

分类号: _____ 密级: _____

UDC: _____

华东理工大学

学位论文

纤维素糖酸发酵菌株的高渗透压抗性强化及副产物生成遏制

杨虎成

指导教师姓名:

鲍杰 教授

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物工程

论文定稿日期: 2023年5月8日 论文答辩日期: 2023年6月2日

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

华东理工大学研究生学位论文提交要求

根据校学位评定委员会要求，研究生学位论文全文（含纸质版和电子版）必须提交档案馆保存。

研究生学位论文全文电子版由档案馆按_____①_____（选择以下一项）方式，转交或不转交图书馆，并提供公开阅览服务。

- ① 可以公开
- ② 3年后公开
- ③ 10年后公开
- ④ 不公开

注：选择②、③或④的需经学校国家技术转移中心备案，以为学校技术转移提供服务。

学位论文作者签名：

杨彦成

2023年6月4日

指导教师签名：

鲍圭

2023年6月4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：杨彦成

2023年5月8日

纤维素糖酸发酵菌株的高渗透压抗性强化及副产物生成遏制

摘要

利用木质纤维素生产糖酸具有广阔的应用前景，但在氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 利用木质纤维素生物质进行高浓度糖酸发酵时仍存在一系列问题。首先，高固含量木质纤维素糖酸发酵时，氧气的传递会受到阻碍，使得糖酸得率降低并增加能耗成本；其次，葡萄糖酸钠的大量积累会对菌株造成一定的渗透压胁迫，从而抑制菌株的生长及发酵性能；最后，*G. oxydans* 将葡萄糖转化为葡萄糖酸后，葡萄糖酸脱氢酶 (Glucose dehydrogenase, GDH) 还会将其进一步转化为副产物酮基葡萄糖酸，从而降低葡萄糖酸得率。本文以氧化葡萄糖酸杆菌 *G. oxydans* DSM 2003 为研究对象，为解决这三方面问题而对糖酸发酵过程进行了研究。

本文第一部分通过调整生物炼制顺序来提高糖酸发酵时的氧气传递速率。将常规生物炼制过程的脱毒-糖化过程转变为糖化-脱毒过程。所采用的独特的生物脱毒菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 实现了在无糖损失下对乙酸、羟甲基糠醛和糠醛等抑制物的去除。同时脱毒过程中纤维素酶的持续水解，显著提高了水解液的氧气传递速率 k_La ，有效改善了溶氧水平。通过在不同转速及通气量条件下进行糖酸发酵实验，确定了 0.1 vvm 及 500 rpm 的最低通气量及转速，降低了能耗。

本文第二部分通过适应性进化的方法提高发酵菌株对高渗透压胁迫的耐受能力。首先探究了糖酸发酵过程中的产物过氧化氢及葡萄糖酸钠对菌株及纤维素酶的影响。结果表明过氧化氢对纤维素酶的影响很小，葡萄糖酸钠对纤维素酶及菌株的抑制较强。为了缓解高浓度葡萄糖酸钠所导致的渗透压胁迫，将菌株在高浓度葡萄糖酸钠的环境中进行适应性进化实验，最终获得了一株稳定的进化菌株。通过实时荧光定量 PCR 分析发现，进化菌株中 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白及催化糖酸合成的葡萄糖脱氢酶相关基因的转录水平显著上调了 10-40 倍。发酵评价表明，进化菌株在木质纤维素水解液中的发酵速率显著增加；在 300 g/L 葡萄糖的合成培养基中可以实现 270.38 g/L 的葡萄糖酸生产，是理论转化率的 83%。上述结果表明相比于出发菌株，进化菌株对高浓度葡萄糖酸钠的高渗透压胁迫具有良好的适应性。

本文第三部分通过降低发酵 pH 来抑制副产物酮基葡萄糖酸的生成。首先，通过实验验证了低 pH 条件会有效抑制酮基葡萄糖酸的生成，但木糖的消耗速率显著降低。因此在低 pH 条件下对发酵菌株进行适应性进化以改善木糖的利用。在不同 pH 条件下进一步对发酵液进行短期 (3 天) 及长期 (30 天) 静置实验。结果表明，在短期静置时，将发酵液离心或调节 pH 至 2.5 可有效避免酮基葡萄糖酸生成。而在长期静置时，只有将发酵液离心才能抑制酮基葡萄糖酸的生成。

综上，本文通过三种不同的手段解决了纤维素糖酸发酵过程中遇到的问题。首先，通过改变生物炼制顺序，降低了氧气传递的阻碍，提高了溶氧，确定了糖酸发酵最低通气及搅拌参数，降低了发酵时的能耗。其次，通过适应性进化的方式，提高了发酵菌株对高浓度葡萄糖酸钠的渗透压胁迫，缩短了发酵时间，提高了发酵性能。最后，通过在低 pH 条件下进行糖酸发酵实验，抑制了酮基葡萄糖酸的生成。通过对发酵液的短期（3 天）及长期（30 天）静置实验，确定了在短期及长期静置条件下抑制酮基葡萄糖酸生成的最适条件。

关键词：木质纤维素；糖酸；氧化葡萄糖酸杆菌；渗透压胁迫；适应性进化

Enhancement of resistance to high osmotic pressure and inhibition of by-product production of cellulose saccharic acid fermentation strains

Abstract

The production of sugar and acid from lignocellulose has broad application prospects, but there are still a series of problems when using lignocellulosic biomass for high concentration sugar and acid fermentation by *Gluconobacter oxydans*. Firstly, during high solid content lignocellulosic acid fermentation, the transfer of oxygen is hindered, resulting in a decrease in acid yield and an increase in energy consumption costs; Secondly, the accumulation of sodium gluconate products will cause certain osmotic pressure stress to the strain, thus inhibiting the growth and fermentation performance of the strain; Finally, *G. oxydans* convert glucose into gluconic acid, glucose dehydrogenase (GDH) further converts it into a byproduct, ketogluconic acid, thereby reducing the yield of gluconic acid. This thesis focuses on the study of the sugar acid fermentation process using *G. oxydans* DSM 2003 as a fermentation strain to address these issues.

The first part of this article mainly aims to improve oxygen transfer during sugar acid fermentation by changing the biological refining sequence. The usual sequence of biological refining is detoxification before saccharification. After replacement, the sequence of biological refining is detoxification after saccharification. Changing the detoxification process to a saccharification solution has the advantage of continuously saccharifying while detoxifying, thereby reducing the viscosity of the saccharification solution. The measurement of the oxygen transfer rate k_La during fermentation indicates that the dissolved oxygen level will be improved after changing the biological refining sequence. The high rotational speed and ventilation rate previously set for obtaining high dissolved oxygen are no longer applicable. By conducting sugar acid fermentation experiments under different rotational speed and ventilation rate conditions, fermentation parameters have been reduced and energy consumption has been saved.

The second part of this paper is mainly to improve the osmotic pressure stress caused by high concentration of sodium gluconate through adaptive laboratory evolution. Firstly, the effects of hydrogen peroxide and sodium gluconate, the products of the sugar acid fermentation process, on the strain were investigated. The results showed that hydrogen peroxide had little effect on cellulase, while sodium gluconate had strong inhibition on cellulase and strains. Then the strain was tested for adaptability in the environment of high concentration of sodium gluconate to reduce the osmotic pressure stress caused by high

concentration of sodium gluconate. Finally, validate the domesticated strains. The real-time fluorescence quantitative PCR experiment results showed that the activity of sodium ion transporters in the adaptive evolved fermentation strains was significantly improved, and the fermentation effect of the domesticated strains was also better than that of the original strains under the conditions of lignocellulose and synthetic medium. The experiment showed that the adaptive evolution improved the tolerance of the fermentation strain to osmotic pressure stress caused by high sodium, and improved the fermentation performance.

The third part of this article mainly suppresses the generation of ketogluconic acid through low pH conditions. Firstly, it was experimentally verified that under low pH conditions, ketogluconic acid is almost not generated, but at the same time, the consumption of xylose is also inhibited. Afterwards, in order to further understand the generation of ketogluconic acid during fermentation broth resting, short-term (3 days) and long-term (30 days) resting experiments were conducted on the fermentation broth under different pH conditions. The results showed that under the conditions of pH 2.5 or centrifugation of the fermentation broth, there was almost no production of keto gluconic acid when the fermentation broth was left standing for a short period of time. When left standing for a long time, only by centrifuging the fermentation broth can the production of ketogluconic acid be inhibited.

In summary, this article solves some of the problems encountered in the fermentation process of cellulose sugar and acid through three different methods. Firstly, by changing the biological refining sequence, the obstruction of oxygen transfer was reduced and the dissolved oxygen was increased. The optimal parameters were determined through exploratory experiments on the minimum speed and ventilation rate, which reduced energy consumption during fermentation. Subsequently, through adaptive laboratory evolution, the activity of sodium ion transporters in the fermentation strains was increased, the fermentation time was shortened, and the fermentation effect was improved. Finally, the production of ketogluconic acid was inhibited by conducting sugar acid fermentation experiments under low pH conditions. The optimal conditions for inhibiting ketogluconic acid were determined through short-term (3 days) and long-term (30 days) static experiments on the fermentation broth.

Keywords: Lignocellulose; Sugar acid; *Gluconobacter oxydans* DSM 2003; Osmotic stress; Adaptive evolution

目录

第 1 章 文献综述	1
1.1 糖酸的生产	1
1.1.1 葡萄糖酸、木糖酸	1
1.1.2 氧化葡萄糖酸杆菌	2
1.2 生物炼制	3
1.2.1 木质纤维素生物质	4
1.2.2 预处理	5
1.2.3 水解	6
1.2.4 脱毒	6
1.2.5 糖酸发酵	8
1.3 木质纤维素产糖酸过程中的主要问题	8
1.3.1 溶氧限制	8
1.3.2 渗透压胁迫	9
1.3.3 副产物酮基葡萄糖酸的生成	10
1.4 论文主要研究内容与意义	10
第 2 章 液态脱毒条件下糖酸发酵最低转速与通气量的探究	12
2.1 引言	12
2.2 材料与方法	12
2.2.1 原材料与酶	12
2.2.2 菌株及细胞培养	13
2.2.3 预处理	13
2.2.4 氧气传递速率 k_La 的测定	13
2.2.5 粘度的测定	13
2.2.6 糖类及糖酸分析	14
2.3 结果与讨论	14
2.3.1 液态脱毒条件下糖酸发酵上罐验证	14
2.3.2 糖酸发酵过程不同转速及通气量对氧气传递速率的影响	17
2.3.3 液态脱毒条件下糖酸发酵过程最低转速及通气量的探究	18
2.3.4 本章小结	20

第 3 章 高产物浓度对糖酸发酵过程的影响	21
3.1 引言	21
3.2 材料与方法	21
3.2.1 原材料与酶	21
3.2.2 菌株及细胞培养	21
3.2.3 过氧化氢的测定	22
3.2.4 糖类及糖酸分析	22
3.2.5 菌体收集和实时荧光定量 PCR 实验	22
3.3 结果与讨论	23
3.3.1 过氧化氢对糖酸发酵过程的影响	23
3.3.2 葡萄糖酸钠对糖酸发酵过程的影响	26
3.3.3 <i>G. oxydans</i> 在高浓度葡萄糖酸钠条件下的适应性进化及验证实验	27
3.3.4 本章小结	32
第 4 章 低 pH 对糖酸发酵过程中酮基葡萄糖酸生成的影响	34
4.1 引言	34
4.2 材料与方法	34
4.2.1 原材料与酶	34
4.2.2 菌株及细胞培养	34
4.2.3 发酵液短期及长期静置方法	34
4.2.4 糖类及糖酸分析	34
4.3 结果与讨论	35
4.3.1 低 pH 上罐糖酸发酵验证	35
4.3.2 发酵液在不同条件下短期静置时酮基葡萄糖酸的生成情况	36
4.3.3 发酵液在不同条件下长期静置时酮基葡萄糖酸的生成情况	37
4.3.4 本章小结	39
第 5 章 结论与展望	40
5.1 结论与创新点	40
5.2 展望	41
参考文献	42
致谢	54
学术成果	54

第 1 章 文献综述

1.1 糖酸的生产

单糖或低聚糖直接氧化得到的酸称为糖酸。其中一些酸，如 D-葡萄糖酸及 D-木糖酸，已经在工业规模上生产和使用，如用于食品、制药和化学工业^[1]。D-葡萄糖酸和 D-木糖酸等醛酸及其盐类也被用作混凝土中的缓凝剂来改善其流体性能，从而使其获得更高的强度^[2]。氧化葡萄糖酸杆菌具有发酵速率快、耐受抑制物能力强及能够代谢木糖等特点^[3]，是生产糖酸的主要菌株之一。随着糖酸工业规模的不断扩大，糖酸的生产逐渐受到越来越多的关注。

1.1.1 葡萄糖酸、木糖酸

葡萄糖酸是葡萄糖的氧化产物，天然存在于植物、水果、葡萄酒(高达 0.25%)、蜂蜜(高达 1%)、大米、肉类、食醋等天然来源中。D-葡萄糖酸通常是由葡萄糖的微生物氧化形成的。葡萄糖酸是一类性质温和、安全有效、无腐蚀性的强有机酸，在许多应用领域具有重要的应用价值^[4]。木糖是自然界中第二丰富的碳水化合物，来源于木聚糖半纤维素^[5]。木糖可以通过氧化还原反应转化为各种化学物质，包括木糖酸、乳酸、甲酸、乙酸和木糖醇^[6-15]。D-木糖酸源自半纤维素糖 D-木糖，具有与 D-葡萄糖酸类似的应用，可以作为 D-葡萄糖酸的替代品。作为一种多功能平台化学品，木糖酸被美国能源部列为最具潜力的 30 种化合物之一^[16]。

葡萄糖酸是商业上生产的最大规模有机酸之一。虽然使用化学和生物技术方法都可以获得葡萄糖酸，但生物法在工业规模上占主导地位^[17]。常用的生产葡萄糖酸的真菌有黑曲霉、青霉、粘帚霉、帚霉和漆孢霉等^[18]；细菌主要有氧化葡萄糖酸杆菌、假单胞菌、肠杆菌和醋酸杆菌等^[19-21]。目前，世界上许多公司都采用间断批次、补料批次或重复批次和补料批次深层发酵来生产葡萄糖酸、葡萄糖酸盐（尤其是葡萄糖酸钠）和葡萄糖酸内酯^[22-26]。木糖酸的合成方法目前有酶法、生物法与化学法。酶法主要是木糖通过酶催化来合成木糖酸。其优点是反应条件温和，对环境友好。其中一些方法可用于木糖酸的工业化生产，产量较高。但依然有成本较高、操作复杂、耗时、目标产物纯化复杂等缺点。化学合成法相对来说反应更加缓和、效率较高、成本较低。与酶法和化学法相比，微生物法生产木糖酸更加具有潜力。D-木糖酸的微生物生产早在 19 世纪末就已被认识到^[27]，许多假单胞菌、醋酸杆菌、气杆菌、葡萄糖杆菌、欧文氏菌和相关属已被证明能产生 D-木糖酸^[28]。最近，通过引入编码 D-木糖脱氢酶的基因，各种酵母菌以及大肠杆菌也已经被改造用来产生 D-木糖酸脱氢酶^[29-31]。在被描述为产生 D-木糖酸的众多细菌中，假单胞菌^[32]、氧化葡萄糖酸杆菌^[33]、微球菌^[34]和肠杆菌^[35]是最有生产力的。

葡萄糖酸、木糖酸及其盐类广泛应用于各种工业领域。葡萄糖酸是具有多种生化特

性的温和有机酸，其盐类（主要是葡萄糖酸钠）应用于建筑、制药、环境卫生、食品等多种领域^[36,37]。木糖酸的功能与应用范围与葡萄糖酸比较相似，可以作为葡萄糖酸的替代品，近年来在众多行业得到广泛应用，尤其是在建筑行业，木糖酸作为一种水泥分散剂，在水泥水化阻滞过程中对混凝土的分散效果大约是常用的木质素磺酸盐的两倍^[38-39]。除此之外，木糖酸还可以生产共聚酰胺^[40-41]，作为 1,2,4-丁三醇合成的前体^[42-43]。葡萄糖酸与木糖酸具有较多的应用市场^[44-47]。其中，应用较为广泛的是将葡萄糖酸及木糖酸作为水泥缓凝剂。重要的城市基础设施，如桥梁、公路和建筑物都需要混凝土。目前，混凝土中使用了各种外加剂来改善其物理性能。混凝土外加剂中最重要的一类是缓凝剂。缓凝剂基本上是一种水泥分散剂，它能分解水泥颗粒，使水泥浆体变得更具流动性。流动性转化为混凝土更好的浇筑能力^[36]。葡萄糖酸和木糖酸的成功应用具有巨大的社会效益和经济效益且有利于环境保护，是具有广泛应用前景的有机酸。

1.1.2 氧化葡萄糖酸杆菌

氧化葡萄糖酸杆菌是一种专性好氧革兰氏阴性细菌，属于醋酸杆菌属。与其它将碳源氧化为水和二氧化碳的好氧微生物不同，氧化葡萄糖酸杆菌具有立体选择性地催化各种底物的不完全氧化^[48]。氧化葡萄糖酸杆菌具有大量的膜结合的脱氢酶，使其能够将葡萄糖和其他醛糖快速氧化，为自身生长提供能量，并降低 pH 制造适合自己生长的环境。这也是该菌能够在混合培养基中具有很好的生长性能的原因^[49]。由于其催化底物的酶基本都位于细胞膜上，生成的产物几乎可以全部分泌到培养基中^[50]。正是由于这些特性，氧化葡萄糖酸杆菌得到了越来越多的关注。目前利用氧化葡萄糖酸杆菌生产的化学品主要有以下几种：

（1）维生素 C

L-抗坏血酸（维生素 C）是人体必需的营养物质，因为我们无法内源性合成。由于需求量大，1930 年初开始工业化生产维生素 C。1933 年，波兰化学家 *Tadeu Reichstein* 开发了一种大规模生产维生素 C 的工艺，直到 20 世纪 90 年代末才得到广泛使用^[51]。整个过程分为 5 个步骤：首先，葡萄糖在镍的催化下被还原为 D-山梨醇，然后被氧化革兰氏菌氧化为 L-山梨糖。经过一系列保护羟基免受氧化的反应，L-山梨糖被氧化为 2-酮-L-古龙酸。2-酮-L-古龙酸的烯醇化和内酯化最终生成 L-抗坏血酸^[52]。目前，整个发酵工艺经过了不断修改，生产效率得到了大大提升。*Wang* 等人^[53] 通过两步发酵法生产 L-抗坏血酸：首先，葡萄糖通过催化生成 D-山梨醇，氧化葡萄糖酸杆菌通过山梨醇脱氢酶将 D-山梨醇转化为 D-山梨糖。之后通过菌株的混合培养产生 2-酮-L-古龙酸。2-酮-L-古龙酸转化为 L-抗坏血酸的过程与之前一致。工艺经过优化后，最终的产量大大提高^[54]。

（2）米格列醇

米格列醇（N-羟乙基-1 脱氧野生霉素）是拜耳开发的一种亚氨基糖，由于其竞争性

抑制 α -葡萄糖苷酶, 已被用于控制 2 型糖尿病^[55]。1996 年, 米格列醇被食品和药物管理局(FDA)批准为抗糖尿病药物, 并已在许多国家销售, 如法国、美国、日本、西班牙和澳大利亚^[56]。米格列醇可以从 1-脱氧诺吉霉素中得到, 1-脱氧诺吉霉素是 1976 年从植物中首次分离出来的一种免疫糖类^[57]。1-脱氧诺吉霉素可从植物中提取或通过化学合成法获得。然而, 这些方法在经济上都不是大规模可行的^[58]。目前较为常用的方法是通过生物转化产生米格列醇合成的关键中间体 6-脱氧-6-氨基(N-羟乙基)- α -L-呋喃山梨糖, 然后经过化学反应可得到米格列醇。氧化葡萄糖酸杆菌来源的山梨糖脱氢酶可催化 N-羟乙基葡萄糖胺合成 6-脱氧-6-氨基(N-羟乙基)- α -L-呋喃山梨糖, 之后通过催化加氢反应即可获得米格列醇。

(3) 葡萄糖酸

目前生产葡萄糖酸所用的菌株主要有黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 以及氧化葡萄糖酸杆菌。氧化葡萄糖酸杆菌由于其发酵速率快、耐受抑制物能力强及能够代谢木糖等特点被广泛的应用于葡萄糖酸的生产^[51]。氧化葡萄糖酸杆菌的氧化是由位于细胞质膜外表面的膜结合脱氢酶催化的。葡萄糖酸的主要生成途径如图 1.1 所示。葡萄糖被葡萄糖脱氢酶催化生成葡萄糖酸内酯, 葡萄糖酸内酯在有水的环境下水解生产葡萄糖酸。同时, 吡咯喹啉醌 (pyrroloquinoline quineone, PQQ) 接受氧化还原过程中生成的电子被还原为 PQQH₂, 随后 PQQH₂ 将两个电子转移给泛醌, 泛醌转变为泛醇。泛醇在被细胞色素 bo3 或者细胞色素 bd 氧化成泛醌, 同时将 O₂ 还原为水, 最后将胞内 H⁺ 泵出胞外, 为 ATP 的形成提供质子梯度^[59-61]。

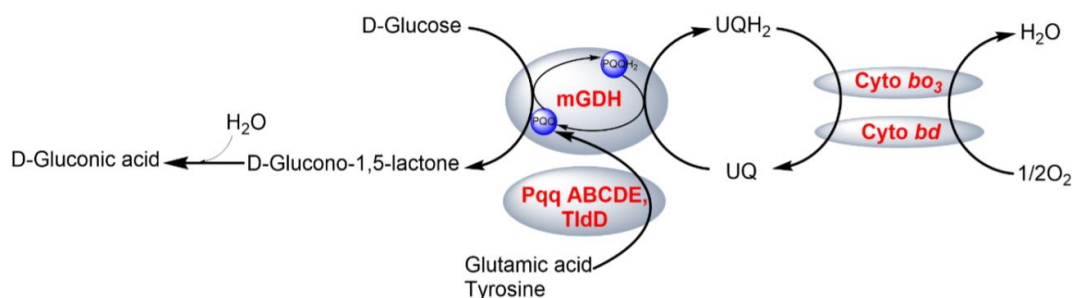


图 1.1 氧化葡萄糖酸杆菌中膜结合型的葡萄糖氧化呼吸链^[93]

Fig. 1.1 Glucose oxidation respiratory chain of membrane-bound type in *Gluconobacter oxydans*^[93]

1.2 生物炼制

2004 年, 美国能源部 (DOE) 给出了生物炼制的第一个精确定义: 生物炼制是将木质纤维素原料转化为可发酵糖并生成一系列有价值产品的加工厂的整体概念。2012 年出版的《德国生物炼制路线图》对其进行了更为全面的描述: 生物炼制过程具有明确的综合性, 是一个多功能的整体概念。生物炼制是一个整合一系列不同的方法和技术, 利用生物质作为多种原料来源, 可持续生产一系列不同的中间体和产品 (化学品、材料、生物能源/生物燃料), 从而最大限度地利用所有原料成分的过程。2012 年, 欧盟三分之

