

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

博士学位论文

干法生物炼制的脱毒微生物和
低碳转化过程研究

张斌

指导教师姓名: 鲍杰 教授 华东理工大学

申请学位级别: 博士 专业名称: 生物工程

论文定稿日期: 2022.6.5 论文答辩日期: 2022.7.9

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: 曲音波 教授

评 阅 人: 李炳志 教授

勇 强 教授

赵雪冰 副教授

学位论文使用授权声明

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

论文涉密情况：

不保密

保密，保密期（___年___月___日至___年___月___日）

学位论文作者签名：

指导老师签名：

日期： 年 月 日

日期： 年 月 日

作 者 声 明

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

论文作者签名：

年 月 日

干法生物炼制的脱毒微生物和低碳转化过程研究

摘要

从气候变化应对、化石和粮食资源替代、农作物秸秆出路等诸多重大需求角度看，以可再生、低成本、易获取的非粮木质纤维素生物质为原料生产液体生物燃料和生物基化学品，是未来经济社会发展和制造业技术进步的核心领域之一。现有的木质纤维素生物炼制技术存在的高废水排放、高能耗、低转化效率等重大技术障碍，使得近十年来生物炼制工业实践遭遇了重大挫折。生物炼制技术必须进行革命性的技术创新，才能突破常规技术的落后产能技术特征，进而实现真正意义上大规模产业化应用、真正服务于应对气候变化和可持续发展所带来的一系列严峻挑战。

干法生物炼制技术是以玉米干法加工为技术模板研发的木质纤维素生物转化技术。干法生物炼制加工链中，干式稀酸预处理和生物脱毒在零废水、低能耗约束下获得了无抑制物、易水解的木质纤维素物料；高固含量同步糖化与共发酵逼近了玉米干法加工的转化、排放、能耗等技术指标，初步具备了生物炼制技术的产业化应用潜力。目前的干法生物炼制技术中，仍然存在着影响过程效率和经济性的诸多技术障碍，有待于进一步的技术升级。这些障碍包括：（1）现有的生物脱毒菌株树脂枝胞菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 环境适应性较差，脱毒温度不超过 30 °C，且必须在接近中性的条件下生长；（2）生物脱毒需要在固体木质纤维素物料中进行，发酵空间大、耗氧量高、混合均匀度差，局部温度和 pH 波动较大，难以匹配实际工业生产中以液态形式进行的生物转化流程；（3）干式稀酸预处理使用的硫酸催化剂，中和后形成的难溶硫酸盐，因而降低了后续木质素残渣燃烧效率，并存在硫氧化物逸出的风险；（4）干法生物炼制过程的碳足迹分析欠缺，过程的碳中和效率不能定量计算。本论文对干法生物炼制技术进行了一系列的微生物技术和过程工程技术创新，通过系统的应用基础研究，提出并验证了类淀粉化干法生物炼制技术的新概念，突破了上述关键技术障碍，对干法生物炼制技术完成了一次重要的技术进步升级。

本论文第一部分筛选得到了一株新的具有强大生物脱毒能力的菌株，鉴定为宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89。该菌株在 28-42 °C 的广泛温度范围和极低 pH 值 (~2.3) 下具有良好的耐受性，可在极低可发酵单糖消耗下对所有类型的木质纤维素来源抑制物（乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛、香草醛、丁香醛和对羟基苯甲醛等）进行终极、快速的降解，较前一株生物脱毒菌株树脂枝胞菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 具有明显的优势。转录组分析表明，抑制物存在下其糖代谢能力显著降低，具有以抑制物作为优先碳源的遗传优势；低 pH 条件下糖代谢通量和胞内 ATP 合成方式有所调整、DNA 和线粒体内蛋白质伴侣修复功能增强，有助于细胞对酸性环境的耐受性。

本论文第二部分以玉米干法加工技术为模板，通过可降解有机酸为催化剂的干式稀

酸预处理和低 pH 生物脱毒技术, 实现了木质纤维素生物质的类淀粉化转化, 即在零废水、零抑制物和酸催化剂排放、低能耗和低糖消耗的约束下, 将木质纤维素生物质转化为与淀粉生物质组成相近、水解性能相近的固体颗粒状碳水化合物; 在后续的高固含量同步糖化与共发酵过程中, 生物转化、废水和化学品排放、能耗等可量化指标接近玉米原料生产乙醇的水准。本论文将可降解有机酸催化的干式稀酸预处理和低 pH 下生物脱毒后的小麦秸秆和玉米秸秆等木质纤维素生物质定义为类淀粉生物质, 包括后续高固含量同步糖化与共发酵在内的生物炼制过程定义为类淀粉化干法生物炼制。以小麦秸秆和玉米秸秆为原料, 可生物降解草酸为催化剂的干式稀酸预处理效果与硫酸催化剂效果基本一致, 且抑制物产生更低; 宛氏拟青霉 *P. variotii* FN89 在低 pH 下实现了对所有类型抑制物以及草酸催化剂的同步生物降解和脱除, 总可发酵糖损失不超过 6%。干酸预处理和生物脱毒后的小麦秸秆和玉米秸秆物料基本不含有酸催化剂和抑制物, 在形态、可发酵糖含量、酶水解得率、元素含量方面与玉米粉相似。小麦秸秆和玉米秸秆经过类淀粉化生物转化, 分别产生了 78.5 g/L (9.9%, v/v) 和 75.3 g/L (9.5%, v/v) 乙醇, 基于原料纤维素和半纤维素的得率分别为 0.47 g/g 和 0.45 g/g, 与玉米乙醇发酵指标类似 (78.7 g/L, 0.48 g/g)。

本论文第三部分探究了类淀粉化干法生物炼制所产生固体废弃物的合理利用。固体废弃物的最终形式为木质素燃烧灰分。SEM/EDX、XRD 和 FTIR 表征揭示其中含有大量的碳酸钙, 可以作为生物炼制过程的中和剂进行循环使用, 从而降低固废和二氧化碳排放。当木质素燃烧灰分中的碳酸钙作为预处理中和剂时, 纤维素 L-乳酸产量达到了 94.6 ± 2.5 g/L, 与碳酸钙作为中和剂类似; 当灰分用做乳酸发酵中和剂时, 最终乳酸产量达到了 78.3 ± 3.5 g/L, 比碳酸钙中和剂提高了 17.6%。物料平衡结果表明, 在年加工 30 万吨 (干基) 小麦秸秆原料的生物炼制工厂内, 通过对类淀粉化生物炼制燃烧灰分的循环利用, 每年至少可减少 867.0 吨的碳酸钙或 1232.1 吨氢氧化钙的使用。

本论文第四部分针对常规生物炼制技术中玉米籽皮生产燃料乙醇的技术障碍, 对干法生物炼制加工链进行了重新调整。研究表明, 玉米籽皮含量最高的半纤维素组分的分解, 导致其中的乙酰基水合产生大量乙酸, 严重抑制了乙醇发酵菌株的生长和代谢。通过对常规生物炼制加工链的调整, 使乙酰基在脱毒之前完成最大限度的释放和水合, 再在后续的液态脱毒中进行完全的降解。最终实现了玉米籽皮的纤维素乙醇高效转化, 其产量和得率分别为 70.2 ± 1.6 g/L 和 0.43 g/g。

本论文第五部分以生物脱毒手段突破抑制物对乙醇发酵菌株的抑制瓶颈后, 对稀酸水解技术生产纤维素乙醇的潜力进行了重新评估。采用硫酸、磷酸和草酸的混合酸水解, 以玉米秸秆为底物获得了含有 51.1 g/L 葡萄糖和 18.1 g/L 的水解产物, 得率分别为 0.50 g/g 纤维素和 0.22 g/g 木聚糖; 通过半连续液体脱毒方法, 在 24 h 内完全脱除了水解液中的乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛, 最终成功发酵获得乙醇 24.2 g/L, 相当于乙醇得率为 72.6 kg/ton 玉米秸秆。初步技术经济评价表明, 在新的生物脱毒技术克服抑制物瓶颈后, 用廉价酸催化剂代替昂贵的纤维素酶催化剂, 只能补偿 21.5%-89.1% 的乙醇生产损失,

远不能弥补稀酸水解低得率所带来的损失。酸水解技术在生产每吨乙醇的能耗成本也明显高于酶水解过程。现有的酸水解技术即使在突破抑制物瓶颈后，仍然不具备实际应用价值。

本论文第六部分对干法生物炼制平台的高纯度纤维素 L-乳酸生产过程案例建立了基于严格 Aspen Plus 流程模拟计算的详细物料平衡，并进行了初步的生命周期分析。结果表明，生产每 kg 纤维素 L-乳酸的碳排放为 0.279-0.815 kg。当以葡萄糖氧化生产的草酸作为生物可降解预处理催化剂时，可以进一步降低全过程的碳排放至 0.267 kg/kg 纤维素 L-乳酸。

综上所述，本论文提出的类淀粉化干法生物炼制技术，突破了脱毒菌株耐受性较差、硫酸催化剂残留、固废处置等关键技术障碍，推动了干法生物炼制技术的进一步技术升级，为生物炼制技术的产业化应用提供了更为坚实的过程工程和微生物技术基础。

关键词：木质纤维素；生物炼制；预处理；生物脱毒；可降解有机酸催化剂

The study of detoxification microorganism and low-carbon conversion process based on dry biorefining platform

Abstract

The production of liquid biofuels and biochemicals from renewable, low-cost and accessible no-food lignocellulosic biomass is one of the core areas in future economic and social developments, and manufacturing technological advancements, in terms of many vital demands such as mitigation of climate change, substitutions of fossil and food resources, and the outlet of crop straw. However, the lignocellulosic biorefinery demonstration has experienced a significant stagnation in the last decade owing to the technical barriers including large-scale wastewater discharge, high energy consumption, low conversion efficiency with the economic hurdles. Overcoming these technical barriers is a prerequisite for the further revival of this highly promising technology into commercial-scale practice, and then truly serves to address a series of serious challenges caused by climate change and sustainable development faced by human society.

Corn dry milling provides a mature process for the establishment of dry biorefinery technology. The easily hydrolysable and inhibitor-free lignocellulosic biomass was obtained by dry acid pretreatment and biodegradation with zero wastewater emission and low energy consumption in the dry biorefinery processing. The dry biorefinery maximizes the potentials of subsequent simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) for cellulosic ethanol. Both the fermentation efficiency, wastewater discharge and energy consumption in the current dry biorefining are very close to that of corn dry milling processing, indicating that the dry biorefinery has the initial potential for industrial application. There are still many technical barriers affecting the process efficiency and economics in the current dry biorefinery, and the further technical upgrades are required, which are as follows: (1) The present biodegradation *Amorphotheca resinae* ZN1 has the poor environmental adaptability, the biodegradation must be conducted at 30 °C and neutral pH; (2) The biodegradation must be conducted on solid state, resulting in large fermentation volume, high oxygen demand, poor mixing uniformity, and wide local temperatures and pH fluctuations, making it difficult to match the actual industrial production of bioconversion process in the form of liquid feedstock; (3) The mineral acid catalyst, sulfuric acid, used in dry acid pretreatment would be neutralized to solid calcium precipitates as the potential sulfur oxide source in downstream lignin combustion; (4) The carbon footprint of dry biorefinery processing has not been established. In this thesis, a series of technological innovations have been made to the current dry biorefinery processing. A new concept of starch-like biorefinery technology was proposed and verified by overcoming the above-mentioned technical barriers.

In the first part of this thesis, a strain with potential for biodegradation was isolated and identified as *Paecilomyces variotii* FN89. *P. variotii* FN89 is well tolerant to a wide temperature range of 28-42 °C and low pH. *P. variotii* FN89 can ultimately and rapidly degrade

various kinds of lignocellulose-derived inhibitors including acetic acid, furfural, 5-hydroxymethylfurfural (HMF), vanillin, syringaldehyde, and 4-HBA with minimal loss of fermentable sugars. *P. variotii* FN89 has significant advantages over the present biodegradation strain *A. resinae* ZN1 in various biodegradation scenarios. The global transcriptome analysis showed that the sugars metabolism of *P. variotii* FN89 is decreased in the presence of inhibitors, indicating the potential of using inhibitors as the preferred carbon source rather than fermentable sugars. The modification of sugars metabolism and intracellular ATP generation modes, as well as the enhancement of macromolecular DNA repair and mitochondrial protein chaperone function at low pH contribute to cellular resistance to acidic environment.

In the second part of this thesis, lignocellulose feedstock was successfully transformed into starch-like carbohydrates, similar to dry milled corn meal in morphology, fermentable sugar content, enzymatic hydrolysis yield, element contents, and ethanol fermentability by biodegradable acid catalyzed pretreatment and low pH biodegradation. The oxalic acid catalyst was effective on disrupting the lignocellulose structure and also biodegradable at low pH value. The biodegradation fungus *P. variotii* FN89 was capable of degrading the furan/phenolic aldehydes and oxalic acid simultaneously and ultimately, while the fermentable sugars loss of lower than 6%. The obtained starch-like carbohydrates from wheat straw and corn stover were similar to dry milled corn meal in terms of morphological properties, fermentable sugar contents, enzymatic hydrolysis yield, elemental contents, and free of inhibitors and acid catalyst. The bioconversion of starch-like wheat straw and corn stover produced 78.5 and 75.3 g/L of ethanol (9.9% and 9.5%, v/v) with the yield of 0.47 and 0.45 g ethanol/g cellulose/xylose, respectively, compared with 78.7 g/L (10.0%, v/v) from corn meal and the yield of 0.48 g ethanol/g starch. Mass balances suggest that the ethanol yield, wastewater generation, and elemental recycling of the starch-like carbohydrates from lignocellulose were essentially the same as those of corn meal. Therefore, the lignocellulose feedstock after oxalic acid pretreatment and low pH biodegradation is defined as starch-like biomass; the biorefinery processing including the subsequent high solids loading SSCF is defined as starch-like dry biorefinery.

In the third part of this thesis, the valorization of the solid waste generated in starch-like biorefinery was investigated. The essential form of solid waste was the ash from the lignin residue combustion. The characterizations of SEM/EDX, XRD and FTIR showed that the ash contains a significant amount of calcium carbonate, which has the potential to be recycled as a neutralizer in the biorefinery process, thereby reducing the emission of solid waste and CO₂. Using the combustion as the neutralizer for pretreated wheat straw, the final lactic acid titer reached 94.6 ± 2.5 g/L, similar to calcium carbonate as the neutralizer. Using the combustion as lactic acid fermentation neutralizer, the final lactic acid titer reached 78.3 ± 3.5 g/L, which is 17.6% higher than calcium carbonate as neutralizer. The overall materials balance showed that at least 867.0 tons of calcium carbonate and 1232.1 tons of calcium hydroxide per year can be saved by recovering the combustion ash in a biorefinery plant with the processing capacity

of 300,000 tons of dry wheat straw per year.

In the fourth part of this thesis, the current dry biorefinery chain was reframed to efficiently convert corn fiber to cellulosic ethanol. High hemicellulose content of corn fiber lignocellulose is a unique property of this material. Most of the xylose molecules present in the hemicellulose backbone are acetylated and a large amount of free acetic acid is released when the hemicellulose is hydrolyzed, which severely inhibits the growth of ethanol-producing strain. This study reframed the regular biorefinery chain by conducting enzymatic hydrolysis before biot detoxification to completely release acetic acid from hemicellulose in corn fiber. Then the biot detoxification was followed immediately to degrade acetic acid, furfural and HMF with the minimum loss of glucose and xylose. The improved ethanol production (70.2 g/L, 0.43 g/g) was obtained by the reframed chain of corn fiber biorefining.

In the fifth part of this thesis, the direct acid hydrolysis of lignocellulose for cellulosic ethanol production was re-examined after a novel biot detoxification approach was introduced to de-bottleneck the inhibitor barrier in order to avoid using high-cost cellulase. The cocktail of sulfuric acid, phosphoric acid and oxalic acid hydrolyzed corn stover to the 51.1 g/L of glucose (0.50 g/g cellulose) and 18.1 g/L of xylose (0.22 g/g xylan). The furfural, 5-hydroxymethylfurfural and acetic acid in the corn stover hydrolysate were completely removed by *Paecilomyces variotii* FN89, leading to the successful ethanol fermentation of 24.2 g/L, corresponding to 72.6 kg per metric ton of dry corn stover. The techno-economic evaluations suggest that the cost reduction of replacing cellulase enzyme with cheap acid catalysts compensated the partial ethanol loss of sugar conversion to inhibitors (21.5-89.1%). The energy consumption per ton of ethanol produced by acid hydrolysis is also significantly higher than that of enzymatic hydrolysis process. The re-examination of acid hydrolysis process reveals that the technical and economic performance of acid hydrolysis process is still far below that of the enzymatic hydrolysis process even after the inhibitor barrier was solved.

In the sixth part of this thesis, the mass balances of different cellulosic L-lactic acid production technologies on dry biorefinery platforms are calculated based on rigorous Aspen Plus software, and the corresponding life cycle analysis (LCA) is conducted. The results showed that the CO₂ emission per kg of L-lactic acid ranged from 0.279 to 0.815 kg. The CO₂ emission can be further reduced to 0.267 kg per kg of L-lactic acid when the oxalic acid generated from glucose oxidation is selected as biodegradable pretreatment catalyst.

In summary, the starch-like biorefining technologies proposed in this thesis further upgraded the current dry biorefinery processing. The starch-like biorefining technologies overcome the key technological barriers such as the application limitations of the current biot detoxification, sulfuric acid catalyst residue, solid waste disposal, etc., providing an effective biot detoxification strain and process engineering for the industrialization of lignocellulosic biorefinery technology.

Key words: lignocellulose; biorefinery; pretreatment; biot detoxification; starch-like; cellulosic ethanol

目录

第 1 章 前言	1
1.1 生物炼制	1
1.1.1 木质纤维素原料	1
1.1.2 生物炼制加工链	1
1.1.3 纤维素乙醇工业示范装置现状	2
1.2 生物炼制过程的主要技术瓶颈	4
1.2.1 预处理阶段	4
1.2.2 水解阶段	7
1.2.3 发酵阶段	8
1.3 先进的生物炼制技术	10
1.3.1 区域式的生物质加工工厂 (RBPDs)	10
1.3.2 干式稀酸预处理	11
1.3.3 生物脱毒技术	11
1.3.4 干法生物炼制技术	12
1.4 本文的立题依据和主要研究内容	13
第 2 章 耐酸性新型生物脱毒菌株的筛选、鉴定和表征	16
2.1 引言	16
2.2 材料与方法	16
2.2.1 菌株, 培养基和培养环境	16
2.2.2 试剂	17
2.2.3 真菌孢子液收集	17
2.2.4 丝状真菌 DNA 快速抽提	17
2.2.5 ITS 序列扩增及鉴定	17
2.2.6 丝状真菌插片观察	17
2.2.7 摇瓶和发酵罐发酵	17
2.2.8 转录组分析	18
2.2.9 分析方法	18
2.3 结果与讨论	18
2.3.1 新型生物脱毒菌株的筛选和鉴定	18
2.3.2 <i>P. variotii</i> FN89 的生物脱毒能力鉴定	21
2.3.3 <i>P. variotii</i> FN89 生物脱毒菌株在抑制物胁迫下的转录组分析	26
2.3.4 <i>P. variotii</i> FN89 菌株在低 pH 下的代谢抑制物能力鉴定	35

2.3.5 <i>P. variotii</i> FN89 生物脱毒菌株在低 pH 胁迫下的转录组分析	39
2.4 本章小结	48
第 3 章 木质纤维素生物质的类淀粉化生物转化	49
3.1 引言	49
3.2 材料与方法	49
3.2.1 菌株, 培养基和培养环境	49
3.2.2 酶和试剂	49
3.2.3 丝状真菌快速抽提 DNA 方法	50
3.2.4 <i>P. variotii</i> FN89 草酸代谢相关途径基因的扩增	50
3.2.5 真菌孢子液收集	50
3.2.6 <i>P. variotii</i> FN89 摇瓶发酵	50
3.2.7 原始物料	50
3.2.8 预处理和生物脱毒	51
3.2.9 酶水解评价	51
3.2.10 乙醇发酵	51
3.2.11 乙醇精馏	52
3.2.12 元素浓度测定	52
3.2.10 残渣热值测定、废水 COD 测定	52
3.2.11 分析方法	52
3.3 结果与讨论	53
3.3.1 生物脱毒菌株 <i>P. variotii</i> FN89 与 <i>Amorphotheca resinae</i> ZN1 的比较	53
3.3.2 可生物降解催化剂的选择	53
3.3.3 草酸预处理及低 pH 生物脱毒	57
3.3.4 类淀粉生物质的表征	59
3.3.5 全过程质量平衡和元素平衡	63
3.3.6 其他排放指标及经济学讨论	65
3.4 本章小结	65
第 4 章 类淀粉化干法生物炼制过程中的钙富集和循环利用	67
4.1 引言	67
4.2 材料与方法	67
4.2.1 菌株, 培养基和培养条件	67
4.2.2 酶和试剂	68
4.2.3 小麦秸秆原料	68
4.2.4 预处理和生物脱毒	68
4.2.5 纤维素乳酸发酵	68

4.2.6	灰分制备	68
4.2.7	扫描电镜观察	68
4.2.8	电感耦合等离子体原子发射光谱	68
4.2.9	XRD 分析	68
4.2.10	FTIR 分析	68
4.2.12	分析方法	69
4.3	结果与讨论	69
4.3.1	草酸预处理参与的常规生物炼制过程用于乳酸生产	69
4.3.2	焚烧灰分的表征	72
4.3.3	焚烧灰分作为预处理物料中和剂	75
4.3.4	灰分作为乳酸发酵中和剂	76
4.3.5	生物炼制过程中灰分回收的物料平衡	77
4.4	本章小结	78
第 5 章	玉米籽皮产纤维素乙醇过程的生物炼制加工链重构	80
5.1	引言	80
5.2	材料与方法	80
5.2.1	原始物料	80
5.2.2	酶和化学试剂	81
5.2.3	菌株和培养基	81
5.2.4	玉米籽皮预处理	81
5.2.5	<i>P. variotii</i> FN89 液体生物脱毒	81
5.2.6	在位乙醇发酵	81
5.2.7	柠檬酸发酵	81
5.2.8	元素浓度测定	82
5.2.9	游离氨基酸测定	82
5.2.10	检测方法	82
5.3	结果与讨论	82
5.3.1	常规生物炼制过程用于玉米籽皮生产纤维素乙醇	82
5.3.2	商业柠檬酸预处理玉米籽皮及常规生物转化	83
5.3.3	重构生物炼制链用于玉米籽皮高效转化	85
5.3.4	全过程物料平衡和比较	89
5.3.5	自产柠檬酸用于玉米籽皮高效生物转化	93
5.3.6	发酵残液和固体表征	94
5.4	本章小结	96
第 6 章	干法生物炼制平台上的木质纤维素酸水解技术重新评价	97

6.1	引言	97
6.2	材料与方法	97
6.2.1	菌株, 培养基和培养环境	97
6.2.2	试剂	97
6.2.3	原始物料	97
6.2.4	酸水解过程	98
6.2.5	酸水解产物生物脱毒和乙醇发酵	98
6.2.6	得率计算	98
6.2.7	Aspen Plus 模型	98
6.2.8	技术经济分析	99
6.2.9	分析方法	99
6.3	结果与讨论	99
6.3.1	基于干式稀酸水解的玉米秸秆高固体含量下直接水解的参数优化	99
6.3.2	半连续液态生物脱毒和乙醇发酵	103
6.3.3	酸水解工艺的物料衡算	105
6.3.4	酸水解工艺的初步技术经济学评价及 Aspen Plus 模型	107
6.3.5	酸水解工艺的结果讨论和展望	111
6.4	本章小结	112
第 7 章	干法生物炼制平台上的纤维素 L-乳酸案例及生命周期分析	113
7.1	引言	113
7.2	材料与方法	113
7.2.1	菌株, 培养基和培养环境	113
7.2.2	酶和试剂	114
7.2.3	原始物料	114
7.2.4	预处理	114
7.2.5	生物脱毒	114
7.2.6	L-乳酸发酵	114
7.2.7	元素浓度测定	114
7.2.8	Apem Plus 模型	114
7.2.9	碳足迹	114
7.2.10	分析方法	115
7.3	结果与讨论	115
7.3.1	较高强度预处理实现纤维素 L-乳酸的低纤维素酶用量生产	115
7.3.2	纤维素生产粗乳酸作为预处理催化剂的潜力	120
7.3.3	一种稳定的生物炼制原料供应链模型	129
7.3.4	四种纤维素 L-乳酸生产案例及技术比较	133

7.3.5 四种纤维素 L-乳酸生产案例的生命周期评价	137
7.4 本章小结	142
第 8 章 结论与展望	143
8.1 结论	143
8.2 创新点	144
8.3 展望	144
参考文献	146
附录 I	165
学术成果	167
致谢	168

第 1 章 前言

1.1 生物炼制

1.1.1 木质纤维素原料

木质纤维素生物质是世界上最廉价、来源最广泛的可再生生物质资源之一^[1]。中国中央财经委员会第九次会议（2021）、第十六届欧洲能源市场国际会议等新政策和法规表明^[2]，将木质纤维素生物质转化为生物氢、生物乙醇、沼气、生物丁醇等绿色清洁能源^[3]，不仅可以有效处置农林业废弃物，而且符合当前的碳中和理念，具有重大应用潜力。

木质纤维素生物质虽然资源量巨大，但目前利用生物质生产能源、化学品和材料的产业化技术尚不成熟^[4]。中国作为世界上最大的农业国，每年产生超过 9 亿吨的秸秆废弃物^[5]；美国的玉米种植面积位居全球首位，每年玉米秸秆产量达到了 1.5 亿吨，其中有超过 6,500 万吨的玉米秸秆被废弃^[6]；印度作为全球最大的谷物生产地区，每年产生的农业废弃物可以达到 6.05 亿吨^[7]。此外，林业废弃物也是木质纤维素生物质的的重要组成部分。在俄罗斯，木材加工产生的木质纤维素生物质废弃物每年可超过 2.875 亿吨^[7]。经济作物也占据了木质纤维素生物质相当大的比重。印度尼西亚、巴西和地中海地区种植了大量的可可、甘蔗和橄榄等经济作物，每个国家每年生物质的产量可以达到 9.6-53 亿吨^[8,9]。目前在发展中国家，有超过 60%的秸秆会被直接焚烧^[10]。这不仅造成了资源的浪费，还会导致严重的环境问题（如空气、土壤和地下水污染等）^[11]。因此开发木质纤维素生物质高效利用的产业化技术至关重要。

木质纤维素是植物细胞壁的主要成分，由纤维素（30-60%）、半纤维素（20-40%）和木质素（15-25%）组成^[12]。不同木质纤维素生物质中的各组分含量由于物料本身的来源和物理性质不同而有所变化^[13]。表 1.1 整理了一些典型的木质纤维素原料及其组成。纤维素是葡萄糖的聚合物，其高度的晶体结构可以有效防止解聚；半纤维素具有无定型、分枝的随机结构，包括五碳糖和六碳糖单体^[14]。纤维素和半纤维素是木质纤维素中两种主要多糖，是木质纤维素生产可发酵糖的主要来源。木质素具有高度交联的三维分子结构，其性质稳定且不溶于水，是连接纤维素和半纤维素的“胶水”^[15]。木质素、半纤维素和纤维素之间强的相互作用关系会限制半纤维素和纤维素的水解。因此以木质纤维素原料生产生物燃料需要一个复杂的转化过程来打破其原有结构^[16]。

1.1.2 生物炼制加工链

以木质纤维素生物质为原料生产液体燃料、化学品和材料的技术称之为生物炼制技术。生物炼制包括糖平台（生物转化）转化和热化学转化两条路线，其中糖平台路线被认为是最具产业化应用潜力的路线。糖平台生物炼制的加工链主要包括预处理、脱毒、水解、发酵和提纯五个步骤^[17,18,30]。预处理步骤破坏致密的木质纤维素生物质天然结构，使其能够被高效酶解；脱毒步骤将预处理产生的各种影响后续酶活性和发酵微生物活性

的小分子抑制物进行脱除；水解步骤利用纤维素酶或酸催化剂从木质纤维素聚糖组分中水解释放大量可发酵糖；发酵步骤利用工程微生物菌株将可发酵单糖转化为乙醇、丁醇、油脂等液体燃料，或手性乳酸、琥珀酸、糖酸等聚合单体化学品和精细化学品，或聚羟基脂肪酸酯（PHA）等生物聚合物；提纯步骤将发酵产品从复杂的发酵液中提取纯化至产品级。目前生物炼制的每个步骤目前都有重大的技术障碍，整个生产过程的成本和指标距离产业化技术仍有较大距离^[17]。

根据不同的生产工艺和产品目的，也可以将糖平台生物炼制系统分为能源驱动型和材料驱动型生物炼制系统^[31,32]。在能源驱动的生物炼制系统中，木质纤维素生物质主要用于生产生物燃料、能源和热量；在材料驱动的生物炼制系统中，则主要是以生产生物基产品为目的，如生产中间化学品或其他生物材料。

表 1.1 典型木质纤维素生物质的组成

Table 1.1 Chemical compositions of typical lignocellulosic feedstocks (% DM).				
Source	Cellulose	Hemicellulose	Lignin	Reference
Wheat straw	35.0	22.3	15.6	[19]
Corn stover	34.0	23.0	21.0	[20]
Rice straw	42.0	25.0	24.0	[21]
Cotton stalk	67.0	16.0	13.0	[22]
Corn cob	45.0	33.0	14.0	[23]
Corn fiber (bran)	23.3	37.4	1.2	[24]
Rice husk	37.1	29.4	24.1	[25]
Sugarcane bagasse	40.0-50.0	20.0-30.0	20.0-25.0	[26]
Bamboo	46.5	18.8	25.7	[27]
Napier grass	47.0	31.0	22.0	[28]
Oak	43.2	21.9	35.4	[29]
Spruce	47.1	22.3	29.2	[29]

注：不同地区物种之间组成会有所差别。

值得注意的是，生物炼制工厂的经济生产模式与目前成熟的石油炼制工厂不同。石油炼制所采用的是线性生产模式，即开采-生产-使用-废物处理的模式；而在循环经济模式下，生物炼制中所使用的木质纤维素材料最终会被回收并不断循环使用^[17,33]。由于木质纤维素生物质本身的附加值较低，以木质纤维素为底物的大规模生物炼制过程必须做到能源集约且极度循环和收敛，从而控制生产成本及潜在的环境影响。这就要求整个生物炼制过程必须要有较为完整的循环利用体系，并尽量减少化学品的输入和废弃物的排放，从而减少对环境有害的化学品的使用或产生。

1.1.3 纤维素乙醇工业示范装置现状

由于生物炼制技术仍存在有明显的缺陷，因此即使木质纤维素生物质的成本远低于淀粉生物质，纤维素乙醇的生产成本也无法与淀粉基乙醇竞争^[34]。近十年来，各国一直在努力开发有效地、具有成本效益的纤维素乙醇生产技术。目前某些已经开展的纤维素

乙醇中试示范工厂如表 1.2 所示。

2012 年, Beta Renewables 在意大利 Crescentino 建立了并运行了世界上第一家纤维素乙醇生产工厂。工厂规模为 4000 万立方米, 预计生产能力为每年生产 7500 万升纤维素乙醇。Beta Renewables 计划在印度、美国、巴西和中国建设更多的纤维素乙醇工厂。然而 Beta Renewables 于 2018 年被出售, 以偿还其破产母公司 Mossi Ghisolfi Group 的债务^[35]。杜邦公司在美国内华达州建立的纤维素乙醇工厂于 2017 年宣布售出, 并改建为可再生天然气生产工厂^[35]。Abengoa 于 2015 年在美国堪萨斯州建立了年产 2500 吨纤维素乙醇工厂; 然而在 2016 年经历财务困难后, Abengoa 宣布其纤维素乙醇炼制工厂破产^[36]。2014 年, Raizen 公司在巴西建立的纤维素乙醇工厂开始运营。Raizen 报告称其最低乙醇售价可达 \$2.17/gal, 是当年所有运营的纤维素乙醇工厂最低。虽然 Raizen 有计划向欧洲出口纤维素乙醇, 但由于汽油价格持续走低, 该公司宣布减少其对纤维素乙醇工厂的投资^[37]。同年 GranBio 在巴西启动了产能为 8200 万升的纤维素乙醇工厂^[38], 然而由于预处理阶段的技术困难, 该工厂于 2016 年暂停运营。2014 年, 由美国和荷兰合资的 POET-DSM 公司在美国爱荷华州建立了预期生产能力为每年 38 亿升的大型纤维素乙醇生产工厂^[39]。至 2017 年, 该公司宣布工厂在 80% 的生产时间可以正常进行预处理。但截止到 2018 年, 该公司仍未宣布其工厂能完全投入运营^[35]。此外由于预处理技术只是生物炼制的第一个重要步骤, 其它的生产流程仍在持续优化中。

表 1.2 现阶段世界上已经开展的一些纤维素乙醇示范工厂

Table 1.2 Current status of bioethanol production throughout the world.

Country	Company	Feedstock	Capacity (per year)
Italy	Beta Renewables	Wheat straw	75 million L
USA	DuPont	Cellulose	104 million L
USA	Abengoa	Wheat/ barely straw	2500 ton
USA	POET-DSM	Corn crop residue	3.8 billion L
Brazil	Raizen	Sugarcane	2.1 billion L
Brazil	GranBio	Sugarcane bagasse	82 million L

注: 目前大型纤维素生物炼制纤维素乙醇工厂均处于无法运行或难以正常运行的状态。

尽管各国对纤维素乙醇生物炼制工厂的建立和运营做出了巨大的努力, 但由于目前所面临的重大技术难题, 投资者对于纤维乙醇的前景并不看好。2015 年, 全球在生物燃料方面的投资仅为 31 亿美元, 相比于 2014 年下降了 35%^[34]。因此, 为了吸引投资者加大对纤维素乙醇的投资, 必须加快开发具有产业化前景的低成本生物炼制技术。现阶段所采用的原料供应系统、预处理方案、生物转化技术和下游工艺都必须得到更为精细的优化和改进。

1.2 生物炼制过程的主要技术瓶颈

1.2.1 预处理阶段

木质纤维素生物质天然致密的结构限制了其中多聚糖的水解，极大的降低了生产效率。通常，木质纤维素生物质应首先进行预处理，以打破其刚性结构，提高酶水解和微生物发酵效率^[40]。目前报道的预处理方法通常都属于物理、化学、物理化学或生物四类方法的范畴，它们在破坏木质纤维素结构方面有着不同作用。因此每一种预处理方法都各有优缺点^[15,41]。对目前所报道比较常用的预处理方法及优缺点进行了总结，如表 1.3 所示。虽然一些方法已经过度到了工业应用阶段，但仍然存在着主要技术障碍，包括预处理效率低、各种有害物质的排放、过量废水排放、高能耗、催化剂难回收等方面^[13]。

物理方法主要通过切割、粉碎、挤压或研磨等方法减少生物质粒径，增加与纤维素酶接触的比表面积，在不破坏内部结构的情况更有利于传质传热^[42]。最近，微波和超声等与辐射有关的方法也被广泛研究并作为木质纤维素生物质的预处理手段。这种方法可以在高能辐射下在短时间内破坏生物质的化学键，促进后续的酶水解^[16,43]。然而这些物料过程通常都需要巨大的能量消耗，并且对生物质结构破坏的有效性有限。

化学方法可以通过酸或碱去除木质素或半纤维素组分以降低原料聚合度，从而可以通过酶水解获得大量可发酵糖^[44]。传统的稀酸和稀碱预处理技术，尽管酶水解糖得率很高，但预处理过程中会产生大有毒废水。使用有机酸、甲醇、乙醇、四氢呋喃醇或乙二醇等有机溶剂可以破坏木质纤维素中的 α -O-aryl 键、 β -O-aryl 键和 4-O-甲基葡萄糖醛酸酯键实现对木质素和半纤维素的降解^[45,46]。有机溶剂预处理通常在 150-220 °C 条件下进行，过低的反应温度会导致木质素的去除率较低^[47]。有机溶剂预处理的成本及污染排放很高^[48]，通常不能大规模应用。与有机溶剂预处理机制类似的是采用离子液体的预处理方法。离子液体 (ILs) 是一种熔融盐或液态电解质，由阴阳离子构成，在室温下处于液态^[15]。大多数离子液体以咪唑、吡啶、胆碱为基础，以氯和乙酸作为阴离子^[49]。由于不形成有害的化学物质且回收率较高，被认为是有机溶剂的绿色替代品。但由于离子液体存在较大的毒性，在使用过程中易产生额外的污染物排放。过氧化氢、臭氧等强氧化剂可以与木质素反应并解聚半纤维素也可用于木质纤维素原料的预处理^[50,51]，但强氧化剂的制备成本较高。

物理化学预处理方法，如蒸汽膨爆、氨纤维膨爆 (AFEX) 在预处理中表现出较好的结构破坏效果^[52]，但整个过程需要大量的能量输入。此外蒸汽膨爆或热水处理方法，尽管避免了预处理催化剂的使用，但由于其本质上是通过生物质原料自身的乙酰基进行水解，其对于乙酰基含量较低的软木预处理效果较差。使用超临界流体也可以有效用于木质纤维素原料的预处理。超临界 CO₂ 是目前最常用的超临界流体。其本质是将 CO₂ 溶解到水中来降低 pH，从而提高极性化合物的溶解度，有利于木质纤维素的水解^[53]。此外使用超临界流体的高压条件会显著增加木质素和半纤维素之间化学键的断裂^[49]，提高预处理效率。综上所述，物理化学预处理方法普遍存在的问题是反应条件的苛刻，会导致大量能量的输入和大量抑制物的产生。

表 1.3 常用预处理手段的优缺点

Table 1.3 Advantages and disadvantages of major pretreatment methods.

Methods	Funtion	Advantages	Disadvantages	Refs
Physical method				
Milling	Reduce the particle size and crystallinity of structure	Easy to operate, short process time	High energy input	[54]
Extrusion	Shorten the fiber and defibrillation	Less inhibitors information	High energy input, low efficiency	[55]
Chemical method				
Dilute acid	Disrupt the lignin structure, remove hemicellulose	High sugars recovery	Inhibitors formation, neutralization	[56]
Alkaline	Lignin and hemicellulose removal	Less sugar overdegradation	Long residence time, wastewater	[45]
Organosolv	Lignin removal and hemicellulose fractionation	Lignin as value-added byproduct	Handling of harsh organic solvents	[57]
Oxidation	Disrupt the lignin and hemicellulose structures	Lower formation of inhibitors	Costly	[58]
Ionic liquid	Disrupt hydrogen bonds and facilitates hydrolysis	Mild reaction conditions	Costly, toxicity	[59]
Phy-chemical method				
Steam explosion	Disrupt the lignin, remove hemicellulose	Limited used of chemicals	Lower efficiency for softwood	[60]
AFEX	Disrupt the lignin, remove hemicellulose	High efficiency, less inhibitors	Costly, high energy input, non-environmentally friendly	[61]
Liquid hot water	Removal of soluble lignin and hemicellulose	Ecofriendly, chemicals free	High energy and water demand	[62]
ScCO ₂ explosion	Cellulose crystallinity reduction and lignin removal	Less inhibitors information	High total utilities costs	[63]
DESs	Lignin removal and hemicellulose fractionation	Biodegradable and biocompatible	Hygroscopicity and high viscous	[64]
Biological method				
Ligninolytic enzymes	Remove and modify lignin	Ecofriendly, mild conditions	Low hydrolysis rate, costly	[65]
Fungi	Delignification	Ecofriendly, mild conditions	Long incubation time	[66]

注：Phy-chemical method, Physicochemical method; AFEX, Ammonia fiber explosion; ScCO₂ explosion, Supercritical CO₂ explosion; DESs, Deep eutectic solvents; CBP, Consolidated bioprocessing.

生物预处理相比于物理化学预处理方法具有更高的底物和反应特异性、更低的能源需求以及更少的环境污染等优势^[65]。其中真菌预处理是指将真菌接种于木质纤维素生物质以分解木质素从而改变生物质结构^[67]。真菌预处理涉及三种常见的真菌，即白腐菌、褐腐菌和软腐菌。但真菌直接在木质纤维素底物上培养有众多问题，例如培养时间过长、孢子污染、难以大规模应用等^[66]。最新的策略之一是使用木质素分解酶来特异性的水解木质素，其本质是相当于通过体外催化的方法进行反应。木质纤维素分解分为过氧化物酶和氧化酶两类^[61]，现阶段木质素分解酶的成本还过高。同时体外酶水解木质纤维素还受到温度、pH、氧气等因素的综合影响^[65]，效率较低。

总结现阶段目前纤维素乙醇公司所采用的技术路线（表 1.4），其预处理手段主要集中于酸催化剂参与的预处理。相比于表 1.3 所整理的多种预处理方式，已经工业化的这些预处理手段在保证较好的水解效果下尽量减少了化学品的使用和排放（水热处理无化学品输入；硫酸可以被中和成难溶的硫酸钙沉淀）。而一些污染较大、能耗巨大、效率较低的预处理手段则被抛弃。但目前来说，水热预处理处理所需要的能耗较高；而稀酸预处理技术则会生成大量有毒抑制物影响后续的发酵，同时硫酸钙在后续焚烧过程中会造成硫氧化物的排放。因此目前的预处理技术仍难以满足大规模生物炼制的需求。

表 1.4 目前一些纤维素乙醇公司所用技术路线

Table 1.4 The technology routes currently used by some selected cellulosic ethanol companies.

Company	Technology route
Clariant	Sunliquid process: a hydrothermal pretreatment at mild process conditions, a process-integrated production of enzymes, enzymatic hydrolysis, a specialized fermentation organism that simultaneously converts C5 and C6 sugars into ethanol in a one-pot reaction, adsorption-based separation of ethanol.
Abengoa	Preparation of biomass, thermochemical pretreatment (acid catalyzed steam explosion), enzymatic hydrolysis and fermentation with enzymes and yeast, distillation to produce ethanol and solid co-product.
Inbicon	Hydrothermal pretreatment (30-40% solids loading), continuous enzymatic liquefaction and hydrolysis, use of externally-produced enzymes, production of C5 molassed, energy co-production.
Sekab	Diluted acid (sulfuric acid or sulfur dioxide) and steam depending on the raw materials, which converts hemicellulose to sugar; enzymatic hydrolysis; sugars are converted to ethanol or other chemicals from yeast fungi; the mixture distillation and the ethanol can be purified and dewatered, sold or further refied; lignin byproduct and biogas co production.
Beta Renewables	Proesa Intellectual Property: Biomass input, a hydrothermal pretreatment, viscosity reduction by enzymes, fermentation, ethanol distillation, lignin byproduct co-production.

目前的预处理手段应向着低成本和低污染的方向进一步优化。Yang 和 Wayman 以及 Alvira 等人提出了一些判断木质纤维素预处理方法是否具有工业可行性的关键因素^[68,69]，对其进行总结如下：

(1) 对于多种不同作物都能保证预处理效果：例如碱预处理、AFEX、蒸汽膨爆和水热处理等方法可以有效处理农业废弃物，但对于一些抵抗性较强的物料（如软木）的预处理效果较差。酸预处理工艺已被证明对广泛的木质纤维素底物有效，但需要解决抑制物和排放问题。

(2) 良好的酶水解得率：72 h 内的酶水解得率应高于 90%（酶用量低于 10 FPU/g 纤维素）。

(3) 预处理过程没有明显的糖损失：预处理过程的固体损失应低于 10%。

(4) 预处理过程产生较少的有毒抑制物：预处理过程中的恶劣条件会导致可发酵糖过度降解，从而生成大量的羧酸、呋喃和酚类化合物。预处理物料必须经过有效地脱毒步骤才能用于发酵。

(5) 预处理后生物质不需要进一步粉碎。

(6) 能够大规模应用：例如稀酸预处理应考虑设备的腐蚀性；膨爆预处理应最小化反应器体积。

(7) 预处理反应的固体含量要足够高：减少预处理反应的水输入，从而降低升温能耗、减少废水排放和糖损失。

(8) 糖浓度足够高：要求预处理物料的固体含量应足够高。酶水解后所得糖浓度应最少高于 10%。

(9) 较低的热量和电力要求。

1.2.2 水解阶段

如何经济合理的将木质纤维素中的聚糖（纤维素和半纤维素）水解成可发酵单糖并用于生物转化，是生物炼制技术中关键的步骤^[40]。然而天然木质纤维素形成了坚固的晶体结构，具有很高的化学稳定性，从而使解聚过程困难。酶和酸是最常见的木质纤维素水解催化剂^[70,71]。常见的酶水解或酸水解参与的生物炼制过程如图 1.1 所示。关于图 1.1 中所展示的浓酸水解和两步酸水解方法将在 6.3.5 小节进行详细讨论。

酶水解以复合纤维素酶为催化剂，水解纤维素和半纤维素至葡萄糖、木糖等可发酵单糖。酶水解反应温和（~50 °C）、特异性强、糖得率高^[72]，是目前生物炼制过程中主要的技术手段。然而，纤维素酶使用量大、成本高昂，是工业应用的极大限制因素。尽管在提高已知酶的效率、发现新酶、优化酶配方等纤维素酶成本最小化上付出了巨大努力^[73-77]。但购买商业纤维素酶的模式将导致纤维素酶的成本占纤维素乙醇生产成本的 \$0.34-1.30/gal；而在位生产酶的模式缺乏其成本效益的商业验证^[78,79]。同时，酶解之前必须进行高强度预处理来消除木质纤维素生物质对纤维素酶的生物抵抗性^[80]，而预处理过程不可避免的生成对纤维素酶和发酵微生物产生抑制的呋喃醛、弱酸和酚醛类抑制物^[81]，导致过程流程复杂。包括预处理、抑制物去除、酶水解的生物炼制前端过程仍然占整个生物炼制成本的 60%以上^[82]。

直接酸水解木质纤维素底物生成可发酵单糖可以追溯到 20 世纪初^[83]，主要以廉价无机酸或有机酸为催化剂水解纤维素生成葡萄糖。尽管酸水解成本低廉且反应速率较快，

在过去的几十年里，酸水解技术已经基本退出了生物炼制技术选项，主要是由于酸水解会形成大量的呋喃醛和有机酸抑制物^[70,71]。这些抑制物的形成不仅降低了可发酵糖得率也对乙醇发酵菌株产生了不良影响^[72]。传统的解毒方法，如水洗、活性炭吸附、萃取等方法无法彻底去除这些高浓度的抑制物^[84]，最终使得酸水解产物失去了生物转化的价值。

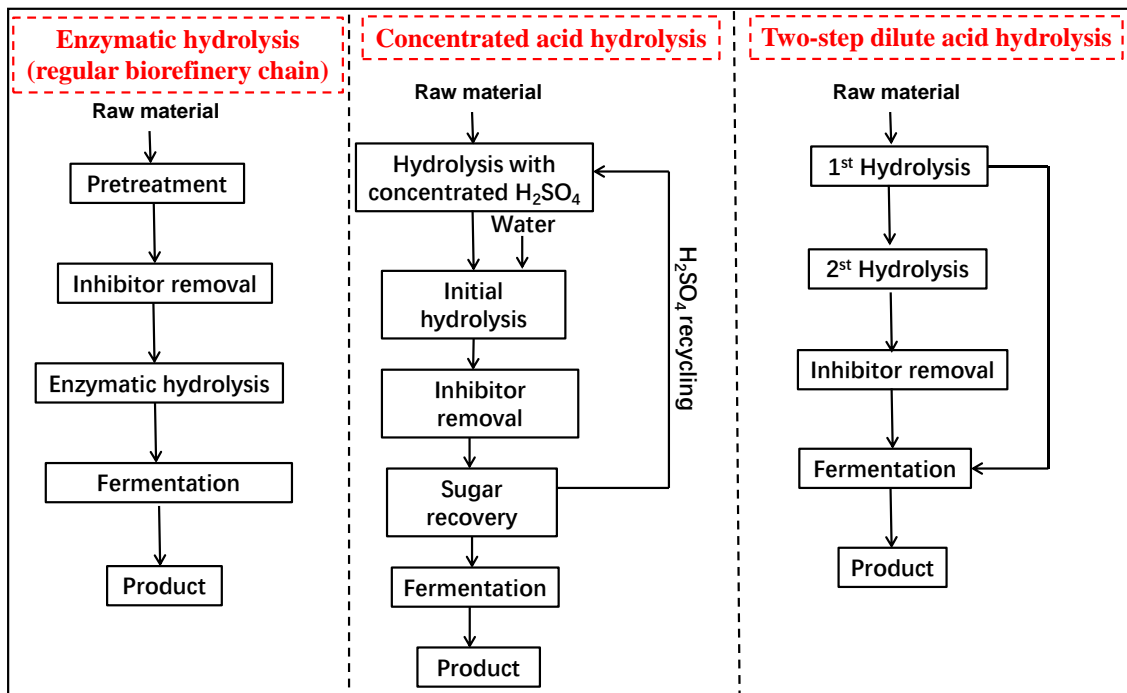


图 1.1 酶水解或酸水解参与的生物炼制过程

Fig. 1.1 The biorefinery processing involving enzymatic hydrolysis or acid hydrolysis.

1.2.3 发酵阶段

预处理和水解过程可以将木质纤维素生物质中的多聚糖降解为单糖；而将其中的多种可发酵糖转化为高附加值产品则是生物炼制的终极目标^[85]。目前已报到的有超过 200 种高附加值产品可以从木质纤维素生物质中生产^[86]。表 1.5 展示了美国能源部(USDOE)确定的由木质纤维素生物炼制工厂生产的最具有潜力的生物基产品^[87]。

目前，生物炼制过程中主要的生物转化过程包括分步水解和发酵 (SHF)、同步糖化和发酵 (SSF) 以及整合生物加工过程 (CBP) ^[41]。不同生物转化过程的步骤以及优缺点被整理在表 1.6。SHF 可以分为可发酵糖制备和生物转化两个过程。Abengoa 纤维素乙醇工厂就是先通过酸催化蒸汽膨爆的方法破坏木质纤维素结构，然后分别将纤维素和半纤维素水解成己糖和戊糖，进一步通过 SHF 发酵成乙醇 (表 1.4)。由于木质纤维素水解和生物转化均在各自最佳的条件下进行，因此具有较高的水解速率和得率，易于规模化生产。但 SHF 的缺点也是也是显著的，高浓度的可发酵糖对纤维素酶的水解活性有极强的产物抑制作用^[88]，这导致了最终可发酵糖浓度受限且纤维素酶成本较高。

表 1.5 美国能源部从生物炼制平台选择的潜在生物基产品

Table 1.5 Potential bio-based products/chemicals selected by US Department of Energy (USDOE) from lignocellulose biorefinery platform.

Potential bio-based products/chemicals selected by USDOE in 2004	Top platform chemicals based on green chemistry by USDOE in 2010
1, 4-Succinic, fumaric and malic acids	Ethanol
2, 5-Furan dicarboxylic acid	Furans
3-Hydroxy propionic acid	Glycerol and its derivatives
Aspartic acid	Biohydrocarbons
Glutaric acid	Lactic acid
Glutamic acid	Succinic acid
Itaconic acid	Hydroxypropionic acid/aldehyde
Levulinic acid	Levulinic acid
3-Hydroxybutyrolactone	Sorbitol
Glycerol	Xylitol
Sorbitol	

表 1.6 生物炼制中不同生物转化过程优缺点

Table 1.6 Advantages and disadvantages of bioconversion process in biorefinery processing.

	Advantages	Disadvantages
SHF	Sacchaification and fermentation can be carried out under the optimal conditions	Process complexity, higher equipment investment, higher cellulase cost, end product inhibition to cellulase
SSF	No end product inhibition to cellulase, lower equipment investment, simplified operation steps	Conditions mismatch between the cellulase and fermentation
CBP	No cellulase cost, lower equipment investment, simplified operation steps	Low efficiency, complex molecular modification

Gauss 等人提出了一种将水解和发酵在同一个反应器内进行的想法^[89]，后被称为同步糖化和发酵（SSF）。在 SSF 中，水解得到的可发酵糖快速被微生物消耗，从而缓解了纤维素酶的产物抑制^[90]。SSF 使发酵可以在更高固体含量下进行，从而获得更高的产物浓度。但是高固体含量下的糖化会严重阻碍传质^[91]，酶活性和微生物发酵性能也会受到影响。添加表面活性剂或可溶性多糖可以增加细胞膜通透性，提高微生物对高固体含量底物的耐受性^[41]。Xiao 等人在 SSF 中添加了 0.1% 的聚氧乙烯（80）山梨糖醇单油酸酯可以加快细胞生长速度并提高糖化效率，与对照相比可发酵糖的产量增加了 13.5%^[92]。在高固体含量下的 SSF 也可以通过添加辅助酶可以增强纤维素酶的水解性能并降低纤维素酶的用量^[93]。通过添加乙酰木聚糖酯酶、阿魏酰基酯酶或木聚糖酶等辅助酶，可以有效水解半纤维素内的分子间键以及木质素和半纤维素之间的相互连接键，从而使得物料的可水解性能提高^[94-96]。然而 SSCF 的缺点也是显著的，纤维素酶的最适糖化温度与大多数微生物的发酵温度不匹配，这就导致了大部分 SSF 的酶水解效率较低^[97]。为了保证糖化效率，SSCF 通常需要先在高温度下完全或预糖化至

液浆^[98]，然后再在较低温度下进行微生物生长和发酵。在这种模式下很难开展真正的连续发酵操作。

SHF 和 SSF 都需要添加昂贵的纤维素水解酶，这将导致成本过高。整合生物加工技术（CBP）是将水解酶生产、酶水解发酵和微生物发酵多个步骤整合到同一个反应器内。该过程可以消除外源酶的添加。从而降低木质纤维素转化的复杂性和成本。有报道称与 SHF 和 SSF 相比，CBP 可将木质纤维素生物质转化成本降低约 78%^[99]。但由于木质纤维素水解酶系统和产物代谢途径都很复杂，菌株代谢复合的增加会明显阻碍最终的生产效率。因此除了单一菌种发酵外，基于 CBP 的菌株共培养策略也越来越受到关注。

1.3 先进的生物炼制技术

1.3.1 区域式的生物质加工工厂（RBPDs）

先进的生物质收集、储存和供应系统是保证生物炼制工厂可持续生产的重要前提^[100]；先进的生物质原料供应链对生物炼制工厂规模方面也有重要的影响^[101]。美国的纤维素乙醇工厂大多采用传统的生物质供应系统，即与当地农民签订采购合同，在当地将玉米秸秆或其他木质纤维素生物质收获、存储并打包，以低密度散装的形式交付到转换设备当中^[102]。该系统已被证明可以在美国玉米带或东南部等农作物高产地区施行^[103]。美国能源部（DOE）的目标是至 2022 年将物流成本降低至每公吨 88 美元^[103]。

然而木质纤维素生物质密度小、体积大、地理上分布较为分散且易于燃烧和被微生物分解^[104]。运输和储存纤维素生物质的成本严重限制了生物炼制工厂的规模。有建模研究表明，在目前的生物质供应系统下，纤维素乙醇生物炼制工厂每天只能处理少于 5000 吨的生物质；并且与当地农民签订采购合同的成本将随着生物炼制工厂规模的增加而增多^[100,105]。Dale 曾表明目前建立的生物质供应链的成本几乎等于生物炼制工厂本身的成本；传统生物质供应系统的成本是预期成本的两倍^[106]。因此在之前的纤维素乙醇工业建设当中可能严重低估了建立稳定有效地生物质供应链的成本和难度。

Hess 等人提出了一种减少生物原料价格和质量不确定性的收集、储存和运输方法^[107]。该方法基于建立区域式的生物质加工工厂（RBPDs），可将不同生物质转化为具有一致物理和化学特性的中间产品，满足生物炼制工厂的生物转化；同时该模式可以提高生物质原料的流动性、可运输性（提高堆积密度）和稳定性（减少干物质损失）。该方法是指在当地的生物质加工仓库直接将收集的生物原料预处理（致密化）。多个分散式的小型加工仓库共同为更大的生物炼制工厂提供稳定的生物质产品。使用该模式可以降低纤维生物燃料的物流和合同成本，可以实现建立更大规模的生物炼制工厂^[104]。

尽管建立区域式的生物质加工工厂有着很多潜在的优势，但其实际的应用仍然面临着许多问题。首先该模式本质上是预处理操作从生物炼制工厂剥离出来，将预处理工厂与仓储共同建立在农田周围地区。由于农田地区的废水处理系统较弱，因此预处理方法必须要做到零废水排放从而减少对环境的污染。其次不能使用高能耗的预处理方法，

减少农郊地区的供电压力；预处理物料必须是致密的，对预处理物料的重新压缩打包可能会导致额外的成本从而抵消在运输成本上的节省^[100]，这限制了一些蒸汽膨爆等预处理方法的应用。预处理物料还必须具有良好的抗菌性能，由于预处理会释放出大量的可发酵糖，而由于生物质收获的周期性，要求预处理物料在收获周期内必须有效抵抗微生物降解。研究表明经过氨纤维膨爆预处理的生物质在储存过程中仍然有明显的染菌现象^[103,108]。综上所述，建立有效地 RBPDS 生物质供应链，对于预处理操作要求极高，现有的常规预处理方法通常难以达到要求。

1.3.2 干式稀酸预处理

最新的预处理技术创新是干酸预处理概念的引入。该方法在极高的固液比下进行，解决了木质纤维素生物质固体颗粒、极少量催化剂液体以及喷射蒸汽的多相混合问题^[109,110]。采用的螺带式搅拌桨可以实现在高固体含量下的有效混合，保证预处理效率^[111]。该过程是一个由“干”原料至“干”产品的过程。预处理物料由于良好的吸湿特性，仍呈干固颗粒状态，预处理废水降至零且蒸汽能耗有效降低。由于不存在大量液体酸催化剂溶液，设备的腐蚀降低至“相当耐腐蚀”的水平^[112]。减少预处理工艺水的输入也避免了随着固液分离操作所带来的大量可溶性单糖和微细固体形态的聚糖损失^[113]。使用该方法可以有效地处理小麦秸秆、玉米秸秆、稻草等生物质，并成功用于乙醇^[114]、乳酸^[115]、柠檬酸^[116]、糖酸^[117]、微生物油脂^[118]、及谷氨酸^[119]等产物的转化。其中使用干式稀酸预处理的纤维素乙醇生产指标可以与玉米乙醇竞争^[113]。

1.3.3 生物脱毒技术

在合适的温度、压力下，有效地预处理手段可水解半纤维，破坏木质纤维素晶体结构，通过增大纤维素与纤维素酶的有效接触，从而可提高酶解效率，释放出更多的可发酵糖。由于严苛的预处理条件，会产生许多小分子微生物生长抑制物，主要包括：五碳糖（木糖）、六碳糖（葡萄糖）过度降解产生的呋喃醛类抑制物，如糠醛和 5-羟甲基糠醛；乙酰基和某些醛的氧化产生的弱酸，如乙酸、甲酸、乙酰丙酸；木质素组分的过度降解如 4-羟基苯甲醛、香草酸和丁香醛^[120]。

在生物炼制过程中必须要尽量在低能耗、无糖损失、无额外污染物流产生的前提下对各类抑制物进行去除，以避免经济的损失以及在后续生物能源生产过程中对发酵微生物生长的阻碍。用于去除木质纤维素物料中微生物生长抑制物的常规方法包括水洗法、石灰处理法、氨水中和法、离子交换法、溶剂处理和活性炭处理的方法等^[121]。然而，这些常见方法通常伴随着巨量废水的产生以及大量可发酵糖的损失。生物解毒已广泛应用于在生活污水、化工废水处理过程中^[122]，可有效降解其中的醛类以及芳香族化合物。生物解毒条件温和、废水产生少，采用独特的生物脱毒菌株来降解预处理木质纤维素体系中的抑制物，具有良好的应用潜力。目前已经有某些菌株被证实了对某些木质纤维素来源抑制物具有良好的耐受性和解毒能力。*Enterobacter cloacae* GGT036 在 20 或 40 mM 糠醛存在的条件下培养 12 h，可以分别将 62.8%和 64.3%的糠醛转化为毒性较低的糠醇

[123]; 菌株 *Kuthia huakuii* LAM0618 可以将经过 $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}_2$ 预处理的玉米秸秆中的香草醛、丁香醛和 4-HBA 转化为毒性较低的酸^[124]; *Issatchenkia occodentales* CCTCC M206097 可以在脱毒 24 后有效减少 66.67%、73.33%、62%和 85%的丁香醛、阿魏酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛^[125]; 油脂酵母 *Rhodococcus opacus* DSM 1069 和 PD630 可以在氮限制的条件下将木质素来源芳香族化合物转变为微生物油脂^[126]; *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 可将糠醛/5-羟甲基糠醛转化为毒性较低的糠醇和 2,5-bis-hydroxymethylfuran^[127]。但上述脱毒菌株无法实现全谱木质纤维素来源抑制物的降解,无法应用于对实际预处理物料的有效彻底脱毒。

从酸预处理的玉米秸秆上的微生物污染菌落分离得到煤油真菌树脂枝孢菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 具有代谢木质纤维素来源全谱抑制物的潜力^[121]。其固态发酵性能优越,可以在经酸预处理的玉米秸秆、小麦秸秆、稻草、棉花秸秆和油菜秸秆等各种物料上进行固态培养,并优先于可发酵糖快速降解各类木质纤维素来源抑制物。使用脱毒物料的纤维素乙醇同步糖化与共发酵 (SSCF) 可以实现 40 g/L 的乙醇产量。Yi 等人对 *A. resinae* ZN1 的基因组和转录组数据进行解读证实其可以实现乙酸、5-羟甲基糠醛、糠醛、香草醛、丁香醛和 4-HBA 的完全终极代谢^[128]。氧气供应是 *A. resinae* ZN1 进行固态生物脱毒的重要影响因素。He 等人发现,将通气量提升至 1 vvm 可有效缩短生物脱毒时间至 36 h^[129]; 而 Ran 等人的研究表明,在通气限制的条件下, *A. resinae* ZN1 只能将糠醛和 5-羟甲基糠醛转化为相应的醇而不能进行终极代谢^[130]。

1.3.4 干法生物炼制技术

基于上述干式稀酸预处理和高效固态生物脱毒技术的干法生物炼制平台用于纤维素乙醇生产,实现了在精馏环节以前废水的零排放。预处理过程中极低工业水的引入也减少了蒸汽能耗。根据 Liu 等人的研究,总结了使用干法生物炼制平台生产纤维素乙醇的工艺水用量、废水排放和能耗,并与不同的生产工艺进行了比较,结果如表 1.7 所示^[113]。

相比于其它纤维素乙醇生产工艺,干法生物炼制技术在工艺水消耗、废水产生和预处理蒸汽消耗上均有优势。干法生物炼制技术的核心预处理能耗低至 8.63 GJ,过程总废水产生量低至 8.77 吨,分别接近玉米乙醇生产的 7.83 GJ 和 8.33 吨。但由于生产过程较为复杂,其过程能耗达到了 262.9 kWh。在另一项研究中尝试通过木质素残渣焚烧热电联产来补充过程能耗。结果表明,从玉米秸秆、小麦秸秆、稻草、甘蔗渣或杨木屑物种典型生物质通过干法生物炼制技术生产一吨纤维素乙醇,会产生 1.26-1.85 吨木质素残渣和 0.19-0.27 吨沼气(废水厌氧消化)。通过燃烧木质素残渣和沼气,可产生分别相当于 4335-5981 kWh 和 1946-2751 kWh 的电力^[131]。在该种模式下的发电量不仅满足了整体工艺的用电需求,而且还产生了一半以上的剩余电量可用于出售给电网增加收益。干法生物炼制技术生产纤维素乙醇的最低售价 (MESP) 可低至 \$1.79/gal。Zheng 等人进一步建立了在乙醇精馏步骤中将精馏残液继续蒸发成冷凝水再循环至预处理过程的干法生物炼制工艺。其结果表明具有该方法可用于废水的多次循环和乙醇的稳定生产。能

量平衡表明只需要消耗 65%的木质素残渣即可满足废水蒸发^[132]。这种模式尽管实现了废水的闭环回收，但其对整体乙醇生产效益的影响并没有深入的探究。

表 1.7 不同纤维素乙醇生产工艺的水平衡和能耗（生产每吨乙醇）

Table 1.7 Summary of water balance and energy consumption by different cellulosic ethanol production technology (per tone ethanol).

	DryPB	CE	DAP	AFEX	DMR	SE
Water input (t)	8.13	7.93	15.02	19.30	113.56	112.14
Wastewater (t)	8.77	8.33	16.58	20.71	115.22	115.74
Electricity (kWh)	262.9	34.5	324.6	529.2	1028.6	168.2
Steam (GJ)	8.63	7.83	11.21	23.04	18.60	11.26

注：DryPB, dry acid pretreatment and biodetoxification; CE, corn ethanol; DAP, dilute acid pretreatment; AFEX, ammonia fiber explosion; DMR, deacetylation, mechanical refining; SE, steam explosion.

1.4 本文的立题依据和主要研究内容

从化石资源替代、粮食原料替代、秸秆出路、气候变化应对等各个方面看，纤维素基生物能源和化学品是未来燃料和化学品生产最重要的发展方向。然而，自 2013 年开始的纤维素乙醇工业示范实践表明，现有的生物炼制技术的废水排放和能耗巨大，转化技术指标远低于粮食乙醇，且需要庞大的投资和社会动员力量，尚不具备大规模产业化的技术水平^[133,134]。现有的生物炼制技术必须经过重大的技术创新，具备在低能耗、低排放的前提下与粮食乙醇竞争的水平才有大规模产业化的可行性。

已经在全球实现大规模产业化应用的玉米乙醇可以作为纤维素乙醇的一个重要的参照。玉米乙醇生产的主要技术路线是干法加工技术（dry milling），即通过干磨、糖化、发酵和分离等简洁的工艺流程，在较低排放和能耗的条件下生产燃料乙醇和 DDGS 两种产品^[135]。如果木质纤维素以接近玉米干法技术的转化水平以及排放和能耗指标来生产纤维素乙醇，就具备了与玉米乙醇进行市场竞争的产业化潜力。木质纤维素生物炼制技术与玉米加工最大的不同在于其破坏木质纤维素超分子结构的强烈预处理步骤。预处理技术是生物炼制加工链（biorefining chain）的起始步骤和核心环节^[68]。目前在已有工业示范装置上采用的预处理技术都是以酸催化为基础的形式，可以有效降解半纤维素并破坏纤维素和木质素结构，预处理效率高但有毒废水排放巨大、蒸汽能耗巨大以及大量糖原料损失，也被认为是纤维素乙醇产业化失败的主要原因所在。

最新的预处理技术创新是干式稀酸预处理概念的引入，这一方法解决了木质纤维素固体颗粒与极少量催化剂液体以及喷射蒸汽的多相混合的问题，实现了以干固颗粒状态的预处理物料生产，预处理废水降至零，蒸汽能耗有效降低，且设备腐蚀降至“相当耐腐蚀”水平，也避免了随着固液分离操作所带来的大量可溶性单糖和微细固体形态的聚糖损失。对预处理固体颗粒中含有的糠醛、羟甲基糠醛、乙酸、对羟基苯甲醛等随预处理产生的抑制物采用了一种固相生物脱毒的方法，以特异的生物脱毒菌种直接对固体预

处理原料在不损失可发酵单糖、无新鲜水添加和废水产生、不添加营养盐的条件下实现快速脱毒，脱毒后原料具有良好的酶水解性和可发酵性，从而克服了常规酸预处理法的缺陷。至此，木质纤维素在干酸预处理、生物脱毒、糖化、发酵和分离步骤上，基本形成了零废水条件下获得无抑制物、易水解木质纤维素原料的工艺。

但目前的干法生物炼制技术仍有一些影响过程效率和经济性的诸多技术障碍，有待于进一步的技术升级，这些障碍包括：（1）现有的生物脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 环境适应性较差，脱毒温度为 30 °C，必须在接近中性条件下生长，且脱毒过程对氧气需求较高；（2）生物脱毒需要在固体木质纤维素物料中进行，发酵空间大、耗氧量高、混合均匀度差，局部温度和 pH 波动较大，难以匹配实际工业生产上以液态形式进行生物转化流程；（3）干式稀酸预处理使用的硫酸催化剂中和后形成的难溶硫酸盐，降低了后续木质素残渣燃烧效率，并存在硫氧化物逸出的风险；（4）干法生物炼制过程的碳足迹分析欠缺，过程的碳中和效率不能定量计算。

基于上述所提出的干法生物炼制过程中存在的问题，本论文对已有干法生物炼制技术进行了一系列的技术创新，通过系统的应用基础研究，提出和验证了类淀粉化干法生物炼制技术的新概念，突破了上述关键技术障碍，对现有的干法生物炼制技术完成了一系列重要的技术升级。具体的研究内容主要包括以下几个方面：

（1）新的生物脱毒菌株的筛选、鉴定和抑制物代谢能力表征。验证其在低溶氧条件下或低 pH 条件下的抑制物代谢能力。通过转录组分析初步揭示其抑制物代谢途径和耐酸机制。

（2）使用新筛选的生物脱毒菌株以及可生物降解有机酸-草酸作为预处理催化剂，实现对两种典型的农作物秸秆（小麦秸秆和玉米秸秆的）类淀粉化，并用于纤维素乙醇生产。以干磨玉米粉及玉米乙醇生产工业为对照，对木质纤维素来源类淀粉生物质进行了表征并对整个纤维素乙醇生产过程进行了评估。

（3）对类淀粉干法生物炼制平台的木质素残渣焚烧所得灰分进行详细表征。寻找灰分合理利用的途径，从而减少生产成本和固体废弃物排放。

（4）解决常规生物炼制过程无法高效转化玉米籽皮的问题。对目前的干法生物炼制链进行重构，实现了以玉米籽皮为底物高效生产纤维素乙醇；重构的生物炼制过程也为匹配液态生物质物料连续化大规模工业生产提供了技术蓝本。

（5）为了解决目前生物炼制过程中纤维素酶成本过高的问题，基于干式稀酸预处理和高效生物降解技术对直接酸水解技术进行了重新评估。使用混合酸水解代替了预处理和纤维素酶水解操作，并对酸水解各操作参数进行了优化。建立了酸水解工艺的 Aspen Plus 模型，并对其成本和能耗进行了进一步的评估。

（6）为了减少生物炼制过程中纤维素酶的成本，探究了是否可以通过较强的预处理来减少后续纤维素酶的用量。对不同较强预处理条件进行了优化，通过酶水解评价和乳酸发酵评价确定最佳反应条件。通过后续高固体含量乳酸发酵验证可行性。

（7）探究了粗乳酸溶液回收作为预处理催化剂的潜力。使用乳酸发酵粗乳酸溶液

替代部分硫酸催化剂，采用研究内容（4）所提出的重构的干法生物炼制过程进一步实现了纤维素 L-乳酸的生产。

（8）以干式稀酸预处理技术和区域式的生物质加工工厂（RBPDS）概念为基础，建立了物料收集、储存和运输模型，并进一步计算了该模型对运输成本和纤维素乙醇生产成本的影响。

（9）对目前所建立的四种最新的纤维素 L-乳酸干法生物炼制技术进行了评价。建立了详细的 Aspen Plus 模型和物料平衡。通过生命周期分析（LCA）计算了四种干法生物炼制技术的碳足迹，探究其应用潜力。

第 2 章 耐酸性新型生物脱毒菌株的筛选、鉴定和表征

2.1 引言

木质纤维素生物质必须通过预处理打破其天然晶体结构，从而保障后续纤维素水解和发酵的高效进行。预处理步骤通常采用强烈的化学或物理条件，不可避免的产生呋喃醛（糠醛、5-羟甲基糠醛）、有机酸（乙酸、甲酸等）和木质素衍生物（丁香醛、香草醛、4-HBA 等）毒性物质，对酶水解和微生物发酵有着协同抑制作用^[120]。尽管多种基因工程手段被用于提高发酵菌株的抑制物耐受性，但目前仍难以有发酵菌株能实现对在真实木质纤维素抑制物体系下的正常生长代谢。预处理物料中的抑制物必须经过去除才能用于后续酶解和发酵。

多种脱除抑制物的方法已经被开发，包括水洗、碱石灰、吸附、蒸发和离子交换等方法。然而这些常规方法通常会导致许多负面影响，如大量工艺水的使用和废水的产生、过量的能耗、大量固体颗粒的损失以及抑制物去除不完全等^[121]。最常用的水洗方法，会导致大量木质纤维素固体颗粒的洗涤和分离步骤中损失，减少后续发酵产物得率；同时产生的大量有毒废水难以处理；水洗后原料中含水量较高也导致了后续发酵无法在高固含量下进行，使得产品浓度降低，增加了产物分离纯化成本。

生物脱毒反应条件温和、废水产生较少，是目前较为理想的抑制物去除手段。实验室之前筛选得到的用于固态生物脱毒菌株煤油真菌树脂枝孢菌 *Amorphotheca resinae* ZN1，可以在 36 h 内对稀酸预处理固体底物中含有的糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸完全降解。整个过程无废水产生且可发酵糖几乎无损失。但该菌株的环境适应性较差，脱毒温度为 30 °C，必须在接近中性的条件下才可以生长，且其脱毒对通气量要求较高。该菌株脱毒需要在固体木质纤维素物料中进行，发酵空间大、耗氧量高、混合均匀度差；固体物料局部温度和 pH 波动较大，影响脱毒效果，且难以匹配实际工业生产中以液态形式进行的生物转化流程。本章研究致力于筛选得到环境适应性更强的生物脱毒菌株。要求菌株对温度、抑制物、pH、溶氧条件均有广泛的耐受性。对该菌株进行相关转录组分析以期挖掘其对于抑制物代谢和低 pH 耐受相关的关键基因，为今后深入了解脱毒菌株的抑制物降解途径及提高解毒效率提供重要的参考信息。

2.2 材料与方法

2.2.1 菌株，培养基和培养环境

菌株 *Paecilomyces variotii* FN89 (CGMCC 17665) 分离自经硫酸预处理的未中和及脱毒的玉米秸秆。*P. variotii* FN89 可以在马铃薯葡萄糖琼脂 (PDA) 平板上生长，培养条件为 37 °C。PDA 的具体成分包括 200.0 g/L 马铃薯提取液，20.0 g/L 葡萄糖和 15.0 g/L 琼脂粉。长满 *P. variotii* FN89 孢子的 PDA 平板可在 4 °C 条件下最多保存两周。*P. variotii* FN89 的液体培养基为简单的合成 (SM) 培养基，具体成分包括 15 g/L 葡萄糖，5 g/L 木糖，1 g/L 酵母提取物，2 g/L 磷酸二氢钾，1 g/L 硫酸铵和 1 g/L 七水硫酸镁。*P. variotii*

FN89 在 SM 培养基的培养条件为 37 °C, 200 rpm。

实验室之前分离得到的菌株树脂枝孢菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 (CGMCC 7452C) 被用于在正常 pH 下的固态生物脱毒。*A. resinae* ZN1 可以在 PDA 培养基上生长, 培养条件为 30 °C。长满 *A. resinae* ZN1 孢子的 PDA 平板可在 4 °C 条件下最多保存两周。*A. resinae* ZN1 也可以在 SM 培养基上正常生长。

2.2.2 试剂

所用酵母提取物购自 Oxoid (UK); 葡萄糖等化学试剂购自国药集团 (上海)。

2.2.3 真菌孢子液收集

真菌 *P. variotii* FN89 在 PDA 平板上划线, 37 °C 培养 4 天以上, 至平板上长满灰黄色孢子。每个平板上加入 10 mL 0.05% (w/w) 吐温 80 水溶液, 使用涂布棒轻轻搓洗并收集孢子液。

2.2.4 丝状真菌 DNA 快速抽提

用灭菌牙签从培养 12 h 的平板上刮取少量菌丝于 1.5 mL 灭菌 EP 管中。在 EP 管内加入少量液氮并研磨, 加入 700 μ L 真菌提取液, 室温静置 10 min。加入等体积的 DNA 提取试剂酚 (索莱宝) 和氯仿, 混匀, 离心 10 min 后, 将上清转移至新的 EP 管中, 加入 0.8 倍体积异丙醇, -80 °C 静置 30 min。离心 10 min, 去除上清, 用 75% (v/v) 乙醇洗两次, 晾干, 加 50 μ L ddH₂O, 即得到丝状真菌 DNA 提取液。

所用真菌提取液成分为 Tris-HCl 40 mM, 乙酸钠 20 mM, NA₂EDTA 10 mM, SDS 10.0 g/L, 调节 pH 值至 8.0, 无需灭菌, 室温保存。

2.2.5 ITS 序列扩增及鉴定

以真菌 DNA 为模板, 使用真菌 ITS 序列通用引物进行扩增, 通用引物为 ITS1: 5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3' 和 ITS4: 5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3'。PCR 程序设置为 95 °C 预变性 3 min, 95 °C 变性 15 s, 51 °C 退火 15s, 72 °C 延伸 1min, 循环 35 次, 72 °C 充分延伸 10 min, 16 °C 保温。使用天根试剂盒对 PCR 产物进行纯化, 并进行琼脂糖凝胶验证。纯化得到的菌体 ITS PCR 产物, 送与生工生物 (上海) 进行测序。得到的测序结果在 NCBI 上进行比对。下载与之相似度较高的菌株基因片段, 使用 MEGA 7 软件进行剪切、比对, 构建进化树。

