

学校代码：10251

学 号：Y20140097

華東理工大學

博 士 学 位 论 文

论文题目 木质纤维素生物质的

水溶性组分生物炼制应用与纳米纤维素制备

学科专业 生物化工

研究方向 生物炼制

论文作者 韩昫身

指导教师 鲍杰 教授

定稿日期：2019 年 12 月 23 日

分类号: Q81 密级: 公开

U D C: _____

华东理工大学 学位论文

木质纤维素生物质的
水溶性组分生物炼制应用与纳米纤维素制备

韩响身

指导教师姓名: 鲍杰 教授 华东理工大学

Jack N. Saddler 院士 加拿大英属哥伦比亚大学

申请学位级别: 博士 专业名称: 生物化工

论文定稿日期: 2019. 12. 23 论文答辩日期: 2019. 12. 19

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: 白凤武 教授
评 阅 人: 曲音波 教授
许 平 教授
潘仁明 研究员
姜 岷 教授
牟伯中 教授

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：韩昫身

2019年12月23日

指导教师签名：鲍杰

2019年12月23日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作 者 声 明

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

论文作者签名： 韩昀身

2019年12月23日

木质纤维素生物质的水溶性组分生物炼制应用与纳米纤维素制备

摘要

木质纤维素生物质在自然界分布广泛，其可再生、产量大且目前大部分未得到高效利用。随着石化资源的日益枯竭与粮食问题的日益严峻，对木质纤维素进行高值化利用以生产生物能源、生物基化学品与生物基材料，成为本世纪的研究热点。在木质纤维素生物炼制的糖平台和纳米纤维素生产平台，其核心步骤均为对木质纤维素进行高效解聚以克服其生物顽抗性，进而获得可发酵糖或者纳米纤维素材料；此外，在目前主流的生物炼制工艺研究中，对木质纤维素生物质所含的除纤维素、半纤维素及木质素之外的水溶性组分鲜有关注，如何充分利用这些组分诸如水溶性碳水化合物及 B 族维生素，成为了亟需解决的问题。

本文首先针对木质纤维素生物质的不规范特性所导致的生物炼制预处理效率的不稳定，提出了稳定预理解聚效率的方法。其次，研究了木质纤维素生物质所含的丰富的水溶性碳水化合物和 B 族维生素对生物炼制过程的影响，探索了水溶性碳水化合物及 B 族维生素的利用策略，为生物炼制糖平台拓展了新的着眼点和研究思路。最后，在木质纤维素生物炼制生产纳米纤维素的过程中，首次尝试了酶法促进高木质素含量的机械浆解聚以制备含木质素的纳米纤维素，并探究了不同酶发挥的作用。

本文第一部分提出了稳定预处理效率的方案，并实现了后续高效稳定的生物转化。农作物秸秆中的灰分含量变化频繁，严重影响了基于酸的预处理效率的稳定性。本章提出基准 pH 调节法，将不同灰分含量的物料滴定至其基准 pH 值，得到该灰分含量物料预处理过程所需的酸用量，本方法可以实现木质纤维素原料预处理及生物转化效率的稳定，并普遍的推广到不同生物质原料（玉米秸秆、麦秆、稻草）的加工及不同发酵产品（乙醇及乳酸）的生产，具备工业化应用价值。

本文第二部分针对木质纤维素生物质中水溶性碳水化合物在预处理过程降解产生较多 5-羟甲基糠醛（HMF）的问题，提出了其生物转化利用的概念并有效实施。农作物秸秆特别是玉米秸秆中含有一定量的水溶性碳水化合物如葡萄糖和果糖，这些糖在常规预处理及脱毒工段中会降解或随废水流出。本章首先在原料储存工段对玉米秸秆进行固态发酵，将水溶性碳水化合物转化为 L-乳酸，接着将含有乳酸的秸秆进行干法生物炼制，转化利用纤维素及半纤维素生产同样的 L-乳酸产品。最终预处理后 HMF 的生成显著降低，脱毒时间大幅缩短，且最后得到的 L-乳酸浓度从 130.2 g/L 提高至 139.0 g/L。本章为生物炼制糖平台生产生物基化学品提供了一种重要的工艺选择。

本文第三部分将水溶性碳水化合物的利用方案应用至玉米秸秆蒸汽处理过程。蒸汽处理可以有效解聚木质纤维素结构并提高秸秆水解转化率，但会带来水溶性碳水化合物的降解及 HMF 的产生。本章在蒸汽处理前的原料储存工段进行固态发酵将水溶性糖转化为乳酸，再进行乳酸催化的蒸汽处理。相比于单纯的蒸汽处理，更多的半纤维素在预

处理过程被水解为单糖与寡糖，后续纤维素的酶水解转化率有所提高，且预处理后 HMF 生成量降低。本章探索了转化利用水溶性碳水化合物对秸秆蒸汽处理效果的促进。

本文第四及第五部分关注了玉米秸秆中另一种重要的水溶性组分——B 族维生素，其在预处理及脱毒过程易降解或随废水流出，在常规生物炼制工艺中往往被忽视。第四部分以 L-乳酸发酵过程为例，说明了干法生物炼制技术保留的这些 B 族维生素可以有效促进 L-乳酸发酵，特定添加玉米秸秆水解液中含量不足的泛酸 (B₅) 及烟酸 (B₃)，获得了更快的 L-乳酸生产速率及更高的得率。本研究以先前鲜有关关注的 B 族维生素利用为切入点为生物炼制糖平台拓展了新的原料利用方案，对综合利用木质纤维素生物质以降低外源营养添加成本有指导意义。

本文第五部分使用微生物法从木质纤维素生物质中对生物素 (生物素 B₇) 进行富集提取，并制备了高生物素含量的发酵营养添加剂。木质纤维素原料选用玉米叶，其生物素含量 (1217.4 μg/kg) 远高于玉米秆 (143.9 μg/kg)，干法生物炼制技术可以将这些生物素基本完全转移进入糖化后制备的水解液中。谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* S9114 对玉米叶水解液中生物素的摄取能力强，过表达生物素转运基因 *bioYMN* 可以有效提高其生物素摄取量及摄取速率，使胞内生物素含量最高可达 303.8 mg/kg 干细胞，远高于酵母粉 (~2 mg 生物素/kg) 等常用的发酵营养添加剂，且该玉米叶中获得的生物素可应用于谷氨酸发酵过程。本章创造了一条使用微生物法从木质纤维素原料中提取生物素的独特工艺，为木质纤维素生物质的高值化利用开辟了一条全新的技术路线。

本文第六、七部分的研究有别于前五部分在生物炼制糖平台的相关研究，这两部分试图利用酶法解聚木质纤维素原料以促进纳米纤维素生产。以机械浆为原料制备的含木质素的纳米纤维素与疏水材料兼容性强，且基于初始木材生物质的得率高，然而其生产需要极高的机械处理能耗，使用化学法辅助机械法处理所需的试剂昂贵且环境污染严重。由于机械浆纤维中木质素及半纤维素的存在，温和且专一性强的酶法难以促进其纳米纤维化。第六部分首先通过中性碘化的方法增加机械浆的纤维素酶可接近性，之后采用诺维信纤维素酶 CTec 3 进行处理，成功的促进了机械浆纤维解聚且回收了副产物可发酵糖，并在机械处理后获得了较为均一的含木质素的纤维素纳米纤丝 (LCNF)。本章提供了一个以机械浆为原料生产 LCNF 与可发酵糖的重要方法。

本文第七部分主要探究了内切葡聚糖酶 (EG) 与辅助酶 (木聚糖酶、甘露聚糖酶及多糖裂解单加氧酶 (LPMO)) 对于机械浆纳米纤维化的促进作用。本章发现木质素及半纤维素的存在限制了内切葡聚糖酶的效果；半纤维素酶特别是木聚糖酶可以显著协助内切葡聚糖酶，促进机械浆纳米纤维化；LPMO 可以在纤维上加入一定量的羧基，促进机械浆纳米纤维化，但作用效果有限。本章对不同酶在机械浆纳米纤维化中发挥的作用进行了初步探索。

综上，本文实现了木质纤维素生物质在预处理过程的稳定解聚，并针对木质纤维素生物质中丰富的水溶性碳水化合物及 B 族维生素提出了相应的几个利用策略，最后在纳

米纤维素制备过程中探索了酶法对机械浆解聚的促进。本文为利用木质纤维素生物质生产生物能源、生物基化学品及生物基材料提供了重要的理论依据和技术支持。

关键词：木质纤维素生物炼制；干酸预处理；水溶性碳水化合物；维生素 B；纳米纤维素

Biorefining applications of lignocellulosic water-soluble compounds & Nanocellulose preparation

Abstract

Lignocellulose biomass is abundantly available without geographical limitation, which is renewable and environmentally friendly, but has not been utilized effectively. With the depletion of fossil resources and lack of food, utilization of lignocellulose biomass to produce biofuels, bio-based chemicals and bio-based materials has become increasingly important. However, effective deconstruction of lignocellulose to overcome its biorecalcitrance is a prerequisite for developing sugar platform and producing nanocellulose. Moreover, few studies have been focused on the biorefining applications of water-soluble compounds in lignocellulose biomass, which potentially can be valorized.

In this thesis, we proposed a method to correct the fluctuating pretreatment efficiency caused by the varying properties of raw lignocellulose feedstock. Secondly, we assayed how water-soluble carbohydrates and vitamin B compounds affected biorefinery, and proposed the strategies of water-soluble compounds valorization, which broadened a new way in sugar platform of lignocellulose biorefinery. Finally, we tried to use enzymatic treatment to help facilitate high lignin containing softwood mechanical pulp nanofibrillation and produce lignin containing cellulose nanofibrils (LCNFs), and tested how different enzymes helped nanofibrillation.

In the first part of the thesis, stable deconstruction and bioconversion of lignocellulose were obtained after acid based pretreatment by using the new method we proposed. The ash content varies in each batch of agricultural residues and leads to frequent and significant fluctuations of acid based pretreatment efficiency. In this chapter, we proposed a simple and fast Base pH Approaching method to correct the fluctuation of the pretreatment efficiency. The acid usage for pretreatment was adjusted by titrating different ash containing feedstocks to the same base pH value. The method is universally effective to different feedstocks (corn stover, wheat straw, or rice straw) using different strains (yeasts or bacteria) for different products (ethanol and lactic acid) at different fermentation types (SSF or SSCF). This study provides an important and practical approach to maintain the stable pretreatment efficiency in industrial applications.

In the second part of the thesis, water-soluble carbohydrates were effectively utilized in biorefinery and the problem of high 5-hydroxymethylfurfural (HMF) generation in acid based pretreatment was effectively solved. Agricultural lignocellulose biomass, especially corn stover, generally contains certain amounts of water-soluble carbohydrates (WSC) such as glucose and fructose. These sugars are generally degraded in pretreatment at high temperature or discharged with wastewater in detoxification process. In this chapter, a simple solid state fermentation was performed during corn stover storage period to convert the sugars into L-lactic acid, then a dry biorefining technology was applied to convert cellulose and hemicellulose fractions into the same L-lactic acid product. The HMF formation in

pretreatment was significantly reduced, the consequent bio-detoxification time was shortened, and L-lactic acid production was increased from 130.2 g/L to 139.0 g/L. This study provides an important option of biorefinery processing technology for production of value added bio-based chemicals.

In the third part of the thesis, water-soluble carbohydrates were effectively utilized in steam treatment of corn stover. Steam treatment is a cost-effective method to disrupt lignocellulose structure and increase its hydrolysis yield, however, water-soluble carbohydrates were easily degraded to HMF at the high temperature. In this chapter, a solid state fermentation was performed during corn stover storage period to convert the sugars into L-lactic acid, followed by the steam pretreatment to produce feed. Compared to the regular steam treatment of raw corn stover, endogenous lactic acid assisted pretreatment elevated the hydrolysis yield and reduced toxic HMF generation in steam heating process. This study explores facilitation of steam treatment by water-soluble carbohydrates utilization.

In the fourth and fifth part of the thesis, we focused on another significant water-soluble compound, vitamin B compounds. The presence of vitamin B compounds is frequently ignored in conventional lignocellulose biorefinery processing, because they are generally degraded in pretreatment or discharged with wastewater in the detoxification process. In this chapter, the dry acid pretreatment and bio-detoxification (DryPB) process allowed the preservation of significant amounts of vitamin B which promoted L-lactic acid fermentation efficiency significantly. The supplementation of the specific vitamin B compounds, VB₃ and VB₅, into corn stover hydrolysate led to the further increase of cellulosic L-lactic acid yield and fermentation rate. This study broadens a new way of vitamin B compounds utilization in sugar platform of lignocellulose biorefinery, and provides a new solution for reducing exogenous nutrient addition by using vitamin B compounds in lignocellulose biomass.

In the fifth part of the thesis, biotin was extracted from lignocellulose biomass by microbes and prepared as nutrient additives. First, we found that the biotin content of corn leaves (1217.4 µg/kg) was much higher than that of corn stalks (143.9 µg/kg), and it could be well preserved in corn leaves hydrolysate by DryPB technology. Second, *Corynebacterium glutamicum* S9114 was found to have the highest biotin uptake capacity in corn leaves hydrolysate among different biotin auxotrophic microorganisms, and it was further significantly increased by overexpressing the *bioYMN* gene cluster encoding biotin transporter. Finally 303.8 mg biotin/kg dry cell was extracted into recombinant *C. glutamicum*, which was far higher than that in commonly used fermentation additives including yeast extract (~2 mg/kg). The biotin extracted from corn leaves was successfully applied to glutamic acid fermentation. This is the first report on microbial extraction of biotin from lignocellulose biomass, and provides a new strategy to make lignocellulose biomass valorization by extracting vitamins in biorefinery process.

In the sixth and seventh part of the thesis, we focused on facilitation of lignin containing cellulose nanofibrils (LCNFs) production from softwood mechanical pulp by enzymatic treatment, instead of the above five parts research in sugar platform of lignocellulose biorefinery. LCNFs show some advantages such as high compatibility and high yield based on

the wood biomass, however, their production need extremely high energy input or high chemical reagent cost with environmental pollutions. Due to the presence of lignin and hemicellulose in the mechanical pulp, it is hard to use the mild and specific enzymatic treatment to facilitate nanofibrillation. In this chapter, neutral sulphonation was conducted on bleached softwood chemi-thermomechanical pulp, followed by enzymatic hydrolysis using cellulase cocktail Novozymes CTec 3 to open up the structure of mechanical pulp. Finally LCNFs were successfully prepared with byproduct fermentable sugars. This study provides an important approach for integrated production of LCNFs and fermentable sugars from softwood mechanical pulp.

In the seventh part of the thesis, we assayed the effect of endoglucanase (EG) and “accessory enzymes” such as xylanase, mannanase and lytic polysaccharides monoxygenases (LPMO) on mechanical pulp nanofibrillation. We found that the presence of lignin and hemicellulose in the mechanical pulp restricted EG treatment. Hemicellulase especially xylanase could synergistically cooperate with EG and significantly facilitate mechanical pulp nanofibrillation. LPMO addition could increase the carboxylic groups on the fibers and limitedly facilitate mechanical pulp nanofibrillation. This study provides a preliminary exploration on nanofibrillation of softwood mechanical pulp facilitated by endoglucanase and accessory enzymes.

Overall, stable deconstruction and bioconversion of lignocellulose were obtained after acid based pretreatment. Several strategies were proposed for utilization of water-soluble carbohydrates and vitamin B compounds in lignocellulose biomass. Enzymatic treatment was successfully applied in mechanical pulp depolymerization and nanofibrillation. This thesis provides several important theoretical basis and technical support for production of biofuels, bio-based chemicals and bio-based materials using lignocellulose biomass.

Key words: Lignocellulose biorefinery; Dry acid pretreatment; Water-soluble carbohydrates; Vitamin B compounds; Nanocellulose

目录

第 1 章 前言	1
1.1 木质纤维素生物质	1
1.2 木质纤维素生物炼制糖平台的技术路线	3
1.2.1 预处理	3
1.2.2 脱毒	5
1.2.3 糖化与发酵	5
1.3 干法生物炼制技术的特点、技术问题及优势拓展	6
1.3.1 干法生物炼制技术的建立及优势	6
1.3.2 干法生物炼制技术的技术问题及优势拓展	8
1.4 木质纤维素生物炼制生产纳米纤维素	9
1.4.1 制浆工艺	9
1.4.2 纳米纤维素的常见制备方法	10
1.5 本论文立题依据和主要研究内容	12
第 2 章 木质纤维素生物质干酸预处理效率稳定性的提升	14
2.1 引言	14
2.2 材料与方法	15
2.2.1 不同灰分含量的木质纤维素原料与酶制剂	15
2.2.2 菌种与培养基	16
2.2.3 干酸预处理与生物脱毒	17
2.2.4 发酵种子液的培养	17
2.2.5 同步糖化发酵 (SSF)	18
2.2.6 基准 pH 调节法	19
2.2.7 组分测定及酶水解评价	19
2.2.8 检测方法	20
2.3 结果与讨论	20
2.3.1 玉米秸秆中灰分含量变化引起的预处理效率不稳定	20
2.3.2 通过酸用量的快速调整实现稳定的预处理效率	27
2.3.3 基准 pH 调节法在不同原料及发酵过程的应用拓展	31
2.4 本章小结	34
第 3 章 木质纤维素生物质中水溶性碳水化合物的乳酸转化及其对生物炼制效率的促进	36
3.1 引言	36
3.2 材料与方法	37

3.2.1	木质纤维素原料与酶制剂	37
3.2.2	菌种与培养基	37
3.2.3	乳酸固态发酵	38
3.2.4	干酸预处理与生物脱毒	38
3.2.5	L-乳酸同步糖化共发酵 (SSCF)	38
3.2.6	组分测定及酶水解评价	39
3.2.7	检测方法	39
3.2.8	过程模型建立及技术经济分析	39
3.3	结果与讨论	43
3.3.1	水溶性碳水化合物在干酸预处理过程的保留情况	43
3.3.2	乳酸固态发酵在不同储存条件下的可行性	44
3.3.3	水溶性碳水化合物利用对纤维素 L-乳酸生产的促进	46
3.3.4	两种 L-乳酸生产场景的技术经济分析	49
3.4	本章小结	51
第 4 章	内源乳酸催化的蒸汽处理对玉米秸秆水解转化率的强化	53
4.1	引言	53
4.2	材料与方法	54
4.2.1	木质纤维素原料与酶制剂	54
4.2.2	菌种与培养	54
4.2.3	乳酸固态发酵	54
4.2.4	蒸汽处理	54
4.2.5	组分测定及酶水解评价	54
4.2.6	检测方法	55
4.3	结果与讨论	55
4.3.1	玉米秸秆中水溶性糖在蒸汽处理过程的转化利用	55
4.3.2	蒸汽处理玉米秸秆水解转化率的提高	58
4.4	本章小结	59
第 5 章	木质纤维素生物质中 B 族维生素组分对 L-乳酸发酵的促进	60
5.1	引言	60
5.2	材料与方法	61
5.2.1	木质纤维素原料与酶制剂	61
5.2.2	菌种与培养	61
5.2.3	干法生物炼制技术制备玉米秸秆水解液	61
5.2.4	L-乳酸发酵	61
5.2.5	组分测定及检测方法	62
5.3	结果与讨论	62

5.3.1 影响乳酸片球菌 L-乳酸生产的关键 B 族维生素组分	62
5.3.2 玉米秸秆水解液中的 B 族维生素组分对 L-乳酸生产的促进	63
5.3.3 通过补加特定种类的 B 族维生素组分促进 L-乳酸发酵	65
5.4 本章小结	67
第 6 章 木质纤维素生物质中生物素的微生物提取及其发酵应用	68
6.1 引言	68
6.2 材料与方法	69
6.2.1 木质纤维素原料与酶制剂	69
6.2.2 菌种、培养基与种子液制备	69
6.2.3 基因工程操作	70
6.2.4 干法生物炼制技术制备玉米叶水解液	73
6.2.5 生物素的微生物提取	73
6.2.6 谷氨酸发酵	73
6.2.7 组分测定及检测方法	74
6.3 结果与讨论	74
6.3.1 原料选择及不同菌株的生物素摄取能力测试	74
6.3.2 在谷氨酸棒杆菌中过表达生物素转运基因提高生物素摄取能力	76
6.3.3 玉米叶中获得的生物素在实际发酵过程的应用	78
6.4 本章小结	81
第 7 章 软木机械浆酶法制备纳米纤维素并联产可发酵糖	82
7.1 引言	82
7.2 材料与方法	83
7.2.1 纸浆和化学品	83
7.2.2 中性磺化处理	83
7.2.3 酶处理及纸浆纳米纤维化	83
7.2.4 分析及表征方法	83
7.3 结果与讨论	85
7.3.1 中性磺化处理提高纤维素酶对纤维素的接近性	85
7.3.2 酶处理促进纤维素纳米纤丝制备并联产可发酵糖	86
7.3.3 酶法协助制备的含木质素纤维素纳米纤丝 (LCNF) 的性质	88
7.4 本章小结	92
第 8 章 内切葡聚糖酶及辅助酶对软木机械浆纳米纤维化的促进	93
8.1 引言	93
8.2 材料与方法	93
8.2.1 原料及中性磺化	93

8.2.2 酶处理及机械处理	93
8.2.3 纤维的表征方法	94
8.2.4 纤维素纳米纤丝的表征方法	94
8.3 结果与讨论	94
8.3.1 不同酶处理在宏观尺度对于纤维的影响	94
8.3.2 不同酶处理在微观尺度对于纤维素纳米纤丝的影响	96
8.4 本章小结	100
第 9 章 结论与展望	102
9.1 结论	102
9.2 创新点	104
9.3 展望	105
参考文献	106
附录 I HPLC 谱图	122
学术成果	123
致谢	125

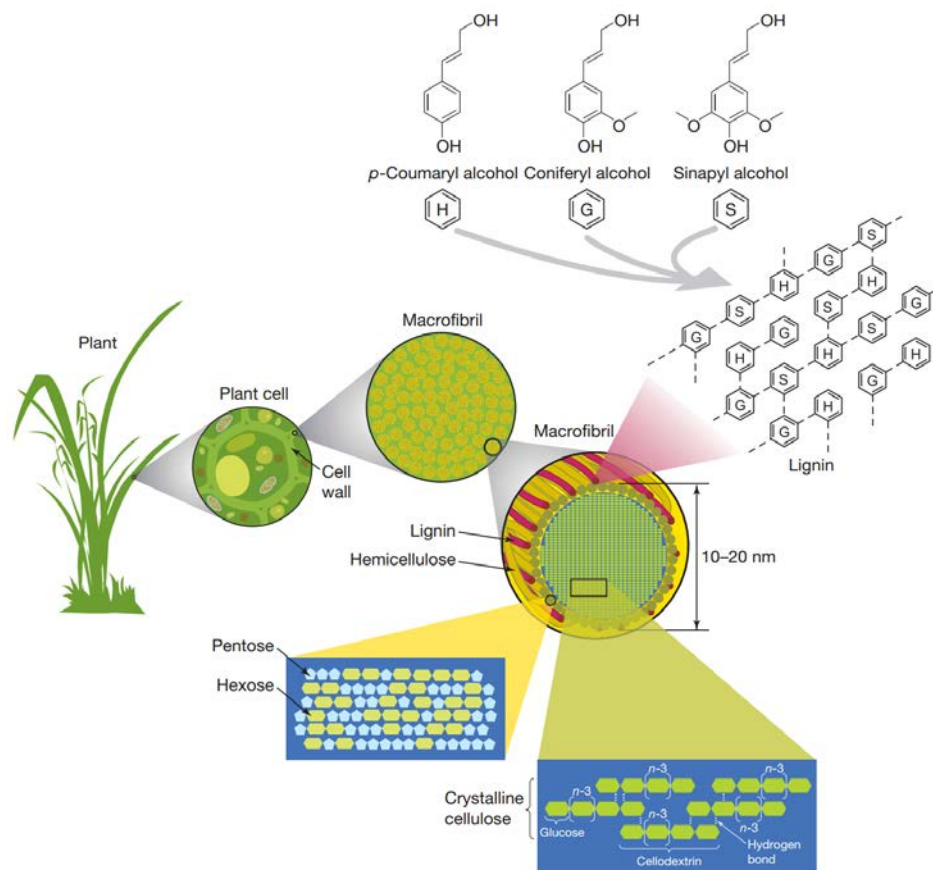
第 1 章 前言

随着经济发展及人口增长,石化资源等不可再生资源日益减少,为了解决对于工业产品日益提高的需求,人类逐渐将目光瞄准了可再生的生物质资源,然而利用淀粉基生物质生产工业产品,存在“与人争粮”的问题,因此,木质纤维素生物质成为了未来解决人类对于能源、化学品及材料需求的非常重要的可再生资源。木质纤维素生物质在自然界普遍存在、产量大且目前大部分未得到高效利用,同时,利用木质纤维素生物质生产燃料不存在温室效应的问题,生产的材料也可以生物降解,对环境的污染远小于石化资源来源的材料。因此,对木质纤维素进行高值化利用以生产生物能源、生物基化学品及生物基材料,成为本世纪的研究热点^[1-6]。

1.1 木质纤维素生物质

以农业废弃物(玉米秸秆、麦秆、稻草、甘蔗渣等)、林业产品(硬木及软木)、能源植物(柳枝稷等)为代表的不同来源的木质纤维素生物质均主要含有三种组分,分别为纤维素、半纤维素及木质素(图 1.1)^[7]。其中纤维素为 D-吡喃葡萄糖经 β -1,4-糖苷键连接并在氢键及范德华力作用下形成的致密大分子同聚多糖,构成了细胞壁骨架,其结晶结构限制了解聚及生物转化,含量约占木质纤维素生物质干重的 20%-50%。半纤维素为结构复杂的非均质聚糖,化学组分包括戊糖(如 D-木糖、L-阿拉伯糖)、己糖(如 D-甘露糖、D-葡萄糖、D-半乳糖)、以及糖醛酸等,半纤维素主要缠绕在纤维素微纤丝周围,限制纤维素的解聚,其化学组成、侧链、糖苷键与聚合度等方面在不同生物质中差异很大,但不易结晶,相对容易水解,其含量约占木质纤维素生物质干重的 15%-35%^[8-10]。木质素是包裹在纤维素和半纤维素表面的芳香族化合物,阻碍聚糖解聚,主要由对羟基苯基(H)、愈创木基(G)和紫丁香基(S)三种酚类基本单元组成,三种结构单元的含量和连接方式在不同生物质中差异很大^[7, 11]。

尽管不同大类的木质纤维素生物质(草、农作物秸秆、甘蔗渣、硬木、软木等)的主要组分均为纤维素、半纤维素及木质素,但三种主要组分的含量、结构有所差异,其他组分如灰分^[12-15]、水溶性碳水化合物^[16, 17]、含氮物质^[16, 18]、维生素^[18, 19]等的含量也差异明显,这也对不同生物质的生物炼制处理工艺及利用效果带来了不同的机遇与挑战。

图 1.1 木质纤维素生物质的结构与组分^[7]Fig 1.1 Diagram of structure and chemical composition of lignocellulose biomass^[7]

以本论文第二至六章生物炼制糖平台相关研究中所用到的玉米秸秆、麦秆及稻草为例，这些农作物秸秆相对于木材生物质而言，纤维较短，木质素含量略低、且结构相对松散，半纤维素的主要成分为木聚糖，其他成分如阿拉伯聚糖、半乳聚糖及甘露聚糖的含量很低^[11]。而由于农作物秸秆特别是稻草的硅含量较高，且这些农作物秸秆暴露在土壤层表面，沾染了大量的泥土及灰尘，其灰分含量往往高于木材生物质^[12-15]；此外，由于农作物叶片是进行光合作用的主要场所，新陈代谢旺盛，而木材细胞主要起到支撑及传输水分的作用，因此农作物秸秆收获时，其中的可浸出物含量（一般大于 10%）远高于木材生物质原料，这些可浸出物包括水溶性盐离子、水溶性碳水化合物（~6%）、粗蛋白（~5%）、维生素等等^[16]。

接着以本论文中第七、八章用于纳米纤维素生产的木材生物质为例，木材生物质细胞壁纤维长于农作物秸秆，其中软木纤维一般长于硬木。对于半纤维素而言，农作物秸秆及硬木的半纤维素主要为木聚糖，而软木中半纤维素基本为葡甘露聚糖（葡萄糖与甘露糖比例约 1:1.6），约占生物质的 20%，半乳糖和乙酰基作为取代基存在，此外还有约占生物质 5%的阿拉伯糖基葡萄糖醛酸基木聚糖存在于软木中^[20]。对于木质素而言，秸秆木质素主要包括对羟基苯基（H）、愈创木基（G）和紫丁香基（S）三种酚类基本单元，而硬木木质素主要由愈创木基（G）和紫丁香基（S）两种基本单元组成，软木木质素主要由愈创木基（G）单元组成^[11]。由于愈创木基（G）单元容易形成碳碳共价键进而聚

合为极为致密的木质素^[21]，不论在生物炼制糖平台还是纳米纤维素生产过程，都极大程度上限制了软木生物质的解聚，使得软木成为最难解聚利用的木质纤维素生物质之一^[22, 23]。

1.2 木质纤维素生物炼制糖平台的技术路线

木质纤维素生物炼制糖平台，指的是将木质纤维素生物化学转化为小分子的可发酵糖，在此基础上将这些糖用发酵法或化学法转化为能源、化学品、食品及动物饲料等产品的平台^[24]。以农作物秸秆为代表的木质纤维素生物质在中国产量很大，2010年中国秸秆总产量高达8.4亿吨，其中玉米秸秆产量为3.3亿吨，麦秆产量为1.5亿吨，稻草产量为1.2亿吨^[16]。除去饲料、堆肥及造纸等用途外，大量的农作物秸秆没有得到有效利用^[25]，而焚烧会带来巨大的环境污染，将农作物秸秆经过糖平台转化为生物能源及大宗生物基化学品是符合中国国情的一条绿色环保的出路。

目前，基于糖平台生产能源及生物基化学品等工业产品的主要原料来自于粮食（玉米）、木薯及糖料作物（甘蔗、甜菜等）。甘蔗及甜菜榨汁后得到的糖可以直接进行发酵利用，而玉米经过干磨或湿磨再加入淀粉酶糖化后也易于发酵利用。不同于粮食及糖料作物，高得率转化廉价的木质纤维素原料为高浓度且易于发酵的糖存在许多技术障碍，导致过程总成本较高。其根源主要在于木质纤维素生物质的生物顽抗性，而解决这些问题主要通过不断改进以下四个工段的技术经济性来实现，即预处理、脱毒、糖化与发酵^[4, 9, 24]。

1.2.1 预处理

由于木质纤维素结构致密（图 1.1），直接加入纤维素酶处理的糖化效率及得率很低，需要通过预理工段来打破木质纤维素结构，以易于在糖化过程将纤维素及半纤维素转化为可发酵糖。预处理的方式多种多样，主要分为物理法、化学法、化学-物理法及生物法^[26, 27]。但不同预处理的目的与发展方向是一致的，比如尽可能的提高后续酶水解得率，较好的保留生物质中六碳糖及五碳糖不被降解，尽可能减少抑制物的产生，降低能耗、废水、催化剂成本、设备要求及处理周期等^[10, 26-28]。

物理法指通过机械剪切、微波及射线辐射等方法处理木质纤维素原料的方法^[29, 30]。机械法可以有效降低纤维颗粒尺寸以增加原料的酶可接近面积，其中球磨法还可以进一步降低纤维素结晶度，达到促进酶解的效果^[31]。但机械法处理木质纤维素原料能耗很高，且后续糖化效果一般，需要化学法的辅助才能达到较高的水解得率。其他如微波热效应及超声波空穴效应对木质纤维素的破坏有限，难以达到很好的水解效果，且设备昂贵、难以放大，不适用于大宗木质纤维素原料的工业化处理^[26, 27, 32]。

生物法主要指利用某些微生物可以降解木质素及半纤维素的特性，对木质纤维素生物质进行预处理，提高后续酶水解糖化得率。以白腐真菌为代表的微生物，可以产生如锰过氧化物酶、木素过氧化物酶及漆酶等木质素降解酶，破坏木质纤维素结构。其优点在于反应条件温和、不需要特定的反应器、无污染等，但其处理周期很长，对工业化生

产效率限制较大^[33-35]。

化学法主要指在酸、碱或有机溶剂、离子液体等条件下，木质纤维素在化学反应中其木质素及半纤维素被移除或木质素结构被破坏以增加纤维素酶可接近性的方法。而化学物理法指在上述反应的同时还有汽爆、膨爆等促进木质纤维素结构变松散的物理变化以进一步促进后续酶水解^[10, 26, 27]。在酸性环境下的预处理我们将之归类命名为基于酸的预处理，酸性环境下的高温处理一般会使得乙酰基水解断裂、半纤维素水解为游离糖、木质素重新分布再聚合等。基于酸的预处理主要包括稀酸预处理^[36-38]、蒸汽爆破预处理^[39-41]、酸催化的汽爆预处理^[42]及热水预处理^[43, 44]等。稀酸预处理和酸催化汽爆预处理的催化剂为外源加入，一般为廉价的硫酸或者 SO_2 等，两种预处理均可以使乙酰基断裂、大部分半纤维素转化为单糖或寡糖、木质素重新分布及聚合、纤维素酶可接近性大幅增加。而汽爆预处理与热水预处理的催化剂为内源产生，即在高温条件下木质纤维素内乙酰基断裂形成乙酸的自水解反应，过程可以水解部分半纤维素，也有木质素的重新分布；此外汽爆预处理最后的爆破，对木质纤维素结构造成了进一步物理破坏。由于汽爆预处理存在突然泄压操作，故对于反应器的耐受性要求较高；而热水预处理往往需要反应温度高达 $200\text{ }^\circ\text{C}$ 以上，对设备要求也比较高且能耗较大。相比而言稀酸预处理成为目前最为经济高效、最有望实现大规模工业化的木质纤维素处理方法，然而其依旧存在诸多问题，例如对反应器耐腐蚀要求较高，抑制物产生较多，游离废水难处理等^[26, 27]。

碱预处理是基于制浆造纸工业不断改进的另一种主流木质纤维素化学处理方法^[45]，其机理在于碱性环境可以脱除木质素及乙酰基，增加纤维素及半纤维素的酶可接近性。其优点在于抑制物产生相对较少，但其弊端在于黑液难以利用，半纤维素进入黑液造成浪费，且由于半纤维素和果胶的存在，纤维素水解往往需要加入大量的半纤维素酶辅助。氨纤维膨爆预处理（AFEX）是另一种有效的预处理方式^[18]，操作方法为使用液氨与木质纤维素原料进行高温反应，打开木质素与纤维素及半纤维素的连接，之后泄压，液氨挥发为气体的同时可以进一步打开木质纤维素结构。其优点在于纤维素和半纤维素基本没有降解，最终物料得率高，液氨处理可以提供氨基酸氮源，过程产生极少抑制物，且没有游离废水产生。但氨气的液压回收成本较高，且原料适用性不广，难以处理结构致密的木质纤维素生物质（如软木等）。

有机溶剂预处理和离子溶液预处理均为化学拆分的主要手段^[26, 27, 46]。有机溶剂一般可以有效的将木质素溶解，辅助以酸液如磷酸，可以得到比较纯的纤维素，之后旋蒸回收有机溶剂，收集析出的木质素，如此将纤维素、半纤维素及木质素三种组分拆分，分别进行高值化利用。而离子液体或深度共熔溶剂（DES）等化学试剂^[46, 47]，也可以有效的拆分木质素及纤维素、半纤维素，分别进行高值化利用。但有机溶剂法回收溶剂成本高且有机溶剂的使用不利于绿色化工的发展思路；离子溶液及 DES 回收困难，试剂昂贵，或许未来这会成为一种拆分木质素进行高值化利用的工业方法，但对于以纤维素水解为糖再进行转化利用为目的的糖平台而言，离子液体法难以对木质纤维素原料实现大规模的工业化处理。

1.2.2 脱毒

由于上述预处理方式大多数是在高温高压的环境下进行，会产生许多木质纤维素过度降解产物，这些降解产物会抑制后续的酶水解、微生物生长代谢及产品生产，因此被称为抑制物^[48]。这些抑制物的来源如图所示，呋喃类抑制物糠醛与 5-羟甲基糠醛(HMF)分别来自于五碳糖和六碳糖的高温降解；弱酸类抑制物乙酸主要来源于乙酰基断裂，而乙酰丙酸和甲酸来源于糠醛和 HMF 的进一步降解；酚类抑制物如香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛与苯醌等主要来源于木质素的降解^[48]。这些预处理工段产生的抑制物需要脱毒工段解决，以减少对后续糖化及发酵工段的消极影响^[49]。

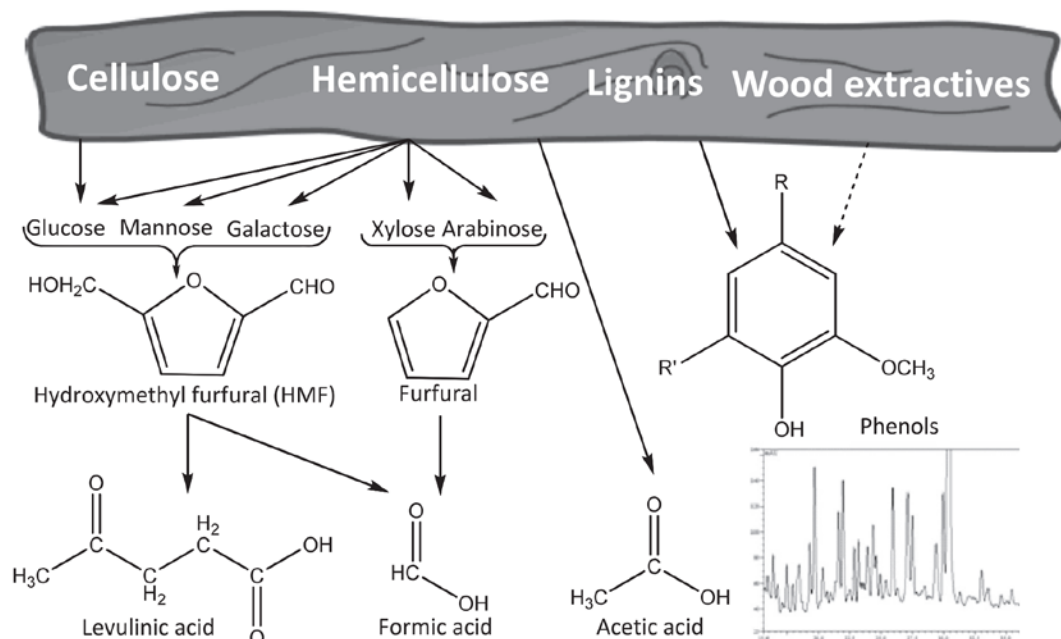


图 1.2 木质纤维素预处理过程产生的过度降解产物^[48]

Fig 1.2 Lignocellulose biomass derived overdegraded product in pretreatment^[48]

目前常用的脱毒方法包括水洗^[45, 50]、氢氧化钙过碱化^[51, 52]、活性炭吸附^[53]、离子交换吸附^[54, 55]及微生物脱毒^[56-59]等。水洗脱毒简单直接，可以去除大部分抑制物，但会产生大量的废水，同时造成预处理产生的水溶性糖类的损失；氢氧化钙过碱化与活性炭吸附简单高效、成本较低、应用广泛，往往针对预处理液或者水解糖化液，但增加了固液分离的步骤，带来液体中糖类物质的损失；离子交换吸附法设备成本较高，且洗脱柱子时废水量大。相比而言，微生物脱毒法由于成本较低、反应温和、不使用特定的化学试剂，逐渐受到研究人员越来越多的关注，但其依旧存在可发酵糖的消耗及脱毒后需要灭菌等问题^[56]。

1.2.3 糖化与发酵

木质纤维素原料的糖化过程总体来看与淀粉原料类似，均为相应的酶水解糖化^[24, 60]。但由于木质纤维素原料不仅含有纤维素和半纤维素这些可以水解为可发酵糖的组分，还含有木质素这种不能水解为糖的组分，因此与淀粉水解过程还存在一定差异，这些差异还取决于不同预处理及脱毒方式所带来的木质素含量、戊糖含量及抑制物含量的不同。

以稀酸预处理为例^[36-38], 预处理过程已经将大部分半纤维素水解为寡糖及单糖, 因此酶水解糖化步骤一般仅需要加入纤维素酶即可; 而稀碱预处理过程将大部分木质素从生物质移除, 此时的预处理后物料含有大量的纤维素和半纤维素, 因此酶水解糖化步骤需要加入纤维素酶及半纤维素酶^[45]。此外, 对于未大量移除木质素的预处理方式而言(如基于酸的预处理、氨纤维膨爆预处理等), 木质素的存在依旧对纤维素酶接近纤维素造成了一定障碍, 限制了酶水解速率; 而木质素及小分子酚类化合物对于纤维素酶的无效吸附作用, 也导致了一部分酶蛋白的浪费^[22, 41]。此外, 对于任何预处理方式而言, 如果脱毒不彻底, 残留的抑制物(如呋喃类及酚类)也会抑制酶水解糖化得率^[61]。

木质纤维素生物炼制糖平台的发酵过程也与淀粉生物炼制发酵过程类似, 其主要区别在于两点, 一是戊糖如木糖及阿拉伯糖的发酵利用^[60, 62, 63], 二是菌株的抑制物耐受性问题^[64-66]。因此将淀粉生物质的发酵微生物引入木质纤维素底物发酵过程, 一方面需要改造代谢菌株使其具备戊糖利用能力, 另一方面需要通过改造、筛选及驯化等手段增强其在木质纤维素水解体系下的抑制物耐受能力。对于木质纤维素底物发酵工艺而言, 一般分为分步糖化与发酵(SHF)、同步糖化与发酵(SSF)两种^[60, 67, 68]。SHF指的是将木质纤维素原料首先进行糖化, 固液分离制备水解液, 再利用微生物对含有可发酵糖的水解液进行发酵, 其优势在于可以分别以较优的温度、pH 等条件进行操作; 而缺点在于水解过程产生的糖对于纤维素酶的产物抑制作用降低了纤维素水解得率, 较高的初始糖浓度会抑制微生物的生长, 固液分离操作造成了糖液的损失, 总过程操作复杂等。SSF指水解糖化与发酵过程同时进行, 其优势在于微生物的发酵转化解除了糖对于纤维素酶的抑制, 可以获得较高的转化得率, 且设备占用较少; 其缺点在于同步发酵时需要选取微生物适合的温度, 往往低于最适的糖化温度, 导致糖化效率不佳。其改进策略为先进行短时间的预糖化, 再接入发酵菌株开始SSF, 称为预糖化同步糖化与发酵(PSSF), 但在大型反应器中, 预糖化后的降温过程也是一个严峻的考验^[60, 69]。

1.3 干法生物炼制技术的特点、技术问题及优势拓展

1.3.1 干法生物炼制技术的建立及优势

稀硫酸预处理成本较低, 且能有效的破坏木质纤维素结构, 得到较高的纤维素水解得率, 被普遍认为是目前最为经济高效、有望实现大规模工业化的木质纤维素处理方法^[26, 27]。但传统的稀酸预处理固含量往往为 1:10 左右, 预处理后进行固液分离, 会产生大量的含有戊糖及抑制物的低 pH 预处理液, 通常使用氢氧化钙过碱化来中和酸液并进行脱毒, 固液分离除去硫酸钙后, 对预处理液中含有的戊糖进行转化利用, 而固体的纤维素部分直接进行水解及发酵。该工艺会产生大量的工业废水, 酸催化剂及碱用量较大, 戊糖液糖浓度低不利于高浓度发酵, 并且存在抑制物脱除不彻底等问题^[26-28, 70]。

本课题组于 2010 年左右独创了干酸预处理工艺^[70], 并在近年来不断完善。干酸预处理实际上是一种先进的稀酸预处理技术, 其主要特点为物料初始固含量高达 70%, 并使用蒸汽进行加热^[70]; 为了解决酸催化剂与木质纤维素原料的混合问题, 设计了螺带

式搅拌桨,可以在 3 min 内将硫酸酸液和物料在 70%的固含量下混合均匀^[71];减少了酸预浸环节,降低了设备成本^[72]。此外,干酸预处理相比于传统的稀酸预处理,对于反应器的腐蚀程度较低^[73];可以使用低压蒸汽进行加热^[74];且预处理后的物料由于其低 pH (~2.3) 及抑制物的存在,可以进行固态长期储存,解决了预处理后物料难以长期存放的难题^[75]。

由于干酸预处理后的物料以固态形式(固含量 50%左右)存在,且纤维素、木质素、戊糖、抑制物等组分均混合在固态物料中,如果采用水洗的方法进行脱毒,那么戊糖液和抑制物则一起被移入水相,最终产生大量的废水;同时这种固态物料也不适于采用氢氧化钙过碱化、活性炭吸附、离子交换吸附等脱毒方法。于是本课题组采用筛选得到的脱毒真菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 进行固态生物脱毒^[56, 76],该真菌可以有效脱除呋喃类、弱酸类及酚类抑制物^[76-81]。作为一株生物脱毒菌,该菌株最大的优势在于优先转化抑制物、其次消耗糖。在实际操作过程中,为了保留预处理产生的木糖基本不被微生物消耗,我们在固态脱毒时通入空气并定期搅拌物料,可以控制该菌株将糠醛、HMF 完全转化,并且转化大部分的乙酸及酚类抑制物,此时物料中的木糖基本完全保留,且纤维素含量基本不变^[77, 82]。

只有在不浓缩糖液的情况下获得高浓度糖 (~200 g/L),才能大幅度提高木质纤维素生物炼制技术经济性,获得与淀粉及甘蔗汁相似的发酵指标,进而降低分离纯化成本^[82, 83]。经过干酸预处理与固态生物脱毒,物料固含量依旧维持在 50%左右,此时半纤维素已经基本转化为单糖及寡糖,纤维素可接近性大幅度提高,抑制物如糠醛与 HMF 基本完全转化或降解,该物料适用于高固含量糖化与发酵。为此,本实验室设计并建造了带有螺带式搅拌桨的生物反应器,适用于高固含量、高粘度的木质纤维素生物质糖化过程^[69]。该反应器可以有效进行高固含量木质纤维素物料糖化过程的传热、传质及混合,获得含高浓度糖的糖化醪液。由于该糖化醪液具备高糖浓度、极低抑制物含量的特点,因此适用于包括好氧发酵^[84, 85]及厌氧发酵^[82, 86-91]在内的不同高指标发酵过程。

以干酸预处理、固态生物脱毒及高固含量同步糖化发酵为基础,本课题组建立了干法生物炼制技术,使用该技术进行木质纤维素生物质转化,可以经济有效的生产不同生物能源及生物基化学品,且均可获得基于木质纤维素原料的国内外基本最高的发酵指标,如乙醇^[82, 86, 88, 89]、乳酸^[62, 87, 90, 91]、生物油脂^[92]、葡萄糖酸^[93, 94]、柠檬酸^[95]、谷氨酸^[19]等。以纤维素乙醇生产为例,如图 1.3,经过干酸预处理、固态生物脱毒、磨浆、高固含量同步糖化共发酵,可以最终获得与粮食乙醇相似的发酵指标(11~13%, v/v)。其中磨浆的作用在于将长纤维变短,避免传输管路堵塞,且一定程度上可以促进糖化^[82]。

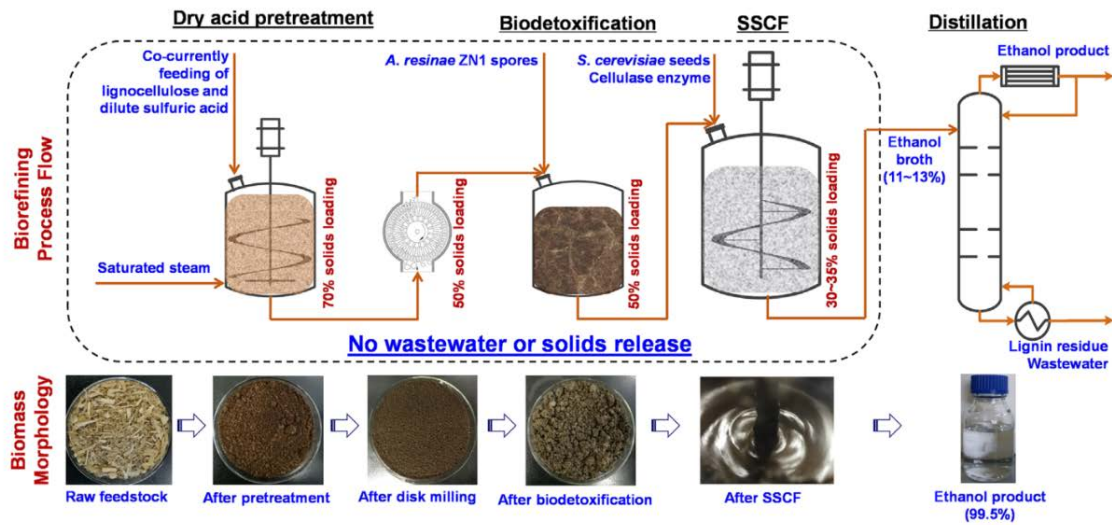


图 1.3 干法生物炼制技术乙醇生产工艺流程图^[82]

Fig. 1.3 Diagram of DryPB biorefining process for cellulosic ethanol production^[82]

1.3.2 干法生物炼制技术的技术问题及优势拓展

尽管干法生物炼制技术极具工业化应用潜力，目前还存在一些技术问题有待解决。相比于稀酸预处理过程，干酸预处理过程固含量很高，预处理后无游离酸液流出，且没有预处理前的酸预浸工段。因此，木质纤维素生物质中的灰分高度积累于预处理过程中，由于不同批次秸秆生物质的灰分含量差距较大，灰分含量的不同对酸催化剂具备不同的中和能力^[96]，影响了预处理效率的稳定性。亟需找到一种简单快捷的手段来调节操作参数，以达到稳定的预处理效率及后续糖化发酵转化效率，并适用于工业化推广。当然，随着目前不同预处理技术朝着高固含量、低废水、低能耗的方向发展，这一问题也存在于几乎所有的高固含量基于酸的预处理过程中，如（酸催化）汽爆预处理、热水预处理、稀酸预处理等^[28, 43]。

此外，我们在实验中发现，农作物秸秆中含有大量的水溶性碳水化合物，这些游离糖基于干生物质的质量一般在 5% 左右^[16]。而在基于酸的预处理过程，这些糖基本完全被降解为抑制物如 HMF 等^[17, 97]，既造成了可发酵糖资源的浪费，又增加了后续脱毒工段的负担，抑制物的存在也会限制水解及发酵过程效率。而在碱、离子液体等预处理过程后，脱毒工段往往会释放游离废水，这些水溶性碳水化合物易从木质纤维素物料中被移除，同样难以得到有效利用。而本课题组开发的干法生物炼制技术从木质纤维素原料开始加工直至发酵工段产生发酵废水之前，没有任何游离废水产生，有希望充分利用这些水溶性碳水化合物，以提高木质纤维素生物质转化得率及效率。

由于干法生物炼制技术具备发酵工段之前无废水产生的特性，因此可以积累盐离子（ K^+ 、 Na^+ 、 Mg^{2+} 等）及维生素等物质进入发酵工段。而在常规生物炼制操作中，由于水溶性物质易随废水排出，因此目前鲜有关注。仅有密歇根州立大学 Bruce E. Dale 教授课题组开发的、同样为无游离废水的 AFEX 预处理测定过维生素等营养物质的保留^[18]，

而这些营养盐及维生素的积累与保留对于发酵的促进有待于进一步挖掘。本文我们重点选择乳酸发酵这一对于营养物质需求量大的发酵过程，探究玉米秸秆在干酸预处理及生物脱毒后保留的维生素对于发酵效率的促进及其对外源维生素添加的替代。

先前课题组还发现，木质纤维素生物质中的生物素含量远高于淀粉生物质，由于生物素耐酸、耐高温，干法生物炼制技术可以有效的保留这些生物素于水解液中^[19]。生物素是一种应用广泛的发酵营养添加剂，使用微生物法富集这些生物素并运用到工业发酵环节，应当是一项非常有吸引力的研究，有助于在维生素提取利用的角度充分挖掘木质纤维素生物质的应用潜力，这也是有别于以转化纤维素及半纤维素为目标产品的木质纤维素糖平台的开拓性研究。

1.4 木质纤维素生物炼制生产纳米纤维素

生物炼制生产纳米纤维素材料，这是有别于生物炼制糖平台的另一个对木质纤维素生物质进行高值化利用的热点研究方向。与将木质纤维素生物质彻底降解为糖单体再进行生物化学转化的糖平台不同，本平台将木质纤维素结构破坏解聚，利用获得的生物大分子物质（纳米纤维素）进行生物基材料的生产^[98, 99]。

软木是加拿大最丰富的木质纤维素原料，针叶林占加拿大林业资源的 60% 以上，主要为松树、柏树及杉树，而不列颠哥伦比亚省（博士联合培养不列颠哥伦比亚大学所在省份）是加拿大林业资源最丰富的省份^[22]。除将木材用于建筑材料外，软木主要用于制浆，加拿大纸浆产量约占世界的三分之一，在国民经济中具有举足轻重的地位^[23]。纸浆主要用于生产纸制品及部分纺织制品，但随着电子媒体的普及，报纸及办公纸的使用逐渐减少，亟需找到新的方式刺激纸浆市场以创造利润，进而维持经济及保障就业。研究人员及林产品公司逐渐将目光瞄准了纳米纤维素——一种极具发展潜力且具备多样化用途的新材料^[100, 101]。

通常直径小于 100 nm 的纤维素即可被定义为纳米纤维素，主要包括纤维素纳米纤维（CNF）、纤维素纳米晶体（CNC）与细菌纤维素（BNC）。尽管三者性质与功能方面存在很多差异，但这些不同种类的纳米纤维素均具备低密度、高比表面积、可生物降解、强度高特点。纳米纤维素主要可以应用在材料领域，制备具备不同功能的新材料，比如聚合物复合材料、薄膜材料与纳米纸、气凝胶、水凝胶、高性能纤维、仿生复合材料等^[100-106]。

1.4.1 制浆工艺

CNF 与 CNC 的生产原料一般为纸浆。纸浆生产，即使用制浆工艺将木片细胞壁胞间层的木素脱除（化学法）或切断（机械法），使纤维分离形成纸浆的过程^[107, 108]。CNF 的生产就是将这些制浆过程产生的纤维进一步纳米纤维化的过程^[100, 102, 103]。

纸浆生产主要分为化学法与高得率法^[107, 108]。化学法制浆主要通过化学试剂在一定温度条件下将木质纤维素生物质中的大部分木质素溶出，使纤维细胞分离成为纸浆。其得率一般约为 50%，其目的及发展方向在于提高木质素脱除效率，减少纤维素移除率，

降低污染、减少能耗等。化学法主要分为亚硫酸盐法和碱法，其中碱法包括烧碱法和硫酸盐法（Kraft 法）。亚硫酸盐法在 1890 年后数十年间，曾是世界上主流制浆方法，生产的纸浆较白且废液可生产乙醇、粘合剂等产品，但由于亚硫酸盐难以回收，对环境污染严重，因此自 1930 年后，逐渐被硫酸盐法所替代，但由于其特性如可生产副产物木质素磺酸盐等，没有被完全淘汰；硫酸盐法主要以氢氧化钠与硫化钠提取木质素，其原料适应性广，可以燃烧黑液回收碱，目前该方法正在工业上广泛应用。

