪液中的乙醇浓度 (g/L)；W 是水解体系或发酵体系中水的总质量 (g)；M 是加入到酶解体系或发酵体系中物料的总质量 (g)；[Cellulose] 是加入到酶解体系或发酵体系中物料的纤维素含量 (g/g DM)；[Xylose] 是加入到酶解体系或发酵体系中物料的木糖含量 (g/g DM)；[Solids] 是加入到酶解体系或发酵体系中物料的固体含量 (g/g)；976.9 是用于衡量质量浓度 (g/g) 和体积浓度 (g/L) 之间相互转化的乙醇校正因子；0.804 是用于计算发酵体系中水损失的无量纲因子；1.111 是等量葡萄糖与纤维素之间相对分子质量之比；0.511 是生物化学计量学中计算酵母菌将糖转化为乙醇的无量纲转换系数。

木糖消耗率是指发酵体系中木糖的起始浓度与终止浓度的变化量相对于木糖起始浓度的百分比。

2.3 结果与讨论

2.3.1 玉米秸秆固态有氧发酵实验与预处理后物料组分测定

固态玉米秸秆原料中的水溶性游离单糖的含量主要通过以下方法测定：将 4 g 干玉米秸秆和 80 mL 去离子水加入到 250 mL 三角瓶中于 30 °C、180 rpm 下振荡 2 h，然后取出浆料并离心取上清，通过高效液相色谱（HPLC）测定原始玉米秸秆中的水溶性碳水化合物（主要为葡萄糖和果糖）的含量。如图 2.1 所示，每克干玉米秸秆中含有 32.8 mg 的葡萄糖和 30.8 mg 的果糖。当接入 *A. niger* M288 孢子液并发酵 10 天后，玉米秸秆的 pH 值由 5.3 降低至 3.6。同时，玉米秸秆中水溶性游离单糖的含量也大幅度降低（减少量约为初始值的 83.0 %），其中葡萄糖被消耗 91.0 %，果糖被消耗 75.0 %，同时生成了 13.7 mg/g DM 的柠檬酸。

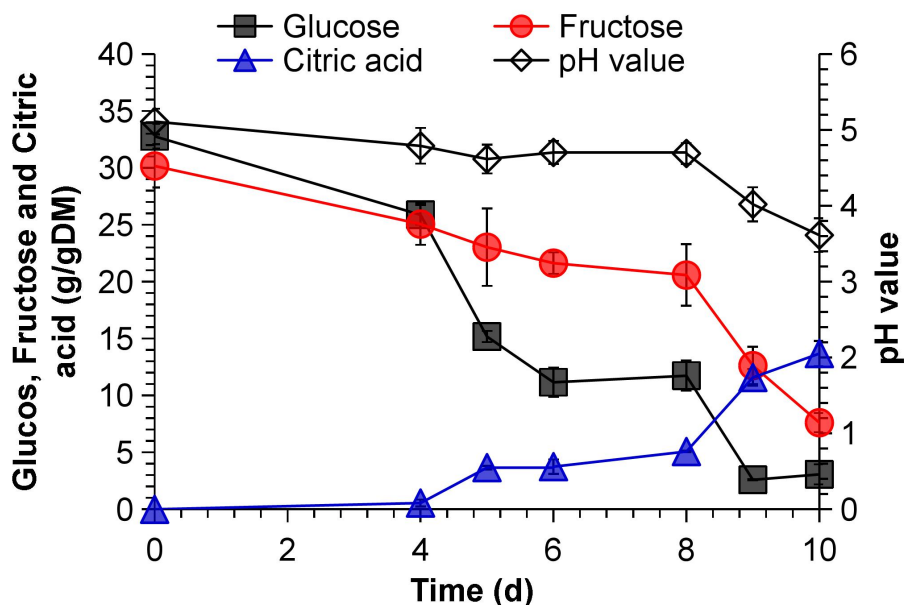


图 2.1 预处理前玉米秸秆固态有氧发酵过程中柠檬酸的产生和水溶性碳水化合物消耗情况

Fig. 2.1 The formation of citric acid from water soluble carbohydrates in corn stover by aerobic solid state fermentation.

固态有氧发酵条件: 28 °C, 初始 pH 值为 5.3, 发酵周期为 10 天, 固态玉米秸秆原料的含水量为 33.3 %, *A. niger* SIIM M288 接种量为 10 % (v/w), 每个密封袋 (34 cm × 26 cm) 的装载量为 650 g (wet material, WM), 整个发酵过程任何无外源营养盐的添加。

采用两步硫酸水解法^[134,135]对两种预处理后玉米秸秆物料进行组分含量测定, 即先用质量分数为 72 % 的硫酸对预处理后物料进行预水解, 对木质纤维素结构进一步破坏, 将其降解为低聚多糖。接着再用质量分数为 4 % 的硫酸, 在 121 °C 下将低聚多糖转化为葡萄糖和木糖。然后经过碳酸钙中和, 充分混匀后取出 1 mL 混合液于 Eppendorf (EP) 管中, 并离心 (5 min, 10,000 rpm) 取上清。该上清液经稀释过滤 (0.22 μm 滤膜) 后用于 HPLC 测定并计算预处理后物料中组分含量。在该测定过程中, 由于葡萄糖和木糖可能会被转化为其它物质, 因此需要校正曲线来表征。

经过计算发现, 虽然预处理过程中两种玉米秸秆的硫酸用量不同, 但是预处理效果基本相似, 具体组分结果如表 2.1 所示。在相似的结构破坏程度下, 由于预处理前固态玉米秸秆中水溶性单糖的大量消耗, 干酸预处理时 5-HMF 的生成量急剧降低 (与对照组相比大约降低 41.0 %, 6.2 mg/g DM vs. 10.5 mg/g DM)。这是由于在高温和低 pH 值的预处理条件下, 木质纤维素原料中的游离葡萄糖和果糖, 尤其是果糖, 容易降解为 5-HMF^[30-32]。

在干酸预处理前, 固态有氧发酵过程产生的柠檬酸可作为酸催化剂, 代替预处理过程中的部分硫酸, 从而降低了预处理过程中的酸用量 (由每 100 g 干玉米秸秆添加 3.8 g 硫酸降低至 3.5 g)。两种预处理后物料的组分含量测定结果表明, 干酸预处理前玉米秸秆中水溶性葡萄糖和果糖的消耗以及柠檬酸的产生可以有效降低预处理过程中的硫酸用量和 5-HMF 的生成量。

表 2.1 两种预处理后玉米秸秆物料组分测定及其酶解评价

Table 2.1 Structural composition and enzymatic hydrolysis yield of two pretreated corn stover

Two corn stover	Composition of pretreated corn stover (mg/g DM)					72 h Enzymatic hydrolysis yield (%)
	Cellulose (% w/w)	Hemicellulose (% w/w)	Acetate (mg/g DM)	Furfural (mg/g DM)	5-HMF (mg/g DM)	
Raw	34.5	2.9	21.9	5.9	10.5	94.3
WSC removal	33.3	2.9	20.8	6.0	6.2	96.0

预处理条件为：玉米秸秆干重与稀酸液溶液的比值为 3:2、预处理温度为 175 °C、搅拌转速为 50 rpm、反应时间为 5 min 和硫酸用量为 3.5-3.8 %（原始玉米秸秆原料酸用量为：每 100 g 干玉米秸秆 3.8 g 硫酸，固态有氧发酵后玉米秸秆酸用量为：每 100 g 干玉米秸秆 3.5 g 硫酸）。

酶解条件为：固体载量为 2.5 % (w/w)、纤维素酶载量为 20 FPU/g DM、pH 4.8、温度为 50 °C、转速为 150 rpm、反应时间为 72 h。

2.3.2 两种预处理后玉米秸秆的生物脱毒和纤维素乙醇发酵性能检测

由于木质纤维素原料结构的难以利用性，在使用其生产纤维素乙醇、柠檬酸等生物基化学品^[15, 16]时，常需要在高温和低 pH 值等极端条件下对其致密结构进行预破坏，在这样的预处理条件下，木质纤维素生物质中的某些组分会发生转化作用，可能会产生一些不利于后续发酵的物质，比如乙酸、糠醛、羟甲基糠醛等^[24, 25]。因此，在进行纤维素乙醇发酵前应将这些抑制物进行降低或脱除，以保证后续发酵操作的进行。在这一过程中，由于氢氧化钙作为中和剂调节预处理玉米秸秆的 pH 值以期其适用于生物脱毒菌株树脂枝孢霉 *A. resinae* ZN1^[44]的生长，固态有氧发酵过程中产生的柠檬酸与氢氧化钙结合产生不溶性的沉淀。因此，可排除物料中柠檬酸的存在对后续乙醇发酵的影响。

利用抑制物脱除菌株 *A. resinae* ZN1 对两种预处理后玉米秸秆（原始玉米秸秆和固态有氧发酵后玉米秸秆）进行 30 h 的快速脱毒，并检测脱毒前后抑制物含量的变化。在相同的生物脱毒条件（28 °C，0.8 vvm）下，两种干酸预处理后玉米秸秆中抑制物的去除效率也会明显不同。如图 2.2 所示，在脱毒 30 h 后，两种预处理玉米秸秆中糠醛被完全脱除，但乙酸和羟甲基糠醛的脱除比例明显不同。对于原始玉米秸秆而言，71.0 % 的羟甲基糠醛和 10.0 % 的乙酸被脱除，脱毒后该物料中的羟甲基糠醛含量为 3.0 mg/g DM 和乙酸含量为 19.7 mg/g DM。对于固态有氧发酵后玉米秸秆而言，88.0 % 的羟甲基糠醛和 61.0 % 的乙酸被脱除，脱毒后该物料中的羟甲基糠醛含量为 0.7 mg/g DM 和乙酸含量为 8.1 mg/g DM。两种预处理后玉米秸秆物料的脱毒实验结果表明，预处理前玉米秸秆中水溶性碳水化合物的消耗有效地提高了生物脱毒效率。

在较短的生物脱毒时间内，两种预处理脱毒后玉米秸秆能够保留较多的木糖为纤维素乙醇的生产提供一定的碳源。本章节以 *S. cerevisiae* XH7 为发酵菌株，以两种预处理脱毒后玉米秸秆物料为原料，在 30 % 固体载量、10 mg 总蛋白/g 纤维素的酶载量下进行纤维素乙醇发酵。

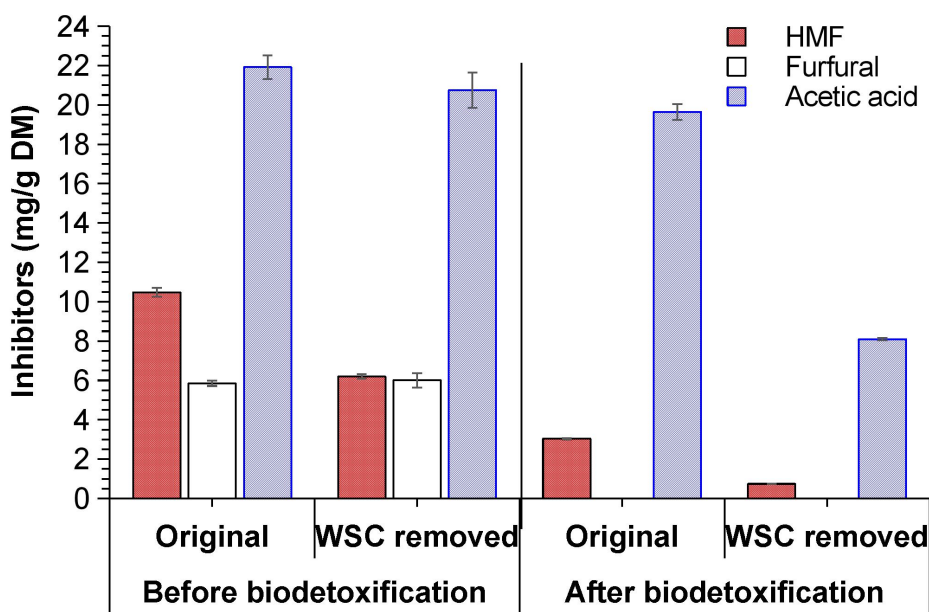


图 2.2 在生物脱毒前后，两种预处理后玉米秸秆物料中抑制物含量变化

Fig. 2.2 Degrading of inhibitors in the pretreated corn stover feedstock by biotreatment.

生物脱毒条件：温度 28 °C，通气量 0.8 vvm ($V_{气} / (V_{物料} \cdot \text{min}) = 0.8$)，脱毒时间 30 h，树脂枝孢霉 *A. resinae* ZN1 接种量 10 % (w/w)。

简写：WSC，水溶性碳水化合物；HMF，羟甲基糠醛；DM，干重。

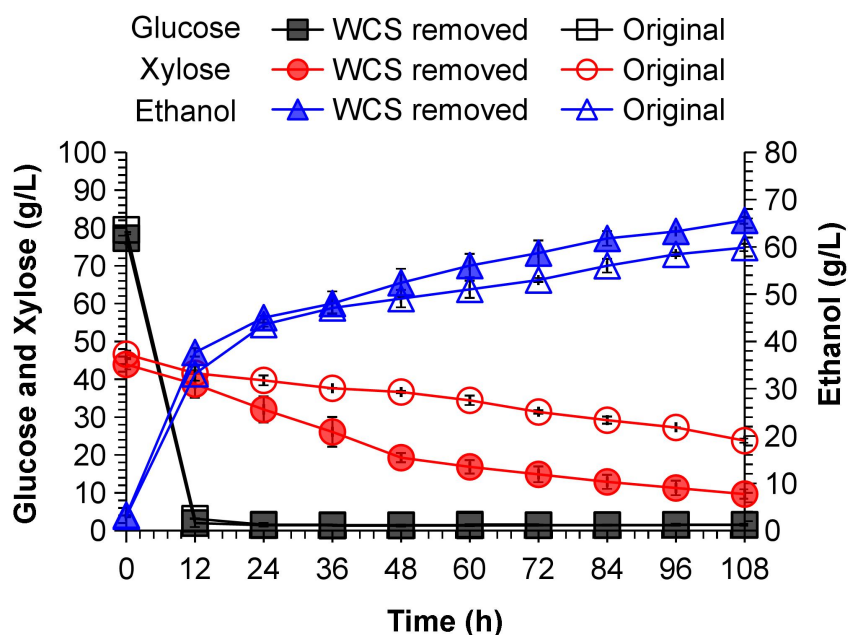


图 2.3 在相同 SSCF 条件下，两种预处理脱毒后玉米秸秆物料乙醇发酵性能评价

Fig. 2.3 Ethanol fermentation performance of the two pretreated and biotreated corn stover (with and without the removal of water soluble carbohydrates) by SSCF at the same experimental conditions.