二的可再生一次能源生产来自生物质和可再生废物^[62]。2012 年,在供热和制冷、电力和交通领域,生物能源分别占可再生能源的 12.4%、4.1%和 5.3%^[63]。木质纤维素生物质根据来源不同主要分为以下几类:农业废弃物(如玉米秸秆、麦秆等)、林业废弃物(如软木、硬木、柳枝稷等)和市政垃圾(如废纸、报纸等)^[65]。与林业废弃物生产的生物能源相比,农业废弃物生产的生物能源所占份额从 2007 年的约 7%增加到 2012 年的 14%^[64]。此外,秸秆、插穗和修剪等形式的农业残留物也用于生产生物能源。农业废弃物主要用于生产生物燃料和沼气,而热量和电力主要来自林业废弃物^[66]。从木质纤维素生产生物燃料需要执行四个步骤。预处理的目的是破坏木质纤维材料的晶体结构;水解阶段的目的是将复杂的聚合物链转化为简单的糖;脱毒的目的是将对发酵菌株可能会造成抑制的那些物质脱除;最后,发酵阶段的目标则是将水解出来的糖转化为各种产品。

1.2.1 木质纤维素生物质

据估计,2020 年世界人口约为 77 亿,预计到 2050 年和 2100 年左右将增加约 30%,分别达到 97 亿和 112 亿^[67],伴随而来的是许多巨大的挑战。挑战之一的是能源的大量利用,从而导致 CO₂ 的大面积排放。目前,大气中二氧化碳的消除不超过排放量的一半,而臭氧层破坏和全球气温上升是残留二氧化碳的有害影响之一。根据英国石油公司能源展望^[68]的说法,基于我们周围演变的不同转型情景,过度使用能源造成排放 CO₂ 的量持续上升约百分之十,将持续到 2040 年。需要迅速采取行动来解决这一二氧化碳威胁,因为它正在影响工业活动,如烟气的热值降低、工业催化剂变质和中毒以及输送管道腐蚀^[69]。木质纤维素生物质作为一种低成本的可再生原料和非反应性物质广泛存在。它被认为是一种全球性的能源,是替代化石天然物质生产能源的最有吸引力的选择^[70]。

木质纤维生物质主要由纤维素、半纤维素和木质素组成^[71],其结构见图 1.2。农业废弃物和森林残渣是最有前景的生物质原料,因为它们资源丰富,成本相对较低^[72]。20 世纪 80 年代后,生物炼制工艺逐渐走向成熟,研究较多的主要是围绕木质纤维素生物质。木质纤维素要想被微生物所利用,首先要通过预处理破坏木质纤维素中紧密的结构,将纤维素暴露出来后利用纤维素酶来水解成可发酵糖。木质纤维素生物质逐渐可以替代化石能源,降低了人类对不可再生能源的依赖,解决了许多由环境问题所引发的负面影响^[73-75]。

目前,利用木质纤维素生产各种化学品已经取得了一定的进展:如随着纤维素生物乙醇行业的最新进展,木质纤维素生物炼制概念已扩展到生物柴油生产,其中植物油被微生物油取代,以增加可持续性并减少对环境的负面影响^[76];木质纤维素生物质作为沥青材料的性能改性剂受到越来越多的关注,这是因为木质纤维素生物质可获得的量大、成本低且具有改善路面耐久性的潜力^[77];木质纤维素生物质被用来生产生物柴油具有很大的前景。解脂耶氏酵母已被改造为有效地将木糖转化为脂质的一种产油酵母^[78];利用

来自生物质材料的可发酵糖通过暗发酵生产生物氢是获得生物氢的可持续方式^[79]。随着科学技术的发展，利用木质纤维素生产的化学品将会越来越多，对环境改善的帮助也会越来越多。

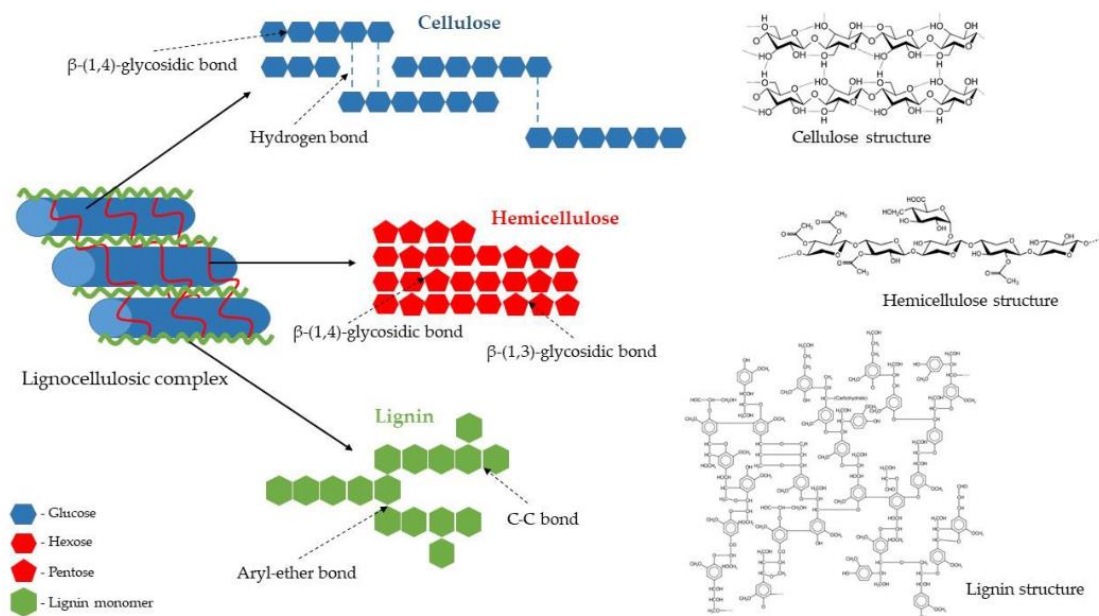


图 1.2 木质纤维素的结构示意图^[63]

Fig. 1.2 Schematic diagram of the structure of lignocellulose ^[63]

1.2.2 预处理

预处理的目的是在于破坏木质纤维大纤维和微纤维的结晶结构，以增加孔表面，从而使纤维素酶更容易降解纤维素与半纤维素^[80,81]。预处理的好处在于不需要降解半纤维素的糖，因为这种降解会导致发酵抑制剂的形成^[82]，从而降低产品生产过程的总体产量。尽管预处理成本不低^[83,84]，但这一步骤是必不可少的，因为它将水解率提高了 20%^[85,86]（相比于不经过预处理）。

不同的木质纤维素生物质的预处理过程有很大的不同，因为它们的物理化学性质都不太一样^[87,88]。针对不同生物质选用不同预处理方法会使得效率大大提升。常见的预处理方法有：①机械预处理；②物理化学预处理；③生物预处理。机械预处理主要目标就是通过将大生物质颗粒破坏成小颗粒以降低木质纤维素的结晶度，增加可接近的表面，从而促进后续的水解。物理化学预处理的原理主要是由于木质纤维素的不同化合物的溶解度与材料的温度、pH 和水分有关，而物理化学过程对这些参数起作用。半纤维素对温度及化学品较为敏感，它在 150°C(35°C)时部分溶解于水中，在这些物理化学过程中，主有蒸汽爆破和水热过程。蒸汽膨爆，包括通过在高压下注入饱和蒸汽来快速加热衬底，然后通过突然松弛将其带到大气压，从而使材料解体^[89,90]。水热法也是几十年来木质纤维素常见的预处理方法之一^[91]，利用水热法预处理后的半纤维素糖的回收率很高，并且

只要保持 pH 值在 4-7 之间,就不会产生抑制物。生物预处理主要是利用过氧化物酶或白腐真菌来脱除木质素,使得纤维素半纤维素更易酶解。在实际应用中,一般会采取综合预处理的方式来获得最佳的效果。本实验室之前的研究中,采用了干式稀酸预处理技术^[92],将物料与稀酸和蒸汽充分混合,非常有效的克服了木质纤维素的外部阻碍。不仅如此,干式稀酸预处理技术中的酸用量极少,实现了预处理过程中无废水排放且酸对设备的腐蚀也降到了最低。预处理过程中产生的抑制物也通过生物脱毒的方式得到了有效的去除。本文中的物料均经过干式稀酸的方式来进行预处理操作。

1.2.3 水解

如前文所述木质纤维素的结构非常复杂,这种复杂性需要几种预处理技术以及多种纤维素酶共同作用,以实现分离的纤维素和半纤维素的降解,这些纤维素和半纤维素可以转化为可在发酵过程中使用的单糖,从而生产“绿色”化学品和生物燃料。由酸催化的水解过程称为酸水解,由酶催化的水解过程的称为酶水解^[93]。纤维素酶在生物技术的各个领域有着广泛的应用。在生物燃料过程中,经过收集和预处理后,生物质通过发酵转化为液体燃料(生物乙醇)或厌氧消化产生的气态燃料(沼气)^[94]。在相同的生物反应器中,酶解和发酵在相同的条件下进行:同步糖化发酵或分步糖化发酵^[95]。纤维素和半纤维素的同时水解是通过己糖和戊糖的同时糖化和共发酵实现的^[96]。酶的产生、酶的水解和发酵可以由同一基因工程微生物在联合生物过程中同时进行^[97]。在酿酒厂,纤维素酶被用来降低黏度,通过水解多余的 β -葡聚糖,并在生产可发酵糖的过程中增加饮料的酒精含量。它们还用于果汁、葡萄酒和橄榄油的各种生产过程,例如在提取、稳定颜色、澄清、释放香气以及改进过滤过程中^[98]。此外,酶还被用来促进柑橘类水果的去皮和降解蔬菜的皮,以增加果汁产量^[99]。近年来,由于人们在研究纤维素酶的功能、优化纤维素酶的生产以及通过生物化学和蛋白质工程来改进纤维素酶方面所做的努力,纤维素酶的应用范围越来越广。酸水解主要是利用稀酸或强酸在较高的温度下水解纤维素和半纤维素,该工艺的优点是可实现 90% 的糖回收,但需要较高的投资成本来应对酸的腐蚀和循环。目前,由于试剂的价格和可能涉及额外纯化步骤的缓蚀剂的生产,化学水解已变得不那么有吸引力和竞争力。酶水解相对来说更加经济并且应用更加广泛。酶通常是高分子量蛋白质,这些是高度特异、多功能和高效的生物催化剂,与环境条件下的化学催化反应相比,具有更高的转化率。多糖酶解是由微生物分泌的酶将纤维素和半纤维素生化转化为单糖的过程。高度专一的酶能促进 100% 的纤维素转化为葡萄糖,而不会形成不需要的产物(抑制剂),这就是使这一过程与化学水解相比非常有吸引力的原因^[100]。此外,操作条件比较温和(50℃, pH 值 5)不会比化学水解更具侵略性,不会导致设备的腐蚀问题。

1.2.4 脱毒

预处理过程中会产生主要抑制物如图 1.3 所示。其中乙酸、糠醛和羟甲基糠醛为最

常见的几种^[94]。抑制物对于菌株的生长以及发酵性能有很大的影响，并且也会影响到纤维素酶的活性，使得酶解效率下降^[101]。将抑制物脱除的过程称为“脱毒”。脱毒在整个生物炼制过程中占据非常重要的作用，如果脱毒效果不好，后续的菌株活性会受到影响，所发酵的产品浓度也无法达到期望，给整个生物炼制带来了巨大的限制。所以选择一个效果好的脱毒方法是至关重要的。常见的脱毒方法可分为化学、生物及物理脱毒三种方法。化学方法包括通过将抑制剂与危害较小的形式反应来消除抑制剂。常见的化学品包括碱和还原剂，如氨或氢氧化钠^[102]。物理方法包括过滤、吸附和萃取^[103]。物理脱毒的方法之一是利用活性碳来吸附抑制物。活性碳具有很大的比表面积、高的微孔率和吸附能力，这使得它可以作为一种有效的吸附剂来净化和/或分离有毒化合物。活性碳的一个显著优点是，它的使用不会显著改变在预处理过程中获得的发酵糖的量。不管是物理脱毒还是化学脱毒法都有一定的缺陷，包括脱毒不彻底、操作繁琐及产生废水增加成本等问题。

对于脱毒来说，生物脱毒最具价值和潜力，因生物脱毒对抑制物如乙酸、糠醛、羟甲基糠醛的脱除比较彻底。在之前的研究中选择了液态脱毒作为去除抑制物的手段^[95]。液态脱毒是指预处理后的物料在预糖化后将脱毒菌株接进去脱除抑制物的方法。液态脱毒相比于其它脱毒方式不仅脱除抑制物彻底，并且脱毒终点可监控，避免进一步的糖耗。同时，液态脱毒糖酸发酵间接增加了糖化的时间，发酵液黏度得到降低，糖酸发酵过程中溶氧水平得到提高。溶解氧浓度是糖酸发酵中一个非常重要的参数，因为氧化葡萄糖酸杆菌对糖类的生物催化是脱氢和细胞呼吸紧密耦合的生物氧化反应，严重依赖于氧气供应^[104]。因此，对于糖酸发酵来说，液态脱毒是一种非常有利于提高糖酸产量的一种脱毒方式。本文中未特别标注的糖酸发酵均采用液态脱毒的方式脱除抑制物。

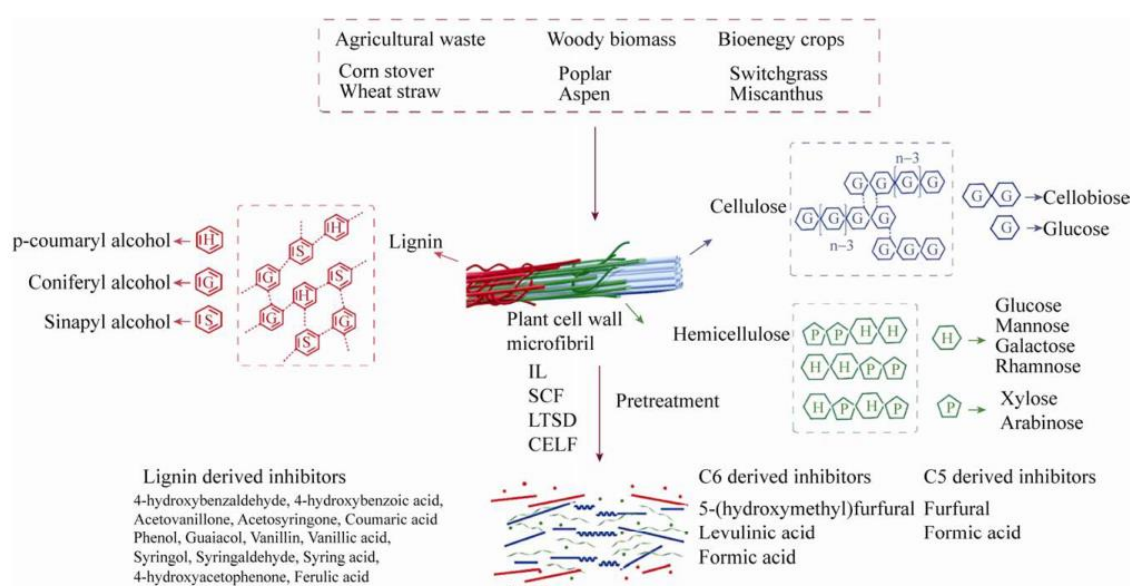


图 1.3 木质纤维素预处理产生的抑制物^[94]

Fig. 1.3 Inhibitors generated from lignocellulose pretreatment^[94]

1.2.5 糖酸发酵

纤维素糖酸发酵主要分为分步糖化发酵 (SHF)、同步糖化共发酵 (SSCF) 及部分糖化和共发酵 (PSCF)。分步糖化发酵指的是将预处理后的物料用纤维素酶完全水解后, 在得到的水解液中接入发酵菌株进行发酵的方式^[95]。分步糖化发酵的优势在于糖化和发酵都可以在各自最适合的条件下进行, 提高糖化与发酵的效果。但也有一定的缺陷, 在糖化得到高浓度可发酵糖时, 纤维素酶活性会因反馈抑制而受到影响, 从而无法进一步提高可发酵糖的产量。同步糖化共发酵过程是指将糖化与发酵步骤相结合的发酵方法^[105]。同步糖化共发酵可以在糖生成的同时被消耗, 避免了高浓度糖的抑制作用。但同步糖化共发酵也有一定缺陷, 如糖化与发酵条件被迫一致, 导致效果变差等。部分糖化和共发酵^[106]是同步糖化发酵和分布糖化发酵的组合, 在最佳条件(45-50 °C 和 pH 5)下, 酶的活性保持最佳, 此时从生物质聚合物中会释放出一些可用的单糖。在几个小时后, 改变发酵有机体接种的条件: pH 通常升高, 温度通常降低。以这种方式, 发酵的生物体迅速消耗先前释放的糖, 酶仍然能够工作。这样做的缺点就是操作繁杂、效率太低。

同步糖化共发酵相较于另外两种发酵方式来说, 最终得到的产物浓度更高、操作更加简单。但在纤维素糖酸发酵过程中, 由于中间产物葡萄糖酸内酯会抑制纤维素酶的活性, 糖酸发酵无法采取同步糖化共发酵的方式, 一般采用的是分步糖化发酵^[95]。为了使糖酸的同步糖化共发酵成为可能, 本文主要探究了纤维素糖酸发酵过程中抑制同步糖化共发酵的因素。在糖酸发酵的过程中, 实现同步糖化共发酵与许多阻碍, 如葡萄糖酸内酯会抑制纤维素酶的活性^[106], 但其作为中间产物, 很难去消除其影响。而有些则是可以尝试解决的, 如糖酸发酵过程中生成的过氧化氢及葡萄糖酸钠对纤维素酶的抑制。过氧化氢在糖酸发酵的过程中生成, 作为强氧化剂会对纤维素酶及菌株的结构产生破坏作用; 高葡萄糖酸钠的积累造成的渗透压胁迫会对纤维素酶及菌株的活性产生抑制。因此, 对糖酸发酵过程生成的过氧化氢及葡萄糖酸钠的影响进行探究是有必要的。

1.3 木质纤维素产糖酸过程中的主要问题

1.3.1 溶氧限制

溶解氧 (dissolved oxygen, DO) 是指溶解于水中的分子态氧, 与氧分压与温度有关。很多好氧发酵菌株由于对难溶于水的气态分子氧的依赖, 有氧反应往往受到低溶解氧浓度的限制。Lindeque 等人^[107]为了更好地了解氧气限制如何影响酶的使用效率, 在连续搅拌釜式反应器中, 研究了葡萄糖氧化酶连续氧化葡萄糖为葡萄糖酸的过程。结果表明, 通入原料中的气体含氧量增加 3 倍, 反应速度提高 2 倍, 这与提高 10 倍酶浓度的效果一致。溶解氧浓度在糖酸发酵中是一个非常重要的参数, 因为氧化葡萄糖酸杆菌对糖类的生物催化是脱氢和细胞呼吸紧密耦合的生物氧化反应, 严重依赖于氧气供应^[108]。在以木质纤维素为底物的糖酸发酵过程中, 氧化葡萄糖酸杆菌的细胞生长同样需要高度溶

解的氧^[109], 如果溶氧受到限制, 氧化葡萄糖酸杆菌上膜结合脱氢酶的活性会受到抑制, 基因表达也会发生变化, 最终对催化性能产生影响^[110]。

尽管越来越多的措施已经被应用以提高溶氧, 但对于高固含量糖酸发酵来说, 溶氧仍是阻碍氧化葡萄糖酸杆菌获得高水平糖酸的关键问题所在。高固体含量对糖酸发酵溶氧的影响主要有两方面: 一方面是随着固含量的提升, 发酵液粘度的增加会导致氧气的传递会受到阻碍, 发酵的效率因此下降^[111]。另一方面, 高固含量及高粘度有氧发酵会导致气泡的大量生成^[112], 不仅造成气液接触面积减少, 严重时甚至会造成发酵液逸出, 增加染风险。另外, 为了提高溶氧, 最常采取的措施是调高发酵罐通气及搅拌, 但由于气-液阻力及其它因素, 通入发酵罐的无菌空气只有 2%左右会被菌株利用^[113], 造成了大量的资源浪费。

为了寻求更合理的解决方案, 许多方法被开发了出来。有些是通过改变发酵装置如改变搅拌桨桨叶形状^[114]以及改善通气口^[115]来提高溶氧以及消除气泡; 有些则是通过对菌株本身的改造如改变菌株形态^[116]以及对透明颤菌血红蛋白 (VHb) 的异源表达^[117]来使菌株更易于利用氧气; 有些则是通过改变基础发酵条件如温度、压力等来增加溶氧。但这些措施都有一定的局限性如成本高、适用性差及效率低下等, 更重要的是这些措施大多是在低固体含量条件下进行的。为了提高高固含量下糖酸发酵的效果, 更合理更有效的措施应该被研究。

1.3.2 渗透压胁迫

对于糖酸发酵过程, 增加的环境渗透压力总是由添加中和剂引起的。在糖酸发酵过程中由于葡萄糖酸钠的积累, 培养液中的渗透压增加, 导致活菌数和全细胞活性显著下降。在糖酸发酵的工业应用中, 具有一定胁迫耐受性的发酵菌株是工业发酵的普遍要求。渗透压胁迫耐受机制是复杂的, 受生理、生物化学和分子水平上的多种因素控制^[118]。发酵时的高盐造成的渗透压胁迫会抑制菌株的生长及发酵性能, 因此了解如何缓解渗透压胁迫对菌株的影响是有必要的。

目前常见的改善渗透压胁迫的方法有: 抗性结构基因的过表达、长期适应进化、人工诱变等^[119-122]。其中较为常见的是适应性进化工程。适应性进化是一种在人为设置的环境下分析进化现象的科学方法^[123]。Saini 等人^[124]通过对酵母在含有乳糖的培养基中进行适应性进化, 提高了其对乳糖的利用能力, 最终得到的乙醇浓度比其亲本菌株高约 17.5%。Yan 等人^[125]通过对细菌的适应性进化, 增强了其酚耐受性, 最终提高了纤维素乙醇产量。Yan 等人^[126]还通过对乳酸片球菌的适应性进化, 提高了其耐酸性, 最终得到了较高的乳酸产量。Dhaliwal 等人^[127]通过对发酵菌株在含有半乳糖的合成培养基中进行适应性进化, 提高了发酵菌株对半乳糖的适应性, 最终增加了乙醇产量、乙醇生产率和细胞生物量。这些例子都表明适应性进化是一个提高菌株适应恶劣环境的有效手段。进化工程已经成为开发用于燃料、化学品和材料工业生产的新菌株的有用过程^[128]。