高得率法制浆指的是纸浆得率较高的制浆方法，不论有无化学手段辅助，最终都需要通过机械手段使细胞壁摩擦撕裂，促进纤维分离为纸浆^[107, 108]。正如其名，该法制备的纸浆相比于化学浆而言，基于原料的得率较高、木质素移除较少、化学试剂用量低、成本较低且环境污染小。高得率法主要分为机械法、化学机械法与半化学法。机械法的发展历史逐渐从制得纤维较短的磨石磨木浆（SGW），逐渐发展为使用盘磨机生产的盘磨机械浆（RMP），之后逐渐被热磨机械浆（TMP）所取代。TMP 制备工艺较之 RMP 增加了预热工艺，起到软化胞间层木质素的作用，可以降低磨浆能耗且保留相对完整尺寸的纤维。化学机械法如化学热磨机械浆（CTMP）是在 TMP 处理过程前，加入化学预处理工段（一般为磺化），以永久软化修饰木质素，达到改善表面性能的目的，同时也有助于磨浆阶段的纤维分离。BCTMP 是在 CTMP 处理结束后增加漂白工段，使纸浆变白，制得的纸浆应用范围更广，可以替代过去化学浆生产的纸种。碱性过氧化氢机械浆（APMP）是 1990 年后逐渐出现的工艺，与 BCTMP 相比由于减少了单独的漂白工段，因此降低了投资及操作费用。CTMP, BCTMP 与 APMP 均属于化学机械浆，得率一般在 90% 左右，是目前最主流的高得率浆生产方式。

1.4.2 纳米纤维素的常见制备方法

纤维素纳米纤丝（CNF）与纤维素纳米晶体（CNC）的主要原料均为化学浆。CNC 主要由浓硫酸法降解破坏纤维素非结晶区制备；而本文第七、八章的研究对象 CNF 主要有三种处理及制备方法，分别为机械法、化学法与酶法。

机械法是生产 CNF 的根本方法，主要是通过高压匀质机、微射流机、研磨机、高速混合机及高强度超声波等机械手段达到剪切的作用，促进纤维纳米纤维化，形成纳米纤维素^[102, 103]。高压匀质机通过容腔内的高速冲击力及空穴作用剪切纤维素制备 CNF，其缺点在于制备的 CNF 尺寸不均一旦机器容易堵塞。微射流机通过高压喷射挤压纤维素制备 CNF，但也需要通过多次循环才能制备直径较均一的 CNF，其能耗很高。研磨机通过动态磨石的高速旋转剪切置于其与静态磨石间的纤维素制备 CNF，但该方法会破坏一部分纤维素结晶区。高速混合机是通过高速旋转的马达带动刀片，使得纤维素水悬液形成高速转动，通过纤维素与纤维素及水的摩擦制备 CNF，但其得率低，仅适用于实验室规模生产。超声波处理是利用超声波在水中产生的空化效应，使纤维素纳米化，但其作用力不够强，产品中存在较粗的纳米纤维。

由于单纯通过机械法解聚纤维生产 CNF 需要极高的能耗，因此可以在机械法处理纤维之前对纤维增加预处理过程，预处理方式主要分为化学法及生物法（酶法）^[102, 103]。

化学法的主要原理是在纤维素上增加电荷，利用同性电荷相互排斥的原理促进纤维在机械处理过程的纳米纤维化，得到尺寸更加均一的 CNF，且降低机械处理的能耗^[102, 103, 109-112]。目前常用的化学方法例如 TEMPO 介导的氧化反应可以将羧基引入到纤维上；高碘酸-亚氯酸的氧化反应同样可以将纤维上的羟基氧化为羧基；高碘酸-亚硫酸氢盐的磺化反应可以将磺酸基团引入至纤维上；羧甲基化反应可以引入羧甲基基团等等。上述反应引入的电荷基团对于纤维素的热稳定性及其他许多性质有一定影响，但可以促进 CNF 在水悬液中的分散，使其不易絮凝沉降。化学法对促进纤维素纳米纤维化整体上而言高效稳定，但其存在的主要问题在于试剂昂贵，对反应器的要求高且反应条件剧烈，环境污染严重等。

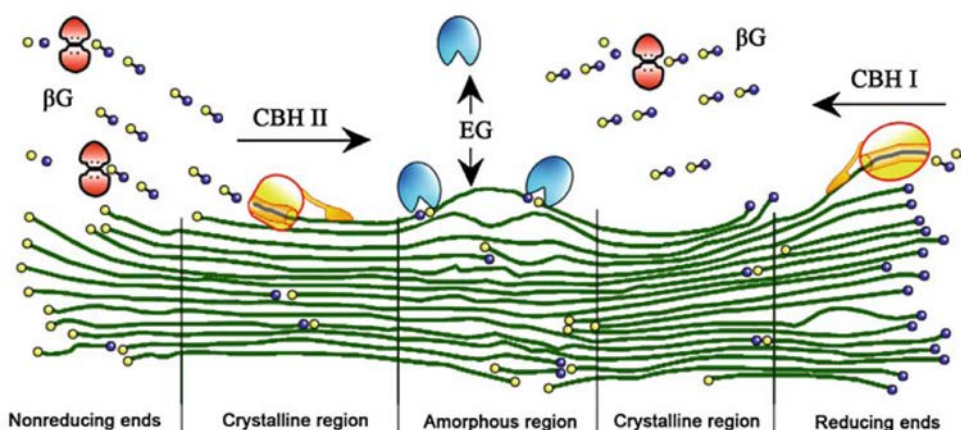


图 1.4 纤维素在内切葡聚糖酶 (EG)、外切葡聚糖酶 (CBH) 及 β -葡糖苷酶 (β G) 作用下的生物解聚^[122]

Fig 1.4 Mechanism of cellulose biodegradation by endoglucanase (EG), exoglucanase (cellobiohydrolase, CBH), and β -glucosidase (β G)^[122]

在造纸及纤维改性领域，上世纪 60 年代以来就有研究人员开展了使用温和的酶处理促进纤维脱纤化的相关研究^[113, 114]。近年来在 CNF 制备领域，酶法处理主要是在内切葡聚糖酶 (EG) 的作用下，水解纤维素不定型区^[115]，促进纤维分层或脱纤化，降低后续机械法制备 CNF 的能耗^[23, 116-119]。也有研究人员在此基础上，研究了辅助酶如木聚糖酶、多糖裂解单加氧酶 (LPMO) 辅助内切酶对纳米纤维化的促进作用，这是因为化学浆如 Kraft 浆中依然含有相当含量的半纤维素 (约 10%-30%)，而木聚糖酶有助于移除纤维表面的木聚糖，协同内切酶促进纤维溶胀和提高孔隙^[23]；而 LPMO 可以氧化断裂纤维素，打开高度组织的纤维素结构，也可以在纤维表面增加羧基电荷^[119]，减少纤维聚集，促进纤维素纳米纤维化。此外，也有研究人员使用纤维素酶全酶进行纤维处理以促进其纳米纤维化^[120, 121]，但由于纤维素酶不仅包括内切葡聚糖酶 (EG)，还包括外切葡聚糖酶 (CBH) 及 β -葡糖苷酶 (β G)，外切酶从纤维素结晶区的还原端或非还原端将二糖逐个切下，之后二糖被 β -葡糖苷酶水解为单糖 (图 1.4)^[122]。因此，尽管全酶处理也可以有效促进纤维素纳米纤维化并降低机械处理能耗，但也会水解部分纤维素为寡糖及单糖，降低纤维素的回收率、纳米纤维素得率及纤维聚合度^[123]。总之，酶法由于其专一性、特异性、反应条件温和、环境污染小的特性，正受到越来越多的关注。

1.5 本论文立题依据和主要研究内容

干法生物炼制技术主要由干酸预处理、固态生物脱毒及高固含量糖化与发酵三大核心工艺组成。干酸预处理实际上是一种固含量极高的稀酸预处理技术，因此在木质纤维素生物质加工过程中，出现了一些技术障碍，比如极高固含量下生物质中灰分的高浓度积累问题。由于不同来源的生物质原料灰分含量存在显著差异，因此在同样的预处理操作参数下，必然会导致预处理效率及后续生物转化效率的不稳定，这一问题在高固含量预处理过程中显得极为突出。此外，本课题组开发的干酸预处理及固态生物脱毒工艺没有废水流出，有助于保存生物质中所有组分进入发酵环节，这种优势给予了我们许多新的思路。比如农作物秸秆中存在一定量的水溶性碳水化合物与维生素 B，如何利用这两种含量较低的组分在先前的生物炼制概念中鲜有提出，其主要原因是水溶性碳水化合物及水溶性维生素均溶于水，而在目前世界上已有的几乎所有生物炼制工艺中，在生物质开始加工至发酵环节之前，基本均有废水流出，这使得这些水溶性组分易随废水排放，难以在生物炼制发酵过程中被利用；其次，水溶性碳水化合物在高温环境下容易降解，不同维生素也有不耐温或不耐酸、碱的性质，而一般的预处理环节就是通过这种剧烈的条件来破坏木质纤维素结构，以增加纤维素酶的可接近性，很难在以木质纤维素解聚为主要目的的糖平台权衡水溶性碳水化合物与维生素的保留。探索如何充分发挥干法生物炼制技术的优势解决水溶性碳水化合物及水溶性维生素两种组分的利用问题，有助于充分发挥木质纤维素生物质的特点及优势，促进生物炼制糖平台的进一步发展，因此本论文开展了如下五项研究解决生物炼制糖平台中的上述问题：

(1) 以预处理后物料组分、酶水解纤维素转化率及纤维素乙醇发酵指标为依据，考察不同灰分含量的玉米秸秆在相同的干酸预处理操作参数下（时间、温度、酸用量）的预处理效率，并分析影响预处理效率的主要因素是灰分中的何种离子。推测解决该方法，使用基于 pH 的调节法快速调节酸用量，测试是否可以使不同灰分含量的玉米秸秆达到相似的预处理效率及乙醇发酵指标，并以麦秆及稻草进行原料拓展，以纤维素乳酸发酵过程进行发酵过程应用拓展。

(2) 测试水溶性葡萄糖及果糖在干酸预处理后的保留情况，由于这部分糖极易在高温、低 pH 的条件下降解，尝试先将其进行生物转化、再进行预处理和脱毒、最后糖化发酵纤维素及半纤维素生产相同产品的策略。鉴于乳酸固态发酵过程简单易行（如黄储饲料），且乳酸可耐高温，首先在预处理前将水溶性糖进行固态生物转化为 L-乳酸，并优化条件测试其工业可行性；之后测试这一步工艺的增加对于干酸预处理物料的影响，主要包括化学组分特别是抑制物生成、催化剂用量、酶水解纤维素转化率等；最后测试同步糖化共发酵后相比于对照组乳酸产量的提高，并利用 Aspen plus 平台进行技术经济评价，分析比较其经济可行性。

(3) 玉米秸秆在蒸汽处理后作为饲料的可消化率大幅增加，但水溶性碳水化合物的降解会造成糖的浪费，且其 HMF 的含量也有所提高。在蒸汽处理前进行乳酸固态发酵，再进行蒸汽处理，以化学组分与酶水解纤维素转化率为依据来判断饲料可消化率的

变化。

(4) 选取营养需求大的乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* 的乳酸发酵过程测试玉米秸秆水解液中 B 族维生素组分对于发酵的促进。首先在合成培养基中进行单一 B 族维生素组分的缺失实验,判断该菌株进行乳酸发酵时对于维生素 B 的需求;之后在玉米秸秆水解液中进行单一 B 族维生素组分缺失实验,寻找与合成培养基缺失相同维生素时的发酵差异。最后测定水解液中的 B 族维生素组分含量,加入菌株需求量大且水解液中含量不足的特定维生素 B 进行发酵促进。

(5) 玉米秸秆中含有大量的生物素,比较玉米秸秆不同解剖学组分(秆、叶)中的生物素含量,制备高生物素含量的玉米叶水解液。探究不同菌株对于水解液中生物素的富集提取情况,选择最优的谷氨酸棒杆菌进行基因工程操作,对其生物素转运体编码基因 *bioYMN* 进行过表达,比较其生物素摄取能力的提高,并制备高生物素含量的细胞提取物,应用于特定需求生物素的谷氨酸发酵过程。

而在加拿大英属哥伦比亚大学(UBC)进行博士联合培养期间,研究方向依旧为木质纤维素解聚,但不同于生物炼制糖平台中将其彻底解聚为单糖再进行转化利用,此处将其解聚为大分子生物基材料——纳米纤维素。目前采用机械浆生产的含有木质素的纤维素纳米纤丝(LCNF)相比于化学浆生产的不含木质素的 CNF,具有得率高、兼容性强、热稳定性强等优势,而直接使用机械法生产 LCNF 的能耗极高,若使用化学法辅助,昂贵的化学试剂会与木质素反应造成浪费,同时产生严重的环境问题。由于机械浆中木质纤维素结构紧密,限制了纤维素酶的接近,因此迄今为止基本没有酶处理机械浆的相关研究。我们企图使用酶法进行软木机械浆处理,以促进其纳米纤维化,因此开展如下两项研究进行初步探索:

(1) 探索中性磺化处理对于机械浆纤维素酶可接近性的影响,并使用具备纤维素酶及半纤维素酶活力的诺维信纤维素酶 CTec 3 进行不同时间的酶处理,在同样的机械处理强度下,比较不同处理时间制备的 LCNF 得率,及副产物单糖的回收率。使用红外光谱(FTIR)、X 光衍射(XRD)、透射电镜(TEM)、热重分析(TGA)等方法表征获得的 LCNF,并制备 LCNF 膜。

(2) 探究内切葡聚糖酶(EG)对于机械浆纳米纤维化是否可以起到如同在化学浆中起到的较好的促进效果,并在此基础上验证辅助酶如木聚糖酶、甘露聚糖酶及多糖裂解单加氧酶(LPMO)对于 EG 处理的协助促进作用,比较不同酶处理后的纤维性质。之后使用相同强度的机械处理制备 LCNF,并比较 LCNF 的得率和特性(直径、结晶度、热稳定性等)。

第 2 章 木质纤维素生物质干酸预处理效率稳定性的提升

2.1 引言

基于酸的预处理(稀酸预处理、热水预处理、汽爆预处理及酸催化的汽爆预处理等)效率可重复性差的问题在木质纤维素生物炼制领域普遍存在,严重制约了木质纤维素预处理技术研发、工业示范和产业化。其主要表现在于预处理后木质纤维素物料的酶水解单糖得率和抑制物生成水平不稳定,这也会对后续的脱毒和发酵水平的稳定性带来显著的不利影响。对于不稳定的预处理强度而言,偏强的预处理条件使木质纤维素组分过度降解,物料回收率降低,并生成了较高浓度的糠醛、5-羟甲基糠醛(HMF)、乙酸、酚醛和酚酸等发酵抑制物,制约后续的酶解糖化和微生物发酵;而较弱的预处理条件则降低了后续酶水解过程的单糖得率,可发酵糖类的减少会导致较低的产品发酵浓度^[26, 27, 70, 96]。预处理过程重复性差与预处理过程工艺本身似乎并无直接关联,即使使用相同的反应器与操作参数,只要木质纤维素原料稍有差异,都可能出现预处理效率的差异。

在众多可能的因素之中,我们预计灰分是影响基于酸的预处理效率稳定性的最为重要的因素。灰分含量占总生物质干重的 3%-20%,频繁且显著的随作物种类、生长区域、季节、土壤、施肥、灌溉、收获方式、运输、储存以及预处理之前的前处理工艺等条件的变化而变化^[124, 125]。木质纤维素生物质的灰分主要有两大类:(1)一些在植物生长及收获等处理过程中,沾染在植物表面的灰尘、泥土及砂砾,称为外源性灰分,这些灰分可以用旋风分离、机械振动等方式脱除。(2)植物生长过程中,从外界环境中吸收的无机营养盐,这些元素不仅构成植物细胞壁(如硅等),还参与各种生化反应,调节植物正常的生理代谢,被称为生理性灰分^[12-15]。在生物炼制预处理操作之前,前处理工段仅仅去除了一部分的外源性灰分,不同批次木质纤维素物料中的灰分含量依旧存在显著的区别^[124, 125]。这些生物质中的灰分普遍具有较强的缓冲能力,可以中和酸催化剂,对于基于酸的预处理效率带来消极影响^[27, 43, 96, 126]。

在传统的稀酸预处理过程中,灰分对于预处理效率稳定性的影响往往被忽视。这是因为传统稀酸预处理固液比往往较低,为 1:5-1:20,酸催化剂的大量使用抵消了部分催化剂被灰分中和的消极效果^[27, 126, 127]。同样的情况也发生在酸预浸后的酸预处理或者汽爆预处理中,酸液的预浸过程同样中和了物料中含量不一的灰分,弱化了不同批次物料中灰分变化对于酸预处理效率的影响^[26, 27, 96]。而随着预处理技术的不断发展,生物质原料固含量不断提高,废水排放逐渐减少,单位原料的酸催化剂用量随之减少^[28, 70]。先进预处理技术诸如本实验室自主开发的干酸预处理技术,预处理前物料固含量已经高达 70%,并且预处理之后没有游离废水产生^[70, 96],这意味着灰分在预处理过程中始终没有从木质纤维素生物质中分离,积累效应严重^[96]。在这样的低酸用量场景下,灰分对酸液的中和严重影响了酸催化剂的催化效率,换句话说,在先进的高固含量预处理条件下,单位物料酸用量较低,没有额外的酸液流出,只有中和完灰分后,剩余的酸才是

真正有效的催化剂。因此，高固含量酸预处理效率对于灰分含量更为敏感。不同批次的物料中灰分含量不同，中和灰分带来的酸液损失也不同，这显著影响了预处理效率的稳定性，因此，亟需调整预处理参数来弥补高固含量预处理过程酸液损失的差异。

预处理参数的调整需要一系列的预处理操作、评估与计算，包括调整反应温度、停留时间及酸用量，这在工业化操作过程中显然是不可行的，这种复杂的实验不能快速应对不断变化的物料带来的不稳定的预处理效率。亟需建立一种简单、快速、应用范围广的方法来提高预处理的稳定性。

本章提出了一种酸用量的调整方法来应对高固含量预处理过程预处理效率不稳定的问题，该方法仅需要在预处理前取出相应批次的物料进行简单快速的 pH 滴定，即可实现预处理效率的稳定。该方法在不同高灰分含量的物料种类（玉米秸秆、麦秆、稻草）中均适用，并且成功的使用不同菌株（酵母菌或乳酸菌）在不同发酵过程（同步糖化共发酵与同步糖化发酵）中生产了不同发酵产品（乙醇及乳酸）。本章的研究为维持工业化高固含量预处理效率的稳定性提供了简单快速的解决方法。

2.2 材料与方法

2.2.1 不同灰分含量的木质纤维素原料与酶制剂

玉米秸秆于 2015 年秋季收获于内蒙古巴彦淖尔市，收获的玉米秸秆中纤维素含量为 31.5%，木聚糖含量为 21.3%，木质素含量为 15.7%，灰分含量为 6.7%。麦秆于 2015 年夏季收获于山东省济南市，收获的麦秆中纤维素含量为 34.0%，木聚糖含量为 25.7%，木质素含量为 19.0%，灰分含量为 10.0%。稻草于 2015 年夏季收获于江西省宜春市，收获的稻草中纤维素含量为 34.0%，木聚糖含量为 21.8%，木质素含量为 18.2%，灰分含量为 11.7%。上述的物料组分含量根据美国国家可再生能源实验室（NREL）的方法 LAP-002 及 LAP-005 测得^[128, 129]。

不同灰分含量的玉米秸秆通过不同量的自来水水洗获得，具体方法如下：将一定量的干秸秆加入一个大塑料盒中，并向其中加入 10、30、50、200 倍秸秆质量的自来水，浸泡 1 h 除去秸秆中的石子和泥沙，捞起玉米秸秆进行压榨除去游离水，烘干后待用。对于麦秆及稻草，仅仅使用 200 倍秸秆质量的自来水进行彻底除尘操作。将除尘后的秸秆与未除尘的原始秸秆分别使用锤式粉碎机粉碎，粉碎机筛网的筛孔直径约为 10 mm，粉碎后的秸秆颗粒密封装入塑料收纳袋，放置在室内待用。

纤维素酶 Cellic CTec 2 来自诺维信（中国）生物技术有限公司（Novozymes (China), Biotechnology Co., Ltd.）。通过 NREL 的纤维素酶滤纸酶活测定方法（LAP-006），测得其滤纸酶活为 203.2 FPU/mL^[130]；采用 Ghose 报道的方法^[131]，测得其纤维二糖酶活为 4900 CBU/mL；以牛血清蛋白（BSA）为标准品，通过考马斯亮蓝法（Bradford 法）^[132]，测得其酶蛋白含量为 87.31 mg/g。糖化酶 GA-L NEW 购自杰能科（中国）生物工程有限公司，其酶活为 103900 WU/mL。

2.2.2 菌种与培养基

生物脱毒菌株树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 (CGMCC 7452) 是本实验室先前筛选得到的真菌^[76]，用于降解转化预处理物料中的抑制物，保藏于 PDA (potato-dextrose-agar) 平板上。PDA 平板的制备：将 200 g 去皮的土豆擦成丝，加入 1 L 去离子水煮沸 30 min，加入 20 g 葡萄糖与 15 g 琼脂，混匀后 115 °C 灭菌 20 min，倒平板。

乙醇发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 (CGMCC 2528) 用于纤维素乙醇发酵过程，该菌株是一株通过 Co60 辐射诱变得到的适用于高固含量纤维素乙醇发酵的突变菌株，其不具备木糖利用能力^[133]。其培养基如下：

(1) 合成培养基 (种子活化)：20 g/L 葡萄糖，1 g/L 酵母粉，2 g/L KH_2PO_4 ，1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，1 g/L MgSO_4 ；

(2) 二级短期驯化种子培养基：60 g/L 葡萄糖 (其中 25% (v/v) 来自于 15% (w/w) 固含量的未脱毒玉米秸秆水解液，75% 来自于商品葡萄糖)，1 g/L 酵母粉，2 g/L KH_2PO_4 ，1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，1 g/L MgSO_4 ；

(3) 三级短期驯化种子培养基：60 g/L 葡萄糖 (其中 50% (v/v) 来自于 15% (w/w) 固含量的未脱毒玉米秸秆水解液，50% 来自于商品葡萄糖)，1 g/L 酵母粉，2 g/L KH_2PO_4 ，1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，1 g/L MgSO_4 ；

(4) 种子培养基：60 g/L 葡萄糖 (其中 50% (v/v) 来自于 15% (w/w) 固含量的未脱毒玉米秸秆水解液，50% 来自于商品葡萄糖)，1 g/L 酵母粉，2 g/L KH_2PO_4 ，1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，1 g/L MgSO_4 ；

(5) 同步糖化发酵营养盐添加量：1 g/L 酵母粉，2 g/L KH_2PO_4 ，1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，1 g/L MgSO_4 。

乙醇发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 由山东大学鲍晓明老师课题组提供，用于纤维素乙醇发酵过程。该菌株的出发菌株是野生型双倍体菌株 *Saccharomyces cerevisiae* BSIF33 (筛选自泰国的热带水果)，通过分子生物学改造、筛选和适应性驯化最终得到，其在乙醇发酵过程中可以在高效利用葡萄糖的同时利用木糖，进行同步糖化共发酵 (SSCF)^[63, 82]。为了降低种子培养成本，在二级与三级短期驯化种子培养基中以脱毒后的预处理玉米秸秆物料为底物，以物料中保留的木糖以及酶解糖化产生的葡萄糖为碳源进行种子培养^[88]，其培养基如下：

(1) YPD 培养基 (种子活化)：20 g/L 葡萄糖，10 g/L 酵母粉，20 g/L 蛋白胨；

(2) 二级短期驯化种子培养基：5% (w/w) 快速固态生物脱毒后的预处理物料，10 g/L 酵母粉，2 g/L KH_2PO_4 ，2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，0.5 g/L MgSO_4 ，纤维素酶 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的预处理物料，10 g/L 酵母粉，2 g/L KH_2PO_4 ，2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，0.5 g/L MgSO_4 ，纤维素酶 10 mg 蛋白/g 纤维素；

(4) 同步糖化共发酵营养盐添加量：10 g/L 酵母粉，2 g/L KH_2PO_4 ，2 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，

0.5 g/L MgSO₄。

乳酸发酵菌株 *Pediococcus acidilactici* TY112 (CGMCC 8664) 用于纤维素 L-乳酸发酵过程, 其来自于敲除 D-乳酸脱氢酶 *ldhD* 的野生型乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2^[91]。其种子培养基为简化的 MRS 培养基: 20 g/L 葡萄糖, 10 g/L 酵母粉, 10 g/L 蛋白胨, 2 g/L 柠檬酸氢二铵, 5 g/L 无水乙酸钠, 0.3 g/L MgSO₄, 2 g/L K₂HPO₄, 0.23 g/L MnSO₄。

2.2.3 干酸预处理与生物脱毒

不同灰分含量的秸秆首先进行干酸预处理以提高后续纤维素酶水解得率^[70, 96]。具体方法如下: 1200g 木质纤维素原料(干重)和稀硫酸溶液按次序加入 20 L 的预处理反应器中, 固液比为 2:1, 酸用量的调整根据 2.2.6 的方法, 预处理反应器中内置螺带搅拌桨, 转速 50 rpm, 搅拌 3 min 使得反应器内固体与液体混合均匀, 之后从反应器底部通入蒸汽进行加热, 初始蒸汽压力为 1.6 MPa, 预处理过程反应温度为 175 °C, 升温时间 5 min, 停留时间 5 min。反应完毕后排出蒸汽, 泄压后放出物料, 预处理后的秸秆物料固含量维持在 50% (w/w) 左右, 以固态形式存在, 没有产生游离废水。

预处理后的物料需要使用 *Amorphotheca resinae* ZN1 进行生物脱毒以去除抑制物^[76, 77]。首先使用一定量的 20% (w/w) Ca(OH)₂ 将预处理后物料的 pH 上调至 5-6, 将 4-5 kg 物料装入 15 L 生物脱毒反应器中, 按照 10% (w/w) 的质量比接入种子开始生物脱毒, 温度 28 °C, 脱毒时间约 48-72 h, 通气量维持 0.8 vvm, 每隔 12 h 开启螺带搅拌桨, 50 rpm 搅拌 3 min, 脱毒种子是指含有大量 *A. resinae* ZN1 菌丝及孢子的预处理物料。脱毒后的物料固含量依然维持在 50% (w/w) 左右, 脱毒过程没有产生游离废水。

2.2.4 发酵种子液的培养

对于不具备木糖代谢能力的乙醇发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1^[96], 首先从 -80 °C 超低温冰箱取出 *S. cerevisiae* DQ1 菌株的冻存管, 倒入装有 20 mL 合成培养基的 100 mL 摇瓶中活化 18 h; 然后以 10% (v/v) 接种量转接到 20 mL 二级短期驯化种子培养基中培养 15 h; 接着以 10% (v/v) 接种量转接到 20 mL 三级短期种子驯化培养基中培养 15 h; 再次以 10% (v/v) 接种量转接到 20 mL 三级短期种子驯化培养基中培养 15 h, 以提高菌株对抑制物耐受能力; 最后转接到装有 200 mL 种子培养基的 1 L 摇瓶中培养 12 h, 该酵母培养液作为发酵罐发酵所需的种子。上述种子培养的条件均为 30 °C, 150 rpm。

对于具备木糖代谢能力的乙醇发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* XH7^[82, 89], 首先从 -80 °C 超低温冰箱取出 *S. cerevisiae* XH7 菌株的冻存管, 倒入装有 20 mL YPD 培养基的 100 mL 摇瓶中活化 12 h; 然后以 10% (v/v) 接种量转接到 20 mL 二级短期驯化种子培养基中培养 12 h; 再以 10% (v/v) 接种量转接到装有 200 mL 三级种子培养基的 1 L 摇瓶中培养 24 h, 该酵母培养液作为发酵罐发酵所需的种子。上述种子培养的条件均为 30 °C, 200 rpm。

对于 L-乳酸发酵菌株 *Pediococcus acidilactici* TY112, 首先从 -80 °C 超低温冰箱取出

P. acidilactici TY112 菌株的冻存管, 倒入装有 20 mL 简化 MRS 培养基的 100 mL 摇瓶中活化 12 h; 然后以 10% (v/v) 接种量转接到装有 200 mL 简化 MRS 培养基的 500 mL 摇瓶中培养 5 h, 该扩培后的乳酸菌培养液作为发酵罐发酵所需的种子。上述种子培养的条件均为 42 °C, 150 rpm, 种子培养过程不调节 pH。为了防止乳酸片球菌絮凝, 还需要在每次转接时, 向简化的 MRS 培养基中加入 1% (v/v) 糖化酶^[87]。

2.2.5 同步糖化发酵 (SSF)

不同灰分含量的玉米秸秆、麦秆及稻草的同步糖化乙醇发酵 (不利用木糖) 在装有螺带式搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行^[69], 发酵采用的乙醇发酵菌株为 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1^[96]。首先将脱毒后的预处理秸秆物料缓慢加入发酵罐中进行预糖化, 酶用量为 14 mg 蛋白/g 纤维素, 温度 50 °C, pH 维持 5.5, 搅拌转速 150 rpm, 预糖化时间为 12 h。对于彻底清洗除尘的秸秆而言, 糖化固含量为 30% (w/w), 而对于高灰分含量的秸秆而言, 为了维持相同的纤维素载量, 固体含量高于 30% (w/w); 预糖化结束后, 将温度降为 37 °C, 将 10% (v/v) 的 *S. cerevisiae* DQ1 种子液与发酵营养盐接入到发酵罐中进行同步糖化发酵, 过程维持温度 37 °C, pH 5.5, 搅拌转速 150 rpm, 发酵时间为 60 h, pH 通过发酵罐自动补碱系统补入 5 M NaOH 溶液进行维持。每 12 h 进行取样, 样品 11167×g 离心 5 min, 上清液通过高效液相色谱 (HPLC) 检测其中的葡萄糖、乙醇、糠醛、5-HMF 及乙酸浓度。

不同灰分含量的玉米秸秆的同步糖化乙醇共发酵 (利用木糖) 在装有螺带式搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行^[69], 发酵采用的乙醇发酵菌株为 *Saccharomyces cerevisiae* XH7^[82, 89]。首先将脱毒后的预处理秸秆物料缓慢加入发酵罐中进行预糖化, 酶用量为 14 mg 蛋白/g 纤维素, 温度 50 °C, pH 维持 5.5, 搅拌转速 200 rpm, 预糖化时间为 12 h, 对于彻底清洗除尘的玉米秸秆而言, 糖化固含量为 30% (w/w), 而对于高灰分含量的玉米秸秆而言, 为了维持相同的纤维素载量 11.7% (w/w), 固体含量高于 30% (w/w); 预糖化结束后, 将温度降为 37 °C, 将 20% (v/v) 的 *S. cerevisiae* XH7 种子液与发酵营养盐接入到发酵罐中进行同步糖化共发酵, 过程维持温度 30 °C, pH 5.5, 搅拌转速 200 rpm, 发酵时间为 96 h, pH 通过发酵罐自动补碱系统补入 5 M NaOH 溶液进行维持。取样及测试方法同上。

不同灰分含量的玉米秸秆的同步糖化乳酸发酵在装有螺带式搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行^[69], 发酵采用的 L-乳酸发酵菌株为 *Pediococcus acidilactici* TY112^[87]。首先将脱毒后的预处理秸秆物料缓慢加入发酵罐中进行预糖化, 酶用量为 14 mg 蛋白/g 纤维素, 温度 50 °C, pH 维持 5.5, 搅拌转速 150 rpm, 预糖化时间为 6 h, 对于彻底清洗除尘的玉米秸秆而言, 糖化固含量为 30% (w/w), 而对于高灰分含量的玉米秸秆而言, 为了维持相同的纤维素载量 11.7% (w/w), 固体含量高于 30% (w/w); 预糖化结束后, 将温度降为 42 °C, 将 10% (v/v) 的 *P. acidilactici* TY112 种子液与营养盐接入到发酵罐中进行同步糖化发酵, 过程维持温度 42 °C, pH 5.5, 搅拌转速 150 rpm, 发酵时间为 72 h, pH 通过发酵罐自动补碱系统补入 5 M NaOH 溶液进行维持。取样及测试方法同上。关

于发酵用的营养盐，对于彻底清洗的玉米秸秆物料，加入除葡萄糖外的简化 MRS 培养基的所有成分，即 10 g/L 酵母粉，10 g/L 蛋白胨，2 g/L 柠檬酸氢二铵，5 g/L 无水乙酸钠，0.3 g/L $MgSO_4$ ，2 g/L K_2HPO_4 ，0.23 g/L $MnSO_4$ ；对于未除尘的玉米秸秆物料，仅加入 10 g/L 酵母粉，10 g/L 蛋白胨，2 g/L 柠檬酸氢二铵及 0.23 g/L $MnSO_4$ 。

2.2.6 基准 pH 调节法

首先将彻底清洗除尘（200 倍质量的水洗）的物料，进行预处理条件实验，通过组分测定，酶水解及乙醇发酵指标评估最优的预处理条件，此时的硫酸用量被确定为基准酸用量（g 硫酸/g 干物料）；再将 2 g 彻底清洗除尘的烘干物料，按基准酸用量加入相应的硫酸，再加入 100 mL 去离子水，置于摇床 30 °C 混合 30 min，此时的 pH 称为基准 pH 值；将不同灰分含量的烘干物料，加入 100 mL 去离子水，摇匀后用 5%（w/w）稀硫酸溶液滴定至该种物料的基准 pH 值，计算加入的硫酸用量（g 硫酸/g 干物料）。将上述测得的每种灰分含量物料对应的酸用量，用于实际的干酸预处理过程。试验进行三组平行，取平均值作为最终数据。

2.2.7 组分测定及酶水解评价

纤维素和半纤维素含量根据 NREL 的两步酸解法（TP-510-42618）测得^[129]。物料经浸提与去离子水彻底清洗后，彻底烘干测得物料不溶性固体含量。取 100 mg 烘干的不溶性固体置于压力试管中，并加入 1 ml 72%（w/w）硫酸溶液，30 °C 反应 1 h，期间使用玻璃棒充分搅拌。反应结束，加入 28 mL 去离子水，稀释酸液浓度为 4%（w/w），置于灭菌锅中 121 °C 稀酸水解 1 h。反应完毕后，用 $CaCO_3$ 粉末中和反应液至无气泡产生，取样 11167×g 离心 5 min，之后用 HPLC 检测其中的葡萄糖和木糖浓度，计算待测样品中的纤维素和木聚糖含量。试验进行两组平行，取平均值作为最终数据。

寡聚葡萄糖和寡聚木糖含量根据 NREL 的一步酸解法（TP-510-42623）测得^[134]。取约 5 g 预处理后的秸秆物料，加入约 50 mL 去离子水，150 rpm 浸提 2 h，抽滤，上清液样品可以用 HPLC 检测其中的抑制物及单糖浓度。对于寡糖测定，取 5 mL 上清液，加入 1 mL 72%（w/w）硫酸溶液及 28 mL 去离子水，稀释酸液浓度为 4%（w/w），置于灭菌锅中 121 °C 稀酸水解 1 h。反应完毕后，用 $CaCO_3$ 粉末中和反应液至无气泡产生，取样 11167×g 离心 5 min，之后用 HPLC 检测其中的葡萄糖和木糖浓度，计算反应前后的差值，多出的部分可折算为样品中的寡聚葡萄糖和寡聚木糖含量。试验进行两组平行，取平均值作为最终数据。

灰分含量按照 NREL 的标准方法（TP-510-42622）测得^[128]。称取约 0.8 g 彻底烘干的木质纤维素原料于烘干的坩埚中，置于马弗炉煅烧，逐渐升温至 250 °C，维持 30 min，继续升温至 575 °C，维持 3 h；反应结束后，冷却称重。反应前后质量比即为木质纤维素原料中的灰分含量。试验进行三组平行，取平均值作为最终数据。

预处理后物料的酶水解评价实验按照 NREL 的标准方法 LAP-009 进行^[135]。称取 0.5 g 干重的预处理后物料，加入 10 mL 去离子水，用 5 M NaOH 溶液调节体系 pH 至 4.8，加入 80 μ L 四环素溶液（10 mg/mL 溶于 70% 乙醇溶液），加入纤维素酶 20 FPU/g 干物料

(DM), 相当于 26 mg 酶蛋白/g 纤维素, 并补入 0.1 M pH 4.8 的柠檬酸缓冲液至总体积 20 mL。置于水浴摇床中, 温度 50 °C, 转速 150 rpm, 72 h 后取样测定其中的葡萄糖浓度。试验进行两组平行, 取平均值作为最终数据。

纤维素水解得率计算公式如下:

$$\text{Cellulose conversion (\%)} = \frac{(C_{\text{glu}} - C_0) \times V}{m \times f_{\text{cellulose}} \times 1.111 + \frac{m \times C_{\text{oligu}}}{1000}} \times 100\% \quad (2-1)$$

Cellulose conversion—酶水解得率, %;

C_{glu} —水解后葡萄糖浓度, g/L;

C_0 —水解体系中物料与酶液引入的初始葡萄糖浓度, g/L;

V —水解过程总体积, L;

m —水解前干物料质量, g;

$f_{\text{cellulose}}$ —水解前干物料中纤维素含量, mg/g DM;

C_{oligu} —水解前干物料中寡聚葡萄糖含量, mg/g DM。

2.2.8 检测方法

葡萄糖、木糖、乙醇、乳酸、乙酸、糠醛、HMF 等可溶性组分含量使用岛津 HPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan) 测得, 泵型号为 LC-20AD, 检测器为示差折光检测器 RID-10A, 色谱柱 (300 mm×7.8 mm) 型号为 Bio-rad Aminex HPX-87H。检测条件: 流动相为 5 mM 的稀硫酸溶液, 流速 0.6 mL/min, 柱温维持 65 °C。

金属离子 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Na^+ 、 Al^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 含量使用等离子体发射光谱 (725 ICP-OES) 测得, 检测器为同步电荷耦合 (CCD) 检测器, 功率 1.2 kW, 等离子体气体流速为 15 L/min, 辅助气体流速为 1.5 L/min, 雾化器气体流速为 0.75 L/min, 泵速 15 rpm, 样品延滞时间为 35 s, 稳定时间 10 s。样品的前处理: 称取约 0.1 g 左右的固体或者液体样品, 加入 3 mL 硝酸及 1 mL 高氯酸, 煮沸反应 4 h, 去离子水定容至 25 mL 待测。

阴离子 Cl^- 与 PO_4^{3-} 含量使用离子色谱 (Dionex ICS-1100) 测得, 检测器为电导检测器 (AERS 500 (4 mm)), 色谱柱为 IonPac AS11 分析柱 (4 × 250 mm), 柱温维持 65 °C, 流速维持 1 mL/min。梯度洗脱方法: 10 mM KOH 溶液进行 12 min, 6 s 内换为 25 mM KOH 溶液, 维持 12 min, 6 s 内换为 10 mM KOH 溶液, 维持 6 min。

2.3 结果与讨论

2.3.1 玉米秸秆中灰分含量变化引起的预处理效率不稳定

为了准确的确定玉米秸秆中灰分含量对于预处理效率的影响, 玉米秸秆首先通过不同量的 (10、30、50、200 倍秸秆质量) 自来水水洗, 获得灰分含量分别为 3.26%, 4.33%, 4.63%, 5.30% 及 6.65% (w/w) 的玉米秸秆。对这些不同灰分的物料, 加入同样的硫酸用量 (20mg 硫酸/g 干玉米秸秆, 后续实验中确定的彻底除尘玉米秸秆的基准酸用量), 进行同样反应温度及停留时间的干酸预处理。结果发现灰分含量越高, 预处理后物料中

木聚糖及寡聚木糖的残余就越高(表 2.1A), 后续的纤维素酶水解转化率也越低(图 2.1A)。使用乙醇发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 (无木糖利用能力), 在相同的纤维素载量下 (11.7%, w/w) 进行同步糖化发酵评价实验。结果发现, 随着原料中灰分含量从 3.26% 提高到 6.65%, 预糖化 12 h 后初始葡萄糖浓度从 112.2 g/L 下降至 81.6 g/L, 乙醇同步糖化发酵结束后的最终浓度从 67.1 g/L 下降到 50.7 g/L (图 2.1B)。简而言之, 原料中的高灰分含量会导致预处理效率急剧下滑, 水解得率及乙醇发酵指标均明显下降。

我们接下来分析预处理效率随灰分含量上升而下降的原因。首先, 测定了水解液中的水溶性离子含量, 发现未除尘的秸秆 (灰分含量 6.65%) 中钾、镁、钠、氯离子含量均远高于水洗除尘的秸秆 (灰分含量 3.26%) (表 2.2)。为了探究这些水溶性离子是否降低了预处理效率, 我们将 31.56 mg/g 干物料 KCl, 1.71 mg/g 干物料 Na_2SO_4 以及 13.88 mg/g 干物料硫酸镁补加入彻底清洗除尘的玉米秸秆中。我们发现补加中性盐离子后的秸秆与彻底清洗除尘的玉米秸秆相比, pH 基本一致。之后将两者在相同条件下进行干酸预处理 (20 mg 硫酸/g 干物料, 175 °C 下反应 5 min), 我们发现两者的预处理效率也基本一致: 酶水解得率非常接近, 补盐组为 $92.82\% \pm 1.87\%$, 未补盐组为 $93.29\% \pm 1.17\%$; 木聚糖、寡聚木糖及乙酸、糠醛、HMF 的含量也非常接近 (表 2.1C)。该结果说明当原料的 pH 维持稳定时, 水溶性离子如钾、镁、钠、氯离子的存在不是影响预处理效率的关键因素。

表 2.1 不同灰分含量玉米秸秆在干酸预处理后的组分

Table 2.1 Composition of dry acid pretreated corn stover containing different ash

Ash (%)	Cellulose (%)	Xylan (%)	Glucose (mg/g DM)	Xylose (mg/g DM)	O-Glu ^a (mg/g DM)	O-Xyl ^b (mg/g DM)	Acetate (mg/g DM)	HMF (mg/g DM)	Furfural (mg/g DM)
(A) Pretreated corn stover under the constant sulfuric acid usage (20 mg sulfuric acid per g dry corn stover)									
3.26	38.85±1.49	3.62±0.05	19.54±0.24	137.11±0.54	11.18±1.19	62.69±3.59	17.88±1.33	1.85±0.01	1.89±0.15
4.33	37.54±0.48	4.79±0.23	16.30±0.37	96.44±1.79	20.70±3.35	88.84±6.24	13.98±0.82	1.97±0.09	1.56±0.02
4.63	37.19±0.50	5.76±0.01	15.87±0.72	94.62±2.03	20.82±1.53	90.02±4.52	13.45±0.02	1.92±0.07	1.65±0.03
5.30	36.64±0.56	6.23±0.12	16.45±0.25	91.59±1.08	20.75±1.77	92.85±4.87	12.06±1.94	2.42±0.03	1.47±0.09
6.65	33.08±0.35	9.01±0.30	19.83±0.16	46.96±1.17	27.08±0.87	95.05±2.01	10.56±0.24	3.54±0.11	0.82±0.02
(B) Pretreated corn stover under the adjusted sulfuric acid usage									
3.26	38.85±1.49	3.62±0.05	19.54±0.24	137.11±0.54	11.18±1.19	62.69±3.59	17.88±1.33	1.85±0.01	1.89±0.15
4.33	38.05±0.95	3.29±0.09	26.37±0.24	124.58±1.47	14.72±0.13	56.93±3.67	16.85±0.78	3.59±0.01	2.92±0.01
4.63	37.03±0.47	3.05±0.15	28.63±0.03	124.87±2.23	13.70±0.44	52.66±0.31	19.43±0.08	4.18±0.12	3.16±0.13
5.30	36.44±0.22	3.18±0.03	32.45±0.20	124.31±1.96	16.53±2.93	50.26±3.96	19.90±0.53	5.76±0.14	3.42±0.03
6.65	33.17±0.25	3.09±0.22	35.70±0.47	116.66±1.67	16.37±2.82	50.02±2.55	18.25±0.20	7.28±0.03	3.09±0.02
(C) Pretreated corn stover under the constant sulfuric acid usage (20 mg sulfuric acid per g dry corn stover) after soluble salts addition									
3.26*	37.80±0.79	3.44±0.09	18.06±0.35	131.07±1.10	14.64±2.99	58.53±2.43	18.35±0.72	1.91±0.04	2.06±0.08

(a) 寡聚葡萄糖含量; (b) 寡聚木糖含量。*: 将 34.31 mg/g DM KCl, 1.85 mg/g DM Na₂SO₄ 及 9.02 mg/g DM MgSO₄ 加入彻底清洗除尘 (200 倍秸秆质量的水) 的玉米秸秆中, 同样在 175 °C, 20.0 mg/g DM 硫酸用量条件下反应 5 min。

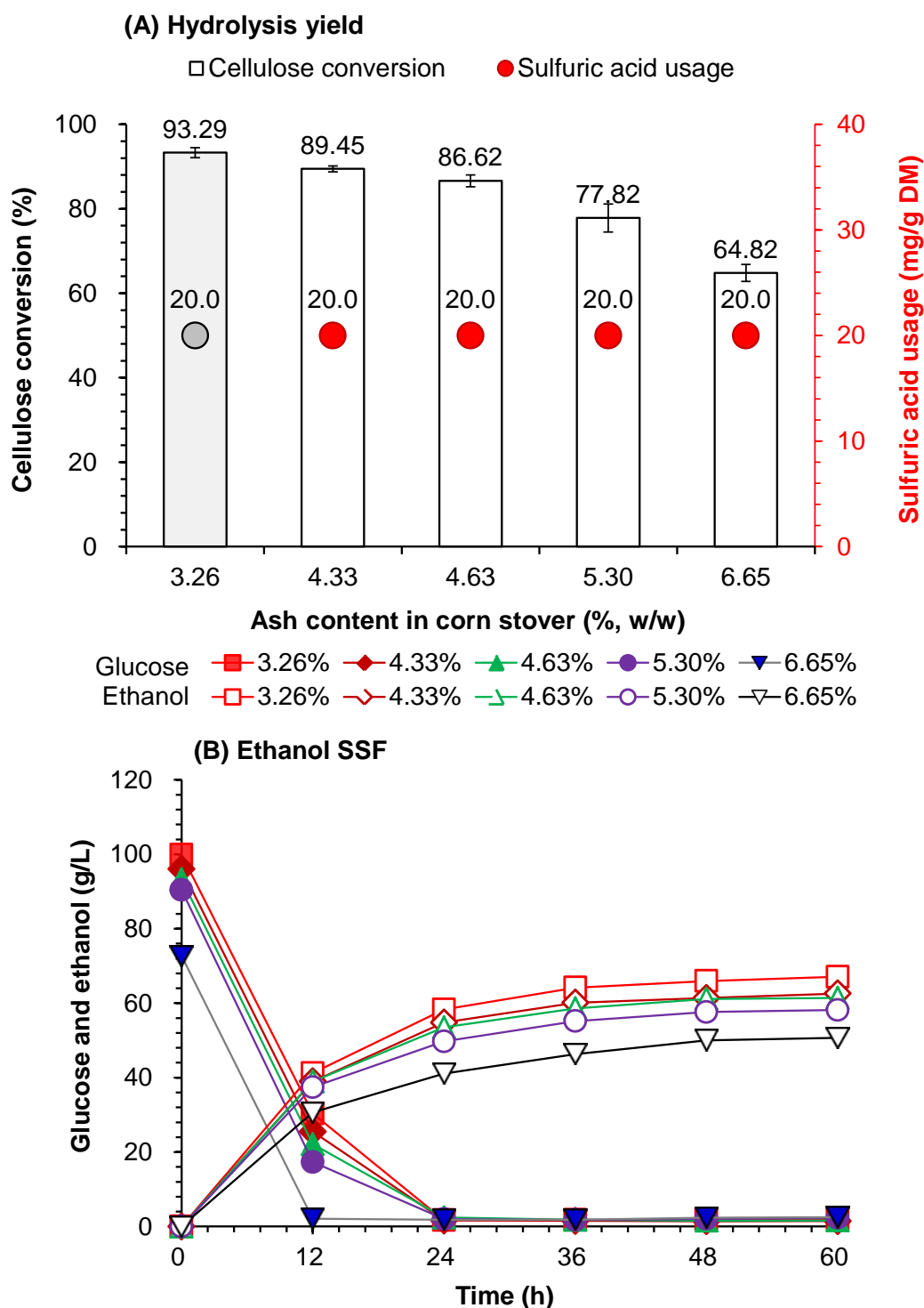


图 2.1 不同灰分含量玉米秸秆在恒定酸用量条件 (20 mg/g DM) 下预处理效率评估

Fig. 2.1 Pretreatment efficiency assay of corn stover feedstocks containing different ash under constant sulfuric acid usage (20 mg/g DM)

(A) 预处理后玉米秸秆的酶水解得率; (B) 预处理且脱毒后玉米秸秆的同步糖化发酵。酶解条件: 2.5%固含量, 酶用量 26 mg 酶蛋白/g 纤维素, 50 °C, pH 4.8, 150 rpm。同步糖化发酵条件: 11.7% (w/w) 纤维素含量, 酶用量 14 mg 酶蛋白/g 纤维素, 预糖化反应温度 50 °C, pH 5.5, 反应 12 h, 同步糖化发酵反应温度 37 °C, pH 5.5, 发酵 60 h, 菌株为 *S. cerevisiae* DQ1。

表 2.2 不同灰分含量玉米秸秆预处理后的水溶性离子含量

Table 2.2 Soluble cation and anion contents in the dry acid pretreated corn stover containing different ash

		Ash in hydrolysate (mg/L)		Ash equivalent in corn stover (mg/g DM)	
		Raw feedstock	Thoroughly washed feedstock	Raw feedstock	Thoroughly washed feedstock
Cation contents	K ⁺	7,600	500	17.73	1.17
	Mg ²⁺	1,800	610	4.2	1.42
	Na ⁺	270	32	0.63	0.075
	Al ³⁺	10	6	0.023	0.014
	Cu ²⁺	<5	<5	<0.012	<0.012
	Fe ³⁺	40	36	0.093	0.084
	Mn ²⁺	15	12	0.035	0.028
	Zn ²⁺	3.5	3.5	0.008	0.008
Anion contents	Cl ⁻	5,051.7	176	11.79	0.41
	PO ₄ ³⁻	217.9	191	0.51	0.45

干酸预处理及生物脱毒后的玉米秸秆在 30% (w/w) 固含量, 酶用量 14 mg 酶蛋白/g 纤维素, 50 °C 的条件下进行水解液制备, 水不溶性组分经 10,000 rpm 离心 10 min 去除, 上清液用于测定离子含量。

第二个考虑的因素在于水洗移除的碳酸盐、氧化物及氢氧化物，这一类物质不同于先前的阳离子及氯离子等阴离子，它们具备很强的酸中和能力^[96, 136]。对于含有不同灰分的秸秆而言，其初始 pH 较为相似，均在 6.65-6.83 的范围。但在加入基准硫酸用量之后，pH 出现显著差异，高灰分含量的秸秆由于其酸中和能力较强，pH 为 3.21；而秸秆中灰分含量越低，pH 也逐渐降低至 2.30（图 2.2），该 pH 值为彻底清洗的玉米秸秆原料在基准酸用量条件下获得的 pH，被我们定义为基准 pH 值。

其中，基准酸用量是通过彻底清洗除尘的玉米秸秆在预处理优化条件实验中得到的（图 2.3，表 2.3）。所谓的较优的预处理条件，指的是在维持后续较高的纤维素酶水解得率，及预处理过程较高的木聚糖移除率、寡聚木糖水解率的情况下，抑制物（糠醛、HMF）产生尽可能低的条件。对于彻底清洗的玉米秸秆而言，当酸用量为 20 mg 硫酸/g 干物料，22.5 mg 硫酸/g 干物料及 25 mg 硫酸/g 干物料时，酶水解得率均高于 90%；若酸用量低于 20 mg 硫酸/g 干物料，酸催化剂过少，预处理效率显著下降；而从抑制物的角度看，在酶水解得率较高时（大于 90%），显然在 20 mg 硫酸/g 干物料的酸用量条件下，糠醛及 HMF 产生较少，故 20 mg 硫酸/g 干物料为该类玉米秸秆在移除所有外源灰分后的最适酸用量，我们将其定义为基准酸用量。

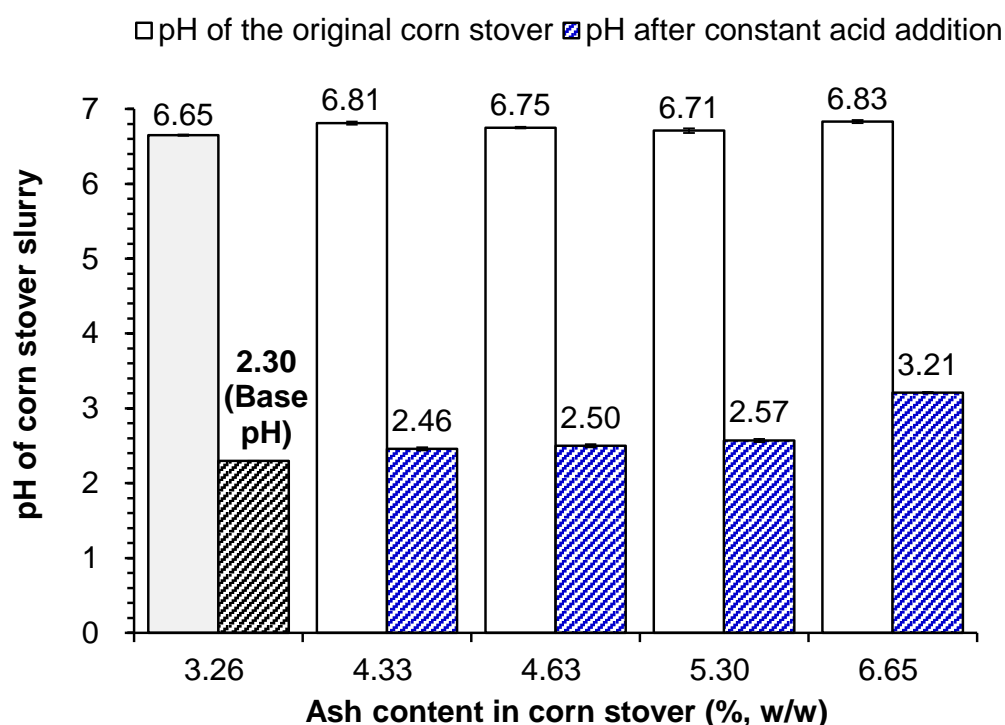


图 2.2 玉米秸秆悬浮液滴加硫酸前后的 pH 变化

Fig. 2.2 pH change of corn stover suspension slurry before and after sulfuric acid addition

将 2 g 不同灰分含量的烘干后的玉米秸秆，加入 100 mL 去离子水，置于摇床 30 °C 混合 30 min 制备玉米秸秆悬浮液，此时的 pH 称为初始 pH 值；再按照基准酸用量向悬浮液滴加硫酸（20 mg 硫酸/g 干物料），置于摇床 30 °C 充分混合 30 min，此时对于彻底清洗除尘的秸秆（3.26% 灰分含量）而言，其 pH 值为基准 pH 值。