糖化条件：固含量 30 % (w/w)，纤维素酶载量 10 mg total protein/g cellulose，温度 50 °C，pH 4.8，糖化时间 12 h。

发酵条件：温度 30 °C，pH 5.5，发酵时间 108 h，*S. cerevisiae* XH7 接种量 20 % (v/v)。

简称：CS，玉米秸秆；WSC，水溶性碳水化合物

图 2.3 表明, 在相同的同步糖化共发酵条件下, 两种预处理脱毒后玉米秸秆物料表现出不同的纤维素乙醇发酵性能。与原始玉米秸秆预处理脱毒后物料相比, 固态有氧发酵后玉米秸秆原料中抑制物含量较低(主要为物料中羟甲基糠醛和乙酸含量), 经过 108 h 发酵后纤维素乙醇浓度为 65.6 g/L, 木糖消耗率为 78.0 %, 远高于原始玉米秸秆预处理后物料的纤维素乙醇发酵指标(59.9 g ethanol/L, 木糖消耗率为 49.0 %)。此外, 在原始玉米秸秆预处理后物料的纤维素乙醇发酵过程中, 出现了 12 h 的菌体生长延滞期, 然而, 在固态有氧发酵后玉米秸秆预处理后物料的纤维素乙醇发酵中却未出现菌体生长延滞期。以上实验数据表明, 预处理前玉米秸秆中水溶性游离单糖的去除可有效增加纤维素乙醇的发酵效率(与原始玉米秸秆相比, 乙醇浓度约增加 11.0 %)。

2.4 本章小结

本章重点在于研究玉米秸秆中水溶性游离单糖的去除对干酸预处理过程中硫酸用量和 5-HMF 生成量的影响, 进而考虑了其对生物脱毒效率和纤维素乙醇发酵效率的影响。对本章的研究成果总结如下:

(1) 在干酸预处理前, 玉米秸秆中水溶性碳水化合物经固态有氧发酵方式转化为柠檬酸。一方面降低玉米秸秆中水溶性游离单糖的含量, 进而降低预处理过程中 5-HMF 的生成量(10.5 mg/g DM vs. 6.2 mg/g DM); 另一方面, 柠檬酸的产生可以降低预处理过程中硫酸的用量(从每 100 g 干玉米秸秆使用 3.8 g 硫酸降低至 3.5 g), 减少木质纤维素生物转化过程的投资成本。

(2) 在相同的生物脱毒条件下, 预处理后物料中 5-HMF 的降低有效地增加了 *A. resinae* ZN1 的生物脱毒效率。

(3) 在相同的 SSCF 条件下, 预处理前固态玉米秸秆中水溶性游离单糖的消耗有效地增加了纤维素乙醇的发酵效率, 提高了发酵体系中木糖的消耗率, 促进纤维素乙醇的工业化进程。

第 3 章 干法生物炼制含镉木质纤维素生物质为乙醇的可行性分析

3.1 引言

近年来,随着人们生活水平不断提高以及对自然的不断索取,环境污染问题尤其是土壤重金属污染威胁着人类的生存和社会的可持续发展^[19-23]。目前,土壤中重金属主要来源于一些人类活动,例如矿产的开采、废水灌溉的应用以及车辆和工业活动等^[96]。土壤中的重金属污染具有积累性、滞后性等特点,不仅会导致植物的各种形态、生理、生化和超微结构变化,还可能通过直接接触或食物链循环危及人类健康与生命安全^[137, 138]。对于土壤中多种重金属离子而言,镉(Cd)的相对流动性较强,即毒性较强,对几乎所有动植物都具有一定毒性^[94, 99]。人体内的镉积累主要是以食物链循环为媒介^[37],通过多次的重金属镉循环富集就非常有可能导致一些疾病,例如痛痛病、癌症和中毒性肾损害,甚至导致人身死亡^[42, 43]。

与化学固定法、化学冲洗法等传统土壤重金属镉污染修复方法相比,作为近年来备受关注与欣赏的植物修复技术具有更多的优势,是一种环境友好型、资源节约型土壤镉污染修复手段,该技术是利用镉超富集植物吸附或者固化土壤中的镉,进而降低其含量或者转移能力,从而达到治理土壤镉污染的目的^[46, 47]。该技术的一个核心步骤就是是否能够找到合适的超富集植物。目前,文献中所报道的可作为重金属镉的超富集植物^[53]多为草本植物,常表现出植株矮小、生物量小、生长周期长等缺陷,极大地限制了其在镉污染修复过程中的应用潜力。然而,杨树、柳树等木本科植物的生物量大、对重金属的吸附能力强、生长周期短、根系发达且一般不参与食物链循环,可在一定程度上避免对人类等高等动物造成伤害^[53]。

植物修复土壤重金属镉污染的另一个关键步骤就是如何将吸附重金属后的植株进行合理有效地处理,以避免重金属镉的二次污染。一方面,必须要保证土壤重金属镉污染植物修复的有效性,即含镉植株在后续处理过程中不会对修复后的土壤造成再次污染。另一方面,也要尽可能的提高含镉植株处理的经济性,即含镉生物质原料应当能产生一定的经济效益。有些地区将含有重金属的生物原料直接进行焚烧以获取重金属^[120]。焚烧产生的烟易造成重金属的二次污染,又易形成温室气体,加速全球冰川融化进程。Slycken SV 等人^[139]通过厌氧转化的方式将含有镉离子的玉米秸秆转化为可作为燃料使用的多组分气体,然而却未对厌氧发酵后的残渣以及废水应进行如何处理给出相应的解决方案,在一定程度上存在重金属镉的二次污染风险。Wan XM 等人^[140]采用多年生桑树植株治理土壤重金属污染,然后将得到的桑叶用于蚕养殖业。此外,他们也研究了通过不同植株之间的间作来实现重金属污染土壤的安全利用,即将超富集植物与所需经济作物共同种植,通过两者之间的相互竞争作用(前者对重金属的高吸附能力),降低经济作物中有毒金属含量,从而得到符合国家标准的经济作物^[141]。这些植物修复技术要么是植物对重金属的吸附量不足,要么为了将重金属富集至植物但又未对该植物进行合

理有效地处理。

采用木质纤维素原料生产燃料乙醇被广大学者一致认为是一种可持续发展的技术，具有社会效益和环境效益^[142, 143]。为了实现绿色修复的目标，深刻贯彻可持续发展观，将植物修复土壤重金属污染后生物质用于纤维素乙醇生产具有非常深刻的意义。Dhiman 等人^[144]将土壤重金属植物修复后生物质—油菜秸秆用来生产纤维素乙醇。该研究方向立意新颖，为后续含有重金属的生物质的处理提供了一个较为科学的方向，但是油菜秸秆预处理所采用的方法为稀碱预处理，且为防止灰分中某些物质对预处理的效果造成干扰，对生物质原料进行了水洗除尘等步骤。由于重金属离子的存在，一旦处理不当就会产生大量难以处理的废水，对自然环境而言存在严重的再次侵害风险。因此，为增加植物治理土壤重金属污染的有效性，必须保证利用该类植物生产乙醇的高效性和低废性。本实验室所研发出的干法生物炼制技术是一种低能耗、低废水、高效率、高效益的木质纤维素生物质转化技术^[68, 84, 85]。如果能够采用该技术处理植物修复土壤重金属污染后生物质，将有可能在一定程度上减少植物修复土壤重金属污染的成本，促进植物修复技术的发展。

本研究尝试采用含镉玉米秸秆和白杨木屑原料经干法生物炼制技术生产高浓度纤维素乙醇。一方面，在避免重金属二次污染的前提下，将含镉的白杨和玉米秸秆进行有效处理，实现土壤重金属污染的根本性解决；另一方面纤维素乙醇的获得可提高土壤重金属污染植物修复技术的经济性，降低土壤重金属污染治理投入成本，加速该技术的实际应用进程。

3.2 材料与方法

3.2.1 原料和纤维素酶

本实验所用玉米秸秆于 2016 年秋季在中国内蒙古通辽地区收获。经 10-mm 锤式粉碎机粉碎后即可装入一次性塑料密封袋中，常温密封储存于实验室通风干燥处，且应避免火灾隐患，以供实验所需。意大利白杨木屑于 2015 年在中国江苏省盐城市收获，该物料除无需进一步粉碎外，储存条件和储存方式与玉米秸秆相同。在物料干重基础上，白杨木屑和玉米秸秆物料中分别包含 39.8 %和 33.2 %的纤维素、16.5 %和 24.9 %的半纤维素、29.0 %和 20.8 %的木质素和 3.4 %和 6.2 %的灰分。

本章节所用纤维素酶详见 2.2.2。

3.2.2 菌株与培养基

羟甲基糠醛、酚类等抑制物脱除菌株—树脂枝孢霉 (*A. resiniae* ZN1)^[40]和纤维素乙醇发酵菌株—酿酒酵母 (*S. cerevisiae* XH7) 均与 2.2.3 相同。

纤维素乙醇发酵使用的培养基同 2.2.3, *S. cerevisiae* XH7 的培养方式同 2.2.5。

3.2.3 预处理、生物脱毒与同步糖化发酵

采用干酸预处理法^[67]对意大利白杨木屑和玉米秸秆这两种木质纤维素生物质结构进行破坏。简单来说，在物料干重基础上，意大利白杨木屑的硫酸用量为 1.5 % (w/w,

每 100 g 干白杨木屑中加入 1.5 g 硫酸), 玉米秸秆的硫酸用量为 3.8 % (w/w, 每 100 g 干玉米秸秆中加入 3.8 g 硫酸)。将玉米秸秆或白杨木屑与稀硫酸溶液按照固液比 2:1 (w/w) 同时加至预处理反应器 (20 L) 中, 并在 50 rpm 下搅拌 3 min, 使得物料和稀硫酸溶液充分混合, 增加预处理效果的一致性。待混合结束后, 正式开始进行预处理。预处理条件为 175 °C 和 5 min。两种预处理后物料的固含量约为 50 %, 并且在整个过程中没有废水产生。

由于木质纤维素原料在经过低 pH 值和高温的稀酸预处理后, 会产生乙酸、糠醛等抑制物^[59, 60], 因此, 在进行后续乙醇等生物基化学品的生产前, 应对预处理后木质纤维素生物质进行脱毒。除脱毒时间不同 (含镉玉米秸秆, 48 h; 含镉白杨木屑, 96 h) 外, 其余具体操作均同 2.2.5。由于木屑中含有较多的木质素, 在干酸预处理过程中会产生较多的酚类抑制物, 对后续乙醇的生产带来较大的抑制作用。同时, *A. resinae* ZN1 对酚类抑制物的转化速率较慢。因此, 预处理后白杨木屑的脱毒步骤需要较长的脱毒时间, 以保证物料中抑制物含量的去除^[84, 85], 从而对纤维素乙醇的 SSCF 产生有利影响, 使得发酵终点的乙醇浓度更高。

在 30 °C、200 rpm 和 15 mg 总蛋白/g 纤维素的酶载量条件下, 以预处理脱毒后含镉白杨木屑或玉米秸秆代替纯品葡萄糖作为碳源, 采用两步短期适应法制备 *S. cerevisiae* XH7 乙醇发酵种子培养基, 具体步骤同 2.2.5。本章节研究以含镉玉米秸秆 (处理镉污染后木质纤维素生物质) 和含镉白杨木屑 (重金属镉超富集植物) 为实验组, 以不含镉玉米秸秆和白杨木屑为对照组, 以工程菌株 *S. cerevisiae* XH7 为发酵菌株经干法生物炼制过程生产纤维素乙醇, 该发酵过程操作、营养成分的添加和发酵体系的 pH 值的维持均同 2.2.5。定时 (每隔 12 h) 取样离心 (10,000 rpm, 5 min) 并检测过程中的参数变化以表征乙醇生产效果。

3.2.4 糖类、乙醇和抑制物分析

在含镉木质纤维素生物质乙醇生产过程中, 葡萄糖、木糖、乙醇、乙酸、糠醛和 5-HMF 含量的测定方法详见 2.2.6。

3.2.5 乙醇得率计算

由于本章节实验所用发酵菌株与第 2 章节相同, 均为葡萄糖和木糖共发酵菌株, 即工程菌株 *S. cerevisiae* XH7, 因此, 在整个纤维素乙醇生产过程中, 乙醇得率和木糖转化率的计算方式同 2.2.7。

3.2.6 乙醇发酵残液处理

本章节实验关注重点在于探究植物修复土壤镉污染或因某种原因被镉污染后的生物质通过干法生物炼制转化为乙醇的可行性。预处理脱毒后物料经纤维素酶 Cellic CTec 2 的糖化和 *S. cerevisiae* XH7 的发酵后所得发酵醪再经简单的乙醇蒸馏装置粗蒸馏获得粗乙醇, 蒸馏后所得发酵醪残液再经烘箱 (DHG-9140A, 60 °C, 24 h) 干燥和热重分析仪 (METTLER TOLEDO, TGA/DSC1, 22.5 °C/min, 250 °C, 30 min; 16.5 °C/min, 575 °C, 3 h) 灰化, 灰化后样品中重金属镉含量与初始木质纤维素生物质中重金属镉含量的比值

用于表征纤维素乙醇生产的整个过程中重金属镉的富集倍数。同时,该过程的主要步骤中镉的总量用于表征纤维素乙醇生产过程中重金属镉是否存在二次污染的可能性,进而验证该技术在实际应用过程中的处理有效性。

3.2.7 重金属镉的添加与测定

在干法生物炼制初始阶段(即木质纤维素生物质预处理阶段)以外源添加重金属镉离子(CdSO_4)的方式来模拟白杨修复土壤重金属镉污染后生物质和被重金属镉侵染后玉米秸秆的生物炼制过程。采用等离子发射光谱仪(ICP-AES)检测预处理、脱毒、糖化与发酵、产品提纯、干燥和灰化等干法生物炼制关键步骤中重金属镉含量与镉总量的变化情况。

3.3 结果与讨论

3.3.1 *S. cerevisiae* XH7 对重金属镉的耐受性能

由于重金属镉的累积性与不可降解性,且对微生物具有较强的毒性^[40,41],因此,在进行纤维素乙醇发酵前,首先在合成培养基中探究了葡萄糖和木糖发酵菌株 *S. cerevisiae* XH7 对重金属镉的耐受性。具体操作如下:在初始重金属镉含量为 0 mg/L、10 mg/L、20 mg/L、30 mg/L、40 mg/L 和 80 mg/L 的合成培养基(葡萄糖为唯一碳源,营养液的添加与纤维素乙醇发酵时相同)中培养 *S. cerevisiae* XH7,并对其培养过程中的葡萄糖和乙醇浓度变化及菌体生成情况进行研究分析。

实验结果如图 3.1 所示,随着合成培养基中镉含量的增加,*S. cerevisiae* XH7 对葡萄糖的消耗速率及其生物量逐渐呈现出下降的趋势。当合成培养基中镉含量大于 10 mg/L 时,*S. cerevisiae* XH7 几乎不生长,葡萄糖也几乎没有什么消耗,且无乙醇产生。然而,当合成培养基中镉含量小于 10 mg/L 时,乙醇最终浓度与对照组相似(17.7 vs. 20.5 g/L),但发酵体系内的葡萄糖消耗量(60.0 vs. 42.3 g/L)和菌体量(7.5 vs. 3.5, OD_{600})有明显的差别。该结果的出现可能是由于重金属镉的存在抑制了工程菌株 *S. cerevisiae* XH7 的生长和繁殖,进而抑制了菌体对葡萄糖的消耗能力,但低浓度下的镉对菌体产醇能力影响较小。以上实验结果表明,*S. cerevisiae* XH7 可以在重金属镉浓度为 10 mg/L 以内的体系中生长并生产乙醇。