高固含量糖酸发酵过程中会生成大量葡萄糖酸盐作为产物，高浓度的葡萄糖酸盐很有可能会抑制发酵菌株及纤维素酶的活性。在利用木质纤维素生产糖酸的过程中，最终的糖酸产量可达到 100g/L 以上，而在合成培养基中葡萄糖酸钠可能达到的浓度更高。为了解决高浓度葡萄糖酸钠所带来的高渗透压胁迫，本文主要利用适应性进化的方式提高菌株的耐受性。

1.3.3 副产物酮基葡萄糖酸的生成

氧化葡萄糖酸杆菌利用葡萄糖生成葡萄糖酸后，葡萄糖酸还会在葡萄糖酸脱氢酶的作用下进一步转化为酮基葡萄糖酸^[129]。酮基葡萄糖酸根据氧化途径不同分为 2-酮基葡萄糖酸（用作合成双抗坏血酸的关键中间体^[130]）、5-酮基葡萄糖酸（重要食品添加剂 L(+)-酒石酸的合成前体^[136]）及 2,5-二酮基葡萄糖酸（维生素 C 的前体-2-酮基-L-古龙酸合成所必需的产物^[137]）。目前生产酮基葡萄糖酸的菌株主要有粘质沙雷氏菌株^[132]、铜绿假单胞菌株^[136]、球形节杆菌株^[134]、荧光假单胞菌株^[135]、肺炎克雷伯氏菌株^[133]、氧化葡萄糖酸杆菌^[131]。

本文通过纤维素糖酸发酵得到的葡萄糖酸钠主要用于水泥缓凝剂，而副产物酮基葡萄糖酸的生成不仅会导致葡萄糖酸钠得率降低，也会使其作为水泥缓凝剂的性能下降^[138]。为了提高葡萄糖酸产量，抑制酮基葡萄糖酸的生成，许多方法被研究出来。有的利用重金属盐如氯化锌^[139]对葡萄糖酸脱氢酶活性的抑制来控制酮基葡萄糖酸的生成；有的发现乙酸^[140]和过氧化氢^[141]的浓度会对酮基葡萄糖酸的生成产生影响；本实验室的研究还发现高浓度木糖对酮基葡萄糖酸的生成也有一定的抑制，通过增加发酵时木糖的含量可以抑制酮基葡萄糖酸的生成。然而，这些方法都有一定的弊端，如加入重金属盐后对菌株的生长发酵性能的影响尚未可知；增加木糖对于木质纤维素发酵来说需要增加糖化的时间，这可能会导致抑制物的进一步增加；改变乙酸及过氧化氢浓度则又需要新的方法，浪费更多成本，这些方法都不是合适的选择，寻找一种绿色、高效的抑制酮基葡萄糖酸生成的方法至关重要。

1.4 论文主要研究内容与意义

本论文以玉米秸秆为原料，采用干法生物炼制技术生产葡萄糖酸及木糖酸。通过解决糖酸发酵过程中的一些问题，改善了发酵环境，提高了发酵指标。本论文主要研究内容包括三个方面：

（1）首先对生物炼制顺序进行改变，选用了先糖化再脱毒的方式进行糖酸发酵，在糖化液中进行脱毒的过程称之为液态脱毒。脱毒的同时纤维素酶也在不断发挥作用，发酵液黏度下降，通过测定发酵过程的 k_{La} ，表明糖酸发酵的溶氧水平得到了提高，以往为了得到高溶氧而设置的高转速及通气量已经不再适用，因此在液态脱毒条件下探究了更合适的转速及通气量。

(2) 为了探究利用氧化葡萄糖酸杆菌生产糖酸的过程中是否有过氧化氢生产, 我们在糖酸发酵时利用过氧化氢试纸检测并通过氧化葡萄糖酸杆菌的代谢途径图确认了过氧化氢在氧化葡萄糖酸杆菌中不生成。即便按照葡萄糖氧化酶过氧化氢生产量加入到糖化体系中, 过氧化氢对纤维素酶的抑制也很小, 这证明了在糖酸发酵过程中, 过氧化氢并不是影响发酵产量提升的主要因素。此外, 在糖酸发酵过程中会积累大量的葡萄糖酸钠, 这可能是抑制纤维素酶及菌株的因素之一。因此, 我们在糖化及发酵时加入了不同的葡萄糖酸盐及钠盐, 最终发现葡萄糖酸钠对纤维素酶及菌株都有很大的抑制效果。其中, 钠离子的抑制要高于葡萄糖酸根的抑制。为了减轻高浓度钠离子对菌株的抑制, 我们在高浓度钠离子条件的合成培养基中对氧化葡萄糖酸杆菌进行适应性进化来提高发酵产量。最终获得了一株能耐受高浓度葡萄糖酸钠的稳定进化菌株。通过实时荧光定量 PCR 实验, 发现发酵菌株中 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性显著提高, 发酵验证结果也优于出发菌株, 这表明发酵菌株通过适应性进化增强了其对高渗透压胁迫的耐受性, 有利于高浓度糖酸的发酵实验。

(3) 有研究表明葡萄糖酸脱氢酶对 pH 比较敏感, 其活性在较低的 pH 下会降低甚至是失活^[142], 并且在低 pH 条件下葡萄糖酸的生成不会受到影响, 低 pH 可能是避免酮基葡萄糖酸生成的较好的方法。因此我们在低 pH 条件下进行液态脱毒糖酸发酵。同时, 为了观察不同静置条件下酮基葡萄糖酸的生成情况, 我们将发酵结束后的发酵液在不同 pH (2.5-6.5) 和不同状态 (离心、抽滤及不做处理) 条件下短期 (3 天) 及长期 (30 天) 静置, 观察酮基葡萄糖酸生成情况。

第 2 章 液态脱毒条件下糖酸发酵最低转速与通气量的探究

2.1 引言

预处理过程中会产生对发酵菌株会产生抑制作用的物质，主要有乙酸、糠醛和羟甲基糠醛等。抑制物对于菌株的生长以及发酵性能有很大的影响，并且也会影响到纤维素酶的活性，使得酶解效率下降^[93]。脱毒在整个生物炼制过程中占据非常重要的作用，如果脱毒效果不好，后续的菌株活性会受到影响，所发酵的产品浓度也无法达到期望，给整个生物炼制带来了巨大的限制。选择一个高效的脱毒方法至关重要。

为了克服抑制物带来的影响，学者们研究了许多方法。例如选择抑制物耐受性较强的发酵菌株^[143]，某些发酵菌株对常见的抑制物如乙酸、糠醛及羟甲基糠醛具有一定的耐受性，可以大大降低抑制物对发酵的影响。但当抑制物浓度较高时仍会对发酵产生不利影响；也有的通过加入过量的碱如 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 中和来去除抑制物^[102]，此方法操作简单，脱除彻底，但同时会产生大量的废水，增加处理废水的成本；还有通过酶催化及生物降解的生物法等。

以往在常规生物炼制的条件下进行脱毒时不仅时间长，而且无法准确检测脱毒结束的时间，从而导致消耗部分糖，对后续发酵的指标产生了一定影响。更重要的是，常规生物炼制下进行的糖酸发酵过程氧气传递会受到影响，为了提高氧气传递速率，发酵时需要较高的转速及通气量，不利于资源的节约。

为了解决常规生物炼制所带来的问题，研究了更换生物炼制顺序的方法。更换后的生物炼制顺序是先糖化再脱毒。在有抑制物的条件下进行糖化并不会影响最终的结果，抑制物的存在对酶解过程的影响几乎可以忽略^[148]。更换生物炼制顺序后不仅脱毒时间短，大大缩减了时间成本，为工业化的进展奠定了基础，且液态脱毒终点可监测，避免了糖的消耗，提高了糖酸发酵的指标。最重要的是，更换生物炼制后，脱毒的同时纤维素酶也在不断发挥作用，发酵液黏度得到降低，通过对 k_La 的测定，表明更换生物炼制顺序后溶氧有所提高。常规生物炼制下糖酸发酵的参数已经不再适用，通过对糖酸发酵最低转速及通气量的研究，确定了更低的发酵参数，节约了能耗。

2.2 材料与方法

2.2.1 原材料与酶

玉米秸秆购自河南南阳。组分中含有纤维素 34.36%，半纤维素 26.12%、木质素 15.91%、灰分 8.05%。数据都是以干物料为基准。

纤维素酶 Celic Ctec 2.0 购自诺维信。根据 NREL 协议 LAP-006^[144]测得的滤纸活性为 256.0 FPU/mL，根据 Ghose^[145]测得的纤维二糖酶活性为 4653 CBU/mL，根据 Bradford^[146]方法，测得蛋白质浓度为 81.5 mg protein/ml。实验中所使用的主要试剂：山

梨醇、葡萄糖、木糖、磷酸二氢钾、七水硫酸镁和硫酸铵等其它试剂级化学品均购自国药化学试剂有限公司(上海)。

2.2.2 菌株及细胞培养

氧化葡萄糖酸杆菌购自德国微生物菌种保藏中心。高效固态生物脱毒所用的菌株宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 保藏于中国微生物菌种保藏中心(CGMCC),注册编号为 17665。由本实验室在含有抑制物的物料中筛选得来。

氧化葡萄糖酸杆菌 使用的培养基如下:

(1)种子培养基: 80.0 g Sorbitol, 20 g Yeast extract, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g KH_2PO_4 , 1.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 加入 1 L 的去离子水中。

(2) 发酵合成培养基: 80.0 g Glucose, 0.5 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.5 g KH_2PO_4 , 1.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 加入 1 L 的去离子水中。

Paecilomyces variotii FN89 使用的培养基如下:

(1)SM 合成培养基: 20.0 g Glucose, 1 g Yeast extract, 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 g KH_2PO_4 , 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 加入到 1 L 的去离子水中。

(2) PDA 固体培养基: 200g 煮沸后的土豆提取液、10 g Glucose、10 g Agar, 加入到 1 L 去离子水中。

氧化葡萄糖酸杆菌培养方法如下:

首先将氧化葡萄糖酸杆菌冻存管从 -80°C 冰箱中取出, 在种子培养基中活化 24 h, 之后扩培培养 24 h 后接入发酵罐中进行发酵实验。接种量皆为 10%, 按照体积比。培养基和水均在 115°C 灭菌 20 min。

Paecilomyces variotii FN89 培养方法如下:

P. variotii FN89 保存在 PDA 平板上。使用时, 在 PDA 平板上接入 10ml 无菌水, 用三角涂布棒刮取 *Paecilomyces variotii* FN89 孢子后倒入 100ml SM 合成培养基中, 37°C 、300 rpm 培养 24 h。

2.2.3 预处理

玉米秸秆的预处理在带有螺带桨的 20 L 预处理反应器中进行。1200 g 干物料和 4% (w/w) 硫酸溶液按照 2:1 的质量比共同投入反应器中。之后通入蒸汽开始升温, 从通入蒸汽使釜内温度达到 100°C 开始, 直到到温度升到 175°C 的过程称为升温过程, 控制在 5 min 之内以保证预处理强度的稳定性。当温度升至 175°C 时维持 5 min, 搅拌桨的转速始终为 50 rpm。预处理结束时, 迅速排空压力, 将物料放出。预处理后的玉米秸秆的含水量大约在 50%, 在此预处理过程中没有废水产生。经过预处理后的玉米秸秆含有纤维素 35.19%、半纤维素 0.89%, 组分使用两步酸解法测定。

2.2.4 氧气传递速率 k_La 的测定

通过动态法测定。首先将 1.0 vvm、 30°C 下的溶氧设置为饱和溶氧。之后通入氮气

赶走氧气。这时溶氧逐渐下降，当溶氧下降到 5% 以下时，断掉氮气通气阀，打开氧气阀通入氧气。此时溶氧会逐渐上升，每 10 s 记录一次溶氧的变化，直至达到饱和溶氧。之后对记录的溶氧绘制曲线，求出氧气传递速率 k_La 。

$$dC/dt=k_La(C^*-C) \quad (2-1)$$

其中 C^* 是饱和溶氧浓度(mol/L)， C 是实时测定的溶氧浓度(mol/L)。

2.2.5 粘度的测定

从生物反应器中取出 5 mL 水解产物样品 使用 Brookfield 测定水解产物的表观粘度。DV2T 粘度计(Stoughton, Middleboro), 30-37 °C 和 58 s⁻¹ 次剪切率。在液态脱毒及糖酸发酵时需通入氧气，粘度计的测定前需排除气体。在发酵液取至具塞试管中，使用真空抽滤机抽空气体后再去测定粘度。

2.2.6 糖类及糖酸分析

糖采用 HPX-87P 型色谱柱进行高效液相测定。无菌超纯水作为流动相，流速为 0.6 mL/min。糖酸使用 HPX-87H 型色谱柱进行测定。0.005 mol 硫酸作为流动相，流速为 0.4 mL/min，紫外检测的波长为 210 nm。

2.3 结果与讨论

2.3.1 液态脱毒条件下糖酸发酵上罐验证

在实验室之前的研究中，使用脱毒菌株对预处理后的物料进行固态脱毒，但是固态脱毒不仅时间长，而且无法准确掌控脱完毒的时间导致糖被消耗，对后续发酵的指标产生了一定影响。更重要的是，利用固态脱毒进行的糖酸发酵过程发酵液黏度较高，溶氧受到影响，而溶解氧浓度是糖酸发酵中一个非常重要的参数，因为氧化葡萄糖酸杆菌对糖类的生物催化是脱氢和细胞呼吸紧密耦合的生物氧化反应，严重依赖于氧气供应^[101]。而为了达到所需的溶氧浓度，发酵时需要较高的转速及通气量，不利于资源的节约。

为了解决固态脱毒所带来的问题，本研究以玉米秸秆为原料，在 3L 生物反应器内考察了液态脱毒糖酸发酵的可行性。液态脱毒相比固态脱毒来说时间短，大大缩减了时间成本，为工业化的进展奠定了基础，且液态脱毒终点可监测，避免了糖的消耗，提高了糖酸发酵的指标。同时，液态脱毒糖酸发酵间接增加了糖化的时间，发酵液黏度得到降低，糖酸发酵过程中溶氧水平得到提高。

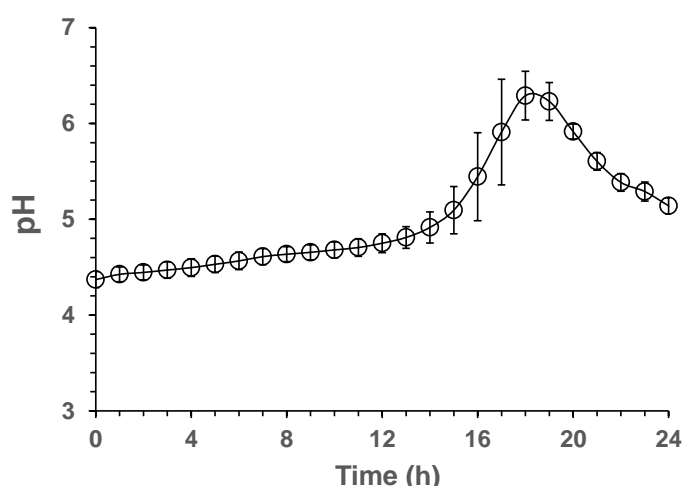


图 2.1 30% (v/v) 固含量玉米秸秆液态脱毒过程中的 pH 变化情况

Fig. 2.1 pH changes during the liquid detoxification process of 30% solid content corn straw

首先将预处理后的玉米秸秆在 5 L 糖化罐中进行预水解, 预水解 12 h 后将得到的糖化液转移至 3 L 脱毒罐中进行脱毒准备。3 L 脱毒罐在进行脱毒的操作之前需要设置温度在 37°C、转速 750 rpm 及通气量 1.0 vvm。将糖化液转移进 3 L 罐后接入 10% (v/v) pv 脱毒种子液进行液态脱毒操作。将脱毒种子液接入 3 L 罐中相比于不在罐中的固态脱毒来说有一个最大的优点就是脱毒终点可监测。不管是液态脱毒还是固态脱毒, 它们都会脱除 3 种主要抑制物: 乙酸、糠醛及羟甲基糠醛。其中乙酸作为一种酸性抑制物, 其被脱除的过程中会导致 pH 的下降。而在 3 L 罐中进行液态脱毒时可以通过 pH 计来检测罐中 pH 的变化。如图 2.1 所示, 在脱毒的过程中 pH 先缓慢上升, 根据之前的研究, 脱毒前期主要是在脱除糠醛及羟甲基糠醛, 乙酸只有略微的消耗, 因此 pH 变化缓慢。在脱毒 14 h 之后 pH 开始快速上升, 脱毒至 18 h 时达到最高值, 之后开始下降。按照之前的理论, 可以认为在 pH 开始快速上升期是在脱除乙酸, 18 h 时乙酸基本脱除完毕, 之后 pH 开始下降。pH 开始下降是因为脱毒菌株生成了其它的酸, 这在实验室其它论文中有所讨论, 本论文不做探讨。

表 2.1 30% (v/v) 固含量玉米秸秆液态脱毒过程中的成分变化情况

Table 2.1 Composition changes of 30% (v/v) solid content corn straw during liquid detoxification process

	葡萄糖	木糖	乙酸	糠醛	羟甲基糠醛
0 h	101.56±5.28	39.27±2.98	6.68±1.89	0.52±0.04	1.11±0.09
18 h	106.23±4.35	40.61±4.40	0.86±0.32	0.00±0.00	0.00±0.00

如前文所述, pH 上升的原因是因为在脱除乙酸, 脱毒 18 h 时达到最高点时表明乙酸已经基本脱除。为了验证这一观点, 对脱毒起始及终点的成分进行了检测, 结果如表

2.1. 脱毒起始即糖化结束后乙酸、糠醛及羟甲基糠醛分别为 6.68 g/L、0.52 g/L 及 1.11 g/L, 3 种抑制物浓度均处于较高的水平, 此时会对菌株的活性及发酵性能产生一定的负面影响。经过液态脱毒 18 h 后我们可以看到最终的抑制物浓度仅有乙酸还剩下不到 1 g/L, 其余两种抑制物均完全脱除。因此, 脱毒 18 h 即 pH 达到最高值的时间点即为脱毒终点。在脱毒终点时, 我们也会发现葡萄糖及木糖均略有增加, 这是因为在液态脱毒的过程中纤维素酶也在不断的分解纤维素及半纤维素来产生更多的可发酵糖。而在固态脱毒时, 由于脱毒终点无法准确检测, 只能依靠液相不断检测抑制物含量来确定, 这造成了资源的浪费且耗时耗力。检测需要一定的时间, 而在检测后可能发现抑制物早已脱除完毕, 脱毒菌株为了生存而开始消耗可发酵糖, 从而对整个发酵产量造成一定的影响。因此液态脱毒相比固态脱毒具有一定的优势, 利用液态脱毒进行糖酸发酵更有利于产量的进一步提高。

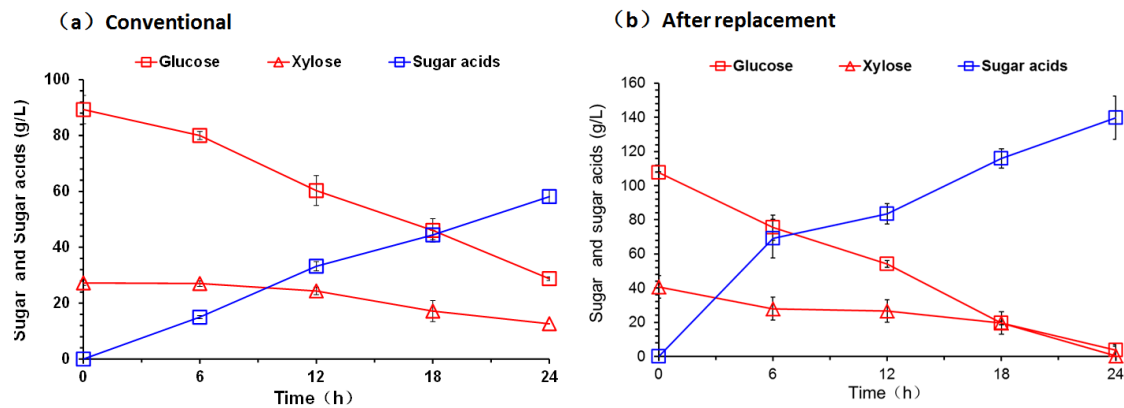


图 2.2 氧化葡萄糖酸杆菌在固态及液态脱毒条件下的糖酸发酵情况。30%固含量玉米秸秆在 30℃、2.4 vvm、500 rpm 及 pH5.5 条件下的 3 L 罐中发酵 24 h

Fig. 2.2 Sugar acid fermentation of *G. oxydans* DSM 2003 under liquid detoxification condition

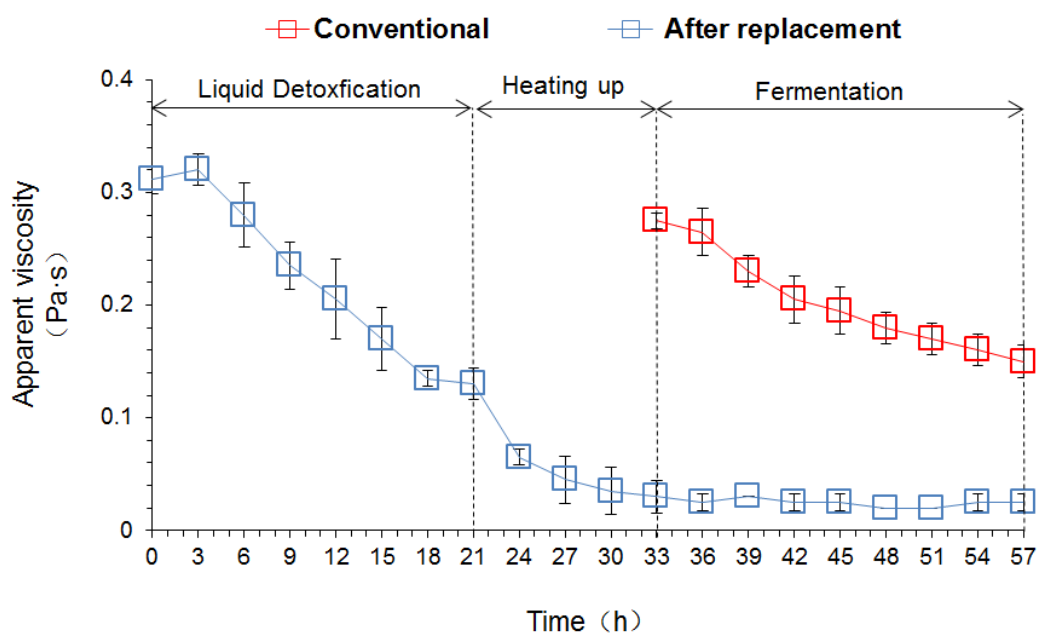
前文提到液态脱毒的过程中也是在不断糖化的过程, 这对于降低整体发酵液的黏度有一定的帮助。众所周知, 利用氧化葡萄糖酸杆菌发酵糖酸是一个对溶氧及其依赖的发酵过程, 当溶氧不足时发酵时间可能会延长, 产率因此下降。因此利用液态脱毒进行糖酸发酵对于产量的提高及发酵时间的缩短而言有一定的好处。在液态脱毒完成后, 根据 Zhang 等人^[149]的研究, 将温度升至 50℃ 维持 12 h 以灭活脱毒菌株, 避免其影响后续的发酵实验。50℃ 维持 12 h 后将温度下降至 30℃ 即发酵温度后即可接入发酵种子液。发酵菌株选择的是氧化葡萄糖酸杆菌, 以往选用发酵糖酸的菌株是黑曲霉。但黑曲霉相比于氧化葡萄糖酸杆菌来说有很多劣势, 如不能利用木糖、对抑制物不耐受以及发酵时间较长等。黑曲霉也有一定的优势, 如不会产生酮基葡萄糖酸。综合来看, 为了进一步提升糖酸的产量, 氧化葡萄糖酸杆菌是更合适的选择。最终的发酵结果如图 2.2 所示。固态脱毒条件下的糖酸发酵 24h 时残糖仍剩余 40g/L 以上, 发酵与耗糖速率较慢。而液态