对于彻底除尘的玉米秸秆而言, 20 mg 硫酸/g 干物料为其最适酸用量, 若酸用量下降至 17.5 mg 硫酸/g 干物料, 预处理效率急剧下滑。同样的, 若对于除尘不彻底甚至未除尘的秸秆而言, 也按照相同的硫酸催化剂用量 (20 mg 硫酸/g 干物料) 加入酸液, 物料中存在的灰分物质如碳酸盐、氧化物及氢氧化物, 会大量的中和加入的硫酸, 导致剩余的硫酸减少, 进而催化预处理反应的有效酸催化剂的量低于彻底除尘的玉米秸秆, 导致预处理效率的下滑。而在工业化角度看, 即使是同一地域生产的同一品种的玉米秸秆, 其外源灰分的含量也由于收割过程的差异而有所不同, 导致每一批次进入预处理工段的秸秆也会有一定差异。必须在高固含量预处理过程中, 使用不同的硫酸量中和这些含量不一的灰分物质, 使得秸秆中残余的硫酸催化剂含量保持一致, 这才是维持酸预处理效率稳定性的关键因素。然而, 用小反应器进行预处理条件实验去确定酸用量费时费力, 亟需找到一个简单、快速且普遍性强的调节方法来应对预处理效率的波动。

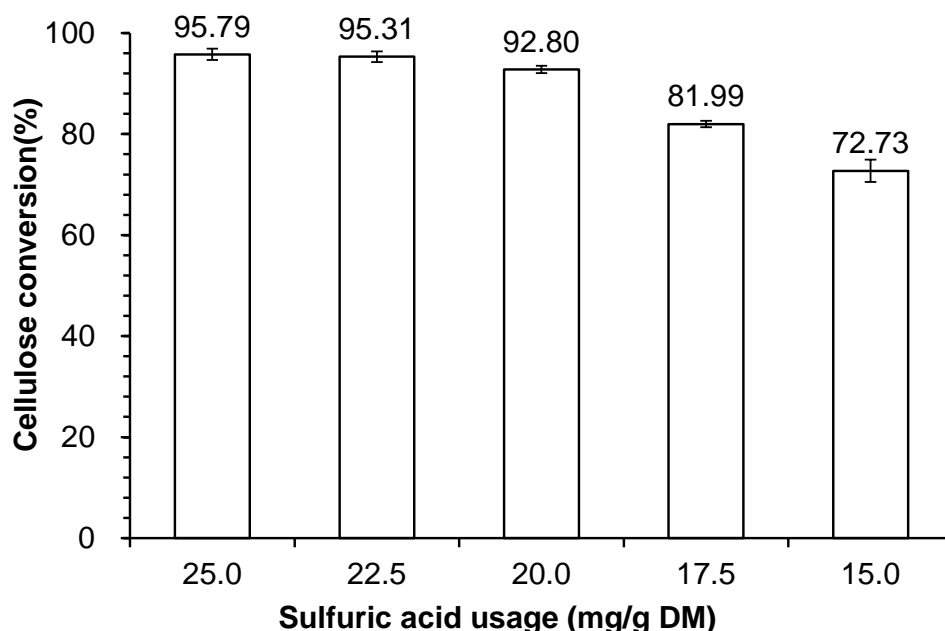


图 2.3 酸用量对干酸预处理效率的影响

Fig. 2.3 Impact of sulfuric acid usage on pretreatment efficiency in dry acid pretreatment
彻底清洗除尘的玉米秸秆 (3.26% 灰分含量) 在不同硫酸用量下进行干酸预处理, 175 °C 反应 5 min。

2.3.2 通过酸用量的快速调整实现稳定的预处理效率

显然一个不需要进行实际预处理参数修正实验的简单快速的酸用量调整方法是理想的解决办法, 这里我们找到了一个对于不同灰分含量物料所需硫酸用量的快速调整方法, 来弥补预处理操作前物料中不同灰分对于硫酸催化剂的中和, 以实现稳定的预处理效率。

由上一节可知, 对于彻底除尘的玉米秸秆而言, 20 mg 硫酸/g 干物料是其最优的酸用量 (图 2.3, 表 2.3)。这个可以使彻底除尘的玉米秸秆达到较优预处理效率的最低的硫酸催化剂用量, 被我们定义为基准酸用量, 可以将其理解为加入的硫酸基本都参与最终的催化过程。之后的实验中, 我们将彻底除尘的秸秆与基准酸用量进行预处理实验的组作为其他灰分含量玉米秸秆预处理操作的对照组。

为了解决预处理效率的波动, 我们首先制备了玉米秸秆悬浮液。其中, 彻底清洗除尘的玉米秸秆 (灰分含量 3.26%) 制备的悬浮液, 加入其基准酸用量 (20 mg 硫酸/g 干物料) 的硫酸, 混合均匀, 我们将此时的 pH 定义为基准 pH 值 (图 2.2), 该批次玉米秸秆为 2.30。我们推测不同灰分含量秸秆预处理效率的差距可以通过提前多加入硫酸进行灰分中和, 使得高灰分含量秸秆的 pH 达到基准 pH 来实现, 这也就意味着多加入的硫酸用于中和, 而剩余的硫酸与彻底除尘秸秆中加入基准酸用量的硫酸后剩余的硫酸一致, 最终有效催化剂的量一致, 我们预计相同的有效催化剂的量可以使得秸秆达到相同的预处理效率。由于中和产生的硫酸盐是中性的, 如表 2.1C 的对照试验可知, 这些中性盐离子对预处理效率不会产生消极的影响。

在本研究中, 对于含有 4.33% (w/w), 4.63% (w/w), 5.30% (w/w) 以及 6.65% (w/w) 不同灰分含量的玉米秸秆而言, 调节相应的 pH 至基准 pH (2.30) 的酸用量分别为 23.0, 23.5, 23.9 及 32.4 mg 硫酸/g 干物料 (图 2.4)。我们将不同灰分含量的玉米秸秆在其相应的调整后的硫酸用量条件下进行干酸预处理, 之后进行组分测定、酶水解评价及乙醇同步糖化发酵评价。正如我们预测的那样, 五种不同灰分含量的玉米秸秆在调整酸用量进行预处理之后, 其酶水解得率基本一致 (图 2.5A); 在乙醇同步糖化发酵过程中, 预糖化 12 h 产生的初糖浓度基本一致, 且最后发酵得到的乙醇浓度也基本一致 (图 2.5B)。从预处理后的组分分析看 (表 2.1B), 五种不同灰分含量的秸秆预处理后木聚糖残余基本一致, 木糖与寡聚木糖的比例也基本一致, 乙酸、糠醛的产生也基本一致。上述现象均可说明经过酸用量的快速调节, 可以获得较为一致的预处理效率, 同时可以实现后续稳定高效的生物转化。特别要注意的有两点, 一是预处理后纤维素含量随灰分含量的提高而逐渐降低, 其原因在于灰分占据了总物料干重的一定比例, 故其他组分的比例均有所下降, 该现象是除尘不彻底的秸秆在无废水物流流出的预处理过程中不可避免的。二是 HMF 的产生, 在预处理后的未水洗除尘的秸秆中, HMF 含量高达 7.3 mg/g 干物料, 而预处理后的彻底清洗的秸秆含有的 HMF 仅为 1.9 mg/g 干物料。该现象的主要原因在于, 水洗除尘移除了玉米秸秆中大部分的水溶性碳水化合物, 大幅减少了预处理过程因水溶性碳水化合物降解而产生的 HMF^[17]。而在工业化除尘如旋风分离除尘等过程中,

这些水溶性碳水化合物均会保留在除尘后的物料中，关于水溶性糖的利用也成为木质纤维素生物炼制过程中亟需解决的问题，本文的第三章及第四章提出了关于水溶性糖利用的两种策略。

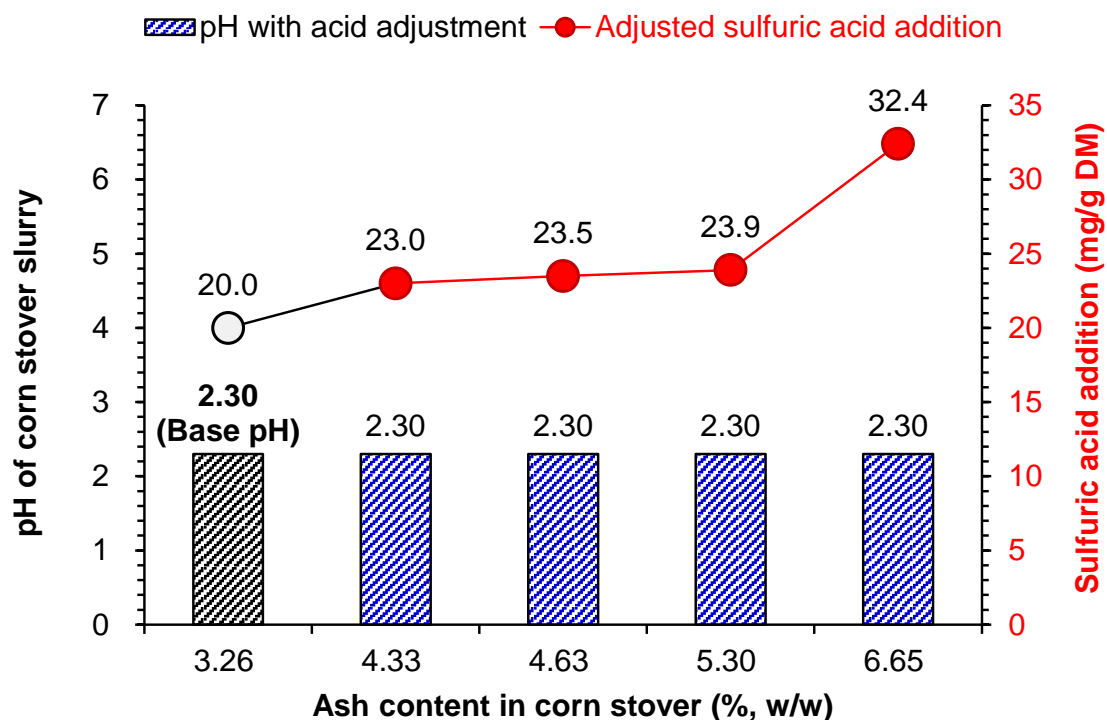


图 2.4 调整硫酸用量使不同灰分含量秸秆的 pH 接近基准 pH 值

Fig. 2.4 pH approach to the Base pH Value of corn stover by adjusting sulfuric acid usage

将 2 g 不同灰分含量的烘干后的玉米秸秆，加入 100 mL 去离子水，置于摇床 30 °C 混合 30 min 制备玉米秸秆悬浮液；再按照基准酸用量向悬浮液滴加硫酸（20 mg 硫酸/g 干物料），置于摇床 30 °C 充分混合 30 min，此时对于彻底清洗除尘的秸秆（3.26% 灰分含量）而言，其 pH 值为基准 pH 值。对于其他灰分含量较高的秸秆悬浊液而言，继续滴加硫酸使得其 pH 达到基准 pH 值，记录调整后的硫酸总用量（mg 硫酸/g 干物料）。

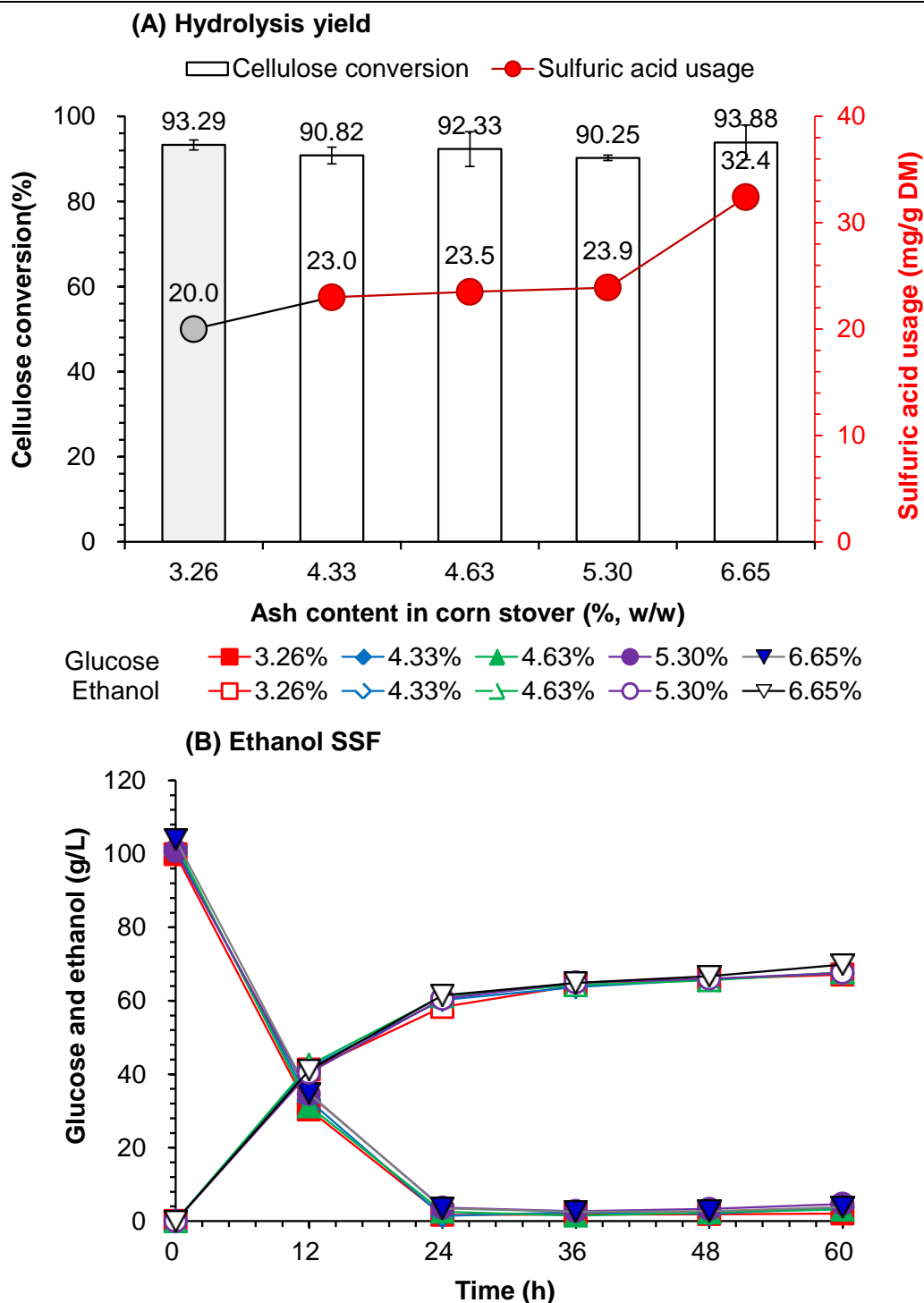


图 2.5 不同灰分含量玉米秸秆在调整后的酸用量条件下预处理效率评估

Fig. 2.5 Pretreatment efficiency assay of corn stover feedstocks containing different ash under adjusted sulfuric acid usage

(A) 预处理后玉米秸秆的酶水解得率；(B) 预处理且脱毒后玉米秸秆的同步糖化发酵。酶解条件：2.5%固含量，酶用量 26 mg 酶蛋白/g 纤维素，50 °C，pH 4.8，150 rpm。同步糖化发酵条件：11.7% (w/w) 纤维素含量，酶用量 14 mg 酶蛋白/g 纤维素，预糖化反应温度 50 °C，pH 5.5，反应 12 h，同步糖化发酵反应温度 37 °C，pH 5.5，发酵 60 h，菌株为 *S. cerevisiae* DQ1。

表 2.3 彻底清洗的玉米秸秆在不同酸用量干酸预处理后的组分测定

Table 2.3 Composition of dry acid pretreated corn stover (thoroughly washed)

Sulfuric acid usage (mg/g DM)	Cellulose (%)	Xylan (%)	Glucose (mg/g DM)	Xylose (mg/g DM)	O-Glu ^a (mg/g DM)	O-Xyl ^b (mg/g DM)	Acetate (mg/g DM)	HMF (mg/g DM)	Furfural (mg/g DM)
25.0	37.71±0.25	2.78±0.07	29.71±0.26	155.07±1.87	11.85±0.45	38.91±1.47	22.67±0.97	3.76±0.02	4.02±0.04
22.5	38.20±1.16	3.31±0.18	20.14±0.12	139.57±1.28	13.59±0.98	51.54±3.05	18.06±1.72	3.19±0.08	2.30±0.11
20.0	38.85±1.02	3.62±0.12	19.54±0.04	137.11±0.44	11.18±1.05	62.69±4.19	17.88±0.19	1.85±0.10	1.89±0.09
17.5	38.60±0.42	6.66±0.31	13.27±0.07	102.26±2.72	18.14±2.08	90.53±4.07	14.15±0.22	1.62±0.02	1.65±0.02
15.0	38.16±0.55	8.95±0.19	9.87±0.53	63.34±1.08	20.05±2.12	108.93±3.23	11.31±0.64	1.06±0.03	1.15±0.05

彻底清洗除尘（200 倍秸秆质量的水）的玉米秸秆在不同硫酸用量下 175 °C 预处理反应 5 min。（a）寡聚葡萄糖含量；（b）寡聚木糖含量。

表 2.4 调节硫酸用量的干酸预处理后麦秆及稻草组分测定

Table 2.4 Composition of dry acid pretreated wheat straw and rice straw with adjusted sulfuric acid usage

Sulfuric acid (mg/g DM)	Ash (% w/w)	Cellulose	Xylan	Glucose (mg/g DM)	Xylose	O-Glu ^a	O-Xyl ^b	Acetate	HMF	Furfural
Wheat straw										
20.0	5.87	38.07±1.32	3.32±0.45	20.35±0.27	187.86±2.04	4.62±0.21	24.72±0.45	11.55±0.12	0.90±0.03	1.74±0.01
20.0	10.04	32.78±0.70	7.72±0.29	6.22±0.14	50.00±1.11	22.52±0.29	121.87±1.96	3.80±0.03	0.60±0.18	1.04±0.02
33.3	10.04	34.86±0.95	2.88±0.19	18.48±0.43	148.61±3.23	5.86±0.02	21.73±0.24	12.00±0.09	1.82±0.12	2.53±0.09
Rice straw										
20.0	8.06	36.40±0.86	3.78±0.44	19.40±0.23	125.72±2.67	16.66±1.35	44.42±2.02	9.69±0.23	1.61±0.09	2.18±0.08
20.0	11.68	31.30±0.14	7.26±0.16	11.72±0.15	45.76±1.32	27.59±0.34	80.20±2.56	4.85±0.44	1.62±0.04	0.92±0.03
31.3	11.68	32.81±0.14	3.41±0.14	23.41±0.33	100.91±1.06	13.02±1.27	27.71±3.49	11.14±0.52	3.92±0.10	2.75±0.06

彻底清洗除尘（200 倍秸秆质量的水）的麦秆及稻草在基准硫酸用量（20 mg 硫酸/g 干物料）下 175 °C 预处理反应 5 min，作为对照组；高灰分含量的原始麦秆及稻草在酸用量调整前（20 mg 硫酸/g 干物料）后（33.3 mg 硫酸/g 干麦秆及 31.3 mg 硫酸/g 干稻草）175 °C 预处理反应 5 min。（a）寡聚葡萄糖含量；（b）寡聚木糖含量。

2.3.3 基准 pH 调节法在不同原料及发酵过程的应用拓展

前一节提到，基准 pH 调节法对于不同灰分含量玉米秸秆预处理效率可重复性的提高具有明显的效果，并且可以获得高效稳定的乙醇发酵指标。本节我们尝试将该方法推广到几个不同的生物炼制案例中。

第一个案例是将基准 pH 调节法从最普遍的玉米秸秆拓展到不同的木质纤维素原料类型上，这里选取了主流的粮食废弃物麦秆和稻草。首先对于 10.04% 灰分含量的麦秆和 11.69% 灰分含量的稻草进行彻底水洗除尘（200 倍干秸秆质量的水），彻底除尘后的麦秆和稻草的灰分含量分别为 5.87% 及 8.06%。根据我们先前的预处理探索，彻底除尘的麦秆和稻草的基准酸用量均为 20 mg 硫酸/g 干物料^[82]。在本试验中，与玉米秸秆的操作类似，将彻底除尘的麦秆和稻草先配制悬浮液，之后按照相应的基准酸用量加入酸液，测得麦秆的基准 pH 为 2.33，稻草为 2.29。进一步，使用未除尘的麦秆和稻草配制悬浮液，滴加硫酸使得其 pH 分别达到对应的基准 pH，测得未除尘麦秆的硫酸用量应调整到 33.3 mg 硫酸/g 干物料，而未除尘稻草的硫酸用量应调整至 31.3 mg 硫酸/g 干物料。将调整后的硫酸用量应用到相应未除尘麦秆及稻草的预处理操作中，以彻底除尘的麦秆及稻草在其相应基准酸用量下的预处理实验作为对照，与未调整硫酸用量的未除尘麦秆及稻草进行对比。

结果发现，调整酸用量的高灰分麦秆与基准酸用量下彻底除尘的麦秆预处理后木聚糖残余基本一致，木糖与寡聚木糖的比例也基本一致，乙酸、糠醛的产生也基本一致。而不调整酸用量的高灰分麦秆木聚糖移除率不高，还存在 7.7% 的木聚糖残余，且寡聚木糖含量过高，达到 121.8 mg/g 干物料，这些寡糖会显著抑制后续的纤维素酶水解。而在稻草的实验中也得到了与麦秆相似的结果（表 2.4）。我们对预处理后的物料进行生物脱毒转化抑制物（糠醛、HMF 及乙酸）之后，进行乙醇同步糖化发酵。结果发现，预处理且脱毒后的调整酸用量的高灰分麦秆与基准酸用量下彻底除尘的麦秆两组原料，在预糖化后可以获得相似的糖化指标，远高于不调整酸用量的高灰分麦秆，且乙醇同步糖化发酵后的乙醇指标较为相似，为 68.6 g/L 与 69.0 g/L，远高于不调整酸用量的高灰分麦秆（43.5 g/L）。对于稻草而言，具有相似的趋势，乙醇发酵指标为 63.4 g/L 与 65.2 g/L，远高于不调整酸用量的高灰分稻草（41.9 g/L）。总体来说，不同灰分含量麦秆和稻草的预处理效率及乙醇发酵效率稳定性也可以通过基准 pH 调节法来实现，通过提前补入额外的硫酸来中和高灰分含量秸秆中的灰分物质，可以有效的调节预处理效率，实现预处理及后续生物转化的高效稳定性。

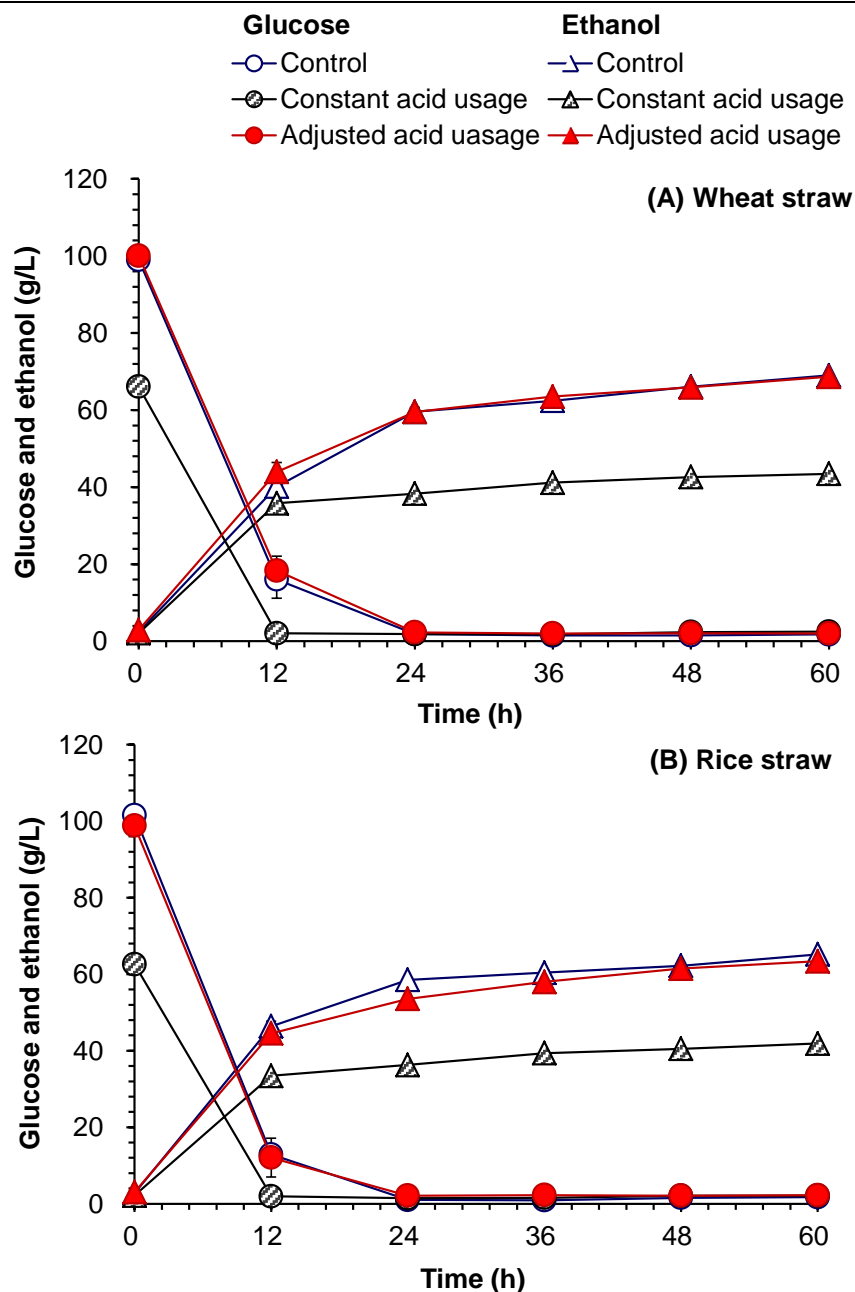


图 2.6 基准 pH 调节法对不同原料（麦秆与稻草）的应用拓展

Fig. 2.6 Application of the Base pH Approaching method on extension of lignocellulose feedstocks (wheat straw and rice straw)

(A) 麦秆; (B) 稻草。对照组, 彻底清洗除尘 (200 倍秸秆质量的水) 的麦秆及稻草在基准硫酸用量 (20 mg 硫酸/g 干物料) 下 175 °C 预处理反应 5 min; 恒定酸用量组, 高灰分含量的原始麦秆及稻草在酸用量调整前 (20 mg 硫酸/g 干物料) 175 °C 预处理反应 5 min; 调整酸用量组, 高灰分含量的原始麦秆及稻草在酸用量调整后 (33.3 mg 硫酸/g 干麦秆及 31.3 mg 硫酸/g 干稻草) 175 °C 预处理反应 5 min。同步糖化发酵条件: 麦秆 11.4% (w/w) 纤维素含量, 稻草 10.9% (w/w) 纤维素含量, 酶用量 14 mg 酶蛋白/g 纤维素, 预糖化反应温度 50 °C, pH 5.5, 反应 12 h, 同步糖化发酵反应温度 37 °C, pH 5.5, 发酵 60 h, 菌株为 *S. cerevisiae* DQ1。

第二个案例是将基准 pH 调节法从乙醇发酵拓展到其他生物基化学品发酵过程（L-乳酸发酵），原料依旧选用不同灰分含量的玉米秸秆。与乙醇发酵相似，对于未经过除尘的玉米秸秆而言（灰分含量 6.65%），其调整后的硫酸用量为 32.4 mg 硫酸/g 干物料，而本组实验的对照组使用彻底清洗除尘的玉米秸秆在基准酸用量下的预处理物料。两种物料在生物脱毒之后在相同的纤维素载量下使用工程乳酸菌 *P. acidilactici* TY112 进行 L-乳酸发酵，如图 2.7，两种物料的最终乳酸发酵指标相似，为 106.4 g/L 与 102.1 g/L。

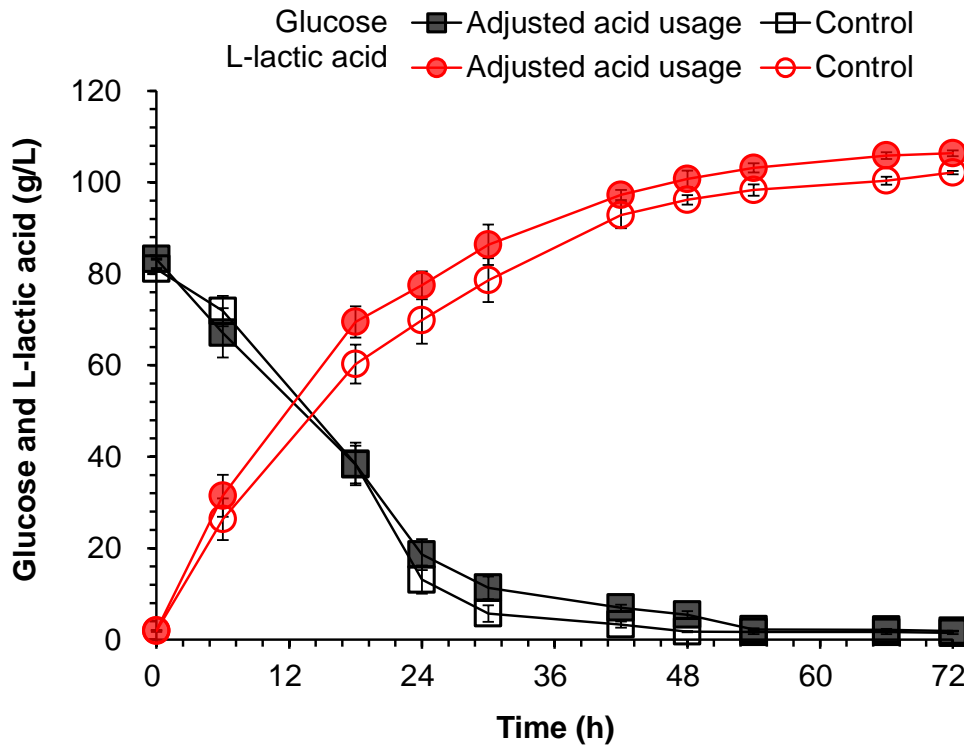


图 2.7 基准 pH 调节法对不同发酵菌株（乳酸菌）及产品（L-乳酸）的应用拓展

Fig. 2.7 Application of the Base pH Approaching method on extension of fermenting strain and product (the engineered lactic acid bacterium and L-lactic acid)

调整酸用量组，高灰分含量的原始玉米秸秆（灰分含量为 6.65%，无水洗及其他除尘操作）在酸用量调整后（32.4 mg 硫酸/g 干玉米秸秆）175 °C 预处理反应 5 min；对照组，彻底清洗除尘（200 倍秸秆质量的水）的玉米秸秆（灰分含量为 3.26%）在基准硫酸用量（20 mg 硫酸/g 干物料）下 175 °C 预处理反应 5 min。同步糖化发酵条件：11.7% (w/w) 纤维素含量，酶用量 14 mg 酶蛋白/g 纤维素，预糖化反应温度 50 °C，pH 5.5，反应 6 h，同步糖化发酵反应温度 42 °C，pH 5.5，发酵 72 h，菌株为乳酸菌 *P. acidilactici* TY112。

第三个案例是将基准 pH 调节法从乙醇同步糖化发酵拓展到乙醇同步糖化共发酵过程（利用木糖），原料依旧选用不同灰分含量的玉米秸秆。与上述类似，对于未经过除尘的玉米秸秆而言（灰分含量 6.65%），其调整后的硫酸用量为 32.4 mg 硫酸/g 干物料，而本组实验的对照组使用彻底清洗除尘的玉米秸秆在基准酸用量下的预处理物料。两种物料在生物脱毒之后具备木糖利用能力的乙醇发酵菌株 *S. cerevisiae* XH7 在相同的纤维素载量下进行乙醇同步糖化共发酵实验。由图 2.8 可知，对于调整过酸用量的高灰分含量的玉米秸秆，其预糖化后的初始葡萄糖及木糖分别为 91.8 g/L 与 45.9 g/L，而最终乙

醇发酵浓度为 76.9 g/L，三项指标均与彻底除尘的玉米秸秆类似（92.4 g/L，50.8 g/L 与 80.1 g/L），并且两种物料在葡萄糖及木糖向乙醇转化的趋势也较为相似。

这三项典型的拓展案例说明，基准 pH 调节法可以有效的提高不同灰分含量物料的预处理稳定性及后续生物转化的稳定性，其应用范围很广，可以应用到不同的生物质原料（玉米秸秆、麦秆及稻草），可以适用于不同的发酵菌株（酵母菌及乳酸菌），可以用于生产不同的发酵产品（乙醇及乳酸），可以用于不同的发酵类型（同步糖化发酵及同步糖化共发酵），对于原料而言，该方法甚至可以应用到不进行任何除尘操作的木质纤维素生物质中。

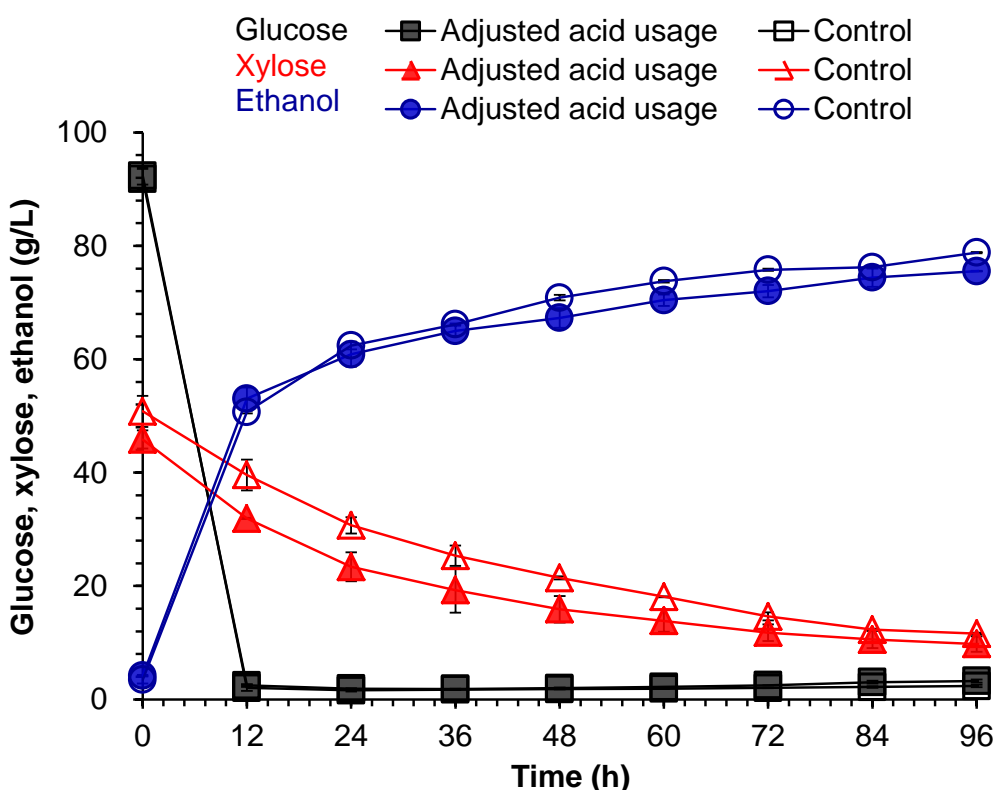


图 2.8 基准 pH 调节法对不同发酵操作类型（利用木糖的乙醇同步糖化共发酵）的应用拓展
Fig. 2.8 Application of the Base pH Approaching method on extension of fermentation operation type (SSCF with xylose utilization for ethanol)

调整酸用量组，高灰分含量的原始玉米秸秆（灰分含量为 6.65%，无水洗及其他除尘操作）在酸用量调整后（32.4 mg 硫酸/g 干玉米秸秆）175 °C 预处理反应 5 min；对照组，彻底清洗除尘（200 倍秸秆质量的水）的玉米秸秆（灰分含量为 3.26%）在基准硫酸用量（20 mg 硫酸/g 干物料）下 175 °C 预处理反应 5 min。同步糖化发酵条件：11.7% (w/w) 纤维素含量，酶用量 14 mg 酶蛋白/g 纤维素，预糖化反应温度 50 °C，pH 5.5，反应 12 h，同步糖化发酵反应温度 30 °C，pH 5.5，发酵 96 h，菌株为 *S. cerevisiae* XH7（具备木糖利用能力）。

2.4 本章小结

本章节揭示了原料中不断变化的灰分含量及其不同的酸中和能力是导致木质纤维素生物质预处理效率稳定性差的重要原因，特别是在本课题组自主研发的高固含量干酸预处理过程中，由于预处理操作无废水流出，灰分的积累效应显著的加剧了预处理效率

的波动。如果使用相同的酸用量，不同灰分含量的物料在中和完相应灰分之后，剩余的有效硫酸催化剂的量显著不同，也就导致了预处理效率的巨大差异，显著影响了后续糖化发酵过程的稳定性。

本章提出了一种可以快速提高预处理效率稳定性的方法，基准 pH 调节法。该方法可以通过简单的滴定实验来实现，将不同灰分含量物料的 pH 滴定至其基准 pH，快速确定相应灰分含量物料预处理过程所需要的酸用量。本方法可以普遍的应用到不同的生物质原料（玉米秸秆、麦秆及稻草），可以适用于不同的发酵菌株（酵母菌及乳酸菌），可以用于生产不同的发酵产品（乙醇及乳酸），可以应用于不同的发酵类型（同步糖化发酵及同步糖化共发酵）。对于原料而言，该方法甚至可以应用到不进行任何除尘操作的木质纤维素生物质中。该方法是一个具备工业化应用价值的提高预处理效率稳定性的方法。

对于该方法的应用范围，做出如下讨论。对于不同类型的生物质原料，应对彻底除尘的物料进行预处理评价，确定基准酸用量，这是由于不同类型的原料中不溶于水的结构性灰分会有较大差异，这一部分灰分不可被水移除，但也具备一定的酸中和能力；而对于相似地域相同品种的木质纤维素原料而言，由于其收获、运输等操作的不稳定导致的外源灰分含量不一，可以在首次确定基准酸用量后用该基准 pH 调节法直接调节，无需后续再进行预处理条件优化实验。

同时，本章在研究乳酸发酵过程中发现，由于高灰分含量的物料中存在大量的钾离子及镁离子，这些离子的存在可以有效的减少发酵过程中营养盐的添加，降低木质纤维素生物质原料发酵过程的营养添加成本，这也是木质纤维素原料相对于淀粉质原料的优势之一。由于这些离子是植物生长过程从土壤中摄取进入植物内部的，可以被水洗移除，但不会被工业化的除尘设备（如旋风分离、机械震荡）移除，因此不同批次木质纤维素生物质中水溶性离子含量不一，理论上也会对后续发酵过程产生一定的影响，这也是未来工业化木质纤维素生物炼制过程所需要关注的问题。

第 3 章 木质纤维素生物质中水溶性碳水化合物的乳酸转化及其对生物炼制效率的促进

3.1 引言

农作物残渣诸如玉米秸秆、麦秆及稻草，均含有或多或少的水溶性碳水化合物，这些水溶性碳水化合物的主要成分是葡萄糖、果糖及蔗糖。这些存在于农作物茎叶中的水溶性碳水化合物主要用于维持种子淀粉合成，而在农作物粮食收获后，还有一定的水溶性碳水化合物残存在木质纤维素生物质中，随木质纤维素原料进入生物炼制加工环节^[16, 17]。Chen 等人及 Niu 等人分别选取了大量的不同品种、不同收获时间及地点的玉米秸秆样品，测得其中的水溶性碳水化合物含量一般为 6%^[16, 17]，这些水溶性碳水化合物的种类及含量随作物的种类、解剖学拆分（玉米芯、玉米叶、玉米秆）、作物成熟度的变化而变化^[17, 137-139]。

葡萄糖、果糖及蔗糖均为典型的可发酵糖类，极易被大部分发酵微生物所利用，但这些水溶性碳水化合物在木质纤维素生物炼制加工过程却往往被忽视，基本没有相应的利用策略提出。主要原因在于，木质纤维素生物炼制的最关键一步是通过高强度的预处理过程破坏木质纤维素生物质的致密结构，增加纤维素酶可接近性，而这些水溶性碳水化合物恰恰在高强度的预处理环节难以保留。在诸如稀酸预处理、汽爆预处理及热水预处理等基于酸的预处理过程中^[26, 27, 39, 40, 44]，这些水溶性碳水化合物在高温、低 pH 的条件下容易降解为 5-羟甲基糠醛（HMF）^[97]，并且对后续的酶水解及发酵过程产生消极影响^[66, 77]。在其他的预处理如碱预处理、有机溶剂预处理及离子液体预处理等过程中，由于预处理后的物料需要使用大量的水进行水洗以去除溶液残余及预处理过程产生的抑制物^[26, 27, 45, 47]，因此几乎全部的未降解的水溶性碳水化合物也随废水排出，不能随纤维素固体组分进入水解糖化环节。

从玉米秸秆中提取水溶性碳水化合物是不可行的，这是因为玉米秸秆中的水溶性糖的含量仅为干重的 6% 左右，占湿重的比例则更低，浓度远低于糖料作物甘蔗及甜高粱^[140]，如果使用水浸提压榨的方式获取低浓度的水溶性糖，后续的浓缩成本非常高。而在生物炼制过程中转化利用水溶性碳水化合物的工艺需要具备如下注意事项：（1）应在预处理前进行水溶性碳水化合物的转化，以避免预处理工段水溶性碳水化合物的降解损失；（2）预处理环节及后续脱毒环节不能有废水流出，否则不管是水溶性碳水化合物还是预先转化的产品，均会随废水排放，而从废水中回收浓缩这样低浓度的产品成本依旧非常高；（3）水溶性碳水化合物在预处理前转化的产品，应与后续纤维素及半纤维素糖转化的产品相同，或者两种发酵产品容易分离，从而降低总生产成本，提高木质纤维素生物质原料的总利用率。

L-乳酸是一种重要的单体化合物，可以用于生产生物可降解的新型塑料材料——聚乳酸^[141, 142]。许多文献报道了使用木质纤维素原料替代粮食原料生产 L-乳酸的相关工

艺^[45, 62, 87, 91, 143]，但没有研究关注过水溶性碳水化合物在木质纤维素原料生产 L-乳酸过程中的利用。本章我们首次将玉米秸秆的乳酸固态发酵过程在预理工段前实施，进行水溶性碳水化合物向 L-乳酸的转化，该固态发酵过程类似于青储、黄储秸秆饲料的生产工艺^[144]，简单易行^[140]。而玉米秸秆中的纤维素及半纤维素组分则通过无废水产生的干法生物炼制技术进行加工，经过干酸预处理、生物脱毒及高固含量同步糖化共发酵，最终转化为相同的 L-乳酸产品。

在这样的工艺路线中，水溶性碳水化合物转化得到的 L-乳酸几乎可以完全在干酸预处理及生物脱毒过程得到保留，并且最终进入 L-乳酸同步糖化共发酵的产品积累中，提高了 L-乳酸的发酵终浓度及其基于秸秆原料的总得率，降低了浓缩纯化成本；由于水溶性碳水化合物的转化，预处理过程中 HMF 的产生量大幅减少，生物脱毒时间显著缩短。通过 Aspen Plus 平台对工艺过程进行经济性分析，发现利用水溶性碳水化合物的新工艺提高了纤维素 L-乳酸生产的经济性，降低了 L-乳酸最低售价。本研究提出了一个简单实际、经济有效的水溶性碳水化合物的利用策略，显著促进了纤维素 L-乳酸生物炼制效率。

3.2 材料与方法

3.2.1 木质纤维素原料与酶制剂

玉米秸秆于 2016 年秋季收获于内蒙古通辽市，收获的玉米秸秆晾干后，使用锤式粉碎机粉碎，粉碎机筛网的筛孔直径约为 10 mm，粉碎后的秸秆颗粒密封装入塑料收纳袋，放置在室内待用。该批次玉米秸秆的纤维素含量为 31.2%，木聚糖含量为 22.3%，木质素含量为 20.8%，灰分含量为 6.2%。上述的物料组分含量根据 NREL 的方法 LAP-002 及 LAP-005 测得^[128, 129]。

水溶性碳水化合物的含量通过去离子水浸提获得，具体步骤如下：将 5 g 玉米秸秆（干重）加入 250 mL 锥形瓶中，再加入 100 mL 去离子水，置于摇床 30 °C 震荡 1 h。该批次玉米秸秆中的葡萄糖及果糖含量分别为 21.9 mg/g 干物料及 20.8 mg/g 干物料，由于其他水溶性碳水化合物在玉米秸秆中含量很低，故忽略不计。

纤维素酶 Cellic CTec 2 与糖化酶 GA-L NEW 来源及酶活同 2.2.1。

3.2.2 菌种与培养基

生物脱毒菌株 *Amorphotheca resinae* ZN1 的培养基同 2.2.2。

乳酸发酵菌株 *Pediococcus acidilactici* TY112 用于固态发酵过程中将水溶性碳水化合物生物转化为 L-乳酸，其种子培养基同 2.2.2。

乳酸发酵菌株 *Pediococcus acidilactici* ZY271 (CGMCC 13611) 用于在同步糖化共发酵过程将纤维素和半纤维素糖转化为 L-乳酸。其来自于将木糖同化途径克隆到不能利用木糖的 L-乳酸生产菌株 *P. acidilactici* TY112，使其获得木糖的共利用能力^[62]。其种子培养基为简化的 MRS 培养基，配方同 *P. acidilactici* TY112 的培养基。

对于两种 L-乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* TY112 与 *P. acidilactici* ZY271，使用相同的种子培养方法，具体如下：首先从 -80 °C 超低温冰箱取出菌株的冻存管，倒入装有 20 mL

简化 MRS 培养基的 100 mL 摇瓶中活化 12 h; 然后以 10% (v/v) 接种量转接到装有 200 mL 简化 MRS 培养基的 500 mL 摇瓶中培养 5 h。该扩培后的乳酸菌 *P. acidilactici* TY112 培养液作为乳酸固态发酵所需的种子, 而扩培后的乳酸菌 *P. acidilactici* ZY271 培养液作为同步糖化共发酵所需的种子。上述种子培养的条件均为 42 °C, 150 rpm, 种子培养过程不调节 pH。为了防止乳酸片球菌絮凝, 还需要在每次转接时, 向简化的 MRS 培养基中加入 1% (v/v) 糖化酶^[87]。

3.2.3 乳酸固态发酵

将一定量的 *P. acidilactici* TY112 培养液与不同量的去离子水(含有或不含有营养盐)混匀, 泼洒到玉米秸秆物料上, 拌匀后放入塑料袋中, 挤压出空气密封保存, 进行乳酸厌氧固态发酵, 该步骤类似于青储、黄储秸秆饲料生产过程^[144]。取出的样品加入去离子水稀释至固液比 1:20 左右, 置于摇床 30 °C 震荡浸提 1 h, 11167×g 离心 5 min, 上清液用于乳酸及残糖测定。

固态发酵的固体含量 (33%, 50%, 67%), 营养 (添加与否), 接种量 (2.5%, 5%, 10%, 基于湿玉米秸秆物料) 及固态发酵温度 (25 °C, 37 °C, 42 °C) 等条件使用小塑料密封袋进行优化实验, 每袋装入 30 g 湿物料后密封, 以天为单位进行取样, 每次取样后丢弃该已经进入空气的密封袋。后续提到的发酵天数, 指的是达到稳定的乳酸及残糖浓度的最小发酵天数。试验进行两组平行, 取平均值作为最终数据。

最终确定的固态发酵最优条件为 67% (w/w) 固体含量, 2.5% (w/w) 接种量, 无营养添加, 25 °C 发酵 6 天。使用上述条件在大塑料密封袋中进行固态发酵, 每袋装入 15 kg 的湿物料。该种乳酸发酵后的玉米秸秆用于后续的预处理、生物脱毒及同步糖化共发酵实验。

3.2.4 干酸预处理与生物脱毒

固态发酵后的秸秆与原始秸秆 (对照组) 首先进行干酸预处理以破坏木质纤维素结构^[70,96], 便于后续同步糖化共发酵。具体方法如下: 1200g 木质纤维素原料 (干重) 和稀硫酸溶液按次序加入 20 L 的预处理反应器中, 固液比为 3:2, 硫酸用量的调整根据 2.2.6 的基准 pH 调节法。预处理反应器中内置螺带搅拌桨, 转速 50 rpm, 搅拌 3 min 使得反应器内固体与液体混合均匀, 之后从反应器底部通入蒸汽进行加热, 初始蒸汽压力为 1.6 MPa, 预处理过程反应温度为 175 °C, 升温时间 5 min, 停留时间 5 min。反应完毕后排出生蒸汽, 泄压后放出物料, 预处理后的秸秆物料固含量维持在 45% (w/w) 左右, 以固态形式存在, 没有产生游离废水。预处理后物料的脱毒方法同 2.2.3。

3.2.5 L-乳酸同步糖化共发酵 (SSCF)

预处理及脱毒后的固态发酵与否的玉米秸秆的同步糖化乳酸共发酵在装有螺带式搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行, 发酵采用的 L-乳酸发酵菌株为 *P. acidilactici* ZY271。首先将脱毒后的预处理秸秆物料缓慢加入发酵罐中进行预糖化, 固体含量为 30% (w/w), 酶用量为 5 mg 蛋白/g 干物料, 温度 50 °C, pH 维持 5.5, 搅拌转速 150 rpm, 预糖化时间为 6 h; 预糖化结束后, 将温度降为 42 °C, 将 10% (v/v) 的 *P. acidilactici* ZY271 种

子液与营养盐接入到发酵罐中进行同步糖化发酵，过程维持温度 42 °C，pH 5.5，搅拌转速 150 rpm，发酵时间为 72 h，pH 通过发酵罐自动补碱系统补入 50% (w/w) Ca(OH)₂ 悬浊液进行维持。每 6 或 12 h 进行取样，样品 11167×g 离心 5 min，上清液通过 HPLC 检测其中的葡萄糖、乳酸、糠醛、HMF 及乙酸浓度。发酵用的营养盐仅加入 10 g/L 酵母粉，10 g/L 蛋白胨，2 g/L 柠檬酸氢二铵及 0.23 g/L MnSO₄。试验进行两组平行，取平均值作为最终数据。

3.2.6 组分测定及酶水解评价

纤维素、半纤维素、寡聚葡萄糖、寡聚木糖及灰分含量的测定方法同 2.2.7，预处理后物料的酶水解评价方法同 2.2.7。

3.2.7 检测方法

葡萄糖、木糖、L-乳酸、乙酸、糠醛、HMF 等可溶性组分含量使用 HPLC 测定，方法同 2.2.8。乳酸光学纯度是按照 Megazyme D-/L-Lactic Acid Kit (Megazyme International Ireland, Bray, Wicklow, Ireland) 试剂盒中的方法进行检测。D-/L-乳酸浓度是通过监测 340 nm 下 NADH 的增加量进行测定，使用的分光光度计为 Biomate 3S (Thermo Scientific, Massachusetts, USA)。

3.2.8 过程模型建立及技术经济分析

利用 Aspen plus 平台 (AspenTech Co., Cambridge, MA, USA)，对产业化规模的利用水溶性糖与否的纤维素乳酸生产工艺进行技术经济分析。过程主要参数如反应条件、物料衡算及转化率等均依据实验数据，其他基础模型设计参数根据 NREL 的设计报告^[145]及先前实验室设计的干法生物炼制技术生产纤维素乳酸的报告^[87]。

总工艺流程包括 10 个工段 (图 3.1)：原料收集及前处理，预处理，生物脱毒，酶解糖化及发酵，纤维素酶在位生产，产品分离回收，废水处理，残渣焚烧发电，储存及公共设施。A200 工段是干酸预处理 (DAP) 单元，不进行水溶性糖转化的玉米秸秆预处理固含量为 2:1，硫酸用量为 37 mg/g 干物料，进行水溶性糖转化的玉米秸秆预处理固含量为 3:2，硫酸用量为 35 mg/g 干物料。A250 工段是生物脱毒单元，固态生物脱毒在氧气供给充分的情况下，将预处理后玉米秸秆中对纤维素乳酸发酵抑制作用明显的糠醛、HMF、乙酸完全脱除并且将酚类抑制物大部分脱除的脱毒时间为 72 h，在水溶性糖转化的秸秆中，这一时间缩短为 48 h。A300 工段是酶解糖化及发酵单元，预处理及脱毒后的玉米秸秆在 30% (w/w) 固体含量下进行同步糖化共发酵，其中产生的乳酸被氢氧化钙所中和，形成乳酸钙产品。A500 工段是产品分离回收单元，乳酸发酵结束后，首先将发酵醪加热到接近沸腾 (约 90 °C)，以达到提高固液分离效率及灭菌的效果。加热后的发酵醪进行固液分离，液体部分经过活性炭脱色后进行双效蒸发浓缩，得到含有 30% (w/w) 乳酸钙的溶液。向该乳酸钙溶液中加入硫酸，产生硫酸钙沉淀，固液分离后除去硫酸钙，含有粗乳酸的液体部分再次经活性炭脱色及三效蒸发，获得质量浓度约 88% 的工业级 L-乳酸。分离纯化工段的乳酸回收率按照成熟的工业化有机酸分离工段的一般情况规定为 80%。本章中 Aspen plus 模型的其他工段与 NREL 的设计报告^[145]维持

一致。

生物炼制工厂的规模为每天加工 900 吨玉米秸秆，每年加工 30 万吨，年操作时长为 8000 h。为了得到 L-乳酸的最低售价 (MLSP, \$/kg)，本章采用了折现现金流回归分析 (DCFROR)，净现值为零，税后内部回归率为 8%，折现现金流分析的主要参数列在表 3.1 中。所有的原材料、设备等物资价格均根据 2013 年的采购数据，美元兑换人民币的比率为 6.2。预处理反应器、发酵罐、螺带搅拌桨、化学品的价格及工人工资根据中国的价格进行计算。玉米秸秆原料组分、主要反应器及原材料的花费在表 3.2, 3.3 及 3.4 中。上述 Aspen plus 平台的过程流程模拟及技术经济分析为本实验室刘刚老师完成。

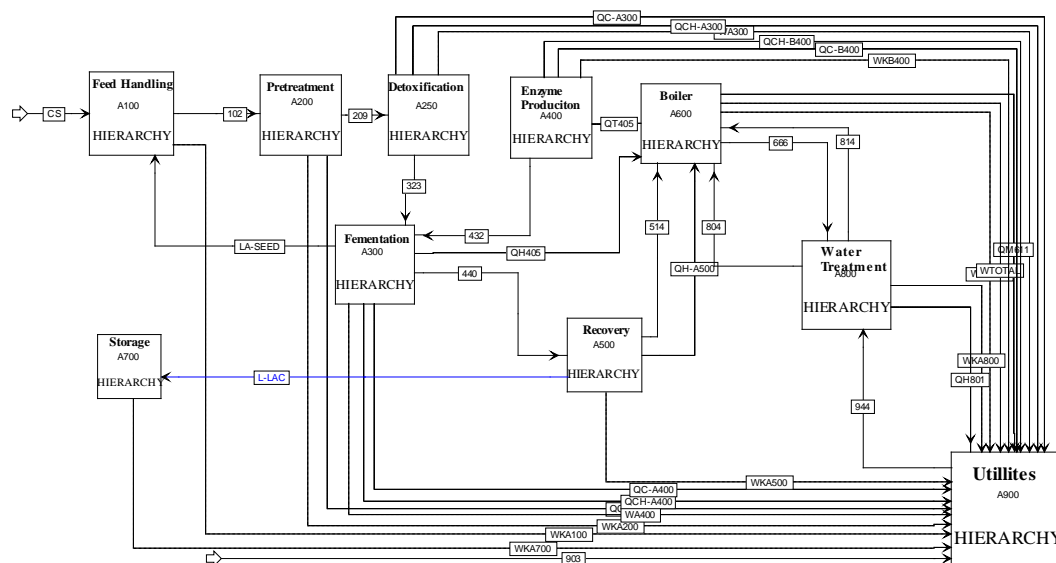


图 3.1 玉米秸秆原料生产纤维素 L-乳酸在 Aspen plus 平台的流程图

Fig. 3.1 Flowchart of cellulosic L-lactic acid production from corn stover feedstock on Aspen plus platform

