

分类号: \_\_\_\_\_ 密级: \_\_\_\_\_

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

# 华东理工大学 工程硕士学位论文

玉米纤维生物炼制生产纤维素乙醇研究

展宝睿 Y45180604

指导教师姓名: 鲍杰 教授 生物工程学院

乔庆安 高级工程师 吉林燃料乙醇有限责任公司

申请学位级别: 硕士 工程领域: 生物工程

论文定稿日期: 2021.04.30 论文答辩日期: \_\_\_\_\_

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:

评 阅 人:

# 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\_\_\_\_\_（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：

年 月 日

指导教师签名：

年 月 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：

年 月 日





## 玉米纤维生物炼制生产纤维素乙醇研究

### 摘要

玉米纤维是玉米在湿磨法加工过程中分离出的玉米种皮及其附带的少量淀粉和蛋白质等物质的组合物，是燃料乙醇生产的重要原料来源和产业研发趋势。常规生物炼制加工链进行生物炼制的过程存在两个主要技术障碍：一是预处理步骤中硫酸催化剂的强酸性导致玉米纤维预处理后的抑制物含量极高；二是由于玉米纤维极高的半纤维素含量，传统固态脱毒无法完全脱除半纤维素完全水解后产生的乙酸。

本文对玉米纤维生物炼制生产纤维素乙醇的过程进行了研究。首先，为了解决硫酸的强酸性造成的高浓度抑制物，以及硫酸钙和硫氧化物造成的环境污染问题，本文采用缓和的柠檬酸有机酸催化剂对玉米纤维进行干酸预处理，在获得有效预处理效率的同时，大幅降低了高毒性抑制物的产生。

其次，为了解决玉米纤维中高半纤维素组分在脱毒后糖化所形成的高浓度乙酸，本文调整了生物炼制链顺序，对常规生物炼制的先固态生物脱毒后糖化的顺序进行了调整，将糖化放在生物脱毒之前进行，并利用宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 进行原位液态脱毒，在充分保护可发酵单糖的前提下，有效地解决了乙酸遗留问题。

再次，针对玉米纤维水解液中较高水平的木糖浓度，本文对发酵菌株酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 在富含木糖的体系中进行了长期的适应性驯化，在具备稳定的木糖代谢速度之后被用于乙醇的发酵。

最后，本文使用玉米纤维原料，在改进后的预处理过程和生物炼制加工链上进行了纤维素乙醇生产，最终得到 70.12 g/L（体积浓度 8.9%）的乙醇发酵浓度及 0.43 g/g 可发酵糖的发酵得率。同时，废水的产生量为 9.93 kg/kg 乙醇，与玉米淀粉乙醇的指标相近，显示出重要的工业应用潜力。

此外，本文为了降低柠檬酸催化剂成本，用黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 进行了柠檬酸发酵，使用简单固液分离后的柠檬酸发酵液作为预处理催化剂进行了玉米纤维的预处理操作，并进行乙醇发酵测试，最终获得了接近商品柠檬酸催化剂的乙醇产量（61.02 g/L，体积浓度 7.7%）。

**关键词：**玉米纤维；纤维素乙醇；乙酸；生物炼制链；柠檬酸

## Research on Biorefinery Production of Cellulosic Ethanol Using Corn Fiber

### Abstract

Corn fiber is a composition of corn seed coat separated from corn in the wet milling process with a small amount of starch and protein attached to it. It is an important source of raw materials for fuel ethanol production and an industry research and development trend. There are two main technical obstacles in the conventional biorefining processing chain: First, the strong acidity of the sulfuric acid catalyst in the pretreatment step leads to a very high content of inhibitors after the pretreatment of corn fiber. Second, due to the high hemicellulose content of corn fiber, traditional solid-state detoxification cannot completely remove the acetic acid produced after hemicellulose is completely hydrolyzed.

This paper studied the process of producing cellulosic ethanol from corn fiber. First of all, in order to solve the high concentration of inhibitors caused by the strong acidity of sulfuric acid, and the environmental pollution caused by calcium sulfate and sulfur oxides, this paper used a mild citric acid organic acid catalyst to conduct the dry acid pretreatment. While obtaining effective pretreatment efficiency, it greatly reduced the production of highly toxic inhibitors.

Secondly, in order to solve the high concentration of acetic acid formed by the saccharification of high hemicellulose components in corn fiber after detoxification, the biorefinery chain sequence was adjusted in this paper. In the conventional biorefinery, the sequence of solid biological detoxification followed saccharification was adjusted. The saccharification was carried out before the biodetoxification, and *Paecilomyces variotii* FN89 was used for in-situ liquid detoxification. Under the premise of fully protecting the fermentable monosaccharide, the problems left over by acetic acid were effectively solved.

Thirdly, in view of the high xylose concentration in the hydrolysate of corn fiber, the fermentation strain *Saccharomyces cerevisiae* XH7 was adaptive acclimated in the system rich in xylose for a long time, and was used for ethanol fermentation with stable xylose metabolism.

Finally, cellulosic ethanol was produced by using corn fiber raw material in the improved pretreatment process and the biorefining process chain, and finally the ethanol fermentation concentration of 70.12 g/L (volume concentration of 8.9%) and the fermentation yield of fermentable sugar of 0.43 g/g were obtained. At the same time, the yield of wastewater was 9.93 kg/kg ethanol, which was similar to that of corn starch ethanol, showing an important industrial application potential.

In addition, in order to reduce the cost of citric acid catalyst, the citric acid fermentation was carried out with *Aspergillus Niger* SIIM M288. The citric acid fermentation broth after simple solid-liquid separation was used as the pretreatment catalyst for the pretreatment of corn fiber, and the ethanol fermentation test was carried out. The yield of ethanol was close to that of commercial citric acid catalyst (61.02 g/L, volume concentration of 7.7%).

**Key words:** Corn fiber; Cellulosic ethanol; Acetic acid; Biorefinery chain; Citric acid

## 目录

第 1 章 序论 .....	1
1.1 前言 .....	1
1.2 木质纤维素生物质 .....	1
1.2.1 木质纤维素原料的基本组成 .....	2
1.2.2 木质纤维素原料的应用 .....	2
1.3 预处理技术 .....	3
1.3.1 预处理的作用 .....	3
1.3.2 预处理方法 .....	4
1.3.3 干式稀酸预处理 .....	4
1.4 脱毒 .....	5
1.4.1 主要的抑制物类型 .....	5
1.4.2 常见的脱毒手段 .....	5
1.4.3 原位液态生物脱毒 .....	5
1.5 玉米纤维 .....	6
1.5.1 玉米纤维的主要来源及特点 .....	6
1.5.2 玉米纤维的加工处理方式 .....	7
1.6 柠檬酸生产 .....	9
1.7 本研究的主要内容 .....	10
第 2 章 调整生物炼制链实现玉米纤维的生物转化 .....	11
2.1 引言 .....	11
2.2 材料与方法 .....	12
2.2.1 原料、酶与试剂 .....	12
2.2.2 菌种及培养基 .....	13
2.2.3 预处理 .....	13
2.2.4 糖化、在位液态生物脱毒及发酵 .....	13
2.2.5 酿酒酵母 XH7 的木糖驯化 .....	14
2.2.6 分析方法 .....	14

2.2.7 乙醇得率的计算.....	15
2.3 结果与分析.....	15
2.3.1 酿酒酵母的木糖驯化.....	15
2.3.2 柠檬酸预处理的玉米纤维及固态脱毒过程.....	16
2.3.3 调整生物炼制链，将糖化与生物脱毒的顺序调换.....	18
2.3.4 玉米纤维生物转化的物料衡算.....	21
2.3.5 本研究与其他研究各项指标的比较.....	24
2.4 本章小结.....	27
第 3 章 自产柠檬酸作为催化剂对玉米纤维进行生物炼制.....	28
3.1 引言.....	28
3.2 材料与方法.....	29
3.2.1 原料、酶及试剂.....	29
3.2.2 菌株和培养基.....	29
3.2.3 玉米粉的糖化及柠檬酸发酵.....	30
3.2.4 利用自产柠檬酸对玉米纤维进行预处理.....	30
3.2.5 预处理玉米纤维的糖化、脱毒和乙醇发酵.....	30
3.2.6 柠檬酸得率计算.....	31
3.2.7 可发酵糖、柠檬酸、抑制物、乙醇的分析方法.....	31
3.2.8 乙醇得率的计算.....	31
3.2.9 发酵结束后相关离子含量的检测方法.....	31
3.3 结果与讨论.....	31
3.3.1 玉米粉的柠檬酸发酵.....	31
3.3.2 自产柠檬酸对玉米纤维进行预处理.....	32
3.3.3 自产柠檬酸预处理得到玉米纤维进行乙醇发酵.....	33
3.3.4 自产柠檬酸预处理玉米纤维工艺与传统生物炼制的比较.....	34
3.4 本章小结.....	36
第 4 章 结论与展望.....	38
4.1 结论.....	38
4.2 创新点.....	39

---

4.3 展望.....	39
参考文献.....	40
附录I 主要实验试剂.....	48
附录II 主要仪器设备.....	49
学术成果.....	50
致谢.....	51



## 第 1 章 序论

### 1.1 前言

随着经济的不断发展和产业升级,能源供应和消耗成为各行各业都格外关注的关键因素。工业界的传统能源如煤炭、石油等应用广泛,它们的热值虽高,但燃烧后排放的温室气体造成的大气污染也不容忽视。如果各国都不遵守《巴黎气候协定》,专家预测到 2050 年,极端天气如干旱导致的全球沙漠化以及温度上升导致的南北极永久冰川的融化,将最终使得海平面上升,同时封冻在冰层中的各种病毒将释放,从而危及全球<sup>[1]</sup>。这样的背景现状催生出新能源产业。自本世纪初以来,新能源中的核能、风能和太阳能分别得到国家大力支持和发展。2006 年,首个可再生能源相关的法规开始实施,目标是到 2020 年底实现水电、风能等可再生能源的供应占到当年能源总量的 10%左右<sup>[2]</sup>。生物质能的发展也在此期间有所加速,十三五期间,我国生物质能产业的投资新增 1960 亿元,目标是通过生物质能源的利用,合计替代化石能源超过 5800 万吨<sup>[3]</sup>。生物燃料包括液体或气体燃料,它们来源于生物质原料,包括从被称为生物质的可降解材料转化而来的燃料<sup>[4]</sup>。生物燃料作为生物能源的主体组成部分,过去十年间由于各国政府政策的支持,已经大范围从实验室走向工业生产,其中生物乙醇和生物柴油的进展尤为可观<sup>[5]</sup>。在生物乙醇的大规模工业生产中,第一代纤维素乙醇的代表国家美国和巴西主要利用玉米为原料进行乙醇的发酵生产,利用的有效成分是玉米淀粉。然而在饥饿危机尚存的全球大环境背景下,大规模利用粮食作为能源的原料难免引起人们的担忧<sup>[6]</sup>。因此,以秸秆等木质纤维素原料进行生物燃料生产的工艺越来越受到业内人士的重视<sup>[7, 8]</sup>,然而,目前对秸秆等农业废弃物生物原料的利用,除了对其当作燃料进行简单粗放的燃烧以外,大都集中在无氧分解生产生物燃气即沼气中<sup>[9]</sup>。将其中的有效组分通过生物转化生产生物燃气的一个限制性因素在于其中固体组分的溶解比例,溶解度过低可能会影响到燃气的生产效率<sup>[10]</sup>。而通过将木质纤维素原料进行预处理及糖化的第二代纤维素乙醇可以很好地解决这一问题,并最大限度地利用原料中的纤维素和半纤维素,得到与玉米淀粉乙醇相当的指标<sup>[11, 12]</sup>。因此,将玉米秸秆、小麦秸秆、稻秆等转化为生物燃料乙醇的研究很有价值。除此之外,我国幅员辽阔、地大物博、农业和林业资源丰富,充分寻找并利用各种农业林业废弃物,有利于对木质纤维素原料的种类和来源进行扩充,寻找木质纤维素原料的替代物,从而促进该产业的长足发展。

### 1.2 木质纤维素生物质

太阳能,早在人类发现并开始利用化石燃料之前,就已经通过光合作用将能量储存在木质纤维素原料中。人类对木质纤维素的利用,最原始的是燃烧方式,且一直到 19 世纪开始才作为纸浆工业的重要原料,到了 20 世纪,其由于低成本、来源广泛、稳定、生物可降解等特点被用来进行加工生产生物燃料<sup>[13, 14]</sup>。我国幅员辽阔,非粮木质纤维素生物质来源广泛,农业废弃物中玉米秸秆<sup>[15, 16]</sup>、小麦秸秆<sup>[17]</sup>和稻秆<sup>[16]</sup>是三个主要来源,且

除了几个面积较小的西北省份之外，其他省份的三种秸秆的年产量都在千万吨以上，且全国总的年产量规模可达 10 亿吨级别<sup>[18]</sup>。除此之外，农业废弃物还包括棉秆<sup>[19]</sup>、稻壳<sup>[20]</sup>、花生壳、甘蔗渣<sup>[21]</sup>等。另一方面，我国森林资源丰富，林业规模庞大，木材加工产生的大量木屑没有得到很好的利用，一般通过燃烧做简单粗放的处理，充分利用这类生物质进行生物燃料的生产或许是更好的选择。

### 1.2.1 木质纤维素原料的基本组成

木质纤维素生物质的主要组成，包括三种主要有机成分——纤维素、半纤维素和木质素，它们是在二氧化碳和水的光合作用中形成的结构较为复杂的大分子有机物，三种物质在木质纤维素生物质体系中的结构关系如图 1.1 所示。纤维素是由葡萄糖组合而成，两分子的葡萄糖 ( $C_6H_{12}O_6$ ) 互相旋转  $180^\circ$  形成纤维二糖 ( $C_{12}H_{22}O_{11}$ )，而纤维素是由很多个纤维二糖连接聚合而成<sup>[22]</sup>；半纤维素由木聚糖和半乳甘露聚糖两种聚合物构成，它的聚合度大概在 200-700 之间<sup>[23]</sup>，半纤维素经过水解可得到五碳糖（木糖和阿拉伯糖）和六碳糖（葡萄糖和甘露糖）<sup>[24]</sup>。木质素是一种酚类聚合物，主要由三种羟基肉桂醇组成：对香豆素醇、松柏醇和芥子醇<sup>[8, 25]</sup>。此外，生物质也含有少量的矿物质和各种提取物和灰分<sup>[25]</sup>。

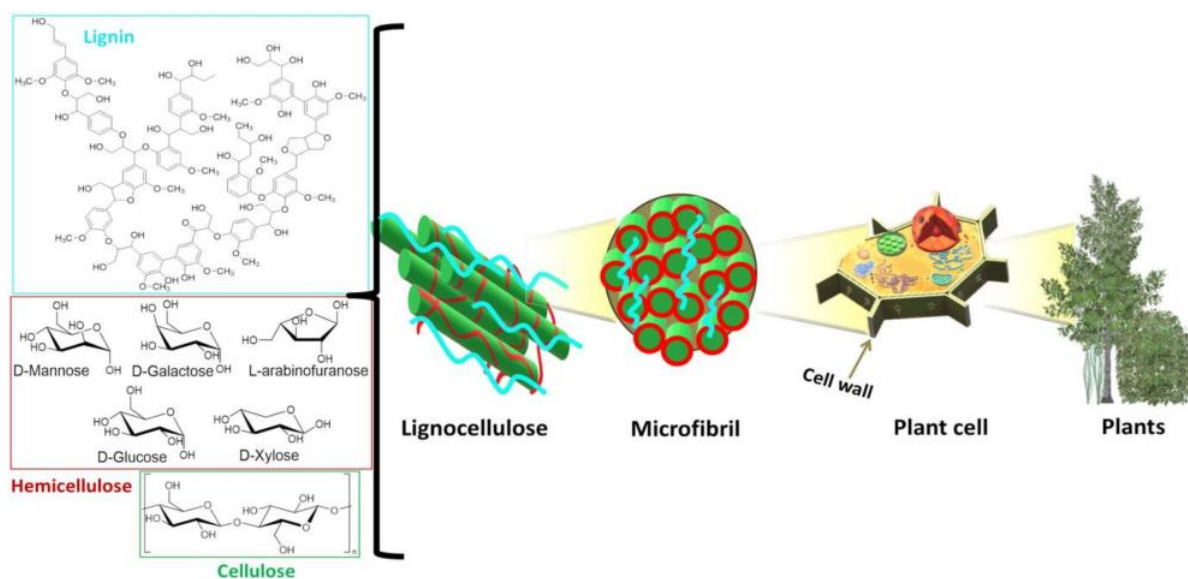


图 1.1 木质纤维素生物质的组成<sup>[14]</sup>

Fig. 1.1 Composition of lignocellulosic biomass

### 1.2.2 木质纤维素原料的应用

对各种生物质原料的处理利用中，美国可再生能源实验室（NREL）对稻秆进行稀酸预处理，并利用其中的可发酵糖（葡萄糖和木糖）进行乙醇发酵，其过程的流程图如图 1.2 所示，在进行稀酸预处理之前，先用碱在  $80^\circ C$  条件下进行脱木质素处理，经过至少两天的发酵，除去少量乳酸的影响，乙醇浓度为  $71-76 g/L$ <sup>[15]</sup>。在另一个研究中，对玉米秸秆进行脱乙酰基和机械精炼过程，经过糖化总共得到  $230 g/L$  可发酵糖，发酵结束

乙醇浓度为 86 g/L，相当于 10.9% (v/v) [11]。对小麦秸秆的研究，还有对糖化条件的优化等方面，研究发现糖化过程中 pH 由 4.8 调整为 5.8-6.0 可以使糖化后可发酵糖的得率提高 20%以上[17]。在一项对稻秆的研究中，利用碱脱除其中的乙酰基，再进行酶水解糖化和乙醇发酵，结果显示糖化得率上升了 16%，乙醇产量也相应由 12.7 g/L 提升到 20.4 g/L[26]。对棉秆进行 2% (w/w) 氢氧化钠的碱预处理，经糖化发酵得到  $22.93 \pm 1.74$  g/L 乙醇，乙醇得率为 0.36 g/g[19]。相比于粮食乙醇，第二代生物乙醇（纤维素乙醇）不仅可以实现更大程度的温室气体减排，也可以避免粮食短缺的争议。

综上所述，无论是各种农业废弃物还是林业废弃物，它们都属于非粮木质纤维素原料。非粮木质纤维素底物来源广泛，除了前面提到的树木（杨、柳、银枫或刺槐）、木材残渣（chips and sawdust）和农作物秸秆（玉米秸秆、玉米秸秆、小麦秸秆、甘蔗渣），施工现场残渣、市政残留、纸张及污水污泥、草本植物（高粱、芦苇草或芒草）等也可以作为木质纤维素生物质的补充来源。对其的有效利用既能减少化石燃料燃烧引起的温室气体的排放，减缓温室效应，又能解决各种废弃物被简单粗放利用引起的浪费，减少 GDP 发展引起的支出，对经济社会发展具有重要意义。

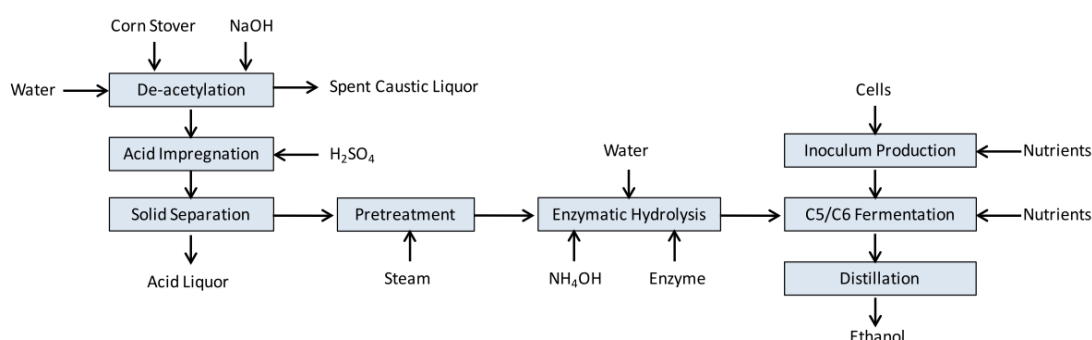


图 1.2 中试实验规模的稻秆-乙醇的工艺流程图

Fig. 1.2 Corn stover-to-ethanol process flow diagram used for integrated pilot-scale testing

### 1.3 预处理技术

#### 1.3.1 预处理的作用

由于木质纤维素中的木质素结构复杂，具有较强的顽固性及环境适应性，一般的处理方法无法有效破坏其致密的结构[27]，从而对其内部的纤维素及半纤维素组分起到很强的保护作用。因此寻找并采用一定强度的预处理方法，对顽固坚硬的木质纤维素结构进行有效破坏，使得其中的部分或全部半纤维素水解后，暴露出纤维素组分，从而在后续的酶解糖化过程中使纤维素酶能够与纤维素充分接触并在其作用下将纤维素水解成葡萄糖，最终用于生物燃料的生产发酵过程。预处理在整个生物炼制链中处于头部位置，好的预处理操作为整个生物炼制奠定了基础，生物炼制的大致顺序及相互作用关系如图 1.3 所示。