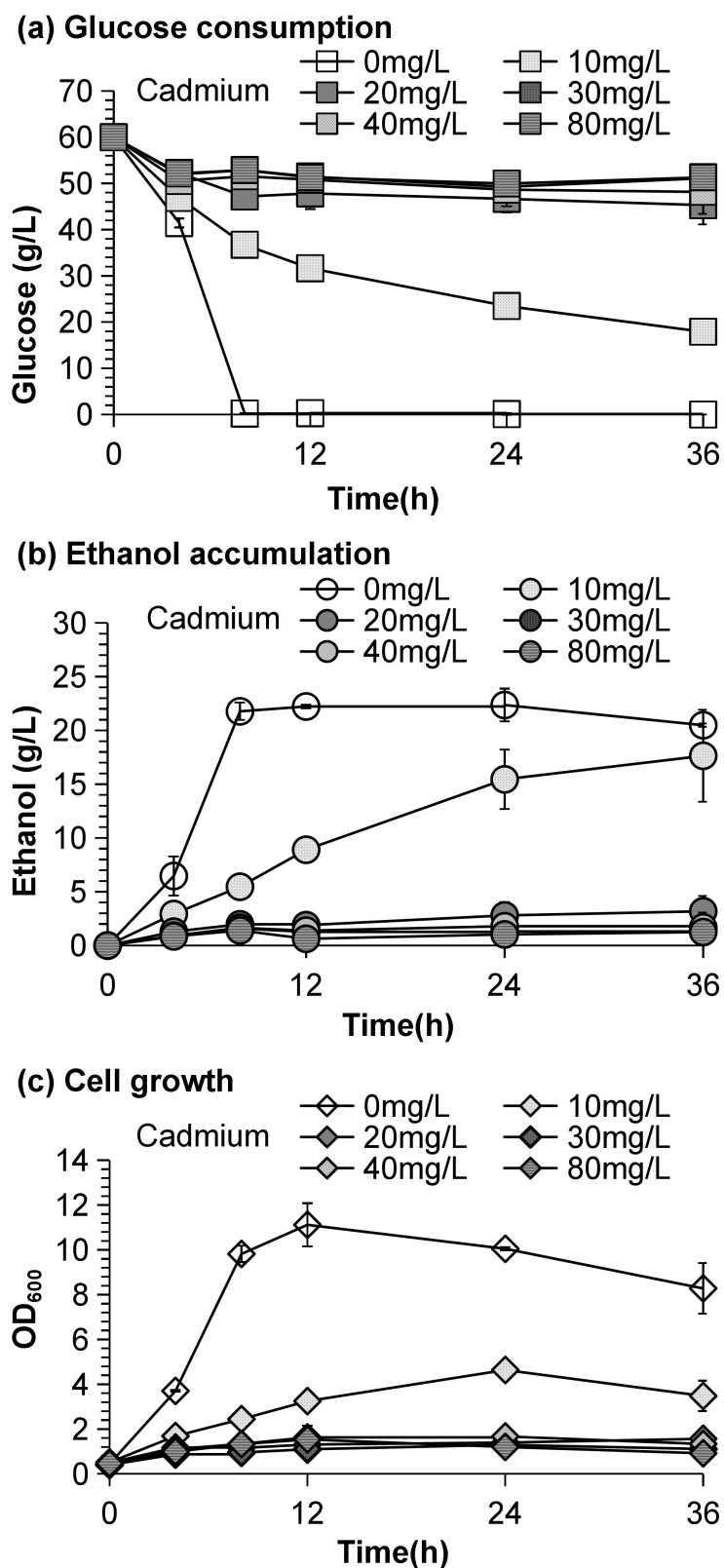


图 3.1 在不同重金属镉浓度体系中, *S. cerevisiae* XH7 的发酵性能评价

Fig. 3.1 Ethanol fermentation performance of *S. cerevisiae* XH7 in different cadmium concentration systems.

(a) 葡萄糖变化; (b) 乙醇变化; (c) OD₆₀₀ 变化;

发酵条件: 温度 30 °C, pH 5.5, 发酵时间 36 h, *S. cerevisiae* XH7 接种量 10% (v/v)

3.3.2 同步糖化共发酵实验

对预处理前后含镉木质纤维素生物质（玉米秸秆和白杨木屑）的组分进行测定，并对该预处理效果进行评价。结果如表 3.1 所示，在两种预处理后含镉物料中，木聚糖被大量降解为木单糖和寡聚木聚糖，乙酸、糠醛和羟甲基糠醛的含量也有明显的增加，72 h 纤维素酶水解得率也较高，因此可以认为该条件下的预处理可以有效地破坏白杨木屑和玉米秸秆的组织结构，为后续纤维素酶的糖化过程提供一定的便利。

为探究木质纤维素生物质中重金属镉的存在对纤维素乙醇发酵性能的影响。在带有特殊装置的 5 L 发酵罐^[135]中对两种预处理脱毒后玉米秸秆（含镉和不含镉玉米秸秆）进行了固体含量为 30 %（w/w）的乙醇同步糖化共发酵实验。结果如图 3.2（a）所示，在相同的糖化和发酵条件下，两种预处理脱毒后玉米秸秆表现出相似的纤维素乙醇发酵性能。经过 12 h 糖化后，含镉与不含镉的发酵体系中葡萄糖和木糖含量分别为 79.7 g/L 和 77.3 g/L、45.2 g/L 和 43.9 g/L。经过 *S. cerevisiae* XH7 消耗代谢 108 h 之后，含镉与不含镉玉米秸秆发酵醪液中残留的葡萄糖浓度分别为 1.4 g/L 和 1.6 g/L、木糖浓度分别为 11.4 g/L 和 9.7 g/L，所得乙醇浓度分别为 63.0 g/L 和 65.6 g/L，得率分别为 67.3 %和 70.7 %。

为拓展纤维素乙醇干法生物炼制技术与土壤重金属镉污染植物修复技术整合方案的可行性，对重金属镉超富集植物—白杨进行了纤维素乙醇生产。在与之前相同的 5 L 发酵罐^[142]中对两种预处理脱毒后白杨木屑（含镉和不含镉白杨木屑）进行 25 %固含量乙醇同步糖化共发酵实验。结果如图 3.2（b）所示，在相同的糖化和发酵条件下，两种预处理脱毒后白杨木屑也表现出相似的纤维素乙醇发酵性能（主要表现在发酵体系中的初始葡萄糖和木糖含量、剩余葡萄糖和木糖含量以及发酵终点的纤维素乙醇浓度）。

不论是木质纤维素生物质中初始重金属镉含量为 83 mg/g DM 还是 55 mg/g DM，以这两种生物质原料为底物进行纤维素乙醇生产时，其发酵醪液中重金属镉浓度都应该超过 10 mg/L。根据合成培养基中 *S. cerevisiae* XH7 对重金属镉的耐受性实验结果可知，当发酵液体体系中重金属镉含量超过 10 mg/L 时，*S. cerevisiae* XH7 的生长和乙醇的生产性能会有严重的抑制作用。因此对以上两种木质纤维素生物质原料的纤维素乙醇发酵醪液进行重金属镉含量测定，结果显示，当木质纤维素生物质中初始镉含量在 83 mg/g DM 以内时，这两种纤维素乙醇发酵醪液的重金属镉含量均低于 10 mg/L。该结果的出现可能是由于木质纤维素的预处理过程及其酶解糖化过程使得木质素分子暴露出更多的阴性离子基团，由于阴阳离子的相互作用将重金属镉螯合在木质素上，从而防止了镉对 *S. cerevisiae* XH7 的损伤抑制作用。

表 3.1 含锯木质纤维素原料预处理前后物料组分测定及酶水解得率

Table 3.1 Structural composition and enzymatic hydrolysis yield of the pretreated and the raw lignocellulose biomass

	Cellulose (%, w/w)	Hemicellulose (%, w/w)	Sugars (mg/g DM)				Inhibitors (mg/g DM)			72 h Enzymatic hydrolysis yield (%)
			Glucose	Xylose	O - Glu	O - Xyl	Acetate	Furfural	5-HMF	
Raw PWC	39.8	16.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-
Raw CS	33.2	24.9	3.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-
Pretreated PWC	42.2	4.3	19.2	118.4	3.8	43.3	20.0	1.8	1.1	73.0
Pretreated CS	35.7	2.8	30.8	109.3	12.7	27.6	17.4	4.7	9.3	93.0

预处理条件为：固液比为 2:1、温度为 175 °C、转速为 50 rpm、时间为 5 min 和酸用量为 1.5-3.8 %（每 100 g 干白杨木屑 1.5 g 硫酸；每 100 g 干玉米秸秆 3.8 g 硫酸）。

简写：O-Glu, 寡聚葡聚糖；O-Xyl, 寡聚木聚糖；HMF, 羟甲基糠醛；DM, 物料干重；PWC, 白杨木屑；CS, 玉米秸秆。

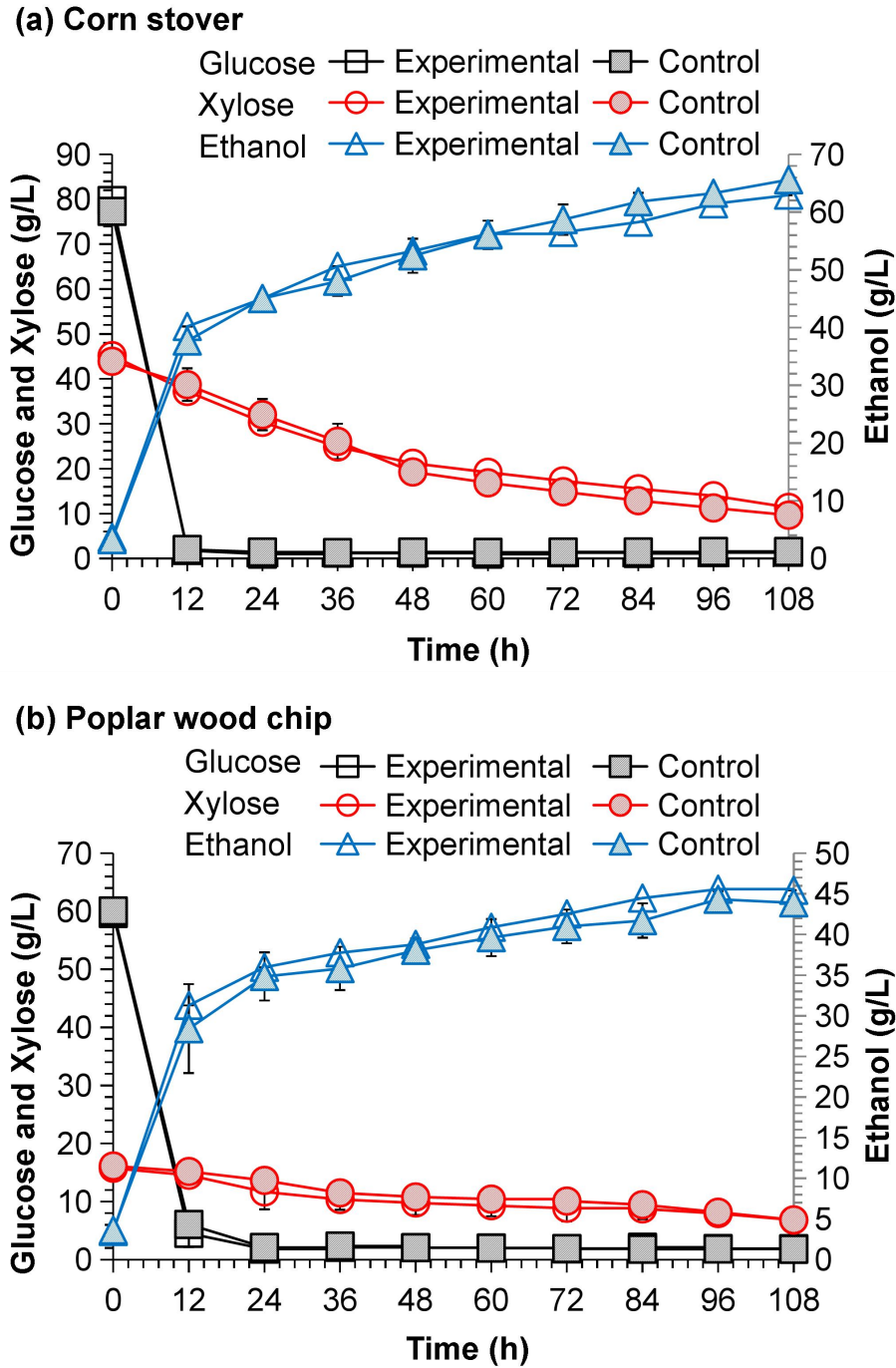


图 3.2 预处理脱毒后含镉木质纤维素原料的乙醇发酵性能评价

Fig. 3.2 Ethanol fermentation performance of the pretreated and biodetoxified lignocellulose biomass contained cadmium by SSCF.

- (a) 含镉玉米秸秆 SSCF 中，葡萄糖、木糖和乙醇变化；
- (b) 含镉白杨木屑 SSCF 中，葡萄糖、木糖和乙醇变化；

糖化条件：固含量 25 % (w/w)，纤维素酶载量 10 mg total protein/g cellulose，温度 50 °C，pH 4.8，糖化时间 12 h。

发酵条件：温度 30 °C，pH 5.5，发酵时间 108 h，*S. cerevisiae* XH7 接种量 20 % (v/v)

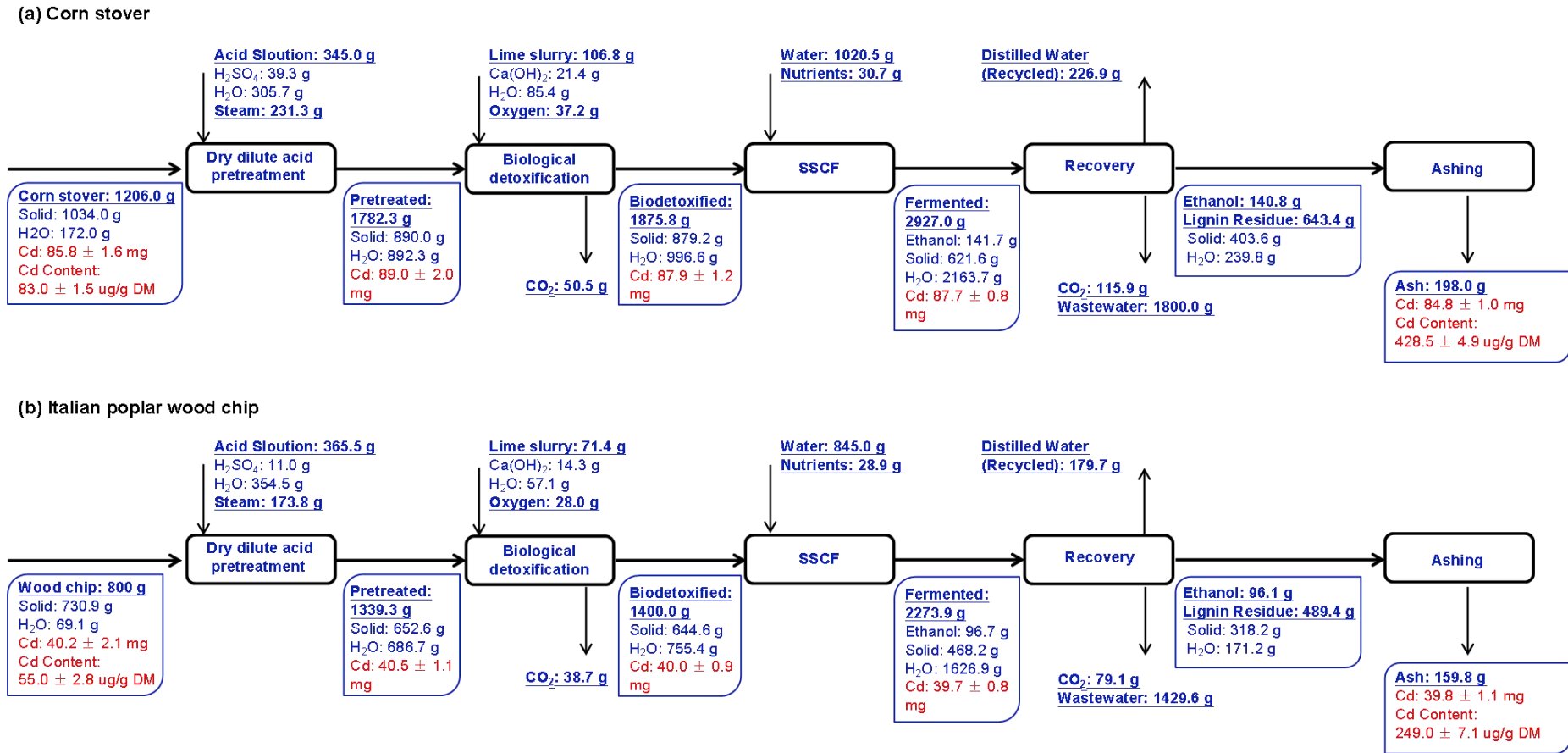


图 3.3 含镉木质纤维素原料整个干法生物炼制过程主要步骤物料衡算

Fig. 3.3 The mass balance during the core steps of dry biorefining process. In the whole mass balance process, the content and the total amount of cadmium in poplar wood chips was calculated based on the dry matter