表 3.1 折现现金流分析参数

Table 3.1 Discounted cash flow analysis parameters

Plant life	30 years
Discount rate	8%
General plant depreciation	200% declining balance (DB)
General plant recovery period	7 years
Steam plant depreciation	150% DB
Steam plant recovery period	20 years
Corporate income tax	15%
Financing	40% equity
Loan terms	10-year loan at 6.55% APR
Construction period	1 years
Working capital	5% of fixed capital investment
Start-up time	3 months
Revenues during start-up	50%

表 3.2 玉米秸秆原料组成

Table 3.2 Composition of corn stover feedstock

Components	Dry matter (w/w, %)
Glucan	31.2
Xylan	22.3
Lignin	20.8
Arabinan	2.38
Galactan	1.43
Mannan	0.6
Protein	3.1
Glucose	2.19
Fructose	2.08
Extractives	5.91
Acetate	1.81
Ash	6.2

表 3.3 干法生物炼制过程主要反应器的供应商报价

Table 3.3 Prices provided by the vendors for main reactors used in dry lignocellulose biorefinery process

Reactors	Size (m ³)	Material	Price (\$)	Year of Quote
Pretreatment reactors	10	SS316L	161,290 ^a	2014
Biodetoxification reactors	500	SS304	291,363 ^a	2014
Saccharification reactors	100	SS340	63,382 ^a	2014
SSF reactors	800	SS340	404,874 ^a	2014
Helical impeller mounted on pretreatment reactors	10	SS316L	18,000d ^b	2014
Helical impeller mounted on saccharification reactors	100	SS340	25,102 ^b	2014

^a 由周口压力容器制造厂提供（河南周口）。

^b 由杭州远征化工科技设备有限公司提供（浙江杭州）。

表 3.4 用于成本分析的原材料单元售价

Table 3.4 Raw material unit cost for cost analysis

Raw material cost	Cost (2013\$)
Feedstock (corn stover)	\$61.72/ton
Sulfuric acid, 93%	\$53.33/ton
Lime	\$142.23/ton
Sodium hydroxide	\$483.87/ton
Glucoamylase	\$4838.71/ton
Corn steep liquor	\$63.97/ton
Diammonium phosphate	\$1111.24/ton
Boiler chemicals	\$5625.31/ton
Cooling tower chemicals	\$3371.25/ton
Fresh water	\$0.29/ton

3.3 结果与讨论

3.3.1 水溶性碳水化合物在干酸预处理过程的保留情况

经测定, 本批次原始玉米秸秆的葡萄糖及果糖含量分别为 21.9 mg/g 干物料及 20.8 mg/g 干物料, 其他水溶性糖含量极低, 在本章的研究中忽略不计。为了确定玉米秸秆中水溶性碳水化合物在干酸预处理过程的损失, 玉米秸秆首先进行彻底水洗 (200 倍秸秆质量自来水), 获得不含葡萄糖及果糖的玉米秸秆, 彻底清洗的玉米秸秆再按原始玉米秸秆的葡萄糖及果糖含量补加糖 (21.9 mg/g 葡萄糖与 20.8 mg/g 果糖)。

将彻底清洗的无水溶性糖的玉米秸秆、补加糖的玉米秸秆及原始玉米秸秆分别进行干酸预处理, 反应温度及时间均一致, 硫酸用量按照第二章的基准 pH 调节法进行调整。对于彻底清洗的玉米秸秆与补加糖的玉米秸秆, 其硫酸用量为 25 mg/g 干物料; 而对于原始玉米秸秆, 由于灰分含量较高, 酸中和能力强, 其硫酸用量为 37 mg/g 干物料。预处理后三种物料的纤维素水解得率相似, 分别为 $94.1\% \pm 0.9\%$, $93.4\% \pm 3.3\%$ 及 $92.1\% \pm 0.5\%$, 木聚糖、寡聚木糖的比例相似, 乙酸及糠醛的产生也相似, 说明整体的预处理强度较为一致 (表 3.5)。

三种物料主要的区别出现在葡萄糖、果糖及 HMF 的含量上 (图 3.2)。彻底清洗的玉米秸秆预处理后产生了 20.6 mg/g 干物料的葡萄糖, 未产生果糖, 说明在该预处理强度下, 从纤维素降解而来的葡萄糖含量为 20.6 mg/g 干物料。在补糖的玉米秸秆中, 其初始葡萄糖含量为 21.9 mg/g 干物料, 预处理过程若无葡萄糖降解, 其预处理后葡萄糖含量应当为 $21.9+20.6=42.5$ mg/g 干物料, 实际上仅有 29.4 mg/g 干物料, 意味着有 60% 的水溶性葡萄糖在预处理过程降解了; 而果糖在预处理过程不会产生, 果糖含量从预处理前的 20.8 mg/g 降为预处理后的 2.1 mg/g, 意味着 90% 的果糖在预处理过程降解了。对于原始玉米秸秆, 葡萄糖和果糖的降解量分别为 82% 与 88%。由于 HMF 是六碳糖如葡萄糖及果糖的直接降解产物, 其含量的差异也可以反应上述现象, 在无糖玉米秸秆中, 预处理后只产生了 2.7 mg/g HMF, 而补糖秸秆与原始秸秆分别产生了 7.3 mg/g 及 7.8 mg/g HMF, 约为无糖秸秆的三倍。

上述结果指出, 在适宜后续纤维素水解转化及高乳酸发酵指标的预处理强度下, 大量的水溶性葡萄糖及果糖在干酸预处理过程被降解, 产生较高含量的抑制物 HMF, 增加了后续脱毒工段的负荷。仅有约 20% 的水溶性糖在干酸预处理后得到保留, 不利于水溶性碳水化合物的产品化利用。

表 3.5 预处理后不同玉米秸秆的组分

Table 3.5 Components of the pretreated feedstocks

	Cellulose (%)	Xylan (%)	Oli-glu ^a (mg/g DM)	Oli-xy ^b (mg/g DM)	Xylose (mg/g DM)	Acetate (mg/g DM)	Furfural (mg/g DM)
Sugar free CS	36.43±1.19	3.43±0.18	26.31±0.09	52.42±0.77	145.95±0.90	19.45±0.12	3.92±0.08
Sugars re-supplemented CS	35.65±0.37	3.24±0.12	23.47±0.27	59.13±0.38	134.10±4.49	18.46±0.60	3.79±0.11
Raw CS	33.31±0.28	3.35±0.09	11.88±0.22	53.38±0.20	115.38±0.71	17.54±1.57	3.77±0.03

(a) 寡聚葡萄糖含量; (b) 寡聚木糖含量。

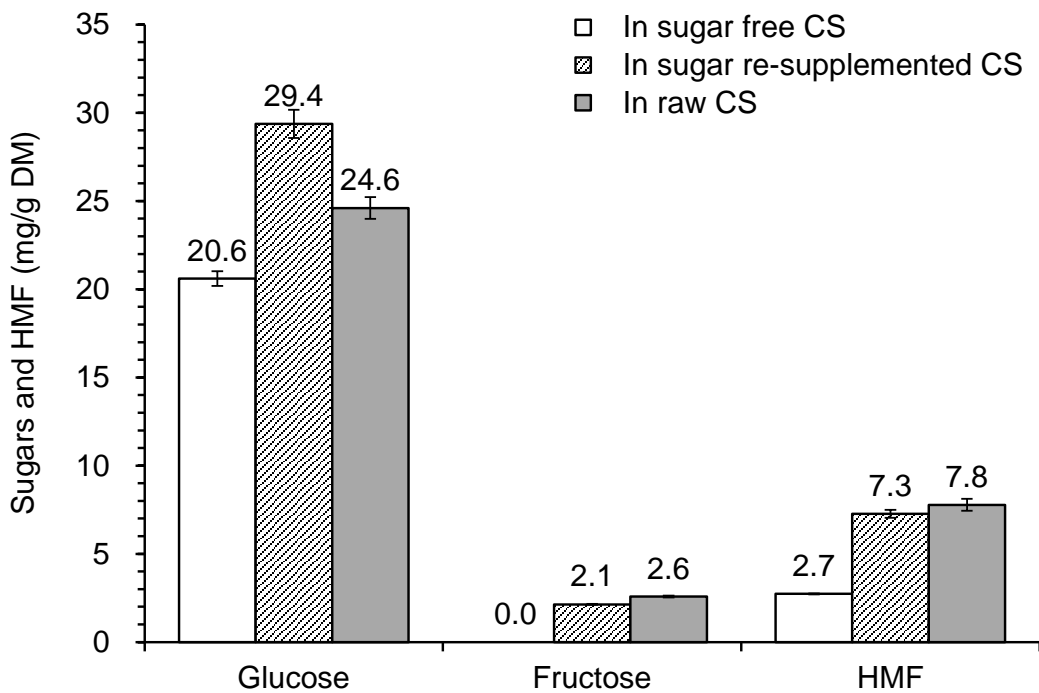


图 3.2 水溶性葡萄糖及果糖在干酸预处理过程的损失

Fig. 3.2 Loss of water-soluble glucose and fructose in dry acid pretreatment

无游离糖的玉米秸秆与补加糖的玉米秸秆硫酸用量为 25 mg H₂SO₄/g 干物料, 在 175 °C 下反应 5 min, 原始玉米秸秆硫酸用量为 37 mg H₂SO₄/g 干物料, 在 175 °C 下反应 5 min。图中的葡萄糖既包括预处理过程纤维素水解产生的葡萄糖, 也包括未在预处理过程中降解的水溶性葡萄糖; 而果糖仅来源于未被降解的水溶性果糖。CS, 玉米秸秆。

3.3.2 乳酸固态发酵在不同储存条件下的可行性

由于水溶性碳水化合物在稀酸预处理过程极难得到良好的保留, 我们首先在预处理前的原料储存工段进行固态发酵, 将水溶性糖转化为较耐高温的 L-乳酸。固态发酵过程没有发生染菌的情况, 因为我们接入了乳酸片球菌 *P. acidilactici* TY112 作为发酵菌株, 该菌株可以分泌一种特殊的抗菌肽, 有效防止染菌^[90]; 另一方面, 严格控制的厌氧条件避免了杂菌在发酵后期的引入, 乳酸发酵产生的乳酸会逐渐将 pH 降低到 4 左右, 抑

制其他菌株生长。我们在下面的实验中逐渐优化固态发酵过程的操作参数（固体含量、营养添加、接种量、发酵温度和时间），以获取适应于工业化放大的固态发酵条件，完成经济可行的、高效的水溶性糖生物转化。

在 42 °C 这一乳酸片球菌 *P. acidilactici* TY112 的最适生长及发酵温度下，在设计的不同实验条件下（固含量、营养、接种量），1 天均可达到稳定的乳酸转化，即使延长发酵时间至 7 天，乳酸及残糖含量也没有明显的变化。如图 3.3 结果显示，在一定范围内，较高的含水量（较低的固含量）有利于促进乳酸发酵，获得较高的乳酸转化率。然而为了保证后续的干酸预处理过程不产生游离水，避免水溶性糖及乳酸产品随游离水流出，同时为了降低预处理过程所需的蒸汽能耗，我们这里选择 67% (w/w) 固含量进行后续的实验。

营养添加与否对水溶性糖的生物转化没有产生明显的影响，这是因为玉米秸秆中含有一定的氮源、微量元素及丰富的维生素组分^[18, 19]，并且由于乳酸固态发酵的限制性因素为逐渐降低的 pH，添加营养也不能促进更多的水溶性糖转化。接种量提高的效果不明显的原因与上述类似，10% (w/w) 接种量并不能比 2.5% (w/w) 接种量在固态发酵中转化更多的水溶性糖，因此后续可以选择不添加营养盐，使用较低的 2.5% (w/w) 接种量进行后续实验。

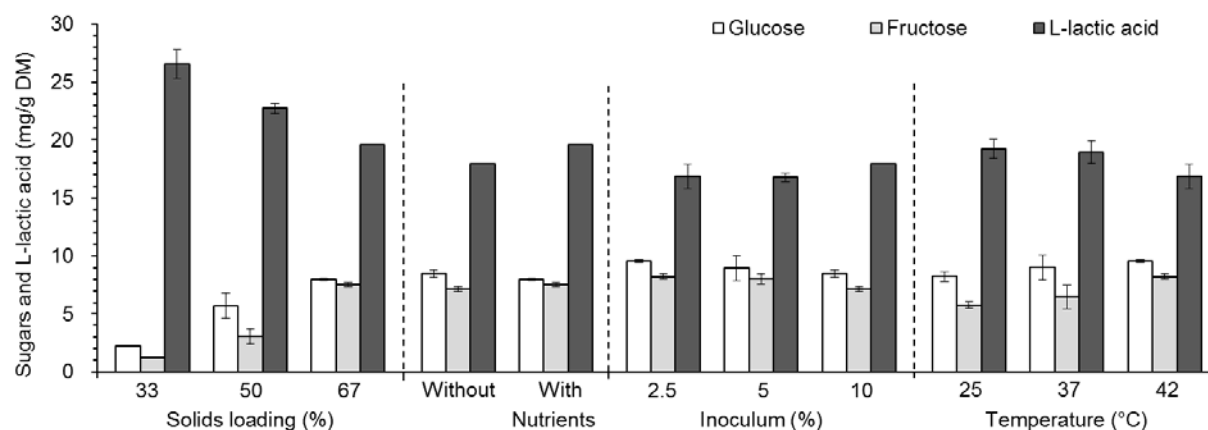


图 3.3 水溶性碳水化合物在乳酸菌 *P. acidilactici* TY112 固态发酵过程的 L-乳酸生物转化

Fig. 3.3 Bioconversion of water-soluble carbohydrates to L-lactic acid by solid state fermentation using *P. acidilactici* TY112

发酵条件：固含量优化组仅改变固含量 33、50 与 67% (w/w)，接种量为 10% (w/w)，有营养添加，42 °C 条件下发酵一天；营养盐优化组分为营养添加（5 g/kg 酵母粉，5 g/kg 蛋白胨，1 g/kg 柠檬酸氢二铵，2.5 g/kg 乙酸钠，以上含量均基于干秸秆质量）与否，固含量为 67% (w/w)，接种量为 10% (w/w)，42 °C 条件下发酵一天；接种量优化组仅改变接种量 2.5、5 与 10% (w/w)，固含量为 67% (w/w)，无营养添加，42 °C 条件下发酵一天；温度优化组仅改变发酵温度 25、37 与 42 °C，乳酸含量稳定的最短发酵天数分别为 5、2 及 1 天，固含量为 67% (w/w)，接种量为 2.5% (w/w)，无营养添加。

重要的是，乳酸固态发酵可以在广泛的温度范围内进行。低于乳酸片球菌 *P. acidilactici* TY112 的最适生长及发酵温度 42 °C 时，乳酸发酵所需的时间有所延长，37 °C

条件下需要 2 天，而 25 °C 条件下需要 5 天，考虑到我们是在预处理前的原料储存工段进行固态发酵，并没有设备占用，时间的延长对于成本的增加没有明显的影响；并且在实际储存过程中，环境温度也会随时变化，且发酵过程会产生生物热，导致秸秆堆积内部的温度高于外部，这些因素会导致固态发酵温度难以维持恒定。因此，在不同温度下乳酸发酵指标的一致，对实际操作情况是极为有利的。

最终，我们将玉米秸秆在 67% (w/w) 固含量、2.5% (w/w) 接种量、无营养添加、25 °C 室温条件下在密封的大塑料袋中（装入 15 kg 湿秸秆）发酵 6 天，最终得到的含乳酸的玉米秸秆中含有 18.6 mg/g 乳酸，6.6 mg/g 葡萄糖，4.0 mg/g 果糖（基于干物质）。其中葡萄糖转化率为 69.9%，果糖转化率为 80.8%。水溶性糖不能彻底转化的原因在于高固含量固态发酵条件下难以严格控制的发酵环境（诸如传质传热不充分），乳酸生产过程不断下降的 pH，种子泼洒不均匀等等。进一步提高转化率需要增加发酵成本，诸如添加中和剂如氨水以维持恒定的 pH，我们为了在储存工段低成本的实施固态发酵，这里选择将玉米秸秆泼洒完种子和水后密封得到的自然的固态发酵环境。

3.3.3 水溶性碳水化合物利用对纤维素 L-乳酸生产的促进

为了将玉米秸秆中的纤维素及半纤维素组分也转化为 L-乳酸，上述生产的含有乳酸的玉米秸秆首先需要进行干酸预处理，过程不产生游离水。结果发现，L-乳酸可以在预处理过程保持稳定，其含量从 18.6 mg/g 提高到 21.9 mg/g，这是由于预处理过程总物质有一定的干重损失，导致乳酸含量略有提高。同时，部分的硫酸催化剂被生产的乳酸取代，含乳酸的秸秆总酸催化剂的量为 35 mg/g 硫酸+18.6 mg/g 乳酸，而原始秸秆对照组的酸用量为 37 mg/g 硫酸。在这样的酸用量调整后，含乳酸的玉米秸秆与原始玉米秸秆预处理后的纤维素水解转化率基本一致，分别为 $92.8\% \pm 1.2\%$ 与 $92.1\% \pm 0.5\%$ ，两者的纤维素、木聚糖、寡聚木糖、木糖、乙酸及糠醛的产生量也基本一致。最大的差异在于 HMF，含乳酸的秸秆预处理后仅仅产生 3.2 mg/g HMF，而原始秸秆产生了 7.8 mg/g HMF，这是由于在含乳酸的秸秆中，易降解为 HMF 的水溶性碳水化合物已经大部分转化为了相对耐受高温的 L-乳酸（图 3.4）。

为了脱除预处理过程产生的抑制物，同时不在脱毒过程产生游离废水，尽可能的将产生的乳酸保留在固体物料中，我们选择了固态生物脱毒技术，使用树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 将物料脱毒至不含有糠醛和 HMF 为止。结果发现，含乳酸的玉米秸秆相对于原始秸秆而言，脱毒时间大幅度缩短，从 72 h 缩短至 48 h，这是因为含乳酸的玉米秸秆中 HMF 的含量较少，脱毒负荷较小。在含乳酸的秸秆中，大部分的乳酸可以得到保留（16.3 mg/g），少部分被 *A. resinae* ZN1 所降解。*A. resinae* ZN1 会优先利用糠醛和 HMF 作为碳源，预处理过程产生的葡萄糖和木糖也基本得到保留，而纤维素也没有在脱毒过程中被降解。

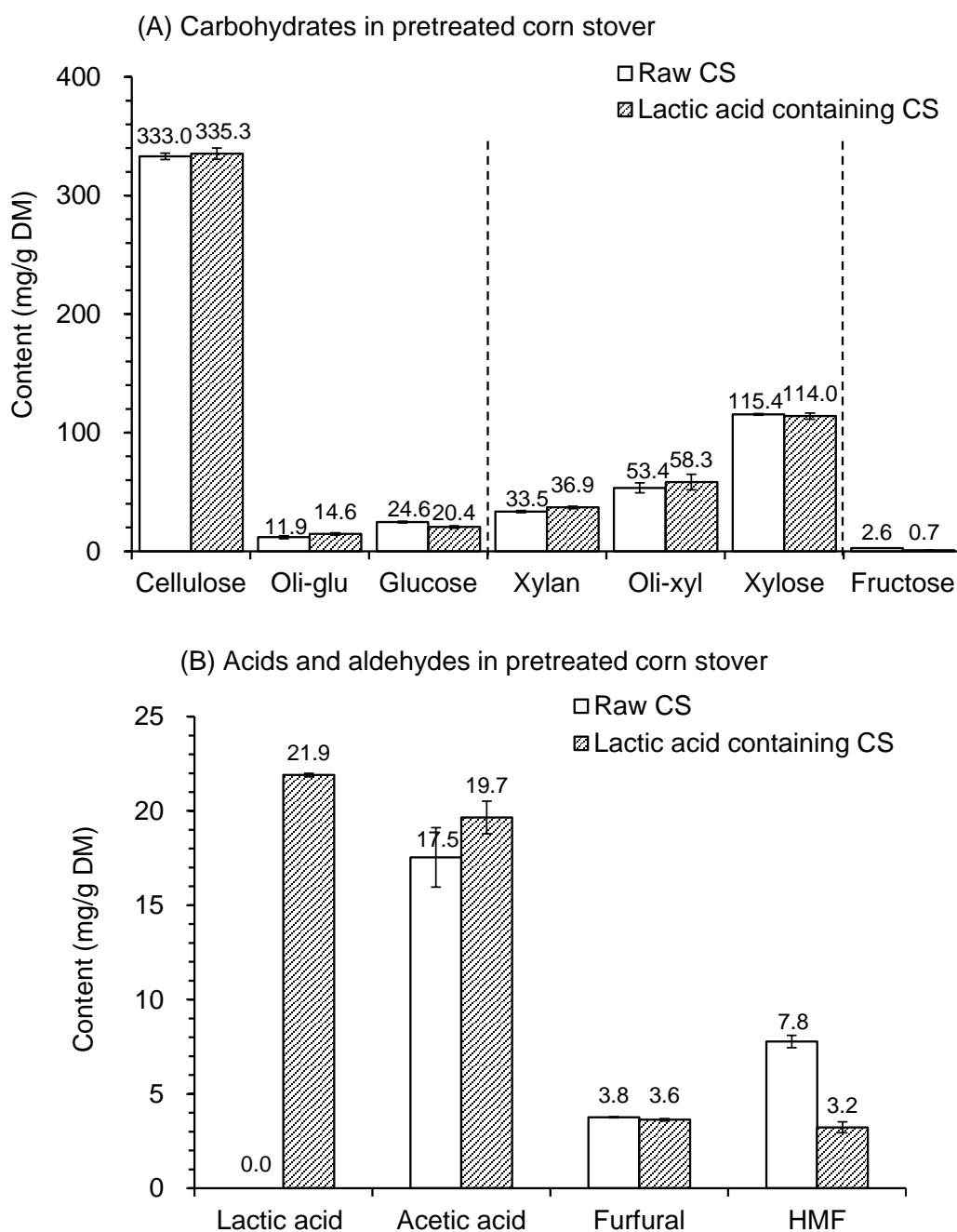


图 3.4 预处理后含乳酸玉米秸秆的组分含量

Fig. 3.4 Composition of pretreated L-lactic acid containing corn stover

(A) 预处理后玉米秸秆的碳水化合物含量；(B) 预处理后玉米秸秆的酸类及醛类含量。原始玉米秸秆与含乳酸的玉米秸秆在 175 °C 下反应 5 min，硫酸用量分别为 37 及 35 mg/g 干物料。CS，玉米秸秆；Oli-glu，寡聚葡萄糖；Oli-xyl，寡聚木糖。

接下来，使用两种生物脱毒后的物料分别进行 L-乳酸同步糖化共发酵，固含量为 30% (w/w)，酶用量为 5 mg 酶蛋白/g 干物料 (图 3.5)。结果显示，含乳酸的秸秆糖化后，其糖化液接种后的 L-乳酸浓度为 7.2 g/L，显著高于原始秸秆糖化液接种后的 L-乳酸浓度 (0.9 g/L)；而初糖浓度较为相似，葡萄糖浓度分别为 67.7 g/L 与 70.7 g/L，木糖浓度分别为 28.7 g/L 与 25.5 g/L。含有乳酸的玉米秸秆在接种后的前 18 h 菌体生长较慢，

相应的糖耗和产酸速率也较慢，这或许是因为初始存在的乳酸对前期的菌体生长有略微的抑制作用。然而随着葡萄糖和木糖的逐渐耗尽，含乳酸的秸秆逐渐体现出较高的乳酸浓度。发酵 72 h 后，含乳酸的秸秆最终乳酸积累量为 139 g/L，高于原始秸秆发酵得来的 130.2 g/L，而两者 L-乳酸的光学纯度均为 99.7%。

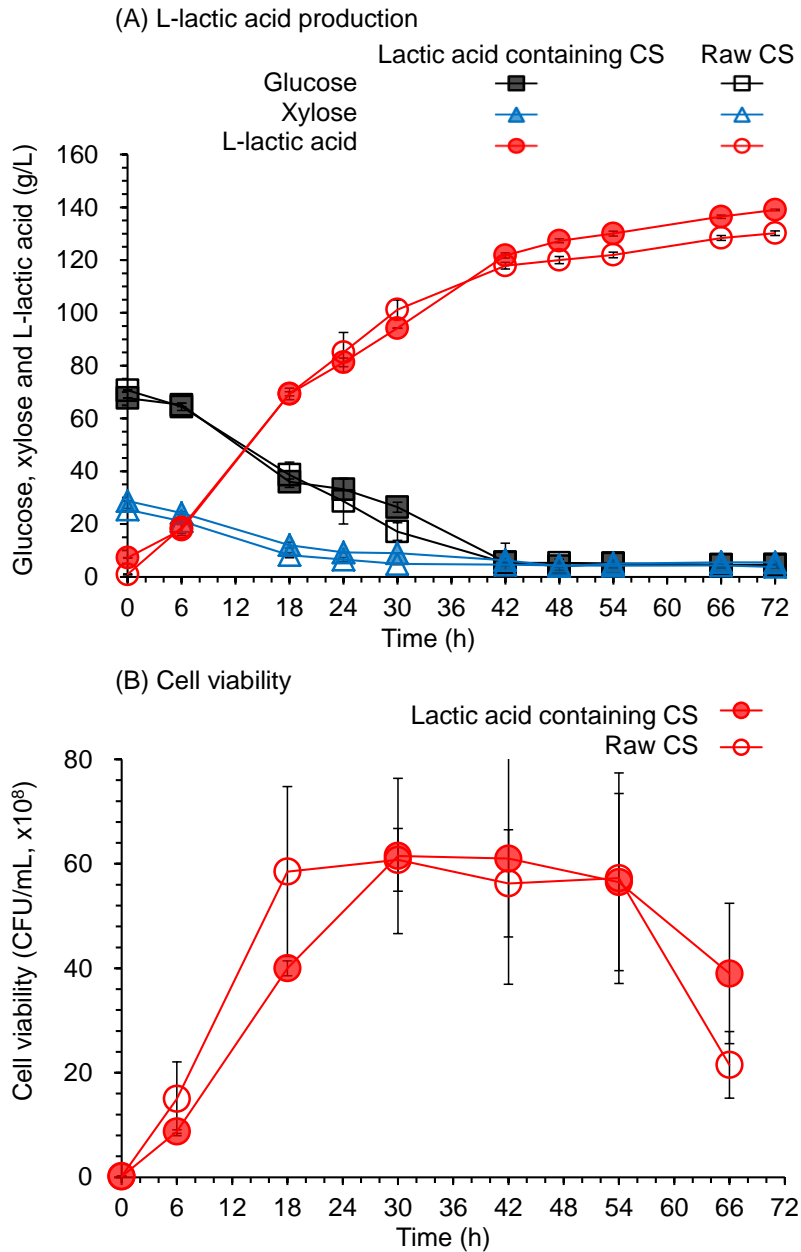


图 3.5 含乳酸的玉米秸秆在乳酸菌 *P. acidilactici* ZY271 的作用下进行同步糖化共发酵

Fig. 3.5 Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) by *P. acidilactici* ZY271 using L-lactic acid containing corn stover

(A) L-乳酸发酵；(B) 细胞生长。同步糖化发酵条件：30% (w/w) 固体含量的预处理及脱毒后的玉米秸秆，酶用量 5 mg 酶蛋白/g 干物料，预糖化反应温度 50 °C，pH 5.5，150 rpm，反应 6 h；同步糖化共发酵反应温度 42 °C，pH 5.5，150 rpm，发酵 72 h，菌株为工程乳酸菌 *P. acidilactici* ZY271。pH 使用 50% (w/w) Ca(OH)₂ 维持。CS，玉米秸秆。

两组实验都进行了细致的重复试验，误差线很低，说明含乳酸的秸秆中水溶性糖转化而来的 L-乳酸，可以经过预处理和脱毒过程得到保留，最终有效的与同步糖化共发酵纤维素及木糖而来的 L-乳酸一起积累，获得更高的 L-乳酸发酵指标。尽管乳酸浓度的提升非常有限，仅有 6.8%，但该新工艺有利于提高工业化纤维素乳酸发酵过程中基于原料的 L-乳酸得率，同时降低后续分离纯化过程的成本。

通过增加简单的固态发酵工艺，可以有效的将水溶性碳水化合物转化为 L-乳酸，最终提高木质纤维素 L-乳酸的生产指标，同时减少硫酸催化剂在预处理过程的用量，极大降低抑制物 HMF 的产生，大幅缩短生物脱毒时间。该水溶性碳水化合物的固态发酵转化方法，也可应用于其他的高固含量预处理过程（汽爆预处理、氨纤维膨爆预处理等），或者其他发酵产品（柠檬酸、葡萄糖酸、衣康酸等）的生产。

3.3.4 两种 L-乳酸生产场景的技术经济分析

我们将传统干法生物炼制过程生产 L-乳酸（场景 1）与上述实验过程提到的利用水溶性糖的整合 L-乳酸生产工艺（场景 2）在 Aspen plus 平台上进行过程推演，比较两者的技术经济性。两种工艺主要存在以下区别：

在原料收集及前处理工段（A100），场景 1 的玉米秸秆原料含水量为 15%（w/w），该含水量为自然晾干后的秸秆含水量，而在场景 2 中，为了调整到固态发酵的条件，原料含水量需要通过泼洒水及乳酸菌种子液提高到 33%（w/w）。该工段的过程流程差异见图 3.6，加入的发酵罐（R101）仅仅是一个模块，在实际操作过程不需要特别的要求和控制，没有实际的设备占用，在仓库中进行即可。由于生物炼制工厂普遍设计的原料贮存厂房的存储周期至少为 1 周^[145]，这恰好可以满足约 6 天的固态发酵时间以进行水溶性碳水化合物向 L-乳酸的转化。该工段成本的增加主要来自于额外的种子培养单元、厌氧发酵需要的覆盖膜及额外的工人工资。额外种子培养带来的设备成本从\$2,885,000 增加到\$2,921,000，提高了 1%；而操作成本提高了\$80,000。原始玉米秸秆的堆积密度约为 0.12 吨/立方米，意味着每吨秸秆的体积约为 8.333 立方米^[146]，因此，每吨玉米秸秆可以堆积成立方体型，其边长约为 2.03 米，表面积大致为 25 平方米；农业用的聚乙烯塑料薄膜可以用来覆盖该堆积的立方体玉米秸秆，以达到维持厌氧的目的，考虑到重叠和裁剪，预计每吨玉米秸秆需要的聚乙烯塑料薄膜面积为 50 平方米；该种薄膜的价格为 1.8 美元/120 平方米（www.1688.com），因此，每立方米玉米秸秆的薄膜材料耗费为 $50 \times \$1.8 / 120 = \0.75 ，薄膜带来的可变操作成本增加了\$230,000。此外，固态发酵的接种及薄膜覆盖工作至少需要 20 个额外的操作工人，才能完成每天 900 吨秸秆的加工工作，导致固定操作成本增加了\$220,000。

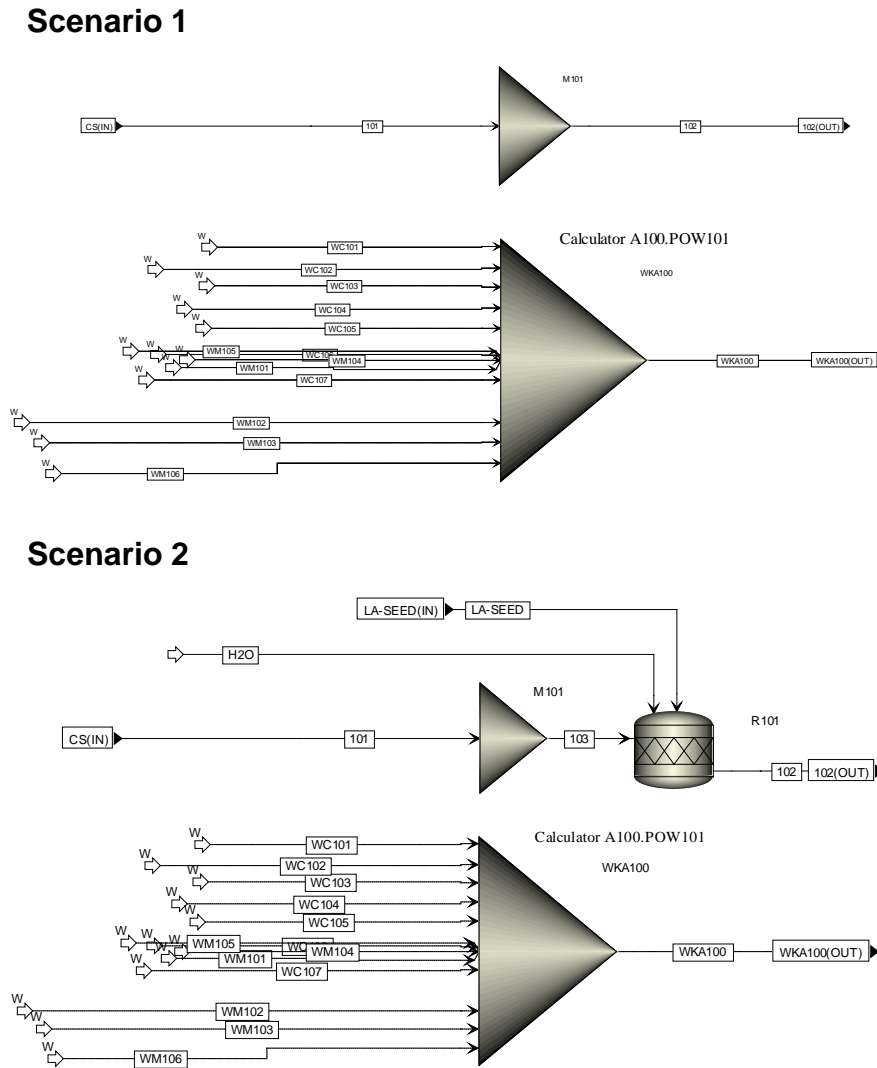


图 3.6 Aspen plus 过程流程模拟中两个场景在前处理工段的主要差异

Fig. 3.6 Major difference of the two scenarios in the Pre-handling Area (A100) in Aspen Plus flowsheet simulation process

场景 1，传统干法生物炼制下的纤维素乳酸生产，不进行水溶性糖利用；场景 2，利用水溶性糖的工艺，添加了种子培养反应器 R101，用于乳酸固态发酵过程额外的种子培养。

在预处理工段（A200），场景 1 的预处理固液比为 2:1（固含量 67%），场景 2 的固液比降低到了 3:2（固含量 60%）。这是因为场景 2 的含有乳酸的秸秆固含量已经为 67%，为了加入硫酸液，而硫酸液不宜配制的太浓，因此预处理固含量降低至 60%。所需要蒸汽量的增加导致了设备及其安装成本从 \$3,300,000 增加到 \$3,597,000，大约提高了 9%。硫酸用量从 37 kg/t 干秸秆降低至了 35 kg/t，导致了可变操作成本的略微降低 (\$30,000)。

在生物脱毒工段（A250），场景 2 的生物脱毒时间从场景 1 的 72 h 缩短为 48 h，设备占用明显降低，设备及安装费从 \$8,854,000 降低为 \$6,548,000，费用大约降低了 26%。在糖化及发酵工段（A300），最终的 L-乳酸生产指标从 130.2 g/L 提升至 139.0 g/L，而 L-乳酸基于原始玉米秸秆原料的乳酸得率也从 424 kg/t 干玉米秸秆提升至 453 kg/t 干玉米秸秆。两个场景下，基于生产单位 kg 乳酸产品在每个工段产生的费用比较见图 3.7。

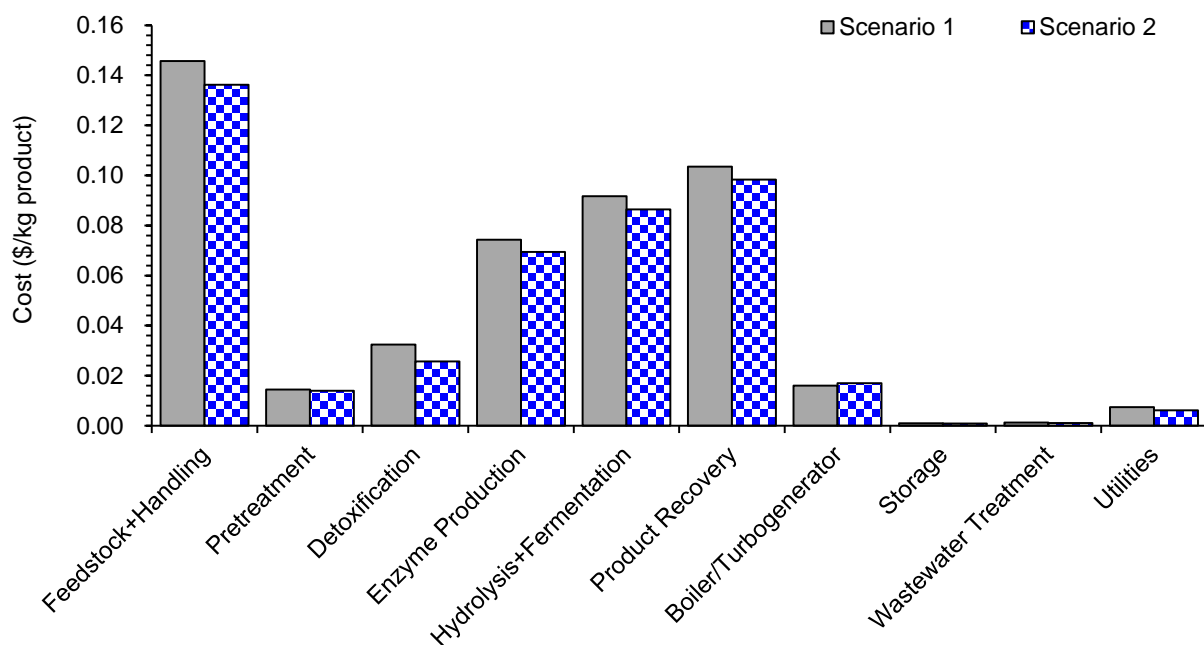


图 3.7 两个场景中每个工段的费用分布细节（基于单位 kg 乳酸产品的费用）

Fig. 3.7 Cost contribution details from each process area (per kg L-lactic acid product) in two scenarios
 场景 1, 传统干法生物炼制下的纤维素乳酸生产, 不进行水溶性糖利用; 场景 2, 利用水溶性糖的工艺。

总的来看, 技术经济分析指出, 总设备投资从场景 1 的\$111,300,000 下降至场景 2 的\$107,400,000, 主要是由于脱毒时间的显著缩短带来的设备规模减小; 总的可变操作成本及固定操作成本从每年\$48,820,000 增加到每年\$49,420,000, 主要由于固态发酵环节的增加。实际上, 由于最终基于原料的乳酸得率有所提高, 生产单位千克 L-乳酸产品的可变及固定操作成本均有所降低, 从\$0.387 下降至\$0.366。通过增加水溶性碳水化合物的利用工艺, 场景 2 的 L-乳酸最低售价(MLSP)为\$0.459/kg, 大约相比于场景 1(\$0.488/kg) 下降了 5.9%。

3.4 本章小结

以玉米秸秆为代表的农业木质纤维素废弃物中往往含有一定含量的水溶性碳水化合物, 其含量一般占玉米秸秆干重的 6%左右。而农作物秸秆在生物炼制过程中, 水溶性碳水化合物往往被忽视, 目前没有研究报道过在生物炼制糖平台中整合利用水溶性碳水化合物的相关工艺, 这是由于在主流的预处理方法中, 水溶性碳水化合物易被降解或者随游离废水排出。如工业化过程最常见的稀酸预处理及汽爆预处理操作中, 大部分的水溶性碳水化合物会被降解为 HMF 等抑制物, 抑制后续的酶解糖化和发酵, 并且造成极大的资源浪费, 这成为了制约木质纤维素原料综合利用的一个挑战。本章首次在木质纤维素生物炼制过程提出了水溶性糖利用的必要条件, 并且提出了一种水溶性糖利用工艺。

本章从黄储秸秆饲料加工操作中获得启发, 将玉米秸秆首先进行简单的 L-乳酸固态

发酵，之后再进行干法生物炼制加工，利用乳酸比水溶性糖耐温性与耐酸性强的特点，将乳酸在干酸预处理过程中有效保留。本工艺将水溶性糖的利用与生物炼制过程纤维素、半纤维素的利用相整合，实现了最大化的原料利用，得到了更高的乳酸得率。此外，由于乳酸的存在，一定程度上减少了外源硫酸催化剂的添加；水溶性糖的转化极大减少了预处理过程抑制物 HMF 的产生，大幅度的缩短了生物脱毒时间。Aspen plus 过程流程模拟指出，利用水溶性碳水化合物的新工艺降低了乳酸的最低售价，是一种经济可行的纤维素 L-乳酸生产工艺。本工艺的提出对以秸秆生物质为原料的乳酸生物炼制产业具有明显的推动作用，并且该思路可以拓展至其他生物基化学品生产过程。

第 4 章 内源乳酸催化的蒸汽处理对玉米秸秆水解转化率的强化

4.1 引言

农作物秸秆除了可以作为生物能源及生物基化学品生产的原料，还有一项重要的产业化应用，即用作反刍动物饲料。木质纤维素生物质的致密结构诸如半纤维素的缠绕、木质素的包裹及纤维素的结晶与聚合，降低了瘤胃微生物对木质纤维素的水解发酵速率，进而减缓了可挥发性脂肪酸（VFA）对反刍动物的能量供给^[147-149]，制约了其直接喂养反刍动物的饲料利用率。

为了克服木质纤维素生物质的拮抗性，提高其作为反刍动物饲料的可消化率。研究人员进行了许多不同种类的预处理尝试，如蒸汽预处理^[150]、蒸汽爆破预处理^[151]、氨纤维膨爆预处理^[152]、碱及磨浆预处理^[153]、真菌生物预处理^[154]等。虽然这些预处理方式与生物炼制糖平台的预处理非常相似，其目的都是打破木质纤维素的致密结构，便于酶水解和糖化，但预处理强度有很大的不同。饲料加工过程的预处理强度不宜过强，因为瘤胃中水解及发酵方式不同于发酵罐中，某些瘤胃微生物可以在位生产纤维素酶进行水解，同时其他微生物将糖转化为 VFA 随即被动物所吸收，这种糖化发酵方式可以直接有效的降解原始秸秆，因此温和的预处理即可达到提高秸秆消化率的目的；同时，温和的预处理可以避免秸秆中较多的干物质损失，并且避免产生较多的过度降解产物如糠醛、5-羟甲基糠醛（HMF）及酚类物质，减少这些物质对瘤胃微生物的毒害作用^[151, 155, 156]。

蒸汽处理或汽爆处理可以在高温高压条件下有效的解聚破坏木质纤维素生物质结构，使木质素达到玻璃化温度后重新分布、乙酰基断裂为乙酸并催化半纤维素水解为寡糖及单糖，因此可以有效增加纤维素的可接近性，提高纤维素及半纤维素在瘤胃中的可消化性。蒸汽及蒸汽爆破预处理加工的农作物秸秆饲料，在体外发酵产气实验、体内瘤胃消化实验及动物饲喂实验中均可得到较好的效果^[149-151]，可以作为一种经济可行的秸秆饲料加工办法用于产业化过程。

常用于反刍动物饲料的秸秆诸如玉米秸秆及麦秆，往往含有或多或少的水溶性碳水化合物，其主要成分是葡萄糖、果糖及蔗糖。第三章提到，玉米秸秆中水溶性碳水化合物的含量一般为 6%^[16, 17]。如果玉米秸秆不进行任何处理，直接进行蒸汽处理，很大一部分水溶性碳水化合物会在高温条件下降解为 HMF^[97]，对于反刍动物及养殖场工人具有毒害作用^[156, 157]，此外，水溶性碳水化合物的降解也造成了一定的可利用碳源的损失。

与第三章类似，我们首先在蒸汽处理之前对玉米秸秆进行固态发酵，将其中的水溶性碳水化合物转化为乳酸，之后将含有乳酸的玉米秸秆进行蒸汽处理，并且与不进行固态发酵的玉米秸秆蒸汽处理物料做对比，通过组分分析及酶水解转化率测试，推测两种饲料生产工艺的优劣。

4.2 材料与方法

4.2.1 木质纤维素原料与酶制剂

玉米秸秆于 2016 年秋季收获于内蒙古通辽市，原料处理及储存方法同 3.2.1。该批次玉米秸秆的纤维素含量为 32.4%，木聚糖含量为 22.4%，阿拉伯聚糖含量 2.8%，木质素含量为 20.8%，灰分含量为 6.2%，水溶性葡萄糖及果糖含量分别为 24.8 mg/g 干物料及 32.0 mg/g 干物料，上述组分的测定方法同 3.2.1。由于其他水溶性碳水化合物在玉米秸秆中含量很低，故忽略不计。该批次的玉米秸秆与第三章提及的玉米秸秆产地及收获年份均相同，然而由于晾晒及储存时间的差异性，其纤维素及水溶性葡萄糖、果糖含量有所差异。

纤维素酶 Cellic CTec 2 与糖化酶 GA-L NEW 来源及酶活同 2.2.1。

4.2.2 菌种与培养

乳酸发酵菌株 *Pediococcus acidilactici* TY112 的培养基与培养方法见 3.2.2。

4.2.3 乳酸固态发酵

将 1% (w/w) 接种量（基于湿玉米秸秆物料）的 *P. acidilactici* TY112 培养液与一定量的去离子水混匀，泼洒到玉米秸秆物料上，调整秸秆的固液比为 2:1，拌匀后将 15 kg 的湿物料放入大塑料袋中，挤压出空气密封保存，进行乳酸厌氧固态发酵，25 °C 条件下发酵 7 天，该步骤与第三章的固态发酵办法一致。取出的样品加入去离子水稀释至固液比 1:20 左右，置于摇床 30 °C 震荡浸提 1 h，测定其 pH，之后 11167×g 离心 5 min，上清液用于乳酸及残糖测定。

4.2.4 蒸汽处理

固态发酵后的秸秆与原始秸秆（对照组）进行蒸汽处理以破坏木质纤维素结构。反应器与第二、三章相同，但不加入硫酸，只通入蒸汽，具体方法如下：将 1200g 木质纤维素原料（干重）加入 20 L 的预处理反应器中，固液比为 2:1，即固态发酵后的含乳酸的秸秆直接加入反应器，而原始秸秆加入反应器后需加入一定量的水调节固液比。预处理反应器中内置螺带搅拌桨，转速 50 rpm，搅拌 3 min 使得反应器内固体与液体混合均匀，之后从反应器底部通入蒸汽进行加热，初始蒸汽压力为 1.6 MPa，201 °C。预处理过程反应温度为 120 °C~180 °C，停留时间为 5 min，温度通过注入蒸汽来控制。反应完毕后排出蒸汽，泄压后放出物料，蒸汽处理后的秸秆饲料固含量大于 50% (w/w)，以固态形式存在，没有产生游离废水。

4.2.5 组分测定及酶水解评价

纤维素、半纤维素、寡聚葡萄糖、寡聚木糖及灰分含量测定方法同 2.2.7。

预处理前后秸秆的酶水解评价实验具体操作与第二、三章略有不同，为了模拟瘤胃中的温度及 pH，选择 39 °C 与 pH 6.0 进行纤维素酶水解实验。具体方法如下：称取 0.5 g 干重的秸秆，加入 10 mL 去离子水，用 5 M NaOH 溶液调节体系 pH 至 6.0，加入 80 μL 四环素溶液（10 mg/mL 溶于 70% 乙醇溶液），加入 60 μL 放线菌酮溶液（10 mg/mL 溶于去离子水），加入纤维素酶 20 FPU/g 干物料（DM），相当于 26 mg 酶蛋白/g 纤维素，

并补入 0.1 M pH 6.0 的柠檬酸缓冲液至总体积 20 mL。置于水浴摇床中, 控制 39 °C, 150 rpm, 48 h 后取样测定其中的葡萄糖浓度。试验进行两组平行, 取平均值作为最终数据。纤维素水解得率的计算方法同 2.2.7。

4.2.6 检测方法

葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、乳酸、乙酸、糠醛、HMF 等可溶性组分含量使用 HPLC 测得, 方法同 2.2.8。

酚类物质(香草醛、丁香醛、4-羟基苯甲醛)的测定使用 HPLC 测得, 泵型号为 LC-20AT, 检测器为紫外检测器 UV/VIS detector SPD-20A, 色谱柱型号 YMC-Pack ODS-A, 柱温维持 35 °C, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 270 nm, 梯度洗脱方法: 流动相由洗脱液 A (0.1% (w/w) 甲酸溶液, 溶于超纯水), 与洗脱液 B (100% 乙腈) 组成, 初始流入 10% 洗脱液 B, 4 min 内提升至 35% 洗脱液 B, 维持 1 min, 然后 15 min 内从 35% 洗脱液 B 下降至 10% 洗脱液 B, 维持 10 min。

4.3 结果与讨论

4.3.1 玉米秸秆中水溶性糖在蒸汽处理过程的转化利用

经测定, 水溶性葡萄糖及果糖共占据本批次原始玉米秸秆干重的 5.7% (w/w)。我们首先将原始秸秆直接在不同的温度条件(120 °C、140 °C、160 °C、180 °C)下进行蒸汽处理, 时间为 5 min, 评估水溶性糖降解的比例及 HMF 的产生量。结果发现(图 4.1), 水溶性糖的降解随着温度的提高而增多, 在 120 °C 及 140 °C 的较低蒸汽处理温度下, 水溶性糖的降解较少; 而在 160 °C 处理时, 有 22.2% 的葡萄糖及 22.6% 的果糖被降解; 而当处理温度提高至 180 °C 时, 38.3% 的葡萄糖及 44.8% 的果糖被降解。较低温度处理下(小于 160 °C), 木聚糖及阿拉伯聚糖的移除率很低, 处理效果较差; 而在较高温度下, 水溶性葡萄糖及果糖的降解带来了资源浪费。我们在接下来的实验中尝试将水溶性糖在蒸汽处理前转化为耐热性较强的乳酸, 避免其降解, 而乳酸也是反刍动物可以直接吸收作为能量的有机酸之一^[158, 159]。

与上一章的方法类似, 通过在秸秆的储存工段实施经济有效的乳酸固态发酵, 实现了水溶性糖向乳酸的生物转化。该批次玉米秸秆中葡萄糖转化了 37%, 从 24.8 mg/g 干物料降低到 15.5 mg/g 干物料; 而果糖转化了 79%, 从 32.0 mg/g 干物料下降到 6.7 mg/g 干物料; 最终转化生成了 25.7 mg/g 乳酸及 6.6 mg/g 乙酸(图 4.2)。除乳酸外, 副产物乙酸同样可以被反刍动物作为能量来源直接吸收^[150], 由于乳酸及乙酸在高温预处理条件下均比较稳定, 因此水溶性糖在预处理前的转化可以有效的提高秸秆饲料在蒸汽处理过程的能量回收率。

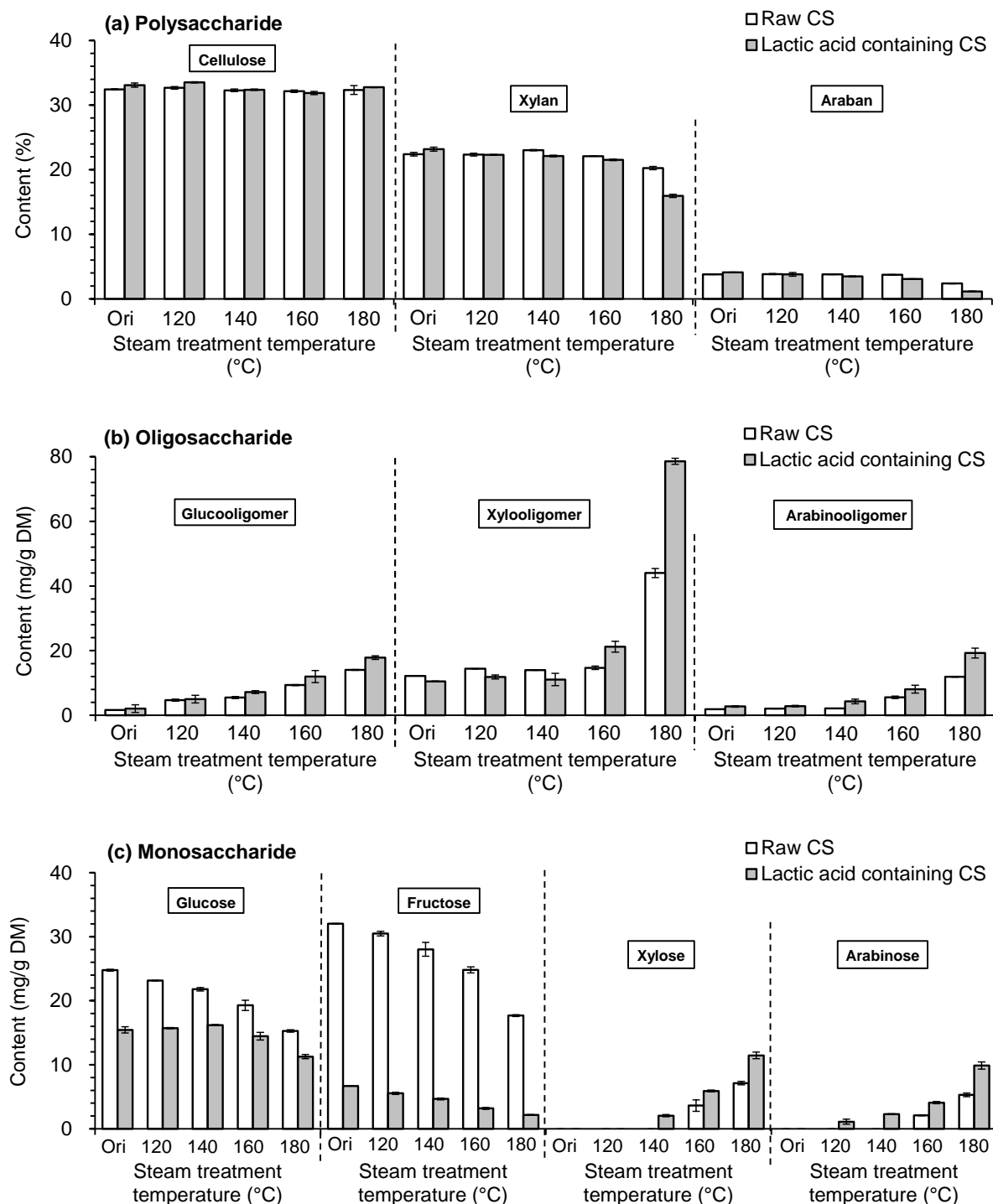


图 4.1 蒸汽处理后的玉米秸秆的聚糖、寡糖及单糖含量

Fig. 4.1 Polysaccharide, oligosaccharide and monosaccharide of steam treated corn stover
 (a) 聚糖; (b) 寡糖; (c) 单糖。原始玉米秸秆与含乳酸的玉米秸秆在不同温度下 (120 °C、140 °C、160 °C、180 °C) 蒸汽处理 5 min。Ori, 未经过蒸汽处理的原始玉米秸秆及含乳酸的玉米秸秆; CS, 玉米秸秆。