脱毒条件下的糖酸发酵第 24 h 时葡萄糖酸与木糖酸产量最高为 104.15 ± 5.39 g/L 和 35.56 ± 7.23 g/L, 此时残余的葡萄糖与木糖之和低于 5 g/L。脱毒菌株对葡萄糖的消耗仅在 1%-10%左右, 木糖几乎没有消耗, 这表明液态脱毒对糖酸发酵来说是一个合适的技术。

2.3.2 糖酸发酵过程不同转速及通气量对氧气传递速率的影响

对于好氧发酵来说, 能够改善溶氧是液态脱毒另一点比较重要的优势。液态脱毒整个过程需要在 37°C 下维持 24 h 左右, 之后升温至 50°C 并维持 12 h 以灭活脱毒菌株。在液态脱毒以及后续的升温过程同时也是不断在糖化的过程, 发酵液黏度会进一步下降, 因此发酵时的溶氧也会得到改善。氧化葡萄糖酸杆菌是一株对溶氧有很高的需求的菌株, 尤其在催化糖酸生产时需要大量氧气的参与。因此提高溶氧, 对于利用氧化葡萄糖酸杆菌生产糖酸来说是非常重要的。

在好氧生物过程中, 氧是用于生长、维持和其他代谢途径的关键底物, 包括产品合成。由于氧气在水溶液中的溶解度较低, 必须由气相连续提供氧气, 因此需要了解氧气传递速率(OTR)的知识。生物反应器中的 OTR 取决于液膜传质系数 k_L 、可用于传质的总比表面积 a 和以浓度表示的驱动力。由于 k_L 和 a 这两个参数不容易单独测量, 所以通常将它们集中在一起作为一个参数, 称为体积传质系数, $k_L a$ 。 $k_L a$ 的值在一定程度上可以反应水溶液中的溶解氧的情况。测定 $k_L a$ 主要有以下三种方法: ① H_2SO_3 氧化法; ②稳态法; ③动态法。稳态法一般是利用物料衡算来进行计算的方法, 存在较大误差。在 H_2SO_3 氧化法中, Na_2SO_3 溶液与真实的培养液有比较大的区别, 不能很好的反应真实情况, 造成数据有较大的误差。而动态法, 是根据培养液中溶氧浓度的变化速率来计算的, 更加真实有效。且利用动态法测 $k_L a$ 时, 只需要测量溶氧一个变量, 很简单就能测出 $k_L a$ 的值。



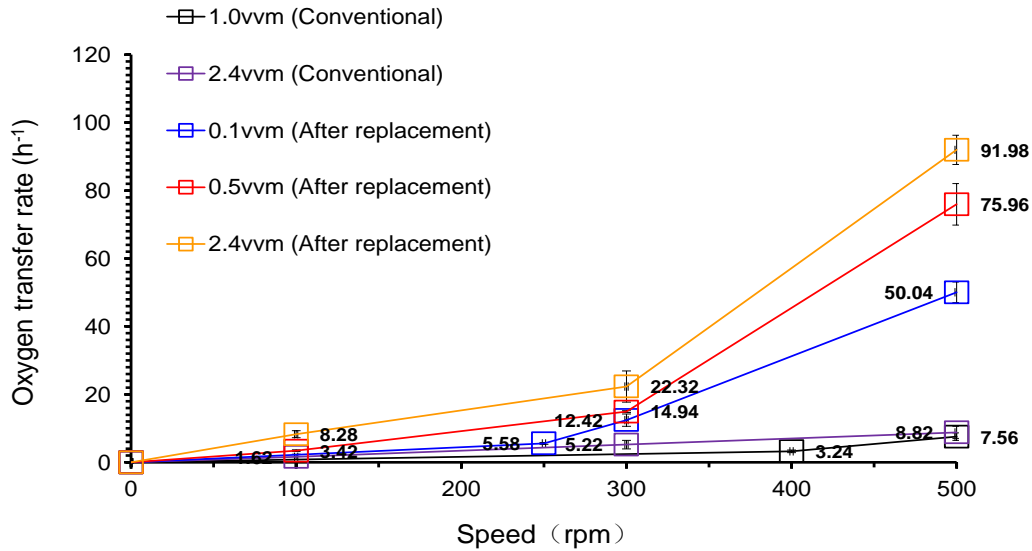


图 2.3 不同生物炼制顺序下的糖酸发酵过程粘度及氧气传递速率 k_{La} 的值

Fig. 2.3 Value of viscosity and oxygen transfer rate k_{La} in sugar acid fermentation process under different biological refining sequences

图 2.3 是利用动态法在更换生物炼制顺序进行糖酸发酵时的粘度及不同转速及通气量下的 k_{La} 测定结果。液态脱毒条件下的糖酸发酵过程粘度随着脱毒过程的进行逐渐降低，糖酸发酵初始的粘度只有 $0.02 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ，而传统生物炼制过程糖酸发酵初始的表现粘度在 $0.28 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ ，高于 $0.02 \text{ Pa} \cdot \text{s}$ 。证明了液态脱毒过程可有降低发酵液的粘度，因此下一步对发酵过程的氧气传递进行了探究。根据以往的研究结果，利用氧化葡萄糖酸杆菌的糖酸发酵要想符合常规发酵结果， k_{La} 必须在 10 h^{-1} 以上^[147]。由图中可以看出，常规生物炼制下的糖酸发酵在 1.0 vvm 通气量及 500 rpm 转速较高参数下，其 k_{La} 的值为 $7.56 \pm 1.08 \text{ h}^{-1}$ ，小于发酵最低标准。当利用液态脱毒时，糖酸发酵在 0.1 vvm 通气量及 300 rpm 转速的较低参数下，其 k_{La} 的值为 $12.42 \pm 1.78 \text{ h}^{-1}$ ，已经达到了发酵最低标准，而随着转速或通气量的增加， k_{La} 的值也越来越高。这表明在液态脱毒条件下，较低参数即可进行糖酸发酵，从侧面证明了液态脱毒对糖酸发酵过程中溶氧提升的帮助。

2.3.3 液态脱毒条件下糖酸发酵最低转速及通气量的探究

根据前面氧气传递速率的测定，液态脱毒对于溶氧的提升是很大的。较低参数条件下依然可以进行糖酸发酵，这表明以往在固态脱毒下进行的糖酸发酵为了达到所需的溶氧而设计的高参数已经不再适用，需要重新寻找更适合的参数。在工业上，高转速及高通气量需要耗费大量的能源，且罐体积越大，效率可能越低。因此，如果能在不影响发酵的前提下降低转速及通气量，对于大规模发酵来说，可以节省大量的能耗及成本。

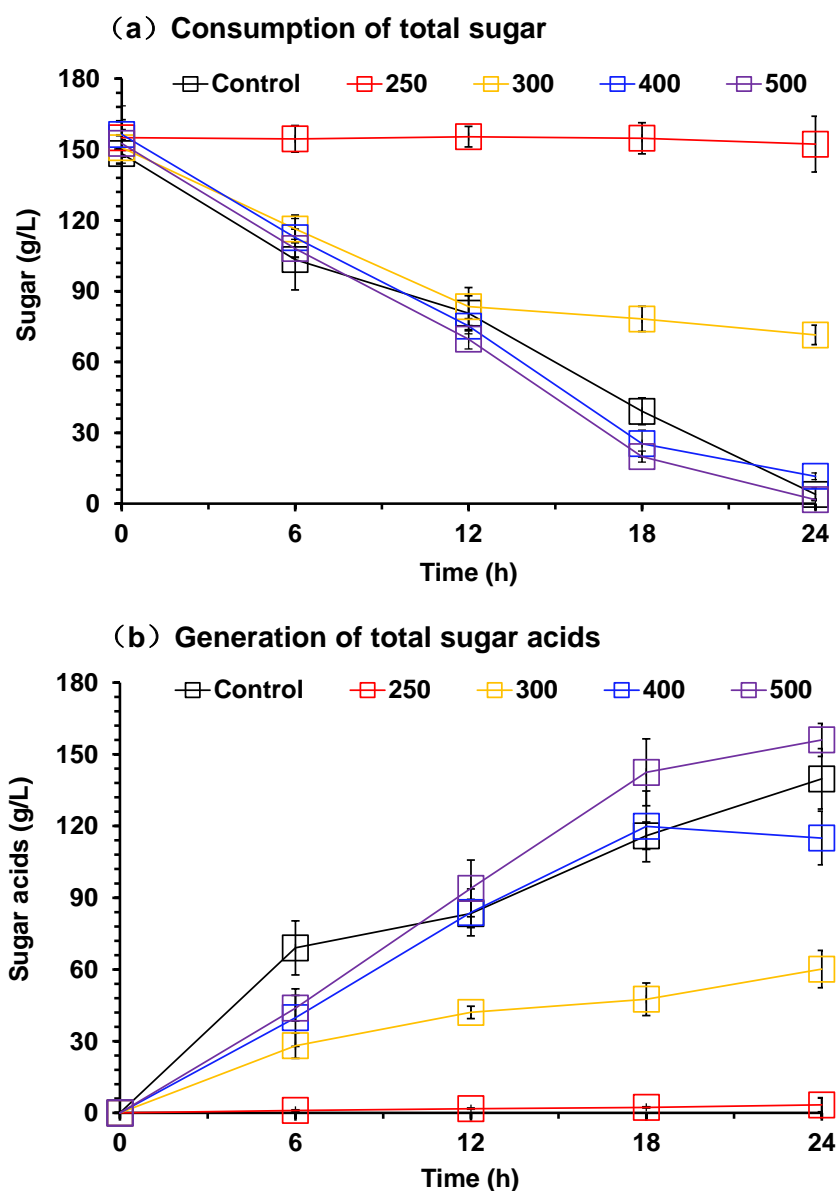


图 2.4 低转速及低通气量条件下的糖耗及糖酸生产情况

(a) 葡萄糖与木糖的消耗 (b) 葡萄糖酸与木糖酸的生成。发酵条件：30℃、0.1 vvm、250-500 rpm 及 pH5.5 条件下发酵 24 h

Fig. 2.4 Sugar and acid fermentation at low rotating speed and low ventilation (a) Consumption of total sugar (b) Generation of total sugar acids

在低转速下小幅度提高通气量对溶氧的影响较小，而在低通气量下提高转速对溶氧的影响较大，因此为了达到较好的发酵指标，我们在极低通气量 0.1 vvm 的条件下来探究发酵过程的最低参数。结果如图 2.4 所示。当转速在 300 rpm 以下时， 150.78 ± 3.31 g/L 的可发酵总糖在发酵 24 h 之后还剩下 71.48 ± 4.14 g/L，生成了 60.15 ± 7.82 g/L 的总糖酸。这样的结果与对照相比相差很多，无论是糖的消耗还是糖酸的生成，这表明 0.1 vvm 及 300 rpm 及以下的参数条件无法达到糖酸发酵的需求。而在 0.1 vvm、400 rpm 和 500 rpm

条件下糖酸发酵的结果均符合正常的发酵规律，这表明我们的溶氧水平已经可以满足需求，考虑到能耗的问题，最终选择 0.1 vvm、400 rpm 为在液态脱毒条件下糖酸发酵的最适转速及通气量。

2.3.4 本章小结

(1) 利用更换后的生物炼制顺序来进行糖酸发酵的效果符合常规的糖酸发酵，且对抑制物的脱除较为彻底及终点可监测，相比于常规生物炼制来说避免了可发酵糖的消耗，更利于提高糖酸产量。除此之外，对于好氧发酵来说，更换生物炼制顺序后也会降低发酵液的黏度，提高发酵时的溶氧，更利于好氧菌株的发酵。

(2) 通过对发酵时的氧气传质系数 k_{La} 的测定，进一步验证了更换生物炼制顺序对发酵时溶氧水平改善的帮助。通过对 k_{La} 进行测定，发现在更换生物炼制顺序后，较低的转速及通气量下依然可以获得较好的溶氧，这表明以往为了获得高溶氧而设置的高参数已经不再适用于全新的发酵。因此，我们做了不同转速及通气量条件下的发酵验证，最后发现能正常进行糖酸发酵且参数最低的条件为 0.1 vvm 通气量和 400 rpm 转速。后续的糖酸发酵实验也都采用全新的发酵参数。

本章主要对更换生物炼制顺序后的糖酸发酵进行了发酵验证，并对更换生物炼制顺序后的氧气传递速率进行了测定，证明了更换生物炼制顺序对溶氧的帮助。最后通过降低最低转速及通气量，节约了成本，降低了能耗。

第 3 章 高浓度产物对糖酸发酵过程的影响

3.1 引言

糖酸发酵过程中有许多影响糖酸发酵的因素。一方面,有研究表明,在利用葡萄糖氧化酶生产糖酸的发酵过程中会生成中间产物葡萄糖酸内酯及过氧化氢,反应过程比较简单,首先葡萄糖葡萄糖氧化酶的催化下生成葡萄糖酸内酯和过氧化氢,随后葡萄糖酸- δ -内酯可以自发或者在内酯水解酶的作用下水解开环生成葡萄糖酸。过氧化氢作为一种强氧化剂会对纤维素酶结构造成一定的破坏,从而抑制纤维素酶的活性,影响后续糖酸的发酵。另外,还有些文献也报道了高产物积累可能是发酵过程中影响产量的因素之一。在糖酸发酵过程中,糖酸盐的积累达到了很高的浓度,这可能会抑制纤维素酶及菌株活性。

为了了解过氧化氢在利用氧化葡萄糖酸杆菌产糖酸过程中的影响,对糖酸的发酵过程中的过氧化氢进行了浓度测定,发现发酵过程中的过氧化氢浓度非常低。通过对氧化葡萄糖酸杆菌中的代谢途径进行研究,发现氧化葡萄糖酸杆菌将葡萄糖转化为葡萄糖酸的过程中并没有过氧化氢的生成。为了进一步探究过氧化氢对纤维素酶的影响,我们探究了在糖化的过程中加入一定浓度的过氧化氢的影响,结果发现随着加入方式逐渐向真实发酵体系靠近时,其对纤维素酶的抑制越来越小,结果表明在真实发酵体系时过氧化氢的影响可能更小甚至没有。另外,在糖酸发酵过程中会生成大量的葡萄糖酸钠作为产物而积累,而这些高浓度的葡萄糖酸钠可能会对纤维素酶及菌株产生渗透压胁迫,因此我们又探究了产物抑制对糖酸发酵的影响,结果发现葡萄糖酸钠造成的渗透压胁迫对发酵的抑制较大。为了获得具有耐受高浓度葡萄糖酸钠的发酵菌株,我们采取了适应性进化的策略,并通过发酵验证及测定相关转运蛋白活性证明了适应性进化策略的可行性,为工业化纤维素糖酸生产提供了帮助。

3.2 材料与方法

3.2.1 原材料与酶

见 2.2.1

3.2.2 菌株及细胞培养

高钠浓度合成培养基: 30 g/L 葡萄糖、15g/L 木糖、20/80/120g/L 葡萄糖酸钠、0.5g/L 七水硫酸镁、1.5g/L 硫酸铵及磷酸二氢钾。

菌体生长的测定: 紫外可见分光光度计 (BIOMATE 3S, Thermo, Waltham, MA, USA) 在吸光度为 600 nm 处检测细胞生长,用超纯水稀释菌液 40 倍使 OD₆₀₀ 值在 0.3-1.0 范围内, 1 mL 超纯水作空白对照。

其余详见 2.2.2

3.2.3 过氧化氢的测定

过氧化氢采用过氧化氢试纸的方式测定。过氧化氢试纸上含有 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (TMB)。TMB 是过氧化物酶和乙型肝炎抗原的染色剂,是测定血液、检测血红素和过氧化物的灵敏和特定试剂。TMB 加在过氧化氢试纸上,当试纸触碰到含有过氧化氢的水溶液时, TMB 会被氧化成淡蓝色,浓度越高颜色越深,从而根据颜色深浅来快速检测过氧化氢浓度。

3.2.4 糖类及糖酸分析

详情见 2.2.4

3.2.5 菌体收集和实时荧光定量 PCR 实验

菌体的收集: 将 *G. oxydans* 培养在 50ml 总体系含有高浓度葡萄糖酸钠的合成培养基中, 12 h 后收集菌体离心并冻存储用。

荧光定量 PCR: 首先将冻存的菌体用研磨棒研磨成粉末状,之后用 TIANGEN DP419 总 RNA 提取试剂盒提取 RNA。最后用 ReverTra Ace qPCR-RT 试剂盒将 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 实验。

表 3.1 钠离子转运蛋白及葡萄糖脱氢酶相关基因 qRT-PCR 实验引物

Table 3.1 Sodium ion transport protein and glucose dehydrogenase related genes qRT-PCR experimental primers

Enzyme	Gene code	Forward primer sequence (5'-3')	Reverse primer sequence (5'-3')
Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	GOX0010	GTCACCTCGCATCACCAGAT	CCGCAATCAGCAGCAATGT
Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	GOX1377	GGTGGCGGGTATGAGTCTT	CGATCAGGTTCCAGAACACTAC
Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	GOX2268	CTGATGGCGGTCACGATCT	ACCACGAGCGATTCCCTTCAT
Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	GOX2369	CGTGCTGGGAATAGTGGTAATC	TGCCTGTTCGCTCCAATCA
Na ⁺ /H ⁺ Antiporter	GOX2370	CGAACAGGCAGGATCAGAAC	CCAGCAAGTGTCGGGTGTA
Na ⁺ -dependent transporter	GOX0682	AGACATTGTGCCAGATGGAGAA	CACGCTCGCCATTGAAGTC
glucose dehydrogenase	GOX0265	CCAATGAACGACGCAGGATT	AACACCAAGCCGCAGACT

3.3 结果与讨论

3.3.1 过氧化氢对糖酸发酵过程的影响

葡萄糖在被葡萄糖氧化酶催化时，会生成过氧化氢，这被认为是影响纤维素酶活性的原因之一。而在氧化葡萄糖酸杆菌中，催化葡萄糖生成葡萄糖酸的是葡萄糖脱氢酶，根据氧化葡萄糖酸杆菌的代谢路径图能够看到催化过程中并没有过氧化氢的生成。对于以氧化葡萄糖酸杆菌为发酵菌株的糖酸发酵而言，过氧化氢可能不会对纤维素酶及菌株产生负面影响。

为了验证我们的猜想，我们利用过氧化氢试纸检测了氧化葡萄糖酸杆菌生产糖酸过程中过氧化氢的含量，我们在摇瓶中进行糖酸发酵的第 0 h、12 h 及 24 h 时分别检测了一次过氧化氢含量，结果如图 3.1。由检测结果可知，在这三个时间段内的过氧化氢浓度生成的较低，这表明氧化葡萄糖酸杆菌在催化葡萄糖生成葡萄糖酸的过程中过氧化氢的生成途径较少。过氧化氢在发酵过程中极不稳定，可能会自行水解或者被搅拌分解，因此检测出的过氧化氢不能代表实际生成的过氧化氢含量。为了进一步排除过氧化氢的影响，我们在糖酸发酵时加入二氧化锰来去除过氧化氢以完全排除其影响。

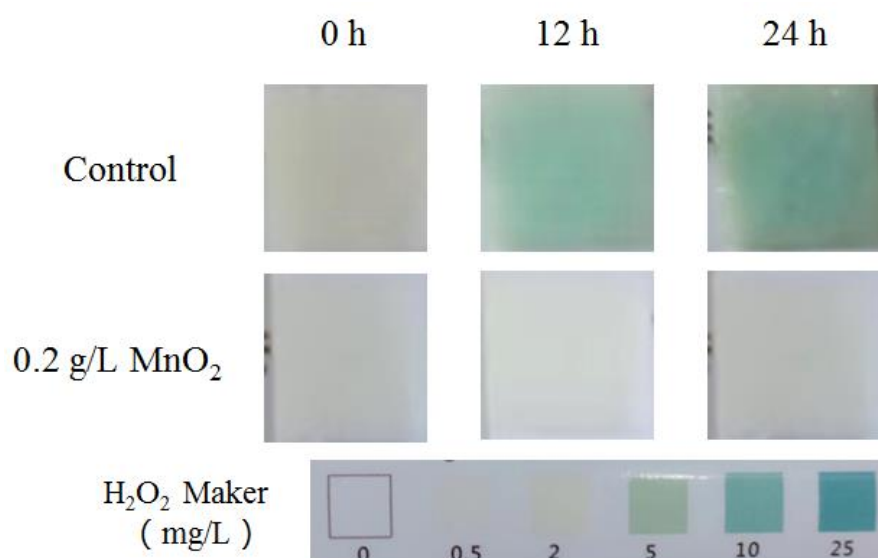


图 3.1 糖酸发酵 0 h、12 h 及 24 h 时加入与不加入二氧化锰时的过氧化氢含量

Fig. 3.1 H₂O₂ content with and without MnO₂ during sugar acid fermentation at 0, 12, and 24 hours

为了确定加入发酵时的二氧化锰的量，首先需要确定二氧化锰对菌株的影响。我们在 50 ml 合成培养基的体系下进行糖酸发酵时分别加入了 10 mg、100 mg 及 500 mg 的二氧化锰。其对发酵的影响可由图 3.2 看出。当添加 10 mg 二氧化锰时，糖酸的生成及 OD₆₀₀ 的变化与对照相比基本没有差别。而当二氧化锰的量增加至 100 mg 甚至 500 mg 时，其糖酸产量及 OD₆₀₀ 都出现了明显的下降，这表明二氧化锰的量太大影响到了菌株的活性。根据《中华人民共和国轻工行业标准 QB/T 4484-2013》中对除食品和医药用途

的葡萄糖酸钠的重金属含量要求为小于等于 10 mg/kg，这是相当低的一个含量，二氧化锰用量应尽量低。因此我们认为后续的去除了过氧化氢实验二氧化锰用量选择 10 mg/50 ml 即 0.2 g/L 的二氧化锰用量。