- (a) 含镉玉米秸秆干法生物炼制过程主要步骤物料衡算；
- (b) 含镉白杨木屑干法生物炼制过程主要步骤物料衡算。

3.3.3 物料衡算

本实验的主要目的是将干法生物炼制生产纤维素乙醇过程与重金属镉污染植物（玉米秸秆）或重金属镉超富集植物—白杨修复土壤重金属镉污染技术相整合，使得植物修复土壤镉污染后可以得到有效地处理，并产生一定的经济效益，以弥补植物修复过程中成本的投入且不能出现重金属镉的二次污染，因此，对整个纤维素乙醇生产过程中几个主要步骤中的重金属镉含量与镉总量的变化进行了监测。一方面，要保证整个干法生物炼制过程可以有效地富集重金属镉；另一方面，也要保证重金属镉总量维持在一个可以接受的误差范围内。

两种含镉木质纤维素生物质（玉米秸秆和白杨木屑）在整个干法生物炼制过程中的物料平衡如图 3.3 所示。不管是预处理过程中排出的蒸汽还是蒸馏过程中得到的粗乙醇中均没有检测到有重金属镉的存在。对于酸预处理、生物脱毒、糖化与发酵、干燥与灰化等干法生物炼制关键步骤中镉含量与总量的检测结果显示，在整个干法生物炼制过程中，重金属镉的总量在可允许的范围基本维持恒定，而白杨木屑发酵醪灰化后的灰分中重金属镉的含量约为初始白杨木屑原料中的 4.5 倍；玉米秸秆发酵醪灰化后的灰分中重金属镉的含量约为初始玉米秸秆原料中的 5.2 倍。该实验结果表明，将植物修复土壤重金属镉污染后的植株通过干法生物炼制技术转变为燃料乙醇，进而可以使得重金属镉得到进一步的有效富集且可有效避免镉对环境的再次侵害，甚至该灰分有望用于镉的提炼工艺。该整合方案的提出与实践表现出良好的实际应用潜力。

3.4. 本章小结

本章重点在于研究植物修复土壤重金属镉污染与干法生物炼制结合生产纤维乙醇的可行性。由于实验室条件所限，通过在干法生物炼制初始阶段以外源添加重金属镉的方式来模拟含镉木质纤维素生物质的处理过程，对本章的研究成果总结如下：

（1）与不含重金属镉的木质纤维素原料相比，高镉含量的木质纤维素原料（玉米秸秆和白杨木屑）经过干法生物炼制过程都能取得比较相似的纤维素乙醇发酵性能，并获得较为理想的发酵结果。

（2）在预处理、生物脱毒、糖化与发酵以及干燥与灰化等整个干法生物炼制关键步骤中，镉含量保持在系统误差范围内（从木质纤维素原料到乙醇产品过程中不会造成镉的再次污染），且两种木质纤维素原料的乙醇发酵醪经过干燥与灰化后可实现重金属镉的有效富集（玉米秸秆原料约富集 5.2 倍，白杨木屑原料约富集 4.5 倍）。两种木质纤维素对重金属镉的富集倍数不同可能是由于干酸预处理过程中，原料结构破坏程度的不同导致了木质素阴离子基团暴露程度的不同。同时，纤维素乙醇的获得也提供了一定的经济收益，降低了植物修复的经济成本，也为植物修复土壤重金属镉污染后植株的有效处理提供了一个切实可行的方案。

第 4 章 三种微生物菌株对麦秆水解液中镉去除特性的研究

4.1 引言

近年来,工业化步伐逐步加快,各国人民的生活水平也得到了明显的改善,但不可避免也不能忽视,这些巨大变化的背后却对生态环境系统尤其是土壤环境和水体环境造成了很大的压力。在过去的一个世纪中,采矿、电镀、冶炼、化肥、农药、制革、造纸和电子工业已经导致大量重金属和石油碳氢化合物释放到自然生态系统中,据报道,这已经破坏了生态系统的生理功能^[145, 146]。由于重金属离子一般具有不易降解转化的特性,因此很难被土壤中的微生物降解,但是能够与土壤中的某些组分进行螯合,进而被某些微生物和植物所积累,甚至有可能通过食物链的富集作用进入人类体内,威胁到人类的生命与健康。

此外,水资源中重金属元素污染也是一个非常值得关注的问题。2005 年,北江的镉污染事件,严重影响了其河流沿边数千万名人民群众的健康与饮水安全;2006 年,新墙河的一类金属砷污染事件,导致大约八万人的饮水安全出现危机;2008 年,云南省昆明市明湖类金属砷的污染事件,严重污染了该地区的地下水;2009 年,湖南湘江铅、镉、汞等多种重金属污染事件,不仅使得当地居民的饮水安全不能保证,也严重损害了当地的生态系统,使得鱼类不能生存,土壤不能种植;2009 年,陕西东岭某工作单位的废弃物乱排问题导致的血铅超标事件等。此类案件的发生均为当地企业不按国家污水排放标准排放所导致,给当地居民,甚至是他们的后代造成了难以磨灭的影响,急需寻找有关方法以杜绝此类案件的再次发生。一方面,国家有关部门应当加大对废水排放的监管力度与人民群众应当严格履行对废水排放的监督与重视;另一方面,企业也要采用一些有效地手段保证废水中重金属含量达到国家污水排放标准。

为避免重金属镉对环境造成二次污染,本研究第三章节采用烘箱干燥法将含镉木质纤维素乙醇发酵醪液体部分蒸干,但该过程能耗较大,会降低植物修复与纤维素乙醇生产相结合的经济性。因此,在不采用烘箱干燥法将液体蒸干的前提下,如何使木质纤维素液体体系中重金属镉的含量达到 GB8978-1996 标准,即重金属镉浓度小于 0.1 mg/L^[147],从而使得发酵醪残液可按照普通废水进行回收利用,以进一步降低含镉木质纤维素生物质的处理成本和含镉废水的处理压力,这是一个非常值得关注与研究的问题。

对于废水中重金属浓度的降低方案有很多,但是传统的物理化学方法难以对含有低浓度重金属离子的废水进行处理,存在易造成重金属的二次污染等缺点^[148]。相比之下,微生物吸附去除法是一种投入少、效率高、操作范围广、易于回收重金属且环境友好的新型重金属废水治理技术,同时可在一定范围内选择性地去除水体中低浓度的金属离子,此外吸附剂还可再生利用,具有良好的经济效益^[149, 150]。据有关文献报道^[151],微生物对水体中重金属镉的去除率与微生物的生物量、初始重金属含量、溶液的 pH 值等因素有关。因此,本章节研究以 *S. cerevisiae* XH7、*C. glutamicum* S9114 和 *T. cutaneum* ACCC

20271 为重金属镉吸附去除菌株（这三株菌株在木质纤维素水解液体系中具有较大生物量），以含重金属镉的麦秆水解液为培养基，探究了这三株菌株对麦秆水解中重金属镉的耐受性和去除性能，并对该过程中存在的问题与应用前景进行了讨论。希望通过微生物的吸附去除作用将发酵醪液体部分的重金属镉含量降低至国家污水排放标准以下，降低废水治理成本，进一步提高土壤重金属镉污染植物修复后生物质处理的经济性。

4.2 材料与方法

4.2.1 原料和纤维素酶

本实验所使用的麦秆是于 2017 年秋季在中国内蒙古通辽地区收获。经 10-mm 锤式粉碎机粉碎后即可装入一次性塑料密封袋中，常温密封储存于实验室通风干燥处，且应避免火灾隐患，以供实验所需。在物料干重基础上，麦秆包含 32.3 % 的纤维素、23.2 % 的半纤维素、16.4 % 的木质素和 9.7 % 的灰分。

本章节所用商业纤维素酶详见 2.2.2。

4.2.2 菌株与培养基

羟甲基糠醛、酚类等抑制物脱除菌株—树脂枝孢霉 (*A. resinae* ZN1)^[40] 在含有 20 g/L glucose、20 g/L peptone 和 10 g/L YE 的 PDA 固体培养基中培养，培养条件为 28 °C。菌种保藏方式同 2.2.3。

纤维素乙醇发酵菌株—酿酒酵母 (*S. cerevisiae* XH7) 在含有 20 g/L glucose、20 g/L peptone 和 10 g/L YE 的 YPD 培养基中培养，培养条件为 30 °C，200 rpm。菌种保藏方式同 2.2.3。

皮状丝孢酵母 (*T. cutaneum* ACCC 20271) 是于中国农业微生物菌株保藏管理中心 (Agricultural Culture Collection of China, <http://www.accc.org.cn/>) 购买。该菌株在含有 20 g/L glucose、20 g/L peptone 和 10 g/L YE 的 YPD 培养基中培养，培养条件为 30 °C，180 rpm。保藏方式类同 *S. cerevisiae* XH7。

谷氨酸棒状杆菌 (*C. glutamicum* S9114) 是于中国上海工业微生物研究所 (Shanghai Industrial Institute of Microorganism, SIIM, <http://www.gsy-siim.com/>) 购买，保藏编号为 SIIM B460。保藏方式类同 *S. cerevisiae* XH7。培养条件为 30 °C，200 rpm，pH 7.0。所使用的培养基包括：

LB 琼脂平板：10 g/L peptone，5 g/L YE，5 g/L NaCl，17 g/L 琼脂粉，pH 7.0；

预培养种子培养基：25 g/L glucose，1.5 g/L KH₂PO₄，0.6 g/L MgSO₄，2.5 g/L urea，25 g/L 玉米浆 (Corn steep liquor)，pH 6.5；

种子培养基：25 g/L glucose，1.5 g/L KH₂PO₄，0.6 g/L MgSO₄，2.5 g/L urea，25 g/L 玉米浆 (Corn steep liquor)，pH 7.0。

4.2.3 预处理、生物脱毒与麦秆水解液的制备

除麦秆的硫酸用量为 3.7 % (w/w，每 100 g 干麦秆中加入 3.7 g 硫酸)，其余预处理、脱毒条件和操作均与 3.2.3 相同。

在带有螺带式搅拌桨的 5 L 发酵罐中, 制备 15 % (w/w) 固含量麦秆水解液 (Wheat straw hydrolysate, WSH)。具体操作为: (1) 在 115 °C 下, 对预处理脱毒后麦秆灭菌 20 min; (2) 向反应器中加入适量的灭菌去离子水和纤维素酶 (4 mg total protein/g DM), 并将灭菌后麦秆加入反应器; (3) 在 50 °C、150 rpm 和 pH 4.8 (5 M NaOH 维持) 条件下, 糖化 48 h; (4) 糖化液经 10,000 rpm 离心 10 min 得到粗水解液, 再经 115 °C 灭菌 20 min 并用滤纸过滤至蓝口瓶存放于 4 °C 冰箱, 备用。

4.2.4 重金属镉的添加与测定

通过在木质纤维素水解液制备阶段以外源添加重金属镉离子 (CdSO_4) 的方式来获取含镉麦秆水解液, 进而研究微生物菌株对水解液中重金属镉离子的耐受性和去除情况。重金属镉元素测定方法同 3.2.7。

4.2.5 糖类、乙醇和生物量分析

葡萄糖和乙醇含量通过 HPLC 进行定量分析 (具体操作同 2.2.6)。菌体生物量通过紫外分光光度计 (Biomate3S) 进行分析 (600 nm 处)。

4.3 结果与讨论

4.3.1 *C. glutamicum* S9114 对麦秆水解液中镉的耐受性与去除性能

据有关文献报道^[40, 41], 微生物对有重金属镉的去除能力与其生物量、镉的初始含量、体系的 pH 有关, 因此, 探究了 *C. glutamicum* S9114 在含镉木质纤维素水解液中的最佳培养时间和玉米浆添加量 (为菌体的生长提供必需氨基酸、生物素等营养物质, 进而提高菌株的生物量)。在本实验中, 麦秆水解液中重金属镉的添加量为 5 mg/L。实验结果如图 4.1 所示, 对于不含重金属镉的麦秆水解液而言, 玉米浆含量的增加对 *C. glutamicum* S9114 的生长与糖耗几乎没有什么影响。但对于含有 5 mg/L 重金属镉的麦秆水解液而言, 玉米浆含量的增加对 *C. glutamicum* S9114 的葡萄糖消耗能力有所促进, 但对其生长影响较小。同时, 在 5 mg/L 的麦秆水解液中经过 32 h 培养后, *C. glutamicum* S9114 可达其最大生物量。因此, 在接下来 *C. glutamicum* S9114 的培养过程中, 玉米浆的添加量为 5 g/L, 培养时间为 32 h, *C. glutamicum* S9114 接种量为 10 (v/v)。

通过考察 *C. glutamicum* S9114 对麦秆水解液中重金属镉的耐受性和去除情况。具体操作如下: 在重金属镉含量为 0 mg/L、2.5 mg/L、5 mg/L、10 mg/L 的麦秆水解液中培养 *C. glutamicum* S9114, 并对其培养过程中的葡萄糖、菌体量变化情况以及培养前后发酵醪液中重金属镉的变化情况进行研究分析。结果如图 4.2 所示, 当麦秆水解液中重金属镉浓度高于 2.5 mg/L 时, *C. glutamicum* S9114 对葡萄糖的消耗能力 (单位时间内, *C. glutamicum* S9114 对葡萄糖的消耗量) 和菌体的生长能力均受到较为严重的抑制作用。然而, 当麦秆水解液中重金属镉浓度在 2.5 mg/L 以内时, *C. glutamicum* S9114 对葡萄糖的消耗能力和菌体的生长能力与对照组相似, 即重金属镉的存在对菌株无抑制作用。在三种初始镉含量下, 经过 32 h 的培养, *C. glutamicum* S9114 对麦秆水解液中重金属镉的去除率均高达 48 % 以上, 且该去除率随其初始镉浓度的增加而提高, 即呈正比例关系。

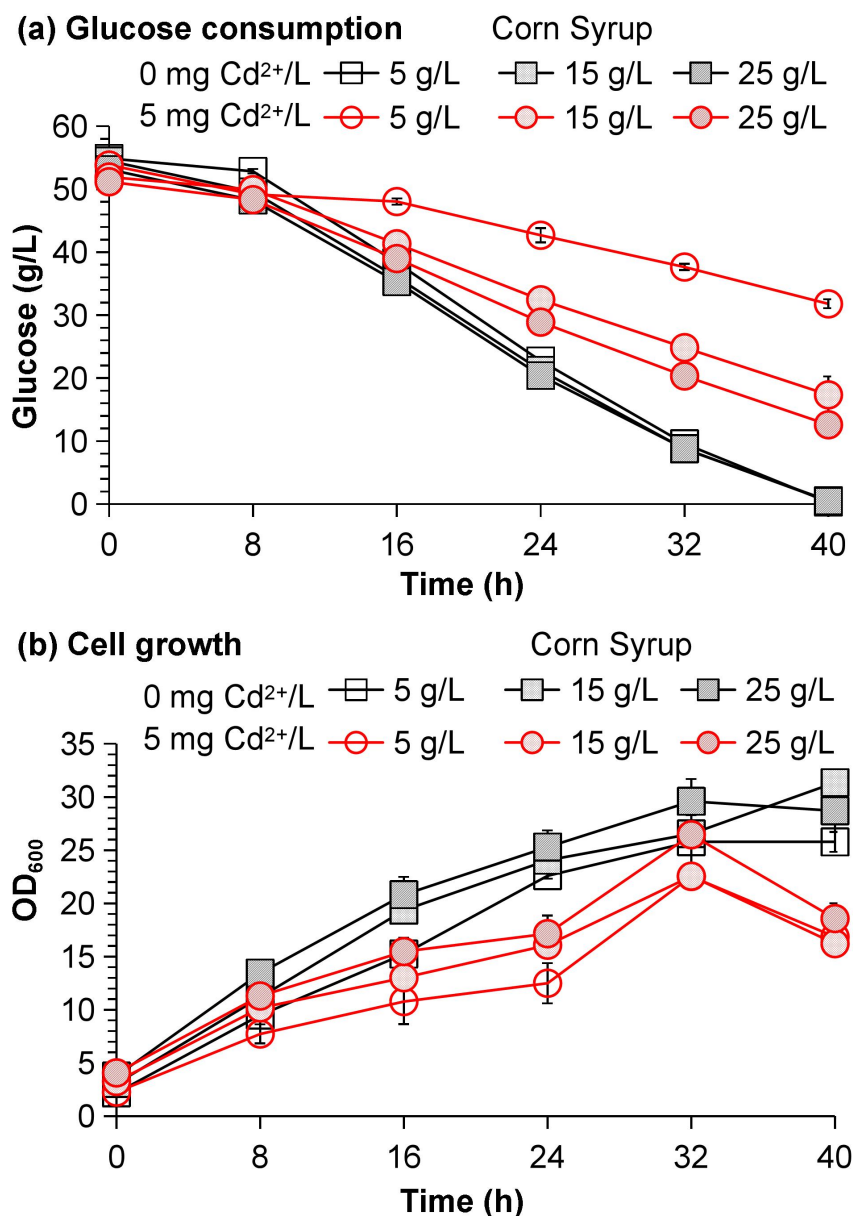


图 4.1 不同玉米浆含量下, 含镉与不含镉麦秆水解液中 *C. glutamicum* S9114 培养情况

Fig. 4.1 Glucose consumption and OD₆₀₀ of *C. glutamicum* S9114 under different concentration corn syrup in WSH (with and without cadmium)

