

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 硕士学位论文

无酶添加二次糖化提高木质纤维素水解和发酵得率的研究

武师南

指导教师姓名: 鲍杰 教授 华东理工大学

张斌 博士 华东理工大学

生物工程学院

申请学位级别: 硕士 专业名称: 生物工程

论文定稿日期: _____ 论文答辩日期: _____

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

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：

日期： 年 月 日

指导老师签名：

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

论文作者签名：

年 月

无酶添加二次糖化提高木质纤维素水解和发酵得率的研究

摘要

木质纤维素的生物炼制发酵通常有分步糖化与发酵（SHF）及同步糖化与发酵（SSF）两种方式。分步糖化与发酵是先对木质纤维素物料进行酶水解获得高糖浓度的水解液，再进行发酵获得发酵产品；而同步糖化与发酵则是糖化与发酵同时进行，水解获得的可发酵单糖被同步转化为发酵产品，糖浓度始终维持在较低的水平，避免了高浓度糖对纤维素酶的抑制作用。由于同步糖化与发酵的发酵液中含有大量的木质素残渣，当发酵产品是微生物油脂、单细胞蛋白等胞内产物时，细胞与木质素残渣难以实现有效分离。因此，同步糖化与发酵的方法并不适用发酵产品为胞内产物的发酵过程。分步糖化与发酵的酶促糖化步骤释放的可发酵糖，必须达到高浓度、高得率和低酶用量的指标才能达到较高的发酵水平。由于酶解生成的可发酵单糖对纤维素酶活性具有强烈的产物抑制，在高糖浓度下纤维素水解效率大幅降低，酶促糖化后仍存在较高的未水解纤维素和半纤维素组分，使得可发酵糖得率下降。对残渣中未水解组分的二次酶促糖化不仅需要额外的纤维素酶，而且获得的水解液糖浓度很低，不具备发酵应用价值。

为了解决这一难题，本文设计了一种新的无酶添加二次糖化未水解纤维素组分的方法，即在不额外添加纤维素酶的前提下，利用一次糖化后木质纤维素物料中木质素组分所吸附的纤维素酶，对残余的纤维素和半纤维素组分进行二次酶促糖化。同时，将二次糖化获得的低糖浓度水解液作为一次糖化添加的工艺水循环使用，从而提高木质纤维素水解过程的可发酵糖浓度和得率。

本论文第一部分工作是在不额外添加纤维素酶的前提下，利用麦秆一次糖化后的麦秆残渣中木质素吸附的纤维素酶，对残渣中未水解的纤维素组分进行二次糖化，并将二次糖化获得低糖浓度水解液作为下一轮的一次糖化工艺水循环利用。研究表明，预处理小麦秸秆在 25%（w/w）固含量下，经过 24 h 糖化后残渣中仍有 6.62%纤维素和 1.52%半纤维素未发生水解反应。未水解组分约占预处理小麦秸秆中纤维素和半纤维素组分的 20%和 10%。在不额外添加纤维素酶的前提下，利用残渣木质素吸附的纤维素酶对一次糖化后残渣进行二次糖化，残渣中 40%的纤维素和 70%的半纤维素被进一步水解为葡萄糖和木糖。二次糖化得到的上清液作为工艺水用于新一轮糖化过程，可获得 88.46 ± 0.92 g/L 的葡萄糖和 49.79 ± 0.39 g/L 的木糖（总糖浓度为 138.25 g/L），葡萄糖和木糖得率分别为 87.45%和 93.44%。这一结果比仅进行一次糖化的葡萄糖和木糖浓度分别提高了约 7.50%和 1.36%，得率分别提高了 4.81%和 1.26%。

本论文第二部分对无酶添加二次糖化方法所获得的高浓度可发酵糖水溶液进行单细胞蛋白和微生物油脂发酵评价。首先，对水解清液的深层液体脱毒方法进行了优化。采用添加低剂量（1.5 g/L）次氯酸钠对脱毒菌株 *Paecilomyces variotii* FN89 进行灭

活，避免其在发酵过程中对可发酵单糖的竞争。其次，对二次糖化水解清液的单细胞蛋白和微生物油脂发酵效果进行了评价。结果表明，在 25% (w/w) 和 30% (w/w) 固含量下单细胞蛋白产量分别达到 13.07 g/L 及 16.68 g/L，与使用一次糖化水解液相比提高了约 25.19%和 17.13%；在 25% (w/w) 和 30% (w/w) 固含量下最大的油脂产量分别为 21.21 g/L 及 26.24 g/L，与使用一次糖化水解液相比提高了约 18.19%和 24.48%。

综上所述，本论文主要提出了一种将木质纤维素糖化后的残渣进行二次糖化的方式来提高糖化浓度与得率，获得了含有高浓度可发酵糖的木质纤维素水解清液。通过单细胞蛋白与微生物油脂对获得的二次糖化水解液进行发酵验证，较仅使用一次糖化水解液的发酵产量以及产物得率都有所提升。通过无酶添加二次糖化未水解纤维素组分的方法，使分步糖化与发酵获得了更高的发酵产量，具备工业化应用的潜力。

关键词：木质纤维素；酶促糖化；无酶添加二次糖化；单细胞蛋白；微生物油脂

Enzyme-free addition of re-hydrolysis of lignocellulose residues to improve the hydrolysis and fermentation yield

Abstract

Commonly, biorefinery fermentation of lignocellulose is carried out in two ways, including separated hydrolysis and fermentation and simultaneous saccharification and fermentation. Separated hydrolysis and fermentation involve enzymatic hydrolysis of lignocellulosic materials to obtain a hydrolysate containing high concentration sugars, followed by fermentation to obtain products. Simultaneous saccharification and fermentation involves saccharification and fermentation at the same time, whereby fermentable monosaccharides obtained from the hydrolysis are converted into fermentation products simultaneously, and the sugar concentration is always maintained at a low level, avoiding the inhibition effect of the cellulase enzymes caused by a high concentration of sugar. However, it is difficult to separate cells and lignin residue effectively in simultaneous saccharification and fermentation when the fermentation products are intracellular bioproducts such as microbial lipid and single-cell protein since the fermentation broth of simultaneous saccharification and fermentation contains a large amount of lignin residue. Therefore, the simultaneous saccharification and fermentation is unsuitable for intracellular bioproducts production. However, the fermentable sugars released from the enzymatic saccharification step of separated hydrolysis and fermentation must reach high concentrations, high yields, and low enzyme dosages to achieve a high level of fermentation. Due to the strong product inhibition of cellulase activity by the fermentable monosaccharides generated by enzymatic saccharification, the cellulose conversion rate is drastically reduced at high sugar concentrations, and high levels of unhydrolyzed cellulose and hemicellulose fractions remain after enzymatic saccharification, resulting in a reduced yield of fermentable sugars. The re-hydrolysis of the solid residues containing unhydrolyzed fractions requires additional cellulase, and leads to low sugars concentration hydrolysate, which is not valuable for fermentation applications.

