

学校代码：10251

学 号：Y45170504

# 华东理工大学

## 工程硕士学位论文

论文题目：广地域多品种木质纤维素原料的长期储存与生物炼制及重金属污染原料能源化应用研究

工程领域：生物工程

研究方向：生物炼制

论文作者：韩涛

学校导师：张建 副教授

企业导师：黄亦钧 高级工程师

定稿日期：2020 年 05 月 07 日

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

U D C: \_\_\_\_\_

# 华东理工大学

## 学位论文

广地域多品种木质纤维素原料的长期储存与生物炼制  
及重金属污染原料能源化应用研究

韩涛

指导教师姓名: 鲍杰 教授 生物工程学院  
张建 副教授 生物工程学院

黄亦钧 高级工程师 山东蔚蓝生物科技有限公司

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物工程

论文定稿日期: 2020.05.07 论文答辩日期: 2020.06.08

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: 庄英萍 教授

评 阅 人: 杨世辉 教授

洪 枫 教授

宁艳春 高级工程师

## 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：韩涛

指导教师签名：鲍杰

2020年6月11日

2020年6月11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：韩涛

2020年6月15日

# 广地域多品种木质纤维素原料的长期储存与生物炼制及 重金属污染原料能源化应用研究

## 摘要

本文着重研究了两个重要的实际应用问题，即：广地域多品种木质纤维素原料的长期储存和重金属污染生物质原料的能源化应用。首先，我国的作物秸秆类木质纤维素原料分布极广、品种众多且产量非常丰富，因而极其有利于进行生物炼制类的能源化应用。然而在进行大规模生物炼制应用之前要想摆脱原料供应对季节的强烈依赖性就必须成功解决一个非常关键的问题——木质纤维素原料的无霉变长期储存，才能保证生物炼制工厂可以进行常年稳定的能源化生产。其次，近年来我国总体的土壤重金属污染情况非常严重，耕地土壤环境质量堪忧，由此每年都会产生大量的重金属污染生物质。为避免直接丢弃而引发严重的重金属二次污染，寻求合理妥善的方法来安全有效地处理这些受重金属污染的生物质便显得尤为重要。虽然目前采用生物炼制方法对这类受污染的生物质原料进行能源化应用是接近该目标的有效方法，但应用的同时做好重金属二次污染的防控工作更是重中之重。

本研究为解决上述问题，借助了本实验室开发的一种成熟且优良的预处理技术——干酸预处理技术，并以此为基础分别进行了广地域多品种木质纤维素原料的长期储存测试研究以及重金属污染生物质原料的全生物质炼制研究，现将主要的研究方法及其最终取得的重要结论总结如下：

(1) 本文第一部分主要研究了干酸预处理后的三种农作物秸秆在中国多种地域环境下进行长期储存的可行性。首先，为了让木质纤维素原料在长期储存期间避开霉变的威胁，我们采用了一种先预处理再进行长期储存的方式。其次，为了把握预处理原料在长期储存期间所发生的变化，针对多种预处理后的秸秆在中国不同城市的储存进行了全年的跟踪测试实验，主要调查了预处理原料的理化性质、组成、酶水解得率以及乙醇发酵性能的变化情况。最后，在分散式原料供应的框架下对木质纤维素原料的储存密度和资源岛外运输成本的关系进行了探讨。最终得到了如下结果或结论：第一，干酸预处理后的作物秸秆能够在中国多种复杂地域环境以及长达一年的时间内实现自身的无霉变储存，因此其拥有优良的抗霉变性能，同时也可说明这样的先干酸预处理再进行长期储存的方式是行之有效的。第二，干酸预处理之后，秸秆原料的堆积密度和振实密度明显提高，并且储存期间原料的储存密度仍在积极的上升，因此这样的性质变化有助于降低原料供应过程的运输成本。第三，干酸预处理原料在储存期间主要抑制物组分的含量显著降低，因而有助于节约后续生物脱毒的时间成本。第四，干酸预处理秸秆原料在长期储存期间酶解得率明显提高但乙醇发酵性能总体上变化不大。

(2) 本文第二部分以目前土壤重金属污染现状下污染现象时常发生的水稻生物质

为研究对象，主要研究了基于干酸预处理技术的全生物质炼制方法对目前大量产生且难以处理的重金属污染水稻生物质进行全封闭能源化应用的可行性。重金属污染水稻的稻秆和稻米均是有潜在二次污染能力的受污染生物质，对其进行能源化应用的同时如果处理不当很容易造成严重的后果。基于干酸预处理技术的干法生物炼制过程可以率先实现重金属污染稻秆的全封闭能源化利用，但受污染稻米没有很好的利用方法，如若单独用于乙醇发酵势必会产生大量可被非法用作动物饲料的重金属污染酒糟从而导致严重的重金属二次污染。由此，为避免稻米的单独发酵，我们在干酸预处理技术的基础上尝试了一种全生物质共同炼制的方法，即：将受污染的稻米制备成水解液并以补料的形式整合至稻秆的乙醇发酵过程中，形成全生物质的发酵形式，从而成功从源头上避免重金属酒糟的产生。最终不仅取得了理想的乙醇指标（56.3 g/L），实现了能源化利用，也成功对受污染水稻生物质做到了无二次污染的全封闭处理，实现了重金属的富集。

综上，干酸预处理技术对广地域多品种木质纤维素原料的长期储存及重金属污染原料全封闭能源化应用意义重大。基于干酸预处理技术的应用不仅能够成功解决农作物秸秆等木质纤维素原料的长期储存问题，还可为重金属污染水稻进行安全的全生物质能源化利用创造有利条件。因此，本研究为今后生物炼制工厂的常年原料供应以及重金属污染生物质的安全有效处理做出了一定的贡献。

**关键词：**干酸预处理；长期储存；分散式原料供应；重金属污染；全生物质炼制

# **The Long-term Storage and Biorefining of Various Lignocellulosic Feedstocks in Multiple Areas and The Energy Application of Heavy Metal Contaminated Feedstocks**

## **Abstract**

This thesis focused on two important practical application issues, namely, the long-term storage of various lignocellulosic feedstocks in multiple areas and the energy-intensive application of heavy metal-contaminated biomass feedstocks. In the first place, lignocellulosic materials in China are widely distributed, with many varieties and rich output, which is extremely conducive to the energy application of biorefining. Before considering large-scale biorefinery applications, it is necessary to consider the strong dependence of multiple raw material supplies on the season. To guarantee the biorefinery plant can carry out stable energy production all year round, a critical problem must be solved, namely, the successful long-term storage of lignocellulose materials without microbial contamination. Besides, in order to avoid serious secondary pollution of heavy metals caused by direct disposal, it is particularly important to seek reasonable and proper methods to safely and effectively treat these heavy metal-contaminated biomass. Although the use of biorefining methods for the energy application of such contaminated biomass materials is an effective method close to this goal, it is even more important to prevent and control heavy metal secondary pollution while applying it.

In order to solve the problems above, this study used a mature and excellent pretreatment technology developed by our laboratory, i.e., dry acid pretreatment technology. And at the same time, we conducted a long-term storage test study of a wide variety of lignocellulose materials as well as the research on the whole-biomass biorefining of heavy metal contaminated biomass feedstocks. The main research methods and the important results finally obtained are summarized as follows:

The first part of this thesis here mainly studies the replacement of long-term storage of several crop straws after dry acid pretreatment in multiple geographical environments of China. Firstly, to prevent the threat of mold during the long-term storage, we adopted a method of pretreatment first and then long-term storage. Secondly, in order to grasp the changes of the pretreated materials during long-term storage, a year-round follow-up test experiment was carried out on the spread of various pretreated feedstocks in different regions of China, mainly investigating the changes of physical and chemical properties, composition and enzymatic hydrolysis yield and ethanol fermentability of the pretreated. Finally, under the

framework of decentralized supply, the relationship between the storage density of lignocellulosic feedstocks and the off-depot transportation cost was discussed. At last, the following results or goals were obtained. Firstly, the dry acid pretreated crop straws can achieve the one-year storage without microbial contamination in a variety of complex regional environments of China, so they have excellent resistance to mold. The performance also shows that this kind of method of pretreated first then stored is reasonable. Secondly, after the dry acid pretreatment, the bulk density and tap density of raw straw materials are significantly improved, and the storage density of raw materials during storage is still positively rising. Therefore, such a property change helps to reduce the transportation cost of the feedstock supply process. Thirdly, the main inhibitor content of the dry acid pretreated feedstocks during storage is significantly reduced, thereby saving the time cost of subsequent biological detoxification. Fourth, the yield of enzymatic hydrolysis is significantly improved, and the overall ethanol fermentation performance is stable.

The second part of this thesis takes rice biomass, which often occurs under the current heavy metal pollution in the soil, as the research object, and mainly studies the current biomass refining method based on dry acid pretreatment technology. The rice straw and rice grain of heavy metal contaminated rice are contaminated biomass with potentially secondary pollution capability, and can be used for energy application. If not handled properly, it is very easy to cause serious consequences. The dry biorefining process based on dry acid pretreatment technology can be realized first with totally enclosed energy utilization of heavy metal contaminated rice straw, but contaminated rice does not have a good use method. If it is used for ethanol fermentation alone, it will inevitably produce a large amount of heavy metal contaminated distillers that can be illegally used as animal feed, and resulting in serious heavy metal secondary pollution. In order to avoid separate fermentation of rice, we have tried a method of whole-biomass biorefining, i.e., preparing contaminated rice into hydrolysate and integrating it into the ethanol fermentation process of rice straw in the form of supplementary raw materials to realize a form of whole-biomass fermentation, thus avoid the occurrence of heavy metal contamination. In the end, it not only achieved an ideal ethanol index (56.3 g/L), realized energy utilization, but also successfully achieved full-enclosed treatment of contaminated rice biomass without secondary pollution, and realized the enrichment of heavy metals.

In summary, dry-acid pretreatment technology is of great significance for the long-term storage of a wide variety of lignocellulosic feedstocks and the fully enclosed energy-intensive application of heavy metal-pollution raw materials. The application of dry acid pretreatment technology can not only successfully solve the problem of long-term storage of crop straw and other lignocellulosic feedstocks, but also create favorable conditions for the

whole-biomass utilization of heavy metal contaminated rice. Therefore, this research has made certain contributions to the future supply of raw materials for biorefinery plants and the safe and effective treatment of biomass contaminated by heavy metals.

**Keywords:** dry acid pretreatment; long-term storage; decentralized biomass supply; heavy metal contamination; whole-biomass biorefining

## 目录

|                                     |    |
|-------------------------------------|----|
| 第 1 章 绪论.....                       | 1  |
| 1.1 前言.....                         | 1  |
| 1.2 木质纤维素原料的组成与应用.....              | 1  |
| 1.2.1 木质纤维素的基本组成.....               | 1  |
| 1.2.2 木质纤维素原料的应用优势.....             | 2  |
| 1.2.3 中国主流的农作物秸秆及其资源分布.....         | 2  |
| 1.3 木质纤维素原料的预处理.....                | 4  |
| 1.3.1 预处理的作用.....                   | 4  |
| 1.3.2 常见的预处理方法.....                 | 5  |
| 1.3.3 干酸预处理.....                    | 5  |
| 1.4 脱毒.....                         | 6  |
| 1.4.1 抑制物的主要来源及类型.....              | 6  |
| 1.4.2 常规的脱毒方法.....                  | 6  |
| 1.4.3 快速固态生物脱毒法.....                | 7  |
| 1.5 干法生物炼制技术的建立.....                | 7  |
| 1.6 木质纤维素原料长期储存及生物炼制供应.....         | 8  |
| 1.6.1 木质纤维素原料长期储存的重要性.....          | 8  |
| 1.6.2 木质纤维素原料生物炼制供应.....            | 8  |
| 1.7 重金属污染生物质的处理.....                | 8  |
| 1.7.1 重金属污染的来源及现状.....              | 8  |
| 1.7.2 重金属污染生物质的生物炼制处理.....          | 9  |
| 1.8 本论文的主要研究内容.....                 | 10 |
| 第 2 章 生物炼制过程广地域多品种木质纤维素原料的长期储存..... | 11 |
| 2.1 引言.....                         | 11 |
| 2.2 材料与方法.....                      | 12 |
| 2.2.1 实验原料与酶制剂.....                 | 12 |
| 2.2.2 菌种和培养基.....                   | 13 |
| 2.2.3 农作物秸秆分布密度的计算方法.....           | 14 |
| 2.2.4 干酸预处理.....                    | 14 |
| 2.2.5 预处理后秸秆原料的组分测定方法.....          | 14 |
| 2.2.6 预处理后秸秆原料的长期储存.....            | 15 |
| 2.2.7 预处理后秸秆储存期间主要物理性质的测定.....      | 16 |

|                                       |    |
|---------------------------------------|----|
| 2.2.8 快速固态生物脱毒.....                   | 17 |
| 2.2.9 酶水解评价.....                      | 17 |
| 2.2.10 乙醇 SSCF.....                   | 18 |
| 2.2.11 乙醇得率的计算.....                   | 19 |
| 2.2.12 HPLC 的定量检测分析.....              | 19 |
| 2.3 结果与分析.....                        | 20 |
| 2.3.1 储存原料的准备及储存前后的原料状况.....          | 20 |
| 2.3.2 长期储存地域的选择及当地全年天气情况.....         | 21 |
| 2.3.3 预处理后秸秆原料在多地储存期间的主要物理性质变化.....   | 24 |
| 2.3.4 长期储存过程中预处理原料的组成变化.....          | 28 |
| 2.3.5 酶水解评价和乙醇发酵性能评估.....             | 32 |
| 2.3.6 干法生物炼制全过程物料衡算.....              | 36 |
| 2.3.7 分散预处理模式下的秸秆资源岛外运输成本分析.....      | 42 |
| 2.4 小结.....                           | 44 |
| 第 3 章 基于干法生物炼制技术实现重金属污染水稻的全生物质利用..... | 45 |
| 3.1 引言.....                           | 45 |
| 3.2 材料与方法.....                        | 46 |
| 3.2.1 实验原料与酶制剂.....                   | 46 |
| 3.2.2 菌种与培养基.....                     | 47 |
| 3.2.3 干酸预处理.....                      | 47 |
| 3.2.4 在位快速固态生物脱毒.....                 | 48 |
| 3.2.5 预处理稻秆在位脱毒后的酶解糖化.....            | 48 |
| 3.2.6 重金属污染稻米的处理方法.....               | 48 |
| 3.2.7 重金属污染水稻的全生物质共发酵.....            | 48 |
| 3.2.8 全生物质发酵过程中乙醇得率的计算方法.....         | 49 |
| 3.2.9 发酵醪的后处理.....                    | 50 |
| 3.2.10 水稻重金属污染的模拟及重金属的监测.....         | 50 |
| 3.2.11 小分子物质的定量分析.....                | 50 |
| 3.3 结果与讨论.....                        | 51 |
| 3.3.1 重金属污染水稻的全生物质炼制过程.....           | 51 |
| 3.3.2 稻秆预处理前后的组分变化.....               | 51 |
| 3.3.3 重金属污染稻米的酶解条件.....               | 54 |
| 3.3.4 重金属污染水稻的全生物质发酵过程.....           | 56 |
| 3.3.5 全生物质炼制过程关于重金属镉的质量衡算.....        | 59 |
| 3.4 小结.....                           | 61 |

---

|                   |    |
|-------------------|----|
| 第 4 章 结论与展望.....  | 62 |
| 4.1 结论.....       | 62 |
| 4.2 展望.....       | 62 |
| 参考文献.....         | 64 |
| 附录 I 主要实验试剂.....  | 72 |
| 附录 II 主要仪器设备..... | 73 |
| 硕士期间学术成果.....     | 74 |
| 致谢.....           | 75 |

## 第 1 章 绪论

### 1.1 前言

当前,全球的能源供应主要还是依托煤、石油、天然气等化石燃料的使用来完成,而包括太阳能、风能、水能、生物燃料等在内的可再生能源虽然是向低碳密集型、更可持续的能源体系转型的核心,但其也仅占全球能源消费的 13.3%<sup>[1]</sup>。自工业革命以来,人口的急剧增长,工农业的迅猛发展以及交通运输业的不断兴起使得化石燃料的消耗量空前巨大,因此,化石资源枯竭的到来并不会像看起来的那样遥遥无期。有学者凭借当前的石化资源消耗速率对石油的使用年限进行了预测,未来的五十年内我们或将用完所有的石油储备<sup>[2]</sup>。不幸的是,化石资源枯竭危机在向我们逼近的同时,全球性的环境危机也正在酝酿之中。由于化石燃料等不可再生能源的大量消耗,全球的环境已经受到了极其不良的影响<sup>[3]</sup>,最主要的体现是地球大气层二氧化碳等温室气体浓度的大幅提高增强了全球的温室效应<sup>[4,5]</sup>,进而引发全球变暖等一系列严重问题。面对化石能源枯竭危机和大气环境日益恶化的威胁,近些年来人们在能源供给结构的变革和新型清洁可再生能源的研发及应用上做了许多的努力和尝试<sup>[6-9]</sup>,其中不乏一些失败的案例,例如 20 世纪七、八十年代出现的骇人听闻的“三里岛核事故”和“切尔诺贝利事件”。尽管人们追求核能这类清洁能源的初衷是好的,但在目前看来很多国家的核裂变乃至核聚变的稳定控制技术尚未完全成熟,短期内无法完成攻关,贸然使用的情况下必定隐藏着极大的风险。因此,近些年来对太阳能<sup>[10]</sup>、风能<sup>[11]</sup>、生物燃料<sup>[12]</sup>等这类既安全又稳定的清洁可再生能源进行应用研究的学者络绎不绝。其中,燃料乙醇是一类常见的且性能优良的清洁型生物燃料,可用作汽油的改良剂从而达到节能环保的目的<sup>[13]</sup>。近些年来在乙醇的生产上为避免出现与人、畜争粮的问题,许多国家均出台了相应的政策来大力推动以木质纤维素原料进行生产的二代燃料乙醇的研究。例如,中国国家能源局在 2016 年发布的《生物质能发展“十三五”规划》就明确提出了要大力发展纤维素乙醇和推进燃料乙醇推广应用<sup>[14]</sup>。因此,以木质纤维素原料为基础所开展的生物能源炼制类研究是深受鼓舞的。

### 1.2 木质纤维素原料的组成与应用

#### 1.2.1 木质纤维素的基本组成

木质纤维素是一种主要由纤维素、半纤维素和木质素所构成的混合物<sup>[15]</sup>。其中的纤维素,成分单一,是一种由多个葡萄糖分子以 $\beta$ -1,4-糖苷键为纽带相互连接而成的多糖类聚合物。此外,由于纤维素分子之间还有氢键的存在,所以常温下的纤维素非常稳定,这也是纤维素可以构成植物细胞壁骨架的原因之一。相对纤维素而言,半纤维素的成分极为复杂,水解产物多样,是一类在五碳糖(D-木糖、L-阿拉伯糖等)和六碳糖(D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖等)共同参与下而形成的杂聚物。至于木质素,它是一种覆盖于纤维素和半纤维素的表面从而起到保护作用的物质,也是一种杂聚

物，只不过是由多种酚类物质聚合而形成的<sup>[16]</sup>。

### 1.2.2 木质纤维素原料的应用优势

木质纤维素类原料是地球上来源极广、储量极丰的可再生生物质资源，其主要来自于三大产业——农业、林业和种植业。作为一种丰富的碳中性可再生资源，其可用于生产生物能源和一定附加价值的生物基化学品，加强对它的利用可满足若干社会需求<sup>[11]</sup>。将木质纤维素原料用于生物炼制应用，具有传统石油炼制难以匹敌的众多优势。首先，生物炼制所用的原料来源极广且可以再生，因而有利于可持续发展。其次，有助于推动能源消费结构变革，从而减少温室气体的排放。植物可以通过光合作用固定环境中的 CO<sub>2</sub> 并将其转化为有机物质（纤维素等）进行储藏，当这些植物被用于生物炼制时本身所固定的 CO<sub>2</sub> 又被释放至环境中或以其他的形式再次被固定，所以从理论上来说可以实现碳的零排放甚至是逆排放。最后，木质纤维素原料用途十分广泛。除了可用于生产燃料乙醇、生物柴油等生物类能源之外，还可被用来生产一些高附加值的产品，如药物、生物材料等等。

### 1.2.3 中国主流的农作物秸秆及其资源分布

我国幅员辽阔并且作为一个农业大国，在农作物的种植上表现出种植种类繁多、分布极广的特点。由此每年所产生的农作物秸秆等农业废弃物的总量可达十亿吨级别，在世界秸秆资源总量的排名榜上位居前列<sup>[17]</sup>。长期以来，玉米、小麦和水稻一直是我国农业种植结构中最重要三大粮食类作物品种，同时也是我国秸秆资源产量的最主要贡献者（表 1.1）。从 2002 年至 2011 年的产量数据来看，这三类作物秸秆的资源量在逐年增加，这也可侧面反映出我国的主要粮食作物的生产能力正在发生着积极的变化。此外，根据国家统计局发布的 2017 年各行政区的玉米、小麦和水稻年产量数据，再结合这三类作物的草谷比（农作物废弃物与谷物颗粒的重量比）<sup>[18]</sup>，从而算得各地区的农作物秸秆年产量总和。虽然这只是个理论值但也可大致反映出我国三大农作物秸秆的区域分布情况。基于此，我们制得 2017 年中国三大农作物秸秆资源的区域分布数据地图（图 1.1）。可以看出，我国的农作物秸秆资源主要来自于：华东地区的安徽（4467 万吨）、山东（5815 万吨）、江苏（4089 万吨）等地；东北地区的吉林（4953 万吨）、黑龙江（8330 万吨）等地；华北地区的内蒙古（3412 万吨）、河北（4039 万吨）等地；中南地区的河南省（6863 万吨）；以及西南地区的四川省（3490 万吨）。全国 31 个省市只有个别地区的稻秆、玉秸、麦秆全年总产量未达到千万吨级别，如北京、天津、福建、海南、宁夏、青海等地。尽管农作物秸秆资源产量丰厚，但长期以来这些资源的利用效率一直很低，其中很大程度上是因为对秸秆的不恰当使用（如秸秆的焚烧和丢弃）。正因为如此，近年来国家发改委及有关部门陆续出台了政策和文件，以政策指导和资金支持的方式竭力促进秸秆资源的有效化利用，但秸秆资源总体的能源化利用率依旧较低。总而言之，我国的农作物秸秆资源虽然非常丰富，但总体利用程度有限，秸秆能源化方面更是与世界上其他农业大国还存在着较大的差距。

表 1.1 2002-2011 年中国主要农作物秸秆类型及产量<sup>[17]</sup>  
Table 1.1 Yield of the major crops straw in 2002-2011 in China

( $\times 10^4$  t)

|             | 2002  | 2003  | 2004  | 2005  | 2006  | 2007  | 2008  | 2009  | 2010  | 2011  |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Corn stalk  | 12616 | 12046 | 13550 | 14494 | 15767 | 15839 | 17255 | 17053 | 18434 | 20049 |
| Wheat straw | 10564 | 10119 | 10758 | 11401 | 12691 | 12788 | 13158 | 13467 | 13476 | 13736 |
| Rice straw  | 17454 | 16066 | 17909 | 18059 | 18172 | 18603 | 19190 | 19510 | 19576 | 20100 |
| Others*     | 19252 | 18590 | 19653 | 19302 | 18430 | 18505 | 20338 | 19687 | 19593 | 20268 |
| Total       | 59886 | 56821 | 61870 | 63256 | 65060 | 65735 | 69941 | 69717 | 71079 | 74153 |

\*包括其他谷物秸秆、豆秸、薯藤、棉柴、甘蔗秸、花生秸、油菜秸、芝麻秸、黄红麻秸、烟叶秸、甜菜秸等共 13 类作物秸秆。

产量单位：万吨

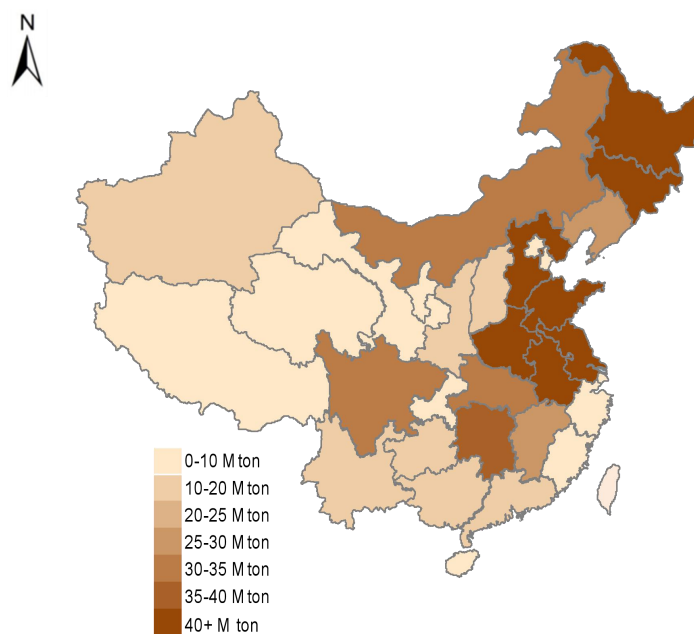


图 1.1 2017 年中国三大农作物秸秆资源的区域分布图

Fig. 1.1 Regional distribution map of the main crop straw production in 2017

### 1.3 木质纤维素原料的预处理

#### 1.3.1 预处理的作用

木质纤维素原料最主要的多糖组分是纤维素和半纤维素，它们是生物炼制过程中游阶段所需的可发酵糖的最重要来源。但是木质纤维素本身具有致密的结构以及多种化学键的存在，使之拥有非常顽固的生物拮抗性，从而不利于对其多糖组分的有效利用。因此，若想让生物炼制过程成功进行下去，第一步要做的就是打破木质纤维素的生物拮抗性，从而为多糖组分的后续利用创造有利条件（图 1.2）。而预处理就是在扮演着这样的重要角色。预处理被誉为是木质纤维素类生物质处理过程中的核心，这是因为预处理的结果会对生物炼制的整体转化过程产生重大影响，其中主要涉及原料尺寸减小、酶水解得率的高低、发酵性能的优劣、产品的回收以及副产品潜力等诸多重要方面<sup>[19]</sup>。

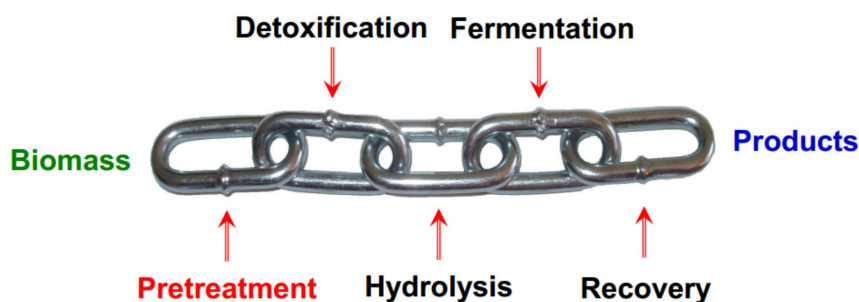


图 1.2 一般生物炼制平台的基本结构

Fig. 1.2 The basic structure of general biorefining platform

### 1.3.2 常见的预处理方法

预处理的方法虽然众多，但基本都是围绕以下几个方面展开设计的。（1）通过改变木质纤维素的纤维素聚合度和结晶度来增强后续纤维素酶解的效果。因为纤维素的分离和自身的降解会对纤维素的聚合度和结晶度产生负面的影响<sup>[20]</sup>，所以这样的预处理方法有利于增大纤维素表面与纤维素酶的可接触性，从而有利于释放其中的可发酵单糖。（2）促进半纤维素的溶解。这也是大多数稀酸预处理法的设计初衷。该组分在降解的过程中有助于破坏木质素和半纤维素之间的连接键，从而促使原本致密的木质纤维素形成疏松多孔的结构。（3）脱除木质纤维素中的木质素组分。木质素可以溶解于碱性的预处理催化剂当中，从而在一定程度上对木质纤维素结构的完整性造成威胁。（4）通过脱除木质纤维素内的乙酰基团来破坏其稳定性。

预处理方法可以根据预处理方法的设计初衷和具体的作用方式分为四类，即：物理预处理、化学预处理、物理-化学预处理和生物预处理。物理预处理法以球磨法<sup>[21]</sup>为典型，可以有效降低纤维素聚合度和结晶度，但预处理效率较差，且能耗较高。此外还有机械粉碎预处理法<sup>[22]</sup>，超声波辐射预处理法<sup>[23-24]</sup>等。化学预处理法以酸预处理法<sup>[25]</sup>和碱预处理法<sup>[26]</sup>最为常见，此外还有有机溶剂预处理法<sup>[27]</sup>等。其中酸预处理法被认为是未来生物燃料工业中具有商业应用潜力的前沿技术之一<sup>[28-30]</sup>，而碱预处理法在经济可行性上的表现也可圈可点。碱预处理过程可以将木质纤维素中的木质素组分溶解至所用的碱催化剂当中，从而实现木质素的脱除，但常规稀碱预处理法总体上对木质纤维素原料的晶体结构破坏程度较低。物理-化学预处理法包括高温液态水预处理<sup>[31]</sup>、蒸汽爆破预处理<sup>[32]</sup>、氨纤维爆破预处理<sup>[33]</sup>等，其中高温液态水预处理法和氨纤维爆破预处理法在预处理过程的成本投资上均比较高，主要体现在能耗、设备要求等方面。生物预处理法<sup>[34-36]</sup>主要是通过使用某些真菌或细菌来降解木质纤维素原料中的相关组分，如白腐真菌可以有效降解木质素组分，从而达到瓦解木质纤维素结构的目的。但是缺点也比较致命，因为生物预处理的过程通常较为漫长，不利于生物炼制应用。

预处理是整个生物炼制过程的核心，同时也是极其需要成本投资的一个工段<sup>[37]</sup>。因此在利用木质纤维素类生物质进行生物炼制应用时必须要选择适当的预处理方法。选取的参考标准主要是：操作成本和能耗的高低、抑制物的生成水平、纤维素底物的产率和糖回收率的高低、原料的普适性以及预处理过程的可放大性等<sup>[38]</sup>。

### 1.3.3 干酸预处理

目前的常规预处理方法或多或少具有一定的缺陷，总的来说主要包括：预处理效率的低下；大量的水耗、能耗；对设备的高要求；容易对预处理反应器造成腐蚀；预处理催化剂的高额回收成本；极高的废水产量；预处理后较高的糖损失率；高浓度的抑制物；预处理后原料的发酵水平低下等等。如果从生物炼制的第一个环节就开始暴露出非常严重的问题，那么必定会给生物炼制的中游或下游过程造成不同程度的负面影响，从而会削弱木质纤维素原料的生物炼制应用潜力。

因此，本实验室基于对以上因素的考虑，倾力开发出了一套成熟的预处理技术——

干酸预处理 (DryAP) 技术<sup>[39-43]</sup>。首先, DryAP 的预处理效果十分优良。通过硫酸、蒸汽的共同作用实现木质纤维素原料中半纤维素组分的有效降解, 而且对原料的结构造成了极大程度的破坏。其次, DryAP 过程的成本相对较低, 主要体现在低水耗<sup>[39]</sup>、蒸汽供应成本低<sup>[43]</sup>、预处理催化剂低廉、废水处理成本为零、对设备的要求较低等方面。再次, 经过 DryAP 后的物料以高固含量 (50%左右) 的形式存在, 因而后续可以进行高含量体系的发酵, 发酵指标提高的同时也有助于降低产品回收的成本, 而且高固含量的发酵也可以提高木质纤维素原料的处理效率。最后, 木质纤维素原料经过干酸预处理之后具有优良的抗霉变性能<sup>[44]</sup>, 有利于长期储存的进行。