2.2.6 丝状真菌插片观察

在 PDA 平板上滴入 10 μ L 孢子液。在孢子液旁 45 ° 斜插入灭菌盖玻片。静置培养 12-24 h。使用光学显微镜观察盖玻片上菌丝并拍照。

2.2.7 摇瓶和发酵罐发酵

发酵均在 250 mL 摇瓶内进行, 装液量为 50 mL, 所用培养基为 SM 培养基。接种量为 1% (v/v) 孢子液, 发酵温度为 37 °C, 转速为 200 rpm。

3-L 发酵罐内的装液量为 1 L, 所用培养基为 SM 培养基。接种量为 1% (v/v) 孢子

液，发酵温度为 37 °C，转速为 300 rpm，通气量为 0.5-1 vvm。

2.2.8 转录组分析

菌株 *P. variotii* FN89 的转录组分析共进行了两组，如图 2.1 所示。第一组为菌株 *P. variotii* FN89 在有无抑制物条件下的转录组分析；第二组为菌株在不同 pH 下的转录组分析（培养基中均添加了抑制物）。SM 培养基中添加的六种抑制物浓度分别为 0.6 g/L 糠醛，1.0 g/L HMF，2.0 g/L 乙酸，0.2 g/L 4-HBA，0.2 g/L 香草酸和 0.2 g/L 丁香醛。菌体收集是在 500 mL 的摇瓶内，装液量为 100 mL，接种量为 1% (v/v) 孢子液，培养条件为 37 °C，200 rpm，10 h。在 4 °C 条件下，8000 rpm 离心收集菌体，液氮速冻，放置于 -80 °C 冰箱过夜。第二天以冷链运输至博奥晶典生物技术有限公司（北京）进行样品质检。所有样本的 RNA 总量均 $\geq 2\mu\text{g}$ ，OD_{260/280} 均在 1.8-2.1 范围内，符合 RNA-seq 样品建库的实验要求。

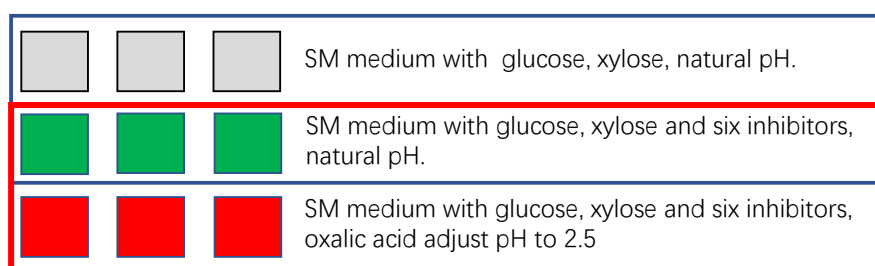


图 2.1 菌株 *P. variotii* FN89 的转录组实验设置。

Fig. 2.1 Transcriptome profiles of *P. variotii* FN89

2.2.9 分析方法

葡萄糖、木糖、乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛的检测采用高效液相色谱法（HPLC）测定，具体设备和操作参照以前的报道（Liu et al., 2018）。使用配有 HPX-87H（Bio-rad Aminex）和 RID-10A 检测器的 Shimadzu（日本）HPLC 系统。进样量为 20 μL ，检测温度 60 °C，流动相为 5 mM 硫酸溶液，流速为 0.6 mL/min。

香草醛、丁香醛及其衍生物（香草酸、香草醇、丁香酸和丁香醇）由配有 YMC-Pack ODA-A 柱和 UV 检测器（SPD-20A）的 Shimadzu（日本）HPLC 系统测定（Hu et al., 2018）。紫外检测波长设定为 270 nm，流动相为 100%乙腈（A 泵）：0.1%甲酸（B 泵）（9:1, v/v），流速为 1.0 mL/min，检测温度为 35 °C。糠酸、糠醇、5-羟甲基糠酸和 5-羟甲基糠醇的测定在同一套系统下，设定紫外检测波长为 220 nm，流动相为 50% (v/v) 乙腈，检测温度为 35 °C。

2.3 结果与讨论

2.3.1 新型生物脱毒菌株的筛选和鉴定

经干式稀酸预处理的小麦秸秆物料含水量约为 50%，环境 pH 约为 2.3，其中含有多木木质纤维素来源抑制物（如乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛等）。预处理后小麦秸秆长期处于室温开放保存状态，极少量预处理物料上发现存在污染霉菌的菌落。将污染菌落于

PDA 平板扩培及传代，最终获得单菌落菌株，命名为 FN89。

首先在不同培养基上验证了 FN89 耐受抑制物的能力，结果如图 2.2 所示。菌株 *A. resinae* ZN1 为实验室之前分离筛选并使用的生物脱毒，使用该菌株作为探究 FN89 耐受抑制物情况的对照菌株。FN89 可以在未脱毒玉米秸秆水解液平板上正常生长(图 2.2 a)，相比于平板上方的对照菌株 *A. resinae* ZN1，经过 72 h 培养后 FN89 的菌落更大。FN89 在生长过程中首先呈现白色菌丝状，菌丝具有很强的延展性；随后在菌落中间产生松散的灰黄色孢子，呈现出较为鲜明的丝状真菌特征。FN89 具有较好的耐热性，可以在 25-42 °C 下正常生长(图 2.2 b)，其最适生长温度为 37 °C，是一株嗜中温真菌。FN89 在含有不同木质纤维素来源抑制物的 PDA 平板上的生长菌落均明显大于对照菌株 *A. resinae* ZN1 (图 2.2 c)，表明 FN89 对木质纤维素来源抑制物具有良好的耐受性。

进一步通过插片观察 FN89 的菌丝生长及孢子产生情况(图 2.3 a)。前 12 h 内，FN89 菌株呈现明显的菌丝状，树状菌丝顶端逐步形成孢子囊。在 24 h 时，菌丝顶端释放大量的分生孢子，其孢子形态为纺锤状。在整个观察过程中不生成厚垣孢子。

采用真菌通用 ITS 序列引物，对 FN89 菌株的 ITS 序列进行扩增并测序。扩增得到的 FN89 菌株 ITS 序列共 624 个核苷酸并提交 Genbank，序列号为 MT754560。对 FN89 的 ITS 序列进行比对，选取相似度较高的不同菌株序列，在 MEGA 7 软件上构建系统发育进化树。进化树的构建按照 neighbor-joining 方法，进行 1000 次的 bootstrap 复制。标尺表示每个位置有 0.05 个核苷酸替换，结果如图 2.3 b 所示。FN89 的 ITS 序列与宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* NRRL 1115 的同源性为 100%。

根据文献报道，子囊菌宛氏拟青霉是一种普遍存在于食品、土壤、室内环境和临床样本中的耐热真菌^[136,137]，具有良好的耐热性和低氧水平下的生长能力^[137]。宛氏拟青霉能够在多种农业或工业的衍生物中生长并且可以用于固态发酵^[138,139]。目前报道的分离及筛选的几株具有产酶潜力的宛氏拟青霉可以用于生产淀粉酶^[140]、壳聚糖酶^[141]、植酸酶^[142]、果胶酶^[143]和单宁酸酶^[144]等。此外，也有报道利用宛氏拟青霉处理工业亚硫酸盐废水，并生产工业单细胞蛋白^[145]。宛氏拟青霉也被报道可以降解一些有毒污染物，如脂肪族和芳香族碳氢化合物和酚类衍生物^[146,147]，因此有潜力应用于工业废水的生物处理。根据对 FN89 的菌落观察、生长特性探究、ITS 序列的鉴定，以及与以往报道的相似性，FN89 被鉴定为宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89，被保藏在中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC)，保藏编号为 CGMCC 17665。

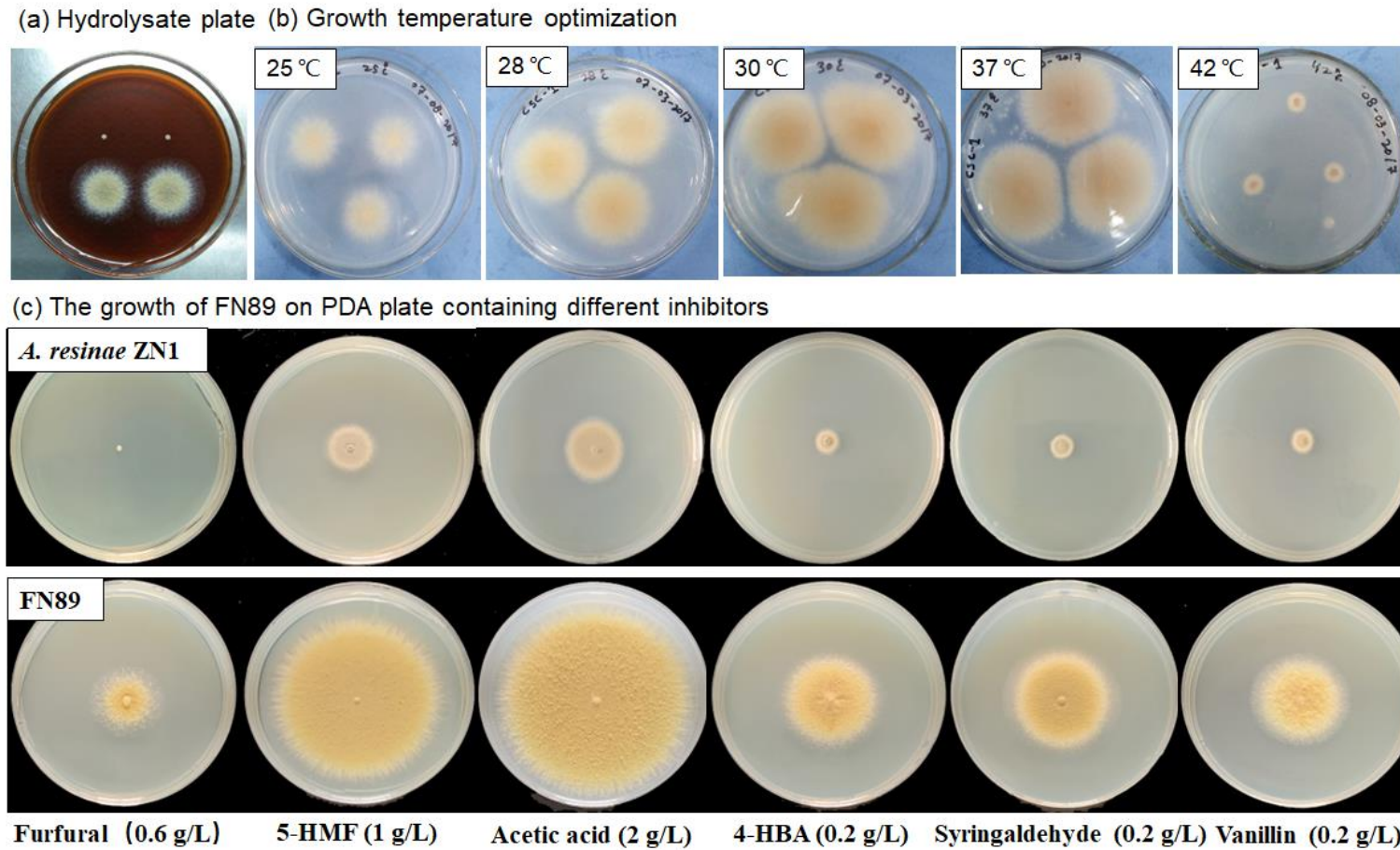


图 2.2 新筛选菌株 FN89 在不同培养基和培养温度下的生长状况

Fig. 2.2 The growth of newly isolated strain FN89 on undetoxified corn stover hydrolysate palte (a), on PDA plate at different temperatures (b), and on PDA plate contining different lignocellulose-derived inhibitors.

注：*A. resiniae* ZN1 为实验室之前分离筛选并使用的生物脱毒菌株，培养温度为 30 °C，在接近中性的环境下生长；图 2.2 a 和图 2.2 c 中的培养温度均为 30 °C，培养时间为 72 h；图 2.2 b 的培养时间为 48 h。每个菌落的初始孢子数大约为 10⁴ 个。

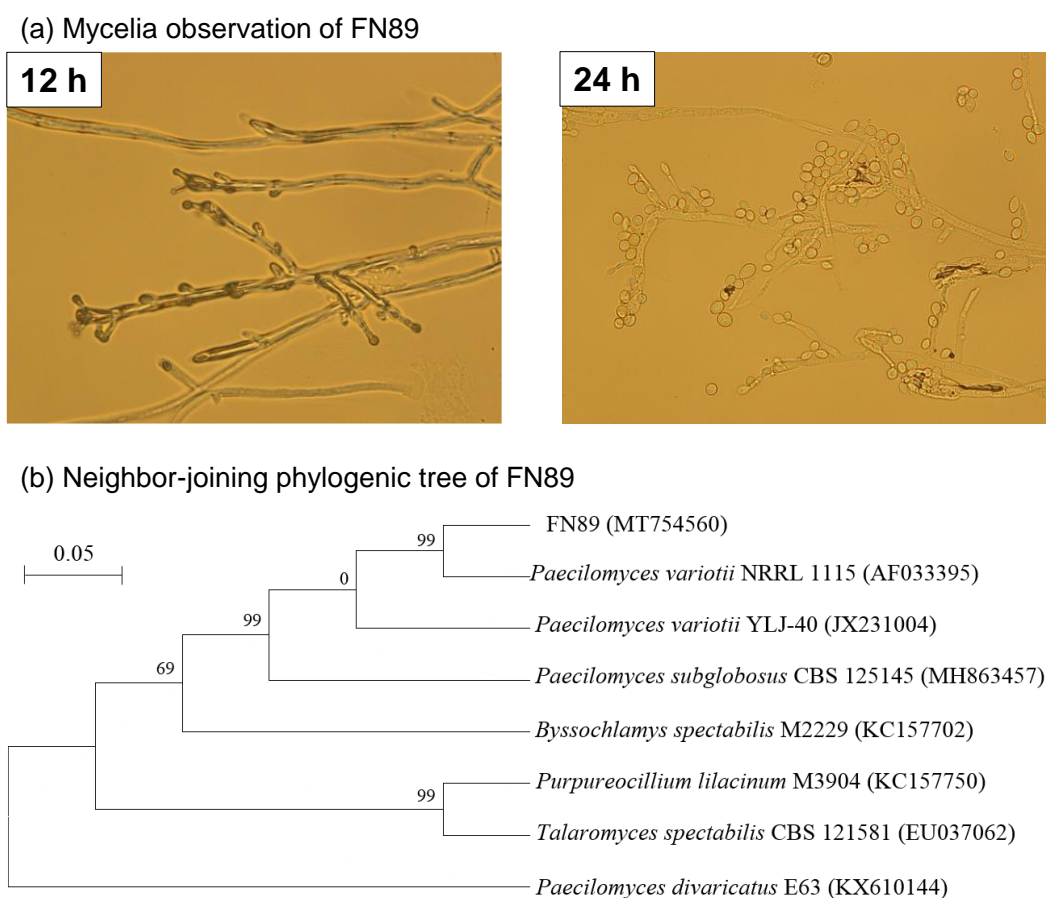


图 2.3 FN89 的菌丝生长及 ITS 序列鉴定

Fig. 2.3 The mycelia observation of FN89 and ITS identification.

2.3.2 *P. variotii* FN89 的生物脱毒能力鉴定

在摇瓶内进一步对 *P. variotii* FN89 降解抑制物的能力进行了鉴定。在含有 40 g/L 葡萄糖的 SM 培养基中分别添加不同浓度的木质纤维素来源抑制物，接种 *P. variotii* FN89 后培养 48 h，测定其中残糖、残余抑制物和菌体干重 (DCW)，结果如图 2.4 所示。由于 *P. variotii* FN89 对不同抑制物的耐受性不同，因此添加抑制物的浓度梯度有所不同。乙酸和 5-羟甲基糠醛的浓度范围为 0-8 g/L，糠醛、香草醛、丁香醛和 4-HBA 的浓度范围为 0-2 g/L。

除丁香醛外，随着抑制物浓度的升高，*P. variotii* FN89 的糖代谢能力和菌体生长均受到了抑制，具体表现为残余葡萄糖浓度的升高以及 DCW 的降低。*P. variotii* FN89 表现出对所测试的六种主要木质纤维素来源抑制物良好的转化能力。尽管在添加丁香醛后，对 *P. variotii* FN89 的糖代谢和菌体生长无明显影响，但 *P. variotii* FN89 对丁香醛的降解能力较弱，在仅添加 0.5 g/L 丁香醛时就无法完全转化，这只能说明 *P. variotii* FN89 对丁香醛的耐受性较好，但并不具备高效代谢的能力。*P. variotii* FN89 对乙酸、5-羟甲基糠醛、糠醛和香草酸的代谢能力较强，仅当其添加量分别高于 6 g/L、6 g/L、2 g/L 以及

2 g/L 的高浓度时才会出现剩余。与丁香醛类似，菌株对 4-HBA 的代谢能力也较弱，但同时，4-HBA 的添加对菌株的生长和糖代谢也产生了明显的抑制。结果表明，*P. variotii* FN89 对来源于木质纤维素的主要微生物生长抑制物均由一定的转化能力。更为重要的是，*P. variotii* 展示出了对其中毒性最强的糠醛和 5-羟甲基糠醛较好的耐受性和转化能力。

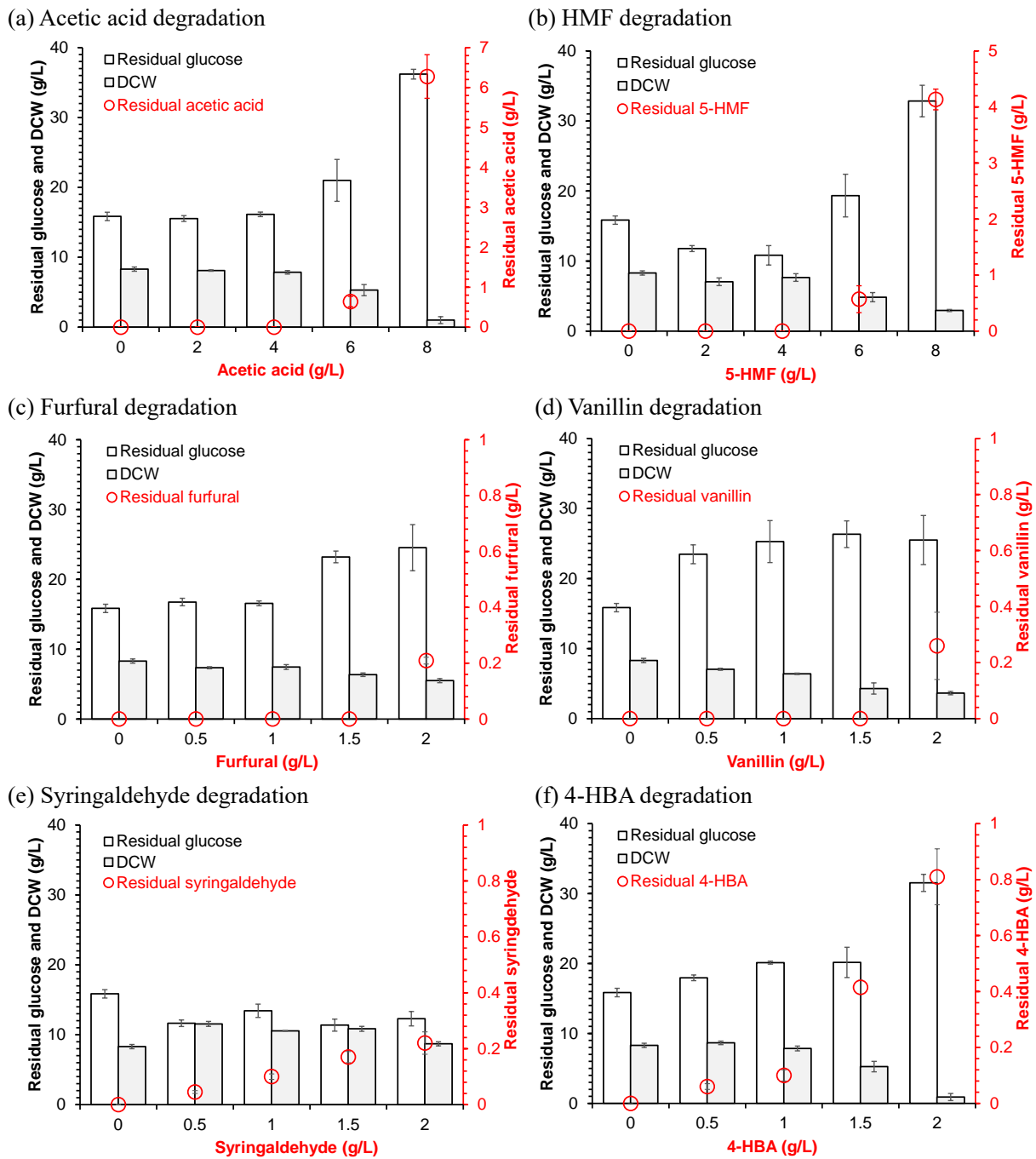


图 2.4 *P. variotii* FN89 对不同抑制物的代谢能力

Fig. 2.4 The degradation of different inhibitors by *P. variotii* FN89 in SM medium containing 40 g/L glucose. (a) Acetic acid; (b) HMF; (c) Furfural; (d) Vanillin; (e) Syringaldehyde; (f) 4-HBA.

注：为了避免抑制物的高温分解或挥发，在所有的抑制物均是在 SM 培养基灭菌后添加。摇瓶发酵

条件：50 mL 装液量，250 mL 摇瓶，1% (w/w) 孢子液接种，200 rpm，37 °C，72 h，不控制 pH。

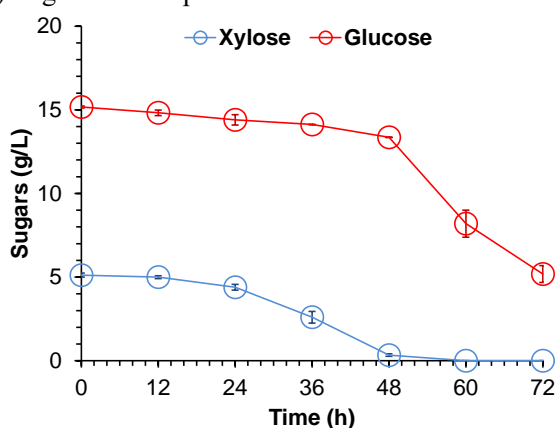
之前使用的生物脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 对抑制物的降解需要充足的氧气，当氧气不足时，抑制物糠醛和 5-羟甲基糠醛只能代谢至相应的酸，无法进一步终极降解^[130]，限制了其在高粘度液体和固态发酵中的应用。宛氏拟青霉 *P. variotii* 被报道过对氧气限制条件具有良好的耐受性^[148]。为了验证 *P. variotii* FN89 是否能实现各类抑制物的终极降解以及在低溶氧下 *P. variotii* FN89 对抑制物的降解能力，进一步在 3-L 发酵罐内对同时降解六种抑制物的过程进行了探究。*P. variotii* FN89 对各类抑制物的同时降解在不同通气量条件下进行，并分别监测了残糖、残余抑制物及其衍生物的浓度。

发酵在 SM 培养基中进行，添加了 15 g/L 葡萄糖和 5 g/L 木糖。同时按照 2.0 g/L 乙酸、1.0 g/L 5-羟甲基糠醛、0.6 g/L 糠醛、0.2 g/L 香草醛、0.2 g/L 丁香醛和 0.2 g/L 4-HBA 的混合抑制物体系模拟了实际木质纤维素水解体系中的抑制物浓度。发酵分别在 1 vvm（高溶氧）和 0.5 vvm（低溶氧）下进行，实验结果如图 2.4 所示。

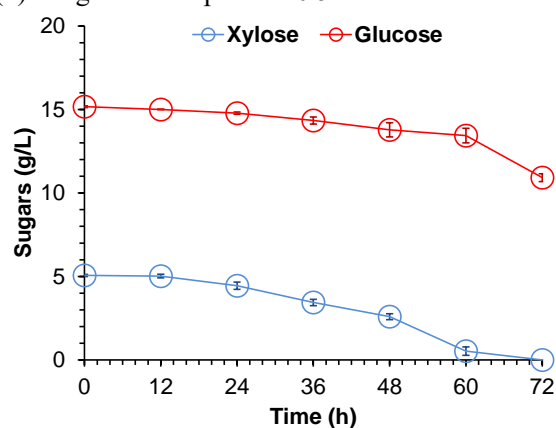
在较为合适的通气条件下（1vvm，图 2.5），经过 72 h 培养后，所有的抑制物均得到了有效地降解。酚醛类化合物，包括 5-羟甲基糠醛、糠醛、香草醛、丁香醛和 4-HBA，首先被转化为相应的毒性较小的醇、酸类衍生物，然后进一步被完全降解。糠醛的代谢最为迅速，在 24 h 内即可完成全部降解，这也说明了糠醛抑制剂对菌株的毒性最大，需要最先去。可发酵糖（葡萄糖和木糖）的快速消耗是从 48 h 开始，在此时间，各类抑制物均处在已被完全或大部分降解的状况，这也就是说对于 *P. variotii* FN89 的生物解毒过程，糖类的利用是滞后于抑制物的代谢。这一特性为 *P. variotii* FN89 在实际脱毒体系中为底物中可发酵糖的保存提供了可能。

在较低的通气条件下（0.5 vvm，图 2.5），尽管 *P. variotii* FN89 对各类抑制物的降解速率减慢，但始终未出现醇酸类衍生物的大量积累。经过 72 h 的培养后，除糠醛剩余 0.15 ± 0.03 g/L（约 25%）及 4-HBA 剩余 0.03 ± 0.01 g/L（约 14.7%）外，所有的抑制物均被完全降解，这表明 *P. variotii* FN89 菌株对低溶氧条件的耐受性较模式脱毒菌株 *A. resinae* ZN1 更好。工业化生物炼制过程中的生物脱毒通常是以固态脱毒形式或是在高粘度水解液中进行的，因此如何解决发酵容器内部的有效通气是生物脱毒过程的重要限制因素。对于大规模的固态脱毒过程中，蓬松的物料往往导致所需容积的变大；而对于高粘度的水解液，在大规模的生产中难以实现有效的搅拌。因此 *P. variotii* FN89 菌株的应用，可以有效解决木质纤维素物料脱毒过程中氧传递较难的问题。此外，在低通气条件下，*P. variotii* FN89 对糖类的消耗更为平缓，相较于高通气条件下 *P. variotii* FN89 的快速生长耗糖，低通气条件下或许能更有效的控制脱毒终点，并保留大部分的可发酵糖。

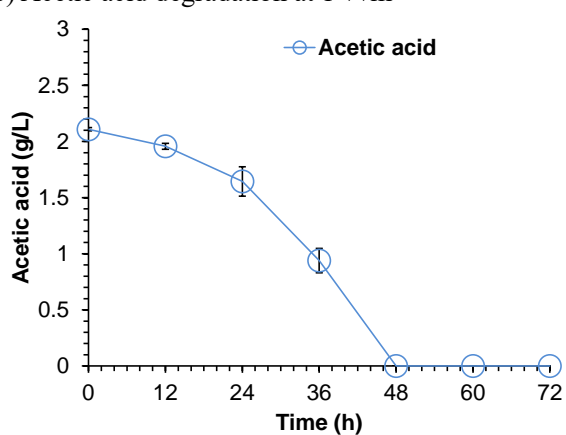
(a) Sugars consumption at 1 vvm



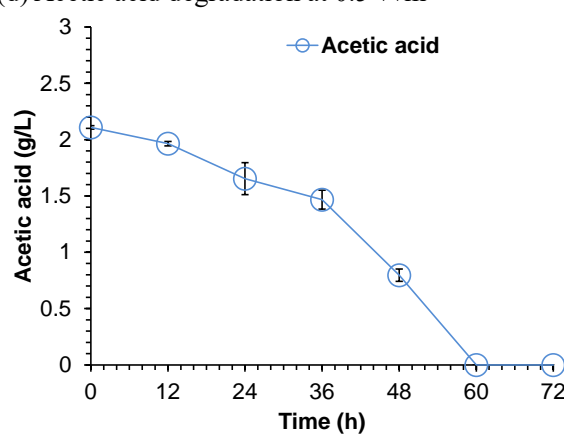
(b) Sugars consumption at 0.5 vvm



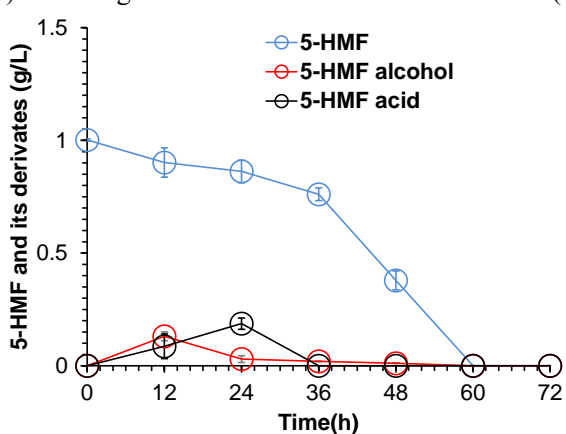
(c) Acetic acid degradation at 1 vvm



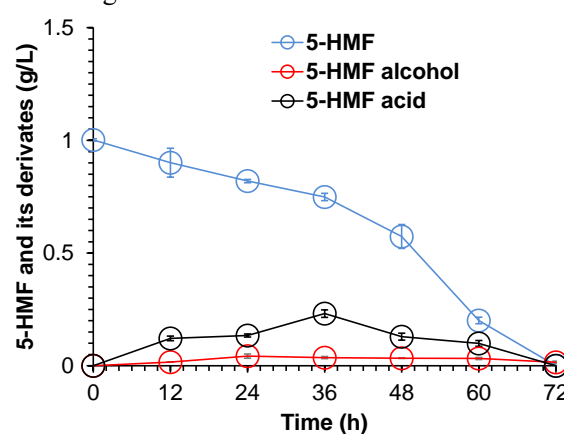
(d) Acetic acid degradation at 0.5 vvm



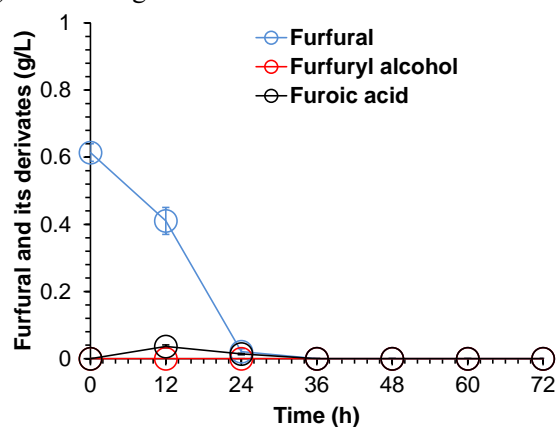
(e) HMF degradation at 1 vvm



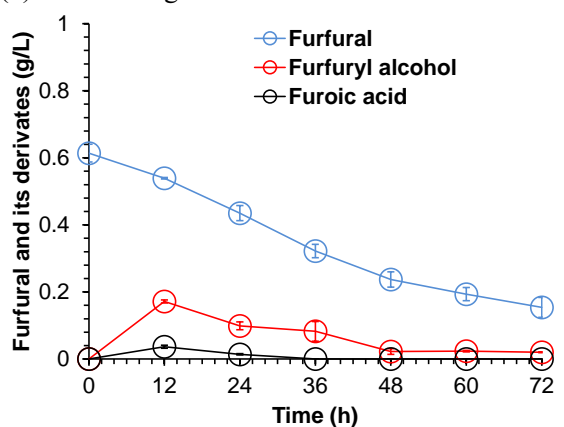
(f) HMF degradation at 0.5 vvm



(g) Furfural degradation at 1 vvm



(h) Furfural degradation at 0.5 vvm



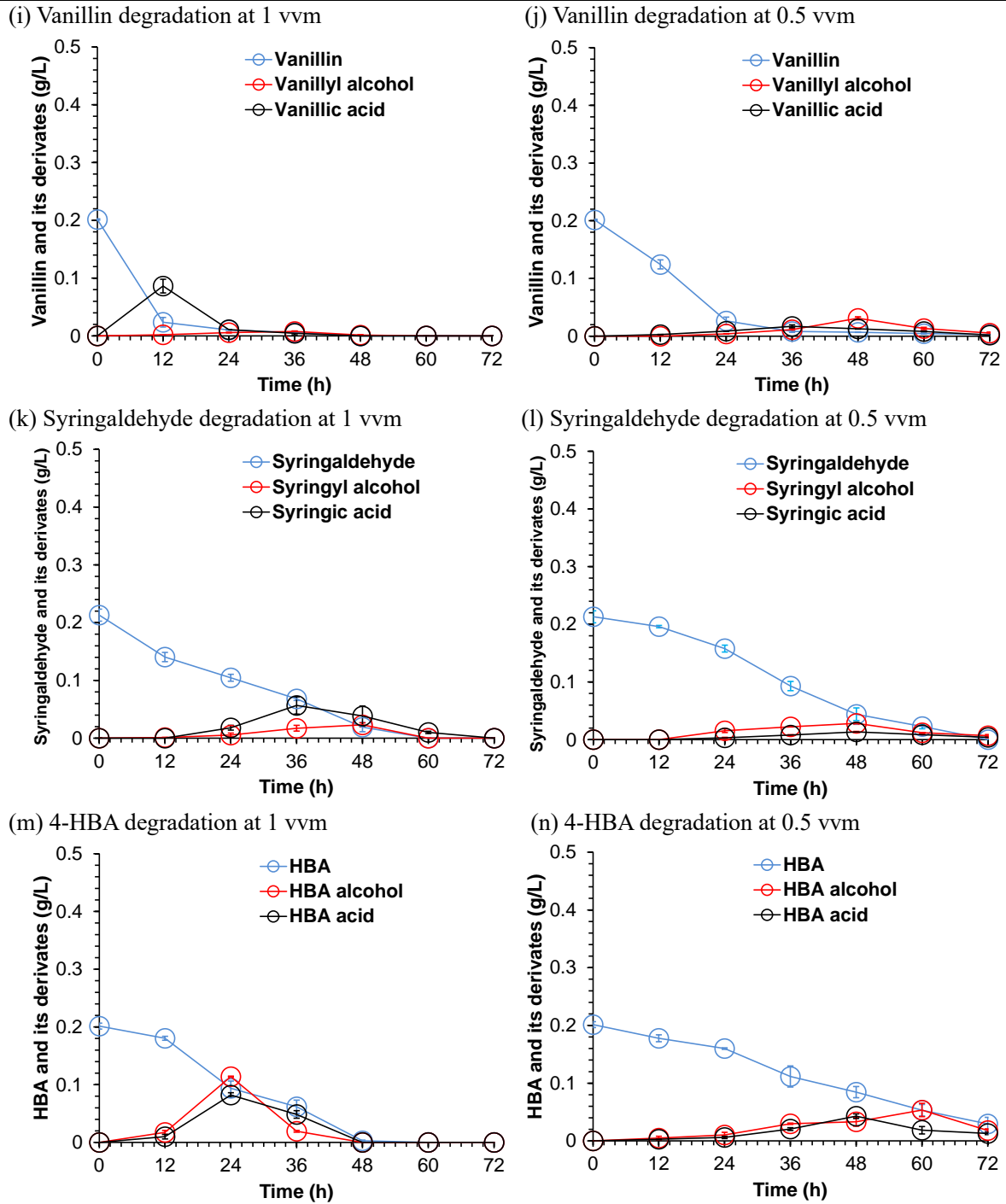


图 2.5 在 3-L 发酵罐内不同通气条件下 *P. variotii* FN89 对抑制物和可发酵糖的代谢情况

Fig. 2.5 The degradation profiles of sugars and inhibitors by *P. variotii* FN89 in 3-L fermentor with different air rates (1 vvm or 0.5 vvm). (a) Sugars consumption at 1 vvm; (b) Sugars consumption at 0.5 vvm; (c) Acetic acid degradation at 1 vvm; (d) Acetic acid degradation at 0.5 vvm; (e) HMF degradation at 1 vvm; (f) HMF degradation at 0.5 vvm; (g) Furfural degradation at 1 vvm; (h) Furfural degradation at 0.5 vvm; (i) Vanillin degradation at 1 vvm; (j) Vanillin degradation at 0.5 vvm; (k) Syringaldehyde degradation at 1 vvm; (l) Syringaldehyde degradation at 0.5 vvm; (m) 4-HBA degradation at 1 vvm; (n) 4-HBA degradation at 0.5 vvm.

注：为了避免抑制物的高温分解或挥发，在所有的抑制物均是在 SM 培养基灭菌后添加。所用 SM 培养基含有 15 g/L 葡萄糖、5 g/L 木糖、2 g/L 乙酸、1 g/L HMF、0.6 g/L 糠醛、0.2 g/L 香草醛、0.2 g/L 丁香醛和 0.2 g/L 4-HBA。发酵条件：接种量 1% (w/w) 孢子液、300 rpm、37 °C、72 h，不控制 pH。

2.3.3 *P. variotii* FN89 生物脱毒菌株在抑制物胁迫下的转录组分析

新筛选的生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 对木质纤维素来源抑制物显示出了良好的降解能力。为了进一步挖掘其代谢抑制物的基因信息，在存在六种抑制物的条件下，使用参考基因组对 *P. variotii* FN89 的各基因相对表达量进行了测定。

目前关于宛氏拟青霉 *P. variotii* 的基因组可获取的信息较少，公布的关于 *P. variotii* 测序的菌株主要有 *Byssochlamys spectabilis* No. 5 (anamorph *Paecilomyces variotii* No. 5)^[149], *Paecilomyces variotii* strain CBS 101075 以及 CBS 144490^[137]，测序结果保存在 JGI (<https://mycocosm.jgi.doe.gov/mycocosm/home/releases?flt=Byssochlamys+spectabilis>) 上^[150]。其中 CBS 101075 的变种菌株 CBS 144490 基因组最大，包含的基因最多、公布时间最新，因此我们选择 CBS 144490 作为转录组分析参考基因组。

在 *P. variotii* FN89 中共鉴定出了 10147 个基因，对参考基因组的覆盖率达到 100%，这表明 *P. variotii* FN89 与 *P. variotii* CBS 144491 的亲缘性较好且转录组数据的完整性较好。其中，在添加六种抑制物后，上调 ($\log_2FC \geq 2.0$) 的基因有 221 个，下调 ($\log_2FC \leq -2.0$) 的基因有 1229 个。为了更显著地表现出基因表达的差异性，将 $\log_2FC \geq 2.0$ 且 $P\text{-value} < 0.001$ 的基因定义为显著上调，共 115 个；而 $\log_2FC \leq -2.0$ 且 $P\text{-value} < 0.001$ 的基因定义为显著下调，共 643 个，相关结果如图 2.6 所示。

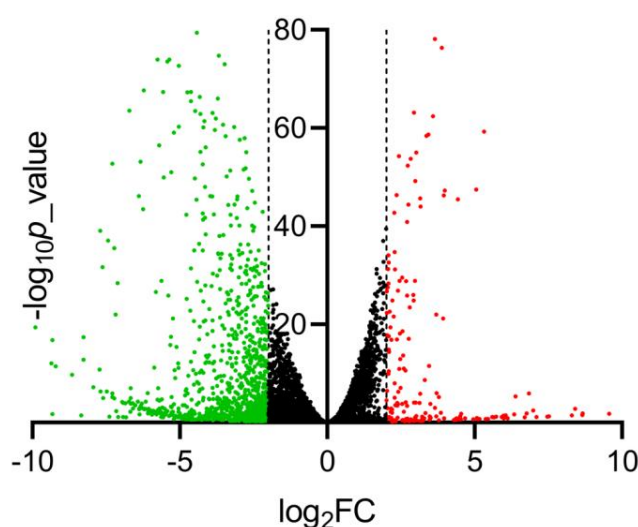
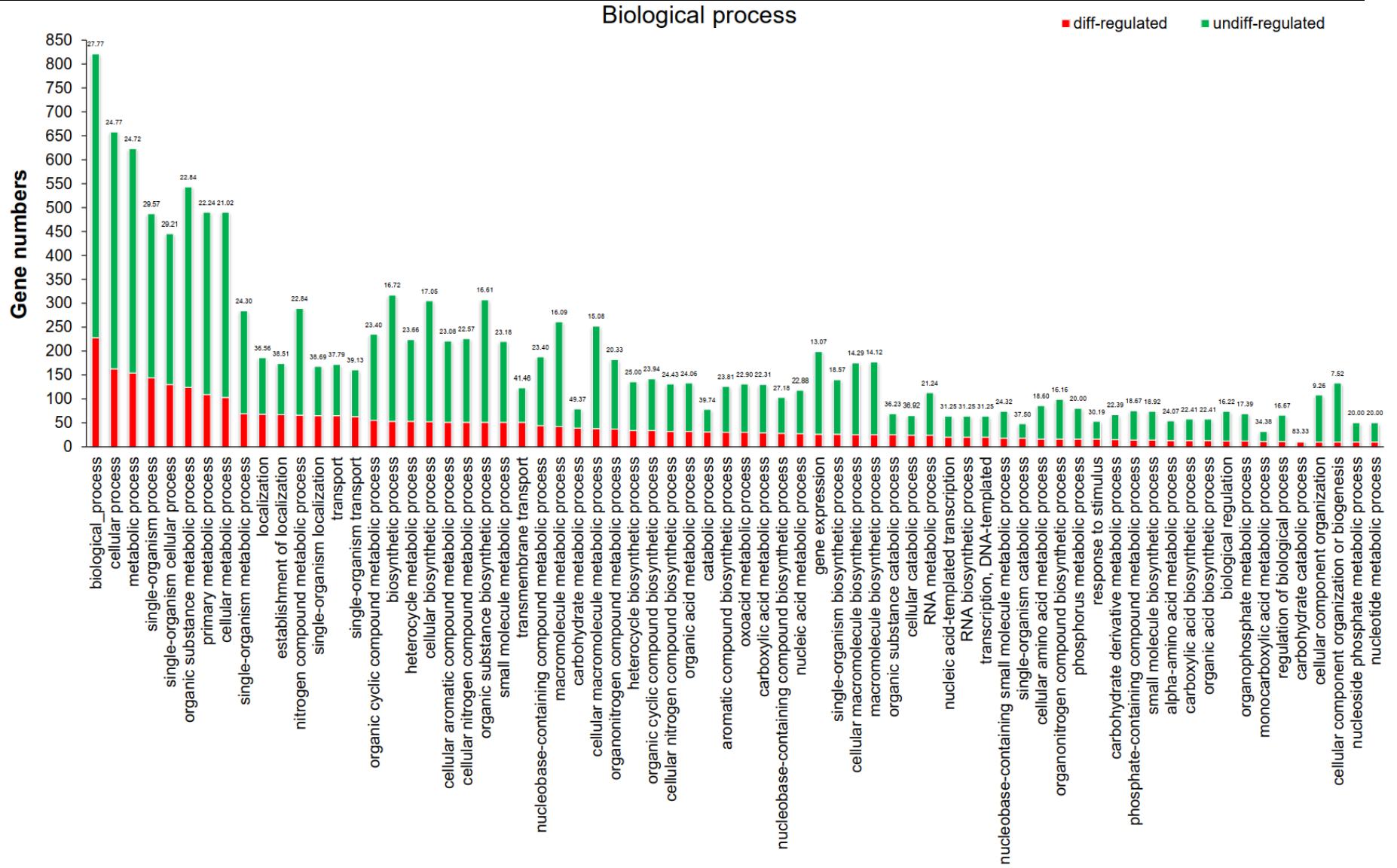
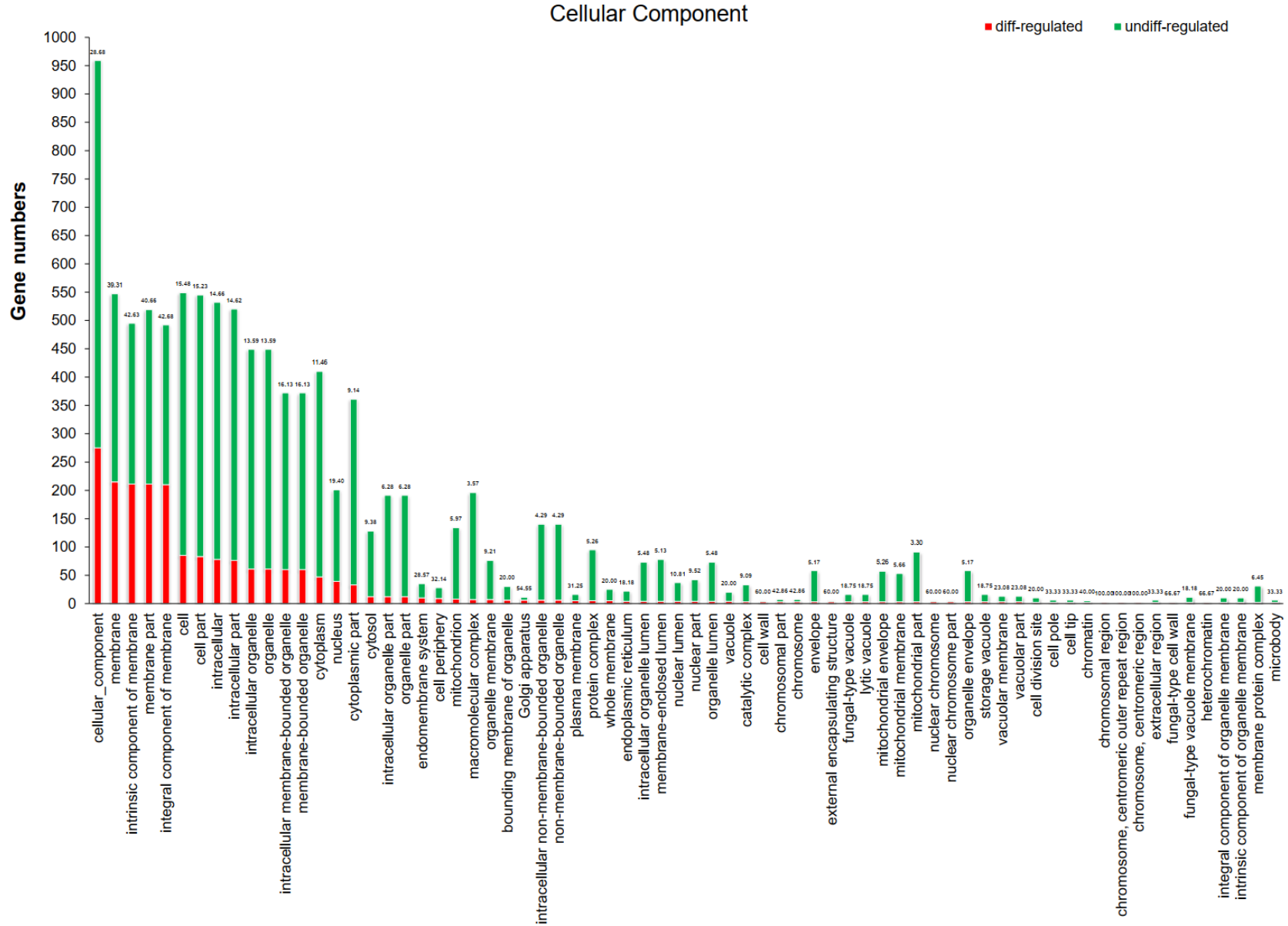


图 2.6 差异表达基因火山图

Fig. 2.6 The volcano plots of differentially expressed genes (DEGs).

进一步的 GO 富集分析将 DEGs 富集到 217 个条目中，包括 77 个生物过程、70 个细胞组分和 70 个分子功能，结果如图 2.6 所示。图形中红色部分表示显著变化基因 ($\log_2FC \geq 2.0$ 或 ≤ -2.0 ，且 $P\text{-value} < 0.001$)。在生物学过程中，差异转录主要集中在胞内初级及次级代谢等；在细胞组分中，差异转录主要集中在膜的成分及完整性上；在分子功能中，差异转录主要集中在酶催化活性以及氧化还原性上。





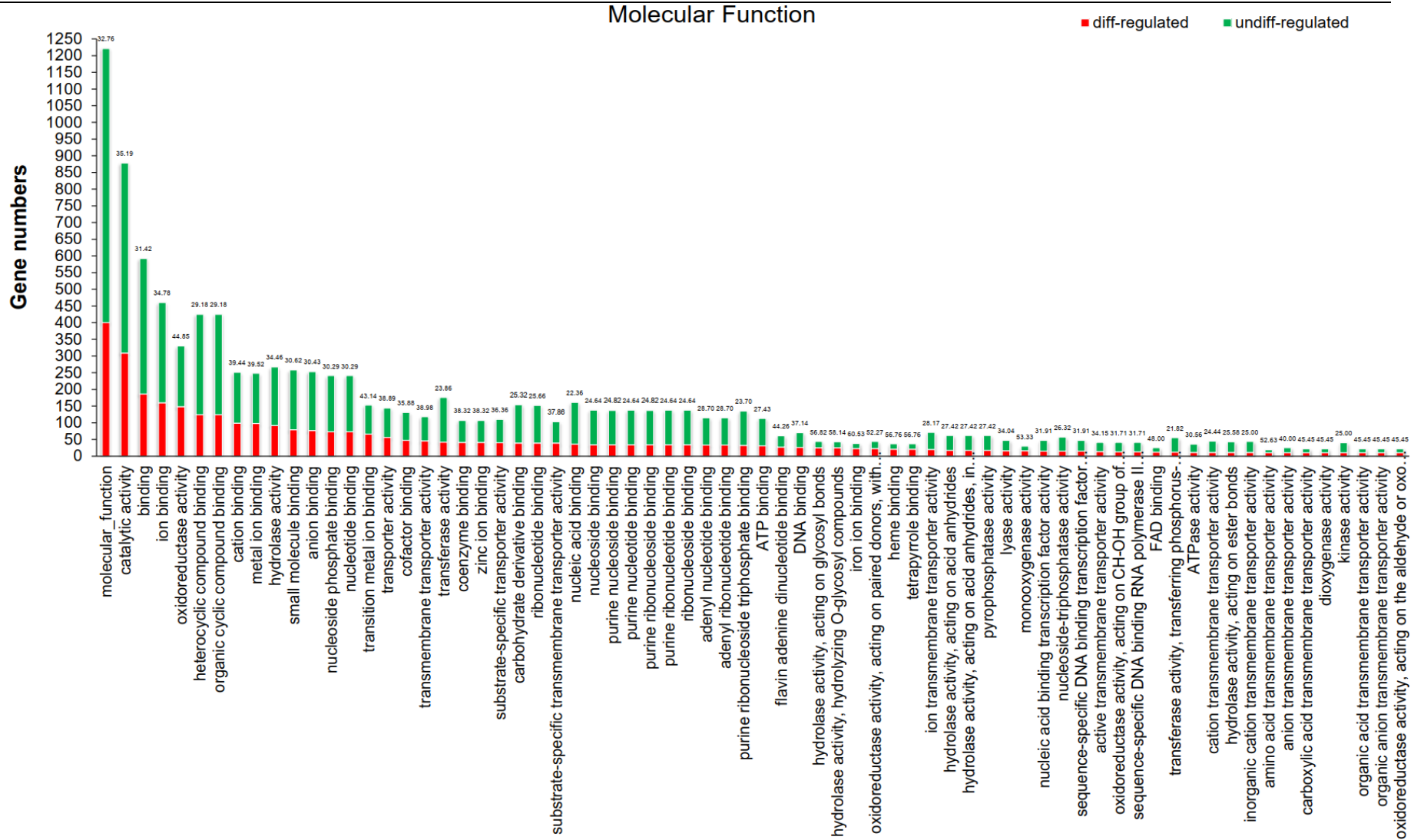


图 2.7 差异表达基因的 GO 富集分析

Fig. 2.7 Gene ontology enrichment of differentially expressed genes (DEGs)

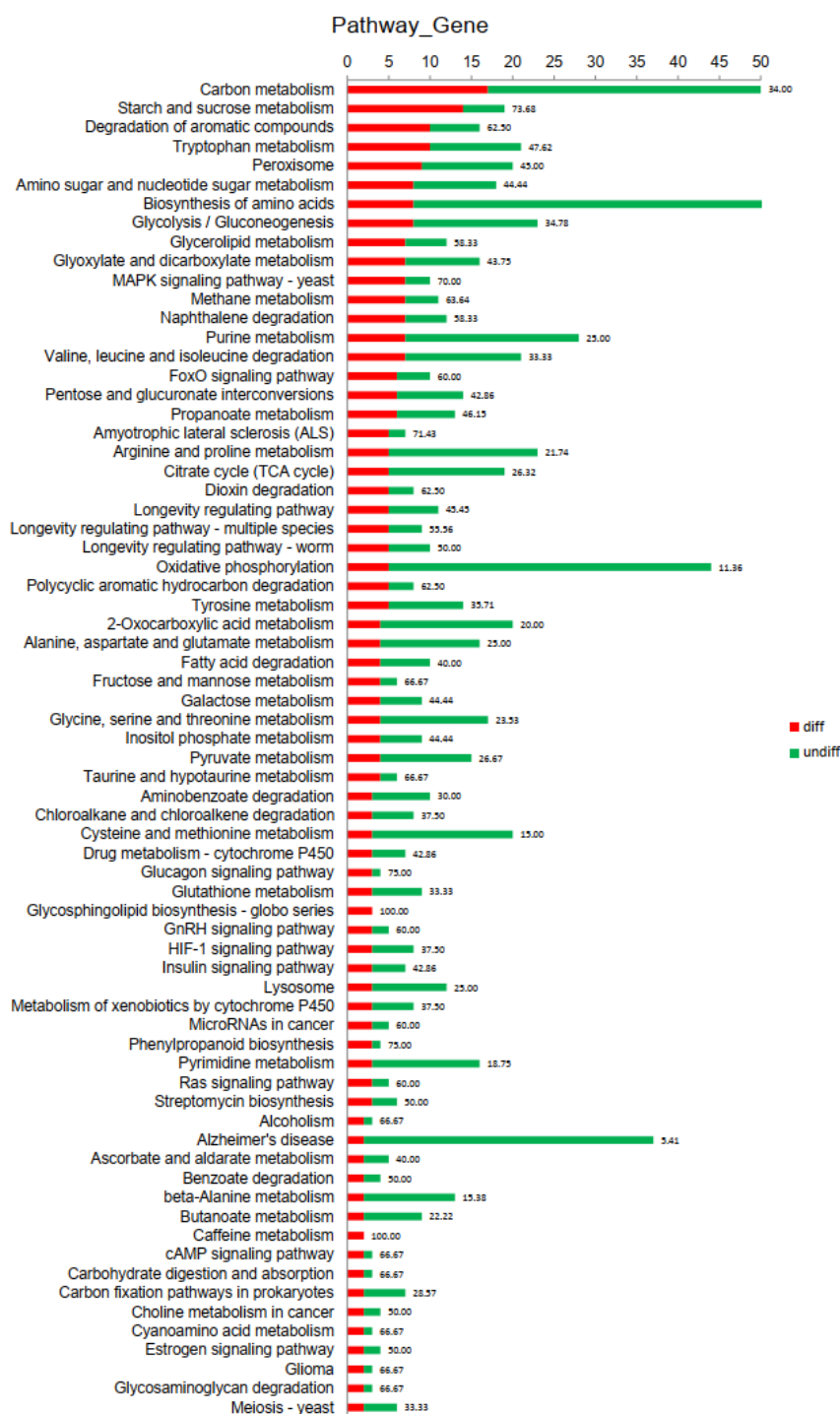


图 2.8 DEGs 编码蛋白的 KEGG 注释

Fig. 2.7 KEGG annotation of proteins encoded by DEGs.

通过 KEGG 富集进一步对 DEGs 进行分类，超过 50% 的差异表达基因参与了代谢过程。KEGG 富集共涉及 70 条代谢途径，结果如图 2.8 所示。KEGG 上具有明显表达变化的基因主要集中于糖代谢、淀粉/蔗糖代谢和芳香族化合物降解等途径上。更为重要的是，在这三条途径上，有明显变化的基因分别占 34%、73.68% 和 62.5%。这表明抑制物

的添加对于糖代谢具有较大的影响。而芳香族化合物降解途径的明显变化,表明培养基中添加的香草醛、丁香醛和 4-HBA 这类芳香族化合物抑制物对 *P. variotii* FN89 的影响较为显著。

为了进一步解析 *P. variotii* FN89 中对各类抑制物的降解途径,通过对参考基因组分析以及参照 *A. resinae* ZN1 的抑制物代谢途径以及报道的某些抑制物途径,分别推定了 *P. variotii* FN89 对各类抑制物的降解路径,如图 2.9 所示。

从图中可以看出,酚醛类化合物的初步转化有两个方向,一种是通过醇脱氢酶生成相应的醇衍生物,降低毒性;另一条途径是通过醛脱氢酶生成相应的酸,并进一步降解,产物可进入 TCA 循环,最终实现终极降解。在代谢的开始,酚醛化合物向醇及酸的转化对于其进入终极代谢途径有重要的作用。对于起到将抑制物转化为醇的主要基因,在 *P. variotii* FN89 基因组中共解析出 30 个醇脱氢酶,仅有 10 个上调;其余起到将抑制物转化为醇的基因包括 AKR/ARI 表示的醛酮还原酶共解析出 11 个。在醇脱氢酶以及醛酮还原酶中,上调基因的占比为 42.5%(表 2.1)。对于起到将抑制物转化为酸的主要基因,在 *P. variotii* FN89 基因组中解析出的 8 个醛脱氢酶,有五个表达上调,占 62.5%。这表明 *P. variotii* FN89 在代谢各类抑制物的时候更倾向于将抑制物转化成相应的酸进行终极代谢,而不是将其以醇的形式保留。

糠醛和 5-羟甲基糠醛的代谢途径已在 *Cupriavidus basilensis* HMF14 中被鉴定和报道,其代谢基因簇相对保守^[151]。糠醛的代谢是经过 2-furoxyl-CoA,随后生成中间代谢产物 2-氧化酮戊二酸(oxoglutarate),最终进入 TCA 循环。5-羟甲基糠醛经过 2,5-furandicarboxylic acid 和 2-furoic acid 转化,进入糠醛代谢途径,最终进入 TCA 循环进行终极代谢。

有文献报道 *P. variotii* 菌株可以有效转化香豆酸^[152]。使用薄层色谱(TLC)和高效液相色谱(HPLC)检测到了其香豆酸的代谢中间产物为 4-HBA 和原儿茶酸(PCA),但文中对 PCA 的终极降解并未提及。PCA 是细菌或真菌降解各种芳香族化合物途径中最重要的中间代谢物之一。原儿茶酸的代谢在各种菌株内已被明确鉴定出^[153,154]。根据在 *P. variotii* FN89 中解析到的基因表明,PCA 的代谢是开环之后,通过粘康酸的 β -ketoamidate 代谢途径变成琥珀酰-CoA 进行代谢,这一途径与 *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas putida*, 和 *Agrobacterium tumefaciens* 相似^[155],且相关 PCA 代谢途径的基因均呈现明显的上调表达。参考 *A. resinae* ZN1 的抑制物代谢途径,香草酸应先通过单加氧酶转变为 PCA 进行终极代谢,但在 *P. variotii* 中未能鉴定出香草酸单加氧酶,该路径需要进一步验证。

有文献报道 *P. variotii* MTCC 6581 具有将芥子酸转化为丁香酸的能力(从芥子酸到丁香醛到丁香酸)^[156],但丁香酸的终极降解仍未进一步阐明。*A. resinae* ZN1 的丁香酸代谢是以没食子酸(gallic acid)为代谢中间体。但丁香酸转化为没食子酸的 Syringate O-demethylase 和 3 O-demethylase 未能在 *P. variotii* FN89 中鉴定出。没食子酸代谢途径中一个关键酶 4-oxalomesaconate tautomerase 得到了鉴定。只能初步推定在 *P. variotii* FN89

中丁香酸的代谢与没食子酸有关。

乙酸代谢中最终的酶则是乙酰 CoA 合成酶在 *P. variotii* FN89 中得到了解析。但可以看出在混和抑制物存在的条件下，乙酰 CoA 合成酶的表达是有所下调的，这可能是由于乙酸的代谢滞后于酚醛类抑制物的代谢。上述实验结果和转录组结果验证，基本表明菌株 *P. variotii* FN89 具有对木质纤维素来源的糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸、4-HBA、丁香醛和香草醛的高效降解能力。其代谢降解中间产物进入 TCA 循环，从而实现对六种抑制物的终极代谢。但由于基因组注释的不完整，糠醛和丁香醛的代谢路径还需要得到进一步的验证。

表 2.1 参与将抑制物转化为相应醇和酸衍生物的基因

Table 2.1 Genes involved in the conversion of inhibitors into corresponding alcohols and acids derivatives

Genes	Functional categories	Up-regulated gene ID	Down-regulated gene ID
Alcohol dehydrogenase (ADH)	Convert aldehydes to its alcohols and vise verse, totally 30 genes	Gene 2515, MSTRG.77, MSTRG.2023, Gene 132, MSTRG.3663, MSTRG.3920, MSTRG.5521, Gene 2998, MSTRG.8130, MSTRG.7437	MSTRG.8343, Gene 7313, Gene 8672, gene 8280, MSTRG.296, Gene 5372, Gene 1603, Gene 1762, MSTRG.2159, MSTRG.2181, MSTRG.2720, Gene 8740, Gene 7023, Gene 3222, MSTRG.4680, Gene 8414, MSTRG.6579, Gene 7144, Gene 912, Gene 4078
Aldehyde reductase, aldo/keto reductase (AKR/ARI)	Convert aldehydes to its alcohols and vise verse, totally 10 genes	Gene 1851, Gene 1896, Gene 4947, Gene 2234, Gene 7217, Gene 1337, Gene 4418	MSTRG.981, Gene 5014, Gene 2257
Alcohol oxidase (MOX)	Convert alcohols to its aldehydes, totally 1 gene	Gene 7122	
GMC oxidoreductase glucose-methanol-choline (Gmc)	Convert alcohols to its aldehydes and convert aldehydes to its acids, toally 1 genes		Gene 4186
Aryl-alcohol oxidase (AAO)	Convert 4-hydroxybenzylalcohol, vanillyl alcohol and syringyl alcohol to it's aldehydes, totally 1 gene	Gene 4421	
Aldehyde oxidoreductase	Convert aldehydes to its	Gene 5306, Gene 1902,	Gene 635, Gene 7728,

dehydrogenase acids, totally 8 genes Gene 1910, Gene 1355, MSTRG.1347
(ALDH) MSTRG.8759

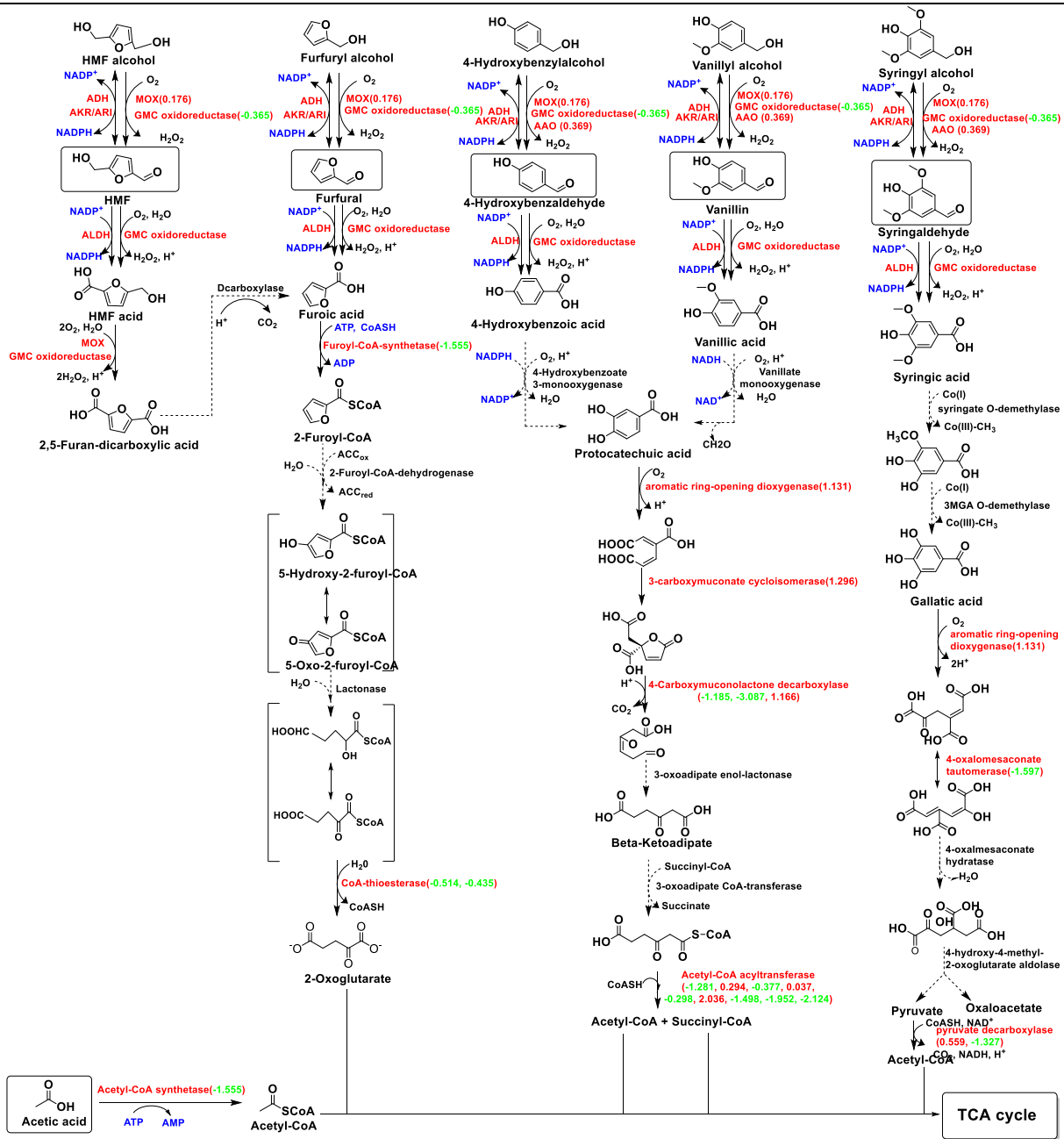


图 2.9 推定的 *P. variotii* FN89 中抑制物代谢途径

Fig. 2.9 The putative inhibitors metabolic pathway in *P. variotii* FN89

注：蓝色代表能量转化；红色代表可在基因组中解析到的酶及上调数值；绿色代表可在基因组中解析到的酶和基因下调数值；假定途径用虚线表示。

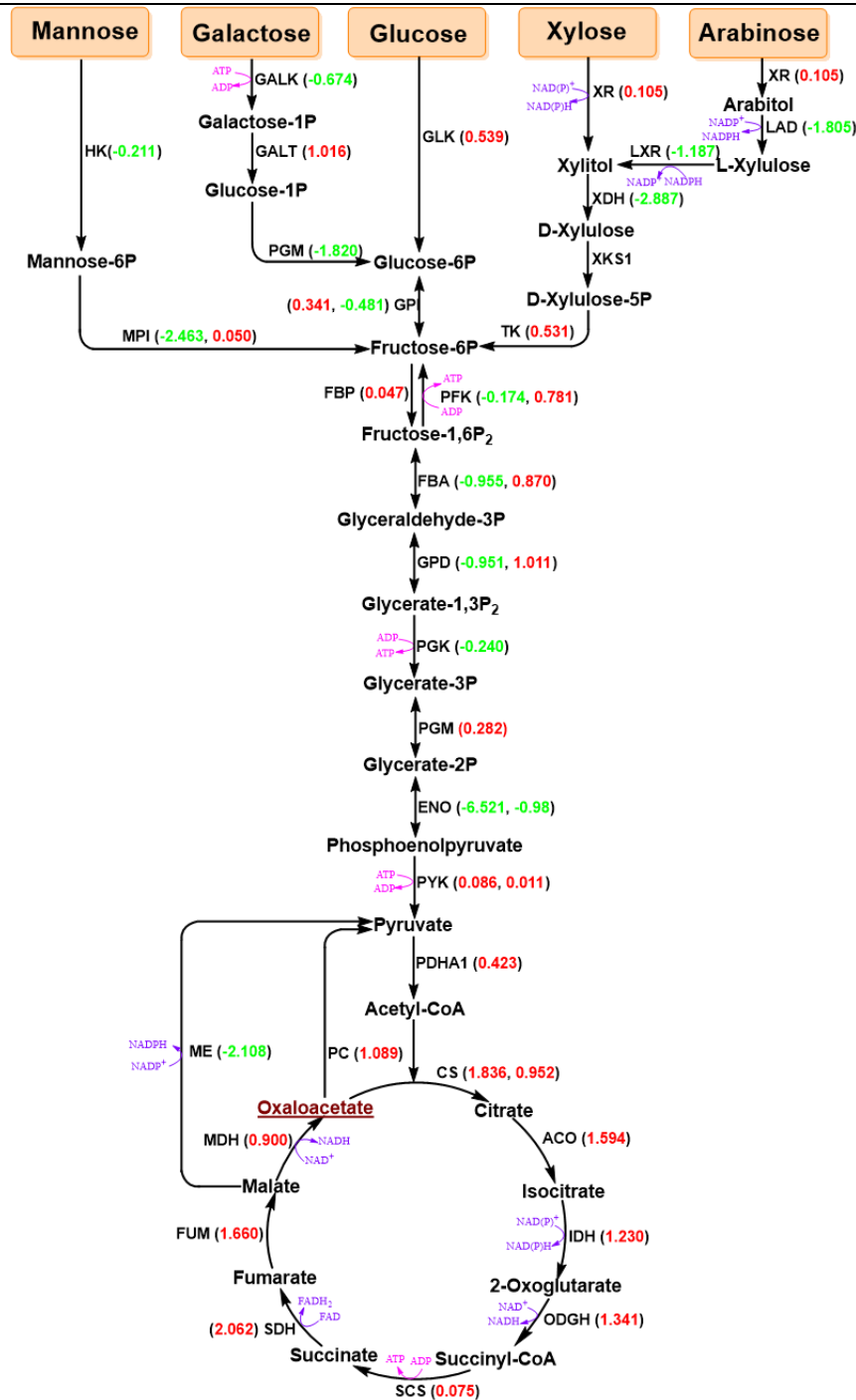


图 2.10 在有抑制物存在条件下的中心碳代谢途径
Fig. 2.10 The central carbon metabolism in the presence of inhibitors

此外，根据发酵结果可知，*P. variotii* FN89 在有抑制物存在的条件下，对葡萄糖和木糖的代谢滞后于抑制物的代谢，这表明 *P. variotii* FN89 具有在生物脱毒过程中保存底物中可发酵糖的潜力。因此我们进一步探究了在有混合抑制物存在情况下，包括五种糖（甘露糖、半乳糖、葡萄糖、木糖和阿拉伯糖）在内的糖酵解/糖异生途径以及 TCA 循环相关基因的转录水平变化（图 2.10）。

糠醛或 5-羟甲基糠醛可攻击细胞膜，干扰细胞内代谢^[157]。一旦进入细胞，其疏水基团会与胞内的多种底物结合，使这些胞内重要的酶失去与底物结合的能力，尤其是糖酵解途径中的酶^[158,159]。正如所预想的，在有抑制物存在的条件下，糖酵解途径总体上确实有了明显的抑制。HK 和 GALK 基因的下调，间接表明了在有抑制物存在的条件下 *P. variotii* FN89 对于甘露糖和半乳糖的摄取能力有所下降。

P. variotii FN89 在有抑制物的条件下还能正常生长，必定克服了抑制物对其生理代谢的抑制。对于胞内合成 ATP 的主要途径 TCA 循环，抑制物的添加并没有对其产生明显的抑制；相反的是，鉴定出的 TCA 循环中的基因上都呈现了上调的趋势，TCA 途径相关基因的上调表达，这既保证了细胞内 ATP 的供给，也保证了对抑制物代谢中间体的快速终极代谢。

2.3.4 *P. variotii* FN89 菌株在低 pH 下的代谢抑制物能力鉴定

菌株 *P. variotii* FN89 是在未经中和的酸预处理玉米秸秆中筛选得到，其环境 pH 大约在 2.3，推测菌株具有一定的耐受抑制物的能力。分别探究了菌株在不同 pH 下代谢六种主要木质纤维素来源抑制物的能力，结果如图 2.11 所示。抑制物的浓度分别设定为 4.0 g/L 乙酸、1.0 g/L HMF、0.6 g/L 糠醛、1.0 g/L 香草醛、1.0 g/L 丁香醛和 1.0 g/L 4-HBA，培养基的初始 pH 设定为 1.5-9.5 之间。培养 72 h 后测定其中的残糖、抑制物和菌体浓度，并检测发酵后的 pH。

在 72 h 培养后，有菌体生长的培养基 pH 相比于初始 pH 均有所下降，这表明 *P. variotii* FN89 在生长代谢过程中会产生酸性代谢产物使环境 pH 更低。除了乙酸，*P. variotii* FN89 对其余物种抑制物的耐受性较好。在初始 pH 1.5 的条件下，除了乙酸，均能实现对添加抑制物的完全或部分降解。低 pH 下乙酸的添加对 *P. variotii* FN89 的生长影响最大，当 pH 低于 3.5 时即完全阻碍了菌株的生长。菌株对糠醛和香草醛的代谢能力较强，在 pH 1.5 时也可以实现完全降解，且残余葡萄糖较少。

P. variotii FN89 除了对低 pH 的耐受性较好，在较高的 pH 下也能实现正常的菌体生长和抑制物代谢。当初始 pH 为 9.5 时，除 4-HBA 外均能实现对添加抑制物的完全降解，菌体生长未受到很大影响。较高的 pH 对添加了丁香醛和 4-HBA 的菌株糖代谢有所影响，残余葡萄糖明显上升。总的来说，*P. variotii* FN89 对于各类抑制物在较广泛的 pH 范围内均有良好的耐受性，其对某些抑制物的降解可以在初始 pH 为 1.5 的条件下正常进行。由于高粘度水解液通常存在着局部混合不均匀的情况，局部 pH 过高或过低，良好的 pH 耐受性有助于菌株在大规模工艺生产上的应用。

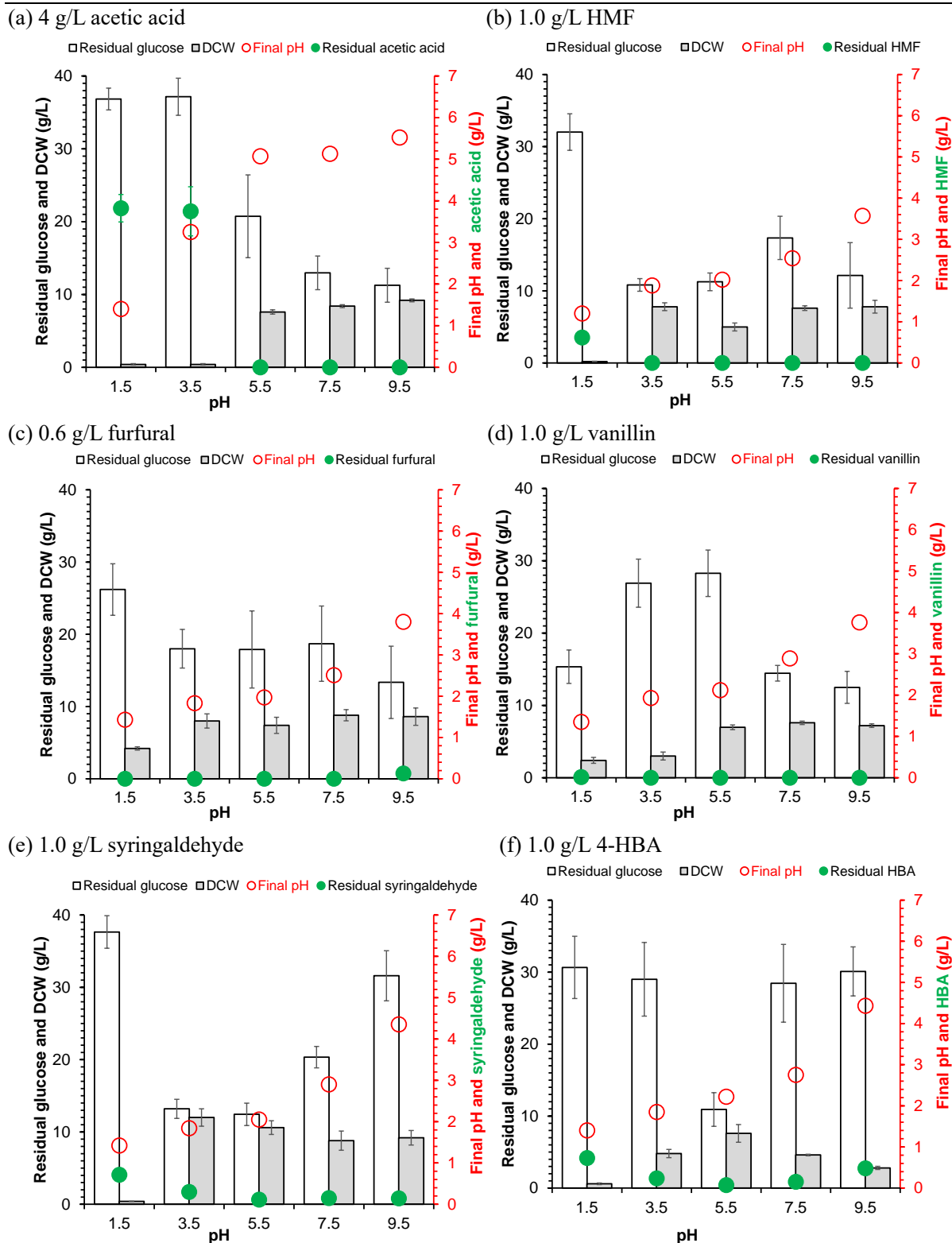


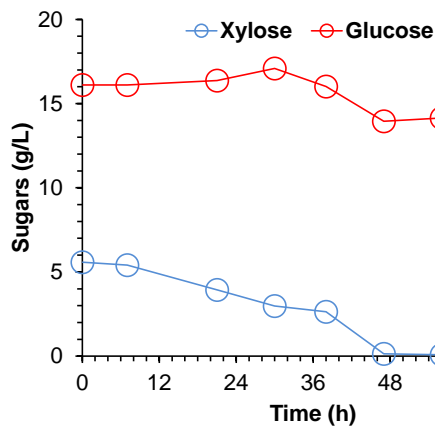
图 2.11 在不同初始 pH 下 *P. variotii* FN89 代谢各种抑制物的能力