To solve this problem, a new method of re-hydrolysis of unhydrolyzed cellulose fractions in solid residues without enzyme addition was designed in this thesis. The cellulase adsorbed by lignin fractions after the primary saccharification was utilized for the re-hydrolysis of residual cellulose and hemicellulose fractions without extra addition of cellulase. The low sugar concentration hydrolysate obtained from the re-hydrolysis was then recycled as processing water for the next round primary saccharification, thereby increasing the fermentable sugar concentration and yield of hydrolysis.

The first part of the thesis was to carry out a re-hydrolysis of unhydrolyzed cellulose fractions using the cellulase adsorbed by lignin in the wheat straw residue after primary saccharification. The low sugar concentration hydrolysate obtained from the re-hydrolysis was recycled as processing water for the next round primary saccharification. The results showed that 6.62% of cellulose and 1.52% of hemicellulose was unhydrolyzed after 24 h saccharification at 25% (w/w) solids loading, accounting for about 20% and 10% of the total

cellulose and hemicellulose in pretreated wheat straw. The re-hydrolysis of solid residues was carried out using the cellulase adsorbed on residue lignin without the extra addition of cellulase, where 40% of the cellulose and 70% of hemicellulose in the unhydrolyzed fractions were hydrolyzed to glucose and xylose. The supernatant obtained from the re-hydrolysate was used in the next round saccharification process, resulting in 88.46 ± 0.92 g/L glucose and 49.79 ± 0.39 g/L xylose (total sugar concentration of 138.25 g/L), with the glucose and xylose yields of 87.45% and 93.44%, respectively. The glucose and xylose concentrations and yields of the saccharification including re-hydrolysis process were 7.50% and 1.36%, 4.81% and 1.26% higher than those of only primary saccharification.

In the second part of this thesis, the clarified hydrolysate containing high concentration fermentable sugars obtained from the saccharification with re-hydrolysis of solid residues was evaluated for single-cell protein and microbial lipid fermentation. The biodetoxified hydrolysate was added low dosage (1.5 g/L) of sodium hypochlorite to inactive the biodetoxification strain *Paecilomyces variotii* FN89 to avoid the over-consumption of fermentable sugars. Afterward, the single-cell protein and microbial lipid fermentation was carried out in a 3 L bioreactor using the biodetoxified clarified hydrolysate. The results showed that the maximum single-cell protein titers reached 13.07 g/L and 16.68 g/L at 25% (w/w) and 30% (w/w) solids loading, which were about 25.19% and 17.13% higher than those using the hydrolysate obtained by primary saccharification. The maximum lipid titers reached 21.21 g/L and 26.24 g/L at 25% (w/w) and 30% (w/w) solids loading, which were about 18.19% and 24.48% higher than those using the hydrolysate obtained by primary saccharification.

In summary, this thesis designed and verified a strategy to improve the sugars concentration and yield in saccharification by re-hydrolysis of the residue after saccharification without fresh cellulase addition. The fermentation titers and titers of single-cell protein and microbial lipid were improved compared with those using primary saccharification hydrolysate. The re-hydrolysis of unhydrolyzed fractions by enzyme-free addition led to higher fermentation yields in separated hydrolysis and fermentation, which has potential for industrial application.

Keywords: Lignocellulose; Enzymatic saccharification; Re-hydrolysis without enzyme addition; Single cell protein; Microbial lipid

目录

第 1 章 文献综述	1
1.1 木质纤维素生物炼制	1
1.1.1 木质纤维素	1
1.1.2 木质纤维素生物炼制过程	2
1.1.3 干法生物炼制技术	4
1.2 单细胞蛋白与微生物油脂	5
1.2.1 单细胞蛋白	5
1.2.2 微生物油脂	6
1.2.3 单细胞蛋白与微生物油脂的联合生产	6
1.3 影响糖化得率的因素	6
1.3.1 高浓度葡萄糖对纤维素酶的抑制	6
1.3.2 非生产性吸附	7
1.3.3 其他影响因素	7
1.4 纤维素酶回收策略	7
1.4.1 对糖化后的游离纤维素酶进行循环利用	7
1.4.2 对糖化后的木质素残渣进行循环利用	7
1.5 本文立题依据及主要研究内容	8
第 2 章 探究残渣二次糖化提高可发酵糖浓度及得率	9
2.1 引言	9
2.2 材料与方法	9
2.2.1 物料与酶	9
2.2.2 小麦秸秆预处理	9
2.2.3 常规水解液及残渣二次糖化法获得高糖得率水解液	10
2.2.4 葡萄糖、木糖及总糖得率计算	11
2.2.5 糖类分析方法	11
2.3 结果与讨论	11
2.3.1 使用残渣二次糖化法提高糖化得率的探究	11
2.3.2 使用残渣二次糖化法对不同糖化参数的探究	14
2.3.3 不同糖化参数下残渣二次糖化法的物耗成本	17
2.3.4 生物炼制糖化环节的物料衡算	20
2.4 本章小结	22
第 3 章 利用残渣二次水解清液生产单细胞蛋白及油脂	23
3.1 引言	23
3.2 材料与方法	23

3.2.1 物料与酶.....	23
3.2.2 菌株培养.....	23
3.2.3 生物脱毒.....	24
3.2.4 同步糖化与发酵生产单细胞蛋白与油脂.....	25
3.2.5 分步糖化与发酵生产单细胞蛋白与油脂.....	25
3.2.6 菌体干重的测定.....	25
3.2.7 单细胞蛋白的测定.....	26
3.2.8 微生物油脂的测定.....	26
3.2.9 单细胞蛋白、油脂得率及成本的计算.....	27
3.3 结果与讨论.....	27
3.3.1 低剂量的次氯酸钠实现生物脱毒与发酵的快速切换.....	27
3.3.2 探究连续补料发酵生产单细胞蛋白的可行性.....	31
3.3.3 探究不同糖化体系下生产单细胞蛋白.....	34
3.3.4 探究不同糖化体系下生产微生物油脂.....	40
3.3.5 评价不同固含量下 SHF 生产单细胞蛋白及油脂成本.....	43
3.4 本章小结.....	44
第 4 章 结果与展望.....	46
4.1 结果和创新点.....	46
4.2 展望.....	46
参考文献.....	48
学术成果.....	56
致谢.....	57