## 1.4 脱毒

### 1.4.1 抑制物的主要来源及类型

用于打破木质纤维素原料生物拮抗性的预处理反应过程通常伴有一个较为极端的内部环境, 其主要由高压、高温和某些化学物质等因素中的若干个共同营造而成。在该环境下, 不可避免地会对木质纤维素中的纤维素、半纤维素和木质素等组分产生过度的降解作用, 从而形成了众多的抑制物<sup>[45-47]</sup>, 并存在于预处理后的液态或固态物料当中。以 DryAP 过程为例, 干酸预处理后的固态预处理秸秆可以检测出众多的抑制物, 主要包括: 呋喃类抑制物 (糠醛 (furfural), 5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 等)、芳香醛类抑制物 (丁香醛、香草醛等) 和有机酸类抑制物 (甲酸、乙酸、乙酰丙酸等) 等等<sup>[48,49]</sup>。如若不设法将预处理产物中的众多抑制物进行降解或安全转化, 必定会给接下来的酶解和乙醇发酵过程带来极其严重的抑制效果<sup>[50,51]</sup>。

### 1.4.2 常规的脱毒方法

为防止预处理后物料中的众多抑制物对后续生物炼制过程产生不良影响, 需要对其进行必要的脱毒程序。常见的脱毒方法主要可分为三大类: 物理脱毒、化学脱毒以及生物脱毒。物理脱毒法主要有水洗法<sup>[52-54]</sup>、活性炭吸附法等<sup>[52]</sup>。其中水洗法最为常见, 当然, 其缺点也非常明显。如若在工业放大过程中使用水洗法进行脱毒, 耗费大量新鲜水的同时必然会产生大量的工业废水, 无形增加了污水处理地成本。活性炭吸附也有一定的缺陷, 即: 在吸附抑制物组分的同时也会在一定程度上产生可发酵糖的吸附消耗。化学类脱毒法主要有过碱中和法<sup>[55,56]</sup>、离子交换吸附法<sup>[57,58]</sup>等。生物脱毒法则是利用某些特定的微生物<sup>[59]</sup> (如真菌、酵母、细菌等) 或特定的酶<sup>[60]</sup>来实现众多抑制物组分的有效降解。

目前绝大多数的生物脱毒研究专注的是木质纤维素原料水解液中的抑制物组分的脱除问题<sup>[45,46]</sup>。针对这类脱毒过程通常需要考虑一些较为实质的问题, 主要体现在以下几个方面。第一, 必须要了解脱毒微生物代谢特点和规律。脱毒菌种直接面对的是抑制物和多种单糖混合的水解液环境, 如果将脱毒菌接入水解液体系之后, 其不选择优先代谢抑制物而转为直接消耗水解液中的单糖组分, 那么必然会导致相当一部分可发酵糖的丢失, 从而造成后期发酵性能的削弱。第二, 必须了解脱毒微生物及其代谢产物对后续

的发酵菌种有无不利影响。脱毒完成之后，脱毒菌及相关代谢产物仍然存在于水解液体体系中，如果直接用于发酵，该菌是否会与发酵菌种形成竞争关系并且其脱毒产物是否会对发酵过程形成抑制均是需要调查清楚的。第三，需要在含有抑制物的水解液体体系中为脱毒微生物提供必要的生存条件。液态环境下的脱毒过程通常是好氧过程，这就需要通过搅拌、供氧等形式来保证体系含有足够的溶氧，以维持脱毒微生物的生存和抑制物的正常降解。综上，以上三个需要在脱毒阶段加以考虑的实质性问题可以反映出最重要的事实，那就是优秀脱毒菌种的选择。

#### 1.4.3 快速固态生物脱毒法

此前本实验室有关科研人员偶然从一批霉变的预处理后秸秆中筛选得到一种名为树脂枝胞霉的煤油真菌——*Amorphotheca resinae* ZN1<sup>[48]</sup>。现已证实该菌能够很好地适应干酸预处理后的高固含量（50%左右）木质纤维素原料体系并且还可以做到优先且高效地降解存在于该体系中的众多抑制物组分<sup>[61,62]</sup>，因而可以实现很好的脱毒效果。在达到该生物脱毒过程的终点时可以发现脱毒前后预处理秸秆原料中的抑制物组分得到充分降解的同时有关纤维素、半纤维素等糖类组分的含量仍可以基本保持不变，而且该脱毒过程的终点也非常容易把握。此外，相对于静态不通气情况下的脱毒过程，在适度通如空气的情况下，快速脱毒菌株 *Amorphotheca resinae* ZN1 还能进一步大大缩短静态固态生物脱毒过程所需的时间<sup>[49]</sup>。因此，综合来看，*A. resinae* ZN1 具有良好的生物脱毒应用潜力。

### 1.5 干法生物炼制技术的建立

木质纤维素类生物燃料的生产需要立足于完整的生物炼制技术之上，一般的生物炼制过程至少涵括了以下几个操作单元：预处理；脱毒；酶解糖化；可发酵糖的生物转化；以及主产物的回收等<sup>[63]</sup>。首先，预处理单元在整个生物炼制过程中占据着极其重要的地位，因为预处理方法的优劣会对木质纤维素原料的后续利用以及整个生物炼制过程的成本造成极大的影响<sup>[37]</sup>。其次，使用何种脱毒方法对于后续发酵体系中菌种的代谢活力以及全过程的原料转化率也会产生影响。此外，原料的整体的发酵性能与发酵阶段所使用的发酵菌种的品质息息相关。例如当所用的发酵菌株对糖的利用非常单一（如只能利用葡萄糖），那么该发酵微生物便无法利用源于木质纤维素充分降解后的其他糖组分，因此势必会造成碳源的浪费，从而引起发酵指标的低下。

因此，基于以上种种因素的综合考虑并且为了避免重蹈常规生物炼制技术的覆辙，开发出成熟且优良的生物炼制技术便显得尤为重要，由此本实验室建立了一种可以最大化促进纤维素乙醇同步糖化共发酵潜力的干法生物炼制技术<sup>[42]</sup>。干法生物炼制过程由干酸预处理、磨浆、*A. resinae* ZN1 参与的快速固态生物脱毒、纤维素酶解糖化、发酵、产物回收等工段所构成，分别在原料结构的破坏、木质纤维素颗粒尺寸的缩小、抑制效应的解除、生物基产品转化的过渡以及主产物的提纯等方面起到了极其重要的作用。总的来说，干法生物炼制过程将“干法”作为自身的特色，在木质纤维素生物炼制领域具

有很大的应用潜力。以纤维素乙醇干法生物炼制为例，从起始的木质纤维素原料到预处理后的原料（固含量 50%左右），再到高固含量（50%左右）的生物脱毒过程，然后形成高固含量（30%左右）的乙醇 SSCF 体系，此过程没有任何废水的产生，纤维素乙醇的发酵指标也相当可观，因而有利于乙醇产品的回收。

## 1.6 木质纤维素原料长期储存及生物炼制供应

### 1.6.1 木质纤维素原料长期储存的重要性

传统化石能源正日渐衰竭，大规模利用廉价且丰富的木质纤维素原料用于生物炼制生产乙醇等可再生能源从而替代传统化石能源的趋势已经不言而喻。在该背景下要着力解决的基础问题正是原料的长期储存问题。然而，一般木质纤维素原料的收集周期为一年，由此势必要考虑原料长期储存的时间，并使之尽量达到甚至超过木质纤维素原料的收集周期，这样才可摆脱实际生产时因原料对季节强烈的依赖性而出现供应链系统崩溃的困境，才能避免影响整个生物炼制工厂生产活动的正常进行。需要重点关注的是在木质纤维素原料的长期储存期间内必须要确保全过程不发生霉变及干物质损失等情况。只有这样的长期储存方式才是具有实际适用价值的，才会不影响后续的生物炼制应用。

近些年来，已经有部分纤维素乙醇的商业化生物炼制工厂投入了生产<sup>[64]</sup>，但从规模来看，它们远远不及商业化石油炼制工厂的生产规模。毕竟大规模的商业纤维素乙醇工厂是非常需要成熟且全年的生物质原料储备的<sup>[65]</sup>，这样才能确保其拥有和石油炼制相近的生产能力。然而，这样的生物炼制工厂其原料供应在很大程度上受到了多种因素的共同制约，主要表现在强烈的季节依赖性、资源的零散分布、运输密度不高等方面<sup>[66]</sup>，最终能影响原料的供应成本。有研究显示农作物秸秆等生物质原料的供应成本约占纤维素乙醇总生产成本的 35%-50%，其中仅运输和储存成本就占据了供应成本的 50%-75%<sup>[67]</sup>。而运输成本在极大程度上会受到原料储存密度的影响，并且在一定范围内两者呈现近似负相关的关系。此外，木质纤维素原料经适当方法处理后然后进行长期储存，自身储存密度在得到提升的同时，会有效地节省原料储存地的空间，从而有效减少了储存成本的投入，进而方便进行集中化管理，也方便了后续的集中化运输。

### 1.6.2 木质纤维素原料的生物炼制供应

在大规模生物炼制工厂的木质纤维素原料的供应问题上，储存和运输一直是众多学者尤为关注的问题。为了使木质纤维素原料的供应脱离以上因素的制约，许多学者在原料的储存方式<sup>[44,68]</sup>、运输路线、供应模式等诸多方面进行了多次尝试和不懈努力。其中在原料供应模式的设计上对供应成本的降低有极大帮助的主要是分散式生物质原料供应法<sup>[69,70]</sup>。这种先在作物秸秆原料的产出地进行预处理然后再运输的方式十分有利于降低生物炼制原料的运输成本<sup>[65]</sup>。

## 1.7 重金属污染生物质的处理

### 1.7.1 重金属污染的来源及现状

近些年来采矿、工业三废排放、化肥农药大量使用以及污水灌溉等人类活动不仅给原本就十分有限的耕地带来重金属污染问题，还直接或间接地危害着人们的身心健康。这种重金属污染虽然是隔了很长时间才暴露出来，但其污染过程相对容易完成。然而，当这些人类活动将众多的重金属频繁带入土壤环境中之后，一旦形成这种重金属的污染，那么治理起来就会变得极其艰难。一方面，土壤中没有能降解重金属的微生物，或者说目前尚未发现这种微生物的存在，因此不加处理的话这种污染将始终存在原土壤环境内。唯一能扩散的点就是通过受污染点周围的其他生物。如种植于受污染土壤中的植物首先其根部会吸收一部分的重金属，然后逐渐地向茎、叶和（或）籽实部分转移，而以这种植物为食的动物将会在体内积累重金属，并且仍可能通过食物链而逐级附加至其他动物体内，因此土壤重金属污染会对处于食物链顶端的人类构成最大的威胁。然而，这种威胁早已来临。根据 2014 年发布的《全国土壤污染状况调查公报》，全国已有近 20% 的耕地受到不同程度的污染，耕地土壤环境质量堪忧<sup>[71]</sup>。我国是一个农业大国，同时也是一个人口大国，仅在 2014 年就达到如此程度的重金属污染必然是极其不利于农业生产和粮食供应的。此外，水稻是我国重要的粮食类作物，同时也是农作物秸秆资源的极大贡献者之一，当重金属污染波及到稻米安全时，其产生的稻秆污染程度将会更高，同等转移的情况下将更加具有产生二次污染的风险。因为一般的重金属污染植物，主要部位的重金属含量顺序是根 > 茎 > 籽实部分。所以，当了解到仅重金属污染的粮食年产量达到 1200 万吨<sup>[72]</sup>，就可以知晓我国总体的重金属污染生物质的产生量是非常巨大的。因为如果全部按水稻（草谷比 1:1）来算的话，在粮食作物类重金属污染生物质的产量上每年至少有 2400 万吨。因此，当前仅由于污染生物质原料的产生就已经对重金属污染形势造成了极为恶劣的影响，因此，当前亟需安全有效的手段对这类受重金属污染的生物质进行处理，以防止产生更加严重的二次污染。

### 1.7.2 重金属污染生物质的生物炼制处理

由于我国的重金属污染监测监管体系尚未健全，所以重金属污染现象时有发生，并由此产生了大量的重金属超标粮食类淀粉生物质及秸秆类木质纤维素类生物质。在禁止露天焚烧秸秆政策的出台之前，处于监管范围之外的受污染地区，所产生的重金属污染秸秆很大程度上在农田中被焚毁，虽然造成了大气污染，但从某种意义上限制了秸秆中重金属的进一步扩散。木质纤维素类生物质原料的处理难度非常大，所以在重金属污染的木质纤维素类生物质原料的处理上鲜有成功的报道，然而也有成功的案例。如 Cheng 等<sup>[73]</sup>尝试采用生物炼制的方法来处理积累重金属镉的小麦，成功地对这类重金属污染的秸秆生物质进行了乙醇发酵的能源化利用。这说明采取有效的生物炼制方法是能够达到安全处理重金属污染秸秆生物质的目的。但遗憾的是，该学者未提及对受污染小麦的谷物方面加以处理。一般受污染的淀粉类生物质通常被用于乙醇发酵过程，虽然得到了能源化利用，但却产生了大量的重金属酒糟，易被非法用于动物饲料生产，根本未做到封闭式处理，所以这样的处理方式极其不负责任。因此，从淀粉类生物质的生物炼制手段上来看，为切断重金属二次污染的产生路径，使用全封闭的生物炼制处理方法是非常有

必要的。由此可见，采用生物炼制方法来处理受重金属污染的生物质原料能够获得成功在很大程度上取决于所用的生物炼制方法能够做到对重金属污染生物质的全封闭处理。

### 1.8 本论文的主要研究内容

干酸预处理技术发展至今已经成为了一种成熟且优良的预处理技术。它是干法生物炼制过程的核心步骤，可以为木质纤维素中多糖组分的有效化利用创造有利条件。该技术具有相当的潜力，可以对原始的木质纤维素原料进行一定的改造，从而赋予其许多有益的性质。因此，利用干酸预处理技术的优点并且围绕着其对原料性质的重塑来展开研究，将极有可能发现该技术的在自身领域或其他相关领域的实际应用价值。总的来说，本论文的第一部分主要是基于干酸预处理技术对木质纤维素原料抗霉变性能的提高，尝试进行多种预处理原料在中国多种地域环境下的长期储存工作，并计划通过长期的跟踪测试来准确把握预处理原料在储存期间所发生的变化。最终从木质纤维素原料供应的角度为商业纤维素乙醇生物炼制工厂的常年稳定运行作出一定的贡献。本论文的第二部分主要是利用干酸预处理技术乃至干法生物炼制过程可以全封闭处理木质纤维素原料而不产生任何废水的特点将其拓展至重金属污染水稻生物质的处理上，同时，还出于防止单独利用稻米生物质而产生重金属二次污染的目的，又在干法生物炼制过程的基础上尝试了全生物质炼制的方法，从而在妥善处理和利用污染生物质的基础上为后续重金属的完全回收创造有利条件。

## 第 2 章 生物炼制过程广地域多品种木质纤维素原料的长期储存

### 2.1 引言

生物质原料的长期储存问题在生物炼制链中的重要性不言而喻。然而，尽管长期以来众多学者围绕该方向进行了许多的努力和尝试<sup>[74-77]</sup>，但该问题仍未得到很好的解决。对于传统的木质纤维素类生物质原料——农作物秸秆而言，其产出周期短且产量丰富，因而颇受生物炼制方向相关研究学者们的亲睐。据文献报道，对农作物秸秆这类传统生物质原料进行长期储存时所用到的较为常见的的储存方式有湿储和干储两种方式。湿储法即饲料青贮<sup>[75]</sup>。该法储存条件严格，过程长期进行的话所储存的生物质本身还会因活菌生长发生可溶性糖等成分的丢失，而且霉变风险很大，因而不适合生物炼制应用。干储秸秆自然干燥周期长<sup>[78]</sup>，紧密堆积的原料其内部温度往往很高，因而染菌情况也很难避免，且储存过程中容易引发火灾等事故。因此，对于大规模生产生物燃料等可再生能源的生物炼制工厂中的原料供应链而言，生物质原料的霉变是制约其储存时间长短的关键所在。除了储存时间之外，生物质原料的储存密度也是影响运输成本的重要因素，高密度化的生物质原料才能有效降低运输成本。

为了解决秸秆原料的储存周期和储存密度的问题，尝试了一种新的储存方式，即：将秸秆原料在收集站点进行预处理后再长期储存。然而，选择何种预处理方法融入这种新的储存方式是非常重要的。常规的预处理方法会产生大量的废水或伴随着很高的能耗<sup>[28,29,79,80]</sup>，从而使得这样的预处理操作在靠近农田的秸秆收集站点无法进行，毕竟农村地区的工艺水供应体系和废水处理系统薄弱，且蒸汽和电力供给不足。而干酸预处理技术则是一种非常适合于上述分散预处理和长期储存的技术<sup>[39-41]</sup>。首先，该预处理法的预处理效果很好，不仅可以有效地破坏木质纤维素的结构从而使得纤维素酶对秸秆中的纤维素的接触性大大提高，而且加以配合本实验室特定的生物脱毒手段再进行后续的乙醇同步糖化共发酵过程就可以实现非常高的秸秆转化效率，由此获得的纤维素乙醇非常接近玉米乙醇的指标<sup>[42]</sup>。其次，干酸预处理法没有常规预处理法的大量废水问题，也没有像氨纤维爆破预处理法那样对设备提出很高的要求<sup>[80]</sup>，更没有后续进行氨或其他化学试剂回收的高能耗问题<sup>[80-82]</sup>，而仅仅是利用廉价的极少量新鲜水、酸催化剂、蒸汽和电<sup>[39,83,84]</sup>，因而该法具有低能耗、低成本的优点。再次，干酸预处理原料中还有较高含量的抑制物和酸催化剂，物料内部处在 pH 为 2-3 的酸性环境，含水量也较高（50%左右）且伴有较高含量抑制物的存在<sup>[44,48,49]</sup>，因而原料霉变和可燃性能大大降低。最后，预处理的作用使秸秆的木质纤维素结构遭到破坏，秸秆被强烈压缩，堆积密度大大提高。

尽管干酸预处理技术赋予了原始秸秆原料一些有利的特性，比如一定程度的抗霉变能力和原料内部结构变化后自身密度的大幅提高等等，然而该技术的应用能否实现秸秆原料的长期储存则仍需通过相关的阶段性测试研究进行跟踪验证。若是可以实现预处理后秸秆物料的固态稳定长期储存，便可方便秸秆原料的分散预处理，继而能够有效减少

木质纤维素原料的收集半径,降低运输成本<sup>[65]</sup>。为了验证此举能否达到我们既定的目标,本研究全面展开对中国主要农作物秸秆的种类和分布特点、供选择的储存地域以及储存时间的广泛研究。首先,在秸秆类型的选择上,我们考虑到:玉米、小麦和水稻是中国的主流农作物;相应地,在全国范围内可收集到的玉米秸秆(CS)、小麦秸秆(WS)和水稻秸秆(RS)总产量也占据着全国主要秸秆可收集资源总量的很大一部分,有文献报道这一比例高达 80%以上<sup>[85]</sup>;并且延续至今,每年这三种农作物的秸秆总产量仍然占据着相当大的比重。因此我们决定选取上述三种常见的农作物秸秆进行长期储存测试研究。其次,我们需要让同批进行储存的同种预处理物料处在较大的地域跨度上,以此研究不同的天气情况对原料的长期储存有无影响,这也是出于对未来大规模多地域储存利用做出考虑,从而保证本研究具有一定的代表意义。此外,还分析了以上三种农作物各自的种植分布特点,我们发现:玉米主要分布在中国的东北和西南方向的种植区带上,而小麦和水稻则分别集中种植于黄河和长江流域附近。再结合这三种农作物秸秆在中国大陆各省及直辖市的分布密度高低做出综合考量之后,我们决定在这三种农作物的集中种植区域中各自选出 3 个用于预处理后秸秆长期储存的具体省份或直辖市,并将其省会城市或直辖市本身作为具体的储存城市。最后,为保证大型生物炼制工厂的充足原料供应,我们有必要进行长达一年的储存实验研究,因为一般木质纤维素原料的收集周期是一年。基于以上的广泛研究,再继续探究不同预处理后的秸秆原料在长达一年的储存周期中以及不同地域环境下的储存状况,主要包括预处理后秸秆原料的组成、酶解得率及乙醇发酵性能等等,从而为今后木质纤维素原料大规模储存利用赋予一定的借鉴意义。

## 2.2 材料与方法

### 2.2.1 实验原料与酶制剂

我们选取了三种在中国最常见的农作物秸秆(玉米秸秆、小麦秸秆和水稻秸秆)作为基本的实验材料以用于后续研究工作的全面展开。这三种农作物秸秆均收获于 2017 年的秋季,其中玉米秸秆产自中国的河南省南阳市,而小麦秸秆和水稻秸秆则分别产自中国的山东省济宁市和江苏省宿迁市。由于实验室的处理条件有限,所购买的三批原始秸秆在寄往本实验室之前均在当地进行了简单的处理,包括:将收获后的秸秆进行短期的晾晒(晾晒后秸秆的固含量在 90%左右),以及将整棵秸秆简单地粉碎成多段。为保持秸秆的原始特性,所购秸秆在寄达实验室之后不经除尘处理,而是分别使用粉碎机将其粉碎至圆直径为 10 mm 后装入透明塑料袋中以便进行常温存放。分别取样并按照美国国家可再生能源实验室(NREL)对木质纤维素原料的组分测定方法<sup>[86,87]</sup>和灰分测定方法<sup>[88]</sup>来测定这些秸秆的具体组成,分析得知,该批河南南阳的玉米秸秆含有 35.40%的纤维素、23.62%的半纤维素、18.16%的木质素和 7.38%的灰分;这批小麦秸秆含有 35.28%的纤维素、23.19%的半纤维素、16.36%的木质素和 9.73%的灰分;而这批宿迁的稻秆则含有 36.83%的纤维素、20.78%的半纤维素、14.19%的木质素和 10.53%的灰分。

秸秆在酶解糖化时所使用的纤维素酶 Cellic CTec 2.0 购买于诺维信(中国)生物技

术有限公司。纤维素酶使用之前均存放在实验室的 4 °C 冰箱内进行妥善冷藏。根据目前常用的 NREL 的滤纸酶活测定方法 (LAP-006)，测定结果显示该品种纤维素酶的滤纸酶活为 203 FPU/mL；再按照当前测定蛋白含量广泛使用的 Brandford 法对该纤维素酶的酶蛋白含量进行测定，结果显示 Cellic CTec 2.0 的酶蛋白含量为 87.31 mg/g。使用时纤维素酶本质上按照 10 mg 酶蛋白/g 纤维素的剂量添加进入所需的反应体系当中。但为量取方便，在计算具体酶用量时通常换算为体积单位毫升再加以取用。

### 2.2.2 菌种和培养基

此前本实验室有关科研人员偶然从一批霉变的预处理后秸秆中筛选得到一种名为树脂枝胞霉的煤油真菌——*Amorphotheca resinae* ZN1 (CGMCC 7452)<sup>[48]</sup>。尽管该菌的某些代谢路径仍不清晰，但现已证实该菌可以优先且高效地降解预处理后秸秆中的众多抑制物<sup>[62]</sup>，如呋喃类抑制物（糠醛 (furfural)，5-羟甲基糠醛 (5-HMF) 等）、芳香醛类抑制物（丁香醛、香草醛等）和有机酸类抑制物（甲酸，乙酰丙酸等）等，然后再利用秸秆中的可溶性单糖。经过大量的生物脱毒实验测试，脱离合成培养基或水解液等水相体系后该霉菌还可以在高固含量（50%左右）的木质纤维素原料体系中实现很好的脱毒效果。此外，相对于静态不通风情况下的脱毒过程，在适度通风的情况下（例如通气量保持 1 vvm），快速脱毒菌株 *Amorphotheca resinae* ZN1 还能进一步大大缩短静态固态生物脱毒过程所需的时间。因此，基于此脱毒菌的种种优点，干酸预处理后的秸秆均在合适温度和保持通风的情况借助 *A. resinae* ZN1 实现自身众多抑制物成分的有效降解，从而避免原先存留的大量抑制物对后期酶解和发酵体系造成不良的干扰。

纤维素乙醇的同步糖化共发酵阶段采用的菌株均是同一种酿酒酵母——*Saccharomyces cerevisiae* XH7，该菌可以对秸秆中的葡萄糖和木糖进行综合利用<sup>[89,90]</sup>。只是在发酵初期由于葡萄糖效应显著才优先利用发酵反应体系中的葡萄糖，待葡萄糖被消耗至很低的水平时对木糖的利用便变得快速起来。进行发酵实验前需要将保有酿酒酵母菌种的冻存管从-80 °C 冰箱里取出并加以活化，再将两级驯化后得到的三级种子液作为最终的乙醇发酵种子液。

培养基：

(1) 一级种子培养基：20 g/L 葡萄糖（分析纯），20 g/L 蛋白胨（分析纯），10 g/L 酵母提取物；

(2) 二级种子培养基：5% (w/w) 快速生物脱毒后的秸秆原料（所用脱毒原料类型取决于发酵物料类型），2 g/L 磷酸二氢钾（分析纯），2 g/L 硫酸铵（分析纯），1 g/L 硫酸镁（分析纯），10 g/L 酵母提取物，纤维素酶 Cellic CTec 2.0 添加标准：10 mg 蛋白/g 纤维素；

(3) 三级种子培养基：10% (w/w) 快速固态生物脱毒后秸秆原料（所用脱毒原料类型取决于发酵物料类型），2 g/L 磷酸二氢钾（分析纯），2 g/L 硫酸铵（分析纯），1 g/L 硫酸镁（分析纯），10 g/L 酵母提取物，纤维素酶 Cellic CTec 2.0 添加标准：10 mg 蛋白/g 纤维素；

(4) 同步糖化共发酵阶段的营养盐添加量: 2 g/L 磷酸二氢钾 (分析纯), 2 g/L 硫酸铵 (分析纯), 1 g/L 硫酸镁 (分析纯), 10 g/L 酵母提取物。

盛装种子培养基的三角瓶经灭菌处理后在超净台内进行接种和转接, 完后使用无菌的 8 层纱布封住瓶口, 并小心地置于 30 °C、200 rpm 的气浴摇床中进行培养

初步活化的酿酒酵母一级种子只是初步适应了合成培养基体系, 随后在二级和三级种子培养基 (加入脱毒物料的低固含量木质纤维素体系) 中逐步驯化以适应最终高固含量的发酵体系。二、三级培养基是以脱毒后的秸秆物料为初始唯一碳源, 所用秸秆的类型与发酵所用的秸秆类型保持一致。脱毒物料本身含有预处理后秸秆的半纤维素转化的木单糖, 只是这点糖远远满足不了酵母种子的大量增殖, 必须再添加适量的纤维素酶将物料分解为酵母可迅速利用的单糖——葡萄糖才可提供充足的碳源。此举在种子培养过程中避免了使用纯品葡萄糖带来的高昂成本<sup>[91]</sup>。

### 2.2.3 农作物秸秆分布密度的计算方法

农作物秸秆在中国大陆各省或直辖市中的分布密度依照公式 2-1 进行计算, 其中需要用到的各行政区总面积数据以及农作物的谷物在某行政区的年产量原始数据均来自于中国国家统计局 (网址: [www.stats.gov.cn](http://www.stats.gov.cn)) 2017 年公布的数据。

$$\rho = M/S = (G \times R)/S \quad (2-1)$$

$\rho$ : 农作物秸秆的分布密度, ton/km<sup>2</sup>;

M: 该种秸秆在某行政区的年产量, ton;

S: 该行政区总面积, km<sup>2</sup>;

G: 该种农作物的谷物在某行政区的年产量, ton;

R: 该种农作物的草谷比, 常数。(根据 Qiu 等<sup>[18]</sup>的研究, CS、WS、RS 的草谷比分别为 1.25, 0.95 和 1.30)

### 2.2.4 干酸预处理

为了保证这三种农作物秸秆原料的原始特性, 原料未作任何除尘处理, 仅将其粉碎至圆直径为 10 mm 的尺寸。由于秸秆原料种类不一, 性质也必然有所不同, 因此在进行干酸预处理前, 采用基准 pH 调节法对预处理过程中所需的硫酸用量进行微调, 以排除秸秆原料中灰分对预处理效率和后续乙醇转化效率的影响<sup>[83]</sup>。玉米秸秆、稻秆、麦秆的硫酸用量分别为原料干重的 3.6% (w/w), 4.3% (w/w) 和 4.0% (w/w)。3.6% (w/w) 的含义是: 每 100 g 干重的秸秆原料所需的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (质量分数 100%) 质量为 3.6 g, 余下以此类推。此外, 预处理反应器内干秸秆和液体部分 (秸秆内的水和外源添加的硫酸溶液) 的质量比即固液比为 2:1, 且每次预处理使用干重 1200 g 左右的秸秆, 以保证容积为 20 L 的反应器其内部的原料填充率接近 100%, 再运行螺带搅拌装置便可使得传质、传热更加均匀, 从而有助于减少预处理过程所需的蒸汽用量<sup>[39,43]</sup>。除了酸用量和秸秆用量之外, 具体的操作参数也很重要, 分别是: 预处理实际维持温度为 175 °C, 反应停留时间是 5 min, 螺带搅拌桨搅拌转速为 50 rpm, 初始蒸汽压力是 1.6 MPa<sup>[40,41]</sup>。

### 2.2.5 预处理后秸秆原料的组分测定方法

本研究中涉及到测定预处理后秸秆原料中纤维素 (cellulose) 和半纤维素 (hemicellulose) 含量的均依据 NREL 的标准方法——两步酸水解法 (TP-510-42618) 进行标准化测定。操作如下: 称取 5 g 左右的预处理后秸秆放入锥形瓶中然后加入定量的去离子水 (dH<sub>2</sub>O), 放入摇床充分混合 3 h, 此时总体系体积接近 50 mL。随后进行抽滤, 过程中用 500 mL 的 dH<sub>2</sub>O 彻底清洗以除去预后秸秆中的可溶性糖, 再将抽滤结束后带有水不溶性固体的滤饼放入 105 °C 烘箱中烘干 12 h 以上至恒重, 通过差重法测定物料中的水不溶性固体含量 (water-insoluble solid content)。之后趁热将滤纸上的不溶性固体磨碎为粉末, 混合均匀后称取 100 mg 置于洁净的压力试管中, 滴入 1 mL 72% 的硫酸溶液, 将试管放入 30 °C 的恒温水浴锅中并用玻璃棒间歇搅拌, 反应时间为 1 h, 此为第一步酸解。1 h 过后再加入 dH<sub>2</sub>O 将总反应体系稀释至 29 mL, 此时体系中硫酸的质量分数是 4%。随后将压力试管的试管塞部分用纱布在外侧包扎好, 上下充分颠倒混匀后置于灭菌锅中于 121 °C 下高温反应 1 h, 此视为第二步酸解。反应结束后, 取出压力试管, 用碳酸钙 (分析纯) 粉末加以中和至不产生气泡, 然后混匀取样、离心后取上清, 之后用高效液相色谱 (HPLC) 测定该样品中的葡萄糖和木糖含量, 再加以计算, 从而可以获知秸秆原料中的纤维素和半纤维素含量。