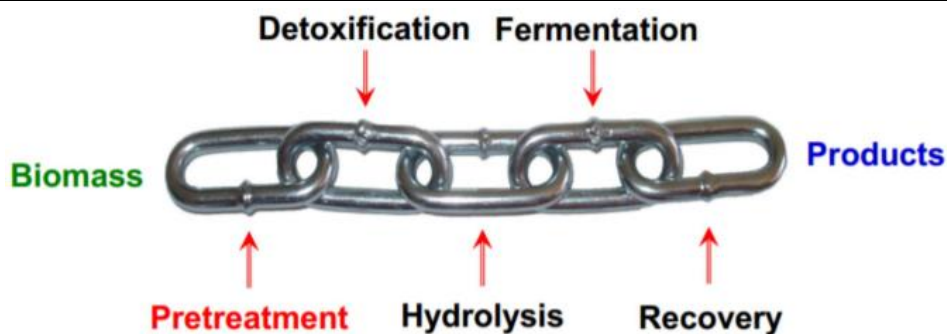


图 1.3 生物炼制平台基本结构

Fig. 1.3 The basic structure of general biorefining platform

### 1.3.2 预处理方法

预处理操作，无论是在酸性、中性、碱性 pH 值下，还是在离子液体中进行，都会溶解和/或水解半纤维素组分，并去除 10%至 50%的木质素。针对木质纤维素原料的预处理方法有很多，大致可分为酸预处理、碱预处理、离子液体预处理、蒸汽爆破预处理、物理研磨预处理、生物降解预处理以及两种或多种方法组合的预处理方式等。在 NREL 公布的方法中，先将玉米秸秆通过 0.4% (w/w) 的 NaOH 溶液进行脱木质素处理，之后将 0.8% (w/w) 的硫酸溶液浸渍的玉米秸秆以 40-60% (w/w) 固体加入预处理反应器中，以 25-40% (w/w) 固体排出，整个过程耗时 10-12 h<sup>[15]</sup>。利用苯氧乙醇和酸按一定比例组合对竹纤维进行预处理，结果表明：在 120°C 时，苯氧乙醇与酸的比从 0:1 提高到 4:1 时，苯氧乙醇对木质素的去除率为 29.4%~91.6%，纤维素的保有率为 82.5%~87.8%<sup>[28]</sup>。美国学者则研究发现，经过离子液体对柳枝稷草进行预处理，纤维素组分的水解得率提高了 16.7 倍，葡聚糖得率在 24 h 时达到 96%<sup>[29]</sup>。碱预处理的研究中，用 2% (w/w) NaOH 对高粱秆进行稀碱预处理，相比于空白对照，总糖得率提高了 5.6 倍<sup>[30]</sup>。将经过硫酸或 NaOH 浸泡的小麦秸秆进行蒸汽爆破<sup>[31,32]</sup>，酶解后己糖的得率提升了 3-6 倍，发酵得到的乙醇得率也有相应的提升<sup>[33]</sup>。对小麦秸秆进行湿磨法预处理，此种预处理方法是无酸无碱的 (Non-acid and alkali pretreatment)，被认为是经济且具有实践意义的预处理方式，经过酶解葡萄糖和木糖的得率分别为 78.5%和 41.5%<sup>[34]</sup>。厌氧消化本身就是一种对木质纤维素进行的生物预处理过程<sup>[9, 10]</sup>，通过利用某种真菌如热解糖厌氧杆菌对富含半纤维素的玉米芯进行生物降解预处理，发酵得到的产物如琥珀酸的产率得到极大提升。针对不同的木质纤维素原料，不同的预处理方法展显出不同的效果，因此选择合适的预处理技术，探索恰当的预处理条件，是对木质纤维素原料进行加工利用时所必不可少的。

### 1.3.3 干式稀酸预处理

以上多种常规预处理操作大都具有一些短板，如效率低下、能耗高、高废水排放、设备损耗大及发酵指标低等，可见并不是十分有效的预处理方式。前期预处理的低效率将导致后期发酵的低指标，进而使木质纤维素生物炼制的应用前景大打折扣。

针对以上常规预处理操作的短板,本实验室自主开发出一套高效低廉且体系成熟的预处理技术——干式稀酸预处理(DAP)技术<sup>[35-38]</sup>。该技术路线采用较低浓度的酸溶液,与含水量较低的木质纤维素原料混合后进行预处理操作,利用极低量的水和水蒸气、反应器内施加较低的压强即能达到预处理的所需条件,最终在实现良好预处理效果的同时,基本无废水产生,预处理后的木质纤维素原料以固体颗粒的形态从反应器下方出口排出,操作简便且原料的收率极高,最大限度减少了原料在预处理过程中的损失。此外,经过对预处理后原料的酶水解实验,纤维素对葡萄糖的水解得率普遍达到 90%以上,足以说明 DAP 对木质纤维素的结构起到了良好的破坏作用。

## 1.4 脱毒

### 1.4.1 主要的抑制物类型

经过一定强度的预处理操作,木质纤维素原料中富含的纤维素、半纤维素有一部分被水解成了相应的单糖,葡萄糖和木糖在预处理过程中与酸进一步反应从而产生 5-羟甲基糠醛(5-HMF)和糠醛。木质素降解还会产生丁香醛、香草醛等醛类抑制物以及甲酸、乙酸等有机酸类抑制物<sup>[39,40]</sup>。在一份相关研究中,糠醛和丁香醛的毒性主要引起细胞内的代谢衰弱,而来自乙酸的毒性主要引起细胞质的酸化和去极化反应<sup>[41]</sup>。由于预处理后木质纤维素原料以固体颗粒的形式进入后续的生物炼制环节,预处理过程中产生的抑制物绝大部分以游离的形式附着在原料中,除了少量由于挥发作用发散到空气中以外,剩余的抑制物在后续过程尤其是发酵过程中会对微生物细胞造成极大危害<sup>[40]</sup>。

本研究中用到的玉米纤维原料,因较高的半纤维素含量导致生物炼制过程中会产生大量乙酸,在过去的研究中,Takahashi 等<sup>[42]</sup>和 Zaldivar 等<sup>[43]</sup>就曾发现体系中一定浓度乙酸的存在将会抑制酿酒酵母发酵生产乙醇的能力。因此,去除各种类型的抑制物是后续生物炼制正常进行的保障,这也是本研究第一部分需要重点完成的内容。

### 1.4.2 常见的脱毒手段

在对木质纤维素原料的生物炼制研究中,已经有多种脱毒手段被进行过尝试。物理手段中,主要是应用大量清水<sup>[44]</sup>进行稀释或者利用活性炭<sup>[45]</sup>,其中水洗法在应用中更加普遍,但是此种方法本质上并不是实现了对抑制物的真正去除,而是“转移”,且巨大的用水量使得废水的排放量陡增,既增加了用水成本,又增加了废水的处理成本。化学手段则有过碱中合法等。生物手段的脱毒,其本质是对抑制物的真正降解,是严格意义上的完全去除,因此是最有潜力和应用价值的脱毒方法。

本实验室即利用生物手段对预处理后木质纤维素原料进行脱毒处理,所用的生物脱毒菌株经 Ran 等<sup>[46]</sup>分析其转录组信息,形成一套全面成熟的培养体系,并在抑制物生物脱毒中表现出良好的功能性。

### 1.4.3 原位液态生物脱毒

在本实验室之前的研究中,快速固态生物脱毒法已经是一种利用微生物对预处理木质纤维素进行抑制物去除的有效工艺手段。因之前利用的抑制物生物降解菌株树脂枝孢

霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 (CGMCC 7452) 的菌丝极易断裂, 故只能用做静态脱毒; 新发现的宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 (CGMCC 17665) 则在液态搅拌体系中生长良好, 且能代谢游离于液态体系中的乙酸等抑制物。将其以孢子液的形式接入含有抑制物的水解液体系中, 脱毒结束后可原位继续进行乙醇的发酵。因此在本研究中, 对该菌种的利用成为解决乙酸遗留问题的关键。

## 1.5 玉米纤维

### 1.5.1 玉米纤维的主要来源及特点

玉米纤维作为包裹玉米粒的外层果皮, 是玉米湿磨法生产玉米淀粉过程中的副产物<sup>[47, 48]</sup>, 玉米湿法的工艺过程包括在 50-55°C 条件下, 将玉米粒浸泡在 0.12-0.20% 的稀硫酸水溶液中 24-48 小时, 然后用机械磨盘进行研磨, 将种皮中的纤维与胚乳中的淀粉、蛋白质和其他成分分离, 是一个物理分离的过程<sup>[49]</sup>。它的产率大约为 80-110 g/kg 干玉米<sup>[50]</sup>, 而全球通过湿磨法加工的玉米为  $2.56 \times 10^7$  t, 因此可以推算玉米纤维的产量大概为  $2.43 \times 10^6$  t<sup>[51]</sup>。图 1.3 为经自然晾干后的玉米纤维图片。



图 1.3 晾干的玉米纤维

Fig. 1.3 Air dried corn fiber

玉米纤维主要是由玉米种皮及附着在内部的少量淀粉所组成的, 相比于纤维素组分, 其中含有更高含量的半纤维素, 半纤维素是一种植物细胞壁多糖, 是自然界第三丰富的聚合物。在一些植物中, 它占了全部干物质的 40%。半纤维素是由易水解的己聚糖和戊聚糖混合而成的短支链杂多糖, 最常见的形式是木糖聚合物 (木聚糖)<sup>[52, 53]</sup>。而玉米纤维中的阿拉伯木聚糖通常可达到干重的 30-50% (w/w)<sup>[54, 55]</sup>, 纤维素、半纤维素和残余的淀粉组分加起来可能达到 75% (w/w) 以上<sup>[56-58]</sup>。正因为此特点, 玉米纤维也代表了“第 1.5 代”生物燃料原料<sup>[59]</sup>。除了纤维素及半纤维素之外<sup>[53, 60]</sup>, 玉米纤维还含有油脂和木质素组分<sup>[61]</sup>, 这些组分因有粘性而附着在种皮内部, 在玉米加工工艺中, 经常将其分离使其成为一种难以利用的副产品<sup>[62]</sup>。

与其他农业生物质来源的原料相比, 玉米纤维不需要从农田里收集, 而是直接从生产玉米淀粉的工厂里得到, 且从湿磨设备中产出后, 不需要进行清洗等任何额外加

工过程，因此是更加方便易得且来源广泛的木质纤维素原材料<sup>[55]</sup>。然而，玉米纤维中的阿拉伯木聚糖特别难被相关的酶制剂糖化，大概是它的结构比玉米秸秆和其他草类更容易产生衍生和交联的缘故<sup>[55]</sup>。阿拉伯木聚糖由线性  $\beta$ - (1,4) -d-木吡喃糖和 1-阿拉伯呋喃糖残基组成，作为 O-2 和/或 O-3 上的侧链。一些阿拉伯糖是连接在羟基肉桂酸（如阿魏酸、对香豆酸以及阿魏酸的二聚体和三聚体）的 O-5 位上<sup>[63]</sup>。

因此，基于玉米纤维复杂顽固的结构特点及较高的半纤维素组分含量，不进行预处理而直接糖化是难以对其利用的。对玉米纤维预处理的相关研究开始于上世纪末<sup>[64]</sup>，针对玉米纤维中不同组分的利用所采用的预处理方式和强度也各不相同，目的大都是对其中的可发酵糖进行释放和利用，以生产生物燃料及其他生物制品。图 1.4 是不同公司研究的对玉米纤维进行加工利用的技术流程图。

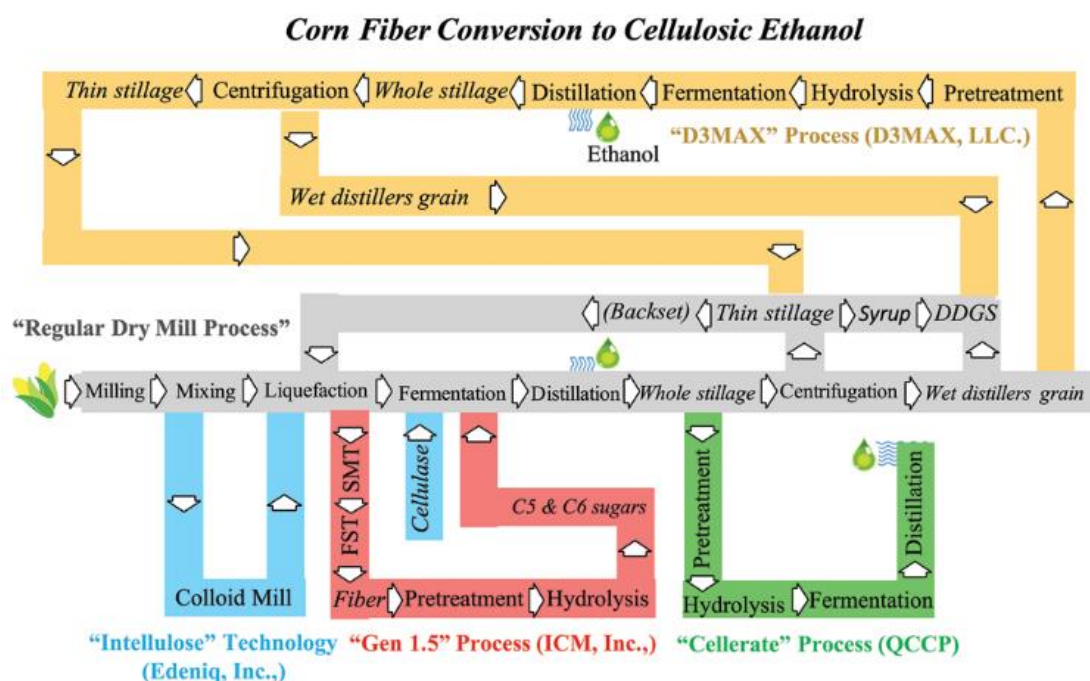


图 1.4 不同公司开发的玉米纤维转化技术<sup>[65]</sup>

Fig. 1.4 Corn fiber conversion technologies developed by different companies

### 1.5.2 玉米纤维的加工处理方式

对玉米的加工主要分为干法和湿法两种加工方式。DDGS 是干法加工的主要副产物<sup>[66]</sup>，营养价值较低，玉米纤维作为 DDGS 的主要组成成分，对其进行燃料乙醇的生产是更好的选择<sup>[67]</sup>。而湿法加工中，目前对玉米纤维的利用主要包括将其作为一种饲料添加剂（50%以上）或者食品添加剂（10%左右）<sup>[50][68]</sup>，但对其的利用都是有限的。因此将其转化为纤维素基燃料或化学品或许是有效的利用手段。

过去的研究，有些是在液化糖化过程中将玉米淀粉和玉米纤维同时水解，以释放出更多的可发酵糖。例如 Li 等<sup>[69]</sup>在传统的玉米干法生产乙醇的基础上，在 SSF（同步糖化发酵）时添加基于物料干重 0.6% 的纤维素酶，使其与淀粉同步糖化和发酵，乙醇

得率提升了 1.8%，但糖化后纤维素的转化率仅为 19.8%，主要原因可能糖化过程中生成的高浓度葡萄糖严重抑制了纤维素酶的酶活<sup>[70]</sup>。Norvell 等<sup>[67]</sup>在 7.5% (w/w) 的氨水溶液中将玉米粒高温 (105°C) 浸泡 24 小时后进行糖化和发酵，乙醇得率提升了 14%，这可能是由于利用氨水进行的碱性浸泡预处理也对淀粉的结构进行了破坏，使得淀粉更好地水解成葡萄糖，而非完全是由于纤维素的水解，其次氨水电离出的铵根离子可能也在后续的发酵中充当了部分氮源，促进了微生物的生长。但是该研究提到预处理后需要用大量水清洗以除去氨水，直至无氨水残余，这极大地提升了用水量，降低了实际应用的可行性。以上都是干法工艺的研究，干法工艺在技术上是合理可行的，但由于生产方式粗放导致生产效率低和生产成本（纤维素酶）高的问题，同时还存在废水过多的弊端。

在湿法工艺中，研究主要集中于使用不同的预处理技术（物理、生物、化学手段）及脱毒手段进行生物炼制处理克服其生物抵抗性，再通过玉米纤维的酶解获取可发酵糖。物理手段，例如 Lin 等<sup>[71]</sup>使用模具直径为 3 mm 的双螺杆挤出机在 140°C 下对去淀粉化的玉米纤维进行挤压处理，以固含量约为 6.7% (w/w) 进行后续酶促糖化及发酵，可以得到 29.08 g/L 乙醇，转化率达到 88.79%，然而较低的葡萄糖得率和未做说明的脱除抑制物的方法是两个需要完善的工作；Kurambhatti 等<sup>[72]</sup>采用热蒸汽处理和湿磨法两种预处理方法，然后添加纤维素酶进行玉米纤维的糖化共发酵，最终发现热蒸汽处理的玉米纤维的可发酵单糖得率提升了 10.4%。因此采用物理手段对玉米纤维进行预处理的能耗很高而转化效率很低，不是一个合理的工业应用选项。生物手段，例如 Beri 等<sup>[73]</sup>利用重组的热解糖热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum*) 表达了四个来源于 *Herbinix spp. strain LL1355* 的水解酶，提高了玉米纤维中葡萄糖醛酸阿拉伯木聚糖 (GAX) 的水解效率，与未酶解结果相比玉米纤维乙醇得率提高了 24%；Rasmussen 等<sup>[74]</sup>利用一株褐腐真菌对木质纤维素的降解作用，进行长时间浸没静置发酵，最终的乙醇得率为 3.3 g/100g 纤维素，然而过长的培养时间及乙醇提纯的困难会极大地降低整个过程的效率。因此利用生物手段对原始物料进行结构上的降解预处理的效率非常低。化学手段主要包括稀酸以及稀碱预处理。例如 Li 等<sup>[65]</sup>在传统玉米淀粉乙醇生产的基础上，在蒸馏乙醇时进行原位常压的稀酸预处理，再将 40% 的预处理后的蒸馏产物进行循环利用，加入到发酵前的液化过程并跟随后续的发酵，乙醇产量增加 7.9%，纤维素转化率为 69.2%，然而，温和的预处理条件（精馏，82~95°C）导致预处理时间过长（30~90 min）以及较低的纤维素转化率。用硫酸对玉米纤维进行预处理，之后对其进行酶解糖化，并进行葡萄糖和木糖的共利用进行丙酮乙醇丁醇的生产，得率在 0.35-0.39 之间<sup>[61]</sup>。

另一个利用玉米纤维进行生物产品生产的瓶颈，是预处理过程中产生的糠醛和 5-HMF 等抑制物<sup>[75]</sup>，过去的研究中提到的脱毒的方法，大都是根据物理吸附或者用大量水稀释的原理进行抑制物的脱除。例如，Buhner 等<sup>[76]</sup>针对稀酸预处理技术详细探究了对稀酸预处理玉米纤维的不同脱毒技术，表明部分中和与活性炭处理相结合是最有效

的脱毒方法，最终木糖醇的转化率可达到 0.4 g/g 木糖，但其不成熟的预处理技术造成的低固体含量及过量废水排放，使其不具备可行性。Prachand 等<sup>[68]</sup>采用 NaOH 预处理技术结合蒸汽爆破和固态发酵，以去离子水清洗来去除预处理物料中的抑制物，最终乙醇得率为 5.5 g/100 g 玉米纤维，乙醇得率和废水的排放都是需要改进的地方。以上通过化学手段对玉米纤维进行预处理以及对脱毒方法的研究，在一定程度上提高了玉米纤维的可发酵单糖得率和后续的乙醇发酵得率，但技术指标较低，也不具备实际应用价值。

从以上的研究可以得出，由于预处理及后续脱毒技术的不成熟，尽管最终产物转化率相对较高，但对玉米纤维的利用过程会造成废水的大量排放、较低的固体含量以及产量，无法达到工业生产的需求，同时也会导致污染物治理和产物回收成本较高。因此为了实现在高固含量、高转化率、低污染排放前提下对玉米纤维的有效利用，需要寻找到有效的预处理及脱毒手段。