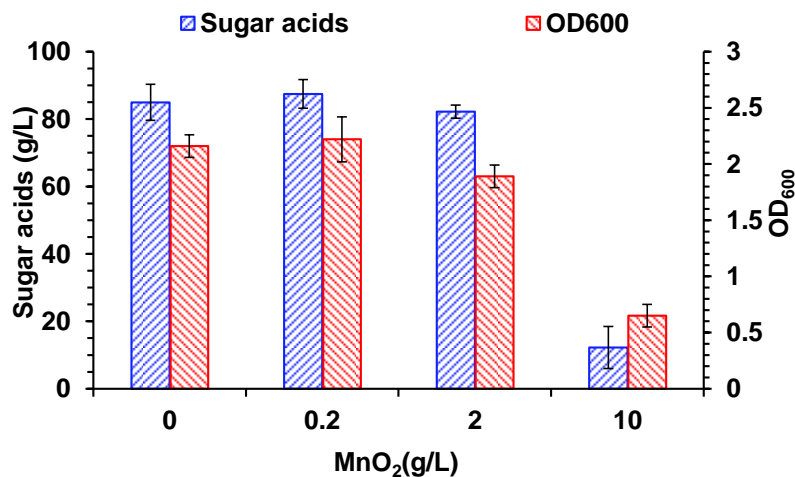


图 3.2 不同浓度二氧化锰对菌株活性及发酵性能的影响

Fig. 3.2 The effect of different concentrations of MnO₂ on the activity and fermentation performance of strains

确定了二氧化锰加入量后，首先在 25% (v/v) 固含量玉米秸秆摇瓶中进行发酵实验，结果发现加入二氧化锰后最终的糖酸产量并没有很明显的差别，这表明二氧化锰去除过氧化氢后并没有有效改善糖酸的发酵情况。我们认为造成这样的原因可能是在摇瓶中无法准确调控 pH，发酵菌株无法一直处在一个合适的 pH 范围内就会导致其发酵的性能受到抑制。此时，影响糖酸发酵性能提升的主要因素就变成了 pH 而不是极低浓度的过氧化氢。这个原因可能是导致加入二氧化锰后效果不显著的主要原因。

为了排除 pH 对发酵菌株的影响，在 3 L 罐中探究了加入二氧化锰对糖酸发酵的影响。其余的操作与正常的液态脱毒糖酸发酵操作一致，液态脱毒结束后发酵前加入 0.2 g/L 的二氧化锰。最终的结果如图 3.3 所示，加入二氧化锰后的发酵结果仍然没有差别，这与摇瓶中的结果一致。在排除了 pH 的因素之后，在罐上仍然出现了同样的结果，因此必须思考其它的原因。在查阅文献后，我们认为造成这样的原因最有可能的就是过氧化氢本身对纤维素酶及菌株的影响可能并没有想象中的那么大。在氧化葡萄糖酸杆菌中并没有过氧化氢的生成，因此去研究过氧化氢对氧化葡萄糖酸杆菌的影响并没有实际的意义。但无论是氧化葡萄糖酸杆菌还是黑曲霉，其中都有纤维素酶在发挥作用，实现同步糖化共发酵最重要的也就是纤维素酶活性的大小。为了进一步探究过氧化氢在发酵过程中的作用，探究过氧化氢对纤维素酶的影响是必要的。众所周知，在利用黑曲霉生产葡萄糖酸的过程中是有过氧化氢生成的，文献中也报道了生成的过氧化氢对纤维素酶的影响，但具体影响程度研究的相对较少。

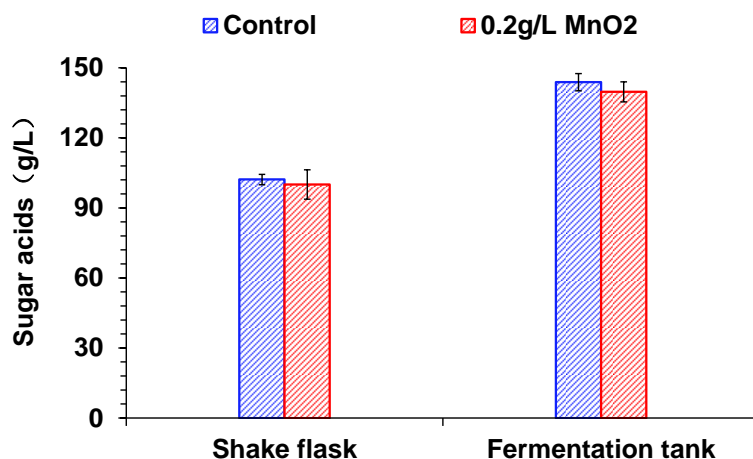


图 3.3 添加二氧化锰对高固含量玉米秸秆摇瓶及上罐糖酸发酵的影响

Fig. 3.3 Effect of adding MnO₂ on high solid content shake flask and fermentation tank sugar acid fermentation

尽管过氧化氢在利用氧化葡萄糖酸杆菌的糖酸发酵中生成的较少，但为了进一步明确过氧化氢在所有糖酸发酵的过程中的影响，以木质纤维素为原料，在摇瓶中探究添加过氧化氢对纤维素酶的影响。操作是经过干式稀酸预处理后的 25% (v/v) 固含量玉米秸秆在 50℃ 条件下进行糖化。过氧化氢的加入量按照葡萄糖氧化酶催化葡萄糖生成 10 0g/L 葡萄糖酸时的过氧化氢生成量加入，过氧化氢浓度为 35% (v/v)，分别每隔 4 h、2 h、1 h 及 0.5 h 加一次过氧化氢，12 h 后糖化结束 (图 3.4)。

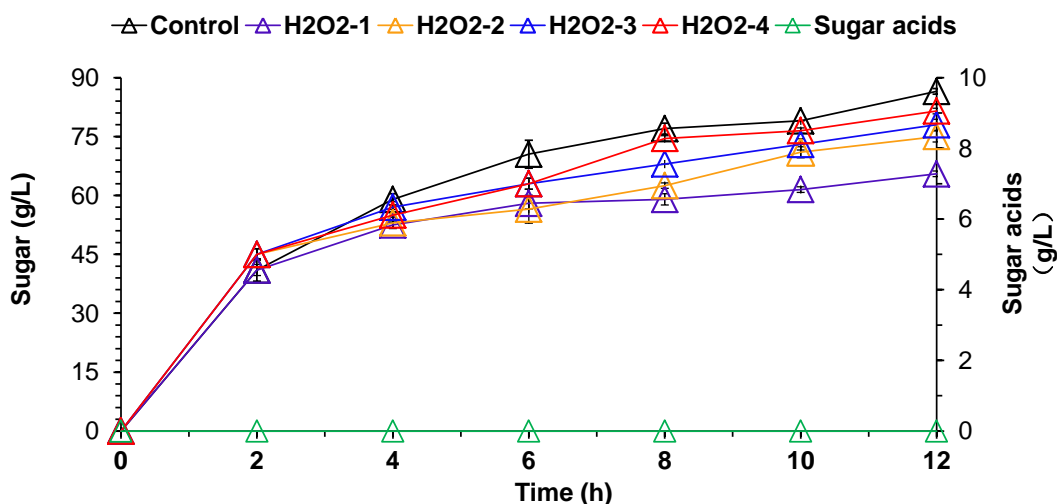


图 3.4 不同的过氧化氢加入方式对糖化的影响

H₂O₂-1: 在 12h 糖化的过程中每 4 个小时加入一次过氧化氢; H₂O₂-2: 在 12 h 糖化的过程中每 2 小时加入一次过氧化氢; H₂O₂-3: 在 12 h 糖化的过程中每 1 小时加入一次过氧化氢; H₂O₂-4: 在 12 h 糖化的过程中每 0.5 小时加入一次过氧化氢。对照为不加入过氧化氢。

Fig. 3.4 Effect of different ways of adding hydrogen peroxide on saccharification

H₂O₂-1: add H₂O₂ every 4 hours during the 12h saccharification process; H₂O₂-2: add H₂O₂ every 2 hours during the

12h saccharification process; H₂O₂-3: add H₂O₂ every 1 hour during 12h saccharification; H₂O₂-4: H₂O₂ is added every 0.5 hour during 12 h saccharification. Blank means no H₂O₂.

根据结果可以得出, 当每隔 4 h 加入一次过氧化氢时对纤维素酶的抑制程度最大, 糖化 12 h 生成了 65.50±0.71 g/L 的可发酵糖, 与对照 (86.50±0.71 g/L) 相比出现了明显了产量下降。每隔 2h 加入一次过氧化氢时, 其 12 h 糖化生成的可发酵糖为 75.00±1.41 g/L, 抑制程度有所缓解。到了每隔 1 h 及 0.5 h 加入一次过氧化氢时, 其 12 h 糖化生成的可发酵糖为 78.00±1.41 g/L 及 81.50±0.71 g/L, 也就是抑制程度随着过氧化氢加入间隔的缩短即越来越接近真实发酵体系时的过氧化氢生产量时, 过氧化氢对纤维素酶的抑制越来越小。因此, 根据实验结果, 我们认为即使在发酵过程中有过氧化氢的生成, 过氧化氢也不是影响糖酸同步糖化共发酵的主要因素。在样品中并未检测出葡萄糖酸的生成, 因此可以排除由于过氧化氢催化葡萄糖生成葡萄糖酸而导致的葡萄糖浓度的下降。因此, 无论是在黑曲霉还是氧化葡萄糖酸杆菌生产糖酸的过程中, 过氧化氢都不是影响发酵的主要因素。这也解释了为什么之前的摇瓶及上罐发酵实验中为何加入二氧化锰后并没有很明显的产量差别。过氧化氢在之前的很多研究中都认为是影响糖酸产量提升的一个因素, 有些工作者为了降低它的影响而加入了过氧化氢酶, 但最终的结果也并没有很大的提升。通过本研究, 证实了在氧化葡萄糖酸杆菌中只有极低含量的过氧化氢生成, 且就算是较高浓度的过氧化氢, 其对纤维素酶的影响也非常小, 基本不会影响糖酸发酵。

3.3.2 葡萄糖酸钠对糖酸发酵过程的影响

前面的研究证实了过氧化氢对糖酸发酵过程的影响非常小, 基本可以忽略。纤维素糖酸发酵过程中, 还会有高浓度的葡萄糖酸盐会积累。因此, 这部分内容主要探究葡萄糖酸钠对糖酸发酵过程的影响。在许多发酵尤其是在产酸发酵过程中, 加入中和剂所导致的渗透压胁迫是影响产量提升的重要问题。高浓度产品的积累会对菌株尤其是关键酶的活性造成一定程度的抑制。对于纤维素糖酸的生产, 为了维持菌株所适应的 pH 范围, 需要加入碱来调节 pH, 这会导致浓度很高的金属阳离子的积累, 会对菌株及纤维素酶造成一定的抑制作用。考虑到糖酸发酵过程中会生成大量的葡萄糖酸钠及木糖酸钠, 这可能会导致菌株及纤维素酶活性下降, 从而影响最后的产量。因此, 有必要去研究高浓度产品积累对发酵的影响。为了探究高浓度葡萄糖酸钠对纤维素酶及菌株的影响, 我们在摇瓶中加入了各种葡萄糖酸盐及钠盐 (图 3.5), 目的是为了探究葡萄糖酸钠对菌株及纤维素酶是否有抑制, 且抑制作用主要是由葡萄糖酸根离子引起的还是钠离子引起的, 得出结论后便于改善发酵的环境, 提高发酵的效果。

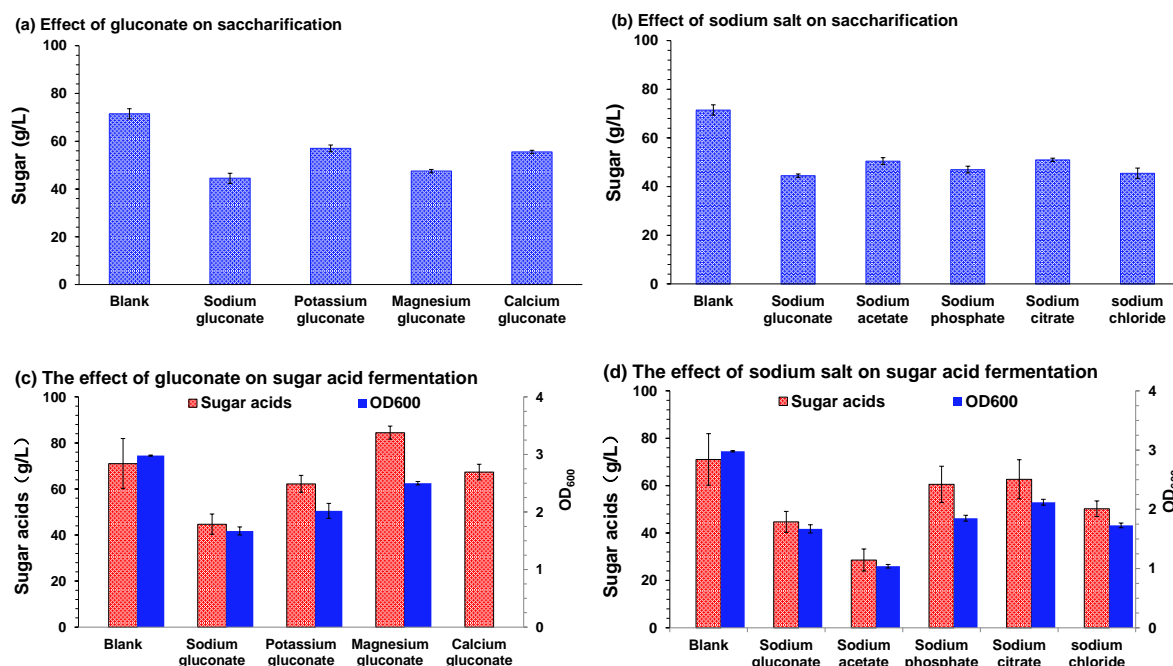


图 3.5 不同葡萄糖酸盐及钠盐对糖化及糖酸发酵过程的影响

(a) 葡萄糖酸盐对糖化的影响；(b) 钠盐对糖化的影响；(c) 葡萄糖酸盐对糖酸发酵的影响；(d) 钠盐对糖酸发酵的影响。葡萄糖酸盐加入的量为 100 g/L。钠盐加入的量（保证钠离子浓度一致）分别为：乙酸钠 35.71g/L、柠檬酸钠 37.04g/L、碳酸钠 23.26g/L 及乳酸钠 50g/L。

Fig. 3.5 Effect of different gluconate and sodium salt on saccharification and saccharification fermentation

(a) Effect of gluconate on saccharification; (b) Effect of sodium salt on saccharification ; (c) The effect of gluconate on saccharin-acid fermentation; (d) The effect of sodium salt on saccharin-acid fermentation

在摇瓶中测试了不同葡萄糖酸盐（图 3.5 a、c）及钠盐（图 3.5 b、d）对糖化及糖酸发酵时的影响。糖化时，不同的葡萄糖酸盐有不同的抑制效果，其中在糖化时加入葡萄糖酸钠及葡萄糖酸钾时生成的总糖分别为 44.50 ± 2.12 g/L 及 57.00 ± 1.41 g/L。数据表明葡萄糖酸钠抑制程度最高，葡萄糖酸钾抑制程度最低。葡萄糖酸根离子浓度保持一致，不同的阳离子有不同的抑制效果，表明葡萄糖酸钠中钠离子对糖酸发酵有一定的抑制作用。发酵时，不同的钠盐也有不同的抑制效果，但不同的钠盐抑制程度的差别比较小，葡萄糖酸钠仍然是抑制程度最高的。这表明葡萄糖酸钠中葡萄糖酸根离子与钠离子都对糖酸发酵有抑制作用，且钠离子抑制程度更高。通过实验我们可以得出：在糖酸发酵的过程中积累的大量葡萄糖酸钠会对纤维素酶及菌株产生一定的抑制作用，其中钠离子的抑制程度要更高些。

3.3.3 *G. oxydans* 在高浓度葡萄糖酸钠条件下的适应性进化及验证实验

微生物最有趣的特征之一是它们能够迅速适应不同的环境条件。通过对微生物中这

种适应性反应的详细研究，其适应的机制和原则正在逐渐被揭开。适应性实验室进化（ALE）被用于深入了解适应的遗传基础和动态，以及研究细菌种群的进化。此外，在工业环境中，ALE 也已成为生物技术应用、提高产量和降低成本的广泛使用工具。

微生物适应性进化一个比较重要的考虑因素是高浓度的底物或产品所带来的抑制作用，因此，设计合适的适应性进化实验是很重要的。AtSumi 等人^[132]成功地应用 ALE 方法培育了一株耐异丁醇的大肠杆菌菌株。经过 45 次连续转移后，对进化菌株在不同异丁醇浓度下的生长进行了评估，最终结果表明大肠杆菌对异丁醇的耐受性增加了 100%。酿酒酵母对酒精耐受性的适应也被证明是有用的^[133]。发酵液中高浓度的乙醇会导致细胞壁不稳定和细胞溶解^[134]。酵母菌株对培养基中高乙醇含量的适应将乙醇耐受性提高到 8%(v/v)，并表明细胞壁的成分发生了重排。高浓度的有机酸，特别是醋酸、乳酸和琥珀酸对酵母菌和大肠杆菌的生长也有抑制作用。通过 9 个月的适应性进化来开发一种高度耐受的大肠杆菌菌株，在培养基中存在近 40 mM 的琥珀酸，该菌株也能够快速生长^[135]。这种进化的菌株随后被用于工业规模的琥珀酸生产，并能够在连续发酵过程中生产并保持显著较高的琥珀酸效价。与在高琥珀酸浓度下生长的未进化菌株相比，该菌株的生长速度也高出 13 倍。这些例子清楚地表明，ALE 可以用来提高对高浓度底物或产物的胁迫耐受性。

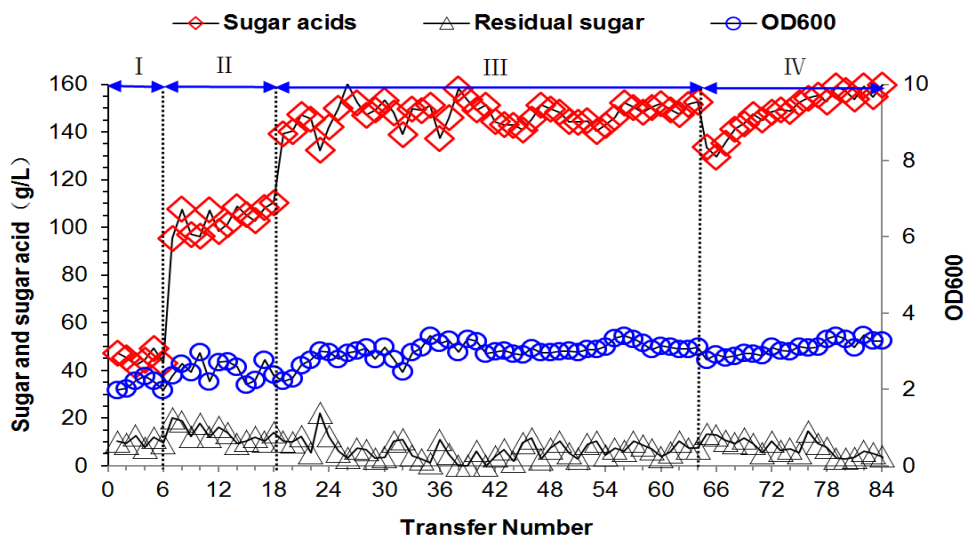


图 3.6 *G. oxydans* DSM 2003 在含有高浓度葡萄糖酸钠合成培养基中的适应性进化情况

I: 20 g/L 葡萄糖酸钠; II: 80 g/L 葡萄糖酸钠; III: 120 g/L 葡萄糖酸钠; IV: 由于疫情, 适应性进化暂停了一段时间造成了产量的下降。

Fig. 3.6 Domestication of *G. oxydans* DSM 2003 in synthetic medium containing high concentration of sodium gluconate.

I: 20 g/L sodium gluconate; II: 80 g/L sodium gluconate; III: 120 g/L sodium gluconate; IV: Due to the epidemic, adaptive evolution has been suspended for a period of time, resulting in a decrease in production.