此外, 涉及到测定预处理后秸秆原料中葡寡糖 (glu-oligomers) 和木寡糖 (xylo-oligomers) 含量均依据 NREL 的标准方法——两步酸水解法 (TP-510-42623) 进行标准化测定。具体操作如下: 首先取 2 个洁净且干燥的 250 mL 三角瓶和橡胶塞待用, 再从袋中多点称取预处理后的秸秆原料 5 g, 同时加入 50 g 左右的 dH<sub>2</sub>O, 然后塞紧橡胶塞后立刻放入气浴摇床进行充分摇晃 (时间 4 h 以上), 摇床的具体参数设置为 30 °C、150 rpm。随后使用真空泵抽滤得到淡黄色的滤液, 收集一小部分利用高效液相色谱 (HPLC) 测定其中的可溶性组分 (可溶性单糖、抑制物等) 含量。另外用移液枪取出 5 mL 该滤液打入干净的压力试管中, 然后加入 1 mL 72% 质量分数的硫酸溶液, 再用 dH<sub>2</sub>O 稀释至 29 mL, 使得整个体系最终的硫酸浓度达到 4% (质量分数), 随后将压力试管的试管塞部分用纱布在外侧包扎好, 上下充分颠倒混匀后置于灭菌锅中于 121 °C 下高温反应 1 h。反应结束后, 取出压力试管后, 用碳酸钙 (分析纯) 粉末加以中和至不产生气泡, 然后混匀取样、离心后取上清。为避免毁坏色谱柱, 所有样品均需过滤后再使用 HPLC 测定葡萄糖和木糖含量。两部酸解法将预后秸秆中的寡糖完全分解为单糖, 因此两部酸解反应后所测得的葡萄糖和木糖的含量与反应前液体中这两种单糖的差值则分别为葡寡糖和木寡糖的含量。

### 2.2.6 预处理后秸秆原料的长期储存

首先在本实验室 (于中国上海) 采用干酸预处理技术来统一制备大批新鲜的预处理后玉米秸秆、小麦秸秆和水稻秸秆, 随后分别用一次性的塑料袋 (50 cm\*60 cm、单面厚度 0.025 mm、材质是聚乙烯) 进行分装、手工扎口 (无需热封), 且每袋物料的质量控制在两千克左右。预处理后的玉米秸秆 (PCS), 预处理后的小麦秸秆 (PWS) 和预处理后的水稻秸秆 (PRS) 最初的干重占比分别为 43.85%, 45.72% 和 38.83%, 而其

最初的含水量 (moisture content, 简称 Mc) 则分别为 56.15%, 54.28% 和 61.17%)。然后分别将多包已经包装完好的预处理物料通过邮寄的方式寄往选定好的长期储存城市, 寄达后由相关人员接收并立刻开始妥善储存。

新鲜预处理后的秸秆在本实验室进行长期储存的环境如图 2.1 所示。而在其他城市进行储存时虽然具体的储存环境彼此之间存在着差异, 但也具备共同特点。例如: 物料在寄达已选定的城市后所进行储存放置的地点均为开放阳台处 (阳台本身可挡雨雪), 这样的地点具备正常的空气流通和短时的阳光照射。我们并未对物料做其他的遮挡、包装等防护。在多个城市进行长期储存的时间段具体为 2018.4.1-2019.3.31, 共 365 天。该期间内每隔三个月 (具体寄回的起始日期分别为 2018 年 7 月 1 日、2018 年 10 月 1 日、2019 年 1 月 1 日和 2019 年 3 月 31 日) 各储存地的当地有关人员通过快递 (快递时间 2-3 天) 寄回两包原料 (各重 2kg 左右) 至本实验室以便进行进一步的测试研究, 范围包括寄回物料的理化性质 (如含水量, 堆积密度, 振实密度和组分等)、纤维素酶水解得率以及各种物料的乙醇发酵性能。而最初留有的一部分新鲜预处理后的秸秆原料 (储存 0 天的物料) 则作为本实验的空白对照, 并且对照组实验在制备预处理秸秆原料完成后应当快速地展开, 以此来尽量保证对照组秸秆原料几乎未进行储存。



图 2.1 预处理后秸秆的长期储存环境 (上海)

Fig. 2.1 Long-term storage environment of pretreated straw (Shanghai city)

### 2.2.7 预处理后秸秆储存期间主要物理性质的测定

在物理性质方面, 长期储存期间主要测定预处理后秸秆的含水量、堆积密度和振实密度等参数。首先是含水量的测定, 具体测定过程是: 打开装有寄回的预处理后秸秆的包装袋, 从中多处取样并放入洁净干燥的玻璃平板 (平板质量记作  $m$ ) 中, 此时平板和物料的总质量记作  $M_1$ ; 然后送至  $105\text{ }^\circ\text{C}$  烘箱中烘干  $12\text{ h}$ , 烘干过后平板和物料的总质量记作  $M_2$ ; 最后通过差重法计算出物料中的含水量  $Mc$ , 即  $Mc=(M_1-M_2)/(M_1-m)*100\%$ 。随后在测量所取秸秆样品的堆积密度时使用 Hoover 等测量方法<sup>[92]</sup>。简单来说就是向长

方体容器内部小心缓慢添加待测的预后秸秆至铺满整个容器的内部，再用直尺水平拂去顶部多余的物料，以此时容器所盛有物料的质量除以该容器的容积即可以得知其堆积密度的大小。在实际测量过程中所用到的不锈钢长方体带盖容器容积为  $437 \text{ cm}^3$ ，质量为  $72 \text{ g}$ 。堆积密度是按照秸秆干重的量来进行计算的。此外，还需测定物料的振实密度，具体方法是：在堆积密度测定环节完成之后，仍保持容器内部原料盛满的状态并盖紧盖子，随后将该容器在离水平地面  $15 \text{ cm}$  高度处作自由落体  $25$  次，视为多次振实，测定此状态下的振实原料所占有的体积，以此时原料的振实体积再加以计算预处理后秸秆原料的振实密度。

### 2.2.8 快速固态生物脱毒

He 等<sup>[49]</sup>在使用树脂枝孢霉 *A. resiniae* ZN1 对干酸预处理后的秸秆进行生物脱毒实验时发现：向静态脱毒的脱毒罐内持续以一定通气量通入空气会加速待脱毒秸秆内众多抑制物的生物降解或转化。比如原来一般需要静态脱毒  $96 \text{ h}$  才可脱除绝大多数抑制物，现在通过快速脱毒仅需  $36 \text{ h}$  便可达到类似的脱毒效果。脱毒时间大大缩短的同时还可尽可能地保留可发酵糖。因此，对于具备脱毒工段的大规模生物炼制工厂来说，如若使用快速生物脱毒法便可明显提高该工段的运作效率，继而促进工厂的生产。

实验中所有需要进行乙醇发酵的预处理后秸秆均通过上述快速脱毒过程完成众多抑制物的生物脱除。该过程有以下四个操作注意事项。第一，由于所使用的脱毒菌种的合适生长 pH 为  $5\sim 6$ ，而待脱毒秸秆原料的 pH 在  $2$  左右，所以在进行上罐脱毒之前，需要对物料进行 pH 的调整。通常使用比较温和的碱液——质量分数  $20\%$  的  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  溶液。中和过程所用碱液的量根据滴定实验来确定。简单来说：准确称取  $10 \text{ g}$  预处理后的物料和  $100 \text{ g}$  去离子水放入洁净的三角瓶内，充分混合后插入 pH 计（准确校验过），然后一边轻轻摇晃三角瓶一边添加新鲜配置的  $20\% \text{ Ca}(\text{OH})_2$  溶液直至 pH 计的读数在  $5\sim 6$  之间，记录已添加的碱液体积再加以换算即可。第二，物料 pH 调整之后，开始以  $10\%$  的接种量接入脱毒种子（*A. resiniae* ZN1）并用手混合均匀。脱毒种子是用未作 pH 调整且含有抑制物的预处理后秸秆原料进行培养的，培养数天后物料中便含有大量活力旺盛的树脂枝孢霉孢子，种子物料整体呈现黄绿色。第三，开启脱毒罐的搅拌装置，开始从加料口缓慢添加混有脱毒种子的物料，完毕后关闭搅拌装置拧紧盖子开始按  $0.8 \text{ vvm}$  的通气量通入空气，随后开启包裹脱毒罐的保温装置并将温度设置为  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 。第四，当预处理物料中的糠醛抑制物被完全脱除后即可停止脱毒并立刻下罐，通常脱毒时间  $24\sim 48 \text{ h}$ 。另外，从加料口上方闻脱毒物料的气味也可辅助判断脱毒是否完成，因为脱毒完全的物料气味比较清新，而未脱毒完全的物料气味比较浑浊难闻。最后，由于 *A. resiniae* ZN1 会优先消耗物料中的抑制物，因而只要对脱毒终点把握准确，及时下罐，那么预处理物料在快速固态脱毒过程前后关于可发酵糖的组分部分就不会有很大差异。

### 2.2.9 酶水解评价

本研究中凡是涉及到测定预处理后秸秆原料的酶水解得率实验的均参考了 NREL 的标准方法——酶水解评价标准实验方法（LAP-009）进行标准化测定。具体操作如下：

第一步, 将待测的储存后物料(未经固态脱毒的预处理秸秆)混合均匀, 再从中多点取样, 准确称取干重为 0.5 g 的物料(具体称取量根据其固含量加以换算)放入洁净的三角瓶内。第二步, 准确向三角瓶中加入 10 g 的去离子水并作轻度混合, 因为实验方法规定的纤维素酶解反应体系的 pH 为 4.8, 所以随后需要用成功校验过的 pH 计配合调节此混合液的 pH 值, pH 调节液是提前配制好的 5 mol/L 氢氧化钠溶液。第三步, 用移液枪加入一定量的抗生素(80  $\mu$ L 四环素溶液即可), 因为此反应体系需要严格排除杂菌的干扰, 防止杂菌因消耗酶解产生的葡萄糖从而给酶解得率的测定带来不利影响。第四步, 加入一定量的柠檬酸缓冲液(Citrate Buffer)使反应体系的固含量降至方法规定的为 5% (w/w), 所用缓冲液的物质的量浓度为 0.1 mol/L, pH 值为 4.8。第五步, 加入一定量的已经在 50  $^{\circ}$ C 预热一段时间的液体纤维素酶 Cellic CTec 2.0, 酶用量按照 20 FPU/g 干秸秆的用量进行添加。第六步, 50  $^{\circ}$ C 下恒温反应 72 h。将三角瓶瓶口塞紧, 然后小心放入恒温水浴摇床中, 再将水浴摇床的参数设置为恒温 50  $^{\circ}$ C, 速度 150 rpm。第七步, 酶解 72 h 后取出液体, 离心取上清液, 经稀释过滤后用 HPLC 测定原液的葡萄糖浓度。

#### 2.2.10 乙醇 SSCF

长期储存后的预处理秸秆的发酵潜力是通过乙醇同步糖化共发酵(SSCF)实验来衡量的。乙醇 SSCF 依靠本实验室较为完备的发酵系统得以进行, 该系统主要包括 5 L 的螺带搅拌浆生物发酵罐, 准确的温度监测控制系统, 敏感的 pH 监测控制系统, 可控的电机搅拌及消泡装置等等。在正式上罐之前, 还需要进行周密的准备工作, 主要有以下几步。第一, 发酵原料的准备。根据 30% (w/w) 的上罐体系固含量来称取脱毒后的已储存预处理物料, 并作灭菌处理。之所以灭菌是因为所做的是研究性的实验, 需要控制众多的变量, 其中杂菌干扰一项则是非常需要规避的。第二, 发酵种子液的制备以及发酵营养盐的配制。种子液是超低温冰箱里的酿酒酵母 XH7 菌种经历一级活化和两级驯化后培养得来的, 而营养盐配制具体可参照 2.2.2 中的有关配比。第三, 脱毒物料的预糖化。将一定量的无菌水倒入灭菌后的发酵罐中, 然后以 10 mg 酶蛋白/g 纤维素的剂量加入适应发酵体系的纤维素酶 Cellic CTec 2.0, 随后开启温控系统和搅拌装置, 在 50  $^{\circ}$ C, 200 rpm 的条件下对纤维素酶水混合液进行预热及混合, 以便达到活化该酶活力的目的。随后分批加入待糖化的物料, 待加入的物料与酶液混合完全后即可开始计时, 控制预糖化时间为 12 h, 糖化体系 pH 为 4.8。需要注意的是, 在预糖化阶段要竭力避免一次性将物料全部加入发酵罐中, 因为这会引起搅拌系统故障和物料整体糖化效果不佳等问题。第四, 预糖化结束后, 降温至 30  $^{\circ}$ C, 接入培养好的活力旺盛的 *S. cerevisiae* XH7 种子液, 并控制发酵体系的 pH 为 5.0, 搅拌转速为 200 rpm。最后一步是取样分析阶段。发酵初期阶段每 12 h 取样, 中后期过程中每 24 h 取样。取出的样品在 12000  $\times$  g 条件下离心 5 min, 保留离心后的上清液, 再通过高效液相色谱测定其中各组分的含量。

乙醇发酵过程中如欲对发酵液内酿酒酵母的生长趋势进行把握的话可采用平板菌落计数法<sup>[93]</sup>。按照该计数法, *S. cerevisiae* XH7 的菌体活力可以用每毫升发酵液的菌落形成单位(colony-forming unit, 简称 CFU)进行表征。使用该方法需要注意的地方是: 尽

管只是 1 mL 的发酵液，其中蕴含的酿酒菌体量也是非常庞大的，因此每次均需使用无菌水进行适当倍数（一般  $10^5 \sim 10^7$  倍）的稀释，要保证稀释涂布再培养 2 天后 YPD 琼脂平板上的菌落数不能太多也不能过少，避免使人为测得的 CFU 与当时实际的菌体数存在太大误差。此外，对于高固含量纤维素乙醇发酵过程而言，发酵液中的酵母细胞量通常是经历一个先快速递增再短期稳定最后持续衰减的过程，因此每一测定阶段的稀释倍数均需做出合理调整。

### 2.2.11 乙醇得率的计算

涉及到乙醇得率的计算时参考了 Zhang 等<sup>[94]</sup>在木质纤维素原料的乙醇发酵体系中所总结出的得率计算方法。计算公式如下：

Ethanol yield(%)=

$$\frac{[Ethanol] \times W}{976.9 - 0.804 \times [Ethanol]} \times \frac{1}{0.511 \times ([Cellulose] \times 1.111 + [Xylose]) \times [Solid] \times M} \times 100\% \quad (2-1)$$

该公式的相关注释如下：

[Ethanol]: HPLC 测定的发酵 96 h 时乙醇浓度，g/L；

W: 发酵罐内的所有液体质量之和，g；

[Cellulose]: 上罐所用预处理后秸秆的纤维素含量，g/g；

[Xylose]: 上罐所用预处理后秸秆的木单糖含量，g/g；

[Soild]: 上罐前的脱毒物料的固含量，g/g；

976.9: 乙醇校正系数，是用来校正质量浓度与体积浓度之间的转化，g/L；

0.804: 是无量纲因子，用来计算发酵过程中水分的丢失；

0.511: 葡萄糖和木糖与乙醇的转化系数。酿酒酵母 XH7 均可利用这两种单糖；

1.111: cellulose 与 glucose 的转化系数，1 g 纤维素可水解生成 1.111 g 的葡萄糖。

### 2.2.12 HPLC 的定量检测分析

在组分测定，酶解评价以及乙醇发酵阶段均会产生大量的待测样品，这些液体样品中有关可溶性糖类（葡萄糖、木糖）、抑制物类（乙酸、糠醛和 5-HMF）和乙醇等可溶性组分含量的测定均采用 HPLC 进行定量地分析。该液相色谱所配备的检测器是由日本岛津（Shimadzu）所生产的示差折光检测器（型号 RID-10A）。此外系统内部还装有质量优良的 HPX-87H 型色谱分析柱（300 mm×7.8 mm）以及 LC-20AD 色谱泵。由于早先已经使用该色谱对上述这类可溶性组分进行定量分析并分别绘制了标准曲线，因此待测物质的浓度只有在标准曲线规定的浓度区间内，色谱的检测结果才可靠，所以待测样品很多时候需要通过适当比例的稀释才可满足此测定条件。所有待测样品稀释之后过柱之前均需通过洁净的滤头（内有孔径为 0.22 μm 的滤膜）进行过滤，以免堵塞色谱柱。需要注意使用该液相色谱进行检测时应严格遵循以下规定：运行时柱温需稳定维持在 65 °C，流动相是新鲜配制且已经过超声除泡的 5 mM 的硫酸溶液，流动相运行流速

为 0.6 mL/min, 最后一针进样量控制为 20  $\mu$ L 且需确保进样针内的样品没有气泡的存在。

## 2.3 结果与分析

### 2.3.1 储存原料的准备及储存前后的原料状况

使用实验室自主研发的容积为 20 L 的预处理反应器, 根据已经计算好的酸用量以及相关的操作参数分别对玉米秸秆、小麦秸秆和水稻秸秆进行干酸预处理操作。每次按照操作规程完成后从反应器底部的放料口放出物料, 并在室内稍作冷却后即用一次性的聚乙烯塑料袋装料扎口, 每袋装有两千克左右的预处理后秸秆原料。完成简单包装后集中快递寄往选定的城市进行为期一年的长期储存。储存的城市在储存期间每隔三个月再寄回一部分预处理后的秸秆原料至上海(实验室所在处), 小部分样品用于分析物性及组成变化, 剩下的样品作为酶水解评价和乙醇发酵性能评估的原料。

由于需要使用三种秸秆原料并在多个城市进行长期的储存实验, 因此在储存期间的预处理秸秆可能会受到自身因素和不同地域天气条件的影响。至于如何能够看出储存秸秆发生了一些最直观的变化, 最简单的方法就是直接观察储存物料的颜色、状态、形状是否发生了变化。于是我们分别对新鲜预处理后的秸秆和已经在不同城市长期储存一年的预处理后秸秆进行了随机取样并拍照观察。所拍照片如图 2.2 所示, 均已标注了秸秆原料的类型及储存地点等信息。初步观察后发现: 在选定城市储存一年后, 预处理秸秆原料并未发生任何染菌的情况。这预示着使用干酸预处理技术处理后的秸秆原料可以成功地解决一般储存方式难以克服的霉变难题。此外, 从物料的状态上来看, 储存前后的预处理玉米秸秆和小麦秸秆均始终保持着蓬松且干爽的状态; 而水稻秸秆在干酸预处理之后物料本身的含水量相对另外二者则偏高许多, 因此预处理之后本身就形成了一些较大的球团, 因而其状态与前面两种预处理物料的蓬松干爽不一致也是有理可循的。储存前后状态相似, 其相对于新鲜预处理后的秸秆并没有明显的差异。初步显示: 新鲜的干酸预处理秸秆借助了塑料袋这种简单的且可以隔绝外界干扰的材料可以实现基于物料表观上的长期稳定储存。

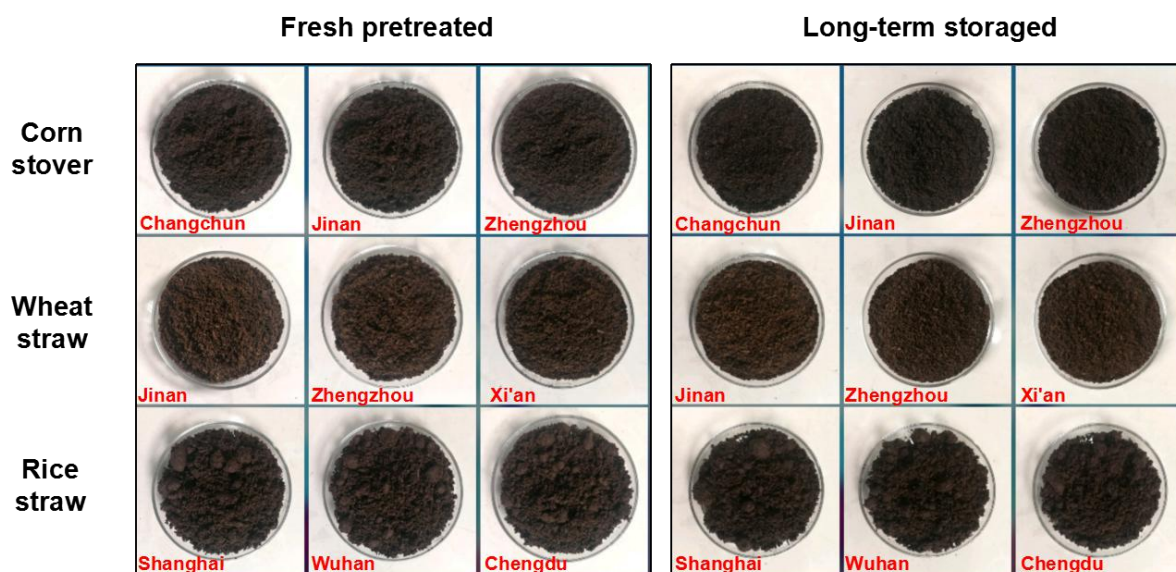


图 2.2 三种预处理后秸秆在中国不同城市进行储存的始末状态

Fig. 2.2 Status of three type of fresh pretreated and long-stored pretreated crop residues stored in different cities of China.

### 2.3.2 长期储存地域的选择及当地全年天气情况

在秸秆类型的选择上，我们考虑到在全国范围内可收集到的玉米秸秆、小麦秸秆和水稻秸秆总产量约占据全国主要秸秆可收集资源总量的 88%<sup>[85]</sup>，并且直至今日，玉秸、麦秆和稻秆仍旧是中国众多农作物秸秆中的主流秸秆，故而选取了这三种常见的农作物秸秆进行本次长期储存研究。其次，在预处理原料储存地域的选择上综合考虑了以上三种农作物秸秆在中国大陆各省或直辖市中的分布密度（单位： $\text{ton}/\text{km}^2$ ）以及农作物种植分布的特点。在分布密度的计算过程中所涉及到的各行政区总面积数据以及农作物的谷物在某行政区的年产量原始数据均来源于国家统计局（[www.stats.gov.cn](http://www.stats.gov.cn)）。

根据上述从国家统计局获取的有关基础数据，再结合这三种农作物的草谷比加以计算（具体计算公式同 2.2.3），最终制得如图 2.3 中所示的三幅分布密度数据地图。数据地图中显示的区块颜色越深则表示相应地区当年某种秸秆的分布密度越大。借助该图可以看出吉林、山东、河南等省是能够大量提供玉米秸秆的省份，同时山东、河南等省也可大量提供所需的小麦秸秆，而能大量提供稻秆的省份主要位于华东、华中地区。此外，这三种农作物在中国的种植特点分别为：玉米作物基本分布在中国东北方向至西南方向的种植区带上，而小麦和水稻则分别集中种植于黄河和长江流域附近。需要一提的是，陕西省大致可分为陕北、关中和陕南三大地区，而全省的小麦则非常集中地种植在关中地区，所以该省小麦秸秆的分布密度并不是以全省面积进行计算，而是以关中地区面积来近似计算的。然而在计算四川省水稻秸秆分布密度时参与计算的是整个四川省的行政区面积（48.14 万平方千米），该区位列全国行政区面积排名第五名。尽管四川的水稻年产量较大，但种植区域却遍布全省，因此其水稻种植并没有陕西省小麦的种植那样集中。故以一个数值一般大的水稻秸秆年产量除以一个数值较大的行政区面积所得到的只

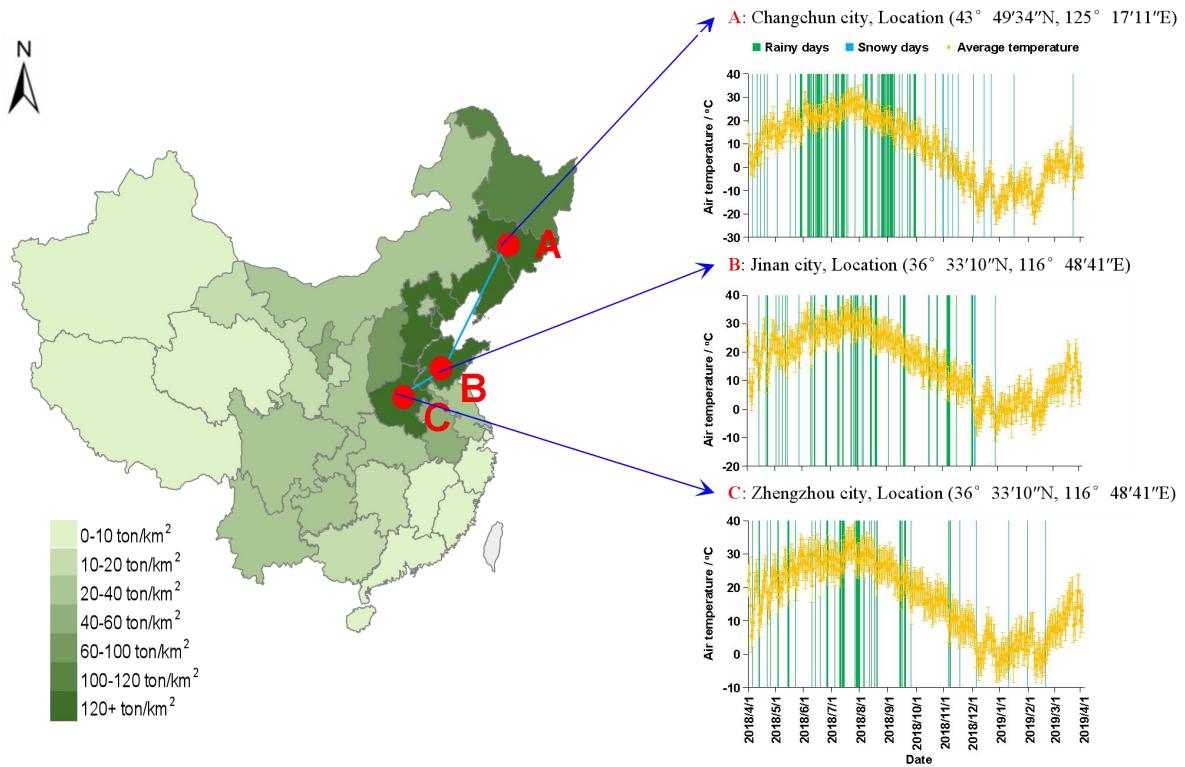
能是一个较小的水稻秸秆分布密度值，所以我们从图 1 第三幅地图中可以看到四川省区块的颜色并不是很深。此外，尽管四川省水稻秸秆分布密度相对其他地区较小，但其稻秆年产量非常大，因此如果选择四川省作为预处理后水稻秸秆长期储存的一个地点，那么在储存的地域空间上就实现了很大的跨越，从而更能了解在中国多个秸秆产出大区进行长期储存的状况。

基于以上论述，最终我们决定将新鲜预处理的玉米秸秆分别存放在吉林长春市（ $43^{\circ}49'34''\text{N}$ ， $125^{\circ}17'11''\text{E}$ ）、山东济南市（ $36^{\circ}33'10''\text{N}$ ， $116^{\circ}48'41''\text{E}$ ）和河南郑州市（ $34^{\circ}47'3''\text{N}$ ， $113^{\circ}39'56''\text{E}$ ）；将新鲜预处理的小麦秸秆则被分别存放在山东省的济南市（ $36^{\circ}33'10''\text{N}$ ， $116^{\circ}48'41''\text{E}$ ）、河南省郑州市（ $34^{\circ}47'3''\text{N}$ ， $113^{\circ}39'56''\text{E}$ ）和陕西省西安市（ $34^{\circ}14'48''\text{N}$ ， $108^{\circ}59'1''\text{E}$ ）；同时将 RS 分别存放在上海市（ $31^{\circ}8'40''\text{N}$ ， $121^{\circ}25'37''\text{E}$ ）、湖北省武汉市（ $30^{\circ}34'43''\text{N}$ ， $114^{\circ}20'1''\text{E}$ ）和四川省成都市（ $30^{\circ}33'32''\text{N}$ ， $104^{\circ}0'0''\text{E}$ ）。括号内的经纬度表示的是物料具体储存地点的地理坐标。

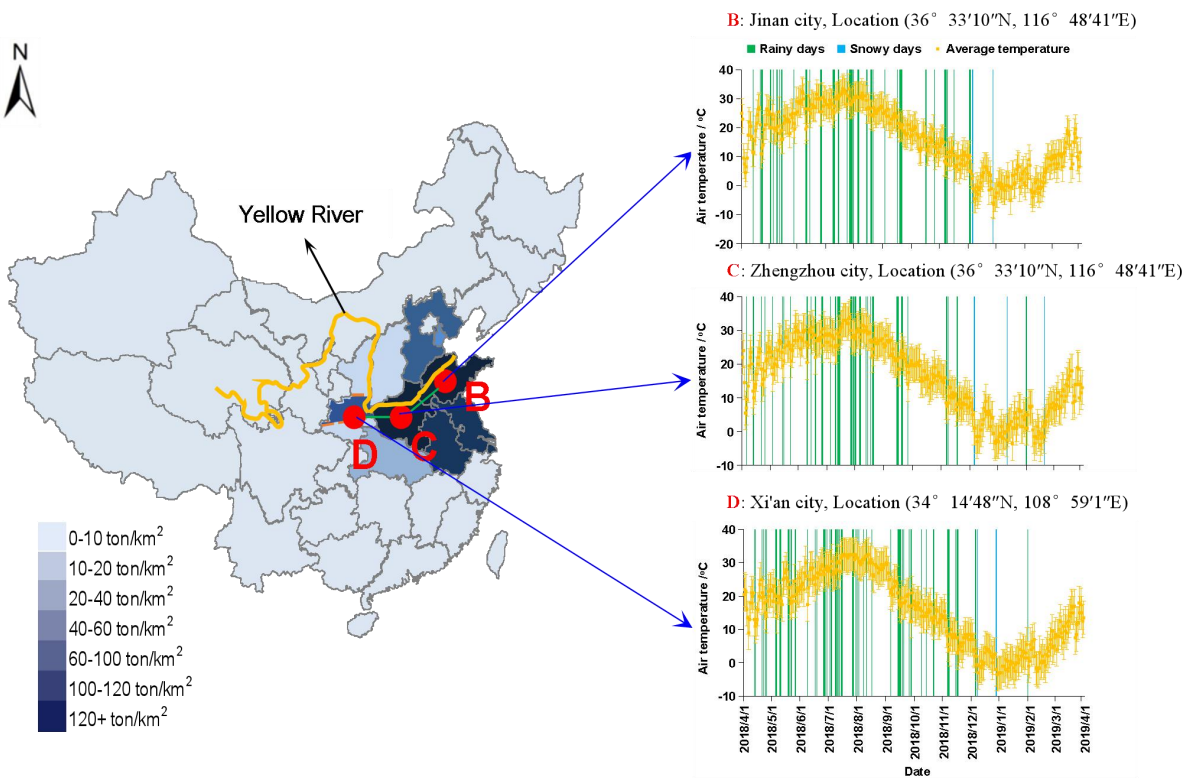
参与长期储存的城市不可避免地会出现连日降雨或持续高温的天气，因而这样的天气要素对于环境微生物的生长繁殖是特别有利的。然而经过干酸预处理后的秸秆原料在储存过程中却能够很好地克服这一类可能由于微生物增殖而出现的霉变问题。因为预处理秸秆长期密封于塑料袋中，且其内部是一个偏酸性、有较多抑制物存在的环境，所以可以很好的与外界不利因素相抗衡。