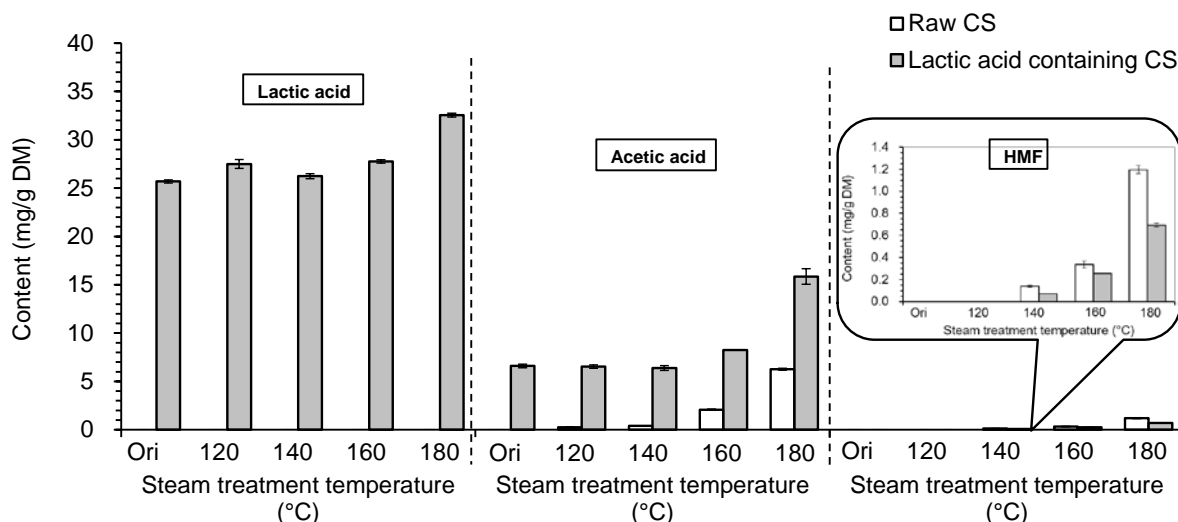


图 4.2 蒸汽处理后的玉米秸秆的酸类及 HMF 含量

Fig. 4.2 Acids and HMF of steam treated corn stover

原始玉米秸秆与含乳酸的玉米秸秆在不同温度下 (120 °C、140 °C、160 °C、180 °C) 蒸汽处理 5 min。Ori, 未经过蒸汽处理的原始玉米秸秆及含乳酸的玉米秸秆; CS, 玉米秸秆。

表 4.1 蒸汽处理后玉米秸秆的糠醛、酚类含量及 pH

Table 4.1 Furfural, phenolic compounds and pH of steam treated corn stover

Pretreatment conditions	Furfural (mg/g DM)	4-hydroxybenzaldehyde (mg/g DM)	Vanillin (mg/g DM)	Syringaldehyde (mg/g DM)	pH
(A) Steam treatment					
Raw corn stover	0.00±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.12±0.01	6.23±0.03
120 °C	0.00±0.00	0.03±0.00	0.03±0.00	0.13±0.01	5.87±0.01
140 °C	0.00±0.00	0.04±0.01	0.06±0.02	0.15±0.00	5.71±0.01
160 °C	0.00±0.00	0.07±0.00	0.07±0.00	0.17±0.01	5.76±0.00
180 °C	0.37±0.01	0.31±0.04	0.28±0.02	0.41±0.04	5.05±0.00
(B) Endogenous lactic acid assisted pretreatment					
Lactic acid containing corn stover	0.00±0.00	0.02±0.00	0.03±0.00	0.09±0.01	4.27±0.01
120 °C	0.00±0.00	0.04±0.01	0.04±0.00	0.09±0.00	4.30±0.01
140 °C	0.00±0.00	0.07±0.01	0.05±0.01	0.12±0.01	4.30±0.00
160 °C	0.08±0.00	0.10±0.01	0.11±0.01	0.19±0.02	4.32±0.01
180 °C	0.41±0.02	0.35±0.03	0.34±0.03	0.44±0.02	4.19±0.01

原始玉米秸秆与含乳酸的玉米秸秆在不同温度下 (120 °C、140 °C、160 °C、180 °C) 蒸汽处理 5 min。

而从 HMF 的产生来看, 温度 120 °C 时, 无 HMF 产生; 在温度为 140-180 °C 范围内, 含乳酸的秸秆相比较于原始秸秆而言, HMF 的产生下降了 24.2-50.0% (图 4.2)。而两者在相同处理温度下, 糠醛及酚类抑制物的含量基本一致 (表 4.1)。由于 HMF 对瘤胃微生物有一定的抑制作用, 其含量的降低对于饲料加工而言是有利的。实验结果充分说明, 通过在蒸汽处理之前的原料储存工段实施固态发酵将水溶性糖转化为耐热的乳酸, 可以有效减少水溶性糖在蒸汽处理环节浪费, 提高能量利用效率, 同时降低有毒且易挥发的 HMF 的产生。

4.3.2 蒸汽处理玉米秸秆水解转化率的提高

限于目前实验条件, 只能先通过组分分析及酶水解得率判断内源乳酸催化蒸汽处理后的玉米秸秆的可消化率, 后续再通过体外产气发酵实验及体内消化实验进一步验证, 如图 4.1, 对照组即为原始秸秆在不同温度下 (120 °C、140 °C、160 °C、180 °C) 进行蒸汽处理后的组分含量。与一般的蒸汽处理相同, 原料的木聚糖及阿拉伯聚糖随着温度的提高逐渐水解为相应的寡糖及单糖, 乙酸的产生也逐渐增多, 这意味着木质纤维素的逐渐解聚。

而将原始玉米秸秆进行乳酸固态发酵后, 大部分水溶性糖转化为了乳酸及副产物乙酸, 这导致了原料 pH 的下降, 从原始秸秆的 6.23 下降到 4.27 (表 4.1)。这些酸理论上会在蒸汽处理过程催化半纤维素的水解, 因此我们推测这些内源酸催化剂的产生会协助提高蒸汽处理效率。结果如图 3.1, 在同样的蒸汽处理温度下, 尤其是在较高的温度下, 有内源乳酸催化剂的实验组半纤维素的水解移除率明显提高, 相应的寡糖及单糖的产生也明显升高。在 180 °C 时, 木聚糖移除率从 9.6% 提高到 28.8%, 而阿拉伯聚糖移除率从 37.2% 提高到 69.6%。简而言之, 2.57% (w/w) 的内源乳酸及一定的内源乙酸催化剂可以有效的提高蒸汽处理过程半纤维素的移除率, 进而更好的破坏木质纤维素生物质的致密结构, 便于后续瘤胃微生物的水解与发酵; 与此同时, 半纤维素聚糖组分的水解产物为寡糖和单糖, 可以更容易的被瘤胃微生物利用。

在上述的蒸汽处理温度下, 纤维素可以在预处理过程维持稳定。我们接下来采用纤维素酶水解转化率来评估纤维素的接近性, 推测其在瘤胃中的可消化率, 这是因为体外产气实验的消化率与纤维素酶水解转化率呈线性关系^[152]。酶水解选用牛瘤胃的常见 pH 6.0 及温度 39 °C, 水解时间选择牛胃中食物的一般停留时间 48 h。结果如图 4.3。对于原始秸秆而言, 随预处理温度的提高, 其纤维素转化率显著提高, 从 23.8% (未经预处理的原始秸秆) 逐渐提高到 48.1% (180 °C 蒸汽处理 5 min 的原始秸秆)。而在每个处理温度下, 我们比对了进行水溶性糖转化的玉米秸秆与原始玉米秸秆蒸汽处理后纤维素水解得率的差异。结果发现, 在 140 °C ~180 °C 的范围内, 蒸汽处理的含乳酸秸秆的纤维素酶水解得率较之相同温度蒸汽处理的原始秸秆的水解得率提高了 5.4 ~16.6%, 这说明了内源产生的乳酸的催化作用提高了纤维素的接近性, 有利于纤维素酶对于纤维素的水解, 而在反刍动物瘤胃中, 微生物产生的纤维素酶预计同样会更容易水解这种内源乳酸催化的蒸汽处理的秸秆。在之后的实验中, 我们还需要进行体外产气实验、体内消

化实验以及动物饲喂实验来进一步验证该饲料生产工艺的优越性。

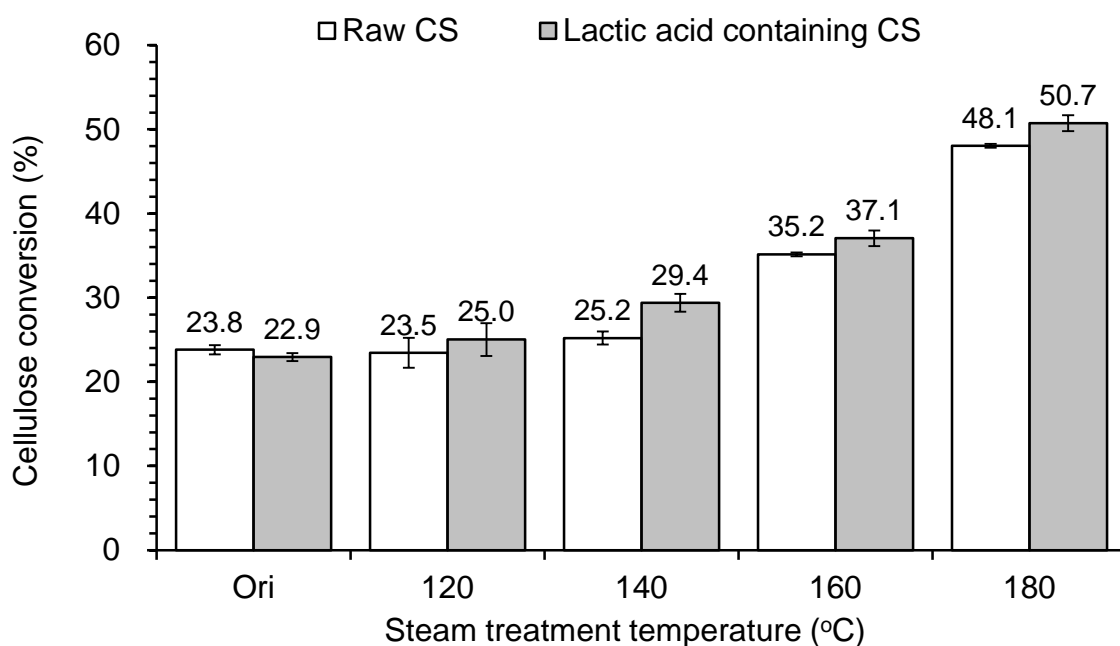


图 4.3 蒸汽处理的玉米秸秆的纤维素酶水解得率

Fig. 4.3 Cellulose enzymatic hydrolysis yield of steam treated corn stover

酶解条件：2.5%固含量，酶用量 26 mg 酶蛋白/g 纤维素，39 °C，pH 6.0，150 rpm 处理 48 h。CS，玉米秸秆。

4.4 本章小结

以玉米秸秆为代表的粮食作物废弃物，在反刍动物饲料行业有着重要的应用。然而木质纤维素生物质的致密结构限制了秸秆的可消化率，秸秆可消化率的提高有利于为反刍动物提供更多的能量，进而提高秸秆饲料的资源利用率。目前蒸汽处理已经被证实可以有效的增加纤维素的接近性，提高纤维素及半纤维素在瘤胃中的可消化性，可以作为一种经济可行的秸秆饲料加工办法用于产业化过程。

而本章节在传统蒸汽处理的基础上，在蒸汽处理前的原料储存工段进行水溶性糖向乳酸的固态发酵生物转化，之后再同样条件的蒸汽处理。该工艺具备如下优点：(1) 内源乳酸催化的蒸汽处理过程将半纤维素更多的水解为寡糖与单糖，同时增加了纤维素的接近性，提高了后续纤维素的酶水解转化率，有利于反刍动物对于饲料的消化及利用；(2) 降低了有毒且易挥发的 HMF 生成量，减小了其对于反刍动物及饲养员的健康危害；(3) 固态发酵过程将易被高温降解的水溶性糖转化为耐温性较强的乳酸及副产物乙酸，这些酸可以被反刍动物转化利用，增加了原料的能量利用率。本章在饲料生产方向为转化利用水溶性碳水化合物提出了重要的工艺选项。

第 5 章 木质纤维素生物质中 B 族维生素组分对 L-乳酸发酵的促进

5.1 引言

农作物秸秆作为一种可再生的农业废弃物,被广泛的应用于生物能源及生物基化学品的生产研究^[24]。生物炼制糖平台的秸秆加工技术主要包括以下几个环节:预处理、脱毒、水解糖化及发酵^[3-6, 24],而相应的研究重点往往放在几个环节的技术突破上:(1)对于预处理环节,不管采用何种预处理技术,其最终目的都是最大可能的增加纤维素的可接近性,提高后续酶水解得率,在此基础上提高预处理环节纤维素及半纤维素及其相应糖的回收率,并减少抑制物的生成。而对于工程性研究,往往比较不同预处理方式的能耗、水耗与技术经济可行性^[3-6, 24, 26, 27, 70]。(2)对于脱毒环节,研究人员一方面关注脱毒方法,尽可能的移除预处理后物料中的抑制物^[45-59, 76-81];另一方面对菌株进行代谢工程改造,提高发酵菌株的抑制物耐受性^[66]。(3)对于糖化环节,主要是筛选高效生产纤维素酶的菌株,采用基因工程、蛋白工程等手段降低纤维素酶的生产成本^[160];另一方面在工程角度,设计相应的糖化反应器以提高糖化固含量,获得较高的糖浓度^[69]。(4)对于发酵环节,主要是对发酵菌株进行改造,使其能够共发酵葡萄糖及其他半纤维素水解得到的糖^[62, 63]。

上面提到的四个环节的技术攻关,重点均在于突破木质纤维素生物质在生物炼制糖平台加工环节中的诸多劣势,以期获得与淀粉生物质原料相似的发酵效果。而迄今为止很少有研究关注过木质纤维素生物质中的微量组分(如维生素及微营养)在生物炼制发酵过程中产生的优势,这是因为在绝大部分生物炼制加工工艺中,这些水溶性组分往往被大量的游离水从木质纤维素生物质中移除。以传统的稀酸预处理为例,其固含量往往为 5%-20% (w/w),预处理后的物料固液分离后,维生素往往从木质纤维素生物质中进入预处理液^[26-28];而在稀碱预处理、离子液体预处理及有机溶剂预处理后,脱毒过程产生的大量废水会移除这些水溶性维生素^[26, 27, 45, 47]。

在本实验室自主开发的干法生物炼制技术中,不会产生预处理液及脱毒废水,因此制备的秸秆水解液中含有丰富的 B 族维生素组分^[19]。本课题组的 Wen 等人发现,干法生物炼制技术生产的玉米秸秆水解液中存在的大量生物素抑制了谷氨酸的分泌^[19],而目前还没有对这些维生素组分对于发酵过程的促进及其他利用方式进行研究,本章与第六章将对秸秆中维生素 B 的发酵促进应用及提取利用展开研究。

B 族维生素是在植株细胞生长代谢中所合成的,是植物生理代谢必须的组分^[161]。在秸秆晾晒及收获后,大量的 B 族维生素组分可以得到保留,从而进入生物炼制加工环节。在无水洗除尘、无预处理液体流出、无脱毒废液流出的加工工艺下(如本课题组的干法生物炼制技术),一部分 B 族维生素组分在预处理过程被高温降解,另一部分未被降解的 B 族维生素组分则完全保留在水解液中。本章的研究思路是充分利用玉米秸秆水解液中保留的 B 族维生素组分,使其促进生物基化学品的发酵过程,进而降低昂贵的外

源维生素的添加。

本章选用了 L-乳酸发酵过程展开研究, L-乳酸是生物可降解材料聚乳酸 (PLA) 的单体^[141, 142]。一般的乳酸发酵过程对于营养的需求量比较大, 对于 B 族维生素组分的需求量也很大^[62, 143, 162], 这是因为大部分乳酸菌是许多维生素及氨基酸的营养缺陷型菌株^[162-167], 因此乳酸发酵过程往往需要添加含有酵母粉的 MRS 培养基。本实验希望充分利用玉米秸秆水解液中保留的 B 族维生素组分, 减少外源维生素的添加, 从而降低 L-乳酸的生产成本。菌株选择可以同步利用木糖的工程菌 *Pediococcus acidilactici* ZY271, 首先在合成培养基中探究其生长及发酵过程对于 B 族维生素组分的需求; 接着在玉米秸秆水解液中探究其中含有的维生素是否对 L-乳酸发酵有一定的促进; 最后对水解液中缺乏的维生素进行补加, 以期获得较高的 L-乳酸生产速率及发酵得率。

5.2 材料与方法

5.2.1 木质纤维素原料与酶制剂

玉米秸秆于 2016 年秋季收获于内蒙古通辽市, 原料处理及储存方法同 3.2.1。该批次原料的纤维素含量为 31.2%, 木聚糖含量为 22.3%, 木质素含量为 20.8%, 灰分含量为 6.2%, 测定方法同 3.2.1。纤维素酶 Cellic CTec 2 与糖化酶 GA-L NEW 来源及酶活同 2.2.1。

5.2.2 菌种与培养

乳酸发酵菌株 *Pediococcus acidilactici* ZY271 的来源、种子培养基及培养方法同 3.2.2。

5.2.3 干法生物炼制技术制备玉米秸秆水解液

原始玉米秸秆不经过水洗除尘, 直接进行干酸预处理及生物脱毒, 具体方法同 2.2.3, 过程没有任何游离水流出。之后在 5 L 生物反应器中对预处理并脱毒的玉米秸秆进行水解糖化, 固含量为 15% (w/w), 酶用量为 4 mg 蛋白/g 干物料, 50 °C, pH 4.8, 150 rpm 糖化 48 h。醪液 11167×g 离心 10 min, 上清液 115 °C 灭菌 20 min 后无菌过滤备用。

5.2.4 L-乳酸发酵

乳酸片球菌在合成培养基中的 B 族维生素组分需求测试采用如下合成培养基: 55 g/L 葡萄糖, 17 g/L 木糖, 2 g/L 柠檬酸氢二铵, 5 g/L 无水乙酸钠, 0.3 g/L MgSO₄, 2 g/L K₂HPO₄, 0.23 g/L MnSO₄, 而复合营养组分则通过复配氨基酸、核苷酸与维生素来实现, 其中维生素 B 的含量根据 Klotz 等人对酵母粉中 B 族维生素组分的分析进行复配^[162]。复合营养组分如下: (1) 氨基酸: 甘氨酸、丙氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、苏氨酸、丝氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、组氨酸、精氨酸、甲硫氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、半胱氨酸和脯氨酸分别添加 250 mg/L; (2) 核苷酸: 114.2 μg/L of 盐酸鸟嘌呤, 143.1 μg/L 硫酸腺嘌呤; (3) B 族维生素: 1070 μg/L 盐酸硫胺素 (维生素 B₁), 495 μg/L 核黄素 (维生素 B₂), 9840 μg/L 烟酸 (维生素 B₃), 2370 μg/L 泛酸钙 (维生素 B₅), 939 μg/L 盐酸吡哆醇 (维生素 B₆), 18.3 μg/L 生物素 (维生素 B₇), 585 μg/L 叶酸 (维生素 B₉) 和 58.4 μg/L 肌醇。将 *P. acidilactici* ZY271 种子

液接入含有 20 mL 上述合成培养基的 100 mL 摇瓶中,并在合成培养基中逐个减少 B 族维生素组分的添加,以探究 *P. acidilactici* ZY271 生长及发酵过程对于 B 族维生素组分的需求。

乳酸片球菌在玉米秸秆水解液中的 B 族维生素组分需求测试步骤如下:将 *P. acidilactici* ZY271 种子液接入含有 20 mL 玉米秸秆水解液的 100 mL 摇瓶中,水解液中补入 2 g/L 柠檬酸氢二铵,0.23 g/L MnSO_4 ,与上述氨基酸、核苷酸与 B 族维生素组分,并逐个减少加入的 B 族维生素组分。

补加特定 B 族维生素组分的发酵实验在装有 1 L 玉米秸秆水解液的 3 L 生物反应器中进行,水解液中补入 2 g/L 柠檬酸氢二铵、0.23 g/L MnSO_4 、上述氨基酸及核苷酸。B 族维生素组分的补入见 5.3.3 节。

上述三种发酵过程均在 42 °C, 150 rpm 进行,加入 36 g/L CaCO_3 用于中和生成的乳酸以维持 pH 稳定,此外,接种后加入 1% (v/v) 糖化酶防止菌体絮凝。试验均进行两组平行,取平均值作为最终数据。

5.2.5 组分测定及检测方法

玉米秸秆组分测定同 2.2.7,葡萄糖、木糖、乳酸等组分分析同 2.2.8。水解液中的 B 族维生素组分测定在上海市动植物检验检疫中心完成,硫胺素通过荧光法测得^[168, 169],核黄素和叶酸通过缺陷型菌株 *Lactobacillus casei* ATCC 7469 的生长量测得^[169-171],烟酸、泛酸及生物素通过缺陷型菌株 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 的生长量测得^[19, 172, 173],吡哆醇通过缺陷型菌株 *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 9080 的生长量测得^[169]。

5.3 结果与讨论

5.3.1 影响乳酸片球菌 L-乳酸生产的关键 B 族维生素组分

为了探究水解液中的 B 族维生素组分是否促进乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 的 L-乳酸发酵,是否可以进一步降低 L-乳酸发酵过程中外源维生素的添加,首先需要测试该菌株对于 B 族维生素组分的需求。因此,我们在自行配置的合成培养基中逐个减少维生素 B,以期找到对 L-乳酸生产影响最大的几种维生素。其中,合成培养基中的 B 族维生素组分添加量采用 Klotz 等人对 10 g/L 酵母粉中维生素 B 含量的测定值^[162]。

如图 5.1 所示,在发酵 72 h 后,完全添加 B 族维生素组分的条件下获得的 L-乳酸浓度为 54.6 g/L;而完全不添加任何 B 族维生素组分(仅依赖 10%接种量的种子液引入 B 族维生素)的条件下 L-乳酸浓度仅仅为 24.0 g/L。对于缺乏单个 B 族维生素组分的实验组而言,缺乏维生素 B₁、B₆、B₇、B₉及肌醇相较于全部添加 B 族维生素组分对于最终的 L-乳酸发酵指标并没有产生明显的影响(53.2 g/L、50.5 g/L、51.8 g/L、50.4 g/L、52.2 g/L),其原因或许在于该乳酸菌对于这些维生素的需求量较低,或者合成这些维生素的速率较快,添加量较少不会对 L-乳酸发酵产生过多的不利影响。而在缺乏维生素 B₂、B₃、B₅的实验组中,乳酸发酵速率及乳酸终浓度明显降低,最终浓度仅仅为 40.3 g/L,

43.2 g/L 与 36.1 g/L, 推测该菌株或许是这三种维生素的营养缺陷型菌株, 或者该菌株合成这些维生素的速率较慢而生长及发酵过程需求量较大。本实验充分表明维生素 B₂、B₃与 B₅是影响 L-乳酸生产的重要 B 族维生素组分, 其缺乏会严重抑制乳酸生产速率及得率。

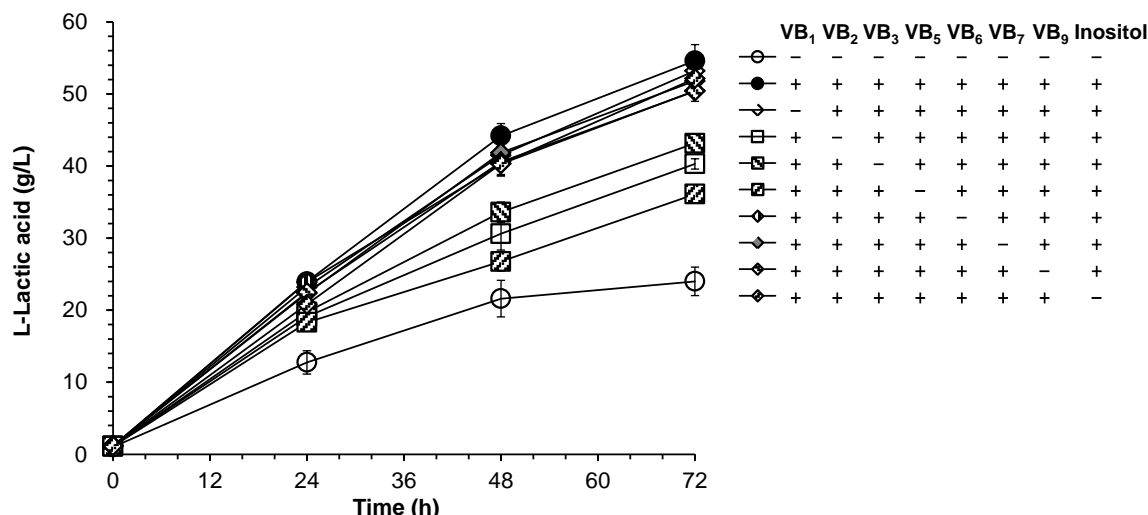


图 5.1 单一维生素 B 缺失对合成培养基中 L-乳酸发酵的影响

Fig. 5.1 Effect of single vitamin B components deficiency on *P. acidilactici* ZY271 in synthetic medium

该现象与许多先前的研究结果类似, 维生素 B₂、B₃、B₅在许多乳酸菌(如乳酸片球菌、乳酸杆菌、芽孢杆菌)的乳酸发酵过程中发挥着重要的作用。维生素 B₅是乙酰辅酶 A (CoA) 及酰基载体蛋白 (ACP) 的组成部分, 是蛋白合成和脂肪酸合成所必须的维生素^[174]; 而维生素 B₂与 B₃分别是辅酶 FAD 及 NAD 的前体物质, 其中, NADH 是乳酸脱氢酶的辅酶, 直接影响乳酸的生成^[175]。

5.3.2 玉米秸秆水解液中的 B 族维生素组分对 L-乳酸生产的促进

接着我们将上述在合成培养基中设计的实验方法应用至玉米秸秆水解液中, 比较玉米秸秆水解液中与合成培养基中 L-乳酸发酵的差异, 其中水解液中的葡萄糖及木糖浓度与合成培养基中一致。如图 5.2, 在不添加任何 B 族维生素组分的水解液中, L-乳酸浓度在发酵 48 h 后即可达到 51.7 g/L, 该乳酸浓度远高于同等条件下合成培养基发酵 72 h 的乳酸浓度 (24.0 g/L), 该现象说明玉米秸秆水解液中丰富的 B 族维生素组分可以有效的促进 L-乳酸发酵。而在完全添加所有 B 族维生素组分的水解液中, 乳酸浓度在 24 h 即可达到最高, 生产速率远高于合成培养基中同等条件下的乳酸发酵过程。该现象意味着水解液中或许存在某些除氨基酸、核苷酸、盐离子及 B 族维生素外其他可以有效促进 L-乳酸发酵的营养组分, 未来在生物炼制糖平台研究中, 需要继续挖掘这些木质纤维素生物质中含有的可以促进发酵的营养物质。

而对于水解液中缺失单个 B 族维生素组分的实验组而言, 由于维生素 B₁、B₆、B₇、B₉及肌醇的缺乏对于乳酸发酵的影响较小, 在水解液中不加入这些维生素也没有明显降低乳酸生产速率及终浓度。而若在水解液中不添加关键维生素 B₂、B₃与 B₅, 产生的消极影响也没有在合成培养基中明显: 不添加维生素 B₂相比于完全添加 B 族维生素组分

没有对乳酸发酵产生明显的不利效果 (56.2 g/L vs. 57.0 g/L); 而缺乏维生素 B₃ 仅导致发酵前期生产速率略微下降; 缺乏维生素 B₅ 会导致发酵过程生产速率明显下降, 且乳酸终浓度有所下降 (53.7 g/L)。

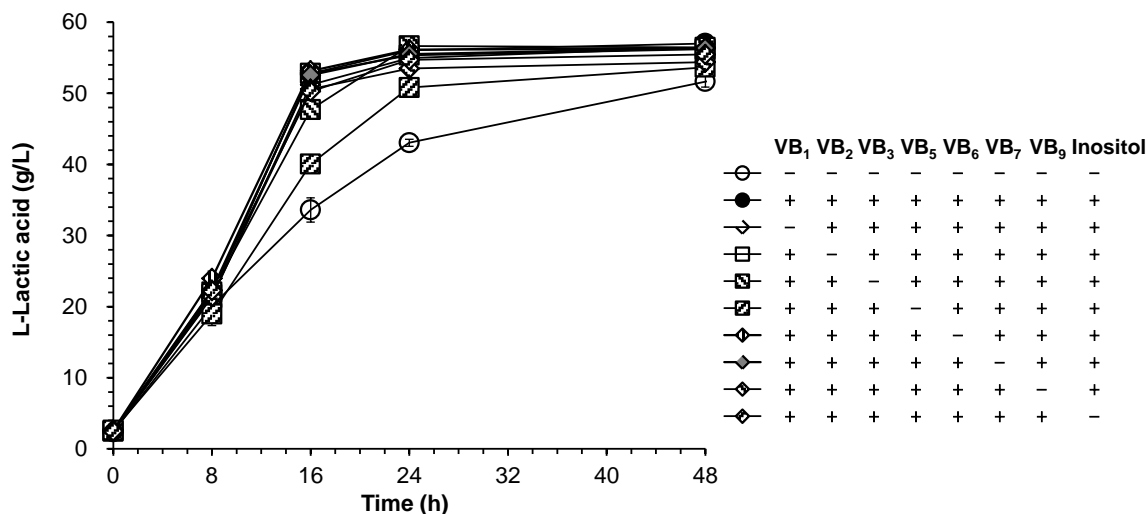


图 5.2 单一维生素 B 缺失对玉米秸秆水解液中 L-乳酸发酵的影响

Fig. 5.2 Effect of single vitamin B components deficiency on *P. acidilactici* ZY271 in corn stover hydrolysate

我们进一步测试了玉米秸秆水解液中的 B 族维生素组分的含量(表 5.2), 结果发现, 水解液中核黄素 (B₂) 的含量远高于合成培养基中模拟 10 g/L 酵母粉所提供的量, 因此图 5.2 中核黄素的缺失对于乳酸发酵没有产生不利影响。水解液中烟酸 (B₃) 含量 (738 μg/L) 约为合成培养基 (9840 μg/L) 的十三分之一, 但也能供给乳酸发酵的部分需求, 仅生产速率略低于完全补加 B 族维生素组分的组。然而, 水解液中泛酸 (B₅) 含量极低, 仅为 30 μg/L, 远远低于合成培养基 (2170 μg/L), 因此不能满足乳酸发酵的需求, 不添加泛酸的实验组乳酸生产速率明显低于完全补加维生素 B 的组, 因此在高效纤维素乳酸发酵的过程中, 仍然需要外源补加泛酸。特别的是, 水解液中生物素 (B₇) 的含量也远远高于合成培养基, 尽管该菌株的乳酸发酵过程对生物素的需求量不大, 但玉米秸秆水解液的这一优势或许会在未来其他生物基化学品发酵过程体现出来, 减少生物素的外源添加需求。

表 5.1 合成培养基与玉米秸秆水解液中的 B 族维生素组分含量比较

Table 5.1 Comparison of vitamin B content in synthetic medium and corn stover hydrolysate

Components	Control ($\mu\text{g/L}$)	Corn stover hydrolysate ($\mu\text{g/L}$)
Thiamine (VB_1)	954	265
Riboflavin (VB_2)	495	1,420
Niacin (VB_3)	9,840	738
Pantothenate (VB_5)	2,170	30
Pyridoxine (VB_6)	772	63
Biotin (VB_7)	18	59
Folic acid (VB_9)	583	4

Control, 对照组, 常用的简化的 MRS 培养基含有 10 g/L 酵母粉, 而酵母粉的 B 族维生素组分含量参考 Klotz 等人的测定^[162]。

5.3.3 通过补加特定种类的 B 族维生素组分促进 L-乳酸发酵

上一节的实验结果指出, 玉米秸秆水解液中丰富的核黄素 (B_2) 完全弥补了乳酸发酵的需求, 而泛酸 (B_5) 及烟酸 (B_3) 则不能完全满足高效乳酸发酵的需求, 与完全补加 B 族维生素组分的条件相比乳酸发酵速率略慢; 而该菌株的乳酸发酵过程对于其他几种 B 族维生素组分 (B_1 、 B_6 、 B_7 、 B_9 及肌醇) 需求量也不高, 因此我们尝试向玉米秸秆水解液中补加 2140 $\mu\text{g/L}$ 泛酸 (B_5) 及 9102 $\mu\text{g/L}$ 烟酸 (B_3), 探究是否可以达到与完全补加 B 族维生素组分的条件获得一致的乳酸得率及生产速率。该实验在 3 L 发酵罐中进行, 放大实验体系有利于获得更为准确的实验结果。

如图 5.3, 在 48 h 发酵结束后, 不补加任何维生素 B 的空白对照组乳酸浓度达到 51.9 g/L, 低于补加所有 B 族维生素组分的组 (60.0 g/L)。而在空白对照组的基础上, 单独补加泛酸可以显著提高乳酸生产速率和最终浓度, 终浓度达到 58.2 g/L; 单独补加烟酸的终浓度则达到 56.4 g/L; 进一步补加这两种维生素, 乳酸生产速率和最终浓度与补加所有 B 族维生素组分基本一致。实验结果说明, 充分利用玉米秸秆水解液中现有的维生素, 仅向水解液中补加特定的 B 族维生素组分, 可以有效的提高 L-乳酸发酵效率, 降低发酵成本。未来可以在生物炼制糖平台中充分利用木质纤维素生物质含有的维生素, 降低外源维生素的添加成本, 在工业化过程以较低的成本实现生物基化学品的高效生产。

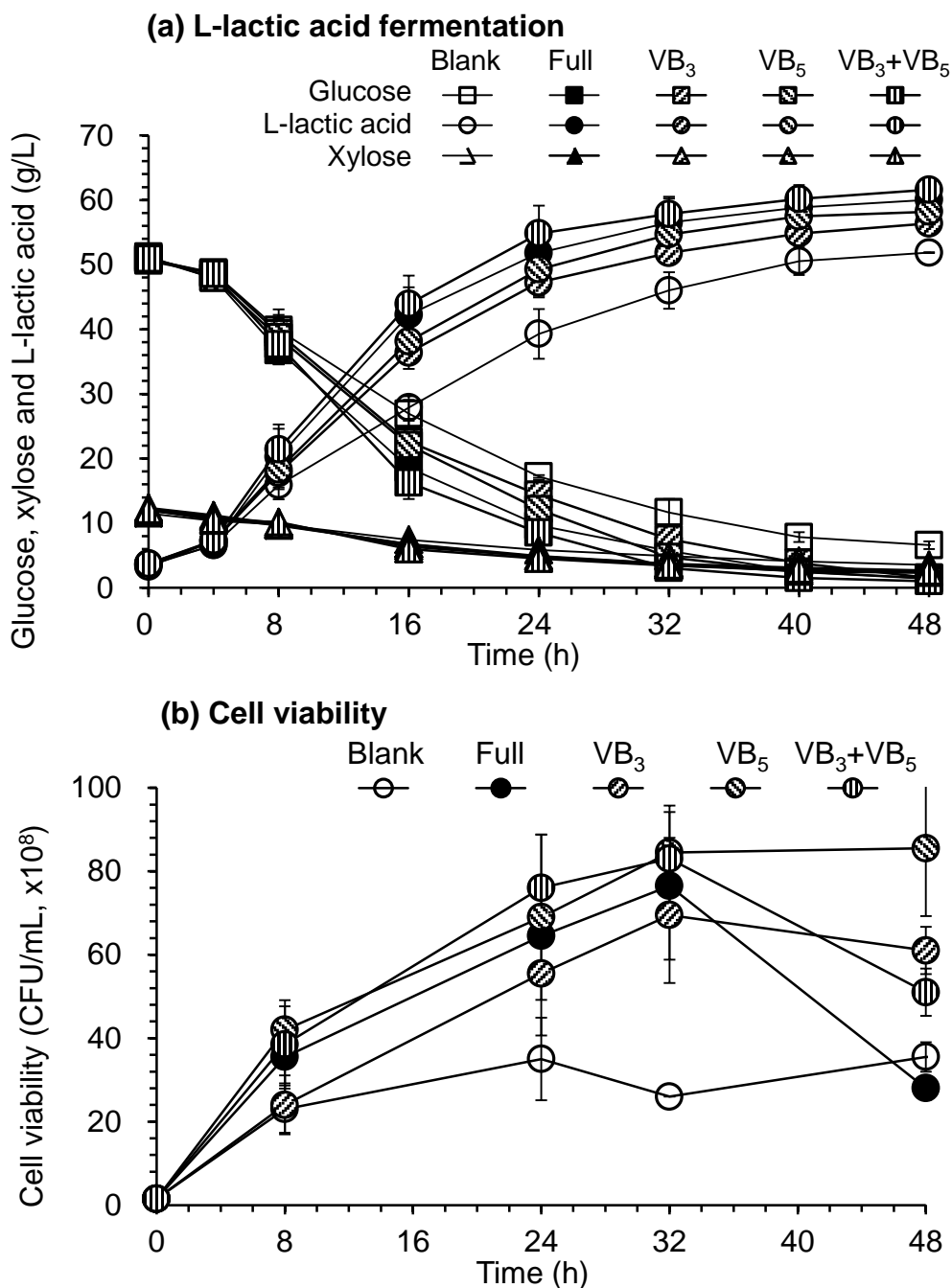


图 5.3 补加维生素 B 对玉米秸秆水解液中 L-乳酸发酵的影响

Fig. 5.3 Effect of vitamin B addition on lactic acid production using *P. acidilactici* ZY271 in corn stover hydrolysate

Blank, 完全不对玉米秸秆水解液补入外源的 B 族维生素组分; Full, 按 5.2.4 补入全部 B 族维生素组分; VB₃, 仅补入维生素 B₃; VB₅, 仅补入维生素 B₅; VB₃+VB₅, 补入维生素 B₃与 B₅。

5.4 本章小结

以玉米秸秆为代表的农业废弃物中含有丰富的 B 族维生素。在不同预处理过程中,部分 B 族维生素组分会在高温、酸、碱等较高强度的反应中降解,而部分 B 族维生素组分则得到保留。在无游离废水流出的生物炼制技术如氨纤维膨爆预处理 (AFEX) 技术及本课题组开发的干法生物炼制技术中,这些未被降解的维生素会全部保留在秸秆物料中,进而在糖化环节后溶于水解液中。充分利用这些维生素可以有效发挥木质纤维素生物质原料的优势,降低木质纤维素生物炼制发酵过程营养添加成本。

本章以需要大量营养添加的乳酸发酵为例,首先找到了乳酸片球菌在乳酸发酵过程中所需的几个关键维生素:核黄素 (B_2)、泛酸 (B_5) 及烟酸 (B_3);接着发现玉米秸秆水解液中所含的 B 族维生素组分可以有效促进乳酸发酵,使其获得比合成培养基中更快的生产速率;最后在秸秆水解液中补加了含量不足的泛酸 (B_5) 及烟酸 (B_3),获得了更快的乳酸生产速率及得率。

根据本章节的研究思路,未来可以充分利用木质纤维素生物质中的 B 族维生素组分,对发酵过程补加水解液中不足的 B 族维生素组分,减少过度补加水解液中富含的维生素,既可以获得高效的生物基化学品发酵效率,又降低了生产成本。而在未来的预处理过程中,不产生废水的预处理方式不仅有利于降低工业化废水处理成本,而且可以有效的保留维生素以促进发酵。进一步,未来可以探究不同预处理方式对维生素的降解与保留情况,甚至可以根据后续发酵菌株所需的维生素组分,选择合适的预处理方式来保留木质纤维素生物质中相应的维生素,将维生素在预处理过程的保留放在更高的层面展开研究,而不仅仅考虑预处理后的纤维素水解及抑制物生成,这或许是未来木质纤维素生物炼制过程中所需要考虑的重要问题。

本章还推测了水解液中或许含有其他促进乳酸发酵的微营养物质 (促进因子),未来我们需要进一步挖掘这些促进因子,找到木质纤维素生物质原料中除 B 族维生素之外的促进发酵的因素。

第 6 章 木质纤维素生物质中生物素的微生物提取及其发酵应用

6.1 引言

本课题组先前的研究发现玉米秸秆生物质中具备大量的生物素，这些生物素可以在干法生物炼制过程基本完全保留，并对玉米秸秆水解液中的谷氨酸发酵产生抑制作用^[19]。第五章我们也同样发现了玉米秸秆水解液中的生物素含量高于 10 g/L 酵母粉添加引入的生物素的量，但在上一章的乳酸发酵过程中，乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271 对于生物素的需求不大，高浓度的生物素对于发酵也没有产生明显的促进作用。根据查阅文献及本实验室谷氨酸发酵的经验，我们了解到酵母菌^[176, 177]、植物乳杆菌^[178]及谷氨酸棒杆菌^[179]等生物素缺陷型菌株具备从外界吸收生物素的特性。根据这一特点，我们希望能够将秸秆水解液中大量的生物素富集提取出来，制成富含生物素的细胞提取物产品。

生物素（维生素 B₇）是一种常见的羧化酶辅酶，被广泛的添加到不同生物基化学品的发酵过程中，促进相应发酵过程的生产速率及得率，诸如谷氨酸发酵^[19, 180, 181]，赖氨酸发酵^[182, 183]，精氨酸发酵^[184]，琥珀酸发酵^[185]，乙醇发酵^[186, 187]及乳酸发酵^[188]等。生物素可以分为化学合成的生物素及天然生物素两种^[189]。化学合成的生物素是目前纯生物素产品的主要来源，工业化成本相对较低，但过程会产生生物素的其他手性异构体，并且合成步骤繁琐，且会多次使用有毒的溶剂及中间体^[190, 191]。天然生物素的最终来源一方面是植物合成，另一方面是微生物合成。因此，也有研究人员利用可以合成生物素的微生物利用中间体生物转化生产生物素，然后再进行纯化，但这样的工艺成本过于昂贵^[189, 192, 193]；而生物素营养缺陷型菌株（例如酿酒酵母）以及动物肝脏或卵中含有的生物素则是从外界摄取富集而来的^[189]，因此另一种方法是使用色谱柱法从较高生物素含量的动物肝脏、鸡蛋或酵母中直接纯化生物素，该工艺的成本同样过于昂贵^[194]。综合以上原因，目前工业化发酵过程往往添加富含生物素的营养添加剂^[19, 183]，例如糖蜜、玉米浆等，这些产品中的生物素一般来源于植物合成；而实验室规模的发酵往往会使用酵母粉，其中的生物素为酵母从外界环境中摄取富集而来，该生物素的最终来源依旧为植物合成^[194]。

玉米秸秆、麦秆、稻草等农业木质纤维素废弃物中具有远高于相应农作物谷物的生物素含量^[19]，这些生物素在植物细胞中主要分为结合生物素和游离生物素两种。结合生物素主要作为羧化酶的辅酶，在植物细胞的脂肪酸合成、氨基酸代谢及糖异生过程发挥重要作用^[194, 195]；而游离生物素存在于细胞质中，作为生物素的储备存在^[196]。由于这些代谢活动在植物的叶绿体中比较活跃，因此含有较多叶绿体的玉米叶比玉米秆中的生物素含量高^[19, 197]。

本章根据木质纤维素生物质的这一特性，首先比较了玉米叶与玉米秆的生物素含量，及其在干法生物炼制后的保留，确定了以玉米叶为原料制备水解液。接着又选择了实验室常用的几株生物素缺陷型菌株（谷氨酸棒杆菌、酿酒酵母及油脂酵母）对玉米叶水解

液中的生物素进行富集提取。之后以分子生物学手段将生物素转运基因 *bioYMN* 进行过表达, 进一步提高谷氨酸棒杆菌的生物素提取能力。最后将提取得到的高生物素细胞水解制备提取物, 并将该提取物应用于谷氨酸发酵过程。本章首次提出了从木质纤维素生物质中使用微生物提取生物素的方法, 对木质纤维素生物质的利用开辟了一条全新的道路。

6.2 材料与方法

6.2.1 木质纤维素原料与酶制剂

玉米秸秆于 2016 年秋季使用镰刀收获于山东省潍坊市, 而没有使用联合收割机。收获的玉米秸秆晾干后, 首先将玉米叶和玉米秆分成两部分, 分别使用锤式粉碎机粉碎, 粉碎机筛网的筛孔直径约为 10 mm, 粉碎后的玉米秆与玉米叶分别密封装入塑料收纳袋, 放置在室内待用。该批次玉米叶的纤维素含量为 26.9%、木聚糖含量为 20.0%、木质素含量为 17.9%、灰分含量为 12.4%。上述的物料组分含量根据 NREL 的方法 LAP-002 及 LAP-005 测得^[128, 129]。纤维素酶 Cellic CTec 2 来源及酶活同 2.2.1。

6.2.2 菌种、培养基与种子液制备

如表 6.1, 大肠杆菌 *E. coli* DH 5 α 用于质粒构建, 37 °C 条件下培养于 Luria-Bertani (LB) 培养基, 其含有 10.0 g/L 蛋白胨, 10.0 g/L NaCl, 5.0 g/L 酵母粉, pH 7。

Amorphotheca resinae ZN1 用于预处理后玉米叶的脱毒, 以制备便于后续微生物生长的玉米叶水解液, 其来源及培养方法见 2.2.2。

Saccharomyces cerevisiae DQ1^[133]与 *Saccharomyces cerevisiae* XH7^[63, 82]两株酿酒酵母均是生物素缺陷型菌株, 用于水解液中生物素的提取, 两者的来源、培养基及培养方法见 2.2.2。

油脂酵母 *Trichosporon cutaneum* ACCC 20271^[92]也是生物素缺陷型菌株, 保存于中国农业菌种保藏中心 (Agricultural Culture Collection of China, ACCC, <http://www.accc.org.cn/>), 培养基为 YPD 培养基 (20 g/L 葡萄糖, 20 g/L 蛋白胨, 10 g/L 酵母粉), 从 -80 °C 超低温冰箱取出冻存管后接入装有 20 mL YPD 培养基的 100 mL 摇瓶中 30 °C, 200 rpm 培养 12 h, 该培养液作为种子液进行后续的生物素提取。

谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* S9114 保藏于中国工业微生物保藏中心 (China Center of Industrial Culture Collection, CICC, <http://www.china-cicc.org/>), 保藏号为 20935。其培养方法如下: 首先从 -80 °C 冰箱取出 *C. glutamicum* S9114 菌株的冻存管, 涂布于 LB 平板上 (10.0 g/L 蛋白胨, 5.0 g/L NaCl, 5.0 g/L 酵母粉, 17 g/L 琼脂粉), 30 °C 培养 24-36 h; 接着挑取单菌落转入含有 30 mL 预种子培养基 (25 g/L 葡萄糖, 25 g/L 玉米浆 (CSL), 2.5 g/L 尿素, 1.5 g/L KH₂PO₄, 0.6 g/L MgSO₄, 2.0 mg/L MnSO₄, 2.0 mg/L FeSO₄) 的 250 mL 摇瓶中 30 °C, 200 rpm 培养 12 h; 将 1.5 mL 培养液转接入含有 30 mL 种子培养基 (25 g/L 葡萄糖, 5 g/L 玉米浆 (CSL), 2.5 g/L 尿素, 1.5 g/L KH₂PO₄, 0.6 g/L MgSO₄, 2.0 mg/L MnSO₄, 2.0 mg/L FeSO₄) 的 250 mL 摇瓶中 30 °C, 200 rpm

培养 8 h, 该培养液作为种子液进行后续的生物素提取或用于谷氨酸发酵过程。而对于卡那霉素抗性菌株的筛选过程, 培养基中需加入 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素。

6.2.3 基因工程操作

质粒及引物见表 6.1, 基因簇 *bioYMN* 包括 *bioY*、*bioM* 与 *bioN* 基因, 分别编码生物素转运蛋白, ATP 结合酶及跨膜蛋白, 通过 PCR 将 *bioYMN* 基因簇从谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* S9114 基因组上扩增。质粒 pH36mob 的构建通过合成的强启动子 *H36*^[198] 代替启动子 *Trc* 而完成, 该步骤由上海捷瑞生物科技公司完成。表达质粒 pH36mob-*bioYMN* 的构建通过将 *bioYMN* 基因簇在 *EcoRI* 与 *XbaI* 位点插入质粒 pH36mob 得来, 并且根据 Ruan 等人^[199] 及 Schaefer 等人^[200] 的方法, 通过电转的方法将表达质粒 pH36mob-*bioYMN* 导入 *C. glutamicum* S9114 细胞中, 最终获得携带表达质粒的重组菌 *C. glutamicum* pH36mob-*bioYMN*。

整合型重组菌的构建首先敲除 *CGS9114_RS02700* 基因, 接着将表达框 *H36-bioYMN* 整合到 *C. glutamicum* S9114 基因组中。步骤如下: *CGS9114_RS02700* 基因的上下游 1,000-bp 片段通过 PCR 扩增, 将扩增的 *H36-bioYMN* 片段与上面两个片段融合, 然后插入自杀质粒 pK18mobsacB 中, 使用上海汉恒无缝克隆试剂盒构建整合质粒 pK18mobsacB- Δ *CGS9114_RS02700::*(*H36-bioYMN*)。根据 Wang 等人的方法^[201], 该整合质粒通过电转导入 *C. glutamicum* S9114, 并且通过同源重组的方法以 *H36-bioYMN* 片段代替 *CGS9114_RS02700* 片段。最终通过 PCR 验证并进行测序, 成功获得了整合型重组菌株 *C. glutamicum* Δ *CGS9114_RS02700::*(*H36-bioYMN*)。通过在玉米叶水解液中的长期驯化 (每 12 h 进行转接, 接种量 10% (v/v), pH 7.0, 培养温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 转速 200 rpm), 获得了能在水解液中稳定生长的整合型菌株。上述基因工程具体操作由本实验室李莉同学完成。

表 6.1 菌株、质粒及引物

Table 6.1 Strains, plasmids and primers

Strains	Characteristics	Sources
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Host for plasmid construction	Lab stock
<i>Amorphotheca resinae</i> ZN1	Biodetoxification fungus isolated in our lab	[76]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DQ1	Biotin-deficient	[133]
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> XH7	Biotin-deficient	[63]
<i>Trichosporon cutaneum</i> ACCC 20271	Biotin-deficient	[92]
<i>Corynebacterium glutamicum</i> S9114	Biotin-deficient	Purchased from SIIM
<i>C. glutamicum</i> pH36mob- <i>bioYMN</i>	<i>C. glutamicum</i> S9114 harboring <i>bioYMN</i> expression plasmid pH36mob- <i>bioYMN</i>	This study
<i>C. glutamicum</i> Δ CGS9114_RS02700::(<i>H36-bioYMN</i>)	Integration of <i>H36-bioYMN</i> into CGS9114_RS02700 locus of <i>C. glutamicum</i> S9114 genome	This study
Plasmids	Characteristics	Sources
pTRCmob	Shuttle expression vector, <i>P_{trc}</i> promoter, Km ^R	[198]
pH36mob	Expression vector, <i>P_{h36}</i> promoter	This study
pH36mob- <i>bioYMN</i>	Expression vector containing <i>bioYMN</i> gene cluster	This study
pK18mobsacB	Mobilizable vector for integration, Km ^R , sacB	[201]
pK18mobsacB- Δ CGS9114_RS02700::(<i>H36-bioYMN</i>)	Plasmid for integration of the expression cassette <i>H36-bioYMN</i>	This study
Primers	Sequences (5'-3')	
<i>bioYMN</i> -F	<u>GAATTCTTGTGAACTGTTTCAGGTGTAT</u>	
<i>bioYMN</i> -R	<u>TCTAGATTAATCGCCGGCACCA</u>	
<i>H36-bioYMN</i> -F	<u>ATTTTTTCTCCCCGTCAACCACCATCAAACAGGA</u>	
<i>H36-bioYMN</i> -R	<u>CAACAACCTGAAAGGGCTACCGCTTCTGCGTTCTGATTTAATCTGTAT</u>	
CGS9114_RS02700-up-F	<u>ACAGCTATGACATGATTACGCGCCGAAAACCTGCTGTCTAT</u>	

CGS9114_RS02700-up-R

GGTGGTTGACGGGGAGAAAAATG

CGS9114_RS02700-down-F

GCAGAAGCGGTAGCCCTTTCAGTTGT

CGS9114_RS02700-down-R

TTGCATGCCTGCAGGTGGCGAAGCCGAGGAAGACA

单下划线指的是酶切位点，而双下划线指的是 over-lap PCR 的同源序列。Km^R指卡那霉素抗性。

6.2.4 干法生物炼制技术制备玉米叶水解液

原始玉米叶不经过水洗除尘，直接进行干酸预处理及生物脱毒，由于玉米叶中灰分含量较高，预处理所需的硫酸用量调整为 60 mg/g 干物料，具体方法同 2.2.3，过程没有任何游离水流出。15% (w/w) 固含量玉米叶水解液的制备方法同 5.2.3，制备的水解液中含有 38.1 g/L 葡萄糖，并且没有糠醛及 HMF 存在。

6.2.5 生物素的微生物提取

酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1、*S. cerevisiae* XH7 和皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* ACCC 20271 的种子液按照 10% (v/v) 的接种量接入装有 30 mL 水解液的 250 mL 摇瓶中，并加入 5 g/L (NH₄)₂SO₄ 补充氮源，分别在种子培养的温度和转速下进行生物素富集吸收测试。

谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* S9114 及其重组菌，种子液按照 10% (v/v) 的接种量接入装有 30 mL 水解液的 250 mL 摇瓶中，并加入 5 g/L (NH₄)₂SO₄ 补充氮源，5 M NaOH 调整 pH 至 7.0，在 30 °C，200 rpm 条件下进行生物素富集吸收测试，菌体培养过程中手动补加 20% (w/w) 尿素溶液以维持 pH。生物素提取试验进行两组平行，取平均值作为最终数据。

对于上述不同的生物素提取过程，取样后均将细胞悬浮液于 15,000×g 下离心 5 min，进行上清液与细胞的分离。菌体沉淀用于测定胞内生物素含量及细胞生长量，而上清液用于测定胞外生物素含量及残糖含量。生物素摄取量 (g/L) 定义为基于细胞干重的胞内生物素含量 (μg/g dry cell weight, DCW) 与培养液中干细胞浓度 (g/L) 的乘积；细胞生长量通过分光光度计在 600 nm 波长的吸光值 (OD₆₀₀) 获得，而干细胞浓度 (g/L) 通过 OD₆₀₀ 与 0.45 g/L (通过生长曲线中吸光值与干重关系测得) 的乘积获得；生物素提取率定义为生物素摄取量 (g/L) 与初始生物素浓度 (g/L) 的比值。

最终细胞提取物的制备过程在 3 L 生物反应器 (Biotech-3BG-4, Baoxing Co., China) 中进行，温度控制 30 °C，转速为 600 rpm，通气为 1.4 vvm。15% (w/w) 固体含量的玉米叶水解液装液量为 1 L，并加入 5 g/L (NH₄)₂SO₄ 补充氮源，种子液接种量为 10% (v/v)，生物素提取过程使用 20% (w/v) 的氨水溶液维持 pH 7.0。在特定时间将细胞培养液固液分离，获得的细胞加入 3% (w/w) 硫酸溶液调整细胞含量至 10% (w/w)，于 121 °C 酸水解 30 min。酸解悬浊液于 15,000×g 离心 5 min，收集上清液作为生物素提取物添加到需求生物素的发酵过程。