## 1.6 柠檬酸生产

柠檬酸是一种三羧酸循环的中间产物，也是一种常见的大宗生物制品，目前全世界的年产量超过百万吨<sup>[77]</sup>，作为食品添加剂是其主要的用途，每年全球消费市场对其的需求仍然以 3.5-4.0% 的速度增长<sup>[78]</sup>。柠檬酸的生产最初是通过从柑橘或柠檬中进行榨汁提炼，后来因效率低下逐渐被生物发酵方式所取代<sup>[77, 79]</sup>。致力于柠檬酸生产及其产量提升的研究一直在进行，二十世纪四十年代，Campbell<sup>[79]</sup>等利用链球菌和乳酸杆菌进行柠檬酸的生产，除此之外，黑曲霉<sup>[80-83]</sup>、解脂假丝酵母<sup>[84]</sup>、解脂耶氏酵母<sup>[85]</sup>等都有利用其进行固体发酵<sup>[82]</sup>或表面发酵<sup>[80]</sup>的研究，发酵的原材料包括橘子皮渣<sup>[86]</sup>、甜菜糖蜜<sup>[87]</sup>、木质纤维素原料<sup>[88]</sup>等，针对发酵菌株进行代谢工程改造以提高柠檬酸产率的研究也很普遍，Hu 等利用代谢工程，高效诱变和最优发酵策略等方式将 *A. niger* 中产柠檬酸的体系重组到解脂耶氏酵母中，实现对低成本碳源的使用；代谢改造方面，Tan 等<sup>[89]</sup>在一株海洋解脂耶氏酵母中表达了来自季也蒙毕赤酵母的丙酮酸脱羧酶基因，使得柠檬酸的得率提高到 0.57 g/g 葡萄糖；Liu 等<sup>[90]</sup>在海洋解脂耶氏酵母中表达了 ATP 柠檬酸裂解酶基因 (*ACLI*)，使得重组菌的柠檬酸产量在 214 h 发酵周期达到 84 g/L，总糖的有效转化率达到 89.6%；发酵优化方面，主要通过优化培养基组成、发酵条件等方式提高发酵菌种的活性来提高柠檬酸的发酵产量。Liu 等探索利用皮状丝孢酵母进行分批补料发酵，提高柠檬酸的发酵指标<sup>[91]</sup>。Barrington 和 Kim<sup>[92]</sup>利用响应面法，确定了 *Aspergillus niger* NRRL 567 发酵时的最佳培养基组分及其浓度，最终得到柠檬酸最大发酵浓度为 354.8 g/kg 干泥炭苔藓。Yu 等<sup>[93]</sup>发明了一种新型的吸附固定化系统 (PAF201)，加入到 8 个周期的柠檬酸连续补料培养中，600 h 后，柠檬酸的浓度达到 162.7 g/L，跟之前的研究相比较，柠檬酸的最大发酵浓度提升了 11.3%。

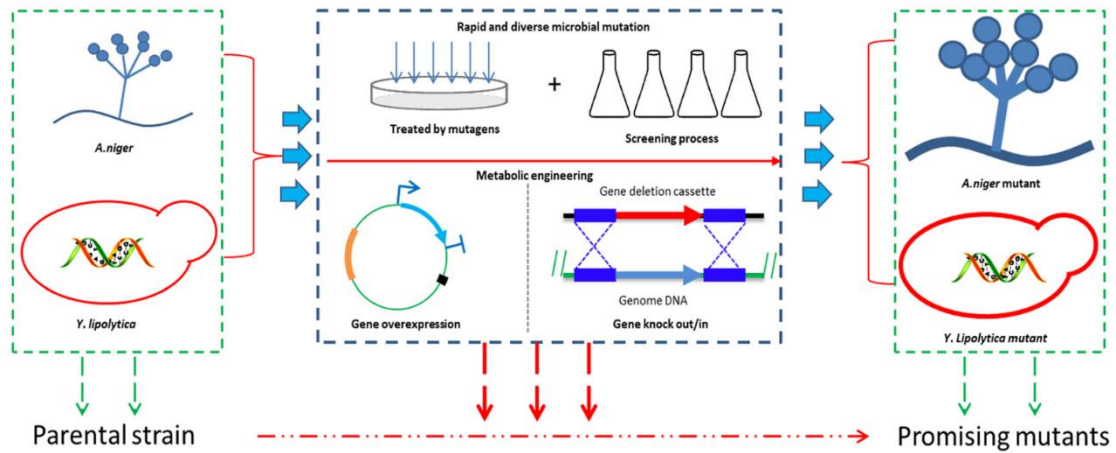
图 1.5 微生物菌株提高柠檬酸生产的策略<sup>[94]</sup>

Fig. 1.5 Strategies to enhance CA production by microbial strains

## 1.7 本研究的主要内容

玉米纤维是富含木质纤维素的木质纤维素原料库中重要的一部分，相比于传统的木质纤维素原料如小麦秸秆、稻秆等，玉米纤维直接在工厂的玉米湿磨加工工序的现场得到，杂质较少且比较干净，不需要额外的收集和加工成本，是来源非常广泛且方便得到的木质纤维素原料。由于玉米纤维含有较高的半纤维素组分，合适的预处理及生物炼制链是对其进行生物转化所必要的。本研究集中解决了玉米纤维的生物乙醇转化过程中遇到的问题，实现了其中可发酵糖向乙醇的转化。具体的研究内容如下：

(1) 将传统生物炼制技术应用于玉米纤维的生物转化中，但由于玉米纤维中半纤维素含量非常高，会导致部分半纤维素在预处理过程中无法完全水解，经生物脱毒后的物料在糖化过程中释放出大量残留乙酰基，过量的乙酰基以乙酸的形式存在于糖化液中，对后续的发酶菌种生长带来巨大阻碍。此外，硫酸预处理方式还存在发酶后残留大量硫酸钙固体废物的问题，固体残渣通过单一的燃烧处理会释放大量的二氧化硫气体。因此，我们尝试利用柠檬酸对玉米纤维进行预处理，并调整生物炼制链的加工顺序，将糖化放到生物脱毒之前，然后进行原位液态脱毒，解决预处理过程中乙酸释放不完全的问题，实现玉米纤维的生物转化。

(2) 鉴于柠檬酸成熟的发酶工艺及发酶结束后满足预处理所需的酸性浓度，尝试利用玉米粉进行柠檬酸生产，发酶得到的柠檬酸进行简单的固液分离及浓度检测后充当酸催化剂对玉米纤维进行酸预处理，进一步进行纤维素乙醇的发酶操作。

## 第 2 章 调整生物炼制链实现玉米纤维的生物转化

### 2.1 引言

随着国际社会对环境污染问题逐渐达成共识,发展绿色清洁的可再生能源是不可逆转的大趋势。木质纤维素原料作为全世界最广泛的原料,利用其中的纤维素、半纤维素组分并转化成生物燃料,毫无疑问对全球的能源市场将产生重大影响。玉米是全球三大粮食作物之一,2014 年其年产量达到 7.17 亿吨<sup>[95]</sup>,根据国际谷物理事会(IGC)的预测,2020 年将达到 11 亿吨,且基本以每年 100 万吨的速度增长。玉米纤维作为玉米粒的种皮,其产率大约为 80-110 g/kg 干玉米<sup>[50]</sup>,而全球通过湿磨法加工的玉米干重为  $2.56 \times 10^7$  t,因此可以推算玉米纤维的产量大概为  $2.43 \times 10^6$  t<sup>[51]</sup>。充分利用玉米纤维中的可发酵糖进行生物燃料的转化,而不是简单粗放地将其作为养殖饲料,能更好地释放其中的价值。之前的很多研究已经对玉米纤维的生物转化提供了思路,并进行了大量的尝试<sup>[55, 57, 64, 71]</sup>。本研究尝试解决利用硫酸作为催化剂时遇到的乙酸不能完全释放的问题。

首先,尝试利用有机酸代替硫酸或许可以有效减少抑制物及硫化物的排放,柠檬酸作为一种六碳三羧酸,被广泛应用于各行各业,尤其以食品行业中的调味剂、保鲜剂及精细化工中的化妆品添加剂居多<sup>[96]</sup>。相比于草酸、马来酸等强有机酸,柠檬酸的酸性较弱,适用于处理玉米纤维较为松散的结构,因此本研究尝试采用柠檬酸代替硫酸作为玉米纤维的预处理催化剂。此外,在本研究中提出并验证了一种对预处理后玉米纤维先糖化后脱毒的策略,即对生物炼制链进行调整,将酸预处理后的玉米纤维先进行高固含量预糖化,释放出大部分乙酰基后,再对其进行生物脱毒过程的操作。相比于固态脱毒,高固含量液体(造成低溶氧)条件下的生物脱毒对脱毒菌株在抑制物的耐受性方面提出了更高的要求。因此采用了以下两种手段保证高固含量下生物脱毒的进行:一、柠檬酸代替硫酸进行预处理。相比于硫酸作为预处理催化剂,柠檬酸酸性较弱,可以有效减少抑制物的生成,从而减轻后续生物脱毒的强度,较弱的酸性也极大地减少了柠檬酸钙的形成。二、使用抑制物高耐受性生物脱毒菌株,能够在溶氧限制的条件下对抑制物进行有效降解。使用新筛选的菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 在高固含量下进行生物脱毒,有效降解了抑制物(乙酸、5-HMF、Furfural)。脱毒后物料在厌氧条件下进行乙醇发酵,得到了较高的乙醇发酵指标。整个在位糖化、脱毒及发酵过程仅需在同一发酵罐内进行,周期仅为 144 h。该方法使玉米纤维的高效生物转化成为了可能。与传统的生物炼制相比,新提出的工艺流程如图 2.1 所示。

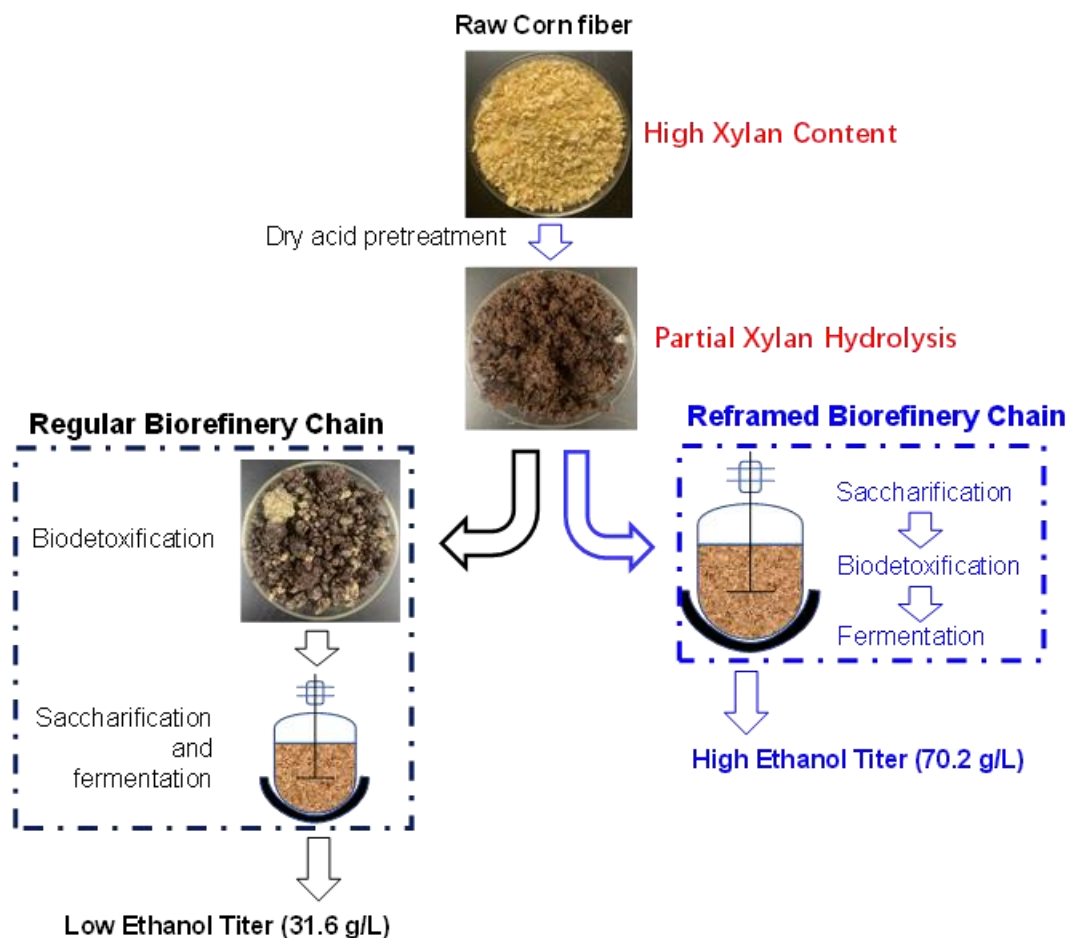


图 2.1 传统生物炼制与本研究工艺流程示意图

Fig. 2.1 Schematic diagram of traditional biorefinery and the process flow in this study

## 2.2 材料与方法

### 2.2.1 原料、酶与试剂

玉米纤维购自山东寿光巨能金玉米开发有限公司，为湿磨法生产玉米淀粉的副产物。原始的玉米纤维的含水量为 59.2% (w/w) 左右，玉米纤维经晾晒后含水量降至 22% (w/w) 左右。

所用的商业纤维素酶 Cellic CTec 2.0 购自诺维信（中国）生物技术有限公司，采用 NREL 公布的 LAP-006<sup>[97]</sup>测得纤维素的滤纸酶活为 203.2 FPU/mL 纤维素酶，采用 Ghose<sup>[98]</sup> 测得纤维二糖酶活为 4900 CBU/mL 纤维素酶，酶试剂中的蛋白含量采用 Bradford<sup>[99]</sup>测得 87.3 mg/mL 纤维素酶。 $\alpha$ -淀粉酶 HTAA 和葡糖糖化酶 GA-L NEW 均购自杰能科（中国）生物工程有限公司，两种酶制剂的酶活分别为 21,000 and 103,900 U/ml，使用之前均存放于 4°C 恒温冰箱妥善保管。

所需的主要试剂中，蛋白胨和酵母膏购买自牛津有限公司（汉普郡，英国），其余试剂如柠檬酸、葡萄糖、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  等均购买自国药化学试剂有限公司（上海）。

### 2.2.2 菌种及培养基

生物脱毒菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 保藏在中国微生物菌种保藏中心, 短期保存在合成培养基斜面上, 用于培养 *Paecilomyces variotii* FN89 的合成培养基组成包括 20 g/L 葡萄糖、1 g/L 酵母膏、2 g/L  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ 、1 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 脱毒时还要另外添加的营养盐合成培养基组成包括 2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g/L 酵母膏 和 1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 。宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 是本实验室人员之前在含有多种抑制物的预处理后玉米秸秆物料中筛选所得, 该菌拥有对各种抑制物强大的生物降解性, 可以将乙酸及酚醛类抑制物完全代谢降解为相应的无毒或轻微毒性的酸, 进而被彻底水解。之前有研究报道过宛氏拟青霉具有这样的功能<sup>[100]</sup>。

乙醇发酵菌株酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 是由山东大学鲍晓明老师提供, 该菌的出发菌株是筛选自泰国热带水果的野生型双倍体菌株 *Saccharomyces cerevisiae* BSIF33, 经过代谢工程改造和含有木糖的合成培养基驯化得到的工程菌株, 该菌株可以在利用葡萄糖的同时消耗木糖进行乙醇的同步糖化共发酵<sup>[101]</sup>, 该菌株的培养基为含有 20 g/L 葡萄糖、20 g/L 蛋白胨以及 10 g/L 酵母膏的 YPD 培养基。木质纤维素体系中大都含有较高浓度的木糖, 由于玉米纤维含有更高含量的半纤维素, 这会导致糖化后的水解液中的木糖含量将会很高, 因此经过代谢工程改造和木糖驯化的酿酒酵母 XH7 具有很强的优越性, 它能够利用葡萄糖和木糖进行乙醇共发酵, 既能提升可发酵糖的利用率, 又提升了乙醇的发酵浓度。

酿酒酵母的发酵培养基:

一级种子培养基: YPD 培养基

二级种子培养基: 5%固含量的脱毒后玉米纤维的水解液、2 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 g/L 酵母膏, 纤维素酶添加量: 5 mg/g DM

三级种子培养基: 10%固含量的脱毒后玉米纤维的水解液、2 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、1 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10 g/L 酵母膏, 纤维素酶添加量: 5 mg/g DM

### 2.2.3 预处理

提前 12 h 测量原始玉米纤维的含水量, 根据含水量计算预处理的反应体系。1200 g (DM) 玉米纤维与 600 g 柠檬酸溶液共同加入 20-L 预处理反应器中, 柠檬酸的酸用量为 4.0% (w/w, DM), 即固液比为 2: 1, 搅拌三分钟。预处理反应条件为  $165 \pm 1^\circ\text{C}$ 、2 min, 50 rpm。预处理反应过程中的操作方法如 Zhang 等<sup>[35]</sup>和 He<sup>[102]</sup>中提到的, 预处理反应结束后, 物料从底部出料口排出。预处理后的玉米纤维的 pH 用少量 20% (w/w) 的  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  溶液调整至 4.8 左右, 用于后续的生物脱毒和糖化过程。

### 2.2.4 糖化、在位液态生物脱毒及发酵

预处理玉米纤维的预糖化在 5-L 发酵罐内进行。发酵罐经过不低于  $115^\circ\text{C}$ 、不低于 1.8 个大气压的内部压强条件并维持 20 min 进行灭菌, 所有物料、营养盐、培养基等都经过灭菌。糖化条件为 25% (w/v) 固含量, 纤维素酶用量 5 mg/g DM,  $50^\circ\text{C}$ , 200 rpm, 12 h。随着糖化的进行, 乙酰基大量释放, 糖化液中乙酸浓度上升导致 pH 下降, 故随

时补充 5M 的 NaOH 溶液将 pH 控制在 4.8 左右, 糖化结束时取样并利用高效液相色谱测定葡萄糖和木糖浓度。

取冻存管中 *Paecilomyces variotii* FN89 首先在 PDA 平板上活化培养 72 h, 温度为 37°C; 接着用接种环将平板上的孢子转接到 PDA 斜面上, 37°C 培养 72 h; 用无菌水将孢子从斜面上洗下, 转接到用 500 mL 锥形瓶装盛的 100 mL 合成培养基中, 接种量为 1% (v/v), 37°C, 300 rpm, 18 h, 作为生物脱毒过程的种子液。按 10% (v/v) 的接种量接入脱毒菌株 *Paecilomyces variotii* FN89, 500 rpm、通气量 1 vvm、37°C。脱毒过程中每隔 12 h 取样检测抑制物及可发酵糖浓度。此外, 关于液态生物脱毒的脱毒终点, 通过 pH 及溶氧的变化判断, 根据探索实验得到的相关经验, 临近脱毒终点时, 由于抑制物浓度大幅降低, 脱毒菌株 *Paecilomyces variotii* FN89 大量增殖导致溶氧下降至 10% 以下; 同时, 由于乙酸被基本降解, pH 出现 0.6-0.8 的上升, 取样立即进行 HPLC 检测, 以及时进行终止脱毒的相关操作。

保藏在冻存管中的酿酒酵母 XH7 转接到装有 30 mL YPD 培养基的 100-mL 锥形瓶中, 30°C 活化 12 h, 活化三代以后, 以 10% 的接种量转接入 5% 固含量玉米纤维水解液中, 200 rpm, 30°C 培养 12 h 作为二级种子液。将一级种子按照 10% 接种量转接入 10% 固含量的玉米纤维水解液中, 200 rpm, 30°C 培养 16 h 作为三级种子液。酿酒酵母 XH7 三级种子液以 10% (v/v) 接种量接入发酵罐。发酵条件为 30°C、200 rpm、5M 氢氧化钠调节 pH 5.5。发酵过程中每隔 12h 取样并检测可发酵糖及乙醇的浓度。以上实验均重复三次。

### 2.2.5 酿酒酵母 XH7 的木糖驯化

木质纤维素体系中除了含有葡萄糖等六碳糖以外, 由于半纤维素的水解, 还包括大量的五碳糖, 其中以木糖为主。经过代谢工程改造的酿酒酵母 XH7, 拥有了利用五碳糖和六碳糖的能力, 但由于底物中的葡萄糖效应, 仍然把葡萄糖作为第一碳源, 而使得木糖的利用速度较慢。因此, 有必要针对木糖利用速率对其进行一定强度的适应性驯化。用于驯化的体系为添加 40 g/L 木糖的 15% (w/w) 固含量的玉米纤维水解液, 每次转接初始时刻水解液中葡萄糖的浓度约为 58.73 g/L, 此外, 体系中额外添加 0.5 g CaCO<sub>3</sub>, 总体积约为 50 mL。具体方法为: 在大小为 250 ml 的锥形瓶中, 分别加入 50 ml 上述培养基和 5 ml 活化后的酿酒酵母 XH7, 水解液的初始 pH 调整至 5.5 左右, 驯化过程中不再做调整, 每 48 h 按同样比例进行转接, 直到木糖利用速率有较为明显且稳定的提升为止。驯化的每一代分别在 0 h 和 48 h 进行取样, 并利用 HPLC 进行检测, 分析酿酒酵母的木糖代谢能力。