Fig. 2.11 The inhibitors degradation by *P. variotii* FN89 at different initial pH. 4 g/L acetic acid (a); 1.0 g/L HMF (b); 0.6 g/L furfural (c); 1.0 g/L vanillin (d); 1.0 g/L syringaldehyde (e); 1.0 g/L 4-HBA (f)

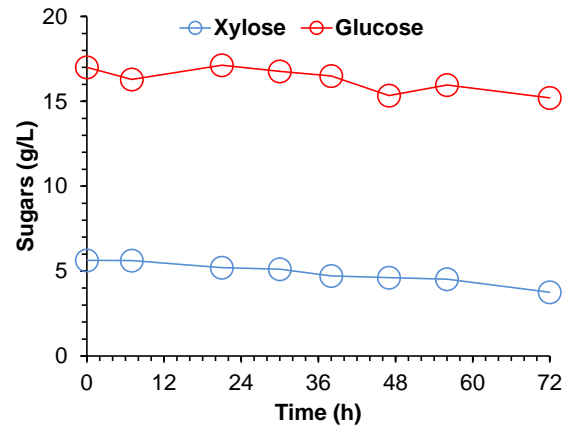
注：为了避免抑制物的高温分解或挥发，在所有的抑制物均是在 SM 培养基灭菌后添加。摇瓶发酵条件：SM 培养基中葡萄糖的浓度为 40 g/L。50 mL 装液量，250 mL 摇瓶，1% (w/w) 孢子液接种，200 rpm，37 °C，72 h。初始 pH 使用 2 M 硫酸或 5 M 氢氧化钠调节。

进一步在 3-L 生物反应器内对菌株 *P. variotii* FN89 在不同 pH 条件下的抑制物代谢能力进行了验证。由于在摇瓶实验内发现在 pH 1.5 的条件下添加乙酸对其生长代谢影响较大，因此本实验设定初始的 pH 分别为 4.5 和 2.5。分别添加了 2 g/L 乙酸、1 g/L HMF、0.6 g/L 糠醛、0.2 g/L 香草醛、0.2 g/L 丁香醛和 0.2 g/L 4-HBA 的混合抑制物。发酵结果如图 2.12 所示。在初始 pH 为 2.5 的条件下，乙酸的代谢较为缓慢，最终仍有 1.05 g/L 的乙酸剩余。pH 的降低对其他酚醛类抑制物的代谢没有显著影响，均能在 72 h 内实现完全的降解。低 pH 下的可发酵糖消耗较少，72 h 培养后仅有 10.5% 的葡萄糖和 33.5% 的木糖消耗，这在一定程度表明在低 pH 下的生物脱毒可能减少可发酵糖的损失。

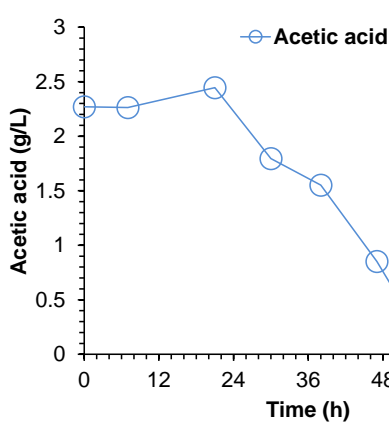
(a) Sugars consumption at pH 4.5



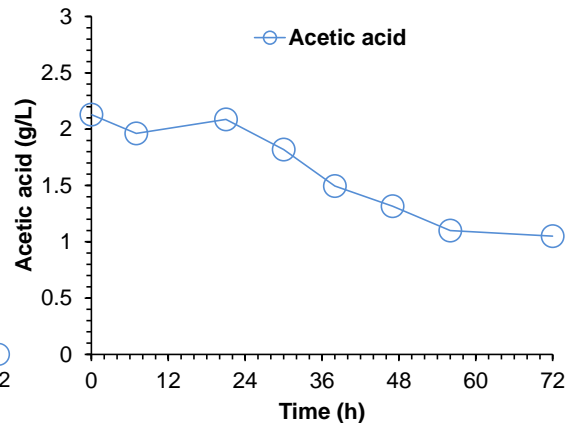
(b) Sugars consumption at pH 2.5



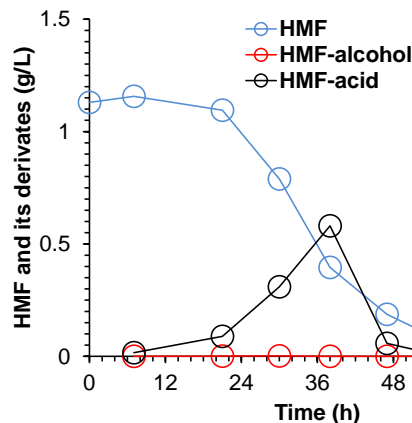
(c) Acetic acid degradation at pH 4.5



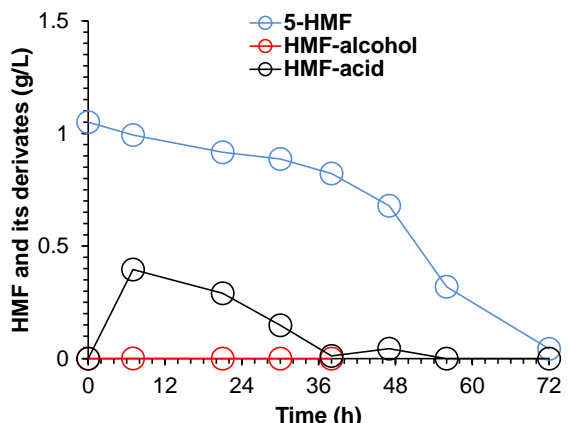
(d) Acetic acid degradation at pH 2.5



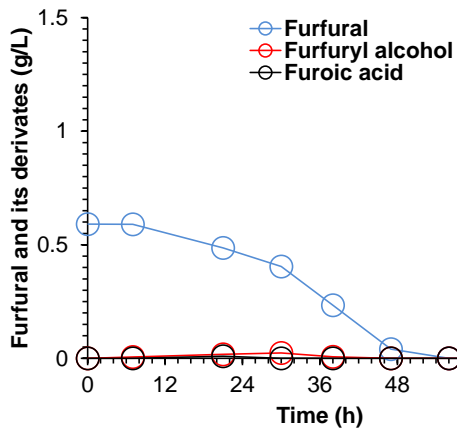
(e) HMF degradation at pH 4.5



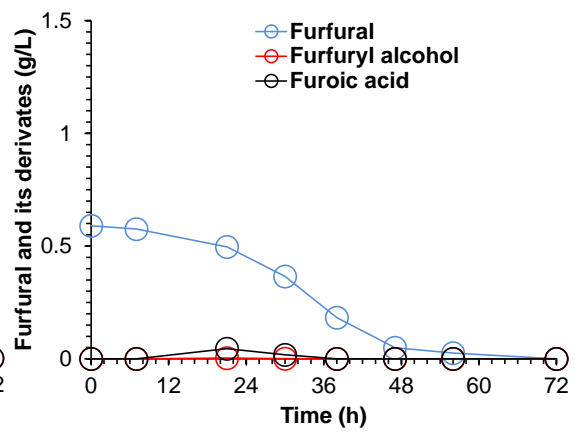
(f) HMF degradation at pH 2.5



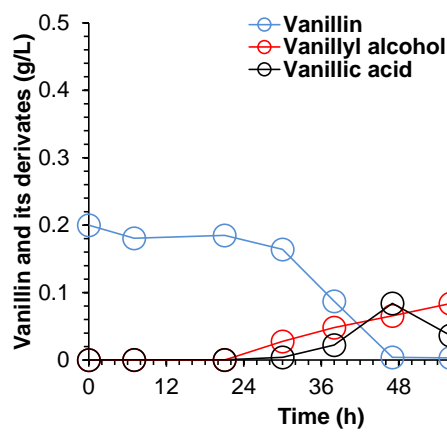
(g) Furfural degradation at pH 4.5



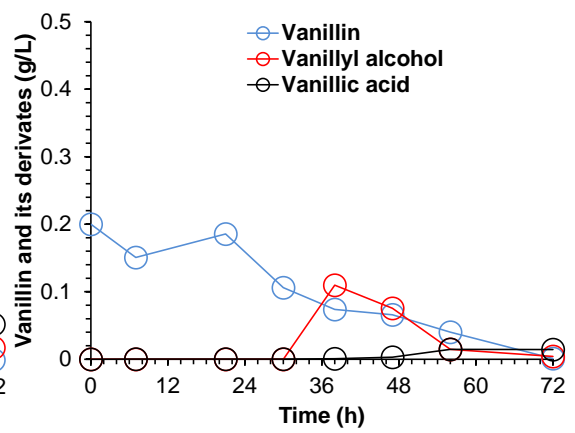
(h) Furfural degradation at pH 2.5



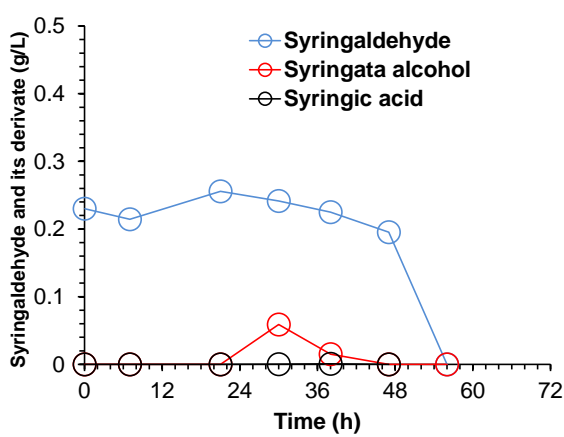
(i) Vanillin degradation at pH 4.5



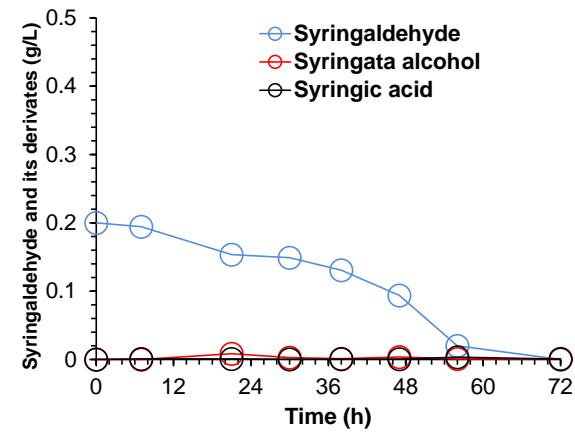
(j) Vanillin degradation at pH 2.5



(k) Syringaldehyde degradation at pH 4.5



(l) Syringaldehyde degradation at pH 2.5



(m) 4-HBA degradation at pH 4.5

(n) 4-HBA degradation at pH 2.5

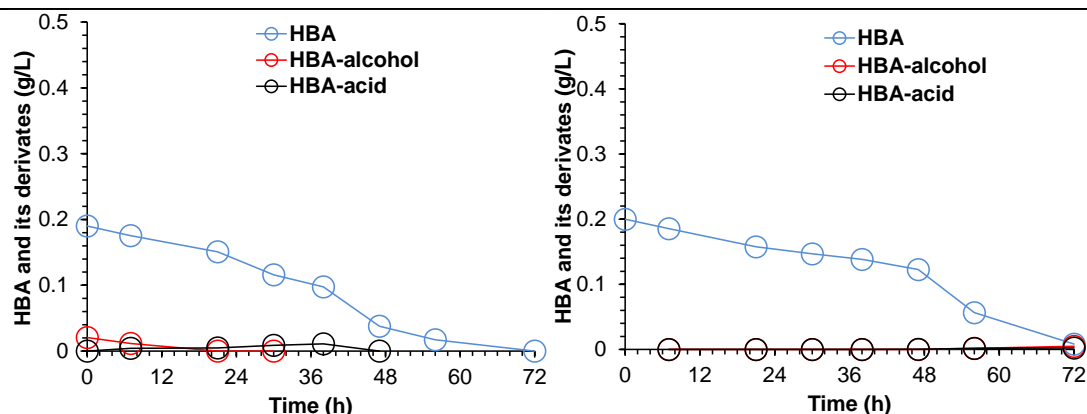


图 2.12 在 3-L 反应器内不同初始 pH 条件下 *P. variotii* FN89 对抑制物和糖的代谢情况

Fig. 2.12 The degradation profiles of sugars and inhibitors by *P. variotii* FN89 in 3-L fermentor with different initial pH (4.5 or 2.5). (a) Sugars consumption at pH 4.5; (b) Sugars consumption at pH 2.5; (c) Acetic acid degradation at pH 4.5; (d) Acetic acid degradation at pH 2.5; (e) HMF degradation at pH 4.5; (f) HMF degradation at pH 2.5; (g) Furfural degradation at pH 4.5; (h) Furfural degradation at pH 2.5; (i) Vanillin degradation at pH 4.5; (j) Vanillin degradation at pH 2.5; (k) Syringaldehyde degradation at pH 4.5; (l) Syringaldehyde degradation at pH 2.5; (m) 4-HBA degradation at pH 4.5; (n) 4-HBA degradation at pH 2.5.

注：为了避免抑制物的高温分解或挥发，在所有的抑制物均是在 SM 培养基灭菌后添加。所用 SM 培养基含有 15 g/L 葡萄糖、5 g/L 木糖、2 g/L 乙酸、1 g/L HMF、0.6 g/L 糠醛、0.2 g/L 香草醛、0.2 g/L 丁香醛和 0.2 g/L 4-HBA。发酵条件：接种量 1% (w/w) 孢子液、300 rpm、37 °C、72 h。发酵初始的 pH 分别使用 2 M 硫酸或 5 M 氢氧化钠调节至 2.5 或 4.5。

2.3.5 *P. variotii* FN89 生物脱毒菌株在低 pH 胁迫下的转录组分析

为了进一步探究 *P. variotii* FN89 耐受低 pH 的机制，在存在抑制物的情况下调节初始 pH 至 2.5，接种 *P. variotii* FN89 后以自然 pH 的 SM 培养基为对照进行转录组学分析。在 *P. variotii* FN89 中共鉴定出了 10096 个基因，调节 pH 至 2.5 后，上调 ($\log_2FC \geq 2.0$) 的基因有 644 个，下调 ($\log_2FC \leq -2.0$) 的基因有 429 个。为了更显著地表现出基因表达的差异性，将 $\log_2FC \geq 2.0$ 且 $P\text{-value} < 0.001$ 的基因定义为显著上调，共 282 个；而 $\log_2FC \leq -2.0$ 且 $P\text{-value} < 0.001$ 的基因定义为显著下调，共 217 个，相关结果如图 2.13 所示。相比于 2.3.3 在有无抑制条件下的转录组分析，pH 降低后上调的基因明显增多。

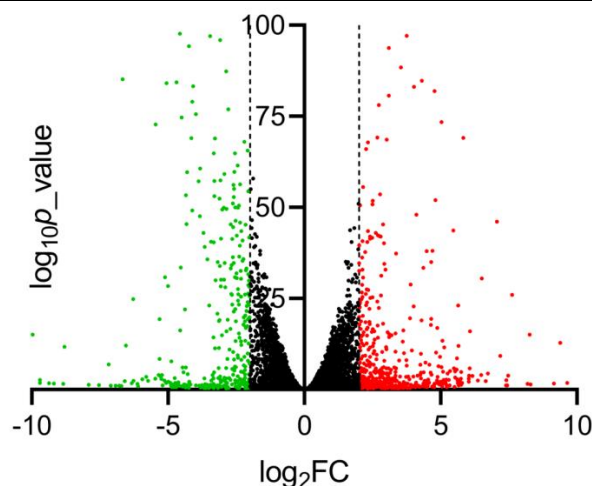


图 2.13 差异表达基因火山图

Fig. 2.13 The volcano plots of differentially expressed genes (DEGs).

进一步的 GO 富集分析将 DEGs 富集到 210 个条目中, 包括 70 个生物过程、70 个细胞组分和 70 个分子功能, 结果如图 2.14 所示。图形中红色部分表示显著变化基因 ($\log_2FC \geq 2.0$ 或 ≤ -2.0 , 且 $P\text{-value} < 0.001$)。在生物学过程中, 差异转录主要集中在胞内有机物代谢等; 在细胞组分中, 差异转录主要集中在膜的内在成分和膜的完整性上; 在分子功能中, 差异转录主要集中在蛋白催化活性及蛋白对底物的结合上。

KEGG 富集共涉及 70 条代谢途径, 结果如图 2.15 所示。KEGG 上具有明显表达变化的基因主要集中于碳代谢、糖酵解/糖异生、氨基酸合成代谢以及芳香族化合物的降解等途径上。由此可见在低 pH 下对菌株的糖代谢有着明显的影响。糖代谢与氨基酸相关的代谢变化可能与菌株耐酸有关。

首先对 *P. variotii* FN89 在低 pH 下的糖代谢途径 (糖异生/糖酵解和 TCA 循环) 进行了构建, 结果如图 2.16 所示。在低 pH 的糖异生/糖酵解途径的相关基因表达量呈现出了更明显的下调, 这也进一步表明在低 pH 下对可发酵糖的摄取和代谢能力减弱。在 TCA 循环中, 与柠檬酸和异柠檬酸代谢有关 ACO、IDH 和 OGDH 基因呈现出了上调趋势, 其他基因基本上都呈现了下调趋势。García-Quintáns 等人曾报道过, 低 pH 会诱导加速乳酸乳球菌 *Lactococcus lactis* 的柠檬酸盐转运和代谢^[160]。这种应激反应会使细胞外部介质碱化, 延长菌株在低 pH 发酵产品中的存活时间。

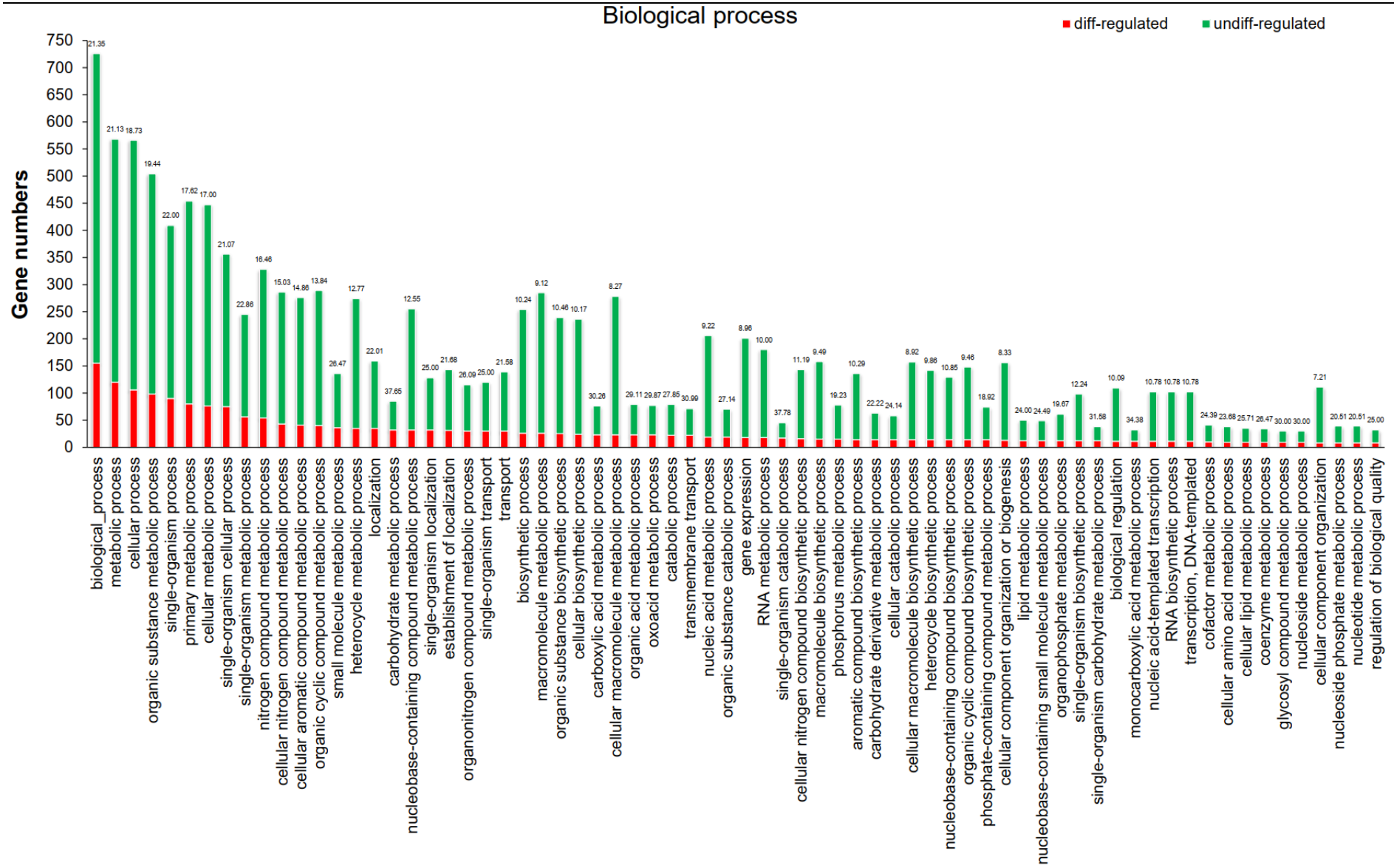
关于菌株的耐酸性研究主要集中于乳酸菌中。目前被广泛接受的乳酸菌耐酸机制主要包括质子泵、基因和蛋白质等大分子的保护和自我修复等^[161]。在质子泵理论中, H^+ -ATP 酶可以将胞内质子泵到胞外从而维持胞内的 pH 稳定。在所有的 H^+ -ATP 酶中 F1 型 ATP 酶可以利用电势进行 ATP 的合成, 从而可以在低 pH 环境下为细胞供能^[162]。F1 型 ATP 酶位于线粒体内。表 2.2 总结了所有在 *P. variotii* FN89 中解析到的 F1 型 ATP 酶及其在低 pH 下的表达量。所有的 F1 型 ATP 酶均呈现了上调的趋势。而相比之下, 主要存在于液泡内的 V 型 ATP 酶通过消耗胞内 ATP 来进行离子转运, 则基本呈现了下调的趋势。这表明在低 pH 下 *P. variotii* FN89 中的 F1 型 ATP 酶对维持胞内 pH 稳定和

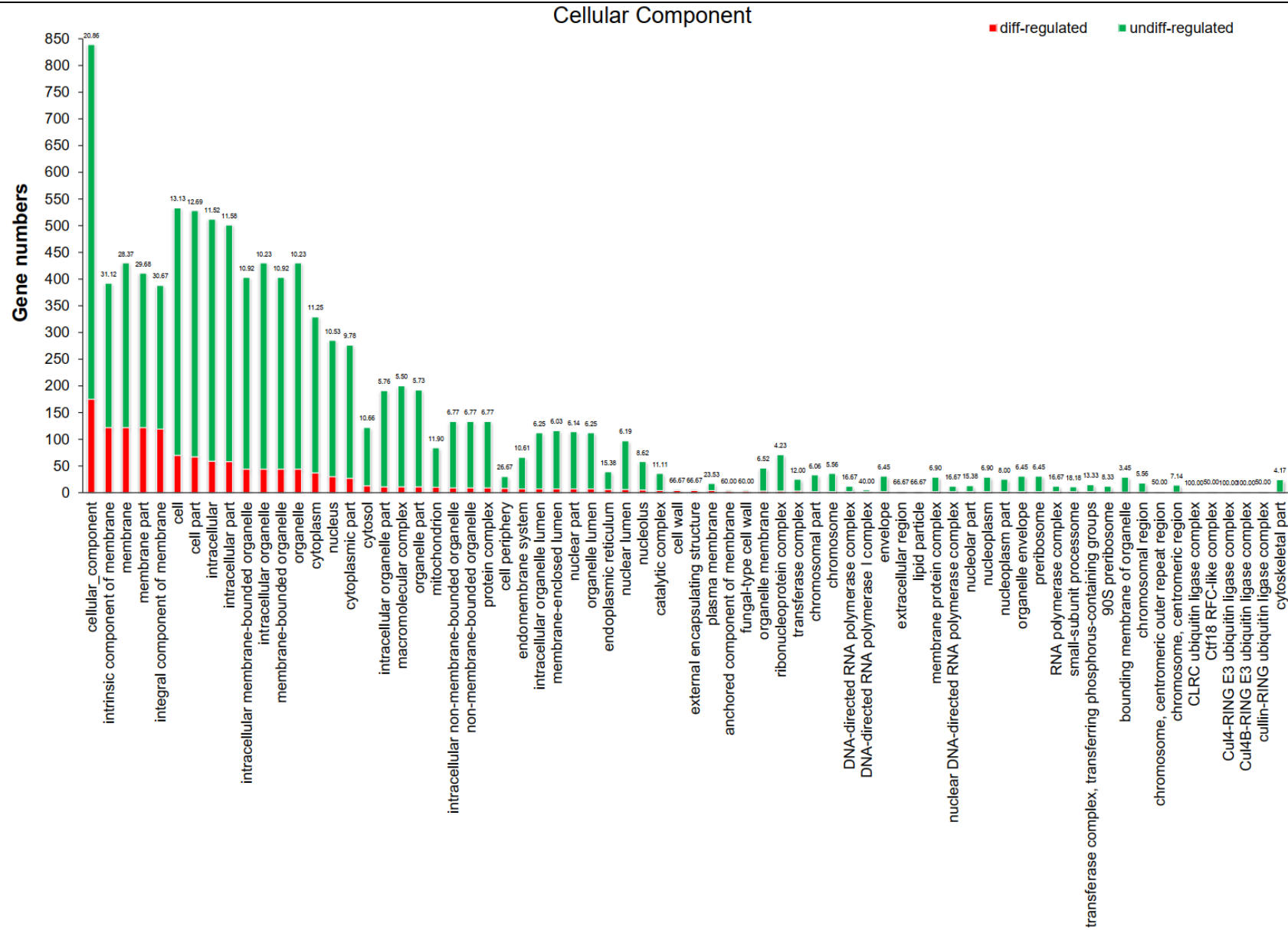
能量供应有着关键作用。

表 2.2 低 pH 下 *P. variotii* FN89 中的 F1 型和 V 型 ATP 酶基因表达量

Table 2.2 The genetic expressions of F1 type ATPase and V type genes in *P. variotii* FN89 at low pH

	Functional description	log ₂ FC
(a) F1 type ATPase		
Gene_924	Mitochondrial F1-F0 ATP synthase s	1.099
Gene_8198	gamma subunit of F0F1-type ATP synthase	1.022
Gene_7385	putative mitochondrial F1F0-ATP synthase g subunit	0.868
Gene_1640	putative F1F0 ATP synthase assembly protein Atp10	0.248
MSTRG.8979	putative F1F0 ATP synthase assembly protein Atp11	0.065
(b) V type ATPase		
MSTRG.5421	vacuolar ATP synthase subunit E	-0.978
MSTRG.7576	vacuolar ATP synthase 16 kDa proteolipid subunit hypothetical protein	-1.204
Gene_5496	vacuolar ATP synthase subunit H	-0.889
Gene_6842	putative vacuolar ATP synthase subunit D	-0.598
MSTRG.5918	vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	-0.471
Gene_1371	putative vacuolar ATP synthase subunit D	-0.306
Gene_5559	vacuolar ATP synthase subunit F	0.007
Gene_5481	vacuolar ATP synthase subunit C	-1.911





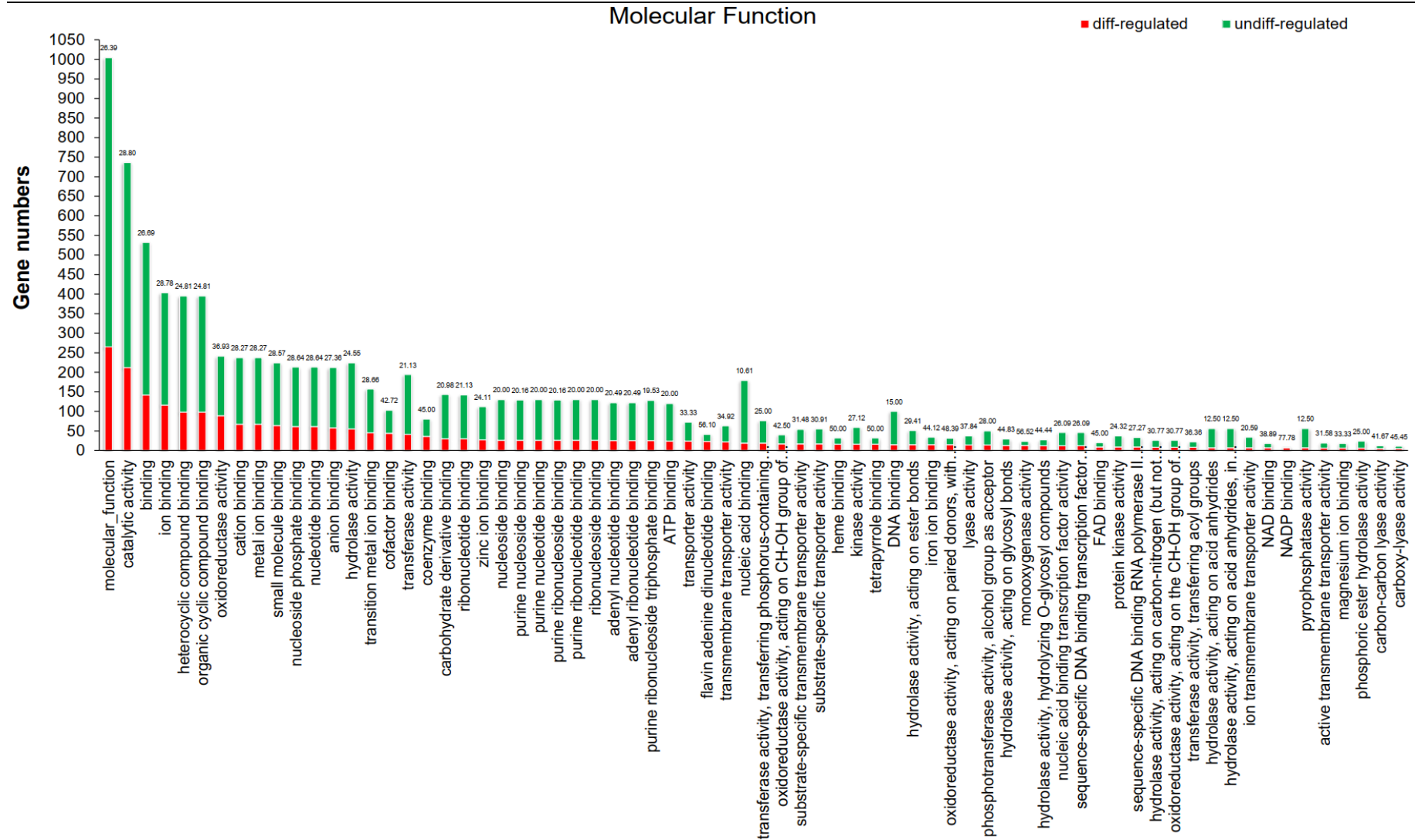


图 2.14 差异表达基因的 GO 富集分析

Fig. 2.14 Gene ontology enrichment of differentially expressed genes (DEGs)

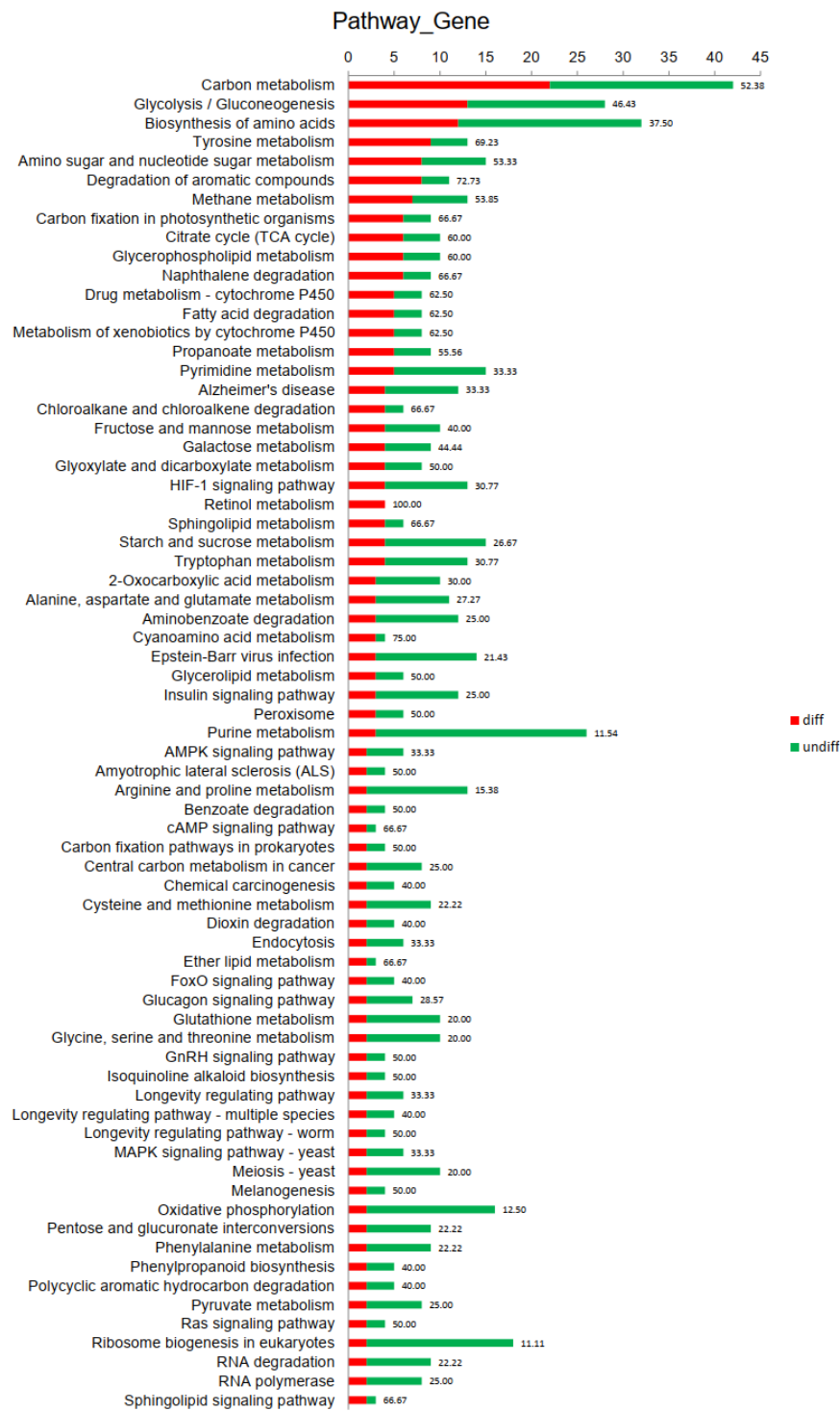


图 2.15 DEGs 编码蛋白的 KEGG 注释

Fig. 2.7 KEGG annotation of proteins encoded by DEGs.

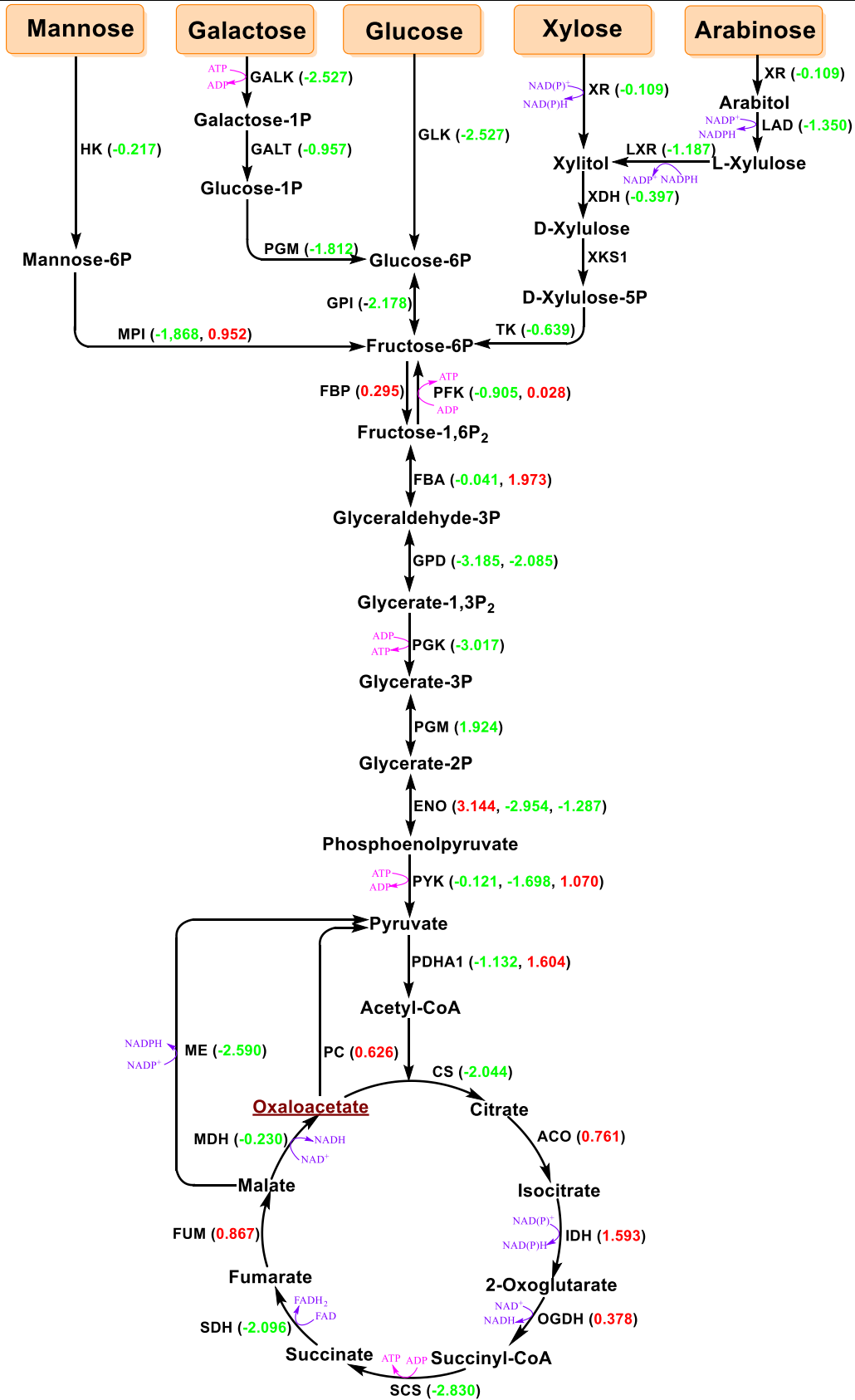


图 2.16 在有抑制物存在和低 pH 条件下的中心碳代谢途径
 Fig. 2.16 The central carbon metabolism in the presence of inhibitors at low pH

在酸性条件下，由于细胞内 DNA 容易发生脱嘌呤或者嘧啶，对自身的 DNA 进行修复也是提高菌株耐酸性的重要途径之一。Hanh 等人报道了一种 DNA 内切酶 AP 在低 pH 下有明显的活性，可以提高 *Streptococcus mutans* 菌株对外界恶劣环境的耐受性^[163]。在 *P. variotii* FN89 中同样鉴定出了一种 AP 内切酶，其表达量在低 pH 下也呈现了上升的趋势（表 2.3）。表中同时也整理了其他的 DNA 内切酶和外切酶基因表达量，也整体呈现出上升的趋势。

对大分子蛋白质的修复主要通过冷/热应激蛋白和分子伴侣来实现的^[164]。*P. variotii* FN89 中的冷/热应激蛋白在低 pH 下的表达没有明显趋势，因此未进行整理。蛋白质分子伴侣可以通过降解对细胞有毒害作用的蛋白维持蛋白质的天然空间构象和功能。表 2.3 同时展示了在低 pH 下线粒体内的蛋白质分子伴侣基因的表达量。鉴定出的 7 个线粒体内的蛋白质分子伴侣基因有 6 个在低 pH 下呈现了上升的趋势，这表明在低 pH 下维持 *P. variotii* FN89 线粒体内蛋白的稳定工作对抵抗低 pH 有重要作用。

综上所述，对 *P. variotii* FN89 在低 pH 下的转录组学分析可以看出，在低 pH 条件下糖代谢方式有所调整，其 ATP 倾向于通过 F1 型 ATP 酶产生，大分子 DNA 和线粒体内蛋白质的修复功能增强，有助于细胞对酸性环境的抵抗。

表 2.3 主要 DNA 修复酶和线粒体内蛋白质分子伴侣的表达量

Table 2.3 The genetic expressions of DNA repair enzymes and mitochondrial protein chaperones

	Functional description	log ₂ FC
(a) DNA reparation		
MSTRG.5245	AP endonuclease	0.158
Gene_6225	putative RNA exonuclease Rex2	-0.076
Gene_4274	exosome complex exonuclease Rrp4	-0.027
Gene_1935	putative exonuclease	0.020
Gene_3316	putative exonuclease Kem1	-0.877
Gene_5720	putative exosome complex exonuclease exoribonuclease	0.450
MSTRG.8243	exonuclease	0.536
Gene_799	endonuclease/exonuclease /phosphatase family protein	-0.424
Gene_6442	endonuclease/exonuclease /phosphatase	-0.355
Gene_4164	endonuclease/exonuclease /phosphatase family protein	1.245
(b) Mitochondrial chaperone		
Gene_5268	putative mitochondrial Hsp70 chaperone	0.072
Gene_1551	putative mitochondrial DnaJ chaperone	0.021
Gene_822	mitochondrial respiratory complex I chaperone	1.343
Gene_1803	putative mitochondrial co- chaperone GrpE	0.649
Gene_8882	putative mitochondrial chaperone BCS1	0.379
Gene_2991	putative mitochondrial chaperone bcs1	-0.536

2.4 本章小结

为了筛选得到抑制物代谢能力更强、环境适应性更好的生物脱毒菌株，本章节从未调节 pH 且未进行解毒的稀酸预处理玉米秸秆上分离筛选得到了一株全新的具有强大生物脱毒潜力的菌株，并鉴定为宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89。经过验证该菌株具有良好的抑制物代谢能力和耐受低 pH 的能力。本章节的主要研究结论如下：

(1) 新筛选分离的生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 具有代谢主要木质纤维素来源抑制物（主要为乙酸、5-羟甲基糠醛、糠醛、香草醛、丁香醛和 4-HBA）的能力，其抑制物代谢能力在低溶氧（0.5 vvm）条件下仍能有效保持。

(2) 在有抑制物条件下的转录组分析表明菌株糖酵解途径显著下调，其甘露糖和半乳糖代谢能力下降；TCA 循环中的基因上都呈现了上调的趋势，TCA 途径相关基因的上调表达，这既保证了细胞内 ATP 的供给，也保证了对抑制物代谢中间体的快速终极代谢。

(3) 新筛选分离的生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 同时具备耐受低 pH 条件的能力。在最低 pH（pH 1.5）条件下仍具有代谢抑制物的能力。

(4) 在有抑制物存在的低 pH 条件下的转录组分析表明，低 pH 条件下糖代谢方式有所调整，柠檬酸盐代谢加速；胞内 ATP 倾向于通过 F1 型 ATP 酶产生，大分子 DNA 和线粒体内蛋白质伴侣的修复功能增强，有助于细胞对酸性环境的抵抗。

第 3 章 木质纤维素生物质的类淀粉化生物转化

3.1 引言

干法生物炼制平台通过干式稀酸预处理和固态生物脱毒,基本形成了零废水条件下获得无抑制物、易水解木质纤维素原料的工艺,其转化指标、排放和能耗与玉米干法加工过程类似。但在实现木质纤维素类淀粉化的目标上,干式稀酸预处理所使用的无机强酸催化剂(如硫酸)的存在(3-5% DM)仍是一个重要难点,也是与淀粉最大的差异所在。这些无机酸必须在中和至 pH 接近 5-6 才能匹配后续的生物脱毒菌株和乙醇发酵菌株的 pH 耐受范围。当使用氢氧化钙中和硫酸时,会产生大量的固体废物,在木质素残渣燃烧发电时产生硫氧化物;当使用氢氧化钠、氢氧化钾或氨水作为中和剂时,会导致乙醇精馏后产生高浓度盐溶液,无法通过常规水处理系统解决^[165]。

解决这一问题的根本出路是使用可降解酸作为预处理催化剂,并在后续生物步骤将其彻底降解。实现这一目标需要做到:(1)预处理所使用的酸催化剂是具备生物可降解性的有机酸,且酸性强度须具备足够的木质纤维素解聚能力;(2)生物脱毒菌株必须具备在极低 pH 下酸催化剂降解能力;(3)生物脱毒菌种必须同时具备在极低 pH 值下同时降解全部预处理产生的抑制物的能力,且能有效保留可发酵单糖。

本章节以玉米干法加工技术为模板,通过可降解有机酸预处理催化剂和低 pH 生物脱毒技术,实现了木质纤维素生物质的类淀粉化转化,即在零废水、零抑制物和酸催化剂排放、低能耗和低糖损失的约束下,将木质纤维素生物质转化为与淀粉组成相近、易水解的固体碳水化合物颗粒。

3.2 材料与方法

3.2.1 菌株,培养基和培养环境

第二章分离得到的菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 (CGMCC 17665) 被用于在低 pH 下的生物脱毒。菌株的保存和培养见 2.2.1。

实验室之前分离得到的菌株树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 (CGMCC 7452C) 作为对照进行平板培养观察。菌株的保存和培养见 2.2.1。

引入木糖代谢途径和长期适应性进化得到的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 被用于纤维素乙醇的生产^[166]。*S. cerevisiae* XH7 的活化培养基为酵母膏脲葡萄糖(YPD)培养基,其具体成分包括 20 g/L 葡萄糖、20 g/L 蛋白脲和 10 g/L 酵母提取物。*S. cerevisiae* XH7 在 YPD 培养基中的培养条件为 30 °C, 180 rpm。*S. cerevisiae* XH7 乙醇发酵营养盐为 2 g/L 磷酸二氢钾、2 g/L 硫酸铵、1 g/L 硫酸镁和 10 g/L 酵母提取物。

3.2.2 酶和试剂

商业纤维素酶 Cellic Ctec 2.0 购自诺维信(北京),根据 NREL LAP-600 方法^[167,168]测得其滤纸酶活和纤维二糖酶活为 203 FPU/mL 和 4900 CNU/mL;根据 Bradford 方法

^[169]测得其蛋白含量为 87 mg/mL。

α -淀粉酶 HTAA 和糖化酶 GA-L NEW 购自杰能科（吉林），根据说明书，其酶活分别为 21,000 U/mL 和 103,900 U/mL。

所用二水合草酸试剂购自 Titan（上海）；酵母提取物购自 Oxoid（UK）；其他化学试剂购自国药集团（上海）。

3.2.3 丝状真菌快速抽提 DNA 方法

丝状真菌 DNA 快速抽提方法见 2.2.3。

3.2.4 *P. variotii* FN89 草酸代谢相关途径基因的扩增

以真菌 DNA 为模板进行的草酸代谢相关途径基因的扩增，具体引物如表 3.1 所示。

表 3.1 本章节所用到的引物

Table 3.1 Primers used in this chapter

Primers	Sequences (5'-3')
<i>fdh</i> -F	agaggttcggagaatctacttggt
<i>fdh</i> -R	cctgtcgtagtagtagttccctgta
<i>Oxo1</i> -F	cgcaatcgggatagagagaagc
<i>Oxo1</i> -R	cctccctccttcacaccacga
<i>Oxo2</i> -F	tacacataccatttcttaagcagg
<i>Oxo2</i> -R	atctcggcaatgggaaagg
<i>Oxo3</i> -F	cgataacaatagccacaatctccg
<i>Oxo3</i> -R	gacgggatgagacagagacaatagg

3.2.5 真菌孢子液收集

真菌孢子液收集方法见 2.2.3。

3.2.6 *P. variotii* FN89 摇瓶发酵

P. variotii FN89 摇瓶发酵方法见 2.26。

3.2.7 原始物料

所用小麦秸秆和玉米秸秆于 2018 年秋季收获自河南省南阳市。新收获的秸秆被自然晾干，然后粗切，水洗去除表面泥土和石块，空气干燥后粉碎并使用 10 mm 筛网分筛。根据 NREL 的两步酸解法测定秸秆中的主要成分^[170,171]。干小麦秸秆中含有 38.1% 纤维素、30.4% 木聚糖、17.2% 木质素和 7.7% 灰分；干玉米秸秆中含有 34.4% 纤维素、27.6% 木聚糖、18.2% 木质素和 7.4% 灰分。

玉米于 2019 年春季收获自吉林省长春市。玉米粒通过 60 目（孔径 0.3 mm）的筛粉机干磨成细玉米粉。玉米粉中的淀粉含量采用 Ewers 旋光法测定^[172]。通过两步液化-糖化方法去除其中的淀粉后，使用 NREL 酸解法测定其中的木聚糖含量。蛋白质含量测定见 3.2.2。经测定，干磨玉米粉中的淀粉含量为 78.2%，蛋白质含量为 14.6%，木聚糖含量为 1.8%。

3.2.8 预处理和生物脱毒

秸秆的预处理在带有螺带桨的 20L 预处理反应器内进行。1200 g 干物料和酸溶液按照 2:1 的质量比共同投入反应器内在 50 rpm 下搅拌 5 min。酸催化剂的用量为 24.8 mg/g 干物料的草酸或者 26.8 mg/g 的硫酸。酸溶液的水用量要去除物料中的含水量。随后通入热蒸汽, 保持温度在 175 °C 下持续 5 min。随后预处理物料从预处理反应器底部出料口排出。尽管物料吸收了所有的酸溶液以及蒸汽冷凝气, 但由于本身具有良好的吸湿性仍呈干固颗粒状态。随后预处理物料使用盘式粉碎机研磨去除其中残留的长纤维。这种预处理方法可以有效地处理各种农业废弃物, 如小麦秸秆、玉米秸秆、稻草、棉秆等。

对预处理物料采用固态生物脱毒的方法去除其中的糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸等抑制物。预处理在带有螺带桨的 15-L 生物反应器内进行。将新鲜的真菌孢子液接种于 200 g 预处理物料上, 接种量为 10^6 个孢子每克物料。随后在 37 °C 下静置培养, 每隔 24 h 喷洒少量清水, 直至灰黄色孢子长满整个物料表面, 时间大约为 3-5 天。按照 10% (w/w) 接种量不断扩培至二级种子, 用于生物反应器内的固态生物脱毒。生物反应器内的生物脱毒温度控制在 37 °C, 通气量为 1 vvm, 每 12 h 以 50 rpm 转速搅拌 5 min 使物料充分混合。整个脱毒过程不需要添加营养物质。

3.2.9 酶水解评价

将 1 g 干玉米粉加入 100 mL 摇瓶内, 加入去离子水配置 5% (w/w) 固体含量的混合液 20 mL。采用两步液化和糖化对玉米粉进行酶水解得率评价。添加 44 FPU/mL 的 α -淀粉酶 HTAA, 在 90 °C, 200 rpm 下液化 12 h。随后加入 200 FPU/mL 的糖化酶 GA-L NEW, 在 60 °C, 200 rpm 下水解 24 h。测定溶液中的葡萄糖浓度, 根据原始物料中淀粉含量计算酶水解得率。

脱毒物料的酶水解评价按照如下方法进行: 将 1 g 脱毒物料 (干重) 加入 100 mL 摇瓶中, 再加入 10 mL 去离子水。使用 5M 氢氧化钠溶液调节 pH 至 4.8。随后加入 0.1M 柠檬酸缓冲液配置 5% (w/w) 固体含量的混合液。加入 20 FPU/g 干物质的纤维素酶, 在 50 °C, 150 rpm 下水解 72 h。测定溶液中的葡萄糖含量, 根据脱毒物料中葡萄糖和纤维素的含量计算酶水解得率。

3.2.10 乙醇发酵

当以玉米粉为底物时, 采用分步水解和发酵 (SHF) 的策略生产乙醇。玉米粉首先进行两步的液化和糖化 (44 FPU/mL 的 α -淀粉酶 HTAA, 在 90 °C, 200 rpm 下液化 12 h; 以及 200 FPU/mL 的糖化酶 GA-L NEW, 在 60 °C, 200 rpm 下水解 24 h) 将其中的淀粉水解为游离葡萄糖。固体含量为 20% (w/v) 左右。酿酒酵母 *S. cerevisiae* XH7 甘油种首先在 20 mL YPD 培养基 30 °C, 180 rpm 下活化 12 h。将活化好的种子按照 10% (v/v) 的接种量接种于 5% (w/v) 固体含量的玉米粉水解液中。水解液中含有 *S. cerevisiae* XH7 乙醇发酵营养盐。一级种子的培养条件仍为 30 °C, 180 rpm, 12 h。继续按照 10% (v/v) 的接种量将一级种子接种于 10% (w/v) 固体含量的玉米粉水解液中, 30 °C, 180

rpm 培养 24 h, 制备二级种子。乙醇发酵在 1L 生物反应器内进行, 接种量为 10% (v/v), 温度为 30 °C, 搅拌为 200 rpm, 装液量为 700 mL。发酵过程的 pH 使用 5M 氢氧化钠自动添加控制在 5.5。

当以生物脱毒秸秆为底物时, 采用同步糖化与共发酵 (SSCF) 的策略生产乙醇。将活化好的种子按照 10% (v/v) 的接种量接种于 5% (w/v) 固体含量的秸秆水解液中, 30 °C, 180 rpm 培养 12 h。水解液中含有 *S. cerevisiae* XH7 乙醇发酵营养盐。继续按照 10% (v/v) 的接种量将一级种子接种于 10% (w/v) 固体含量的秸秆水解液中, 30 °C, 180 rpm 培养 24 h, 制备二级种子。制备种子液的秸秆水解液中纤维素酶的用量为 10 mg 蛋白/g 干物料。乙醇的 SSCF 在 5-L 带有螺带桨的生物反应器内进行, 装液量为 2.2 L 左右, 固体含量为 25% (w/w) 左右。物料首先在 50 °C, 150 rpm, 4 mg 蛋白/g 干物质酶用量下预糖化 12 h。随后按照 10% (w/w) 接种量接种二级种子, 在 30 °C, 150 rpm 下进行乙醇发酵。发酵过程的 pH 使用 5M 氢氧化钠自动添加控制在 5.5。纤维素乙醇得率按照 Zhang 和 Bao 的方法进行计算^[173]。

3.2.11 乙醇精馏

仅在实验室规模上对所得乙醇发酵液进行初步精馏。精馏系统配有换热器和螺旋冷凝器。精馏温度控制在 72-75 °C, 回流比为 2。所得精馏乙醇溶液中乙醇浓度为 54.9% (w/v)。在实际工业中, 还需要进行多次精馏并进一步脱水至 99.5% (w/w) 从而得到乙醇产品。精馏后发酵液, 在 8000 rpm 下离心 10 min。固液分离后得到发酵废液和发酵残渣。

3.2.12 元素浓度测定

元素含量通过电感耦合等离子体原子发射光谱法 (725 ICP-OES, Agilent) 进行测量。使用同步 CCD 检测器, 功率 1.2 千瓦, 等离子体气体流量 15 升/分钟, 辅助气体流量 1.5 升/分钟, 雾化器流量 0.75 升/分钟, 泵速 15rpm, 样品延迟时间 35 秒, 稳定时间 10 秒 (Han & Bao, 2018)。将 0.1 克含离子的固体或水解物与 3 毫升硝酸和 1 毫升高氯酸混合, 然后在电炉上煮沸 4 小时, 再将所有液体转移到烧瓶中, 用去离子水稀释到 25 毫升后用于检测。

3.2.10 残渣热值测定、废水 COD 测定

发酵残渣和废液寄送至凯思普科技有限责任公司 (上海) 进行分别热值和 COD 的测定。残渣热值测定按照国标 GB/T 213-2008 方法测定; 废水 COD 按照国标 HJ 828-2017 测定。

3.2.11 分析方法

葡萄糖、木糖、乙酸、乙醇、5-羟甲基糠醛、糠醛、香草醛、丁香醛、4-HBA 及其相应的醇、酸类衍生物按照 2.2.10 所述方法测定。

草酸的测定由配备了 HPX-87H (Bio-rad Aminex) 柱和 UV 检测器 (SPD-20A) 的 Shimadzu (日本) 的 HPLC 系统测定。紫外检测波长设定为 210 nm。进样量为 20 μ L,

检测温度为 55 °C，流动相为 5 mM 硫酸溶液，流速为 0.4 mL/min。

3.3 结果与讨论

3.3.1 生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 与 *Amorphotheca resiniae* ZN1 的比较

实现木质纤维素生物质的完全类淀粉化的一个关键环节是通过生物降解的方式同步脱除预处理过程中的抑制物和酸催化剂。已有的生物脱毒菌株 *Amorphotheca resiniae* ZN1 只能在接近中性的 pH 条件完成生物脱毒，而在中性 pH 下酸催化剂已经被中和形成水不溶性钙盐沉淀，对不溶性钙盐的生物降解已基本不可能。实现木质纤维素生物质预处理后的抑制物和酸催化剂的同步降解，必须使用一种能在极低 pH 下的同时降解酸催化剂以及全部预处理产生的抑制物的生物脱毒菌株，且能有效保留可发酵单糖。

P. variotii FN89 是在未经中和处理的干固颗粒形态的干酸预处理玉米秸秆原料中分离出的一株新筛选的能够耐受低 pH 的生物脱毒菌株。经过验证，*P. variotii* FN89 具备在低 pH 和低溶氧下有效代谢木质纤维素来源抑制物。分别在正常 pH 5.2 和低 pH 2.3 合成培养基平板上添加 1 g/L 糠醛、2 g/L HMF 和 2 g/L 乙酸对 *P. variotii* FN89 和模式脱毒菌株 *A. resiniae* ZN1 进行点板培养（图 3.1）。经过观察表明 *P. variotii* FN89 的生长速率明显高于 *A. resiniae* ZN1，表明 *P. variotii* FN89 对抑制物和低 pH 的耐受性更好。

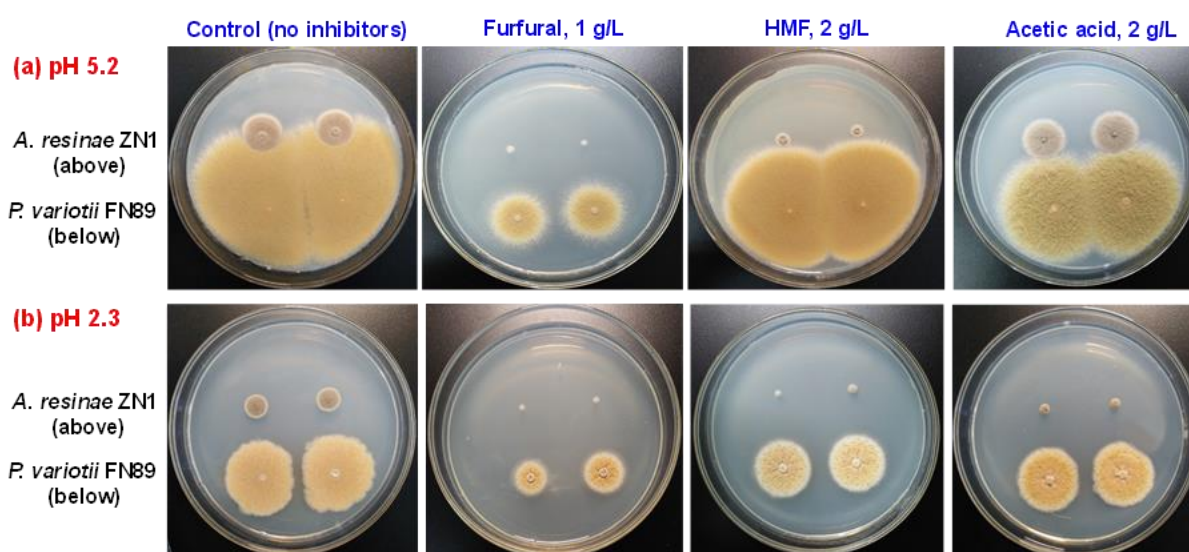


图 3.1 宛氏拟青霉 *P. variotii* FN89（下方）和树脂枝孢霉 *A. resiniae* ZN1（上方）在不同 pH 和抑制物条件下的生长状况

Fig. 3.1 Growth performance of *P. variotii* FN89 (below) and *A. resiniae* ZN1 (above) on synthetic medium gels containing different levels of inhibitors at normal pH (a) and low pH (b) at 37 °C for 96 h.

注：每个菌落最初由 10^4 个孢子培养而成。正常 pH 5.2 为 SM 培养基的初始 pH；用 1 M 硫酸调节 SM 培养基 pH 至 2.3。

3.3.2 可生物降解催化剂的选择

常规的稀酸预处理采用硫酸作为预处理催化剂，由于硫酸难以降解且模式脱毒菌株

A. resinae ZN1 无法耐受低 pH，需要对硫酸进行中和。钙盐（如氢氧化钙、碳酸钙）是目前常用的中和剂。中和生成的硫酸钙作为沉淀与木质素发酵残渣共同被用于焚烧发电。硫酸钙的存在降低了木质素残渣燃烧效率，同时存在硫氧化物逸出的风险。为了避免中和剂的使用形成额外污染物流，寻找到一种可被生物降解的酸催化剂是有效的手段之一。

表 3.2 选择了 6 种典型的具备作为可降解预处理催化剂潜力的有机强酸，包括丙二酸、马来酸、富马酸、琥珀酸、草酸和柠檬酸，按照 2 g/L 的浓度添加至 SM 培养基中（SM 培养基中不含有可发酵糖）。以上述有机酸为唯一碳源的合成培养基初始 pH 均能降低到 3.5 以下；其中草酸酸性最强，其 pH 最低为 2.3。培养 48 h 后，除添加丙二酸和马来酸的 pH 未发现明显升高外，添加富马酸、琥珀酸、草酸和柠檬酸的培养基 pH 均大幅提升至 5.0 以上；同时，以这些有机酸为唯一碳源，观察到菌株均有不同程度的生长，这表明富马酸、琥珀酸、草酸和柠檬酸可以作为碳源用于 *P. variotii* FN89 的生长。并且由于酸的消耗，造成了培养基 pH 的上升，因而这些有机酸具有作为可生物降解类型的酸预处理催化剂的潜力。为了保证在酸预处理过程中木质纤维素的解聚效果，选取了其中酸性最强的草酸进行进一步探究。

表 3.2 *P. variotii* FN89 以游离有机酸为唯一碳源的生长情况

Table 3.1 Growth behavior of *P. variotii* FN89 with free organic acids as sole carbon source

	Maleic acid	Malonic acid	Oxalic acid	Fumaric acid	Citric acid	Succinic acid
Microbial growth	-	-	+	++	+++	+++
Initial pH	2.4	2.7	2.3	2.8	3.1	3.4
Ending pH	2.4	2.7	5.6	5.6	5.2	5.6

注：“+++”表示细胞生长极好；“++”表示细胞生长良好；“+”表示细胞正常生长；“-”表示没有细胞生长。培养条件：接种量 10% (v/v)，37 °C，200 rpm，48h。

目前已经报道的微生物中草酸代谢途径共 4 条^[174]。在单子叶植物大麦等中，草酸通过草酸氧化酶（oxalate oxidase）直接降解成二氧化碳和过氧化氢；在枯草芽孢杆菌及某些真菌中草酸通过草酸脱羧酶（oxalate decarboxylase）催化生成甲酸，并进一步通过甲酸脱氢酶（formate dehydrogenase）降解成二氧化碳和水；在双子叶植物如拟南芥、苜蓿，或者酿酒酵母中，草酸先通过草酰辅酶 A 合成酶（oxalyl-CoA synthetase）生成草酰辅酶 A，进一步通过草酰辅酶 A 脱羧酶（oxalyl-CoA decarboxylase）生成甲酰辅酶 A，在甲酰辅酶 A 水解酶（formyl-CoA hydrolase）作用下生成甲酸，最终通过甲酸脱氢酶降解成二氧化碳和水；在某些需氧细菌如 *Alcaligenes oxalaticus*、*Thiobacillus novellus*，某些厌氧细菌如假单胞菌、产甲酸草酸杆菌中，草酸先通过草酰辅酶 A 合成酶（oxalyl-CoA synthetase）生成草酰辅酶 A，进一步通过草酰辅酶 A 脱羧酶（oxalyl-CoA decarboxylase）生成甲酰辅酶 A，通过甲酰辅酶 A 转移酶（formyl-CoA transferase）生成甲酸和二氧化碳。在 *P. variotii* FN89 基因组中对上述所基因进行扩增，共鉴定出一个甲酸脱氢酶（FH）和 4 个草酸脱羧酶（OD）。在 *P. variotii* FN89 中草酸的降解途径如图 3.2 所示。

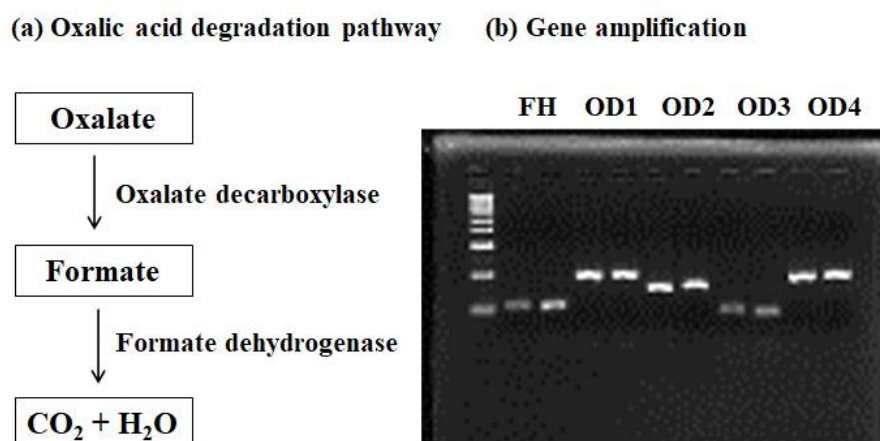
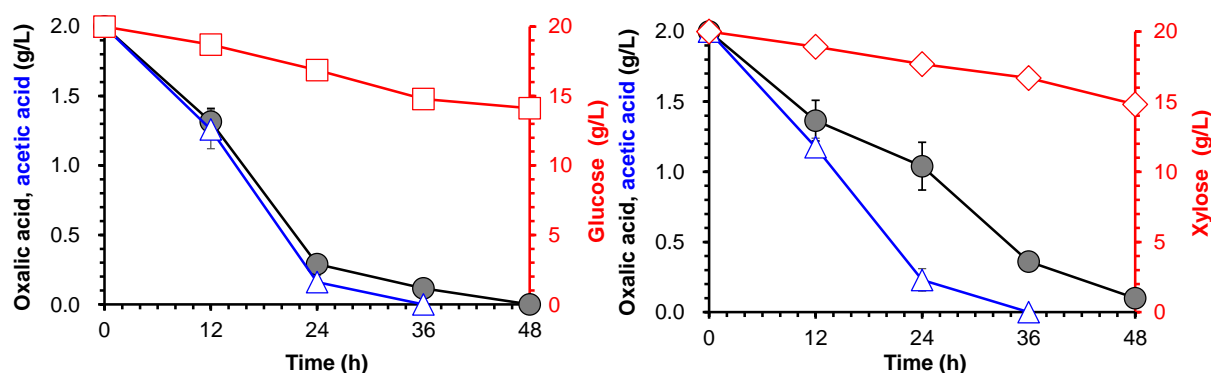


图 3.2 *P. variotii* FN89 中草酸代谢途径及相关基因的扩增

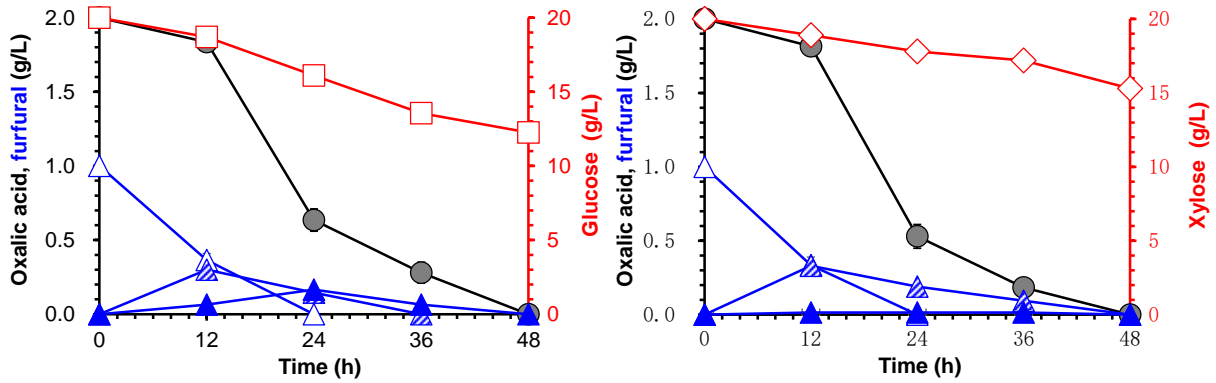
Fig. 3.2 Oxalic acid degradation pathway in *P. variotii* FN89 (a) and amplification of related genes (b).

由于酸预处理后物料中含有大量游离木糖和少量葡萄糖，脱毒菌株在大量可发酵糖存在的情况下，降解抑制物和草酸的能力以及与糖共存时的优先利用顺序需要进一步验证。如图 3.3 所示，在摇瓶内探究了在有葡萄糖和木糖存在的情况下，*P. variotii* FN89 同时代谢糖类、抑制物和草酸的情况。分别选择了木质纤维素来源的乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛、香草醛和丁香醛作为研究对象，分别添加到含有 2 g/L 草酸，20 g/L 葡萄糖或木糖的 SM 液体培养基中。结果表明，培养基中所有的草酸和抑制物均在 48 h 内被 *P. variotii* FN89 降解（香草酸除外，降解时间为 60 h）。当每种抑制物降解至一半时，培养基中的葡萄糖和木糖仍能保留 90% 以上，这表明即使在草酸存在的情况下，*P. variotii* FN89 仍具有优先于可发酵糖代谢抑制物的能力。所探究的酚醛类抑制剂（糠醛、羟甲基糠醛、香草醛和丁香醛）先将降解成相应的低毒性中间代谢物醇和酸，最终进入中心代谢途径。具有生物可降解性的草酸催化剂和耐受低 pH 的生物脱毒菌株为实现木质纤维素原料转化为干净的类淀粉生物质提供了必要的工具。

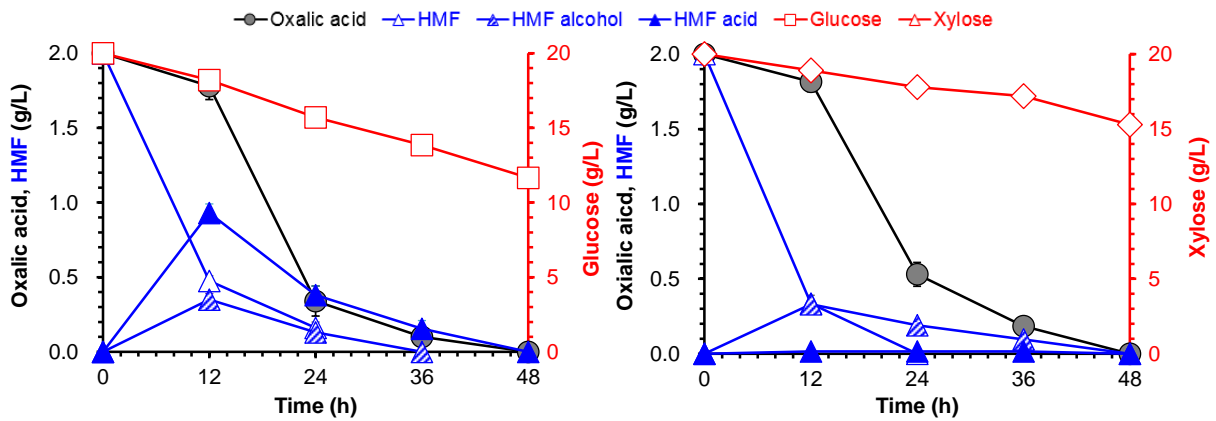
(a) Oxalic acid degradation with acetic acid and glucose or xylose



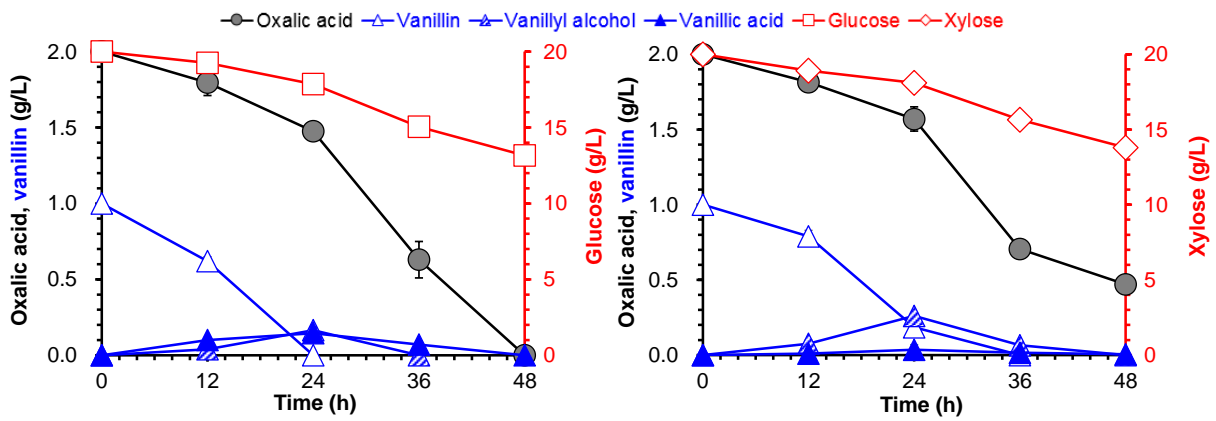
(b) Oxalic acid degradation with furfural and glucose or xylose



(c) Oxalic acid degradation with HMF and glucose or xylose



(d) Oxalic acid degradation with vanillin and glucose or xylose



(e) Oxalic acid degradation with syringaldehyde and glucose or xylose

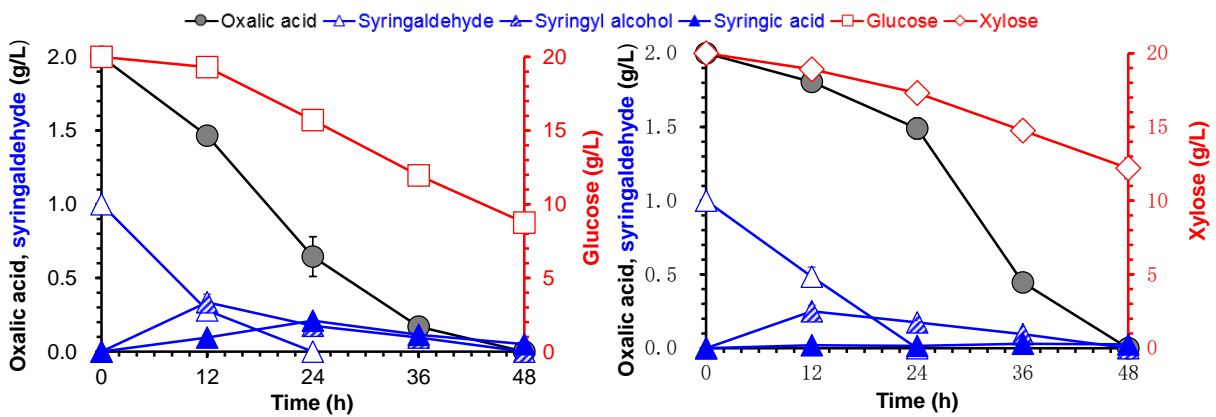


图 3.3 *P. variotii* FN89 在低 pH (2.3) 条件下对抑制物、可发酵糖、抑制物的同时生物降解情况
 Fig. 3.3 Simultaneous biodegradation of inhibitors and oxalic acid catalyst by *P. variotii* FN89 at low pH 2.3. The synthetic medium contained 2 g/L oxalic acid, 20 g/L glucose or 20 g/L xylose, and (a) 2 g/L acetic acid, (b) 1 g/L furfural, (c) 2 g/L HMF (d) 1 g/L vanillin, or (e) 1 g/L syringaldehyde as carbon source.