6.2.6 谷氨酸发酵

谷氨酸发酵根据 Wen 等人的方法^[19]。简要的说，谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* S9114 种子培养同 6.2.2，谷氨酸发酵在 3 L 生物反应器中进行，装液量为 1 L (120 g/L 葡萄糖，2.5 g/L 尿素，1.5 g/L KH₂PO₄，0.6 g/L MgSO₄，2.0 mg/L MnSO₄，2.0 mg/L FeSO₄ 及生物素提取物)。发酵接种量 10% (v/v)，温度 30 °C，通气量 1.4 vvm，发酵过程自动补加 20% (w/v) 的氨水溶液维持体系 pH 7.0，不断调节转速以调整溶氧 10%~40%。

6.2.7 组分测定及检测方法

玉米秸秆组分测定方法同 2.2.7；葡萄糖、糠醛、HMF 等含量测定同 2.2.8；谷氨酸通过 SBA-90D 生物传感分析仪测得；生物素含量通过微生物法测得，使用的菌株为生物素缺陷型菌株 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014^[19]。

6.3 结果与讨论

6.3.1 原料选择及不同菌株的生物素摄取能力测试

为了选择较高生物素含量的生物质原料进行水解液制备及后续生物素提取，首先测定了玉米秸秆不同部位（玉米秆、玉米叶）的生物素含量，同时测试了生物素在干法生物炼制过程中的保留情况。由图 6.1 可知，玉米叶的生物素含量为 $1217.4 \pm 31.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 干物料，是玉米秆（ $143.9 \pm 11.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ 干物料）的 8.5 倍，也是未分离的玉米秸秆（ $371.6 \pm 27.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 干物料）的 3 倍，更是用于工业发酵的玉米（ $29 \mu\text{g}/\text{kg}$ 干物料）的 42 倍，因此后续选择玉米叶作为生物素富集提取的原料。

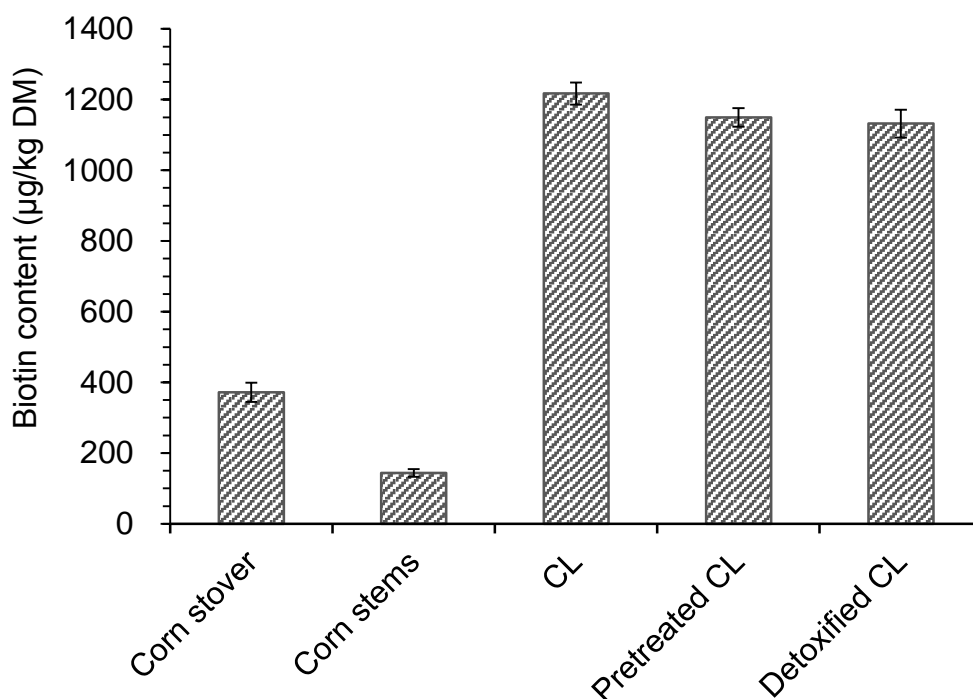


图 6.1 玉米秸秆不同部分的生物素含量及其在干法生物炼制中的保留

Fig. 6.1 Biotin content in different positions of corn stover and its preservation in dry acid pretreatment and biodetoxification (DryPB) technology

CL, 玉米叶。

如图 6.1，在干法生物炼制过程中，预处理前、预处理后及生物脱毒后的生物素含量分别为 $1217.4 \pm 31.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ， $1149.5 \pm 26.2 \mu\text{g}/\text{kg}$ ， $1132.0 \pm 39.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 干物料，说明生物素基本可以在干法生物炼制后得到保留；另一方面，干酸预处理可以帮助玉米叶中约占 30% 的结合态生物素释放，糖化后进入上清液中。在最终酶解糖化制备的 15% (w/w) 固体

含量的玉米叶水解液中，生物素含量达到 179.2 $\mu\text{g/L}$ ，相当于 1015.5 $\mu\text{g/kg}$ 的生物素从预处理并脱毒的固态物料中释放，得率为 90% 左右。上述结果表明，干法生物炼制技术可以有效的将生物素从木质纤维素生物质中保留并提取至水解液中。

接下来以玉米叶水解液为底物，使用不同的生物素缺陷型菌株进行生物素富集提取，比较不同菌株在水解液中的生物素摄取能力。由图 6.2 可知，在接种后 1 h 的较低细胞量情况下，*C. glutamicum* S9114 的生物素摄取量达到了 31.0 $\mu\text{g/L}$ ，高于 *S. cerevisiae* DQ1 (6.1 $\mu\text{g/L}$)，*S. cerevisiae* XH7 (7.2 $\mu\text{g/L}$)，及 *T. cutaneum* ACCC 20271 (6.9 $\mu\text{g/L}$)。在培养 24 h 后，*C. glutamicum* S9114 的生物素摄取量达到了 88.1 $\mu\text{g/L}$ ，此时的生物素提取得率为 49.2%，显著高于 *S. cerevisiae* DQ1 (21.4 $\mu\text{g/L}$ ，11.9%)，*S. cerevisiae* XH7 (14.6 $\mu\text{g/L}$ ，8.1%) 与 *T. cutaneum* ACCC 20271 (16.1 $\mu\text{g/L}$ ，9.0%)。上述结果表明，谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* 适于在玉米叶水解液中提取生物素。

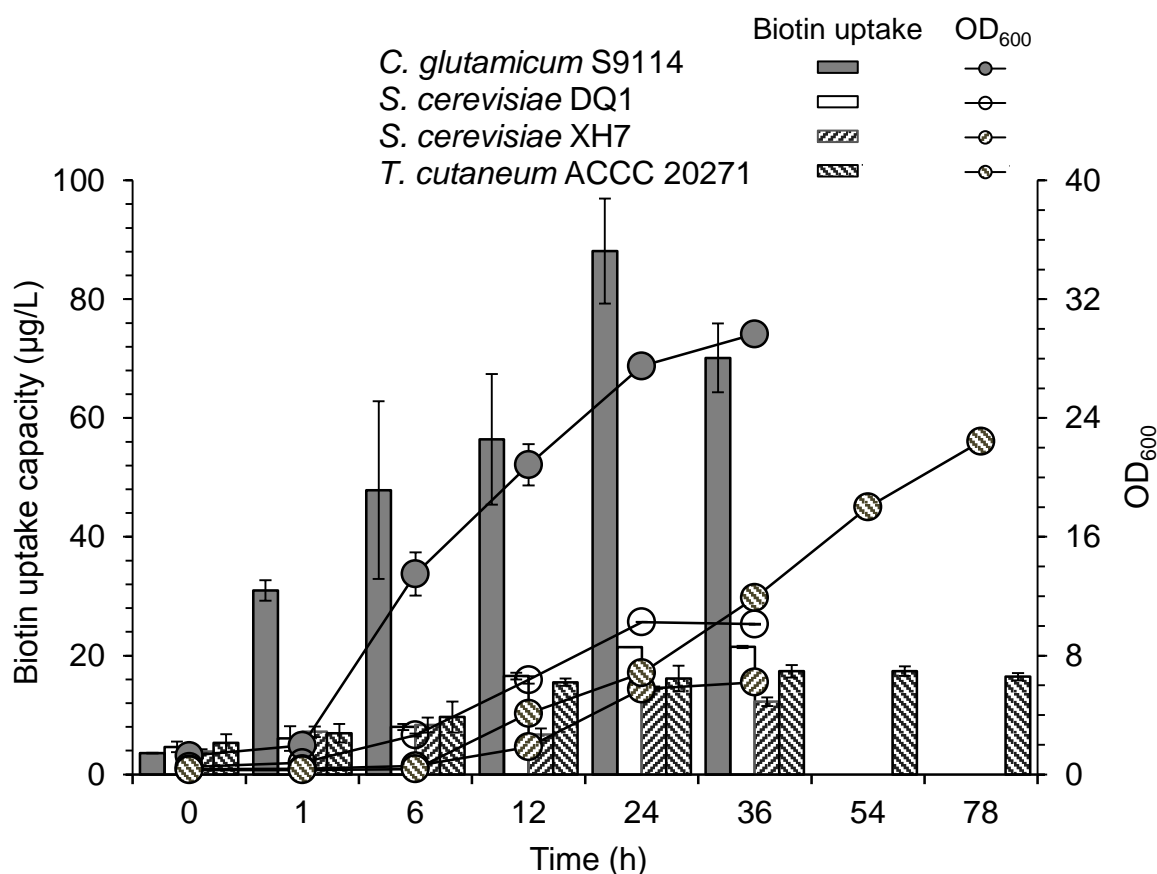


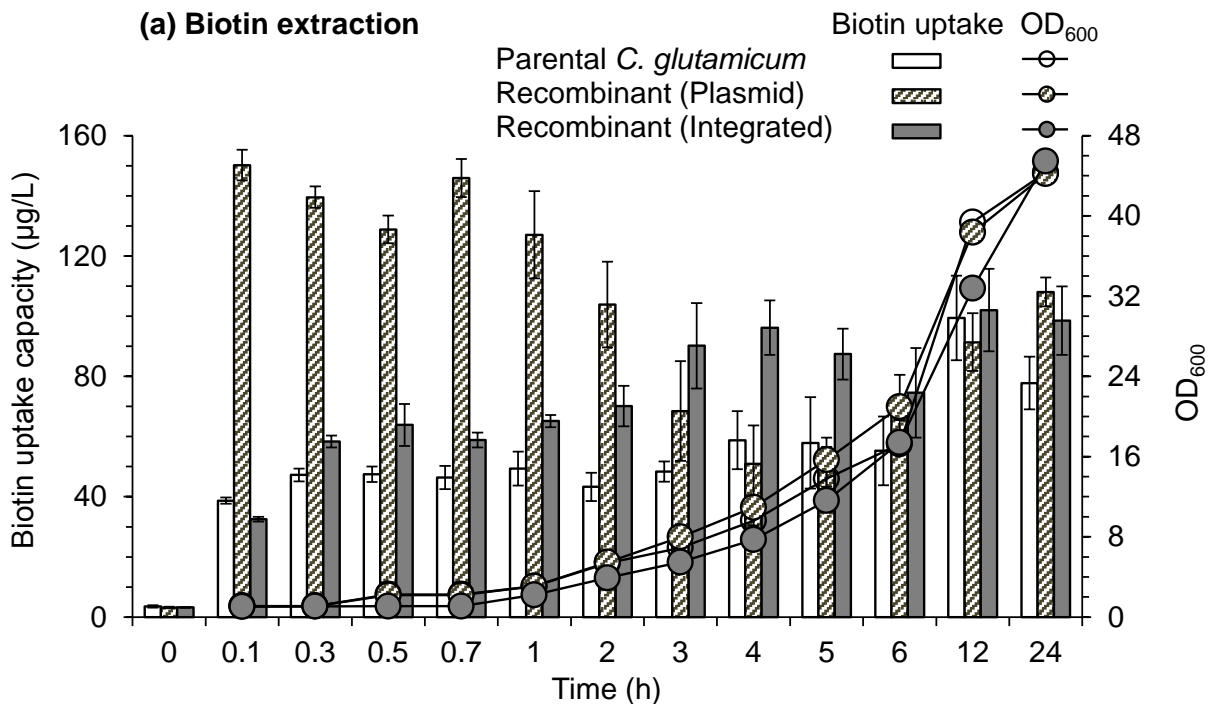
图 6.2 不同生物素缺陷型菌株在水解液中的生物素摄取能力比较

Fig. 6.2 Microbial extraction of biotin from corn leaves hydrolysate by biotin auxotrophic strains
生物素摄取量 ($\mu\text{g/L}$) 是胞内生物素浓度 ($\mu\text{g/g}$ 干细胞) 与干细胞浓度 (g/L) 的乘积。

6.3.2 在谷氨酸棒杆菌中过表达生物素转运基因提高生物素摄取能力

由于谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* 对于生物素的富集吸收主要通过 *bioYMN* 基因簇编码的生物素转运体蛋白来实现^[179, 202]，因此我们在 *C. glutamicum* 中过表达该基因以进一步提高其生物素富集提取能力。通过导入携带有表达框 *H36-bioYMN* 的质粒构建出重组菌 *C. glutamicum* pH36mob-*bioYMN*；而通过同源重组将表达框整合到谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* 基因组上构建出重组菌 *C. glutamicum* Δ CGS9114_RS02700::(*H36-bioYMN*)。

在生物反应器中对两株重组菌及原始菌的生物素摄取能力进行比较。如图 6.3a，携带表达质粒的重组菌在接种后 6 min 时的生物素摄取量即可达到 150.2 $\mu\text{g/L}$ ，提取率高达 83.8%，并且可以维持 2 h；之后部分胞内生物素逐渐释放至胞外，导致胞外生物素含量略有提高（图 6.3b）。而整合型重组菌的生物素摄取能力略高于原始菌株，但由于 *bioYMN* 基因拷贝数不如携带表达质粒的重组菌，其生物素摄取能力也不如携带表达质粒的重组菌。总之，使用携带表达质粒的重组菌 *C. glutamicum* pH36mob-*bioYMN*，可以获得最大的生物素提取率（83.8%）及最高的胞内生物素含量（303.8 mg/kg 细胞干重）（图 6.3c）。这一结果相对于原始玉米叶生物质（1.2 mg/kg 干物料）而言，生物素浓缩了 250 倍。根据先前对于生物素缺陷型菌株 *Saccharomyces cerevisiae*^[177] 及 *Lactobacillus plantarum*^[178] 的生物素胞内分布情况的研究报道进行推测，在收获的谷氨酸棒杆菌细胞中，大部分的生物素以游离态存在，只有少部分作为辅酶结合到酶上。



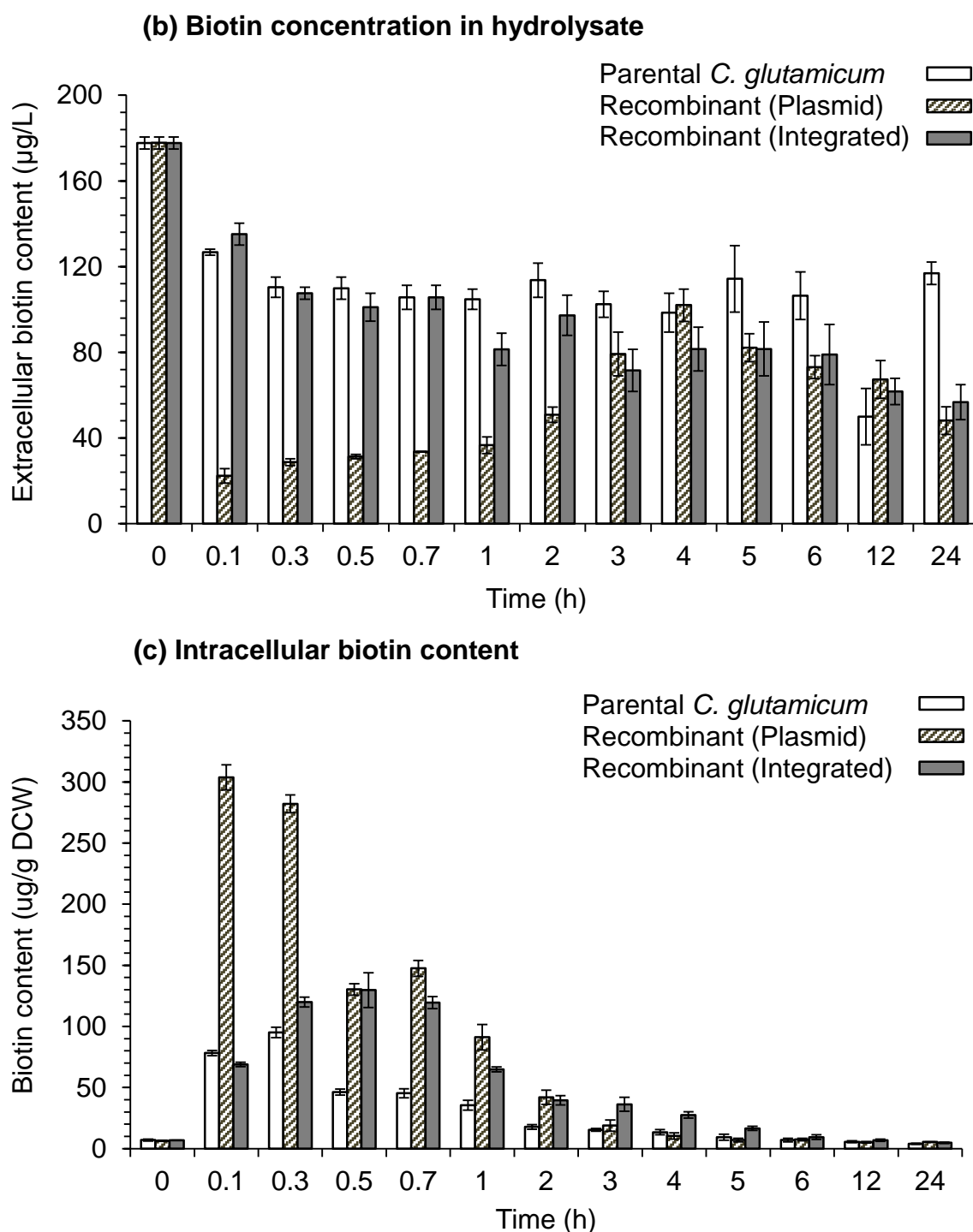


图 6.3 过表达生物素转运基因 *bioYMN* 对谷氨酸棒杆菌生物素提取的促进

Fig. 6.3 Overexpression of biotin transporter gene *bioYMN* in *C. glutamicum* facilitates biotin uptake from corn leaves hydrolysate

(a) 生物素摄取量及细胞生长量; (b) 胞外生物素浓度; (c) 胞内生物素浓度。Recombinant (Plasmid), 携带质粒的重组菌 *C. glutamicum* pH36mob-*bioYMN*; Recombinant (Integrated), 整合型重组菌 *C. glutamicum* Δ CGS9114_RS02700::(*H36-bioYMN*)。

总的来说, 谷氨酸棒杆菌细胞从玉米叶中富集提取得到的生物素含量 (303.8 mg/kg 细胞干重) 比常见的发酵营养添加剂高两个数量级, 如酵母粉 (~2 mg/kg)、糖蜜 (~1 mg/kg) 及玉米浆 (~0.75 mg/kg)。此外, 由于提取过程所需的时间极短 (6 min), 玉米叶水解液中的葡萄糖 (36 g/L) 几乎可以完全保留, 并用于其他发酵过程。

6.3.3 玉米叶中获得的生物素在实际发酵过程的应用

将收获的谷氨酸棒杆菌细胞进行酸解, 获得了高生物素含量的细胞提取物, 接下来我们有必要选择合适的发酵过程来验证从玉米叶中提取得到的生物素的实际应用价值。由于谷氨酸发酵过程对于生物素含量比较敏感, 低生物素含量抑制生物素缺陷型菌株 *C. glutamicum* S9114 菌体生长; 过高生物素含量抑制谷氨酸分泌, 导致谷氨酸产量很低; 只有生物素亚适量 (1~5 $\mu\text{g/L}$) 才有助于谷氨酸生产^[181]。因此, 选择工业微生物 *C. glutamicum* S9114 进行谷氨酸发酵来验证玉米叶中提取获得的生物素的有效性。

结果如图 6.4, 当提取物引入的生物素含量为 5 $\mu\text{g/L}$, 发酵体系内的生物素含量达到了 5.6 $\mu\text{g/L}$ (0.6 $\mu\text{g/L}$ 来自于种子液), 该条件下葡萄糖消耗及细胞生长很快, 但谷氨酸发酵被抑制, 仅为 6.9 g/L; 当提取物引入的生物素含量为 2.5 $\mu\text{g/L}$, 葡萄糖消耗及细胞生长减缓, 谷氨酸终浓度达到 35.8 g/L; 当提取物引入的生物素含量为 1.25 $\mu\text{g/L}$, 谷氨酸发酵浓度达到了最大值, 为 44.1 g/L; 当提取物引入的生物素含量为 0.0625 $\mu\text{g/L}$, 谷氨酸发酵浓度降低为 31.8 g/L, 并且发酵结束后有 27.6 g/L 残余葡萄糖存在; 如果不加入提取物, 发酵体系内的生物素含量仅为 0.6 $\mu\text{g/L}$, 细胞生长受到明显抑制, 而谷氨酸发酵浓度仅为 11.8 g/L, 发酵结束后有 73.2 g/L 残余葡萄糖存在。

进一步我们比较了添加细胞提取物与玉米浆及纯生物素时谷氨酸发酵的差异, 为了维持相同的生物素添加 (1.25 $\mu\text{g/L}$), 细胞提取物、玉米浆及纯生物素添加量分别为 4.11 mg/L、1.67 g/L 及 1.25 $\mu\text{g/L}$ 。如图 6.5, 三个场景下谷氨酸发酵浓度相似, 分别为 44.1 g/L, 46.3 g/L 及 42.1 g/L, 细胞生长情况也相似。上述结果表明, 采用谷氨酸棒杆菌从玉米叶中富集提取得到的生物素与玉米浆中的生物素类似, 可以有效的应用于谷氨酸发酵过程, 该提取物同样具备促进其他需求生物素的发酵过程的工业化应用潜力。

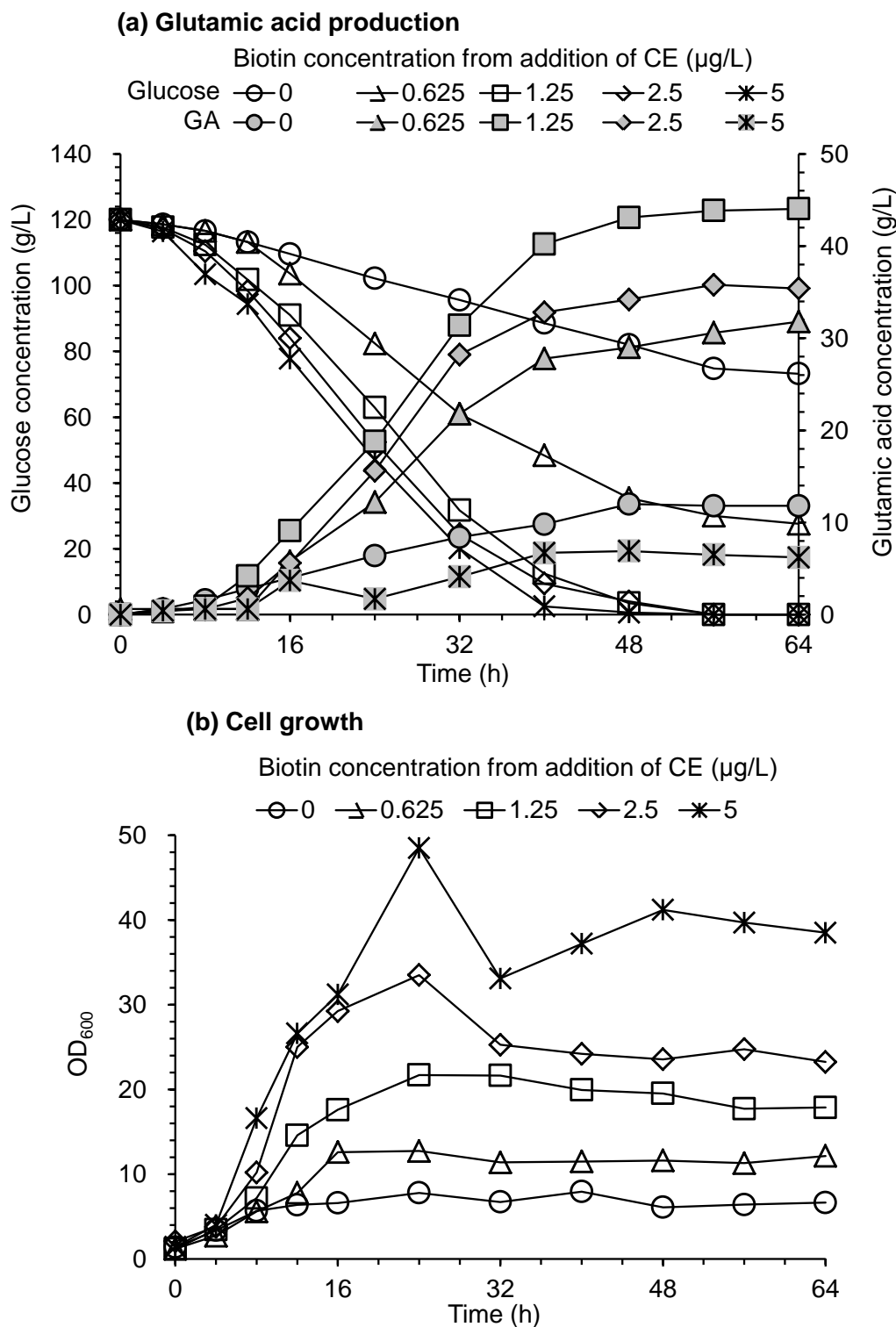


图 6.4 富含生物素的细胞提取物在谷氨酸发酵过程的应用

Fig. 6.4 Application of biotin-rich cell extract (CE) in glutamic acid (GA) production

(a) 谷氨酸发酵曲线; (b) 细胞生长曲线。将收集得到的谷氨酸棒杆菌细胞在硫酸酸解后的提取物加入到谷氨酸发酵过程, 提取物引入的生物素浓度为 0~5 $\mu\text{g/L}$, 而谷氨酸棒杆菌种子液引入的生物素浓度为 0.6 $\mu\text{g/L}$ 。

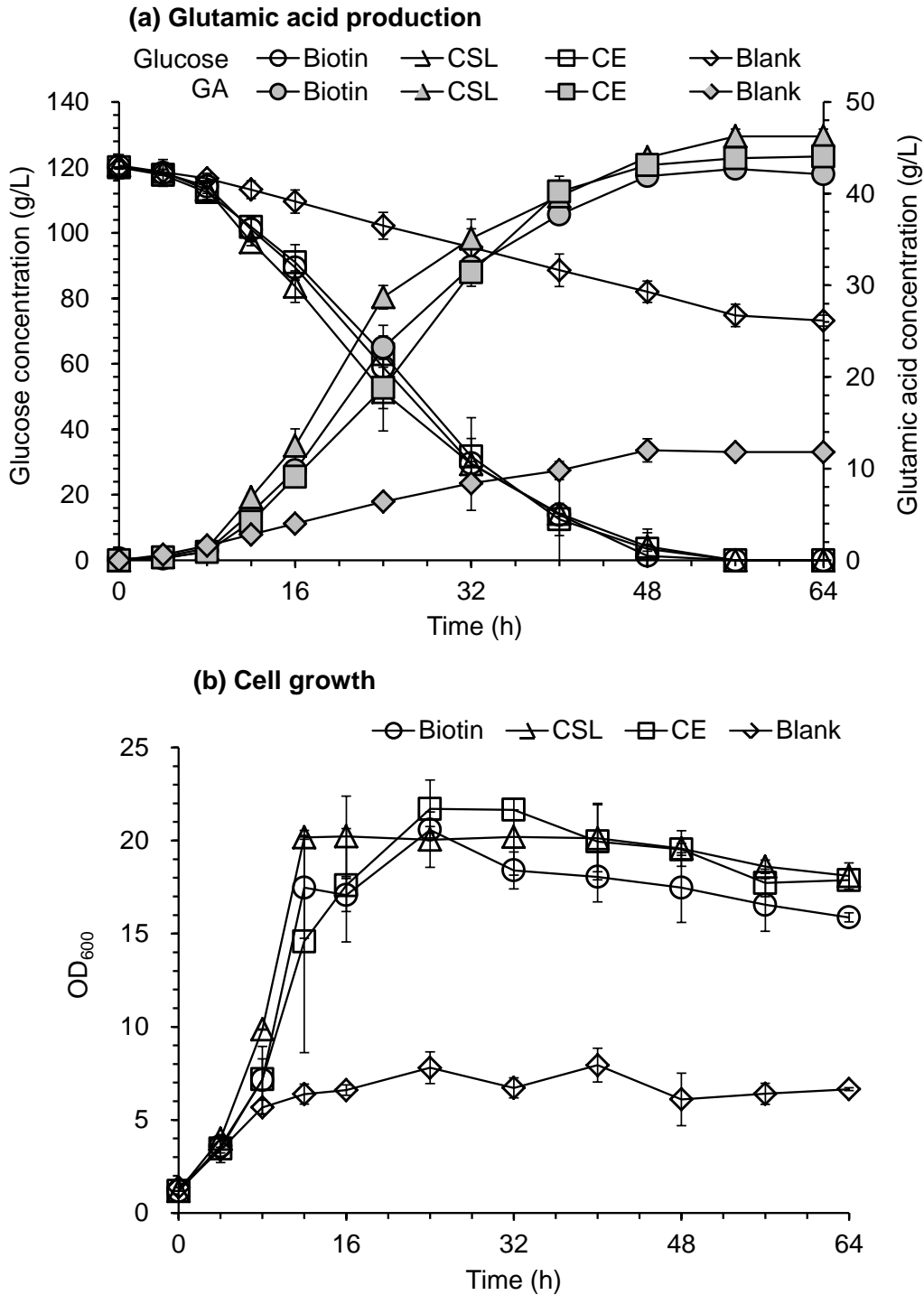


图 6.5 富含生物素的细胞提取物在谷氨酸发酵过程对玉米浆 (CSL) 及纯生物素的替代

Fig. 6.5 Application of biotin-rich cell extract (CE) to replace corn steep liquor (CSL) and pure biotin in glutamic acid (GA) production

(a) 谷氨酸发酵曲线; (b) 细胞生长曲线。将收集得到的谷氨酸棒杆菌细胞在硫酸酸解后的提取物加入到谷氨酸发酵过程, 同时将玉米浆和纯生物素分别加入谷氨酸发酵过程作为对比。三者引入的生物素浓度均为 1.25 $\mu\text{g/L}$, 而谷氨酸棒杆菌种子液引入的生物素浓度为 0.6 $\mu\text{g/L}$ 。

6.4 本章小结

以玉米秸秆为代表的农业木质纤维素废弃物中含有丰富的生物素，特别是玉米叶中的生物素含量极高。干法生物炼制技术可以有效的在糖化体系中保留这些生物素，本章根据生物素缺陷型菌株从外界摄取生物素的特性，国内外首次利用微生物在木质纤维素生物炼制加工过程中富集提取生物素。创造了一条独特的极高生物素含量产品的生产工艺，为木质纤维素生物物质的高值利用开辟了一条全新的道路。

谷氨酸棒杆菌在木质纤维素水解液中的生长较快，生物素摄取能力也很强，过表达生物素转运基因 *bioYMN* 可以进一步提高谷氨酸棒杆菌的生物素摄取能力。携带表达质粒的重组菌因为生物素转运基因 *bioYMN* 的拷贝数较高，可以在接种后很短的时间内将胞外生物素富集到胞内，提取得率高达 83.8%，胞内含量高达 303.8 mg/kg DCW，远高于常用的富含生物素的发酵添加剂，该富集过生物素的细胞酸解后制备的高生物素含量的提取物可以成功的应用到谷氨酸发酵过程。

未来我们需要继续探究谷氨酸棒杆菌细胞的自水解条件，不仅保留生物素，也充分利用细胞水解产生的氨基酸、核苷酸等物质，使其成为更好的营养添加剂。

未来我们可以选择不同的木质纤维素原料，在不同的预处理过程中进行加工，根据不同维生素的高温、酸、碱耐受特性，减少维生素在预处理过程的损失。同时应当避免预处理及脱毒过程废水的排放，将这些维生素充分保留在水解体系中。之后选择不同的微生物在木质纤维素水解液中富集提取不同的维生素，促进木质纤维素生物物质资源的充分利用。

第 7 章 软木机械浆酶法制备纳米纤维素并联产可发酵糖

7.1 引言

纳米纤维素在包装、纳米复合材料、能量储存、医用材料及电子元器件等诸多领域具备潜在的应用价值^[100-104, 106]。目前, 纳米纤维素主要以 Kraft 浆和溶解浆为原料生产^[100, 102, 103], 这些底物纤维素含量高, 且基本无木质素存在, 但其与机械浆相比, 价格高、得率低、生物质损失严重^[107, 108]。对于热磨机械浆 (TMP) 而言, 在加拿大, 由于其主要产品报纸的用量越来越少, TMP 需求量也不断下滑。为了维持软木的持续利用, 稳定经济及保障就业, 亟需找到一种新产品进行软木热磨机械浆的高值化利用。

先前利用机械浆制备纳米纤维素的研究较少, 近几年来, 逐渐有研究人员利用机械浆制备含有木质素的纤维素纳米纤丝 (LCNF)。LCNF 与不含木质素的纤维素纳米纤丝 (CNF) 相比, 具备相对疏水的特性, 有利于提高后续与其他材料的兼容性^[104, 105, 203-205]; 此外, LCNF 制备的材料热稳定性较高, 表面也相对光滑^[206-210]。而目前研究人员制备 LCNF 的主要方法为机械法及化学法^[105]。机械法主要是利用高压匀质机、微射流机、研磨机或超声破碎仪将纤维结构打开, 解聚成为纳米纤丝, 而与利用 Kraft 浆生产无木质素的纤维素纳米纤丝过程相比, LCNF 机械法生产能耗高, 且产物相对不均一^[103, 203, 204, 211, 212]。这主要是因为机械浆较好的保留了木材生物质的化学组分和纤维结构, 其中木质素及半纤维素对纤维素致密的包裹及缠绕限制了 LCNF 的机械法生产。化学法往往用来降低机械法直接处理的能耗, 在不含木质素的 CNF 生产过程中方法很多, 如 TEMPO 介导的氧化、羧甲基化、磺化及阳离子化等等^[103, 109, 111, 206]。而在 LCNF 的生产过程, 也可以使用类似的方法如 TEMPO 介导的氧化法^[112, 213], 但机械浆中木质纤维素的致密结构限制了化学试剂对纤维素的处理^[208, 214], 使得电荷难以加到纤维上; 此外, 由于化学试剂的非专一性, 大量昂贵的化学试剂也会与木质素反应, 造成试剂及催化剂的浪费, 带来了潜在的环境污染问题。

为了减少环境污染及高温高压反应条件的使用, 我们希望使用特异、专一且温和的酶法来处理热磨机械浆进而生产 LCNF。目前据我们所知还没有酶法处理机械浆的文献报道, 原因在于木质纤维素的致密结构会阻碍纤维素酶接近纤维素, 限制了纤维结构的打开^[41]。而在 Kraft 浆生产无木质素的 CNF 过程中, 大量的文献报道了内切葡聚糖酶可以快速水解纤维素非结晶区, 使得纤维分层解聚, 有效促进 CNF 的生产^[23, 116-119]。也有文献采用含有内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶及 β -葡糖苷酶的纤维素酶全酶处理 Kraft 浆, 将易水解的不定型区纤维素及部分结晶区纤维素转化为糖, 之后用水解后的纤维制备纳米纤维素, 获得了较好的效果^[120, 121]。

在本研究中, 由于机械浆纤维组分与木材生物质组分相似, 处理难度大, 我们选择了诺维信酶 CTec 3, 其具备纤维素酶及半纤维素酶的活性, 可以有效处理木质纤维素原料, 水解半纤维素以减少半纤维素对纤维素的缠绕保护, 并且将易水解的纤维素不定型

区及部分结晶区水解为可发酵糖作为副产物，同时打开纤维结构，促进纤维断裂及分层，有利于 LCNF 的机械法生产。接着我们使用红外光谱 (FTIR)、X 光衍射 (XRD)、透射电镜 (TEM) 等方法表征了获得的 LCNF，并制备了 LCNF 膜。

7.2 材料与方法

7.2.1 纸浆和化学品

漂白的软木化学热磨机械浆 (BCTMP) 来自加拿大 Quesnel River 制浆造纸公司，原料为云杉、松树及冷杉。干 BCTMP 首先加入水在 10% (w/w) 固含量下进行疏解，完成后抽滤至固含量约 70% (w/w)，置于 4 °C 保存备用。其他化学品来自美国 Fisher Scientific 公司。

7.2.2 中性磺化处理

疏解后的 BCTMP 根据 Chandra 等人的方法^[41]进行中性磺化处理，其具体步骤如下：将机械浆中加入亚硫酸钠溶液，固含量调整至 10% (w/w)，亚硫酸钠加量为 0.16 g/g 干纸浆，放入 Parr 反应器 (T136 不锈钢、1L 体积) 中，160 °C 反应 1 h。处理后的纸浆用去离子水洗，抽滤，直至滤液电导率接近 0，获得的纸浆固体部分固含量约为 30% (w/w)，置于 4 °C 保存备用。

7.2.3 酶处理及纸浆纳米纤维化

磺化后的 BCTMP (S-BCTMP) 加入 50 mM、pH 5.0 的乙酸钠缓冲液与纤维素酶酶液，纤维素酶选用诺维信酶 Cellic CTec 3，酶用量为 20 mg 蛋白/g 纤维素，混合后置于 50 °C 摇床 180 rpm 进行水解，酶处理选择 10% (w/w) 固含量，以提高酶水解产生的糖浓度，回收糖液作为副产物。处理后，置于 85 °C 水浴 20 min 以灭活酶蛋白，接着对处理后的固体纤维进行水洗，直至滤液电导率接近 0。

固体纤维通过机械法制备纤维素纳米纤丝。首先将固体纤维配制成 0.25% (w/w) 固含量的悬浊液，使用高速混合机进行机械剪切 (约 20000 rpm) 30 min，之后进行超声 (Fisher Model 700) 处理，90% 功率处理 30 min。处理后的悬浊液 5000 rpm 离心 30 min，所得的上清液即为纳米纤维素水悬液。以去离子水作为对照，纳米纤维素水悬液浓度于 105 °C 烘箱烘干测得，纳米纤维素质量即为其浓度与体积的乘积，纳米纤维素得率即为纳米纤维素质量与糖化前原料质量的比值。试验进行三组平行，取平均值作为最终数据。

7.2.4 分析及表征方法

7.2.4.1 组分测定

组分测定根据制浆造纸标准方法 TAPPI T-222，其原理及步骤与 2.2.7 两步酸解法一致。糖含量通过液相色谱 Dionex DX-3000 (Sunnyvale, CA) 测定，色谱柱为阴离子交换柱 Dionex CarboPac PA1。

7.2.4.2 纤维素酶可接近性分析及酶水解评价

保水率 (Water retention value, WRV) 根据 TAPPI Useful Method-256 测得。具体的说，0.5 g 物料于 50 mL 去离子水中浸泡过夜，置于含滤网的 50 mL 离心管中，900×g

离心 30 min, 基于干基物料的保水量即为 WRV。西蒙氏染色使用与酶分子量类似的橘黄色染料来模拟酶, 通过染色剂吸附在物料上的量来判断纤维素的接近性^[215]。酸基团电荷的量通过电导率滴定法测得^[216], 简单的说, 强酸的电导率碱滴定曲线为向下的直线, 弱酸为平稳的线, 弱酸滴定结束后, 继续滴定碱液, 电导率为向上的直线。纤维长度采用纤维分析仪测得 (FQA, LDA02, OpTest Equipment, Inc., Hawkesbury, ON, CA)。

酶水解评价原理与 2.2.7 一致。使用 2% (w/w) 固含量, 50 mM、pH 5.0 的乙酸钠缓冲液, 纤维素酶选用诺维信酶 Cellic CTec 3, 酶用量为 30 mg 蛋白/g 纤维素, 混合后置于 50 °C 摇床 180 rpm 水解 72 h。

7.2.4.3 显微镜观察

冻干后的纤维样品使用克雷辛顿高分辨率溅射镀膜机 (Ted Pella Inc., Sweden) 进行喷金 (9 nm 厚), 利用扫描电子显微镜 (Hitachi S-4700 Field Emission SEM, Hitachi, Pleasanton, CA) 在工作距离 5 mm、加速电压 5 kV 条件下观察纤维形态。

将含有 LCNF 的悬浊液 (0.01 wt%, 8 μ L) 滴在网格 (Formvar 涂层碳栅, 300 目铜网, Ted Pella Inc., Redding, CA) 上, 用滤纸吸干多余液体。然后用 2% 乙酸铀酰溶液对网格进行负染, 并在室温条件下干燥。利用透射电子显微镜 (Hitachi H7600 TEM, Hitachi, Pleasanton, CA) 在 100kV 加速电压下观察 LCNF 形态, 使用 Image J 软件随机选取超过 100 个样本统计直径分布。

7.2.4.4 紫外-可见光光谱分析

透射光测试样品选择 0.1% (w/w) 的 LCNF 水悬浊液, 吸收光测试样品选择 0.01% (w/w) 的 LCNF 水悬浊液, 将样品分别使用分光光度计进行 200-800 nm 波长的全波长扫描。

7.2.4.5 Zeta 电位测试

样品为 0.1% (w/w) 的 LCNF 悬浊液, 使用 Zeta 电位分析仪 (Zetasizer nano-ZS, Malvern, CA) 进行测试。

7.2.4.6 结晶度分析

冻干后样品的结晶度通过粉末式 X 射线衍射仪 (Bruker D8-Advance powder x-ray diffractometer, Bruker, CA) 测得, 采用 Cu-K α , 射线波长 0.1540 nm, 电压 40 kV, 电流 40 mA, 扫描范围为 5 至 80 度, 间隔 0.04 度。结晶度计算方法采用面积法^[217], 通过软件 (PeakFit, www.systat.com) 计算结晶度 (CrI), 根据 Scherrer 等式^[218]计算结晶尺寸。

7.2.4.7 红外光谱分析

使用衰减全反射傅里叶变换红外光谱仪 (ATR-FTIR, PerkinElmer, CA) 测试冻干后样品在 500 至 4000 cm^{-1} 的透射谱图, 扫描次数 80 次。

7.2.4.8 膜制备及接触角测试

将 40 mL 0.1% (w/w) 的 LCNF 悬浊液进行真空抽滤 (滤膜孔径 0.2 μm)。膜抽干后压平, 使用接触角分析仪 (DataPhysics PSL 250, DataPhysics, CA) 测试接触角, 通过针管滴下一滴 4 μL 的去离子水, 记录 2 min 之内的接触角, 每 30 s 记录一次。

7.3 结果与讨论

7.3.1 中性磺化处理提高纤维素酶对纤维素的可接近性

本文使用的原料为漂白化学热磨机械浆 (BCTMP)，这是用于报纸及纸板等产品生产的主要纸浆原料。具体的说，其制备是在热磨机械浆 (TMP) 处理前先进行温和的化学处理 (一般为磺化处理)，通过软化木质素，以达到降低磨浆能耗等诸多目的；此外在热磨处理后加入漂白工艺，将木质素的发色团漂白，但基本不损失木质素，这样制备的纸浆被称为 BCTMP。因此 BCTMP 依旧属于高得率浆，本批次 BCTMP 的木质素含量高达 24.6%，与原始木材生物质接近。

由于 TEMPO 氧化等化学法试剂昂贵、且试剂与木质素反应造成浪费，本研究我们希望通过专一性强且温和的酶处理，在较高固含量下将半纤维素与易水解的纤维素转化为糖并回收糖液作为副产物，在合适的时间节点收集酶处理后的纤维制备含木质素的纳米纤维素。首先，有必要探究酶对 BCTMP 纤维素的可接近性，判断是否可以充分水解及解聚纤维，如表 7.1，经过较高酶用量 (30 mg 蛋白/g 纤维素) 72 h 的水解，仅有 27.9% 的纤维素可以被水解为糖，说明软木 BCTMP 纤维的纤维素酶可接近性较差。这是因为 BCTMP 纤维的纤维素被致密的木质素包裹，其制浆过程仅仅切断了细胞壁间隙的胞间层，对于次生细胞壁结构基本没有破坏，纤维结构依旧保存良好；此外，软木木质素的愈创木基含量较高，这种木质素结构非常致密，也阻碍了水解。

表 7.1 磺化前后机械浆纤维素酶可接近性比较

Table 7.1 Comparison of cellulase accessibility of BCTMP and sulphonated BCTMP

	Acid groups (mmol/kg)		Sulfonic group	Water retention value (%)	Direct orange dye adsorption (mg/g)	Enzymatic cellulose conversion yield (%)
	Strong	Weak				
BCTMP	55	262	ND	209	44	27.9
S-BCTMP	148	212	93	257	60	72.1

我们试图在不大量移除木质素的情况下，改善 BCTMP 纤维的纤维素酶可接近性。最终选用了中性磺化的方法，在木质素上加入磺酸基团进行改性，适当增加木质素的亲水性，便于纤维溶胀和分层^[22, 41]。磺化结束后，如表 7.1，通过电位滴定法发现，新加入的磺酸基含量为 93 mmol/kg。接着通过保水率的方法判断底物亲水性，发现磺化后的 BCTMP (S-BCTMP) 保水率从 209% 提高到了 257%，保水率的提高反映出纤维的溶胀，可以侧面说明底物的酶可接近性有所提高。接着我们采用西蒙氏染色的方法来判断与酶分子量类似的染料染色情况，发现吸附上的染料量也从 44 mg/g 提高到 60 mg/g，理论上说明会有更多的酶分子接触到纤维素。最后，我们采用酶水解评价的方法判断，发现纤维素酶水解得率从 27.9% 提高到 72.1%。总之，磺化过程显著增加了酶对机械浆纤维的可接近性，为后续酶法促进纳米纤维素生产和回收可发酵糖奠定了基础。

表 7.2 磺化前后机械浆组分比较

Table 7.2 Comparison of chemical composition of BCTMP and sulphonated BCTMP

	Klason lignin (%)	Glucan (%)	Xylan (%)	Araban (%)	Galactan (%)	Mannan (%)
BCTMP	24.6	44.0	5.4	1.3	2.0	9.5
S- BCTMP	20.1	48.9	5.3	1.0	1.7	8.9

对磺化前后的 BCTMP 纤维化学组分比较发现,木质素含量仅从 24.6% 下降至 20.1%,说明中性磺化主要通过改性木质素来提高纤维素可接近性,而并非通过移除大量的木质素来实现。此外,通过 FQA 比较纤维尺寸变化,发现纤维长度和宽度分别从 2096 μm 与 32.6 μm 变为 2111 μm 与 33.0 μm ,磺化前后没有明显的变化。总之,通过中性磺化这种成本相对较低且相对温和的化学处理,基本保留了原有纤维结构及纤维中的木质素,且显著提升了 BCTMP 纤维的纤维素酶可接近性,便于后续含木质素的纤维素纳米纤丝 (LCNF) 的酶法生产。

7.3.2 酶处理促进纤维素纳米纤丝制备并联产可发酵糖

使用纤维素酶诺维信 CTec 3 处理磺化后的 BCTMP,该酶是一种复配后的混合酶,具有纤维素酶及半纤维素酶的活性。为了尽可能提高副产物可发酵糖的终浓度,便于回收利用副产物,此处选择 10% (w/w) 固含量进行水解,无法进一步提高的原因在于软木机械浆纤维长、体积大,进一步提高固含量会导致酶水解过程混合不均匀。

如图 7.1a、b,酶水解时间分别选择 6、12、24、48 及 72 h,结果发现木聚糖、阿拉伯聚糖和纤维素易被水解,而甘露聚糖和半乳聚糖则相对较难被水解为单糖。随着水解时间的变长,不同组分的水解程度均有所提高。以 12 h 及 72 h 为例,纤维素的单糖水解转化率分别为 33.4% 与 66.4%,所得葡萄糖浓度分别为 20.2 g/L 与 40.1 g/L;木聚糖的单糖水解转化率分别为 67.9% 与 88.2%,所得木糖浓度分别为 4.5 g/L 与 5.9 g/L;甘露聚糖的单糖水解转化率分别为 14.5% 与 43.3%,所得甘露糖浓度分别为 1.6 g/L 与 4.8 g/L;阿拉伯聚糖的单糖水解转化率分别为 45.7% 与 57.3%,所得阿拉伯糖浓度分别为 0.6 g/L 与 0.7 g/L;半乳聚糖的单糖水解转化率分别为 5.5% 与 14.8%,所得半乳糖浓度分别为 0.1 g/L 与 0.3 g/L。而纤维长度随着水解时间的延长逐渐变短,从未经酶处理的 S-BCTMP 的 2111 μm 逐渐降低至 1469 μm 、1355 μm 、1092 μm 、864 μm 、626 μm 。纤维的变短、变薄及半纤维素的移除等变化,理论上对纤维在后续机械处理过程中的纳米纤维化有促进作用。

图 7.1c 展示了磺化后软木 BCTMP (S-BCTMP) 的纤维形态,由图可见,软木纤维长度较长,热磨机械处理过程在纤维表面产生了一些脱纤化。图 7.1d、e 展示了水解 12 h 后的纤维形态 (S-BCTMP-H12),可以明显看到纤维长度显著变短,纤维上多出许多横向切口、且有的纤维从径向上被劈开,说明酶解过程可以有效的解聚纤维结构。

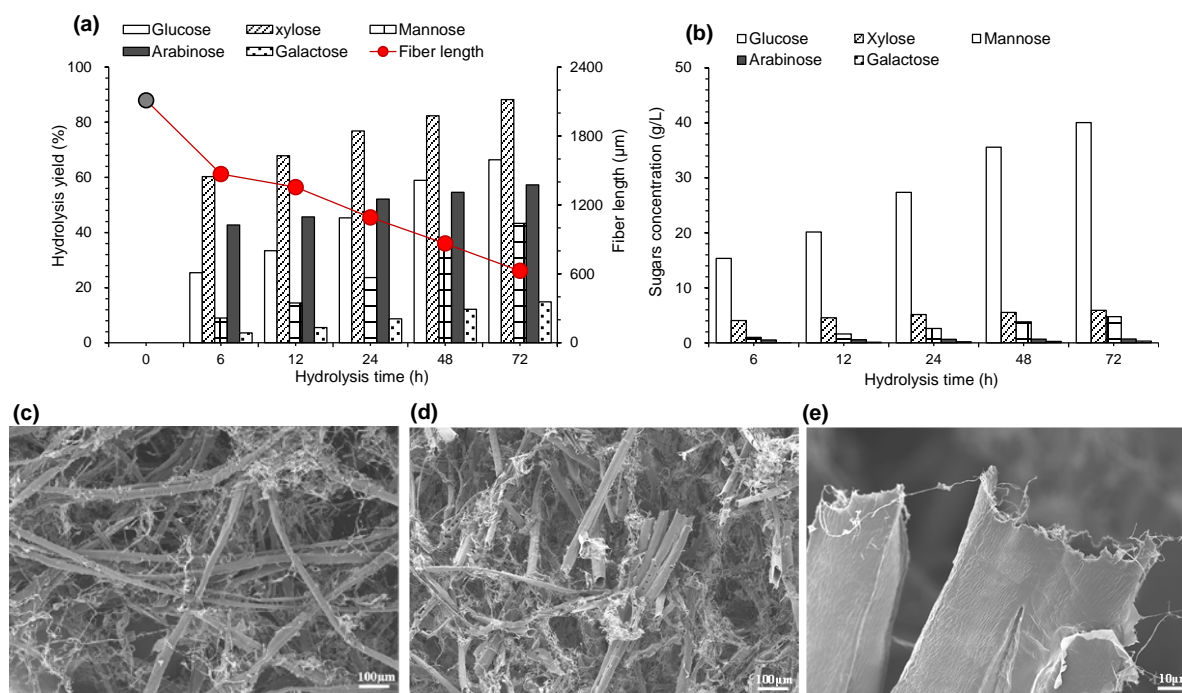


图 7.1 酶处理对于机械浆纤维的影响及副产物糖的产生

Fig. 7.1 Effect of enzymatic treatment on S-BCTMP fibers and sugars byproduct generation

(a) 纤维长度及糖转化率；(b) 副产物糖浓度；(c) 磺化后的机械浆纤维 (S-BCTMP) 的 SEM 图像；(d-e) 水解 12 h 后的纤维 (S-BCTMP-H12) 的 SEM 图像。

接着我们对收集得到的水解不同时间 (6、12、24、48 及 72 h) 后的纤维进行机械处理, 选用高速混合机进行机械剪切 (约 20000 rpm) 30 min, 之后进行超声 (Fisher Model 700) 处理, 采用 90% 功率处理 30 min。处理完成后的悬浊液在 5000 rpm 条件下离心 30 min, 所得的上清液即为纳米纤维素水悬液, 其浓度的计算根据上清液中的固体含量进行烘干计算。

图 7.2 展示了酶水解及机械处理过程的总物料衡算, 就纳米纤维素得率而言, 磺化处理可以使 BCTMP 在机械处理后的 LCNF 得率从 7.0% 提高至 14.5%, 推测其原因在于木质素磺化后亲水性提高使得纤维溶胀, 促进了纤维素的纳米纤维化。而经过不同时间酶处理后, 基于水解后干固体的 LCNF 得率均比未经酶解的 S-BCTMP 得率高, 说明酶水解可以有效打开纤维结构, 促进纳米纤维化。然而基于水解前干固体的 LCNF 得率如图所示, 在 12 h 时达到最高 (29.0%), 这是因为水解后期过多的纤维素转化为糖, 纤维回收率有所下降, 总的 LCNF 得率也因此下降。对于单糖得率而言, 随着糖化时间的增加, 葡萄糖及半纤维素单糖得率均有所提高。

由于酶处理 12 h 后制备的 LCNF 得率最高 (29.0%), 我们以此作为最优条件, 此时葡萄糖得率为 16.3%, 半纤维素单糖得率为 5.5%, 总有效物质得率为 50.9%。而 72 h 水解后, LCNF 得率为 15.5%, 此时可以获得最多的可发酵糖 (葡萄糖得率为 32.5%, 半纤维素单糖得率为 9.5%), 同时水解后纤维的木质素含量最高, 因此我们同样对 72 h 制备的 LCNF 进行表征, 评估水解较长时间获得的纤维残渣制备得到的 LCNF 的性质。