第 1 章 文献综述

1.1 木质纤维素生物炼制

1.1.1 木质纤维素

木质纤维素是一种来源广泛且廉价的生物质资源^[1]。随着生物炼制工艺的成熟，使用木质纤维素生物质代替化石资源生产生物燃料、化学品及材料，可降低对不可再生能源的依赖，有效缓解二氧化碳大量排放的问题^[2,3]。

木质纤维素生物质主要由纤维素、半纤维素和木质素组成，其结构组分见图 1.1^[4]。纤维素、半纤维素及木质素这三种聚合物相互关联，形成了致密结构。其中纤维素主要由葡聚糖链组成，有晶体和非晶体结构，经过水解可获得葡萄糖^[5]。半纤维素由不同的聚合物组成。将半纤维素水解可获得木糖、阿拉伯糖、半乳糖及甘露糖等^[6]。相较于纤维素，半纤维素不仅分子量较低，而且其主链和侧链长度较短，因此更易降解^[7]。木质素一般由三种不同的苯丙烷单元通过醚链和碳碳链组成，其溶解性极差，因此木质素的降解十分困难^[8]。

在木质纤维素结构中，木质素和纤维素通过半纤维素连接，形成了纤维素-半纤维素-木质素的网络结构，这使得木质纤维素不易破坏裂解^[9]。在生物炼制中，需要进行预处理过程破坏木质纤维素的天然致密结构，从而便于后续酶解和发酵^[10]。

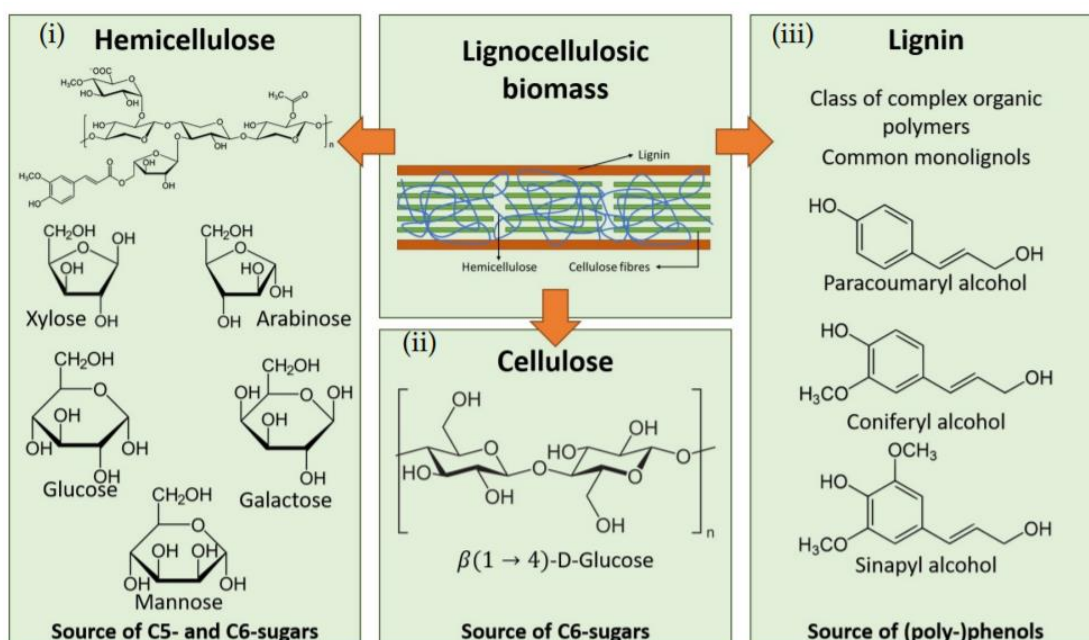


图 1.1 木质纤维素生物质及其三个主要组成部分的示意图:(i)半纤维素, (ii)纤维素和(iii)木质素^[4]

Fig.1.1 Schematic representation of lignocellulosic biomass and its three main building-blocks: (i) hemicellulose, (ii) cellulose and (iii) lignin^[4]

1.1.2 木质纤维素生物炼制过程

木质纤维素生物炼制是将木质纤维素通过水解作用转化为可发酵糖，利用可发酵糖生产生物基燃料及化学品的技术^[11]。生物炼制过程主要包括预处理、水解、脱毒、发酵以及下游的分离纯化等步骤^[12]。对于木质纤维素生物炼制流程图见图 1.2。