(a) 葡萄糖消耗情况; (b) 菌体生长情况

培养条件: 温度 30 °C, pH 7.0, 发酵时间 40 h, *C. glutamicum* S9114 接种量 10% (v/v)

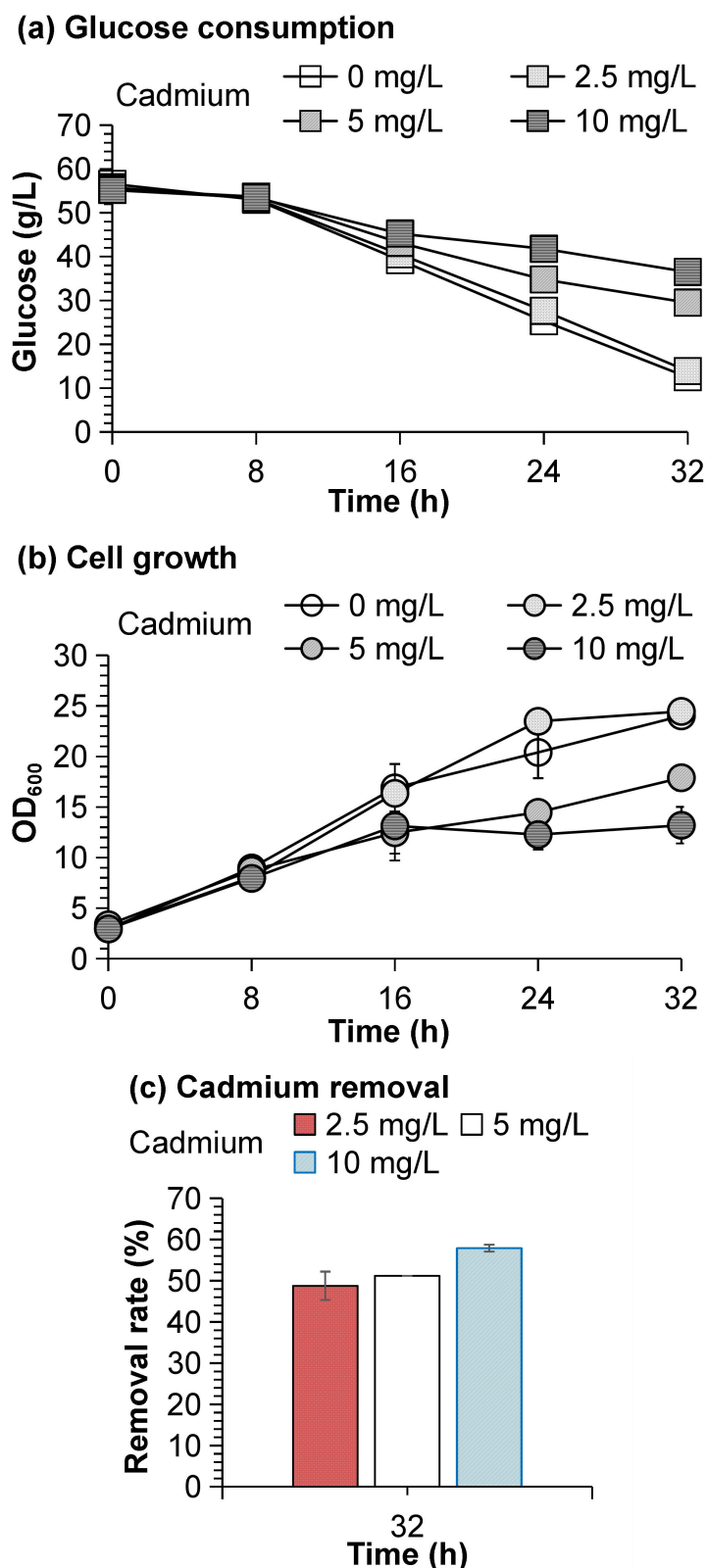


图 4.2 *C. glutamicum* S9114 对麦秆水解液中重金属镉的耐受性分析与去除情况

Fig. 4.2 Tolerance of *C. glutamicum* S9114 to cadmium in WSH and its removal ratio

(a) 葡萄糖消耗情况; (b) 菌体生长情况; (c) 麦秆水解液中镉的去除情况

培养条件: 温度 30 °C, pH 7.0, 发酵时间 32 h, *C. glutamicum* S9114 接种量 10% (v/v)

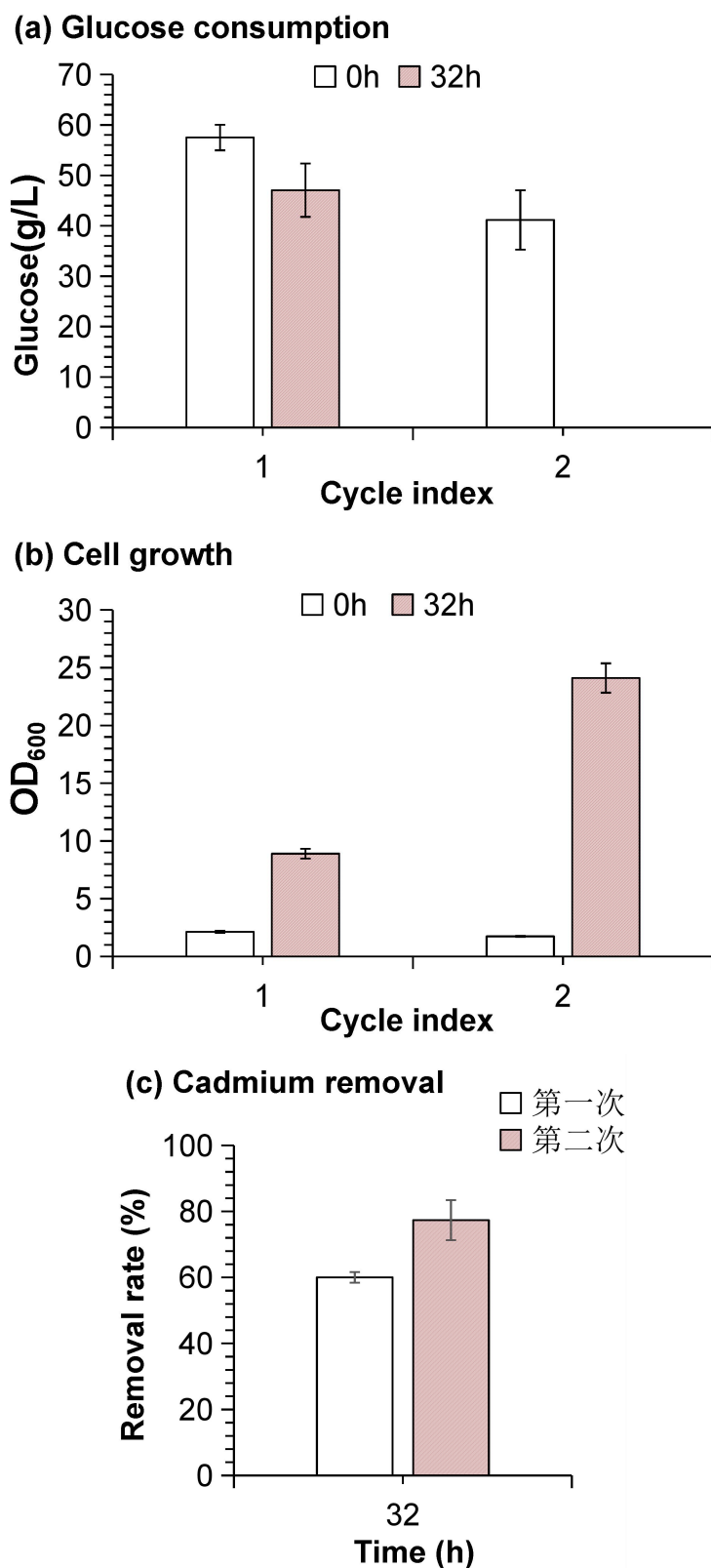


图 4.3 在 3 L 生物反应器中，采用含镉麦秆水解液对 *C. glutamicum* S9114 进行循环培养
 Fig. 4.3 Cyclic culture of *C. glutamicum* S9114 with WSH containing cadmium in a 3 L bioreactor
 (a) 葡萄糖变化量；(b) OD₆₀₀ 变化量；(c) 麦秆水解液中镉的去除情况。

培养条件：温度 30 °C，搅拌转速 600 rpm，pH 7.0，发酵时间 32 h，*C. glutamicum* S9114 接种量 10 % (v/v)，重金属镉的添加量 10 mg/L，通气量 1.4 vvm。

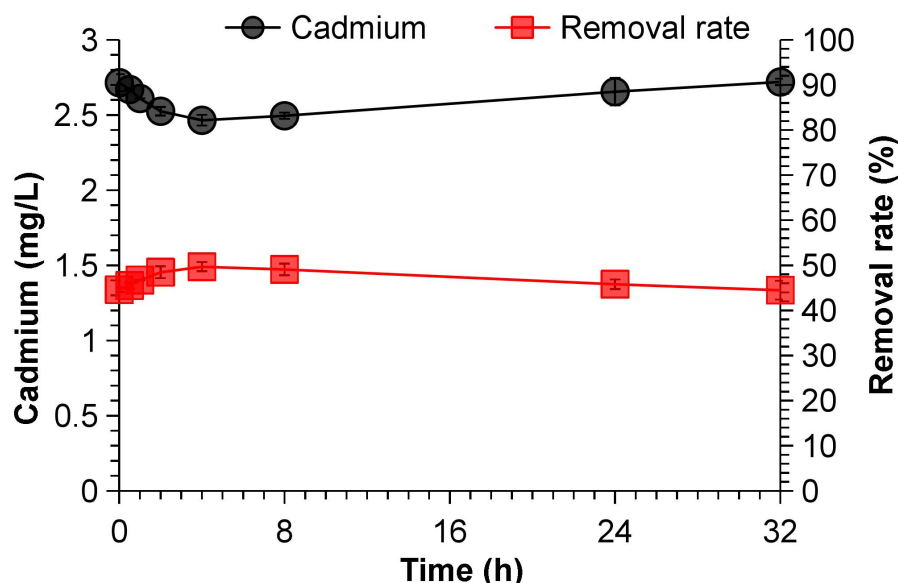


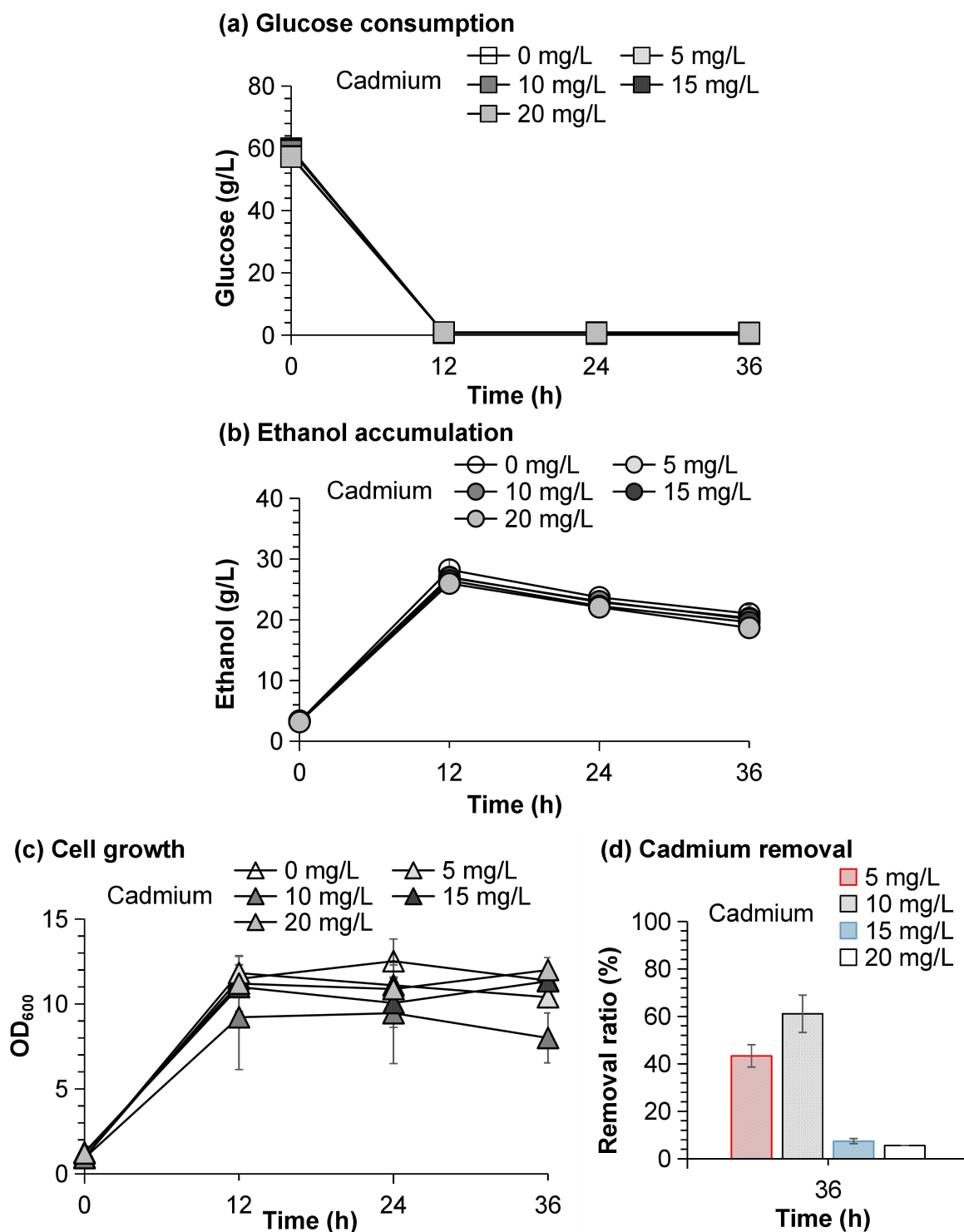
图 4.4 在 *C. glutamicum* S9114 整个培养过程中，菌株对对麦秆水解液中重金属镉的去除情况

Fig. 4.4 The removal rate of cadmium from WSH by *C. glutamicum* S9114 in the whole cultivation process

培养条件：温度 30 °C，pH 7.0，发酵时间 32 h，*C. glutamicum* S9114 接种量 10 % (v/v)，重金属镉的添加量 5 mg/L