然而，降雨和高温等天气条件以及不同的储存地域是否会对储存中的预处理秸秆的自身性质造成影响却是不为人知的。因此，我们需要对上述所有参与储存工作的城市的全年基本天气情况进行详细的调查以方便后期对可能产生的实验结果给予一定的合理解释。由此，我们借助了中国国家气象局（[www.cma.gov.cn](http://www.cma.gov.cn)）的数据资源对上述选定的 7 个城市在长达一年的储存期间内（2018.4.1-2019.3.31）的基本天气情况进行了统计与分析，结果如图 2.3 中右侧的天气情况图所示。对比之下可以看出：上海、武汉、成都市的全年降水天数相对居多，而且常年比较潮湿，尤其是上海和武汉两个城市的降雨天数几乎占全年的 1/3；剩下的 4 个城市虽然其降雨天数只占全年的 10%~20%，但却相对集中在原料开始储存后的半年期间内（夏季），并且该期间气温较高，尤其是郑州和西安市的“高温天气”（气温 $\geq 35^{\circ}\text{C}$ 的天气）数相对最多。如果仅根据降雨和高温这两个因素来判断在不同城市储存原料的染菌风险高低的话，武汉市应该是相对最不适合进行长期储存的城市之一。然而，在进行长期储存的一年时间内每次从这些城市寄回上海的储存原料皆未观察到干物质损失和明显的染菌现象，说明经过干酸预处理后的秸秆原料可以实现长期储存的要求，但物料内部的理化性质及其应用潜力是否变化还要进行后续的研究测试才可知晓。

(a) Corn stover



(b) Wheat straw



## (c) Rice straw

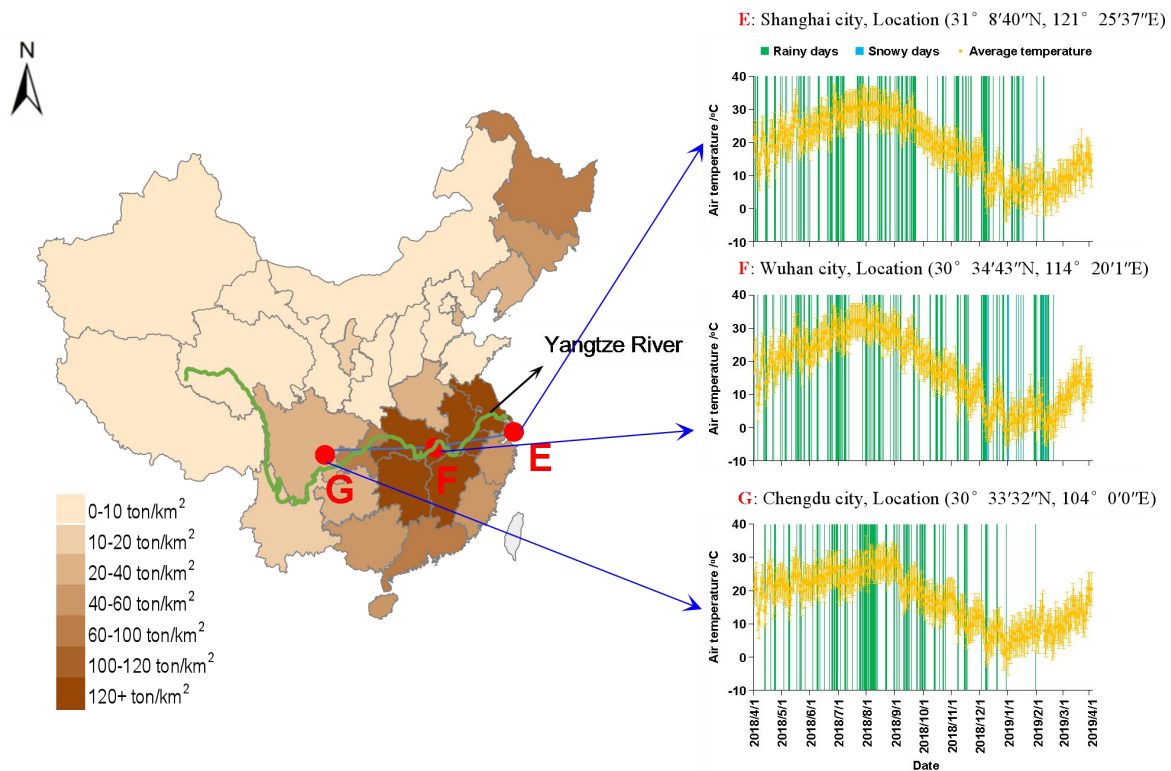


图 2.3 三种农作物秸秆的分布密度数据地图和储存地的全年基本天气情况

Fig.2.3 Distribution data map of three crop residues and local weather conditions of whole year

(a) 玉米秸秆的分布密度数据地图及长春、济南和郑州三地的全年基本天气情况；(b) 小麦秸秆的分布密度数据地图及济南、郑州和西安三地的全年基本天气情况；(c) 水稻秸秆的分布密度数据地图及上海、武汉和成都三地的全年基本天气情况

这三种秸秆分布密度统计区域仅限于中国大陆地区。数据地图上的大写字母代表城市：A:长春；B:济南；C:郑州；D:西安；E:上海；F:武汉；G:成都。全年基本天气情况：主要统计的是各储存地在 2018.4.01-2019.3.31 期间内每天的平均气温，全年降雨及降雪情况。

### 2.3.3 预处理后秸秆原料在多地储存期间的主要物理性质变化

从表面上看，尽管三种预处理后秸秆均经历了为期一年的长期储存过程，但储存前后原料的颜色、状态等表观特征均未发生变化。不过原料本身性质如果发生了一些变化的话肉眼是难以直接观察出的，例如含水量、堆积密度和振实密度等等。按照 2.2.7 所描述的测定方法，分别对储存期间各预处理物料的这三种物理参数予以全部掌握。测定后的结果如图 2.3 所示。总体来看，从储存开始至结束，这三种预处理物料的堆积密度和振实密度均有缓慢的上升；相反的是，物料的含水量却在逐渐地降低。

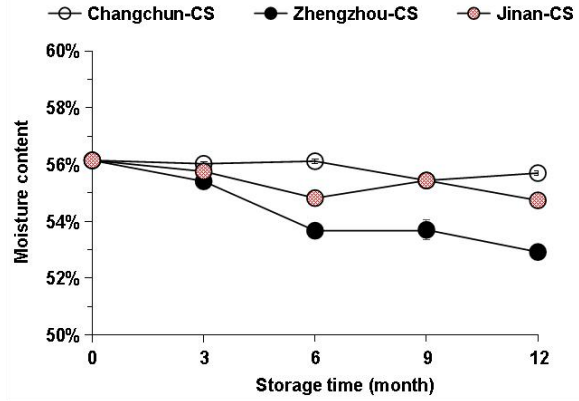
原始的秸秆原料经过预处理后实现了自身堆积密度和振实密度的提升，并且随着储存的继续进行，这两种密度还在缓慢地提高。在表 2.1 中可以看出，使用 CS、WS、这两种秸秆原料开展预处理和长期储存工作，基于干重的振实密度相对各自原始的秸秆而

言均提高了 2 倍之多，而使用 RS 时甚至提高了 4-5 倍之多。这表明干酸预处理技术的应用对原料的储存密度提高有着显著的实际意义，而储存密度的提高也会提高运输的效率，从而在一定程度上降低运输成本的投入。之所以这么说是因为大规模利用木质纤维素原料用于生物炼制时必定需要大量的运输作业给予后勤支持，这就使得运输原料的密度与运输成本关系密切。

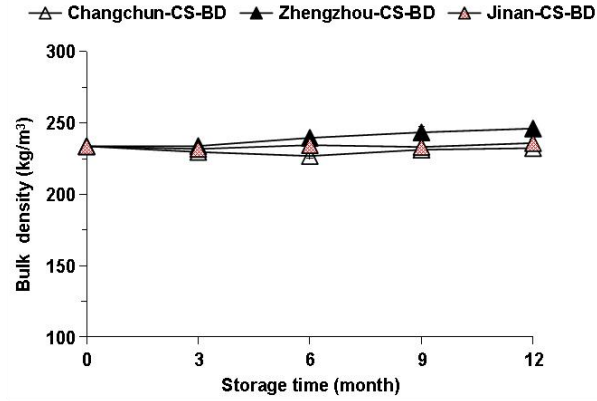
此外，原始的秸秆原料起初致密且规则的木质纤维素结构在预处理阶段受到破坏后便变得非常的疏松多孔，这得益于木质纤维素中的半纤维素组分几乎被移除殆尽（该批新鲜预处理后的秸秆半纤维素组分仅 2%-3%）。由于储存过程中，预处理秸秆原料在残余的硫酸作用下还具有微弱的酸预处理效果，因而半纤维素组分又被进一步的降解。这使得预处理后本就疏松多孔的结构变得更加脆弱，于是物料彼此之间就可以挤压得更加紧密。物料的这种能够挤压的限度也就以振实密度的形式间接展现出来。

至于三种预处理后秸秆物料随着储存时间的延长含水量出现下降的趋势，推测原因可能有两个：一是物料中抑制物 5-HMF 的自然分解消耗了一部分，所发生的化学反应是 5-HMF 与 2 分子  $H_2O$  相结合生成了甲酸和乙酰丙酸，随后这两种生成物进入到物料内部；二是预处理秸秆中的半纤维素组分在硫酸的作用下发生了缓慢水解，水解的过程也就需要消耗一部分物料中的水分。

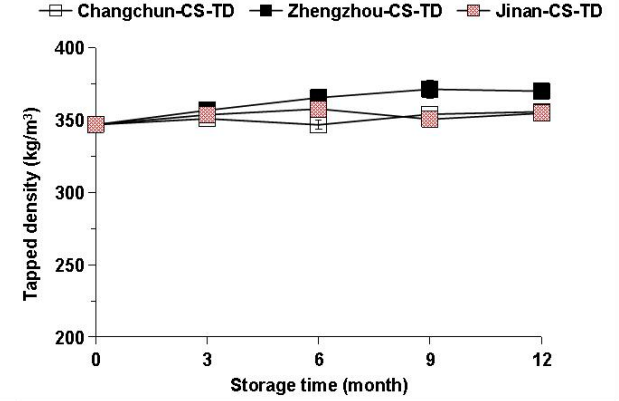
(a) Moisture of pretreated corn stover under different storage time



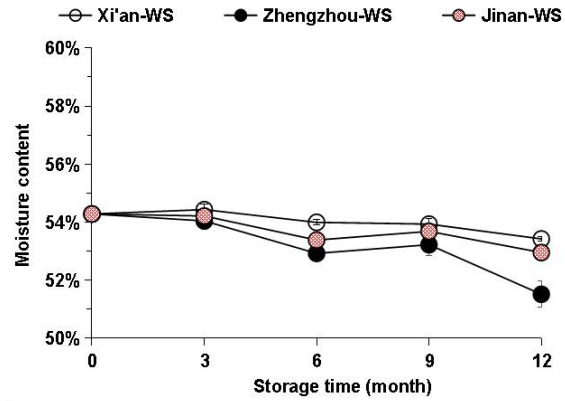
(b) Bulk density of pretreated corn stover under different time



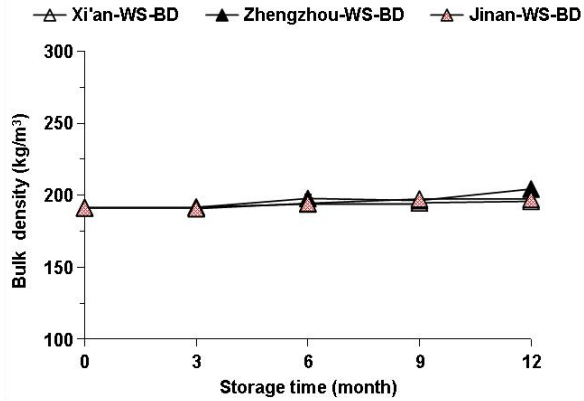
(c) Tapped density of pretreated corn stover under different time



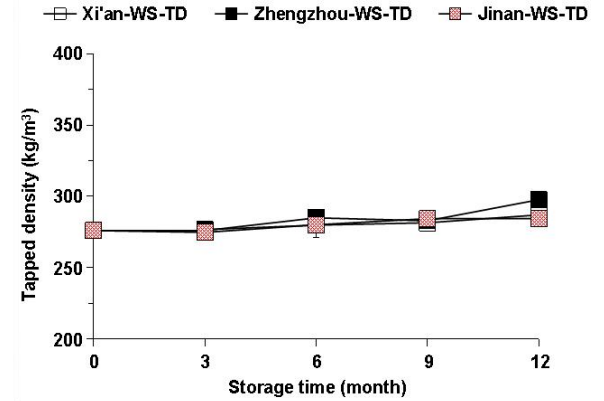
(d) Moisture of pretreated wheat straw under different storage time



(e) Bulk density of pretreated wheat straw under different time



(f) Tapped density of pretreated wheat straw under different time



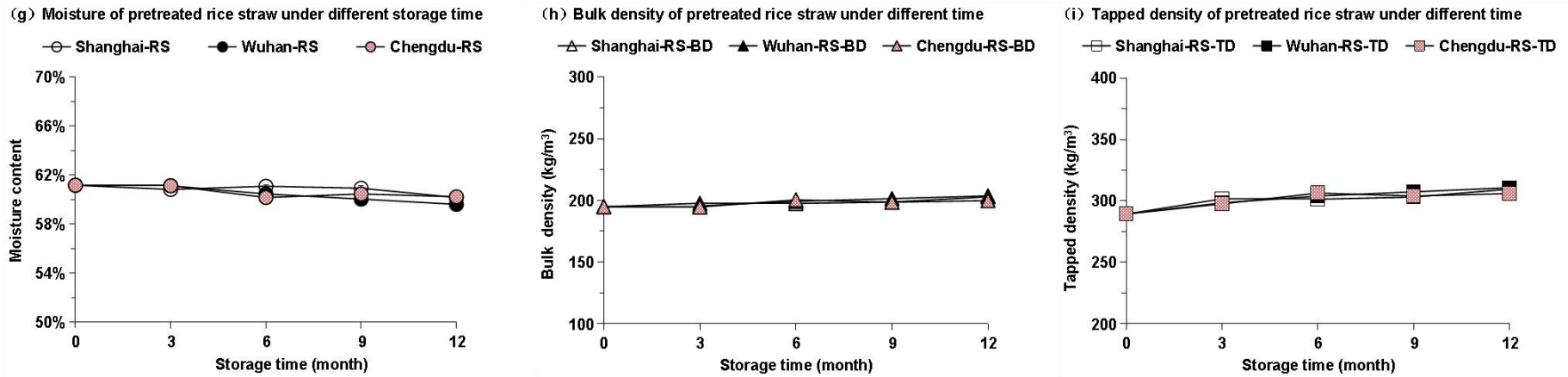


图 2.4 预处理后秸秆多地储存一年内的主要物理性质变化

Fig.2.4 Changes of main physical properties of pretreated straw stored in multiple places

(a)、(b)、(c) 分别表示储存于长春、郑州、济南的预处理后玉米秸秆在储存期间内的含水量、堆积密度和振实密度变化；(d)、(e)、(f) 分别表示储存于西安、郑州、济南的预处理后小麦秸秆在储存期间内的含水量、堆积密度和振实密度变化；(g)、(h)、(i) 分别表示储存于上海、武汉、成都的预处理后水稻秸秆在储存期间内的含水量、堆积密度和振实密度变化

简写释义：CS：玉米秸秆；WS：小麦秸秆；RS：水稻秸秆；BD：堆积密度；TD：振实密度。堆积密度和振实密度均是基于预处理后秸秆的干重进行计算的，单位均为 kg/m<sup>3</sup>。

表 2.1 三种农作物秸秆在不同处理方式下的干振实密度

Table 2.1 Dry tapped density of three crop straws treated with different ways

| Straw | Dry tapped density <sup>a</sup> (ton/m <sup>3</sup> ) |                                 |                               |
|-------|---|---------------------------------|-------------------------------|
|       | Raw <sup>b</sup>                                      | Freshly pretreated <sup>c</sup> | Long-term stored <sup>d</sup> |
| CS    | 0.115   | 0.347                           | 0.360                         |
| WS    | 0.116   | 0.276                           | 0.290                         |
| RS    | 0.058   | 0.289                           | 0.309                         |

(a) 不同处理方式下秸秆基于干重的振实密度; (b) 不作预处理的原始秸秆原料的干振实密度值, 所用的原始秸秆原料是指从农田收获后经晾晒并粉碎至 40-60 目的农作物秸秆; (c) 新鲜的干酸预处理秸秆原料的干振实密度值; (d) 干酸预处理之后又进行了在三所城市长期储存一年的预处理后秸秆的干振实密度平均值

### 2.3.4 长期储存过程中预处理原料的组成变化

由表 2.2, 2.3, 2.4 中的组分数据, 我们发现预处理后秸秆原料的纤维素含量在储存期间基本不变 (cellulose 含量在 30%左右), 其他可溶性糖组分 (如葡萄糖、木糖、葡寡糖、木寡糖等物质) 的组成占比也基本保持不变, 但半纤维素含量略微下降。此外, 新鲜的预处理后的物料在硫酸催化剂的存在下随着储存时间的延长, 乙酰基缓慢断裂, 因而物料内部乙酸含量缓慢上升。

另外, 在分析抑制物组分变化时还发现了一个令人感兴趣的现象, 三种预处理秸秆原料中的糠醛和 5-HMF 含量在长期储存过程降低得非常明显, 而且在所有参与长期储存工作的城市均可发现这种情况。储存一年后, 预处理后的玉米、小麦、水稻秸秆中的糠醛含量分别降低了 3.97, 5.08, 1.88 mg/g 干预处理后秸秆 (相对于储存 0 个月的对照组, 分别下降了 83.23%, 96.76%, 78.66%), 而 5-HMF 含量则分别降低了 3.13, 2.15, 3.34 mg/g 干预处理后秸秆 (相对于储存 0 个月的对照组, 分别下降了 48.08%, 52.96%, 68.02%)。

至于储存过程中为什么预处理秸秆的糠醛和 5-HMF 抑制物组分降低得如此明显, 可能的原因如下: 最初在制备了大批的新鲜预处理秸秆之后, 并没有对装料后的塑料袋进行绝对的密封 (即热封), 而是采用手工扎紧的方式, 这就导致了包装袋比较松散并存在着一定的空隙, 因而物料中的糠醛就得已从空隙逸出。这是糠醛本身的易挥发性造成的, 尤其在储存于郑州、西安、河南等地的预处理物料最为明显, 因为这些城市夏季的“高温天气” (气温  $\geq 35^{\circ}\text{C}$  的天气) 数相对较多。另外, 糠醛下降速率最快的时候是在 2018 年 4 月至 7 月, 此时正好处于夏季, 平均气温当属全年最高。而正常需在低温条件下才可稳定保存的 5-HMF 具有吸湿性, 对光和空气敏感, 因为其稳定性不好, 所以可能发生聚合反应或分解为甲酸和乙酰丙酸, 从而使 5-HMF 含量出现降低的现象。

表 2.2 预处理后的玉米秸秆在多地长期储存期间的组分含量

Table 2.1 Components of dry acid pretreated corn stover during long-term storage in three cities

| Storage Time (month)                    | Polysaccharides (%) |               | Oligosaccharide (mg/g DM)  |                             | Monosaccharides (mg/g DM) |            | Inhibitors (mg/g DM) |           |            |
|---|---------------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------|----------------------|-----------|------------|
|   | Cellulose           | Hemicellulose | Glu-oligomers <sup>a</sup> | Xylo-oligomers <sup>b</sup> | Glucose                   | Xylose     | Furfural             | HMF       | Acetate    |
| (A) Pretreated corn stover in Changchun |                     |               |                            |                             |                           |            |                      |           |            |
| 0                                       | 30.68±0.37          | 2.01±0.03     | 8.45±0.76                  | 10.75±2.36                  | 34.08±0.88                | 92.15±0.62 | 4.77±0.24            | 6.51±0.38 | 20.17±1.91 |
| 3                                       | 31.32±0.19          | 1.95±0.02     | 6.10±0.89                  | 16.56±3.23                  | 35.40±0.41                | 95.95±0.65 | 2.11±0.09            | 5.79±0.23 | 21.74±1.01 |
| 6                                       | 30.83±0.79          | 1.21±0.08     | 8.89±0.18                  | 11.56±1.15                  | 35.67±0.32                | 96.46±3.31 | 1.52±0.08            | 5.05±0.04 | 21.84±1.18 |
| 9                                       | 30.56±0.35          | 1.54±0.05     | 6.14±0.74                  | 11.32±1.36                  | 35.42±0.26                | 97.03±0.84 | 1.51±0.07            | 5.02±0.02 | 21.69±1.28 |
| 12                                      | 29.34±0.12          | 1.57±0.04     | 4.29±1.96                  | 6.19±3.85                   | 36.32±0.07                | 97.47±0.25 | 1.28±0.07            | 3.19±1.84 | 22.34±2.53 |
| (B) Pretreated corn stover in Jinan     |                     |               |                            |                             |                           |            |                      |           |            |
| 0                                       | 30.68±0.37          | 2.01±0.03     | 8.45±0.76                  | 10.75±2.36                  | 34.08±0.88                | 92.15±0.62 | 4.77±0.24            | 6.51±0.38 | 20.17±1.91 |
| 3                                       | 30.42±0.68          | 1.76±0.02     | 5.85±1.21                  | 12.22±0.65                  | 36.80±0.57                | 98.84±1.22 | 1.98±0.06            | 4.01±0.03 | 21.30±0.08 |
| 6                                       | 30.52±0.20          | 2.23±0.07     | 5.64±5.62                  | 14.65±6.36                  | 30.59±0.08                | 92.18±0.02 | 2.01±0.10            | 4.07±0.02 | 21.41±0.57 |
| 9                                       | 30.71±0.17          | 1.60±0.03     | 10.47±0.05                 | 15.75±2.28                  | 30.49±0.78                | 81.80±0.27 | 1.79±0.60            | 4.05±0.37 | 21.71±3.50 |
| 12                                      | 29.65±0.26          | 1.71±0.31     | 9.09±7.43                  | 5.55±0.21                   | 35.46±0.77                | 94.47±2.02 | 0.64±0.09            | 3.92±0.05 | 21.15±0.88 |
| (C) Pretreated corn stover in Zhengzhou |                     |               |                            |                             |                           |            |                      |           |            |
| 0                                       | 30.68±0.37          | 2.01±0.03     | 8.45±0.76                  | 10.75±2.36                  | 34.08±0.88                | 92.15±0.62 | 4.77±0.24            | 6.51±0.38 | 20.17±1.91 |
| 3                                       | 30.59±1.88          | 1.70±0.18     | 5.87±1.04                  | 17.71±2.44                  | 38.01±2.48                | 95.32±1.29 | 1.89±0.14            | 3.75±0.13 | 20.78±1.45 |
| 6                                       | 30.08±0.06          | 1.38±0.02     | 6.08±0.17                  | 17.05±1.42                  | 34.85±0.07                | 92.92±0.19 | 1.07±0.01            | 3.88±0.02 | 20.59±0.05 |
| 9                                       | 29.97±0.38          | 1.51±0.06     | 7.22±1.50                  | 9.18±1.65                   | 33.15±0.25                | 86.90±0.59 | 0.98±0.06            | 3.34±0.10 | 20.92±0.09 |
| 12                                      | 29.24±0.12          | 1.32±0.16     | 8.45±7.29                  | 18.09±1.90                  | 34.93±0.60                | 91.83±1.76 | 0.48±0.01            | 3.04±0.43 | 20.72±1.11 |

玉米秸秆原料的干酸预处理条件及参数: 3.6% (w/w) 的硫酸用量, 175 °C 下维持 5 min, 搅拌桨搅拌转速 50 rpm。(a) 葡寡糖含量; (b) 木寡糖含量。

表 2.3 预处理后的小麦秸秆在多地长期储存期间的组分含量

Table 2.2 Components of dry acid pretreated wheat straw during long-term storage in three cities

| Storage Time (month)                    | Polysaccharides (%) |               | Oligosaccharide (mg/g DM)  |                             | Monosaccharides (mg/g DM) |            | Inhibitors (mg/g DM) |           |            |
|---|---------------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------|----------------------|-----------|------------|
|   | Cellulose           | Hemicellulose | Glu-oligomers <sup>a</sup> | Xylo-oligomers <sup>b</sup> | Glucose                   | Xylose     | Furfural             | HMF       | Acetate    |
| (A) Pretreated wheat straw in Jinan     |                     |               |                            |                             |                           |            |                      |           |            |
| 0                                       | 29.69±0.29          | 2.70±0.16     | 12.27±0.78                 | 18.62±0.12                  | 30.89±0.02                | 92.35±0.49 | 5.25±0.14            | 4.06±0.01 | 15.00±0.34 |
| 3                                       | 29.87±0.19          | 2.96±0.11     | 12.53±2.78                 | 24.71±3.30                  | 30.87±2.64                | 95.46±1.25 | 1.58±0.43            | 2.44±0.01 | 17.21±1.90 |
| 6                                       | 28.65±0.13          | 2.21±0.08     | 12.31±0.48                 | 19.39±1.37                  | 30.39±0.63                | 91.70±1.78 | 0.50±0.06            | 2.19±0.03 | 15.89±0.38 |
| 9                                       | 29.88±0.18          | 2.21±0.03     | 12.00±0.43                 | 19.75±1.56                  | 29.17±0.37                | 88.30±1.20 | 0.53±0.04            | 2.02±0.04 | 16.27±0.44 |
| 12                                      | 28.93±1.20          | 2.19±0.13     | 9.85±0.54                  | 13.83±0.46                  | 30.63±0.04                | 92.42±0.46 | 0.00±0.00*           | 1.98±0.13 | 17.28±0.17 |
| (B) Pretreated wheat straw in Zhengzhou |                     |               |                            |                             |                           |            |                      |           |            |
| 0                                       | 29.69±0.29          | 2.70±0.16     | 12.27±0.78                 | 18.62±0.12                  | 30.89±0.02                | 92.35±0.49 | 5.25±0.14            | 4.06±0.01 | 15.00±0.34 |
| 3                                       | 30.30±0.45          | 2.63±0.39     | 11.50±0.05                 | 18.05±2.63                  | 31.17±1.25                | 96.09±2.15 | 1.16±0.09            | 2.52±0.05 | 17.34±2.21 |
| 6                                       | 29.44±0.28          | 2.23±0.07     | 11.13±0.13                 | 18.31±0.87                  | 30.59±0.08                | 92.18±0.02 | 0.70±0.06            | 2.04±0.05 | 16.08±0.03 |
| 9                                       | 28.56±0.60          | 2.22±0.03     | 11.06±0.72                 | 19.13±1.55                  | 31.12±0.05                | 93.17±0.17 | 0.70±0.01            | 2.60±0.02 | 17.69±1.08 |
| 12                                      | 28.56±0.32          | 2.10±0.02     | 7.27±0.62                  | 14.34±4.18                  | 30.64±0.10                | 91.89±0.34 | 0.11±0.16            | 1.81±0.05 | 16.67±0.41 |
| (C) Pretreated wheat straw in Xi'an     |                     |               |                            |                             |                           |            |                      |           |            |
| 0                                       | 29.69±0.29          | 2.70±0.16     | 12.27±0.78                 | 18.62±0.12                  | 30.89±0.02                | 92.35±0.49 | 5.25±0.14            | 4.06±0.01 | 15.00±0.34 |
| 3                                       | 30.06±0.25          | 2.13±0.62     | 14.12±1.17                 | 17.24±0.27                  | 30.75±1.03                | 93.65±2.28 | 1.37±0.08            | 2.50±0.16 | 16.52±0.42 |
| 6                                       | 29.35±0.27          | 2.34±0.05     | 10.87±0.96                 | 19.45±0.68                  | 30.31±0.45                | 91.79±0.88 | 0.44±0.06            | 2.17±0.05 | 16.75±0.65 |
| 9                                       | 29.54±0.75          | 2.23±0.21     | 10.67±1.12                 | 18.75±2.12                  | 30.74±0.65                | 92.85±2.02 | 0.43±0.04            | 2.22±0.09 | 16.57±0.05 |
| 12                                      | 29.85±0.09          | 2.15±0.10     | 10.17±0.49                 | 17.81±0.99                  | 29.71±0.56                | 89.93±1.83 | 0.40±0.07            | 1.95±0.23 | 16.59±1.67 |

小麦秸秆原料的干酸预处理条件及参数：4.0% (w/w) 的硫酸用量，175 °C 下维持 5 min，搅拌桨搅拌转速 50 rpm。(a) 葡寡糖含量；(b) 木寡糖含量。

\*使用 HPLC 对已在济南储存 12 个月的两包预处理后小麦秸秆的糠醛含量分别进行了检测，均未出现糠醛峰，故此时的糠醛含量记作 0.00 ± 0.00。

表 2.4 预处理后的水稻秸秆在多地长期储存期间的组分含量

Table 2.3 Components of dry acid pretreated rice straw during long-term storage in three cities

| Storage Time (month)                  | Polysaccharides (%) |               | Oligosaccharide (mg/g DM)  |                             | Monosaccharides (mg/g DM) |            | Inhibitors (mg/g DM) |           |            |
|---------------------------------------|---------------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|------------|----------------------|-----------|------------|
|                                       | Cellulose           | Hemicellulose | Glu-oligomers <sup>a</sup> | Xylo-oligomers <sup>b</sup> | Glucose                   | Xylose     | Furfural             | HMF       | Acetate    |
| (A) Pretreated rice straw in Shanghai |                     |               |                            |                             |                           |            |                      |           |            |
| 0                                     | 30.83±0.38          | 1.96±0.01     | 9.17±0.21                  | 6.54±0.76                   | 38.17±2.20                | 87.81±0.16 | 2.39±0.53            | 4.91±0.41 | 11.88±0.06 |
| 3                                     | 31.31±0.23          | 1.98±0.01     | 11.37±0.70                 | 5.74±0.88                   | 36.57±0.24                | 84.05±0.07 | 1.94±0.03            | 3.70±0.75 | 13.46±0.87 |
| 6                                     | 29.31±0.38          | 1.45±0.20     | 7.90±1.86                  | 4.21±1.61                   | 38.64±0.32                | 88.04±0.53 | 1.78±0.10            | 2.67±0.00 | 13.67±0.03 |
| 9                                     | 29.81±0.95          | 1.59±0.13     | 10.75±3.83                 | 10.22±2.32                  | 36.46±0.61                | 82.94±1.77 | 1.77±0.08            | 2.25±0.03 | 13.23±1.11 |
| 12                                    | 29.88±0.01          | 1.61±0.42     | 7.92±0.93                  | 9.63±1.19                   | 34.93±1.79                | 79.93±3.42 | 0.66±0.05            | 1.20±0.05 | 11.68±0.48 |
| (B) Pretreated rice straw in Wuhan    |                     |               |                            |                             |                           |            |                      |           |            |
| 0                                     | 30.83±0.38          | 1.96±0.01     | 9.17±0.21                  | 6.54±0.76                   | 38.17±2.20                | 87.81±0.16 | 2.39±0.53            | 4.91±0.41 | 11.88±0.06 |
| 3                                     | 31.61±0.30          | 1.96±0.05     | 10.36±0.16                 | 5.84±0.38                   | 37.45±0.20                | 86.52±0.06 | 1.48±0.11            | 3.97±0.20 | 14.20±0.34 |
| 6                                     | 30.27±0.48          | 1.71±0.03     | 7.86±1.67                  | 8.99±0.58                   | 35.69±1.88                | 82.26±4.28 | 0.59±0.04            | 2.80±0.21 | 13.24±1.63 |
| 9                                     | 28.90±0.11          | 1.65±0.11     | 8.02±2.42                  | 9.85±1.33                   | 36.78±0.44                | 83.81±0.33 | 0.41±0.31            | 2.12±0.02 | 11.47±1.13 |
| 12                                    | 29.52±0.48          | 1.52±0.01     | 7.74±1.01                  | 6.79±2.98                   | 38.40±0.12                | 86.93±0.56 | 0.42±0.05            | 1.26±1.00 | 13.68±0.16 |
| (C) Pretreated rice straw in Chengdu  |                     |               |                            |                             |                           |            |                      |           |            |
| 0                                     | 30.83±0.38          | 1.96±0.01     | 9.17±0.21                  | 6.54±0.76                   | 38.17±2.20                | 87.81±0.16 | 2.39±0.53            | 4.91±0.41 | 11.88±0.06 |
| 3                                     | 31.78±0.66          | 2.01±0.05     | 11.49±0.07                 | 6.33±0.83                   | 31.73±0.83                | 85.90±0.60 | 1.31±0.19            | 3.77±0.59 | 13.70±0.16 |
| 6                                     | 29.63±0.03          | 1.48±0.21     | 7.43±1.93                  | 7.06±0.50                   | 38.04±0.00                | 86.84±0.03 | 0.53±0.00            | 1.98±0.60 | 14.59±1.24 |
| 9                                     | 30.21±0.27          | 1.69±0.09     | 9.80±0.15                  | 12.06±2.51                  | 37.42±0.53                | 85.43±0.99 | 0.36±0.04            | 2.78±0.05 | 14.56±1.58 |
| 12                                    | 29.04±1.77          | 1.64±0.20     | 9.18±0.78                  | 8.52±1.53                   | 36.49±0.82                | 83.36±1.38 | 0.44±0.10            | 2.24±0.12 | 12.23±1.78 |