### 2.2.6 分析方法

自然晾干后的玉米纤维及预处理后的玉米纤维含水量测定方法依据 Sluiter 等(2012)<sup>[103]</sup>, 原始玉米纤维的组分及预处理后玉米纤维中的单糖、寡糖和抑制物等的测定是根据美国可再生能源实验室 (NREL) 拟定的方法<sup>[104]</sup>, 原始玉米纤维中的淀粉含量, 是根据一种双酶法测定的, 第一步是淀粉的液化 ( $\alpha$ -淀粉酶 HTAA 的酶用量为 44 FPU/ml,

液化条件为 90°C, 200 rpm, 12 h), 第二步是糖化(糖化酶 GA-LNEW 的酶用量是 200 FPU/ml, 糖化条件是 60°C, 200 rpm, 12 h), 整个过程中体系的固含量为 5% (w/w)。去淀粉后的玉米纤维的组分(纤维素及半纤维素成分)是根据 NREL 颁布的方法<sup>[103]</sup>进行测定的。处理后收集的样品都用 HPLC 检测。

葡萄糖、木糖、乙醇、柠檬酸、乙酸、5-HMF 和糠醛都用 Hou<sup>[88]</sup>等描述的方法进行测定。

发酵过程中利用到的菌落形成单位(colony forming units, CFU), 是将 100 μL 发酵液稀释 10<sup>-6</sup> 倍, 均匀涂布到 YPD 平板上, 30°C 培养 48-72 h 后数菌落数以检测细胞的生长活力。

### 2.2.7 乙醇得率的计算

利用 HPLC 进行检测以及计算得到的乙醇浓度单位为 g/L, 当需要将乙醇浓度以得率的形式表示出来时, 其计算方法和公式参考 Zhang 等<sup>[105]</sup>中提到的。其公式可以表示为:

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

公式中的字母所代表的相关成分注释如下:

Ethanol: HPLC 测定的乙醇发酵的浓度, 单位 g/L;

W: 发酵体系的质量总和, 单位 g;

Cellulose: 预处理后玉米纤维中半纤维素的含量, 单位 g/g;

Xylose: 预处理后玉米纤维中木糖的含量, 单位 g/g;

Solid: 用于发酵的玉米纤维的固含量;

976.9: 乙醇校正系数, 校正乙醇质量浓度与体积浓度之间的转化, 单位 g/L;

0.804: 无量纲因子, 计算发酵过程中水分的丢失;

0.511: 可发酵糖(葡萄糖和木糖)和乙醇之间的转化系数, 此为理论值。原因是本实验中应用的酿酒酵母 XH7 可以同时利用葡萄糖和木糖;

1.111: 纤维素和葡萄糖之间的转化系数, 及 1 g 纤维素水解后可以得到 1.111 g 葡萄糖。

## 2.3 结果与分析

### 2.3.1 酿酒酵母的木糖驯化

酿酒酵母 XH7 是经过代谢工程改造的重组菌, 经过代谢工程改造的酿酒酵母 XH7, 虽然拥有了利用五碳糖和六碳糖的能力, 但由于保藏在 -80°C 冰箱, 初步活化后的木糖代谢能力不够稳定, 而使得木糖的利用速度较慢。因此, 有必要针对木糖利用速率对其进行一定强度的适应性驯化。经过长时间的传代驯化以后, 菌种在含有木糖的木质纤维素体系中的细胞活力及细胞代谢情况如图 2.5 所示, 每次传代经过 48 h 的驯化, 剩余葡萄糖的浓度维持在较低的水平, 菌株在消耗完葡萄糖后, 能否利用木糖成为体系中菌种存货的限制条件。木糖的剩余浓度在传代的前 70 代表现出剧烈的波动, 说明期间菌株

对木糖的代谢情况发生一定变化,但并没有形成稳定的突变。70代以后,经过一段时间稳定的代谢后,木糖的利用量出现上升的趋势。最终,木糖的剩余浓度从开始的 30 g/L 降到 10 g/L 左右。此外,从图中可以看出,前七十代剧烈波动时期,每当某一代出现对木糖的高效利用时,菌种的 OD<sub>600</sub> 都出现较高的增长,说明对木糖的利用在引起乙醇浓度提升之前,还会先对细胞本身的增殖起到积极作用。OD<sub>600</sub> 由起始的 10 以下增长到 18 左右。乙醇的浓度也有相应的提升,由最低的 10 g/L 提升至 25 g/L。

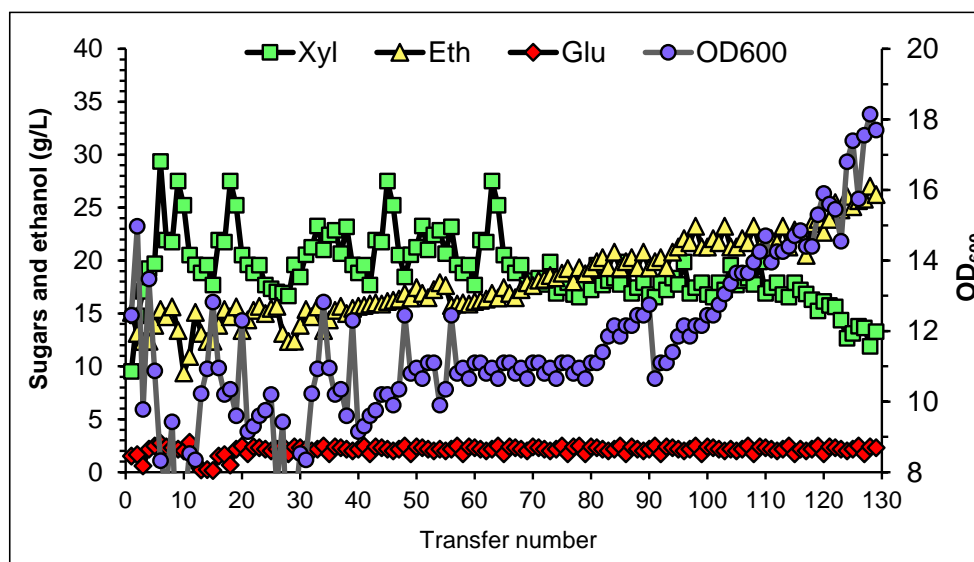


图 2.2 含有木糖的木质纤维素水解液中驯化 *S. cerevisiae* XH7

Fig. 2.2 *S. cerevisiae* XH7 domesticated from lignocellulosic hydrolysates containing xylose

经过长期的驯化后, *S. cerevisiae* XH7 的木糖代谢能力得到稳定的提高, 利用此菌株进行本研究的全部乙醇发酵。

### 2.3.2 柠檬酸预处理的玉米纤维及固态脱毒过程

首先, 我们采用两步酸解法对原始玉米纤维的组分进行了测定, 结果显示原始的玉米纤维含  $12.3 \pm 0.60\%$  的淀粉、 $26.50 \pm 1.10\%$  的纤维素和  $30.50 \pm 0.80\%$  的半纤维素 (木聚糖)。经过  $165^\circ\text{C}$ 、2 min、柠檬酸用量为  $4\%$  (w/w, DM) 的预处理之后, 通过两步酸解法和高效液相色谱测得物料的组分变化。如表 2.1 所示, 经过预处理, 玉米纤维中附着的淀粉都水解为葡寡糖或者葡萄糖。63.3% 的半纤维素被破坏并降解为寡糖或单糖, 这意味着包裹在内部的纤维素组分暴露出来, 有利于后续纤维素酶的酶解作用。经预处理后的玉米纤维可发酵糖占干重的  $61.5\%$  (w/w), 其中包括纤维素、半纤维素、葡萄糖和木糖低聚物以及葡萄糖和木糖。以玉米干纤维重量为基准, 柠檬酸预处理的羟甲基糠醛 (5-HMF) 和糠醛含量分别为  $1.31 \pm 0.03\%$  和  $0.56 \pm 0.12\%$  (w/w)。部分乙酰基水解成乙酸, 释放到水解液中。预处理产生的乙酸为  $0.79 \pm 0.12\%$  (w/w)。从结果来看, 利用柠檬酸对玉米纤维进行干式稀酸预处理实现了对物料中顽固组分的破坏, 释放了足量的可发酵糖, 为后续的糖化发酵过程奠定了基础。

表 2.1 玉米纤维中预处理前后糖及其衍生物的含量

Table 2.1 Sugar and its derivative contents of corn fiber before and after pretreatment

	Components	Contents (% , w/w)
(a) Raw corn fiber	Starch	12.30±0.60
	Cellulose	26.50±1.10
	Hemicellulose	30.50±0.80
(b) Pretreated corn fiber	Starch	0 (not detected)
	Cellulose	20.12±1.46
	Hemicellulose	9.58±0.73
	Glu-oligos	13.91±0.34
	Glucose	1.98±0.11
	Xylo-oligos	10.78±1.12
	Xylose	5.13±0.61

柠檬酸预处理后的玉米纤维经过 24 h 的固态脱毒（图 2.3(a)），糠醛、5-HMF 和乙酸全都被抑制物耐受性菌株 *Paecilomyces variotii* FN89 全部降解，且只消耗了少量（约 4.5%， w/w）可发酵糖。脱毒后的玉米纤维以 25%固含量进行同步糖化与共发酵（SSCF）（图 2.3 (b)），经过 12 h 的预糖化过程，发酵 0 h 的总糖浓度为 130.2 g/L（葡萄糖 88.7 g/L，木糖 41.5 g/L），乙酸浓度为 6.86 g/L，且随着发酵的进行最终达到 8.99 g/L。然而，过高的乙酸浓度严重威胁发酵菌株的正常生长和乙醇发酵的进行，导致 72 h 乙醇的最终浓度只有 31.6 g/L，乙醇的产率仅有 0.17 g/g 可发酵糖。显然，过高的乙酸浓度是导致发酵失败的主要原因，传统的干法生物炼制技术在预处理过程中无法完全释放玉米纤维组分中的乙酰基，固态脱毒后仍有大量乙酰基存在，从而在后续的 SSCF 中以乙酸的形式释放出来，造成发酵菌株的死亡。

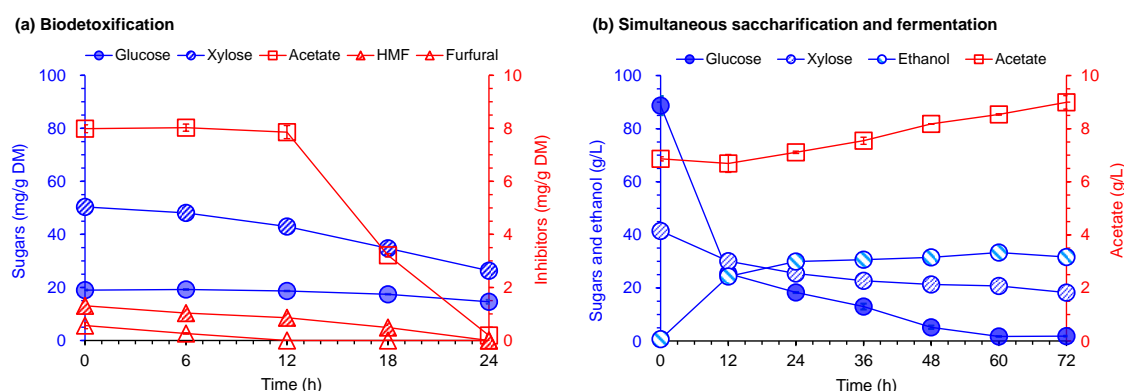


图 2.3 常规生物炼制链中脱毒 (a) 以及后续的同时糖化与共发酵 (SSCF) (b)，生物脱毒在 37°C 条件下进行 24 h，SSCF 在 30°C、180 rpm 条件下进行 72 h

Fig. 2.3 Biodetoxification (a) and the subsequent simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) (b) in the regular biorefinery chain. The biodetoxification was carried out at 37 °C within 24 h. SSCF was carried out at 30 °C, 180 rpm for 72 h

### 2.3.3 调整生物炼制链，将糖化与生物脱毒的顺序调换

由于乙酸在糖化过程中持续释放最终达到危害发酵菌种的浓度，导致玉米纤维的乙醇发酵无法进行。基于传统生物炼制技术的失败，我们提出了一种新型的策略：即调整生物炼制链的顺序，预处理后的玉米纤维直接以 25%固含量在 50°C 进行糖化，尽量使其中的乙酰基释放出来，然后直接向发酵液提供氧气，加入 *Paecilomyces variotii* FN89 的孢子液，在 30°C 下进行在位脱毒。脱毒结束后，接着进行乙醇发酵。

利用柠檬酸对玉米纤维进行预处理后的原位脱毒及发酵曲线如图 2.4 所示,图 2.4 (a) 为玉米纤维经过 12 h 预糖化后, 36 h 的脱毒过程中可发酵糖和抑制物的浓度变化,图 2.2 (b) 为 72 h 的乙醇发酵过程中可发酵糖、乙酸以及乙醇的浓度变化。糖化过程中共释放出  $94.06 \pm 0.16$  g/L 葡萄糖和  $30.94 \pm$ g/L 木糖（相当于  $282.17 \pm 13.23$  mg/g DM 的葡萄糖和  $92.81 \pm 6.78$  mg/g DM 的木糖含量），与图 2.3 中可发酵糖的含量基本一致。同时糖化液中还包含  $4.65 \pm 0.19$  g/L 乙酸（ $21.84 \pm 2.34$  mg/g DM）、 $0.30 \pm 0.01$  g/L 5-HMF（ $1.30 \pm 0.04$  mg/g DM）和  $0.27 \pm 0.02$  g/L 糠醛（ $0.56 \pm 0.02$  mg/g DM）。相比于预处理后玉米纤维浸提液中检测到的乙酸含量（ $7.3$  mg/g DM），糖化后得到的乙酸浓度提高了 176%，这意味着半纤维素中全部的乙酸都成功地被释放出来。此外，可以发现总的抑制物含量与其他研究中提到的相比要低很多<sup>[106]</sup>，因此没有发现在 SSCF 过程中纤维素酶的酶活有被抑制的现象。

经过 36 h 的脱毒（图 2.4 (a)），水解液中所有的乙酸、5-HMF 和糠醛都得到了降解，且可发酵糖仅仅损失了  $9.06$  g/L，即  $29.03$  mg/g DM（包括  $5.26$  g/L 葡萄糖和  $3.80$  g/L 木糖，分别相当于  $17.64$  mg/g DM 和  $11.39$  mg/g DM；仅计算检测到的数值，不考虑糖化）。图 2.4 (b) 为发酵过程，最终经过发酵最终生成了  $50.46 \pm 0.63$  g/L 乙醇，并仅残留了  $2.48 \pm 0.20$  g/L 乙酸和  $9.5 \pm 1.95$  g/L 木糖。

尽管使用柠檬酸预处理以及先糖化后脱毒的策略得到了较高的乙醇浓度。但整个过程的乙醇转化率（ $0.29$  g/g）远远低于理论值。我们推测可能还有部分半纤维素未能完全水解。此外，作为液体脱毒和乙醇发酵的两个过程，仅仅是以温度的控制和氧气的供应为变化参数而耦联的。之前的研究中我们假定了在温度降低至 30°C 且厌氧条件下脱毒菌株 *Paecilomyces variotii* FN89 会迅速死亡，接入酿酒酵母后即可开始乙醇发酵。而生物脱毒菌株 *Paecilomyces variotii* FN89 是一株嗜中温、可在氧气限制条件下存活的丝状真菌<sup>[107]</sup>。*Paecilomyces variotii* FN89 也曾被报道可用于在厌氧条件下乙醇的发酵<sup>[108, 109]</sup>，因此我们推测在乙醇发酵过程中酿酒酵母和 *Paecilomyces variotii* FN89 可能存在一定的竞争关系。

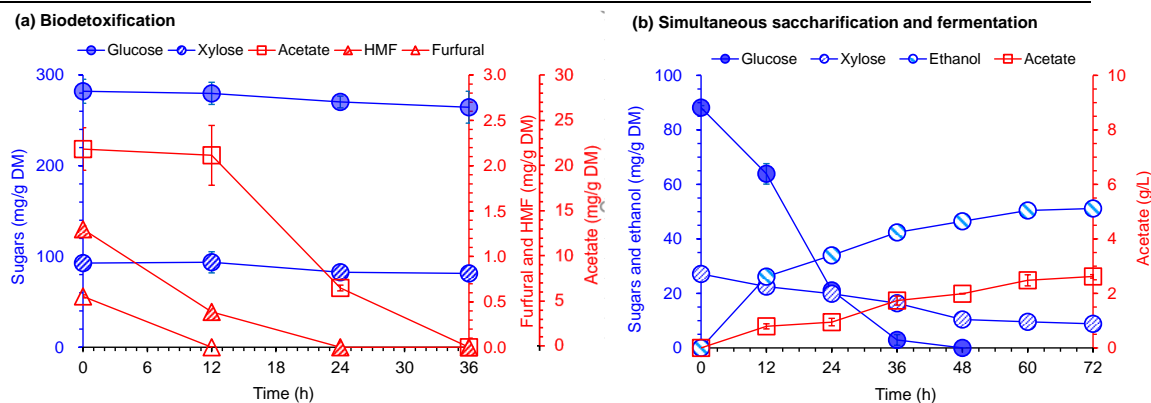


图 2.4 调整生物炼制链后的生物脱毒 (a) 以及后续的同时糖化与共发酵 (SSCF) (b), 生物脱毒在 37°C 条件下进行 24 h, SSCF 在 30°C、180 rpm 条件下进行 72 h

Fig. 2.4 Biodetoxification (a) and the subsequent simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) (b) in the re-framed biorefinery chain. The biodetoxification was carried out at 37°C within 24 h. SSCF was carried out at 30 °C, 180 rpm for 72 h.

为了验证我们的猜想 (*Paecilomyces variotii* FN89 在乙醇发酵过程中可能会存活), 在新一轮的乙醇发酵过程中取样进行稀释 ( $10^{-6}$ ) 涂布, 观察发酵液中 *Paecilomyces variotii* FN89 和 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 的存活情况。从图 2.5 可以看出: 脱毒后直接进行乙醇发酵, 发酵 24 h 时仍有大量 *Paecilomyces variotii* FN89 存活, 直至发酵 48 h, *Paecilomyces variotii* FN89 才完全死亡。而当我们在脱毒后增加一段 50°C, 12 h 的灭活后, 乙醇发酵过程中并无 *Paecilomyces variotii* FN89 存活。更值得注意的是, 当 *Paecilomyces variotii* FN89 存活在乙醇发酵体系中时, 发酵菌株 XH7 的菌落数明显少于经过 50°C 加热的一组。这表明在之前的实验中, 存在 *Paecilomyces variotii* FN89 与酿酒酵母的竞争 (此外, 另外一组实验也验证了这一点: 脱毒后的水解液不接入酿酒酵母, 关闭通气, 经过 48 h 发酵, 经检测, 水解液中的葡萄糖和木糖浓度分别减少了 30 g/L 和 10 g/L 左右, 说明液态脱毒后 *Paecilomyces variotii* FN89 仍在其中存活且对可发酵糖进行了大量消耗。) 因此, 当 *Paecilomyces variotii* FN89 存活时, 不仅是发酵菌株的细胞活力受到了影响, 水解液中的可发酵糖也会被 *Paecilomyces variotii* FN89 进行一定程度的消耗, 从而进一步降低了乙醇的发酵指标。

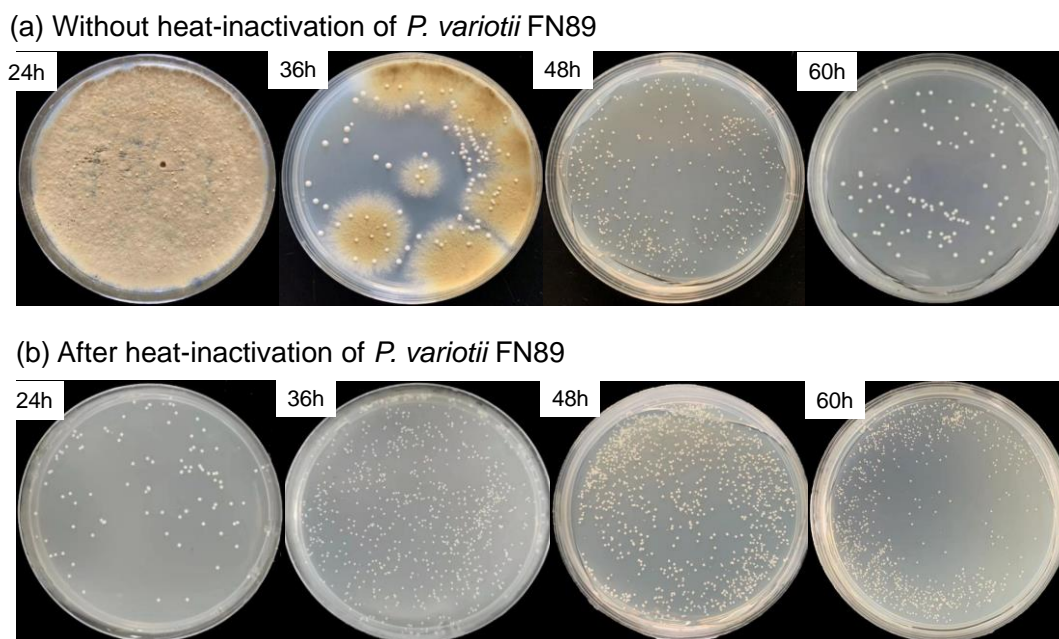


图 2.5 *P. variotii* FN89 和 *S. cerevisiae* XH7 在脱毒后水解液中的细胞活力

Fig. 2.5 Viability of *P. variotii* FN89 and *S. cerevisiae* XH7 in the fermentation broth after biodegradation.