由图 4.2 可知，含镉麦秆水解液经过对 *C. glutamicum* S9114 培养 32 h 后仍含有较多的葡萄糖，且仍存在部分重金属镉。因此，采用同一含镉麦秆水解液对 *C. glutamicum* S9114 进行循环培养。结果如图 4.3 所示，经过 *C. glutamicum* S9114 的两次培养，可去除水解液中将近 80.0 % 的重金属镉，葡萄糖也是被完全消耗了。对比两次培养过程中 *C. glutamicum* S9114 的生长情况以及培养前后水解液中镉的去除情况可知，虽然在第二次培养时 *C. glutamicum* S9114 对葡萄糖的消耗能力增强，且其生物量也有很大程度的增加，但是水解液中重金属镉浓度的降低情况却不是很理想。从而考虑到是否 *C. glutamicum* S9114 对麦秆水解液中重金属镉的去除能力与其生物量之间的关系较小，而是与 *C. glutamicum* S9114 对重金属镉的吸附性能关系较大。为证明这一猜想，对 *C. glutamicum* S9114 在培养过程中对重金属镉的去除情况进行了实验探究。结果如图 4.4 所示，当 *C. glutamicum* S9114 刚接入培养基中时就可以实现 40 % 左右的去除率。在培养 0-4 h 内，重金属镉的去除率与培养时间呈正比，该时间段内葡萄糖基本不被菌体所消耗，菌体量也没有明显的变化；在培养 4-32 h 内，重金属镉的去除率与培养时间基本维持不变，这可能是由于 *C. glutamicum* S9114 对镉的吸附处于动态平衡。

以上实验结果表明，*C. glutamicum* S9114 对重金属镉的耐受性较弱，但去除能力较强，去除率与菌体生物量相关性较弱，吸附过程在 4 h 内即可完成且糖耗较少。由于经过 *C. glutamicum* S9114 吸附后，水解液中重金属镉含量仍旧高于国家排放标准，因此，在以后的实验中，可先将含镉水解液进行过滤浓缩，提高培养体系中初始镉浓度，进而增加菌体对重金属镉的相对去除率。当废水需要排放至环境中时，可以再将浓缩时除掉的水回补至废水中，从而实现废水排放合乎国家标准。

图 4.5 *S. cerevisiae* XH7 对麦秆水解液中重金属镉的耐受性分析与去除情况Fig. 4.5 Tolerance of *S. cerevisiae* XH7 to cadmium in WSH and its removal rate

(a) 葡萄糖消耗情况; (b) 乙醇生产情况; (c) 菌体生长情况; (d) 麦秆水解液中镉的去除情况
 培养条件: 转速 200 rpm, 温度 30 °C, pH 5.5, 发酵时间 36 h, *S. cerevisiae* XH7 接种量 10% (v/v)

4.3.2 *S. cerevisiae* XH7 对麦秆水解液中镉的耐受性与去除性能

在 3.3.1 的合成培养基中探究了 *S. cerevisiae* XH7 对重金属镉的耐受性能,但是木质纤维素水解液作为一种特殊的液体,其组成成分复杂,可能会存在某种物质利于从而 *S. cerevisiae* XH7 的生长或能够降低重金属镉对该菌株的毒害作用。因此,探究了该菌株在麦秆水解液中对重金属镉的耐受性。实验结果如图 4.5 (a)、(b) 和 (c) 所示,与合成培养基相比, *S. cerevisiae* XH7 在含镉麦秆水解液中生长较好,且发酵终点可以获得较为相似的乙醇浓度。经过培养 12 h 后,几种发酵体系(重金属镉含量为: 0 mg/L、5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L 和 20 mg/L)中葡萄糖基本被完全消耗。以上实验结果表明,与合成培养基相比,在麦秆水解液中培养的 *S. cerevisiae* XH7 对重金属镉的耐受性更强。该结果的出现可能是由于麦秆水解液中仍含有少量的木质素细小颗粒降低了其对发酵菌株的毒害作用,或者含有某些离子或营养物质提高了菌株的生长能力与糖耗能力。

为了有效地表征 *S. cerevisiae* XH7 对麦秆水解液中重金属镉的去除情况,测定了该菌株培养前后,这几种发酵体系中重金属镉的含量变化。结果如图 4.5 (d) 所示,当麦秆水解液中初始镉浓度不同时, *S. cerevisiae* XH7 对重金属镉的去除率不同。当重金属镉浓度小于 10 mg/L 时, *S. cerevisiae* XH7 对麦秆水解液中的重金属镉具有较高的去除能力(当初始镉浓度为 10 mg/L 时,去除率最高,为 64.8%)。然而,当麦秆水解液中初始镉浓度大于 10 mg/L 时, *S. cerevisiae* XH7 对水解液中镉的去除能力较弱。

根据之前的实验数据表明,在固体含量为 15% 的木质纤维素水解液中 10 mg/L 的重金属镉换算到原始生物质原料中镉的含量应该超过 200 mg/g DM。然而,目前大部分植物对重金属镉的吸附容量都低于 200 mg/g DM^[123, 160]。因此, *S. cerevisiae* XH7 对于大部分重金属镉污染后植物的干法生物炼制过程具有可行性,也具有从木质纤维素体系中去除重金属镉的潜力。

4.3.3 *T. cutaneum* ACCC 20271 对麦秆水解液中镉的耐受性与去除性能

为了探究 *T. cutaneum* ACCC 20271 菌株应用于对木质纤维素水解液中重金属镉的可行性,对该菌株在麦秆水解液中对重金属镉的耐受性和去除情况进行了实验探究。结果如图 4.6 所示,当培养体系中初始重金属镉浓度在 0-20 mg/L 之内时, *T. cutaneum* ACCC 20271 的菌体生长情况与葡萄糖的消耗情况非常相似(培养 96 h 后,葡萄糖基本已被菌体消耗完,菌体量也有了明显的增加),且其对麦秆水解液中重金属镉的去除率普遍偏低(当麦秆水解液中初始镉含量为 5-20 mg/L 时,该菌株对镉的去除率均低于 25.0%)。该结果表明,与 *C. glutamicum* S9114 和 *S. cerevisiae* XH7 相比, *T. cutaneum* ACCC 20271 对麦秆水解液中重金属镉具有高耐受性和低去除能力,应用于去除木质纤维素糖化液中重金属镉的潜力较小。

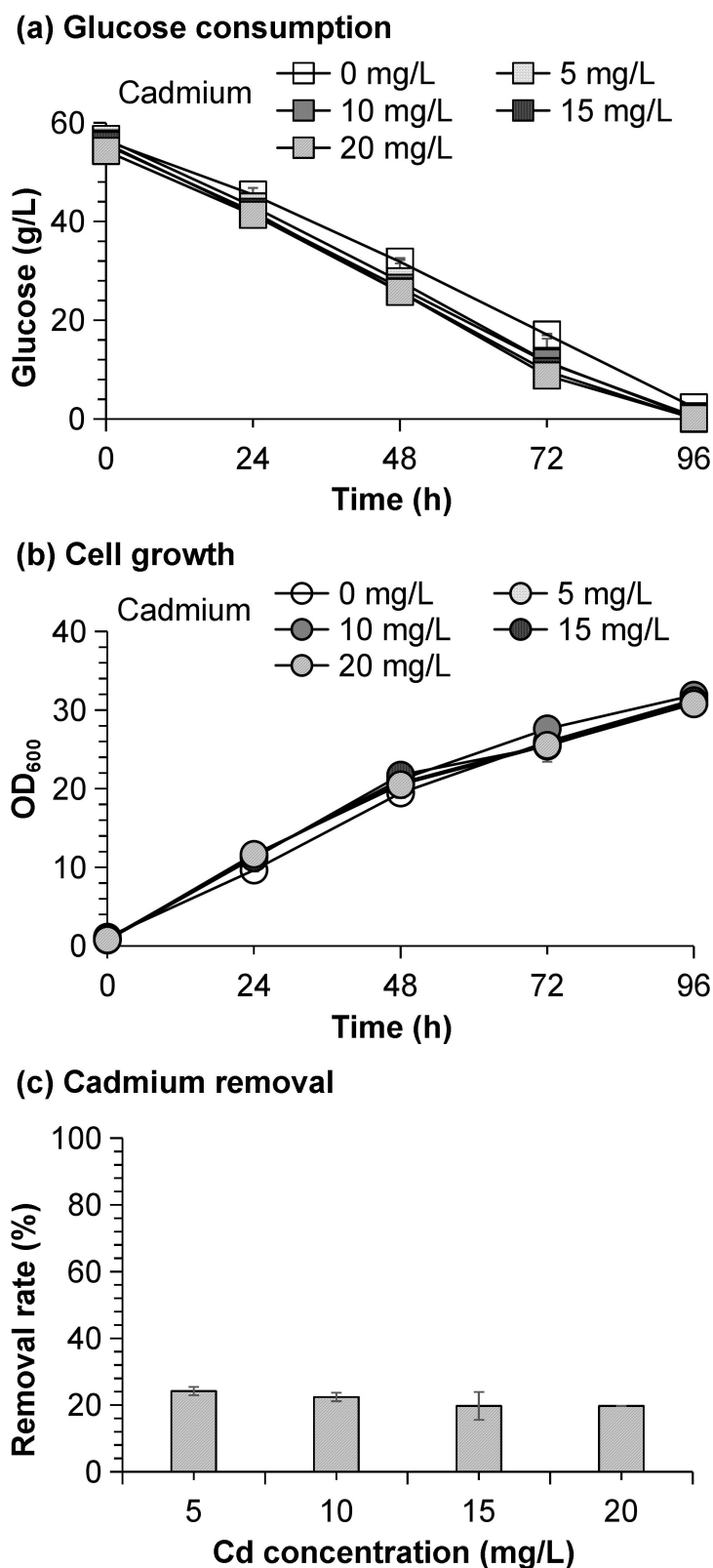


图 4.6 *T. cutaneum* ACCC 20271 对木质纤维素水解液中重金属镉的耐受性分析与去除情况

Fig. 4.6 Tolerance of *T. cutaneum* ACCC 20271 to cadmium in WSH and its removal ratio

(a) 葡萄糖消耗情况; (b) 菌体生长情况; (c) 麦秆水解液中镉的去除情况

培养条件: 转速 180 rpm, 温度 30 °C, 初始 pH 5.5, 发酵时间 96 h, *T. cutaneum* ACCC 20271 接种量 10% (v/v)

4.4. 本章小结

本章重点通过在麦秆水解液制备阶段以外源添加重金属镉的方式来研究微生物对木质纤维素水解液重金属镉的耐受性与去除能力。对本章的研究成果总结如下：

(1) 三种微生物菌株对重金属镉的耐受性实验结果表明，*S. cerevisiae* XH7 和 *T. cutaneum* ACCC 20271 对重金属镉的耐受性较强。当麦秆水解液中重金属镉浓度为 5-20 mg/L 时，这两株菌种的生长和糖耗与对照组（初始镉含量为 0 mg/L）基本相似。相比之下，*C. glutamicum* S9114 对镉的耐受性较弱。当麦秆水解液中重金属镉含量大于 2.5 mg/L 时，该菌株的生长和糖耗出现了明显的抑制情况。

(2) 三种微生物菌株对重金属镉的去除实验结果表明，当麦秆水解液中重金属镉含量在 10 mg/L 以内时，与 *T. cutaneum* ACCC 20271（去除率为 25.0 % 以下）相比，*S. cerevisiae* XH7 和 *C. glutamicum* S9114 对重金属镉的去除率较高，均在 43.0 % 以上。但是仍未将水解液中重金属镉的含量降低至 0.1 mg/L 以下，需要通过进一步强化微生物对水解液中镉的吸附去除能力。

(3) 在麦秆水解液中三株菌株对重金属镉的耐受性、吸附去除性能与糖耗能力的综合结果表明，*C. glutamicum* S9114 应用于木质纤维素体系中重金属镉的去除潜力最大，*S. cerevisiae* XH7 次之，*T. cutaneum* ACCC 20271 的应用潜力最小。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论

本课题组所研发的干法生物炼制技术是一项低能耗、低水耗、低废水排放与高效率的生物燃料和生物基化学品生产技术,具有广阔的实际应用潜力^[44, 45]。木质纤维素生物质作为一种可再生的自然资源,含有较多的葡萄糖、果糖等游离单糖以及重金属离子等水溶性组分^[128-130]。在木质纤维素生物炼制过程中,这些组分的存在可能会对后续乙醇等生物燃料和乳酸、氨基酸等生物基化学品的生产带来不利影响。因此需要对这些水溶性组分的转化利用或富集去除进行深入研究,主要内容为木质纤维素原料中水溶性游离单糖转为柠檬酸对纤维素乙醇发酵的影响、含镉木质纤维素原料的有效处理以及木质纤维素水解液中镉的微生物去除法。以下是本研究的主要结论与创新点:

(1) 预处理前采用固态有氧发酵的方式将玉米秸秆中水溶性碳水化合物转化为柠檬酸。一方面,作为中强酸的柠檬酸可以代替部分硫酸,从而降低预处理过程中酸催化剂的用量(原始玉米秸秆 vs. 水溶性游离单糖去除后玉米秸秆, 3.8 mg/g DM vs. 3.5 mg/g DM); 另一方面,玉米秸秆中游离单糖的消耗可以有效地降低预处理过程中 5-HMF 生成量(10.5 mg/g DM vs. 6.2 mg/g DM),进而缩短了抑制物脱除所用时间,提高了纤维素乙醇发酵效率(发酵 108 h 后,原始玉米秸秆和水溶性游离单糖去除后玉米秸秆 SSCF 体系中乙醇浓度之比为 59.9 vs. 65.6 g/L,木糖消耗率之比为 49.0 % vs. 78.0 %),为燃料乙醇的实际工业化生产提供了一个非常值得借鉴的方案。

(2) 通过研究含镉玉米秸秆和含镉白杨木屑的纤维素乙醇发酵性能及该过程中镉含量与镉总量的变化,提出了植物修复土壤镉污染技术与纤维素乙醇干法生物炼制技术相整合的理念,验证了重金属镉总量在干酸预处理、生物脱毒、糖化与发酵等干法生物炼制主要阶段维持在系统误差范围内,即整个过程中不存在重金属镉的二次污染。同时,燃料乙醇的获得可以在一定程度上提高植物修复镉污染的实用性与经济性,且重金属镉的存在并不影响 *S. cerevisiae* XH7 的繁殖和代谢。乙醇精馏后发酵醪液经过干燥与灰化后可以实现重金属镉的有效富集(玉米秸秆原料约富集 5.2 倍,白杨木屑原料约富集 4.5 倍),有望用于镉的提纯工艺。

(3) 通过研究三种微生物菌株对含镉麦秆水解液中葡萄糖的消耗情况以及重金属镉的耐受性能和去除情况。结果显示,当麦秆水解液中初始镉含量不大于 10 mg/L 时, *S. cerevisiae* XH7 和 *C. glutamicum* S9114 对重金属镉的去除率均高于 43.0 %; 当麦秆水解中初始镉含量不小于 10 mg/L 时, *T. cutaneum* ACCC 20271 和 *S. cerevisiae* XH7 对镉的去除率均低于 25.0 %。同时, *S. cerevisiae* XH7、*T. cutaneum* ACCC 20271 和 *C. glutamicum* S9114 对葡萄糖的消耗能力依次降低。综上所述, *C. glutamicum* S9114 应用于木质纤维素体系中重金属镉的去除潜力最大, *S. cerevisiae* XH7 次之, *T. cutaneum* ACCC 20271 的应用潜力最小。

5.2 展望

本文主要对木质纤维素中水溶性游离单糖和重金属镉及其应用进行了研究,实现了经济合理有效的生物转化与生物富集过程。然而,在课题进展阶段仍旧存在一些不足之处可以进一步完善,主要方面如下:

(1) 进一步在高效率转化下降低玉米秸秆等木质纤维素中的水溶性游离单糖含量,提高柠檬酸的得率,从而降低干酸预处理阶段中酸催化剂的用量和 5-HMF 的生成量。

(2) 进一步改善预处理条件以增强木质纤维素对有重金属离子的去除能力。这种去除能力依赖于木质纤维素生物质中的一些阴离子基团与不同金属离子之间的螯合作用,而预处理过程可有效地破坏木质纤维素生物质的结构,进而暴露其中阴离子基团。因此,可以通过进一步改善干酸预处理条件,提高预处理后物料中阴离子基团的含量,从而提高对重金属离子的富集能力,降低发酵醪液体部分中该离子的含量,提高整个过程的实用有效性与经济可行性。

(3) 进一步增强微生物菌株对木质纤维素体系中重金属镉的去除性能。本实验所用的三株微生物吸附菌株对麦秆水解液中重金属镉的耐受性能和去除性能相差较大,因此可以进一步从基因分子层面探讨导致该结果的原因,并采用基因工程手段对菌株进行优化改造,增大其在去除重金属镉方面的实际应用潜力。

(4) 进一步拓展干法生物炼制技术在其它有毒金属离子去除方面的应用。本文第 3、4 章节主要研究了通过该技术对单一重金属镉的富集与去除性能,但在实际环境中,木质纤维素生物质可能含有铅、镉、铬等多种重金属。所以,接下来可以在多种重金属存在的木质纤维素体系中,探究该技术是否仍具有如此优异的产物生成能力与重金属离子富集性能。

参考文献

- [1] Balan V. Current challenges in commercially producing biofuels from lignocellulosic biomass. *Isrn Biotechnology*. 2014, 2014: 463074.
- [2] Demirbas A. Products from lignocellulosic materials via degradation processes. *Energy Sources Part A Recovery Utilization & Environmental Effects*. 2007, 30(1): 27-37.
- [3] Bhatia L, Johri S, Ahmad R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: a review. *AMB Express*. 2012, 2: 65.
- [4] Knauf M, Moniruzzaman M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective. *International Sugar Journal*. 2004, 106(1263):147-150.
- [5] Cateto C, Hu G, Ragauskas A. Enzymatic hydrolysis of organosolv Kanlow switchgrass and its impact on cellulose crystallinity and degree of polymerization. *Energy & Environmental Science*. 2011, 4(4):1516-1521.
- [6] Valdivia M, Galan JL, Laffarga J, et al. Biofuels 2020: Biorefineries based on lignocellulosic materials. *Microbial Biotechnology*. 2016, 9(5): 585-594.
- [7] Fuqaha AH. Sustainable lignin fractionations with ultrafiltration. *Italic*. 2011.
- [8] Zabed H, Sahu J, Suely A, et al. Bioethanol production from renewable sources: current perspectives and technological progress. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2017, 71: 475–501.
- [9] Isikgor FH, Becer CR. Lignocellulosic biomass: a sustainable platform for the production of bio-based chemicals and polymers. *Polymer Chemistry*. 2015, 6(25): 4497-4559.
- [10] Takahashi T, Chevalier P, Rupp R, 2001. Storage and remobilization of soluble carbohydrates after heading in different plant parts of a winter wheat cultivar. *Plant Production Science*. 2001, 4: 160-165.
- [11] Athmanathan A, Emery IR, Kuczek T, et al. Impact of temperature, moisture, and storage duration on the chemical composition of switchgrass, corn stover, and sweet sorghum bagasse. *Bioenergy Research*. 2015,8: 843–856.
- [12] Shen F, Liu RH. Research on solid-state ethanol fermentation using dry sweet sorghum stalk particles with active dry yeast. *Energy Fuel* 2009, 23: 519-525.
- [13] 王俊, 张义生. 化学污染物与生态效应: 中国环境科学出版社. 1993.
- [14] Peng Q, Guo J, Zhang Q, et al. Unique lead adsorption behavior of activated hydroxyl group in two-dimensional titanium carbide. *Journal of the American Chemical Society*. 2014, 136: 4113-4116.
- [15] Simon L. Cadmium accumulation and distribution in sunflower plant. *Journal of Plant Nutrition*. 1998, 21(2): 342-352.
- [16] Moreno-Caselles J, Moral R, Perez-Espinosa A, et al. Cadmium accumulation and distribution in cucumber plant. *Journal of Plant Nutrition*. 2000, 23(2): 243-250.

- [17] Wei SH, Zhou QX, Kovl PV. Flowering stage characteristics of cadmium hyperaccumulator *Solanum nigrum* L and their significance to phytoremediation. *Science of the total Environment*. 2006, 369: 441-446.
- [18] Francisca MS, Luciana PM, Diego AM, et al. Inhibition effect of zinc, cadmium, and nickel ions in microalgal growth and nutrient uptake from water: An experimental approach. *Chemical Engineering Journal*. 2019, 366: 358-367.
- [19] Hu Y, Cheng H. Application of stochastic models in identification and apportionment of heavy metal pollution sources in the surface soils of a large-scale region. *Environmental Science and Technology*. 2013, 47, 752-3760.
- [20] Chen HM, Zheng CR, Tu C, et al. Heavy metal pollution in soils in China: status and countermeasures. *Ambio*. 1999, 28, 130-134.
- [21] Cheng S. Heavy metal pollution in China: origin, pattern and control. *Environmental Science and Pollution Research*. 2003, 10, 192-198.
- [22] Wang QR, Dong Y, Cui Y, et al. Instances of soil and crop heavy metal contamination in China. *Soil and Sediment Contamination*. 2001, 10, 497-510.
- [23] Peng H, Chen YL, Weng LP, et al. Shafiqul Islam. Comparisons of heavy metal input inventory in agricultural soils in North and South China: A review. *Science of the Total Environment*. 2019: 660: 776-786.
- [24] 环境保护部, 国土资源部. 全国土壤污染状况调查公报. *中国环保产业*. 2014, 5: 10-11.
- [25] Qiu S, Zhang M, Sun YD, et al. Research advances in the mechanisms of Cd^{2+} uptake, transport, accumulation and tolerance in plants. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*. 2006, 26: 2615-2622.
- [26] 罗慧, 刘秀明, 王世杰, 等. 中国南方喀斯特集中分布区土壤 Cd 污染特征及来源. *生态学杂志*. 2018, 37(5): 1538-1544.
- [27] 冉烈, 李会合. 土壤镉污染现状及危害研究进展. *重庆文理学院学报(自然科学版)*. 2011, 30(4): 69-73.
- [28] Wang YT, Bjorn LO. Heavy metal pollution in Guangdong Province, China, and the strategies to manage the situation. *Frontiers in Environmental Science*. 2014, DOI: 10.3389/fenvs.2014.00009.
- [29] Li B, Ma YB, Mclaughlin MJ, et al. Influences of soil properties and leaching on copper toxicity to barley root elongation. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 2010, 29(4): 835-834.
- [30] 邬飞波. 大麦镉积累和耐性基因型差异的机理研究[博士学位论文]. 杭州: 浙江大学. 2002.
- [31] Nagajyoti PC, Lee KD, Streekanth TVM. Heavy metals occurrence and toxicity for plants: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2010, 8(3): 199-216.
- [32] 党志, 刘从强, 尚爱安. 矿区土壤中重金属活动性评估方法的研究进展. *地球科学进展*. 2001, 16(1): 86-92.

- [33] Kumar SR, Agrawal M, Marshall F. Heavy metal contamination of soil and vegetables in suburban areas of Varanasi, India. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2007, 66(2), 258-266.
- [34] Liu WH, Zhao JZ, Ouyang ZY, et al. Impacts of sewage irrigation on heavy metal distribution and contamination in Beijing, China. *Environmental International*. 2005, 31 (6), 805-812.
- [35] Singh KP, Mohan D, Sinha S, et al. Impact assessment of treated/untreated wastewater toxicants discharged by sewage treatment plants on health, agricultural, and environmental quality in the wastewater disposal area. *Chemosphere*. 2004, 55(2), 227-255.
- [36] Yang J, Huang ZC, Chen TB, et al. Predicting the probability distribution of Pb-increased lands in sewage-irrigated region: a case study in Beijing, China. *Geoderma*. 2008, 147(3-4), 192-196.
- [37] Rizwan M, Ali S, Abbas T, et al. Cadmium minimization in wheat: a critical review. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 2016, 130: 43-53.
- [38] Rizwan M, Ali S, Adrees M, et al. Cadmium stress in rice: toxic effects, tolerance mechanisms and management: a critical review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016, 23: 17859-17879.
- [39] Gallego SM, Pena LB, Barcia RA, et al. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*. 2012, 83: 33-46.
- [40] Giller KE, Witter E, McGrath SP. Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil Biology and Biochemistry*. 1998, 30: 1389-1414.
- [41] Giller KE, Witter E, McGrath SP. Heavy metals and soil microbes. *Soil Biology and Biochemistry*. 2009, 41: 2031-2037.
- [42] Wang L, Zhou Q, Ding L, Sun Y. Effect of cadmium toxicity on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *Journal of Hazardous Materials*. 2008, 154(1-3): 818-825.
- [43] Zhang F, Zhang H, Wang G, et al. Cadmium-induced accumulation of hydrogen peroxide in the leaf apoplast of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa* and the roles of different antioxidant enzymes. *Journal of Hazardous Materials*. 2009, 168(1): 76-84.
- [44] Van Aken B. Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends in Biotechnology*. 2008, 26(5): 225-227.
- [45] Sivaci A, Elmas E, Gümüş F, et al. Removal of cadmium by *Myriophyllum heterophyllum* Michx. and *Potamogeton crispus* L. and its effect on pigments and total phenolic compounds. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2008, 54(4): 612-618.
- [46] Purakayastha T, Chhonkar P. Phytoremediation of heavy metal contaminated soils. *Soil Heavy Metals*. 2010, 19: 389-429.

- [47] Nadeem S, Muhammad I, Muhammad RS, et al. Phytoremediation strategies for soils contaminated with heavy metals: Modifications and future perspectives. *Chemosphere*. 2017, 171: 710-721.
- [48] Gong X, Huang D, Liu Y, et al. Remediation of contaminated soils by biotechnology with nanomaterials: biobehavior, applications, and perspectives. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2017, DOI: 10.1080/07388551.2017.1368446.
- [49] Gong X, Huang D, Liu Y, et al. Pyrolysis and reutilization of plant residues after phytoremediation of heavy metals contaminated sediments: for heavy metals stabilization and dye adsorption. *Bioresource Technology*. 2018, 253: 64-71.
- [50] Ali H, Khan E, Sajad MA. Phytoremediation of heavy metals-concepts and applications. *Chemosphere*. 2013, 91: 869-881.
- [51] Ma Q, Cao X, Tan X, et al. Effects of cadmium stress on pakchoi (*Brassica chinensis* L.) growth and uptake of inorganic and organic nitrogenous compounds. *Environmental and Experimental Botany*. 2017, 137: 49-57.
- [52] Robinson BT, Mills TM, Petit D. et al. Natural and induced cadmium-accumulation in poplar and willow: Implications for phytoremediation. *Plant and Soil*. 2000, 227(1-2): 301-306.
- [53] Van Engelen DL, Sharpe-Pedler RC, Moorhead KK. Effect of chelating agents and solubility of cadmium complexes on uptake from soil by *Brassica juncea*. *Chemosphere*. 2007, 68: 401-408.
- [54] Luo L, Voet EVD, Huppes G. Biorefining of lignocellulosic feedstock-Technical, economic and environmental considerations. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 5023-5032.
- [55] Kamm B, Kamm M. Principles of biorefinery. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64: 137-145.
- [56] Liu G, Sun J, Zhang J, et al. High titer L-lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen plus modeling. *Bioresource Technology*. 2015, 198: 803-810.
- [57] Zhang H, 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.
- [58] Brown T, Brown R. A review of cellulosic biofuel commercial-scale projects in the United States. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2013, 7: 235-245.
- [59] O'sullivan AC. Cellulose: the structure slowly unravels. *Cellulose*. 1997, 4(3): 173-207.
- [60] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2008, 2: 26-40.
- [61] Tayyab M, Noman A, Waheed S, et al. Bioethanol production from lignocellulosic biomass by environment-friendly pretreatment methods: A review. *Applied Ecology and Environmental Research*. 2017, 16(1): 225-249.

- [62] Ranjithkumar M, Ravikumar R, Sankar MK, et al. An effective conversion of cotton waste biomass to ethanol: A critical review on pretreatment processes. *Waste and Biomass Valorization*. 2016, 8: 57-68.
- [63] Sun Y, Cheng JJ. Dilute acid pretreatment of rye straw and bermudagrass for ethanol production. *Bioresource Technology*. 2005, 96(14): 1599-1606.
- [64] Gorhmann K, Torget RW, Himmel ME. Optimization of dilute acid pretreatment of biomass. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 1986, 15(15): 59-80.
- [65] Grohmann K, Himmel M, Rivard CJ, et al. Chemical-mechanical methods for the enhanced utilization of straw. *Biotechnology and Bioengineering Symposium*. 1984, 14(14): 137-157.
- [66] Lloyd TA, Wyman CE. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*. 2006, 96(18): 1967-1977.
- [67] Zhang J, Wang XS, Chu DQ, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480-4488.
- [68] He YQ, Zhang LP, Zhang J, et al. Helically agitated mixing in dry dilute acid pretreatment enhances the bioconversion of corn stover into ethanol. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1).
- [69] Almeida JRM, Modig T, Petersson A, et al. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, 82(4): 340-349.
- [70] Landaeta R, Aroca G, Acevedo F, et al. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. *Applied Energy*. 2013, 120: 124-130.
- [71] Almeida JRM, Modig T, Petersson A. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2007, 82: 340-349.
- [72] Dunlop AP. Furfural formation and behavior. *Industrial and Engineering Chemistry Research*. 1948, 40(2): 204-209.
- [73] Mamman AS, Lee JM, Kim YC, et al. Furfural: Hemicellulose/xylo-derived biochemical. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*. 2008, 2(5): 438-454.
- [74] Ulbricht RJ, Northup SJ, Thomas JA. A review of 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. *Fundamental and Applied Toxicology*. 1984, 4(5): 843-853.
- [75] Capuano E, Fogliano V. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT-Food Science and Technology*. 2011, 44(4): 793-810.
- [76] Rosatella AA, Simeonov SP, Frade RFM, et al. 5-Hydroxymethylfurfural (HMF) as a building block platform: biological properties, synthesis and synthetic applications. *Green Chemistry*. 2011, 13(4): 754-793.

- [77] Guo HW, Zhang B, Qi ZJ, et al. Inside Cover: Valorization of lignin to simple phenolic compounds over tungsten carbide: Impact of lignin structure. *Chemsuschem*. 2017, 10.
- [78] Li H, Chen H. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process Biochemistry*. 2008, 43: 1447-1451.
- [79] Lu YF, Chu J, Zhuang Y, Zhuang YP, et al. Influence of highsolid concentration on enzymatic hydrolysis and fermentation of steam-exploded corn stover biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 160: 360-369.
- [80] Wu DX, Li Q, Wang D, et al. Enzymatic hydrolysis and succinic acid fermentation from steam-exploded corn stalk at high solid concentration by recombinant *Escherichia coli*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2013, 170: 1942-1949.
- [81] Rajan K, Carrier DJ. Effect of dilute acid pretreatment conditions and washing on the production of inhibitors and on recovery of sugars during wheat straw enzymatic hydrolysis. *Biomass Bioenergy*. 2014, 62: 222-227.
- [82] Mussatto SI, Roberto IC. Hydrolysate detoxification with activated charcoal for xylitol production by *Candida guilliermondii*. *Biotechnology Letters*. 2001. 23: 1681-1684.
- [83] Chandel AK, Kapoor RK, Singh A, et al. Detoxification of sugarcane bagasse hydrolysate improves ethanol production by *Candida shehatae* NCIM 3501. *Bioresource Technology*. 2007, 98: 1947-1950.
- [84] Canilha L, Carvalho W, Felipe MGA, et al. Xylitol production from wheat straw hemicellulosic hydrolysate: hydrolysate detoxification and carbon source used for inoculum preparation. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2008, 39: 333-336.
- [85] Chandel AK, Silva SSD, Singh OV. Detoxification of lignocellulose hydrolysates: biochemical and metabolic engineering toward white biotechnology. *Bioenergy Research*. 2013, 6: 388-401.
- [86] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Review in Biotechnology*. 2011, 31: 20-31.
- [87] Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus *Amorphotheca resinae* ZN1 and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26.
- [88] 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(1):1-13.
- [89] Roberto R, Ferdi S. Acid hydrolysis of cellulose as the entry point into biorefinery schemes. *Chemsuschem*. 2009, 2(12): 1096-1107.
- [90] Yan L, Ren XZ, Wei Q, et al. A review of dilute-acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Journal of Jilin Institute of Chemical Technology*. 2009, 156(2): 395-403.
- [91] Ladisch M, Lin K, Voloch M, et al. Process considerations in the enzymatic hydrolysis of biomass. *Enzyme and Microbial technology*. 1983, 5(2): 82-102.