水稻秸秆原料的干酸预处理条件及参数：4.3% (w/w) 的硫酸用量，175 °C 下维持 5 min，搅拌桨搅拌转速 50 rpm。(a) 葡寡糖含量；(b) 木寡糖含量。

### 2.3.5 酶水解评价和乙醇发酵性能评估

长期储存后的秸秆最后不可避免地需要投入到中游的发酵过程中去以用于生产纤维素乙醇等生物基化学品，因此秸秆的乙醇发酵能力有待评估。此外，所进行的发酵是同步糖化共发酵，接种之前发酵罐内必须具备充足的碳源，单纯依靠脱毒物料内的少量的可发酵木糖是远远不够的，因而这就需要借助纤维素酶与脱毒后物料的预糖化反应。通常来看，酶水解评价实验如若测出秸秆原料的纤维素酶解程度很高（酶解得率在 90%-100%）的话，则预示着该秸秆原料将会取得很好的预糖化效果。预处理后的秸秆经历着长期的储存过程中，秸秆本身可能会发生很多变化，而且对于其可以取得的酶解程度和乙醇发酵性能都是未知的，因此为了准确把握储存后预处理物料的这两个指标，我们进行了大量的酶水解评价和上罐发酵实验。

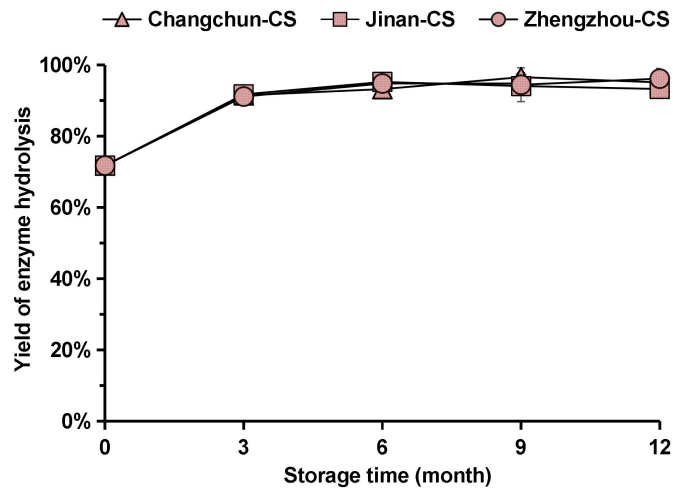
酶水解评价实验的结果如图 2.5 所示。可以清晰地看出：预处理物料在刚开始储存的 3 个月内，酶解得率便明显提高。我们推测可能有两方面原因。第一，预处理秸秆的结构变得愈加脆弱从而增加了纤维素酶的可接触性。由于预处理阶段所制备的预处理后秸秆内部仍然有些许硫酸催化剂的存在，因此在长期储存过程中，预处理秸秆的某些易受影响的组分很可能就在进行缓慢的酸解过程。事实证明该推想是正确的，因为组分测定的数据的确显示了秸秆原料的半纤维素组分在长期储存过程的初始阶段（0-3 个月内）出现了缓慢降解的情况，并最终趋于稳定。所以，由于半纤维素组分的减少使得经过预处理后本就脆弱的木质纤维素原料结构变得更加脆弱，可接触的纤维素表面随之也就暴露得更多。第二，抑制物含量的降低对纤维素酶参与的酶解反应十分有利，毕竟抑制物组分在一定程度上能够抑制纤维素酶的酶活力，从而降低酶解效率。组分测定结果显示预处理后玉米秸秆中抑制物糠醛及 HMF 含量在长期储存过程显著降低，尤其是在储存三个月的时候已经降低了很大一部分。

此外，我们还注意到储存 0 个月 PCS（即新鲜预处理后的 PCS）的酶解得率最低，只有 71.8%，低于储存 0 个月 PRS 的 83.0%及储存 0 个月 PWS 的 86.0%，针对此种现象的出现，我们给出了一个可能的推测：通过分析组分数据可看出预处理后的玉米秸秆中各种抑制物的含量基本上都比另外两种预处理秸秆所对应的抑制物含量高，所以很有可能是预处理后玉米秸秆中含量总水平相对较高的抑制物对后续初步阶段的酶解得率产生了相对不利的影响，所以储存 0 天的预处理后玉米秸秆的酶解得率相对最低。

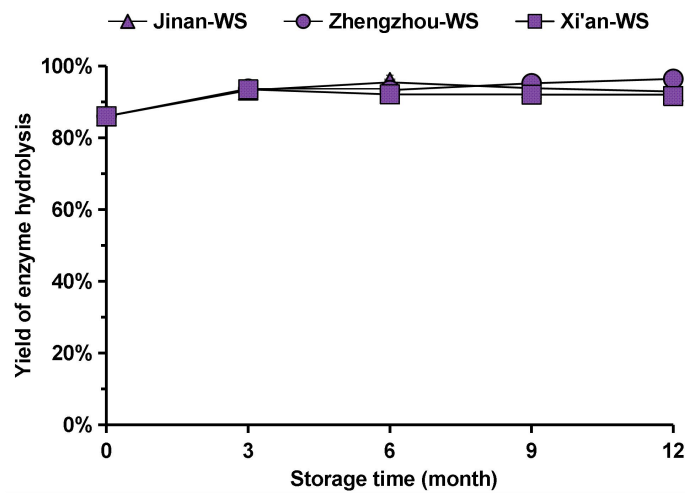
乙醇同步糖化共发酵的结果如图 2.6 所示，不同地点储存的同种干酸预处理后的秸秆原料进行乙醇 SSCF 96 h 时的乙醇浓度几乎没有太大的差别，基本维持在 60-70 g/L。乙醇发酵性能基本稳定的原因可能是：长期储存过程中预处理后的秸秆原料内部所涉及的可以生成后期乙醇发酵所需的可溶性糖的组分并没有发生比较大的变化。另外，在物料储存的一年时间内，就这三种预处理后秸秆各自参与乙醇发酵 96 h 时所取得的乙醇浓度的高低来看，预处理后稻秆的乙醇发酵水平是相对较低的。我们推测可能有两方面原因：一是三种原始秸秆的纤维素含量非常接近，但稻秆原料的半纤维素含量相对偏低，只有 20.78%，而玉米秸秆和小麦秸秆则分别为 23.62%和 23.19%；二是因为原始的水稻

秸秆的灰分含量（10.53%）相对较高，而原始玉米秸秆和小麦秸秆的灰分含量分别为 7.38%和 9.73%，因而稻秆经过干酸预处理后很可能会向最后的乙醇发酵过程中引入相对较多的金属离子（如  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ 等），继而这些金属离子会对酿酒酵母的细胞活力造成相对于玉米秸秆和小麦秸秆乙醇发酵时额外的抑制效果<sup>[56,95]</sup>。

(a) Hydrolysis yield of pretreated CS during long-term storage



(b) Hydrolysis yield of pretreated WS during long-term storage



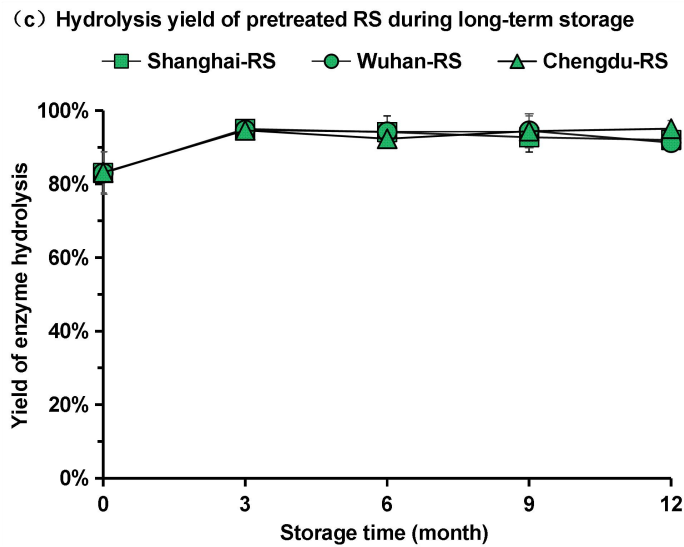
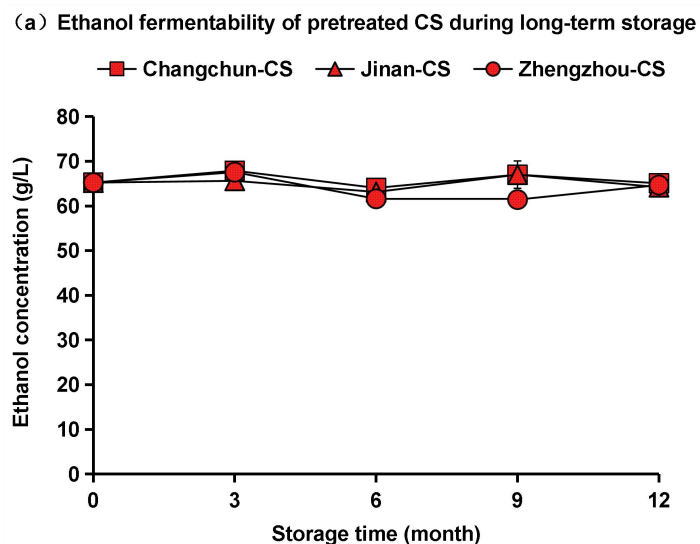


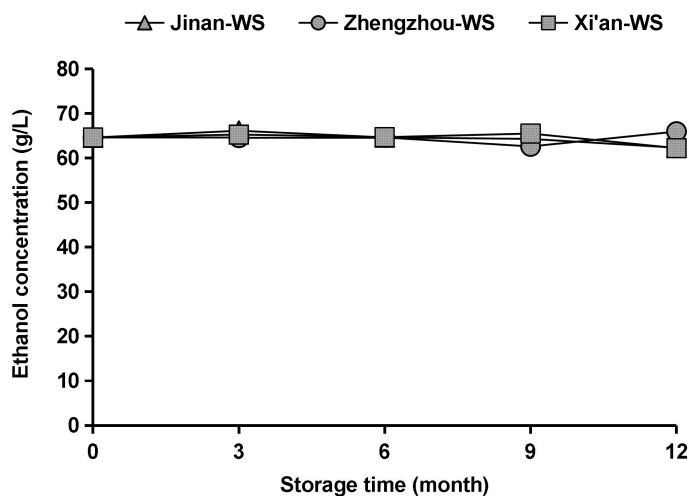
图 2.5 三种干酸预处理后的秸秆原料在多地长期储存期间的酶解得率变化

Fig.2.5 Changes of hydrolysis yield of three pretreated crop residues during long-term storage in multiple places

(a) 储存于长春、济南、郑州的预处理后玉米秸秆在储存期间内的酶解得率变化。(b) 储存于济南、郑州、西安的预处理后小麦秸秆在储存期间内的酶解得率变化。(c) 储存于上海、武汉、成都的预处理后水稻秸秆在储存期间内的酶解得率变化。纤维素酶水解评价的参数及条件：2.5%固含量，pH 4.8，20 FPU/g DM 酶用量，50 °C 酶解反应温度，150 rpm 水浴摇床转速，72 h 酶解反应时间。



(b) Ethanol fermentability of pretreated WS during long-term storage



(c) Ethanol fermentability of pretreated RS during long-term storage

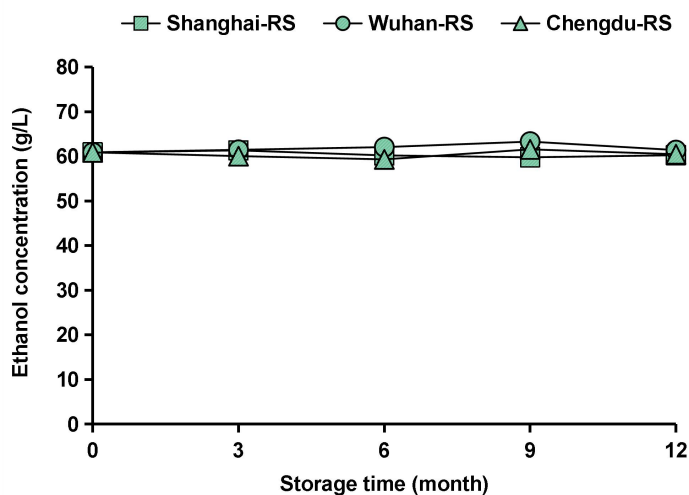


图 2.6 三种干酸预处理后的秸秆原料在多地长期储存期间的乙醇发酵性能

Fig.2.6 Ethanol fermentation performance of three pretreated crop residues during long-term storage in multiple places

(a) 储存于长春、济南、郑州的预处理后玉米秸秆在储存期间内的发酵终点乙醇浓度。(b) 储存于济南、郑州、西安的预处理后小麦秸秆在储存期间内的发酵终点乙醇浓度。(c) 储存于上海、武汉、成都的预处理后水稻秸秆在储存期间内的发酵终点乙醇浓度。乙醇同步糖化共发酵条件：30% (w/w) 上罐固含量，10 FPU/g 干秸秆的纤维素酶用量，50 °C 预糖化温度，12 h 预糖化时间，20% (v/v) 接种量，30 °C 发酵温度，5.5 发酵 pH，96 h 发酵时间，200 rpm 搅拌转速。

### 2.3.6 干法生物炼制全过程物料衡算

之所以对干法生物炼制的整个过程进行物料衡算，是因为物料衡算对于整个生物炼制工艺的计算来说是最基础的同时也是最值得重视的一环，而且也是日后生物炼制工厂生产规模的放大以及新工艺的开发所依赖的基石。

在进行正式的物料衡算之前需要了解一个有关修正系数的问题。大部分预处理方式在打破木质纤维素原料的生物拮抗性的同时都会产生一定量的可挥发性降解产物 (volatilizable matter, VM)。随着预处理技术不断进步的同时，预处理固含量也在不断提高，因而 VM 的主要集中场所也逐渐地从液体部分转移至固态的物料中去。干酸预处理技术制备的预处理物料固含量高达 50%，整体呈固态，因而 VM 均存在与固态物料当中。在固含量测定时，理论上是需要把测得的 VM 含量算入干固体中，单位为 mg/g DM，但是我们基本上会忽略掉这一点，因为通常采用的 NREL 的固含量测定方法（差重法）就没有把这一点考虑进去。所谓的差重法，就是将待测的预处理原料放入 105 °C 烘箱烘干至恒重，然后计算烘干后的原料质量与烘干前原料质量的比值，此即待测原料的固含量。之所以说该法存在缺陷，是因为在 105 °C 的环境下，存在于固态物料中的 VM 被完全移除后往往被当作水分的移除，从而造成了一定的误差。这就给预处理过程的物料衡算及准确的工业化模型设计带来严峻的挑战。根据实验室前人的实验数据所提供的经验值，预处理物料中的 VM 质量约占干酸预处理后物料总质量的 4.5%，与干固体质量的比率为 9.3%，因此应当对干固体质量增加 9.3% 才更符合预处理后生物质来源的质量；或者说，对于预处理物料中每种物质组成的含量，应当在计算物料衡算时均缩减 8.5% 的修正系数，才能更好的符合实际过程。基于以上经验值和此修正系数分别展开对三种秸秆原料的全过程物料衡算工作。

如图 2.7, 2.8, 2.9 所示，均从 1 t 的秸秆原料出发，分别对玉米秸秆，麦秆和稻秆进行了生物炼制全过程的物料衡算。由于本研究涉及到秸秆的长期储存工作，故而将长期储存作为一个操作单元列入其中，所以主要过程单元包括干酸预处理、长期储存、快速固态生物脱毒、高固含量乙醇 SSCF、精馏以及最后的固液分离等等。透过这三张物料衡算图，我们可以从中清晰地看出整个纤维素乙醇的生产过程，并且还可以看出物料的基本组成及其转变。需要提及的是，干酸预处理阶段之后所涉及的数据计算均建立在长期储存 12 个月的预处理后秸秆原料的测定数据之上。

通过物料衡算可以发现干酸预处理过程的干物质损失问题。我们知道使用干酸预处理技术对原始的农作物秸秆原料进行预处理的过程中会伴随生成 VM，如乙酰基水解得到的乙酸，半纤维素的过度降解产生的糠醛、甲酸、乙酰丙酸，纤维素的过度降解得到的 HMF，木质素的降解而产生的各种酚类抑制物等等。这些 VM 中的一部分在预处理操作过程中以气体的形式逃逸至空气中，剩下的另一部分则存在于固态的预处理物料当中，因此预处理过程干物质的回收率并非 100%，也就是说该过程的确存在干物质的损失（损失的部分就是散发至空气中的那部分 VM）。如果按照图 2.7, 2.8, 2.9 所示的物料衡算来看，原始的玉米秸秆、麦秆和稻秆在预处理阶段的干物质回收率分别为 88.30%，

91.05%和 90.87%。进行这样的物料衡算可以为以后的干酸预处理阶段提供一个比较准确的经验值，那就是干酸预处理过程的干物质回收率在 90%左右。这样的经验值在生物炼制应用中具有一定的实际应用意义。

此外，我们还可以看出：1 t 的原始玉米秸秆、麦秆和稻秆通过干法生物炼制过程最终分别可以产生 0.205 t，0.244 t 和 0.197 t 的纤维素乙醇；通过对乙醇精馏后的釜底液进行固液分离还可分别产生 0.820 t，0.786 t，0.698 t 的木质素残渣以及 2.683 t，3.451 t，2.926 t 的废水。以干重进行换算的话，1 t 干玉米秸秆、干麦秆和干稻秆最终分别可以生产出 0.228 t，0.249 t 和 0.224 t 的纤维素乙醇。在 2017 年的一篇报道中 Liu 等<sup>[42]</sup>也对类似的干法生物炼制过程进行了物料衡算的分析，其中的衡算数据如图 2.10 所示。有所不同的是，该学者是基于干重为 1 吨的玉米秸秆进行计算的，即 1 t 干的原始玉米秸秆经过干法生物炼制过程产生了 0.252 t 的纤维素乙醇，0.590 t 的木质纤维素残渣和 2.241 t 的废水。将本研究中有关玉米秸秆原料的物料衡算结果与上述文献中的有关结果进行对比，可以明显发现： $0.228\text{ t} < 0.252\text{ t}$ 。造成这一结果有两方面的原因：第一，该学者使用的玉米秸秆原料的纤维素含量较高，从而使得乙醇发酵体系中纤维素的占比相对较高，因而体系中的可发酵糖总量相对较高；第二，该学者所使用的秸秆原料经过了除尘处理，因而在预处理阶段产生的可抑制酵母细胞活力的金属离子总量相对较低，抑制能力总体被削弱的话就可以获得相对较高的乙醇产量。

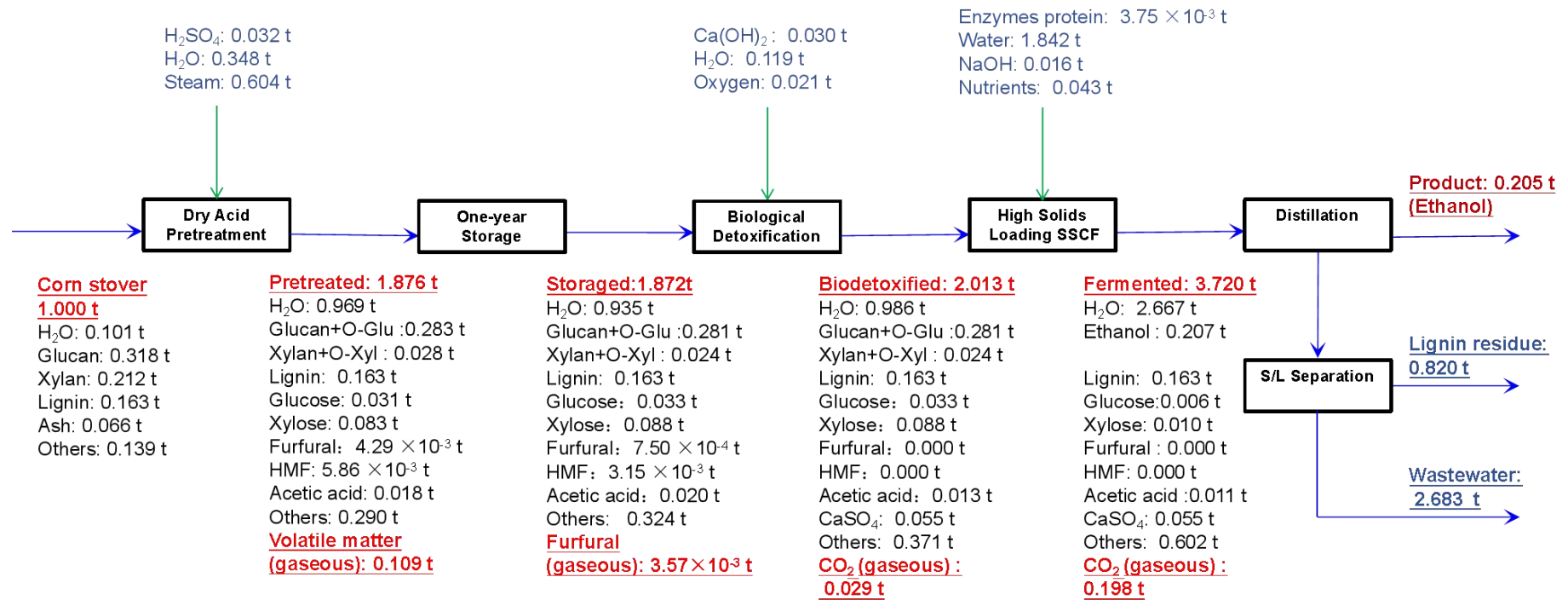


图 2.7 玉米秸秆纤维素乙醇干法生物炼制过程物料衡算

Fig. 2.7 Mass balance of cellulosic ethanol production in dry biorefinery process process with corn stover

同步糖化共发酵（SSCF）、葡寡糖（O-Glu）、木寡糖（O-Xyl）、S/L separation（固液分离）。

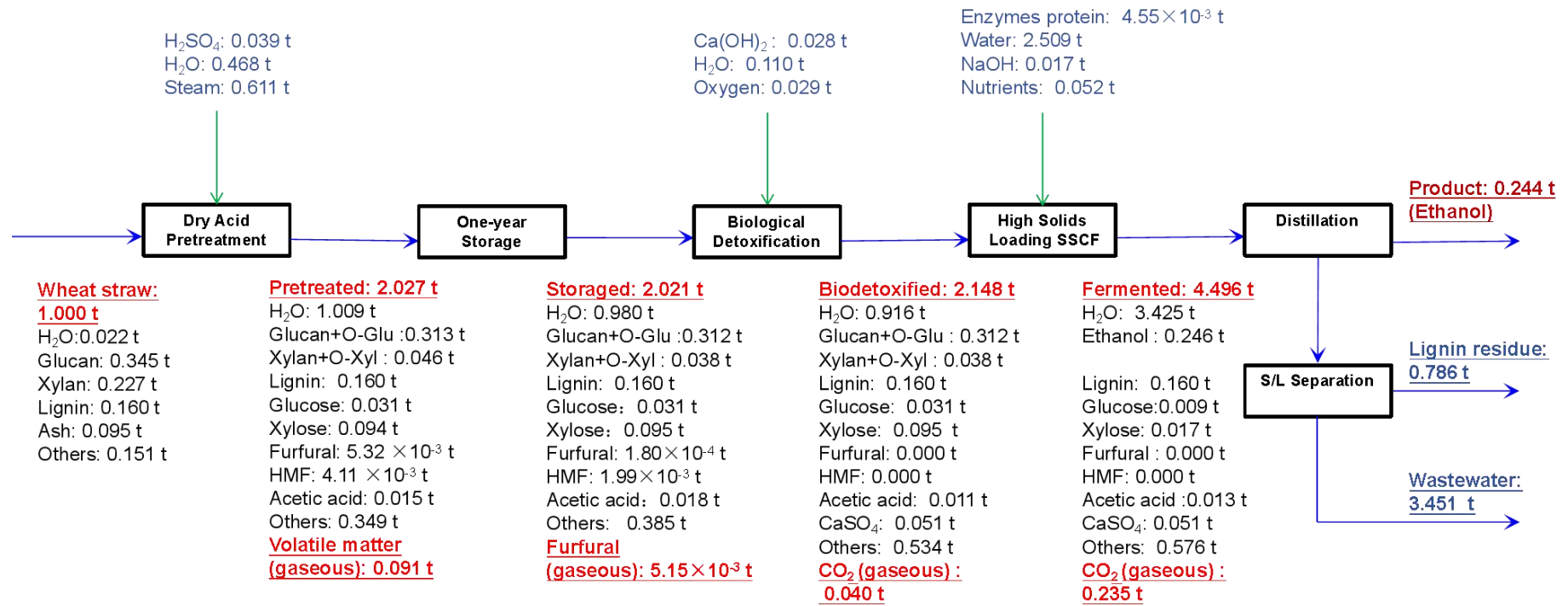


图 2.8 小麦秸秆纤维素乙醇干法生物炼制过程物料衡算

Fig. 2.8 Mass balance of cellulosic ethanol production in dry biorefinery process process with wheat straw

同步糖化共发酵（SSCF）、葡寡糖（O-Glu）、木寡糖（O-Xyl）、固液分离（S/L separation）。

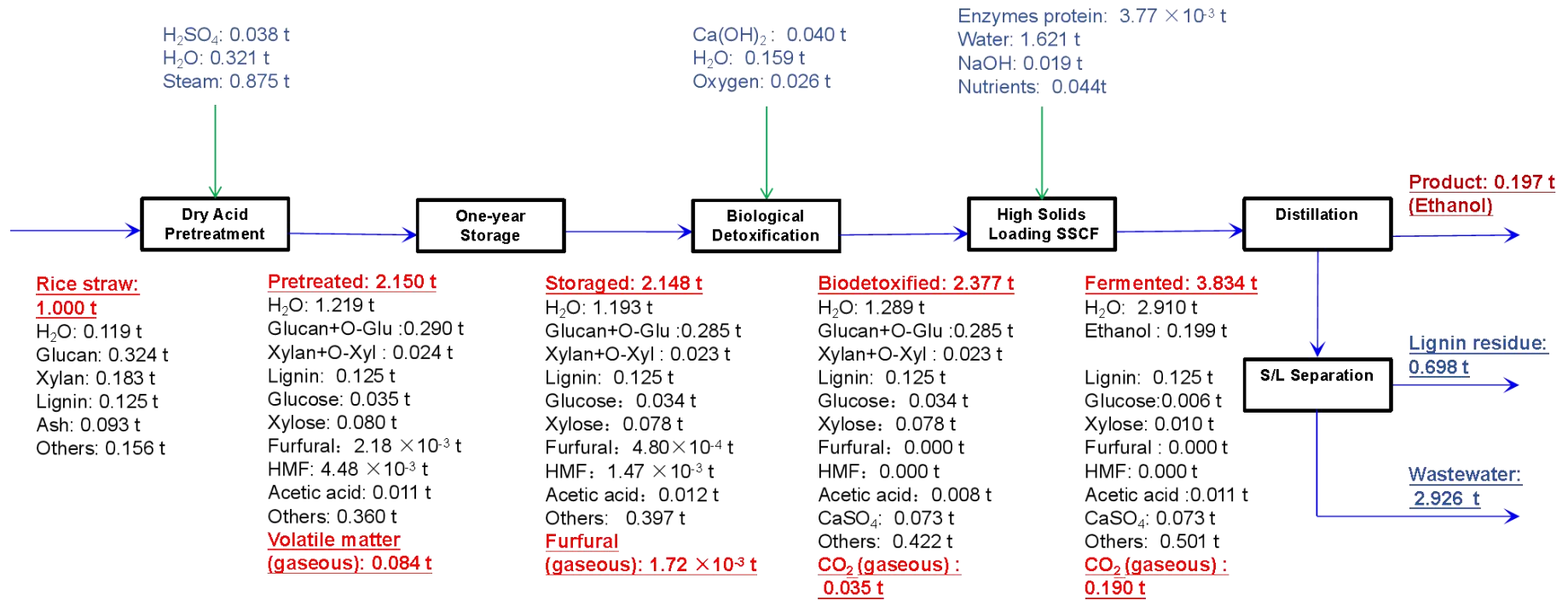


图 2.9 水稻秸秆纤维素乙醇干法生物炼制过程物料衡算

Fig.2.9 Mass balance of cellulosic ethanol production in dry biorefinery process with rice straw