注：由于加入了草酸，SM 培养基的初始 pH 为 2.3。发酵在 250 mL 摇瓶内进行，每个摇瓶装液量为 50 mL。培养条件为 37 °C，100 rpm，60 h。每个实验有三个重复，误差棒表示标准误差。

3.3.3 草酸预处理及低 pH 生物脱毒

选择两种典型的农作物木质纤维素生物质，小麦秸秆和玉米秸秆，在高固体含量下以草酸作为催化剂进行了预处理。随后在低 pH (不中和) 条件下使用脱毒菌株 *P. variotii* FN89 进行固态脱毒。以常规硫酸预处理进行对照。

表 3.3 为草酸和硫酸分别作为催化剂预处理小麦秸秆和玉米秸秆的结果。以两种催化剂进行稀酸预处理的原料组成变化和趋势相似：大部分的木聚糖被水解，而纤维素含量基本保持不变。草酸作为催化剂的预处理产生了更少的抑制物（糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸）。本研究采用的是干酸预处理的方式，在高固体含量下，原料吸收了所有的酸溶液和冷凝水，所有抑制物组分均积累到预处理物料。预处理原料仍处于固体颗粒状态，且整个预处理过程没有任何废水产生。

表 3.3 预处理小麦秸秆和玉米秸秆的主要组成

Table 3.3 Compositions of the pretreated wheat straw and corn stover

Feedstock	Catalyst dosage (%, w/w)*	Compositions (mg/g DM)				
		Cellulose	Xylan	Furfural	HMF	Acetate
Wheat straw	H ₂ SO ₄ , 2.68	326.5 ± 11.2	2.6 ± 1.1	3.3 ± 0.4	1.4 ± 0.1	15.2 ± 2.8
	Oxalic acid, 2.48	321.6 ± 13.1	3.5 ± 1.6	1.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	5.2 ± 0.4
Corn stover	H ₂ SO ₄ , 2.68	335.2 ± 4.8	1.7 ± 1.3	5.2 ± 0.2	7.1 ± 0.4	22.1 ± 0.1
	Oxalic acid, 2.48	358.3 ± 17.3	4.4 ± 1.8	1.9 ± 0.3	1.6 ± 0.4	18.6 ± 0.5

注：草酸和硫酸用量按照 Han 的方法确定。

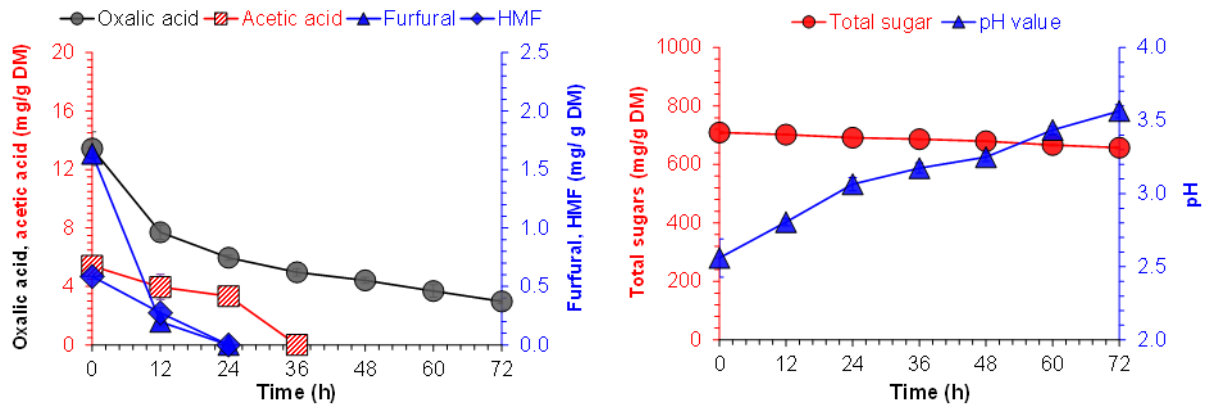
在接下来的使用 *P. variotii* FN89 的固态生物脱毒步骤中，预处理小麦秸秆和玉米秸秆不添加碱性中和剂和营养物质，直接对其中的抑制物和草酸催化剂同时进行生物降解。如图 3.4 所示，麦秆和玉米秸秆中草酸的初始浓度分别为 13.43 ± 1.17 和 15.43 ± 1.12 mg/g DM，这明显低于酸用量，可能是由于在高温预处理过程中部分草酸被分解为水、一氧化碳和二氧化碳。经过 72 h 培养后，草酸预处理后麦秆和玉米秸秆中所有的抑制物全部被代谢且未添加营养物质。麦秆和玉米秸秆中最终仅有 2.97 ± 0.14 和 2.97 ± 0.13 mg/g DM 的草酸剩余。并且随着草酸和乙酸的降解，物料的 pH 也逐渐上升至接近 4.0。在整个 72 h 的固态生物脱毒过程中，小麦秸秆和玉米秸秆中的糖损失分别为 7.2% 和 10.5%。

值得注意的是，对于小麦秸秆的生物脱毒过程，所有的乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛均在 36 h 完全降解。此时 63.0% 的草酸被同时降解。进一步延长脱毒时间至 72 h，草酸

含量虽然在不断减少, 但仅仅只降解了 $1.99 \pm 0.12 \text{ mg/g DM}$, 糖却损失了 $28.98 \pm 1.88 \text{ mg/g DM}$ 。从经济性上考虑, 控制小麦秸秆的脱毒时间为 36 h 或许是一个更好地选择, 此时的糖损失仅为 3.2%。玉米秸秆的脱毒过程与麦秆相似, 48 h 时所有抑制物被均被降解, 并且草酸仅剩余 $4.91 \pm 0.09 \text{ mg/g DM}$, 继续进行脱毒会造成较多的糖损失, 因此选择脱毒过程为 48h, 此时的糖损失为 5.3%。

使用 *P. variotii* FN89 在低 pH 下的生物脱毒过程, 有效降解了草酸预处理的小麦秸秆和玉米秸秆中的抑制物和大部分草酸催化剂。脱毒生物质只需要轻微调节 pH 即可进行酶解、糖化和发酵。剩余草酸 (约 5 mg/g DM) 中和生成的不溶性草酸钙盐最终混合到木质素残渣中作为固体燃料焚烧发电^[131]。在这种高温燃烧的情况下, 草酸钙被分解为碳酸钙和二氧化碳^[175]; 有效防止了硫酸作为催化剂时, 中和后硫酸钙高温分解为大量硫氧化物。

(a) Wheat straw: biodegradation of inhibitors and oxalic acid catalyst



(b) Corn stover: biodegradation of inhibitors and oxalic acid catalyst

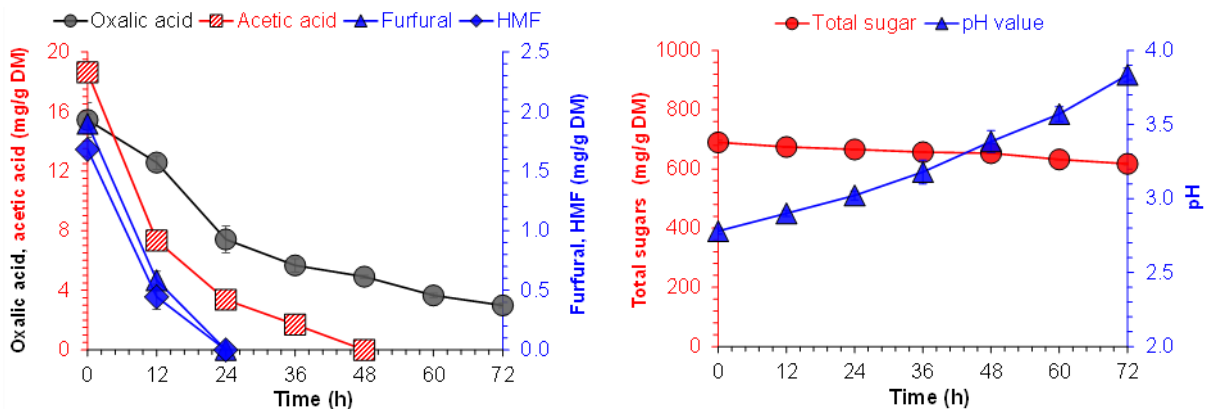


图 3.4 *P. variotii* FN89 对草酸预处理小麦秸秆和玉米秸秆的固态生物脱毒

Fig. 3.4 Biotoxification of oxalic acid pretreated wheat straw and corn stover by *P. variotii* FN89. (a) Total sugar consumption, pH value change, inhibitors biotoxification and oxalic acid degradation of pretreated wheat straw. (b) Total sugar consumption, pH value change, inhibitors biotoxification and oxalic acid degradation of pretreated corn stover.

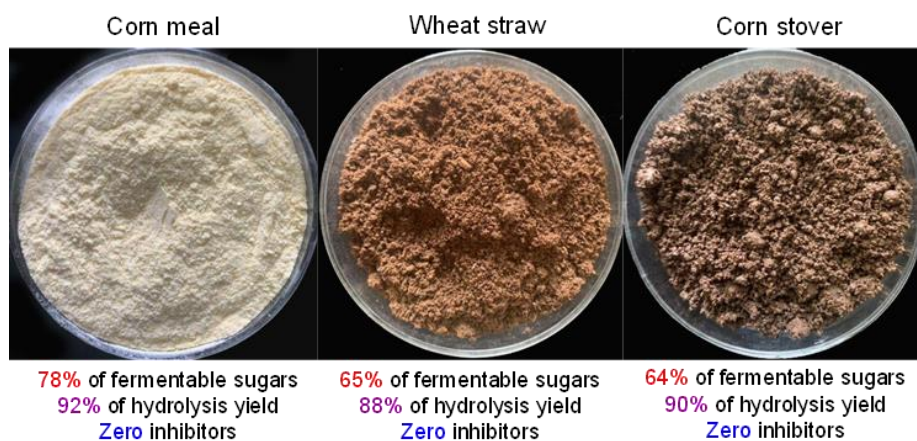
注: 整个脱毒过程不调节 pH 且不添加营养物质。总糖包括纤维素、木聚糖、低聚糖、葡萄糖和木糖。脱毒条件: 15-L 带有螺带桨的生物反应器, 37°C , 1 vvm, 每 12 h 以 50 rpm 搅拌 5 min。

3.3.4 类淀粉生物质的表征

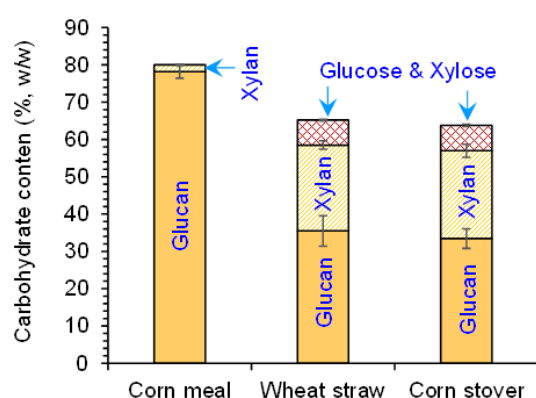
对经过草酸预处理和低 pH 生物脱毒得到的小麦秸秆和玉米秸秆在形态、组成、酶解得率和乙醇发酵性能方面与干磨玉米粉进行了比较。如图 3.5 a, 从外观形态来看, 生物脱毒后小麦秸秆和玉米秸秆均为棕色干固颗粒形态, 类似于干磨玉米粉。从碳水化合物含量来看(图 3.5 b), 脱毒小麦秸秆和玉米秸秆分别总共含有 $65.2 \pm 5.4\%$ 和 $63.8 \pm 4.7\%$ (w/w, dry base) 的单糖(包括葡萄糖和木糖)、葡聚糖(包括纤维素和葡寡糖)和木聚糖(包括木聚糖和木寡糖), 比玉米粉中葡聚糖(淀粉)含量的 $78.2 \pm 1.8\%$ (w/w, dry base) 略低 20%左右。这主要是由于木质纤维素本身的不可发酵的灰分和纤维素组分的存在。从酶水解得率来看(图 3.5 c), 生物脱毒小麦秸秆和玉米秸秆中接近 90%的多糖在正常条件下可被商业纤维素酶水解成可发酵糖, 这与玉米粉经液化和糖化的酶水解得率类似。

进一步测定了脱毒小麦秸秆和玉米秸秆中钠、钾、钙、镁、铝、铁、硫和磷元素的含量, 并与玉米粉进行对比(图 3.5 d)。对原料中主要元素的检测有助于控制污染物排放, 也有助于探究其循环利用的潜力^[176]。脱毒小麦秸秆和玉米秸秆中的钠元素含量与玉米粉类似; 但由于秸秆中含有较多的灰分, 因此镁、钙、铝和铁元素的含量明显高于玉米粉。相比于秸秆, 玉米粉中含有较多的钾和磷, 这可能是由于相比于茎秆, 玉米籽粒会更多的积累钾和磷^[177,178]。而玉米粉中较多的硫元素, 可能是由于其中含有较多的蛋白质组分。

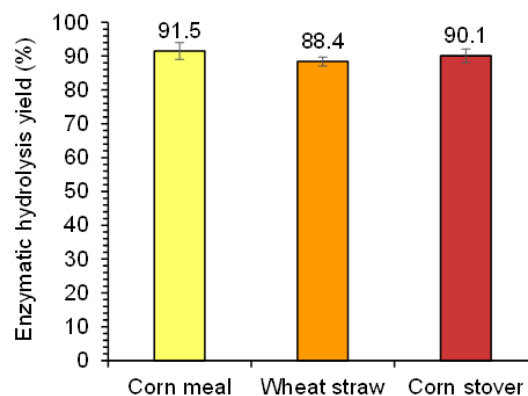
(a) Morphology of corn meal (dry milled), wheat straw and corn stover (pretreated and biodetoxified)



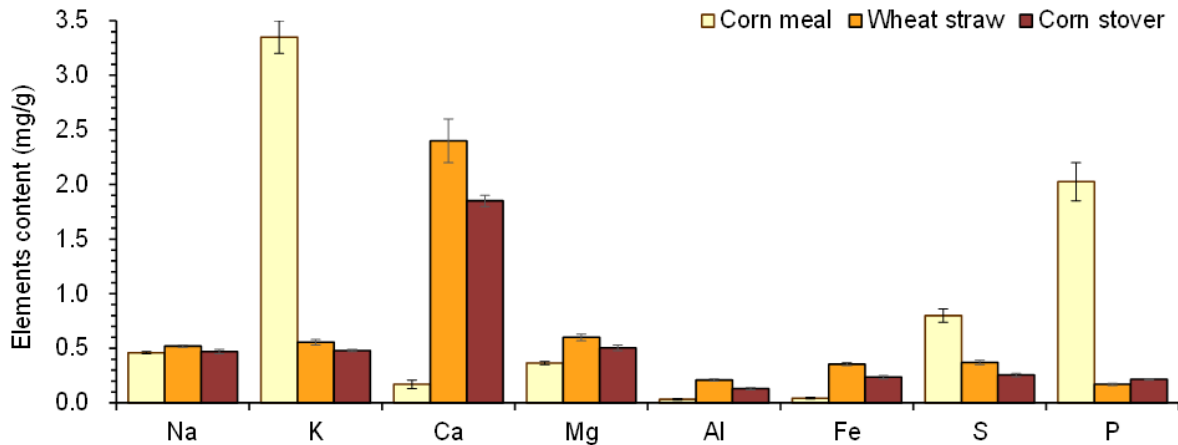
(b) Carbohydrates content



(c) Enzymatic hydrolysis yield



(d) Elemental content



(e) Mass balances of corn meal milling and lignocellulosic carbohydrates transformation

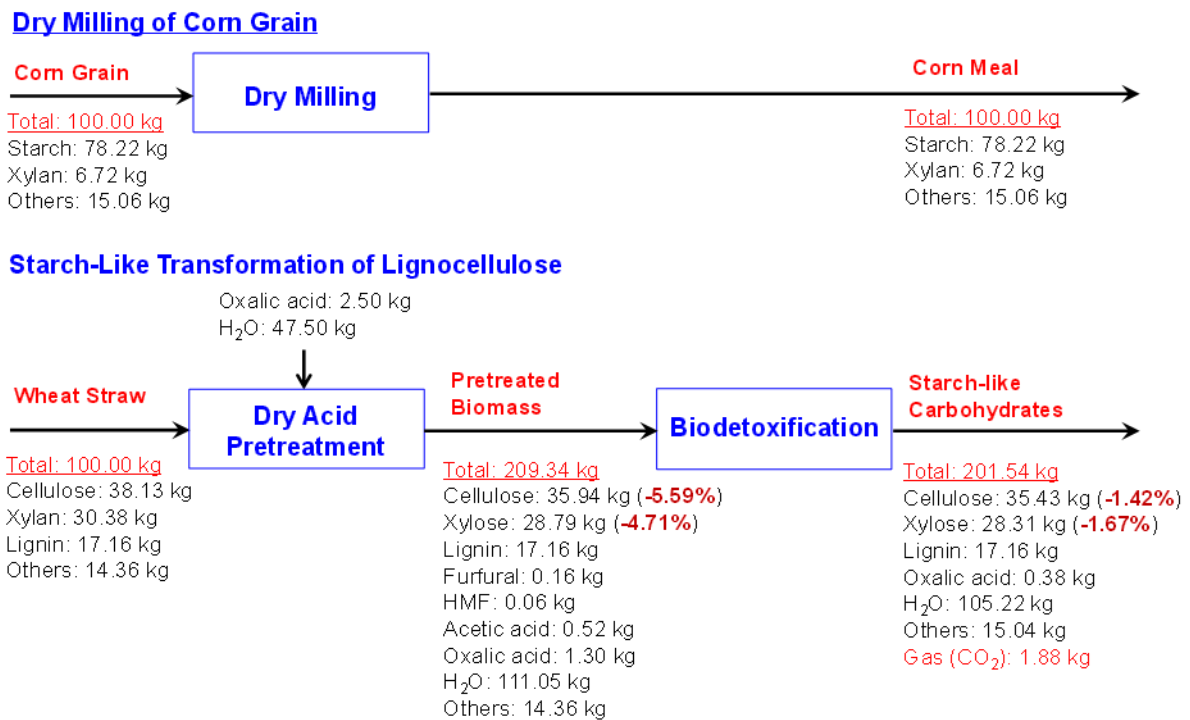


图 3.5 类淀粉木质纤维素碳水化合物和干磨玉米粉的比较

Fig. 3.5 Starch-like carbohydrates transformation of lignocellulose with the comparison of corn dry milling. (a) Morphology. (b) Carbohydrates content. (c) Enzymatic hydrolysis yield. (d) Elemental contents. (e) Mass balances of corn dry milling and starch-like carbohydrates transformation of wheat straw.

注：干磨玉米粉的酶水解得率是基于两步液化和糖化得到；物料平衡中的纤维素组分实际包括葡聚糖、葡寡糖和葡萄糖；木糖组分实际包括木聚糖、木寡糖和木糖。物料平衡中物料组分的实际测量值和理论值之间的相对误差以棕色数值表示，这表明了在预处理和脱毒过程中物料存在损失。

以小麦秸秆为例，根据上述预处理和脱毒结果，以玉米干磨工艺（dry milling）为对照，计算了获得脱毒小麦秸秆的物料平衡（图 3.5 e）。质量平衡从 100 kg（干物质）玉米粒或小麦秸秆开始，其中小麦秸秆中纤维素和木聚糖的测量误差在可接受的范围内

(1.42%-5.59%)。玉米干磨工艺中，没有可发酵糖（淀粉）的损失，同时也没有废水的产生。100 kg 干物质小麦秸秆含有 68.48 kg 的可发酵糖（包括纤维素和木聚糖），大约相当于玉米粒的 85%。经过草酸预处理和低 pH 生物脱毒后，分别产生 209.34 kg 的预处理小麦秸秆和 201.54 kg 的脱毒小麦秸秆。预处理过程产生了 0.16 kg 糠醛、0.06 kg 5-羟甲基糠醛和 0.52 kg 乙酸，然后在生物脱毒过程中被完全降解。所使用的草酸催化剂在预处理过程中被热解了 48.0%，在生物脱毒过程中降解了 36.8%。可发酵糖在最终的类淀粉样碳水化合物中高度保留，相比于原始物料，类淀粉生物转化过程可发酵糖总损失低于 8%。总的来说，在没有废水和固体废物产生的加工限制下，通过草酸预处理和低 pH 生物脱毒技术产生了清洁的（抑制物完全降解，草酸仅剩余~5 mg/g DM）、高可发酵糖含量的（~65%, w/w）、良好酶水解效率的（~90%）的生物质原料，这一过程和产品与成熟的玉米干磨工艺高度相似，因此我们将所得到的生物脱毒生物质定义为类淀粉碳水化合物。

仍以干磨玉米粉为对照，通过同步糖化与共发酵（SSCF）对类淀粉碳水化合物生产纤维素乙醇的性能进行了评估。如图 3.6，小麦秸秆和玉米秸秆的固体含量（约 25%, w/w, dry base）被调整到与玉米粉原料（约 20% 固体含量）发酵相同的可发酵糖含量。对于以分步糖化和发酵（SHF）进行的玉米乙醇生产，玉米粉在经过两步液化和糖化后的初始葡萄糖浓度达到了 164.5 ± 1.8 g/L，最终乙醇浓度为 78.7 ± 1.7 g/L (10.0%, v/v)，从玉米粉中的淀粉生产乙醇的得率为 0.48 g/g。对于纤维素乙醇的生产，小麦秸秆预糖化生成了 99.5 ± 3.7 g/L 葡萄糖和 51.4 ± 6.9 g/L 木糖（总计 150.9 ± 10.6 g/L 可发酵糖）。随后的 SSCF 过程得到了 78.5 ± 1.3 g/L (9.9%, v/v) 乙醇，从原始物料的纤维素和木聚糖到乙醇的得率为 0.47 g/g；玉米秸秆预糖化生成了 95.0 ± 5.5 g/L 葡萄糖和 54.5 ± 4.0 g/L 木糖（总计 149.5 ± 9.5 g/L 可发酵糖）。随后的 SSCF 过程得到了 75.3 ± 1.1 g/L (9.5%, v/v) 乙醇，从原始物料的纤维素和木聚糖到乙醇的得率为 0.45 g/g。乙醇发酵结果表明，使用生物脱毒小麦秸秆生产纤维素乙醇的产量和得率与干磨玉米粉类似。但由于乙醇发酵菌株 *S. cerevisiae* XH7 自身利用木糖的能力较弱且纤维素酶的水解效率较淀粉酶弱，因此纤维素乙醇的产率低于玉米乙醇。

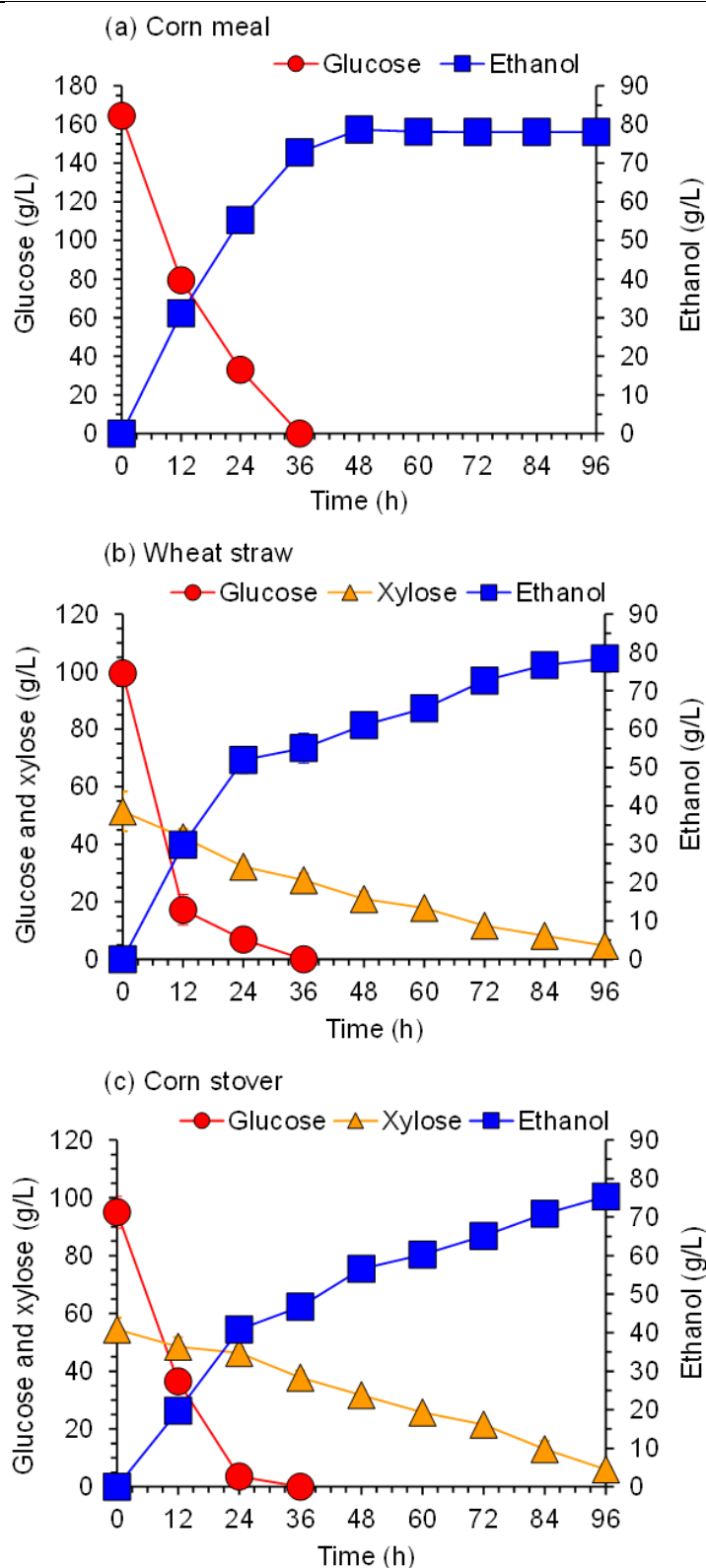


图 3.6 草酸预处理和低 pH 生物脱毒物料同步糖化与发酵生产纤维素乙醇性能评价

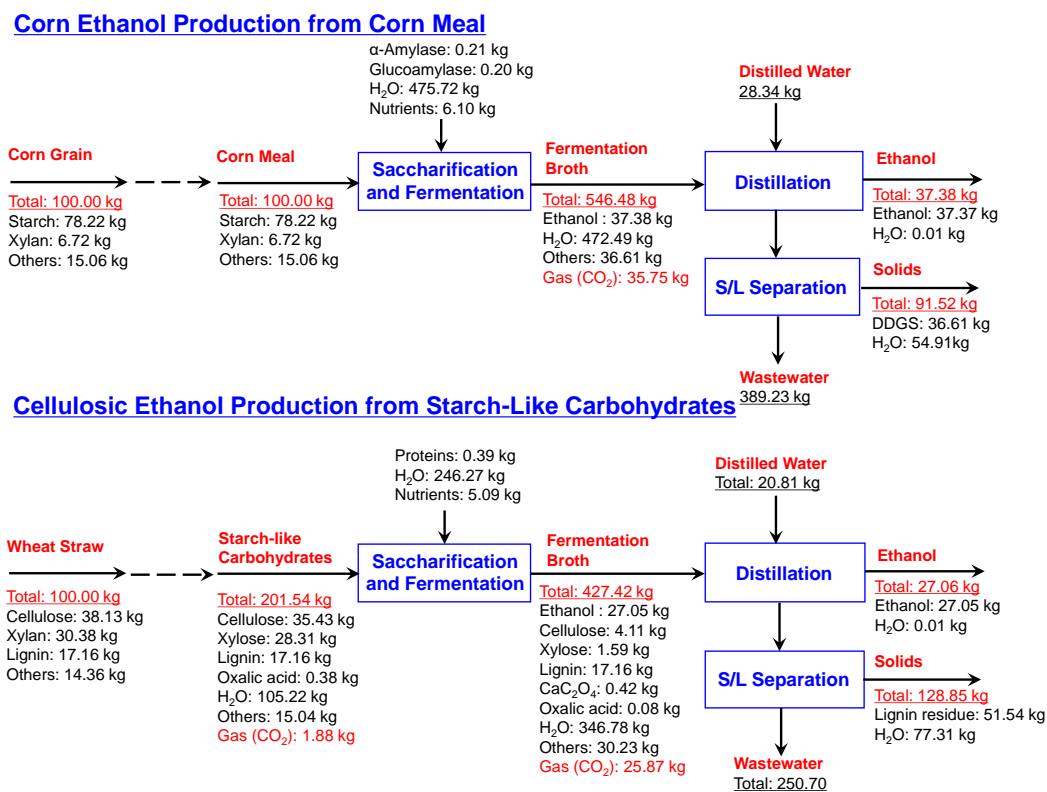
Fig. 3.6 Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) of starch-like wheat straw (b) and corn stover (c) for ethanol production with the comparison of corn meal control (a).

注：在预糖化前脱毒物料 pH 使用碳酸钙轻微调节至 4.0。SSCF 条件：30°C, pH 5.5, 200 rpm。

3.3.5 全过程质量平衡和元素平衡

以小麦秸秆为例，进一步对玉米乙醇和纤维素乙醇生产的全流程进行了质量平衡和元素平衡计算，从而进一步计算整个过程的排放。在这里我们仅考虑发酵废水的产生，而没有像实际的生物炼制工厂那样考虑到废水的回收。如图 3.7 a 所示，初始物料为 100 kg（干重）玉米粒或原始小麦秸秆。就玉米乙醇而言，100 kg 原料可以生产 37.37 kg 乙醇，由原料中淀粉生产乙醇的得率为 0.48 g/g。同时产生了 91.52 kg 固体废物（DDGS，36.61 kg 固体并含水 51.91 kg）和 389.23 kg 废水，这相当于每生产 1 kg 玉米乙醇会同时产生 2.45 kg 固体残留物和 10.36 kg 废水。对于纤维素乙醇，100 kg 小麦秸秆可以生产 27.05 kg 乙醇，由原料中纤维素和半纤维素生产乙醇的得率为 0.40 g/g（约为玉米乙醇的 83%）。纤维素乙醇生产同时产生了 128.85 kg 木质纤维素残留物（51.54 kg 固体并含水 77.31 kg）和 250.70 kg 废水，这相当于每生产 1 kg 纤维素乙醇会同时产生 4.76 kg 的固体残留物和 9.27 kg 废水。生产单位纤维素乙醇的废水排放较玉米淀粉较低，这主要是由于 SSCF 过程中采用了较高的固体含量（~25% vs. ~20%）。

(a) Mass balances of ethanol production



(b) Elemental balances of ethanol production

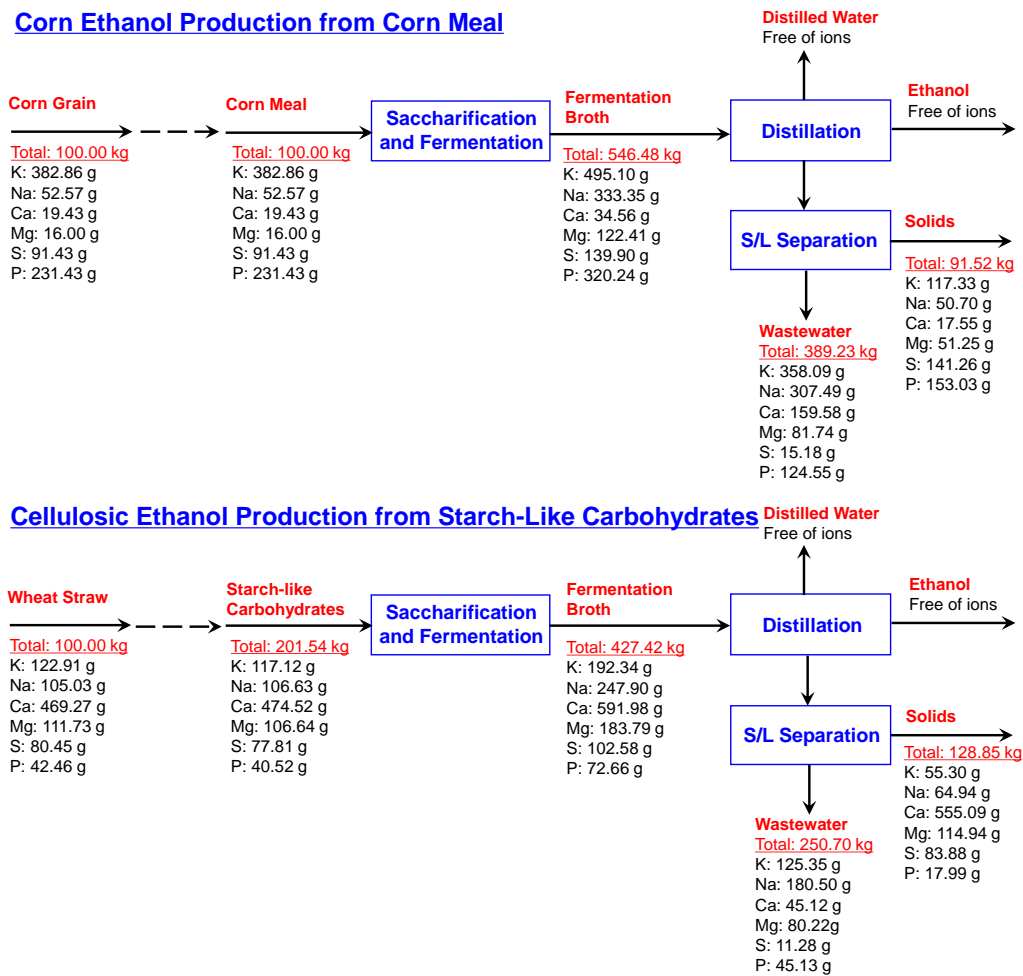


图 3.7 玉米乙醇和纤维素乙醇生产的全流程质量平衡和元素平衡

Fig. 3.7 Mass and elemental balances of corn ethanol and cellulosic ethanol production. (a) Mass balances of ethanol production from corn meal or starch-like carbohydrates. (b) Elemental balances of ethanol production from corn meal or starch-like carbohydrates.

注：物料衡算均基于重复的实验结果。

如图 3.7 b 所示，对整体流程的元素质量进行了计算。根据实际测量物料中的元素含量，并分别考虑到了可溶性和不溶性组分的元素质量。主要计算了钾、钠、钙、镁、硫和磷的质量平衡。100 kg 原始小麦秸秆中的钾（122.91 g）和磷（42.46 g）分别大约只有玉米粒（钾，382.26 g；磷 231.43 g）的 1/3 和 1/6。而小麦秸秆中的硫（80.45 g）也略低于玉米粒中的硫（91.43 g）。小麦秸秆中的钙（469.27 g vs. 19.43 g）和镁（111.73 g vs. 41.71 g）含量明显高于玉米粒，这是由于其中含有较多的不溶性灰分。基于生产单位 kg 乙醇，纤维素乙醇所排放的钠（9.07 g）和硫（3.52 g）与玉米乙醇相似（钠，9.58 g；硫，4.19 g）；而相比于玉米乙醇，单位 kg 纤维素乙醇的生产只排放了大约 1/2 的钾（6.68 g vs. 12.72 g）和 1/3 的磷（2.33 g vs. 7.43 g）。在纤维素乙醇生产中，更多的钙（22.19 vs. 0.90 g）和镁（7.21 g vs. 3.56 g）被排放，但大多为不溶性物质。

3.3.6 其他排放指标及经济学讨论

分别对硫酸预处理和草酸预处理并生物脱毒的小麦秸秆进行乙醇 SSCF。所得发酵液在实验室规模上进行精馏。所得残液进行固液分离。分别对精馏残液和残渣进行化学需氧量 (COD) 和热值测定, 结果如表 3.4 所示。以草酸预处理的小麦秸秆生产乙醇的废液 COD 比硫酸预处理低 37.5%, 残渣的热值基本相同。推测可能是由于草酸作为催化剂, 其预处理强度略低于硫酸催化剂, 从而使得在预处理过程中产生了较少的酚醛抑制物。其中来自于木质素降解的香草醛、丁香醛和 4-HBA, 在脱毒过程中的降解速率较慢, 通常会有所残留。因此草酸预处理产生的酚醛类抑制物较少, 后续残留也较少, 发酵废液的 COD 也较低。

表 3.4 精馏残液和残渣的 COD 和热值测定

Table 3.4 Determination of COD and calorific value of distillation residue liquid and solid.

	COD (mg/kg)	Calorific value (MJ/kg)
Oxalic acid pretreatment	1.10×10^5	17.88
Sulfuric acid pretreatment	1.76×10^5	17.47

此外, 对目前草酸生产以及其应用的经济性进行了初步的讨论。以前的研究表明, 与无机酸催化的木质纤维素预处理过程相比, 强有机酸 (如苹果酸、富马酸和草酸等) 的预处理效果基本与硫酸作为催化剂类似, 且抑制物的生成量更少^[179,180]。对于本研究中草酸的去向和来源来说, 草酸催化剂不仅可在使用后被生物降解, 同时草酸还可以通过葡萄糖氧化或发酵高效生产^[181]。葡萄糖可以通过在木质纤维素中提取, 作为草酸生产的原料, 从而实现草酸生产和消耗的完整循环。因此在实际的生物炼制示范装置中, 可以建立一个在位生产草酸的装置, 以减少催化剂的成本。此外根据 NREL 的报告^[182], 用于纤维素乙醇生产的硫酸 (约 85 美元/吨) 催化剂成本为 2.4 美分/加仑乙醇。草酸 (约 500 美元/吨) 的成本可相应的计算为 14.1 美分/加仑乙醇。在不考虑使用草酸催化剂所带来的优势下, 总的乙醇成本只会增加 5.4% 左右 (从 2.15 美元/加仑至 2.26 美元/加仑)。因此, 使用草酸作为预处理催化剂代替硫酸所增加的成本是完全可以接受的。

3.4 本章小结

本章节以常见的两种农业生物质残留物小麦秸秆和玉米秸秆为研究对象, 采用可降解有机酸预处理和低 pH 下生物脱毒技术, 在零废水、零抑制物和酸催化剂排放、低能耗和低糖损失的约束下, 将木质纤维素生物质转化为与淀粉组成相近、易水解的固体碳水化合物颗粒。本章节的主要研究进展如下:

(1) 新筛选生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 具有在低 pH (~2.3) 下同步代谢木质纤维素来源抑制物和草酸的能力, 同时能有效保存可发酵糖。其草酸代谢路径为先通过草酸脱羧酶转化为甲酸, 在进一步通过甲酸脱氢酶进一步将中间体甲酸终极降解。

(2) 可生物降解草酸催化剂的预处理效果与硫酸催化剂基本一致, 且产生了更少

的抑制物。

(3) 新筛选的生物脱毒菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89, 在低 pH 下实现了对预处理产生的所有类型抑制物以及草酸催化剂的同步生物降解和脱除, 总可发酵糖损失不超过 6%。

(4) 经草酸预处理和低 pH 生物脱毒后的小麦秸秆和玉米秸秆物料基本不含有酸催化剂和抑制物, 在形态、可发酵糖含量、酶水解产量、元素含量和乙醇发酵性方面与干磨玉米粉相似或相同。可将其定义为类淀粉生物质。小麦秸秆和玉米秸秆经过类淀粉化生物转化, 分别产生了 78.5 g/L (9.9%, v/v) 和 75.3 g/L (9.5%, v/v) 乙醇, 基于原料可发酵糖的得率分别为 0.47 g/g 和 0.45 g/g, 与玉米乙醇发酵指标类似(78.7 g/L, 0.48 g/g)。

(5) 全过程质量平衡结果表明, 包括类淀粉生物质转化过程的干法生物炼制工艺生产纤维素乙醇与玉米乙醇干磨法工艺的乙醇得率和废水产生量相似, 具有可比性。

(6) 元素质量平衡结果进一步表明, 相比于玉米乙醇生产过程, 类淀粉生物质转化和纤维素乙醇生产在控制钾、磷元素释放和回收具有一定优势。在木质纤维素生物炼制中复制玉米干磨工艺的转化和排放指标已成功实现。

第 4 章 类淀粉化干法生物炼制过程中的钙富集和循环利用

4.1 引言

在木质纤维素生物质代替石油进行生产的过程中，需要尽量使用可持续原料，消除对环境有害的化学品的使用或产生，并最小化能源需求，其中一个重要环节就是木质纤维素生物质的全回收、循环和重复利用。

能耗和废水排放是评价一个生物炼制工厂能否持续经济运行的重要指标。干法生物炼制平台最小化了废水的排放；同时木质素残渣经过焚烧热电联产可以补偿整个过程的能耗，超过一半的热电可以用于出售^[131]。因此生物炼制过程固体废弃物的最终形式为木质素残渣焚烧灰分。对于木质素参照焚烧所产生的灰分，Liu 等人认为其中含有大量的磷和钾元素可以回收至农田用做肥料^[176]。事实上，焚烧灰分中有机质明显不足，直接还田极易在短时间内造成土壤板结，影响作物生长^[183]。而 NREL 的报告中则简单的认为焚烧灰分可以直接以填埋的方式处理^[182]。1 吨生物质原料会平均产生 51-87 kg 灰分，按照年处理量为 30 万吨生物质的生物炼制工厂，每年产生的焚烧灰分将达到万吨。因此草率的将其掩埋不符合当前循环经济和环境影响要求。但目前对木质纤维素生物炼制工厂所产生的焚烧灰分的合理利用暂没有明确的研究论文。

对粉煤灰或城市固体垃圾焚烧飞灰的广泛研究可以作为木质素残渣焚烧灰分合理处理的参考。粉煤灰或城市固体垃圾焚烧飞灰中由于含有大量重金属和有毒物质，必须妥善处理。由于飞灰中含有大量的钙、硅和铝，通过对其中有毒物质进行水洗或固定等方法，可将其回收用于建筑材料、玻璃制作材料等^[184-187]。但由于其中含有大量的氯容易造成腐蚀，通常需要先进行脱氯处理^[188]。Huang 等人尝试着将飞灰回收用氧化锌冶炼中和剂，并通过生命周期分析表明，在多种灰分处理方式中，该方法对环境的影响最小，并且有较好的经济效益^[184]。作为参考，本章研究首先对木质素残渣灰分进行表征，并致力于将其回收用做预处理物料中和剂和纤维素乳酸发酵过程的中和剂，以期减少固体废物排放、中和剂使用和二氧化碳排放，获得更好的生产效益。

4.2 材料与方法

4.2.1 菌株，培养基和培养条件

第二章分离得到的菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 (CGMCC 17665) 被用于在低 pH 下的生物脱毒。菌株的保存和培养见 2.2.1。

所用乳酸发酵菌株为经过代谢工程改造和长期适应性进化得到的乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* ZY271 (CGMCC 13611) ^[115]。该菌株敲除了 D-乳酸脱氢酶以及乙酸合成途径，并引入了木糖代谢途径，可以利用全谱木质纤维素来源糖进行 L-乳酸同型发酵。*P. acidilactici* ZY271 种子培养基为简化 Man-Rogosa-Sharp (MRS) 培养基，组分为 20 g/L 葡萄糖、10 g/L 酵母提取物、10 g/L 蛋白胨、5 g/L 乙酸钠、2 g/L 柠檬酸氢二铵、2 g/L 磷酸二氢钾、0.58 g/L 七水合硫酸镁和 0.25 g/L 一水合硫酸锰。*P. acidilactici*

ZY271 的纤维素乳酸发酵营养盐为 15 g/L 酵母提取物、10 g/L 蛋白胨、2 g/L 柠檬酸氢二铵和 0.25 g/L 一水合硫酸锰。

4.2.2 酶和试剂

所用纤维素酶和试剂见 3.2.2。

4.2.3 小麦秸秆原料

所用物料为 2021 年春季在河南省南阳市收获的小麦秸秆，根据 NREL 两步酸解法测定其干重主要组成为 34.3%纤维素、19.3%木聚糖、22.1%木质素和 8.4%的灰分。

4.2.4 预处理和生物脱毒

预处理和生物脱毒方法见 3.2.8。

4.2.5 纤维素乳酸发酵

采用同步糖化与共发酵的方法 (SSCF) 进行纤维素乳酸发酵生产。*P. acidilactici* ZY271 的甘油种首先在 20 mL MRS 培养基中活化，42 °C，100 rpm 培养 12 h。活化种子全部转入 200 mL MRS 培养基中，42 °C，100 rpm 培养 8 h 作为乳酸发酵种子液。在种子培养过程中添加 1% (v/v) 糖化酶防止菌体絮凝。

经生物脱毒后的物料首先在 5-L 反应器内进行预糖化。预糖化条件为 50 °C，150 rpm，20% (w/w) 固体含量，4 mg 蛋白/g 干物料，6 h。随后加入发酵营养盐，按照 10% (v/w) 接种量接种 *P. acidilactici* ZY271 种子液。42 °C，150 rpm 发酵 72-96 h。发酵 pH 通过自动添加 25% (w/w) 氢氧化钙溶液稳定控制在 5.5。

4.2.6 灰分制备

纤维素乳酸发酵液 8000 rpm 离心 10 min 后，经固液分离得到发酵残渣。发酵残渣自然晾干，水分含量约为 8%。将发酵残渣碎块使用破壁机粉碎，于马弗炉灼烧。灼烧条件为先在 275 °C 下预热 30 min，随后升温至 575 °C 并维持至少 4 h。

4.2.7 扫描电镜观察

焚烧灰分经过始终保存在 90 °C 烘箱中保持干燥。焚烧灰分经 Pt 喷金后使用场发射扫描电镜 (GeminiSEM 500) 拍摄其表面形态，并通过 EDS 分析其表面成分。

4.2.8 电感耦合等离子体原子发射光谱

使用电感耦合等离子体原子发射光谱法 (725 ICP-OES, Agilent) 测定焚烧灰分的主要元素浓度，具体操作参考 3.2.12。

4.2.9 XRD 分析

焚烧灰分充分干燥后使用 X 射线衍射仪 (Dmax 2550VB) 对其中的主要矿物晶体物质进行定性分析。所得数据结果于 Jade 6 软件进行分析比对。

4.2.10 FTIR 分析

焚烧灰分充分干燥取 1-2 mg 与干燥的 100 mg 溴化钾粉末在玛瑙研钵中研磨，装入

模具内压制成片。使用红外光谱仪 (Nicolet 6700) 对焚烧灰分中的主要特征基团的红外吸收光谱进行测定。

4.2.12 分析方法

葡萄糖、木糖、乳酸的浓度采用 HPLC 方法测定, 具体操作和设备见 2.2.10。

4.3 结果与讨论

4.3.1 草酸预处理参与的常规生物炼制过程用于乳酸生产

在论文第三章探究并建立了一种包括草酸作为可生物降解催化剂的预处理方法及低 pH 生物脱毒过程的类淀粉生物质转化过程。所获得的脱毒物料用于纤维素乙醇发酵, 最终的指标逼近了玉米乙醇生产指标。使用同样预处理方法和脱毒手段获得的小麦秸秆物料被用于了纤维素 L-乳酸的发酵, 结果如图 4.1 所示。经草酸预处理和低 pH 生物脱毒的物料, 在 20% (w/w) 固体含量下, 经过 72 h 乳酸 SSCF 后, L-乳酸产量达到了 101.8 ± 0.1 g/L, 为理论转化率的 85% 左右, 这表明本研究第三章所得到的类淀粉生物质可有效应用于多种生物炼制产品的发酵生产。

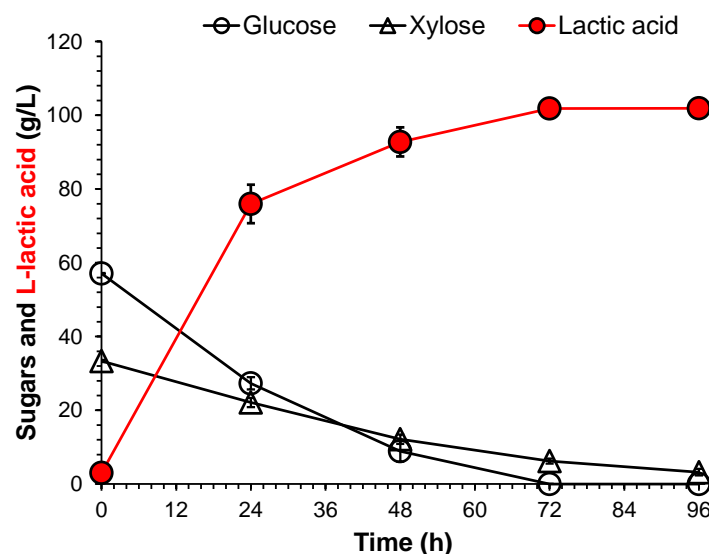


图 4.1 使用草酸预处理生物脱毒小麦秸秆的 L-乳酸发酵

Fig. 4.1 L-lactic acid SSCF from oxalic acid pretreated and low pH biodetoxified wheat straw
注: 低 pH 脱毒后物料使用氢氧化钙调节 pH 至 5.0。SSCF 条件: 20% (w/w) 固体含量, 42 °C, 150 rpm, 96 h, 发酵 pH 通过自动添加 25% (w/w) 氢氧化钙控制在 5.5。

图 4.2 展示了包括类淀粉生物质转化和纤维素 L-乳酸发酵的整体干法生物炼制过程。主要包括原始物料的草酸 (可降解有机酸) 预处理、低 pH 生物脱毒、乳酸 SSCF、固液分离、及木质素残渣热电联产过程。整个过程在固液分离之前不产生废水。固液分离发酵液用于乳酸分离纯化后, 按照 NREL 所报道的废水处理方法^[182], 废水经过有氧/厌氧发酵可以用于生产部分甲烷副产品。固液分离所得到的木质素固体残渣被送入焚化

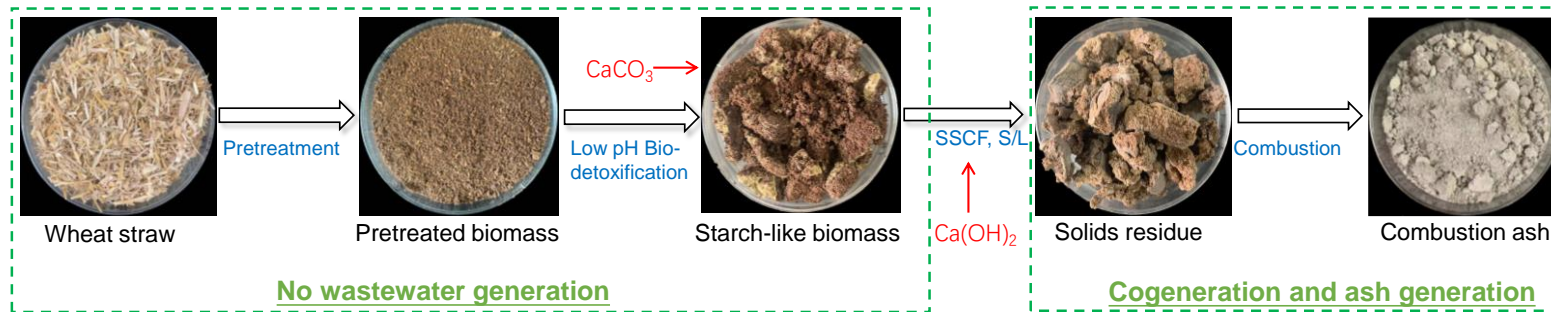
炉进行热电联产，所产生的热蒸汽转化为电能不仅可以满足整个生物炼制过程的电耗，多余电力还可并入电网获得额外收益。

对于焚烧最终所剩生物质灰，按照 NREL 报告，其与尾气脱硫（硫酸作为预处理催化剂）所得的硫酸钙共同填埋；按照实验室之前的研究，所得灰分理论上可以提取其中可溶性钾和磷作为液体肥料还田^[113]。但事实上这两种方法对木质素灰分的处理均对环境存在潜在影，因此极有必要开发生物炼制过程中所产生的灰分的利用手段。

目前大多数研究中的灰分主要来自于煤、生物质或城市固体废物（MSW）的焚烧^[187]。粉煤灰主要来自于电厂燃煤和烟气脱硫；生物质灰主要来源于生物质发电；而城市固体废物灰主要来源于城市生活垃圾焚烧（MSWI）并以此发电。MSWI 所产生的灰分包括全部的锅炉飞灰、洗涤塔残留和过滤器灰，这些组分通常在焚烧厂的一个粉煤灰储存和处理系统中统一收集。MSWI 飞灰是一种危险废物，因为其中含有二噁英和呋喃等有毒物质以及锌和铅等重金属。由于 MSWI 飞灰中含有大量的钙、硅和铝元素，有大量研究开发 MSWI 的多种用途，例如 MSWI 飞灰被证明了可以回收用于制造水泥、骨料和砖等建筑材料。但 MSWI 灰分回收之前必须要经过有效脱毒（去除重金属以及破坏二噁英和呋喃）以及脱氯才能保证后续产品的安全性和稳定性。相比于 MSWI 飞灰，生物质灰成分相对简单，目前对于生物质灰的开发多集中于生物炭的制备^[189]。但生物炭的制备过程需要高温灼烧，这对于控制能耗是不利的。生物炼制中的木质素残渣焚烧所产生的灰分与常规的生物质灰较为类似。但生物炼制过程中由于对生物质原料经过结构的破坏和糖化，其中大部分纤维素/半纤维素组分已经被去除，且其中大部分金属/非金属氧化物已经溶解，与典型的生物质焚烧灰分仍存在一定区别。如图 4.2 b 所示，在生物炼制过程中每 1000 kg 干重生物质原料就会产生 59.69 kg 灰分，对于年处理 30 万吨的生物炼制工厂，其每年产生的灰分将达到 18000 吨。但目前对生物炼制工厂所产生的灰分并没有实际的应用研究因此十分有必要对生物炼制过程中木质素固体残渣焚烧所得到的灰分进行表征并开发其进一步的用途。

在类淀粉生物质转化过程中，低 pH 脱毒过程为了减少可发酵糖损失，缩短了脱毒时间，从而导致部分草酸残余（~5 mg/g DM）。脱毒物料需要进行轻微中和后再进行后续糖化和发酵。由此引入了额外的碳酸钙中和剂并生成草酸钙。草酸钙在后续焚烧过程中理论上会进一步分解成为一氧化碳、二氧化碳和氧化钙，所得氧化钙进一步转化为碳酸钙。除此之外，原始生物质原料由于含有部分来自农田的外源灰分以及内源性灰分，其中主要的钙、镁元素在整个生物炼制过程相对稳定，在最终焚烧后极有可能也会转变为相应的碳酸盐。因此初步判定由生物炼制过程所得到的灰分中应含有大量的碳酸盐，可以回收用于中和使用。在纤维素乳酸生物炼制过程中需要中和的步骤主要包括对预处理脱毒物料的中和以及乳酸发酵 pH 的控制，在接下来的研究主要集中于将木质素残渣焚烧灰分应用于这两个方面。

(a) The overall flowsheet of dry biorefinery chain with transforming the wheat straw to starch-like carbohydrate



(b) Overall mass balance of dry biorefinery chain for cellulosic lactic acid production

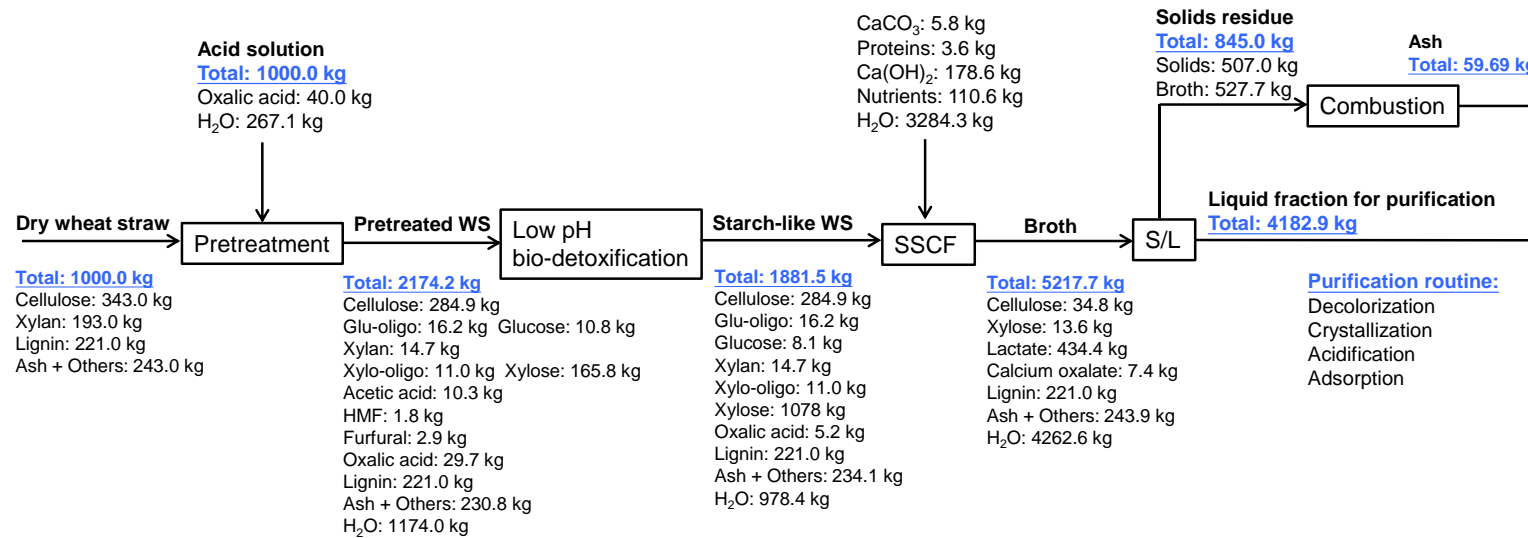


图 4.2 包括类淀粉生物质转化和乳酸发酵的整个干法生物炼制过程

Fig. 4.2 The overall flowsheet of biorefinery chain involving starch-like carbohydrates transformation and L-lactic acid fermentation. (a) Graphic flowsheet; (b) Mass balance.

注：物料衡算均基于重复的实验结果。

4.3.2 焚烧灰分的表征

首先对生物炼制焚烧所得到灰分的中和能力进行了验证。使用磁力搅拌器分别配置了 1 g/L 的氢氧化钙、碳酸钙和焚烧灰分的悬浊溶液。使用 0.1 mol/L 的标准盐酸溶液进行滴定，测定溶液 pH，结果如图 4.3 所示。碳酸钙由于自身比较难溶，因此初始的 pH 为 8.75；氢氧化钙作为一种强碱，初始的 pH 可以达到 12.42；焚烧灰分的碱性在碳酸钙和氢氧化钙之间，其初始 pH 为 11.28，推测焚烧灰分中可能含有一部分可溶性的碱性盐。进一步使用标准盐酸溶液将悬浊溶液 pH 滴定至 4.0，碳酸钙、氢氧化钙和焚烧灰分的酸用量分别为 70.4%、85.0%和 77.4%，由此可知焚烧灰分的中和能力结余碳酸钙和氢氧化钙之间，非常有潜力作为生物炼制过程中的碱性中和剂。

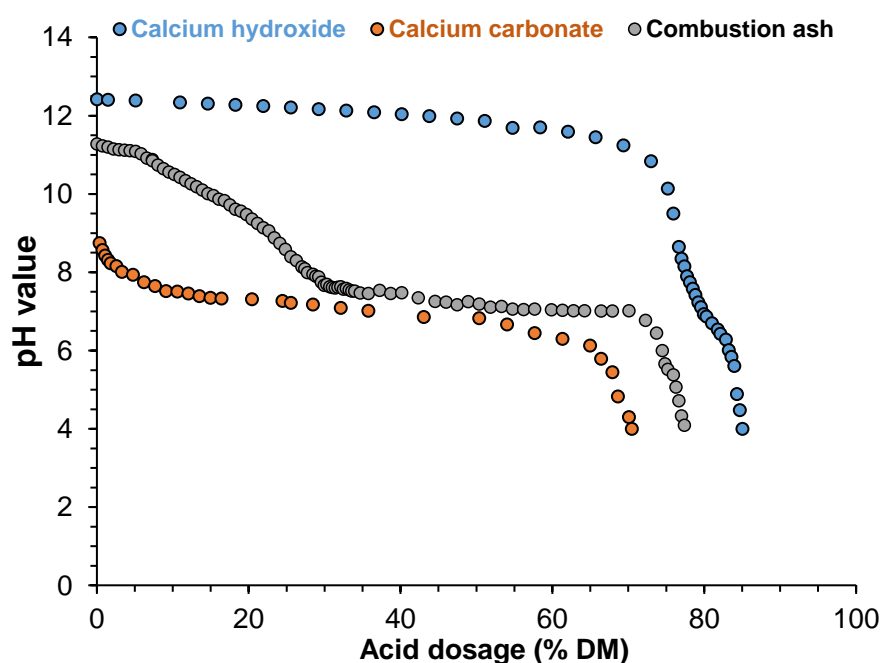


图 4.3 生物炼制灰分的中和能力

Fig. 4.3 The pH neutralization capacity of ash from solid residue combustion.

使用配置了能谱仪的扫描电镜对焚烧灰分进行了进一步的表征，结果如图 4.4 所示。所拍摄的焚烧灰分呈现松散的碎石状，其表面疏松多孔。对其表面进行能扫，发现表面中含量较高的几种元素分别为 C、O、Si、Cl、K 和 Ca，元素含量分别为 16.21 ± 0.99 、 37.7 ± 0.85 、 6.37 ± 0.15 、 1.27 ± 0.72 、 2.39 ± 1.04 、 34.39 ± 3.00 wt%。推测焚烧灰中含有的大量钙元素大部分应都以碳酸钙的形式存在；其中的钾元素，大部分应都以可溶性钾盐如氯化钾、氢氧化钾的形式存在；其中的硅元素，大部分应以二氧化硅、硅酸钙的形式存在。

进一步使用等离子体光谱对焚烧灰整体的主要金属元素组成进行了测定，结果如图 4.5 所示。焚烧灰分中浓度最高的三种金属元素为 K、Ca 和 Si，其含量分别为 4.95 ± 0.23 、

29.5 ± 0.70、以及 1.45 ± 0.21% DM。等离子体光谱与 EDX 所测定的元素浓度基本一致。

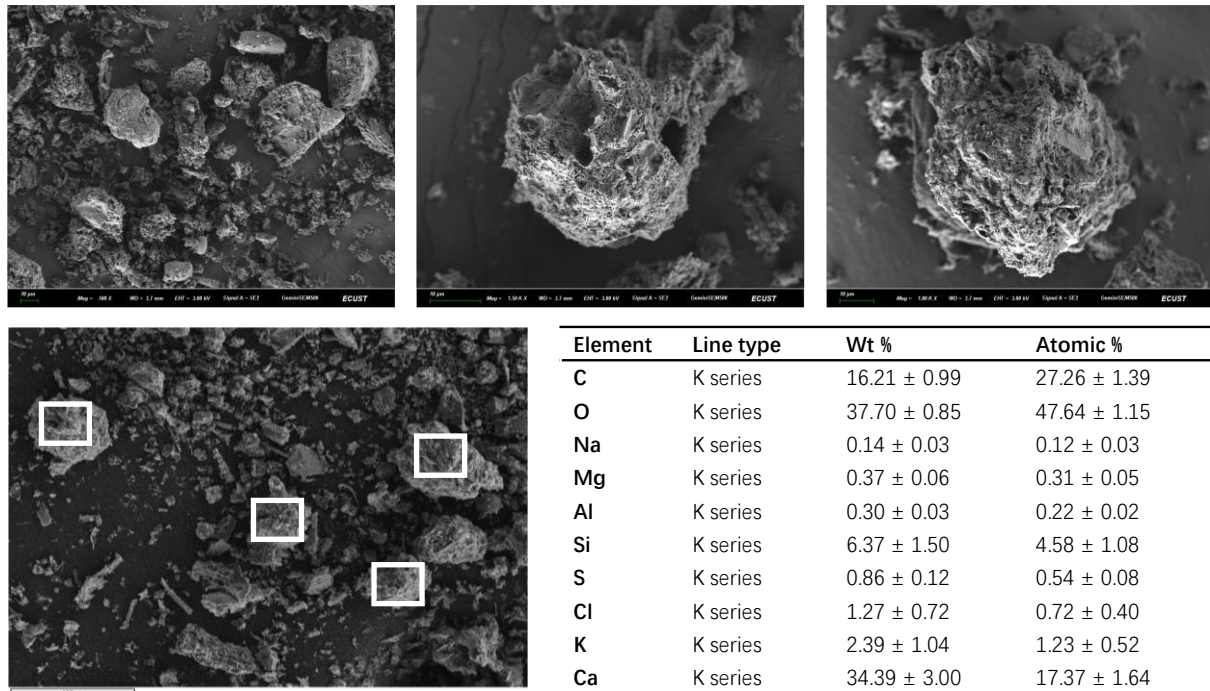


图 4.4 焚烧灰分的扫描电镜观察和能谱分析

Fig. 4.4 SEM and EDX spectra of combustion ash.

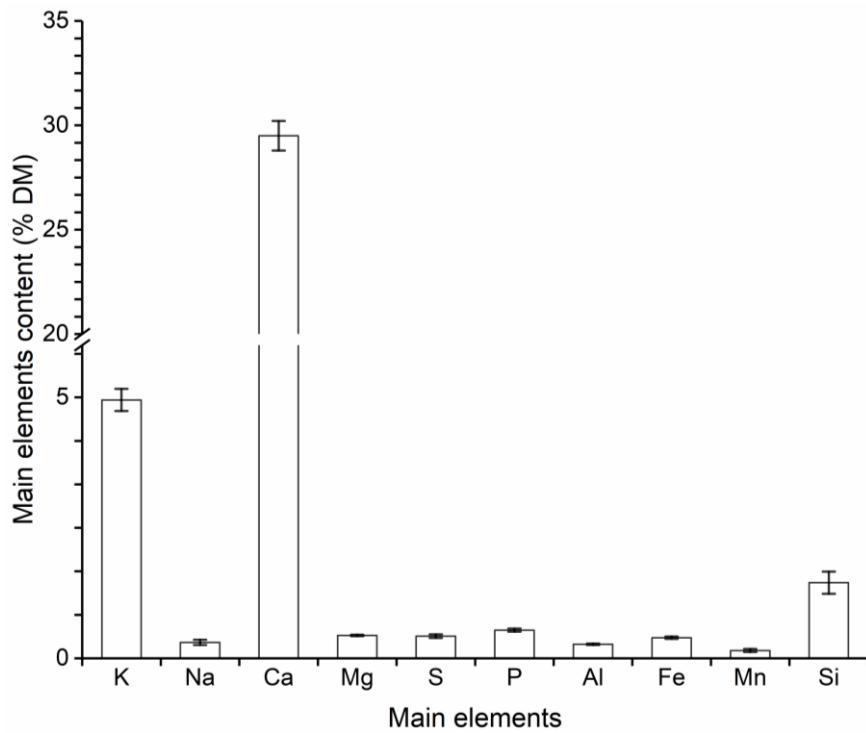


图 4.5 焚烧灰分中主要金属元素含量的测定

Fig. 4.5 Main metal elements content of combustion ash.

使用 XRD (X-射线衍射) 对焚烧灰分中的固相晶态物质进行了测定, 结果如图 4.6 所示。使用 JADE 6 软件分别对木质素固体残渣和焚烧灰分的特征峰进行分析比对。可以发现, 在木质素固体残渣中含有两个二水合草酸钙和一水合草酸钙的特征峰, 这里的草酸钙来自于草酸催化剂的中和; 同时还含有二氧化硅的特征峰, 推测其应来源于原始物料本身所带有的灰分。对焚烧灰分的 XDR 分析表明, 经焚烧后生成了大量的碳酸钙组分; 与此同时也检测到了一定量的氯化钾化合物; 部分二氧化硅得以保留, 其余部分转化为硅酸钙。XRD 分析未能表征出一些可溶性的碱性化合物 (例如碱式氯化镁、碱式氯化钙、氢氧化钾等), 这可能是由于其中的含量较低, 被杂峰所覆盖。在实际的测定中, 焚烧灰分的不溶性组分约占 93.96%, 其中含有的约 6%的可溶性组分极难进行进一步的鉴定。

木质素残渣和焚烧灰分的 FTIR (红外光谱) 分析进一步表明, 在木质素残渣中存在草酸钙组分 (有草酸钙特征峰), 其在焚烧过程中转化成了部分碳酸钙 (焚烧灰分中不存在草酸钙特征峰)。在木质素残渣中不存在明显的碳酸钙特征峰, 而在焚烧灰分中则表征出了明显了碳酸钙特征峰, 这表明木质素残渣中的含钙化合物在高温焚烧过程中实现了向碳酸钙的转化。

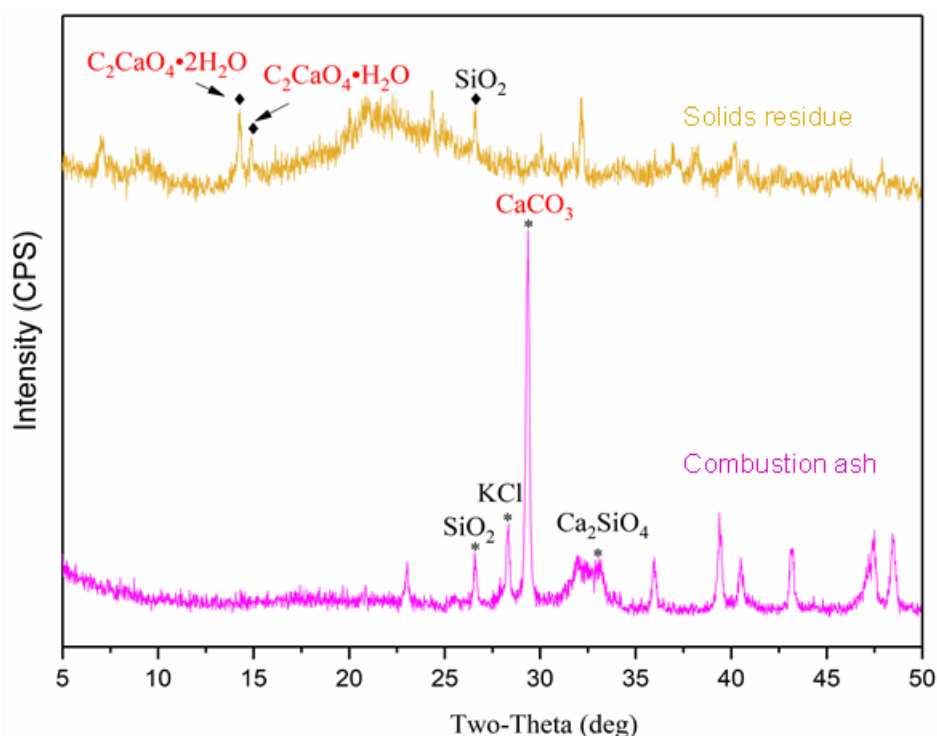


图 4.6 木质素残渣和焚烧灰分的 XDR 分析

Fig. 4.6 XRD analysis of lignin residue and combustion ash.

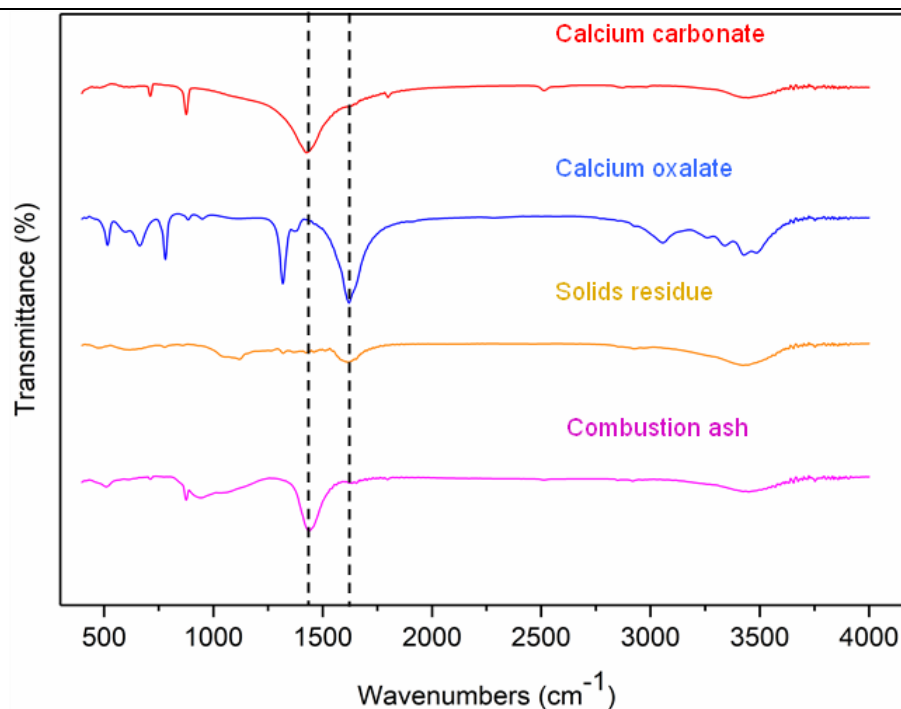


图 4.7 木质素残渣和焚烧灰分的红外光谱分析

Fig. 4.7 FTIR analysis of lignin residue and combustion ash.

4.3.3 焚烧灰分作为预处理物料中和剂

经草酸预处理物料分别经过碳酸钙和焚烧灰分调节 pH 后用于乳酸发酵。这里为了更清楚的显示出灰分作为酸催化剂的中和剂是否会对后续乳酸发酵产生负面影响，直接对预处理催化剂进行了 pH 调节然后在进行正常 pH 下的固态生物脱毒（未进行低 pH 下的生物脱毒）。用于调节 pH 的碳酸钙用量为 5.6% DM，而焚烧灰分用量为 4.5% DM。所得脱毒物料用于了纤维素 L-乳酸的 SSCF，结果如图 4.8 所示。

对于使用经碳酸钙中和并生物脱毒小麦秸秆的乳酸 SSCF，经预糖化后得到了 51.4 ± 0.7 g/L 葡萄糖和 29.8 ± 0.3 g/L 木糖。经过 72 h 的 SSCF，最终乳酸产量达到了 97.0 ± 3.6 g/L。对于使用焚烧灰分中和并生物脱毒小麦秸秆的乳酸 SSCF，预糖化后共得到了 52.7 ± 0.2 g/L 葡萄糖和 22.2 ± 0.1 g/L 木糖，最终乳酸产量达到了 94.6 ± 2.5 g/L。使用焚烧灰分作为预处理物料的中和剂对于物料糖化和乳酸发酵无消极影响。值得注意的，如果焚烧灰分仅用于调节预处理物料的 pH，会有一些量的剩余，因此进一步对灰分用于乳酸发酵 pH 调节进行了探究。

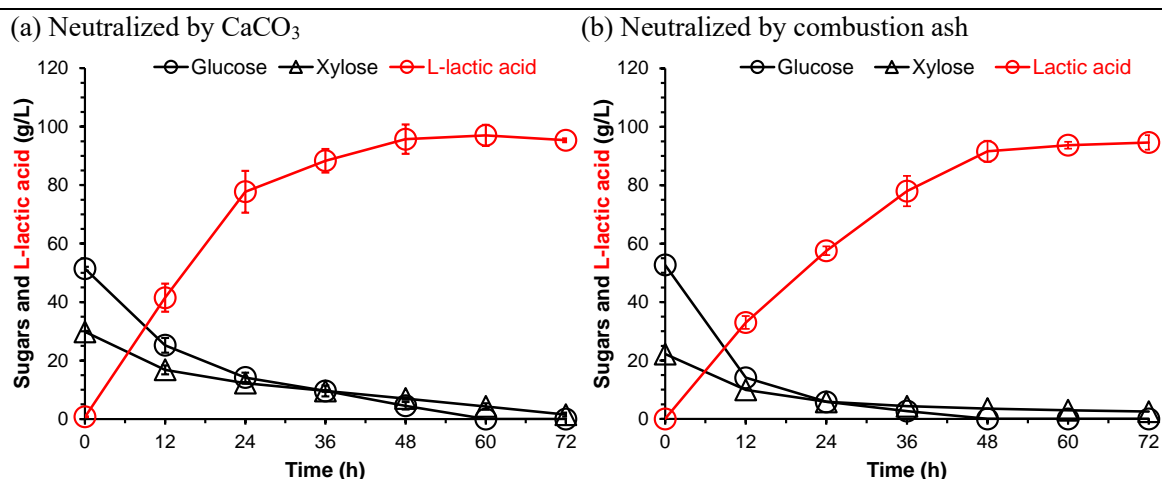


图 4.8 使用碳酸钙或灰分调节 pH 物料的乳酸 SSCF

Fig. 4.8 Cellulosic L-lactic acid SSCF from oxalic acid pretreated wheat straw.