为了降低高浓度葡萄糖酸钠对菌株的影响, 采用生物适应性进化的方法提高氧化葡萄糖酸杆菌对钠离子的耐受性 (图 3.6)。首先在含有 20 g/L 葡萄糖酸钠的合成培养基中适应性进化发酵菌株, 适应性进化至残糖在 10 g/L 以内, 稳定后提高葡萄糖酸钠浓度至 80 g/L, 继续适应性进化至残糖在 10 g/L 以内后, 提高葡萄糖酸钠浓度至 120 g/L。在 120 g/L 的高浓度钠离子条件下一直适应性进化, 直至生成的糖酸及残糖达到理想且稳定的状态后对发酵菌株进行进一步验证。

适应性进化结束后对发酵菌株进行实时荧光定量 PCR 验证。将适应性进化菌株及出发菌株培养在含有 120 g/L 葡萄糖酸钠浓度的合成培养基中, 培养 12 h 后收集菌体。提取菌体的 RNA 并反转录成 cDNA 后在 qPCR 仪上测定活性。相关钠离子转运蛋白基因是在氧化葡萄糖酸杆菌的全基因组上寻找到的有明确注释的。*GOX0010*、*GOX1377*、*GOX2268*、*GOX236* 及 *GOX2370* 均为 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白; *GOX0682* 为 Na^+ 依赖性转运蛋白; *GOX0265* 为葡萄糖脱氢酶。结果如图 3.7。

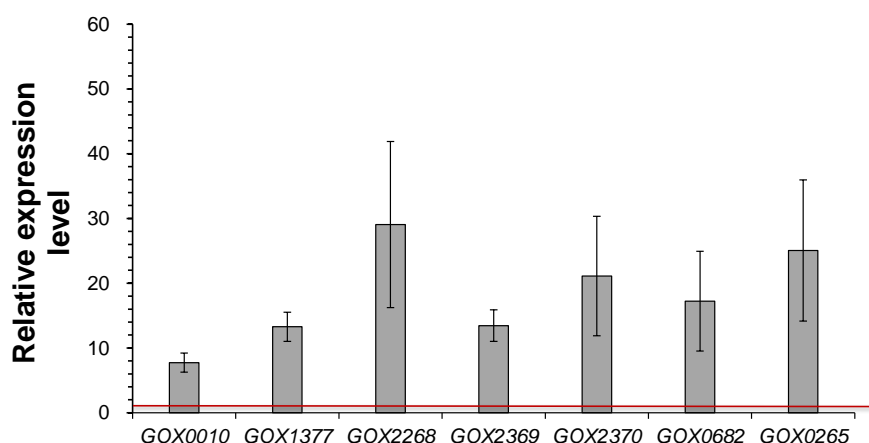


图 3.7 氧化葡萄糖酸杆菌中钠离子转运蛋白相关基因的转录水平分析

GOX0010、*GOX1377*、*GOX2268*、*GOX2369*、*GOX2370* 均为 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白; *GOX0682* 为 Na^+ 依赖性转运蛋白; *GOX0265* 为 PQQ 依赖性葡萄糖脱氢酶

Fig. 3.7 Transcription level analysis of sodium ion transporter related genes in *G. oxydans*

GOX0010, *GOX1377*, *GOX2268*, *GOX2369*, and *GOX2370* are all Na^+/H^+ transporters; *GOX0682* is a Na^+ dependent transporter protein; *GOX0265* is a PQQ-dependent glucose dehydrogenase

根据 qPCR 结果, 进化菌株中 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白活性相比出发菌株均得到了很大的提高, 其分别提高了 9 倍、15 倍、41 倍、22 倍及 30 倍。这表明发酵菌株在高钠条件下的适应性进化的效果是很显著的, 钠离子转运蛋白将钠离子泵出胞内, 从而保证发酵菌株避免高渗透压的胁迫。钠离子依赖性的蛋白及葡萄糖脱氢酶活性也得到了一定程度的提高, 分别提高了 24 倍及 35 倍。进化菌株活性的提高可能是葡萄糖脱氢酶及钠离子依赖性转运蛋白活性提高的原因。相比于出发菌株, 进化菌株体内的各个蛋白活性均

得到了一定的提高，这表明在高钠条件下进行适应性进化是有效果的。为了进一步验证进化菌株提高的效果，下一步将在木质纤维素体系及合成培养基中进行糖酸发酵实验，实验结果如图 3.8 及 3.9 所示。

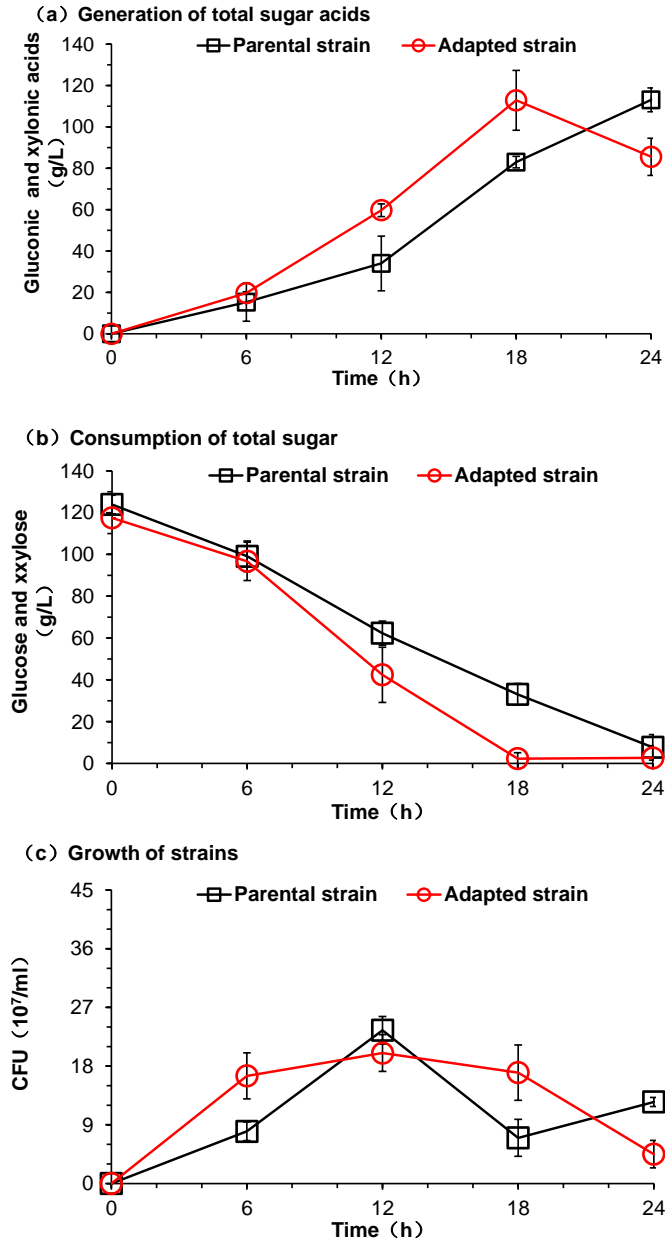


图 3.8 木质纤维素体系下进化菌株发酵验证

(a) 糖酸生成情况 (b) 糖消耗情况 (c) 菌株生长情况。30%固含量玉米秸秆在 30℃、pH5.5、0.1 vvm 及 400 rpm 的 3 L 罐中发酵 24 h，每 6 h 取样分析并涂部在固体培养基中，放置在 30℃ 培养箱中 24 h 后进行菌落计数

Fig. 3.7 Validation of Evolutionary Strain Fermentation in the Lignocellulose System

(a) Sugar and acid production (b) Sugar consumption (c) Strain growth. 30% solid content corn straw is fermented for 24 hours in a 3L tank at 30 °C, pH 5.5, 0.1vvm, and 400rpm. Samples are taken and analyzed every 6 hours, and the part is coated in solid culture medium. After 24 hours in a 30°C incubator,

colony counting is performed.

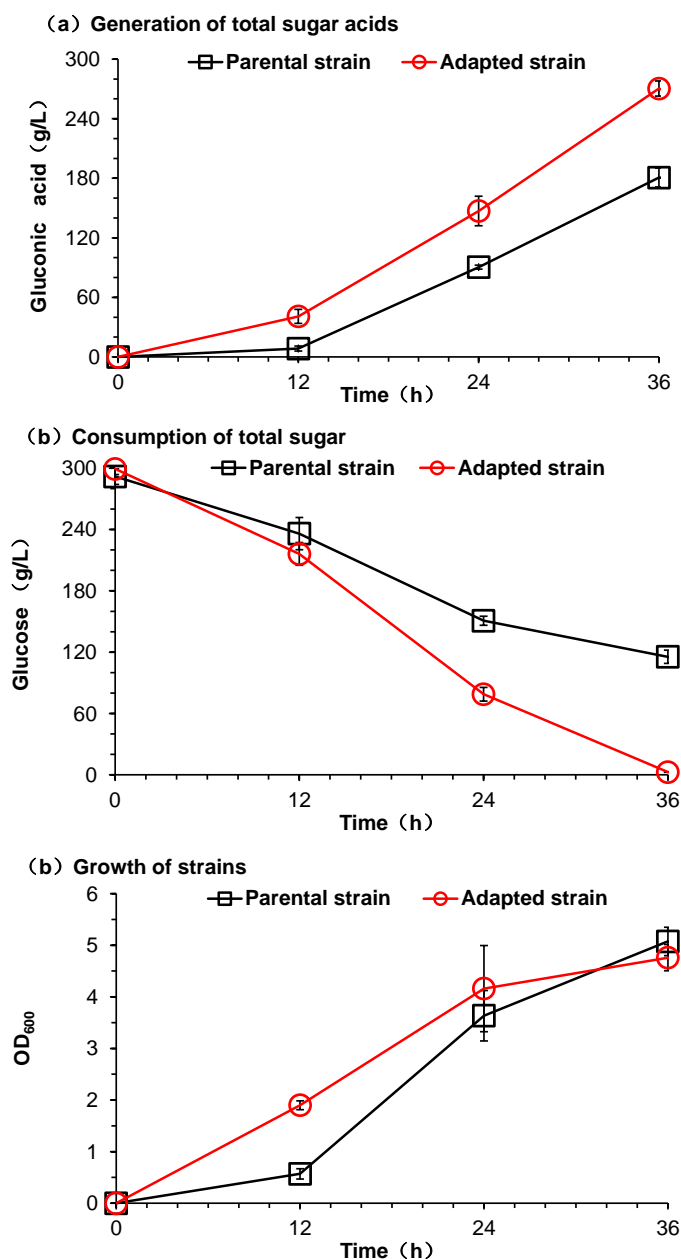


图 3.9 高浓度葡萄糖合成培养基中进化菌株发酵验证

(a) 糖酸生成情况 (b) 糖消耗情况 (c) 菌株生长情况。在 30℃、pH 5.5、0.1 vvm 及 400 rpm 的 3 L 罐中发酵 36 h，每 12 h 取样分析。

Fig. 3.7 Validation of Evolutionary Strain Fermentation in High Concentration Glucose Synthesis Medium

(a) Sugar and acid production (b) Sugar consumption (c) Strain growth. Fermentation at 30 °C, pH 5.5, 0.1 vvm, and 400 rpm in a 3 L tank for 36 hours, and sampling analysis every 12 hours.

首先在木质纤维素体系下进行进化菌株的发酵验证。结果表明，接入进化菌株后，18 h 葡萄糖及木糖均已消耗完全，117.53 g/L 的总糖生成了 112.86 g/L 的总糖酸。而出发菌株则是在 24 h 时才将可发酵糖消耗完全，123.91 g/L 的总糖生成了 113.06 g/L 的总

糖酸。相比于出发菌株, 进化菌株的发酵时间更短, 利用可发酵糖的速率更快。通过对菌株菌落形成单位的检测, 发现进化菌株在 6-18 h 内的菌株活性要比出发菌株更加稳定, 这表明进化菌株在高钠环境下的适应性要强于出发菌株。但由于在木质纤维素体系下, 可发酵糖的量无法达到更高的浓度, 所产生的高钠环境并没有对菌株造成更大的胁迫, 最终的效果并不是特别明显。为了进一步凸显出进化菌株对高钠环境下的适应能力, 提高发酵效果, 将进化菌株在含有高葡萄糖浓度的合成培养基中进行发酵实验。

下一步在含有高浓度葡萄糖的合成培养基中进行发酵验证。结果表明, 进化菌株在发酵 36 h 时将 299.26 g/L 的葡萄糖完全消耗生成了 270.38 g/L 的葡萄糖酸。而出发菌株在发酵 36 h 时还剩下 115.50 g/L 的葡萄糖, 只生成了 180.72 g/L 的葡萄糖酸。这表明出发菌株在含有高钠环境下的合成培养基中发酵效果要明显优于出发菌株。根据菌株 OD_{600} 的值来看, 进化菌株的活性一直要优于出发菌株。木质纤维素体系及合成培养基条件下进行的适应性进化实验结果表明, 进化菌株在高钠条件下的活性及发酵性能均优于出发菌株, 进化菌株对高钠的适应性进化有比较明显的提升。

3.3.4 本章小结

(1) 本文发现在氧化葡萄糖酸杆菌的膜结合型葡萄糖氧化呼吸链中并没有过氧化氢的生成, 并通过在糖酸发酵时利用过氧化氢试纸也只检测到极低浓度的过氧化氢, 这表明在氧化葡萄糖酸杆菌生产糖酸的过程中过氧化氢的生成途径较少。为了进一步了解过氧化氢在糖酸发酵过程中的作用, 在糖化时加入真实体系下生成的过氧化氢的量, 通过不同加入方式来确定其对纤维素酶的抑制。结果发现, 即便加入了一定浓度的过氧化氢, 其对纤维素酶的影响也非常小, 并没有对糖化的效果产生很大的影响。因此认为, 过氧化氢在糖酸发酵的过程中并不是一个主要的限制因素。

(2) 在糖酸发酵的过程中会积累高浓度的葡萄糖酸钠, 高浓度钠盐的积累很有可能会对菌株及纤维素酶产生一定的抑制, 从而影响最终的发酵结果。为了探究葡萄糖酸钠对菌株及纤维素酶的影响, 在发酵及糖化时加入了不同的葡萄糖酸盐及钠盐, 最终发现葡萄糖酸钠相比于其它葡萄糖酸盐及钠盐, 其抑制程度都比较高, 这也验证了我们的猜想。同时也发现, 不同葡萄糖酸盐的抑制波动相较于钠盐的波动要大, 这表明阳离子的抑制程度要高于阴离子的抑制程度。葡萄糖酸钠对菌株及纤维素酶的抑制, 主要是钠离子的抑制作用导致的。

(3) 为了降低高浓度钠离子对菌株的抑制, 使发酵菌株氧化葡萄糖酸杆菌在含有高浓度钠离子的合成培养基中进行适应性进化。适应性进化过程中不断提高钠离子的浓度, 最终在较高的钠离子浓度下适应性进化至稳定。将适应性进化后的菌株在 30% (v/v) 固含量的玉米秸秆及超高葡萄糖浓度的合成培养基中进行发酵验证, 证明了适应性进化菌株的效果。同时, 通过对发酵菌株进行实时荧光定量 PCR 测定, 发现了在菌株中钠离子转运蛋白及葡萄糖脱氢酶活性的提高, 从而在分子层面证明了适应性进化的效果。

本章节主要对影响糖酸发酵的一些产物的抑制情况做了探究。发现了氧化葡萄糖酸杆菌中并没有过氧化氢的生成，且过氧化氢也并不会对纤维素酶产生很大的抑制作用。此外也探究了产物葡萄糖酸钠的积累对发酵菌株及纤维素酶的影响，发现葡萄糖酸钠中钠离子有很强的抑制作用，通过适应性进化的方式，提高发酵菌株对高浓度钠离子的耐受性，改善了发酵的效果。

第 4 章 低 pH 对糖酸发酵过程中酮基葡萄糖酸生成的影响

4.1 引言

氧化葡萄糖酸杆菌利用葡萄糖生成葡萄糖酸时，其还会进一步氧化成酮基葡萄糖酸^[129]。尽管酮基葡萄糖酸具有许多应用价值，但仍具有缺陷。作为将葡萄糖酸钠作为水泥缓凝剂为目的的糖酸发酵而言，酮基葡萄糖酸是不希望生成的产物，需要尽可能减少酮基葡萄糖酸的生成。前文提及有许多方法被开发出来以如何抑制酮基葡萄糖酸生成^[139-141]，但最后取得的效果并不好。因此需要一种更加高效的抑制酮基葡萄糖酸的方法。

有研究表明葡萄糖酸脱氢酶对 pH 比较敏感，其活性在较低的 pH 下会降低甚至是失活^[142]，而葡萄糖酸脱氢酶主要就是将葡萄糖酸转化为酮基葡萄糖酸的关键酶，因此低 pH 可能是避免酮基葡萄糖酸生成的较好的方法。在低 pH 条件下进行液态脱毒糖酸发酵，发现酮基葡萄糖酸在较低的 pH 下几乎不生成。之后在不同 pH 条件下对发酵液进行静置来探究酮基葡萄糖酸的抑制是否稳定，这对于水泥缓凝剂的储存来说相当重要。另一方面，随着 pH 的降低，在酮基葡萄糖酸生成受到抑制的同时，木糖的利用速率下降，可能是低 pH 条件抑制了发酵菌株对木糖的利用。通过采取发酵菌株在低 pH 条件下适应性进化的方式来解决低 pH 条件下木糖利用速率低的问题，最终实现糖酸产量的提高。

4.2 材料与方法

4.2.1 原材料与酶

详情见 2.2.1

4.2.2 菌株及细胞培养

详情见 2.2.2

4.2.3 发酵液短期及长期静置方法

玉米秸秆水解液发酵 24 h 后取出，一部分取 20 ml 至 50 ml 离心管中常温放置，并将 pH 调至 2.5、3.5、4.5、5.5 及 6.5，一式两份；一部分用真空抽滤机抽滤，抽滤后的液体取 20 ml 至 50 ml 离心管中并将 pH 分别调至 2.5、3.5、4.5、5.5 及 6.5，一式两份；发酵液用离心机在 9000 rpm 转速下离心 10 min 以去除菌株，离心后取上清 20 ml 至 50 ml 离心管中并将 pH 分别调至 2.5、3.5、4.5、5.5 及 6.5，一式两份。发酵液短期静置时需放置 3 天，每 12 h 取一次样并分析糖酸的结果。短期放置时，抽滤与离心可能看不出差距，所以短期静置只选择了常温静置与离心静置。发酵液长期放置时需放置 30 天，每 5 天取一次样并分析糖酸的结果。

4.2.4 糖类及糖酸分析

由于并未购买酮基葡萄糖酸的标准品，以葡萄糖酸下降的浓度作为酮基葡萄糖酸浓

度。其余详情见 2.2.4。

4.3 结果与讨论

4.3.1 低 pH 上罐糖酸发酵验证

氧化葡萄糖酸杆菌将葡萄糖氧化成葡萄糖酸后还会进一步将其氧化成酮基葡萄糖酸。酮基葡萄糖酸盐在水泥缓凝剂上的效果相较于葡萄糖盐来说要差很多。这对于以水泥缓凝剂为目标的葡萄糖酸发酵来说，酮基葡萄糖酸是不希望得到的产物。根据 Xu 等人^[142]的研究，低 pH 可以有效抑制酮基葡萄糖酸的生成，因其在较低的 pH 下，葡萄糖酸脱氢酶活性会受到很大的抑制，从而抑制了葡萄糖酸向酮基葡萄糖酸的转化。

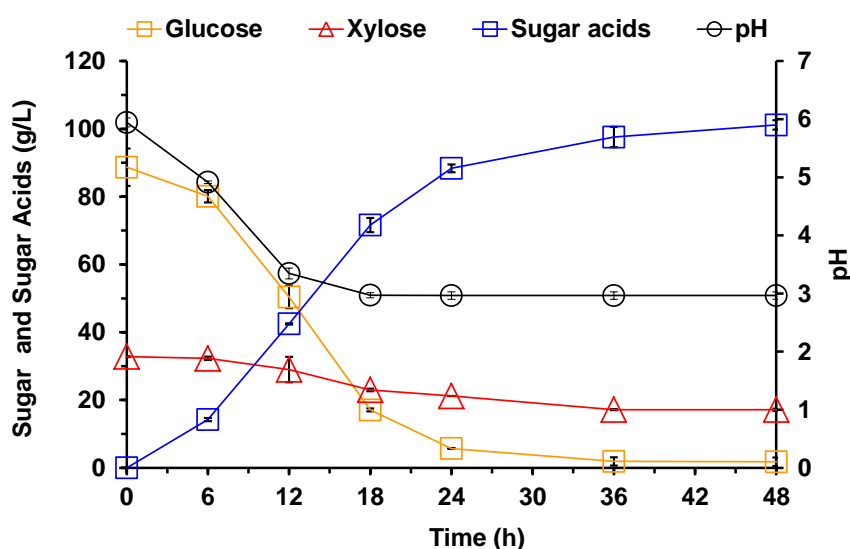


图 4.1 氧化葡萄糖酸杆菌低 pH 条件下的糖酸发酵情况

玉米秸秆固含量为 30% (v/v)，发酵温度为 30℃，通气量 0.1 vvm 转速 400 rpm，在 3 L 罐中进行，pH 自然下降

Fig. 4.1 Sugar acid fermentation at low pH in *G. oxydans*

The solid content of corn straw is 30% (v/v), the fermentation temperature is 30 °C, the ventilation rate is 0.1 vvm, and the speed is 400 rpm. It is carried out in a 3 L tank, and the pH naturally decreases

为了验证低 pH 条件下酮基葡萄糖酸的生成确实会受到抑制，本研究在 30% (v/v) 固含量的玉米秸秆中进行低 pH 糖酸发酵实验 (图 4.1)。121.50±5.64 g/L 总糖发酵 48h 共生成 101.16±1.37 g/L 总糖酸，剩余木糖 17.15±0.30 g/L，发酵数据表明在低 pH 糖酸发酵过程中几乎没有酮基葡萄糖酸的生成。但在发酵时发现木糖的利用效率降低了很多，这与常规糖酸发酵结果不同，这可能是因为在低 pH 条件下木糖脱氢酶的活性受到了比较大的抑制。因此，虽然在低 pH 条件下确实能够抑制酮基葡萄糖酸的生成，但木糖酸的生成也会受到抑制，从而影响到整体糖酸的产量。为了提高在低 pH 条件下的木糖利用效率，在木糖较多的低 pH 合成培养基的环境下适应性进化菌株，从而提高低 pH 条

件下的木糖利用效率。

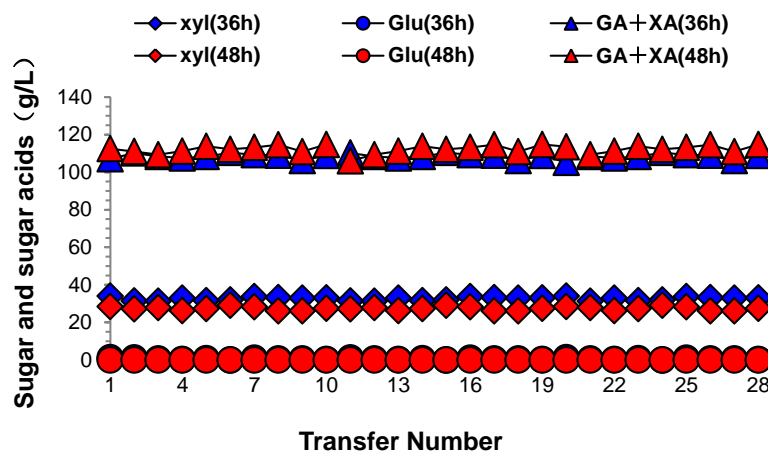


图 4.2 氧化葡萄糖酸杆菌低 pH 条件下的适应性进化情况

进化在 20 ml 总体系的合成培养基中进行。培养条件：30℃、200 rpm、pH 自然下降，培养 48 h 后 pH 大约在 2.8。在 36 h 及 48 h 时取样分析。

Fig. 4.2 Adaptive evolution of *G. oxydans* under low pH conditions

Evolution was carried out in a synthetic medium of a 20 ml total system. Culture conditions: 30 °C, 200 rpm, pH naturally decreasing, cultured for 48 hs. After 48 h of cultivation, the pH is approximately 2.8. Take samples for analysis at 36 h and 48 h.