注：上面为脱毒后不经二次加热直接发酵的水解液进行的涂布（a）；下面为脱毒后经过 12 h 加热后的水解液进行发酵的过程中进行的涂布（b）。二次加热时的温度设为 50°C，涂布时将发酵液稀释到  $10^{-6}$ ，然后取 100  $\mu\text{L}$ ，在 YPD 平板上进行涂布，之后放置于 30°C 培养箱中培养 72 h。

Note: The above was the CFU (a) of the hydrolysate that is directly fermented after detoxification without secondary heating; the following was the CFU (b) during the fermentation of the hydrolysate heated for 12 h after detoxification. The temperature during the secondary heating was set to 50°C, and the fermentation broth was diluted to  $10^{-6}$  before coating, and then 100  $\mu\text{L}$  was taken and spread on the YPD plate, and then placed in a 30°C incubator for 72 h.

因此为了保证酿酒酵母的正常生长发酵及释放更多的可发酵糖，基于上述提出的柠檬酸预处理玉米纤维的原位糖化脱毒策略，在脱毒结束后进行 50°C、12 h 加热，然后再进行纤维素乙醇发酵。由图 2.6 可以看出，在 12 h 的灭活及二次糖化过程以后，葡萄糖浓度上升了 6.52%，木糖浓度上升了 29.9%，乙酸浓度上升了  $0.52 \pm 0.03$  g/L，这表明水解液在这一过程中得到了进一步的糖化。

发酵得到的乙醇浓度达到了  $70.17 \pm 1.57$  g/L，与常规的生物炼制进行的发酵相比，提升了约 122%，与未二次加热的调整生物炼制链的发酵相比，乙醇浓度提升了 39%。最终残余木糖  $8.34 \pm 1.20$  g/L，残余乙酸  $3.63 \pm 0.30$  g/L，在酿酒酵母可以耐受的浓度范围内。结果证明，增设的二次加热过程不仅使得 *Paecilomyces variotii* FN89 迅速灭活并提高了 *S. cerevisiae* XH7 的活力，还起到了延长糖化时间的作用，有效提升了乙醇转化率。

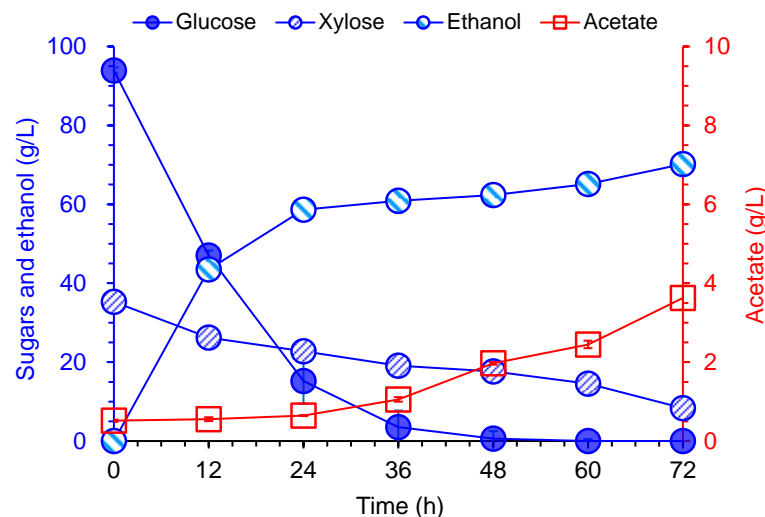


图 2.6 增设二次加热后进行 SSCF

Fig. 2.6 Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) in the re-framed biorefinery chain with heat inactivation after biodetoxification.

注：在调整生物炼制链的工艺中，液态脱毒后增设二次加热过程，再进行乙醇发酵。生物脱毒在 37°C 条件下进行 24 h，二次加热在 50°C 条件下进行 12 h，SSCF 在 30°C、180 rpm 条件下进行 72 h。

Note: In the process of adjusting the biorefining chain, a secondary heating process was added after liquid detoxification, and then ethanol fermentation was carried out. Biodetoxification was carried out at 37°C for 24 h, the secondary heating was carried out at 50°C for 12 h, and SSCF was carried out at 30°C and 180 rpm for 72 h.

### 2.3.4 玉米纤维生物转化的物料衡算

上述结果表明了以传统干法生物炼制技术为基础，针对玉米纤维原料提出的调整生物炼制链顺序的先糖化后脱毒发酵的技术成功实现了对玉米纤维生产纤维素乙醇的转化。为了进一步表明该技术在废水排放、转化率等方面的结果，进行了物料衡算，数据采用上述实验结果，如图 2.5 所示。

以干重为 100 kg 的玉米纤维为基础，按照之前组分测定的结果，它含有 26.50 kg 的纤维素、30.50 kg 的半纤维素、和 12.30 kg 的淀粉。

在预处理过程中，将含有 4.00 kg 柠檬酸的水溶液与原始物料一起进入反应器中，并泵入 54.41kg 的水蒸气。预处理后生成了 200.55 kg 物料。其中仅有部分纤维素和半纤维素水解成 1.98 kg 葡萄糖和 5.35 kg 木糖。同时，部分柠檬酸在预处理过程中降解，剩余 2.64 kg。使用氢氧化钙调节 pH，发生酸碱中和反应生成 2.64 kg 柠檬酸钙，柠檬酸钙为固体形式存在而不被后续的生物脱毒过程降解。糖化过程中加入总质量为 215.95 kg 的纤维素酶和水，使糖化的总体固含量为 25% (w/w) 左右。经过 *Paecilomyces variotii* FN89 的生物脱毒过程（包括 12 h，50°C 的灭活过程），全部的糠醛、5-HMF 和乙酸被降解，同时可发酵糖（葡萄糖和木糖）浓度有所提升，得到 31.49 kg 葡萄糖和 11.94 kg 木糖。但仍有部分葡聚糖和木聚糖未被水解，这部分聚糖或寡糖将在后续的 SSCF 中逐渐被水解释放。添加 2.88 kg 的营养盐和以 10% (v/v) 的比例接入发酵三级种子后进入后续同步糖化共发酵过程。

发酵完成后，经过精馏和固液分离操作，100 kg 玉米纤维原料干物质（含可发酵糖 69.30 kg）总共生产得到 29.54 kg 乙醇，乙醇得率为 0.43 g/g，相当于理论产率的 86%，与理论得率的偏差主要是由于在预处理及脱毒过程中少量的糖损失造成的。发酵结束后的发酵液中剩余 3.31 kg 木糖和 1.44 kg 乙酸盐。精馏过程生成可直接循环利用的 25.26 kg 精馏水。精馏后经固液分离得到 171.35 kg 固体残渣可用作 DDGS（含水 103.01 kg）及 293.19 kg 废水。在整个玉米纤维的生物转化过程中，酸预处理过程中物料完全吸收酸液，并无废水产生。而最终经糖化脱毒发酵后废水的生成仅为 9.93 kg/kg 乙醇，废水排放指标与玉米乙醇生物转化相近<sup>[12]</sup>。

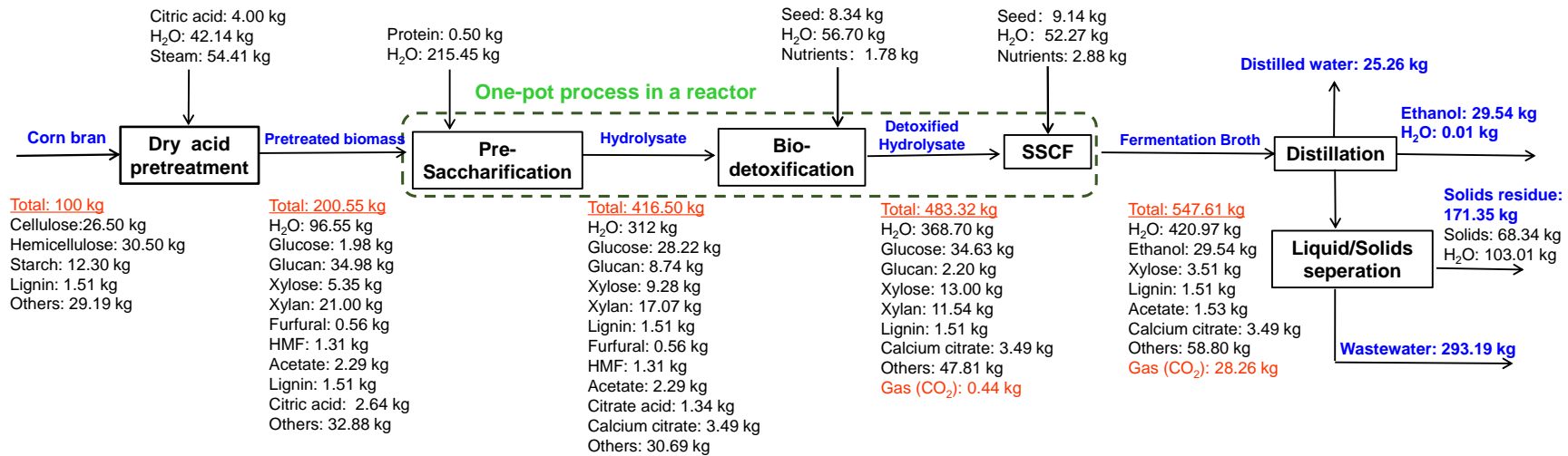


图 2.7 玉米纤维乙醇转化的物料衡算

Fig. 2.7 Feedstock mass balance of corn fiber ethanol conversion

注：假设原玉米纤维中的淀粉全部经过柠檬酸预处理水解为葡萄糖。生物脱毒过程包括 50°C 热灭活 12 h，预糖化、生物解毒和 SSCF 步骤在同一反应器中进行，视为连续过程。由于蒸馏和固液分离过程产生的固体残渣中木质素含量很少（3.38%，DM），以 DDGS（distillers dry grains with solubles, DDGS）的形式输出。

Note: It was assumed that the starch in the original corn fiber was hydrolyzed to glucose after citric acid pretreatment. The biotreatment process included heat inactivation at 50°C for 12 h. The pre-saccharification, biotreatment and SSCF steps were carried out in the same reactor, which was regarded as a continuous process. Because the solid residue produced by the distillation and solid-liquid separation process contains very little lignin (3.38%, DM), it was output in the form of DDGS (distillers dry grains with solubles, DDGS).

### 2.3.5 本研究与其他研究各项指标的比较

为了进一步验证对经过柠檬酸预处理的玉米纤维进行先糖化后脱毒发酵这一技术路线的优势，与之前报道的对玉米纤维进行物理和化学方法预处理的生物炼制过程进行了比较，如表 2.2。

稀硫酸法、稀碱法、热水、以及氨气膨爆的方法都被证实了可以用于玉米纤维的预处理过程<sup>[58, 110]</sup>，通过酶解糖化及微生物发酵的方法得到了多种产品，包括微生物氢、油脂、木糖醇、乙醇等（表 2.2）。尽管报道的炼制过程转化率都较高，但普遍存在着固含量较低、产量较低的问题，增加了后续的产物回收及废水处理成本。此外，还有一些研究采用生物降解的方法对木质纤维素原料进行酶解，其本质其实是利用真菌本身的消化能力或分泌有消化能力的相关酶对木质纤维素中的半纤维素和纤维素进行酶解<sup>[73]</sup>。另一方面，以各种物理方法或化学方法进行的预处理都会产生抑制物，而之前的研究中应用的去除抑制物的方法，除了要耗费大量清水以外，另外的方法是用过量活性炭吸附，两种方法都不是真正的在去除抑制物，只是进行了稀释或转移。无论是对水的耗费还是活性炭的使用都会增加整个工艺的成本。在酶的使用量方面，由于之前的研究使用的酶的种类各不相同，对酶的使用量不能单一地进行比较，但是对于之前的几个乙醇得率较高的研究进行分析，可以看出，较高的酶使用量或多种酶的组合酶制剂对提高乙醇的得率可能起到积极的作用<sup>[45, 71]</sup>。

而本研究以不去淀粉的玉米纤维为原料，柠檬酸作为预处理催化剂，得到的固体形态的玉米纤维，可以以 25% 的高固含量进行糖化发酵。通过合理的设计糖化和脱毒手段，最终得到了较高的乙醇产量（ $70.17 \pm 1.57 \text{ g/L}$ ）。值得注意的是，由于在玉米纤维物料中存在部分淀粉，会严重影响预处理及糖化效果，因此大部分报道均以脱淀粉的玉米纤维为研究对象。但本研究的采用的柠檬酸催化的干式稀酸预处理技术，对未脱淀粉的玉米纤维的高温预处理，并未生成大量抑制物，同时也保证了预处理后玉米纤维的高效水解能力。

预处理技术是生物炼制过程的关键步骤，能否在低能耗、低污染物排放、低糖损失的前提下保证物料的高水解效率是判断一项预处理技术在实际应用中是否可行的重要标准。先进的干式稀酸预处理技术，以极高固液比混合物料和酸液，仅需少量蒸汽在短时间内即可完成对物料的有效破坏，并保留大部分可发酵糖。由于物料完全吸收酸液，对容器的腐蚀降至可接受标准。本研究以柠檬酸代替硫酸，既减少了抑制物的生成，同时也避免了潜在大量硫化物的排放。

对于稀酸预处理后的玉米纤维脱毒手段，之前的研究主要集中于碱石灰、中和、活性炭吸附等手段（表 2.2）。在干法生物炼制过程，对于干式稀酸预处理物料（如麦秆和秸秆）的固态生物脱毒，可有效去除预处理物料中的乙酸、5-HMF 和糠醛等微生物生长抑制物，保证发酵菌株的正常生长。但由于玉米纤维的半纤维素含量较高，部分半纤维素无法在酸预处理过程中水解，因此部分乙酰基残留于原有结构中，在固态脱毒过程中得以保留。在随后的糖化过程中，残留的乙酰基释放，严重危害发酵菌株的

正常生长，因此传统地干法生物炼制过程并不适用于玉米纤维的生物转化。新提出的先糖化后脱毒的概念，并未发现明显的抑制物对纤维素酶的抑制作用，大部分乙酰基在预糖化工程中释放。而新筛选的生物脱毒菌株在高固含量液体条件下也表现出了良好的生物解毒能力，增加的二次糖化及灭活步骤，更加有效地保障了发酵菌株的高效转化。在同一反应器内的连续糖化、脱毒和发酵也精简了装备设置，可有效减少设备的投资。

表 2.2 以玉米纤维为原料进行乙醇发酵研究的概述，包括对其中部分淀粉的利用

Table 2.2 Summary of cellulosic ethanol production from corn fiber feedstock (excluding the cases of co-fermentation with starch)

Pretreatment	Detoxification	Solids content (w/v)	Dosage of enzymes (per gram dry matter)	Ethanol titer (g/L)	Ethanol yield (g/g corn fiber)	Wastewater generation (g/g ethanol)	References
Steam explosion with SO <sub>2</sub>	<u>Overliming</u>	2%	22.5 FPU <u>Celluclast 1.5L</u> 5 IU <u>Novozyme 18850-</u> 80 U glucoamylase	6.9	0.49	~145.1	Bura 等 <sup>[45]</sup>
Dilute KOH and NaOH	Water washing	5%	25 FPU <u>Celluclast 1.5L</u> , 25 IU <u>Novozyme 188</u>	12.5	0.25	~78.2	Gáspár 等 <sup>[44]</sup>
Dilute NaOH	Water washing	~4.3%	~15 FPU ( <u>Spezyme</u> CP)	3.3	0.077	~86.6	Shrestha 等 [56]
Liquid hot water	Water washing	7.8%	10 FPU <u>Celluclast</u> 1.5L/ <u>Novozyme 188</u>	~20.0	~0.26	~29.3	Mosier 等 <sup>[111]</sup>
Extrusion	None	~7%	~5.9 FPU <u>Celluclast</u> 1.5L, 38 CBU $\beta$ - glucosidase and 1 FBG <u>Viscozyme L</u>	29.1	0.41	~34.4	Myat 等 <sup>[71]</sup>
Citric acid pretreatment	Biodetoxificati on	25%	~10 FPU <u>CTec 2.0</u>	70.2	0.28	~9.9	This study

## 2.4 本章小结

柠檬酸是一种酸性适中的有机酸，利用商品柠檬酸对玉米纤维进行预处理，实现了对其中木质纤维素组分的有效破坏，并最终完成了对玉米纤维向燃料乙醇得到生物转化。得出主要结论如下：

(1) 柠檬酸预处理在充分释放可发酵糖的前提下，少量的抑制物产生，降低了后续 *Paecilomyces variotii* FN89 生物脱毒的难度；

(2) 调整生物炼制链，将糖化在生物脱毒之前进行，完全释放半纤维素组分中的乙酰基，再在后续液态原位脱毒中完全脱除乙酸，可以解决乙酸浓度过高而影响乙醇发酵的问题，最终乙醇的发酵浓度为 70.17 g/L。

(3) *Paecilomyces variotii* FN89 可以在相对厌氧的环境中维持活性并消耗环境中的糖，在原位液态脱毒和乙醇发酵之间增加二次加热是必要的，也是有效的。

(4) 对整个工艺流程进行物料衡算，分析表明其发酵指标、废水排放和能源指标等方面均与玉米淀粉乙醇相似或接近。随着人口增多，粮食问题日益加剧的当下，此工艺进行的纤维素乙醇毫无疑问是具有竞争力的，因此拥有很好的产业化前景。

### 第 3 章 自产柠檬酸作为催化剂对玉米纤维进行生物炼制

#### 3.1 引言

玉米纤维作为一种富含纤维素和半纤维素的木质纤维素原料来源，对其的低效利用实际上造成了一定的浪费和能源的损失。之前的研究中，我们采用一种新提出的工艺方式，对生物炼制链进行调整，即将糖化过程调整到生物脱毒过程前面进行，使其中的半纤维素完全水解，乙酰基基本完全释放，从而将脱毒达到最好的效果。最终，凭借高固含量的发酵体系，实现了玉米纤维的高效转化，得到较高乙醇得率的同时，较少的废水排放和能耗指标也基本与玉米淀粉乙醇一致，有较好的工业应用前景。

之前我们使用的柠檬酸，是购买的商品柠檬酸。柠檬酸作为一种大宗调味品，被广泛应用于各行各业，尤其以食品行业中的调味剂、保鲜剂及精细化工中的化妆品添加剂居多<sup>[96, 112]</sup>。尽管柠檬酸的酸性较上述提到的有机酸较弱，但玉米纤维结构松散（干磨法生产），比较容易被水解。成功应用柠檬酸实现了对玉米纤维的高效转化之后，如果可以对原料的来源进行自给自足，则能够将整个工艺的成本进一步降低。柠檬酸的生产发酵自上世纪四十年代以来<sup>[79, 87]</sup>，已经经过了几十年的更新换代，生产技术非常成熟且市场趋于饱和，应用各种微生物进行柠檬酸发酵的研究都取得了不错的进展。

本实验室的黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288（上海工业微生物研究所，中国）是一株好氧型柠檬酸发酵菌株，且能高效同步利用葡萄糖和木糖。之前的研究已经实现了黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 在木质纤维素体系中同步糖化与好氧发酵生产纤维素柠檬酸，并最终达到 136.3 g/L 的柠檬酸最大浓度<sup>[88]</sup>。

玉米可以通过湿磨法被分离为玉米纤维以及内部的胚、胚乳三部分，玉米淀粉即在胚乳中积累。在上一章的研究中，我们成功利用玉米纤维进行了乙醇的发酵生产，对内部其他成分的进一步转化将实现对玉米粒完整的利用，其工艺转化如图 3.1 所示。玉米淀粉被用来生产柠檬酸，自产的柠檬酸再被用于玉米纤维酸预处理的催化剂，从而实现酸催化剂的自给自足，进一步减少玉米纤维乙醇转化的成本。