同步糖化共发酵 (SSCF)、葡寡糖 (O-Glu)、木寡糖 (O-Xyl)、S/L separation (固液分离)。

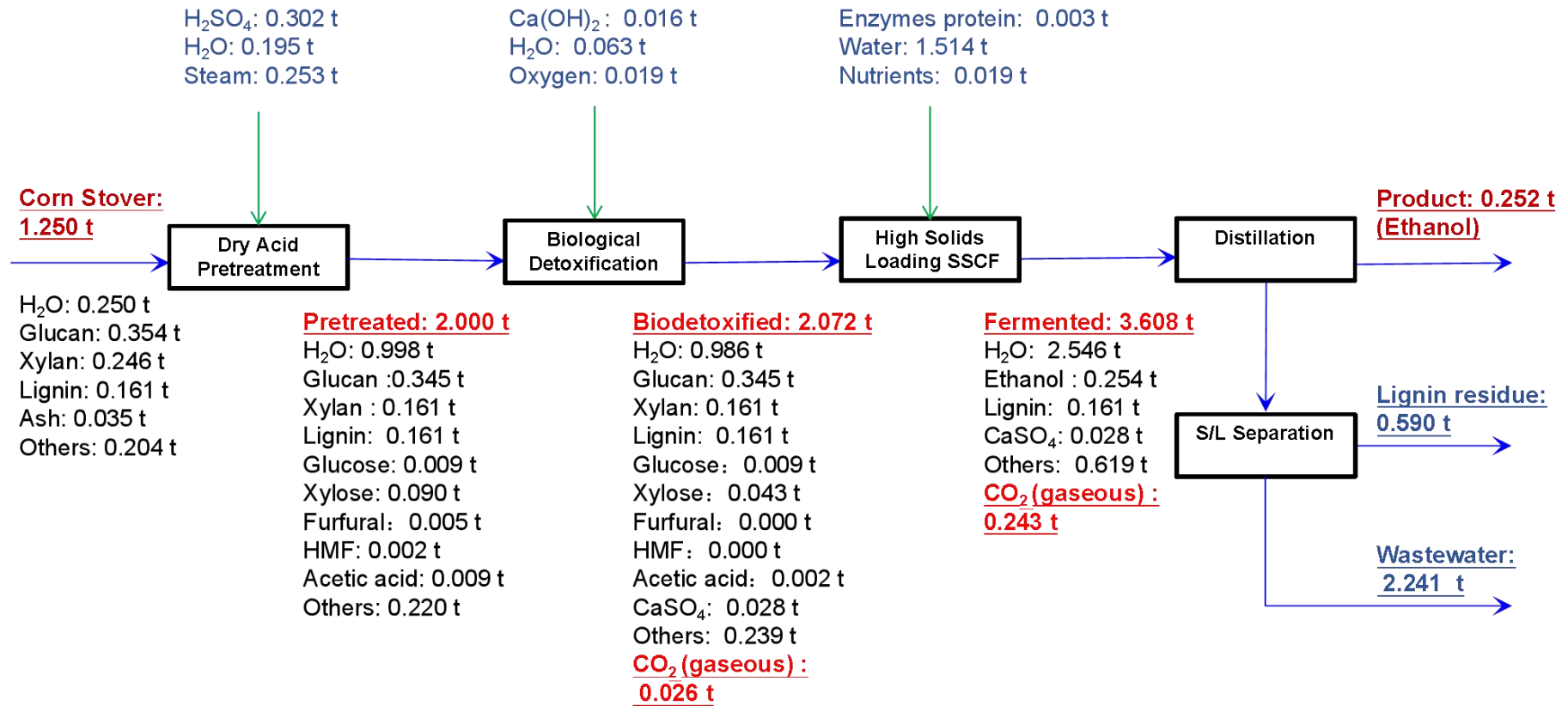


图 2.10 关于纤维素乙醇生产的干法生物炼制过程物料衡算<sup>[42]</sup>

Fig.2.10 Mass balance of cellulosic ethanol production in dry biorefinery process process

物料衡算基于 1 吨干玉米秸秆，原始玉米秸秆的含水量为 20% (w/w)。

### 2.3.7 分散预处理模式下的秸秆资源岛外运输成本分析

商业纤维素乙醇工厂需要成熟且全年的生物质原料储备，将核心乙醇工厂的预处理技术分散至当地的生物质收集站的方法不失为一种接近该目标的重要解决方法，并且通过将干酸预处理技术融入这种分散预处理模式可以将作物秸秆原料的收集半径扩大至 100 km，由此，生产纤维素乙醇的生物炼制规模便可达到当今位于中美农业集中地区的石油炼制工厂规模<sup>[65]</sup>。分散干酸预处理模式下的原料供应示意图如图 2.11 所示。可以看出：在总的收集区域内分为一个中心岛和若干小型的资源岛；每个小型资源岛内的秸秆废弃物均被运往当地的小型预处理工厂然后被制备成预处理秸秆物料，然后再被运往位于中心岛的生物炼制工厂以进行乙醇等生物基化学品的生产。

在这种模式下生物质原料供应的总运输成本计算涉及两种运输成本，一是各小型资源岛内秸秆收集点（农田）至各资源岛中心的预处理工厂所产生的资源岛内运输成本；二是将预处理后的秸秆原料从各资源岛预处理工厂运至处于中心资源岛的生物炼制工厂所产生的资源岛外运输成本。由于参加岛外运输的是预处理后的原料而且很可能是在小型资源岛中心区域储存了一段时间的预处理原料，因此我们着重对本研究中进行长期储存的地域的资源岛外运输成本进行分析。相对于未经预处理的农作物秸秆，使用干酸预处理技术处理后的农作物秸秆其堆积密度和振实密度均有明显提高。此外，从图 2.3 还可看出，随着预处理秸秆原料储存时间的延长，其堆积密度和振实密度还在继续上升。因此，岛外运输原料密度的逐步提高很有可能对预后秸秆岛外运输成本的继续降低有所帮助。基于此，我们拟在分散预处理模式下分析资源岛外运输的模型从而对上述结论的正确性予以证明。

假设均采用分散预处理模式，分别以每个长期储存所选地区对应的省份（上海除外，但以预处理原料在上海市的长期储存模拟在江苏省的长期储存）为模拟研究对象，加之所运输秸秆类型不同，所以总共是 9 种分散式运输模型，分别是吉林省 CS 运输、山东省 CS 运输、河南省 CS 运输、山东省 WS 运输、陕西省 WS 运输、河南省 WS 运输、四川省 RS 运输、江苏省 RS 运输和湖北省 RS 运输。随后参考 Kim 等<sup>[96]</sup>的研究中有关资源岛外运输成本计算的公式。为了使模型中构建的超大规模纤维素乙醇工厂的平均产能可以与石油炼制工厂的相提并论，我们在计算时将日处理秸秆量设为 30000 t<sup>[65]</sup>。公式中用到的模型中的相关参数主要包括：秸秆可用分布密度，资源岛个数，秸秆总收集面积，收集半径，中心资源岛面积，中心资源岛半径，原始秸秆干振实密度，预处理秸秆干振实密度，乙醇得率（gal/ton）。

干振实密度数据来源于此次研究中的表 2.1，而公式中其他未知数在具体模型中皆有准确的数值与其相对应，由此分散预处理模式下作物秸秆供应过程中的资源岛外运输成本（单位，\$/gal）与运输原料干振实密度（单位，metric ton/m<sup>3</sup>）的数据对应关系如表 2.5 所示。由此说明了一个问题：相对于直接用原始秸秆原料进行运输，采用干酸预处理操作所带来的运输原料干振实密度的提高，的确会显著降低资源岛外秸秆原料运输的成本，而且预处理物料储存一段时间再进行运输的话，此成本还会有所降低。因此，

在分散预处理模式配合下的作物秸秆供应系统中，预处理和长期储存均是有效降低资源岛外运输成本的有效手段。

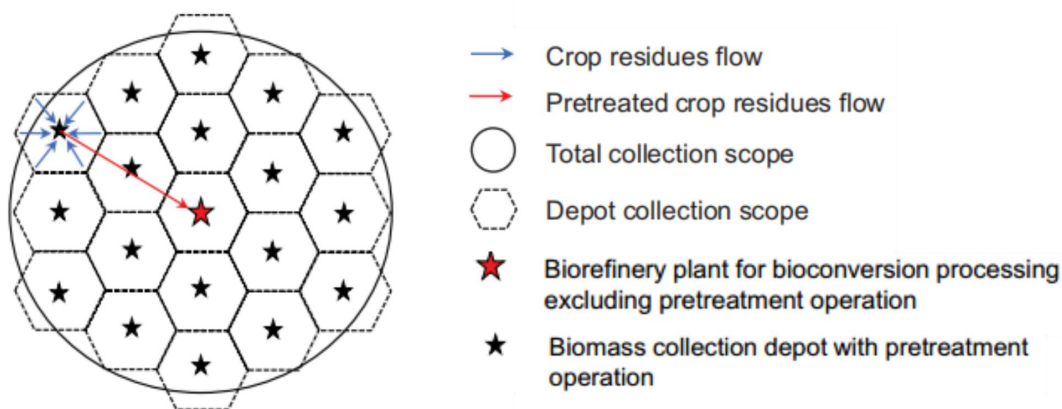


图 2.11 分散式原料供应法示意图<sup>[65]</sup>

Fig. 2.11. Schematic diagram of decentralized biomass supply method

表 2.5 分散预处理模式下多地秸秆在不同处理方式下的资源岛外运输成本

Table 2.5 Off-depot transportation cost of multi-site straw under different treatment modes indecentralized dry acid pretreatment operation

| Straw       | Off-depot transportation cost <sup>a</sup> (\$/gal) |                                 |                              |
|-------------|---|---------------------------------|------------------------------|
|             | Raw <sup>b</sup>                                    | Freshly Pretreated <sup>c</sup> | One-year stored <sup>d</sup> |
| Jilin CS    | 1.3194  | 0.4373                          | 0.4263                       |
| Shandong CS | 1.7075  | 0.5659                          | 0.5533                       |
| Henan CS    | 1.0879  | 0.3605                          | 0.3379                       |
| Shandong WS | 1.6898  | 0.7112                          | 0.6840                       |
| Shaanxi WS  | 4.8815  | 2.0544                          | 1.4655                       |
| Henan WS    | 1.0767  | 0.4531                          | 0.4202                       |
| Sichuan RS  | 7.4153  | 1.4861                          | 1.4056                       |
| Jiangsu RS* | 3.1651  | 0.6343                          | 0.5929                       |
| Hubei RS    | 4.0311  | 0.8079                          | 0.7523                       |

(a) 运输成本: 分别以表中所列各省行政区内的特定秸秆为研究对象并以此建立分散预处理模式运输模型, 针对不同处理方式的农作物秸秆所计算的资源岛外的运输成本; (b) 不作预处理的原始秸秆原料: 从农田收获后经晾晒并粉碎至 40-60 目的农作物秸秆, 并直接进行资源岛外运输; (c) 新鲜的预处理后秸秆原料; (d) 干酸预处理之后又进行了长期储存一年的预处理后秸秆。

\*因条件有限, 未在江苏省进行长期储存实验, 但江苏省毗连上海市, 故参考上海 RS 的干振实密度数据来模拟计算江苏 RS 的资源岛外运输成本。

## 2.4 小结

传统化石能源正日渐衰竭,大规模利用廉价且丰富的木质纤维素原料用于生物炼制生产乙醇等可再生能源从而替代传统化石能源的趋势已经不言而喻。在该背景下要着力解决的基础问题正是木质纤维素原料的大规模供应问题,这样才可摆脱实际生产时可能出现的原料供不应求的困境。然而,一般木质纤维素原料的收集周期是一年,由此势必要考虑其长期储存问题,并尽量使原料储存时间达到甚至超过收集周期,才可突破原料收集过程中季节带来的限制,从而最终避免生产生物基产品时在供应链上出现原料不足的问题。然而,如何处理木质纤维素原料使其可以在长期储存期间避开染菌的威胁却一直是众多学者不得不面对的一项挑战。

由此我们采用了一种先干酸预处理再进行长期储存的方式,并且主要开展了针对三种常见农作物秸秆在更多地域、更长时间储存的广泛研究。通过对多地储存的预处理原料进行全年的跟踪测试后加以分析得出如下结论:

(1) 干酸预处理后的秸秆在多地长期储存期间可以成功避免霉变等风险,因而这样的先预处理再进行长期储存的方式是可行的。

(2) 经过干酸预处理后的秸秆其堆积密度和振实密度明显提高,并且随储存时间的延长,密度还在逐步提高,非常有利于降低秸秆运输的成本。

(3) 预处理后的秸秆在长期储存期间纤维素和半纤维素含量基本保持不变,乙醇发酵性能也能基本保持恒定(乙醇浓度 60-70 g/L);此外还存在许多有价值的结果,如预处理物料储存期间糠醛和 5-HMF 抑制物的含量明显减少,酶水解得率显著上升。

(4) 通过干酸预处理后的秸秆可以成功实现长期储存一年的目标,在不同地域进行长期储存对秸秆的整体性质影响不大。

(5) 分散预处理模式下的秸秆资源供应可以充分结合干酸预处理技术和长期储存过程的优势,从而为生物炼制工厂原料供应链的持续运行保驾护航。

### 第 3 章 基于干法生物炼制技术实现重金属污染水稻的全生物质利用

#### 3.1 引言

世界人口正在以惊人的速度进行增长, 预计到 2050 年将达到 90 亿左右<sup>[97]</sup>, 因此未来的几十年内数量如此庞大的世界人口必定会给全球的农业和粮食生产带来更大的压力, 以应对未来可能爆发的全球性的饥饿问题<sup>[98]</sup>。众所周知, 粮食生产几乎都建立在利用耕地等土地资源的基础上, 然而近些年来采矿、工业三废排放、化肥农药大量使用以及污水灌溉等人类活动不仅给原本就十分有限的耕地带来重金属污染问题, 还直接或间接地危害着人们的身心健康。就中国而言, 截至 2014 年, 全国已有近五分之一的耕地受到不同程度的污染, 耕地土壤环境质量堪忧<sup>[71]</sup>。此外, 我国平均每年被重金属污染的粮食就达到了 1200 万吨, 由此造成的直接经济损失超过 200 亿元<sup>[72]</sup>。其中, 由于水稻是中国的主要粮食作物, 种植广泛并且全国近 65% 的人口以稻米为主食<sup>[99]</sup>, 因而其受污染问题尤为突出。正因为目前水稻生产已经受到了土壤重金属污染问题的严重威胁, 因此每年都会产生大量的安全品质不过关(重金属含量超标)的受污染稻米以及相应的含重金属的稻秆废弃物。如果直接对其弃置不顾又或是依旧以传统的方式进行加工利用的话, 很容易造成重金属的二次污染问题, 因此, 寻求合适的手段对受污染水稻予以安全的处理和利用便显得尤为重要。

一般而言, 在受重金属污染的土壤中种植的水稻经收获之后, 通常根部还残留原土壤中, 但其秸秆和籽实(稻米)部分仍可被人为转移, 因此它们是存在重金属二次污染扩散风险的源头, 故而水稻的这两部分生物质是当前亟需妥善处理的对象。据文献报道, 有学者采用生物炼制的方式成功对积累重金属镉的小麦秸秆进行了安全有效的利用<sup>[73]</sup>, 这说明采取有效的生物炼制方法是可以达到安全处理受污染生物质的目的。然而没有成熟且优良的生物炼制技术是无法实现重金属污染稻秆的全封闭处理的, 这就需要严格地对生物炼制过程中的每个步骤作出合理性考量。值得注意的是, 虽说预处理阶段在生物炼制链中是为打破木质纤维素生物拮抗性以方便后续利用其中的可发酵糖而设计的, 但对于重金属污染生物质的生物炼制处理过程来说却是极其重要的领头环节。这是因为预处理方法的优劣就直接决定了其能否具有被用于妥善处理重金属污染秸秆而不产生二次污染的可行性。然而, 目前诸多的秸秆预处理方法有一个共同的弊端, 即预处理之后会产生大量的废水<sup>[100-102]</sup>。如果基于这些预处理方法来处理受重金属污染的水稻秸秆的话, 势必会产生大量含有重金属离子的废水, 不仅处理起来非常棘手, 而且也为更为棘手的重金属二次污染创造了可能性。因此, 必须使用全封闭的预处理方式进行后续的处理。基于这一点, 本实验室自主研发的具有低能耗、低水耗和无废水排放等特点的干酸预处理技术不失为一种可能<sup>[39-41]</sup>。此外, 包括这一预处理方法的更是较为成熟的干法生物炼制工艺<sup>[42]</sup>, 如果该工艺可以成功实现受重金属污染水稻秸秆的安全利用的话, 不仅可以很好地解决受污染秸秆不易安全处理的难题, 还能通过最终炼制得到的乙

醇等生物基化学品来回补一些处理污染生物质时所投入的成本。至于水稻的籽实部分——稻米，一般可采用类似工业酒精发酵的方式以生产乙醇<sup>[103]</sup>。但是，进行粮食乙醇发酵后所产生的酒糟残渣是传统的禽畜饲料，因此如果用该法来处理目前受重金属污染的稻米的话，必定会产生大量富含重金属的酒糟残渣，若不加以监督处理的话很可能会让其非法流入市场，从而产生二次污染并最终造成非常严重的后果。因此，应该仔细考虑使用何种方式才能既安全又妥善地利用受重金属污染的水稻生物质。

为了避免单独利用重金属污染稻米而产生可能的二次污染问题，本实验室基于干法生物炼制技术对受重金属污染的稻秆和稻米进行全生物质利用的研究。首先，对受污染稻秆仍然采用干法生物炼制的手段进行处理，即：依序进行干酸预处理、磨浆、生物脱毒，随后将脱毒后的物料用于同步糖化共发酵过程生产纤维素乙醇；其次，为避免酒糟残渣的产生，我们将含重金属的稻米经过液化和糖化制备成稻米糖化液并以补料的形式整合到高固含量稻秆的乙醇同步糖化共发酵过程中，进行水稻全生物质发酵。这样一来，受污染水稻中的重金属离子都将进入到最后的发酵醪中，在其他步骤不产生重金属泄漏的基础上只需对所得的发酵醪进行集中化处理便可解决重金属污染水稻的处理问题。此外，如果全生物质发酵结束后发酵醪蒸馏所得的乙醇粗品中没有重金属超标的情况，便可继续精制成乙醇纯品，以此产生的经济效益便可回补一部分用于处理污染生物质时所投入的成本。本研究着重关注的是能否做到封闭式处理重金属污染水稻而不产生二次污染的问题，因此还需对整个全生物质炼制过程中的每个过程单元进行重金属含量的监测以及重金属总量的衡算，进而判断该过程能否做到重金属污染水稻的全封闭处理。

## 3.2 材料与方法

### 3.2.1 实验原料与酶制剂

由于实验条件有限，本研究中所用的水稻秸秆和稻米均未受到重金属的污染，所谓的重金属污染是我们通过人为地向这两部分生物质中各自添加一定量的含镉重金属盐（ $\text{CdSO}_4$ ）而模拟出来的，实际上原始的稻秆和稻米经测定后均未发现重金属镉的存在。本研究所用的无镉水稻秸秆原料产自江苏省盐城市，收获于 2015 年；而所用的无镉稻米则产自安徽省滁州市，收获于 2017 年。购买的水稻秸秆运至实验室后为保持其原始特性不经除尘处理而直接使用锤式粉碎机粉碎至圆直径为 10 mm 后装入透明塑料袋中以便进行常温存放。而稻米则通过磨粉机粉碎至 40-60 目左右，也被放入塑料袋中另行存放。分别取样并按照美国国家可再生能源实验室（NREL）对木质纤维素原料的组分测定方法<sup>[86-87]</sup>和灰分测定方法<sup>[88]</sup>来测定稻秆的具体组成。稻米的淀粉含量一般在 70-80%，但实验时需要准确的淀粉含量，这就需要借助双酶法<sup>[104]</sup>进行定量测定。在测定过程中具体用到了两种酶——耐高温淀粉液化酶 HTAA 和糖化酶 GA-L NEW。基本测定原理如下：先是通过这两种酶来实现待测稻米的充分液化糖化；然后测定糖化液中的葡萄糖总量并将其换算成淀粉总量；最后计算这部分淀粉质量占所用稻米质量的比例，此即淀粉含量。最终双酶法测得的稻米淀粉含量为 76.06%。

水稻秸秆在酶解糖化时所使用的纤维素酶 Cellic CTec 2.0 购买于诺维信（中国）生物技术有限公司，根据目前常用的 NREL 的滤纸酶活测定方法（LAP-006），测定结果显示该品种纤维素酶的滤纸酶活为 203 FPU/mL；再按照当前测定蛋白含量广泛使用的 Brandford 法对该纤维素酶的酶蛋白含量进行测定，结果显示 Cellic CTec 2.0 的酶蛋白含量为 87.31 mg/g。使用时纤维素酶本质上按照 10 mg 酶蛋白/g 纤维素的剂量添加进入所需的反应体系当中，但为实际操作时量取方便，在计算具体酶用量时通常换算为体积单位毫升后再加以取用。HTAA 和 GA-L NEW 均购买于杰能科（中国）生物工程有限公司，且这两种酶制剂的酶活分别为 21,000 U/mL 和 103,900 U/mL，使用之前所有酶制剂均存放在实验室的 4 °C 冰箱内进行妥善冷藏。

### 3.2.2 菌种与培养基

水稻秸秆经干酸预处理后会产生众多的抑制物组分，如果不将其移除的话势必会对本研究接下来的纤维素酶解糖化以及乙醇发酵过程造成非常消极的影响。因此，基于本实验室的条件，我们使用了一种煤油真菌——*Amorphotheca resinae* ZN1<sup>[48,49]</sup>，并采用快速固态生物脱毒的方式<sup>[49]</sup>，完成对预处理稻秆中抑制物成分的有效降解。

稻秆和稻米经适当处理后即可在发酵罐内进行全生物质乙醇发酵，此阶段所用的发酵菌株乃是一种可以适应高固含量的木质纤维素发酵体系并且还能实现葡萄糖和木糖综合利用的酿酒酵母——*Saccharomyces cerevisiae* XH7<sup>[89,90]</sup>。

种子培养基及水稻全生物质共发酵培养基的配方具体可参考 2.2.2 中的有关内容，需要注意的是：二级和三级种子培养基中所用到的快速生物脱毒物料均是脱毒后的预处理稻秆，结合纤维素酶的使用从而为酵母种子的生长繁殖提供必需的碳源。所有种子培养基及发酵培养基在配制完成后都需尽快进行灭菌处理，防止因杂菌生长提前消耗培养基内的营养物质而给后续的实验准确性带来不利影响。盛装种子培养基的三角瓶经高温灭菌处理后在超净台内进行接种和转接，操作完成后立刻使用无菌的 8 层纱布封住瓶口，并小心地置于 30 °C、200 rpm 的气浴摇床中进行培养。

### 3.2.3 干酸预处理

使用干酸预处理法对存放于塑料袋内的已粉碎稻秆进行预处理。简单而言，进行预处理操作之前需要预先测出所需的硫酸浓度并加以计算硫酸用量，而使用基准 pH 法微调后可知干重相当于 100 g 的原始稻秆实际需要 3.8 g 的硫酸，则酸液的浓度需要配制成 7.6% (w/w)，准确配制后混合均匀。然后打开蒸汽发生器的电源，从而为预处理过程提供所需的低压蒸汽，随后开启具备螺旋搅拌功能且工作容积为 20 L 的预处理反应器并通入蒸汽进行预热。预热完成后，将相当于 1200 g 干重的原始稻秆缓慢加入预处理反应器，同时小心加入一定量的酸液，使得反应器内总体固液质量比值为 1200:600。维持 50 rpm 的搅拌转速达 3 min 后，在预热温度的基础上继续加热至 175 °C，并维持 5 min。随后小心排出反应器内的气体（其中主要是蒸汽和 VM），卸除压力，便可进行放料操作。将从放料口放出的预处理稻秆物料置于室内进行短暂冷却，然后用一次性的聚乙烯（PE）塑料袋（50 cm\*60 cm、单面厚度 0.025 mm）进行装料、手工扎口（无需热封）。为防

止过重损坏塑料袋，每袋只装两千克左右的预处理稻秆（固含量 44.6%）。最后，将所有制备好的原料集中妥善放置于实验室内备用。

### 3.2.4 在位快速固态生物脱毒

本研究中的脱毒实验部分使用的是 *Amorphotheca resinae* ZN1 参与下的快速固态生物脱毒法。该脱毒菌种在木质纤维素类预处理原料体系中的优势以及在进行快速脱毒前我们需要做的准备具体可参考 2.2.8。不过，该脱毒过程与之前的生物脱毒过程有所不同，因为该脱毒过程是在位进行的，也就是说，预处理后的稻秆可以在一个反应器（发酵罐）内进行生物脱毒，酶解糖化和最终的乙醇 SSCF 过程，因此可以很大程度上减少了设备的投入。同时这也能避免重金属稻秆在多设备运行情况下进行物料转移时的丢失问题，从而避免二次污染产生。此外快速固态脱毒前后的预处理稻秆在可发酵糖的组成上变化不大，这得益于该脱毒菌种对秸秆内抑制物的优先代谢能力。待预处理后的稻秆在发酵罐内达到脱毒终点时停止通气，即可进行后续的酶解糖化过程。

### 3.2.5 预处理稻秆在位脱毒后的酶解糖化

待预处理后的稻秆在位脱毒完成后关闭通气装置，准备进行预糖化过程。无需将罐内的脱毒后稻秆取出作灭菌处理，直接开启搅拌装置及温控系统，并设置温度为 50 °C。一方面利用这较高的温度杀死脱毒物料中的 *Amorphotheca resinae* ZN1，另一方面也为纤维素酶提供适合的糖化反应温度。在该温度下维持一段时间后加入一定量的无菌水和纤维素酶 Cellic CTec 2.0，具体加入的水量根据糖化体系的固含量（30%）计算而来，而纤维素酶的实际添加量则依据脱毒秸秆的纤维素总量以及 10 mg 酶蛋白/g 纤维素的添加标准进行换算。在螺带搅拌桨的作用下，脱毒后稻秆与纤维素酶将接触得更加充分，从而促进糖化反应的进行。当预糖化时间达到 12 h 时，秸秆糖化液中已经有相当量的可发酵单糖，可以为接下来酿酒酵母参与的乙醇 SSCF 提供初步的碳源。

### 3.2.6 重金属污染稻米的处理方法

在本研究中所用的重金属污染稻米均被制备成水解液，并以补料的形式融入稻秆的乙醇 SSCF 当中。由于稻米的主要成分是淀粉（占比 70%-80%），因此耐高温淀粉液化酶和糖化酶作用后的稻米糖化液中便含有大量的可发酵单糖，从而可以为处在木质纤维素发酵体系中的酿酒酵母细胞额外提供来源于淀粉的葡萄糖。

基于实验室有限的条件，我们将稻米的液化和糖化过程安排在恒温水浴摇床中的三角瓶内进行。我们发现：高固含量的体系下，稻米很难在摇瓶中被液化糖化，这可能是在 90 °C 的高温液化条件下摇瓶内的水分蒸发严重，从而导致转化效果不佳。因此，为了使稻米充分水解从而让其中的重金属得到完全释放，我们选择将已粉碎至 40-60 目的大米制备成固含量为 15% (w/w) 的水解液。然而，尽管已知耐高温淀粉液化酶 HTAA 和糖化酶 GA-L NEW 各自的最适作用温度（分别为 90 °C 和 50 °C），但是具体的液化时间和糖化时间还有待探索，毕竟要保证稻米的充分转化，以便后期在发酵过程中 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 可以直接对稻米水解液中的葡萄糖进行利用。

### 3.2.7 重金属污染水稻的全生物质共发酵

利用稻秆和稻米进行共同发酵来生产生物乙醇，一方面可以为单独利用稻秆的乙醇 SSCF 过程提供额外的可发酵单糖，还能避免单独利用稻米时易产生的重金属二次污染问题。Ji 等<sup>[105]</sup>研究得出水稻草谷比（农作物废弃物与谷物的重量比）是 1.0。因此，我们需要确保使用一份的干稻秆就要使用一份的干稻米，这样就可以将重金属污染水稻的这两部分生物质全部加以利用，从而从源头上避免水稻生物质可转移部分的遗漏。

水稻全生物质共发酵的实验步骤可概括为以下几点。第一，依旧按照 30% (w/w) 的固含量在温度和搅拌转速为 50 °C 和 200 rpm 的情况下对预处理稻秆进行预糖化。第二，搅拌转速不变的情况下在预糖化阶段结束后将温度设置为 30 °C，从而开始利用冷却水对罐体进行降温，以满足发酵时酿酒酵母细胞对合适温度的需求。第三，在火焰保护的前提下开始向温度已经维持在 30 °C 的反应器内接入处于对数生长期的三级酵母种子液，并添加发酵过程所需的营养盐和水。第四，开启 pH 自控系统，使用 5 M NaOH 溶液对此时的发酵体系进行 pH 的调整，并最终使发酵液的 pH 值维持在 5.5 左右。第五，当发酵进行到 12 h 时，向罐体内一次性补加新鲜制备好的稻米水解液，调整体系 pH 为 5.5 后继续进行乙醇的发酵。第六，过程中进行多次取样，以方便把握发酵液中有关葡萄糖、木糖、乙醇、甘油、乙酸和菌体量等参数的变化。欲知发酵过程中酵母菌体量的变化，可采用平板菌落计数法进行离线参考，而所取样品中小分子物质的浓度则可利用高效液相色谱来分析完成。

### 3.2.8 全生物质发酵过程中乙醇得率的计算方法

在水稻的全生物质发酵过程中既用到了木质纤维素原料——水稻秸秆，也用到了淀粉类原料——稻米，因此该过程的乙醇得率不能再按照之前单纯利用秸秆进行发酵时所用的得率计算方法。由此，我们在 Zhang 等<sup>[94]</sup>总结的乙醇得率计算方法的基础上加入自己的理解并对原有公式做了些许改变，具体公式如下：

$$Yield(\%) = \frac{[Ethanol] \times W}{976.9 - 0.804 \times [Ethanol]} \times \frac{1}{0.511 \times \{ (M_{RS} \times [Solid] \times [Cellulose] + M_R \times [Amylose]) \times 1.111 + M_{RS} \times [Solid] \times [Xylose] \}} \times 100\% \quad (3-1)$$

[Ethanol]: HPLC 测定的发酵 96 h 时乙醇浓度, g/L;

W: 发酵罐内的所有液体质量之和, g;

[Cellulose]: 上罐所用预处理后稻秆的纤维素含量, g/g;

[Xylose]: 上罐所用预处理后秸秆的木单糖含量, g/g;

[Soild]: 上罐前的脱毒物料的固含量, g/g;

M<sub>RS</sub>: 上罐稻秆总质量, g;

M<sub>R</sub>: 上罐所用稻米的总质量, g;

[Amylose]: 该批稻米的淀粉含量;

976.9: 乙醇校正系数, 是用来校正质量浓度与体积浓度之间的转化, g/L;

0.804: 是无量纲因子, 用来计算发酵过程中水分的丢失;

0.511: 葡萄糖和木糖与乙醇的转化系数。酿酒酵母 XH7 均可利用这两种单糖;

1.111: 纤维素与葡萄糖的转化系数, 1 g 纤维素可水解生成 1.111 g 的葡萄糖;

### 3.2.9 发酵醪的后处理

重金属污染水稻的两部分生物质经初步处理后, 其中的重金属离子全部聚集于乙醇发酵后的发酵醪中。然而, 截至这一步我们才仅仅实现了初步利用污染生物质的目标, 因此最终的发酵液如何妥善处置而不产生二次污染才是本研究的重中之重。

我们采取以下几步对其进行处理。第一, 基于本实验的玻璃精馏装置将重金属污染水稻全生物质共发酵之后所产生的发酵醪液进行蒸馏, 回收一定量的生物乙醇。因为设施较为简陋且蒸馏操作有些许不当之处, 所以可能会对最终蒸馏所得液体样品中的乙醇纯度产生一定影响。第二, 将乙醇粗馏后剩留于反应釜内的液体部分全部转移至 105 °C 的烘箱中, 持续烘干至恒重。第三, 将烘干所得的固体残渣磨成粉末, 然后作灰化处理。灰化时所用的仪器是热重分析仪, 具备完善的温控系统和精准且耐高温的称重装置, 同时它还可与计算机相连, 因而可以实时地反映固体残渣粉末随温度而出现的质量变化。