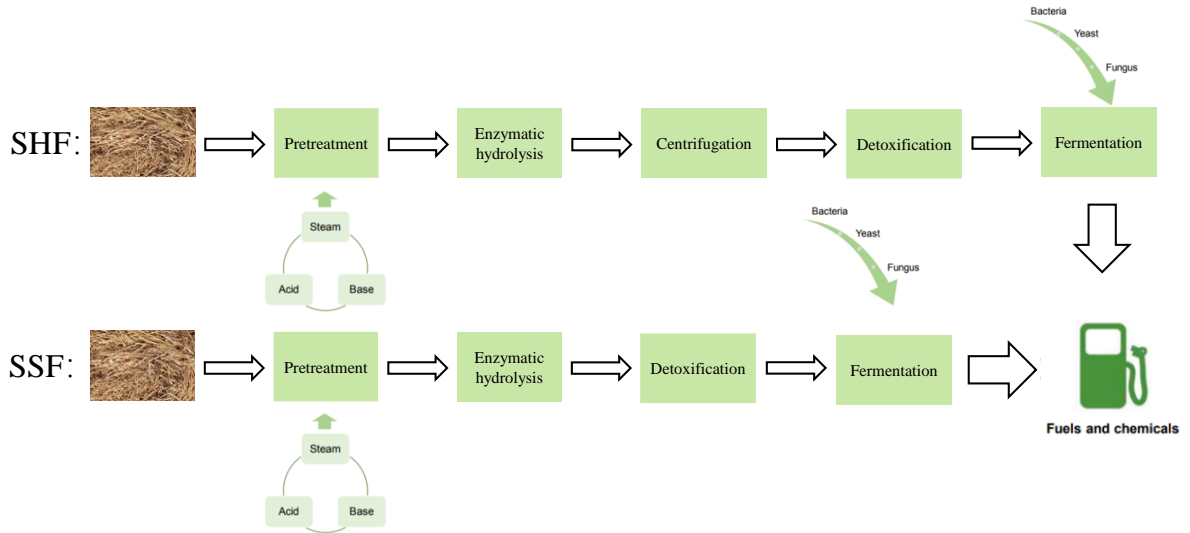


图 1.2 木质纤维素生物炼制流程图

Fig 1.2 Lignocellulosic biorefinery flowchart

(1) 预处理

预处理的目的是破坏木质纤维素的结晶结构，从而使得纤维素酶更容易降解纤维素和半纤维素。预处理一般分为单纯物理预处理、物理化学联合预处理及生物预处理^[13]。物理预处理主要通过机械力改变生物质的形状和大小，将大生物质颗粒破坏成更小的颗粒来降低木质纤维素的结晶度，增加表面积，利于后续纤维素酶对纤维素和半纤维素进行吸附水解^[14]。物理化学联合预处理主要通过改变木质纤维素的温度、pH、含水量或者根据各组分在不同化学试剂中的溶解度不同对木质纤维素进行破坏分离^[15]，常见的物理化学预处理有蒸汽爆破^[16]、氨纤维爆破法^[17]以及酸/碱预处理法^[18]。相较于单纯的机械预处理，物理化学预处理可以获得更好的预处理效果，但是在预处理过程中会产生有毒化合物^[19]。生物预处理是通过添加特定的菌株、酶或微生物联合体对木质素进行破坏和去除，相较于其它预处理具有一定的优势，包括能耗低、避免有毒化合物的产生、获得所需产品的高产量以及具有针对特定化合物的能力^[20]。用于生物预处理的微生物有细菌和真菌，常用白腐霉和软腐霉降解木质素、褐腐霉降解纤维素和半纤维素。微生物对木质纤维素的降解依赖于酶的作用，这些酶包括漆酶、多酚氧化酶、锰依赖型过氧化物酶和木质素过氧化物酶等^[21]。但是现阶段生物预处理仍有较多的缺点，例如效率较低，需要较长的时间；成本较高；需要对预处理过程进行监测；过程中可能消耗部分可发酵组分等^[22]。

(2) 水解

在生物炼制中，需要通过水解作用将生物质的纤维素及半纤维素转化为可发酵单糖，常用的两种水解方法为酸水解^[23]与酶水解^[23, 24]。酸水解是木质纤维素中的纤维素

和半纤维素在酸催化下分解成单糖的过程。使用酸水解具有以下优点：（1）不需要使用昂贵的纤维素酶；（2）酸水解反应剧烈，所需时间短；（3）酸水解不会受到底物抑制作用^[25]。但是现阶段酸水解存在诸多问题，例如对反应器腐蚀性强、酸水解的废液难以处理、效率低、处理废液所需时间长等^[25]。最重要的是酸水解纤维素在得到葡萄糖后，仍会继续反应造成可发酵糖的过度降解，严重影响最终的糖浓度与得率。

纤维素酶可以通过协同作用，高效的将纤维素和半纤维素水解成各种单体、二聚体和寡聚糖^[26]。通常认为协同作用是内切纤维素酶率先破坏纤维素的结晶区，形成外切纤维素酶需要的新的游离末端。然后外切纤维素酶从多糖链的非还原性末端切下纤维二糖单位。最后 β -葡萄糖苷酶再水解纤维二糖单位，形成葡萄糖^[27]。影响纤维素酶水解的因素主要包括温度、pH 值和底物浓度等^[28]。

（3）脱毒

为了破坏木质纤维素的结构，在严苛的预处理过程中，不可避免的会产生对微生物生长代谢有抑制的化合物^[29]。产生的抑制性化合物主要分为三类：戊糖和己糖过度降解产生的呋喃醛类化合物^[30]，例如糠醛和 5-羟甲基糠醛（HMF）^[31]；木质素过度降解成酚醛类化合物，例如香草醛和丁香醛^[32]；乙酰基及醛类化合物的氧化生成弱酸，例如乙酸及甲酸^[33]。

因此为了微生物正常生长代谢，必须通过脱毒这一过程对抑制物进行去除。脱毒方法包括物理、化学和生物法。物理法如蒸发和活性炭吸附^[34]；化学方法如氨水中和法和石灰处理法^[35]；生物脱毒法主要使用特定微生物和/或酶类处理木质纤维素水解物中的有毒化合物，将有毒化合物转化为对发酵微生物不造成影响的其他物质。相较于化学或物理方法，生物脱毒方法具有诸多优势^[36]：反应条件温和；减少化学品的使用；减轻对设备的腐蚀；降低有毒产物生成概率；对设备和能源需求较低等。

（4）发酵

在生物炼制中，发酵是指利用微生物将水解得到的可发酵糖转化为所需要的高附加值产品的过程，这一过程受到温度、pH 值、培养基的性质和组成、溶解氧等诸多因素的影响^[37]。这些变量的改变可能会影响发酵速率、产量、产物种类及其他物理化学特性^[38]。对于不同的发酵产物选择不同的发酵方法^[39]，需要考虑其是否适合发酵微生物生长以及下游处理成本等因素^[40,41]，其中下游处理主要包括分离和纯化，例如清洗、细胞破碎、蛋白质提取和纯化等步骤^[42]。

一般的发酵方式分为同步糖化与发酵以及分步糖化与发酵，其中同步糖化与发酵（Simultaneous saccharification and fermentation, SSF）的定义为在同一反应器内预处理后的木质纤维素被外源或微生物分泌的纤维素酶分解成葡萄糖并同时转化成高附加值产品的过程^[43]。由于糖化和发酵同时进行，纤维素酶水解得到的可发酵糖直接就被微生物利用，不会发生葡萄糖的累积，所以不存在产物抑制作用。纤维素酶在 SSF 过程中始终保持高活性，保证了较高的糖化得率^[44]。此外，由于 SSF 整个过程可在同一个反应器进行，也大大降低了染菌的风险。但 SSF 也存在一些问题：（1）糖化和发酵的

温度可能并不匹配,一般纤维素酶在 45-50°C 达到最佳活性^[45],而绝大部分的发酵菌株最适生长温度在 40°C 以下,例如酵母的最佳发酵温度为 30°C。(2) 不仅仅是温度,微生物和纤维素酶的最适 pH 也可能不同,酶的最适 pH 一般在 4-6 之间,而菌株如大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌的发酵最适 pH 为 7 左右^[46]。严重影响纤维素酶的活性^[47]。(3) 发酵液中存在大量的木质素残渣,难以对菌体的生长进行检测。发酵结束时,由于菌体与木质素残渣无法分离,这会对胞内产物(蛋白^[48]、油脂^[49]及聚- β -羟基丁酸酯等^[50])的提取造成影响。