- [92] Taherzadeh MJ, Karimi K. Enzymatic-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *Bioresources*. 2007, 2(4): 707-738.
- [93] Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion and Management*. 2011, 52(2): 858-875.
- [94] Liu G, Zhang J, Bao J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous aspen plus modeling. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2016, 39:133-140.
- [95] Walker L, Wilson D. Enzymatic hydrolysis of cellulose: an overview. *Bioresource Technology*. 1991, 36(1): 3-14.
- [96] Coughlan MP. The properties of fungal and bacterial cellulases with comment on their production and application. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 1985, 3: 39-109.
- [97] Zhang YHP, Lynd LR. Toward an aggregated understanding of enzymatic hydrolysis of cellulose: noncomplexed cellulase systems. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, 88(7): 797-824.
- [98] Bansal P, Hall M, Realff MJ, et al. Modeling cellulase kinetics on lignocellulosic substrates. *Biotechnology Advances*. 2009, 27(6): 833-848.
- [99] Sannigrahi P, Miller SJ, Ragauskas AJ. Effects of organosolv pretreatment and enzymatic hydrolysis on cellulose structure and crystallinity in Loblolly pine. *Carbohydrate Research*. 2010, 345(7): 965-970.
- [100] Nidetzky B, Steiner W, Hayn M, Claeysens M. *Biochem J*. 1994, 298: 705.
- [101] Suominen PL, Mantyla AL, Karhunen T, Hakola S, Nebalainien KMH. *Mol Gen Genet*. 1993, 241: 523.
- [102] Lee I, Evans BR, Woodward J. The mechanism of cellulase action on cotton fibers: evidence from atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*. 2000, 82(1): 213-221.
- [103] Garvey M, Klose H, Fischer R, et al. Cellulases for biomass degradation: comparing recombinant cellulase expression platforms. *Trends in Biotechnology*. 2013, 31(10): 581-593.
- [104] Klein-Marcuschamer D, Oleskowicz-Popiel P, Simmons BA, et al. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, 109:1083-1087.
- [105] Zhang J, Chu D, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105: 718-728.
- [106] He Y, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation. *Bioresource Technology*. 2014, 158: 360-364.
- [107] Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnology Progress*. 2003, 19(4):1109-1117.

- [108] Cotana F, Cavalaglio G, Gelosia M, et al. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2015, 69: 424-432.
- [109] Ask M, Olofsson K, Felice TD, et al. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. *Process Biochemistry*. 2012, 47(10): 1452-1459.
- [110] Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, et al. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2000, 25(4): 184-192.
- [111] Tomás-Pejó E, Oliva JM, Olsson L. Comparison of SHF and SSF processes from steam-exploded wheat straw for ethanol production by xylose-fermenting and robust glucose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, 100(6): 1122-1131.
- [112] Huang YH, Jin YL, Fang Y, et al. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of non-starch polysaccharides and starch from fresh tuber of *Canna edulis* ker at a high solid content for ethanol production. *Biomass and Bioenergy*. 2013, 52: 8-14.
- [113] Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G. A short review on SSF-an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. 2008, 1(1):7.
- [114] Chen X, Shekiro J, Pschorn T, et al. A highly efficient dilute alkali deacetylation and mechanical (disc) refining process for the conversion of renewable biomass to lower cost sugars. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7(1): 1-12.
- [115] Thorsten S, Eckhard B. Competition between pentoses and glucose during uptake and catabolism in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2012, 5(1): 14.
- [116] Nielsen F, Zacchi G, Galbe M, et al. Prefermentation improves ethanol yield in separate hydrolysis and cofermentation of steam-pretreated wheat straw. *Sustainable Chemical Processes*. 2016, 4(1): 1-12.
- [117] Wang RF, Unrean P, Franzén CJ. Model-based optimization and scale-up of multi-feed simultaneous saccharification and co-fermentation of steam pretreated lignocellulose enables high gravity ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9(1): 1-13.
- [118] Pocket guide to ethanol. Washington, DC, USA: Renewable Fuels Association. 2017.
- [119] Senthilkumar V, Gunasekaran P. Bioethanol production from cellulosic substrates: Engineered bacteria and process integration challenges. *Journal of Scientific and Industrial Research*. 2005, 64: 845-53.
- [120] Sims REH, Mabee W, Saddler JN, et al. An overview of second generation biofuel technologies. *Bioresource Technology*. 2010, 101(6):1570-80.
- [121] Tye YY, Lee KT, Abdullah WNW, et al. The world availability of non-wood lignocellulosic biomass for the production of cellulosic ethanol and potential pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016, 60:155-172.

- [122] Chen S, Mowery RA, Scarlata CJ, et al. Compositional analysis of water-soluble materials in corn stover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55: 5912-5918.
- [123] Chen S, Mowery RA, Sevcik RS, et al. Compositional analysis of water-soluble materials in switchgrass. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58: 3251-3258.
- [124] Niu W, Han L, Liu X, Huang G, et al. Twenty-two compositional characterizations and theoretical energy potentials of extensively diversified China's crop residues. *Energy*. 2016, 100: 238-250.
- [125] 罗茂春, 田翠婷, 李晓娟, 等. 水稻茎秆形态结构特征和化学成分与倒伏关系综述. *西北植物学报*. 2007, 27(11): 2346-2353.
- [126] 范华, 裴彩霞, 董宽虎. 秸秆的水溶性碳水化合物营养评价. *畜牧兽医杂志*. 2008, 27(2): 1-5.
- [127] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO. 2008, NREL/TP-510-42623.
- [128] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO. 2012, NREL/TP-510-42618.
- [129] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities, Laboratory Analytical Procedure (LAP)-006; NREL: Golden, CO, 1996; Report NREL/TP-510-42628.
- [130] Ghose T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59, 257-268.
- [131] Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72: 248-254.
- [132] Li H, Wu M, Xu L, et al. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. *Microbial Biotechnology*. 2015, 82: 66.
- [133] Han XS and Bao J. General Method to Correct the Fluctuation of Acid Based Pretreatment Efficiency of Lignocellulose for Highly Efficient Bioconversion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018, 6(3), 4212-4219.
- [134] Brown L, Torget R. Chemical analysis and testing task laboratory analytical procedure: enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 1996.
- [135] Chu D, Zhang J, Bao J. Simultaneous Saccharification and Ethanol Fermentation of Corn Stover at High Temperature and High Solids Loading by a Thermotolerant Strain *Saccharomyces cerevisiae* DQ1. *BioEnergy Research*. 2012, 5(4): 1020-1026.

- [136] Zhang J, Bao J. A modified method for calculating practical ethanol yield at high lignocellulosic solids content and high ethanol titer. *Bioresource Technology*. 2012, 116: 74-79.
- [137] Ali B, Gill RA, Yang S, et al. Regulation of cadmium-induced proteomic and metabolic changes by 5-aminolevulinic acid in leaves of *Brassica napus* L. *Plos One*. 2015, 10: 1-23.
- [138] Gill RA, Zang L, Ali B, et al. Chromium-induced physio-chemical and ultrastructural changes in four cultivars of *Brassica napus* L. *Chemosphere*. 2015, 120: 154-164.
- [139] Slycken SV, Witters N, Meers E, et al. Safe use of metal-contaminated agricultural land by cultivation of energy maize (*Zea mays*). *Environ. Pollut.* 2013, 178: 375-380.
- [140] Wan XM, Lei M, Chen TB. Cost-benefit calculation of phytoremediation technology for heavy-metal-contaminated soil. *Science of the Total Environment*. 2016, 563-564: 796-802.
- [141] Wan XM, Lei M, Chen TB, et al. Safe utilization of heavy-metal-contaminated farmland by mulberry tree cultivation and silk production. *Science of the Total Environment*. 2017, 599-600: 1867-1873.
- [142] Carvalho AR, Fragoso R, Gominho J, et al. Waterenergy nexus: anaerobic co-digestion with elephant grass hydrolyzate. *Journal of Environmental Management*. 2016, 181: 48-53.
- [143] Mohapatra S, Dandapat SJ, Thatoi H. Physicochemical characterization, modelling and optimization of ultrasono-assisted acid pretreatment of two *Pennisetum* sp. using Taguchi and artificial neural networking for enhanced delignification. *Journal of Environmental Management*. 2017, 187: 537-549.
- [144] Dhiman SS, Selvaraj C, Li JL, et al. Phytoremediation of metal-contaminated soils by the hyperaccumulator canola (*Brassica napus* L.) and the use of its biomass for ethanol production. *Fuel*. 2016, 183: 107-114.
- [145] Arivalagan P, Singaraj D, Haridass V, et al. Removal of cadmium from aqueous solution by batch studies using *Bacillus cereus*. *Ecological Engineering*. 2014, 71, 728-735.
- [146] Taiwo AM, Gbadebo AM, Oyedepo JA, et al. Bioremediation of industrially contaminated soil using compost and plant technology. *Journal of Hazardous Materials*. 2016, 304: 166-172.
- [147] 李婷. 化学修饰面包酵母菌对其表面结构及吸附水中 Cd^{2+} 的影响. *上海环境科学*. 2010, 5(7): 45.
- [148] Lim AP, Aris AZ. A review on economically adsorbents on heavy metals removal in water and wastewater. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2013, 13(2): 163-181.
- [149] Vijayaraghavan K, Yun YS. Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*. 2008, 26(3): 266-291.

-
- [150] Wang J, Chen C. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnology Advances*. 2006, 24(5): 427-451.
- [151] Mahnaz K, Seyed DA, Kamran T, et al. Adsorption of cadmium and lead onto live and dead cell mass of *Pseudomonas aeruginosa*: A dataset. *Data in Brief*. 2014, 18: 1185-1192.

附录 I 主要试剂

试剂	规格	生产厂家
酵母提取物	生化试剂	Oxoid Ltd
蛋白胨	生化试剂	Oxoid Ltd
琼脂	生化试剂	上海捷瑞生物工程有限公司
葡萄糖	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
氯化钠	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
乙酸	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
氯化铵	分析纯	上海泰坦科技股份有限公司
四水合氯化锰	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
七水合硫酸镁	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸铵	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
尿素	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
柠檬酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
柠檬酸三钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
木糖	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
甘油	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
硫酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钙	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
七水合硫酸亚铁	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
无水乙醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
五水合硫酸铜	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
七水合硫酸锌	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
糠醛	分析纯	上海德默医药科技有限公司
羟甲基糠醛	分析纯	上海德默医药科技有限公司
纤维二糖	分析纯	上海源聚生物科技有限公司
硫酸镉	分析纯	阿达玛斯试剂有限公司
牛血清蛋白	分析纯	美国 Biosharp 公司
葡萄糖液体试剂盒	分析纯	上海科欣生物技术研究

附录 II 主要仪器和设备

名称	型号	生产厂家
高速冷冻离心机	Avanti J-26	Beckman Coulter, Inc.
立式震荡培养箱	HZ-2411KB	江苏华利达实验设备有限公司
超声波脱气机	SB-5200D	宁波新芝生物科技
台式离心机	5418	德国 Eppendorf 公司
超低温冰箱	Forma-86C	美国 Thermo Scientific 公司
超纯水纯化系统	Milli-Q Synthesis	德国默克密理博公司
预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工设备有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器有限公司
隔水式培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器有限公司
电子计重器	YP150001	上海圣科仪器设备有限公司
电子天平	BS223S	瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司
溶氧电极	InPro 6800	瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司
恒温水浴槽	ZC-18Q	宁波天恒仪器厂
高压蒸汽发生器	DZSF4.5C	上海蒸源机电有限公司
预处理蒸汽发生器	HX-36D-2.5	上海华征特种锅炉制造有限公司
高效液相色谱	LC-20AD 示差检测器	日本岛津公司
高效液相色谱	LC-20AT 紫外检测器	日本岛津公司
色谱柱	HPX-87H	Bio-rad Aminex
恒温水浴振荡器	HZ-9212S	江苏华利达实验设备厂
超净工作台	SW-CJ-1D	沪净净化
锤式粉碎机	SF-300	上海科太粉碎设备厂
生物反应器	BIOTECH-5L	上海保兴生物设备工程有限公司
生物反应器	BIOTECH-3L	上海保兴生物设备工程有限公司
生物传感分析仪	SBA-40D	山东省科学院生物研究所
移液枪	0.1-5 mL	德国 Eppendorf 公司
pH 电极	G301K	苏州汉星分析传感器有限公司

硕士期间学术成果

发表论文:

Weitao Dong, Xushen Han, Gang Liu*, Jie Bao*. Improving cellulosic ethanol fermentation efficiency by converting endogenous water soluble carbohydrates into citric acid before pretreatment. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2019, DOI: 10.1007/s00449-019-02107-8. (IF=2.139 对应本文第二章)

致谢

时光荏苒，岁月如梭，转眼间三年的时光即将逝去，曾经的那些美好画面依旧在我的脑海中盘旋，成为了我人生中的一笔宝贵财富。值此结尾之际，我由衷的感谢那些曾经给予我帮助与支持的人。

首先，我要真诚地感谢我的硕士研究生导师，鲍杰教授。本篇毕业论文是在鲍老师的精心指导下完成的，从最开始的论文选题到实验中难关的度过，从实验数据的处理到大小论文的撰写，以及从小论文的撰写修改到投稿等，无不凝聚了鲍老师的心血与厚望。鲍老师的欣欣指导、敦敦教诲、博学多才、严谨认真以及对我们的爱护，都深深感染了我们，使我们受益颇深。因此，在我的硕士研究生生活即将结束之际，请允许我对老师说一声：鲍老师，您辛苦了！

其次，我要真诚地感谢那些在我课题研究过程与论文撰写过程中，给予我帮助与指导的张建副教授、高秋强老师和刘刚老师，是你们的支持与鼓励引导我完成了这篇论文。同时，也要感谢华东理工大学，给我这样一个广阔的学习平台，让我从中不断汲取知识的养分，不断提高，不断进步。此外，也要感谢邵帅师兄、邱忠洋师兄、周平平师姐、韩昫身师兄、侯伟亮师兄、温经柏师兄以及其他同学们给予我的帮助与支持。

最后，我要真诚地感谢我远在家乡的父母。正是他们的兢兢业业为我树立一个好的榜样，从而使得我也有一个比较好的品行。同时，父母的养育之恩重如泰山，在我十几年的上学过程中，父母一直是最坚强的后盾，提供我的衣食住行。父母的无私奉献是我们每个做儿女都应当铭记的。父母不仅交给了我们生命，也教会了我们如何做人，如何与人交流，如何为人处世。

董维涛

2019年4月 于上海

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 伍拾捌 页

立卷人 _____

检查人 _____

立卷时间 _____