(a) The pretreated wheat was neutralized by 5.6% DM CaCO_3 ; (b) The pretreated wheat straw was neutralized by 4.5% DM combustion ash.

注：SSCF 条件：20% (w/w) 固体含量，42 °C，150 rpm，96 h，发酵 pH 通过自动添加 25% (w/w) 氢氧化钙控制在 5.5。

4.3.4 灰分作为乳酸发酵中和剂

以碳酸钙作为对照，继续探究了以焚烧灰分为中和剂的乳酸 SSCF，结果如图 4.8 所示。预处理物料仍然分别使用碳酸钙和焚烧灰分调节 pH。在后续的乳酸发酵中，40 g/L 的碳酸钙在发酵开始时直接加入木质纤维素发酵体系，用来控制整个体系的 pH，最终乳酸产量为 66.6 ± 1.5 g/L。使用碳酸钙调节乳酸发酵 pH，比使用氢氧化钙时产量下降了 31.3% (图 4.9 a vs. 图 4.1)，这表明碳酸钙并不适合调节乳酸发酵 pH。其原因可能是由于碳酸钙本身溶解性较差且调控 pH 能力较低，无法对发酵过程产生的乳酸进行快速的中和，较低 pH 的环境从而影响了发酵菌株的代谢性能，最终剩余了 33.8 ± 0.9 g/L 的葡萄糖和 12.1 ± 1.8 g/L 的木糖。整个发酵过程中 pH 呈现缓慢下降的趋势，最终 pH 为 4.57。

之前的研究表明，焚烧灰分的中和能力介于碳酸钙和氢氧化钙之间。不同于碳酸钙，焚烧灰分溶液的初始 pH 可以达到 11 以上。因此尽管之前的表征表明焚烧灰分中存在大量的碳酸钙，但是在实际发酵过程中，如果像碳酸钙一样将其直接在发酵开始时全部加入培养基，会造成发酵液初始 pH 较高，影响发酵效果。然而配置的 20% (w/w) 灰分水溶液，由于其溶解度较低且颗粒较大，在通过发酵罐 pH 自动控制管线时会造成固体颗粒的沉积堵塞，因此焚烧灰分无法像氢氧化钙溶液一样采用自动控制模式流加。在本次发酵中只能采用了人工添加焚烧灰分的方法。每当发酵液 pH 降低至 4.5 左右时，便添加 5 g 左右焚烧灰分。添加后发酵液 pH 会升高至 5.0 左右。整个发酵过程共添加 5 次，添加的灰分约为 25 g。最终在 60 h 时乳酸的产量为 78.3 ± 3.5 g/L，相比于碳酸钙作为发酵中和剂提高了 17.6%，但整体发酵效果仍低于氢氧化钙作为发酵中和剂(图 4.1)。

发酵 60 h 最终剩余了 8.2 ± 2.1 g/L 葡萄糖和 4.9 ± 2.3 g/L 木糖。

焚烧灰分单独作为发酵中和剂的效果较氢氧化钙中和剂下降了 17.2%。这主要是由于焚烧灰分中起主要中和作用的仍然是碳酸钙组分，而其中可溶性的碱性物质仅占一小部分。对于灰分在乳酸发酵时作为中和剂的使用，更建议用来替换部分氢氧化钙中和剂。结果表明使用灰分对氢氧化钙溶液进行 10-20% 的替换并不会对乳酸发酵性能有明显影响。但具体如何分配利用一批次生物炼制焚烧灰分还需要进行进一步计算。

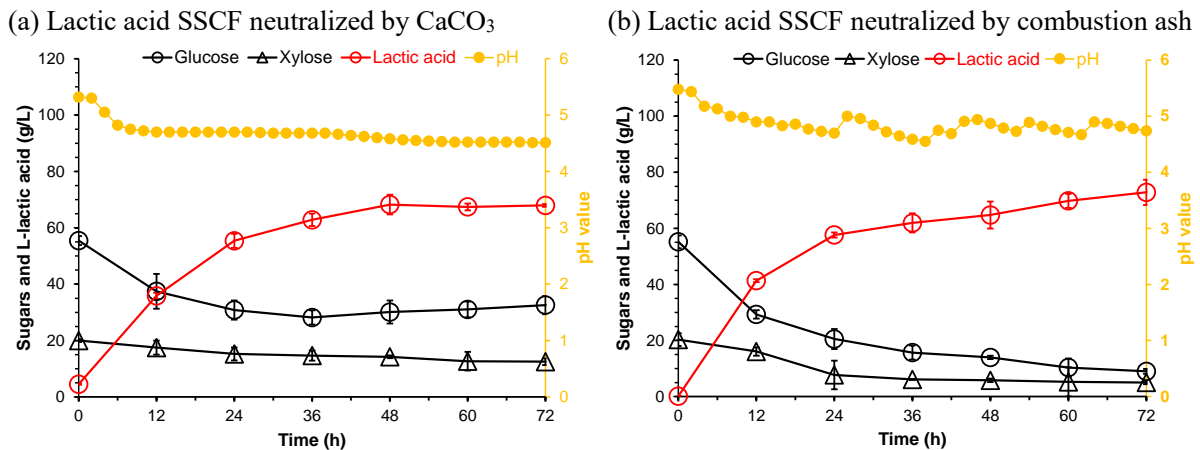


图 4.9 使用碳酸钙或焚烧灰分作为乳酸发酵中和剂

Fig. 4.9 Lactic acid SSCF neutralized by CaCO_3 (a) or combustion ash (b).

注：预处理物料分别使用碳酸钙和焚烧灰分调节 pH。SSCF 条件：20% (w/w) 固体含量， 42°C ，150 rpm，96 h。碳酸钙用量为 40 g/L，在发酵开始时全部加入培养基。当 pH 下降至 4.5 时，加入 20% (w/w) 焚烧灰分溶液，调节发酵 pH 至 5.0 左右。

4.3.5 生物炼制过程中灰分回收的物料平衡

为了准确的表明焚烧灰分的来源和如何循环使用，分别建立了正常生物炼制过程中灰分（钙）的物料平衡以及理论上焚烧灰分循环使用的方法，结果如图 4.10 所示。首先如图 4.9 a 所示，由 1000 kg 干小麦秸秆开始的生物炼制过程，最终焚烧灰分中的钙为 17.37 kg，主要来源于三个途径：原始物料中的灰分（4.69 kg）、预处理物料中和剂（2.31 kg）以及固体残渣中所含的残余发酵液（10.62 kg）（不考虑营养物质中 0.32 kg 的钙）。该物料衡算仅是根据实验室规模上的数据进行计算的。在实验室中，发酵液的固液分离仅仅是通过简单的离心操作完成。最终残余固体的含水量为 60%左右。这就相当于残渣中含有大量发酵液，而发酵液中存在大量的乳酸钙产品，从而会额外引入大量的钙。在工业规模上，由于会对残渣进行反复的冲洗以充足的回收乳酸产品，发酵残渣中并不会额外引进大量的乳酸钙，在这种情况下，最终灰分中的钙大部分都来自于原始物料的灰分以及预处理中和剂。

图 4.9 b 展示了在实验室规模上如何合理的使用焚烧灰分作为中和剂。在第一轮生物炼制过程得到的焚烧残渣共 17.34 kg，其中 7.83 kg 用于中和脱毒物料中剩余的草酸。剩余灰分则用来替代一定质量的氢氧化钙作为乳酸发酵中和剂（假定此时乳酸发酵性能

不变)。所剩余的 51.86 kg 焚烧灰分共能替代 28.32 kg 氢氧化钙。但值得注意的是, 由于乳酸产品的特殊性, 大量的钙元素是作为乳酸钙产品输出, 因此, 最终得到的灰分中钙的含量仍然为 17.34 kg。而焚烧灰分的质量理论上会增多为 75.36 kg (这里不考虑碳酸钙反应后会生成水和二氧化碳, 仅简单的减掉钙元素重量)。尽管计算相对来说较为粗糙, 但是可以得到的结论是, 对于乳酸的生物炼制过程, 焚烧的灰分不能始终进行收集和循环。因为灰分中的钙会随着乳酸钙产品的输出而减少。随之带来的是灰分中钙元素含量的降低。本研究的焚烧灰分循环使用本质上是对原始物料中的钙和预处理物料中和剂的重复使用 (理想状态下残渣中不存在残余发酵液), 最终作为乳酸产品输出。但由于实验较为复杂, 本研究并未对循环多次的灰分及发酵指标进行进一步的检测。在此基础上, 可以提出的最为保险的一种焚烧灰分利用方式为隔代循环, 即先进行一次正常的生物炼制过程, 再完全回收焚烧灰分, 作为下一批次预处理物料中和剂以及取代部分乳酸发酵氢氧化钙中和剂。这种循环利用方式对乳酸发酵指标不会产生明显的影响, 并且最终也会减少焚烧灰分的排放。

对年处理 30 万吨干小麦秸秆原料的生物炼制工厂内, 通过上述焚烧灰分循环利用的方法, 每年至少减少用于预处理物料中和的 867.0 吨的碳酸钙使用; 对于只是用原始物料中的钙用于乳酸发酵中和 (不考虑发酵液在残渣中的存在), 每年至少会减少 1232.1 吨的氢氧化钙使用。对于不使用生物可降解有机酸催化剂的预处理反应, 对硫酸催化剂的中和需要更多的钙盐中和剂, 其最终灰分中会有更多的钙, 灰分循环利用的方法更有效节省碳酸钙的用量, 从而提高工厂的经济效益并减少相关排放。

4.4 本章小结

木质素焚烧灰分作为生物炼制工厂所产生的主要固体废物需要进行合理的处置。本章节对干法生物炼制过程所产生的木质素焚烧灰分进行了表征并探究了其作为中和剂的潜力, 具体研究内容如下:

(1) 木质素焚烧灰分具有较好的中和能力, 其调节 pH 的能力介于碳酸钙和氢氧化钙之间。

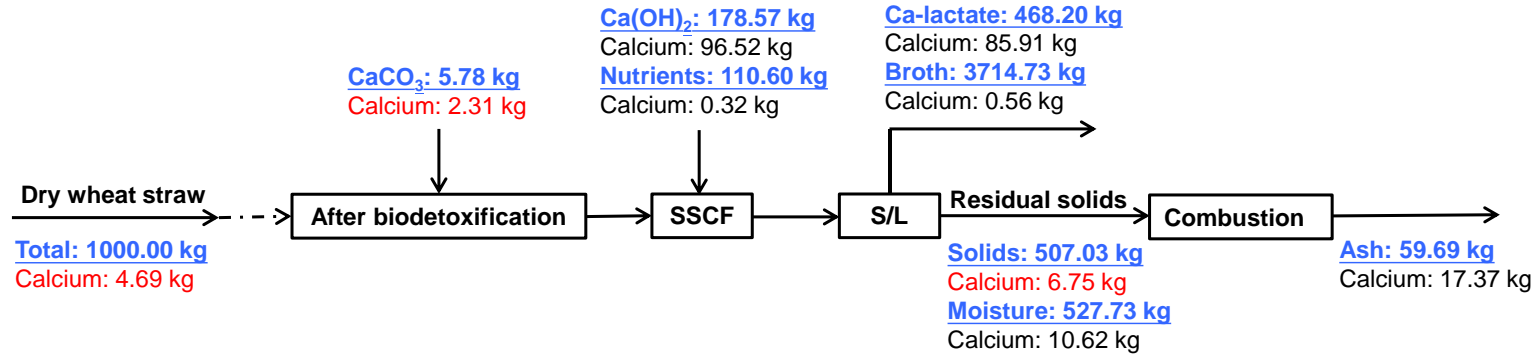
(2) 对木质素焚烧灰分进行 SEM/EDX, XRD 和 FTIR 表征, 揭示其中含有大量的钙元素, 其主要存在形式为碳酸钙。

(3) 木质素焚烧灰分作为中和剂用于了对酸预处理物料的中和, 最终乳酸产量达到了 94.6 ± 2.5 g/L, 发酵指标与以碳酸钙作为中和基相似。

(4) 木质素焚烧灰分进一步作为了乳酸发酵中和剂, 最终乳酸产量达到了 94.6 ± 2.5 g/L, 比碳酸钙作为中和剂提高了 17.6%。

(5) 物料平衡表明如果将木质素焚烧灰分完全用于类淀粉化干法生物炼制过程中预处理催化剂的中和以及乳酸发酵中和, 在年处理 30 万吨干小麦秸秆原料的生物炼制工厂内, 每年至少减少 867.0 吨的碳酸钙和 1232.1 吨氢氧化钙的使用。

(a) The mass balance of calcium element in bench scale



(b) Recovery and utilization of all calcium elements from ash

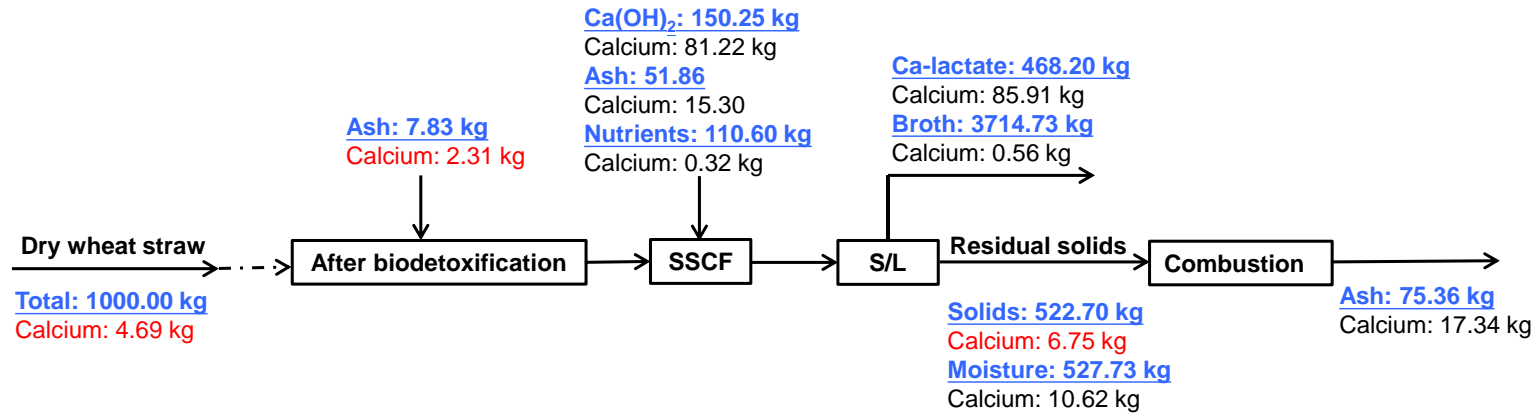


图 4.10 生物炼制中灰分（钙）的物料平衡和循环利用方法

Fig. 4.10 The mass balance of combustion ash (calcium) (a) and recovery (b).

注：对于预处理物料的中和所用中和剂计算仅简单的基于钙元素含量，而不考虑实际中和用量；由于焚烧灰分的中和能力大于碳酸钙，在实际使用中所用于物料中和的灰分应少于图中数值；由于氢氧化钙中和能力大于灰分，实际发酵中所用灰分无法等量的代替氢氧化钙。假设部分灰分替代乳酸发酵中和剂氢氧化钙不会造成乳酸产量下降。

第 5 章 玉米籽皮产纤维素乙醇过程的生物炼制加工链重构

5.1 引言

玉米籽皮是玉米湿磨工艺的副产物^[190]，其产量大约为 60-110 g/kg 干玉米^[191]，在中国年产可达百万吨^[192]。相比于其他农作物残留生物质，玉米籽皮有几个明显的特点：

(1) 其本身较为干净易获取，可直接从玉米淀粉工厂收集，不需要进行额外的清洗和粉碎等步骤^[193]；(2) 本身含有少量玉米淀粉^[24]，也可用于生物转化；(3) 较高的半纤维素含量。玉米籽皮中纤维素含量通常为 20-30%，半纤维素含量通常在 30%以上^[194]。半纤维素主链中高达 70%的木糖分子会被乙酰化^[195]，当半纤维素被水解时会释放出大量的游离乙酸。

多种预处理方式和脱毒方法用于了玉米籽皮的生物转化。Lin 等使用机械挤压的方法对玉米籽皮进行预处理^[196]，后续的乙醇产量达到了 29.08 g/L，转化率为 88.79%，但机械预处理能耗较高；Kurambhatti 等人采用热蒸汽预处理方法，提高了玉米纤维的酶水解得率，但该过程的纤维素酶用量较高，达到了 120 FPU/g 干物料^[197]；Beri 等人采用经过工程改造的 *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* 菌株对玉米籽皮进行生物处理^[198]，其纤维素乙醇得率提高了 24.0%，但生物预处理方法时间较长，效率较低。Buhner 等人详细研究了稀酸预处理玉米籽皮的脱毒方法^[199]，结果表明碱石灰法和活性炭吸附法结合的技术可以实现木糖醇的生产，但整个过程产生了较多的有毒废水；Prachand 等人通过水洗的方法对碱处理玉米籽皮中有毒物质进行去除^[200]，最终乙醇的得率仅为 5.5 g/100 g 干玉米籽皮，且过程中有较多的糖损失。

鉴于以往的工作在预处理技术和脱毒技术上的不成熟，本章探究了以干法生物炼制平台对玉米籽皮进行转化的可行性。干法生物炼制技术可以用于多种木质纤维生物质的转化，例如小麦秸秆、玉米秸秆、稻草、甘蔗渣、棉花秆等；但常规的干法生物炼制过程难以实现玉米籽皮的正常乙醇发酵。本章对目前常规的干法生物炼制加工链进行重新调整，从而实现了以玉米纤维素为底物高效生产纤维素乙醇。该方法也为匹配以液态生物质为原料的生物炼制工厂的连续化大规模工业生产模式提供技术蓝本。

5.2 材料与方法

5.2.1 原始物料

所使用的玉米籽皮购自山东省寿光市巨能金有限公司。该玉米籽皮是湿磨法玉米淀粉生产过程中的副产品之一。由于原始玉米籽皮含水量较高，达到了 60% (w/w) 左右，需先自然晾干至含水量为 20% (w/w) 左右后再进行组分测定。由于玉米籽皮本身结构较为松散，采用 NREL 两步酸解法会造成水解单糖的过度降解，从而无法测准纤维素和半纤维素含量。经过探索实验，修正了两步酸解时间分别为 25 min 和 1 h，所测定组分见表 5.1。

所用玉米粉来源及成分见 3.2.7。

5.2.2 酶和化学试剂

所用纤维素酶和试剂见 3.2.2。

5.2.3 菌株和培养基

所用生物脱毒菌株为第二章分离得到的菌株 *Paecilomyces variotii* FN89 (CGMCC 17665)，具体保存方法及培养基成分见 3.2.1。

所用乙醇发酵菌株为 *Saccharomyces cerevisiae* XH7，具体培养基成分见 3.2.1。

所用柠檬酸发酵菌株为黑曲霉 *Aspergillus niger* SIIM M288。 *A. niger* SIIM 288 可在 PDA 平板上生长，在 30 °C 条件下静置培养 7 天 PDA 平板即可长满黑色孢子。真菌孢子的收集见 2.2.3。 *A. niger* SIIM 288 种子培养基组分为 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 七水合硫酸镁、0.24 mg/L 五水合硫酸铜、1.1 mg/L 七水合硫酸锌、6.4 mg/L 七水合硫酸亚铁和 3.6 mg/L 氯化锰。

5.2.4 玉米籽皮预处理

玉米籽皮的预处理设备和操作参考 3.2.8，针对玉米籽皮的预处理条件有所调整。所用酸催化剂为柠檬酸，酸用量为 4% (w/w)。玉米籽皮和酸溶液的固液比为 2:1，共同投入到预处理反应器中搅拌 3 min。随后通入蒸汽，在 165 °C 下反应 2 min，随后排出预处理物料。

5.2.5 *P. variotii* FN89 液体生物脱毒

预处理的玉米籽皮首先进行预糖化，固体含量为 25% (w/w)，预糖化设备及操作条件见 3.2.10。预糖化过程的 pH 通过自动添加 5 M 氢氧化钠溶液被控制在 4.8。 *P. variotii* FN89 孢子液按照 1% (v/v) 接种量接种于 100 mL SM 培养基中，37 °C，300 rpm 培养 18 h，作为液体脱毒的种子液。预糖化液转移至 3-L 生物反应器内进行有氧生物脱毒。种子液按照 10% (v/w) 接种量接种于预糖化液进行液体脱毒。脱毒条件为 37 °C，500 rpm，1 vvm。每 6 h 测定水解液中的可发酵糖和各类抑制物含量。

5.2.6 在位乙醇发酵

脱毒后玉米籽皮水解液用于厌氧乙醇发酵。乙醇发酵种子液的培养参考 3.2.10。在脱毒水解液中按照 10% (w/w) 接种量接种酿酒酵母 *S. cerevisiae* XH7 种子液。发酵条件为 30 °C，200 rpm。发酵 pH 通过自动添加 5 M 氢氧化钠溶液控制在 5.5。

5.2.7 柠檬酸发酵

黑曲霉 *A. niger* SIIM 288 用于发酵生产柠檬酸^[116]。所用底物为干磨玉米粉。玉米粉的两步液化和糖化方法见 3.2.9 和 3.2.10。黑曲霉孢子液按照每 mL 10⁵ 个孢子的接种量接种于 100 mL 种子培养基，28 °C，300 rpm 培养 36 h，作为柠檬酸发酵种子液。种子液按照 10% (v/v) 接种于玉米粉水解液中进行柠檬酸发酵。发酵条件为 33 °C，300 rpm，1 vvm，不控制 pH。

5.2.8 元素浓度测定

发酵液和发酵残渣中的主要元素浓度通过电感耦合等离子体原子发射光谱法（725 ICP-OES, Agilent）进行测定。具体操作方法参照 3.2.12。

5.2.9 游离氨基酸测定

将发酵液寄送至科铭生物技术有限公司（苏州）对其中主要的十七种氨基酸含量进行测定。测定所用方法为 HPLC 法，具体操作如下：取上述待衍生的清液 200 μl 以及氨基酸标准品溶液 200 μl ，分别置于 1.5 mL EP 管中；往每个离心管中准确加入正亮氨酸内标溶液 20 μl ；分别加入三乙胺乙腈溶液 200 μL （确保 PH 大于 7），异硫氰酸苯酯乙腈溶液 100 μL ，混匀后 25 $^{\circ}\text{C}$ 下放置 1 小时；然后加入正己烷 400 μL 至离心管，摇晃后放置 10 min；取下层溶液，0.22 μm 针式过滤器过滤。使用 Rigol L3000 高效液相色谱仪，Kromasil C18 反相色谱柱（250 mm*4.6 mm, 5 μm ）测样。流动相 A：称取 7.6 g 无水乙酸钠，加水 925 mL，溶解后用冰醋酸调节 pH 至 6.5，然后加入乙腈 70 mL，混匀，用 0.45 μm 滤膜过滤；流动相 B：80%乙腈水溶液。进样量 10 μL ，流速 1.0 mL/min，柱温 40 $^{\circ}\text{C}$ ，测样时间为 45 min。

5.2.10 检测方法

柠檬酸、葡萄糖、木糖、乙酸、乙醇、5-羟甲基糠醛、糠醛按照 2.2.10 所述方法测定。

5.3 结果与讨论

5.3.1 常规生物炼制过程用于玉米籽皮生产纤维素乙醇

首先按照常规的生物炼制过程对玉米籽皮进行了转化（图 5.1 a），玉米籽皮首先进行了干式稀酸预处理，采用了 4.0%（w/w, DM）的硫酸作为催化剂。固态生物脱毒实现了对预处理玉米籽皮中所有游离糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸的去除。脱毒玉米籽皮进一步被用于了纤维素乙醇发酵。脱毒的玉米籽皮首先进行了 12 h 的预糖化，随后接入酿酒酵母 *S. cerevisiae* XH7，但最终无乙醇积累，使用常规生物炼制路线对玉米籽皮的转化失败。对所得预糖化液进行表征，发现尽管在生物脱毒阶段实现了对游离抑制物的去除，但预糖化阶段释放了高浓度的乙酸，最终乙酸浓度达到了 11.3 g/L，导致酿酒酵母 *S. cerevisiae* XH7 无法正常生长（图 5.1 b）。推测其原因可能是由于玉米籽皮中含有较高的半纤维素组分。当半纤维素被水解时会释放出大量的游离乙酸。由于干式稀酸预处理不存在游离水，且预处理时间较短（5 min），因此难以实现对玉米籽皮中高含量半纤维素的完全水解。尽管固态脱毒过程去除了预处理水解产生的游离乙酸，但所残余的半纤维素组分会在糖化阶段进一步水解，从而在预糖化液中积累高浓度乙酸，导致发酵失败。因此必须采用有效地手段使得玉米籽皮中半纤维素组分较为完全水解并释放出大部分乙酸，就可以在生物脱毒过程中对乙酸进行降解，从而避免在发酵过程中乙酸的大量积累。

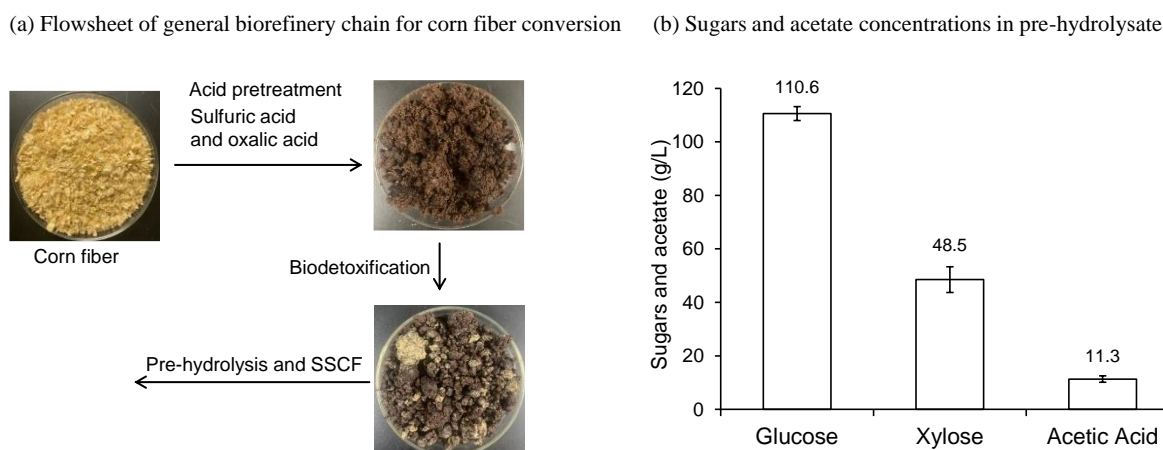


图 5.1 以玉米籽皮为底物常规生物炼制过程生产纤维素乙醇流程图

Fig. 5.1 The diagram of cellulosic ethanol production from corn fiber by general biorfinry chain (a) and concentraions of sugars and acetate in pre-hydrolysate (b).

注：预处理过程采用的干法预处理，硫酸或草酸均作为催化剂进行了尝试，酸用量为 4.0% (w/w, DM)。固态生物脱毒过程实现了对游离抑制物的去除。

5.3.2 商业柠檬酸预处理玉米籽皮及常规生物转化

首先采用了一种酸性较弱的有机酸-柠檬酸来代替常用强酸如硫酸和草酸对玉米籽皮进行预处理。这是由于玉米籽皮作为玉米湿磨法生产过程中的副产物，其本身结构已经变得较为松散。对玉米籽皮使用强酸作为催化剂可能会导致较多的糖损失和更多的抑制物生成。预处理柠檬酸的用量为 4% (w/w, DM)，玉米籽皮预处理前后的主要可发酵糖组分如表 5.1 所示。原始玉米籽皮中含有 $12.3 \pm 0.60\%$ 淀粉、 $26.50 \pm 1.10\%$ 纤维素和 $30.50 \pm 0.80\%$ 半纤维素。柠檬酸预处理过程完全水解玉米籽皮中的淀粉、很大比例的半纤维素 (68.90%) 和部分的纤维素 (6.38%)。预处理后的玉米籽皮中可发酵总糖含量为 61.5%，包括纤维素、半纤维素、葡寡糖、木寡糖、葡萄糖和木糖。除了表中所示的糖类，预处理玉米秸秆中还含有 $1.31 \pm 0.03\%$ 的 5-羟甲基糠醛和 $0.56 \pm 0.12\%$ 糠醛。部分半纤维素的水解释放了乙酰基，预处理玉米秸秆中还包括 $0.79 \pm 0.12\%$ 的乙酸。

表 5.1 玉米籽皮预处理前后的糖含量

	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-oligo	13.91 ± 0.34
	Glucose	1.98 ± 0.11
	Xylo-oligos	10.78 ± 1.12

Xylose 5.13 ± 0.61

对柠檬酸预处理的玉米籽皮进行常规生物炼制的生产纤维素乙醇。固态脱毒及后续的 SSCF 过程如图 5.2 所示。菌株 *P.variotti* FN89 对预处理玉米籽皮进行固态生物脱毒 (图 5.2 a)。所有游离的糠醛、5-羟甲基糠醛的乙酸均在 24 h 内被降解。脱毒过程的总可发酵糖损失为 4.5%。使用经过生物脱毒的玉米籽皮进行乙醇的同步糖化与共发酵 (SSCF) (图 5.2 b)。经过 12 h 的预糖化生成了 88.7 ± 3.6 g/L 葡萄糖和 41.5 ± 1.3 g/L 木糖 (总计 130.2 ± 4.8 g/L 可发酵糖)。柠檬酸预处理的玉米籽皮, 相比于硫酸预处理物料, 预糖化过程放出的可发酵糖较少 (图 5.1 b), 这表明柠檬酸预处理过程较为缓和, 由于所采用的发酵方式为 SSCF, 后续发酵过程仍能对残余底物继续进行水解。但最终乙醇的产量仅为 31.6 ± 1.4 g/L。预糖化过程释放了 6.86 ± 0.08 g/L 乙酸; 经过长时间的 SSCF 过程, 最终乙酸积累到 8.99 ± 0.25 g/L。如此高浓度的乙酸明显抑制了 *S. cerevisiae* XH7 的发酵性能, 使得发酵的乙醇得率仅为 0.17 g/g 发酵糖。但相比于硫酸预处理, 柠檬酸预处理在发酵初期的乙酸浓度较低, 使得酿酒酵母可以在水解液中存活。

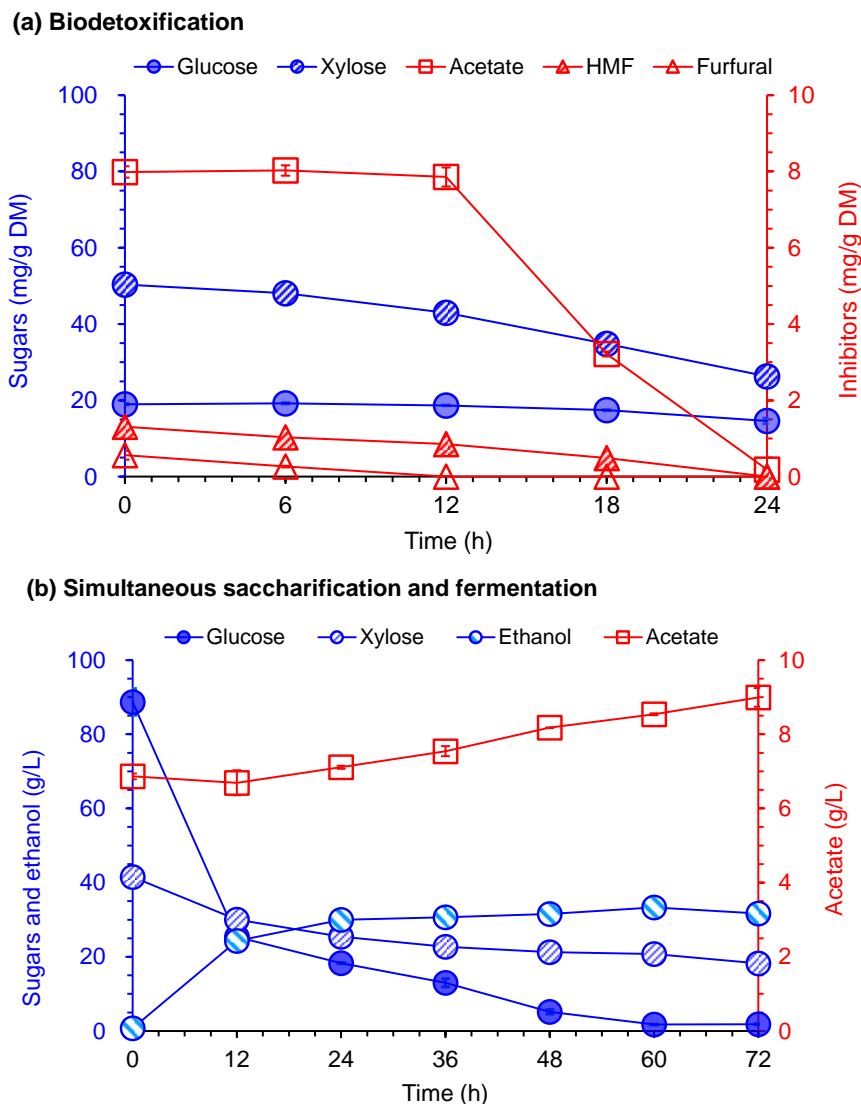


图 5.2 柠檬酸预处理玉米籽皮常规生物炼制转化

Fig. 5.2 Biodetoxification (a) and the subsequent simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) (b) in the regular biorefinery chain.

注：脱毒条件为 37 °C，1 vvm，24 h；SSCF 条件为 30 °C，180 rpm，72 h。

5.3.3 重构生物炼制链用于玉米籽皮高效转化

预处理玉米籽皮中残余半纤维素的水解，导致乙酰基的释放。高浓度的乙酸使得后续乙醇发酵失败。为了去除玉米籽皮水解过程中产生的过量乙酸，对常规生物炼制链进行了重构。如图 5.3 所示，不同于常规生物炼制过程的两级反应器固态脱毒-糖化发酵策略，重构的生物炼制过程采用了一锅法的糖化-脱毒-发酵策略。预处理物料首先进行预糖化，释放出大量的残余乙酸；随后对预糖化水解液进行在位液体脱毒去除乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛抑制物；随后得到的脱毒水解液用于乙醇发酵。在整个重构的生物炼制转化过程中有明显需要关注的几个问题：

- (1) 预处理玉米籽皮中的抑制物是否会影响糖化过程纤维素酶活性；
- (2) 生物脱毒菌株能否在高乙酸环境下正常生物解毒；
- (3) 粘稠水解液导致的溶氧降低，是否会影响菌株的脱毒能力；
- (4) 预糖化水解液中的可发酵糖浓度可以达到 100 g/L 以上，明显高于固态脱毒的可发酵糖水平，在液体脱毒过程中能否有效保留这些可发酵糖；
- (5) 如何在位偶联有氧的脱毒过程和厌氧的发酵过程。也就是说，如何在乙醇发酵过程中快速消除脱毒菌株对酿酒酵母生长的影响。

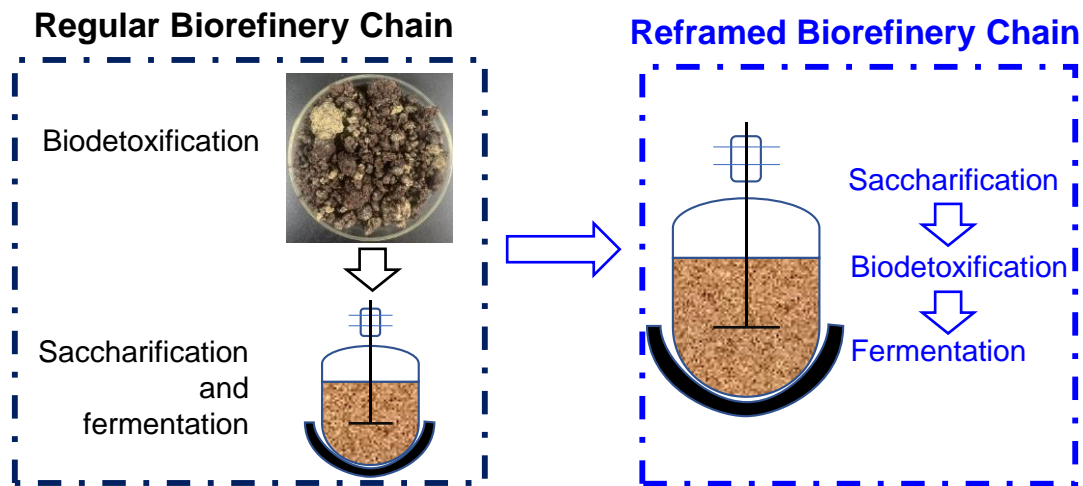


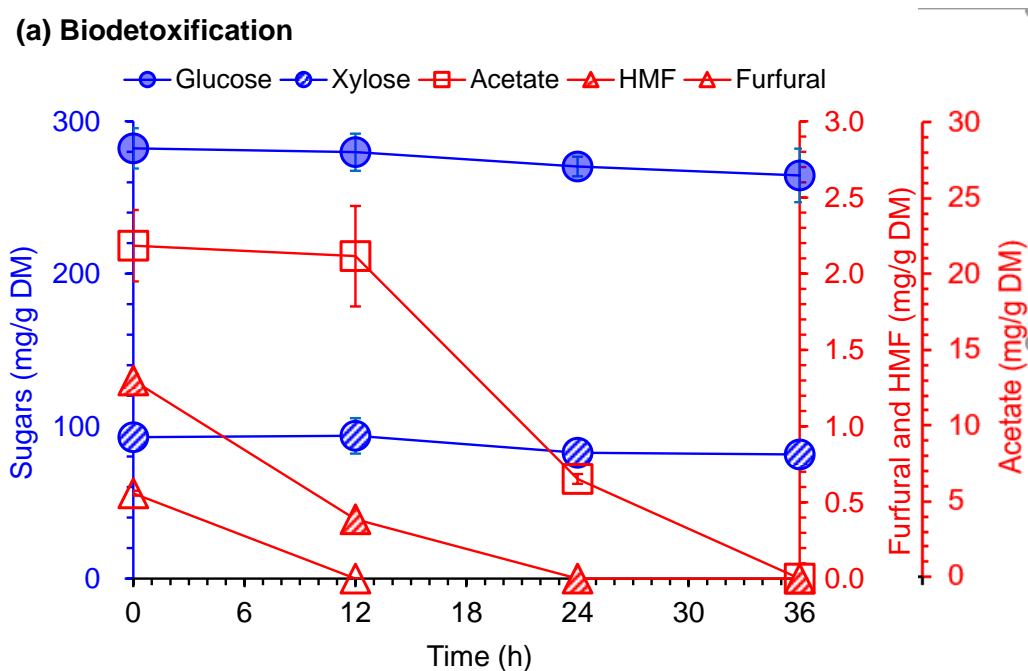
图 5.3 用于玉米籽皮高效转化的重构生物炼制过程

Fig. 5.3 Flowsheet of the reframed biorefinery chain for corn fiber conversion

图 5.4 表明了使用重构生物炼制技术对柠檬酸预处理玉米籽皮的转化过程。预处理玉米籽皮的初步酶水解、液体生物脱毒和乙醇发酵均在同一个 5-L 生物反应器内进行。12 h 的预糖化过程产生了 94.06 ± 4.41 g/L 葡萄糖和 30.94 ± 2.26 g/L 木糖，相当于每克干重玉米籽皮可产生 282.17 ± 13.23 mg 葡萄糖和 92.81 ± 6.78 mg 木糖。所产生的的可发

醇糖总量与常规生物炼制过程产生的可发酵糖基本类似，这表明柠檬酸预处理物料中的抑制物由于浓度相对较低，对纤维素酶活性和玉米籽皮的酶水解得率没有明显的消极影响。此外，预糖化过程中每克干重玉米籽皮的水解还释放出了 21.84 ± 2.34 mg 乙酸、 1.30 ± 0.04 mg 5-羟甲基糠醛和 0.56 ± 0.02 mg 糠醛。与只经过预处理的玉米籽皮相比，经过酶水解后，释放的乙酸浓度增加了 176%，这表明通过调整生物炼制链从预处理物料中释放大量残余乙酰基的目标已经实现。

对预糖化水解液的液体生物脱毒过程如图 5.4 a 所示。在接入 *P. variotii* FN89 后的 36 h 内，所有游离的乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛均被完全降解。脱毒过程仅损失了 29.03 mg/g DM 的可发酵糖（包括 17.64 mg/g 葡萄糖和 17.64 mg/g 木糖）。这表明 *P. variotii* FN89 菌株对高粘度的预糖化液有良好的脱毒能力；同时菌株优先于可发酵糖代谢抑制物的性质有效地保留了水解液中大量的可发酵糖。在脱毒水解液中直接接入酿酒酵母 *S. cerevisiae* XH7 进行后续的乙醇发酵（图 5.4 b）。经过 72 h 的乙醇发酵，最终乙醇浓度达到了 50.5 ± 0.6 g/L。相比于常规的生物炼制过程，乙醇产量提高了 60%（从 31.6 ± 1.4 g/L 提高至 50.5 ± 0.6 g/L，图 5.2 b）。然而在整个乙醇发酵过程中，从可发酵糖到乙醇的转化率仍然很低，只有 0.33 g/g，仅大约相当于理论得率的 66%。需要进一步对乙醇发酵过程中的影响因素进行探究。



(b) Simultaneous saccharification and fermentation

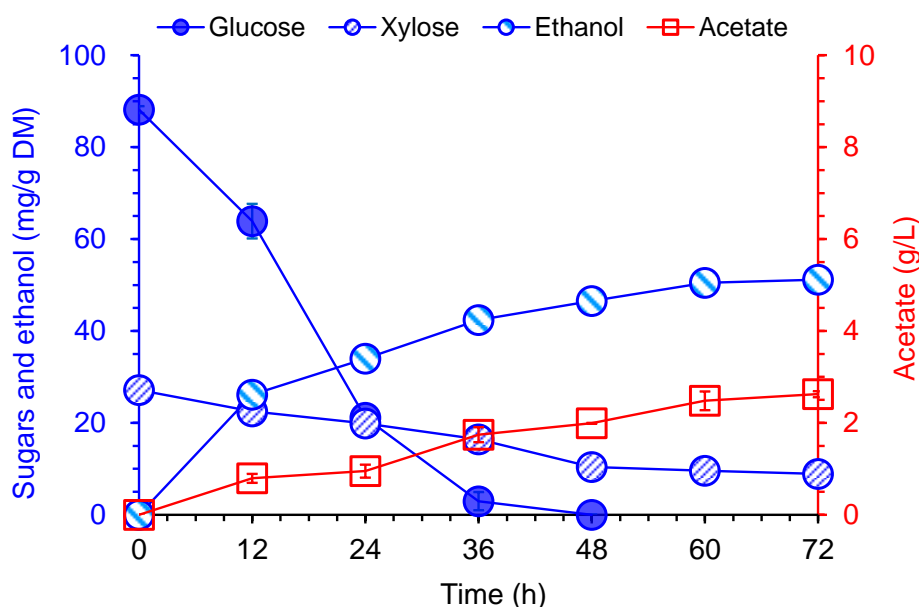


图 5.4 重构生物炼制链对玉米籽皮的脱毒和后续同步糖化共发酵过程

Fig. 5.4 Biodetoxification (a) and the subsequent simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) (b) in the re-framed biorefinery chain.

注：脱毒条件为 37 °C，500 rpm，1 vvm，36 h；SSCF 条件为 30 °C，180 rpm，72 h。

为了探究乙醇发酵过程中酿酒酵母活性较低的原因，对发酵液中的活菌数进行了涂布计算。在乙醇发酵的前 36 h 内（图 5.5 a），可以清楚的观察到脱毒菌株 *P. variotii* FN89 和乙醇发酵菌株 *S. cerevisiae* XH7 的菌落。在上述实验中，液体脱毒和乙醇发酵的两个过程，仅仅是以温度和氧气的供应为变化参数而藕联的。我们假定了在温度降低至 30 °C 且厌氧条件下脱毒菌株 *P. variotii* FN89 会迅速死亡，接入酿酒酵母后即可开始乙醇发酵。但文献查阅后可知，生物脱毒菌株 *P. variotii* 是一株嗜中温、可在氧气限制条件下存活的丝状真菌^[139]。*P. variotii* 也曾被报道过在厌氧条件下用于发酵生产乙醇，但效率较低^[201,202]。因此推测在厌氧乙醇发酵中，由于 *P. variotii* FN89 的存活，会与乙醇发酵菌株 *S. cerevisiae* XH7 产生竞争，导致乙醇发酵产量降低。

为了消除 *P. variotii* FN89 在乙醇发酵过程中的存活，在液体生物解毒完成后，在 50 °C 下进行了 12 h 的不通气灭活过程。随后温度降低至 30 °C 后接入乙醇发酵菌株 *S. cerevisiae* XH7。对发酵过程的菌落活力进行了涂布测定（图 5.5 b）。经过灭活后，乙醇发酵过程中无 *P. variotii* FN89 存活。此时，酿酒酵母的菌落数明显多于未灭活过程。这进一步表明在未灭活时，存在 *P. variotii* FN89 和发酵菌株 *S. cerevisiae* XH7 的竞争。此外还有另一组实验液证明了这一点，即脱毒后的水解液不接入酿酒酵母，关闭通气，经过 48h 培养，经检测，水解液中的葡萄糖和木糖浓度分别减少了 30g/L 和 10g/L 左右，这也表明了 *P. variotii* FN89 在厌氧条件下会消耗大量的糖。

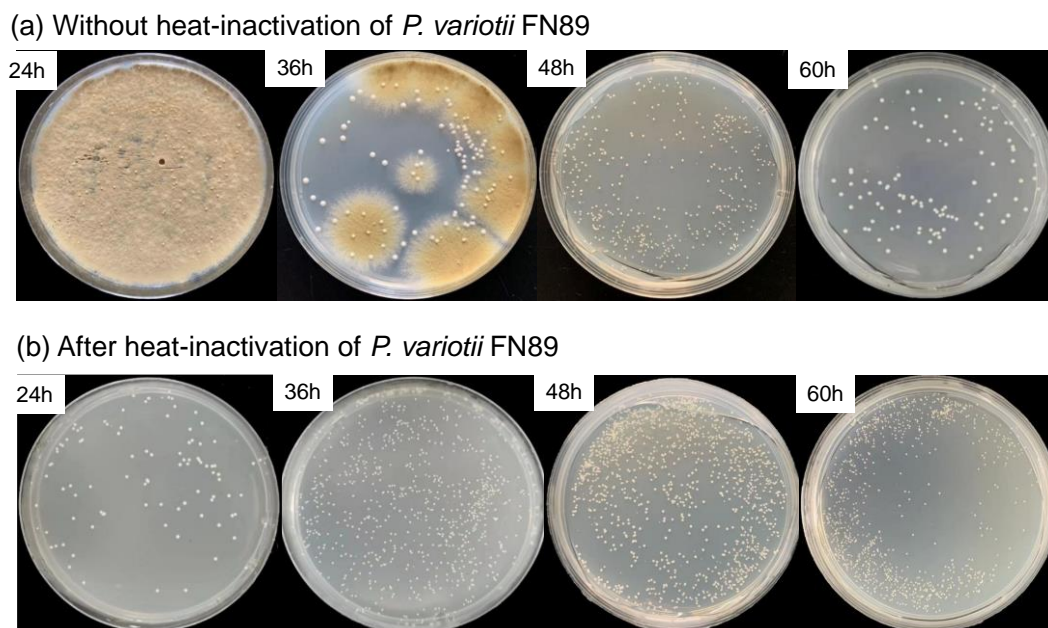


图 5.5 脱毒菌株 *P. variotii* FN89 和酿酒酵母 *S. cerevisiae* XH7 在发酵液过程的活性

Fig. 5.5 Viability of *P. variotii* FN89 and *S. cerevisiae* XH7 in the fermentation broth after biodegradation. (a) without heat-inactivation after biodegradation; (b) with 12h heat-inactivation at 50 °C after biodegradation.

注：涂布的稀释率为 10^{-6} 。涂布时，取 100 μL 样品均匀涂布于 YPD 平板上，30 °C 培养 72 h。

因此为了保证乙醇发酵菌株 *S. cerevisiae* XH7 的正常生长，基于上述提出的柠檬酸预处理和在位预糖化-脱毒-发酵策略，在对预糖化水解液的液态脱毒结束后，增加了在 50 °C 下的 12 h 灭活过程。在灭活完成后，温度降低至 30 °C 再接入 *S. cerevisiae* XH7 进行乙醇发酵。如图 5.6 所示，最终乙醇产量达到了 $70.2 \pm 1.6 \text{ g/L}$ ，相比于常规生物炼制过程，提高了 122% ($31.6 \pm 1.4 \text{ g/L}$ ，图 5.2 b)；相比于未灭活的重构生物炼制过程，乙醇产量提高了 39% ($50.5 \pm 0.6 \text{ g/L}$ ，图 5.4 b)。增加灭活过程后，从可发酵糖至乙醇的得率达到了 0.43 g/g，大约为理论得率的 90%。因此通过有效调整常规生物炼制过程，采用柠檬酸预处理-预糖化-液体脱毒-灭活-SSCF 技术路线，成功实现了以玉米籽皮为原料高效生产纤维素乙醇。

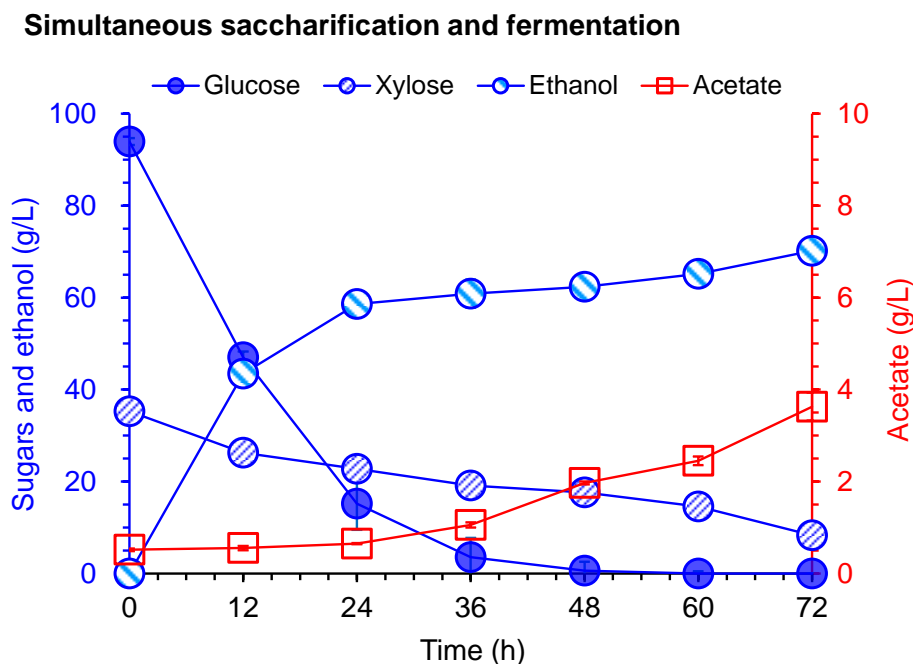


图 5.6 增加灭活过程后的玉米籽皮乙醇发酵过程

Fig. 5.6 Simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) in the re-framed biorefinery chain with heat inactivation after biodetoxification.

注：灭活条件：50 °C，12 h，不通气；SSCF 条件：30 °C，180 rpm，72 h。

5.3.4 全过程物料平衡和比较

对整个重构的生物炼制过程进行了物料衡算，旨在进一步表明该技术路线在控制废水排放和提高转化率方面的结果。物料平衡均采用上述实验结果进行计算。以干重为 100 kg 的玉米籽皮为初始物料，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，含有 4.00 kg 柠檬酸的水溶液与原始物料按照 2:1 的固液比被共同送入预处理反应器中。在 175 °C、5 min 的预处理反应过程中，共泵入了 54.41 kg 的饱和蒸汽。物料吸收了所有的酸溶液和蒸汽冷凝水，得到了 200.55 kg 的预处理物料。由于物料具有良好的吸湿性，预处理物料仍然处于干固颗粒状态。预处理过程中，部分葡聚糖和半纤维素分别水解成相应的 1.98 kg 葡萄糖和 5.35 kg 木糖。仍有 21.00 kg 木聚糖剩余。预处理过程中生成了 0.09 kg 糠醛、0.10 kg 5-羟甲基糠醛和 0.76 kg 乙酸抑制物。部分柠檬酸催化剂在预处理高温过程中热解，最终只剩余 2.64 kg。使用氢氧化钙对预处理物料进行 pH 调节，生成 2.64 kg 难溶的柠檬酸钙。柠檬酸钙为固体形式存在而不会被后续的生物脱毒过程降解。

采用在位一锅法进行预处理原料的预糖化-脱毒-乙醇发酵。预糖化的固体含量设置为 25% (w/w)，需要加入总质量为 215.95 kg 的纤维素酶和水。预糖化过程水解了大部分纤维素组分，但仍有部分木聚糖组分剩余。同时进一步释放了乙酰基，物料中乙酸质量总共达到了 1.47 kg。经过在位液态生物脱毒，全部游离的糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸

被降解,同时可发酵单糖(葡萄糖和木糖)产量有所提高,共得到 31.49 kg 葡萄糖和 11.94 kg 木糖。这主要由于高温灭活过程促进了玉米籽皮的二次糖化,使得更多的可发酵糖被释放。

随后在脱毒水解液中添加 2.88 kg 营养盐并接种乙醇发酵菌株进入后续同步糖化与共发酵(SSCF)过程。发酵完成后,发酵液经过乙醇精馏和固液分离操作,共得到 29.54 kg 乙醇,从物料中可发酵糖到乙醇的得率为 0.43 g/g,相当于理论得率的 86%。在预处理过程中单糖的过度降解和脱毒中部分糖的消耗,是造成乙醇得率低于理论得率的主要原因。发酵液中剩余了 3.31 kg 木糖和 1.44 kg 乙酸盐。经过生成的 25.26 kg 精馏水可以直接循环利用。精馏后发酵液经过固液分离得到 170.85 kg 固体残渣(含水 102.51 kg)作为 DDGS 副产品输出,并生成了 293.19 kg 的废水。在整个重构的生物炼制过程中,在精馏和固液分离之前无任何废水产生。最终生产单位 kg 乙醇的废水排放为 9.93 kg/kg,与第三章提到的玉米乙醇废水排放基本相当。

进一步与以往研究报道的玉米籽皮转化案例进行比较。如表 5.2 所示,稀碱法、热水、蒸汽膨爆及机械挤压等方法都被用于玉米籽皮预处理,并用于后续乙醇发酵。而对于预处理之后物料中抑制物的去除多采用水洗或者碱石灰的方法,导致产生大量废弃物。本研究在高固体含量下采用了重新构架的生物炼制路线(糖化-生物脱毒-发酵),获得了 70.17 ± 1.57 g/L 的高浓度乙醇产品,废水产生量为 9.9 g/g 乙醇,远低于其他研究(29.3-145.1 g/g 乙醇),具有良好的应用潜力。

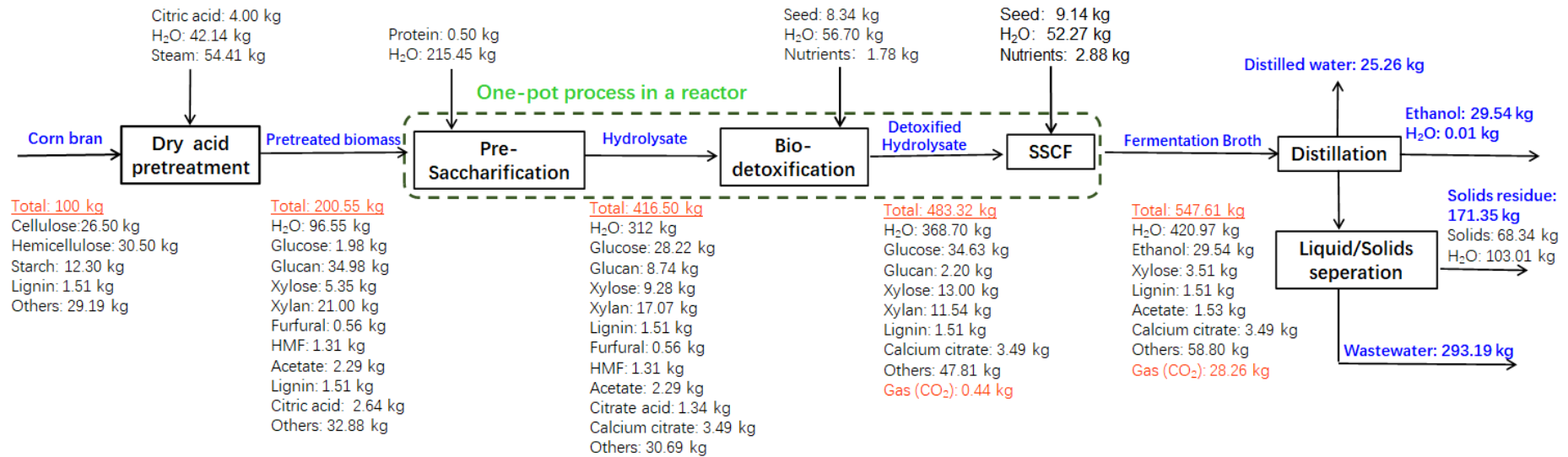


图 5.7 以玉米籽皮为原料生产纤维素乙醇的整体物料平衡

Fig. 5.7 Feedstock mass balance of cellulosic ethanol production from corn fiber.

注：原始物料中的其余组分包括自身的内源性灰分和蛋白等物质；假设在柠檬酸催化的预处理过程中，玉米籽皮中所有的淀粉都被水解成葡萄糖；所示的液体生物脱毒环节中已经包括了灭活的过程；预糖化、生物脱毒、灭活和 SSCF 是在同一个反应器内进行的（绿色字体），是一个连续的过程；玉米籽皮乙醇发酵后，经过精馏和固液分离得到的固体废物，由于其中仅含有少量木质素，因此不适合作为固体燃料焚烧，这些固体废物通常作为 DDGS 副产品输出。

表 5.2 以玉米籽皮为原料生产纤维素乙醇的总结（不包括与淀粉共发酵的情况）

Table 5.2 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 DM)	Ethanol titer (g/L)	Ethanol yield (g/g corn fiber)	Wastewater generation (g/g ethanol)	References
Steam explosion with SO ₂	Overliming	2%	22.5 FPU Celluclast 1.5L 5 IU Novozyme 188 50-80 U glucoamylase	6.9	0.49	~145.1	[203]
Dilute KOH and NaOH	Water washing	5%	25 FPU Celluclast 1.5L, 25 IU Novozyme 188	12.5	0.25	~78.2	[204]
Dilute NaOH	Water washing	~4.3%	~15 FPU (Spezyme CP)	3.3	0.077	~86.6	[200]
Liquid hot water	Water washing	7.8%	10 FPU Celluclast 1.5L/Novozyme 188	~20.0	~0.26	~29.3	[205]
Extrusion	None	~7%	~5.9 FPU Celluclast 1.5L, 38 CBU β -glucosidase and 1 FBG Viscozyme L	29.1	0.41	~34.4	[196]
Citric acid pretreatment	Biodetoxification	25%	~10 FPU CTec 2.0	70.2	0.28	~9.9	This study

5.3.5 自产柠檬酸用于玉米籽皮高效生物转化

本研究中所使用的柠檬酸催化剂，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^[206]。柠檬酸主要由微生物发酵生产，且技术成熟。柠檬酸发酵菌株主要为黑曲霉，在发酵过程中不需要控制 pH，柠檬酸产量可达到 100 g/L 以上。最终发酵液的 pH 会低于 1.8，这基本与柠檬酸的 pKa 相近。因此对于柠檬酸作为预处理催化剂，可以直接使用柠檬酸发酵液代替商业柠檬酸试剂，从而降低催化剂的成本。

如图 5.8 a 所示，柠檬酸发酵所用玉米淀粉来自于玉米淀粉湿磨法工艺。玉米淀粉经过两步液化和糖化后，直接接入柠檬酸生产菌株 *A. niger* M288，在有氧条件下进行柠檬酸发酵（图 5.8 b）。玉米淀粉水解共释放了 108.2 ± 5.0 g/L 的葡萄糖。经过 168 h 发酵最多得到柠檬酸 98.5 ± 5.5 g/L。发酵前 36 h 未在发酵液中检测到柠檬酸。随着发酵液 pH 下降至 3.0 左右，从 48 h 后逐渐在发酵液中检测到柠檬酸，最终发酵液 pH 在 1.6-1.7 之间。

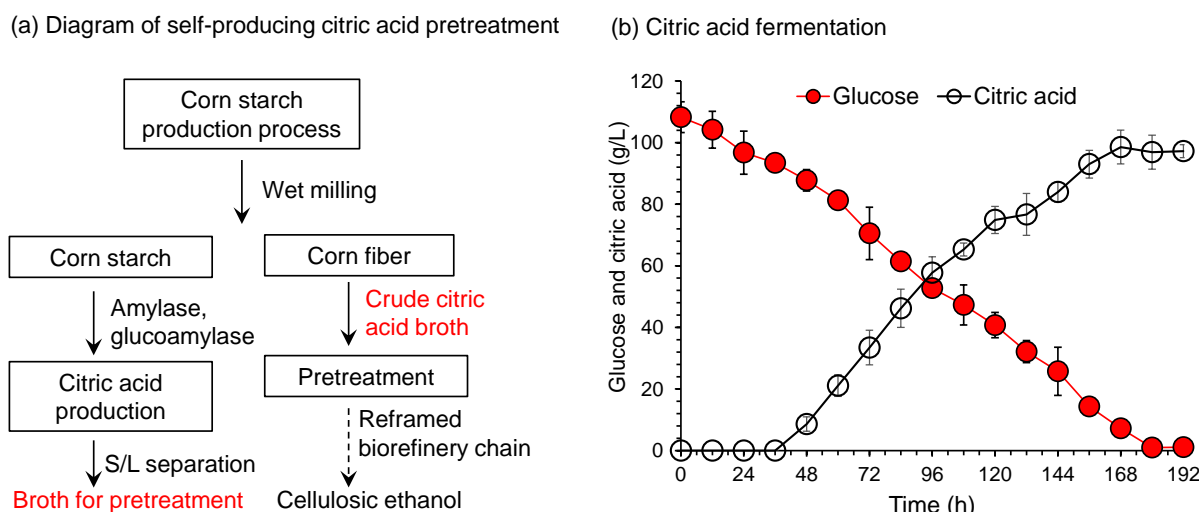


图 5.8 自产柠檬酸作为玉米籽皮预处理催化剂的流程及柠檬酸发酵

Fig. 5.8 Flowsheet of self-producing citric acid as pretreatment catalyst (a) and citric acid fermentation from corn starch (b)

注：柠檬酸发酵条件：初始 pH6.0，33 °C，300 rpm，1 vvm，192 h，发酵过程不控制 pH。

由玉米粉发酵得到的柠檬酸溶液直接稀释，用于玉米籽皮的预处理过程。所得到的预处理后玉米籽皮经中和后按照 5.3.3 的方法，通过重构的生物炼制过程进行纤维素乙醇发酵。液体生物脱毒过程如图 5.9 a 所示，在 36 h 内完成了对所有游离乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛的去除，总可发酵糖损失为 6.6%。脱毒水解液经过高温灭活后，接入乙醇发酵菌株 *S. cerevisiae* XH7。经过 72 h 厌氧发酵，最终乙醇浓度为 68.2 ± 0.4 g/L。从可发酵糖至乙醇的得率达到了 0.42 g/g，大约为理论得率的 80%。使用粗柠檬酸发酵液作为预处理催化剂的乙醇发酵效果与使用试剂级柠檬酸类似，实现了对催化剂成本的控制。

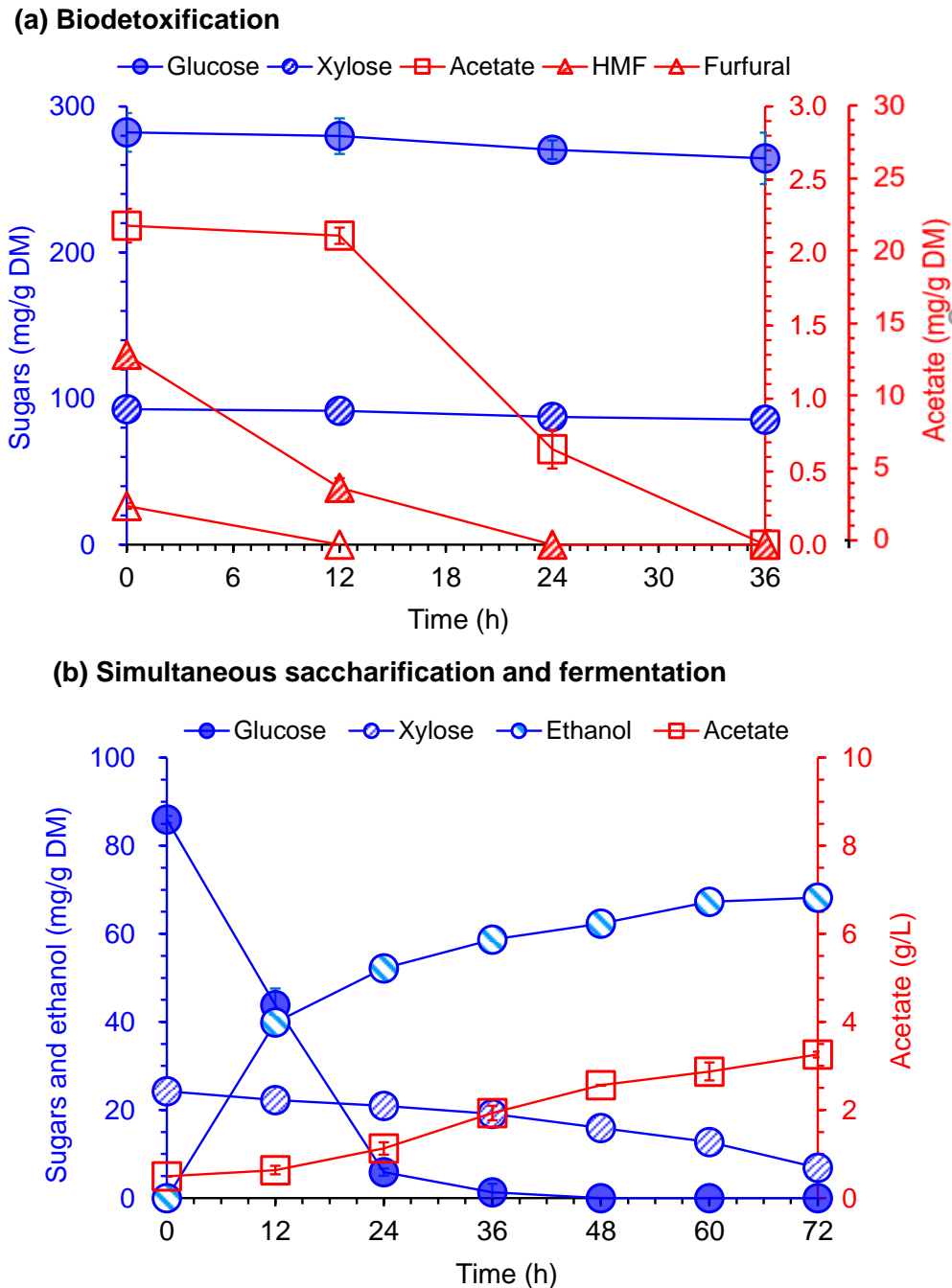


图 5.9 自产柠檬酸预处理及重构生物炼制链对玉米籽皮的脱毒和后续同步糖化共发酵过程

Fig. 5.9 Biodetoxification (a) and the subsequent simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) (b) in the re-framed biorefinery chain using self-produced citric acid pretreated corn fiber.

注：脱毒条件为 37 °C，500 rpm，1 vvm，36 h；SSCF 条件为 30 °C，180 rpm，72 h。

5.3.6 发酵残液和固体表征

柠檬酸作为预处理催化剂，相比于硫酸，不会额外引入硫元素。由于柠檬酸的酸性较弱，用于中和预处理物料中柠檬酸所使用的氢氧化钙用量会降低，这也使得柠檬酸作为催化剂中的残液和固体残渣中钙元素含量较硫酸催化剂低（图 5.10）。同时硫酸预处理玉米籽皮残渣中含有大量的硫元素，分别是柠檬酸预处理和自产柠檬酸预处理的 26.1

倍和 21.6 倍，因此使用柠檬酸作为催化剂可有效避免固体残渣焚烧时造成的硫氧化物排放问题。

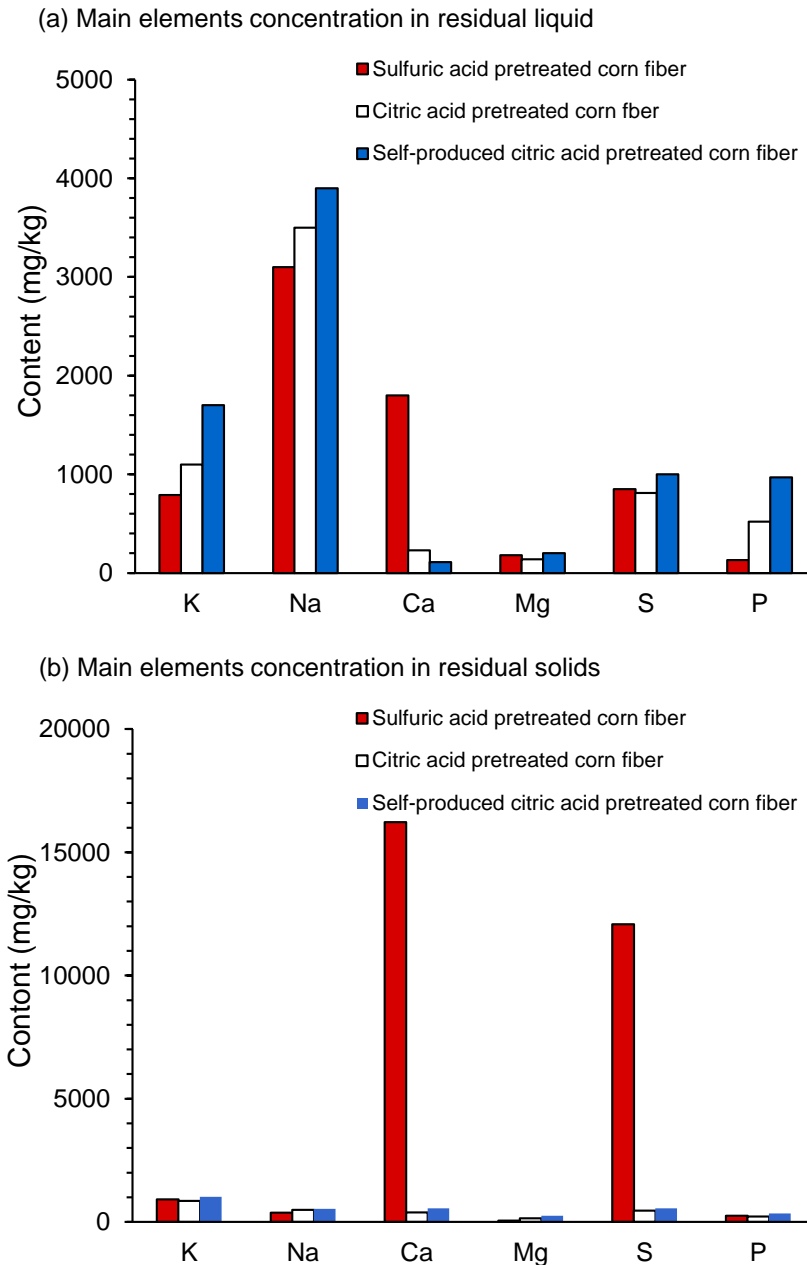


图 5.10 玉米籽皮发酵残液和残渣中的主要元素浓度

Fig. 5.10 Main elements content in residual solid liquid (a) or solids (b) after cellulosic ethanol fermentation from corn fiber by sulfuric acid pretreatment, citric acid pretreatment, or self-produced citric acid pretreatment.