将发酵菌株置于合成培养基中进行适应性进化，主要目的是使菌株在低 pH 条件下能够有效利用木糖。培养 36h 会后葡萄糖基本消耗完全，此时开始检测木糖的浓度，并在 12h 之后再测定一次木糖浓度，观察是否有木糖消耗。进化结果如图 4.2 所示，进化了 28 代，每一代 36h 的木糖浓度与 48h 的木糖浓度都几乎相当，表明在低 pH 下菌株对于木糖的利用几乎没有提高。菌株在低 pH 条件下的进化相比其它恶劣条件下的进化来说似乎要更加困难，菌株对于低 pH 的适应性进化可能需要进一步的研究。

4.3.2 发酵液在不同条件下短期静置时酮基葡萄糖酸的生成情况

为了观察低 pH 碳酸发酵结束后在不同条件下静置时葡萄糖酸是否能够依然保持稳定不转化为酮基葡萄糖酸，我们将低 pH 条件下糖酸发酵结束后的发酵液静置一段时间，并检测其糖酸产量来观察其稳定性。葡萄糖酸钠在工业上用作水泥缓凝剂时，一般情况下将发酵液离心后直接使用。但有些情况下需要将其储存一段后再去使用，因此了解发酵液重葡萄糖酸钠在不同条件下的转化情况是很有必要的。为了进一步观察发酵液在不同条件下的稳定性，将发酵结束后的发酵液短期静置，观察酮基葡萄糖酸的生成情况(图 4.3)。

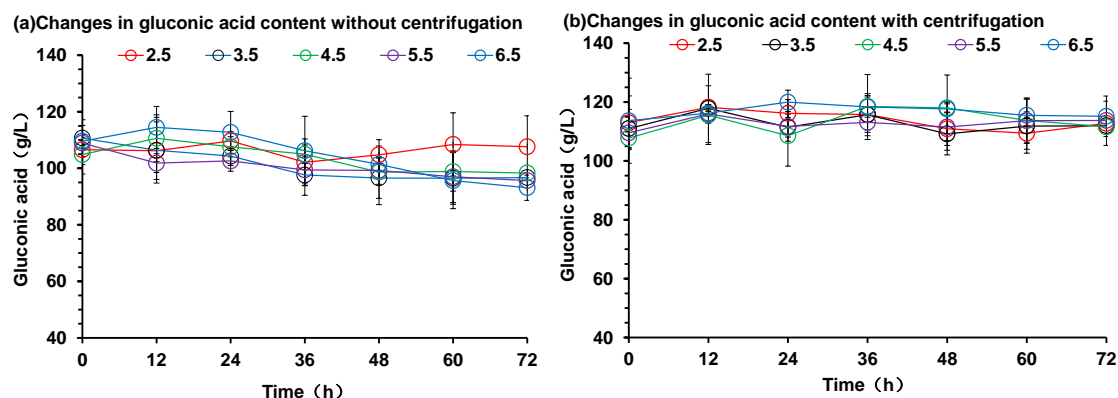


图 4.3 离心对发酵液在不同 pH 条件下短期静置时产品转化的影响

(a) 在不同 pH 条件下短期放置而不离心时发酵液中葡萄糖酸含量的变化 (b) 不同 pH 条件下离心后发酵液短期静置期间葡萄糖酸含量的变化

Fig. 4.3 Product transformation of fermentation broth after centrifugation under short-term standing at different pH

(a) Changes in gluconic acid content in fermentation broth during short-term storage without centrifugation under different pH conditions (b) Changes in gluconic acid content during short-term storage of fermentation broth after centrifugation under different pH conditions

由短期静置数据可以看出，离心后的发酵液由于菌株及脱氢酶被大部分去除，在不同 pH 条件下都没有酮基葡萄糖酸的生成，离心去除菌株可能是一个比较好的短期保存发酵液的方式。而在不经过离心的发酵液中，只有在 pH 2.5 的条件下没有酮基葡萄糖酸的生成，而高于此 pH 条件的发酵液均有酮基葡萄糖酸的生成，这表明离心或者是不经离心的发酵液保持低 pH 是抑制酮基葡萄糖酸生成的有效方法。

4.3.3 发酵液在不同条件下长期静置时酮基葡萄糖酸的生成情况

葡萄糖酸钠被用作水泥缓凝剂时，一般将发酵液直接离心就可以使用。但有时需要将其放置一段时间后在使用，因此去研究发酵液静置时是否会有酮基葡萄糖酸的生成是有必要的。前文已经研究过发酵液短期静置时的酮基葡萄糖酸生成情况，考虑到实际情况，长期静置也可能在考虑范围中，因此将发酵结束后的发酵液长期静置，观察糖酸浓度的变化情况（图 4.4）。

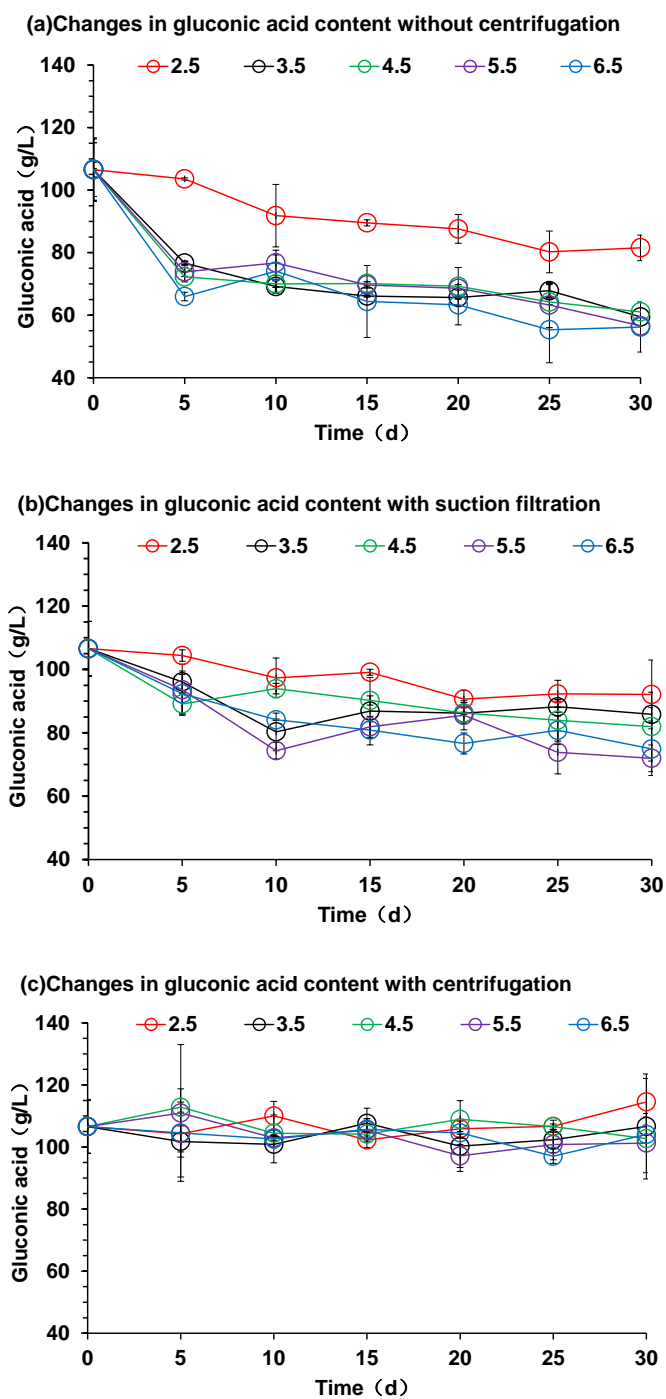


图 4.4 离心后发酵液在不同 pH 条件下长期静置时产物转化的情况

(a) 在不同 pH 条件下长期放置而不离心后发酵液中葡萄糖酸含量的变化 (b) 在不同 pH 条件下过滤和长期放置后发酵液中葡萄糖酸含量的变化 (c) 不同 pH 条件下离心和长期放置后发酵液中葡萄糖酸含量的变化

Fig. 4.4 Product transformation of fermentation broth after centrifugation under long-term standing at different pH

(a) Changes in gluconic acid content in fermentation broth after long-term storage without centrifugation under different pH conditions (b) Changes in gluconic acid content in fermentation broth after filtration and

long-term storage under different pH conditions (c) Changes in gluconic acid content in fermentation broth after centrifugation and long-term storage under different pH conditions

由长期静置数据可以看出，常温静置下在不同 pH 条件下时的葡萄糖酸产量均出现明显下降，这表明长期常温静置时 pH 并不能有效抑制酮基葡萄糖酸的生成。同时，抽滤后静置下葡萄糖酸产量也出现了一定程度的下降。而将发酵液完全离心后葡萄糖酸的产量则几乎没有下降，这表明在长期静置的条件下，将发酵液完全离心可能是一个比较好的选择。

4.3.4 本章小结

(1) 本文在 30% (v/v) 固含量的玉米秸秆中进行了低 pH 糖酸发酵验证，结果表明，低 pH 确实可以有效抑制酮基葡萄糖酸的生成，发酵 24 h 葡萄糖基本被利用完，48 h 时产量也没有进一步下降。同时也发现在低 pH 条件下木糖的消耗会受到很大影响，这需要进一步的解决措施。

(2) 通过研究发现低 pH 条件下木糖的利用效率会降低，为了提高低 pH 条件下木糖的利用效率，在低 pH 条件下的合成培养基中对菌株进行适应性进化。但最终的结果并没有达到最初的预期，这可能需要进一步的研究。

(3) 为了观察在发酵液在低 pH 条件下静置一段时间后酮基葡萄糖酸的生成的抑制情况，将发酵液经过离心/不离心后短期及长期静置。通过研究发现短期静置时，离心或者极低 pH 下可以抑制酮基葡萄糖酸的生成。长期静置时，离心是抑制酮基葡萄糖酸生成的最有效的方法。

本章节主要围绕抑制酮基葡萄糖酸的生成来进行探究，在低 pH 条件下有效抑制了酮基葡萄糖酸的生成。并通过对发酵液的短期及长期静置探究了不同条件下酮基葡萄糖酸的生成情况，为工业上的水泥缓凝剂的储存提供研究基础。在低 pH 条件下，木糖的利用速率会受到显著的影响，为了提高低 pH 条件下的木糖利用效率，我们将菌株在低 pH 环境的合成培养基中进行适应性进化，从而提高了菌株在低 pH 条件下利用木糖的能力。

第 5 章 结论与展望

5.1 结论与创新点

本文主要对高浓度纤维素糖酸发酵过程中的问题进行探究。首先，高固含量体系下会导致氧气的传递受到阻碍，影响菌株的发酵效率。另外，高固含量意味着会有高浓度产物葡萄糖酸钠的积累，这可能会导致菌株活性受到抑制。最后，氧化葡萄糖酸杆菌中的葡萄糖脱氢酶会将产物葡萄糖酸转化为酮基葡萄糖酸，从而导致产量的降低。本实验室通过更换生物炼制顺序，提高了脱毒的效率。由于液态脱毒的同时纤维素酶也会发挥作用，这可能会降低发酵液整体的黏度，因此对液态脱毒条件下的糖酸发酵进行了考察。为了了解在糖酸发酵过程中生成的产物对发酵的影响，探究了过氧化氢及葡萄糖酸钠对菌株及纤维素酶的抑制作用。最后还探究了低 pH 对酮基葡萄糖酸生成的抑制作用以及在不同静置条件下酮基葡萄糖酸的生成情况。得出的结论如下：

(1) 更换生物炼制顺序后抑制物被脱除得更加彻底且在溶氧提升方面效果显著。更换生物炼制顺序后测定的氧气传递速率 k_{La} 要比常规生物炼制顺序下的 k_{La} 高，这验证了液态脱毒在溶氧方面的帮助。此外，本研究还确定了液态脱毒下最低转速及通气量，节约了能耗和资源。

(2) 氧化葡萄糖酸杆菌中并没有过氧化氢的生成且额外添加一定的过氧化氢浓度也对纤维素酶无太大抑制作用，这表明过氧化氢并不是影响糖酸发酵过程的主要原因。本研究还发现高浓度产物葡萄糖酸钠的积累会对纤维素酶和菌株产生严重的抑制作用。通过对菌株的适应性进化，提高了菌株对高浓度产物的耐受性，最终提高了发酵性能。

(3) 在低 pH 条件下酮基葡萄糖酸的生成会受到一定程度的抑制，但同时木糖的利用速率也会下降。本研究进一步探究了不同静置条件下酮基葡萄糖酸的生成情况，发现在短期静置时将发酵液离心或者保持极低 pH 可以有效抑制酮基葡萄糖酸的生成；而长期静置时只有将发酵液离心才能有效抑制酮基葡萄糖酸的生成。

本文的创新点如下：

(1) 以往的糖酸发酵都是在常规生物炼制条件下进行的，会有可发酵糖的损耗以及高能源消耗等问题。本研究首次对生物炼制顺序进行调整，并进行糖酸发酵验证。测定了不同参数条件下液态脱糖酸发酵时的氧气传递速率 k_{La} 的变化，确定了更换生物炼制顺序后溶氧水平有了一定程度的提升。最后在该种生物炼制条件下进行糖酸发酵实验，确定了更合适的发酵参数，降低了能耗。

(2) 糖酸发酵时会产生过氧化氢，这可能是影响糖酸产量提高的其中一个因素。本研究发现在以氧化葡萄糖酸杆菌为发酵菌株生产糖酸时没有过氧化氢的生成，并且过氧化氢本身对纤维素酶的影响也非常小。同时，本研究发现高浓度产物的积累会对纤维

素酶及菌株产生负面影响，并通过适应性进化的方式提高了菌株的耐受性，改善了发酵效果。

(3) 在利用氧化葡萄糖酸杆菌生产糖酸的过程中，糖酸会进一步转化为酮基葡萄糖酸，这对以糖酸生成为目标的发酵来说是导致产量降低的因素之一。本研究首次探究了不同静置条件下酮基葡萄糖酸的转化情况。发现了短期静置时将发酵液离心或保持极低 pH 是保持高糖酸产量的方法，而在长期静置时将发酵液离心才是保持高糖酸产量的方法。

5.2 展望

本研究的工作还有许多值得继续探讨的地方：

(1) 尽管液态脱毒相比固态脱毒有许多优点，但也有一些需要改进的地方。液态脱毒在 37℃ 下脱毒结束后需要将温度升至 50℃ 并维持 12 h 来灭活脱毒菌株，之后再降温至发酵温度，对于氧化葡萄糖酸杆菌来说，合适的发酵温度为 30℃，这个升温及降温的过程耗费的大量的能源。后续的试验可以在如何杀灭脱毒菌株入手，寻找能节约资源且无其它负面影响的方法。

(2) 本研究证明了高浓度葡萄糖酸钠会对菌株及纤维素酶的活性产生抑制作用，通过对菌株的适应性进化降低了产物的抑制作用，但纤维素酶的活性降低暂时没有好的解决方法。尽管本研究发现不同的葡萄糖酸盐对纤维素酶活性不同，更换中和剂可能会有所改善。但在本实验的糖酸发酵中，作为水泥缓凝剂的葡萄糖酸钠是目标产物，因此无法更换。另外，通过适应性进化的方式来提高菌株的活性虽然有效果，但效率并不高。后续可以考虑从分子层面提高菌株中钠离子或者酸根离子转移蛋白的活性来解决这个问题。

(3) 木糖的适应性进化实验暂时并没有得到更好的一个结果，后续可能需要改变发酵策略从而进一步提高菌株利用木糖的能力。本研究探究了短期及长期静置下酮基葡萄糖酸的生成情况及抑制方法，但最终的目的是希望葡萄糖酸钠的水泥缓凝性能不会受到影响。低 pH 条件静置下对水泥缓凝性能的影响并未做过多探讨。因此后续实验可以从对短期及长期静置下离心发酵液的水泥缓凝性能进行测定并进行表征，与常规离心发酵液进行比较以进一步了解水泥缓凝剂发生的变化。

参考文献

- [1] Byong-Wa C, Benita D, Macuch PJ, Debbie W, Charlotte P, Ara J. The development of cement and concrete additive. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2006, 131(1-3):645-658.
- [2] Saito H, Tsuchida S, Fujita H. An immunological test for fecal occult blood by counter immunoelectrophoresis. Falsepositive reaction due to non-hemoglobin proteins in the tests with an anti-crude hemoglobin antibody. *Japanese Journal of Gastroenterology*. 1982, 79(10):1944-1949.
- [3] Deppenmeier U. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter strains*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(3):67-68.
- [4] Shen CF, Man LD, Buzzell RI. Yield and quality of tofu as affected by soybean and soymilk characteristics: Glucono - delta - lactone coagulant. *Journal of Food Science*. 2010, 56(1):109-112.
- [5] Toivari M, Vehkomäki ML, Nygård Y, Penttilä M, Ruohonen L, Wiebe MG. Low pH d-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. *Bioresource Technology*. 2013, 133:555-562.
- [6] Kwak S, Jin YS. Production of fuels and chemicals from xylose by engineered *saccharomyces cerevisiae*: a review and perspective. *Microbiology Cell Factories*. 2017,16:82.
- [7] Feher, Aniko, Csaba, Rozbach, Margareta, Racz, Gergely, Fekete, Melinda, Hegedus, Laszlo, Barta, Zsolt. Treatments of lignocellulosic hydrolysates and continuous-flow hydrogenation of xylose to xylitol. *Chemical Engineering and Technology*. 2018, 41(3):496-503.
- [8] Ma JL, Liu ZW, Song JL, Zhong LX, Xiao DQ, Xi HX. Au@h-Al₂O₃ analogic yolk shell nanocatalyst for highly selective synthesis of biomass-derived D-xylonic acid via regulation of structure effects. *Green Chemistry*. 2018, 20:51-88.
- [9] Li B, Xie CY, Yang BX, Gou M, Xia ZY, Sun ZY. The response mechanisms of industrial *saccharomyces cerevisiae* to acetic acid and formic acid during mixed glucose and xylose fermentation. *Process Biochemistry*. 2020, 91:19-29.
- [10] Li YC, Ma JL, Jin DV, Jiao GJ, Yang XP, Liu KN. Copper oxide functionalized chitosan hybrid hydrogels for highly efficient photocatalytic-reforming of biomass-based monosaccharides to lactic acid. *Applied Catalysis B-environmental*. 2021, 291:120-123.
- [11] Ma JL, Li YC, Jin DV, Ali Z, Jiao GJ, Zhang JQ. Functional B@mCN-assisted photo

- catalytic oxidation of biomass-derived pentoses and hexoses to lactic acid. *Green Chemistry*. 2020, 22: 84-92.
- [12] Ma JL, Jin DV, Li YC, Xiao DQ, Jiao GJ, Liu Q. Photocatalytic conversion of biomass based monosaccharides to lactic acid by ultrathin porous oxygen doped carbon nitride. *Applied Catalysis B-environmental*. 2021, 283:119-520.
- [13] Ma JL, Jin DV, Yang XP, Sun SL, Zhou JH, Sun RC. Phosphorus-doped carbon nitride with grafted sulfonic acid groups for efficient photocatalytic synthesis of xylonic acid. *Green Chemistry*. 2021, 23:50-60.
- [14] Yim SS, Choi JW, Lee SH, Jeon EJ, Chung WJ, Jeong KJ. Engineering of *Corynebacterium glutamicum* for consolidated conversion of hemicellulosic biomass into xylonic acid. *Plant Biotechnology Journal*. 2017, 12:17-40.
- [15] Werpy T, Petersen G. Top value added chemicals from biomass: volume I-results of screening for potential candidates from sugars and synthesis gas. Office of Scientific and Technical Information. 2004, 11-12.
- [16] Shen CF, Man LD, Buzzell RI. Yield and quality of tofu as affected by soybean and soymilk characteristics: Glucono - delta - lactone coagulant. *Journal of Food Science*. 2010, 56(1):109-112.
- [17] Singh O, Kumar R. Biotechnological production of gluconic acid: Future implications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007, 75(4): 713-722.
- [18] Mounir M, Shafiei R, Zarmehrkhoshid R, et al. Simultaneous production of acetic and gluconic acids by a thermotolerant *Acetobacter* strain during acetous fermentation in a bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2016, 121, (2): 166-171.
- [19] Sainz F, Navarro D, Mateo E, et al. Comparison of D-gluconic acid production in selected strains of acetic acid bacteria, *International Journal of Food Microbiology*. 2016, 222(2): 40-47.
- [20] Attwood MM, Dijken JP, Pronk JT. Glucose metabolism and gluconic acid production by *Acetobacter diazotrophicus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1991, 72(2): 101-105.
- [21] Vroemen J, Buurman WA, Schutte B, Maessen JG, Van DL, Kootstra G. The cytokinetic behavior of donor hepatocytes after syngenic hepatocyte transplantation into the spleen. *Transplantation*. 1988, 45(3):600-606.
- [22] Anastassiadis S, Rehm HJ. Continuous production of gluconic acid in cascading of fermenters. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 73:541-548.
- [23] Syal S. Development and interaction of a concrete additive for improved performance

- and durability. *Cement Concrete and Aggregates*. 1981, 4(2):7.
- [24] Ramachandran S, Fontanille P, Pandey A. Gluconic acid: Properties, applications and microbial production. *Journal of Catalysis*. 2004, 223(1):122-133.
- [25] Jiyoung A, Demetrius A, Berndt SI. Vitamin D-related genes, serum vitamin D concentrations and prostate cancer risk. *Carcinogenesis*. 2009, 30(5):769.
- [26] Lockwood LB, Nelson GEN. The oxidation of pentoses by *Pseudomonas*. *Journal Of Bacteriology*. 1961, 52:581-586
- [27] Buchert J. Biotechnical oxidation of D-xylose and hemicellulose hydrolyzates by *G. oxydans*. Publications Technical Research Centre of Finland. 1990.
- [28] Toivari MH, Ruohonen L, Richard P, Penttil äM, Wiebe MG. *Saccharomyces cerevisiae* engineered to produce D-xylonate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 88:751-760
- [29] Nygård Y, Toivari MH, Penttil äM, Ruohonen L, Wiebe MG. Bioconversion of D-xylose to D-xylonate with *Kluyveromyces lactis*. *Metabolic Engineering*. 2011, 13:383-391
- [30] Liu HV, Aldehuesa KN, Nisola GM, Ramos KR, Chung WJ. High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 2011, 115:244-248
- [31] Buchert J, Viikari L, Linko M, Markkanen P. Production of xylonic acid by *Pseudomonas fragi*. *Biotechnology Letters*. 1986, 8:541-546
- [32] Ohsugi M, Tochikura T, Ogata K. The production of D-xylonic acid by *Micrococcus* sp. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1970, 34:357-363
- [34] Ishizaki H, Ihara T, Yoshitake J. D-xylonic acid production by *Enterobacter cloacae*. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*. 1973, 47:755-761
- [34] Jin D, Ma J, Li Y, Jiao G, Liu K, Sun S, Zhou J, Sun R. Development of the synthesis and applications of xylonic acid: a mini-review. *Fuel*. 2022,314:12-77.
- [35] Reiss M, Heibges A, Metzger J, Hartmeier W. Determination of BOD-values of starch-containing waste water by a BOD-biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 1998, 13(10):1083-1090.
- [36] Saito H, Tsuchida S, Fujita H. An immunological test for fecal occult blood by counter immunoelectrophoresis. Falsepositive reaction due to non-hemoglobin proteins in the tests with an anti-crude hemoglobin antibody. *Japanese Journal of Gastroenterology*. 1982, 79(10):1944-1949.
- [37] Toivari M, Vehkomäki ML, Nygård Y, Penttil äM, Ruohonen L, Wiebe MG. Low pH D-xylonate production with *Pichia kudriavzevii*. *Bioresource Technology*. 2013,