分步糖化与发酵(Separated hydrolysis and fermentation, SHF)的定义是在生物炼制过程中,糖化和发酵在两个反应器中进行,先将预处理后的木质纤维素通过水解作用产生可发酵糖,随后将这些可发酵糖转化为高附加值产品的过程^[51]。因此这两个环节都可以在各自最适的添加下进行^[52],发酵产物也不会对纤维素酶造成影响^[40,53]。由于在木质纤维素糖化过程中,纤维素被持续水解,葡萄糖不断累积。在糖化后期,高浓度的糖会对纤维素酶产生抑制,使纤维素酶的活性降低。当糖化结束,木质纤维素残渣被去除,从而导致大量未水解组分的损失,可发酵糖的得率和发酵产量都低于 SSF 过程^[54]。但是,SHF 在发酵前可以将糖化液中的木质素残渣进行去除,因此发酵液的粘度低于 SSF,这就使得 SHF 下发酵液具有更好的传质,因此搅拌和通气的能耗更低^[55]。最重要的是,当最终发酵产物为胞内产物时,SHF 发酵液不含有木质素残渣,更易收集发酵菌体,便于下游胞内产物的分离提取^[56]。

1.1.3 干法生物炼制技术

本实验室应用的干法生物炼制技术,主要包括干式稀酸预处理、生物脱毒及高固含量同步糖化与发酵(SSF)等步骤。

干式稀酸预处理是在极高的固含量下,通过螺带式搅拌桨将生物质原料、酸溶液和蒸汽进行混合,充分反应,提高了预处理效率^[57]。在整个过程中,反应器中的物料始终处于一个干固体颗粒的状态,因此在预处理过程中无废水的排放^[58]。采用较少的酸溶液避免了其对预处理反应器的过度腐蚀。通过该法预处理后发酵的纤维素乙醇的产量可以达到玉米乙醇的水平^[59]。

对木质纤维素进行干酸预处理时,不仅会对木质纤维素的结构造成破坏,使其解聚水解,而且还会产生抑制性化合物^[60],其中主要是糠醛、5-羟甲基糠醛(HMF)和乙酸,这些抑制物会对微生物的细胞生长和代谢造成影响^[61]。在发酵前必须进行脱毒,相比于物理和化学脱毒,生物脱毒由于其能耗低、反应温和、选择性高等优势,可以作为更优的选择。本实验室现有两株从预处理原料分离得到的丝状真菌可有效用于去除预处理原料中的抑制物。

树脂枝孢霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 是从预处理后的玉米秸秆中筛选得到一株生物脱毒菌株,在脱毒期间,可以优先利用抑制物作为唯一碳源。*A. resinae* ZN1 可以完全适应木质纤维素体系下的高浓度抑制物,通过固态脱毒快速代谢抑制物^[62]。但是使用 *A. resinae* ZN1 面临着诸多困难:(1) 对温度和 pH 的要求高,需要维持 30°C 及中性

的条件下才可以生长和代谢抑制物；固态原料混合不均匀可能会导致局部的温度或 pH 不适合菌株的生长，影响脱毒过程；（2）对氧的需求大，因此只能生长在物料的表面；（3）该菌株只能进行固态脱毒，无法对该过程进行监测，可能会导致可发酵糖的损失；同时固体物料的密度小，所需要的反应器巨大；（4）开放式的运输极易染菌，不适合大规模生产。

宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 是从稀酸预处理后的玉米秸秆中新筛选得到的生物脱毒菌株^[63]。该菌株是一株嗜中温的丝状真菌，并且对于缺氧环境具有一定的耐受性。相比于 *A. resinae* ZN1, *P. variotii* FN89 对 pH (2.3-10.5) 和温度 (最高可至 42°C) 的耐受范围大，并且可以进行液态脱毒。在脱毒时，先代谢糠醛及 5-羟甲基糠醛，再代谢乙酸。当抑制物完全耗尽后，脱毒菌株会产生大量游离脂肪酸造成糖化液 pH 的下降。因此在生物脱毒过程中，当监测到糖化液的 pH 最高点时，即意味着脱毒的结束^[64]。通过监测 pH 来判断脱毒终点，有效避免可发酵糖的损失。

现有的干法生物炼制过程严格控制了废水的产生。过程中产生的木质素残渣可以通过燃烧用于废水的全循环，剩余的电力可以通过售出增加效益^[65]。但目前的干法生物炼制主要是围绕 SSF 展开，适用于乙醇、乳酸和糖酸等胞外产物。对于胞内产物，难以实现木质素残渣和菌体的分离，会严重影响下游产物的提取。在进行 SHF 时，糖化后大量的未水解组分与水解上清液分离，影响可发酵糖的浓度和得率。因此需要对 SHF 的糖化过程进行改进，提高可发酵糖的得率，使其可用于胞内产物的生产。

1.2 单细胞蛋白与微生物油脂

1.2.1 单细胞蛋白

伴随着世界人口的不断增长，食物匮乏一直是难题^[66]。近些年来，自然资源不足、食品需求与供应的差异不断增加，以及全球变暖、人类健康和土壤侵蚀等影响，全球有超过十亿人口营养不良，营养食物的需求与匮乏的食品供应的矛盾变得越发激烈^[67]。蛋白质是氮和必需氨基酸的来源，对于人类和动物的生长和细胞再生都是必需的，同时食物的营养价值，依赖于氨基酸含量和特定氨基酸的利用。

单细胞蛋白是一种从微生物（如细菌、酵母菌、藻类等）中提取的蛋白质。相较于动植物，微生物可以在各种环境中迅速生长，并利用多种有机物质生产蛋白质^[68]。单细胞蛋白可以作为植物和动物蛋白质的替代品，具有广阔的应用前景。使用单细胞蛋白可以满足人类在日常饮食中的蛋白质需求，也可以用于畜牧养殖中的高蛋白饲料添加剂^[69]。

通过发酵来进行单细胞蛋白的生产成本相对较低，所获得产品也更为安全健康。而在微生物中，酵母具有生长速度快、蛋白质含量高、且无毒素及致病性风险等优点，常常作为单细胞蛋白的生产菌株^[70]。生产单细胞蛋白的碳源底物较为广泛，农业废弃物、工业产品及副产品、城市生活垃圾以及沼气等都可以为微生物提供碳源。近些年，越来越多的研究选择木质纤维素来生产单细胞蛋白。木质纤维素是丰富的可再生资源，

利用木质纤维素生产单细胞蛋白，可以有效降低了单细胞蛋白的生产成本^[48]。虽然使用木质纤维素进行单细胞蛋白的生产具有诸多优势，但是由于在木质纤维素体系下，无法实现细胞与木质素残渣的分离，因此无法直接使用。木质素残渣的存在为下游的分离纯化造成了严重的影响。