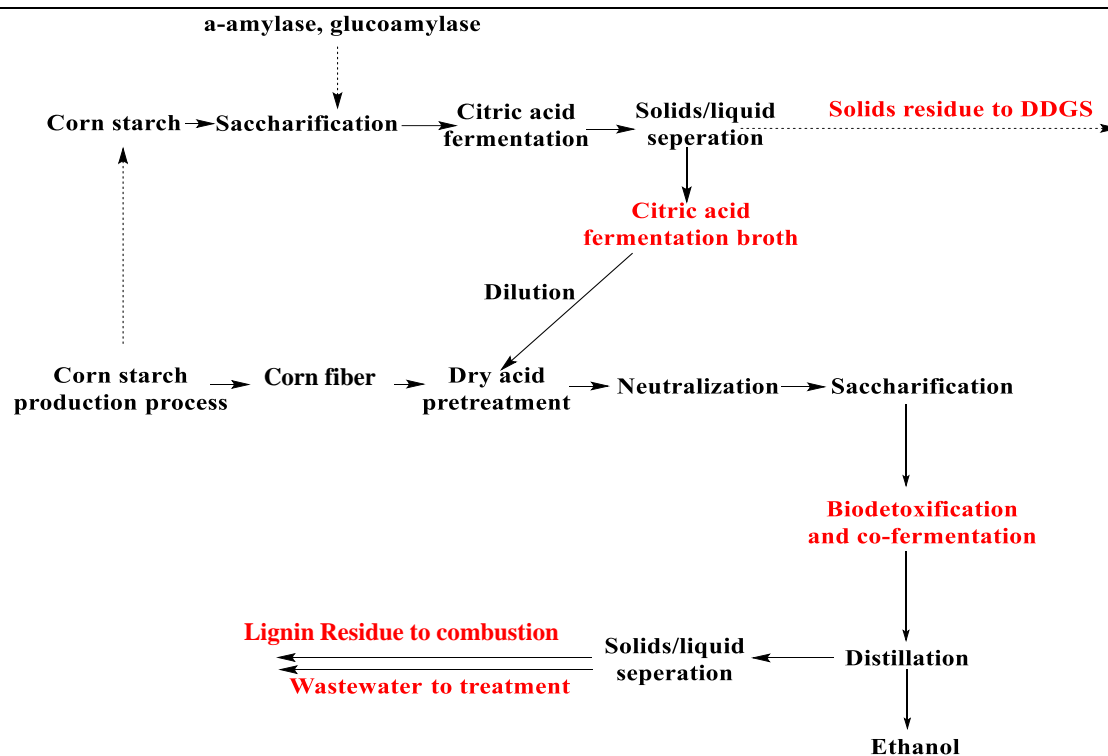


图 3.1 玉米纤维和玉米淀粉被分别利用的工艺流程图

Fig. 3.1 Process flow chart of corn fiber and corn starch being utilized

在本小节的研究中，我们计划利用筛过的玉米淀粉为原料，经过液化和糖化两步得到可发酵糖，利用黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 进行柠檬酸发酵。发酵结束后，由于柠檬酸以游离的形式存在，故只经过简单的固液分离，而没有其他复杂的分离操作，便可得到浓度不低于 100 g/L 的柠檬酸溶液。该柠檬酸溶液可以当作玉米纤维预处理过程中的酸催化剂，对玉米纤维进行干酸预处理。预处理后的玉米纤维进行组分测定和乙醇发酵等，通过乙醇发酵浓度和分析发酵液及固体残渣中的离子浓度，评价与传统的硫酸预处理、购买的商品柠檬酸进行预处理相比各有什么优势和劣势。

## 3.2 材料与方法

### 3.2.1 原料、酶及试剂

玉米粉（玉米粒购自中国吉林省，自行进行粉碎、筛分得到颗粒较小且质地均匀的玉米粉）；其他原料、酶及试剂详见 2.2.1。

### 3.2.2 菌株和培养基

黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 购买自上海工业微生物研究所（中国，上海）。黑曲霉的孢子液和 60% (v/v) 甘油以 1: 1 (v/v) 的比例保藏在 -80°C 的深冷冰箱中。活化该菌种的 PDA 培养基成分包括 200 g/L 的土豆浆（将新鲜土豆切块后蒸煮至软烂），20 g/L 葡萄糖和 2% (w/w) 琼脂。黑曲霉的种子培养基成分包括：70 g/L 葡萄糖，2.5 g/L 氯化铵，2.5 g/L 磷酸二氢钾，0.25 g/L 七水硫酸镁，0.24 mg/L 五水硫酸铜，1.1 mg/L 七水硫酸锌，6.4 mg/L 七水硫酸亚铁，3.6 mg/L 氯化锰。

用于预处理玉米纤维脱毒的菌种和乙醇发酵菌种及其对应的培养基详见 2.2.2。

### 3.2.3 玉米粉的糖化及柠檬酸发酵

经过处理后的玉米粉中的主要成分是淀粉，故需要添加  $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶两种酶对其进行糖化。由于发酵罐的温度达不到  $90^{\circ}\text{C}$ ，故玉米淀粉的糖化在 2-L 的锥形瓶中进行。 $\alpha$ -淀粉酶的添加量为 22 U/g DM，液化条件为  $90^{\circ}\text{C}$ ，150 rpm，3 h；糖化酶的添加量为 100 U/g DM，糖化条件为  $60^{\circ}\text{C}$ ，150 rpm，12 h。玉米粉的固含量为 20% (w/w)，糖化结束后将玉米粉水解液转移到 5-L 的反应器中进行后续发酵。

黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 从冻存管中转移到 PDA 固体培养基中进行活化， $28^{\circ}\text{C}$ ，72 h；之后从 PDA 培养基中转移到种子培养基中，通过血球计数法控制种子液中孢子的浓度在  $2\text{-}3\times 10^5$  孢子数/mL， $28^{\circ}\text{C}$ ，36 h。

玉米粉的水解液、种子液以及种子培养基（不包括葡萄糖）一起转入发酵罐中进行柠檬酸发酵，发酵条件为  $33^{\circ}\text{C}$ 、300 rpm、初始 pH 调至 6.0 左右，后续 pH 不控制，1 vvm 通气量、192 h。

### 3.2.4 利用自产柠檬酸对玉米纤维进行预处理

柠檬酸发酵结束后，将发酵液分装进 200-mL 的离心瓶中，10000 rpm，15 min，得到柠檬酸发酵液的上清液，由于柠檬酸以游离形式存在，不需要另外的分离操作。利用 HPLC 检测上清液中柠檬酸的浓度，通过添加清水使柠檬酸浓度为预处理需要的浓度，提前 12 h 测量原始玉米纤维的含水量，根据含水量计算预处理的反应体系。1200 g (DM) 玉米纤维与 600 g 柠檬酸溶液共同加入 20-L 预处理反应器中，柠檬酸的酸用量为 4.0% (w/w, DM)，即固液比为 2: 1，搅拌三分钟。预处理反应条件为  $165\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、2 min，50 rpm。预处理反应过程中的操作方法如 Zhang 等<sup>[35]</sup>和 He<sup>[102]</sup>，预处理反应结束后，物料从底部出料口排出。预处理后的玉米纤维的 pH 用少量 5M 的 NaOH 溶液调整至 4.8 左右，用于后续的生物脱毒和糖化过程。

### 3.2.5 预处理玉米纤维的糖化、脱毒和乙醇发酵

自产柠檬酸预处理的玉米纤维的糖化、脱毒和乙醇发酵依然采用第 2 章中提到的调整后的生物炼制链顺序，有效脱出原始组分中的大量乙酰基，保证后续的发酵能够顺利进行。

预处理玉米纤维的预糖化在 5-L 发酵罐内进行。发酵罐经过不低于  $115^{\circ}\text{C}$ 、不低于 1.8 个绝对大气压的内部压强条件进行灭菌，所有物料、营养盐、培养基等都经过灭菌。糖化条件为 25% (w/v 固含量，纤维素酶用量 5 mg/g DM， $50^{\circ}\text{C}$ ，200 rpm，12 h。随着糖化的进行，乙酰基大量释放，糖化液中乙酸浓度上升导致 pH 下降，故随时补充 5M 的氢氧化钠溶液将 pH 控制在 4.8 左右，糖化结束时取样并利用高效液相色谱测定葡萄糖和木糖浓度。

取冻存管中 *Paecilomyces variotii* FN89 首先在 PDA 平板上活化培养 72 h，温度为  $37^{\circ}\text{C}$ ；接着用接种环将平板上的孢子转接到 PDA 斜面上， $37^{\circ}\text{C}$  培养 72 h；用无菌水将孢子从斜面上洗下，转接到用 500 mL 锥形瓶装盛的 100 mL 合成培养基中，接种量为

1% (v/v), 37°C, 300 rpm, 18 h, 作为生物脱毒过程的种子液。按 10% (v/v) 的接种量接入脱毒菌株 *Paecilomyces variotii* FN89, 500 rpm、通气量 1 vvm、37°C。脱毒过程中每隔 12 h 取样检测抑制物及可发酵糖浓度。

保藏在冻存管中的酿酒酵母 XH7 转接到装有 30 mL YPD 培养基的 100-mL 锥形瓶中, 30°C 活化 12 h, 活化三代以后, 以 10% 的接种量转接入 5% 固含量玉米纤维水解液中, 200 rpm, 30°C 培养 12 h 作为一级种子液。将一级种子按照 10% 接种量转接入 10% 固含量的玉米纤维水解液中, 200 rpm, 30°C 培养 16 h。酿酒酵母 XH7 二级种子液以 10% (v/v) 接种量接入发酵罐。发酵条件为 30°C、200 rpm、5M 氢氧化钠调节 pH 5.5。发酵过程中每隔 12 h 取样并检测可发酵糖及乙醇的浓度。以上实验均重复三次。

### 3.2.6 柠檬酸得率计算

柠檬酸的得率根据 Zhou<sup>[113]</sup> 中提到的方法及公式进行计算。其公式为:

$$\text{Citric acid yield} = \frac{[CA] \times V - [CA]_0 \times V_0}{[Glu]_0 \times V_0} \times \frac{M[Glu]}{M[CA]} \times 100\% \quad (3-1)$$

公式中的字母分别表示为:

CA 和 CA<sub>0</sub> 分别表示发酵结束和开始时柠檬酸的浓度, g/L;

V 和 V<sub>0</sub> 分别是发酵结束和开始时的发酵液体积, L;

[Glu]<sub>0</sub> 是发酵初始的葡萄糖浓度, g/L;

M[Glu]/M[CA] (0.9375) 是葡萄糖对柠檬酸的转化系数。

### 3.2.7 可发酵糖、柠檬酸、抑制物、乙醇的分析方法

HPLC 的使用详见 2.2.6。

### 3.2.8 乙醇得率的计算

乙醇得率的计算方法详见 2.2.7。

### 3.2.9 发酵结束后相关离子含量的检测方法

为了将传统硫酸预处理的生物炼制乙醇发酵、柠檬酸预处理的调整生物炼制链的乙醇发酵与自产柠檬酸做酸催化剂的调整生物炼制链的乙醇发酵进行比较, 发酵结束后分别对发酵液上清及残渣中的离子浓度进行检测。

金属离子 K<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>、Na<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup> 等阳离子含量的检测采用采用 Han<sup>[114]</sup> 中提到的方法。

阴离子 SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 和 PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 等的含量使用离子色谱 (Dionex ICS-1100) 测得, 其中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 65°C, 流速 1 mL/min。梯度洗脱方法为: 10 mM 的 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。

## 3.3 结果与讨论

### 3.3.1 玉米粉的柠檬酸发酵

柠檬酸是一种四碳三羧酸, 葡萄糖对其的理论转化率是 100%, 因此利用玉米粉中的淀粉糖化后的糖化液进行柠檬酸的发酵, 可以较轻易地得到高浓度的发酵结果。将黑

曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 在 PDA 固体培养基和含有丰富营养盐的合成培养基中活化培养后，接入 5-L 发酵罐中进行发酵，192 h 后，其发酵结果经 HPLC 检测后如图 3.2 所示。

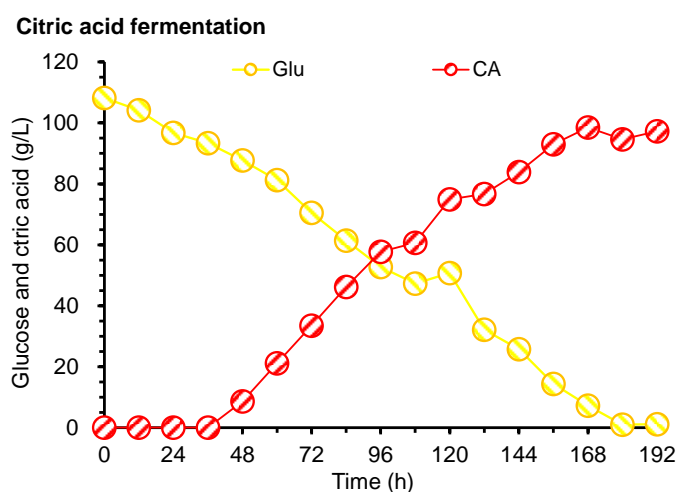


图 3.2 玉米粉的柠檬酸转化

Fig. 3.2 Fermentation of citric acid from corn meal

注：以固含量为 20% (w/w) 的玉米粉糖化后的糖化液进行柠檬酸的发酵，温度 33°C，通气量 1 vvm，300 rpm，初始 pH 调整至 6.0，后续 pH 不控制，发酵时长为 192 h。

Note: The hydrolysate of corn flour with a solid content of 20% (w/w) was used for citric acid fermentation with condition of 33°C, 300 rpm for 192 h. The aeration rate was 1 vvm, and the initial pH was adjusted to 6.0.

从图 3.2 可以看出，发酵的前 36 h，葡萄糖的浓度出现下降，但没有观测到柠檬酸的生产。一方面，黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 的生长和增殖需要消耗一部分的碳源，导致葡萄糖的下降；另一方面，有证据表明，当 pH 接近或低于 3 时，*Aspergillus niger* SIIM M288 才开始柠檬酸的发酵<sup>[115]</sup>，更早的研究表明，黑曲霉柠檬酸发酵中积累柠檬酸的原理跟低 pH 时的草酰乙酸水解酶有关，这意味着当 pH 没有降到足够低时，发酵体系中的有机酸更多以草酰乙酸的形式存在<sup>[116]</sup>。经过 192 h 的发酵，108.2 g 的葡萄糖生成了 97.2 g 的柠檬酸，得率约为 89.8%。较高的发酵得率，也证明通气量和搅拌转速是合适的发酵条件，过高的通气量和过高的转速会导致溶氧的上升，过高的溶氧将使菌丝过度生长，而过高的菌丝尺寸不利于实现柠檬酸的高效生产<sup>[117]</sup>。

### 3.3.2 自产柠檬酸对玉米纤维进行预处理

将发酵完成后的柠檬酸发酵醪进行简单的固液分离，根据其中的柠檬酸浓度加水进行调整，按 2.2.3 的方法对玉米纤维进行预处理，预处理后的玉米纤维经过两步酸解法测量其中的单糖（葡萄糖和木糖）、寡糖（葡寡糖和木寡糖）以及组分（纤维素和半纤维素），其结果如图 3.3 所示。

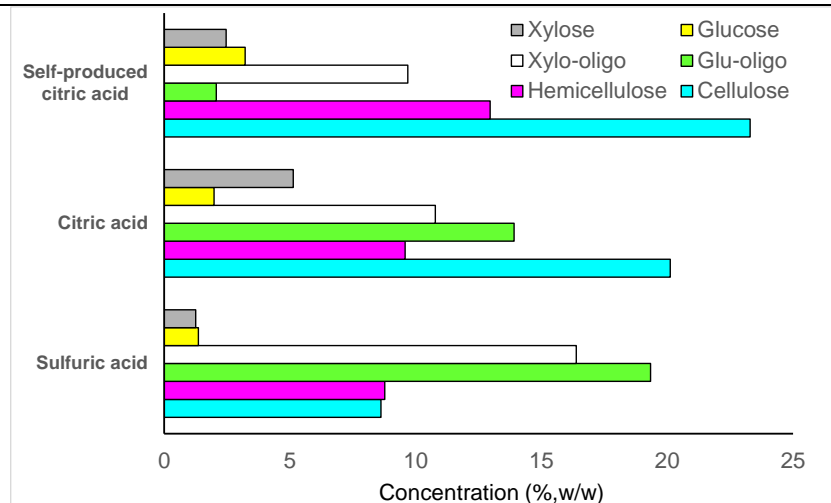


图 3.3 不同酸预处理的玉米纤维组分对比

Fig. 3.3 Comparison of corn fiber components pretreated with different acid

由图可以看出，与硫酸作为催化剂进行预处理相比，柠檬酸作为酸催化剂时，预处理后的玉米纤维有更高的纤维素及半纤维素含量，这意味着预处理的强度要弱得多，但也使得预处理后更大比例的纤维素和半纤维素组分保留了下来，而不是与酸过度反应生成大量糠醛、5-HMF 等抑制物。硫酸预处理的玉米纤维中单糖相对更少，可能是转化为了抑制物（数据未显示）。商品柠檬酸和自产柠檬酸相比，纤维素和半纤维素含量更高，寡糖的含量相对较少，说明更多的纤维素和半纤维素保留了下来，只要纤维素组分能够充分暴露于纤维素酶环境中，就不会对后续的糖化造成影响。此外，应用柠檬酸进行预处理还有两个优势。第一，柠檬酸作为三羧酸循环的中间产物，在后续液态脱毒和乙醇发酵过程中可能会参与到菌种的三羧酸循环中，有利于菌种的生长；第二，柠檬酸被脱毒菌种菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 分解或被酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 代谢利用，从而实现了酸催化剂的无污染降解，解决了硫酸预处理会产生排放硫氧化物的问题，是真正无污染又“自给自足”的生产方式。发酵结束后固体残渣和发酵上清中的离子浓度比较将进一步说明此优势，详情见于 3.3.4。硫酸钙固体的存在可能还会在发酵过程的高速搅拌中对 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 的菌体产生影响而降低乙醇的生产。

### 3.3.3 自产柠檬酸预处理的玉米纤维进行乙醇发酵

预处理的玉米纤维以 25% (w/w) 固含量进行糖化，后经过原位液态脱毒、50°C 二次加热然后进行乙醇发酵。发酵结果如图 3.4 所示。与商品柠檬酸预处理的玉米纤维相比，自产柠檬酸预处理的玉米纤维经过糖化得到的葡萄糖浓度基本与前者一致，分别为 95.05 g/L（图 3.4）和 94.06 g/L，木糖的浓度为 36.20 g/L，比商品柠檬酸预处理的玉米纤维糖化后的水解液还高，这说明自产柠檬酸的浓度和酸性完全可以胜任商品柠檬酸，应用于玉米纤维的预处理是完全合适的。经过 72 h 的发酵，木糖的利用程度更加彻底，可能是因为柠檬酸发酵液中剩余的氮源等营养成分，共同促进了发酵菌种的生长和代谢。最终，乙醇浓度为 61.02 g/L，乙酸浓度最终达到了 3.4 g/L，处在 *Saccharomyces cerevisiae*

XH7 可以耐受的浓度范围内。

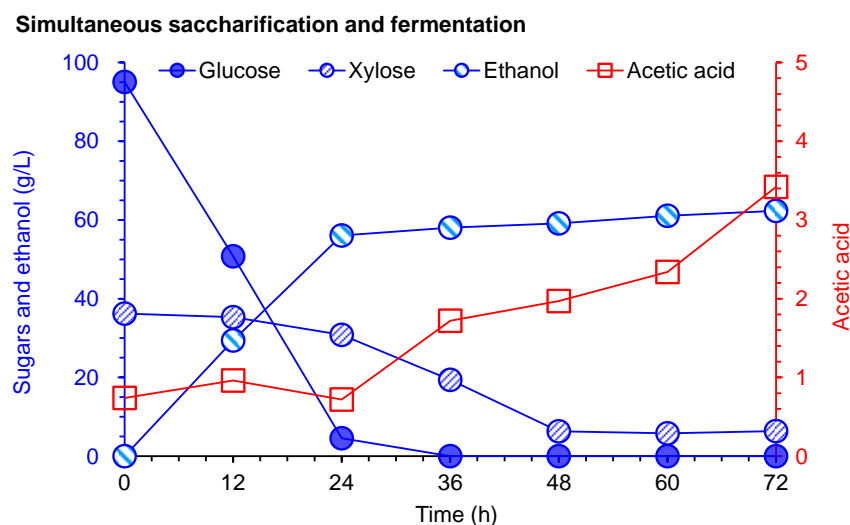


图 3.4 自产柠檬酸预处理玉米纤维的乙醇发酵

Fig. 3.4 Ethanol fermentation of corn fiber pretreated by self-produced citric acid

发酵条件: SSCF 在 5-L 发酵罐中进行, 25%固含量, 30°C, 180rpm

Fermentation conditions: SSCF was carried out in a 5-L fermenter, 25% solid content, 30°C, 180rpm

### 3.3.4 自产柠檬酸预处理玉米纤维工艺与传统生物炼制的比较

从前述研究可以看出, 自产柠檬酸对玉米纤维进行预处理后的各项指标, 包括组分、糖化效果以及最终的发酵性能都与商品柠檬酸相似, 为了体现出在成本和环境保护方面的优势, 本小节将通过定义几种模式对其进行直观的比较。

为了方便阐述, 我们将传统的硫酸干式稀酸预处理并采用固态脱毒的方式定义为模式 1; 将利用商品柠檬酸进行预处理、采用先糖化后原位液态脱毒且脱毒和发酵之间增加 12 h 二次糖化过程的方式定义为模式 2; 将利用自产柠檬酸进行预处理、采用先糖化后原位脱毒且脱毒和发酵之间增加 12 h 二次糖化的方式定义为模式 3。我们从固含量、脱毒时间、发酵时间、乙醇浓度及总时间等几个方面对 3 种模式进行大致的比较。可以看出, 模式 2 与模式 1 相比较, 由于柠檬酸参与 *Paecilomyces variotii* FN89 的生长代谢以及低固含量下较少的抑制物含量, 使得脱毒速率加快, 降低了糖的损失从而生产了更多的乙醇, 模式 1 中硫酸钙颗粒在高速搅拌中可能也影响了酿酒酵母 XH7 的活力而抑制了发酵活性。而模式 3 与模式 2 相比, 相似的初始糖浓度最终乙醇发酵浓度较低, 说明可发酵糖对乙醇的转化率较低, 可能是水解液中存在柠檬酸发酵过程中遗留的细胞毒素影响了酿酒酵母 XH7 的发酵性能。即便如此, 乙醇的发酵得率也达到了理论得率的 99%, 说明在 SSCF 中, 依然有部分没被检测到的葡萄糖和木糖被水解释放并被迅速利用进行了乙醇的发酵。

表 3.1 定义的三种模式间的比较

Table 3.1 Comparisons between the three models defined

	Solid loading (w/w)	Detoxification time (h)	Fermentation time (h)	Ethanol titer (g/L)	Total time (h)
Model 1	25%	42	96	43.39	150
Model 2	25%	36	72	72.09	132
Model 3	25%	36	72	61.02	132

模式 1: 传统的硫酸预处理玉米纤维, 先后经过固态脱毒和 SSCF;

模式 2: 商品柠檬酸预处理的玉米纤维, 调整生物炼制链顺序的乙醇转化, 且原位液态脱毒和发酵之间增加 12 h 的二次加热过程;

模式 3: 自产柠檬酸预处理的玉米纤维, 调整生物炼制链顺序的乙醇转化, 且原位液态脱毒和发酵之间增加 12 h 的二次加热过程。

Mode 1: Traditional sulfuric acid pretreatment of corn fiber, followed by solid state detoxification and SSCF;  
Mode 2: Commercial citric acid pretreatment of corn fiber, adjustment of the biorefinery chain sequence of ethanol conversion, and a secondary heating process was added between in-situ liquid detoxification and fermentation for 12 hours ;

Mode 3: Self-produced citric acid pretreated corn fiber. Adjusting the ethanol conversion of the biorefinery chain sequence, and added 12 hours of secondary heating between in-situ liquid detoxification and fermentation process.