### 3.2.10 水稻重金属污染的模拟及重金属的监测

由于重金属污染水稻等实验原料的不易获取以及有限实验条件的约束, 故而本研究所使用的皆是未受到重金属污染的原料。所谓的重金属污染乃是我们实验环节中人为造就的, 是一种只模拟一种重金属所造成的污染, 即: 初步处理未受到污染的稻秆和稻米时, 分别向其中加入一定量的重金属盐, 从而在稻秆的预处理阶段及稻米的液化阶段向总体的生物炼制过程中引入重金属离子。由于重金属镉 (Cd) 可以在环境中造成持久性的污染, 而且毒性非常之高 (通过多地的“镉米事件”便能见其一斑), 所以我们将其作为本研究中污染水稻生物质的唯一重金属污染源, 并以超富集植物积累重金属的含量标准 (100 mg/kg) 作参考然后换算为硫酸镉的用量进行添加。

稻秆中人为引入的重金属镉, 随后将逐步流向预处理、生物脱毒、预糖化、乙醇共发酵、乙醇粗馏和烘干灰化等阶段; 而稻米中的重金属污染源会先后进入液化、糖化、全生物质共发酵阶段, 然后暂时聚集于稻秆、稻米共同发酵的发酵醪液中。因此, 在对重金属镉的流动踪迹完全把握的基础上还应当对各阶段形成的物质进行质量的记录, 同时也应对每阶段产生的物质取样然后进行镉含量的检测。其中, 各阶段产生的物质的总质量可以轻松通过称重予以掌握, 但重金属镉的含量测定则稍显繁琐一些。不过, 依据 GB/T 5009.15 的标准方法再采用 Agilent 725 系列的 ICP-OES 等离子体发射光谱仪是完全可以实现快速且准确测定样品中的镉含量的。

### 3.2.11 小分子物质的定量分析

在组分测定、酶解糖化以及全生物质发酵等阶段均会产生大量的待测样品。这些液体样品中有许多可溶性的小分子物质, 并且每种样品主要包括可溶性糖类 (葡萄糖、木糖)、抑制物类 (乙酸、糠醛和 5-HMF)、甘油和乙醇等物质中的一类或若干类。这些

可溶性小分子物质的含量均采用 HPLC 进行定量的分析。所用的 HPLC 主要包括示差折光检测器（型号为 RID-10A）、HPX-87H 型色谱分析柱和 LC-20AD 色谱泵等装置。需要注意使用该 HPLC 进行检测时应严格遵循以下规定：运行时柱温需稳定维持在 65 °C，流动相是新鲜配制且已经过超声除泡的 5 mM 的硫酸溶液，流动相的运行流速为 0.6 mL/min，最后一针进样量控制为 20  $\mu$ L 且需确保进样针内的样品没有气泡的存在。

### 3.3 结果与讨论

#### 3.3.1 重金属污染水稻的全生物质炼制过程

在重金属污染的耕地里种植水稻势必会造成水稻的污染，由此会产生两部分具有潜在重金属污染扩散风险的生物质——稻秆和稻米。受污染的稻秆可以通过干法生物炼制过程实现安全的利用，但受污染的稻米一般没有很好的处置方式，因为如果对其单纯进行乙醇发酵必定会产生大量的含有重金属的酒糟残渣，因而具备很高的重金属扩散风险。图 3.1 展示了解决这一问题的研究思路。我们计划将稻米的利用整合到稻秆的发酵过程，这样不仅可以为稻秆的发酵提供额外的营养物质从而提高总体发酵乙醇的产量，还能从源头上切断重金属酒糟的生成路径。从最开始的含镉水稻生物质的进入至发酵结束后含镉发酵醪液的产生，并未产生任何重金属二次污染的路径。由此，只要做好最后安全处理含重金属发酵醪的收尾工作便能成功实现对重金属污染水稻的全生物质利用。最终通过先乙醇蒸馏再烘干灰化的方式将最初添加的重金属离子全部富集至最后的残渣内，由此达到了利用污染水稻生物质且不产生二次污染的目的。

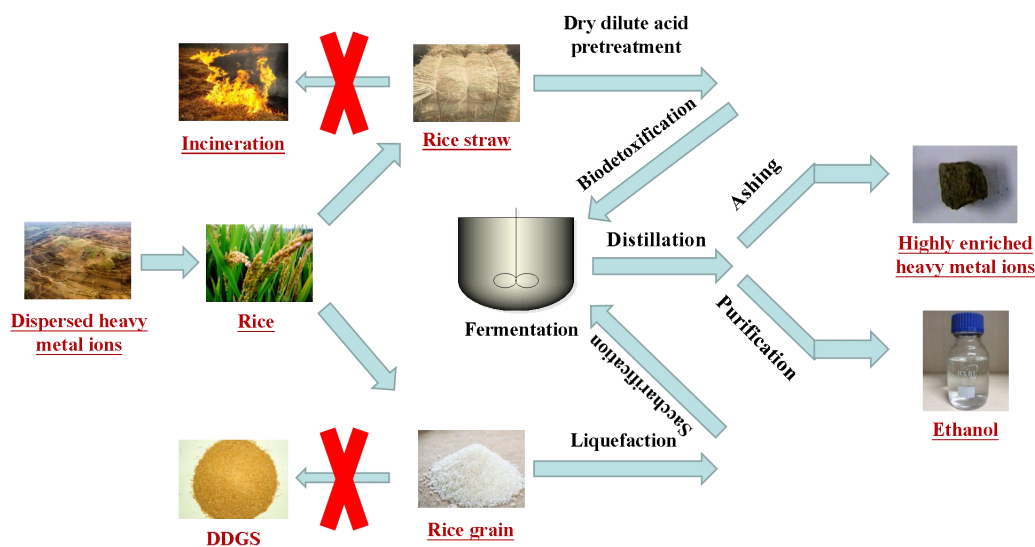


图 3.1 重金属污染水稻的全生物质炼制过程示意图

Fig. 3.1 Schematic diagram of whole-biomass refining process of rice contaminated by heavy metals

#### 3.3.2 稻秆预处理前后的组分变化

干酸预处理法借助低压蒸汽提供的高温（175 °C）和硫酸来打破木质纤维素原料的生物拮抗性。该预处理法主要移除木质纤维素中的半纤维素组分（表 3.1 中有关半纤维素组分的变化也可反映出），从而达到破坏木质纤维素本身稳定且致密的结构的目的，

并最终有利于后续过程对原料中可发酵糖的使用。原始的水稻秸秆经过干酸预处理后本身的半纤维素组分含量下降了 15.62%，其主要转化为木单糖和木寡糖，还有极少一小部分转化为阿拉伯糖、甘露糖等。原始的水稻秸秆经过干酸预处理后本身的半纤维素组分含量下降了 15.62%，转化的部分在固态预处理稻秆中的主要存在形式为木单糖（10.47%）和木寡糖（3.11%），还有极少一小部分转化为阿拉伯糖、甘露糖等（表中未显示）。而稻秆中的纤维素含量在预处理前后几乎不变，因为干酸预处理过程对纤维素的影响是非常弱的，仅有极少部分纤维素在高温且酸性的预处理环境下发生了降解，因而产生了占据预处理物料总质量 1.76%的葡寡糖和 2.60%的葡萄糖。此外，与诸多预处理方法相似的是：打破生物拮抗性的同时，也就不可避免地产生一些由木质纤维素组分过度降解而产生的可挥发降解产物（VM）。不加处理的话，它们是多种可以对酶解糖化和发酵等生物炼制中游过程造成恶劣影响的抑制物。比如脱乙酰基形成的乙酸，半纤维素过度降解产生的糠醛，纤维素组分降解过度产生的 HMF 等等。从表中可以得知预处理后稻秆中的糠醛、HMF 和乙酸的含量分别是  $4.41 \pm 0.76$ ， $4.24 \pm 0.66$  和  $13.80 \pm 1.50$  mg/g 干稻秆，参照实验室前人的相关研究数据<sup>[106]</sup>，对比之下发现该批预处理后稻秆中的 HMF 含量相对较高。我们推测出现这种结果是因为前人使用的相关秸秆原料经过了水洗等除尘步骤，从而在一定程度上淘汰了原始秸秆原料中本身存在的一些水溶性六碳糖，因而水洗秸秆在干酸预处理时这部分被淘汰的六碳糖便幸免于被过度降解成 HMF。而我们所用的这批水稻秸秆原料在预处理前依旧保持着原始特性，原料中的水溶性六碳糖含量仍是原来的水平，因而也可参与过度降解成 HMF 的过程，因此预处理之后其 HMF 含量相对偏高。

表 3.1 水稻秸秆预处理前后的组分含量

Table 3.1 Components of rice straw before and after pretreatment

|               | Polysaccharides (%) |               | Oligosaccharide (mg/g DM)  |                             | Monosaccharides (mg/g DM) |               | Inhibitors (mg/g DM) |             |              |
|---------------|---------------------|---------------|----------------------------|-----------------------------|---------------------------|---------------|----------------------|-------------|--------------|
|               | Cellulose           | Hemicellulose | Glu-oligomers <sup>a</sup> | Xylo-oligomers <sup>b</sup> | Glucose                   | Xylose        | Furfural             | HMF         | Acetate      |
| Raw RS        | 33.65 ± 0.05        | 19.70 ± 0.23  | —                          | —                           | —                         | —             | —                    | —           | —            |
| Pretreated RS | 34.93 ± 0.90        | 4.08 ± 1.21   | 17.63 ± 1.33               | 31.05 ± 2.40                | 26.01 ± 0.17              | 104.73 ± 0.24 | 4.41 ± 0.76          | 4.24 ± 0.66 | 13.80 ± 1.50 |

重金属污染稻秆的干酸预处理条件及参数：3.8% (w/w) 的硫酸用量，175 °C 下维持 5 min，搅拌桨搅拌转速 50 rpm。(a) 葡寡糖含量；(b) 木寡糖含量。

### 3.3.3 重金属污染稻米的酶解条件

该批重金属污染后的稻米仍然属于淀粉类生物质，其淀粉含量高达 76.01%，因此充分水解后的水解液中将含有大量的可发酵糖。稻米的液化和糖化过程安排在恒温水浴摇床中的三角瓶内进行。然而高固含量体系下，稻米很难在三角瓶中被液化，更不用说完全糖化，而且如若将未水解完全的稻米水解液补入稻秆的乙醇 SSCF 的体系中的话，液化酶和糖化酶的作用效果必然比较微弱，因此发酵结束后的稻米转化率必然很低。此外，实际情况下的重金属污染稻米如若不能被完全水解，本身的重金属离子便很难完全释放出来，从而具备着二次污染的风险。因此，基于以上论述，在三角瓶内制备的高固含量的稻米水解液将不符合全生物质安全利用的概念。进行了部分水解实验，我们最后选择制备固含量为 15% 的稻米水解液。这样的话，该体系下的稻米不仅几乎得到了完全的水解，而且最后水解液中浓度不至于过高的葡萄糖对发酵菌种的渗透压影响也很小，同时也不会因过度稀释稻秆的发酵体系而对最后的乙醇发酵指标造成太大影响。然而尽管已知耐高温淀粉液化酶 HTAA 和糖化酶 GA-L NEW 的合适作用温度（分别为 90 °C 和 50 °C），但是具体的液化时间和糖化时间还有待探索，毕竟要确保所用稻米的充分转化从而避免给全生物质发酵过程带来不便。

由此，我们对低固含量（质量分数 15%）的稻米水解液的制备条件进行了探究，包括粉碎后的稻米在液化阶段的时间的控制以及随后糖化时间的确定。如图 3.2 (a) 显示了不同液化时间和糖化时间组合后的 15% (w/w) 稻米水解液的葡萄糖浓度。从该图中我们可以看出：稻米在相同糖化时间（5 h）但前期液化时间不同时（30 min 和 60 min）的糖浓度差异不太明显（71.6 g/L vs 80.6 g/L），但稻米经过相同液化时间（30 min）但后续糖化时间不同时（5 h 和 24 h）的糖浓度差异却特别明显（111.5 g/L vs 113.1 g/L），由此说明了液化时间基本满足（30 min）的前提下，糖化时间的长短对最后水解液的糖浓度高低起决定性作用。因此下一步着重展开对稻米液化后的糖化时间进行探究。

稻米在 90 °C 液化 0.5 h 后使其自然降温然后将水浴摇床温度设置为 50 °C，等待温度恒定后，加入糖化酶进行糖化反应。起初糖化时间为 5~27 h，继而又延长至 48 h，在此期间多次取样，最后借助 HPLC 分析比较不同酶解程度的样品中的葡萄糖浓度，结果如图 3.2 (b) 所示。可以看出在糖化 5~23 h 期间水解体系的糖浓度明显升高，但 23 h 之后糖浓度却增加非常缓慢（23~48 h 的糖浓度区间为 121~129 g/L），并且通过计算，在 23 h 稻米中淀粉向葡萄糖的转化率已达 93%，这充分地说明此时液化后的稻米已经基本糖化完全，因此过多延长糖化时间没有实际意义。由于后续需要将稻米水解液整合入稻秆的乙醇发酵中，所以为了实验时间安排的方便，我们将糖化时间确定为 24 h。

因此，全生物质发酵补料阶段所用的 15% (w/w) 稻米水解液的具体制备方法是：先将一定量的粉碎大米在 90 °C 条件下加入 HTAA 液化 0.5 h，再在 50 °C 下加入 GA-L NEW 糖化 24 h，其中液化酶用量按 5 U/g 干米粉，糖化酶用量按 37.5 U/g 干米粉进行添加。

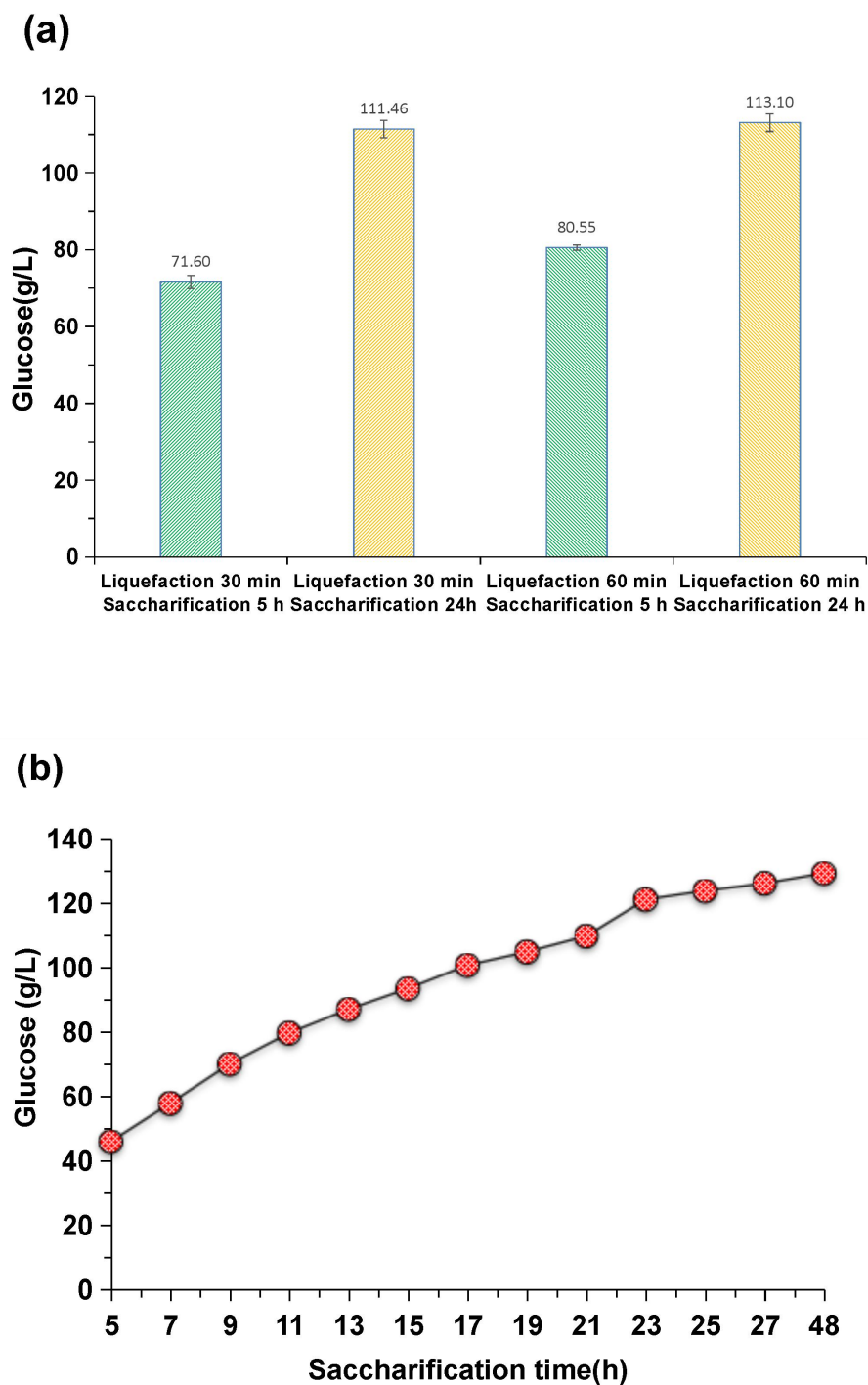


图 3.2 重金属污染稻米的液化和糖化时间探究

Fig. 3.2 Study on liquefaction and saccharification time of heavy metal contaminated rice

(a) 不同液化时间和糖化时间组合后的 15% (w/w) 稻米水解液的葡萄糖浓度；  
(b) 15% (w/w) 的体系下液化 0.5 h 后的稻米在不同糖化时刻的葡萄糖浓度  
稻米的酶水解条件：均为 15% 的体系固含量，液化时反应温度为 90 °C，耐高温淀粉液化酶 HTAA 添加标准 5 U/g 干米粉，糖化时反应温度 50 °C，糖化酶 GA-L NEW 添加标准 37.5 U/g 干米粉。

### 3.3.4 重金属污染水稻的全生物质发酵过程

我们发现在单独利用稻米的乙醇同步发酵时中,会产生富集大量重金属的发酵醪(酒糟),如若被非法用作动物饲料或食品营养剂,将会造成非常严重的重金属二次污染问题,从而威胁人类的身体健康。所以为了避免产生这种威胁,我们基于干法生物炼制过程对受重金属污染的稻秆和稻米进行全生物质的利用。具体的利用方法是将稻米进行液化、糖化处理,制备成水解液,然而将其以补料的形式整合至稻秆的乙醇同步糖化共发酵过程当中,从而从根本上避免稻米单独发酵后重金属酒糟的出现。然而,该补多少料和何时补入均是值得考虑的问题。

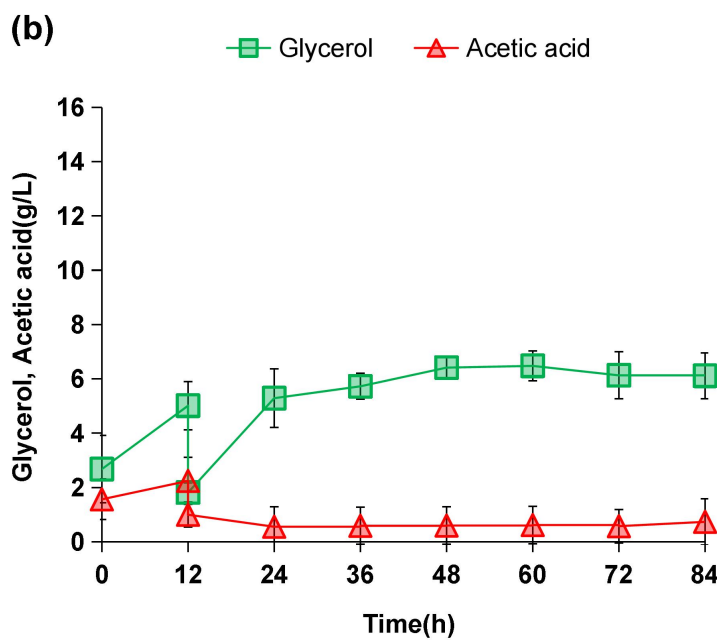
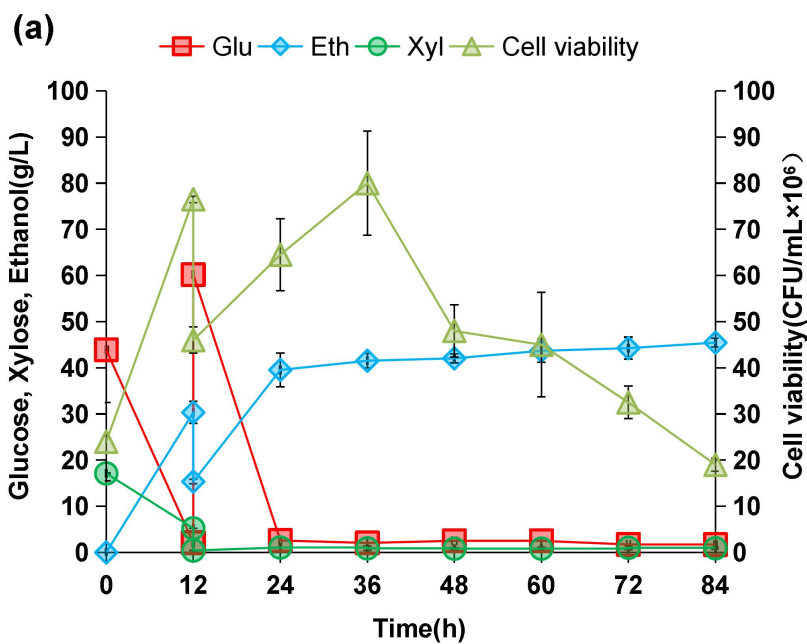
首先考虑补料多少的问题。全生物质发酵是对重金属污染稻秆和稻米综合利用的集中体现形式,我们必须确保稻秆 SSCF 体系所用干稻秆的质量与稻米水解液所用干稻米的质量之比必须和水稻的草谷比保持一致,才能使重金属污染水稻的生物质全部得到利用,才能避免由于受污染生物质的遗漏而造成二次污染。我们已知水稻的草谷比是 1:1,因此每次全生物质发酵过程所用干稻秆和干稻米的质量比保持为 1:1。

通常来说,以木质纤维素原料为基础的乙醇 SSCF 体系均可在初始阶段(接种 0-12 h 左右)产生许多泡沫,从而导致罐内的液面在短时间内快速上升。这是因为该期间发酵液中的酿酒酵母细胞正处在代谢活力非常旺盛的对数生长期,正从发酵液中大量地摄取秸秆糖化后所产生的可发酵单糖用于自身的生长、代谢、繁殖以及乙醇的生产。所以,此时段细胞对糖的消耗速率相对于其他时期而言最高。这一点还可以通过观察图 3.3 中分别表示细胞活力(以 CFU 表征)和乙醇浓度的曲线走势得以证实。通过观察图 3.3(a)、(c)内表示葡萄糖浓度的曲线,可以看出在开始发酵的短短 12 h 内,之前稻秆糖化产生的葡萄糖基本已被消耗殆尽。发酵液中虽然还残留一些木糖,纤维素酶也能在发酵过程中缓慢水解未糖化完全的秸秆产生的一些可发酵单糖,但这仍然不能满足酵母细胞对糖的需求,极大地限制了细胞生产乙醇的能力。这一点从发酵 12 h 之后的乙醇合成速率变得愈来愈慢看出。因此我们在接种后 12 h 的这个时刻向正在进行稻秆发酵的体系中补入额外的碳源物质(含有大量葡萄糖的新鲜稻米水解液),目的是削弱了这种由于糖匮乏而对乙醇生产造成的不利影响,从而有助于提高最终的乙醇产量。

基于以上论述,我们在水稻的全生物质发酵阶段进行了两类共发酵实验。第一种是 15% (w/w) 固含量稻秆体系预糖化 12 h 后接入酿酒酵母 XH<sub>7</sub>,发酵 12 h 后补加 15% (w/w) 固含量大米糖化液,共同发酵 84 h,其相关发酵参数如图 3.3(a)、(b)所示;第二种是 30% (w/w) 固含量稻秆体系预糖化 12 h 后接入酿酒酵母 XH<sub>7</sub>,发酵 12 h 后补加 30% (w/w) 固含量大米糖化液,共同发酵 84 h,其相关发酵参数如图 3.3(c)、(d)所示。

进行第一类发酵实验是为了验证了重金属污染水稻进行全生物质发酵的可行性以及具备一定的乙醇发酵能力。至于进行第二类共发酵实验,主要有以下两

点原因：其一，相对于低固含量的发酵体系，较高固含量的发酵体系具有一定优势，即可以提高对重金属污染生物质原料的处理效率；其二，适当提高发酵体系的固含量无疑能够提高最终发酵液中乙醇的浓度有助于降低乙醇精馏的成本，毕竟从低乙醇浓度的发酵液中蒸馏乙醇的能耗成本很高。第二类全生物质发酵在发酵终点（84 h）的时候获得了相对理想的乙醇指标（56.3 g/L），此时的乙醇得率为 86.71%，可见此次全生物质发酵过程中稻秆和稻米的转化率很高。另外从 CFU 的下降趋势来看，在发酵的中后期还是无法逃避因为发酵环境逐渐恶劣而导致酵母细胞大量死亡的现实，所以最终发酵液中还是残留了少许葡萄糖和木糖（浓度分别为 3.95 g/L 和 1.78 g/L）。



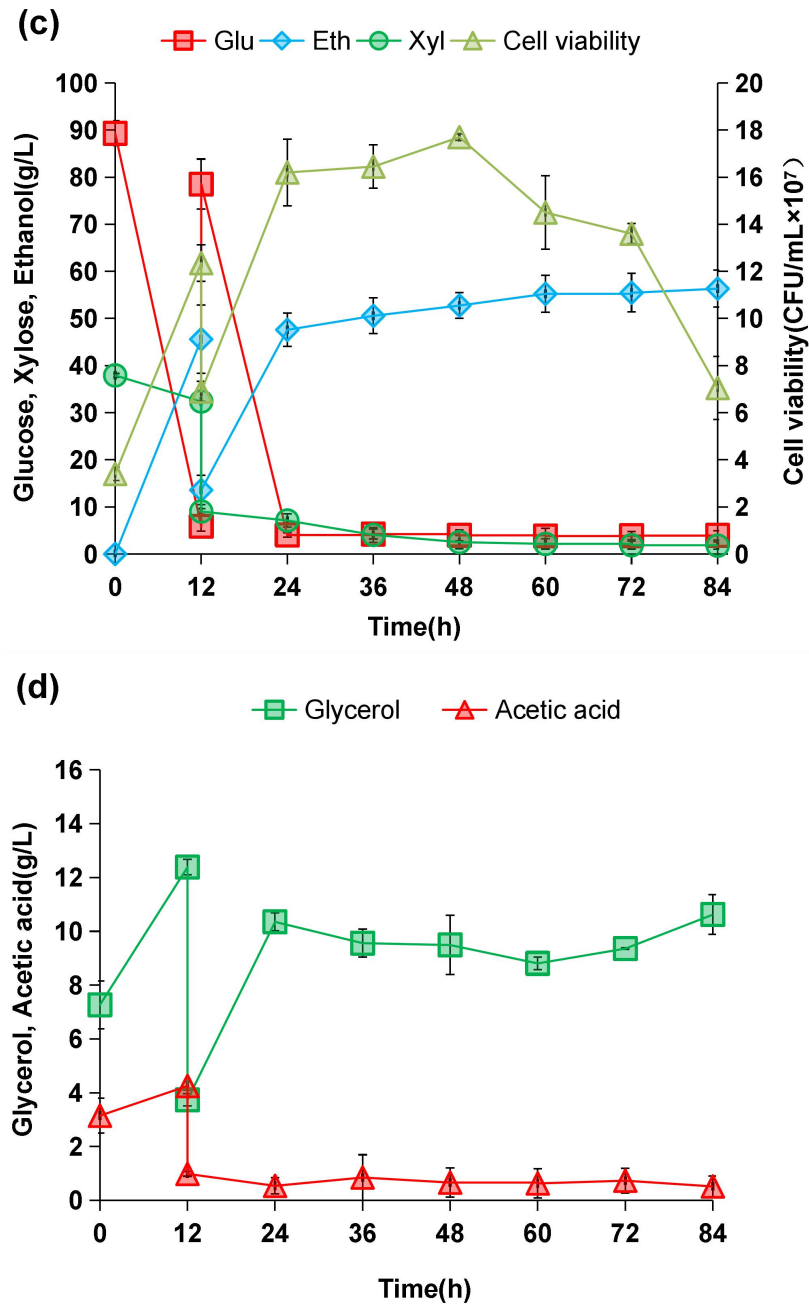


图 3.3 重金属污染水稻全生物质发酵性能评估

Fig.3.3 Ethanol fermentability evaluation of the whole biomass of rice contaminated by heavy metal

(a) 全生物质发酵 (15% (w/w) 稻秆加 15% (w/w) 稻米) 过程中葡萄糖、木糖、乙醇和 CFU 的变化; (b) 全生物质发酵 (15% (w/w) 稻秆加 15% (w/w) 稻米) 过程中甘油、乙酸的变化; (c) 全生物质发酵 (30% (w/w) 稻秆加 15% (w/w) 稻米) 过程中葡萄糖、木糖、乙醇和 CFU 的变化; (d) 全生物质发酵 (30% (w/w) 稻秆加 15% (w/w) 稻米) 过程中甘油、乙酸的变化

乙醇共发酵条件: 10 FPU/g 干秸秆的纤维素酶用量, 50 °C 预糖化反应温度, 12 h 预糖化反应时间, 20% (v/v) 接种量, 30 °C 发酵温度, 5.5 发酵 pH, 接种后发酵 12 h 开始补加 15%

(w/w) 稻米水解液, 84 h 总发酵时间, 200 rpm 搅拌转速。

### 3.3.5 全生物质炼制过程关于重金属镉的质量衡算

全生物质发酵过程后, 重金属污染水稻中的镉离子全部汇聚至发酵液中, 并且再经过乙醇蒸馏之后, 镉离子全部汇聚至发酵醪残液中。因此, 最终如何妥善处理蒸馏后的发酵醪残液使其不产生重金属二次污染问题则是本研究需要解决的关键问题之一。由此我们全程跟踪了重金属镉在水稻全生物质炼制过程中的足迹, 并测定每个阶段所产生物质的镉含量, 然后进行镉的质量衡算, 结果如图 3.4 所示。可以看出从稻秆、稻米原料的分别处理到两者的整合, 再到最终的发酵醪的处理, 整个过程中重金属镉的总量基本保持不变, 同样没有出现重金属二次污染的现象。此外, 使用 Agilent 725 系列 ICP-OES 等离子体发射光谱仪对蒸馏出的乙醇粗品(乙醇质量分数在 80%左右)进行镉含量的测定后发现该样品中镉的浓度远远小于 0.010 mg/L (该仪器对镉离子的检出限), 这预示着含有大量重金属镉的发酵醪在乙醇蒸馏后, 镉并未进入蒸馏得到的乙醇粗品中, 因而进一步精馏除去其中的杂醇便与正常的生物乙醇产品无异。对比初始稻秆和稻米中的镉元素含量(分别为  $96.0 \pm 3.9$  mg/kg 和  $106.6 \pm 1.4$  mg/kg)与最终经热重分析仪灰化后所得的灰分中的镉元素含量( $345.0 \pm 21.2$  mg/kg), 可以发现被重金属污染后的水稻生物质经过全生物质炼制过程后, 重金属镉的富集倍数达到了 3 倍左右。因此, 该全生物质炼制过程成功实现了重金属污染水稻生物质的全封闭处理, 同时对镉污染水稻生物质中的重金属镉也进行了有效且完全的富集, 此外还能安全地利用受镉污染的水稻生物质进行发酵并取得了较为理想的乙醇指标。