注：三种催化剂分别预处理玉米籽皮后，均通过重构的生物炼制过程进行了乙醇发酵。发酵液精馏后进行固液分离，分别测定液体和固体残渣中的主要元素含量。

在图 5.7 中，玉米籽皮总含有约 30%左右的无法被准确性的组分，这一部分主要为自身的内源性灰分和蛋白质组分。推测在高温酸预处理过程可能会使得玉米籽皮中蛋

白质水解,从而释放出部分游离氨基酸。对经柠檬酸预处理的玉米籽皮发酵液中的 18 种常见氨基酸浓度进行了测定,结果如表 5.3 所示。所测定的 18 中氨基酸中, Asp (天冬氨酸)、Gly (甘氨酸)、Ala (丙氨酸)、Pro (脯氨酸)和 Leu (亮氨酸)的浓度最高。但总体来说,发酵液中单一游离氨基酸浓度并不高,不具备实际再利用的价值。

表 5.3 发酵液中主要游离氨基酸浓度

Table 5.3 Concentraions of main amino acids in broth

Asp ($\mu\text{g/mL}$)	Gly ($\mu\text{g/mL}$)	Ala ($\mu\text{g/mL}$)	Pro ($\mu\text{g/mL}$)	Leu ($\mu\text{g/mL}$)
101.8 ± 53.3	141.0 ± 101.7	190.1 ± 137.0	253.8 ± 144.5	110.6 ± 40.0

注:仅展示了超过 100 $\mu\text{g/mL}$ 浓度的氨基酸。

5.4 本章小结

玉米籽皮中过高的半纤维素含量会在水解时释放大量的游离乙酸,如果不能对大量的游离乙酸进行有效去除,会严重影响后续的生物转化。本章节探究了使用干法生物炼制技术以玉米籽皮为原料生产纤维素乙醇的可行性。具体研究内容如下:

(1) 传统的预处理-脱毒-酶水解-发酵的生物炼制过程难以实现对玉米籽皮的高效转化,主要原因在于预处理残留的半纤维素组分水解,导致其中的乙酰基水合产生大量乙酸,严重抑制了乙醇发酵菌株的生长和代谢。

(2) 使用酸性较弱的柠檬酸代替硫酸作为预处理催化剂,减少了可发酵糖的损失以及残渣和废液中过量硫元素的排放。

(3) 对常规生物炼制过程进行了重新调整,以预处理-预糖化-液体脱毒-发酵的过程代替传统的预处理-固态脱毒-发酵过程,使乙酰基在脱毒之前完成最大限度的释放和水合,再在后续的液态脱毒中进行完全的降解。该方法实现了对玉米籽皮的纤维素乙醇转化,但得率较低,其原因在于脱毒菌株在乙醇发酵过程中的存活导致可发酵糖的消耗。

(4) 继续在重构的生物炼制过程中对脱毒菌株进行了灭活,以预处理-预糖化-液体脱毒-灭活-发酵过程实现了对玉米籽皮的高效转化,乙醇产量达到 $70.2 \pm 1.6 \text{ g/L}$,得率为 0.43 g/g 可发酵糖。整个过程的废水排放接近了玉米乙醇干磨过程。

(5) 采用未经纯化的柠檬酸发酵液替代试剂级柠檬酸以降低催化剂成本,仍实现了对玉米纤维有效地预处理和转化,最终乙醇产量达到了 $68.2 \pm 0.4 \text{ g/L}$,得率为 0.42 g/g 可发酵糖。

第 6 章 干法生物炼制平台上的木质纤维素酸水解技术重新评价

6.1 引言

木质纤维素的直接酸水解技术已经基本退出了生物炼制技术选项，其核心因素不仅在于过低的可发酵单糖得率，而且在于水解液中的高浓度抑制物无法有效去除，使得后续乙醇发酵无法进行。随着生物炼制技术的进步，现阶段有必要对酸水解技术进行重新探讨。

高效生物脱毒微生物的发现是生物炼制技术的一个重要突破^[207]。两株已发现的真菌树脂枝孢菌 *A. resiniae* ZN1 和宛氏拟青霉 *P. variotii* FN89，可以将高浓度的呋喃醛、有机弱酸和酚醛等抑制物快速和终极降解到 CO₂ 和水，并在脱毒期间优先利用呋喃醛等抑制物作为碳源而不消耗可发酵单糖^[121,128-130,208]。这一技术促进了酶水解生物炼制技术以类似玉米干法技术的方式进行操作，纤维素乙醇的生产技术水平接近了玉米乙醇，废水排放与玉米乙醇相当^[113,114,208]。尽管酸水解生成的呋喃醛类抑制物远高于预处理过程，但仍有可能将生物脱毒技术应用于降解酸水解液中的高呋喃醛抑制物降解，从而为突破这一关键障碍提供一个强有力的技术支撑。同时，复合酸催化剂被发现在预处理过程中相比于单一酸催化剂敏感程度范围更广且活性更高^[209,210]，会更有效的控制预处理强度，减少单糖的过度降解^[211,212]。将复合酸催化剂应用于木质纤维素原料的酸水解，可能会减少单糖进一步转化为呋喃醛，进而减少单糖损失和对生物脱毒的压力。

本章首先对玉米秸秆原料在高固含量下的混合酸(硫酸、草酸、磷酸)水解参数(反应温度、酸浓度、时间、固含量等)进行了优化，尝试获得更高含量和得率的可发酵单糖。然后，采用半连续高效液体生物脱毒的方式对有效脱除了水解液中的高浓度乙酸、羟甲基糠醛和糠醛抑制物，使之具备微生物发酵的品质；最后，采用上述生物脱毒后的玉米秸秆酸水解液进行乙醇发酵。在 Aspen Plus 平台上对完整的酸水解和酶水解生物炼制过程进行严格流程模拟，对酸水解的单糖得率损失与零纤维素酶成本之间的平衡进行了讨论，从而在目前的技术水准下对酸水解技术的价值进行最终的评价。

6.2 材料与方法

6.2.1 菌株，培养基和培养环境

所用生物脱毒菌株 *Paecilomyces variotii* FN89 具体保存方法及培养基参考 2.2.1。

所用乙醇发酵菌株 *Saccharomyces cerevisiae* XH7 具体保存方法及培养基参考 3.2.1。

6.2.2 试剂

纤维素酶和化学试剂的来源与用途见 3.2.2。

6.2.3 原始物料

本章所用物料为 2018 年春季于河南省南阳市收获的玉米秸秆。原料经过水洗除尘、风干、粉碎，通过直径为 10 mm 的筛网。使用 NREL 的两步酸解法测定其中的主要组

成为 28.4%纤维素、22.6%木聚糖、18.2%木质素和 7.4%的灰分。

6.2.4 酸水解过程

酸水解过程的设备和操作参考干式稀酸预处理过程，见 3.2.8，但在操作条件上有所不同。酸水解所用的催化剂为硫酸、草酸和磷酸的混合酸，总的酸用量为 8.5-18.0% DM。水解初始固体含量为 10-60%(w/w)，相应的固液比为 3:2-1:10。反应温度为 175-195 °C，反应时间为 5-25 min。反应结束后，酸水解产物从预处理反应器底部排出。

6.2.5 酸水解产物生物脱毒和乙醇发酵

制备脱毒菌株 *P. variotii* FN89 液体脱毒种子液的方法见 5.2.5。

酸水解产物首先使用碳酸钙粉末调节 pH 至 5.0 左右。由于水解液中所含抑制物浓度过高，*P. variotii* FN89 难以对其直接进行生物解毒。对酸水解产物的生物脱毒采用半连续液体发酵的方法。脱毒在 3-L 反应器内进行，装液量为 1 L。600 mL 酸水解产物首先和 400 mL SM 培养基（此时 SM 培养基中的可发酵糖含量调整为 40 g/L 葡萄糖和 20 g/L 木糖）进行混合。按照 10% (w/w) 接种 *P. variotii* FN89 种子液。在 37 °C，200 rpm 培养 24 h，此时无乙酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛剩余。发酵过程不需要添加营养物质。每 24 h 使用 400 mL 中和的酸水解产物置换发酵液。脱毒水解液在 50 °C 下灭活 12 h，用于乙醇发酵。

乙醇发酵种子液培养及发酵条件见 5.2.6。用于乙醇发酵的营养盐不需要添加磷酸二氢钾，因为磷酸作为了酸水解催化剂，经中和后可以作为磷酸盐用于乙醇发酵。

6.2.6 得率计算

酸水解的中从纤维素或木聚糖水解释得到的葡萄糖 (g/g cellulose) 和木糖 (g/g xylan) 得率按照公式 (1) 进行计算：

$$\text{Sugar yield (g/g)} = \frac{C_1 \times m_1 \times (1 - D)}{m_0 \times C_0} \quad (1)$$

其中 C_1 是水解液中的糖浓度（葡萄糖或木糖，g/L）； m_1 是一批次酸水解产物的重量； D 是酸水解产物的固体含量（近似的认为其中的液体组分密度为 1 g/mL）； m_0 是原始玉米秸秆的干重； C_0 是玉米秸秆的纤维素或木聚糖的含量（% DM）。

酸水解过成的纤维素转化率（%）按照公式 (2) 计算：

$$\text{Conversion ratio (\%)} = \frac{m_0 \times C_0 - m_1 \times D \times [C_1]}{m_0 \times C_0} \quad (2)$$

其中 $[C_1]$ 是酸水解产物中固体残渣的纤维素含量。

6.2.7 Aspen Plus 模型

基于 NREL 的模型^[182]和之前建立的干法生物炼制技术模型^[113]在 Aspen Plus 软件（version 11.0, Aspen Tech Co., Cambridge, MA, USA）上建立了酸水解工艺仿真模型。酸水解工艺主要包括原料处理（A100）、直接酸水解（A200）、原位液体脱毒和乙醇发酵（A300）、乙醇回收（A400）和固废处理（A500）五个模块。原料储存、废水处理和公

用事业部分不包括在内。具体的模型及参数根据实际的操作和测量结果进行了调整，主要包括以下几个方面：

(1) 酸水解/预处理过程所用蒸汽为 1.6 MPa (273 °C) 过饱和蒸汽。根据当地热电厂的报价，蒸汽价格为\$31.3/ton。(https://www.chplaza.net/article-5738-1.html) 过饱和蒸汽的用量代表了反应的能耗。

(2) 按照实际测定，大约 30%的草酸催化剂在反应器内被分解。

(3) 按照实际测定，大约 6%的 5-羟甲基糠醛被进一步分解成为乙酰丙酸。生成的乙酰丙酸对后续脱毒及微生物发酵影响不大，在液体脱毒过程中仅降解了 20%左右。

(4) 生物转化过程由原先的固体脱毒、预糖化、SSCF 转变为在位的液体脱毒和乙醇发酵。

(5) 乙醇精馏是通过粗馏塔 (T501) 和精馏塔 (T502) 提纯的。精馏能耗为两个塔的总能耗。粗馏塔 (T501) 分离溶解的 CO₂ 和大部分的水。粗馏塔共 16 块塔板，从顶部第二块板进料，摩尔回流比要求为 3:1，再沸比为 0.21，塔顶温度约为 60 °C。精馏塔 (T502)，其用于浓缩乙醇至共沸物状态。粗馏塔的馏出物 (物流 507) 被直接送入精馏塔 T502，含 35 块板。粗馏塔 T501 的乙醇蒸汽出物 (物流 507) 被送入第 14 块板 (从顶部计算)。含有较高浓度乙醇的分子筛循环物流 (物流 509) 在第 6 块板通入。要求摩尔回流比为 3.2:1 以得到塔顶含有 92.3%的乙醇混合物及塔底 0.5%的乙醇。乙醇产品离开精馏塔后其浓度大概为 92.3%，然后进一步通过气相分子筛吸附脱水浓缩至 99.5%。粗馏塔的底部物流含有未被转化可溶和不溶物质。不溶性物质使用板框压滤机脱水，然后被送到燃烧炉)。中。乙醇在精馏塔的损失设定在 20%左右。

(6) 固体残渣焚烧的热损失设定为 15%。

6.2.8 技术经济分析

能耗与经济学分析基于年处理 30 万吨干物料的生物炼制工厂的建设，年操作时间为 8000 h。2013 年作为某一确定年的设备、化学品和劳务报价调整的参考年。根据官方公布的计算周期，美元和人民币的汇率被设置为 6.38，可能会随时发生变动。设备的设定和投资、现金流分析均参照之前的研究^[113]。

6.2.9 分析方法

葡萄糖、木糖、乙酸、乙醇、5-羟甲基糠醛、糠醛、香草醛、丁香醛、4-HBA 及其醇酸类衍生物的浓度测定使用 HPCL 方法，参考 2.2.10。

6.3 结果与讨论

6.3.1 基于干式稀酸水解的玉米秸秆高固体含量下直接水解的参数优化

常规稀酸水解技术由于没有有效去除抑制物的手段，通常需要在低固体含量原料条件下进行以尽量降低抑制物浓度^[213]。这意味着可发酵单糖和发酵产物的低浓度，也意味着大量新鲜水的消耗和有毒废水的排放。新的生物脱毒技术出现，不仅可以选择性的

完全降解高浓度抑制物，同时大部分可发酵糖也得以保留。因此本研究可以在不考虑高浓度抑制物生成的限制下，对玉米秸秆酸水解过程的催化剂种类、用量，水解反应温度、时间，原料固含量等参数进行优化，尝试获得更高含量和得率的可发酵单糖（表 6.1）。高的反应温度显著加快纤维素或半纤维素水解成葡萄糖和木糖的反应速度，但也同时增加了水解反应生成的单糖向呋喃醛转化反应的速度^[71,214]。对于玉米秸秆在高固含量和硫酸催化剂水解反应条件下，硫酸用量为 8.5% (w/w, DM)，185 °C 下葡萄糖浓度最高，是一个较为合适的反应温度（表 6.1 a）。但在此反应温度下，木糖被过度降解转化为糠醛副产物的趋势严重，需要寻找一个更合适的酸水解条件来减少单糖的过度降解。

酸催化剂的种类和复合配方是酸水解过程的关键之一。有研究表明在稀酸预处理过程中，有机酸和无机酸的混合酸水解比起单一无机酸的催化活性和单糖得率有正面的影响^[209,211,212]。如表 6.1 b 所示，设计了硫酸、草酸和磷酸的混合酸组合用于玉米秸秆的直接水解。硫酸是一种最常用于木质纤维素水解的廉价无机酸催化剂^[212]；草酸是一种可生物降解二元有机强酸，对 β -1,4-糖苷键具有很强的水解作用，同时在水解过程中会产生较少的呋喃醛^[215,216]；磷酸作为另外一种酸性较强的无机酸，有报道称磷酸在水解半纤维素时产生的糠醛较少，并且经过水解反应中和后的磷酸盐可以作为乙醇发酵的营养物质，减少发酵成本^[217,218]。在本研究中磷酸添加量控制在 0.5% DM 时与后续发酵磷酸盐（2 g/L KH_2PO_4 ）添加量一致。在相同用量的硫酸或草酸（均为干玉米秸秆重量的 8.5%）和相同水解条件下，葡萄糖的浓度和得率类似，分别为 18.6 ± 2.8 vs. 17.4 ± 0.7 g/L 以及 0.13 vs. 0.13 g/g cellulose。而使用草酸催化剂保留了更多的木糖（0.12 vs. 0.06 g/g xylan）；同时使用草酸催化剂水解产生的 5-羟甲基糠醛和糠醛更少，相比于硫酸催化剂分别减少了 53.3%和 19.3%。对于 8.0%硫酸与 0.5%磷酸的组合，与单独使用 8.5% DM 硫酸相比水解效果基本类似。通过对一定浓度硫酸、草酸和磷酸的初步组合，当混合酸的组合为 6.0%硫酸+0.5%磷酸+6.0%草酸时，葡萄糖得率最高，达到了 0.31g/g cellulose。

经过对反应过程中初始固含量（表 6.1 c）和酸用量的优化（表 6.1 d）后，40%初始固含量，7.25% DM SA+7.25% DM OA+0.5% DM PA 酸用量下，葡萄糖得率最高，达到了 0.49 g/g cellulose。对反应时间进行进一步的合理控制（表 6.1 e），即在 185 °C 维持 15 min 水解后，停止通入蒸汽，继续维持搅拌 5 min，以此来减少水的输入从而提高水解液中糖浓度。由于反应器具有良好的保温层，最终反应器内温度仍能维持在 182.1 °C。此时葡萄糖和木糖的浓度进一步提高分别达到了 51.1 ± 1.7 g/L 和 18.1 ± 0.7 g/L，同时生成了 10.9 ± 0.2 g/L 乙酸、 4.4 ± 0.2 g/L 5-羟甲基糠醛以及 4.3 ± 0.2 g/L 糠醛。水解后纤维素组分的转化率达到 72.7%，木聚糖组分转化率接近 100%。但最终葡萄糖和木糖的得率分别为 0.50 g/g cellulose 和 0.22 g/g xylan。一般来说，由于纤维素酶在木质素会发生不可逆的非生产性吸附，高固体负荷下的酶水解反应是不完全的^[219]。对不同条件下所得的水解液中的固体残渣进一步进行组分测定可以发现，经过高温酸解后，残渣中仍有部分纤维素残留。这表明，在高固体含量的酸水解过程中也出现了纤维素的不完全水解（25.6%-64.5%），这也对进一步提高葡萄糖得率有所限制。

表 6.1 酸水解过程参数优化获得最高可发酵糖产量

Table 6.1 Maximizing the fermentable sugars yield by varying hydrolysis parameters

	Glucose (g/L)	Cellulose conversion (%)	Glucose yield (g/g cellulose)	Xylose (g/L)	Xylose yield (g/g xylan)	Acetate (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)
(a) Temperature (°C)	(20 min; 1200 g dry CS (60 % loading, w/w); 8.5% sulfuric acid based on dry CS)							
175	8.2±2.5	35.5	0.04	35.4±1.3	0.21	8.1±0.0	3.6±1.2	3.3±0.1
185	24.1±1.2	38.8	0.15	10.3±0.0	0.08	9.1±0.0	4.5±0.0	4.1±0.0
195	20.4±2.0	55.3	0.15	4.8±0.2	0.04	10.6±0.1	5.00±0.5	2.5±0.0
(b) Acids cocktail (% DM)	(185 °C; 20 min; 1200 g dry CS (60 % loading, w/w); SA, sulfuric acid; OA, oxalic acid; PA, phosphoric acid)							
8.5%SA	18.6±2.8	51.6	0.13	7.0±0.2	0.06	9.1±0.3	4.4±0.2	3.8±0.2
8.5%OA	17.4±0.7	50.5	0.13	12.3±1.4	0.12	9.5±0.2	2.1±0.1	3.0±0.5
8.0%SA+0.5% PA	19.6±1.0	46.0	0.15	9.3±0.4	0.09	9.4±0.4	4.1±0.1	4.0±0.1
6.0%SA+0.5%PA+2.0%OA	39.6±0.5	54.0	0.29	9.5±0.1	0.09	10.7±0.4	4.9±0.1	3.4±0.2
6.0%SA+0.5%PA+6.0%OA	40.8±1.4	64.2	0.31	10.3±0.3	0.10	10.9±0.4	4.8±0.2	2.8±0.1
8.0%SA+0.5%PA+2.0%OA	34.4±2.2	65.2	0.26	8.8±0.7	0.08	10.9±0.8	4.1±0.4	2.6±0.1
8.0%SA+0.5%PA+6.0%OA	30.6±1.2	78.0	0.22	7.7±0.6	0.07	10.4±1.0	3.9±0.1	2.9±0.0
(c) Solids loading (% w/w)	(185 °C; 20 min; 167, 333, 500, 667, 833 g dry CS; 6.0% SA + 0.5% PA + 6.0% OA. *ND, not detected)							
10	3.0±0.2	56.7	0.12	7.8±0.4	0.39	1.6±0.6	0.2±0.0	ND*
20	10.0±0.4	67.1	0.21	12.6±0.5	0.34	3.8±0.5	0.8±0.0	0.8±0.0
30	18.8±0.5	67.8	0.27	15.1±0.4	0.27	5.9±0.1	1.5±0.1	1.8±0.2
40	33.8±1.9	65.2	0.44	12.7±1.5	0.20	8.5±0.0	3.0±0.1	2.5±0.0
50	36.6±1.2	72.3	0.32	15.3±0.2	0.17	8.6±0.3	3.6±0.1	2.4±0.1
(d) Catalysts dosage (% DM)	(185 °C; 20 min; 667 g dry CS (40% solids, w/w))							
4.25%SA+0.5%PA+4.25%OA	26.1±0.7	52.6	0.33	23.6±0.7	0.38	7.9±0.6	2.1±0.0	2.6±0.0
7.25%SA+0.5%PA+7.25%OA	39.4±0.8	73.0	0.49	13.4±0.4	0.21	9.1±0.2	3.5±0.1	2.7±0.3
8.75%SA+0.5%PA+8.75%OA	34.9±0.7	71.6	0.48	11.1±0.5	0.19	9.3±0.2	4.4±0.1	2.7±0.2
(e) Reaction time (h)	(185 °C; 20 min; 667 g dry CS (40% solids, w/w); 7.25% SA + 0.5% PA + 7.25%OA)							
10	49.1±0.5	44.0	0.40	23.2±0.1	0.24	10.1±0.7	2.9±0.0	3.7±0.1

15	39.7±2.3	47.1	0.43	18.5±1.0	0.25	8.8±0.0	2.8±0.2	2.9±0.0
25	26.4±0.3	74.4	0.41	10.0±0.1	0.20	7.3±0.2	3.1±0.0	1.9±0.0
5+15*	39.3±1.5	63.4	0.35	18.5±0.9	0.20	9.2±1.3	2.5±0.1	3.6±0.3
10+10*	46.8±1.7	66.3	0.42	19.8±0.6	0.23	11.1±1.0	3.9±0.7	4.4±0.0
15+5*	51.1±1.7	72.7	0.50	18.1±0.7	0.22	10.9±0.2	4.4±0.2	4.3±0.2

注：反应时间 5 + 15，10 + 10，15 + 5 表明该酸水解过成是分别在 185 °C 维持 5、10、15 分钟，然后停止通入蒸汽，并继续搅拌保持 15、10、5 分钟。由于水解反应器具有良好的隔热层，最终反应器内的温度仍能维持在 174.3、178.8 和 182.1 °C。

SA，硫酸；PA，磷酸；OA，草酸。

6.3.2 半连续液态生物脱毒和乙醇发酵

以前的研究表明, 由于缺乏有效地手段来去除高浓度的发酵抑制剂, 玉米秸秆的稀酸水解液基本上不可能直接用于乙醇发酵。通过对水解液进行稀释可以得到非常低浓度的乙醇 (小于 5 g/L) [220,221]。尽管目前新筛选或基因工程改造得到的一些酵母菌株可以耐受一种或几个木质纤维素来源抑制剂, 但都无法耐受真实木质纤维素水解液体系下的抑制物[120,222]。因此对于目前得到含有大量可发酵糖的稀酸水解, 彻底清除其中所含有的高浓度抑制剂是获得良好乙醇发酵指标的重要前提。在本研究中, 使用了第二章中新分离得到的生物脱毒真菌 *P. variotii* FN89, 该菌株可以有效降解全谱木质纤维素来源抑制物。同时该菌株也在第五章中被证实了可以用于液体生物脱毒, 并在存在大量可发酵糖的情况下有限代谢抑制物, 从而有效保留大部分可发酵糖。

首先使用氢氧化钙将所得到的酸水解物中和值 pH 5.0 左右, 并对其中的主要酚醛类抑制物及其衍生物浓度进行了测定 (表 6.2)。大量氢氧化钙中和剂的加入, 将部分酚醛类抑制剂还原为相应的醇, 这一现象与碱性脱毒 (overliming) 过程相似。

表 6.2 原始酸水解物、中和后酸水解物以及脱毒后酸水解物中主要酚醛抑制物及其衍生物的浓度
Table 6.2 The concentrations of main phenolic aldehyde inhibitors in original hydrolysate, neutralized hydrolysate, and biotetoxified hydrolysate.

	Original hydrolysate	Neutralized hydrolysate	Biotetoxified hydrolysate
HMF	4.43 ± 0.23	3.74 ± 0.01	ND
HMF alcohol	ND	0.81 ± 0.01	ND
HMF acid	ND	ND	ND
Furfural	4.34 ± 0.34	3.67 ± 0.14	ND
Furfuryl alcohol	ND	0.69 ± 0.32	ND
Furoic acid (g/L)	ND	ND	0.72 ± 0.33
4-HBA (g/L)	0.56 ± 0.06	0.45 ± 0.02	0.07 ± 0.04
4-HBA alcohol (g/L)	ND	0.08 ± 0.01	0.24 ± 0.12
4-HBA acid (g/L)	ND	ND	0.35 ± 0.16
Vanillin (g/L)	1.17 ± 0.06	0.66 ± 0.03	0.12 ± 0.04
Vanillyl alcohol (g/L)	ND	0.40 ± 0.02	0.79 ± 0.31
Vanillic acid (g/L)	ND	ND	0.78 ± 0.58
Syringaldehyde (g/L)	2.31 ± 0.12	1.91 ± 0.09	0.27 ± 0.04
Syringyl alcohol (g/L)	ND	0.55 ± 0.04	0.49 ± 0.20
Syringic acid (g/L)	ND	ND	0.05 ± 0.00

注: ND, 表示未在 HPLC 中未检测到; 4-HBA, 表示对羟基苯甲醛。

尽管氢氧化钙中和剂的加入缓解了水解液中高浓度抑制物的毒性, 但由于水解液中抑制物浓度较高, 脱毒菌株 *P. variotii* FN89 无法在酸水解液中直接生长。对原始水解液进行了一定的稀释来探究菌株 *P. variotii* FN89 能正常生长的抑制物浓度。分别使用 SM 培养基对原始水解液进行稀释, 稀释率为 20%-80%。对稀释后水解液在摇瓶内进行生物

脱毒，结果如表 6.3 所示。当稀释度为 20%时，*P. variotii* FN89 可以在水解液中生长，但将其中乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛全部降解需要较长时间（84 h），同时还伴随有 $35.2 \pm 2.3\%$ 的可发酵糖损失。进一步将水解液稀释 40%，*P. variotii* FN89 可在 24 h 内完成对抑制物的去除，此时可发酵糖损失降低至 $11.5 \pm 0.7\%$ 。随着稀释率的进一步提高，尽管抑制物浓度进一步降低，脱毒压力减少，但可发酵糖的损失逐渐提高。因此对水解液稀释 40%可以保证 *P. variotii* FN89 对抑制物的高效去除，并有效保留大部分可发酵糖。

表 6.3 原始水解不同稀释度下 *P. variotii* FN89 的脱毒状况

Table 6.3 The biotodetoxification performance of the corn stover hydrolysate by mixed acids hydrolysis with different dilution rate by *P. variotii* FN89.

Dilution (%)	Acetate (g/L)	HMF (g/L)	Furfural (g/L)	Biotodetoxification time (h)	Sugar loss (%)
No dilution	10.9 ± 0.2	4.4 ± 0.2	4.3 ± 0.2	/	/
20%	8.8 ± 0.5	3.6 ± 0.1	3.4 ± 0.2	84	35.2 ± 2.3
40%	6.3 ± 0.3	2.3 ± 0.2	2.3 ± 0.1	24	11.5 ± 0.7
60%	4.2 ± 0.1	1.6 ± 0.3	1.7 ± 0.1	24	15.3 ± 0.9
80%	1.1 ± 0.1	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.1	12	18.1 ± 1.2

注：使用含有 40 g/L 葡萄糖和 20 g/L 木糖的 SM 培养基对水解液进行稀释；生物脱毒过程在 500 mL 摇瓶中进行，直至无乙酸、HMF 和糠醛剩余。摇瓶内生物脱毒的条件：100 mL 装液量，37 °C，200 rpm；总糖损失是葡萄糖和木糖的总损失。

半连续发酵的方法被用于了 *P. variotii* FN89 对水解液的脱毒。采用半连续发酵不仅只需要在发酵开始时对水解液进行一次稀释，同时还可以在长期的发酵中对脱毒菌株代谢抑制物的能力进行驯化，提高其耐受性。具体的操作为原始水解液被稀释 40%后接入 *P. variotii* FN89 进行液体生物脱毒。随后每 24 h 使用新鲜的水解液置换 40%已脱毒水解液，结果如图 6.1 a 所示。每个批次的初始乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛浓度分别降低至 6.3 ± 0.3 g/L， 2.3 ± 0.1 g/L 和 2.3 ± 0.2 g/L。所有的抑制物在 24 h 内被有效去除，最终水解液中葡萄糖和木糖浓度分别为 50.3 ± 4.5 g/L 和 18.4 ± 2.0 g/L，总糖损失小于 11.6%。

经过生物解毒后的水解液被收集，并按照论文第五章的方法于 50 °C 下灭活 12 h，用以消除 *P. variotii* FN89 对乙醇发酵菌株的消极影响。随后在灭活水解液中接入菌株 *S. cerevisiae* XH7 进行乙醇发酵，结果如图 6.1 b 所示。经过 60 h 发酵后，发酵液中葡萄糖完全消耗，木糖残留 6.9 ± 0.3 g/L，乙醇浓度最高达到了 24.2 ± 0.3 g/L，乙醇得率为理论得率的 94.8%。由木质素过度降解产的香草醛、丁香醛和 4-HBA 在短时间的脱毒过程中难以完全去除（表 6.2），影响酿酒酵母正常代谢^[221]，这可能导致了木糖的剩余。

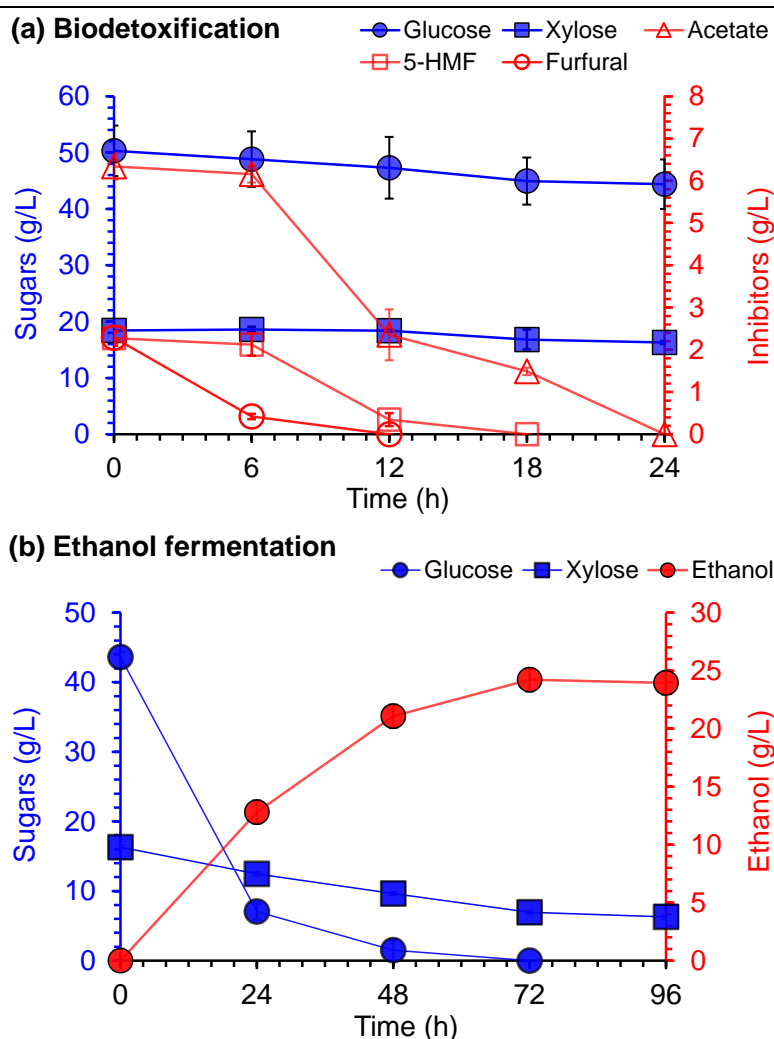


图 6.1 玉米秸秆水解液的半连续脱毒和乙醇发酵

Fig. 6.1 Biodetoxification and consequent ethanol fermentation of the corn stover hydrolysate by mixed acids hydrolysis. (a) Submerged semi-biodetoxification. 37 °C, 1 vvm aeration, 300 rpm stirring, 20% (v/v) inoculation, 2.5% dilution ratio (60% of fresh corn stover hydrolysate feeding and broth discharge every 24 h); (b) ethanol fermentation. 30 °C, 200 rpm, 10% (v/v) inoculation.

注：只展示了半连续脱毒过程中一个批次数据；图中未展示脱毒后的灭活过程。

6.3.3 酸水解工艺的物料衡算

对酸水解工艺的整体流程进行了物料衡算。整个工艺流程包括高固含量的混合酸水解、液体生物脱毒、乙醇发酵、精馏及固液分离操作。衡算以 1000.0 kg 干玉米秸秆为底物，含有 283.3 kg 纤维素和 225.9 kg 木聚糖，最终生产得到了 72.6 kg 纤维素乙醇，乙醇得率仅为纤维素酶参与的干法生物炼制过程的 35%左右（图 3.7）。在整个酸水解工艺中，从原始玉米秸秆加工至精馏之间无废水、固体废物和氯化化合物的排放。精馏过程产生 59.3 kg 精馏水可以循环利用。在精馏和固液分离后产生了 1482.4 kg 固体残渣和 2299.5 kg 废水，相当于每生产单位 kg 乙醇排放 20.4 kg 固体残渣和 31.7 kg 废水。参照论文第三章图 3.7 数据，酸水解工艺生产单位 kg 乙醇的固体残渣和废水的排放分别是酶水解参与的干法生物炼制过程固体和液体排放的 319.5%和 339.7%。

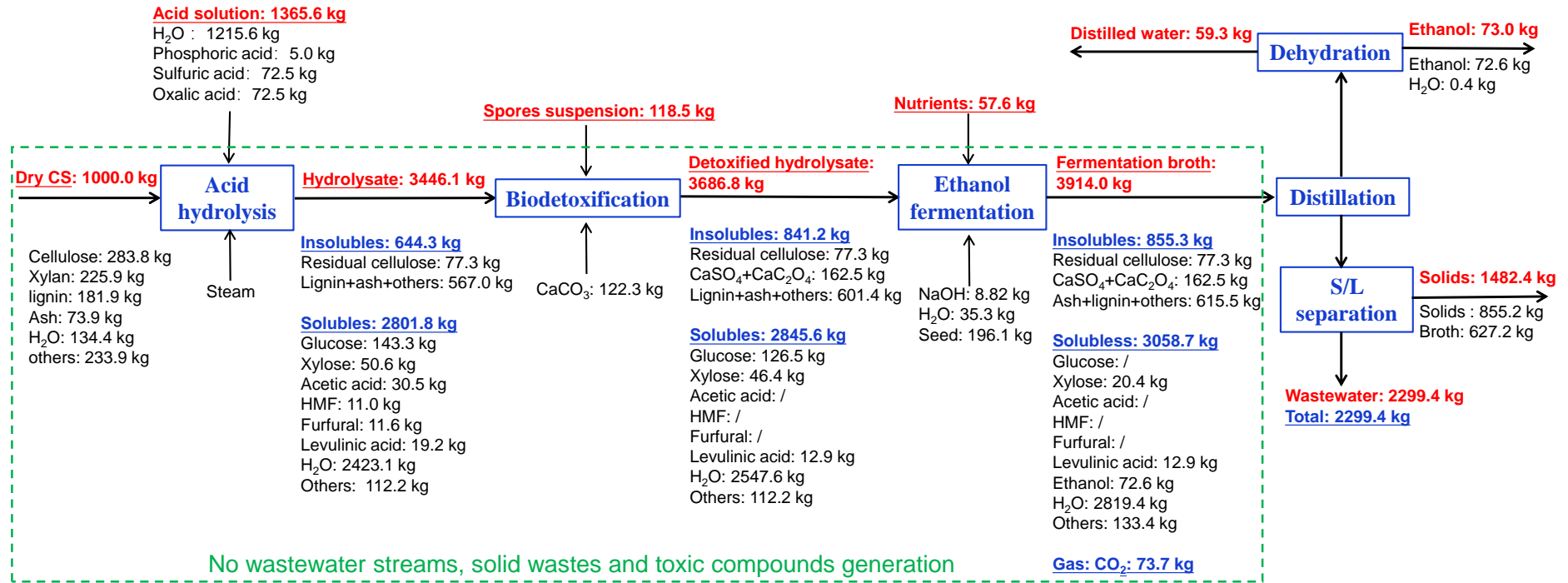


图 6.2 以玉米秸秆为底物的整体酸水解工艺物料衡算

Fig. 6.2 Overall mass balance of mixed acid hydrolysis and cellulosic ethanol production from 1,000.0 kg dry corn stover.

注：CS，表示玉米秸秆；在配有换热器和螺旋冷凝器的精馏系统中进行了乙醇的精馏。实验室规模上得到的精馏乙醇浓度为 54.9% (w/w)。精馏得到的乙醇溶液需要进一步脱水至 99.5% (w/w) 从而得到乙醇产品。

6.3.4 酸水解工艺的初步技术经济学评价及 Aspen Plus 模型

本研究采用的高固含量混合酸水解以及生物脱毒技术，完整的实现了在非酶条件下的纤维素乙醇转化。是目前较完整且指标较高的酸水解生物转化过程。因此可以根据本研究的数据对目前的酸水解技术进行最终的可行性评价。

尽管酸水解(非蛋白催化)过程减少了酶水解过程，但在水解能耗、产物转化率与酶水解过程(蛋白催化)具有明显的差别，需要在能耗及生产成本上进行进一步的技术和经济评价。所比较的酸水解工艺(Case 1)和酶水解工艺(Case 2-4)的主要技术参数和性能如表 6.4 所示。酸水解技术由目前所建立的混合酸水解、液体脱毒和乙醇发酵工艺组成；酶水解技术分别采用了由 NREL 所报道的纤维素乙醇转化工艺(Case 2)^[182]以及实验室之前建立的干法生物炼制工艺(Case 3-4)^[113,114]。其中案例 4 是在案例 3 的基础上将酶用量减少一半所得到的，用于探究酶成本对整个生物炼制过程的影响。酶用量的减少也导致了乙醇产量和得率的下降。

四种工艺的整体物料平衡比较是以建设具备年处理 30 万吨干玉米秸秆能力生物炼制工厂为基础的。该生物炼制工厂的规模相当于中等规模的石油炼制工厂。初步的技术经济评价结果如表 6.5 所示。对于稀酸水解工艺(案例 1)，乙醇年产量为 719 万加仑，仅为一般酶法水解工艺(案例 2-3)乙醇产量的 29.6-33.9%。按目前乙醇销售价格 2.21 美元/加仑计算，减少的乙醇产量意味着每年 3100-3770 万美元的经济损失(<https://tradingeconomics.com/commodity/ethanol>)。根据在位生产酶(案例 2)中纤维素酶价格为 4.24 美元/公斤蛋白质，酸水解工艺每年可节省 811 万美元的纤维素酶成本。但即使在酸水解工艺的最佳性能下，也只能弥补 21.5%的乙醇生产损失。但目前在位生产纤维素酶用于生物炼制的技术缺乏相应的商业验证。如果按照从不同的工业纤维素酶制造商处购买(案例 3)，纤维素酶的价格将提高到 6.27 美元或 23.3/公斤蛋白质，纤维素酶的年成本将达到 743 万美元或 2762 万美元。采购纤维素酶的成本过高以及外部供应商的不稳定因素将给纤维素乙醇精炼工厂的经济可持续性生产带来很大的不确定性。

如果进一步将纤维素酶的用量从 10 mg 蛋白/g 纤维素减少至 5 mg 蛋白/g 纤维素(案例 3-4)，会导致乙醇年产量减少 18.5%，所造成的经济损失为 867 万美元；而每年购买纤维素酶的费用也会相应的减少 419 万美元或 1519 万美元。目前在不添加任何辅助剂或辅助酶的情况下，在高固体含量下酶水解的纤维素酶最低用量一般为 10 mg 蛋白/g 纤维素。在此基础上，是否可以通过牺牲部分乙醇产量来减少纤维素酶的用量，需要进一步权衡市售纤维素酶的价格和乙醇生产的经济损失。稀酸水解的另一个不确定因素是高酸催化剂用量，其年成本比酶法水解加工中的稀酸预处理高 10.0 倍以上(表 6.5)。

表 6.4 稀酸水解工艺和酶水解工艺主要工艺参数及性能比较

Table 6.4 Process parameters and performances of dilute acid hydrolysis and enzymatic hydrolysis for cellulosic ethanol production.

Processing	Case 1 ^a	Case 2 ^b	Case 3 ^c	Case 4 ^c
	Direct acid hydrolysis	NREL process	Dry biorefinery	Dry biorefinery
Pretreatment or hydrolysis	Acid hydrolysis	Dilute acid pretreatment	Dilute acid pretreatment	Dilute acid pretreatment
Acid dosage (% DM)	7.25%SA+7.25%OA+0.50%PA	2.10% SA	2.50% SA	2.50% SA
S/L ratio	2:3	3:7	2:1	2:1
Temperature (°C)	185	158	175	175
Reaction time (min)	15+5 ^b	5	5	5
Final solids content	19.8%	>20.0%	45.2%	45.2%
Detoxification	Biodetoxification	Alkaline detoxification	Biodetoxification	Biodetoxification
Fermentation ^d	SHF	SHF	SSF	SSF
Initial solids loading	19.8% (w/w)	20.0% (w/w)	30.0% (w/w)	30.0% (w/w)
(Pre-) Hydrolysis	/	48°C for 84 h	50 °C for 12 h	50 °C for 20 h
Cellulase	/	On-site	Purchase	Purchase
Cellulase dosage	/	25 mg/g cellulose	10 mg/g cellulose	5mg/g cellulose
Ethanol titer	24.2 g/L (3.1%, v/v)	53.4 g/L (6.7%, v/v)	85.1 g/L (10.8%, v/v)	64.9 g/L (8.2%, v/v)
Ethanol yield (kg/ton CS) ^e	72.6	244.8	214.2	174.6

注:

^a 所用酸水解工艺为表 6.1 中最优酸水解条件;^b 案例 2 参考 NREL 生物炼制过程^[182], 这个过程中氨用于对预处理物料的脱毒;^c 案例 3 参考干法生物炼制过程^[113,114], 案例 4 是在案例 3 的基础上将酶用量从 10 mg/g cellulose 调整至 5mg/g cellulose 得到的;^d SHF, 表示分步糖化与发酵; SSCF 表示同步糖化与共发酵;^e 所有案例结果均按照本研究物料的组分进行了调整。

表 6.5 不同生物炼制工艺物料衡算及初步的经济学衡算

Table 6.5 Materials balance and preliminary economic estimations of different biorefinery processing.

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
Processing	Dilute acid hydrolysis	NREL process	Dry biorefinery	Dry biorefinery
(a) Materials balance				
Raw corn stover (ton/year)	300,000	300,000	300,000	300,000
Acid catalyst (ton/year)	45,000	6,300	7,500	7,500
Cellulase (ton protein/year) ^a	/	1,913	1,186	533
Ethanol production (million gallons/year)	7.19	24.25	21.22	17.29
(b) Materials cost and ethanol sale				
Feedstock cost (\$ million/year) ^b	17.73	17.73	17.73	17.73
Acid cost (\$ million/year) ^c	10.30	0.82	0.98	0.98
Cellulase cost (\$ million/year)	/	8.11 ^d	7.43/27.62 ^e	3.35/12.43 ^e
Ethanol sale (\$ million/year) ^f	15.89	53.60	46.89	38.22

注:

^a 所有案例所用的纤维素酶量均按照本研究物料的组分进行了调整;

^b 根据中国河南省当地供应商的报价, 玉米秸秆的价格为 59.0\$/ton;

^c 本研究的磷酸被中和成磷酸盐, 作为后续乙醇发酵的营养物质。因此酸催化剂的成本不包括磷酸的成本;

^d 假设纤维素酶的在位生产是以葡萄糖为碳源;

^e 纤维素酶从两个渠道购买。据 Novozymes 的公告, 纤维素酶的成本为 0.5 美元每加仑乙醇, 相当于 6.27\$/kg 蛋白^[113]; 或从中国制造商尤特尔 (上海) 处购买, 价格为 23.3\$/kg 蛋白^[223];

^f 目前乙醇的销售价格为\$2.21/gal (<https://tradingeconomics.com/commodity/ethanol>)。

传统的酶水解参与的干法生物炼制技术，包括干式稀酸预处理、固态脱毒、乙醇同步糖化共发酵、精馏等工段。其纤维素乙醇的各项转化指标以及成本均在玉米乙醇的生产范围中，这为我们对酶水解参与的生物炼制过程进行比较提供了技术蓝本。参照先前建立的干法生物炼制技术的 Aspen Plus 模型（案例 3），进一步在 Aspen Plus 软件上初步建立了以年处理 30 万吨干玉米秸秆生产纤维素乙醇的酸水炼制过程，年操作时间为 8000 h。整个模型包括原料处理（A100）、混合酸水解（A200）、在位液体脱毒和乙醇发酵（A300）、乙醇精馏（A400）和热电联产（A500）五个工艺模块，如图 6.3 所示。初步建立的酸水解工艺模型未建立原料储存、废水处理和公用设施等工艺模块，仅与干法生物炼制过程做初步的比较。

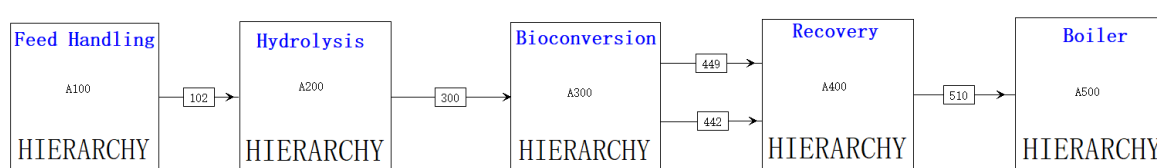


图 6.3 非酶催化（酸水解工艺）在 Aspen Plus 软件上的流程图

Fig. 6.3 The flowsheet of non-enzymatic biorefinery processing on Aspen Plus software.

使用 Aspen Plus 模型主要进行了相关能耗的比较，包括预处理（酸水解）蒸汽用量以及糖化（酶水解工艺）、乙醇精馏和固体废弃物热电联产的能量消耗和输出，结果如表 6.6 所示。尽管稀酸水解技术避免了大量使用昂贵的纤维素酶，但由于自身水解过程固液比较低（更多工艺水的输入）且水解温度高、时间长，这就意味着需要更多热蒸汽的输入。经过流程模拟可以看出水解过程的蒸汽使用量为预处理过程的 1.9 倍。将 1.6MPa 蒸汽的价格按照当地的市场价 31.3\$/ton 计算，生产每吨乙醇稀酸水解的蒸汽花费是酶水解预处理过程的 5.43 倍。

对于干法生物炼制或酸水解过程，所剩余的固废焚烧产热均可以满足糖化和精馏能耗。多余热量经热电联产可以作为电力输出进一步提高工厂的经济效益。之前的研究表明在酶水解参与的干法生物炼制过程中，木质素残渣焚烧在满足各生产环节的电量需求外，生产每加仑乙醇会额外输出 2.5 kWh 电量来提高工厂效益。但由于酸水解过程较为苛刻，一方面造成了大量固形物的损失；另一方面大量酸经中和后生成的不溶性盐积累于木质素残渣中，影响其焚烧放热。造成最终酸水解残渣焚烧可用于热电联产的热量仅为 41,995 MJ/h，仅为干法生物炼制的 21.2%。综上所述，尽管混合酸水解和高效生物脱毒技术实现了非酶参与的乙醇生产，但由于其可发酵糖损失较大，难以实现糖得率降低（乙醇收益减少）和酶成本减少之间的成本平衡。同时酸水解技术在生产每吨乙醇的催化剂成本和蒸汽成本均明显高于酶水解过程，在热电联产方面也与酶水解过程有较大差距，因此酸水解技术暂不具备实际应用价值。

表 6.6 非蛋白催化（酸水解）和干法生物炼制过程的能耗比较

Table 6.6 Costs and energy consumption of non-enzymatic biorefinery process compared to dry biorefinery process.

	Non-enzymatic biorefining	Dry biorefining
(a) Steam usage and cost		
Steam (ton/year)	224,000	425,696
Steam cost (\$ million/year)	13.3	7.0
(b) Energy consumption and generation		
Pre-saccharification (MJ/h)	/	-12,453
Ethanol distillation (MJ/h)	-57,771	-81,783
Solid residue combustion (MJ/h)	+99,766	+291,771

注：所用蒸汽为 1.6MPa，273 °C 的过饱和蒸汽，按照当地热电厂的报价，蒸汽售价为 \$ 31.3/ton。

6.3.5 酸水解工艺的结果讨论和展望

对于酸水解过程，尽管进行了很长时间的探索，对不同的底物、使用新式连续反应器、不同的酸组合等^[213,224-226]，但使用常见无机酸或有机酸的常规酸水解的得率始终被限制在 60%以内^[71]。尽管在本研究中，高固含量的酸水解技术得到了较高浓度的可发酵糖 (~66g/L)，同时生物解毒技术也实现了在保留部分可发酵糖的前提下对微生物生长抑制物的有效去除，后续的乙醇发酵浓度也达到了 24.2 g/L，是目前酸水解工艺较为成功的案例。但经过客观的流程建立及模拟，酸水解过程相比于酶水解参与的生物炼制过程在整体转化效率和工厂效益方面仍存在着巨大的差距。

这一沮丧的结果在我们的意料之中。对于酸水解过程，目前正处在一个两难的境地中。首先对于固液比及酸用量。许多研究集中于在低固含量下使用极低的酸来进行水解 (0.5-2%, w/w)。尽管这样子有效地控制了酸的耗费同时也避免了高浓度抑制物的生成，但所生成的低浓度可发酵糖水溶液对于后续的生物转化并没有很大的价值。为了避免乙醇回收的巨大能耗，Mats Galbe, Zhao 和 Zacchi 等人均提出了工业乙醇精馏浓度应不低于 4% (w/w)^[227-229]，这也就要求了用于乙醇生产的可发酵糖浓度不应低于 80 g/L。许多研究也明显表明，当乙醇浓度超过 5% (~40 g/L) 时，精馏的能耗变化将不再显著。但是值得注意的是^[227]。Zacchi 等人的研究也表明，如果采用蒸发作为预浓缩的手段，将葡萄糖浓度从 1.5%蒸发浓缩至 8.0%，所需要的蒸汽比精馏减少的蒸汽会更多^[229]。对于本研究所采用的高固含量下的水解，这势必需要高浓度酸的介入。更多的成本集中于酸催化剂的大量使用。而使用发酵生物质残渣热电联产，则完全可以满足精馏的能耗。

其次是酸对可发酵糖降解的不可控。纤维素酶可以有选择性的水解聚糖，从而得到较高浓度的可发酵糖。但对于酸水解而言，高温高压下得到的可发酵单糖会在短时间内进一步降解为微生物生长抑制物，这在木质纤维素原料水解过程中半纤维素先于纤维素水解的情况下^[230]，木糖的损失显得更加尤为严重。先前的研究多采用两步稀酸水解方法尽可能多的保留可发酵糖^[231-233]，即在温和条件下先水解半纤维素并及时移除水解液；对富含纤维素的残渣收集后再进行二步酸解。但整个过程需要大量工艺水且两步酸解所

得到的含有低浓度木糖的水解液仍然不具有应用价值，同时在后续纤维素水解过程中由于抑制物的生成，糖的得率仍被限制在 60%以内。

新型固体有机酸的开发^[70,234]、酸水解后化学法转化葡萄糖^[235]、拟纤维素酶固体催化剂^[72]的合成或许是稀酸水解技术的另一条出路。但上述方法想要在实际工业场景进行有效地应用仍有明显的技术瓶颈。但总的来说，对于历时已久的常规酸水解技术，尽管使用酸水解环节替代了纤维素酶前处理、水解过程，但目前看来整体的转化效率及经济效益与酶水解过程仍有明显的差距。基于我们具有了有效脱除抑制物的手段，今后的酸水解技术可以集中于高转化率的得到高浓度可发酵糖水溶液上。但在现阶段，如果无法实现在高选择性酸催化剂上有实质性的突破，后续的木质纤维素酸水解技术都难以具备应用价值。

6.4 本章小结

酸水解木质纤维素生物质生产纤维素乙醇可以节省昂贵纤维素酶成本，但核心障碍是水解获得单糖后在酸催化剂作用下继续转化生成呋喃醛，造成可发酵单糖的大量损失以及后续发酵无法进行。新筛选的生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 具有在液体条件下高效降解木质纤维素来源抑制物的能力。该生物脱毒手段突破了酸水解产物中抑制物对乙醇发酵菌株的抑制瓶颈，因此本章节对稀酸水解技术生产纤维素乙醇的潜力进行了重新评估。主要内容如下：

(1) 对基于干式稀酸预处理的酸水解过程进行了酸组合、温度、固含量、酸用量和反应时间的优化，以玉米秸秆为底物水解获得到了 51.1 g/L 葡萄糖和 18.1 g/L 木糖，得率分别为 0.50 g/g 纤维素和 0.22 g/g 木聚糖。

(2) 采用半连续液体脱毒的方法，在 24 h 将玉米秸秆水解物中的糠醛、5-羟甲基糠醛和乙酸完全去除；在位发酵获得了 24.2 g/L 乙醇产品，相当于乙醇得率为 72.6 kg/ton 干玉米秸秆。物料平衡表明在水解、生物脱毒额发酵过程中不产生废水、固体废物和有毒化合物排放。

(3) 在 Aspen Plus 软件上建立了酸水解工艺的整体流程。初步技术经济学评价表明用在新的生物脱毒技术克服抑制物瓶颈后，用廉价酸催化剂代替昂贵的纤维素酶催化剂后，仍然只能补偿 21.5%-89.1%的乙醇生产损失，远不能弥补稀酸水解工艺中低乙醇得率所带来的损失。

(4) 酸水解残渣焚烧可用于热电联产的热量仅为 41,995 MJ/h，仅为酶水解参与的干法生物炼制过程的 21.2%。酸水解技术在生产每吨乙醇的催化剂成本和蒸汽成本均明显高于酶水解过程，在热电联产方面也与酶水解过程有较大差距，因此目前酸水解技术即使在突破抑制物瓶颈后，仍暂不具备实际应用价值。

第 7 章 干法生物炼制平台上的纤维素 L-乳酸案例及生命周期分析

7.1 引言

高手性度乳酸作为 PLA 的聚合前体^[236]，其生产具有巨大的潜力。以粮食类生物质为底物进行微生物发酵是目前生产高手性度乳酸的主要工业生产方法^[237]。以粮食基原料进行的乳酸生产案例已经有了广泛的研究，考虑到至 2024 年全球聚乳酸需求量保守估计将达到 37 亿美元产值^[238]，其对前体乳酸的需求量将是百万至千万吨的数量级，以粮食类生物质大规模生产乳酸无论是在经济性上还是可持续性上都将是现实的。因此以廉价且来源广泛的木质纤维素生物质生产纤维素乳酸将是极具工业应用价值的生产路线。

木质纤维素生物质必须通过生物炼制平台进行转化。常规生物炼制平台包括预处理、脱毒、糖化与发酵、以及下游产物分离等多个环节。以木质纤维素生物质生产高手性乳酸除了必须在环境友好、节能控排下进行外，还必须时刻关注各环节产生的杂质对最终产品手性度的影响^[1]，其中最主要的杂质包括预处理所产生的抑制物残留以及发酵残糖。因此尽管基于多种预处理手段的纤维素乳酸生产已经进行了诸多的研究，但由于预处理过程能耗和排放巨大、抑制物彻底去除困难、发酵混合糖利用效率低等原因，大多数生产的纤维素乳酸尚不具备用于聚乳酸单体的产业化要求^[239]。

干法生物炼制技术在实现高手性乳酸得率的同时严格限制了木质纤维素生物质转化过程的废水排放。首先干式稀酸预处理有效打破了物料原始结构同时保有了物料的干燥形态，预处理过程不产生游离废水；新筛选的生物脱毒菌株实现了在极地可发酵糖消耗下对全谱木质纤维素来源抑制物的彻底去除；乳酸发酵菌株具备同时利用全谱木质纤维素来源糖（葡萄糖、木糖、甘露糖、半乳糖和阿拉伯糖）生产高手性度 L-乳酸的能力，且发酵过程极难被污染；所获得的 L-乳酸最终合成了 L-丙交酯^[240]。也就是说，以干法生物炼制技术生产高手性度纤维素乳酸，解决了目前纤维素乳酸生产中的能耗、排放和产品手性度的问题，具备了产业化要求。

本章研究首先建立了在低酶用量下生产纤维乳酸的技术。并对目前最新的多种不同干法生物炼制技术生产纤维素 L-乳酸的技术路线进行了案例分析。建立了基于干法生物炼制过程和区域式的生物质加工工厂（RBPDs）的生物质收集、储存和运输模型，用于乳酸生产生命周期分析。对基于干法生物炼制平台技术的高手性度纤维素 L-乳酸生产过程案例建立了基于严格 Aspen Plus 流程模拟计算的详细物料平衡，并进行了初步的生命周期分析和碳排放分析，以期在基本技术经济数据分析基础上给出其成本数据和产业化潜力，并对未来进一步的技术进步和成本降低给出展望

7.2 材料与方法

7.2.1 菌株，培养基和培养环境

所用 L-乳酸发酵菌株 *Pediococcus acidilactici* ZY271（CGMCC 13611）的保存方法

及培养基参考 4.2.1。

所用生物脱毒菌株 *Paecilomyces variotii* FN89 (CGMCC 17665) 的保存方法和培养基参考 2.2.1。

7.2.2 酶和试剂

纤维素酶和化学试剂的来源与用途见 3.2.2。

7.2.3 原始物料

本章节所用物料为玉米秸秆，主要测定方法及组成参考 6.2.4。

7.2.4 预处理

本章节所采用的预处理手段为干式稀酸预处理，具体设备及操作方法参考 3.2.8。

7.2.5 生物脱毒

本章节使用了固态生物脱毒和液体生物脱毒两种方法。其中固态生物脱毒的具体操作参考 3.2.8；液体生物脱毒的具体操作参考 5.2.5。

7.2.6 L-乳酸发酵

本章节分别在常规生物炼制过程和调整的生物炼制过程下进行了纤维素 L-乳酸的生产。其中常规纤维素 L-乳酸的 SSCF 操作参考 4.2.5。调整生物炼制过程后的 L-乳酸发酵参考 5.2.6 的乙醇发酵过程，并加以调整。其中因为乳酸菌的发酵温度较高，生物脱毒完成后的水解液不需要在 50 °C 下高温灭活脱毒菌株，直接按照 10% (v/w) 接种量接入乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZY271。发酵温度为 42 °C，转速为 300 rpm，发酵 pH 采用自动添加氢氧化钙溶液的方法控制在 5.5。

7.2.7 元素浓度测定

发酵液和发酵残渣中主要元素含量通过电感耦合等离子体原子发射光谱法 (725 ICP-OES, Agilent) 进行测量，具体操作方法参考 3.2.12。

7.2.8 Aspen Plus 模型

基于 NREL 的模型^[182]和之前建立的干法生物炼制技术生产 L-乳酸的模型^[241]在 Aspen Plus 软件 (version 11.0, Aspen Tech Co., Cambridge, MA, USA) 上分别建立了四种最新的干法生物炼制技术生产高手性纤维素 L-乳酸的技术工艺仿真模型。模型主要包括原料处理 (A100)、预处理 (A200)、纤维素酶在位生产 (A300)、生物转化 (A400)、分离纯化 (A500)、固废处理 (A600) 和废水处理 (A700) 七个主要模块。其中分离纯化模块个根据已经建立的技术路线进行了修正，主要包括固液分离、活性炭脱色、蒸发结晶、酸化和离子吸附等步骤。

7.2.9 碳足迹

纤维素 L-乳酸的碳足迹采用生命周期分析(LCA)的方法，在 Open LCA 软件(version 1.11.0, GreenDelta, Berlin) 上建立。所用数据库为 agribaluse v301、bioenergiedat 18 和

ecoinvent 37, 所用分析方法为 ReCiPe 2016 Midpoint (H)。具体的系统边界在 7.3.6 小节中进行了讨论。

7.2.10 分析方法

葡萄糖、木糖、乳酸、乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛浓度采用 HPLC 方法测定, 具体设备和操作参考 2.2.10。

7.3 结果与讨论

7.3.1 较高强度预处理实现纤维素 L-乳酸的低纤维素酶用量生产

第三章的研究表明, 2.6% DM 的硫酸可以有效处理水洗后的玉米秸秆, 经过 4 mg 蛋白/g DM 的高固含量 SSCF 后, 乙醇生产指标可以达到~70 g/L。以草酸作为酸催化剂, 在相同的预处理条件下达到了与硫酸催化剂相同的催化效率和发酵指标, 同时还有效降低了发酵残渣中硫的含量。在本研究中, 2.6% DM 硫酸用量、175 °C 反应温度和 5 min 的反应时间作为预处理的对照组。在此基础上通过提高酸用量、反应温度或反应时间来增加预处理强度, 以期更加有效的破坏木质纤维素底物的结构^[242], 从而增加后续纤维素与纤维素酶的有效接触面积, 降低糖化所需要的纤维素酶用量, 不同条件下预处理的玉米秸秆主要组分如表 7.1 所示。以 4% DM 草酸复合 0.5% DM 磷酸的酸用量下, 175 °C 反应 10 min, 相比于反应 5 min 会造成大概 14.2% 的总可发酵糖损失。当预处理反应温度提高至 180 °C 时, 使用 4% DM 草酸复合 0.5% DM 磷酸的酸用量, 反应 5min 时, 相比于 175 °C 反应 5 min, 可发酵糖含量损失了 31.5%。这一结果也表明, 对于所用的干式稀酸预处理方法, 温度比酸用量对预处理效果的影响更大。而 Loannis A 的研究表明^[243], 对于稀酸预处理, 在预处理温度超过 170 °C 后, 预处理温度对后续酶水解效率的影响减弱, 这一本研究略有不同。先前的研究表明, 175 °C 是干式稀酸预处理较为有效的温度^[111,244]。在本研究中, 在酸用量增加的前提下, 为了保存大部分的可发酵糖, 预处理反应温度应该有效控制在 175 °C, 过高的温度会导致大量可发酵糖的损失。

值得注意的是, 尽管在 175 °C 的温度下, 对照组 2.6% DM 硫酸以及 4.0% DM 草酸复合 0.5% DM 磷酸的酸用量反应 5 min 时可发酵糖含量较高。但这并不代表后续酶解可以释放出更多的可发酵糖。因为酶解可发酵糖的产量还与酶解效率有关。因此接下来对 175 °C 预处理条件下得到的玉米秸秆 (共七组) 进行了酶水解及 L-乳酸发酵性能评价。

表 7.1 不同预处理条件下预处理后玉米秸秆的主要组分

Table 7.1 The main compositions of pretreated corn stover.

Conditions			Poly-saccharides		Oligo-saccharides		Mono-saccharides		Inhibitors		
Dosage (%) ^a	Tem (°C) ^b	RT (min) ^c	Cellulose	Xylan	Glu-oligo	Xylo-oligo	Glucose	Xylose	Furfural	HMF	Acetate
2.6% H ₂ SO ₄	175	5	294.2±0.3	1.7±1.3	7.5±0.9	112.5±0.5	30.1±4.2	95.6±3.5	5.2±1.2	7.1±0.2	22.1±1.5
4.0% OA + 0.5% PA	175	5	250.4±2.1	8.6±0.2	46.6±1.1	124.4±2.4	40.2±3.2	130.9±2.5	7.6±0.9	1.9±0.1	26.2±2.2
4.0% OA + 0.5% PA	175	10	219.8±1.3	5.9±0.8	13.3±2.3	109.9±3.1	45.6±1.2	121.1±1.5	4.0±0.4	1.9±0.3	21.9±0.2
6.0% OA + 0.5% PA	175	5	212.1±2.4	6.0±1.1	55.0±1.5	108.8±0.5	45.2±1.9	148.5±1.9	4.2±0.6	1.1±0.2	23.9±0.8
6.0% OA + 0.5% PA	175	10	183.0±1.5	6.0±0.9	42.2±1.8	49.3±1.6	44.8±2.3	132.7±6.1	4.2±1.1	2.1±0.3	22.8±1.9
8.0% OA + 0.5% PA	175	5	180.6±1.9	3.0±0.3	52.1±3.3	104.0±0.3	45.2±3.5	137.9±4.3	3.7±0.5	1.3±0.2	23.5±1.4
8.0% OA + 0.5% PA	175	10	170.3±2.1	/	37.8±2.5	46.0±5.5	39.3±1.2	89.5±6.5	5.9±1.2	2.3±0.2	27.4±0.1
4.0% OA + 0.5% PA	180	5	164.9±2.5	/	53.3±4.1	39.9±3.2	63.3±4.5	90.0±7.5	6.3±0.9	4.1±0.4	38.5±3.5
4.0% OA + 0.5% PA	180	10	138.1±0.1	/	55.8±3.5	15.5±0.9	63.5±6.1	74.1±6.2	5.7±1.1	7.4±0.3	27.2±0.3

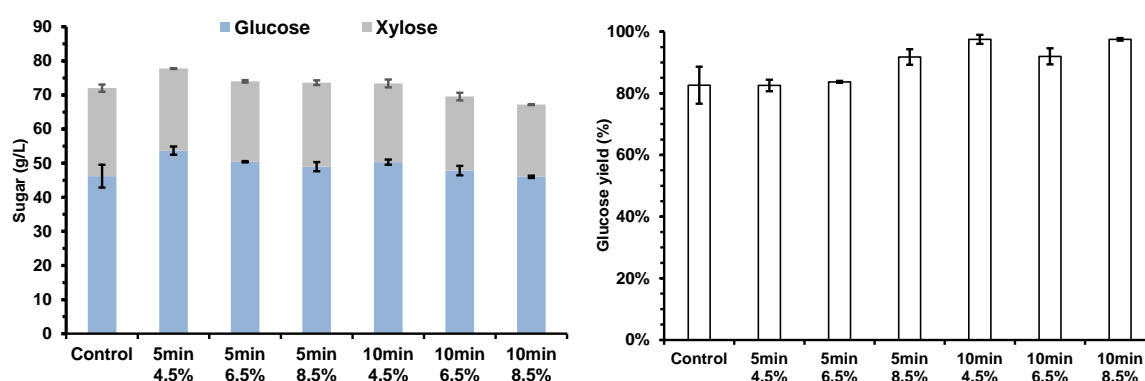
注:

^a 酸用量是基于物料干基计算的; OA, 代表草酸; PA, 代表磷酸; 磷酸添加量控制在 0.5% DM 时与后续发酵磷酸盐 (2 g/L KH₂PO₄) 添加量一致;^b Tem, 表示预处理反应温度;^c RT, 表示预处理反应时间。

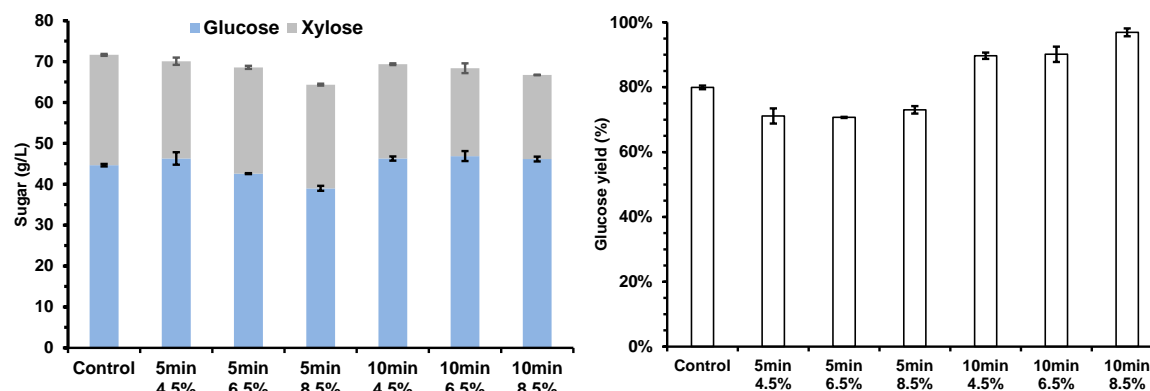
预处理所得物料直接在摇瓶内进行了 15% (w/w) 固含量的酶水解评价, 分别使用 1-4 mg 蛋白/g 干物质的酶用量, 并计算了 12h 酶解后的可发酵糖产量及葡萄糖水解得率, 结果如图 7.1 所示。在不同酶用量下, 相同预处理条件下木糖的产量基本相同, 这表明所用的预处理方法可保证半纤维素的高效水解。而随着酶用量的减少, 葡萄糖的产量逐渐降低, 葡萄糖的得率也随之减少。

此外, 从图中可以看出, 尽管随着酸用量及预处理时间的升高, 葡萄糖的得率会相对升高, 但更高的预处理强度相对于对照组并不会得到更高的总糖产量, 尤其是葡萄糖产量。其原因可能有四个方面: 可能是由于抑制物的存在抑制了纤维素酶的活性, 导致结果不明显; 可能是由于糖浓度较高, 抑制了纤维素酶的活性, 导致结果不明显; 也存在一定可能是较强的预处理强度导致部分可发酵的损失; 最后可能是由于水解的时间较短 (12 h), 导致底物水解不完全。因此对各种预处理条件下得到的物料进行了相应的固态生物脱毒, 使用脱毒物料在要瓶内进行了 L-乳酸的发酵实验, 来验证更高的预处理强度在酶用量较低的情况下是否会得到更多的糖或产品。

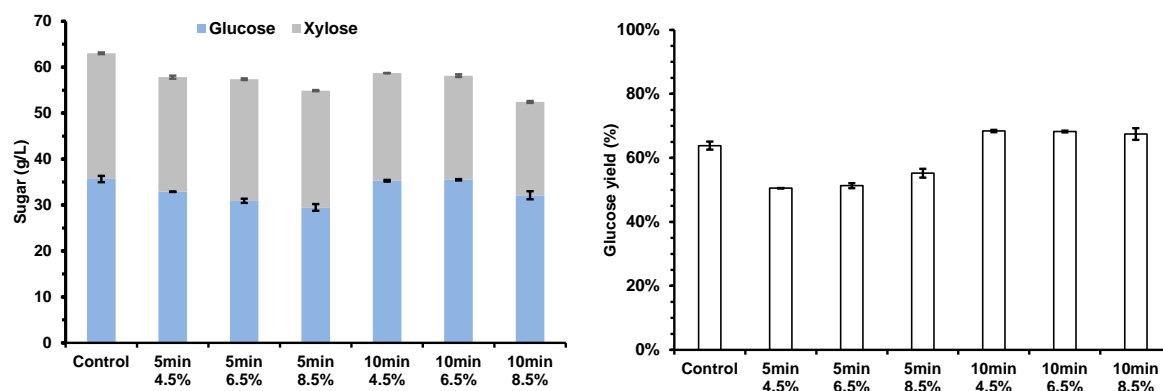
(a) Enzymatic hydrolysis evaluation with cellulase dosage of 4 mg protein/g DM



(b) Enzymatic hydrolysis evaluation with cellulase dosage of 3 mg protein/g DM



(c) Enzymatic hydrolysis evaluation with cellulase dosage of 2 mg protein/g DM



(d) Enzymatic hydrolysis evaluation with cellulase dosage of 1 mg protein/g DM

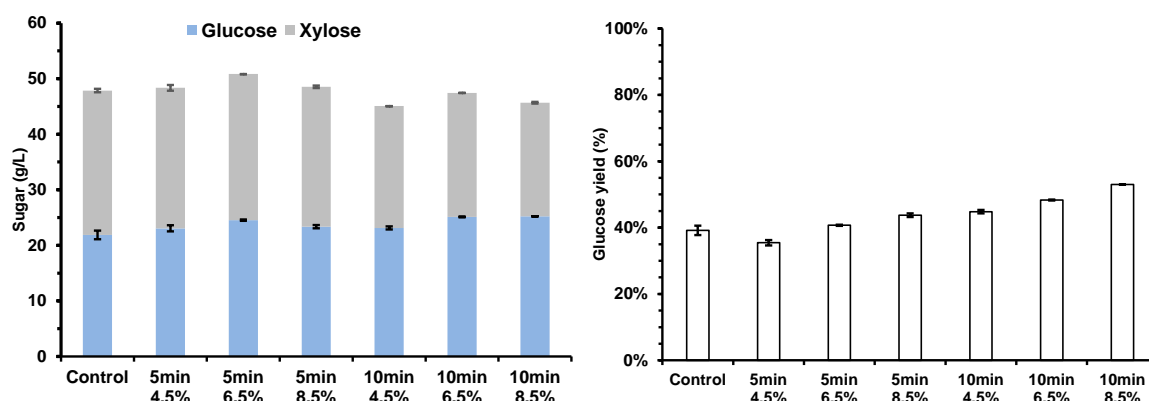


图 7.1 不同预处理条件下预处理物料的酶水解评价

Fig. 7.1 The enzymatic hydrolysis evaluation of pretreated corn stover with different cellulase dosage. (a) cellulase dosage of 4 mg protein/g DM; (b) cellulase dosage of 3 mg protein/g DM; (c) cellulase dosage of 2 mg protein/g DM; (d) cellulase dosage of 1 mg protein/g DM.

注：酶水解条件：250 mL 摇瓶，50 mL 装液量，15% (w/w) 固体含量，150 rpm，50 °C，12 h。

使用脱毒物料在摇瓶内的 SSCF 仍然使用了不同用量的纤维素酶，结果如图 7.2 所示。脱毒物料经过预糖化 6 h 后，接入乳酸片球菌 *P. acidilactic* ZY271 进行 L-乳酸发酵。当酶用量从 4 mg 蛋白/g DM 降低至 2 mg 蛋白/g DM 时，对照组乳酸产量由 66.0 g/L 降低至 55.1 g/L，减少了 16.7%；但对于强较强预处理的物料，如 4.5% DM 酸用量预处理 5min 或 10min，当酶用量从 4 mg 蛋白/g DM 降低至 2 mg 蛋白/g DM 时，乳酸产量分别只减少了 4.7% 以及 7.2%。这表明强度较高的预处理对于提高水解得率和发酵效果确实有所帮助。尽管在某些更高强度的预处理条件下，产物的产量更高，但是考虑到催化剂的成本以及预处理能耗，选择较为适中的 4.5% DM 酸用量预处理 5min 或者 10min 或许是较优的选择，此时糖化发酵的酶用量可以降低一半至 2 mg 蛋白/g DM。

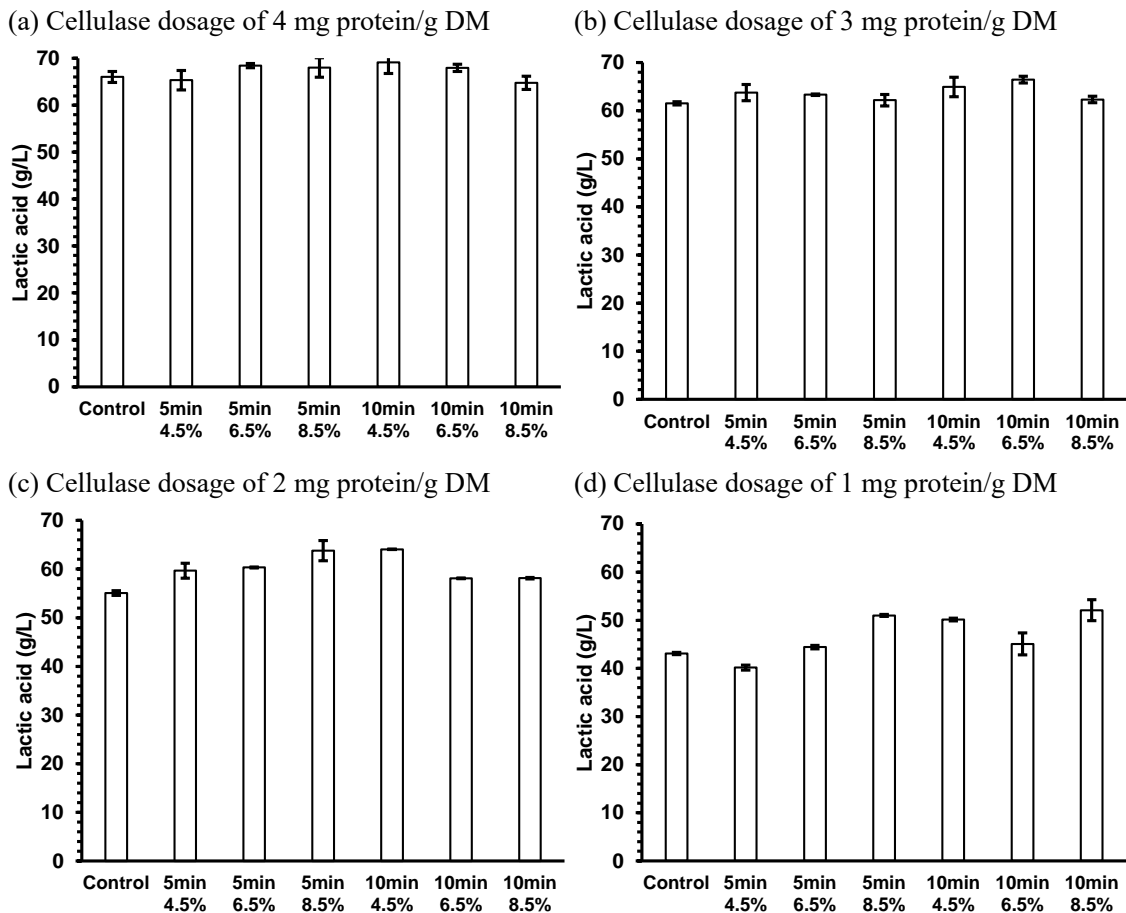


图 7.2 不同预处理条件物料脱毒后用于摇瓶发酵产乳酸

Fig. 7.2 L-lactic acid SSCF from pretreated and biodetoxified corn stover with the cellulase dosage of 4 4 mg protein/g DM (a), 3 mg protein/g DM (b), 2 mg protein/g DM (c), and 1 mg protein/g DM (d).