除此之外, 为证实发酵液的上清和残渣中各种元素尤其是 S 和 Ca 的含量, 我们对上述三种模式发酵结束后的样品进行了离子色谱检测。发酵液经蒸馏去掉乙醇和含有的其他沸点较低的杂醇。之后进行固液分离, 残渣置于常温风干, 上清直接用于检测, 样品前处理方法详见 3.2.9。如图 3.5 所示为离子检测的结果。由图 3.5 (a) 可以看出: 模式 2 和模式 3 相较于模式 1, 发酵残液中含有更高的 Na, 这主要是来自预处理后中和过程的 NaOH; 由于模式 1 中硫酸的高强酸性, 导致中和过程引入大量的 Ca, 模式 2 和模式 3 中的 Ca 含量降低了约 97.5%, 同时 S 元素的含量减少了 96.7%; 模式 3 比模式 2 含有更多的 K、P 元素, 这主要是由于 *Aspergillus niger* M288 发酵培养基中相关元素的引入。同样的, 从图 3.5 (b) 可以更加清楚地看出, 在三种模式的发酵液残渣中, 由于硫酸钙以固体的形式存在, S 和 Ca 的含量相差了 1-2 个数量级之多, 其中模式 2 和模式 3 中的 S 主要来自于培养基中营养盐的添加, Ca 则主要来自于玉米纤维本身少量的灰分。其他几种元素的含量则保持着不大的差距, 这是符合预期的结果。离子色谱的结果, 证明了发酵之后模式 2 和模式 3 的残液和残渣中 S 和 Ca 的含量远低于模式 1, 因此模式 2 和模式 3 的应用, 可以从根本上解决残渣燃烧后排放硫氧化物的环境问题。

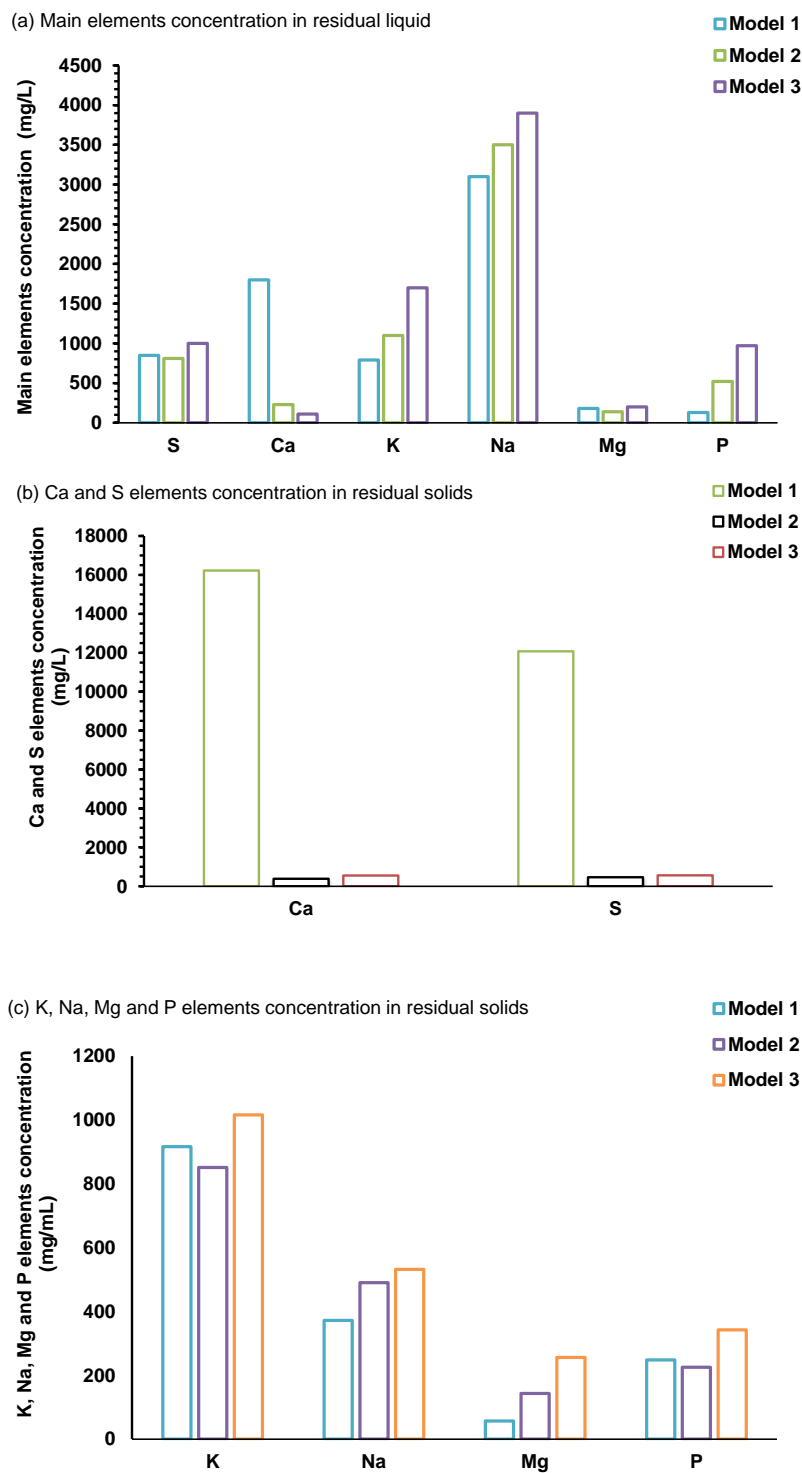


图 3.5 三种模式中残液和残渣中主要元素的离子浓度

Fig. 3.5 Ion concentrations of major elements in the residual solution and residue of the three modes

### 3.4 本章小结

本章证明了用玉米淀粉进行柠檬酸发酵，再用自产的柠檬酸对玉米纤维进行预处理，进而进行生物乙醇的发酵是行得通的。得到的结论如下：

- (1) 利用自行粉碎筛分的玉米粉进行糖化，得到的高糖水解液能够进行柠檬酸的

发酵，并得到浓度足以进行玉米纤维预处理的柠檬酸发酵液；

(2) 利用自产的柠檬酸对玉米纤维进行预处理，其效果跟商品柠檬酸基本一致，完全能替代商品柠檬酸；

(3) 与传统的硫酸预处理相比，商品柠檬酸和自产柠檬酸的应用解决了令工业界头疼的硫酸钙固体的难题，且避免了发酵后残渣经简单燃烧处理后排放的  $\text{SO}_2$  等温室气体；

(4) 利用玉米粉生产的柠檬酸可以替代商品柠檬酸，那么利用小麦秸秆、玉米秸秆等来源更加广泛的木质纤维素原料进行自产柠檬酸发酵，并应用于后续的预处理操作中，也应该是可行的。因此，本章的研究，对未来生物炼制中处理结构较松散的原料给出了更加“低碳环保”的思路。

## 第 4 章 结论与展望

### 4.1 结论

本研究聚焦于木质纤维素原料库的扩充及其的转化利用，针对玉米纤维的生物炼制乙醇发酵工艺进行推进与创新。由于玉米纤维中极高的半纤维素含量，以及半纤维素组分中包含的大量乙酰基，导致传统的生物炼制手段无法使乙酸在固态生物脱毒阶段得到完全降解，而在后续 SSCF 过程中又陆续释放达到影响发酵菌株正常生长的浓度。新提出的调整生物炼制链的方法，即将糖化过程调整至生物脱毒之前，再进行罐内的原位液态脱毒，成功地解决了这一问题，最终实现了玉米纤维向燃料乙醇的转化。

另一方面，为了进一步降低生产工艺的成本，尝试进行柠檬酸的发酵生产，经过简单分离处理即用于玉米纤维的预处理。在证明了可行性之后既实现了柠檬酸的自给自足，又完成了玉米粒湿磨后的两大部分——玉米纤维和玉米淀粉——的完整利用。

(1) 第 2 章中采用柠檬酸对玉米纤维进行较低强度的预处理，达到了良好的效果，既高效破坏了玉米纤维中木质纤维素的结构，又释放了少量抑制物。解决了硫酸钙及温室气体的排放问题。

(2) 针对乙酸浓度过高致使发酵失败的问题，调整生物炼制链顺序的方法取得了很好的效果，在 12 h 预糖化过程中，绝大部分乙酰基以乙酸的形式释放出来，后续的原位液态生物脱毒过程中，脱毒菌种宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 将抑制物彻底降解，保证后续的乙醇发酵得以正常进行。

(3) 液态生物脱毒与发酵之间增加的二次加热过程既是使 *Paecilomyces variotii* FN89 灭活又是减少可发酵糖损失的必要措施。

(4) 经过对玉米纤维的柠檬酸预处理以及对传统生物炼制链的调整，本研究成功地将玉米纤维中的可发酵糖转化为燃料乙醇，其得率为 0.43 g/g 可发酵糖，为理论得率的 86%，废水排放量为 9.93 kg/kg 乙醇，与玉米淀粉乙醇的各项指标相近，此外，柠檬酸预处理很好地解决了硫酸钙固体及硫氧化物的排放问题，显示出很强的环境包容性。

(5) 本实验室的柠檬酸自主发酵技术形成成熟的配套体系，之前已经利用黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 在玉米秸秆的水解液体系中进行了柠檬酸的 SSCF，得到了高浓度的柠檬酸发酵液。在本研究中，利用玉米粒除去玉米纤维的部分进行高糖水解液的制备，并利用黑曲霉进行发酵，同样得到了较高的柠檬酸发酵指标。

(6) 将柠檬酸发酵液进行简单的固液分离操作，按预处理的体系进行浓度的配置，应用于玉米纤维的预处理，预处理后的玉米纤维经过第 2 章中提到的工艺，得到了较高的乙醇发酵指标 61.02 g/L。

(7) 最终进行的离子浓度检测及分析可以发现，无论利用商品柠檬酸还是自产柠檬酸对玉米纤维进行预处理，发酵结束后无论是发酵残液还是残渣中 S 元素和 Ca 元素

都只有低水平的积累量，从而比较彻底地解决了本文初始所关心的大气污染问题。

## 4.2 创新点

(1) 成功利用柠檬酸对玉米纤维进行了预处理操作，有效破坏了其中的木质纤维素结构，实现了后续的预糖化及乙醇发酵操作，达到了较高的发酵指标。

(2) 调整了传统的生物炼制链的顺序，将糖化过程调整到生物脱毒过程之前进行，糖化完成后再进行原位液态脱毒，解决了发酵过程中乙酸浓度过高影响发酵正常进行的问题。

(3) 首次在同一个反应器中完成了预糖化、生物脱毒及 SSCF 过程，避免了工序中转罐可能发生的染菌风险，大大节省了工艺所占用的空间面积。

(4) 自产柠檬酸实现了酸催化剂的自给自足，降低了生产成本，为以后行业的发展和改进方向提供建议。无污染的生产方式也是高污染排放工业生产的解决方案。

## 4.3 展望

本研究通过实现玉米纤维向燃料乙醇的转化，对拓宽木质纤维素原料库有积极意义，基于我们的研究，得到了较高的乙醇发酵指标及柠檬酸发酵指标，但研究过程中依然存在部分问题：

(1) 在本研究中，玉米纤维被自然风干至含水量 20%左右，并被作为原料进行预处理操作，但是在大规模的工业应用中，将含水量较高的玉米纤维进行长时间自然风干显然是不现实的。而原始物料中由于含水量不同，当进行柠檬酸预处理时，基于原料干重的柠檬酸用量的效果可能会下降。因此探索更加合适的柠檬酸用量计算方法是必要的。

(2) 在原位液态生物脱毒阶段，判断脱毒的终点是控制何时停止氧气供应并开始升温过程进行二次加热的关键。我们起初采用的方法是通过观察脱毒过程中体系的 pH 和溶氧变化，发现当脱毒完成时，体系的 pH 往往上升 0.6-0.8，溶氧则从校准的 100% 降至 10% 以下。然而，达到以上条件的时间并不是十分一致，使得无法精确后续实验的准备时间，只能进行大致地计划。因此探索脱毒结束的时间点依然是一个可以改进的工作点。

(3) 本研究利用黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288 对玉米粉的糖化液进行柠檬酸发酵，并将自产柠檬酸成功应用于玉米纤维的预处理过程中。将此方法推而广之，利用小麦秸秆、玉米秸秆等进行柠檬酸发酵，再利用柠檬酸对玉米纤维进行预处理，将进一步降低原料的成本，同时提高麦秆等木质纤维素原料的利用。

(4) 玉米纤维乙醇的产业化评估。本研究完成了玉米纤维的小试操作，证明了其进行燃料乙醇的可行性，且对其的发酵指标和废水排放等进行了分析。但其能否真正应用于工业生产，并满足产业化所有指标的要求，还有待进行技术经济性等的评估。

### 参考文献

- [1] Xu Y, Ramanathan V. Well below 2 degrees C: Mitigation strategies for avoiding dangerous to catastrophic climate changes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(39): 10315-10323.
- [2] Kuenzer C. Winds of Change: Wind Power Development in China. *Business Forum China*, 2007, 01/07: 68-70.
- [3] 电力与能源编辑委员会. 国家能源局印发《生物质能发展“十三五”规划》. *电力与能源*, 2016(06):761-761.
- [4] Yılmaz S, Selim H. A review on the methods for biomass to energy conversion systems design. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2013, 25: 420-430.
- [5] Su Y, Zhang P, Su Y. An overview of biofuels policies and industrialization in the major biofuel producing countries. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2015, 50: 991-1003.
- [6] Cherpozat L, Loranger E, Daneault C. Ultrasonic pretreatment of soft wood biomass prior to conventional pyrolysis: Scale-up effects and limitations. *Biomass and Bioenergy*, 2019, 124: 54-63.
- [7] Abraham A, Mathew A K, Park H, et al. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 2020, 301: 122725.
- [8] Dos Santos A C, Ximenes E, Kim Y, et al. Lignin-Enzyme Interactions in the Hydrolysis of Lignocellulosic Biomass. *Trends in Biotechnology*, 2019, 37(5): 518-531.
- [9] Almomani F, Bhosale RR, Khraisheh MM, et al. Enhancement of biogas production from agricultural wastes via pre-treatment with advanced oxidation processes. *Fuel*, 2019, 253: 964-974.
- [10] Gonzalez-Fernandez C, Sialve B, Molinuevo-Salces B. Anaerobic digestion of microalgal biomass: Challenges, opportunities and research needs. *Bioresource Technology*, 2015, 198: 896-906.
- [11] Chen X, Kuhn E, Jennings EW, et al. DMR (deacetylation and mechanical refining) processing of corn stover achieves high monomeric sugar concentrations ( $230 \text{ g L}^{-1}$ ) during enzymatic hydrolysis and high ethanol concentrations ( $>10\% \text{ v/v}$ ) during fermentation without hydrolysate purification or concentration. *Energy and Environmental Science*, 2016, 9(4): 1237-1245.
- [12] Liu G, Bao J. Maximizing cellulosic ethanol potentials by minimizing wastewater generation and energy consumption: Competing with corn ethanol. *Bioresource Technology*, 2017, 245(Pt A): 18-26.
- [13] Tillman DA, Duong DN B, Harding NS. Chapter 4 - Blending Coal with Biomass: Cofiring Biomass with Coal. *Solid Fuel Blending*. City: Butterworth-Heinemann, 2012: 125-200.
- [14] Testa ML, Tummino ML. Lignocellulose Biomass as a Multifunctional Tool for Sustainable Catalysis and Chemicals: An Overview. *Catalysts*, 2021, 11(1).

- [15] Tao L, Schell D, Davis R, et al. NREL 2012 Achievement of Ethanol Cost Targets: Biochemical Ethanol Fermentation via Dilute-Acid Pretreatment and Enzymatic Hydrolysis of Corn Stover[R]. City, 2014.
- [16] Park SH, Pham TT H, Kim TH. Effects of Additional Xylanase on Saccharification and Ethanol Fermentation of Ammonia-Pretreated Corn Stover and Rice Straw. *Energies*, 2020, 13(17).
- [17] Abdulsattar MO, Abdulsattar JO, Greenway GM, et al. Optimization of pH as a strategy to improve enzymatic saccharification of wheat straw for enhancing bioethanol production. *Journal of Analytical Science and Technology*, 2020, 11(1).
- [18] 郭冬生,黄春红. 近 10 年来中国农作物秸秆资源量的时空分布与利用模式. *西南农业学报*, 2016,29(04):234-240.
- [19] Shahzad K, Sohail M, Hamid A. Green ethanol production from cotton stalk. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 2019, 257.
- [20] Megawati, Sediawan W B, Sulisty H, et al. Kinetics of sequential reaction of hydrolysis and sugar degradation of rice husk in ethanol production: effect of catalyst concentration. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2): 2062-2067.
- [21] Batalha LA, Han Q, Jameel H, et al. Production of fermentable sugars from sugarcane bagasse by enzymatic hydrolysis after autohydrolysis and mechanical refining. *Bioresource Technology*, 2015, 180: 97-105.
- [22] Castro R CDA, Fonseca BG, Dos Santos HTL, et al. Alkaline deacetylation as a strategy to improve sugars recovery and ethanol production from rice straw hemicellulose and cellulose. *Industrial Crops and Products*, 2017, 106: 65-73.
- [23] Maleki SS, Mohammadi K, Ji KS. Characterization of Cellulose Synthesis in Plant Cells. *Scientific World Journal*, 2016, 2016: 8641373.
- [24] Somerville C, Bauer S, Brininstool G, et al. Toward a systems approach to understanding plant cell walls. *Science (New York, NY)*, 2005, 306: 2206-2211.
- [25] Pareek N, Gillgren T, Jonsson LJ. Adsorption of proteins involved in hydrolysis of lignocellulose on lignins and hemicelluloses. *Bioresource Technology*, 2013, 148: 70-77.
- [26] Templeton DW, Scarlata CJ, Sluiter JB, et al. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 2. Method uncertainties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2010, 58(16): 9054-9062.
- [27] Sheng Y, Lam SS, Wu Y, et al. Enzymatic conversion of pretreated lignocellulosic biomass: A review on influence of structural changes of lignin. *Bioresource Technology*, 2021, 324: 124631.
- [28] Zheng Y, Yu Y, Lin W, et al. Enhancing the enzymatic digestibility of bamboo residues by biphasic phenoxyethanol-acid pretreatment. *Bioresource Technology*, 2021, 325: 124691.
- [29] Li C, Knierim B, Manisseri C, et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic

- saccharification. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4900-4906.
- [30] McIntosh S, Vancov T. Enhanced enzyme saccharification of *Sorghum bicolor* straw using dilute alkali pretreatment. *Bioresource Technology*, 2010, 101(17): 6718-6727.
- [31] Ren N, Xu J, Su D, et al. Biological hydrogen production from hydrogen-producing fermentative liquid steam-exploded pretreatment of corn straw. *Journal of Biotechnology*, 2008, 136.
- [32] Pan C, Liu Z, Bai X, et al. Structural Changes of Lignin from Wheat Straw by Steam Explosion and Ethanol Pretreatments. *BioResources*, 2016, 11.
- [33] Zahoor, Tu Y, Wang L, et al. Mild chemical pretreatments are sufficient for complete saccharification of steam-exploded residues and high ethanol production in desirable wheat accessions. *Bioresource Technology*, 2017, 243: 319-326.
- [34] Hideno A, Inoue H, Tsukahara K, et al. Wet disk milling pretreatment without sulfuric acid for enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresource Technology*, 2009, 100(10): 2706-2711.
- [35] 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(6): 4480-4488.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] 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): 1.
- [39] Todhanakasem T, Yodsanga S, Sowatad A, et al. Inhibition analysis of inhibitors derived from lignocellulose pretreatment on the metabolic activity of *Zymomonas mobilis* biofilm and planktonic cells and the proteomic responses. *Biotechnology and Bioengineering*, 2018, 115(1): 70-81.
- [40] Soares L B, Bonan C I D G, Biazzi LE, et al. Investigation of hemicellulosic hydrolysate inhibitor resistance and fermentation strategies to overcome inhibition in non-saccharomyces species. *Biomass and Bioenergy*, 2020, 137: 105549.
- [41] López PC, Peng C, Arneborg N, et al. Analysis of the response of the cell membrane of *Saccharomyces cerevisiae* during the detoxification of common lignocellulosic inhibitors. *Scientific Reports*, 2021, 11(1).
- [42] Takahashi C, Takahashi D, Carvalhal M, et al. Effects of Acetate on the Growth and Fermentation Performance of *Escherichia coli* KO11. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, 81: 193-203.
- [43] Zaldivar J, Ingram L. Effect of organic acids on the growth and fermentation of ethanologenic *Escherichia coli* LY01. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 66: 203-210.