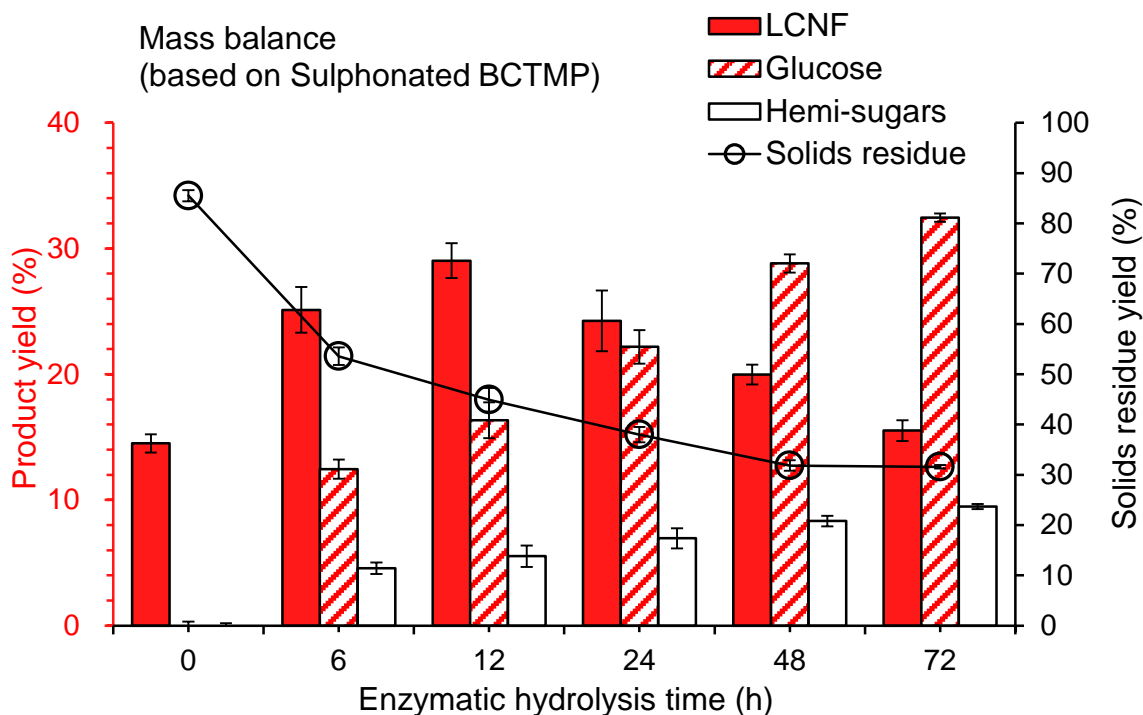


图 7.2 酶处理及机械处理后纤维的物料衡算

Fig. 7.2 Mass balance of the LCNFs and sugars after enzymatic treatment and mechanical treatment on fibers

由于高速混合机和超声探针的机械处理强度弱于高压匀质机和研磨机等高功率机器，我们此处仅仅通过该种处理比较同样机械处理强度下的 LCNF 得率高低，来判断纤维结构的解聚情况，选择合适的酶处理时间以回收纤维和糖，达到提高纳米纤维素得率及糖得率的效果。未来使用高功率的机器进行机械处理时，在相同磺化处理及酶处理工艺下，最终获得的 LCNF 得率预计会显著提高，固体残渣比率也会显著减少。

7.3.3 酶法协助制备的含木质素纤维素纳米纤丝 (LCNF) 的性质

图 7.3a 展示了 12 h 及 72 h 酶处理后制备的纳米纤维素在 0.1% (w/w) 浓度条件水悬液的相机照片，直观上看纳米纤维素水悬液中没有明显较大的纤维沉淀存在，与澄清透明的去离子水相比不浑浊，显示出类似于胶体的特性，说明制备的纳米纤维素在水中分散效果较好。图 7.3b 为吸光率曲线，两者在 280 nm 处均有明显的吸收峰存在，意味着所制备的纳米纤维素含有木质素，而 230 nm 处的吸收峰表明两种纳米纤维素均有木质素与糖的连接键。图 7.3c 为透光率曲线，在可见光 600 nm 处，两者透光率均较高，分别为 85.5% 与 87.7%，说明没有较大的纤维颗粒存在^[110]。图 7.3d 具体测定了两种 LCNF 的组分，发现 12 h 与 72 h 水解后制备的 LCNF 的纤维素含量分别为 52.7% 与 45.5%，半纤维素含量分别为 12.5% 与 9.6%，木质素含量分别为 26.8% 与 38.5%，组分比例与水解后的纤维相似。未来可以通过水解程度的不同来调节 LCNF 中木质素的含量，进而改变材料的性能。

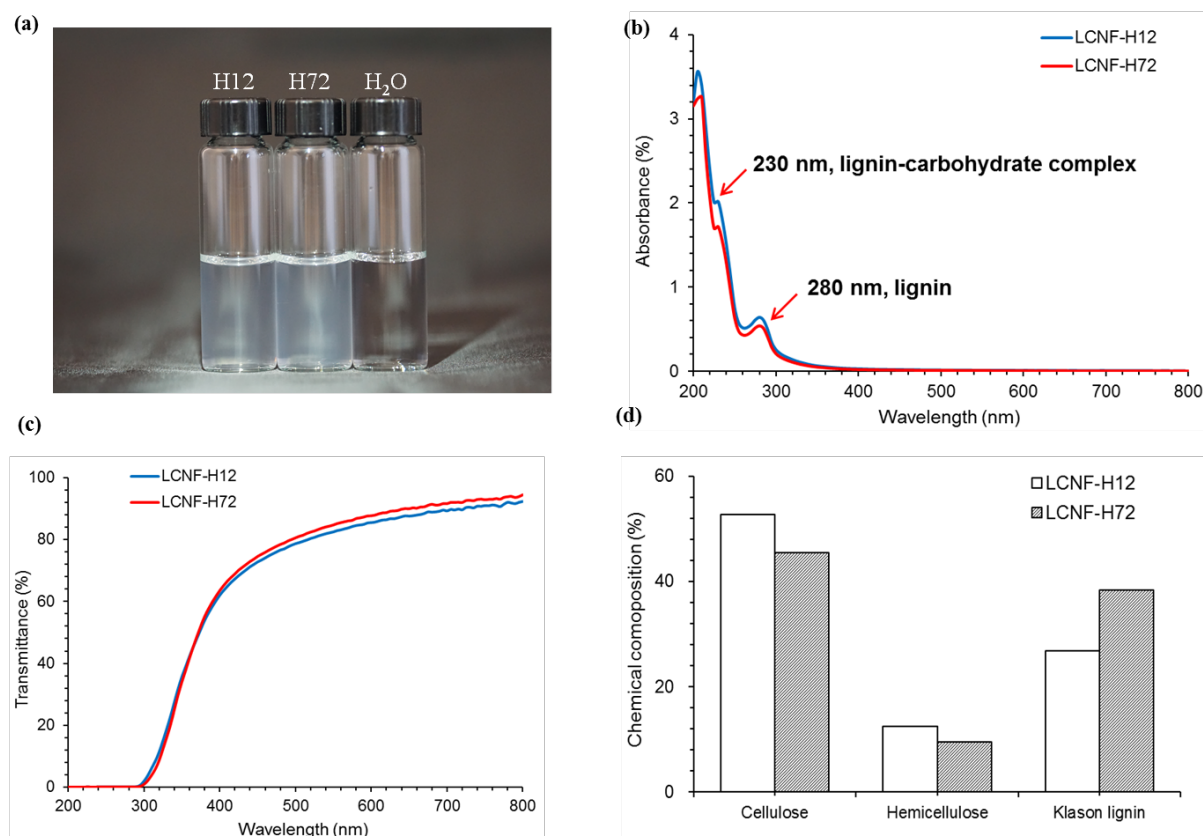


图 7.3 纳米纤维素水悬液特性

Fig. 7.3 Characteristics of the LCNF suspension

(a) 不同纳米纤维素水悬液照片；(b) 不同纳米纤维素水悬液吸光率；(c) 不同纳米纤维素水悬液透光率；(d) 不同纳米纤维素化学组分。

使用透射电镜对 12 h 及 72 h 酶处理后制备的纳米纤维素进行拍照 (图 7.4)。发现制备的纳米纤维素形态比较相似, 均为细长型带有一定树杈状结构的纤维素纳米纤丝, 其直径分别为 7.6 nm 与 7.1 nm (直径小于 100 nm 即可被定义为纤维素纳米纤丝), 后者更细或许与半纤维素含量较低有关。TEM 照片并未发现纤维素纳米纤丝表面存在木质素纳米颗粒, 但 280 nm 处的光吸收 (图 7.3b) 与红外光谱图像中的木质素特征峰 (图 7.5a) 证实了木质素的存在。因此我们推测磺化后的木质素亲水性相对较强, 可以完全覆盖在纳米纤丝表面, 本工艺制备出一种与直接机械处理^[204]或者 TEMPO 氧化处理^[213]等方法截然不同的 LCNF, 后两者均有木质素纳米颗粒存在于纤维素纳米纤丝表面。

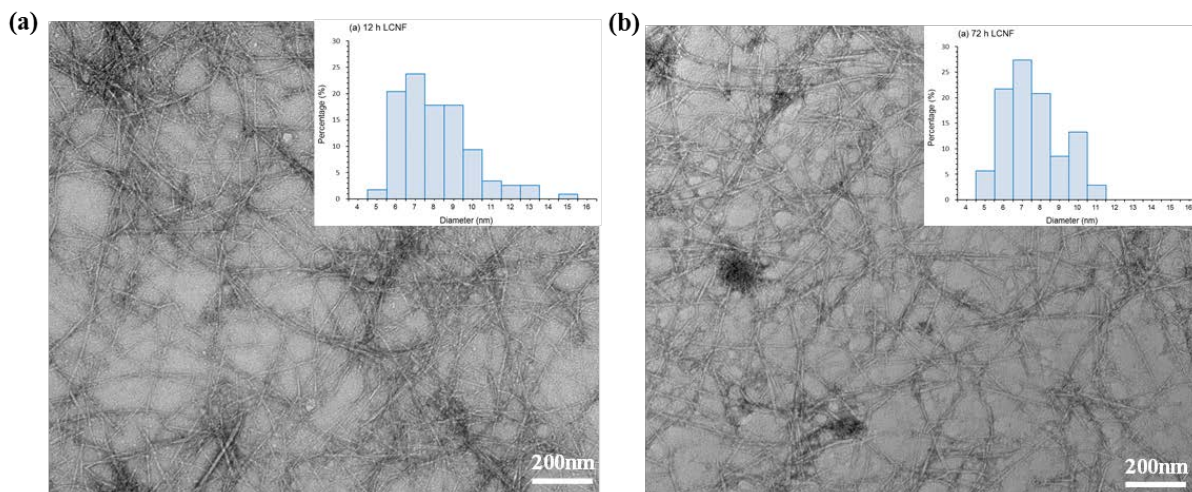


图 7.4 纳米纤维素透射电镜照片

Fig. 7.4 TEM images of produced LCNFs

(a) 酶处理 12 h 后制备的 LCNF; (b) 酶处理 72 h 后制备的 LCNF。

接下来我们对两种纳米纤维素进行红外光谱测试 (图 7.5a), 结果发现磺化后的机械浆 (S-BCTMP)、水解不同时间后的纤维 (S-BCTMP-H12、S-BCTMP-H72) 与两种 LCNF (LCNF-H12、LCNF-H72) 整体曲线平行, 说明机械浆纤维含有的官能团在磺化及酶解过程基本不变。3340 cm^{-1} 与 2900 cm^{-1} 处的吸收峰基本平行表示纤维素的特征峰 O-H 基团和 C-H 基团比较稳定, 而 1507 cm^{-1} 、1606 cm^{-1} 与 1460 cm^{-1} 处的吸收峰表示木质素的 C=C 芳香骨架和 C-H 键振动, 这是本章制备的纳米纤维素中含有木质素的证据之一。

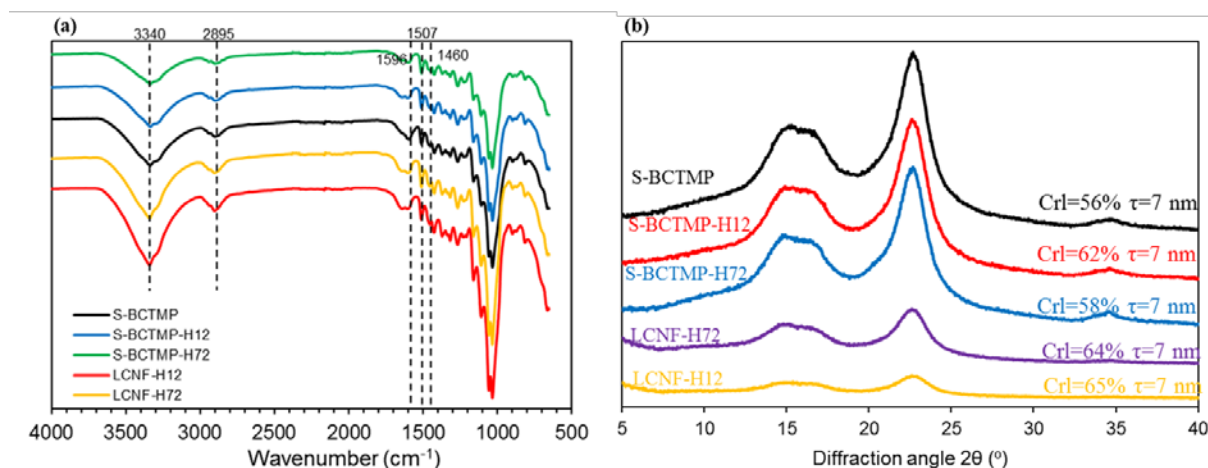


图 7.5 纳米纤维素红外光谱及 X 射线衍射图像

Fig. 7.5 FTIR spectra and XRD patterns of produced LCNFs

(a) 红外光谱测试; (b) 结晶度测试。

结晶度测试可以反映出 LCNF 中纤维素结晶区比例的相对值 (图 7.5b)。酶水解 12 h 后的机械浆 (S-BCTMP-H12) 纤维的结晶度为 62%，略高于 S-BCTMP (56%)，其原因在于不定型区纤维素在水解初期的水解速率很快^[8, 115, 219]，而整体纤维素含量变化不大，因此结晶区纤维素比例略微变高；之后机械处理制备得到的 LCNF (LCNF-H12) 的结晶度略微提高为 65%，原因估计在于机械处理也破坏了一小部分不定型区纤维素或半纤维素，而纤维素结晶区基本保留。水解 72 h 后的机械浆 (S-BCTMP-H72) 纤维的结晶度为 58%，低于 S-BCTMP-H12 的结晶度 (62%)，原因估计在于随着水解时间的延长，纤维素的含量下降而木质素的含量上升，导致结晶度下降；之后机械处理制备得到的 LCNF (LCNF-H72) 的结晶度略微上升 (64%)，推测原因同样在于不定型区纤维素及半纤维素的断裂。

Zeta 电位可以显示 LCNF 在水悬液中的稳定性。一般 Zeta 电位绝对值大于 40 mV 的水悬液体系非常稳定，纳米纤维素不易沉降；而小于 20 mV 则不稳定，纳米纤维素易絮凝沉降，其影响因素很多，如表面电荷、尺寸等。12 h 与 72 h 酶水解制备的 LCNF 水悬液的 Zeta 电位分别为 -32.7 mV 与 -36.1 mV，说明其水悬液相对比较稳定，后者较高的原因可能在于颗粒尺寸较小 (图 7.4)，也可能是因为其木质素含量较高，磺化木质素上带有磺酸基电荷，负电荷较多有利于维持其在水悬液中的稳定性。

最后我们用得率最高的 12 h 水解后制备的 LCNF 通过抽滤法 (0.2 μm 滤膜) 进行纳米纤维素薄膜制备。如图 7.6a 所示，制备的 LCNF 膜呈微黄色，不同于 LCNF 水悬液的微白色，应当是木质素浓度提高造成的。膜透明程度较好，在 800 nm 处的透光率为 78.2%。而其与水在接触 2 min 后的接触角依旧为 80.4°，与刚接触时基本一致，远高于无木质素存在的纳米纤维素膜 (10%-50%)^[204, 213]。这充分说明了使用 LCNF 制备的材料具备相对较强的疏水性，未来与疏水材料的兼容性强于不含木质素的 CNF。

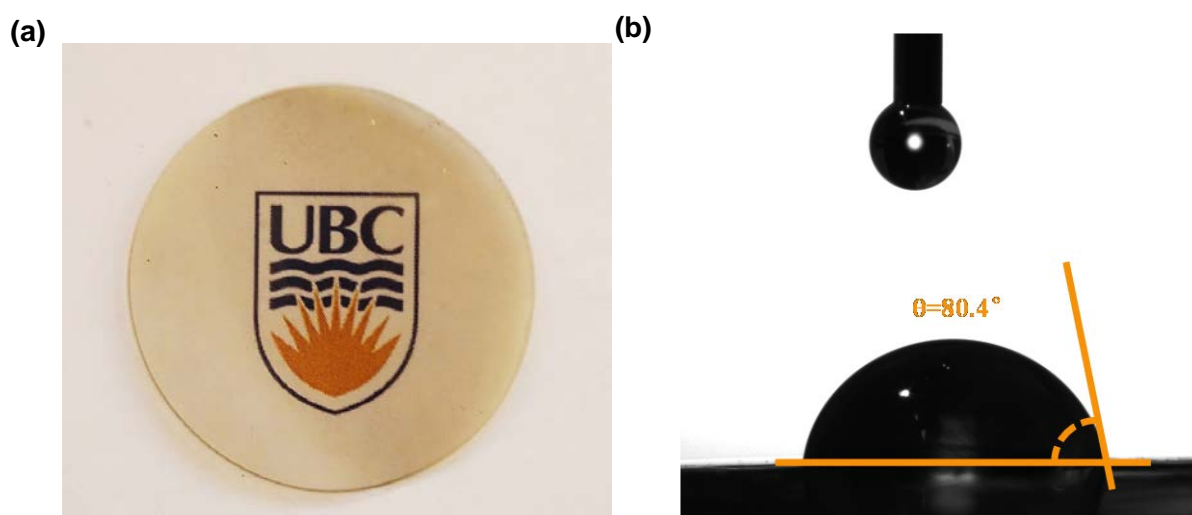


图 7.6 纳米纤维素膜及接触角

Fig. 7.6 LCNF film and its contact angle

(a) LCNF 膜；(b) 膜接触角测定。

7.4 本章小结

相比于 TEMPO 氧化、浓草酸酸解等 LCNF 制备方法，酶处理是一种特异性强且温和的处理方式，可以减少昂贵的试剂浪费并避免潜在的环境问题。对于软木机械浆而言，其纤维较长，木质素含量高，且木质素中的愈创木基含量较高，严重阻碍了其纳米纤维化及糖平台转化。因此我们选用中性磺化处理对其木质素进行改性，增加纤维素的酶可接近性，而诺维信酶 CTec 3 可以有效水解半纤维素及纤维素，打开纤维结构，促进机械浆纳米纤维化。

本章成功以机械浆为原料，通过温和的化学处理和酶处理促进了机械处理过程含木质素纤维素纳米纤丝（LCNF）的制备，同时回收了副产物糖。经过酶处理 12 h 后，磺化机械浆中容易水解的纤维及细小纤维被转化为糖，而未水解部分最终通过机械处理制备得到 LCNF。在同样的机械处理设备及处理强度下，相对于未经过酶处理的磺化机械浆而言，LCNF 得率从 14.5% 提高至 29.0%，充分说明了酶处理对于机械浆纤维纳米纤维化的显著促进作用。此时还以 21.9% 的得率回收了葡萄糖及半纤维素糖作为副产物，糖液浓度为 27.0 g/L。以该种 LCNF 制备的薄膜，透光性较好，接触角高（80.4°），说明该 LCNF 与疏水材料的兼容性强于不含木质素的 CNF。

此外，本章还讨论了延长酶水解时间为 72 h，尽可能的将纤维转化为糖，再利用纤维残渣进行 LCNF 制备的情况。此时收集得到的糖液浓度为 51.8 g/L，可发酵糖基于原料的得率为 41.9%。利用该种纤维残渣制备的 LCNF 基于酶解前原料的得率为 15.5%，这种 LCNF 的木质素含量高达 38.5%，未来我们可以用该种工艺生产极高木质素含量的 LCNF。

需要注意的是，由于高速混合机和超声探针的机械处理强度弱于高压匀质机和研磨机等高功率机器，我们此处仅仅通过该种处理比较同样机械处理强度下的 LCNF 得率高低，来判断机械浆纤维的解聚情况。未来使用高功率的机器进行机械处理时，最终获得的 LCNF 得率预计会显著提高，残余固体残渣的比例也会显著减少。经过磺化处理及酶处理后的机械浆，相比于未经过处理的机械浆而言，若要在研磨机等机器中获得相似得率及尺寸的 LCNF，其能耗预计会大幅降低。

第 8 章 内切葡聚糖酶及辅助酶对软木机械浆纳米纤维化的促进

8.1 引言

第七章提出了一种利用软木机械浆生产含木质素的纳米纤维素的方法,通过温和的磺化处理 and 酶处理,可以有效的促进机械浆纳米纤维化。而由于使用的酶(诺维信 CTec 3)既含有纤维素酶(内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶、 β -葡糖苷酶),也含有大量的辅助酶如半纤维素酶(木聚糖酶等),我们难以判断这些酶在促进机械浆纳米纤维化中分别发挥的作用。许多文献已经报道了内切葡聚糖酶(EG)可以快速破坏纤维素不定型区,使得化学浆(Kraft 浆、亚硫酸盐浆、溶解浆)纤维断裂及分层,促进化学浆纳米纤维化^[23, 116-119],而 EG 在机械浆中是否也可以高效促进其纳米纤维化则无相关报道。

辅助酶如木聚糖酶、甘露聚糖酶及多糖裂解单加氧酶(LPMO)已经在木质纤维素底物(秸秆、木材等)糖化过程中证明了可以促进纤维素酶对纤维素底物的接近,提高纤维素酶水解效率^[220-223]。尽管这些辅助酶并不能直接水解纤维素,但他们可以特异性的改变纤维网络,例如木聚糖酶既可以移除纤维表面的木聚糖,又可以协同纤维素酶促进纤维溶胀和提高孔隙^[23, 220];甘露聚糖酶理论上也能对软木中大量的葡甘露聚糖发挥类似的作用^[23];LPMO 不仅可以氧化断裂纤维素,打开高度组织的纤维素结构,也可以在纤维表面增加羧基电荷^[223, 224],减少纤维聚集,促进其纳米纤维化^[119, 225]。但上述关于辅助酶促进纳米纤维化的相关研究均以化学浆为底物开展,辅助酶是否促进含大量木质素的高得率浆纳米纤维化则无相关报道。

为了探究 EG 是否可以促进软木机械浆纳米纤维化,获得与 Kraft 浆 EG 处理后类似的效果。本研究使用 EG 为主要酶对磺化 BCTMP 进行处理,并以不进行酶处理的磺化 BCTMP 作为对照,比较两者在相同强度的机械处理后获得的含木质素的纤维素纳米纤维(LCNF)的得率及性质。在此基础上探究辅助酶(木聚糖酶、甘露聚糖酶及 LPMO)对于 EG 的协同促进效果,比较不同酶处理后的纤维性质及最终机械处理后制备的 LCNF 的得率和性质(直径、结晶度、热稳定性等)。

8.2 材料与方法

8.2.1 原料及中性磺化

漂白的软木化学热磨机械浆(BCTMP)来自加拿大 Quesnel River 制浆造纸公司,疏解后进行中性磺化,步骤同 7.2.2,磺化时间为 3 h。

8.2.2 酶处理及机械处理

内切葡聚糖酶(EG)选用 Novozyme 476,木聚糖酶选用 Novozyme HTec,甘露聚糖酶选用 Novozyme Mannanase,多糖裂解单加氧酶(LPMO)选用 Novozyme LPMO。其中 EG、木聚糖酶及甘露聚糖酶酶用量均为 1 mg 蛋白/g 干物料,LPMO 酶用量为 5 mg 蛋白/g 干物料。酶处理的底物为磺化后的 BCTMP(S-BCTMP),加入 50 mM、pH 5.0

的乙酸钠缓冲液与酶液，混合后体系固含量为 1% (w/w)，置于摇床 50 °C、180 rpm 进行酶处理，反应持续 6 h，期间为了充分给 LPMO 的氧化反应提供氧气，处理过程中每 1 h 通入 3 min 氧气。反应结束后，置于 85 °C 水浴 20 min 灭活酶蛋白，接着对处理后的固体纤维进行水洗，直至滤液电导率接近 0。

对于不同酶处理的机械浆纤维及未经酶处理的纤维，采用同样条件的机械处理制备 LCNF。首先将固体纤维配制成 0.125% (w/w) 固含量的悬浊液，使用高速混合机进行机械剪切（约 20000 rpm）20 min，之后进行超声（Fisher Model 700）处理，采用 90% 功率处理 1 h。处理后的悬浊液 5000 rpm 离心 30 min，所得的上清液即为纳米纤维素水悬液，纳米纤维素得率计算同 7.2.3。试验进行三组平行，取平均值作为最终数据。

8.2.3 纤维的表征方法

酶处理前后的纤维长度采用纤维分析仪测得，同 7.2.4.2；纤维组分测定同 7.2.4.1。

8.2.4 纤维素纳米纤丝的表征方法

纤维素纳米纤丝组分测定根据 7.2.4.1，但测定 Klason 木质素含量时，使用 0.2 μm 滤膜对酸解物质过滤且水洗后，烘干称重。纳米纤丝形态使用透射电镜（TEM）进行观察，同 7.2.4.3。纳米纤丝悬浊液的透射光分析同 7.2.4.4。纳米纤丝悬浊液的 Zeta 电位测定同 7.2.4.5。结晶度测试通过 X 射线衍射仪测得，方法同 7.2.4.6。红外光谱分析同 7.2.4.7。热重分析使用热重分析仪（NETZSCH, TG 209F1, Germany）测得，大约 10 mg 样品从室温以 20 °C/min 的速度逐渐加热至 600 °C，期间维持 20 mL/min 氮气物流。

8.3 结果与讨论

8.3.1 不同酶处理在宏观尺度对于纤维的影响

不同酶处理可以改变纸浆纤维的长度、纤维素酶可接近性、表面电荷等特性，对木质纤维素解聚的效果也有所不同，我们首先在纤维级别的尺度探究不同酶处理的效果。由图 8.1 可知，相比于未经过酶处理的磺化 BCTMP (S-BCTMP, Control) 而言，加入 EG 处理可以释放极少量的半纤维素糖，并且将纤维平均长度从 2168 μm 变至 2144 μm ，EG 的主要作用在于切断纤维素不定型区，大量半纤维素的缠绕阻止了 EG 对纤维素不定型区的攻击，使得纤维基本没有变短。当 EG 与 LPMO 一起加入时，对半纤维素转化的效果基本没有提高，但使得纤维进一步变短（2015 μm ），原因在于 LPMO 是一种辅助酶，不参与水解，但可以氧化断裂纤维素，配合 EG 使用可以协同提高 EG 的处理效果，使纤维进一步变短。当加入木聚糖酶 HTec 辅助 EG 时，木聚糖和阿拉伯聚糖的水解转化率明显提高，分别达到 16.0% 与 16.0%，甘露聚糖水解转化率较低（3.2%），纤维长度进一步变短（1922 μm ），这说明木聚糖酶可以水解半纤维素特别是木聚糖和阿拉伯聚糖，破坏半纤维素的缠绕结构，有助于 EG 接近纤维素不定型区从而发挥作用。在此基础上加入甘露聚糖酶时，甘露糖的水解得率并没有提高许多（3.9%），推测原因在于软木葡甘露聚糖埋于其他半纤维素底部，不易水解，限制了纤维素的接近性^[23]，其部分水解即可帮助内切酶更好的接近纤维素不定型区，将纤维长度进一步变短（1832

μm)。当加入全部三种辅助酶协助 EG 时, 可以取得最好的协同作用效果, 半纤维素移除率最高, 纤维长度最短 ($1782 \mu\text{m}$)。

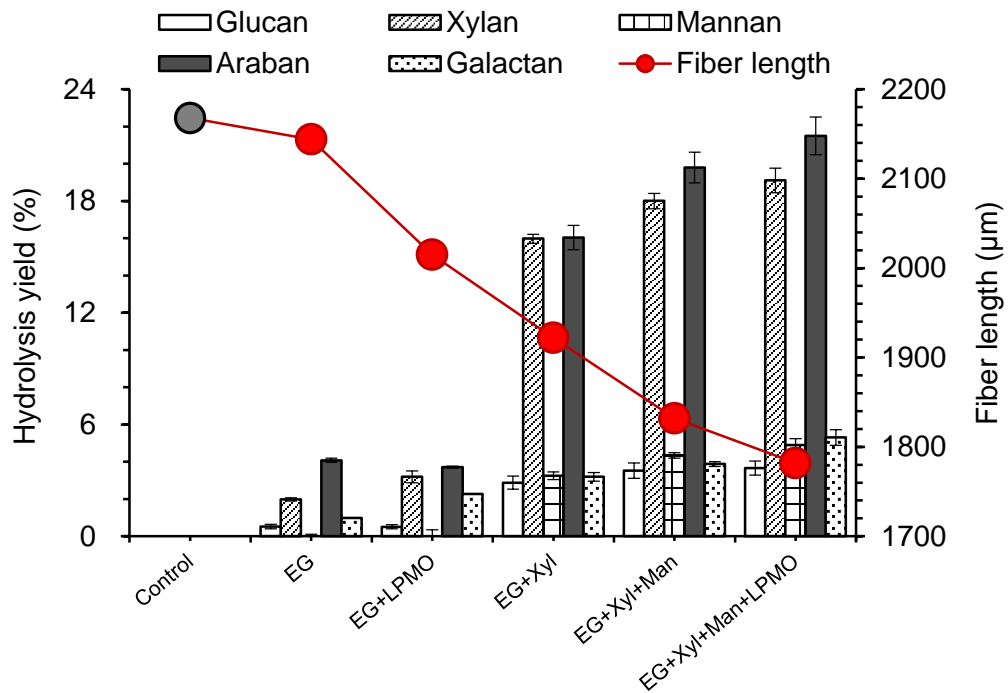


图 8.1 不同酶处理对磺化后机械浆纤维长度及水解得率的影响

Fig. 8.1 Effect of enzymatic treatment on length and hydrolysis yield of the S-BCTMP fibers

Control, 对照组, 不进行酶处理; EG, 加入内切酶处理; EG+LPMO, 加入内切酶与 LPMO 处理; EG+Xyl, 加入内切酶与木聚糖酶处理; EG+Xyl+Man, 加入内切酶与木聚糖酶及甘露聚糖酶处理; EG+Xyl+Man+LPMO, 加入内切酶与木聚糖酶、甘露聚糖酶及 LPMO 处理。

我们对酶处理后的纤维固体回收率及每种纤维的组分进行了测定。如表 8.1, 由于木聚糖酶与甘露聚糖酶均属于半纤维素酶, 且甘露聚糖酶的加入对于半纤维素的水解提高不明显, 此后我们仅选取同时加入 EG、木聚糖酶与甘露聚糖酶的组展开研究, 不再单列仅加入 EG 与木聚糖酶的组。

加入 EG 或 EG+LPMO 时, 纤维化学组分基本不变, 固体回收率高达 99% 以上; 当加入木聚糖酶与甘露聚糖酶协助 EG 时, 处理后的纤维中木聚糖及阿拉伯聚糖含量分别从 5.2% 与 0.8% 下降至 3.4% 与 0.5%, 甘露聚糖含量基本维持不变, 葡聚糖和木质素含量略微提高, 固体回收率下降至 95.9%; 在此基础上 LPMO 的加入与否对组分影响不大, 固体回收率为 95.1%。总的来说, 不同酶处理后的纤维固体回收率均较高 (大于 95%), 酶处理过程并没有造成太多的水解与纤维固体损失。

表 8.1 不同酶处理后的机械浆组分

Table 8.1 Chemical composition of enzymatic treated mechanical pulp

Pulp	Solids recovery (%)	Klason lignin (%)	Glucan (%)	Xylan (%)	Araban (%)	Galactan (%)	Mannan (%)
Control	100	18.1	49.2	5.2	0.8	1.7	9.6
EG	99.5	18.4	48.8	5.0	0.8	1.6	9.6
EG+LPMO	99.4	18.5	49.2	4.9	0.7	1.6	9.6
EG+Xyl+Man	95.9	19.3	50.2	3.4	0.5	1.7	9.8
EG+Xyl+Man+LPMO	95.1	20.1	50.6	3.4	0.5	1.8	9.8

8.3.2 不同酶处理在微观尺度对于纤维素纳米纤丝的影响

接着我们在纤维素纳米纤丝级别的尺度比较不同酶处理的效果。将得到的不同酶处理后的纤维进行相同强度的机械处理，制备纳米纤维素水悬液，过程采用高速混合机进行机械剪切 20 min，之后进行超声处理 1 h。在相同的设备及操作参数下，纳米纤维素得率越高，就说明纤维解聚（如溶胀、分层、断裂等）效果越好；同时也可以预计在工业化生产过程中，使用研磨机等设备制备均质的纳米纤维素纤丝，所需要投入的能耗就越小。

如图 8.2a, EG 处理相比于未经酶处理的机械浆纤维而言，纳米纤维素得率仅从 25.7% 提升至 30.1%，这与本课题组先前利用 EG 处理化学浆的结果完全不同^[23]。对于化学浆而言，EG 可以有效攻击不定型区纤维素，促进纤维分层，有效提高纤维素纳米纤丝得率；而本实验结果显示 EG 对于机械浆纤维的处理效果不甚明显，推测原因在于木质素与半纤维素限制了 EG 对不定型纤维素的水解。接着我们将牛血清蛋白与 EG 一起加入，以减小木质素对酶的无效吸附，结果最终制备的纳米纤维素得率基本没有提高（30.5%），这充分说明木质素对酶蛋白的无效吸附不起主导限制作用，主要的限制来源于木质素及半纤维素的屏障作用。而使用 LPMO 辅助 EG 时，纳米纤维素得率相比于仅加入 EG 处理提高了 12%，达到了 33.6%，这说明 LPMO 的氧化断裂功能可以有效的协助 EG 打开纤维结构；此外后续的红外光谱（FTIR）测试结果也说明，当加入 LPMO 时，会氧化纤维素，使得纤维上增加一定的羧基电荷，负电荷的相互排斥作用也会促进纤维素纳米纤维化。当加入木聚糖酶辅助 EG 时，纳米纤维素得率为 36.7%，当继续加入甘露聚糖酶时，得率提高到 39.7%，相比于仅 EG 处理（30.1%），纳米纤维素得率分别提高了 21.8% 与 31.6%，这说明半纤维素酶特别是木聚糖酶，对于机械浆纤维解聚处理效果较好，水解移除部分半纤维素组分有利于 EG 接近并切断纤维素不定型区，达到促进机械浆纳米纤维化的目的。当加入所有辅助酶协助 EG 时，纳米纤维素得率达到 40.5%，LPMO 在半纤维素酶与 EG 基础上的加入，并不能显著促进机械浆纳米纤维化，原因可能是机械浆制备 LCNF 对于机械处理强度要求高，半纤维素酶的加入已经显著促进了机械浆纳米纤维化，达到了机械处理设备的上限。

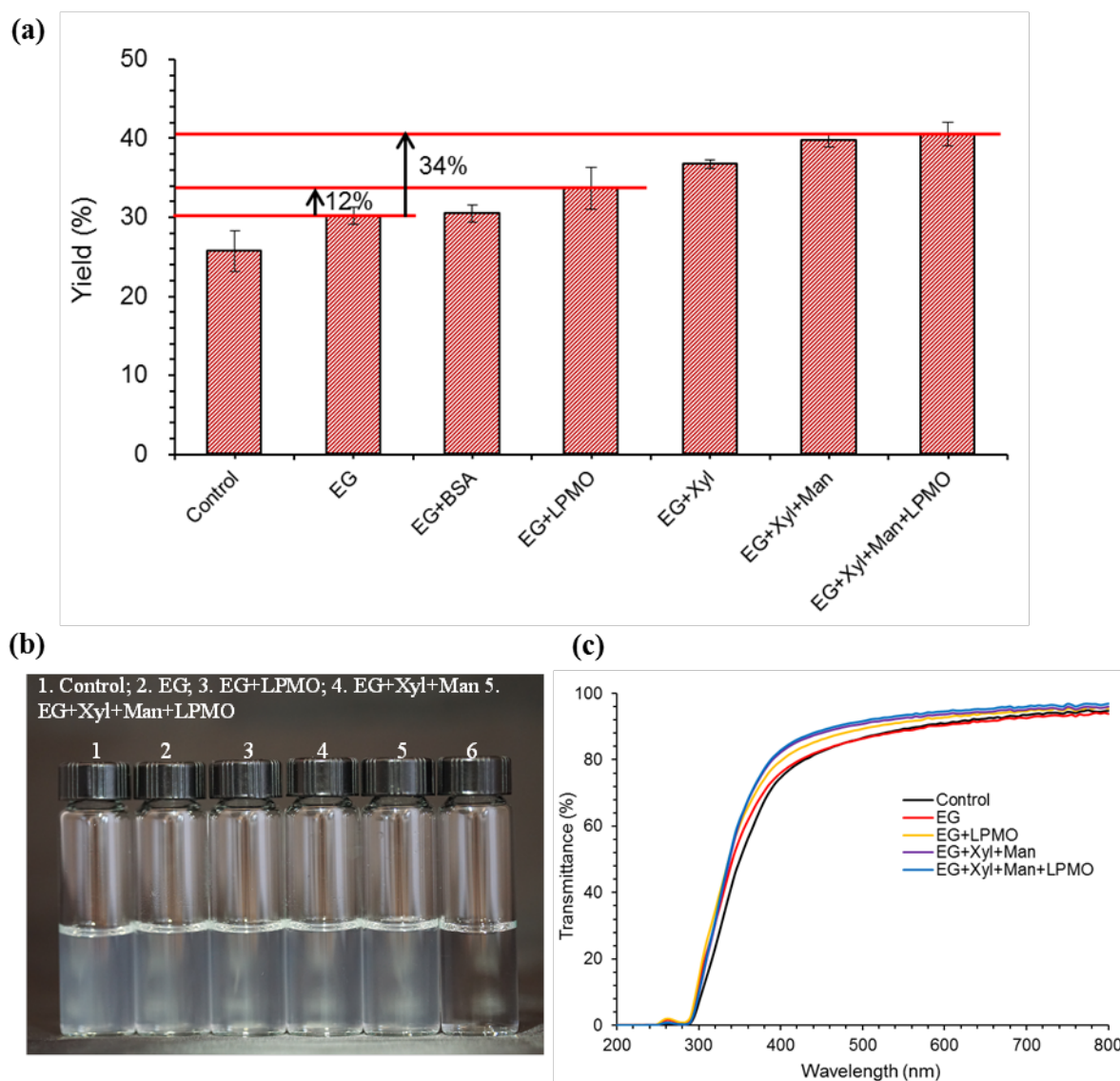


图 8.2 纳米纤维素得率及其水悬液特性

Fig. 8.2 Yield and characteristics of LCNFs

(a) 不同酶处理后机械法制备的纳米纤维素得率；(b) 不同纳米纤维素水悬液照片；(c) 不同纳米纤维素水悬液透光率。内切葡聚糖酶 (EG)、木聚糖酶 (Xyl)、甘露聚糖酶 (Man) 用量为 1 mg 蛋白/g 干物料，牛血清蛋白 (BSA) 与 LPMO 用量为 5 mg 蛋白/g 干物料。

图 8.2b 展示了不同酶处理后制备的纳米纤维素 0.1% (w/w) 浓度的水悬液特性, 直观上看纳米纤维素水悬液中没有明显较大的纤维沉淀存在, 与澄清透明的去离子水相比不浑浊, 显示出类似于胶体的特性, 说明制备的纳米纤维素在水中分散效果较好。图 8.2c 为水悬液透光率曲线, 在可见光 600 nm 处, 直接机械处理制备的纳米纤维素透光率略低 (90.9%), 经过酶处理后其透过率逐渐提高, 所有酶一起处理机械浆时, 制备的纳米纤维素透光率最高 (94.6%)。其原因在于直接机械处理制备的 LCNF 直径较大, 且有很多团聚存在, 平均直径为 12.8 nm (图 8.3a); 而经过 EG 处理后制备的 LCNF 团聚变少, 平均直径降低为 11.1 nm (图 8.3b); 继续加入 LPMO 处理时, 制备的 LCNF 平均直径降低为 9.7 nm, 聚集的 LCNF 更少, 由于羧基的增加导致 LCNF 相互排斥, 即使略微聚集也出现了蓬松的效果 (图 8.3c); 而经过半纤维素酶 (木聚糖酶、甘露聚糖酶) 辅助 EG 处理制备的 LCNF 比较细, 平均直径为 7.0 nm, 且基本没有聚集现象 (图 8.3d); 当继续加入 LPMO 时, 制备的 LCNF 平均直径为 7.2 nm, 与仅加入 EG 与半纤维素酶处理相比没有明显区别 (图 8.3e)。总的来说, 根据 TEM 图像, 制备的纳米纤维素呈细长的树杈交错状, 且直径均小于 100 nm, 可以被定义为纤维素纳米纤丝。

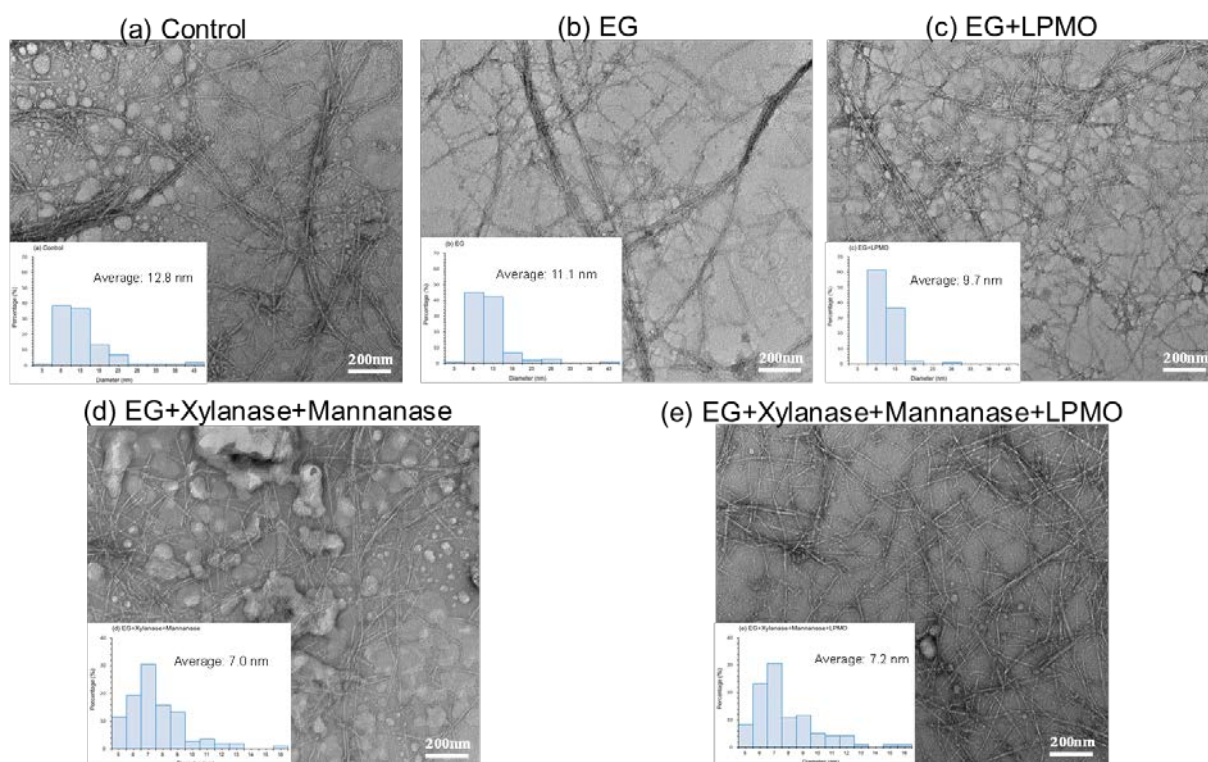


图 8.3 不同酶处理制备的纳米纤维素透射电镜照片

Fig. 8.3 TEM images of produced LCNFs by different enzymatic treatment

图 8.4 展示了不同酶处理制备的纳米纤维素冻干后样品的红外光谱图像。酶处理与否制备的纳米纤维素的红外光谱曲线整体平行, 说明机械浆纤维中含有的官能团在酶处理过程基本不变。3340 cm^{-1} 与 2900 cm^{-1} 处的吸收峰基本平行表示纤维素的特征峰 O-H 基团和 C-H 基团比较稳定, 而 1507 cm^{-1} 、1606 cm^{-1} 与 1460 cm^{-1} 处的吸收峰表示木质素的 C=C 芳香骨架和 C-H 键振动, 这说明了制备的纤维素纳米纤丝中含有木质素, 因此

可以被称为含木质素的纤维素纳米纤丝 (LCNF)。特别的是, LPMO 加入制备得到的两组 LCNF 在 1700 cm^{-1} 处可以发现微弱的 COOH 峰出现, 这应当是 LPMO 氧化纤维素形成的。为了大致估计增加的羧基量, 分别对酶处理后的纤维进行滴定, 发现仅采用 EG 处理得到的机械浆纤维中弱酸电荷量为 0.22 mmol/g , 而 LPMO 协同 EG 处理得到的纤维中弱酸电荷量为 0.25 mmol/g , 增加的部分应该是 LPMO 氧化纤维素形成的羧基。

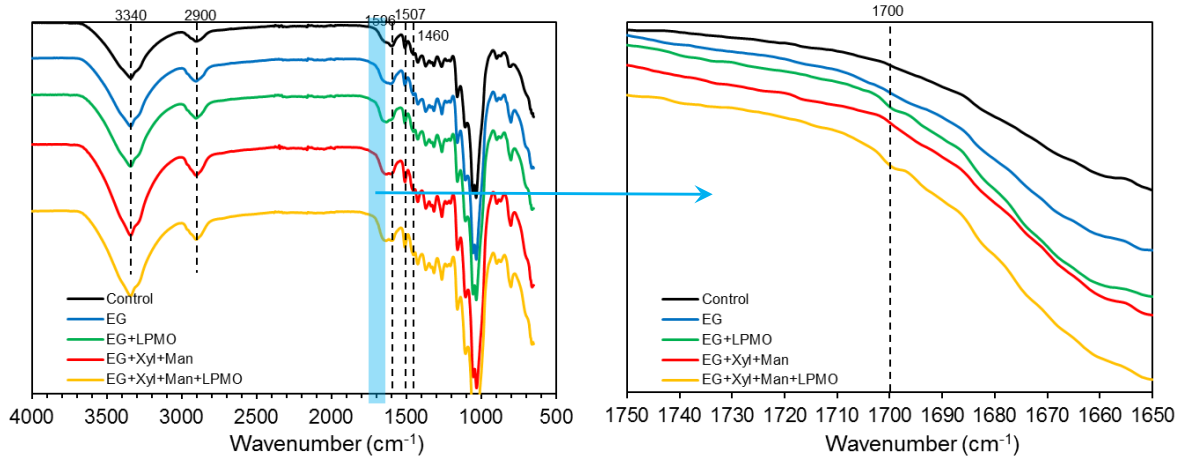


图 8.4 不同酶处理制备的纳米纤维素的红外光谱图像

Fig. 8.4 FTIR spectra of produced LCNFs by different enzymatic treatment

对于所获得的不同酶处理制备的 LCNF, 我们接下来从结晶度、热稳定性及 Zeta 电位的角度进行比较 (表 8.2)。由于 EG 可以水解纤维素不定型区, 因此制备的 LCNF 的结晶度 (67%) 高于直接机械处理制备的 LCNF (62%); 而 LPMO 的协同作用略微促进了 EG 的处理效果 (68%), 文献报道 LPMO 也可以略微提高纤维素结晶度^[119]; 当 EG 与木聚糖酶、甘露聚糖酶一起使用时, 半纤维素酶对半纤维素的移除促进了 EG 对不定型纤维素的水解, 同时, 由于半纤维素均为不定型的, 其移除本身也提高了结晶度 (70%); 四种酶一起使用时, 制备的 LCNF 结晶度最高 (72%)。由于结晶度是相对数值, 此处仅可以说明酶对于纤维的处理作用, 并不是 LCNF 真正含有 70% (w/w) 的结晶纤维素。而不同酶处理下, 纤维素结晶尺寸均不变 (7 nm), 说明上述酶处理主要作用于半纤维素和不定型纤维素, 对纤维素结晶基本单元影响较小。

表 8.2 不同酶处理制备的含木质素的纤维素纳米纤丝特性

Table 8.2 Characteristics of produced LCNFs by different enzymatic treatment

LCNF	Ti (°C)	Tmax (°C)	Crystallinity index (%)	Crystallite size (nm)	Zeta potential (mV)
Control	230	283	62	7	-27.0±0.5
EG	236	291	67	7	-27.1±0.6
EG+LPMO	234	294	68	7	-28.7±0.4
EG+Xyl+Man	240	299	70	7	-30.3±0.3
EG+Xyl+Man+LPMO	237	299	72	7	-30.5±0.3

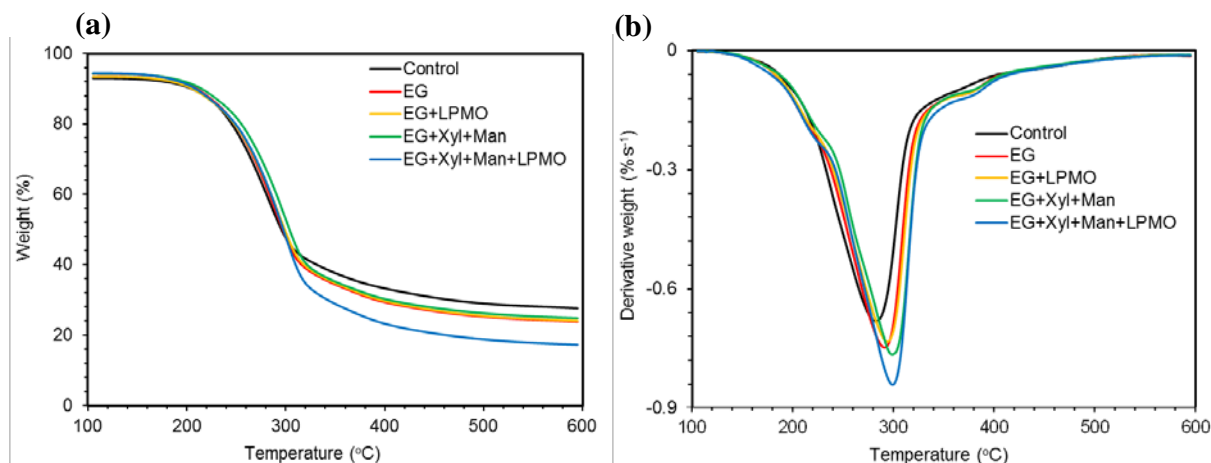


图 8.5 不同酶处理制备的纳米纤维素的热稳定性

Fig. 8.5 Comparison of thermal stability of produced LCNFs by different enzymatic treatment

(a) 热重曲线; (b) 微商热重曲线。

热重分析用于研究不同 LCNF 的热稳定性 (图 8.5, 表 8.2), T_i 指开始降解时的温度, 而 T_{max} 指降解速率最快时的温度^[206]。EG 处理相比于对照组而言, 热稳定性有所提高, 原因在于纤维素结晶区比例的提高, 结晶纤维素的热稳定性高于不定型纤维素^[119]; EG 与 LPMO 协同处理后热稳定性进一步提高, 原因在于 LPMO 的协同作用略微促进了 EG 的处理效果; 当半纤维素酶与 EG 一起加入时, LCNF 热稳定性进一步提高, 原因一方面在于半纤维素酶可以移除半纤维素从而协助增强 EG 的处理效果, 另一方面在于移除的半纤维素自身热稳定性差, 其移除本身就会一定程度上提高热稳定性。当四种酶一起使用时, 制备的 LCNF 具备最好的热稳定性。

Zeta 电位可以显示 LCNF 在水悬液中的稳定性 (表 8.2), 一般 Zeta 电位绝对值大于 40 mV 的水悬液体系非常稳定, 纳米纤维素不易沉降; 而小于 20 mV 则不稳定, 纳米纤维素易聚集沉降, 其影响因素很多, 如表面电荷、尺寸等。如表 8.2, 酶处理后制备的 LCNF 的 Zeta 电位逐渐提高, 其原因我们推测是因为多种酶处理后制备的 LCNF 中很少有较大的纳米纤维素团聚存在, 而只经过机械处理制备的 LCNF 有很多微纤丝聚集, 平均尺寸的减小有助于增加比表面积, 利于其在水中的分散 (图 8.3)。此外, LPMO 还具备在纤维上增加羧基基团的效果, 负电荷的相互排斥作用有利于 LCNF 在水中的分散, 使水悬液体系趋于更加稳定的状态。

8.4 本章小结

内切葡聚糖酶 (EG) 可以有效促进化学浆纳米纤维化, 但没有相关研究报道其对机械浆的处理效果。本章首先对机械浆进行中性磺化, 增加酶对纤维素的接近性, 之后研究了 EG 对软木机械浆纤维纳米纤维化的促进效果。在此基础上, 探究其他辅助酶对于 EG 的协助作用。

不同于处理化学浆, EG 对高木质素含量机械浆的纳米纤维化促进效果有限。半纤维素酶特别是木聚糖酶可以有效协助 EG 打开纤维结构, 显著促进机械浆纳米纤维化。

LPMO 可以在纤维素上加入一定量的羧基，促进机械浆纳米纤维化，但作用效果有限。

就最终机械法制备的 LCNF 而言，EG 处理可以有效减少纳米纤维团聚(40-50 nm)的存在，EG 与 LPMO 一起加入可以进一步疏松这种团聚，EG 与半纤维素酶一起加入可以使得制备的 LCNF 明显更加均一，基本无团聚存在。

本章还就结晶度、热稳定性及 Zeta 电位讨论了不同酶处理后制备的 LCNF 的性质。结果发现，EG 单独加入或者与 LPMO、半纤维素酶一起加入均可以有效提高 LCNF 结晶度与热稳定性，并且可以略微提高 LCNF 在水悬液中的稳定性。

本章对不同酶在机械浆纳米纤维化中发挥的作用进行了初步探索，但由于采用了“一锅法”加入不同酶，无法清楚的判断是辅助酶单独发挥的作用还是其处理后提高了 EG 的处理效果。下一步我们可以分步加入不同酶，对每一步的处理效果进行比较，明确不同酶在机械浆纳米纤维化中发挥的作用及局限性。

第 9 章 结论与展望

9.1 结论

木质纤维素的有效解聚是破坏其致密结构以实现高值化利用的关键步骤，而木质纤维素生物质中水溶性组分的利用是生物炼制过程亟需解决的重要问题。本文的第 2-6 章以干法生物炼制技术为平台，提出了解决农作物秸秆类型的生物质预理解聚效率不稳定的方法；对玉米秸秆中富含的水溶性碳水化合物提出了有效的利用策略；对玉米秸秆富含的 B 族维生素组分对于乳酸发酵过程的促进进行了研究；对玉米叶富含的生物素提出了有效的富集提取方案。上述研究极大拓展了生物炼制糖平台的研究思路和发展潜力。本文的第 7-8 章在纳米纤维素生产过程中，实现了酶法促进软木机械浆的有效解聚并探索了不同酶发挥的作用，这两项研究拓展了生物炼制生产纳米纤维素的工艺路线。以下是本论文逐个章节得到的主要结论。