1.2.2 微生物油脂

微生物油脂是指微生物通过细胞内的代谢过程产生的油脂^[71]，在细胞内通常由组成细胞结构的体质脂以及储存于胞质中的脂质体组成。其中三酰甘油（TAG）是含量最丰富的脂质成分，约占总脂质含量的 95%以上。而三酰甘油可以作为生物柴油的脂肪酸来源^[72]。与动植物相比，利用微生物生产油脂不受气候地理环境的影响而且有着更为稳定的脂肪酸构成。因此，微生物油脂可以代替植物油或者动物油进行生物柴油的生产。

在真菌、酵母、藻类和细菌等产油微生物细胞内，脂质的含量能够积累超过其干重 20%（w/w）。与其他产油微生物相比，酵母有以下产油特性：（1）菌体较大，可以更好积累油脂；（2）可以利用多种底物基质；（3）较高的金属离子耐受性^[73]；（4）容易培养并且可以利用各种廉价原材料生产油脂^[74]。在生物柴油的生产中，过高的原料成本阻碍了其大规模生产，而酵母能广泛的利用碳源，采用低成本的碳源以及简单的培养方法就可以获得高产量的油脂。使用产油酵母利用木质纤维素为原料进行油脂生产可以有效降低其原料成本，利于实现微生物油脂的工业化生产^[75]。使用木质纤维素进行微生物油脂生产与单细胞蛋白面临同样的问题，首先要进行细胞的破碎，但是木质素残渣的存在，严重影响了下游的分离纯化。

1.2.3 单细胞蛋白与微生物油脂的联合生产

产油微生物通常具有积累高密度菌体量的能力，同时这些微生物在生长过程中，菌体大约有 30%的蛋白含量^[76]。因此用来生产单细胞蛋白的同时获得微生物油脂。到目前为止，已经研究了许多能够共同生产微生物油脂和蛋白质的微生物。例如，产油酵母 *Pichia guilliermondii* 可以利用广泛的基质进行高密度发酵，使用甘油和玉米浆（CSL）作为发酵底物时，*P. guilliermondii* 可以获得最大的菌体干重为 24.47 g/L，油脂含量为 52.09%^[77]；油脂微生物 *Mucor circinelloides* 在 6 L 生物反应器中培养 2 天后，获得 20 g/L 的菌体干重，其中油脂含量为 46%，蛋白含量为 30%^[78]。单细胞蛋白与微生物油脂的联产，可以将菌体中的油脂进行提取，用作生物柴油的原料，而剩余的菌体可以作为蛋白产品例如动物饲料^[79]，联产单细胞蛋白和微生物油脂这一策略合理利用生产过程得到的副产物，进一步提高经济效益。

1.3 影响糖化得率的因素

1.3.1 高浓度葡萄糖对纤维素酶的抑制

纤维素酶是一种复合酶，其中的 β -葡萄糖苷酶对终产物葡萄糖十分敏感^[80]。在水解过程中，高浓度的葡萄糖会抑制 β -葡萄糖苷酶的活性，这导致了纤维二糖和寡糖的

积累。积累的纤维二糖会进一步抑制外切葡聚糖酶的活性，而寡糖则会进一步抑制内切葡聚糖酶的活性^[81,82]。这一连锁反应直接导致在高糖水解液中的纤维素酶降解效率降低。

1.3.2 非生产性吸附

使用纤维素酶对预处理后的木质纤维素进行水解时，木质素在疏水、静电、氢键等多种因素下会与纤维素酶结合^[83,84]。由于纤维素酶被木质素吸附，因而不能对纤维素进行水解，将这种现象称作纤维素酶的非生产性吸附^[85]。

在糖化液中，一部分纤维素酶被固体残渣吸附，另一部分纤维素酶则是游离在酶水解后的上清液中，其中固体残渣主要包括木质素以及未水解的纤维素^[86]。研究发现，在酶解反应后，稀碱预处理和稀酸预处理小麦秸秆的未水解固体残渣分别吸附了 49% 和 72% 的纤维素酶^[87]。

1.3.3 其他影响因素

在实际的糖化过程中，除了高浓度葡萄糖对于纤维素酶的产物抑制和纤维素酶的非生产性吸附外，温度、pH、含水量以及搅拌转速等都会影响最终的糖化得率。而纤维素酶对温度和 pH 较为敏感^[45]，一般商业纤维素酶的最佳温度为 45-50 °C，过高的温度会使得纤维素酶变性而失去活性；纤维素酶的最适 pH 值一般为 5.0-5.5，纤维素酶对 pH 较为敏感，只有在最适 pH 范围下才能表现更高的活性。这些因素之间的相互作用可以对纤维素酶的活性产生复杂的影响，一般在糖化过程中需要严格控制温度、pH、固液比等因素来实现最佳的酶活性。

1.4 纤维素酶回收策略

1.4.1 对糖化后的游离纤维素酶进行循环利用

在生物炼制过程中，一大部分的生产成本来自纤维素酶，并且在发酵结束后，有大量的纤维素酶游离在发酵液中^[88]。为了降低纤维素酶的成本，有必要对这些游离酶进行回收再利用。Rahikainen 等人^[88]采用超滤法对预处理松木水解上清液的纤维素酶进行回收，将回收得到的酶在后续的水解中与新鲜底物反应。结果表明回收上清液得到的纤维素酶仍保持较高的活性，对其再利用可以降低后续新鲜酶的添加量。同样的，Qi 等人^[89]对碱预处理的小麦秸秆水解液中的纤维素酶进行回收再利用，结果表明纤维素酶在回收后仍具有较高的活性，从而减少了在后续的水解过程中新鲜酶的添加量。

然而在游离纤维素酶的回收过程中存在许多问题：（1）不同的预处理方式可能会导致木质素对纤维素酶有不同的吸附性，例如稀碱处理的吸附性弱于稀酸处理^[87]。因此无法判断游离纤维素酶在水解液中的含量；（2）不同回收方法的回收率存在较大差异，并且会产生额外回收成本，例如超滤法使用的滤膜^[90]；（3）有诸多因素会导致回收的纤维素酶活性降低，例如高温导致的失活、吸附结合木质素等^[91,92]。