- [44] Gáspár M, Kálmán G, Réczey K. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. *Process Biochemistry*, 2007, 42(7): 1135-1139.
- [45] Bura R, Mansfield SD, Saddler JN, et al. SO<sub>2</sub>-catalyzed steam explosion of corn fiber for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002, 98(1): 59-72.
- [46] 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(1): 51.
- [47] Elmekawy A, Diels L, De Wever H, et al. Valorization of cereal based biorefinery byproducts: reality and expectations. *Environmental Science and Technology*, 2013, 47(16): 9014-9027.
- [48] Akin DE, Rigsby LL. Corn fiber: structure, composition, and response to enzymes for fermentable sugars and coproducts. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2008, 144(1): 59-68.
- [49] Moreau R, Powell M, Hicks K. Extraction and quantitative analysis of oil from commercial corn fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996, 44.
- [50] Rose DJ, Inglett GE, Liu SX. Utilisation of corn (*Zea mays*) bran and corn fiber in the production of food components. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2010, 90(6): 915-924.
- [51] Jiang K, Li L, Long L, et al. Comprehensive evaluation of combining hydrothermal pretreatment (autohydrolysis) with enzymatic hydrolysis for efficient release of monosaccharides and ferulic acid from corn bran. *Industrial Crops and Products*, 2018, 113: 348-357.
- [52] Rao RS, Jyothi Ch P, Prakasham RS, et al. Xylitol production from corn fiber and sugarcane bagasse hydrolysates by *Candida tropicalis*. *Bioresource Technology*, 2006, 97(15): 1974-1978.
- [53] Grohmann K, Bothast RJ. Saccharification of corn fibre by combined treatment with dilute sulphuric acid and enzymes. *Process Biochemistry*, 1997, 32(5): 405-415.
- [54] Agger J, Johansen KS, Meyer AS. pH catalyzed pretreatment of corn bran for enhanced enzymatic arabinoxylan degradation. *New Biotechnology*, 2011, 28(2): 125-135.
- [55] Leathers TD, Nunnally MS, Stanley AM, et al. Utilization of corn fiber for production of schizophyllan. *Biomass and Bioenergy*, 2016, 95: 132-136.
- [56] Shrestha P, Rasmussen M, Khanal SK, et al. Solid-substrate fermentation of corn fiber by *Phanerochaete chrysosporium* and subsequent fermentation of hydrolysate into ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(11): 3918-3924.
- [57] De Mattos NR, Colodette JL, De Oliveira CR. Alkaline extraction and carboxymethylation of xylans from corn fiber. *Cellulose*, 2019, 26(3): 2177-2189.
- [58] Saha BC, Bothast RJ. Pretreatment and enzymatic saccharification of corn fiber. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1999, 76(2): 65-77.
- [59] Beri D, Herring CD, Blahova S, et al. Coculture with hemicellulose-fermenting microbes reverses inhibition of corn fiber solubilization by *Clostridium thermocellum* at elevated solids loadings. *Biotechnology for Biofuels*, 2021, 14(1): 24.

- [60] Hespell RB. Fermentation of xylan, corn fiber, or sugars to acetoin and butanediol by *Bacillus polymyxa* strains. *Current Microbiology*, 1996, 32(5): 291-296.
- [61] Qureshi N, Ezeji TC, Ebener J, et al. Butanol production by *Clostridium beijerinckii*. Part I: use of acid and enzyme hydrolyzed corn fiber. *Bioresource Technology*, 2008, 99(13): 5915-5922.
- [62] Coda R, Katina K, Rizzello CG. Bran bioprocessing for enhanced functional properties. *Current Opinion in Food Science*, 2015, 1: 50-55.
- [63] Ma F, Li X, Yin J, et al. Optimisation of double-enzymatic extraction of arabinoxylan from fresh corn fibre. *Journal of Food Science and Technology*, 2020, 57(12): 4649-4659.
- [64] Xia Y, Ho NWY, Gong CS. Saccharification and fermentation of dilute pretreated corn fiber to ethanol using a recombinant xylose-fermenting saccharomyces. *Abstracts of Papers American Chemical Society*, 1995,209:1-2.
- [65] Li X, Xu Z, Yu J, et al. In situ pretreatment during distillation improves corn fiber conversion and ethanol yield in the dry mill process. *Green Chemistry*, 2019, 21(5): 1080-1090.
- [66] Li X, Chen S, Yu Y, et al. Ethanol production from mixtures of Distiller's Dried Grains with Solubles (DDGS) and corn. *Industrial Crops and Products*, 2019, 129: 59-66.
- [67] Norvell K, Nghiem N. Soaking in Aqueous Ammonia (SAA) pretreatment of whole corn kernels for cellulosic ethanol production from the fiber fractions. *Fermentation*, 2018, 4(4).
- [68] Shrestha P, Khanal SK, Pometto AL, 3rd, et al. Ethanol production via in situ fungal saccharification and fermentation of mild alkali and steam pretreated corn fiber. *Bioresource Technology*, 2010, 101(22): 8698-8705.
- [69] Li X, Chen S, Huang H, et al. In-situ corn fiber conversion improves ethanol yield in corn dry-mill process. *Industrial Crops and Products*, 2018, 113: 217-224.
- [70] Holtzapple M, Cognata M, Shu Y, et al. Inhibition of trichoderma reesei cellulase by sugars and solvents. *Biotechnology and Bioengineering*, 1990, 36(3): 275-287.
- [71] Myat L, Ryu G-H. Characteristics of destarched corn fiber extrudates for ethanol production. *Journal of Cereal Science*, 2014, 60(2): 289-296.
- [72] Kurambhatti C, Kumar D, Rausch K, et al. Ethanol production from corn fiber separated after liquefaction in the dry grind process. *Energies*, 2018, 11(11).
- [73] Beri D, York WS, Lynd L R, et al. Development of a thermophilic coculture for corn fiber conversion to ethanol. *Nature Communication*, 2020, 11(1): 1937.
- [74] Rasmussen ML, Shrestha P, Khanal SK, et al. Sequential saccharification of corn fiber and ethanol production by the brown rot fungus *Gloeophyllum trabeum*. *Bioresource Technology*, 2010, 101(10): 3526-3533.
- [75] Lee JE, Vadlani PV, Faubion J. Corn bran bioprocessing: Development of an integrated process for microbial lipids production. *Bioresource Technology*, 2017, 243: 196-203.
- [76] Buhner J, Agblevor FA. Effect of detoxification of dilute-acid corn fiber hydrolysate on xylitol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2004, 119(1): 13-30.

- [77] Khosravi-Darani K, Zoghi A. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane baggase: experimental design for citric acid production. *Bioresource Technology*, 2008, 99(15): 6986-6993.
- [78] Cavallo E, Charreau H, Cerrutti P, et al. *Yarrowia lipolytica*: a model yeast for citric acid production. *FEMS Yeast Research*, 2017, 17(8).
- [79] Campbell JJR, Gunsalus I. Citric acid fermentation by streptococci and lactobacilli. *Journal of Bacteriology*, 1944, 48: 71-76.
- [80] Soccol C, Vandenberghe L, Rodrigues C, et al. New perspectives for citric acid production and application. *Food Technology and Biotechnology*, 2006, 44.
- [81] Grewal HS, Kalra KL. Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances*, 1995, 13(2): 209-234.
- [82] Soccol C, Vandenberghe L, Rodrigues C, et al. Production of organic acids by solid-state fermentation[M]. *Current Developments in Solid-state Fermentation*, 2008: 205-229.
- [83] Roukas T, Kotzekidou P. Pomegranate peel waste: a new substrate for citric acid production by *Aspergillus niger* in solid-state fermentation under non-aseptic conditions. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2020, 27(12): 13105-13113.
- [84] Vandenberghe LPS, Soccol CR, Pandey A, et al. Microbial production of citric acid. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 1999, 42(3): 263-276.
- [85] Papanikolaou S, Galiotou-Panayotou M, Fakas S, et al. Citric acid production by *Yarrowia lipolytica* cultivated on olive-mill wastewater-based media. *Bioresource Technology*, 2008, 99 (7): 2419-2428.
- [86] Torrado A, Cortes S, Salgado J, et al. Citric acid production from orange peel wastes by solid-state fermentation. *Brazilian Journal of Microbiology*, 2011, 42: 394-409.
- [87] Gerhardt P, Dorrell W, Baldwin I. Citric acid fermentation of beet molasses. *Journal of Bacteriology*, 1946, 52: 555-564.
- [88] Hou W, Bao J. Simultaneous saccharification and aerobic fermentation of high titer cellulosic citric acid by filamentous fungus *Aspergillus niger*. *Bioresource Technology*, 2018, 253: 72-78.
- [89] Tan MJ, Chen X, Wang YK, et al. Enhanced citric acid production by a yeast *Yarrowia lipolytica* over-expressing a pyruvate carboxylase gene. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2016, 39(8): 1289-1296.
- [90] Liu XY, Chi Z, Liu GL, et al. Both decrease in *ACLI* gene expression and increase in *ICLI* gene expression in marine-derived yeast *Yarrowia lipolytica* expressing *INU1* gene enhance citric acid production from inulin. *Marine Biotechnology*, 2013, 15(1): 26-36.
- [91] Liu X, Lv J, Zhang T, et al. Citric acid production from hydrolysate of pretreated straw cellulose by *Yarrowia lipolytica* SWJ-1b using batch and fed-batch cultivation. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 45(8): 825-835.
- [92] Barrington S, Kim JW. Response surface optimization of medium components for citric

- acid production by *Aspergillus niger* NRRL 567 grown in peat moss. *Bioresource Technology*, 2008, 99(2): 368-377.
- [93] Yu B, Zhang X, Sun W, et al. Continuous citric acid production in repeated-fed batch fermentation by *Aspergillus niger* immobilized on a new porous foam. *Journal of Biotechnology*, 2018, 276-277: 1-9.
- [94] Hu W, Li WJ, Yang HQ, et al. Current strategies and future prospects for enhancing microbial production of citric acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(1): 201-209.
- [95] Ranum P, Pena-Rosas JP, Garcia-Casal MN. Global maize production, utilization, and consumption. *Annals of The New York Academy of Sciences*, 2014, 1312: 105-112.
- [96] Dhillon GS, Brar SK, Kaur S, et al. Screening of agro-industrial wastes for citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* NRRL 2001 through solid state fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(7): 1560-1567.
- [97] Adney B, Baker J. Measurement of Cellulase Activities. *Laboratory Analytical Procedure*, 1996, 6: 1-8.
- [98] Ghose T K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*, 1987.
- [99] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1): 248-254.
- [100] Zerva A, Savvides A, Katsifas E, et al. Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol production from lignocellulose through consolidated bioprocessing. *Bioresource Technology*, 2014, 162C: 294-299.
- [101] Li H, Shen Y, Wu M, et al. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*, 2016, 3(1): 51.
- [102] 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(6): 4480-4488.
- [103] 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.
- [104] Sluiter A, Hames B, Scarlata C, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO, 2012,
- [105] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, et al. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. NREL/TP-510-42623. National Renewable Energy Laboratory, Golden CO, 2008.
- [106] Zhang J, Bao J. A modified method for calculating practical ethanol yield at high lignocellulosic solids content and high ethanol titer. *Bioresource Technology*, 2012, 116: 74-79.
- [107] Guo T, He AY, Du TF, et al. Butanol production from hemicellulosic hydrolysate of corn

- fiber by a *Clostridium beijerinckii* mutant with high inhibitor-tolerance. *Bioresource Technology*, 2013, 135: 379-385.
- [108] Houbraeken J, Varga J, Rico-Munoz E, et al. Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssoschlamys spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*). *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(5): 1613-1619.
- [109] Wu JF, Lastick SM, Updegraff DM. Ethanol production from sugars derived from plant biomass by a novel fungus. *Nature*, 1986, 321(6073): 887-888.
- [110] Zerva A, Savvides AL, Katsifas EA, et al. Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol production from lignocellulose through consolidated bioprocessing. *Bioresource Technology*, 2014, 162: 294-299.
- [111] Hespell RB, O'bryan PJ, Moniruzzaman M, et al. Hydrolysis by commercial enzyme mixtures of AFEX-treated corn fiber and isolated xylans. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1997, 62(1): 87-97.
- [112] Mosier NS, Hendrickson R, Brewer M, et al. Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2005, 125(2): 77-97.
- [113] Chysirichote T. Valorization of banana peel for citric acid production under solid state fermentation with *Aspergillus niger*. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2020, 34(1): 49-57.
- [114] Han X, Bao J. General method to correct the fluctuation of acid based pretreatment efficiency of lignocellulose for highly efficient bioconversion. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2018, 6(3): 4212-4219.
- [115] Zhou PP, Meng J, Bao J. Fermentative production of high titer citric acid from corn stover feedstock after dry dilute acid pretreatment and biodetoxification. *Bioresource Technology*, 2017, 224: 563-572.
- [116] Joshi A, Ramakrishnan C. Mechanism of formation and accumulation of citric acid in *Aspergillus niger*. Part I. Citric acid formation and oxaloacetic hydrolase in a citric acid producing strain of *Aspergillus niger*. *Enzymologia*, 1959, 21: 43-51.
- [117] Papagianni M. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*, 2007, 25(3): 244-26

## 附录I 主要实验试剂

实验试剂	试剂规格	生产商
蛋白胨	BC	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
酵母提取物	BC	安琪酵母股份有限公司
琼脂	BC	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
葡萄糖	AR	上海泰坦科技股份有限公司
磷酸二氢钾	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
七水硫酸镁	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸铵	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
氢氧化钙	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
氢氧化钠	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
柠檬酸	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
碳酸钙	AR	上海凌峰化学试剂有限公司
五水硫酸铜	AR	国药集团化学试剂有限公司
七水硫酸锌	AR	国药集团化学试剂有限公司
七水硫酸亚铁	AR	国药集团化学试剂有限公司
氯化锰	AR	上海凌峰化学试剂有限公司

## 附录II 主要仪器设备

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

## 学术成果

投稿论文:

1. Bin Zhang<sup>1</sup>, Baorui Zhan<sup>1</sup>, Jie Bao\*. Reframing biorefinery processing chain of corn fiber for cellulosic ethanol production. *Industrial Crops & Products*. (对应本文第 2 章)
2. Bin Zhang<sup>1</sup>, Baorui Zhan<sup>1</sup>, Jie Bao\*. Starch-like carbohydrates transformation of lignocellulose by biodegradable acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification. *Biotechnology & Bioengineering*

拟申请专利:

1. 一种使用柠檬酸作为催化剂处理玉米纤维生产纤维素乙醇的方法。发明人: (1) 鲍杰, (2) 展宝睿, (3) 张斌

## 致谢

看以前的师兄师姐的毕业论文的时候，我有很多次想象自己会怎么写完这一段致谢，然而脑子里还没有形成一些调理的文字，就已经坐在这里开始了对三年的总结。

本科期间我渡过了贪玩的四年，凭运气以垫底的成绩踏上了考研复试的末班车，初见鲍老师，就是在那时候。在家里人都建议我调剂的时候，是鲍老师的鼓励，让我坚持了自己的选择，这大概是人生第一次没有采纳家人的建议，开始自己独立思考和规划自己的人生，最终凭借复试的逆袭来到了生物能源与生物炼制这个大家庭。我底子不好，基础不牢固，知识领域的短板很多，鲍老师会耐心地教我，从他那里拿给我很多书让我看；我的课题起初频繁地遇到难题，个人状态特别不好，自己在隔壁房间发呆的时候，他看到了过来跟我说不舒服就休息几天，后来也是凭借鲍老师和师兄的点子渡过了课题的瓶颈期，成为了课题中的一个创新点。这就是我三年来的导师，对每一个学生都关照备至尽心尽力，他对学术的赤诚以及在学术领域的理念向我以及每一个同门传播。我还要特别感恩他对我的重视及信任，三年里给我足够多的机会去锻炼、去经历、去承担，在学校这样一个相对温和的环境里学会为人处事待人接物，很多道理会让我受益终生；另外，由于能力不足，实验和日常工作中我犯过一些错误，感恩有这样一位包容的导师，容忍我犯错，慢慢进步。希望以后老师能一切都好，毕业以后的人生道路上，我也会时常想起您。

硕士三年中，另一个对我帮助很大的人是张斌师兄。大概是由于同为山东人的地缘关系，我们在很多方面都有相似的地方，在很多领域有交流的话题，且师兄脑洞大、思路灵活，与他交流特别有意思。尤其感谢他对我科研中的帮助，是他把我慢慢带上了这条路，并帮我逐渐能自己走得很好，我很庆幸自己在每一个人生阶段都能遇到对我这么好的人，所以也祝愿师兄，能过上自己想要的生活。

再就是几个三年来同起居、共学习的人，我的三个室友张翼、钟驭涛、赵晨休以及隔壁寝室的谢智勇、刘广，隔壁寝室兼实验室同仁的贾佳。很多时候我是一个性子直、快言快语雷厉风行的人，日常相处中他们担待了很多。同时，在我经历小低谷的时候，感谢那段时间的陪伴，他们是在困难时期可以依靠可以信任的伙伴。我会怀念大家在一起的日子，希望大家散是满天星，在各自的一方发光发热，一定会再见。

此外，还要感谢张建老师和刘刚老师，二位老师都对我的专业技能和工作进行过指导；感谢刚进实验室时带我实验的柳云龙师兄，他带领我完成了对课题雏形的塑造；感谢韩涛师兄，学习工作中很多本领都受益于他，有这样一个正直向上的师兄在，自己也会变得特别认真；感谢金慈师兄和颜钊师兄的帮助，两人是整个课题组的标杆和榜样；感谢已经毕业的很多位往届的师兄师姐，感谢同届的何妮玲、华珂君和孙鲁欢，祝大家毕业快乐，一切顺利；感谢李景、陈明星两位师弟，一起打球训练的日子让人特别怀念；感谢王雅师姐的监督及投喂，让我按时完成了这篇毕业论文；也同样感谢课题组的刘祺

师姐、苏雷、徐迎迎、李静、吴雷以及其他师弟师妹，我的科研天赋不高，陪同大家实验的时候出现过失误，也没能给大家带来很多有用的帮助，希望大家各自加油，都有光明的未来。

最后，感谢家人这么多年义无反顾的支持和陪伴，走出校园，明天我就长大了，鸦有反哺之义，请给我时间，去回报养育我的土地和人。

2020.4.8 于上海徐汇