注：SSCF 条件：250 mL 摇瓶，15% (w/w) 固含量，预糖化 6 h，10% (v/w) 接种量，150 rpm，42 °C，72 h。

为了进一步评价在高固含量下所选择预处理物料的发醇性能，在 5L 发醇罐内进一步进行了 L-乳酸的 SSCF 发醇，结果如图 7.3 所示。对照组为正常经 2.6% DM 硫酸预处理和脱毒的玉米秸秆物料，发醇固含量为 30% (w/w)。当酶用量为正常 4 mg 蛋白/g DM 时，经过 72 h 发醇可生成 114.6 ± 1.0 g/L 乳酸；而当使用较低的 2 mg 蛋白/g DM 酶用量时，72 h 时只生成了 72.8 ± 6.6 g/L 乳酸，产量下降了 36.5%；延长发醇时间至 96h，乳酸产量提高至 81.6 ± 2.1 g/L。低酶用量下的乳酸发醇呈现典型的同步糖化与共发醇的趋势，即游离糖被消耗完后仍通过物料的持续糖化释放可发醇糖用于乳酸生产，乳酸生产始终处于上升的趋势，这表明仍有底物未能完全糖化。

当使用 4.5%酸用量预处理 5min 的物料用于乳酸发醇时，在低酶用量下经过 72 h 发醇乳酸产量达到了 98.4 ± 6.5 g/L。从 72 h 后乳酸产量没有明显上升的趋势，这表明此时物料的水解基本停滞。但此时乳酸的产量比正常 4 mg 蛋白/g DM 酶用量发醇低 14.1%，这表明仍有部分底物未能水解，推测此时纤维素酶失活的原因是由于对木质素的不可逆

非生产性吸附。但预处理时间增加为 10 min 时，在 72 h 时的乳酸产量仅为 89.6 ± 0.2 g/L 更长的预处理没有获得更高的发酵性能^[80,219]，可能是由于长时间预处理导致的可发酵糖大量损失。

以上结果表明，较高强度的预处理条件提高了物料的水解得率，在仅一半纤维素酶用量下，乳酸产量仅下降了 14.1%。但此方法带来的负面影响是预处理催化剂费用的提升以及发酵产量的减少，还需要进一步的核算来确定该方法是否可行。

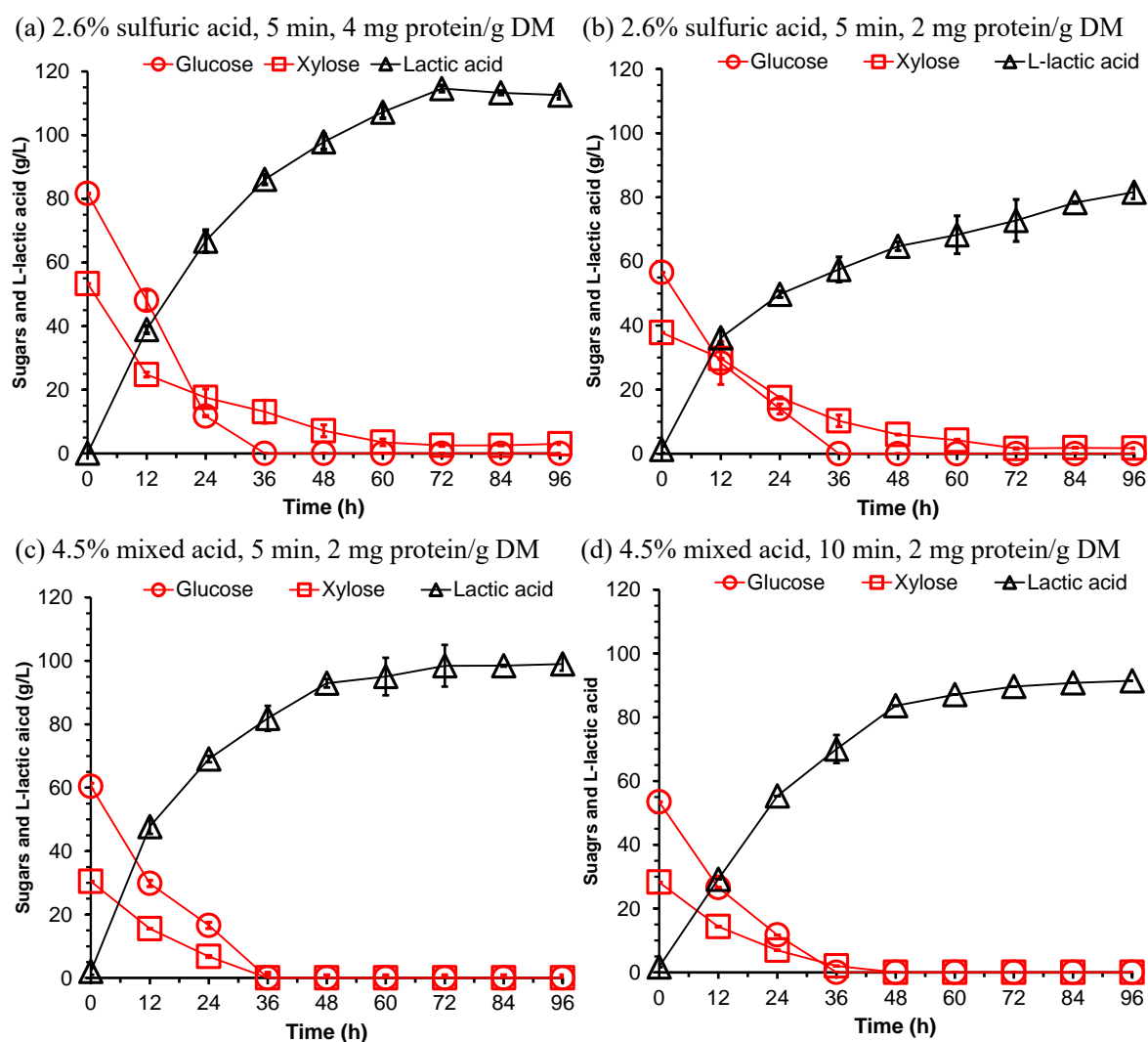


图 7.3 不同酶用量下的纤维素 L-乳酸 SSCF

Fig. 7.3 The L-lactic acid SSCF from pretreated and biodetoxified corn stover. (a) Corn stover was pretreated by 2.6% DM sulfuric acid for 5 min, cellulase dosage was 4 mg protein/g DM; Corn stover was pretreated by 2.6% DM sulfuric acid for 5 min, cellulase dosage was 2 mg protein/g DM; (c) Corn stover was pretreated by 4.0% OA and 0.5% PA for 5 min, cellulase dosage was 2 mg protein/g DM; (d) Corn stover was pretreated by 4.0% OA and 0.5% PA for 10 min, cellulase dosage was 2 mg protein/g DM.

注：SSCF 条件：30% (w/w) 固体含量，42 °C，150 rpm，96 h。

7.3.2 纤维素生产粗乳酸作为预处理催化剂的潜力

乳酸作为具有广泛应用有机酸，大部分由微生物发酵获得。在干法生物炼制基础上

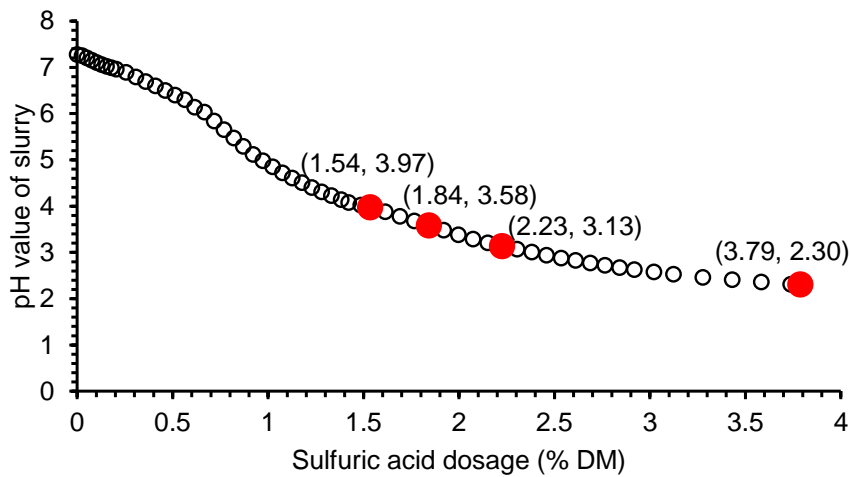
进行的纤维素乳酸的生产，其产量及产转化率都达到了工业化生产的水平。相比于其他非生物法生产的有机酸，纤维素乳酸的生产成本和潜在碳排放明显较低。高浓度乳酸的发酵通常是以合成乳酸钙的形式。在乳酸提纯过程中，乳酸钙酸化后通常需要经过阴阳离子吸附才能得到高纯度乳酸溶液，这也是乳酸损失及生产成本较高的环节。

在研究中表明，有机酸和无机酸混合作为稀酸预处理催化剂，具有更高的反应活性和选择性，减少抑制物的生成。由于乳酸的酸性较弱，很难单独作为酸处理催化剂，通常作为一种辅助酸被添加到预处理过程中。在这一框架下，如果我们能够使用木质纤维素原料生产乳酸，并得到酸化后的粗乳酸溶液（不经过阴阳离子吸附），直接回收至预理工段来部分代替硫酸，不仅能有效控制有机酸催化剂的成本，也会减少后续硫氧化物的排放。

在我们之前的研究中发现，由于每批次原料的碱性灰分含量会因种植区域、收获季节、灌溉、土壤、肥料使用、收获晾晒操作、运输、储存等过程的不同而变化^[245-247]。灰分与酸催化剂的中和导致了酸预处理的效率频繁且显著波动^[248,249]。一种根据基础 pH 而不需要实际检验，确定稀酸预处理中酸用量快速高效的方法从而被提出并得到了验证^[250]。按照之前报道的方法，麦秆经彻底水洗后配置成 2.0% (w/w) 的浆状物。将浆料调节 pH 至 2.3 时，麦秆预处理效果最好，其糖化及乙醇发酵效率达到最高。因此将 pH 2.3 定义为麦秆的基准 pH。因此确定对于不同灰分含量的玉米秸秆，尽管由于不同灰分含量的中和能力不同造成酸用量不同，我们可以简单的通过将浆料 pH 的调节至 2.3，来确定每克干物料预处理所需要的酸用量。分别使用硫酸和商业乳酸对 2.0% (w/w) 的未经除尘的小麦秸秆浆状物 pH 进行调节，酸用量和 pH 的曲线如图 7.4 所示。

2.0% (w/w) 小麦秸秆液浆的 pH 为 7.3 左右，这主要是由于其中含有一些可溶性的碱性组分，如氢氧化钾，碱式氯化镁等。除此之外，秸秆中的灰分还包含一些难溶的碱性组分，例如碱式氯化钙、碳酸钙、碳酸镁等。

硫酸是最常用的稀酸水解催化剂，成本低易获得且水解效率高。使用硫酸调节小麦秸秆液浆至 pH 至 2.3 的酸用量为 3.79% DM。而乳酸由于酸性较低，想要调节到基础 pH 2.3 则需要使用超过 20% DM 的乳酸，这在经济合理性上是难以接受的。因此我们仅选择了添加 4.29, 8.24, 16.43% DM 的乳酸作为酸催化剂，复合硫酸作为稀酸水解催化剂。根据 pH 调节的曲线，我们可以计算出对应 4.29, 8.24, 16.43% DM 乳酸添加下，硫酸所用量为 2.25%, 1.95%, 1.56%，相比于单独使用硫酸分别减少了 40.6%, 48.5% 和 58.8%。在这三种酸组合下，我们分别对小麦秸秆进行了干式稀酸预处理并进行了后续的生物转化。



(b) The pH value of wheat straw slurry adjusted by commercial lactic acid

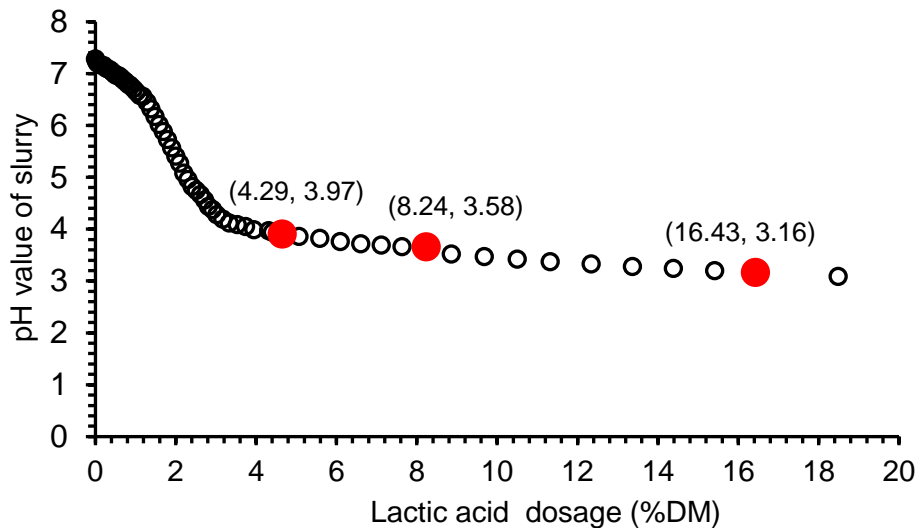


图 7.4 使用硫酸或商业乳酸对 2.0% (w/w) 小麦秸秆液浆调节 pH

Fig. 7.4 The pH values of wheat straw slurry (2.0%, w/w) adjusted by commercial lactic acid or sulfuric acid. (a) sulfuric acid; (b) lactic acid.

分别使用不同的酸组合对小麦秸秆进行干酸预处理。所得预处理物料均呈干固颗粒状态。但当使用更多乳酸替代硫酸时，预处理物料中的长纤维明显增多（图 7.5），这表明乳酸作为一种弱酸，对物料原有的结构破坏力较弱。

进一步测定了预处理物料的组分（表 7.2）。以单独 37.9 mg/g DM 的硫酸作为催化剂水解小麦秸秆时，原始物料中大部分的木聚糖水解成木糖；同时生成了 13.7 ± 1.1 mg/g DM， 1.5 ± 0.8 mg/g DM 以及 4.1 ± 1.5 mg/g DM 的乙酸，5-羟甲基糠醛和糠醛抑制物。同时发现，即使没有添加乳酸作为催化剂，在预处理物料中仍然检测出了 1.5 ± 0.7 mg/g DM 的乳酸。我们推测这可能是物料在储存过程中，原始物料中携带的游离单糖如葡萄糖、果糖等被广泛存在的乳酸生产菌株如粪肠球菌、植物乳杆菌等转化为乳酸^[251]。

表 7.2 不同混合酸预处理的小麦秸秆组分

Table 7.2 The compositions (mg/g DM) of pretreated wheat straw by sulfuric and lactic acid as catalysts.

Acid dosage* (% DM)	Poly-saccharides		Oligo-saccharides		Mono-saccharides		Inhibitors and lactate (mg/g DM)			
	Cellulose	Xylan	Glu-oligo	Xylo-oligo	Glucose	Xylose	Acetate	HMF	Furfural	Lactate
3.8 SA	276.1 ± 3.0	12.3 ± 0.7	4.0 ± 0.5	14.6 ± 3.2	20.0 ± 0.6	108.3 ± 0.5	13.7 ± 1.1	1.5 ± 0.8	4.1 ± 1.5	1.5 ± 0.7
4.3 LA + 2.2 SA	285.3 ± 5.2	18.4 ± 1.3	3.4 ± 0.3	21.2 ± 1.0	15.5 ± 2.1	110.3 ± 8.4	9.8 ± 2.2	1.8 ± 0.9	1.1 ± 0.0	43.7 ± 1.9
8.2 LA + 1.9 SA	295.6 ± 4.4	25.3 ± 2.5	5.3 ± 1.2	19.5 ± 0.9	15.1 ± 0.7	92.7 ± 3.6	8.9 ± 1.1	1.6 ± 0.4	2.3 ± 0.7	84.8 ± 1.5
16.4 LA + 1.6 SA	291.3 ± 1.9	47.1 ± 3.4	8.7 ± 2.2	21.3 ± 6.7	13.4 ± 0.3	85.6 ± 1.1	7.8 ± 0.1	1.6 ± 0.2	2.2 ± 0.5	187.7 ± 3.3
4.3 CLA + 2.2 SA	298.2 ± 1.2	26.3 ± 3.5	1.5 ± 0.7	8.3 ± 0.4	19.3 ± 1.0	106.8 ± 4.5	15.0 ± 0.6	1.5 ± 0.1	5.5 ± 1.3	42.2 ± 1.7

注：SA 表示硫酸；LA 表示乳酸；CLA；表示纤维素粗乳酸。

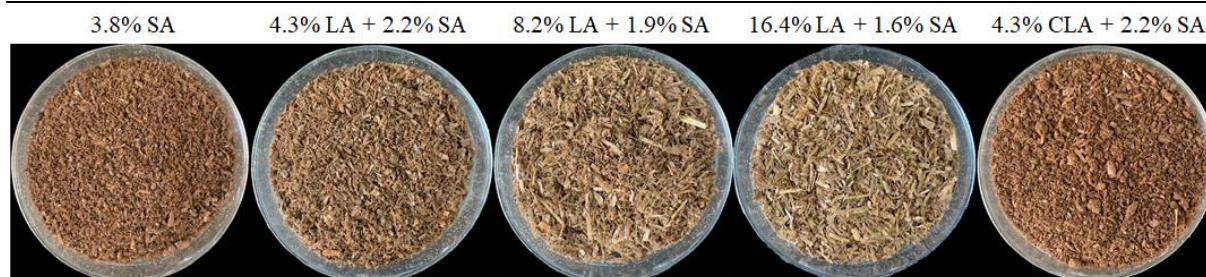


图 7.5 不同混合酸预处理的小麦秸秆形态特征

Fig. 7.5 The morphologies of different acid pretreated wheat straw. All the acid dosage was based on dry wheat straw weight. SA, sulfuric acid, LA, purchased lactic acid, CLA, cellulosic lactic acid.

当通过添加商业乳酸来部分替代硫酸作为酸催化剂时，生成的乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛抑制物有明显减少。从预处理物料的组成中可以看出，预处理后乳酸占干基含量相比于乳酸催化剂的添加略有升高，多余的乳酸可能来自于物料本身含有的；同时由于预处理过程中某些固体物质的损失，导致了预处理物料中乳酸含量的升高。当随着乳酸用量的提升，预处理物料中残余木聚糖含量也逐渐升高，这表明此时预处理的水解效果出现降低。

对不同酸组合的预处理物料进行酶水解评价（图 7.6），也表明了当用更多的乳酸取代硫酸时，酶水解得率也会出现明显下降，这表明乳酸作为一种弱有机酸，对纤维素天然结构的破坏较弱。当 4.3% LA 与 2.2% SA 组合时，此时预处理物料的表现以及酶水解效果基本与 3.8% SA ($91.6 \pm 0.9\%$ vs. $92.5 \pm 2.6\%$) 作为催化剂的相似。为了进一步验证乳酸替代部分硫酸的可行性，我们对所得到的预处理进行了生物转化。

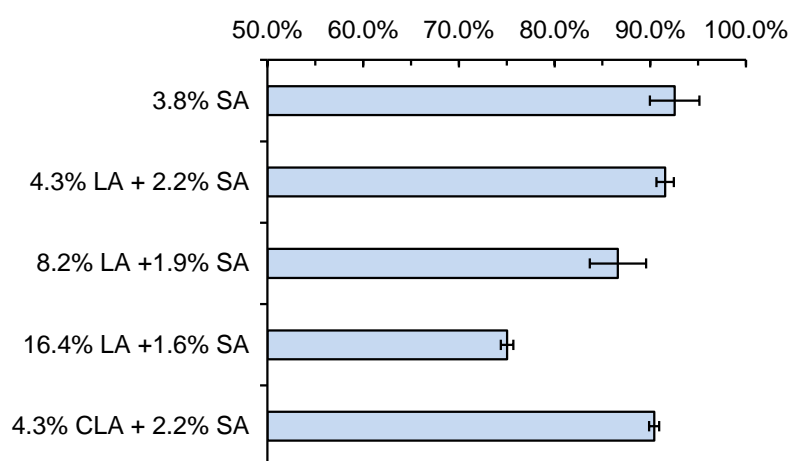
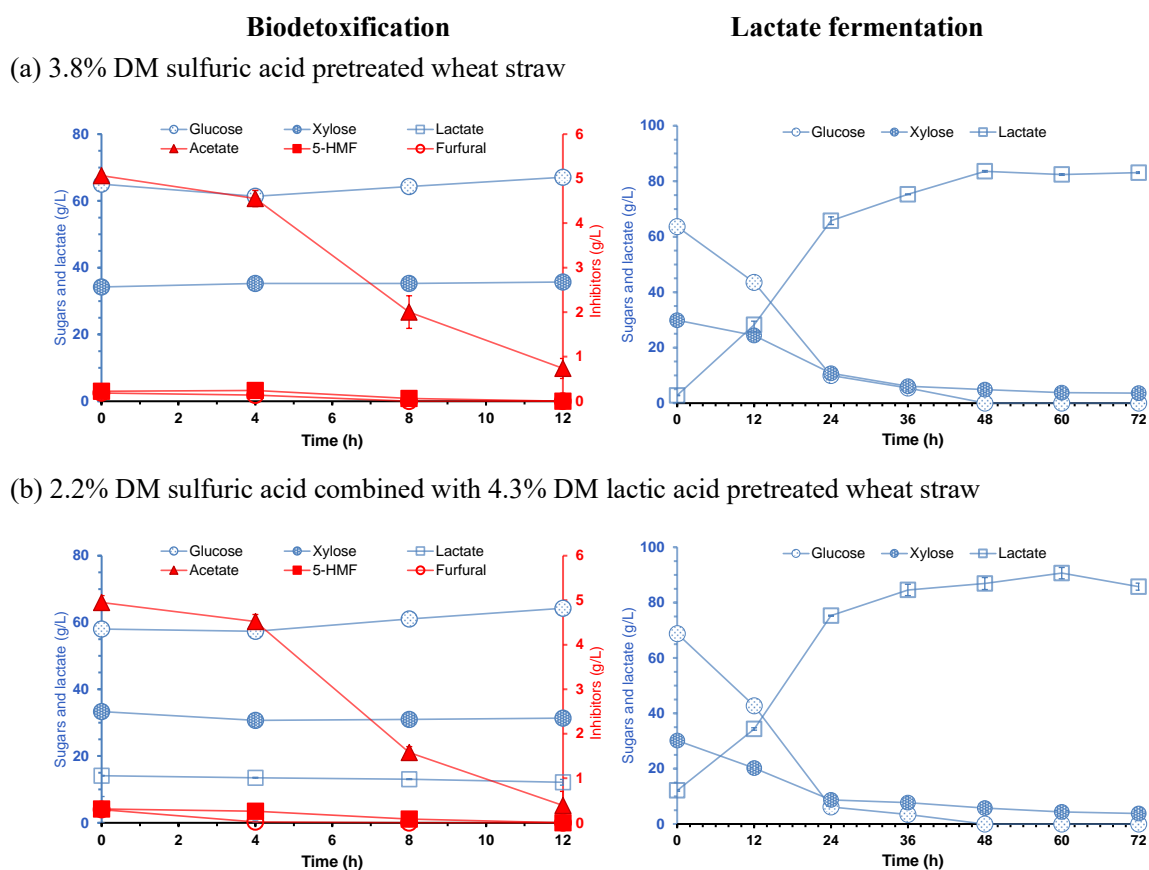


图 7.6 不同混合酸预处理的小麦秸的酶水解评价

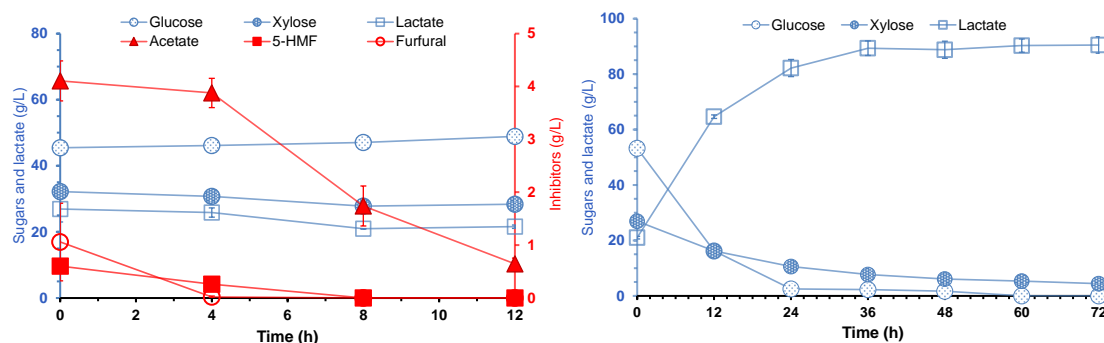
Fig. 7.6 Enzymatic hydrolysis evaluation of different acid pretreated wheat straw. All the acid dosage was based on dry wheat straw weight. SA, sulfuric acid, LA, purchased lactic acid, CLA, cellulosic lactic acid.

按照第五章所重构的生物炼制过程,经中和后的预处理物料经过预糖化后进行了在位一罐式的生物脱毒和乳酸发酵,结果如图 7.7 a-d 所示。有氧条件下的真菌脱毒和厌氧条件下的细菌乳酸发酵可以通过调节温度、溶氧来进行偶联,从而保证整个过程的连续性,来减少操作的复杂性和设备的投资。

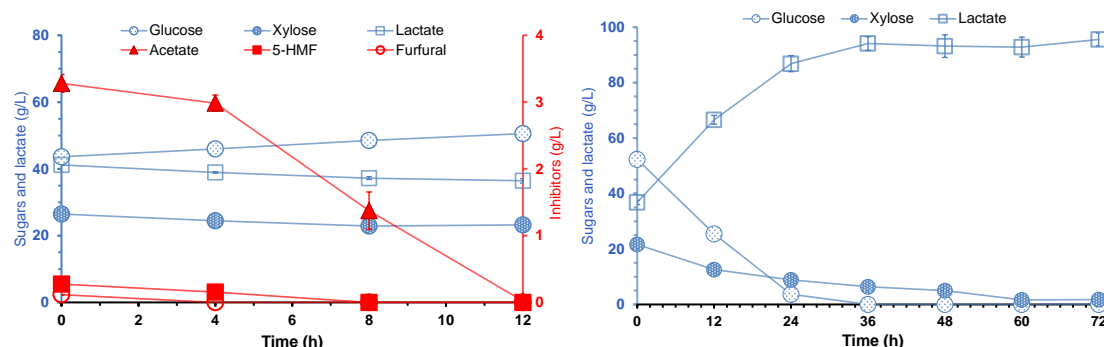
预糖化液首先接入 *P. variotii* FN89 在有氧条件下去除其中的乙酸和酚醛类抑制物。不同预处理物料的液体脱毒过程都在 12 h 结束。所有的 5-羟甲基糠醛、糠醛以及 80% 以上的乙酸都被去除。剩余的部分乙酸可以作为后续乳酸发酵的营养组分,脱毒过程乳酸催化剂的损失在 10% 左右。对于 3.8% DM 硫酸预处理的物料 (图 7.7 a),经 12 h 预糖化后,生成了 65.0 ± 0.2 g/L 的葡萄糖和 34.2 ± 0.5 g/L 的木糖。相比于预处理物料,占理论得率的 78.5% 和 98.9%。随着脱毒和乳酸发酵的进行,可发酵糖会进一步释放。最终乳酸浓度达到了 83.6 ± 0.3 g/L,乳酸产量为理论得率的 89.0% (表 7.3)。当以 4.3% DM 乳酸和 2.2% DM 硫酸的混合酸预处理进行预糖化时 (图 7.7 b),尽管葡萄糖得率仅为 69.1%,但最终乳酸发酵产量及得率分别达到了 90.7 ± 2.1 g/L 和 89.1%,指标基本与硫酸单独作为催化剂相似,这表明了该种混合酸预处理是有效的。尽管其糖化速度较慢,但最终通过 SSCF 过程仍释放出了足够的可发酵糖用于乳酸发酵。而随着乳酸催化剂比例的不提高 (硫酸用量减少,图 7.7 cd),预糖化的葡萄糖得率也不断降低,这一结果与酶水解结果相似 (图 7.6),相应的最终乳酸产量和得率也分别有所下降。2.2% DM 的硫酸及 4.3% DM 的乳酸因此被确定为较为合适的预处理催化剂组合和用量。



(c) 1.9% DM sulfuric acid combined with 8.2% DM lactic acid pretreated wheat straw



(d) 1.6% DM sulfuric acid combined with 16.4% DM lactic acid pretreated wheat straw



(e) 2.2% DM sulfuric acid combined with 4.3% DM cellulosic crude lactic acid pretreated wheat straw

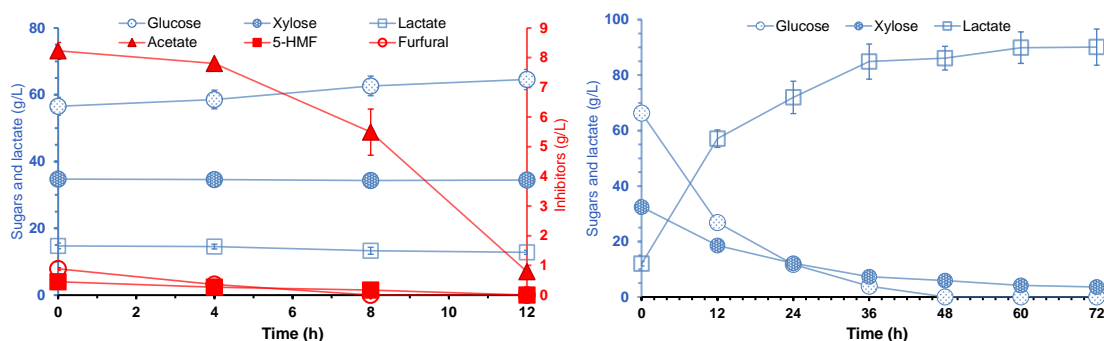


图 7.7 小麦秸秆的在位糖化脱毒及乳酸发酵

Fig. 7.7 In-situ biotodetoxification and lactate fermentation using acid pretreated wheat straw. (a) Biotodetoxification and lactate fermentation using 3.8% DM sulfuric acid pretreated wheat straw; (b) biotodetoxification and lactate fermentation using 2.2% DM sulfuric acid combined with 4.3% DM lactic acid pretreated wheat straw; (c) biotodetoxification and lactate fermentation using 1.9% DM sulfuric acid combined with 8.2% DM lactic acid pretreated wheat straw; (d) biotodetoxification and lactate fermentation using 1.6% DM sulfuric acid combined with 16.4% DM lactic acid pretreated wheat straw; (e) biotodetoxification and lactate fermentation using 2.2% DM sulfuric acid combined with 4.3% DM cellulosic crude lactic acid pretreated wheat straw.

注：在 5-L 螺旋桨生物反应器中，20 (w/w) 固含量、4 mg 蛋白/g DM 的酶用量的条件下，将酸预处理后的麦秸在 50 °C，12 h 内水解成液浆。水解液随后转移到 3-L 配备垂直平叶搅拌桨的生物反应器中，用于原位生物解毒和随后的乳酸发酵。脱毒条件：500 rpm，37 °C，1 vvm。乳酸发酵条件：200 rpm，50 °C，pH 5.5。

表 7.3 在位脱毒和乳酸发酵结果

Table 7.3 The Results of in-situ biotransformation and lactate fermentation

Acid dosage (% DM)	Pre-hydrolysis				Bio- detoxification ¹	Lactate fermentation	
	Glucose (g/L)	Glucose yield ² (%)	Xylose (g/L)	Xylose yield ² (%)		Lactate loss (%)	Lactate titer (g/L)
3.8 SA	65.0 ± 0.2	78.5	34.2 ± 0.5	98.8	/	83.6 ± 0.3	89.0
4.3 LA + 2.2 SA	58.0 ± 0.4	69.1	33.3 ± 1.0	84.4	14.2	90.7 ± 2.1	89.1
8.2 LA + 1.9 SA	45.5 ± 0.8	52.1	32.2 ± 1.3	89.9	19.7	90.5 ± 3.0	82.7
16.4 LA + 1.6 SA	43.6 ± 0.1	50.3	26.5 ± 0.6	65.1	11.6	95.6 ± 2.3	72.4
4.3 CLA + 2.2 SA	56.5 ± 2.7	64.2	34.7 ± 1.7	95.9	12.9	90.1 ± 6.5	88.3

注:

¹ 生物脱毒阶段的糖损失无法计算, 因为糖在纤维素酶的水解下会不断从底物中释放出来。

² 葡萄糖、木糖和乳酸的得率均是根据预处理小麦秸秆中的可发酵糖含量来计算的 (g/g); 预处理麦秆中可发酵糖包括葡聚糖、木糖、葡寡糖、木寡糖、葡萄糖和木糖; 在计算得率时, 已从实际产量中减掉所添加的乳酸。

所得纤维素乳酸钙发酵液经过离心、脱色、结晶、酸化、浓缩后得到高浓度乳酸溶液。由于发酵过程中有残糖剩余和乙酸生成，因此所得粗纤维素乳酸溶液中含有葡萄糖 1.78 g/L，木糖 4.80 g/L，乳酸 199.99 g/L，乙酸 2.93 g/L。将得到的粗乳酸溶液与浓硫酸的混合，作为干式稀酸预处理催化剂，预处理物料的组成见表 7.2。其可发酵糖组分基本与使用商业乳酸相似。值得注意的是，使用粗乳酸作为酸催化剂，生成了 5.5 ± 1.3 mg/g DM 的糠醛和 15.0 ± 0.6 mg/g DM 的乙酸，明显高于使用商业乳酸的 1.1 ± 0.0 mg/g DM 和 9.8 ± 2.2 mg/g DM，这主要来源于粗乳酸溶液中的残余乙酸以及残余木糖在预处理过程中的降解。

对使用纤维素乳酸及硫酸预处理的小麦秸秆物料用于了后续的糖化、脱毒及乳酸 SSCF (图 7.7 e)。最终乳酸产量为 90.1 ± 6.5 ，为理论转化率的 88.3%，基本与单独使用硫酸或商业乳酸的效果相同 (表 7.3)，这表明使用粗纤维素乳酸溶液和硫酸的混合酸预处理效果与单独使用硫酸基本类似。

尽管粗纤维素乳酸溶液没有经过离子交换树脂去除其中的残余阴阳离子，但用于酸催化剂并不会影响后续乳酸发酵的效果。为了探究粗乳酸溶液的回收是否会造成高离子浓度的富集，进一步对单独硫酸预处理 (3.8% DM)、商业乳酸-硫酸 (4.3% DM 商业乳酸和 2.2% DM 硫酸)、以及纤维素乳酸-硫酸 (4.3% DM 纤维素乳酸和 2.2% DM 硫酸) 预处理物料的乳酸发酵上清及固体残渣中的主要元素浓度进行了测定。所测的元素主要包括 K、Na、Ca、Mg、S、P、Al 和 Fe，结果如图 7.8 所示。

对于发酵上清中主要元素的测定 (图 7.8 a)，在单独硫酸预处理 (3.8% DM)、商业乳酸-硫酸 (4.3% DM 商业乳酸和 2.2% DM 硫酸)、以及纤维素乳酸-硫酸 (4.3% DM 纤维素乳酸和 2.2% DM 硫酸) 预处理条件下，主要元素浓度并没有明显的差异，这表明粗乳酸回收过程中，采用乳酸钙结晶的方法可以有效去除发酵液中的可溶性离子。所测得元素中钙的含量最高，达到了 20,000 mg/L 以上，这主要是由于发酵上清中存在大量的乳酸钙产品。

对发酵液进行固液分离，对所获得的木质素残渣进行彻底的清洗防止有发酵液残留，并测定了残渣中的主要元素浓度。在实际生物炼制过程中，富含大量木质纤维素的残渣可以用于焚烧发电。在对预处理物料的中和过程中，硫酸催化剂被中合成硫酸钙以沉淀形式存在于固体残渣中。以硫酸单独作为催化剂的固体残渣中含有 12.9 ± 1.3 mg/g 的硫酸元素，当乳酸取代部分硫酸时，残渣中硫的含量下降至 3.6-4.1 mg/g，这表明使用乳酸对硫酸的部分取代可以减少木质素残渣焚烧过程中硫的释放。

综上所述，纤维素粗乳酸具备替代部分硫酸作为酸预处理催化剂的潜力，其对硫酸催化剂的部分取代可以减少固体废物中硫的排放。但受限于乳酸的酸性较弱，需要添加大量乳酸才可以进行部分的取代，该方法的经济性需要进一步验证。

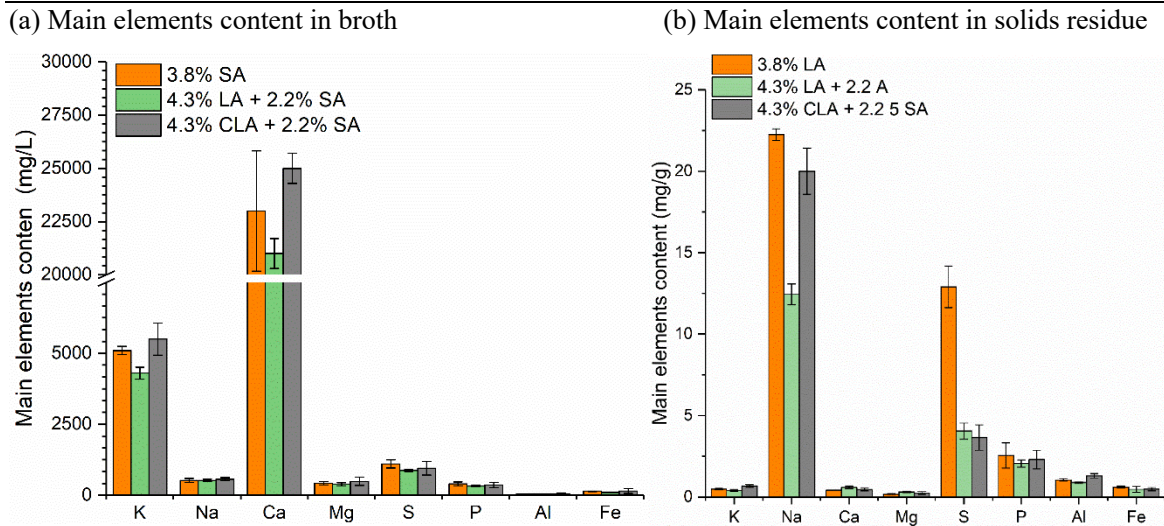


图 7.8 发酵上清及残渣中主要元素浓度

Fig. 7.8 The main elements content in fermentation broth supernatant (a) and solids residue (b).

注：发酵残渣经过水洗后测定，以排除残余发酵液的影响。

7.3.3 一种稳定的生物炼制原料供应链模型

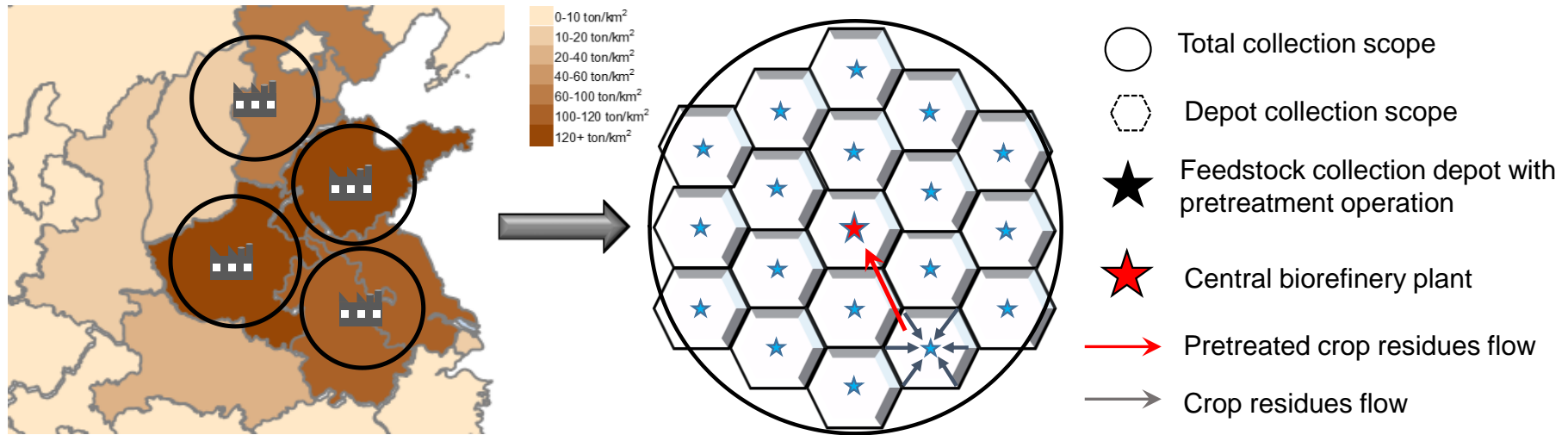
商业生物炼制工厂的运行需要可靠、低成本和稳定的原料供应系统^[100]。由于农作物的秸秆收获具有一定的周期性，这意味着玉米秸秆、小麦秸秆或水稻秸秆等农作物秸秆的贮藏期最少应为一年^[104]。目前农作物秸秆的长期储存主要由两种方法，青贮和干燥储存。对于青贮来说，新收获的农作物秸秆水分变化很大（一般从 20%-45%）^[252]，且含有部分碳水化合物^[251]，极易快速腐烂，饲料青贮因此需要严格的厌氧环境^[253]；对于干燥储存，农作物秸秆需要先经过空气干燥、热风干燥或烘晒，将其水含量降低到足够的水平，从而抑制微生物的生长^[254]。但干燥储存期间，有很大几率的火灾和腐烂风险^[255]。有许多研究表明，直接对原始物料的储存和运输，由于体积密度过小、易于腐烂分解，超过了其应在生物炼制总成本中的合理份额^[103]。Dale 和他的团队提出了基于区域生物质处理仓库（RBPDs）的对氨纤维膨爆预处理物料进行长期储存的概念^[100,104]。在这一模式下，将原料的预处理操作由中央生物炼制工厂分散至不同的区域仓库，也就是说，区域仓库收集到的原始物料直接进行预处理并进行储存。

在这个模型中，在区域收集仓库中开展的预处理操作起着决定性的作用。高效的预处理操作可以有效破坏木质纤维素的天然结构，释放出大量的可发酵糖和木质纤维素来源微生物生长抑制物。预处理产生的抑制物可以有效避免微生物生长，从而防止物料的变质。预处理物料的结构被严重破坏，其振实密度远大于原始物料。此外，区域收集仓库通常建立在基础设施薄弱的农村地区，废水处理系统不够完善，需要更加关注废水的排放。因此，在区域收集仓库中进行的预处理物料制备，不应产生废水流，且产品应为适合包装的干燥固体颗粒，而不应该是液浆状。传统的稀酸、稀碱、蒸汽和离子液体等预处理方法由于废水的产生或能耗过高等问题均不适用于该模型。氨膨爆虽然符合上述要求，但之前的研究表明其预处理物料不能完全消除微生物污染^[103,108]。

实验室之前建立的干式稀酸预处理方法，废水排放为零、设备腐蚀低。预处理产品为固体颗粒，含有大量的微生物生长抑制物且环境 pH 较低，可以实现良好的抑菌效果。因此在本小节中探究了将干法生物炼制技术应用于区域生物质处理仓库（RBPDs）模型的潜力。图 7.9 a 首先对目前主要小麦生产大省的小麦秸秆年产进行了计算，并建立了 RBPDs 模型。模型中，原始小麦秸秆首先被分散的小型区域收集仓库收集（灰色箭头、蓝色五角星），随后进行预处理、打包，运输至中央生物炼制工厂进行生物脱毒和生物转化（红色箭头、红色五角星）。根据不同省份的小麦秸秆分布密度不同，计算了满足年处理 100 万吨干小麦秸秆的中央炼制工厂的收集半径和区域仓库数量（图 7.9 b）。以在河南麦秆为例（图 7.9 c），首先测定了其原始麦秆和预处理麦秆的振实密度，分别为 0.116 和 0.276 ton/m³。这表明干酸预处理操作可以有效破坏原始物料的结构。将运输成本分为两部分计算，分别为资源岛内运输（原始秸秆至分散仓库）成本及资源岛外运输（预处理秸秆至中央生物炼制工厂）成本。相比于原始原料直接从农田收集至中央生物炼制工厂每小时所需的 31,245 MJ 运输能耗，采用 RBPDs 模型的每小时运输能耗可以降低至 15,393 MJ（包括 3,211MJ 的岛内运输和 12,181 MJ 的岛外运输）。运输能耗的降低进一步降低了运输成本。对于生产每加仑纤维素乙醇，采用直接运输原始物料的成本为 \$1.01/gal，而采用 RBPDs 模型的物料运输成本可以降低至 \$0.43/gal。

本小节的研究为木质纤维素原料的长期大规模储存提供了一种重要的方法和策略。提出并验证了在 RBPDs 模型上采用在干法生物炼制技术的可行性。所提出的储存和运输模型可以有效降低原料运输成本，为大型生物炼制工厂提供了一套有效的物流系统。

(a) Wheat straw distribution density and the model of Regional Biomass Processing Depots (RBPDs)



(b) The collection radius, and depot number of one central biorefinery plant

Regions	Collectable density (ton/km ²)	Collection radius (km)	Depot number
Jilin	109.38	170.63	99
Shandong	85.30	193.22	127
Henan	138.09	151.87	78
Shaanxi	9.56	577.10	1142
Sichuan	19.77	401.35	552
Jiangsu	177.18	134.07	60
Hubei	68.28	215.97	159

(c) Tap density of virgin or pretreated wheat straw from Henan province, and the cost of different transportation and storage modes

	Virgin wheat straw	Pretreated wheat straw
Tap density (ton/m ³)	0.116	0.276
Transportation energy (MJ)	31245	15393
From farmland to central plant	31245	/
From farmland to depot	/	3211
From depots to central plant	/	12181
Transportation cost (\$/gal ethanol)		
From depots to central plant	1.01	0.43

图 7.9 主要小麦秸秆产出省份的分布密度及分散预处理及储存模型 (a); 在不同省份建立大型生物炼制工厂所需收集面积、收集半径及分散式仓库数量 (b); 以河南省为例, 原始物料和预处理物料的密度及不同运输方式的成本

Fig. 7.9 Wheat straw distribution density and the model of Regional Biomass Processing Depots (RBDs) (a); The collection radius, and depot number of one central biorefinery plant in different province; (c) Tao density of virgin or pretreated wheat straw from Henan provinve, and the cost of different transportation and storage modes.

注:

¹ 农作物秸秆 (玉米秸秆、小麦秸秆或稻草) 的分布密度是根据不同地区的粮食 (玉米、小麦或水稻) 产量计算的。计算公式为 $\rho = M/S = (G \times R)/S$ 。其中 M 是在不同区域的特定农作物秸秆的产量 (kg), G 是不同区域特定农作物的粮食 (玉米、小麦或水稻) 年产量, R 是农作物秸秆和谷物重量比值, 本研究中所用的 R 值引自 Qiu 等人的研究^[256], 其中玉米秸秆为 1.25, 小麦秸秆为 0.95, 稻草为 1.30;

² 中央生物炼制工厂的年处理能力 1000 万吨农作物秸秆 (每天 3 万吨), 年工作时间为 8000 h;

³ 分散式仓库每天的处理能力为 300 吨农作物秸秆, 不同省份的满足一个中央炼制工厂所需要的分散式仓库数量引自 Liu 和 Bao 的研究报告^[257];

⁴ 所计算的运输能耗表明的是每小时运输能耗。

⁵ 仅计算河南地区运输的柴油能耗。柴油车单车运载体积为 69 m³, 柴油车百公里油耗为 35 L, 柴油密度为 0.855 kg/L, 柴油热值为 44 MJ/kg。根据密度计算, 柴油车单车可运载河南地区原始小麦秸秆 8 吨, 预处理后秸秆 19.0 吨。

⁶ 仅计算了从分散式仓库至中央生物炼制工厂的运输成本, 不考虑仓库范围内的收集操作成本。计算方法参考 Liu 和 Bao 的研究报告^[257]。

7.3.4 四种纤维素 L-乳酸生产案例及技术比较

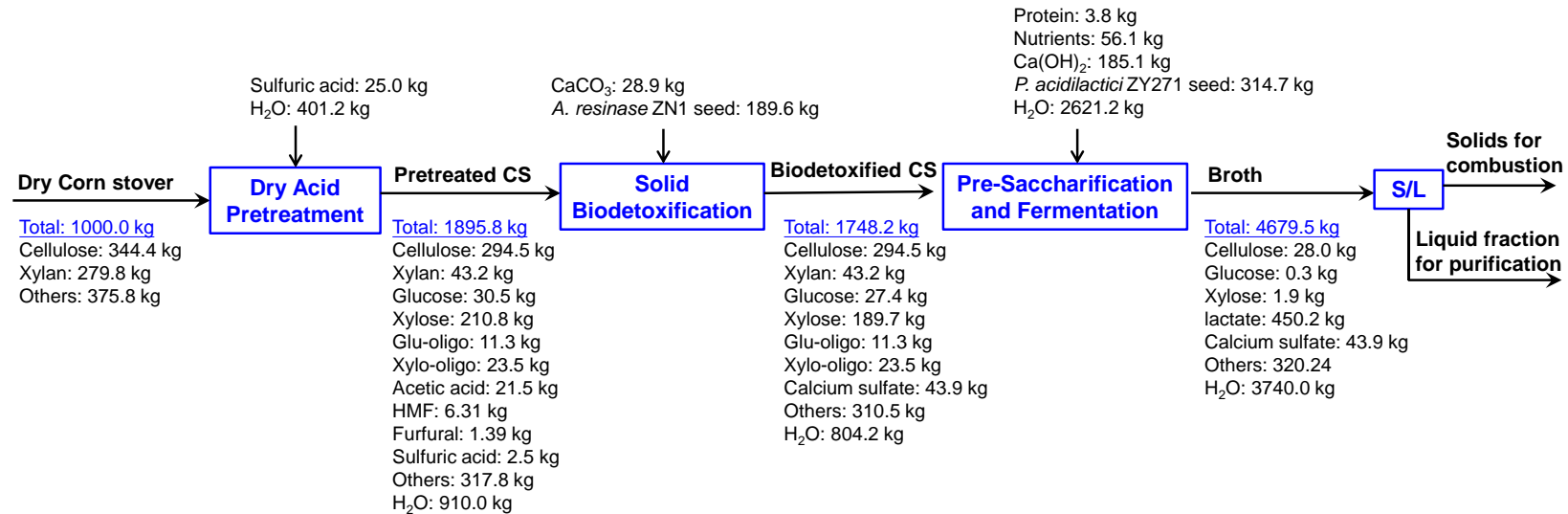
高手性度乳酸作为 PLA 的聚合前体，其生产具有巨大的潜力。以粮食类生物质为底物进行微生物发酵是目前生产高手性度乳酸的主要工业生产方法。考虑到至 2024 年全球聚乳酸需求量保守估计将达到 37 亿美元产值^[238]，其对前体乳酸的需求量将是百万至千万吨的数量级，以粮食类生物质大规模生产乳酸无论是在经济性上还是可持续性上都将是现实的。因此以廉价且来源广泛的木质纤维素生物质生产纤维素乳酸将是极具工业应用价值的生产路线。木质纤维素生物质必须通过生物炼制平台进行转化。常规生物炼制链包括预处理、脱毒、糖化与发酵、以及下游产物分离等步骤。基于多种预处理手段的纤维素乳酸生产路线及经济学评价已经进行了诸多的研究，包括蒸汽爆破、碱处理、稀酸预处理等。但目前纤维素乳酸的生物炼制过程仍然存在很多问题，包括能耗偏高、废水排放过多、乳酸产品质量不达标（抑制物残余、残糖、手性度低）等问题。因此，虽有大量投入和论文产出，大多数纤维素乳酸尚不具备用于聚乳酸单体的产业化要求。

在之前的研究中所介绍的干法生物炼制过程控制了整个生物炼制过程的废水排放，其指标与玉米干磨法相似；生物脱毒菌株 *P.variotii* FN89 的发掘实现了对木质纤维素来源全谱抑制物的去除；所用乳酸发酵菌株 *P. acidilactic* ZY271 可以同步利用木质纤维素来源全谱可发酵糖，最终 L-乳酸手性纯度达到 99.0%以上^[115]；在这一框架下成功建立的 L-丙交酯合成技术路线进一步使得干法生物炼制技术所制备的 L-乳酸具有了作为 PLA 前体的能力。

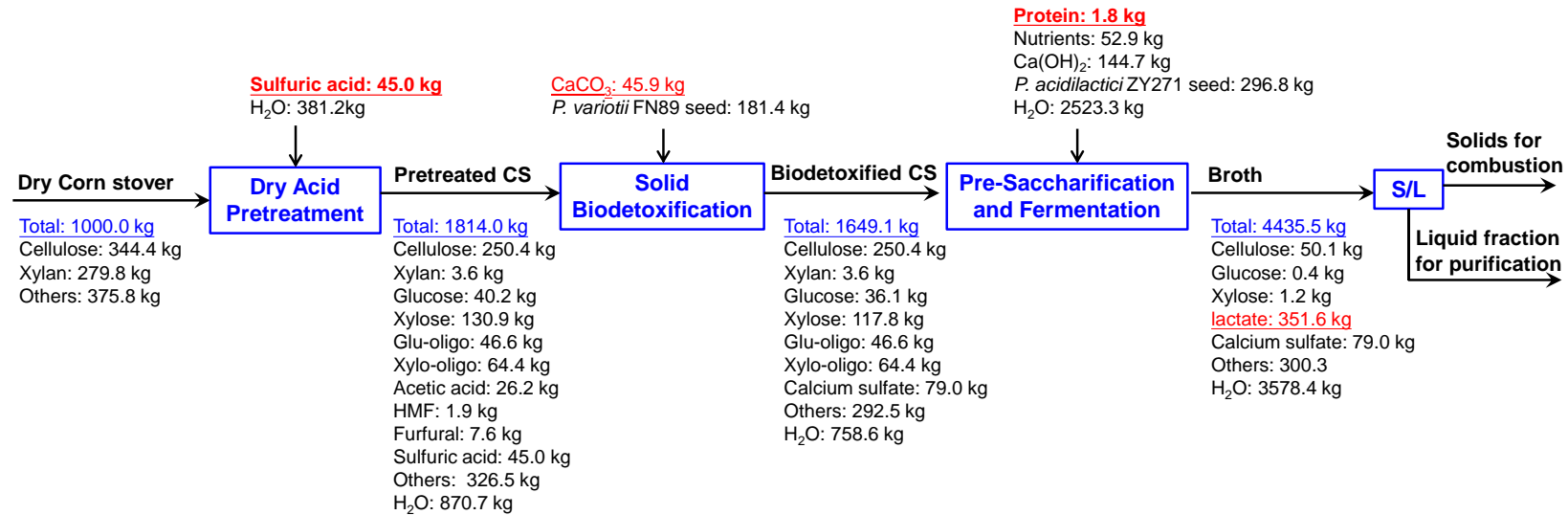
在这一小节中，对目前所建立的多种干法生物炼制生产纤维素 L-乳酸的案例进行了分析和对比。在基本技术经济数据分析基础上给出碳足迹分析。其研究边界涉及到原料的供应、预处理、生物脱毒、生物转化、产品回收、废水处理和固废处理等方面，并对未来进一步的技术进步和成本降低给出展望。

本小节所提出四种乳酸生产技术路线均是已经经过了实验的验证，并且其纯度可以进一步合成 L-丙交酯^[240]，其从原料至乳酸发酵的物料平衡如图 7.10 所示。物料平衡从 1000.0 kg 干玉米秸秆出发。第一种生产工艺为传统的干法生物炼制技术，经过干酸预处理、固态脱毒和 SSCF 生成了 450.2 kg 乳酸；第二种工艺为低酶用量的干法生物炼制技术，包括高强度的干酸预处理、固态脱毒和低酶用量下的 SSCF，生成了 351.6 kg 乳酸，参考 7.3.1 的实验结果（本小节采用了硫酸作为催化剂）；第三种工艺为包括类淀粉生物质转化过程的干法生物炼制技术，包括可生物降解草酸催化剂干酸预处理、低 pH 固态生物脱毒和 SSCF，生成了 453.0 kg 乳酸，参考第三章实验结果（本小节假定草酸在脱毒过程完全降解）；第四种工艺为调整了生物炼制链的干法生物炼制技术，包括干酸预处理、预糖化和液体脱毒、在位 SSCF，生成了 440.7 kg 乳酸，参考第五章及 7.3.2 的实验结果。四种技术路线的具体技术参数见表 7.4。

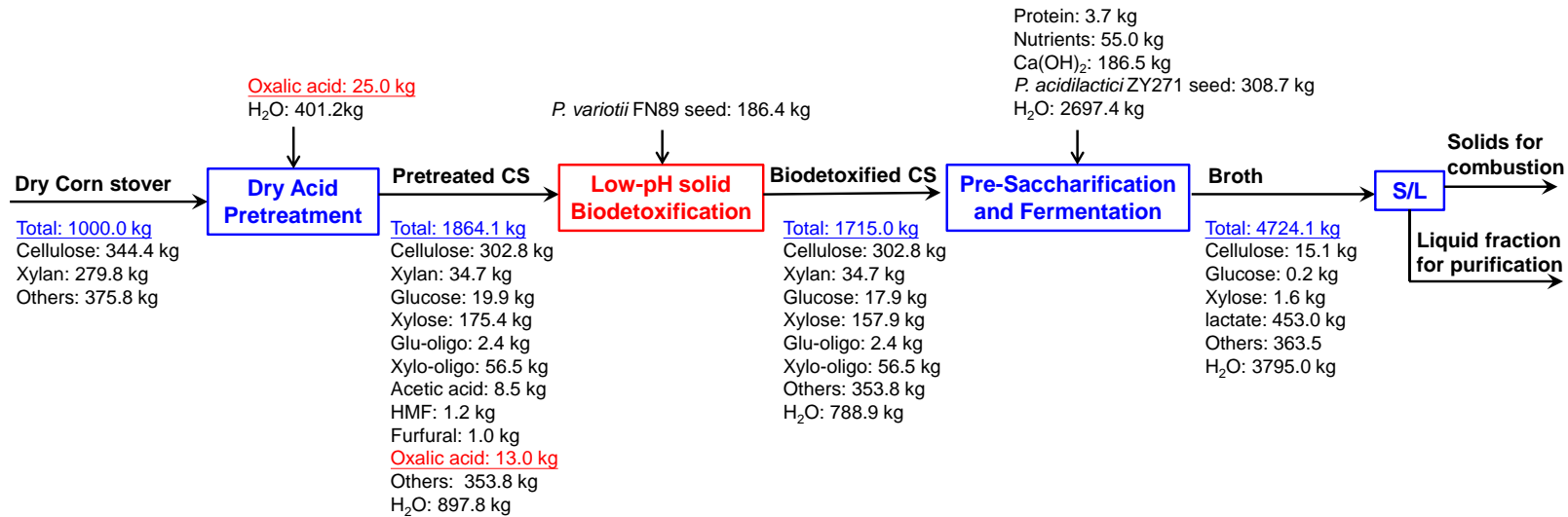
(a) Case 1: General dry biorefinery processing for cellulosic L-lactic acid production



(b) Case 2: Dry biorefinery processing with low cellulase dosage



(c) Dry biorefinery processing with starch-like carbohydrate transformation



(d) Continuous dry biorefinery processing (reframed biorefinery chain)

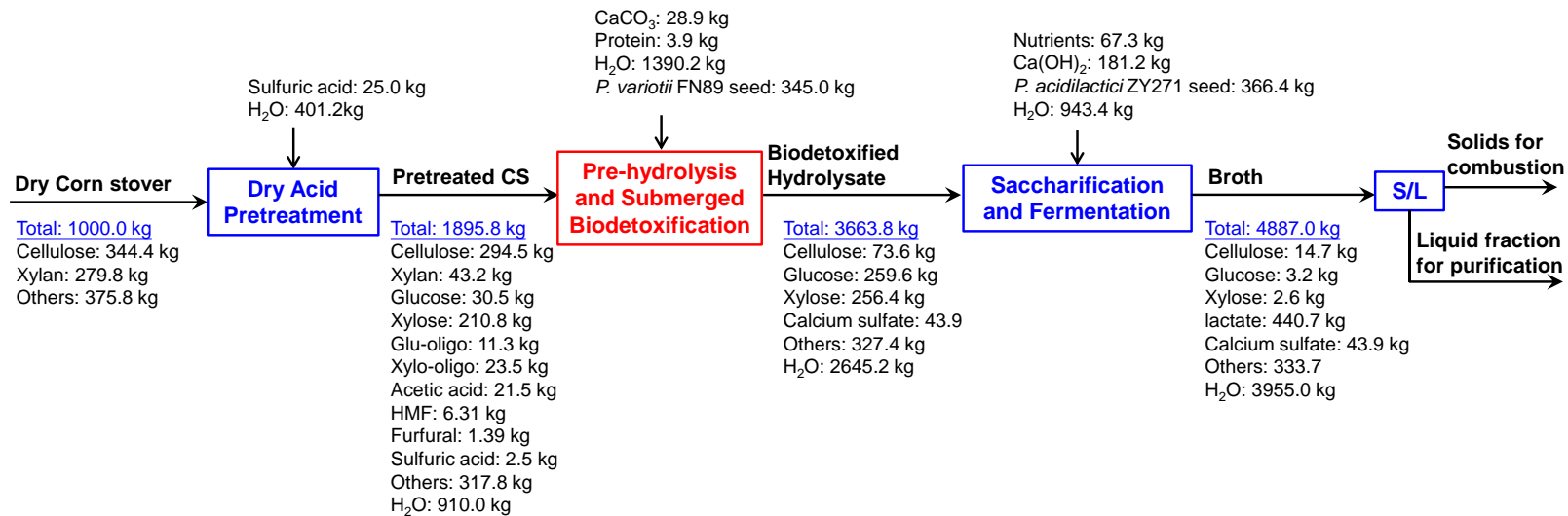


图 7.10 基于干法生物炼制技术的最新的生产高手性度纤维素 L-乳酸技术路线

Fig. 7.10 The current state-of-the-art cellulosic L-lactic acid production processings based on dry biorefinery platform. (a) Case 1: General dry biorefinery processing for cellulosic L-lactic acid production; (b) Case 2: Dry biorefinery processing with low cellulase dosage; (c) Case 3: Dry biorefinery processing with starch-like carbohydrate transformation; (d) Case 4: Continuous dry biorefinery processing (reframed biorefinery chain).

注：物料衡算均基于重复的实验结果。

表 7.4 不同干法生物炼制过程生产纤维素 L-乳酸的技术参数比较

Table 7.4 The main technological parameters of different cellulosic lactic acid production processings.

	Case 1	Case 2	Case 3	Case 4
<i>Pretreatment</i>				
Catalyst	Sulfuric acid	Sulfuric acid	Oxalic acid	Sulfuric acid
Catalyst dosage	25 mg/g dry feedstock	45 mg/g dry feedstock	25 mg/g dry feedstock	25 mg/g dry feedstock
Solids loading	~70% (w/w)	~70% (w/w)	~70% (w/w)	~70% (w/w)
Temperature	175 °C	175 °C	175 °C	175 °C
Residence time	5 min	5 min	5 min	5 min
<i>Detoxification</i>				
Neutralizer	CaCO ₃	CaCO ₃	/	CaCO ₃
Strain	<i>A. resinae</i> ZN1	<i>P. variotii</i> FN89	<i>P. variotii</i> FN89	<i>P. variotii</i> FN89
Fermentation mode	Solid fermentation	Solid fermentation	Solid fermentation	Submerged fermentation
Biodetoxification time	72 h	72 h	48 h	16 h
<i>Saccharification and fermentation</i>				
	SSCF	SSCF	SSCF	Pre-hydrolysis and SSCF
Strain	<i>P. acidilactici</i> ZY271	<i>P. acidilactici</i> ZY271	<i>P. acidilactici</i> ZY271	<i>P. acidilactici</i> ZY271
Solids loading	30% (w/w)	30% (w/w)	30% (w/w)	30% (w/w)
LA titer	120.4 g/L	98.3 g/L	119.4 g/L	111.4 g/L
LA yield from raw feedstock	0.45 g/g dry feedstock	0.35 g/g dry feedstock	0.45 g/g dry feedstock	0.44 g/g dry feedstock
<i>Product recovery</i>				
	Solids/Liquid separation, decolorization, crystallization, acidification, cation adsorption			
LA product yield from broth	71.1%	70.5%	71.1%	67.4%

注：表中相关数据从 Aspne Plus 模型中计算得来。

7.3.5 四种纤维素 L-乳酸生产案例的生命周期评价

基于干法生物炼制技术的四种 L-乳酸生产路线的指标以及产品性能差距较小,为了进一步表明四种生产方法的差异,对其碳足迹进行了计算。碳足迹的计算使用生命周期分析的方法,其系统边界设定如 7.11 所示。在生命周期计算中,还包括了玉米种植过程的相关排放。秸秆的运输采用柴油车运输,运输能耗则采用了 7.3.3 的运输模型进行计算。硫酸作为预处理催化剂时数据库中具有相关的生产排放,但草酸的生产排放不具备相关的参数,需要自行建立。生物炼制过程中的二氧化碳排放主要来自碳酸钙对预处理物料的中和以及草酸的生物降解。纤维素酶的在位生产在数据库中具有相关的排放数据,可以直接引用。最后废液经过有氧/厌氧处理产生甲烷气体作为副产品。固废则经过燃烧热电联产,其中的硫酸钙会分解为硫氧化物,因此设备中需要增加脱硫装置。脱硫使用的是氢氧化钙溶液,脱硫率设定为 95%,剩余 5%以二氧化硫气体进行排放。整个系统的能量供应本质上是来自于生物质,因此不计算碳排放。

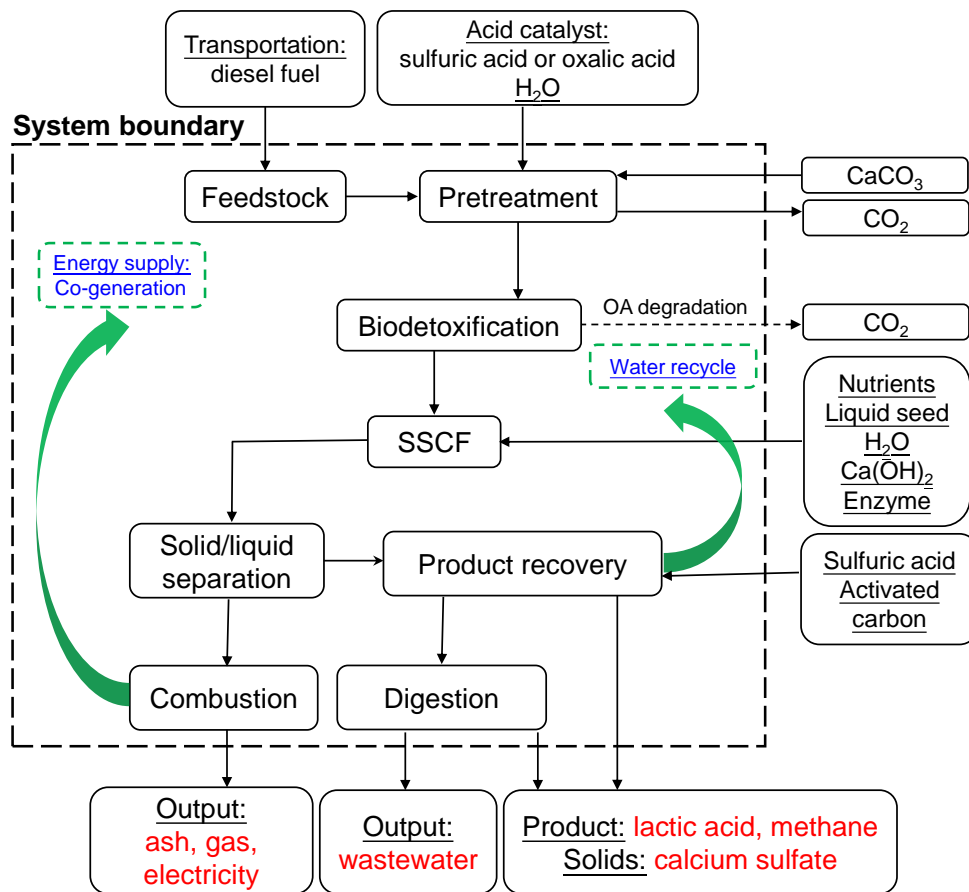


图 7.11 生命周期分析的系统边界

Fig. 7.11 The system boundary of LCA.

草酸是结构最简单的二元羧酸,工业上生产草酸的方法主要分为氧化法和合成,包括如甲酸钠法、硝酸-硫酸氧化法、羰基合成法、乙二醇氧化法、一氧化碳偶联法等。本研究首先采用的草酸合成方法是由 Rhone-Poulenc 公司发明的丙烯氧化法^[258]。该方法分

成两步，第一步是硝酸氧化丙烯生成硝基乳酸，再进一步氧化催化得到草酸。第二步所用的氧化催化剂为混合酸，基于丙烯的草酸总得率大于 90%。具体的流程以及生命周期分析所用到的数据如图 7.12 所示。

基于 Aspen Plus 模型的物料平衡数据，对四种 L-乳酸生产路线的二氧化碳排放进行了计算，结果如图 7.13 所示。四种生产方法的二氧化碳排放分别为 0.7279、0.323、0.815 以及 0.310 kg/kg L-乳酸。对于以硫酸作为酸水解催化剂以及乳酸回收酸化的案例 1、案例 2 和案例 4，硫酸生产的二氧化碳排放占总排放的比重最大。在该模型中，乳酸钙酸化制备乳酸产品需要大量的硫酸，且生成大量硫酸钙废弃物，因此进一步发展能耐受低 pH 的乳酸生产菌株以及开发萃取等乳酸提纯手段会有效的减少硫酸的使用，从而减少二氧化碳排放。对于案例 1，传统的干法生物炼制技术生产乳酸，纤维素酶的二氧化碳排放占比达到了 19.7%。为了减少纤维素酶用量，案例 2 通过增加预处理的硫酸用量加强了预处理效果。尽管通过强化的预处理，减少了后续发酵的酶用量，但由于预处理物料中大量硫酸需要通过添加碳酸钙进行中和，因此导致生产过程中会有较多的二氧化碳排放，因此在案例 2 中生物炼制过程的二氧化碳排放占到了 25.1%。案例 4 的碳排放整体趋势与案例 1 基本类似，但由于案例 4 的过程存在接种液体脱毒菌株的操作，造成了其整体被稀释，乳酸产量较低导致乳酸的回收率较低，仅为 67.4%（表 7.10），因此单位乳酸生产的二氧化碳排放比案例 1 高 11.1%。

对于案例 3，假定预处理催化剂草酸是由丙烯氧化生产得到，其整个过程的二氧化碳排放达到了 0.815 kg/kg 乳酸，明显高于其他案例。该模式下主要的碳排放来自于草酸的生产，其占比可达 44.2%以上（只计算了用于草酸生产的硝酸、丙烯、氢氧化钠和过程排放），相应的其二氧化硫排放也达到了 18.02×10^{-3} kg/kg 乳酸（图 7.15），明显高于其他案例。因此，在生物炼制过程中引入石油基产品对于碳和硫的排放控制影响极大。

四种案例的二氧化硫排放如图 7.13 所示。案例 1 和案例 4 的主要二氧化硫排放仍是硫酸的生产和购买。而案例 2 主要是来源于固废的焚烧。在 Aspen Plus 模型下，乳酸钙酸化生成的硫酸是作为建筑材料石膏副产品排出，因此不计算其硫氧化物的排放。该模式下二氧化硫的排放主要来自于硫酸催化剂。大约有 5%的硫酸催化剂经中和、焚烧后作为二氧化硫排出。这就相当于预处理过程中硫酸催化剂的用量与二氧化硫排放成正比，因此案例 2 由于大量硫酸催化剂的使用导致了其过程排放占比最高，达到了 55.9%。

事实上，葡萄糖氧化法生产草酸已经非常成熟（参考 3.3.6）。可循环催化剂的开发进一步降低了草酸生产的成本和排放。因此重新建立了以购买的精制葡萄糖为原料生产草酸的模型^[259]，并应用于案例 3 的生命周期分析中。结果表明其二氧化碳和二氧化硫排放可分别降低至 0.267 和 5.97×10^{-3} kg/kg 乳酸，为四种案例最低。这表明以葡萄糖为原料生产的草酸作为可生物降解催化剂，有潜力降低整个过程的碳排放。在此基础上，如果能以生物质中的纤维素为原料制备葡萄糖并用于草酸的合成，可进一步降低整个过程的生产成本。

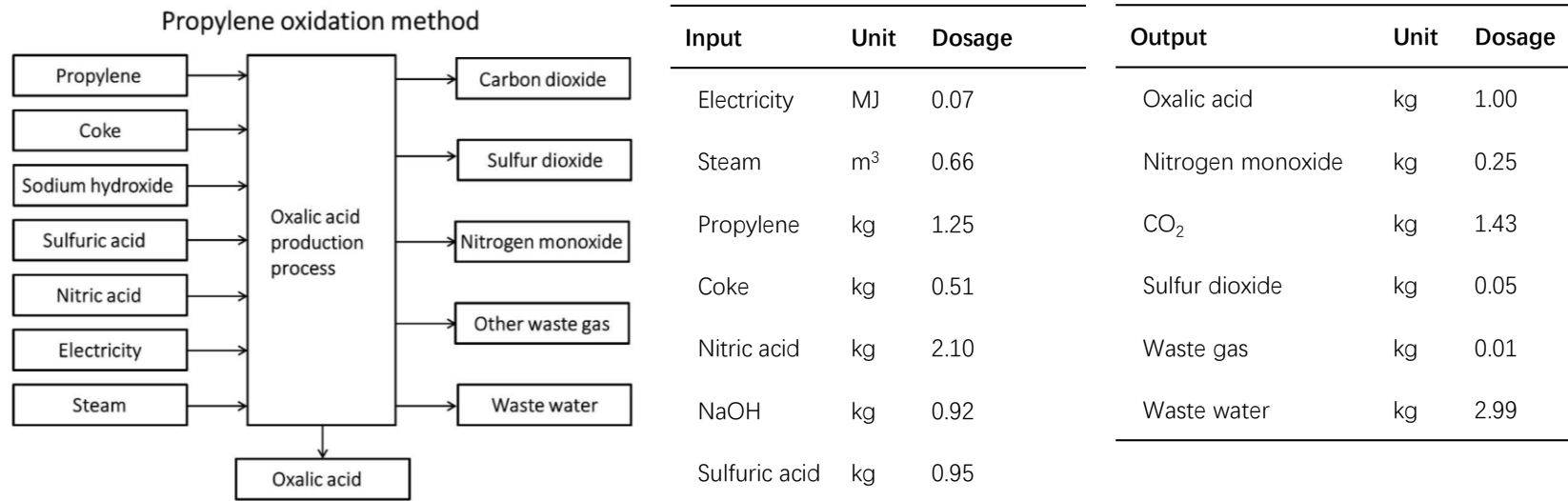
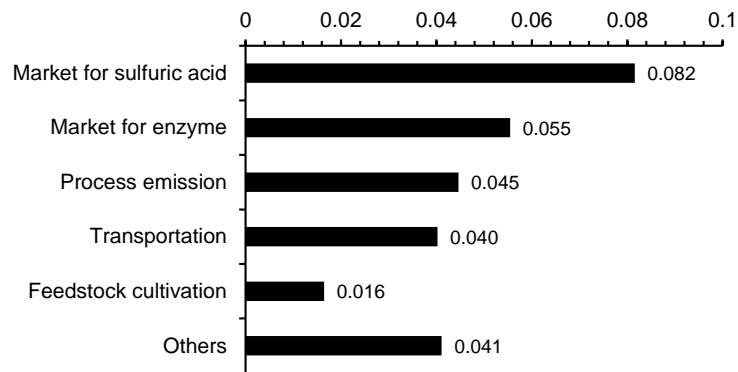
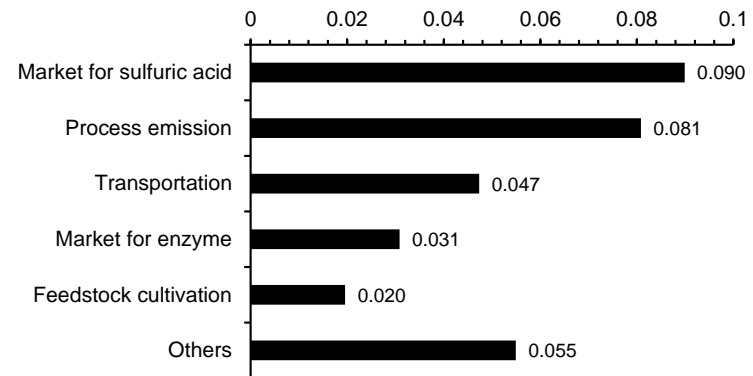


图 7.12 以丙烯作为原料生产草酸的生命周期数据
Fig. 7.12 Life cycle inventory data of oxalic acid production.

(a) Case 1: 0.279 kg eq



(b) Case2 0.323 kg eq



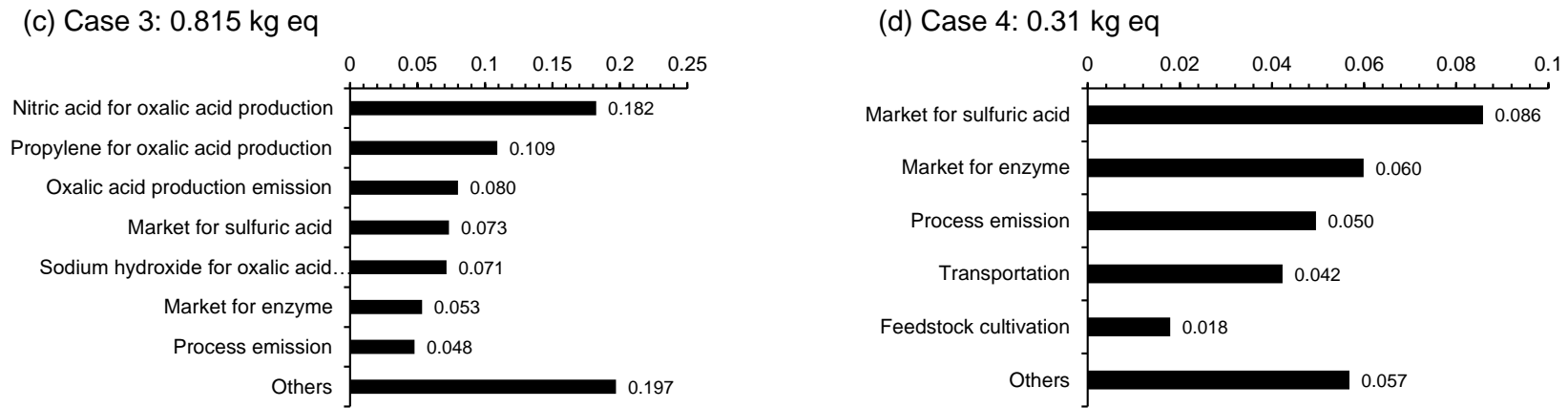
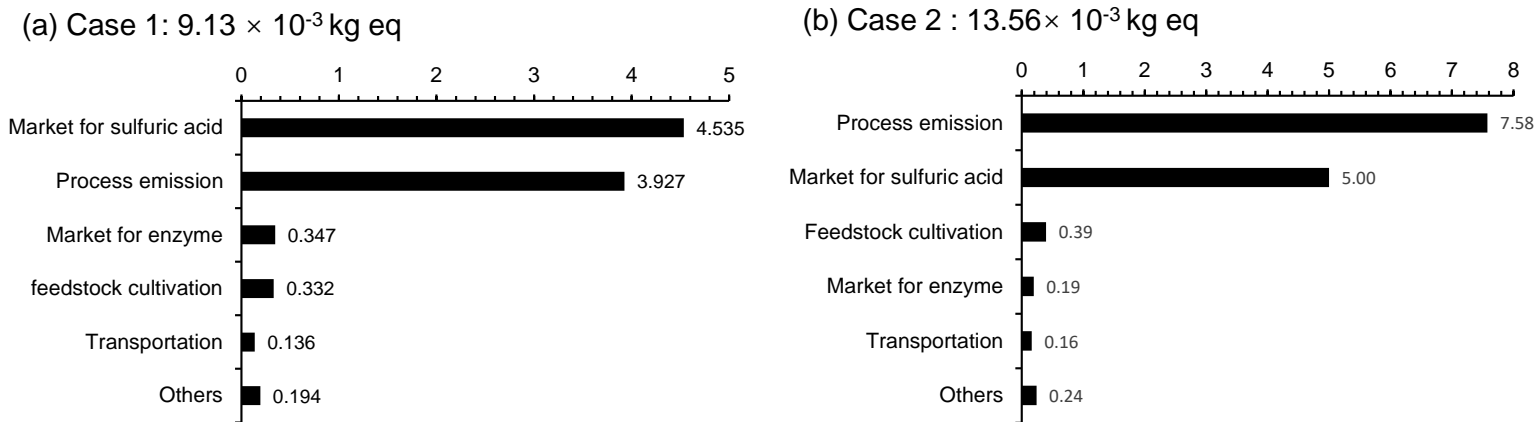


图 7.13 四种纤维素 L-乳酸生产技术的二氧化碳排放

Fig. 7.13 The carbon dioxide emission of different L-lactic acid production processing based on dry biorefinery platform.