1.4.2 对糖化后的木质素残渣进行循环利用

在水解过程中，吸附在木质纤维素残渣上的纤维素酶仍保留大量活性。因此可以

对其进行再利用^[91]。有大量研究尝试将结合的纤维素酶从固体残渣中解吸或直接回收未完全水解的固体残渣并用于下一批次的酶解^[93,94]。Gomes 等人^[85]对预处理后的废纸渣进行酶水解,用碱溶液将残渣上的纤维素酶进行洗脱。通过这个方法节省了 53-60% 的纤维素酶,最终减少了 40% 的处理成本。Rodrigues 等人^[95]对水解后吸附在固体残渣上的纤维素酶进行解吸附,对解吸附的纤维素酶进行回收再利用。然而此过程需要过滤才能得到纤维素酶,并且解吸附所用的溶液可能会对纤维素酶的活性造成影响。最重要的是解吸过程适用于不含木质素或者木质素含量较低的原料,否则会严重影响纤维素酶的解吸过程^[96]。

相较于对吸附在固体残渣上的纤维素酶进行解吸,直接将未水解的固体残渣作为下一次酶解过程使用的纤维素酶在工业生产中更容易操作^[97]。Zheng 等人^[98]对稀酸预处理后的玉米秸秆进行糖化,将糖化后的残渣直接应用于下一次糖化,补充少量新鲜的纤维素酶,通过循环残渣可以节约 30% 纤维素酶。然而将固体残渣直接作为纤维素酶加入到下一轮糖化,需要对吸附的纤维素酶含量进行测定,无法保证纤维素酶的用量。最重要的是循环利用固体残渣会导致糖化液的固含量以及木质素含量不断增大^[99]。

由于木质素的存在会对纤维素酶产生严重影响^[94]。一方面,木质素通过空间位阻抑制高固含量的酶解反应^[100];另一方面,木质素还会对酶的再利用效率产生负面影响^[101]。因此利用含木质素的高固含量物料,对于糖化后的纤维素酶的再利用还需要不断探索^[102]。在对固体残渣的回收利用中,需要寻找避免木质素不断积累的方法。

1.5 本文立题依据及主要研究内容

木质纤维素 SSF 过程中菌体与木质素残渣无法分离,因此并不适用于胞内产物的生产及提取。然而现有的 SHF 过程得到的可发酵糖浓度和得率均比较低,需要尽可能的提高其糖化效率。为了实现上述目标,本论文研究了如下内容:

(1) 探究利用木质纤维素残渣二次水解上清液提高糖化后可发酵糖浓度及得率的可行性。糖化后,木质素残渣上吸附有大量的纤维素酶以及未水解的组分。通过对糖化液进行离心,对沉淀残渣进行二次糖化,将残渣糖化后的上清液作为下一次糖化过程的工艺水,从而提高可发酵糖浓度及得率。

(2) 在发酵过程中,脱毒菌株的存在不仅会消耗可发酵糖,同时会抑制发酵菌株的生长。因此在发酵前需要对其进行灭活处理。通过添加次氯酸钠来代替高温灭活,有效避免了可发酵糖的损失并降低能耗。

(3) 通过生产单细胞蛋白及微生物油脂对获得的水解清液进行发酵验证,并且与 SSF 和 SHF 的产量及得率进行对比。

第2章 探究残渣二次糖化提高可发酵糖浓度及得率

2.1 引言

在木质纤维素生物炼制过程中，水解及发酵过程通常分为两种方法：同步糖化与发酵（SSF）以及分步糖化与发酵（SHF）。其中 SHF 是先对木质纤维素物料进行酶水解获得高糖浓度的水解液，再进行发酵获得发酵产品。而 SSF 能够在发酵过程中持续对底物进行水解，并释放低浓度的可发酵糖，因此其糖得率和最终产品产量均优于 SHF。但是 SSF 并不适用胞内产品的生产。这是由于在下游分离过程中，菌体会和木质素残渣混合，难以分离最终产物。因此需要在清液下进行胞内产品的生产，对于发酵液进行离心，此时发酵菌体会沉淀在底部，便于分离提取。

为了适应胞内产品的生产，需要尽可能提高 SHF 的可发酵糖的浓度和得率。在糖化过程中，高浓度可发酵糖抑制纤维素酶的活性，而未水解的木质纤维素残渣在糖化后需要进行分离，这会导致大量未水解组分的损失，降低了可发酵糖的浓度和得率。木质纤维素经过酶水解后会残留大量木质素以及未水解的纤维素，这些木质素在疏水、静电、氢键等多种因素的协同作用下与纤维素酶结合。对于碱预处理和酸预处理后物料在水解后，从残渣中分别发现了 49%和 72%蛋白含量，有大量的纤维素酶与未水解的残渣结合在一起^[87]。因此，回收 SHF 中的未水解固体组分是提高其糖得率的有效方法。

本章研究提高糖化过程的可发酵糖浓度及得率。通过对吸附在木质纤维素残渣上的纤维素酶进行再利用，不添加纤维素酶，对残渣进行二次糖化。将得到的水解上清液用于新一轮的糖化过程，以提高糖化过程中的糖浓度与得率。首先探究了残渣二次糖化的可行性；其次对残渣二次糖化过程中的关键参数进行了研究；最后对糖化过程的物耗成本进行了技术经济评价。

2.2 材料与方法

2.2.1 物料与酶

使用的预处理原料为小麦秸秆，根据 NREL 组分测定方法^[103]，测得小麦秸秆纤维素含量为 34.55%，半纤维素含量为 21.91%，木质素含量为 20.36%，灰分含量为 9.57%，其中各组分均按照干重计算。

用于糖化水解的纤维素酶为 Cellic CTec3HS，购自诺维信（中国，北京）。根据制造商提供的数据，其总蛋白浓度为 90.1 mg/mL。

2.2.2 小麦秸秆预处理

根据本实验室 Zhang^[104]等人研发的干式稀酸法对小麦秸秆进行预处理。小麦秸秆通过粉碎机粉碎后，尺寸变为 10 ± 2 mm 后，随后进行干酸法预处理。小麦秸秆和酸溶液按照固液比 2:1 的比例加入到预处理反应器中。硫酸的用量为每 100 kg（干重）小麦秸秆添加 4 kg 浓硫酸。在预处理开始前需要搅拌 1 min 以使得小麦秸秆与稀硫酸溶液混

合均匀，之后进行升温，在 50 rpm 和 175°C 下保持 5 min。预处理结束后，原料从反应器底部排出。使用碳酸钙将预处理后物料 pH 调至 5.5 后，通过盘式粉碎机处理粉碎长纤维及大块预处理物料。粉碎后的物料可以直接进行水解。其中对预处理后小麦秸秆组分测定，测得纤维素含量为 31.02%、木聚糖含量为 5.89%、葡萄糖 39.31 mg/g、木糖 110.93 mg/g、乙酸 28.3mg/g、HMF3.9 mg/g、糠醛 4.2 mg/g。