- 133:555-562.
- [38] Sundar MSL, Nampoothiri KM. An overview of the metabolically engineered strains and innovative processes used for the value addition of biomass derived xylose to xylitol and xylonic acid. *Bioresource Technology*. 2022, 345:12-48.
- [39] Zamora F, Bueno M, Molina I, Iribarren JI, Muñoz-Guerra S, Galbis JA. Stereoregular copolyamides derived from D-Xylose and L-Arabinose. *Macromolecules*. 2000, 33:2030-2038.
- [40] Niu W, Molefe MN, Frost JW. Microbial synthesis of the energetic material precursor 1,2,4-Butanetriol. *Journal of The American Chemical Society*. 2003, 125:12998-12999.
- [41] Liu H, Valdehuesa KNG, Nisola GM, Ramos KRM, Chung WJ. High yield production of D-xylonic acid from D-xylose using engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 2012, 115:244-248.
- [42] Toivari MH, Nygård Y, Penttilä M, Ruohonen L, Wiebe MG. Microbial D-xylonate production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2012b, 96:1-8.
- [43] Salusjärvi L, Havukainen S, Koivistoinen O, Toivari M. Biotechnological production of glycolic acid and ethylene glycol: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2019, 103:2525-2535.
- [44] Buchert J, Viikari L. The role of xylonolactone in xylonic acid production by *Pseudomonas fragi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1988a, 32:149-178.
- [45] Buchert J, Viikari L. Oxidative D-xylose metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1988b, 29:375-379.
- [46] Toivari MH, Ruohonen L, Richard P, Penttilä M, Wiebe MG. *Saccharomyces cerevisiae* engineered to produce D-xylonate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 88:751-760.
- [47] 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:S0960852418308046-.
- [48] Olijve W, Kok JJ. Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Archives of Microbiology*. 1979, 121(3): 283-290.
- [48] Herrmann U, Merfort M, Jude M. Biotransformation of glucose to 5-keto-Dgluconic acid by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004, 64(1): 86-90.
- [49] Schweiger P, Gross H, Deppenmeier U. Characterization of two aldo-keto reductases from *Gluconobacter oxydans* 621H capable of regio- and stereoselective α -ketocarbonyl

- reduction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 87(4): 1415-1426.
- [50] Deppenmeier U. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter strains*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(3):67-68.
- [51] Pappenberger G, Hohmann HP. Industrial Production of L-ascorbic acid (Vitamin C) and D-isoascorbic acid. *Biotechnol Food Feed Addit*. 2013, 123:143–188.
- [52] Reichstein T, Grüssner A. Eine ergiebige synthese der l-ascorbins äure (C-Vitamin). *Helvetica*.1934, 17:311–328.
- [53] Wang P, Zeng W, Xu S. Current challenges facing one-step production of L-ascorbic acid. *Biotechnol Adv*.2018, 36:1882–1899.
- [54] Yang W, Xu H. Industrial Fermentation of Vitamin C. In: Vandamme EJ, Revuelta JL. *Industrial biotechnology of vitamins, biopigments, and antioxidants*, 1st edn. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KGaA, Weinheim. 2016, 161–192.
- [55] Zhang JB, Zhang XL, Wang DH. Biocatalytic regioselective oxidation of N-hydroxyethyl glucamine for synthesis of miglitol. *Adv Mater Res*.2011, 197–198:51–55.
- [56] Sugimoto S, Nakajima H, Kosaka K, Hosoi H. Review: Miglitol has potential as a therapeutic drug against obesity.2015.
- [57] Yagi M, Kouno T, Aoyagi Y, Murai H. The structure of morano-line, a piperidine alkaloid from morus species. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*.1976, 50:571–572.
- [58] Schedel M. Regioselective oxidation of aminosorbitol with *Gluconobacter oxydans*, key reaction in the industrial 1-deoxynojirimycin synthesis. In: Rehm HJ, Reed G (eds) *Biotechnology Second, Second*. Wiley, Wuppertal.2000, 296–311.
- [59] Yamada M, Elias MD, Matsushita K. *Escherichia coli* PQQ-containing quinoprotein glucose dehydrogenase: Its structure comparison with other quinoproteins. *Biochimica Et Biophysica Acta*. 2003, 1647(1-2): 185-192.
- [60] Matsushita K, Shinagawa E, Adachi O. Reactivity with ubiquinone of quinoprotein D-glucose dehydrogenase from *Gluconobacter suboxydans*. *Journal of Biochemistry*.1989,105(4); 633-637.
- [61] Richhardt J, Luchterhand B, Bringer S, et al. Evidence for a key role of cytochrome bo3 oxidase in respiratory energy metabolism of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Bacteriology*.2013, 195(18): 4210-4220.
- [62] Konchev, M. Bulgaria-supply, transformation and consumption of renewable energies over the period. *Oxidation Communications*. 2019, 42(1):89-90.
- [63] Scarlat N, Dallemand JF, Monforti-Ferrario F, Banja M, Motola V. Renewable energy policy framework and bioenergy contribution in the European Union - an overview from

- national renewable energy action plans and progress reports. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015,51:969-985.
- [64] Centre J, Kotsakis E, Ketselidis M. European Commission. *Agriculture and bioenergy*. 2001.
- [65] Long SP, Karp A, Buckeridge MS, Davis SC and Vonshak A. *Feedstock for biofuels and bioenergy*. 2015.
- [66] Elbersen BS, Staritsky IG, Hengeveld GM, Schelhaas MJ, Naeff SDH. *Atlas of EU biomass potentials: spatially detailed and quantified overview of EU biomass potential taking into account the main criteria determining biomass availability from different sources*. 2012.
- [67] Dolgonosov BM. *Knowledge production and world population dynamics. Technological Forecasting and Social Change*. 2016, 103:127-141.
- [68] Lin B, Raza MY. *Analysis of energy security indicators and CO₂ emissions. A case from a developing economy. Energy*. 2020, 200:11-75.
- [69] Li S, Zhou C, Wang S. *Does modernization affect carbon dioxide emissions? A panel data analysis. Science of the Total Environment*. 2019, 663:426-435.
- [70] Nanda S, Kozinski JA, Dalai AK. *Biomass - an overview on classification, composition and characterization. Biomass-Process Conversion Biorefinery*. 2013:1-35.
- [71] Bodjui, Olivier, Abo, Ming Gao, Yonglin Wang, Chuanfu Wu, Hongzhi Ma, Qun hui. *Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. Reviews on Environmental Health*. 2019.
- [72] Vertes AA, Qureshi N, Yukawa H, Blaschek HP. *Biomass to biofuels: strategies for global industries. Wiley Interdisciplinary Reviews-developmental Biology*. 2011.
- [73] Michael W, May W, Hong H. *Life cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types. Environmental Research Letters*. 2007, 2(2): 24001-24013.
- [74] Demirbas A. *Products from lignocellulosic materials via degradation processes. Energy Sources, Part A: Recovery Utilization and Environmental Effects*. 2007, 30(1): 27-37.
- [75] Elias MH, Grant C, Jhuma S. *Economic value and environmental impact analysis of biorefinery systems. Chemical Engineering Research and Design*. 2013, 91(8): 1418-1426.
- [76] Ko JK, Lee SM. *Advances in cellulosic conversion to fuels: Engineering yeasts for cellulosic bioethanol and biodiesel production. Current Opinion in Biotechnology*. 2018, 50: 72-80.

- [77] Lee J, Park KY. Impact of hydrothermal pretreatment on anaerobic digestion efficiency for lignocellulosic biomass: Influence of pretreatment temperature on the formation of biomass-degrading byproducts. *Chemosphere*. 2020, 256:127116.
- [78] Yook SD, Kim J, Gong G, Ko JK., Um Y, Han SO, Lee S. High yield lipid production from lignocellulosic biomass using engineered xylose - utilizing *Yarrowia lipolytica*. *GCB Bioenergy*. 2020, 12.
- [79] Nagarajan D, Lee DJ, Chang JS. Recent insights into consolidated bioprocessing for lignocellulosic biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2019, 44(28):14362-14379.
- [80] Sassner P, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of bioethanol production from three different lignocellulosic materials. *Biomass Bioenergy*. 2008,32(5):30-422.
- [81] Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*. 2010, 101(13):4744-53.
- [82] Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energy Conversion Management*. 2011,52(2):858-875.
- [83] D Chiamonti, M Prussi, S Ferrero, L Oriani, P Ottonello, P Torre, F Cherchi. Review of pretreatment processes for lignocellulosic ethanol production, and development of an innovative method. *Biomass Bioenergy*. 2012,46:25-35.
- [84] Alvira P, Tom ás-Pejó E, Ballesteros M, Negro MJ. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review. *Bioresource Technology*. 2010,101(13): 51-61.
- [85] Fatih Demirbas M, Balat M, Balat H. Biowastes-to-biofuels. *Energy Conversion and Management*. 2011, 52(4):15-28.
- [86] Hamelinck CN, Van Hooijdonk G, Faaij APC. Ethanol from lignocellulosic biomass: technoeconomic performance in short-middle and long-term. *Biomass Bioenergy*. 2005,28(4):384-410.
- [87] Limayem A, Ricke SC. Lignocellulosic biomass for bioethanol production: current perspectives, potential issues and future prospects. *Prog Energy Combust*. 2012, 38(4):44-67.
- [88] 杨莉, 谭丽萍, 刘同军. 木质纤维素预处理抑制物产生及脱除方法的研究进展. *生物工程学报*, 2021, 37(1):15.
- [89] Talebnia F, Karakashev D, Angelidaki I. Production of bioethanol from wheat straw: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation. *Bioresource Technology*. 2010,

- 101(13): 44-53.
- [90] Prasad S, Singh A, Joshi HC. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resource Conservation Recycling*. 2007, 50(1):1-39.
- [91] Zhang Y, Chen H. Multiscale modeling of biomass pretreatment for optimization of steam explosion conditions. *Chemical Engineering Science*. 2012, 75:177-82.
- [92] Zhang J, Wang X, Chu D, He Y, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102:4480-4488.
- [93] Nazhad MM, Ramos LP, Paszner L, Saddler JN. Structural constraints affecting the initial enzymatic hydrolysis of recycled paper. *Enzyme Microbiology Technology* 1995, 17(1):68-74.
- [94] Z.M.A, Bundhoo A, Mudhoo R, Mohee. Promising unconventional pretreatments for lignocellulosic biomass. *Environmental science and technology*. 2013,43:2140-2211,
- [95]Antonio, D, Moreno. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2015.
- [96] Z Anwar, M Gulfraz M Irshad. Agro-industrial lignocellulosic biomass a key to unlock the future bio-energy: A brief review. *Research Applied Science*. 2014, 7:12-19.
- [97] E.Antonov I, Schlembach L, Regestein MA, Rosenbaum, J. Büchs. Process relevant screening of cellulolytic organisms for consolidated bioprocessing. *Biotechnology Biofuels*. 2017, 10:106.
- [98] A. Morana, L. Maurelli, E. Ionata, F. La Cara, M. Rossi. Cellulases from fungi and bacteria and their biotechnological applications, in: A.E. Golan Cell. Types Action, Mech. Uses, Nova Science. 2011, 12:1-79.
- [99] Toushik SH, Lee KT, Lee JS. Functional applications of lignocellulolytic enzymes in the fruit and vegetable processing industries. *Journal of Food Science*. 2017, 82(1-3):585.
- [100] Guibet JC, Chauvel A. Using oxygenated organic products as fuels in engines. Part two: different systems for producing alcohol fuels. Technico-economic analysis. *Oil Gas Science Technology*. 2006, 36(6):685-733.
- [101] Zhou P, Yao R, Zhang H, Bao J. Unique glucose oxidation catalysis of *Gluconobacter oxydans* constitutes an efficient cellulosic gluconic acid fermentation free of inhibitory compounds disturbance. *Biotechnology and Bioengineering*. 2019, 116(9):2191-2199.
- [102] Kordala N, Lewandowska M, Bednarski W. Effect of the method for the elimination of inhibitors present in *Miscanthus giganteus* hydrolysates on ethanol production effectiveness. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2021.

- [103] Zhang B, Zhan B, Bao J. Reframing biorefinery processing chain of corn fiber for cellulosic ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2021, 170(2):11-91.
- [104] Hödscher T, Schleyer U, Merfort M, Bringer-Meyer S, Görisch H, Sahm H. Glucose oxidation and PQQ-dependent dehydrogenases in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2008, 16(1-2):6-13.
- [105] Gauss WF, Suzuki S, and Takagi M. Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments. US Patent. 1976, 3990944
- [106] Doranpeterson J, Jangid A, Brandon SK. Simultaneous saccharification and fermentation and partial saccharification and co-fermentation of lignocellulosic biomass for ethanol production. *Methods in Molecular Biology*, 2009, 581:263.
- [107] Lindeque RM, Woodley JM. The effect of dissolved oxygen on kinetics during continuous biocatalytic oxidations. *Organic Process Research and Development*. 2020.
- [108] THödscher, Schleyer U, Merfort M. Glucose oxidation and PQQ-dependent dehydrogenases in *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2008, 16(1-2):6-13.
- [109] Ke X, Vliet JV, Zhu T. Direct and indirect loss of natural habitat due to built-up area expansion: A model-based analysis for the city of Wuhan, China. *Land use policy: The International Journal Covering All Aspects of Land Use*. 2018, 6: 231-239.
- [110] Zhang H, Shi L, Mao X, Lin J, Wei D. Enhancement of cell growth and glycolic acid production by overexpression of membrane-bound alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* DSM 2003. *Journal of Biotechnology*. 2016, 237:18-24.
- [111] Mizunuma T, Kokufuta E, Sato S. A mycelium with polyelectrolyte complex-bunched hyphae: Several important factors affecting on the fermentation performance at a very high cell density. *Colloids and Surfaces B Biointerfaces*. 2007, 57(1):56-60.
- [112] Freitas C, Teixeira JA. Oxygen mass transfer in a high solids loading three-phase internal-loop airlift reactor. *Chemical Engineering Journal*. 2015, 84(1):57-61.
- [113] 张海龙, 张帆, 刘倩. 提高发酵过程中溶解氧浓度的探讨. *齐鲁师范学院学报*, 2009, 24(003): 70-72.
- [114] Zhou X, S Lü, Xu Y, Yu S. Improving the performance of cell biocatalysis and the productivity of xylonic acid using a compressed oxygen supply. *Biochemical Engineering Journal*. 2015, 93:196-199.
- [115] Leeuwen M V, Heijnen JJ, Han G, Arthur O, Henk N, Jan V, Luuk AM. A system for accurate on-line measurement of total gas consumption or production rates in microbioreactors. *Chemical Engineering and Science*. 2009, 64(3):455-458.

- [116] F Lu, Ping K, Wen L. Enhancing gluconic acid production by controlling the morphology of *Aspergillus niger* in submerged fermentation. *Process Biochemistry*. 2015, 50(9):1342-1348.
- [117] Liu D, Ke X, Hu ZC, Zheng YG. Improvement of pyrroloquinoline quinone-dependent D-sorbitol dehydrogenase activity from *Gluconobacter oxydans* via expression of *Vitreoscilla* hemoglobin and regulation of dissolved oxygen tension for the biosynthesis of 6-(N-hydroxyethyl)-amino-6-deoxy- α -l-sorbofuranose. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2021, 131(5):518-524.
- [118] Wani S H, Prateek T, Abbu Z. Transcriptional regulation of osmotic stress tolerance in wheat. *Plant Molecular Biology*. 2018, 97:469-487.
- [119] PK Bajwa, T Shireen, FD Aoust, D Pinel, VJ Martin, JT Trevors, H Lee. Mutants of the pentose - fermenting yeast *Pichia stipitis* with improved tolerance to inhibitors in hardwood spent sulfite liquor. *Biotechnology Bioengineering*. 2005, 104 (5):892–900.
- [120] CC Geddes, IU Nieves, LO Ingram. Advances in ethanol production. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2011, 22 (3):312–319.
- [121] S Hohmann, WH Mager. *Yeast Stress Responses*. Springer Science & Business Media, 2003, 1.
- [122] S Hasegawa, T Ogata, K Tanaka, A Ando, H Takagi J. Shima, Overexpression of vacuolar H⁺ - ATPase - related genes in bottom - fermenting yeast enhances ethanol tolerance and fermentation rates during high - gravity fermentation, *J. Inst. Brewing*. 2012, 118 (2):179–185.
- [123] U Sauer. *Evolutionary engineering of industrially important microbial phenotypes*, *Metabolic Engineering*, Springer, Berlin Heidelberg, 2001, 129–169.
- [124] P Saini, A Beniwal, A Kokkiligadda, S Vij. Evolutionary adaptation of *Kluyveromyces marxianus* strain for efficient conversion of whey lactose to bio-ethanol. *Process Biochem*. 2017, 62:69–79.
- [125] Yan Z, Zhang J, Bao J. Increasing cellulosic ethanol production by enhancing phenolic tolerance of *Zymomonas mobilis* in adaptive evolution. *Bioresource Technology*, 2021, 329(1–2):124926.
- [126] Yan Z, Chen M, Jia J. Increasing Acid Tolerance of an Engineered Lactic Acid Bacterium *Pediococcus acidilactici* for L-Lactic Acid Production. *Fermentation*, 2022, 8(3):96.
- [127] SS Dhaliwal, HS Oberoi, SK Sandhu, D Nanda, D Kumar, SK Uppal. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of newly isolated

- thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*, *Biores. Technol.* 2011, 102(10):5968–5975.
- [128] KK Hong, J Nielsen. Adaptively evolved yeast mutants on galactose show trade-offs in carbon utilization on glucose. *Metabolic Eng.* 2013, 16:78–86.
- [129] Silberbach M, Maier B, Zimmermann M, Büchs J. Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*: characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. *Applied Microbiology and Biotechnology.* 2003, 62(1): 92-98.
- [130] Sun W, Yun Q, Zhou Y, Cui F, Yu S, Zhou Q, Sun L. Continuous 2-keto-gluconic acid (2-KGA) production from corn starch hydrolysate by *Pseudomonas fluorescens* AR4. *Journal of Biochemical and Engineering.* 2013, 77: 97–102.
- [131] Kulka D, Hall AN, Walker TK. Formation of 2-keto-D-gluconic acid, 5-keto-D-gluconic acid, and tartronic acid by acetobacter species. *Nature.* 1951, 167: 905–906.
- [132] Minisenhermer TJ, Anderson RF, Lagoda AA, Tyler D. Production of 2-ketogluconic acid by *Serratia marcescens*. *Applied Microbiology.* 1965, 13: 393–396.
- [133] Wei D, Xu J, Sun J, Shi J, Hao J. 2-Ketogluconic acid production by *Klebsiella pneumonia* CGMCC 1.6366. *J. Ind. Microbiology and Biotechnology.* 2013, 40: 561–570.
- [134] Teng W, Sun W, Yu B, Cui F, Qian J, Wang L, Qi X, Wei H. Continuous conversion of rice starch hydrolysate to 2-keto-D-gluconic acid by *Arthrobacter globiformis* C224. *Biotechnol. Bioprocess Engineering.* 2013, 18:709–714.
- [135] Sun W, Zhou Y, Zhou Q, Cui F, Yu S, Sun L. Semi-continuous production of 2 keto gluconic acid by *Pseudomonas fluorescens* AR4 from rice starch hydrolysate. *Bioresource Technology.* 2012, 110:546–551.
- [136] Chia M, Nguyen TBV, Choi WJ. DO-stat fed-batch production of 2-keto-D-gluconic acid from cassava using immobilized aeruginosa. *Applied of Microbiology and Biotechnology.* 2008, 78:759–765.
- [137] Matzerath I, Kläui W, Klasen R, Sahn H. Vanadate catalysed oxidation of 5 keto D-gluconic acid to tartaric acid: the unexpected effect of phosphate and carbonate on rate and selectivity. *Inorganica Chimica Acta.* 1995, 237: 203-205.
- [138] Zhang X, He Y, Lu C, Huang Z. Effects of sodium gluconate on early hydration and mortar performance of Portland cement-calcium aluminate cement-anhydrite binder. *Construction and Building Materials.* 2017, 157:1065-1073.
- [139] Zhou X, Zhou X, Huang L, Rou C, Yong X. Efficient coproduction of gluconic acid and xylonic acid from lignocellulosic hydrolysate by Zn(II)-selective inhibition on

- whole-cell catalysis by *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*. 2017:855-859.
- [140] Dai L, Jiang W, Jia R, Zhou X, Xu Y. Directional enhancement of 2-keto-gluconic acid production from enzymatic hydrolysate by acetic acid-mediated bio-oxidation with *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*. 2022, 12:348.
- [141] Zhou X, Shen Y, Xu Y, Balan V. Directing cell catalysis of glucose to 2-keto-D-gluconic acid using *Gluconobacter oxydans* NL71. *Process Biochemistry*. 2020, 94:138.
- [142] Dai L, Lian Z, Fu Y, Zhou X, Xu Y, Zhou X, Kuznetsov BN, Jiang K. Low pH stress enhances gluconic acid accumulation with enzymatic hydrolysate as feedstock using *Gluconobacter oxydans*. *Fermentation*. 2023, 9: 278.
- [143] Gupta A, Singh VK, Qazi GN. *Gluconobacter oxydans*: Its biotechnological applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 2001, 3(3):445-456.
- [144] Adney B, Baker J. *Measurement of Cellulase Activities*. 1996.
- [145] Ghose T. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59(2): 257-268.
- [146] 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(1-2): 248-254.
- [147] Hou W, Li L, Bao J. Oxygen transfer in high solids loading and highly viscous lignocellulose hydrolysates. *Sustainable Chemistry & Engineering*. 2017, 7:25-30.
- [148] 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*, 2022, 186:108543.
- [149] Zhang B, Zhan BR, Bao J. Reframing biorefinery processing chain of corn fiber for cellulosic ethanol production. *Industrial Crops and Products*, 2021, 170(2):113791.

致谢

感谢鲍杰老师和张斌老师，两位老师在我的科研生涯里给了我很多建议，帮助我不断的提高和改变自己；感谢已经毕业的李景、吴雷、展宝睿、张宏森、侯伟亮师兄对我实验提供的一些建议；感谢王雅师姐、何妮玲师姐、刘祺师姐、徐迎迎师姐以及张翼师兄；感谢与我同一届的郭晓梦、李治斌、任大字；最后要感谢武师南、张凌霄、陈峙苇师弟以及韩莹、韩庆美、刘娇师妹；还有新来的研一的师弟师妹们，祝你们科研顺利。感谢大家在这三年来对我在生活及科研上的帮助，祝大家生活愉快。

学术成果

已发表论文:

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*. 2022,186,108543.

待发表论文:

Han Tao, Bin Zhang, **Hucheng Yang**, Xiucui Liu, Jie Bao*. Submerged liquid bioremediation of acid pretreated lignocellulose with a visible endpoint in biorefinery chain. *Bioresource Technology*.

Bin Zhang, **Hucheng Yang**, Xiucui Liu, Jie Bao*. Enhancement of resistance to osmotic pressure stress of cellulose sugar acid fermentation strain. *Bioresource Technology*.

Bin Zhang, **Hucheng Yang**, Ya Wang, Xiucui Liu, Jie Bao*. Improving the dissolved oxygen level in high solids loading cellulosic sugar acids fermentation by fine-tuning the biorefinery chain. *Biochemical Engineering Journal*.

卷 内 备 考 表

本 卷 情 况 说 明

本卷共伍拾伍页

立 卷 人 _____

检 查 人 _____

立卷时间 _____