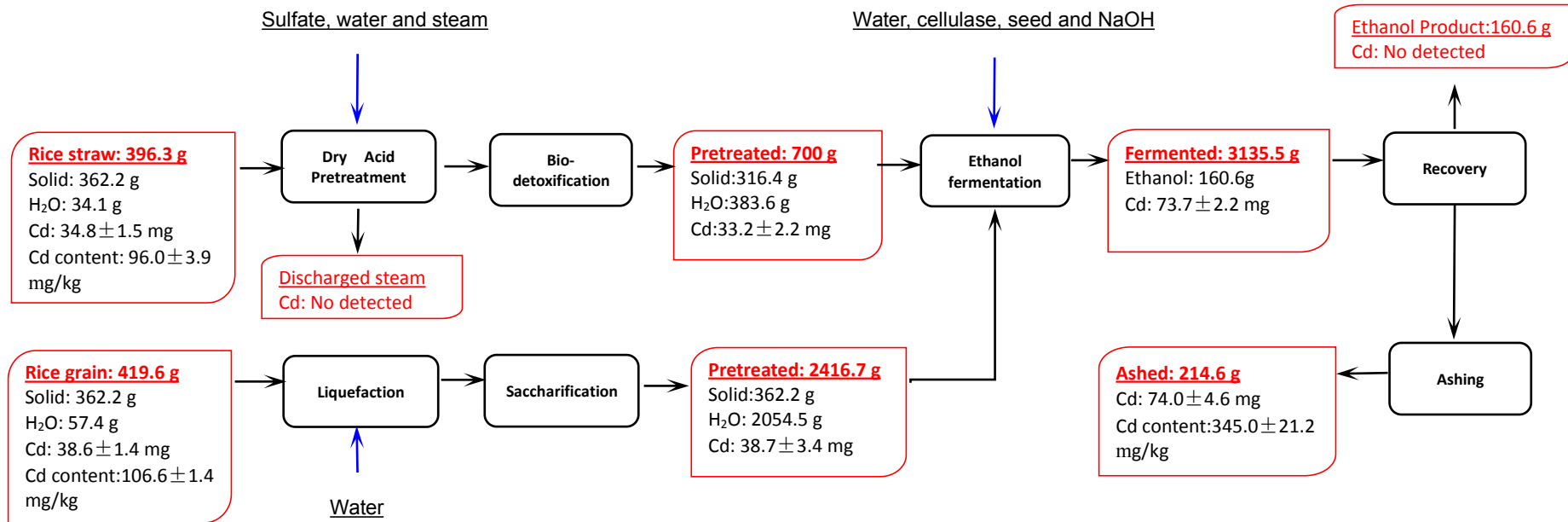


图 3.7 全生物质炼制过程中有关重金属镉的质量衡算

Fig. 3.7 Mass balance of cadmium during the whole-biomass biorefining process

### 3.4 小结

(1) 本研究基于干酸预处理技术和干法生物炼制技术的应用开创了一种全生物质炼制的方法，并成功实现了重金属污染水稻生物质的安全有效地资源化应用。通过将受污染稻米制备成水解液并以补料的方式整合至稻秆的乙醇 SSCF 中进行全生物质共同发酵，成功从源头避免了单独利用稻米而导致的重金属酒糟的产生。全生物质发酵阶段达到了较为理想的乙醇指标 (56.3 g/L)，并且乙醇蒸馏后得到的乙醇产品是绿色无镉的，因而可以产生一定的经济效益。

(2) 对全生物质炼制过程中的每一环节进行镉含量的监测，然后以质量衡算的形式分析判定该过程中重金属镉的总量有无变化，结果发现最初重金属污染稻秆和稻米中的重金属镉最终全部富集到烘干灰化后的灰分当中，富集倍数达 3 倍之多，有利于重金属镉的进一步回收。

(3) 基于干法生物炼制技术的全生物质炼制过程是从生物炼制的角度出发来解决重金属污染生物质难处理和难利用问题的，可以为今后有关土壤重金属污染的治理和相应受污染生物质的处置问题提供一定的参考。

## 第 4 章 结论与展望

### 4.1 结论

农作物秸秆等木质纤维素原料的供应极大地受制于秸秆原料的收集周期,所以木质纤维素原料的长期储存对于生物基化学品的大规模开发非常重要。另外,如何安全地资源化利用受重金属污染的生物质原料也尤为重要。本文着重开展了广地域多品种木质纤维素原料的长期储存以及重金属污染生物质原料能源化应用的研究,并以干酸预处理技术为切入点,研究了干酸预处理后的三种农作物秸秆在我国秸秆主产区的多种地域环境下进行长期储存的可行性,以及基于该处理技术的全生物质炼制对重金属污染水稻生物质进行全封闭能源化应用的可行性。取得了许多有利的进展,现将主要的成果及重要的结论总结如下:

(1) 干酸预处理后的作物秸秆其抗霉变性能非常优良,能够在中国多种地域环境以及长达一年的时间内实现自身的稳定储存,因此这样的先干酸预处理再进行长期储存的方式是可以成功规避染菌风险的;干酸预处理之后,秸秆原料的堆积密度和振实密度明显提高,并且储存期间原料的密度性质还在缓慢发生着积极的变化,因此这种原料运输密度的提高非常有助于降低原料供应过程中总体运输的成本;干酸预处理原料在储存期间的抑制物组分含量发生了非常显著的降低,有助于节约后续生物脱毒的时间成本;干酸预处理秸秆原料在长期储存期间的多糖组分含量变化不大,最终的乙醇发酵性能也基本保持稳定(发酵 84 h 后的乙醇浓度介于 60-70 g/L)。因此,干酸预处理技术的应用,能够成功解决木质纤维素类原料储存周期短、运输密度低等问题,最终从木质纤维素类原料稳定供应的角度为商业纤维素乙醇生物炼制工厂的常年稳定运行给予一定的参考。

(2) 通过包括干酸预处理技术的干法生物炼制过程,可以率先实现对重金属污染稻秆的安全无害化处理,随后以全生物质共同发酵的方式,成功从源头避免了单独利用稻米而导致的重金属酒糟的产生,同时也取得了较为理想的乙醇指标(56.3 g/L),由此产生的经济效益有助于污染生物质处理成本的回补;全生物质炼制的过程中没有重金属二次污染的情况,最初重金属污染稻秆和稻米中的重金属镉最终全部富集到烘干灰化后的灰分当中,富集倍数达 3 倍之多,这为后续重金属的完全回收创造了有利条件。基于干法生物炼制技术的全生物质炼制研究是从生物炼制的角度出发来解决重金属污染生物质难处理和难利用问题的,可以为今后有关土壤重金属污染的治理和相应受污染生物物质的处置问题提供一定的参考价值。

### 4.2 展望

本文在干酸预处理技术的应用前提下为木质纤维素类原料的长期储存和重

金属污染生物质的处理问题提供了解决之道。在研究的过程中，某些操作的普适性以及在未来工艺的放大上或多或少存在着不足之处。因此为面对未来实际应用时可能遇到的挑战，现进行后续的展望：

(1) 按照长期储存测试研究所得的数据，干酸预处理后的秸秆原料在储存期间自身的糠醛含量下降了 78.66%-96.76%，5-HMF 则下降了 48.08%-68.02%。抑制物组分的减少对于后续的利用过程确实有利，但也应考虑抑制物的挥发在实际储存过程中可能带来的风险。所以在进行干酸预处理原料的大规模长期储存时不加控制地让有毒抑制物组分自由地挥发至空气中，是否会对周围的环境造成不良的影响是需要调查清楚的。如若由于其挥发导致空气中的抑制物含量超标，则必须要采取一定的应对措施，如安排抑制物组分的吸收装置以及对空气中抑制物浓度的有效监测等。

(2) 在重金属污染的耕地里种植粮食类作物势必会造成相应粮食的重金属污染，但起初这种污染并不容易被人们所察觉，因此完善的土壤重金属污染监测体系是需要尽快落实的。此外，要想解决耕地土壤的重金属污染问题单单做好对已污染的耕地和生物质的治理工作是远远不够的，因为从长远来看此举顶多只能起到扬汤止沸的效果，解决不了重金属污染的根本问题。因此，最重要的是要竭力找出重金属污染源并进行严肃处理，因为从源头治理才能有效遏制重金属污染源的继续流入和二次扩散。因此，殷切希望未来有更多的学者投入到重金属污染源的治理工作中。只有共同做好源头整治和地方治理工作，才能有效阻止重金属污染形势的进一步恶化。

## 参考文献

- [1] International Energy Agency. Key world energy statistics. Available from: [http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/key\\_world\\_energy\\_stats-1.pdf](http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/key_world_energy_stats-1.pdf). 2011.
- [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] Bruhwiler LMP, Petron G, Hirsch AI, et al. 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, et al. Observational determination of surface radiative forcing by CO<sub>2</sub> from 2000 to 2010. *Nature*. 2015, 519(7543 ):339-343.
- [6] Aliyu A K, Modu B, Tan C W. A review of renewable energy development in Africa: A focus in South Africa, Egypt and Nigeria. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2018, 81(pt.2):2502-2518.
- [7] Turner, J A. A Realizable Renewable Energy Future. *Science*. 1999, 285(5428):687-689.
- [8] Lund H. Renewable energy strategies for sustainable development. *Energy*. 2007, 32(6):p.912-919.
- [9] 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.
- [10] Li G, Shrotriya V, Huang J, et al. High-efficiency solution processable polymer photovoltaic cells by self-organization of polymer blends. *Nature Materials*. 2005, 4(11): 864-868.
- [11] Heier S. Grid Integration of Wind Energy Conversion System. *Renewable Energy*. 2000, 21(3-4):12-14.
- [12] Ragauskas AJ. The Path Forward for Biofuels and Biomaterials. *Science*. 2006, 311 (5760):484-489.
- [13] Ribeiro B E, Quintanilla M A. Transitions in biofuel technologies: An appraisal of the social impacts of cellulosic ethanol using the Delphi method, *Technological Forecasting & Social Change*. 2015, 92: 53-68.
- [14] 栗鸿源.《生物质能发展“十三五”规划》公布. *中国矿业报*, 2016-12-06(002).
- [15] Knauf M, Moniruzzaman M. Lignocellulosic biomass processing: a perspective.

- International Sugar Journal. 2004, 106(1263): 147-150.
- [16] Arantes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3(1): 4.
- [17] 郭冬生, 黄春红. 近 10 年来中国农作物秸秆资源量的时空分布与利用模式. *西南农业学报*. 2016, v.29(04):234-240.
- [18] Qiu HG, Sun LX, Xu XL, et al. Potentials of crop residues for commercial energy production in China: A geographic and economic analysis. *Biomass and Bioenergy*. 2014, 64: 110-123
- [19] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*. 2008, 2, 26-40.
- [20] Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012, 38(4): 522-550.
- [21] Zhu J Y, Wang G S, Pan X J, et al. Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification. *Chemical Engineering Science*. 2009, 64(3): 474-485.
- [22] Barakat A, de Vries H, Rouau X. Dry fractionation process as an important step in current and future lignocellulose biorefineries: A review. *Bioresource Technology*. 2013, 134: 362-373.
- [23] Bussemaker MJ, Zhang D. Effect of ultrasound on lignocellulosic biomass as a pretreatment for biorefinery and biofuel applications. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2013, 52: 3563-3580.
- [24] Sasmal S, Goud VV, Mohanty K. Ultrasound assisted lime pretreatment of lignocellulosic biomass toward bioethanol production. *Energy & Fuels*. 2012, 26: 3777-3784.
- [25] Wei W, Wu S, Liu L. Enzymatic saccharification of dilute acid pretreated eucalyptus chips for fermentable sugar production. *Bioresource Technology*. 2012, 110: 302-307.
- [26] Kim JS, Lee YY, Kim TH. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2016, 199:42-48.
- [27] Devendra L P, Pandey A. Hydrotropic pretreatment on rice straw for bioethanol production. *Renewable Energy*, 2016, 98: 2-8
- [28] 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*. 2005. 96, 1967-1977.
- [29] Saha BC, Iten LB, Cotta M.A, et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. *Process Biochemistry*. 2005, 40, 3693-3700.
- [30] Wyman C, Dale B, Elander R, et al. Coordinated development of leading biomass

- pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96, 1959-1966.
- [31] Phaiboonsilpa N. Chemical conversion of lignocellulosics as treated by two step semi-flow hot-compressed water. Graduate School of Energy Science, Doctoral Dissertation, Kyoto University, Kyoto, Japan, 2010.
- [32] Asada C, Sasaki C, Uto Y, et al. Effect of steam explosion pretreatment with ultra-high temperature and pressure on effective utilization of softwood biomass. *Biochemical Engineering Journal*. 2012, 60: 25-29.
- [33] Li BZ, Balan V, Yuan YJ, et al. Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 1285-1292.
- [34] Kurakake M, Ide N, Komaki T. Biological pretreatment with two bacterial strains for enzymatic hydrolysis of office paper. *Current Microbiology*. 2007, 54(6): 424.
- [35] Salvachúa D, Prieto A, López-Abelairas M, et al. Fungal pretreatment: An alternative in second-generation ethanol from wheat straw. *Bioresource Technology*. 2011, 102(16): 7500-6.
- [36] Eggeman T, Elander R T. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96(18): 2019-25.
- [37] 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.
- [38] Yoo CP, X. Pretreatment of lignocellulosic feedstocks. In: Li YK, S.K., ed. *Bioenergy: principles and applications*. Blackwell, Hoboken: Wiley, 2016.
- [39] 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: 4480-4488
- [40] 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.
- [41] 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
- [42] Liu G, Zhang Q, Li HX, et al. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018, 115:60-69.
- [43] Shao S, Zhang J, Hou WL, et al. Lower pressure heating steam is practical for the distributed dry dilute sulfuric acid pretreatment. *Bioresource Technology*. 2017, 238:

744-748

- [44] Zhang J, Shao S, Bao J. Long term storage of dilute acid pretreated corn stover feedstock and ethanol fermentability evaluation. *Bioresource Technology*, 2016, 201, 355-359
- [45] Palmqvist E, Hahnhägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 2000, 74(1): 25-33.
- [46] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2011, 31(1): 20
- [47] Klinke HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pretreatment of biomass. *Applied Microbiology & Biotechnology*. 2004, 66:10-26.
- [48] Zhang J, Zhu ZN, Wang XF, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3:26
- [49] 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, 9:19
- [50] Jorgensen H, Kristensen JB, Felby C: Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioproducts & Biorefining*. 2007, 1:119-134.
- [51] Jing X, Zhang X, Bao J: Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Applied Biochemistry Biotechnol*. 2009, 159:696-707.
- [52] Larsson S, Reimann A, Nilvebrant NO, Jönsson LJ: Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulose hydrolyzates of spruce. *Applied Biochemistry Biotechnol*. 1999, 77-79:91-103.
- [53] 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 and Bioenergy*. 2014, 62: 222-227.
- [54] Li H, Chen H. Detoxification of steam-exploded corn straw produced by an industrial-scale reactor. *Process Biochemistry*. 2008, 43: 1447-1451
- [55] Martinez A, Rodriguez M E, York S W, et al. Effects of Ca(OH)<sub>2</sub> treatments ("overliming") on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000, 69(5): 526-536.
- [56] Ranatunga TD, Jervis J, Helm RF, et al. The effect of overliming on the toxicity of dilute acid pretreated lignocellulosics: the role of inorganics, uronic acids and ether-soluble

- organics. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 27: 240-247.
- [57] Nilvebrant NO, Reimann A, Larsson S, et al. Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resins. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2001, 91-93: 35-49.
- [58] Zhuang J, Liu Y, Wu Z, et al. Hydrolysis of wheat straw hemicellulose and detoxification of the hydrolysate for xylitol production. *BioResources*. 2009, 4: 674-686.
- [59] Palmqvist E, Hågerdal-H, Gerdal B, et al. Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment[J]. *Enzyme & Microbial Technology*, 1997, 20(4):286-293.
- [60] Chandel A K, Silva S S D, Singh O V. Detoxification of Lignocellulose Hydrolysates: Biochemical and Metabolic Engineering Toward White Biotechnology. *Bioenergy Research*, 2013, 6(1): 388-401.
- [61] Hong Ran, Jian Zhang, Qiuqiang Gao, et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resiniae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7:51.
- [62] Yi X, Gao QQ, Zhang L, et al. Heterozygous diploid structure of *Amorphotheca resiniae* ZN1 contributes efficient biotransformation on solid pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels*. 2019: 12:126.
- [63] Lynd LR, Laser MS, Bransby D. How biotech can transform biofuels. *Nature Biotechnology*. 2008, 26: 169-172.
- [64] Lynd LR, Liang X, Bidy MJ, et al. Cellulosic ethanol: status and innovation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2017, 45, 202-211.
- [65] Liu G, Bao J. Constructing super large scale cellulosic ethanol plant by decentralizing dry acid pretreatment technology into biomass collection depots. *Bioresource Technology*. 2019, 275:338-344
- [66] Caputo AC, Palumbo M, Pelagagge PM, et al. Economics of biomass energy utilization in combustion and gasification plants: effects of logistic variables. *Biomass and Bioenergy*. 2005, 28: 35-51.
- [67] Hess JR, Wright CT, Kenney KL. Cellulosic biomass feedstocks and logistics for ethanol production. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. 2007, 1, 181-190.
- [68] Jin MJ, Bothfeld W, Austin S, et al. Effect of storage conditions on the stability and fermentability of enzymatic lignocellulosic hydrolysate. *Bioresource Technology*. 2013, 147: 212-220.
- [69] Eranki PL, Bals BD, Dale BE. Advanced regional biomass processing depots: a key to the logistical challenges of the cellulosic biofuel industry. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2011, 5: 621-630.

- [70] Bals BD, Dale BE. Developing a model for assessing biomass processing technologies within a local biomass processing depot. *Bioresource Technology*. 2012, 106: 161-169.
- [71] 陈能场, 郑煜基, 何晓峰等. 全国土壤污染状况调查公报. *中国环保产业*, 2014, 000(005):10-11.
- [72] 钟秀明, 武雪萍. 我国农田污染与农产品质量安全现状、问题及对策. *中国农业资源与区划*, 2007(05):31-36.
- [73] Cheng L, Wang L, Wei L, et al. Combined mild chemical pretreatments for complete cadmium release and cellulosic ethanol co-production distinctive in wheat mutant straw. *Green Chemistry*, 2019, 21(13).
- [74] Digman MF, Shinnars KJ, Casler MD, et al. Optimizing on-farm pretreatment of perennial grasses for fuel ethanol production. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 5305- 5314.
- [75] Cui ZF, Shi J, Wan CX, et al. Comparison of alkaline- and fungi-assisted wet-storage of corn stover. *Bioresource Technology*. 2012, 109: 98-104.
- [76] Mujumdar AS, Law CL. Drying technology: trends and applications in post harvest processing. *Food Bioprocess Technol*. 2010, 3: 843-852.
- [77] Jin MJ, Bothfeld W, Austin S, et al. Effect of storage conditions on the stability and fermentability of enzymatic lignocellulosic hydrolysate. *Bioresource Technology*. 2013, 147:212-220.
- [78] Liu ZH, Qin L, Jin MJ, et al. Evaluation of storage methods for the conversion of corn stover biomass to sugars based on steam explosion pretreatment. *Bioresource Technology*. 2013, 132: 5-15.
- [79] Yong CP, Lee JS, Kim CH, et al. Optimization of NaOH-catalyzed steam pretreatment of empty fruit bunch. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6:170
- [80] Lau MW, Bals BD, Chundawat SPS, et al. An integrated paradigm for cellulosic biorefineries: utilization of lignocellulosic biomass as self-sufficient feedstocks for fuel, food precursors and saccharolytic enzyme production. *Energy & Environmental Science*, 2012, 5,7100
- [81] Tian D, Chandra RP, Lee JS, et al. A comparison of various lignin-extraction methods to enhance the accessibility and ease of enzymatic hydrolysis of the cellulosic component of steam-pretreated poplar. *Biotechnology for Biofuels*. 2017, 10: 157
- [82] Ninomiya K, Utami ARI, Tsuge Y, et al. Pretreatment of bagasse with a minimum amount of cholinium ionic liquid for subsequent saccharification at high loading and co-fermentation for ethanol production. *Chemical Engineering Journal*. 2018, 334: 657-663
- [83] Han XS, Bao J. General Method to Correct the Fluctuation of Acid Based Pretreatment

- Efficiency of Lignocellulose for Highly Efficient Bioconversion. ACS Sustainable Chemistry Engineering. 2018, 6:4212-4219.
- [84] Liu G, Bao J. Maximizing cellulosic ethanol potentials by minimizing wastewater generation and energy consumption: Competing with corn ethanol. Bioresource Technology. 2017, 245: 18-26
- [85] Cui M, Zhao L, Tian Y, et al. Analysis and evaluation on energy utilization of main crop straw resources in China. Trans CSAE 2008, 24(12): 291-6.
- [86] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. NREL/TP-510-42623. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO, 2008.
- [87] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO, 2002.
- [88] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of ash in biomass, laboratory analytical procedure. Technical Report NREL/TP-510-42622. Golden, Colorado: NREL, 2005.
- [89] 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, 8(2), 266-274.
- [90] Li H, Yu S, Wu M, et al. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production. Bioresources and Bioprocessing. 2016, 3(1), 51.
- [91] Qureshi AS, Zhang J, Bao J. Cellulosic ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* seeds cultured by pretreated corn stover material. Applied Biochemistry and Biotechnology. 2015, 175: 3173-3183.
- [92] Hoover AN, Tumuluru JS, Teymouri F, et al. Effect of pelleting process variables on physical properties and sugar yields of ammonia fiber expansion pretreated corn stover. Bioresource Technology. 2014, 164: 128-135
- [93] Gu HQ, Zhang J, Bao J. High tolerance and physiological mechanism of *Zymomonas mobilis* to phenolic inhibitors in ethanol fermentation of corncob residue. Biotechnology and Bioengineering. 2015, 112: 1770-1782.
- [94] 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.
- [95] Lynd LR, Baskaran S, Casten S. Salt accumulation resulting from base added for pH control, and not ethanol, limits growth of thermoanaerobacterium

- thermosaccharolyticum HG-8 at elevated feed xylose concentrations in continuous culture. *Biotechnol. Prog.* 2001, 17, 118-125.
- [96] Kim S, Dale BE. Comparing alternative cellulosic biomass biorefining systems: centralized versus distributed processing systems. *Biomass Bioenergy.* 2015, 74, 135-147.
- [97] FAO (2009) [www.fao.org/](http://www.fao.org/) “How to Feed the World in 2050”. Accessed 10 Jan 2015
- [98] Hussain S, Peng S, Fahad S, et al. Rice management interventions to mitigate greenhouse gas emissions: a review. *Environmental Science & Pollution Research.* 2015, 22(5): 3342-3360
- [99] 中国农业年鉴编辑委员会. 中国农业年鉴. 北京: 中国农业出版社, 2005.
- [100] García JC, Díaz MJ, Garcia MT, et al. Search for optimum conditions of wheat straw hemicelluloses cold alkaline extraction process. *Biochemical Engineering Journal.* 2013, 71: 127-133.
- [101] Jung YH, Kim IJ, Kim HK, Kim KH: Dilute acid pretreatment of lignocellulose for whole slurry ethanol fermentation. *Bioresour Technol* 2013, 132:109 – 114.
- [102] Kim S, Park JM, Seo JW, Kim CH: Sequential acid-/alkali-pretreatment of empty palm fruit bunch fiber. *Bioresource Technology.* 2012, 109:229 – 233.
- [103] McAloon A, Taylor F, Yee W. Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks. Technical Report NREL/TP-580-28893. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2000.
- [104] Holm J, Bjorck I, Drews A, et al. A rapid method for the analysis of starch. *Starch Starke.* 1986, 38: 224-226.
- [105] Ji LQ. An assessment of agricultural residue resources for liquid biofuel production in China. *Renewable & Sustainable Energy Reviews.* 2015, 44: 561-575.
- [106] Zhang Q, Bao J. Industrial cellulase performance in the simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of corn stover for high titer ethanol production. *Bioresources and Bioprocessing.* 2017, 4: 17.

## 附录 I 主要实验试剂

| 实验试剂      | 试剂规格 | 生产商             |
|-----------|------|-----------------|
| 蛋白胨       | BC   | 上海阿拉丁生化科技股份有限公司 |
| 酵母提取物(YE) | BC   | 安琪酵母股份有限公司      |
| 琼脂        | BC   | 上海阿拉丁生化科技股份有限公司 |
| 葡萄糖       | AR   | 上海泰坦科技股份有限公司    |
| 磷酸二氢钾     | AR   | 上海凌峰化学试剂有限公司    |
| 七水硫酸镁     | AR   | 上海凌峰化学试剂有限公司    |
| 硫酸铵       | AR   | 上海凌峰化学试剂有限公司    |
| 氢氧化钙      | AR   | 上海凌峰化学试剂有限公司    |
| 氢氧化钠      | AR   | 上海凌峰化学试剂有限公司    |
| 盐酸        | AR   | 上海泰坦科技股份有限公司    |
| 硫酸        | AR   | 上海凌峰化学试剂有限公司    |
| 硫酸镉       | AR   | 阿达玛斯试剂有限公司      |
| 柠檬酸       | AR   | 上海凌峰化学试剂有限公司    |
| 柠檬酸钠      | AR   | 上海凌峰化学试剂有限公司    |
| 碳酸钙       | AR   | 上海凌峰化学试剂有限公司    |

分析纯：AR；生化试剂：BC

## 附录 II 主要仪器设备

| 名称        | 型号                | 生产商                           |
|-----------|-------------------|-------------------------------|
| 立式震荡培养箱   | HZ-2111KB         | 江苏华利达实验设备厂                    |
| 隔水式恒温培养箱  | GHP-9160          | 上海一恒科学仪器                      |
| 生物反应器     | BIOTECH-5L        | 上海保兴生物设备工程有限公司                |
| 恒温水浴振荡器   | HZ-9212S          | 江苏华利达实验设备厂                    |
| pH 电极     | G301K             | 苏州汉星分析传感器有限公司                 |
| 粉碎机       | SF-300            | 上海科太粉碎设备厂                     |
| 高效液相色谱    | LC-20AD、LC-20AT   | 日本岛津公司                        |
| 紫外检测器     | SPD-20A           | 日本岛津公司                        |
| 示差检测器     | RID-10A           | 日本岛津公司                        |
| 蒸汽发生器     | HX-36D-2.5        | 上海华征特种锅炉制造有限公司                |
| 预处理反应器    | PCF20-1.6         | 烟台科立化工设备有限公司                  |
| 超低温冰箱     | Forma-86C         | Thermo Scientific. LTD. (USA) |
| 超纯水制备仪    | Milli-Q Synthesis | 德国默克密理博公司                     |
| 台式小型高速离心机 | 5415D             | Eppendorf. LTD. (Germany)     |
| 立式震荡培养箱   | HZ-2111KB         | 江苏华利达实验设备厂                    |
| 电子天平      | BS223S            | 瑞士梅特勒利多仪器有限公司                 |

## 硕士期间学术成果

### 准备投稿论文:

1. **Tao Han**<sup>1</sup>, Bin Zhang<sup>1</sup>, Lixiang Zheng, Xushen Han, Gang Liu, Hongsen Zhang, Lizhen Hu, Qiang Fei, Xiaodong Ren, Yongfu Yang, Shihui Yang, Shipeng Wang, Yueqin Tang, Hongxing Li, Xiaoming Bao, Jian Zhang, Jie Bao\*. One-year storage of three major agricultural crop residues at their growth regions used for cellulosic ethanol production. *Energy & Environmental Science*. (对应本论文第二章)
2. **Tao Han**<sup>1</sup>, Shuai Shao<sup>1</sup>, Jie Bao\*. Whole-Biomass Utilization of Heavy Metal Contaminated Rice Based on Dry Biorefinery Technology. *Environmental Science & Technology*. (对应本论文第三章)

### 学术会议论文:

1. **Tao Han**, Shuai Shao, Jie Bao\*. Heavy Metal Contaminated Rice Can Be Safely Utilized Based on Dry Biorefinery Technology. **Chinese Society of Biotechnology (CSB) "Young Scientists ForumIV "**.2019, East China Normal University, Shanghai, China. (**Poster**)

## 致谢

三年的“花梨”时光一闪即逝。回过头来，自己能够来到华理，能够来到生物能源与生物炼制实验室，是兴趣的选择，更是命运的眷顾。

每当回想起刚加入实验室大家庭时鲍老师在微信群里说的一句话——“欢迎帅小伙韩涛加入我们实验室”，都会让我憋不住笑话自己：“怎么当时就起了个那么傻的微信昵称呢？”初见鲍老师时，便可感受到老师在待人上的和蔼和学术上的严肃。老师为人非常低调，性格也比较坦率，给人的感觉特别真实。至今仍记得在研一时鲍老师授予第一堂全英文课的情景，他进门后看着我们，然后笑着说了一句“我们上的是全英文课，但是我的口语不太好，大家听起来可能会比较费力，请多担待”之类的话，看似开玩笑的一句话却让我觉着老师非常的可爱和自然。在正式融入实验室之后，我时常能在周末看到鲍老师端坐在电脑前认真工作的身影，这大概就是对科研工作的“真爱”吧。老师也很关爱自己的学生，他将大量的时间和精力花费在训练学生的科研能力上。从新课题的给予到文献的阅读，从每周的进展讨论到学期末的总结汇报，他总是非常耐心地引导我们这些“科研萌新们”以端正的态度、灵动的思维、勤奋的付出对待科研工作。当我们踏入科研误区而停滞不前时，鲍老师总会及时地给予正确的指导和亲切的鼓励。因此，在生物炼制与生物能源实验室的这段时间里，真心地感谢鲍杰老师为我们提供的成长环境，以及对我科研工作和生活上无微不至的帮助和照顾。

我还想要感谢张建老师和刘刚老师。感谢张老师将最后一个招生名额留给了我以及对我学习和生活上的帮助；感谢刘老师在长期储存课题中教会了我如何制作分布密度数据地图以及在实验数据的整理上给予我的重要帮助。此外，我还想特别感谢带我实验的邵帅师兄和董维涛师兄；陪我玩转羽毛球的同时也能“玩转”球菌的邱忠洋师兄；非常优秀且见识广博的韩响身师兄；“学术大咖”兼“人生赢家”的侯伟亮师兄；每晚在实验室忙至深夜并在近期成功“持证上岗”的温经柏师兄；非常勤奋且口才超棒的赵瞭学姐；在实验室肯陪我“胡侃”两年且情商超高又酒量极好的外国好友苏雷。还要感谢课题组里其他帮助过我的同学，包括：周平平、高小创、魏成香、湛泽宇、周奇圣、胡明珊、李莉、柳云龙、颜钊、金慈、张斌、卢敏萍、郑理想、李园园、方纯、黄振、展宝睿、张翼、贾佳、孙鲁欢、华柯君、何妮玲、王江以及其他师兄师姐和师弟师妹们。此外，要感谢曾在我本科考研及复试期间为我提供诸多帮助和宝贵建议的汪军姑爷、韩贤菊姑姑和李媛媛学姐；以及张宏云、夏传伟、郑阳杨、杜君宏、黄芬、熊月芝等好友。

最后感谢我最可爱的故乡，感谢我的家人对我的关心、照顾和陪伴，感谢你们让我在想家的时候可以回去感受家的味道。

韩涛

2020年5月4日 于全椒

# 卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 柒拾伍 页

立卷人 \_\_\_\_\_

检查人 \_\_\_\_\_

立卷时间 \_\_\_\_\_