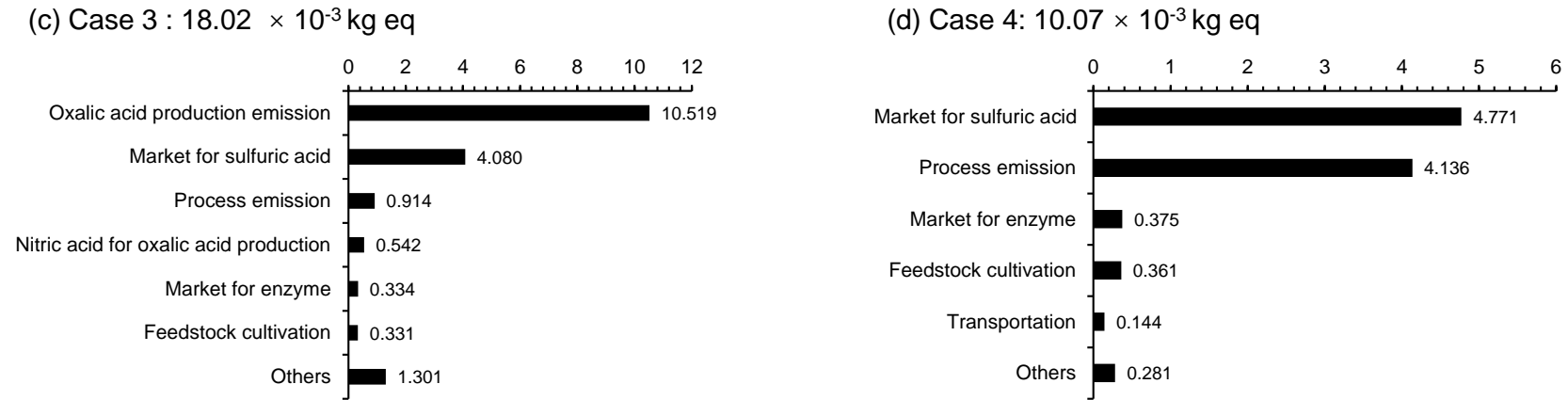


图 7.14 四种纤维素 L-乳酸生产技术的二氧化硫排放

Fig. 7.13 The sulfur dioxide emission of different L-lactic acid production processing based on dry biorefinery platform.

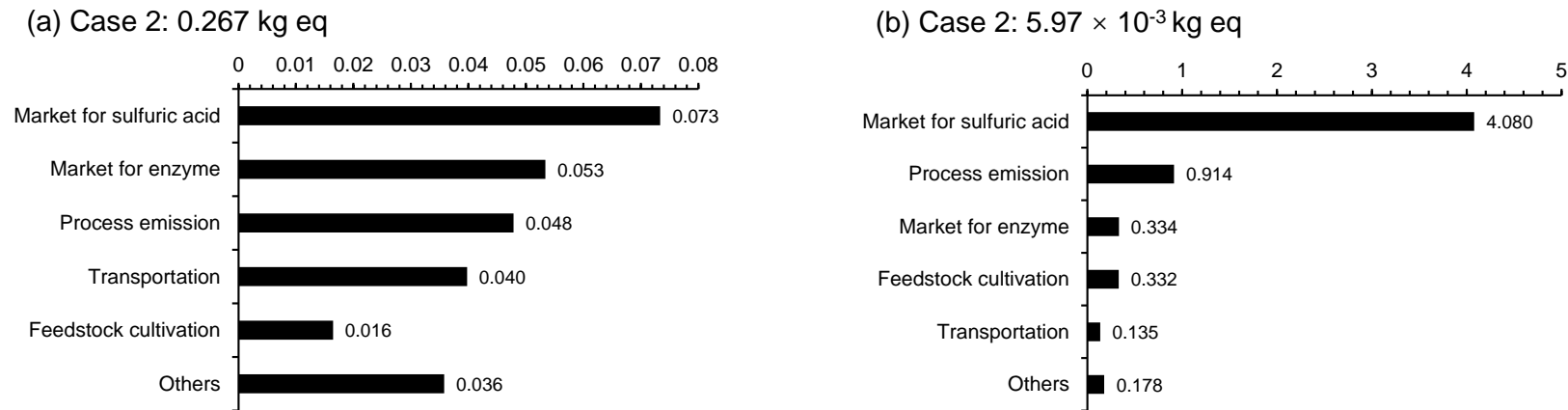


图 7.15 以葡萄糖氧化法生产草酸的案例 3 的二氧化碳和二氧化硫排放

Fig. 7.15 The carbon dioxide emission (a) and sulfur dioxide (b) of Case 2 involved the glucose oxidation for oxalic acid production.

7.4 本章小结

生产高手性度纤维素 L-乳酸需要完全去除残余预处理抑制物并尽量减少残糖浓度。干法生物炼制平台通过高效生物脱毒技术可以有效降解预处理抑制物；乳酸片球菌 *P. acidilactic* ZY271 可以同步利用木质纤维素来源全谱可发酵糖。最终获得的 L-乳酸成功合成 L-丙交酯，初步具备了工业应用的潜力。本论文第六部分对基于干法生物炼制平台技术的高手性度纤维素 L-乳酸生产过程案例建立了基于严格 Aspen Plus 流程模拟计算的详细物料平衡，并进行了初步的生命周期分析和碳排放分析。主要内容如下：

(1) 通过提高预处理过程酸用量增加了预处理强度，后续同步糖化与共发酵生产纤维素 L-乳酸的酶用量减少一半，乳酸产量仅下降了 14.1%。

(2) 纤维素粗乳酸溶液被回收至预处理阶段取代部分硫酸作为催化剂。结果表明使用 4.3% DM 的粗纤维素乳酸与 2.3% DM 的硫酸共同作为预处理催化剂时，最终乳酸发酵产量及得率分别达到了 90.1 ± 6.5 g/L 和 88.3%，指标基本与 3.8% DM 硫酸单独作为催化剂时相似；同时发酵残渣中的硫浓度下降了 72.1%。

(3) 基于区域生物质仓库 (RBPDs) 概念和干式稀酸预处理技术建立了木质纤维素原料收获、长期储存及运输的模型。相比于原始原料直接从农田收集至中央生物炼制工厂每小时所需的 31,245 MJ 运输能耗，采用该模型有效增加了运输物料的振实密度，每小时运输能耗可以降低至 15,393 MJ。运输能耗的降低进一步降低了运输成本，生产每加仑纤维素乙醇，采用直接运输原始物料的成本为 \$1.01，而采用该模型的物料运输成本可以降低至 \$0.43。

(4) 对四种基于干法生物炼制平台建立的高手性度纤维素 L-乳酸的生产技术路线建立了详细的物料平衡和 Aspen Plus 模型。包括物料运输、生物质转化和产品回收的生命周期分析表明生产每 kg 纤维素 L-乳酸的碳排放为 0.279-0.815 kg。以葡萄糖为原料氧化生产草酸作为生物可降解预处理催化剂更有潜力进一步降低整个过程的碳排放至 0.267 kg/kg 纤维素 L-乳酸。

第 8 章 结论与展望

8.1 结论

以木质纤维素生物质代替化石资源和粮食原料生产液体生物燃料和生物基化学品,是目前实现碳中和的重要手段之一。虽然近年在生物炼制技术的开发和应用上取得了很大进展,但以木质纤维素为底物的纤维素乙醇生物炼制技术在能源消耗、废水排放、转化指标等方面仍与粮食基玉米乙醇有很大差距,导致产业化难以正常实现。干法生物炼制技术是以玉米干法加工为技术模板研发的一种木质纤维素生物转化技术。本研究对已有干法生物炼制技术进行了一系列的技术创新,通过系统的应用基础研究,提出和验证了类淀粉化干法生物炼制技术的新概念,突破了目前干法生物炼制技术中的关键技术障碍,完成了一系列重要的技术升级。

本论文的主要结论如下:

(1) 筛选得到了一株全新的具有强大生物脱毒潜力的丝状真菌,鉴定为 *Paecilomyces variotii* FN89。相比于脱毒模式菌株树脂枝胞霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1, 该菌株在 28-42 °C 广泛温度范围、极低 pH 值具有良好的耐受性,可在极低可发酵单糖损失下对多种木质纤维素来源抑制物如乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛、香草醛、丁香醛和 4-HBA 均有优异的终极、快速降解能力,同时可以适用于各种场景下的生物脱毒过程。转录分析结果表明,在抑制物存在情况下会严重抑制其糖代谢,具有以抑制物作为优先碳源的遗传优势;在低 pH 下糖代谢方式和胞内 ATP 产生方式的调整、以及大分子 DNA 和线粒体内蛋白质伴侣修复功能的增强有助于细胞对酸性环境的抵抗。

(2) 使用可降解有机酸催化剂进行预处理,结合新筛选生物脱毒菌株在低 pH 下实现了对常见木质纤维素原料小麦秸秆和玉米秸秆中酸催化剂和抑制物的去除。所得脱毒物料在各种可观测指标与干磨玉米粉类似,最终实现了木质纤维素原料的类淀粉化。

(3) 探究了类淀粉化干法生物炼制所产生的固体废弃物的合理利用。在此过程中,固体废弃物的最终形式为木质素焚烧灰分。结果表明,木质素焚烧灰分中含有大量碳酸钙组分可用于预处理物料中和以及乳酸发酵中和剂。该方法可有效减少固体废弃物的排放、中和剂的使用以及二氧化碳的排放。

(4) 预处理残留的半纤维素组分水解释放的大量乙酰基水合产生的游离乙酸阻碍了乙醇发酵菌株的生长,是传统干法生物炼制不能有效转化玉米籽皮的主要问题。使用酸性较弱的柠檬酸作为预处理催化剂,调整传统生物炼制过程预处理-脱毒-糖化发酵至预处理-预糖化-液体脱毒-发酵的过程最大程度释放了乙酸并进行去除。脱毒后继续增加灭活过程实现了玉米籽皮的高效转化,整个过程的废水排放和乙醇生产指标均逼近了玉米乙醇生产。

(5) 以消除生物炼制过程中高成本纤维素酶为目标,以生物脱毒手段突破抑制物对乙醇发酵菌株的抑制瓶颈后,重新评估了现阶段的木质纤维素原料的稀酸水解工艺。采用高固含量稀酸水解和半连续液体脱毒的方法得到了可供生物转化的非酶水解可发

醇底物。技术经济评价表明用廉价酸催化剂代替纤维素酶，只可以补偿 21.5%-89.1% 的乙醇生产损失。酸水解技术在生产每吨乙醇的催化剂成本和蒸汽成本均明显高于酶水解过程，在热电联产方面也与酶水解过程有较大差距，因此酸水解技术暂不具备实际应用价值。

(6) 在预处理阶段通过适当增加酸用量可以相对提高处理强度，使得后续同步糖化与共发酵生产纤维素 L-乳酸制成的酶用量减少一半，乳酸产量仅下降了 14.1%。

(7) 探究了粗乳酸溶液回收作为预处理催化剂的潜力。使用 4.3% DM 的粗纤维素乳酸与 2.3% DM 的硫酸共同作为预处理催化剂时，指标基本与常规 3.8% DM 硫酸单独作为催化剂时相似。发酵残渣中的硫浓度下降了 72.1%。

(8) 基于区域生物质仓库 (RBPDs) 概念和干式稀酸预处理技术建立的木质纤维素原料收获、长期储存及运输的模型，可以有效降低运输能耗及纤维素乙醇生产成本。

(9) 对多种基于干法生物炼制平台生产高纯度纤维素 L-乳酸的技术路线进行了评估，结果表明包括物料运输、生物质转化和产品回收的生命周期分析表明生产每 kg 纤维素 L-乳酸的碳排放为 0.279-0.815 kg。如果以葡萄糖为原料生产的草酸作为生物可降解预处理催化剂更有潜力进一步降低整个过程的碳排放至 0.267 kg/kg 纤维素 L-乳酸。

8.2 创新点

(1) 新筛选的菌株 *Paecilomyces variotii* 首次被用于预处理木质纤维素原料的生物脱毒，并且具有较好的环境适应性，具有优先于可发酵糖代谢抑制物的能力，可应用于多种场景下的生物脱毒过程。

(2) 首次提出了木质纤维素类淀粉化的概念，实现了以生物方法同时去除预处理物料中酸催化剂和抑制物的目标。

(3) 合理利用了生物炼制过程产生的固体废物，减少了固废排放、化学品的使用和二氧化碳的排放，符合当前低碳生产的概念。

(4) 基于区域生物质仓库 (RBPDs) 概念和干式稀酸预处理技术建立了木质纤维素原料收获、长期储存及运输的模型，对包括物料运输、生物质转化和产品回收的多种基于干法生物炼制平台的纤维素 L-乳酸生产案例的评估揭示了其应用潜力。

8.3 展望

本文针对目前干法生物炼制过程中脱毒菌株耐受性较差、硫酸催化剂残留、固废处置不合理等问题进行了探究，在控制排放的前提下实现了纤维素乙醇、L-乳酸的高效生产。本研究仍存在较多问题需要深入探究：

(1) 脱毒菌株的抑制物代谢途径需要进一步构建及验证。可通过相应关进基因的鉴定、相关酶活测定、体内/外中间代谢物检测等方法进一步完善。

(2) 脱毒菌株耐受低 pH 机制需要进一步深入解析。包括蛋白质代谢方式、胞内离子浓度、胞内 ATP 浓度、细胞膜组分、细胞膜流动性等需要进一步测定。

(3) 目前所用的脱毒菌株为丝状真菌，脱毒过程成本还是太高。继续筛选脱毒菌株，在降低生物脱毒过程要求的前提下实现对木质纤维素来源抑制物的终极降解。

(4) 脱毒菌株具有许多特异的催化活性的酶，可以用于建立多种催化过程生产多种精细化学品。

(5) 木质素焚烧灰分的回收利用局限于草酸作为预处理催化剂的干法生物炼制过程。需要进一步验证该方法是否可以用于不同的酸催化剂或不同的生物炼制过程。灰分回收利用对碳排放的影响可以进一步计算。

(6) 当回收灰分至纤维素乳酸生产过程时，可能会引入额外的可溶性元素，如氯、钾等。这些元素对乳酸产品分离纯化的影响需要进一步探究。

(7) 当草酸作为预处理催化剂时，采用重构的生物炼制过程对预处理物料直接进行预糖化，接种脱毒菌株后，在高固体含量水解液下脱毒菌株无法正常生长（硫酸作为催化剂时可以正常生长）。这可能是由于部分游离草酸对脱毒菌株生长具有较大的毒性。后可以通过增加接种量或开放更多的可生物降解预处理催化剂来尝试解决。

(8) 重构的生物炼制过程需要进一步在不同底物、不同产物目标下验证其广泛应用的可行性。脱毒过程中孢子的形成也需要值得关注。在实际示范装置中需要建立发酵废弃处理装置，以避免孢子污染。

(9) 相比于之前的研究，尽管本研究的酸水解工艺保证了较高浓度的可发酵糖，但其得率仍然较低。后续研究需要进一步选择更高选择性的酸水解催化剂并对水解条件进行优化。

(10) 对四种高手性度纤维素 L-乳酸的生产路线评价还缺少相关的排废水排放、能耗及产物成本的计算，在后续研究中会进一步进行核算。

(11) 目前实验室所用的经改造的乳酸片球菌完美的匹配了木质纤维素体系对发酵菌株的要求：菌株耐高温的性质可以保证 SSCF 的高效进行；可以协同代谢所有木质纤维素来源糖；对抑制物有良好的抗逆性；可以分泌抗菌肽，进行开放式发酵。计划在乳酸片球菌中建立多种重要化学品的合成路径。目标产物包括乙醇（耐高温特性保证了高效的 SSCF、糖代谢能力强）；琥珀酸；乳酸衍生物（3-HP、丙烯酸）；苯乳酸等。

(12) 整个生物炼制过程的连续化生产。包括连续预处理、连续糖化、连续脱毒和连续发酵过程的整合。

(13) 进一步建立纤维素聚乳酸（PLA）整体生产过程的计算模型及进行相关成本和碳排放计算。

参考文献

- [1] Ahmad A, Banat F, Taher H. A Review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: recent developments and challenges. *Environmental Technology & Innovation*. 2020, 20: 101138.
- [2] Stavroula R, Maria K, Georgios Z, Pantelis C, Model-based assessment of electricity storage in a European system producing hydrogen and hydrocarbons from renewable energy. 16 th International conference on the European energy market (EEM). 2019, 1-7.
- [3] Li M, Guo C, Luo B, Chen C, Wang S, Min D. Comparing impacts of physicochemical properties and hydrolytic inhibitors on enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2020, 43: 111-122.
- [4] Shen X, Sun R. Recent advances in lignocellulose prior-fractionation for biomaterials, biochemicals, and bioenergy. *Carbohydrate Polymers*. 2021, 261: 117884.
- [5] Ma Y, Shen Y, Liu Y. State of the art of straw treatment technology: challenges and solutions forward. *Bioresource Technology*. 2020, 313: 123656.
- [6] Ndayisenga F, Yu Z, Zheng J, Wang B, Liang H, Phulpoto IA, Habiyakare T, Zhou D. Microbial electrohydrogenesis cell and dark fermentation integrated system enhances biohydrogen production from lignocellulosic agricultural wastes: substrate pretreatment towards optimization. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021, 145: 111078.
- [7] Tripathi N, Hills CD, Singh RS, Atkinson CJ. Biomass waste utilisation in low-carbon products: harnessing a major potential resource. *npj Climate and Atmospheric Science*, 2019, 2: 1-10.
- [8] Abu Tayeh HN, Azaizeh H, Gerchman Y. Circular economy in olive oil production - olive mill solid waste to ethanol and heavy metal sorbent using microwave pretreatment. *Waste Management*. 2020, 113: 321-328.
- [9] Nurika I. The pattern of lignocellulose degradation from cacao pod using the brown rot (*serpula lacrymans*) and white rot (*schizophyllum commune*) fungi. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. 2019, 230: 012080.
- [10] Ren J, Yu P, Xu X. Straw utilization in China—status and recommendations. *Sustainability*. 2019, 11: 1-17.
- [11] 代亚平. 生物秸秆处理技术综述. *智慧农业导刊*. 2021, 1: 10-12.
- [12] Dahadha S, Amin Z, Bazyar Lakeh AA, Elbeshbishy E. Evaluation of different pretreatment processes of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production. *Energy & Fuels*. 2017, 31: 10335-10347.
- [13] Yiin CL, Yap KL, Ku AZE, Chin BLF, Lock SSM, Cheah KW, Loy ACM, Chan YH. Recent advances in green solvents for lignocellulosic biomass pretreatment: potential of choline chloride (ChCl) based solvents. *Bioresource Technology*. 2021, 333: 125195.
- [14] Hosseini Koupaie E, Dahadha S, Bazyar Lakeh AA, Azizi A, Elbeshbishy E. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-a review. *Journal of Environmental Management*. 2019, 233: 774-784.

- [15] Rezania S, Oryani B, Cho J, Talaiekhosani A, Sabbagh F, Hashemi B, Rupani P F, Mohammadi AA. different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: an overview. *Energy*. 2020, 199: 117457.
- [16] Mankar AR, Pandey A, Modak A, Pant KK. Pretreatment of lignocellulosic biomass: a review on recent advances. *Bioresource Technology*. 2021, 334: 125235.
- [17] Capolupo L, Faraco V. Green methods of lignocellulose pretreatment for biorefinery development. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100: 9451-9467.
- [18] Zhang M, Su R, Qi W, He Z. Enhanced enzymatic hydrolysis of lignocellulose by optimizing enzyme complexes. *Appl Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 160: 1407-1414.
- [19] Bolado-Rodriguez S, Toquero C, Martin-Juarez J, Travaini R, Garcia-Encina PA. Effect of thermal, acid, alkaline and alkaline-peroxide pretreatments on the biochemical methane potential and kinetics of the anaerobic digestion of wheat straw and sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*. 2016, 201: 182-190.
- [20] An S, Li W, Xue F, Li X, Xia Y, Liu Q, Chen L, Jameel H, Chang HM. Effect of removing hemicellulose and lignin synchronously under mild conditions on enzymatic hydrolysis of corn stover. *Fuel Processing Technology*. 2020, 204: 106407.
- [21] Zhang Q, Tan X, Wang W, Yu Q, Chen X, Miao C, Guo Y, Zhang Y, Zhuang X, Sun Y, Kong X, Yuan Z. A novel recyclable alkaline biphasic 2-phenoxyethanol/water system for rice straw biorefinery under mild conditions. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering* 2020, 8: 7649-7655.
- [22] Kim H, Ahn Y, Kwak SY. Comparing the influence of acetate and chloride anions on the structure of ionic liquid pretreated lignocellulosic biomass. *Biomass and Bioenergy*. 2016, 93: 243-253.
- [23] Louis ACF, Venkatachalam S. Energy efficient process for valorization of corn cob as a source for nanocrystalline cellulose and hemicellulose production. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020, 163: 260-269.
- [24] Agger J, Johansen KS, Meyer AS. pH catalyzed pretreatment of corn bran for enhanced enzymatic arabinoxylan degradation. *New Biotechnology*. 2011, 28: 125-135.
- [25] Kalita E, Nath BK, Deb P, Agan F, Islam MR, Saikia K. High quality fluorescent cellulose nanofibers from endemic rice husk: isolation and characterization. *Carbohydrate Polymers*. 2015, 122: 308-313.
- [26] Santos J, Ouadi M, Jahangiri H, Hornung A. Valorisation of lignocellulosic biomass investigating different pyrolysis temperatures. *Journal of the Energy Institute*. 2020, 93: 1960-1969.
- [27] Chen W, Chen Y, Yang H, Xia M, Li K, Chen X, Chen H. Co-pyrolysis of lignocellulosic biomass and microalgae: products characteristics and interaction effect. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 860-868.
- [28] Reddy KO, Maheswari CU, Dhlamini MS, Mothudi BM, Kommula VP, Zhang J, Zhang J, Rajulu AV. Extraction and characterization of cellulose single fibers from native African

- Napier grass. *Carbohydrate Polymers*. 2018, 188: 85-91.
- [29] Yu J, Paterson N, Blamey J, Millan M. Cellulose, xylan and lignin interactions during pyrolysis of lignocellulosic biomass. *Fuel*. 2017, 191: 140-149.
- [30] Reshmy R, Philip E, Madhavan A, Sirohi R, Pugazhendhi A, Binod P, Kumar Awasthi M, Vivek N, Kumar V, Sindhu R. Lignocellulose in future biorefineries: strategies for cost-effective production of biomaterials and bioenergy. *Bioresource Technology*. 2022, 344: 126241.
- [31] Takkellapati S, Li T, Gonzalez MA. An Overview of biorefinery derived platform chemicals from a cellulose and hemicellulose biorefinery. *Clean Technologies & Environmental Policy*. 2018, 20: 1615-1630.
- [32] Okolie JA, Nanda S, Dalai AK, Kozinski JA. Chemistry and specialty industrial applications of lignocellulosic biomass. *Waste and Biomass Valorization*. 2020, 12: 2145-2169.
- [33] Velis CA, Vrancken KC. Which material ownership and responsibility in a circular economy?. *Waste Management & Research*. 2015, 33: 773-774.
- [34] Rosales-Calderon O, Arantes V. A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12: 240.
- [35] Almuth E, Rachel S. Dead end road: the false promises of cellulosic biofuels. *Biofuelwatch*. 2018, <http://www.biofuelwatch.org.uk/dead-end-road/>.
- [36] Voegelé E. Shell files bid to purchase Abengoa's cellulosic ethanol plant. *Biomass Magazine*. 2016, <http://biomassmagazine.com/articles/13792/shell-files-bid-to-purchase-abengoas-cellulosic-ethanol-plant>.
- [37] Lane J. Strategic intent: the Digest's 2016 multi-slide guide to Raizen, Reliance Industries. *biofuelsDigest*. 2016, <https://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2016/10/10/strategic-intent-the-digests-2016-multi-slide-guide-to-raizen-reliance-industries/9/>.
- [38] Schill SR. Global cellulosic ethanol developments. *Ethanol Producer Magazine*. 2016 <http://www.ethanolproducer.com/articles/13135/global-cellulosic-ethanol-developments>.
- [39] Sapp M. Poet-Dsm to host Poet liberty grand opening on Sept. 3. *biofuelsDigest*. 2014, <https://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2014/08/14/poet-dsm-to-host-poet-liberty-grand-opening-on-sept-3/>.
- [40] Hassan SS, Williams GA, Jaiswal AK. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2018, 262: 310-318.
- [41] Liu Y, Tang Y, Gao H, Zhang W, Jiang Y, Xin F, Jiang M. Challenges and future perspectives of promising biotechnologies for lignocellulosic biorefinery. *Molecules*. 2021, 26: 5411.
- [42] Tsapekos P, Kougias P G, Angelidaki I. Mechanical pretreatment for increased biogas production from lignocellulosic biomass; predicting the methane yield from structural plant components. *Waste Management*. 2018, 78: 903-910.
- [43] Pellerá FM, Gidarakos E. Microwave Pretreatment of lignocellulosic agroindustrial waste for methane production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2017, 5: 352-

- 365.
- [44] Paudel SR, Banjara SP, Choi OK, Park KY, Kim YM, Lee JW. Pretreatment of agricultural biomass for anaerobic digestion: current state and challenges. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1194-1205.
- [45] Kumar B, Bhardwaj N, Agrawal K, Chaturvedi V, Verma P. Current perspective on pretreatment technologies using lignocellulosic biomass: an emerging biorefinery concept. *Fuel Processing Technology*. 2020, 199: 106244.
- [46] Cheah WY, Sankaran R, Show PL, Tg. Ibrahim TNB, Chew KW, Culaba A, Chang JS. Pretreatment methods for lignocellulosic biofuels production: current advances, challenges and future prospects. *Biofuel Research Journal*. 2020, 7: 1115-1127.
- [47] Zhao L, Sun ZF, Zhang CC, Nan J, Ren NQ, Lee DJ, Chen C. Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: challenges and perspectives. *Bioresource Technology*. 2022, 343: 126123.
- [48] Sun F, Chen H. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Bioresource Technology*. 2008, 99: 5474-5479.
- [49] Roy R, Rahman MS, Raynie DE. Recent advances of greener pretreatment technologies of lignocellulose. *Current Research in Green and Sustainable Chemistry*. 2020, 3: 100035.
- [50] Garcia-Cubero MA, Gonzalez-Benito G, Indacochea I, Coca M, Bolado S. Effect of ozonolysis pretreatment on enzymatic digestibility of wheat and rye straw. *Bioresource Technology*. 2009, 100: 1608-1613.
- [51] Zhao C, Ding W, Chen F, Cheng C, Shao Q. Effects of compositional changes of afex-treated and h-afex-treated corn stover on enzymatic digestibility. *Bioresource Technology*. 2014, 155: 34-40.
- [52] Jacquet N, Maniet G, Vanderghem C, Delvigne F, Richel A. Application of steam explosion as pretreatment on lignocellulosic material: a review. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2015, 54: 2593-2598.
- [53] Alonso E. The role of supercritical fluids in the fractionation pretreatments of a wheat bran-based biorefinery. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2018, 133: 603-614.
- [54] Maurya DP, Singla A, Negi S. An overview of key pretreatment processes for biological conversion of lignocellulosic biomass to bioethanol. *3 Biotech*. 2015, 5: 597-609.
- [55] Duque A, Manzanares P, Ballesteros M. Extrusion as a pretreatment for lignocellulosic biomass: fundamentals and applications. *Renewable Energy*. 2017, 114: 1427-1441.
- [56] Jonsson L J, Martin C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 103-112.
- [57] Nitsos C, Rova U, Christakopoulos P. Organosolv fractionation of softwood biomass for biofuel and biorefinery applications. *Energies*. 2017, 11: 50.
- [58] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresource Technology*. 2002, 83: 1-11.
- [59] Yoo C G, Pu Y, Ragauskas AJ. Ionic liquids: promising green solvents for lignocellulosic biomass utilization. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. 2017, 5: 5-11.

- [60] Pielhop T, Amgarten J, Von Rohr PR, Studer MH. Steam explosion pretreatment of softwood: the effect of the explosive decompression on enzymatic digestibility. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9: 152.
- [61] Baruah J, Nath BK, Sharma R, Kumar S, Deka RC, Baruah DC, Kalita E. Recent trends in the pretreatment of lignocellulosic biomass for value-added products. *Frontiers in Energy Research*, 2018, 6: 141
- [62] Zhuang X, Wang W, Yu Q, Qi W, Wang Q, Tan X, Zhou G, Yuan Z. liquid hot water pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production accompanying with high valuable products. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 68-75.
- [63] Daza Serna LV, Orrego Alzate CE, Cardona Alzate CA. Supercritical fluids as a green technology for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 113-120.
- [64] Zhang CW, Xia SQ, Ma PS. Facile pretreatment of lignocellulosic biomass using deep eutectic solvents. *Bioresource Technology*. 2016, 219: 1-5.
- [65] Masran R, Zanirun Z, Bahrin EK, Ibrahim MF, Lai Yee P, Abd-Aziz S. Harnessing the potential of ligninolytic enzymes for lignocellulosic biomass pretreatment. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2016, 100: 5231-5246.
- [66] Wan C, Li Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass. *Biotechnology Advances*. 2012, 30: 1447-1457.
- [67] Isroi I, Ria M, Syamsiah S, Niklasson C, Cahyanto M, Lundquist K, Taherzadeh M. Biological pretreatment of lignocelluloses with white-rot fungi and its applications: a review. *BioResources*. 2011, 6: 5224-5259.
- [68] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethano. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2008, 2: 26-40.
- [69] Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, Negro M J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4851-4861.
- [70] Huang YB, Fu Y. Hydrolysis of cellulose to glucose by solid acid catalysts. *Green Chemistry*. 2013, 15: 1095-1111.
- [71] Taherzadeh MJ, Karimi K. Acid-based hydrolysis processes for ethanol from lignocellulosic materials: a review. *BioResources*. 2007, 2: 472-499.
- [72] Shuai L, Pan X. Hydrolysis of cellulose by cellulase-mimetic solid catalyst. *Energy & Environmental Science*. 2012, 5: 6889-6894.
- [73] Brijwani K, Oberoi HS, Vadlani PV. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. *Process Biochemistry*. 2010, 45: 120-128.
- [74] Champreda V, Mhuantong W, Lekakarn H, Bunternngsook B, Kanokratana P, Zhao XQ, Zhang F, Inoue H, Fujii T, Eurwilaiachitr L. Designing cellulolytic enzyme systems for biorefinery: from nature to application. *Journal of Bioscience Bioengineering*. 2019, 128: 637-654.

- [75] Gregg DJ, Boussaid A, Saddler JN. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnology & Bioengineering*. 1996, 51: 375-383.
- [76] Kim IJ, Jung JY, Lee HJ, Park HS, Jung YH, Park K, Kim KH. Customized optimization of cellulase mixtures for differently pretreated rice straw. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2015, 38: 929-937.
- [77] Xu C, Zhang J, Zhang Y, Guo Y, Xu H, Xu J, Wang Z. Enhancement of high-solids enzymatic hydrolysis efficiency of alkali pretreated sugarcane bagasse at low cellulase dosage by fed-batch strategy based on optimized accessory enzymes and additives. *Bioresource Technology*. 2019, 292: 121993.
- [78] Klein-Marcuschamer D, Oleskowicz-Popiel P, Simmons BA, Blanch HW. The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology & Bioengineering*. 2012, 109: 1083-1087.
- [79] Liu G, Zhang J, Bao J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2016, 39: 133-140.
- [80] Gong Z, Yang G, Song J, Zheng P, Liu J, Zhu W, Huang L, Chen L, Luo X, Shuai L. Understanding the promoting effect of non-catalytic protein on enzymatic hydrolysis efficiency of lignocelluloses. *Bioresources and Bioprocessing*. 2021, 8: 9.
- [81] Jing X, Zhang X, Bao J. Inhibition performance of lignocellulose degradation products on industrial cellulase enzymes during cellulose hydrolysis. *Appl Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 159: 696-707.
- [82] Gregg DJ, Boussaid A, Saddler JN. Techno-economic evaluations of a generic wood-to-ethanol process: effect of increased cellulose yields and enzyme recycle. *Bioresource Technology*. 1998, 63: 7-12.
- [83] Murphy W. Editorials. *Industrial & Engineering Chemistry*. 1945, 37: 1-3.
- [84] Jönsson LJ, Alriksson B, Nilvebrant NO. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. *Biotechnology for Biofuels*. 2013, 6: 16.
- [85] Wang C, Zhang X, Liu Q, Zhang Q, Chen L, Ma L. A review of conversion of lignocellulose biomass to liquid transport fuels by integrated refining strategies. *Fuel Processing Technology*. 2020, 208: 106485.
- [86] Chandel AK, Garlapati VK, Singh AK, Antunes FF, Da Silva SS. The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology*. 2018, 264: 370-381.
- [87] Bozell JJ, Petersen GR. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the Us department of energy’s “Top 10” revisited. *Green Chemistry*. 2010, 12: 539-554.
- [88] Liu CG, Xiao Y, Xia XX, Zhao XQ, Peng L, Srinophakun P, Bai FW. Cellulosic ethanol production: progress, challenges and strategies for solutions. *Biotechnology Advances*. 2019, 37: 491-504.

- [89] Gauss WF, Suzuki S, Takagi M. Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments. Volume 3990944. Issue 610731 Edited by: Office USPT. USA , Bio Research Center Company Limited. 1976.
- [90] Hahn-Hagerdal B, Galbe M, Gorwa-Grauslund M F, Liden G, Zacchi G. Bioethanol-the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*. 2006, 24: 549-556.
- [91] Nogueira CDC, Padilha CEDA, Santos ESD. Enzymatic hydrolysis and simultaneous saccharification and fermentation of green coconut fiber under high concentrations of ethylene oxide-based polymers. *Renewable Energy*. 2021, 163: 1536-1547.
- [92] Xiao WJ, Song HT, Li HN, Li X, Yang YX, Hu P, Zhou SN, Hu YM, Xu XY, Zhang Z, Jiang ZB. Effect of different biological surfactants on engineering *saccharomyces cerevisiae* in simultaneous saccharification and fermentation of corncob. *BioResources*. 2020, 15: 2512-2524.
- [93] Amoah J, Kahar P, Ogino C, Kondo A. Bioenergy and biorefinery: feedstock, biotechnological conversion, and products. *Biotechnol Journal*. 2019, 14: e1800494.
- [94] Berlin A, Gilkes N, Kilburn D, Bura R, Markov A, Skomarovsky A, Okunev O, Gusakov A, Maximenko V, Gregg D, Sinitsyn A, Saddler J. Evaluation of novel fungal cellulase preparations for ability to hydrolyze softwood substrates—evidence for the role of accessory enzymes. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005, 37: 175-184.
- [95] Gao D, Uppugundla N, Chundawat SPS, Yu X, Hermanson S, Gowda K, Brumm P, Mead D, Balan V, Dale BE. Hemicellulases and auxiliary enzymes for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnology for Biofuels*. 2011, 4: 5.
- [96] Jia L, Goncalves GA, Takasugi Y, Mori Y, Noda S, Tanaka T, Ichinose H, Kamiya N. Effect of pretreatment methods on the synergism of cellulase and xylanase during the hydrolysis of bagasse. *Bioresource Technology*. 2015, 185: 158-164.
- [97] Robak K, Balcerek M. Review of second generation bioethanol production from residual biomass. *Food Technology and Biotechnology*. 2018, 56: 174-187.
- [98] Chen H, Fu X. Industrial technologies for bioethanol production from lignocellulosic biomass. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016, 57: 468-478.
- [99] Lynd LR, Van Zyl WH, McBride JE, Laser M. Consolidated bioprocessing of cellulosic biomass: an update. *Current Opinion Biotechnology*. 2005, 16: 577-583.
- [100] Eranki P, Bals B, Dale B. Advanced regional biomass processing depots: a key to the logistical challenges of the cellulosic biofuel industry. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. 2011, 5: 621-630.
- [101] Muth DJ, Langholtz MH, Tan ECD, Jacobson JJ, Schwab A, Wu MM, Argo A, Brandt CC, Cafferty KG, Chiu YW, Dutta A, Eaton LM, Searcy EM. Investigation of thermochemical biorefinery sizing and environmental sustainability impacts for conventional supply system and distributed pre-processing supply system designs. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. 2014, 8: 545-567.
- [102] Bonner IJ, Muth DJ, Koch JB, Karlen DL. Modeled impacts of cover crops and vegetative barriers on corn stover availability and soil quality. *BioEnergy Research*. 2014, 7: 576-

589.

- [103] Lamers P, Roni MS, Tumuluru JS, Jacobson JJ, Cafferty KG, Hansen JK, Kenney K, Teymouri F, Bals B. Techno-economic analysis of decentralized biomass processing depots. *Bioresource Technology*. 2015, 194: 205-213.
- [104] Kim S, Dale B. Comparing alternative cellulosic biomass biorefining systems: centralized versus distributed processing systems. *Biomass and Bioenergy*. 2015, 74: 135-147.
- [105] Carolan JE, Joshi SV, Dale BE. Technical and financial feasibility analysis of distributed bioprocessing using regional biomass pre-processing centers. *Journal of Agricultural & Food Industrial Organization*. 2007, 5: 10.
- [106] Dale B. A sober view of the difficulties in scaling cellulosic biofuels. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. 2017, 11: 5-7.
- [107] Hess J R, Kenney, KL, Ovard, LP, Searcy, EM, Wright, CT. Commodity-scale production of an infrastructure-compatible bulk solid from herbaceous lignocellulosic biomass. Idaho National Laboratory, USA, INL/EXT-09-17527. 2009.
- [108] Lau MW, Bals BD, Chundawat SPS, Jin M, Gunawan C, Balan V, Jones AD, Dale BE. 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.
- [109] Zhang J, Chu D, Huang J, Yu Z, Dai G, Bao J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology & Bioengineering*. 2009, 105: 718-728.
- [110] Shao S, Zhang J, Hou W, Qureshi AS, Bao J. Lower pressure heating steam is practical for the distributed dry dilute sulfuric acid pretreatment. *Bioresource Technology*. 2017, 238: 744-748.
- [111] He Y, Zhang L, Zhang J, Bao J. Helically agitated mixing in dry dilute acid pretreatment enhances the bioconversion of corn stover into ethanol. *Biotechnology for Biofuels*, 2014, 7: 1.
- [112] 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.
- [113] 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.
- [114] Liu G, Zhang Q, Li H, Qureshi AS, Zhang J, Bao X, Bao J. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. *Biotechnology & Bioengineering*. 2018, 115: 60-69.
- [115] 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.
- [116] 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.
- [117] 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.
- [118] Liu Q, Lu M, Jin C, Hou W, Zhao L, Bao J. Ultra-centrifugation force in adaptive evolution changes the cell structure of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* into a favorable space for lipid accumulation. *Biotechnology & Bioengineering*. 2022, 119: 1509-1521.
- [119] Jin C, Huang Z, Bao J. High-titer glutamic acid production from lignocellulose using an engineered *Corynebacterium glutamicum* with simultaneous co-utilization of xylose and glucose. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2020, 8: 6315-6322.
- [120] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*. 2000, 74: 25-33.
- [121] Zhang J, Zhu Z, Wang X, Wang N, Wang W, Bao J. Biodegradation 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.
- [122] Ortiz-Monsalve S, Valente P, Poll E, Jaramillo-García V, Pegas Henriques JA, Gutterres M. Biodecolourization and biodegradation of dye-containing wastewaters from leather dyeing by the native fungal strain *Trametes villosa* SCS-10. *Biochemical Engineering Journal*. 2019, 141: 19-28.
- [123] Choi SY, Gong G, Park HS, Um Y, Sim SJ, Woo HM. Extreme furfural tolerance of a soil bacterium *Enterobacter cloacae* GGT036. *Journal of Biotechnology*. 2015, 193: 11-13.
- [124] Xie Y, Hu Q, Feng G, Jiang X, Hu J, He M, Hu G, Zhao S, Liang Y, Ruan Z, Peng N. Biodegradation of phenolic inhibitors from lignocellulose pretreatment using *Kurthia huakuii* LAM0618T and subsequent lactic acid fermentation. *Molecules*, 2018, 23: 2626.
- [125] Hou-Rui Z, Xiang-Xiang Q, Silva SS, Sarrouh BF, Ai-Hua C, Yu-Heng Z, Ke J, Qiu X. Novel isolates for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysate. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 152: 199-212.
- [126] Kosa M, Ragauskas AJ. Bioconversion of lignin model compounds with oleaginous *Rhodococci*. *Appl Microbiology and Biotechnology*. 2012, 93: 891-900.
- [127] Zhang Y, Han B, Ezeji TC. Biotransformation of furfural and 5-hydroxymethyl furfural (HMF) by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 during butanol fermentation. *New Biotechnology*. 2012, 29: 345-351.
- [128] Yi X, Gao Q, Zhang L, Wang X, He Y, Hu F, Zhang J, Zou G, Yang S, Zhou Z, Bao J. Heterozygous diploid structure of *Amorphotheca resinae* ZN1 contributes efficient biodegradation on solid pretreated corn stover. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12: 126.
- [129] He Y, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodegradation on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation.

- Biotechnology for Biofuels. 2016, 9: 19.
- [130] Ran H, Zhang J, Gao Q, Lin Z, Bao J. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. Biotechnology for Biofuels. 2014, 7: 51.
- [131] Liu G, Bao J. Evaluation of electricity generation from lignin residue and biogas in cellulosic ethanol production. Bioresource Technology. 2017, 243: 1232-1236.
- [132] Zheng L, Han X, Han T, Liu G, Bao J. Formulating a fully converged biorefining chain with zero wastewater generation by recycling stillage liquid to dry acid pretreatment operation. Bioresource Technology. 2020, 318: 124077.
- [133] Irshad A. Cellulosic ethanol, what happened, what's happening?. biofuelsDigest. 2016. <https://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2016/08/01/cellulosic-ethanol-what-happened-whats-happening/>.
- [134] Sarantis M. Advanced biofuels 'not yet viable', industry study warns. Euractiv. 2018. <https://www.euractiv.com/section/agriculture-food/news/advanced-biofuels-cannot-yet-stand-on-its-own-two-legs-industry-study-says/>.
- [135] Mosier NS, Ileleji KE. Chapter 23: how fuel ethanol is made from corn. Biomass to Biofuels. 2015: 379-384.
- [136] Samson RA. *Paecilomyces* and some allied hyphomycetes. Transaction for the British Mycological Society. 1975, 64: 174.
- [137] Urquhart AS, Mondo SJ, Makela MR, Hane JK, Wiebenga A, He G, Mihaltcheva S, Pangilinan J, Lipzen A, Barry K, De Vries RP, Grigoriev IV, Idnurm A. Genomic and genetic insights into a cosmopolitan fungus, *Paecilomyces variotii* (Eurotiales). Frontiers in Microbiology. 2018, 9: 3058.
- [138] Herrera Bravo De Laguna I, Toledo Marante FJ, Mioso R. Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. Journal of Applied Microbiology. 2015. 119: 1455-1466.
- [139] Houbraken J, Varga J, Rico-Munoz E, Johnson S, Samson RA. Sexual reproduction as the cause of heat resistance in the food spoilage fungus *Byssosclamyces spectabilis* (anamorph *Paecilomyces variotii*). Applied and Environmental Microbiology. 2008, 74: 1613-1619.
- [140] Michelin M, Silva TM, Benassi VM, Peixoto-Nogueira SC, Moraes LA, Leao JM, Jorge JA, Terenzi HF, Polizeli Mde L. Purification and characterization of a thermostable alpha-amylase produced by the fungus *Paecilomyces variotii*. Carbohydrate Research. 2010, 345: 2348-2353.
- [141] Nguyen VN, Oh IJ, Kim YJ, Kim KY, Kim YC, Park RD. Purification and characterization of chitinases from *Paecilomyces variotii* DG3 parasitizing on *Meloidogyne incognita* eggs. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 2009, 36: 195-203.
- [142] Fernanda SP, Vania B, Alves MG. Fermentation and enzyme treatments for sorghum. Brazilian Journal of Microbiology. 2012, 43: 89-97.

- [143] Patil N P, Patil KP, Chaudhari BL, Chincholkar SB. Production, purification of exo-polygalacturonase from soil isolate *Paecilomyces variotii* NFCCI 1769 and its application. *Indian Journal of Microbiology*. 2011, 52: 240-246.
- [144] Battestin V, Macedo GA. Tannase production by *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology*. 2007, 98: 1832-1837.
- [145] Silva J, Lima UA, Taqueda M, Guaragna FG. Use of response surface methodology for selection of nutrient levels for culturing *Paecilomyces variotii* in *Eucalyptus* hemicellulose hydrolysate. *Bioresource Technology*. 2003, 87: 45-50.
- [146] Wang L, Li Y, Yu P, Xie Z, Luo Y, Lin Y. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel fungal strain *Paecilomyces variotii* JH6. *Journal of Hazard Materials*. 2010, 183: 366-371.
- [147] Fukuda R, Nagahama K, Fukuda K, Ekino K, Oka T, Oka T, Nomura Y. Purification and properties of s-hydroxymethylglutathione dehydrogenase of *Paecilomyces variotii* No. 5, a formaldehyde-degrading fungus. *AMB Express*. 2012, 2: 32.
- [148] Houbraken J, Samson RA, Frisvad JC. *Byssochlamys*: significance of heat resistance and mycotoxin production. In: Hocking, AD, Pitt JI, Samson RA, Thrane U. (eds) *Advances in Food Mycology. Advances in Experimental Medicine & Biology*. 2006, 571: 211-224.
- [149] Oka T, Ekino K, Fukuda K, Nomura Y. Draft genome sequence of the formaldehyde-resistant fungus *Byssochlamys spectabilis* No. 5 (anamorph *Paecilomyces variotii* No. 5) (NBRC109023). *Genome Announcements*. 2014, 2: e01162-13.
- [150] Grigoriev IV, Nikitin R, Haridas S, Kuo A, Ohm R, Otilar R, Riley R, Salamov A, Zhao X, Korzeniewski F, Smirnova T, Nordberg H, Dubchak I, Shabalov I. Mycocosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*. 2014, 42: 699-704.
- [151] Koopman F, Wierckx N, De Winde JH, Ruijsenaars HJ. Identification and characterization of the furfural and 5-(hydroxymethyl)furfural degradation pathways of *Cupriavidus basilensis* HMF14. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010, 107: 4919-4924.
- [152] Sachan A, Ghosh S, Mitra A. Biotransformation of p-coumaric acid by *Paecilomyces variotii*. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, 42: 35-41.
- [153] Masai E, Katayama Y, Fukuda M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Bioscience, Biotechnology, & Biochemistry*. 2007, 71: 1-15.
- [154] Bugg TD, Ahmad M, Hardiman EM, Rahmanpour R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi. *Natural Product Reports*. 2011, 28: 1883-1896.
- [155] Okamura-Abe Y, Abe T, Nishimura K, Kawata Y, Sato-Izawa K, Otsuka Y, Nakamura M, Kajita S, Masai E, Sonoki T, Katayama Y. Beta-ketoadipic acid and muconolactone production from a lignin-related aromatic compound through the protocatechuate 3,4-metabolic pathway. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 121: 652-658.
- [156] Mukherjee G, Sachan A, Ghosh S, Mitra A. Conversion of sinapic acid to syringic acid by a filamentous fungus *Paecilomyces variotii*. *Journal of General & Applied*

- Microbiology. 2006, 52: 131-135.
- [157] Quéméneur M, Hamelin J, Barakat A, Steyer JP, Carrère H, Trably E. Inhibition of fermentative hydrogen production by lignocellulose-derived compounds in mixed cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012, 37: 3150-3159.
- [158] Mills TY, Sandoval NR, Gill RT. Cellulosic hydrolysate toxicity and tolerance mechanisms in *Escherichia coli*. *Biotechnology for Biofuels*. 2009, 2: 26.
- [159] Hristozova T, Angelov A, Tzvetkova B, Paskaleva D, Gotcheva V, Gargova S, Pavlova K. Effect of furfural on carbon metabolism key enzymes of lactose-assimilating yeasts. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006, 39: 1108-1112.
- [160] García-Quintáns N, Magni C, De Mendoza D, López P. The citrate transport system of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar diacetylactis is induced by acid stress. *Applied and Environment Microbiology*. 1998, 64: 850-857.
- [161] 张艳国,田雷. 乳酸菌的耐酸性机制. *饲料工业*. 2007, 4: 62-64.
- [162] Sanchez B, Champomier-Verges MC, Collado Mdel C, Anglade P, Baraige F, Sanz Y, De Los Reyes-Gavilan CG, Margolles A, Zagorec M. Low-ph adaptation and the acid tolerance response of *Bifidobacterium longum* biotype longum. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, 73: 6450-6459.
- [163] Hahn K, Faustoferri RC, Quivey JRG. Induction of an AP endonuclease activity in *Streptococcus mutans* during growth at low pH. *Molecular Microbiolgy*. 1999, 31: 1489-1498.
- [164] 吴重德. 干酪乳杆菌抵御酸胁迫的生理机制解析. 江南大学. 2012.
- [165] Kumar D, Murthy GS. Impact of pretreatment and downstream processing technologies on economics and energy in cellulosic ethanol production. *Biotechnology for Biofuels*. 2011, 4: 27.
- [166] Li H, Shen Y, Wu M, Hou J, Jiao C, Li Z, Liu X, Bao X. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*. 2016, 3: 51.
- [167] Brown L, Torget R. Enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass. Laboratory Analytical Procedure No. 009. National Renewable Energy Laboratory. 1996.
- [168] Ghose TK. Measurement of cellulase activities. *Pure & Applied Chemistry*. 1987, 59: 257-268.
- [169] 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.
- [170] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. NREL/TP-510-42623. National Renewable Energy Laboratory. 2008.
- [171] Sluiter A, Hames B, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass national renewable. NREL/TP-510-42613. National Renewable Energy Laboratory. 2012.

- [172] International Standard: ISO 10520. Determination of starch content—Ewers polarimetric method. 1997.
- [173] 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.
- [174] Sidhu H, Ogden SD, Lung HY, Luttge BG, Baetz AL, Peck AB. DNA sequencing and expression of the formyl coenzyme a transferase gene, *frc*, from *Oxalobacter formigenes*. *Journal of Bacteriology*. 1997, 179: 3378-3381.
- [175] Sawada H, Murakami T. Oxalic Acid. *Encyclopedia of chemical technology*. In G. D. Considine & G. D. Van Nostrand (Eds.). 2000.
- [176] Liu G, Bao J. Maximizing phosphorus and potassium recycling by supplementation of lignin combustion ash from dry biorefining of lignocellulose. *Biochemical Engineering Journal*. 2019, 144: 104-109.
- [177] Cassidy NG. The distribution of potassium in plants. *Plant and Soil*. 1970, 32: 263-267.
- [178] Trevizam AR, Silva MLDS, Muraoka T. Distribution of fertilizer phosphorus in soybean plant and its exportation by the crop. *Revista Ambiente*. 2013, 9: 475-486.
- [179] Kootstra AM, Beeftink HH, Scott EL, Sanders JP. Optimization of the dilute maleic acid pretreatment of wheat straw. *Biotechnology for Biofuels*. 2009, 2: 31.
- [180] Kootstra AMJ, Beeftink HH, Scott EL, Sanders JPM. Comparison of dilute mineral and organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biochemical Engineering Journal*. 2009, 46: 126-131.
- [181] Betiku E, Emeko HA, Solomon BO. Fermentation parameter optimization of microbial oxalic acid production from cashew apple juice. *Heliyon*. 2016, 2: e00082.
- [182] Humbird D, Davis R, Tao L, Kinchin C, Hsu D, Aden A, Schoen P, Lukas J, Olthof B, Worley M, Sexton D, Dudgeon D. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. NREL/TP-5100-47764. National Renewable Energy Laboratory. 2011.
- [183] Yu CL, Deng Q, Jian S, Li J, Dzantor EK, Hui D. Effects of fly ash application on plant biomass and element accumulations: a meta-analysis. *Environmental Pollution*. 2019, 250: 137-142.
- [184] Huang TY, Chiueh PT, Lo SL. Life-cycle environmental and cost impacts of reusing fly ash. *Resources, Conservation and Recycling*. 2017, 123: 255-260.
- [185] Park YJ, Heo J. Conversion to glass-ceramics from glasses made by msw incinerator fly ash for recycling. *Ceramics International*. 2002, 28: 689-694.
- [186] Rajamma R, Ball RJ, Tarelho LA, Allen GC, Labrincha JA, Ferreira VM. Characterisation and use of biomass fly ash in cement-based materials. *Journal of Hazard Materials*. 2009, 172: 1049-1060.
- [187] Zacco A, Borgese L, Gianoncelli A, Struis RPWJ, Depero LE, Bontempi E. Review of fly ash inertisation treatments and recycling. *Environmental Chemistry Letters*. 2014, 12:

153-175.

- [188] Wang X, Gao M, Wang M, Wu C, Wang Q, Wang Y. Chloride removal from municipal solid waste incineration fly ash using lactic acid fermentation broth. *Waste Management*. 2021, 130: 23-29.
- [189] 梁光兵, 李艳红, 訾昌毓, 张远琴, 彭昭霞, 赵榆林, 赵文波. 生物质发电厂飞灰制备生物炭的研究. *生物质化学工程*. 2020, 54: 21-26.
- [190] Li X, Xu Z, Yu J, Huang H, Jin M. *In situ* pretreatment during distillation improves corn fiber conversion and ethanol yield in the dry mill process. *Green Chemistry*. 2019, 21: 1080-1090.
- [191] 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 Food and Agriculture*. 2010, 90: 915-924.
- [192] Jiang K, Li L, Long L, Ding S. 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.
- [193] Leathers TD, Nunnally MS, Stanley AM, Rich JO. Utilization of corn fiber for production of schizophyllan. *Biomass and Bioenergy*. 2016, 95: 132-136.
- [194] Beri D, Herring CD, Blahova S, Poudel S, Giannone RJ, Hettich RL, Lynd LR. Coculture with hemicellulose-fermenting microbes reverses inhibition of corn fiber solubilization by *Clostridium thermocellum* at elevated solids loadings. *Biotechnology for Biofuels*. 2021, 14: 24.
- [195] van der Pol EC, Bakker RR, Baets P, Eggink G. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio) chemicals and fuels. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014, 98: 9579-9593.
- [196] Myat L, Ryu GH. Characteristics of destarched corn fiber extrudates for ethanol production. *Journal of Cereal Science*. 2014, 60: 289-296.
- [197] Kurambhatti C, Kumar D, Rausch K, Tumbleson M, Singh V. Ethanol production from corn fiber separated after liquefaction in the dry grind process. *Energies*. 2018, 11: 2921.
- [198] Beri D, York WS, Lynd LR, Pena MJ, Herring CD. Development of a thermophilic coculture for corn fiber conversion to ethanol. *Nature Communications*. 2020, 11: 1937.
- [199] Buhner J, Agblevor FA. Effect of detoxification of dilute-acid corn fiber hydrolysate on xylitol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004, 119: 13-30.
- [200] Shrestha P, Rasmussen M, Khanal S, Pometto Iii A, Van Leeuwen H. Solid-substrate fermentation of corn fiber by *Phanerochaete chrysosporium* and subsequent fermentation of hydrolysate into ethanol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2008, 56: 3918-3924.
- [201] Zerva A, Savvides AL, Katsifas EA, Karagouni AD, Hatzinikolaou DG. Evaluation of *Paecilomyces variotii* potential in bioethanol production from lignocellulose through consolidated bioprocessing. *Bioresource Technology*. 2014, 162: 294-299.

- [202] Wu JF, Lastick SM, Updegraff DM. Ethanol production from sugars derived from plant biomass by a novel fungus. *Nature*. 1986, 321: 887-888.
- [203] Bura R, Mansfield SD, Saddler JN, Bothast RJ. SO₂-catalyzed steam explosion of corn fiber for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2002, 98: 59-72.
- [204] Gáspár M, Kálmán G, Réczey K. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. *Process Biochemistry*. 2007, 42: 1135-1139.
- [205] Mosier NS, Hendrickson R, Brewer M, Ho N, Sedlak M, Dreshel R, Welch G, Dien BS, Aden A, Ladisch MR. Industrial scale-up of pH-controlled liquid hot water pretreatment of corn fiber for fuel ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2005, 125: 77-97.
- [206] Dhillon GS, Brar SK, Kaur S, Verma M. Screening of agro-industrial wastes for citric acid bioproduction by *Aspergillus niger* NRRL 2001 through solid state fermentation. *Journal of the Science of Food & Agriculture*. 2013, 93: 1560-1567.
- [207] Dong H, Bao J. Metabolism: biofuel via biodetoxification. *Nature Chemical Biology*. 2010, 6: 316-318.
- [208] Zhang B, Khushik FA, Zhan B, Bao J. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification. *Biotechnology & Bioengineering*. 2021, 118: 4105-4118.
- [209] Guo B, Zhang Y, Ha S J, Jin YS, Morgenroth E. Combined biomimetic and inorganic acids hydrolysis of hemicellulose in *Miscanthus* for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2012, 110: 278-287.
- [210] Schreiner P R. Cooperativity tames reactive catalysts. *Science*. 2010, 327: 965-966.
- [211] Pal S, Joy S, Kumbhar P, Trimukhe KD, Gupta R, Kuhad RC, Varma AJ, Padmanabhan S. Pilot-scale pretreatments of sugarcane bagasse with steam explosion and mineral acid, organic acid, and mixed acids: synergies, enzymatic hydrolysis efficiencies, and structure-morphology correlations. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2016, 7: 179-189.
- [212] Pal S, Joy S, Kumbhar P, Trimukhe KD, Varma AJ, Padmanabhan S. Effect of mixed acid catalysis on pretreatment and enzymatic digestibility of sugarcane bagasse. *Energy & Fuels*. 2016, 30: 7310-7318.
- [213] Franzidis JP, Porteous A, Anderson J. The acid hydrolysis of cellulose in refuse in a continuous reactor. *Conservation & Recycling*. 1982, 5: 215-225.
- [214] Taherzadeh MJ, Niklasson C, Lidén G. Conversion of dilute-acid hydrolyzates of spruce and birch to ethanol by fed-batch fermentation. *Bioresource Technology*. 1999, 69: 59-66.
- [215] Qing Q, Huang M, He Y, Wang L, Zhang Y. Dilute oxalic acid pretreatment for high total sugar recovery in pretreatment and subsequent enzymatic hydrolysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2015, 177: 1493-1507.
- [216] Zhang T, Kumar R, Wyman CE. Sugar yields from dilute oxalic acid pretreatment of maple wood compared to those with other dilute acids and hot water. *Carbohydrate Polymers*. 2013, 92: 334-344.

- [217] de Vasconcelos SM, Santos AM, Rocha GJ, Souto-Maior AM. Diluted phosphoric acid pretreatment for production of fermentable sugars in a sugarcane-based biorefinery. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 46-52.
- [218] Martínez-Patiño JC, Romero-García JM, Ruiz E, Oliva JM, Álvarez C, Romero I, Negro MJ, Castro E. High solids loading pretreatment of olive tree pruning with dilute phosphoric acid for bioethanol production by *Escherichia coli*. *Energy & Fuels*. 2015, 29: 1735-1742.
- [219] Chandra RP, Au-Yeung K, Chanis C, Roos AA, Mabee W, Chung PA, Ghatora S, Saddler JN. The influence of pretreatment and enzyme loading on the effectiveness of batch and fed-batch hydrolysis of corn stover. *Biotechnology Progress*. 2011, 27: 77-85.
- [220] Brandberg T, Sanandaji N, Gustafsson L, Johan Franzén C. Continuous fermentation of undetoxified dilute acid lignocellulose hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 96581 using cell recirculation. *Biotechnology Progress*. 2005, 21: 1093-1101.
- [221] Klinker HB, Thomsen AB, Ahring BK. Inhibition of ethanol-producing yeast and bacteria by degradation products produced during pre-treatment of biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 66: 10-26.
- [222] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technology*. 2000, 74: 17-24.
- [223] Fang ZH, Zhang J, Lu QM, Bao J. Process development of short-chain polyols synthesis from corn stover by combination of enzymatic hydrolysis and catalytic hydrogenolysis. *Biotechnology Reports*. 2014, 3: 15-20.
- [224] Karimi K, Kheradmandinia S, Taherzadeh MJ. Conversion of rice straw to sugars by dilute-acid hydrolysis. *Biomass and Bioenergy*. 2006, 30: 247-253.
- [225] Gurgel LVA, Marabezi K, Zambom MD, Curvelo ADS. Dilute acid hydrolysis of sugar cane bagasse at high temperatures: a kinetic study of cellulose saccharification and glucose decomposition. part i: sulfuric acid as the catalyst. *Industrial & Engineering Chemistry Research*. 2012, 51: 1173-1185.
- [226] Heinonen J, Tamminen A, Uusitalo J, Sainio T. Ethanol production from wood via concentrated acid hydrolysis, chromatographic separation, and fermentation. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*. 2012, 87: 689-696.
- [227] Galbe M, Sassner P, Wingren A, Zacchi G. Process engineering economics of bioethanol production. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*. 2007, 108: 303-327.
- [228] Zhao J, Xu Y, Wang W, Griffin J, Wang D. High ethanol concentration (77 g/L) of industrial hemp biomass achieved through optimizing the relationship between ethanol yield/concentration and solid loading. *ACS Omega*. 2020, 5: 21913-21921.
- [229] Zacchi G, Axelsson A. Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnology & Bioengineering*. 1989, 34: 223-233.
- [230] Lenihan P, Orozco A, O'neill E, Ahmad M, Rooney DW, Mangwandi C, Walker GM. Kinetic modelling of dilute acid hydrolysis of lignocellulosic biomass. Chapter 12, *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*, Dr. Marco Aurelio Dos Santos

- Bernardes (Ed.), ISBN: 978-953-307-478-8, InTech. 2011, 293-308.
- [231] Nagle N, Ibsen K, Jennings E. A process economic approach to develop a dilute-acid cellulose hydrolysis process to produce ethanol from biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 1999, 79: 595-607.
- [232] Sanchez G, Pilcher L, Roslander C, Modig T, Galbe M, Liden G. Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the bolivian straw material paja brava. *Bioresource Technology*. 2004, 93: 249-256.
- [233] Harris J, Baker A, Zerbe J. Two-stage, dilute sulfuric acid hydrolysis of hardwood for ethanol production. *Energy Biomass Wastes*. 1984: 1151-1170.
- [234] Zhang X, Lu H, Wu K, Liu Y, Liu C, Zhu Y, Liang B. Hydrolysis of mechanically pre-treated cellulose catalyzed by solid acid $\text{SO}_4^{2-}\text{-TiO}_2$ in water-ethanol solvent. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2020, 28: 136-142.
- [235] Liu Q, Wang H, Xin H, Wang C, Yan L, Wang Y, Zhang Q, Zhang X, Xu Y, Huber GW, Ma L. Selective cellulose hydrogenolysis to ethanol using Ni@C combined with phosphoric acid catalysts. *ChemSusChem*. 2019, 12: 3977-3987.
- [236] 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.
- [237] Zhang Y, Yoshida M, Vadlani PV. Biosynthesis of D-lactic acid from lignocellulosic biomass. *Biotechnology Letters*. 2018, 40: 1167-1179.
- [238] Augustiniene E, Valanciene E, Matulis P, Syrpas M, Jonuskiene I, Malys N. Bioproduction of L- and D-lactic acids: advances and trends in microbial strain application and engineering. *Critical Reviews Biotechnology*. 2021, 42: 1-19.
- [239] Rawoof SA, Kumar PS, Vo DVN, Devaraj K, Mani Y, Devaraj T, Subramanian S. Production of optically pure lactic acid by microbial fermentation: a review. *Environmental Chemistry Letters*. 2020, 19: 539-556.
- [240] He N, Jia J, Qiu Z, Fang C, Liden G, Liu X, Bao J. Cyclic L-lactide synthesis from lignocellulose biomass by biorefining with complete inhibitor removal and highly simultaneous sugars assimilation. *Biotechnology & Bioengineering*. 2022, in press.
- [241] Liu G, Sun J, Zhang J, Tu Y, Bao J. 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.
- [242] Di Risio S, Hu CS, Saville BA, Liao D, Lortie J. Large-scale, high-solids enzymatic hydrolysis of steam-exploded poplar. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2011, 5: 609-620.
- [243] Panagiotopoulos IA, Lignos GD, Bakker RR, Koukios EG. Effect of low severity dilute-acid pretreatment of barley straw and decreased enzyme loading hydrolysis on the production of fermentable substrates and the release of inhibitory compounds. *Journal of Cleaner Production*. 2012, 32: 45-51.
- [244] 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.
- [245] Bonner IJ, Smith WA, Einerson JJ, Kenney KL. Impact of harvest equipment on ash variability of baled corn stover biomass for bioenergy. *BioEnergy Research*. 2014, 7: 845-855.
- [246] Tao G, Geladi P, Lestander TA, Xiong S. Biomass properties in association with plant species and assortments. ii: a synthesis based on literature data for ash elements. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2012, 16: 3507-3522.
- [247] Vassilev SV, Baxter D, Andersen LK, Vassileva CG, Morgan TJ. An overview of the organic and inorganic phase composition of biomass. *Fuel*. 2012, 94: 1-33.
- [248] He Y, Fang Z, Zhang J, Li X, Bao J. De-ashing treatment of corn stover improves the efficiencies of enzymatic hydrolysis and consequent ethanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2014, 169: 552-558.
- [249] Huang C, Wu X, Huang Y, Lai C, Li X, Yong Q. Prewashing enhances the liquid hot water pretreatment efficiency of waste wheat straw with high free ash content. *Bioresource Technology*. 2016, 219: 583-588.
- [250] Han X, Bao J. General method to correct the fluctuation of acid based pretreatment efficiency of lignocellulose for highly efficient bioconversion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018, 6: 4212-4219.
- [251] Han X, Hong F, Liu G, Bao J. An approach of utilizing water-soluble carbohydrates in lignocellulose feedstock for promotion of cellulosic L-lactic acid production. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 2018, 66: 10225-10232.
- [252] Womac AR, Igathinathane C, Sokhansanj S, Pordesimo LO. Biomass moisture relations of an agricultural field residue: corn stover. *Transactions of the ASAE*. 2005, 48(6): 2073-2083.
- [253] Cui Z, Shi J, Wan C, Li Y. Comparison of alkaline- and fungi-assisted wet-storage of corn stover. *Bioresource Technology*. 2012, 109: 98-104.
- [254] Tenorio C, Roque R. Evaluation of different approaches for the drying of lignocellulose residues. *BioResources*. 2012, 7: 3500-3514.
- [255] Liu ZH, Qin L, Jin M J, Pang F, Li BZ, Kang Y, Dale BE, Yuan YJ. Evaluation of storage methods for the conversion of corn stover biomass to sugars based on steam explosion pretreatment. *Bioresource Technology*. 2013, 132: 5-15.
- [256] Qiu H, Sun L, Xu X, Cai Y, Bai J. Potentials of crop residues for commercial energy production in china: a geographic and economic analysis. *Biomass and Bioenergy*. 2014, 64: 110-123.
- [257] Liu G, Bao J. Constructing super large scale cellulosic ethanol plant by decentralizing dry acid pretreatment technology into biomass collection depots. *Bioresource Technology*. 2019, 275: 338-344.
- [258] Wang L, Wang P, Chen WQ, Wang QQ, Lu HS. Environmental impacts of scandium oxide production from rare earths tailings Bayan Obo Mine. *Journal of Cleaner Production*.

2020, 270: 122464.

- [259] Ventura M, Williamson D, Lobefaro F, Jones MD, Mattia D, Nocito F, Aresta M, Dibenedetto A. Sustainable synthesis of oxalic and succinic acid through aerobic oxidation of C6 polyols under mild conditions. *ChemSusChem*. 2018, 11: 1073-1081.

附录 I

缩略词表

英文缩写	英文全称	中文全称
ACO	Aconitase	乌头酸酶
ADH	Alcohol dehydrogenase	乙醇脱氢酶
AFEX	Ammonia fiber explosion	氨纤维膨爆
AKR/ARI	Aldehyde reductase, aldo/keto reductase	醛酮还原酶
ATP	Adenosine Triphosphate	三磷酸腺苷
CBP	Consolidated bioprocessing	整合生物加工过程
CE	Corn ethanol	玉米乙醇
CLA	Cellulosic crude lactic acid	纤维素粗乳酸
CGMCC	China General Microbiological Culture Collection Center	中国普通微生物保藏中心
COD	Chemical oxygen demand	化学需氧量
DAP	Dilute acid pretreatment	稀酸预处理
DEGs	Differentially expressed genes	差异表达基因
DESs	Deep eutectic solvents	低共熔溶剂
DDGS	Distillers dried grains with solubles	玉米干酒糟
DM	Dry matter	基于干重
DMR	Deacetylation, mechanical refining	脱乙酰作用, 机械加工
DOE	U.S. department of energy	美国能源部
DryPB	Dry acid pretreatment and biodetoxification	干式稀酸预处理和生物脱毒
EDX	Energy disperse spectroscopy	能谱仪
FD	Formate dehydrogenase	甲酸脱氢酶
FTIR	Fourier transform infrared spectroscopy	傅里叶变换红外光谱
GALK	Galactokinase	半乳糖激酶
GO	Gene ontology	基因功能
HBA	Parahydroxubenzaldehyde	对羟基苯甲醛
HK	Hexokinase	己糖激酶
HMF	5-hydroxymethylfurfural	5-羟甲基糠醛
HPLC	Highperformance liquid chromatogra	高效液相色谱
IDH	Isocitrate dehydrogenase	异柠檬酸脱氢酶
ILs	Ionic liquid	离子液体
ITS	Internal transcribed spacer	转录间隔区

英文缩写	英文全称	中文全称
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes	京都基因与基因组数据库
LA	Lactic acid	乳酸
LCA	Life cycle assessments	生命周期评估
MESP	Minimum ethanol selling price	乙醇最低售价
MSWI	Municipal solid waste incineration	城市垃圾焚烧
NCBI	National Center of Biotechnology Information	美国国家生物技术信息中心
ND	Not detected	未检测到
NREL	National Renewable Energy Laboratory	美国国家可再生能源实验室
OGDH	α -ketoglutarate dehydrogenase	α -酮戊二酸脱氢酶
OA	Oxalic acid	草酸
OD	Oxalate decarboxylase	草酸脱羧酶
PA	Phosphoric acid	磷酸
PCA	Protocatechuic acid	原儿茶酸
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
PDA	Potato dextrose agar (medium)	马铃薯葡萄糖琼脂培养基
PHB	Polyhydroxybutyrate	聚羟基丁酸酯
PLA	Polylactic acid	聚乳酸
RBPDs	Regional Biomass Processing Depots	区域生物质加工仓库
rpm	Revolutions per min	每分钟转数
SA	Sulfuric acid	硫酸
ScCO ₂	Supercritical CO ₂	超临界二氧化碳
SE	Steam explosion	蒸汽膨爆
SEM	Scanning electron microscopy	扫描电镜
SHF	Separated hydrolysis and fermentation	分步糖化和发酵
SM	Synthetic medium	合成培养基
SSCF	Simultaneous saccharification and co-fermentation	同步糖化与共发酵
SSF	Simultaneous saccharification and fermentation	同步糖化和发酵
TCA	Tricarboxylic acid cycle	三羧酸循环
TLC	Thin-layer chromatography	薄层色谱
vvm	Air volume per culture volume per min	每分钟通气量与罐体实际料液的体积的比值
XRD	X-ray diffraction	X 射线衍射 FTIR

学术成果

已发表论文:

1. **Bin Zhang**, Faryal A. Khushik, Baorui Zhan, Jie Bao*. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification. **Biotechnology & Bioengineering**. 2021, 118: 4105-4118. (SCI IF=4.530, 对应本论文第二、三章)
2. **Bin Zhang**, Baorui Zhan, Jie Bao*. Reframing biorefinery processing chain of corn fiber for cellulosic ethanol production. **Industrial Crops & Products**. 2021, 170: 113791. (SCI IF=5.645, 对应本论文第五章)
3. **Bin Zhang**, Lei Wu, Ya Wang, Jing Li, Baorui Zhan, Jie Bao*. Re-examination of dilute acid hydrolysis of lignocellulose for production of cellulosic ethanol after de-bottlenecking the inhibitor barrier. **Journal of Biotechnology**. 2022, 353: 36-43. (SCI IF=3.307, 对应本论文第六章)
4. Tao Han, **Bin Zhang** (共同第一作者), Hongxing Li, Hongsen Zhang, Yongfu Yang, Lizhen Hu, Xiaodong Ren, Shipeng Wang, Lixiang Zhang, Xushen Han, Gang Liu, Jian Zhang, Qiang Fei, Yueqin Tang, Shihui Yang, Xiaoming Bao, Jie Bao*. Year-round storage operation of three major agricultural crop residue biomasses by performing dry acid pretreatment at regional collection depots. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**. 2021, 9: 4722-4734. (SCI IF=8.198, 对应本论文第七章)

准备发表论文:

1. **Bin Zhang**, Jing Li, Xiucui Liu, Jie Bao*. Continuous simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) for cellulosic L-lactic acid production. **Industrial Crops & Products**. Major revise. (对应本论文第七章)
2. **Bin Zhang**, Lei Wu, Xiucui Liu, Jie Bao*. Alternative complex nutrients source for high chiral purity L-lactic acid fermentation from lignocellulose feedstock. In preparation. (对应本论文第七章)
3. **Bin Zhang**, Jie Bao*. Criteria of industrial pretreatment technology for lignocellulose biorefining. **Bioresource Technology**. (期刊约稿综述)
4. Ya Wang, Hucheng Yang, **Bin Zhang**, Xiucui Liu, Jie Bao*. Continuous enzymatic saccharification and its rheology profiling under high solids loading of lignocellulose biomass. **Biochemical Engineering Journal**. Under review.

授权专利:

1. 鲍杰, 张斌, 郑理想。一种使用生物可降解有机酸催化剂的木质纤维素预处理方法。已授权发明专利 CN 110699387 B, 2021-06。
2. 鲍杰, 张斌, 法亚尔·艾哈迈德, 高秋强。一种极低 pH 条件下降解木质纤维素来源抑制物的菌株及应用。已授权发明专利 CN 110713939 B, 2021-21。

致谢

感谢我的博士生导师鲍杰教授给我在华东理工大学开展博士课题的宝贵学习机会，感谢您对我的指导和栽培；

感谢我的硕士导师广西大学生命科学与技术学院曾伟副研究员对我科研道路的引领和科研性格的塑造；

感谢华东理工大学生物工程学院为我提供良好的学习环境，感谢研工办各位老师的关心和帮助；

感谢我所有的师兄师姐、师弟师妹和同学们，所有的成果离不开我们共同的努力；感谢我的家人们对我漫长学习之路无条件的支持。

最后，我会做一个回报社会、对社会有用的人。