(1) 预处理效率随原料批次不同的频繁变化限制了生物炼制糖平台技术的工业化，本文第二章揭示了农作物秸秆中的碱性灰分物质中和了部分酸催化剂并降低了预处理效率，而不同批次农作物秸秆灰分含量的变化显著影响了基于酸的预处理效率的稳定性。本章提出了一个简单、快捷的调节预处理效率的方法，基准 pH 调节法，本方法首先使用彻底清洗除尘的物料进行预处理参数调整实验，确定基准酸用量及其悬浊液的基准 pH，再将不同灰分含量的物料滴定至基准 pH，所用的酸即为不同灰分含量物料对应的酸用量。本方法可以普遍应用到不同的生物质原料（玉米秸秆、麦秆及稻草），可以适用于不同的发酵菌株（酵母菌及乳酸菌），可以用于生产不同的发酵产品（乙醇及乳酸），可以用于不同的发酵过程（同步糖化发酵及同步糖化共发酵），对于原料而言，本方法甚至可以应用到不进行任何除尘操作的木质纤维素生物质中。本章提出了一种具备工业化应用价值的提高木质纤维素预处理效率稳定性的方法。

(2) 农作物秸秆特别是玉米秸秆中含有丰富的水溶性碳水化合物如葡萄糖和果糖，本文第三章发现这些糖极易在干酸预处理过程降解为 5-羟甲基糠醛（HMF），难以保留至发酵工段加以利用，因此本章提出了一个提高纤维素乳酸生物炼制效率的水溶性糖利用方案。首先对玉米秸秆进行固态乳酸发酵将水溶性碳水化合物转化为 L-乳酸，接着将含有乳酸的秸秆进行常规干法生物炼制，将纤维素及半纤维素转化为相同的 L-乳酸产品。经过水溶性碳水化合物转化处理，预处理后秸秆中的 HMF 生成显著降低，脱毒时间大幅缩短，最终得到的 L-乳酸浓度从 130.2 g/L 提高至 139.0 g/L，乳酸最低售价降低 5.9%。本章为木质纤维素生物炼制糖平台生产生物基化学品提供了一种重要的工艺选择。

(3) 本文第四章在提高饲料可消化率的角度提出了另一种水溶性碳水化合物的利用方案。蒸汽处理可以有效解聚木质纤维素结构，提高纤维素及半纤维素在瘤胃中的可消化性，但会造成水溶性碳水化合物的浪费及 HMF 的产生。本章在蒸汽处理前的原料储存工段将水溶性碳水化合物固态发酵转化为乳酸，再进行蒸汽处理。该内源乳酸催化

的蒸汽处理具备如下优点：预处理过程将半纤维素水解为更多的单糖与寡糖，增加了纤维素的可接近性，提高了后续纤维素的酶水解转化率，有利于反刍动物对于饲料的消化；降低了有毒的 HMF 生成量；固态发酵过程将易被高温降解的水溶性糖转化为耐高温性较强的乳酸及副产物乙酸，可以被反刍动物转化利用，增加了原料的能量利用率。本章在饲料生产方向为转化利用水溶性碳水化合物提出了重要的工艺选项。

(4) B 族维生素组分的保留和利用在常规木质纤维素生物炼制过程鲜有关注，本文第五章揭示了玉米秸秆水解液中的 B 族维生素组分可以促进 L-乳酸发酵，在水解液中添加其含量不足的泛酸 (B₅) 及烟酸 (B₃) 可以进一步提高乳酸生产效率。本研究指出了生物炼制预理解聚过程中保留维生素的重要性，为木质纤维素生物炼制糖平台拓展了新的原料利用方案。

(5) 本文第六章使用微生物法从木质纤维素生物质中提取生物素。生物素是许多发酵过程所需的重要营养物质，玉米叶中的生物素含量 (1217.4 μg/kg) 远高于玉米秆 (143.9 μg/kg)，干法生物炼制技术可以将这些生物素基本完全保留于水解液中。本章根据生物素缺陷型菌株从外界吸收生物素的特性，使用谷氨酸棒杆菌对水解液中的生物素进行富集提取，并通过过表达生物素转运基因 *bioYMN* 强化其提取效果，获得了极高生物素含量的细胞提取物 (303.8 mg/kg DCW)，该浓度远高于酵母粉 (~2 mg/kg) 等常用的富含生物素的发酵营养添加剂，最后将该细胞提取物成功的应用于谷氨酸发酵过程。本章首创了一条独特的生物素发酵营养添加剂的生产工艺，为木质纤维素生物质的高值化利用开辟了一条全新的技术路线。

(6) 本文第七章以温和的中性磺化处理与纤维素酶处理促进了软木机械浆纳米纤维化。中性磺化处理可以有效增加机械浆纤维的纤维素酶可接近性，而不同时间的酶处理均对机械浆纤维解聚有促进作用。相比于未经酶处理的磺化机械浆而言，诺维信酶 CTec 3 处理 12 h 后，在同样机械处理强度下可以得到更高的含木质素的纤维素纳米纤维 (LCNF) 得率 (从 14.5% 提高至 29.0%)，而水解时间的延长有利于获得较高的可发酵糖得率，此时 LCNF 得率也高于未经处理的磺化机械浆。以 12 h 酶处理并机械处理后生产的 LCNF 制备的薄膜，透光性较好，接触角高 (80.4°)，推测该 LCNF 与疏水材料的兼容性强于不含木质素的纳米纤维素。

(7) 本文第八章进一步探究了内切葡聚糖酶 (EG) 及辅助酶 (木聚糖酶、甘露聚糖酶及多糖裂解单加氧酶 (LPMO)) 对于软木机械浆纳米纤维化的促进作用。不同于 EG 对化学浆的处理效果，木质素及半纤维素的存在限制了 EG 在机械浆中发挥作用；半纤维素酶特别是木聚糖酶可以显著协助 EG 打开纤维结构，促进机械浆纳米纤维化，最终制备的 LCNF 尺寸比较均一；LPMO 可以在纤维上加入一定量的羧基，促进其纳米纤维化，但作用效果有限。此外，内切葡聚糖酶、半纤维素酶及 LPMO 的加入均可以提高机械法制备的 LCNF 的结晶度与热稳定性，并且可以略微提高 LCNF 在水悬液中的稳定性。本章对不同酶在机械浆纳米纤维化过程发挥的作用进行了初步探索。

9.2 创新点

(1) 提出了基准 pH 调节法,可以快速简便的根据原料灰分含量不同调整预处理酸用量,并且可以推广至不同原料及不同发酵过程,具有较为普遍的应用价值。

(2) 通过预处理前的固态发酵转化,实现了玉米秸秆中水溶性碳水化合物的产品化利用,并有效提高了生物炼制转化效率。提出了水溶性碳水化合物在饲料生产过程的应用策略。

(3) 发现了木质纤维素生物质中的 B 族维生素组分对于 L-乳酸发酵的促进作用以及生物炼制过程中保留水溶性维生素的必要性。实现了木质纤维素生物质中生物素的微生物法富集提取,并成功应用于谷氨酸发酵过程。

(4) 实现了酶法促进软木机械浆纳米纤维化并联产可发酵糖的技术路线;探究了内切葡聚糖酶及辅助酶在机械浆纳米纤维化中发挥的作用。

9.3 展望

本研究以干法生物炼制技术为基础，解决了预理解聚效率不稳定的问题，重点对农作物秸秆中富含的水溶性碳水化合物及 B 族维生素提出了不同的利用策略，极大拓展了生物炼制糖平台的研究思路和发展潜力；联合培养期间在纳米纤维素生产过程成功的实现了酶法促进软木机械浆解聚。但本论文依旧存在许多需要解决的问题及可以拓展的方面。

(1) 玉米秸秆中钾离子及镁离子含量较高，这些农作物生长过程中吸收的离子对于不同发酵过程的影响有待于进一步探究。

(2) 水溶性碳水化合物的利用策略已经成功应用于干法生物炼制技术生产纤维素 L-乳酸的过程中，未来可以使用该策略生产其他生物基化学品如衣康酸、葡萄糖酸等；也可以将该思路拓展至其他干法预处理过程如氨纤维膨爆预处理 (AFEX) 等。

(3) 将水溶性碳水化合物转化为内源乳酸催化剂提高了蒸汽处理秸秆的纤维素水解得率，但其在体外发酵实验、体内消化实验及动物饲喂实验的效果有待于进一步验证。

(4) 进一步挖掘玉米秸秆水解液中除维生素 B 外促进 L-乳酸发酵的活性物质；探索木质纤维素水解液对于其他生物基化学品发酵过程的促进作用。

(5) 测试富含生物素的细胞提取物中其他组分的含量 (氨基酸、核苷酸、维生素等)；寻找可以富集木质纤维素生物质中其他含量较高的维生素 (如核黄素) 的微生物，并生产相关提取物。

(6) 比较磺化前后机械法制备的 LCNF 的性质，探究磺化对于 LCNF 的影响。

(7) 将“一锅法”加入不同酶改为分步加入酶，明确不同酶在机械浆纳米纤维化中的作用。先进行机械处理制备 LCNF，再用酶法进行后处理，探究该策略对于 LCNF 性质的影响。

参考文献

- [1] National Renewable Energy Laboratory (NREL). What is a biorefinery? Available from: <http://www.nrel.gov/biomass/biorefinery.html>.
- [2] International Energy Agency. Key world energy statistics. Available from: http://www.iea.org/publications/freepublications/publication/key_world_energy_stats-1.pdf. 2011.
- [3] Brown T, Brown R. A review of cellulosic biofuel commercial-scale projects in the United States. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2013, 7: 235-245.
- [4] Fernando S, Adhikari S, Chandrapal C, et al. Biorefineries: current status, challenges, and future direction. *Energy & Fuels*. 2006, 20: 1727-1737.
- [5] Kamm B, Kamm M. Principles of biorefineries. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2004, 64: 137-145.
- [6] Rostrup-Nielsen JR. Making fuels from biomass. *Science*. 2005, 308: 1421-1422.
- [7] Rubin EM. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*. 2008, 454: 841-845.
- [8] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: Fundamentals and biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2002, 66: 506-577.
- [9] Banerjee S, Mudliar S, Sen R, et al. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2010, 4: 77-93.
- [10] Meng X, Ragauskas AJ. Recent advances in understanding the role of cellulose accessibility in enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014, 27: 150-158.
- [11] Popper ZA. Evolution and diversity of green plant cell walls. *Current Opinion in Plant Biology*. 2008, 11: 286-292.
- [12] Bonner IJ, Smith WA, Einerson JJ, et al. Impact of harvest equipment on ash variability of baled corn stover biomass for bioenergy. *BioEnergy Research*. 2014, 7: 845-855.
- [13] Kochian LV. Molecular physiology of mineral nutrient acquisition, transport, and utilization. In *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*; Buchanan, B., Eds.; American Society of Plant Physiologists press: Rockville, M.D., U.S., 2000.
- [14] Tao G, Geladi P, Lestander TA, et al. Biomass properties in association with plant species and assortments. II: a synthesis based on literature data for ash elements. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*. 2012, 16: 3507-3522.
- [15] Vassilev SV, Baxter D, Andersen LK, et al. An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. *Fuel*. 2012, 94: 1-33.
- [16] Niu W, Han L, Liu X, et al. Twenty-two compositional characterizations and theoretical energy potentials of extensively diversified China's crop residues. *Energy*. 2016, 100: 238-250.
- [17] Chen S, Mowery RA, Scarlata CJ, et al. Compositional analysis of water-soluble

- materials in corn stover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2007, 55: 5912-5918.
- [18] 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: 7100-7110.
- [19] Wen J, Xiao Y, Liu T, et al. Rich biotin content in lignocellulose biomass plays the key role in determining cellulosic glutamic acid accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, 11: 132.
- [20] Carpita NC, McCann MC. The Cell Wall. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2000, 52-109.
- [21] Cai Y, Bhuiya MW, Shanklin J, et al. Engineering a monoglucosyltransferase with high selectivity for the condensed lignin precursor coniferyl alcohol. *Journal of Biological Chemistry*. 2015, 290: 26715-26724.
- [22] Kumar L, Arantes V, Chandra R, et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. *Bioresource Technology*. 2012, 103: 201-208.
- [23] Long L, Tian D, Hu J, et al. A xylanase-aided enzymatic pretreatment facilitates cellulose nanofibrillation. *Bioresource Technology*. 2017, 243: 898-904.
- [24] Wyman CE, Dale BE. Producing biofuels via the sugar platform. *Chemical Engineering Progress*. 2015, 111: 45-51.
- [25] Qiu H, Sun L, Xu X, et al. Potentials of crop residues for commercial energy production in China: A geographic and economic analysis. *Biomass & Bioenergy*. 2014, 64: 110-123.
- [26] Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, et al. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4851-4861.
- [27] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, et al. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technology*. 2005, 96: 1959-1966.
- [28] Modenbach AA, Nokes SE. The use of high-solids loadings in biomass pretreatment - a review. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, 109: 1430-1442.
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Zhu J, Wang G, Pan X, et al. Specific surface to evaluate the efficiencies of milling and pretreatment of wood for enzymatic saccharification. *Chemical Engineering Science*. 2009, 64: 474-485.
- [32] Sasmal S, Goud VV, Mohanty K. Ultrasound assisted lime pretreatment of

- lignocellulosic biomass toward bioethanol production. *Energy & Fuels*. 2012, 26: 3777-3784.
- [33] Dashtban M, Schraft H, Qin W. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues; Opportunities & Perspectives. *International Journal of Biological Sciences*. 2009, 5: 578-595.
- [34] Tian X, Fang Z, Guo F. Impact and prospective of fungal pre-treatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2012, 6: 335-350.
- [35] Bak JS, Ko JK, Choi IG, et al. Fungal pretreatment of lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium* to produce ethanol from rice straw. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009, 104: 471-482.
- [36] Pingali SV, Urban VS, Heller WT, et al. Breakdown of cell wall nanostructure in dilute acid pretreated biomass. *Biomacromolecules*. 2010, 11: 2329-2335.
- [37] Lloyd TA, Wyman CE. Predicted effects of mineral neutralization and bisulfate formation on hydrogen ion concentration for dilute sulfuric acid pretreatment. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004, 113: 1013-1022.
- [38] Shi S, Guan W, Kang L, et al. Reaction kinetic model of dilute acid-catalyzed hemicellulose hydrolysis of corn stover under high-solid conditions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2017, 56: 10990-10997.
- [39] Liu Z, Chen H. Xylose production from corn stover biomass by steam explosion combined with enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*. 2015, 193: 345-356.
- [40] Kabel MA, Bos G, Zeevalking J, et al. Effect of pretreatment severity on xylan solubility and enzymatic breakdown of the remaining cellulose from wheat straw. *Bioresource Technology*. 2007, 98: 2034-2042.
- [41] Chandra RP, Chu Q, Hu J, et al. The influence of lignin on steam pretreatment and mechanical pulping of poplar to achieve high sugar recovery and ease of enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 135-141.
- [42] De Bari I, Nanna F, Braccio G. SO₂-catalyzed steam fractionation of aspen chips for bioethanol production: Optimization of the catalyst impregnation. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2007, 46: 7711-7720.
- [43] Huang C, Wu X, Huang Y, et al. Prewashing enhances the liquid hot water pretreatment efficiency of waste wheat straw with high free ash content. *Bioresource Technology*. 2016, 219: 583-588.
- [44] Michelin M, Teixeira JA. Liquid hot water pretreatment of multi feedstocks and enzymatic hydrolysis of solids obtained thereof. *Bioresource Technology*. 2016, 216: 862-869.
- [45] Hu J, Zhang Z, Lin Y, et al. High-titer lactic acid production from NaOH-pretreated corn stover by *Bacillus coagulans* LA204 using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation under nonsterile condition. *Bioresource Technology*. 2015, 182: 251-257.
- [46] 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.
- [47] 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.
- [48] Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6: 16.
- [49] Palmqvist E, Hahn-Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 2000, 74: 17-24.
- [50] 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.
- [51] Martinez A, Rodriguez ME, York SW, et al. Effects of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ treatments (“overliming”) on the composition and toxicity of bagasse hemicellulose hydrolysates. *Biotechnology and Bioengineering*. 2000, 69: 526-536.
- [52] Mohagheghi A, Ruth M, Schell DJ. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields. *Process Biochemistry*. 2006, 41: 1806-1811.
- [53] Liu Y, Liu G, Zhang J, et al. Itaconic acid fermentation using activated charcoal-treated corn stover hydrolysate and process evaluation based on Aspen plus model. *Biomass Conversion and Biorefinery*. DOI: 10.1007/s13399-019-00423-3.
- [54] 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.
- [55] Zhu J, Zhu W, Obryan P, et al. Ethanol production from SPORL-pretreated lodgepole pine: preliminary evaluation of mass balance and process energy efficiency. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 86: 1355-1365.
- [56] Dong H, Bao J. Biofuel via biodetoxification. *Nature Chemical Biology*. 2010, 6: 316-318.
- [57] Lopez MJ, Nichols NN, Dien BS, et al. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64: 125-131.
- [58] Wierckx N, Koopman F, Bandounas L, et al. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microbial Biotechnology*. 2010, 3: 336-343.
- [59] Nichols NN, Dien BS, Cotta MA. Fermentation of bioenergy crops into ethanol using biological abatement for removal of inhibitors. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 7545-7550.
- [60] Jorgensen H, Kristensen JB, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels Bioproducts and*

- Biorefining. 2007, 1: 119-134.
- [61] Zhai R, Hu J, Saddler JN. What are the major components in steam pretreated lignocellulosic biomass that inhibit the efficacy of cellulase enzyme mixtures? ACS Sustainable Chemistry & Engineering. 2016, 4: 3429-3436.
- [62] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic L-lactic acid fermentation. Bioresource Technology. 2018, 249, 9-15.
- [63] 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: 51.
- [64] Gu H, 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.
- [65] Qureshi AS, Zhang J, Bao J. High ethanol fermentation performance of the dry dilute acid pretreated corn stover by an evolutionarily adapted *Saccharomyces cerevisiae* strain. Bioresource Technology. 2015, 189: 399-404.
- [66] Wang X, Gao Q, Bao J. Enhancement of furan aldehydes conversion in *Zymomonas mobilis* by elevating dehydrogenase activity and cofactor regeneration. Biotechnology for Biofuels. 2017, 10: 24.
- [67] Cotana F, Cavalaglio G, Gelosia M, et al. A comparison between SHF and SSSF processes from cardoon for ethanol production. Industrial Crops and Products. 2015, 69: 424-432.
- [68] Ask M, Olofsson K, Di Felice T, et al. Challenges in enzymatic hydrolysis and fermentation of pretreated *Arundo donax* revealed by a comparison between SHF and SSF. Process Biochemistry. 2012, 47: 1452-1459.
- [69] Zhang J, Chu D, Huang J, et al. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. Biotechnology and Bioengineering. 2010, 105: 718-728.
- [70] Zhang J, Wang X, Chu D, et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. Bioresource Technology. 2011, 102: 4480-4488.
- [71] He Y, Zhang L, 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.
- [72] He Y, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation. Bioresource Technology. 2014, 158: 360-364.
- [73] Shao S, Zhang J, Bao J. Reduction of reactor corrosion by eliminating liquid phase existence in dry dilute acid pretreatment of corn stover. Energy & Fuels. 2017, 31: 6140-6144.
- [74] Shao S, Zhang J, Hou W, et al. Lower pressure heating steam is practical for the

- distributed dry dilute sulfuric acid pretreatment. *Bioresource Technology*. 2017, 238: 744-748.
- [75] 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.
- [76] Zhang J, Zhu Z, Wang X, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus *Amorphotheca resinae* ZN1 and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26.
- [77] He Y, 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.
- [78] Ran H, Zhang J, Gao Q, et al. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7: 51.
- [79] Wang X, Gao Q, Bao J. Transcriptional analysis of *Amorphotheca resinae* ZN1 on biological degradation of furfural and 5-hydroxymethylfurfural derived from lignocellulose pretreatment. *Biotechnology for Biofuels*. 2015, 8: 1-13.
- [80] Gao X, Gao Q, Bao J. Tolerance response and metabolism of acetic acid by biodetoxification fungus *Amorphotheca resinae* ZN1. *Journal of Biotechnology*. 2018, 275: 31-39.
- [81] Yi X, Gao Q, Zhang L, et al. Heterozygous diploid structure of *Amorphotheca resinae* ZN1 contributes efficient biodetoxification on solid pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12: 126.
- [82] Liu G, Zhang Q, Li H, et al. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2018, 115: 60-69.
- [83] Chen X, Kuhn E, Jennings EW, et al. DMR (deacetylation and mechanical refining) processing of corn stover achieves high monomeric sugar concentrations (230 g L^{-1}) during enzymatic hydrolysis and high ethanol concentrations ($> 10\% \text{ v/v}$) during fermentation without hydrolysate purification or concentration. *Energy & Environmental Science*. 2016, 9: 1237-1245.
- [84] Hou W, Li L, Bao J. Oxygen transfer in high solids loading and highly viscous lignocellulose hydrolysates. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2017, 5: 11395-11402.
- [85] Hou W, Zhang M, Bao J. Cascade hydrolysis and fermentation of corn stover for production of high titer gluconic and xylonic acids. *Bioresource Technology*. 2018, 264: 395-399.
- [86] 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.
- [87] Liu G, Sun J, Zhang J, et al. High titer L-lactic acid production from corn stover with

- minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen plus modeling. *Bioresource Technology*. 2015, 198: 803-810.
- [88] 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.
- [89] 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.
- [90] Qureshi AS, Zhang J, Sousa LDC, et al. Antibacterial peptide secreted by *Pediococcus acidilactici* enables efficient cellulosic open L-lactic acid fermentation. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2017, 5: 9254-9262.
- [91] Yi X, Zhang P, Sun J, et al. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer l- and d-lactic acid production from corn stover feedstock. *Journal of Biotechnology*. 2016, 217: 112-121.
- [92] Wang J, Gao Q, Zhang H, et al. Inhibitor degradation and lipid accumulation potentials of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* using lignocellulose feedstock. *Bioresource Technology*. 2016, 218: 892-901.
- [93] Zhang H, Zhang J, Bao J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource Technology*. 2016, 203: 211-219.
- [94] Zhang H, Liu G, Zhang J, et al. Fermentative production of high titer gluconic and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. *Bioresource Technology*. 2016, 219: 123-131.
- [95] Zhou P, Meng J, Bao J. Fermentative production of high titer citric acid from corn stover feedstock after dry dilute acid pretreatment and biodetoxification. *Bioresource Technology*. 2017, 224: 563-572.
- [96] He Y, Fang Z, Zhang J, et al. De-ashing treatment of corn stover improves the efficiency of enzymatic hydrolysis and consequent ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2014, 169: 552-558.
- [97] Newth FH. The formation of furan compounds from hexoses. *Advances in Carbohydrate Chemistry*. 1951, 6: 83-106.
- [98] Garcia A, Labidi J, Belgacem MN, et al. The nanocellulose biorefinery: woody versus herbaceous agricultural wastes for NCC production. *Cellulose*. 2017, 24: 693-704.
- [99] Thomas B, Raj MC, Athira KB, et al. Nanocellulose, a versatile green platform: from biosources to materials and their applications. *Chemical Reviews*. 2018, 118: 11575-11625.
- [100] Klemm D, Kramer F, Moritz S, et al. Nanocelluloses: A new family of nature-based materials. *Angewandte Chemie International Edition*. 2011, 50: 5438-5466.
- [101] Lin N, Dufresne A. Nanocellulose in biomedicine: Current status and future prospect. *European Polymer Journal*. 2014, 59: 302-325.
- [102] Khalil HPSA, Davoudpour Y, Islam MN, et al. Production and modification of

- nanofibrillated cellulose using various mechanical processes: A review. *Carbohydrate Polymers*. 2014, 99: 649-665.
- [103] Nechyporchuk O, Belgacem MN, Bras J. Production of cellulose nanofibrils: A review of recent advances. *Industrial Crops and Products*. 2016, 93: 2-25.
- [104] Habibi Y. Key advances in the chemical modification of nanocelluloses. *Chemical Society Reviews*. 2014, 43: 1519-1542.
- [105] Chinomso ME, Liu X, Wu M, et al. Lignin-containing cellulose nanomaterials: A promising new nanomaterial for numerous applications. *Journal of Bioresources and Bioproducts*. 2019, 1: 3-10.
- [106] Zheng Q, Cai Z, Ma Z, et al. Cellulose nanofibril/reduced graphene oxide/carbon nanotube hybrid aerogels for highly flexible and all-solid-state supercapacitors. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2015, 7: 3263-3271.
- [107] Sixta H. *Handbook of Pulp*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaH, Weinheim, Germany. 2006.
- [108] Bajpai P. *Environmentally friendly production of pulp and paper*. John Wiley & Sons, New Jersey, 2010.
- [109] Bian H, Chen L, Dai H, et al. Integrated production of lignin containing cellulose nanocrystals (LCNC) and nanofibrils (LCNF) using an easily recyclable di-carboxylic acid. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 167: 167-176.
- [110] Luo J, Huang K, Xu Y, et al. A comparative study of lignocellulosic nanofibrils isolated from celery using oxalic acid hydrolysis followed by sonication and mechanical fibrillation. *Cellulose*. 2019, 26: 5237-5246.
- [111] Patankar SC, Renneckar S. Greener synthesis of nanofibrillated cellulose using magnetically separable TEMPO nanocatalyst. *Green Chemistry*. 2017, 19: 4792-4797.
- [112] Wen Y, Yuan Z, Liu X, et al. Preparation and characterization of lignin-containing cellulose nanofibril from poplar high-yield pulp via TEMPO-mediated oxidation and homogenization. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2019, 7: 6131-6139.
- [113] Bolaski W, Gallatin A, Gallatin JC. Enzymatic conversion of cellulosic fibers. U.S. Patent 1962, 3041246.
- [114] Mansfield SD, Swanson DJ, Roberts N, et al. Enhancing Douglas-fir pulp properties with a combination of enzyme treatments and fiber fractionation. *Tappi Journal*. 1999, 82: 152-158.
- [115] Hidayat BJ, Felby C, Johansen KS, et al. Cellulose is not just cellulose: a review of dislocations as reactive sites in the enzymatic hydrolysis of cellulose microfibrils. *Cellulose*. 2012, 19: 1481-1493.
- [116] Filson PB, Dawson-Andoh BE, Schwegler-Berry D. Enzymatic-mediated production of cellulose nanocrystals from recycled pulp. *Green Chemistry*. 2009, 11: 1808-1814.
- [117] Liu X, Jiang Y, Qin C, et al. Enzyme-assisted mechanical grinding for cellulose nanofibers from bagasse: energy consumption and nanofiber characteristics. *Cellulose*. 2018, 25: 7065-7078.
- [118] Paakko M, Ankerfors M, Kosonen H, et al. Enzymatic hydrolysis combined with

- mechanical shearing and high-pressure homogenization for nanoscale cellulose fibrils and strong gels. *Biomacromolecules*. 2007, 8: 1934-1941.
- [119] Hu J, Tian D, Renneckar S, et al. Enzyme mediated nanofibrillation of cellulose by the synergistic actions of an endoglucanase, lytic polysaccharide monooxygenase (LPMO) and xylanase. *Scientific Reports*. 2018, 8: 3195.
- [120] Zhu J, Sabo R, Luo X. Integrated production of nano-fibrillated cellulose and cellulosic biofuel (ethanol) by enzymatic fractionation of wood fibers. *Green Chemistry*. 2011, 13: 1339-1344.
- [121] Beyene D, Chae M, Dai J, et al. Enzymatically-mediated co-production of cellulose nanocrystals and fermentable sugars. *Catalysts*. 2017, 7: 11.
- [122] Wang M, Li Z, Fang X, et al. Cellulolytic enzyme production and enzymatic hydrolysis for second-generation bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering-Biotechnology*. 2012, 128: 1-24.
- [123] Nechyporchuk O, Pignon F, Belgacem MN. Morphological properties of nanofibrillated cellulose produced using wet grinding as an ultimate fibrillation process. *Journal of Materials Science*. 2015, 50: 531-541.
- [124] Lacey JA, Emerson RM, Westover TL, et al. Ash reduction strategies in corn stover facilitated by anatomical and size fractionation. *Biomass & Bioenergy*. 2016, 90: 173-180.
- [125] Thompson VS, Lacey JA, Hartley D, et al. Application of air classification and formulation to manage feedstock cost, quality and availability for bioenergy. *Fuel*. 2016, 180: 497-505.
- [126] Chen Y, Stevens MA, Zhu Y, et al. Reducing acid in dilute acid pretreatment and the impact on enzymatic saccharification. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2012, 39: 691-700.
- [127] Schell DJ, Farmer J, Newman M, et al. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor-Investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2003, 105: 69-85.
- [128] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of ash in biomass. Laboratory Analytical Procedure. Technical Report NREL/TP-510-42622. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden, Colorado: NREL, 2005.
- [129] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass. Laboratory Analytical Procedure. Technical Report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden CO. 2012.
- [130] Adney B, Baker J. Measurement of cellulase activities. Laboratory analytical procedure. Technical Report NREL/TP510-42628. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden CO. 1996.
- [131] Ghose T. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59: 257-268.
- [132] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72: 248-254.
- [133] Chu D, Zhang J, Bao J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of corn stover at high temperature and high solids loading by a thermotolerant strain *Saccharomyces cerevisiae* DQ1. *Bioenergy Research*. 2012, 5: 1020-1026.
- [134] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of Sugars, Byproducts, and Degradation Products in Liquid Fraction Process Samples. Laboratory Analytical Procedure. Technical Report NREL/TP-510-42623. National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden CO. 2008.
- [135] Brown L, Torget R. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Laboratory Analytical Procedure (LAP)-009. NREL: Golden, CO. 1996; Report NREL/TP-510-42629.
- [136] Angles MN, Reguant J, Martinez JM, et al. Influence of the ash fraction on the mass balance during the summative analysis of high-ash content lignocellulosics. *Bioresource Technology*. 1997, 59: 185-193.
- [137] Galletti GC, Reeves JBI, Bocchini P, et al. Compositional differentiation of maize hybrid stovers using analytical pyrolysis and high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1997, 45: 1715-1719.
- [138] Montross MD, Crofcheck CL. Effect of stover fraction and storage method on glucose production during enzymatic hydrolysis. *Bioresource Technology*. 2004, 92: 269-274.
- [139] Pordesimo LO, Hames BR, Sokhansanj S, et al. Variation in corn stover composition and energy content with crop maturity. *Biomass & Bioenergy*. 2005, 28: 366-374.
- [140] Richter K, Träger A. L(+)-Lactic acid from sweet sorghum by submerged and solid-state fermentations. *Acta Biotechnologica*. 1994, 4: 367-378.
- [141] Farah S, Anderson DG, Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications- A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2016, 107: 367-392.
- [142] Nampoothiri NK, Nair NR, John RP. An overview of the recent developments in polylactide (PLA) research. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 8493-8501.
- [143] Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Lactic acid production from lignocellulose-derived sugars using lactic acid bacteria: overview and limits. *Journal of Biotechnology*. 2011, 156: 286-301.
- [144] Fitzsimons A, Duffner F, Curtin D, et al. Assessment of *Pediococcus acidilactici* as a potential silage inoculant. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 58: 3047-3052.
- [145] Humbird D, Davis R, Tao L, et al. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. NREL/TP-5100-47764. National Renewable Energy Laboratory, Golden, Colorado, 2011.
- [146] Ma S, Eckhoff SR. Economy of scale for biomass refineries: bulk densities, transportation cost, and producer incentives. *Transactions of the ASABE*. 2014, 57:

- 85-91.
- [147] Buxton DR, Redfearn DD. Plant limitations to fiber digestion and utilization. *Journal of Nutrition*. 1997, 127: 814-818.
- [148] Clauss M, Fritz J, Tschuor A, et al. Dry matter and digesta particle size gradients along the goat digestive tract on grass and browse diets. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*. 2017, 101: 61-69.
- [149] Zhao S, Li G, Zheng N, et al. Steam explosion enhances digestibility and fermentation of corn stover by facilitating ruminal microbial colonization. *Bioresource Technology*. 2018, 253: 244-251.
- [150] Muhammad N, Nasir R, Li D, et al. Effects of steam-treated rice straw feeding on growth, digestibility, and plasma volatile fatty acids of goats under different housing systems. *Tropical Animal Health and Production*. 2014, 46: 1475-1482.
- [151] Viola E, Zimbaridi F, Cardinale M, et al. Processing cereal straws by steam explosion in a pilot plant to enhance digestibility in ruminants. *Bioresource Technology*. 2008, 99: 681-689.
- [152] Bals B, Murnen H, Allen M, et al. Ammonia fiber expansion (AFEX) treatment of eleven different forages: improvements to fiber digestibility in vitro. *Animal Feed Science and Technology*. 2010, 155: 147-155.
- [153] Pordesimo LO, Ray SJ, Buschermohle MJ, et al. Processing cotton gin trash to enhance in vitro dry matter digestibility in reduced time. *Bioresource Technology*. 2005, 96: 47-53.
- [154] Tuyen VD, Cone JW, Baars JJP, et al. Fungal strain and incubation period affect chemical composition and nutrient availability of wheat straw for rumen fermentation. *Bioresource Technology*. 2012, 111: 336-342.
- [155] Borneman WS, Akin DE, Vaneseltine WP. Effect of phenolic monomers on ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986, 52: 1331-1339.
- [156] Castro F, Hotten P, Ørskov E. Inhibition of rumen microbes by compounds formed in the steam treatment of wheat straw. *Bioresource Technology*. 1994, 50: 25-30.
- [157] Carvalho AFA, Neto PD, Da Silva DF, et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: Chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis. *Food Research International*. 2013, 51: 75-85.
- [158] Luo J, Ranadheera CS, King S, et al. In vitro investigation of the effect of dairy propionibacteria on rumen pH, lactic acid and volatile fatty acids. *Journal of Integrative Agriculture*. 2017, 16: 1566-1575.
- [159] Piveteau P. Metabolism of lactate and sugars by dairy propionibacteria: a review. *Le Lait*. 1999, 79: 23-41.
- [160] Passos DD, Pereira N, de Castro AM. A comparative review of recent advances in cellulases production by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Trichoderma* strains and their use for lignocellulose deconstruction. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2018, 14: 60-66.
- [161] Zempleni J, Suttie JW, Gregory JF, et al. *Handbook of Vitamins*, 5th ed., CRC Press:

- New York, 2014.
- [162] Klotz S, Kuenz A, Prusse U. Nutritional requirements and the impact of yeast extract on the D-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus*. *Green Chemistry*. 2017, 19: 4633-4641.
- [163] Deguchi Y, Morishita T. Nutritional requirements in multiple auxotrophic lactic acid bacteria: genetic lesions affecting amino acid biosynthetic pathways in *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, and *Pediococcus acidilactici*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1992, 56: 913-918.
- [164] Sakaguchi, K. Vitamin and amino acid requirements of *Pediococcus soyae* and *Pediococcus acidilactici* Kitahara's strain. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*. 1960, 24: 638-643.
- [165] Ford JE, Perry KD, Briggs CAE. Nutrition of lactic acid bacteria isolated from the rumen. *Journal of General Microbiology*. 1958, 18: 273-284.
- [166] Nancib A, Nancib N, Meziane-Cherif D, et al. Joint effect of nitrogen sources and B vitamin supplementation of date juice on lactic acid production by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *Bioresource Technology*. 2005, 96: 63-67.
- [167] Du Plessis LDW. The microbiology of South African winemaking. Part V. Vitamin and amino acid requirements of lactic acid bacteria from dry wines. *South African Journal of Agricultural Science*. 1963, 6: 485-494.
- [168] Macbride D, Wyatt C. Evaluation of a modified AOAC determination for thiamin and riboflavin in foods. *Journal of Food Science*. 1983, 48: 748-750.
- [169] Ollilainen V, Finglas PM, van den Berg H, et al. Certification of B-group vitamins (B₁, B₂, B₆, and B₁₂) in four food reference materials. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2001, 49: 315-321.
- [170] Golbach JL, Chalova VI, Woodward CL, et al. Adaptation of *Lactobacillus rhamnosus* riboflavin assay to microtiter plates. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2007, 20: 568-574.
- [171] Horne DW, Patterson D. *Lactobacillus casei* microbiological assay of folic acid derivatives in 96-well microtiter plates. *Clinical Chemistry*. 1988, 34: 2357-2359.
- [172] Tsuda H, Matsumoto T, Ishimi Y. Biotin, niacin, and pantothenic acid assay using lyophilized *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*. 2011, 57: 437-440.
- [173] Zhang H, Lan F, Shi Y, et al. A "three-in-one" sample preparation method for simultaneous determination of B-group water-soluble vitamins in infant formula using VitaFast (R) kits. *Food Chemistry*. 2014, 153: 371-377.
- [174] Yao C, Chou J, Wang T, et al. Pantothenic acid, vitamin C, and biotin play important roles in the growth of *Lactobacillus helveticus*. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9: 1194.
- [175] Chan PC, Bielski BHJ. Enzyme-catalyzed free radical reactions with nicotinamid adenine nucleotides. *Journal of Biological Chemistry*. 1974, 249: 1317-1319.
- [176] Kosugi A, Koizumi Y, Yanagida F, et al. A permease exhibiting a dual role for lysine

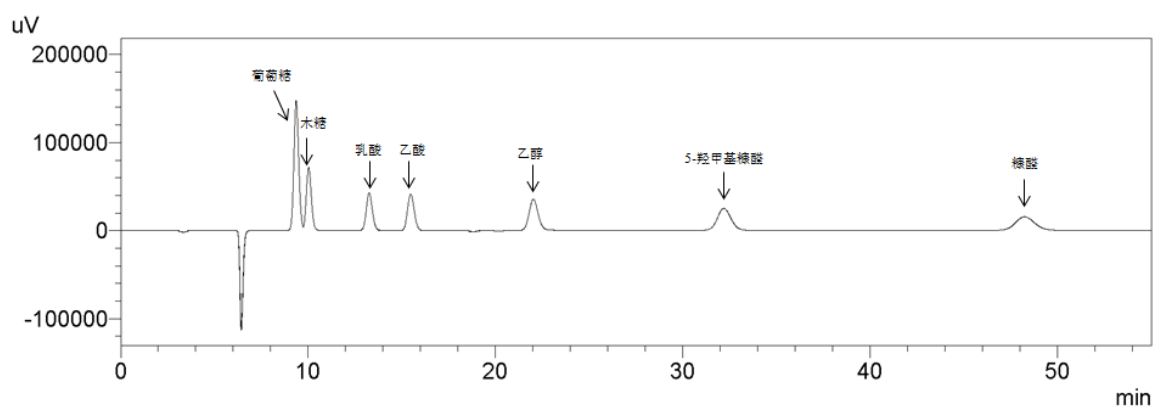
- and biotin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2000, 89: 90-93.
- [177] Rogers TO, Lichstein HC. Characterization of the biotin transport system in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Bacteriology. 1969, 100: 557-564.
- [178] Waller JR, Lichstein HC. Biotin transport and accumulation by cells of *Lactobacillus plantarum*. I. General properties of the system. Journal of Bacteriology. 1965, 90: 843-852.
- [179] Schneider J, Peters-Wendisch P, Stansen KC, et al. Characterization of the biotin uptake system encoded by the biotin-inducible *bioYMN* operon of *Corynebacterium glutamicum*. BMC Microbiology. 2012, 12: 6.
- [180] Cao Y, Duan Z, Shi Z. Effect of biotin on transcription levels of key enzymes and glutamate efflux in glutamate fermentation by *Corynebacterium glutamicum*. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 2014, 30: 461-468.
- [181] Eggeling L, Krumbach K, Sahm H. L-glutamate efflux with *Corynebacterium glutamicum*: why is penicillin treatment or tween addition doing the same? Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology. 2001, 3: 67-68.
- [182] Coello N, Montiel E, Concepcion M, et al. Optimisation of a culture medium containing fish silage for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*. Bioresource Technology. 2002, 85: 207-211.
- [183] Chen Z, Liu G, Zhang J, et al. A preliminary study on l-lysine fermentation from lignocellulose feedstock and techno-economic evaluation. Bioresource Technology. 2019, 271: 196-201.
- [184] Zhan M, Kan B, Dong J, et al. Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for improved l-arginine synthesis by enhancing NADPH supply. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2019, 46: 45-54.
- [185] Chen K, Li J, Ma J, et al. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using hydrolysates of spent yeast cells and corn fiber. Bioresource Technology. 2011, 102: 1704-1708.
- [186] Alfenore S, Molina-Jouve C, Guillouet SE, et al. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. Applied Microbiology and Biotechnology. 2002, 60: 67-72.
- [187] Nikolic S, Mojovic L, Rakin M, et al. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. Fuel. 2009, 88: 1602-1607.
- [188] Kwon S, Lee PC, Lee EG, et al. Production of lactic acid by *Lactobacillus rhamnosus* with vitamin-supplemented soybean hydrolysate. Enzyme and Microbial Technology. 2000, 26: 209-215.
- [189] Seki M. Biological significance and development of practical synthesis of biotin. Medicinal Research Reviews. 2006, 26: 434-482.
- [190] Seki M, Hatsuda M, Mori Y, et al. A practical synthesis of (+)-biotin from L-cysteine. Chemistry-A European Journal. 2004, 10: 6102-6110.

- [191] Zhong Z, Wu X, Chen F. Recent progresses in total synthesis of (+)-biotin. *Chinese Journal of Organic Chemistry*. 2012, 32: 1792-1802.
- [192] Saito I, Honda H, Kawabe T, et al. Comparison of biotin production by recombinant *Sphingomonas sp.* under various agitation conditions. *Biochemical Engineering Journal*. 2000, 5: 129-136.
- [193] Survase SA, Bajaj IB, Singhal RS. Biotechnological production of vitamins. *Food Technology and Biotechnology*. 2006, 44: 381-396.
- [194] Alban C, Job D, Douce R. Biotin metabolism in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2000, 51: 17-47.
- [195] Baldet P, Alban C, Axiotis S, et al. Characterization of biotin and 3-methylcrotonyl-coenzyme a carboxylase in higher plant mitochondria. *Plant Physiology*. 1992, 99: 450-455.
- [196] Baldet P, Alban C, Axiotis S, et al. Localization of free and bound biotin in cells from green pea leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1993, 303: 67-73.
- [197] Rawsthorne S. Carbon flux and fatty acid synthesis in plants. *Progress in Lipid Research*. 2002, 41: 182-196.
- [198] Yim S, An SJ, Kang M, et al. Isolation of fully synthetic promoters for high-level gene expression in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology and Bioengineering*. 2013, 110: 2959-2969.
- [199] Ruan Y, Zhu L, Li Q. Improving the electrotransformation efficiency of *Corynebacterium glutamicum* by weakening its cell wall and increasing the cytoplasmic membrane fluidity. *Biotechnology Letters*. 2015, 37: 2445-2452.
- [200] Schaefer A, Tauch A, Jaeger W, et al. Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: Selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*. 1994, 145: 69-73.
- [201] Wang Y, Cao G, Xu D, et al. A novel *Corynebacterium glutamicum* L-glutamate exporter. *Applied and Environmental Microbiology*. 2018, 84: e02691-17.
- [202] Brune I, Gotker S, Schneider J, et al. Negative transcriptional control of biotin metabolism genes by the TetR-type regulator BioQ in biotin-auxotrophic *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032. *Journal of Biotechnology*. 2012, 159: 225-234.
- [203] Abe K, Nakatsubo F, Yano H. High-strength nanocomposite based on fibrillated chemi-thermomechanical pulp. *Composites Science and Technology*. 2009, 69: 2434.
- [204] Chen Y, Fan D, Han Y, et al. Effect of high residual lignin on the properties of cellulose nanofibrils/films. *Cellulose*. 2018, 25: 6421-6431.
- [205] Jiang F, Hsieh YL. Holocellulose nanocrystals: amphiphilicity, oil/water emulsion, and self-assembly. *Biomacromolecules*. 2015, 16: 1433-1441.
- [206] Bian H, Chen L, Dai H, et al. Effect of fiber drying on properties of lignin containing cellulose nanocrystals and nanofibrils produced through maleic acid hydrolysis. *Cellulose*. 2017, 24: 4205-4216.
- [207] Nair SS, Kuo P, Chen H, et al. Investigating the effect of lignin on the mechanical,

- thermal, and barrier properties of cellulose nanofibril reinforced epoxy composite. *Industrial Crops and Products*. 2017, 100: 208-217.
- [208] Nair S, Yan N. Effect of high residual lignin on the thermal stability of nanofibrils and its enhanced mechanical performance in aqueous environments. *Cellulose*. 2015, 22: 3137-3150.
- [209] Tarrés Q, Ehman NV, Vallejos ME, et al. Lignocellulosic nanofibers from triticale straw: The influence of hemicelluloses and lignin in their production and properties. *Carbohydrate Polymers*. 2017, 163: 20-27.
- [210] Rojo E, Peresin MS, Sampson WW, et al. Comprehensive elucidation of the effect of residual lignin on the physical, barrier, mechanical and surface properties of nanocellulose films. *Green Chemistry*. 2015, 17: 1853-1866.
- [211] Diop CIK, Tajvidi M, Bilodeau MA, et al. Evaluation of the incorporation of lignocellulose nanofibrils as sustainable adhesive replacement in medium density fiberboards. *Industrial Crops and Products*. 2017, 109: 27-36.
- [212] Osong SH, Norgren S, Engstrand P. An approach to produce nano-ligno-cellulose from mechanical pulp fine materials. *Nordic Pulp & Paper Research Journal*. 2013, 28: 472-479.
- [213] Herrera M, Thitiwutthisakul K, Yang X, et al. Preparation and evaluation of high-lignin content cellulose nanofibrils from eucalyptus pulp. *Cellulose*. 2018, 25: 3121-3133.
- [214] Spence KL, Venditti RA, Habibi Y, et al. The effect of chemical composition on microfibrillar cellulose films from wood pulps: Mechanical processing and physical properties. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 5961-5968.
- [215] Chandra RP, Saddler JN. Use of the Simons' staining technique to assess cellulose accessibility in pretreated substrates. *Industrial Biotechnology*. 2012, 8: 230-237.
- [216] Katz S, Beatson RP. The determination of strong and weak acidic groups in sulfite pulps. *Svensk Papperstidning*. 1984, 87: 48-53.
- [217] Park S, Baker JO, Himmel ME, et al. Cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 10.
- [218] Scherrer P. Estimation of the size and internal structure of colloidal particles by means of Röntgen rays. *Nachrichten von der Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen*, 1918, 96-100.
- [219] Gourlay K, Hu J, Arantes V, et al. The use of carbohydrate binding modules (CBMs) to monitor changes in fragmentation and cellulose fiber surface morphology during cellulase- and swollenin-induced deconstruction of lignocellulosic substrates. *Journal of Biological Chemistry*. 2015, 290: 2938-2945.
- [220] Hu J, Arantes V, Saddler JN. The enhancement of enzymatic hydrolysis of lignocellulosic substrates by the addition of accessory enzymes such as xylanase: is it an additive or synergistic effect? *Biotechnology for Biofuels* 2011, 4: 36.
- [221] Hu J, Arantes V, Pribowo A, et al. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a "cellulase mixture" but is highly substrate

- specific. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6: 112.
- [222] Hu J, Arantes V, Pribowo A, et al. Substrate factors that influence the synergistic interaction of AA9 and cellulases during the enzymatic hydrolysis of biomass. *Energy & Environmental Science* 2014, 7: 2308-2315.
- [223] Hu J, Pribowo A, Saddler JN. Oxidative cleavage of some cellulosic substrates by auxiliary activity (AA) family 9 enzymes influences the adsorption/desorption of hydrolytic cellulase enzymes. *Green Chemistry*. 2016, 18: 6329-6336.
- [224] Beeson WT, Phillips CM, Cate JHD, et al. Oxidative cleavage of cellulose by fungal copper-dependent polysaccharide monooxygenases. *Journal of the American Chemical Society*. 2012, 134: 890-892.
- [225] Villares A, Moreau C, Bennati-Granier C, et al. Lytic polysaccharide monooxygenases disrupt the cellulose fibers structure. *Scientific Reports*. 2017, 7: 40262.

附录 I HPLC 谱图



附图 1 葡萄糖、木糖、乳酸、乙酸、乙醇、5-羟甲基糠醛及糠醛的 HPLC 谱图

测定方法: 岛津 HPLC, 泵型号 LC-20AD, 检测器为折光检测器 RID-10A, 色谱柱(300 mm×7.8 mm) 型号为 Bio-rad Aminex HPX-87H。检测条件: 流动相为 5 mM 的稀硫酸溶液, 流速 0.6 mL/min, 柱温维持 65 °C。

学术成果

已发表论文:

1. **Xushen Han**, Jie Bao*. 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. (SCI, IF: 6.97, 中科院一区) (对应本论文第二章)
2. **Xushen Han**, Feng Hong, Gang Liu*, Jie Bao*. An approach of utilizing water-soluble carbohydrates in lignocellulose feedstock for promotion of cellulosic L-lactic acid production. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2018, 66: 10225-10232. (SCI, IF: 3.571, 中科院一区) (对应本论文第三章)
3. **Xushen Han**[#], Li Li[#], Chengxiang Wei, Jian Zhang, Jie Bao*. Facilitation of L-lactic acid fermentation by lignocellulose biomass rich in vitamin B compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2019, 67: 7082-7086. (SCI, IF: 3.571, 中科院一区) (对应本论文第五章)
4. **Xushen Han**[#], Li Li[#], Jie Bao*. Microbial extraction of biotin from lignocellulose biomass and its application on glutamic acid production. **Bioresource Technology**. 2019, 288: 121523. (SCI, IF: 6.669, 中科院一区) (对应本论文第六章)
5. Hongsen Zhang[#], **Xushen Han**[#], Chengxiang Wei[#], Jie Bao*. Oxidative production of xylonic acid using xylose in distillation stillage of cellulosic ethanol fermentation broth by *Gluconobacter oxydans*. **Bioresource Technology**. 2017, 224: 573-580. (共一作, SCI, IF: 6.669, 中科院一区)
6. Weitao Dong, **Xushen Han**, Gang Liu*, Jie Bao*. Improving cellulosic ethanol fermentation efficiency by converting endogenous water-soluble carbohydrates into citric acid before pretreatment. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. 2019, 42: 1099-1103. (SCI, IF: 2.371, 中科院三区)

待发表论文:

1. **Xushen Han**, Weitao Dong, Jie Bao*. Elevating digestibility of corn stover as ruminant feed by endogenous lactic acid assisted pretreatment. In preparation. (对应本论文第四章)
2. **Xushen Han**, Ran Bi, Masatsugu Takada, Hale Oguzlu, Jungang Jiang, Feng Jiang*, Jie Bao, Jack Saddler*. Production of lignin-containing cellulose nanofibrils (LCNFs) and sugars from bleached softwood chemi-thermomechanical pulp. In preparation. (对应本论文第七章)
3. **Xushen Han**, Ran Bi, Masatsugu Takada, Hale Oguzlu, Jungang Jiang, Feng Jiang*, Jie Bao, Jack Saddler*. Do accessory enzymes help facilitate mechanical pulp nanofibrillation? In preparation. (对应本论文第八章)

申请专利:

1. 鲍杰, 韩昀身, 张建。一种消除不同木质纤维素原料预处理效率差异的参数调整方法。专利申请号: 201710434121.0
2. 鲍杰, 韩昀身, 张建。一种发酵原料中水溶性糖提高纤维素乳酸产量的方法。专利申请号: 201810328434.2
3. 鲍杰, 韩昀身, 张建。一种内源乳酸催化的蒸汽预处理秸秆饲料加工方法。专利申请号: 201810036857.7
4. 鲍杰, 张宏森, 韩昀身, 张建。一种高效转化纤维素乙醇蒸馏醪中木糖生产木糖酸的方法。专利申请号: 201610443682.2

学术会议论文:

1. **Xushen Han**, Hongsen Zhang, Chengxiang Wei, Jie Bao. Integrated production of high titer ethanol and xylonic acid from corn stover feedstock with minimum waste water generation. **Asia Federation of Biotechnology (AFOB)** Bioenergy and Biorefinery Division. 2016, Bangkok, Thailand. **(Oral Presentation)**

致谢

在毕业论文即将完成准备答辩的时候，回首这五年半以来的科研生活，思绪万千。经历了实验上的挫折、课题成功的喜悦、第一次发表 SCI 论文的激动，一切的一切，要感恩以及感谢的人太多太多。

首先要感恩的是导师鲍杰教授，能有幸加入鲍老师的团队进行博士期间的科研学习和训练，是一生中极其宝贵的财富。鲍老师极其严谨的科研态度、严格的规范化要求及开阔的国际化视野，教导我从一个只会简单操作的本科生，一步步学会设计实验、查阅文献、规范的完成科研工作、在日后的工作学习中比较职业的完成每件工作和任务。鲍老师每天帮助我们修改论文和改进实验计划，很辛苦，在耳濡目染了五年之后，我的工作态度也越来越严谨，工作强度和效率也越来越高。

还要感恩外籍导师加拿大皇家科学院院士 Jack N. Saddler 教授，在加拿大英属哥伦比亚大学为期一年的博士联合培养期间内，外导百忙之中基本每隔两三周与我讨论实验计划，给我学习建议，使我的知识面从农作物秸秆生物能源糖平台领域逐渐拓展到生物能源热平台、林产品制浆造纸及生物基材料等相关领域。外导诙谐幽默，经常以极其宏观的视角分析世界生物能源糖平台及热平台的发展方向，使我的大局观及逻辑思维能力提高许多。

感谢国内课题组的张建老师和高秋强老师在科研和生活上对我的帮助，祝愿张老师科研顺利、多发论文，高老师在美国生活幸福快乐。感谢雷成师兄、顾翰琦师兄、何燕青师兄与邵帅师兄在我刚进实验室的时候对我手把手的指导；感谢刘刚师兄在模型建立方面知识的传授，并建立了本文第三章的 Aspen plus 模型；感谢张宏森师兄与魏成香师弟，我们一起合作完成课题，共同发表了我第一篇 SCI 论文；感谢李莉师妹、董维涛师弟与郑理想师弟在进入实验室之后快速适应，一步步的跟我一起完成课题，李莉师妹进行了许多维生素相关实验，并构建了强化生物素转运能力的谷氨酸棒杆菌菌株；感谢周奇圣师弟在实验和生活上帮助了我很多；感谢易霞老师、王霞师姐、王娟师姐、高小创师兄、邱忠洋师兄、侯伟亮师兄、周平平师姐、刘克师兄、张鹏师兄、孙娇娥师姐、Sattar、Imrana、Faryal、Mesfin、温经柏、张强、姚瑞苗等同学在实验和生活上给我的建议和帮助；也要感谢湛泽宇、阚家伦、胡明珊、金慈、颜钊、赵瞭、柳云龙、韩涛、方纯、卢敏萍、李园园、黄振等诸位师弟师妹与我在实验上的讨论及生活上的陪伴。实验室这个大家庭很欢乐，科研氛围也很积极，衷心祝愿实验室诸位老师及师兄师姐师弟师妹事业顺利，家庭幸福；也祝愿实验室未来成果越来越多，发展越来越好！

在加拿大英属哥伦比亚大学联合培养期间，能够顺利的完成实验任务，与姜锋老师、毕然老师的指导和帮助是分不开的，非常感谢两位老师带我走进制浆造纸及生物基材料这些全新的领域，大大拓展了我的知识面和视野。祝愿两位老师科研顺利，生活幸福。也要感谢林学院诸位老师、博后及同学对我在科研和生活上的支持和帮助。特别感谢国

家留学基金委提供了出国联合培养的机会和资助。

最后，感恩父母和亲人们一直以来对我的鼓励和支持，家人是我最坚强的后盾和前进的动力，这种感情不是文字所能包含的。希望以博士顺利毕业来让父母开开心心，无愧于已经去世的爷爷、奶奶、姥姥、姥爷多年来的养育和教诲。

韩昫身 2019 年 12 月 于上海

卷内备考表

本卷情况说明

本卷共 壹佰贰拾陆 页

立卷人_____

检查人_____

立卷时间_____