2.2.3 常规水解液及残渣二次糖化法获得高糖得率水解液

对中和后的预处理后小麦秸秆进行水解。水解过程在 5 L 生物反应器中进行，将计算好的预处理物料、水（按照所需固含量）及纤维素酶（2-6 mg/g DM）加入其中进行糖化，糖化参数为：200 rpm、50°C、24 h、pH 为 5.5。

残渣二次糖化法获得高糖得率水解液是在第一次对糖化液离心后，将离心沉淀的残渣进行二次糖化。其中对残渣进行糖化的参数为：20%（w/w）固含量、200 rpm、50°C、12 h，此过程不添加纤维素酶。在残渣进行糖化后，继续进行离心，在 8000 rpm 转速下离心 10 min，取离心上清液替代下一次糖化过程加入的水，按照糖化所需固含量补充剩下部分的水，重新开始糖化，糖化结束后在 8000 rpm 的转速下离心 10 min，上清液继续进行后续的脱毒及发酵。此时所得水解液即为使用残渣二次糖化法获得的高糖得率水解液（流程图见图 2.1）。

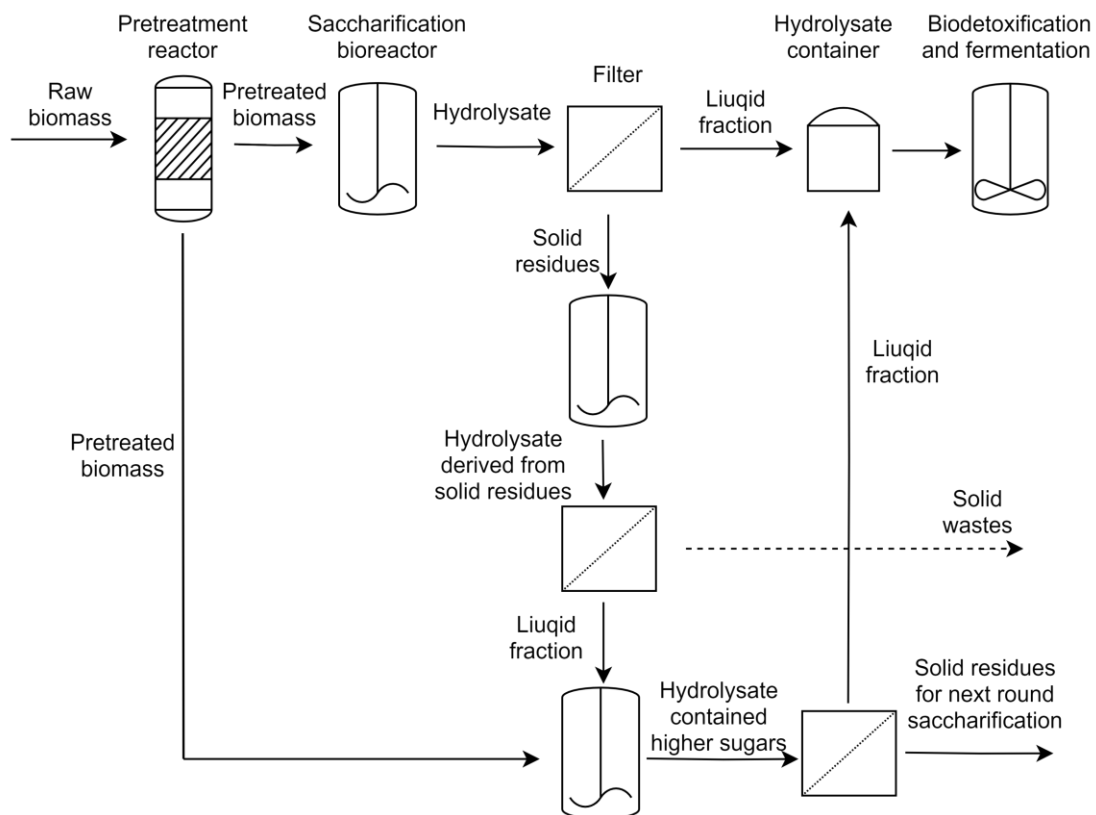


图 2.1 残渣二次糖化法获得水解液流程图

Fig.2.1 Flow chart for obtaining hydrolysate by re-hydrolysis of residue

2.2.4 葡萄糖、木糖及总糖得率计算

用木质纤维素原料进行糖化后，糖化所得可发酵糖的得率计算公式如下：

$$\text{Glucose yield (\%)} : Y_{\text{Glucose}} = \frac{V \times ([\text{Glu}] - [\text{glu}])}{S \times f_1 \times X_1} \times 100\% \quad (2-1)$$

公式 (2-1) 中， Y_{Glucose} (%) 为葡萄糖得率； V (L) 为糖化结束所得的液体体积； $[\text{Glu}]$ (g/L) 为糖化所得葡萄糖的浓度； $[\text{glu}]$ (g/L) 为糖化初始葡萄糖的浓度； S (g) 为糖化使用的木质纤维素的干重质量； f_1 为纤维素转化为单糖的系数 1.11； X_1 (%) 为木质纤维素的纤维素含量。

$$\text{Xylose yield (\%)} : Y_{\text{Xylose}} = \frac{V \times ([\text{Xyl}] - [\text{xy1}])}{S \times f_2 \times X_2} \times 100\% \quad (2-2)$$

公式 (2-2) 中， Y_{Xylose} (%) 为木糖得率； V (L) 为糖化结束所得的液体体积； $[\text{Xyl}]$ (g/L) 为糖化所得木糖的浓度； $[\text{xy1}]$ (g/L) 为糖化前游离的木糖浓度； S (g) 为糖化使用的木质纤维素的干重质量； f_2 为半纤维素转化为单糖的系数 1.136； X_2 (%) 为木质纤维素的半纤维素含量。

$$\text{Total sugar yield (\%)} : Y_{\text{Total}} = \frac{V \times ([\text{Glu}] + [\text{Xyl}] - [\text{xy1}])}{S \times (f_1 \times X_1 + f_2 \times X_2)} \times 100\% \quad (2-3)$$

公式 (2-3) 中， Y_{Total} (%) 为总糖得率； V (L) 为糖化结束所得的液体体积； $[\text{Glu}]$ (g/L) 为糖化所得葡萄糖的浓度； $[\text{Xyl}]$ (g/L) 为糖化所得木糖的浓度； $[\text{xy1}]$ (g/L) 为糖化前游离的木糖浓度； S (g) 为糖化使用的木质纤维素的干重质量； f_1 为纤维素转化为单糖的系数 1.11； f_2 为半纤维素转化为单糖的系数 1.36； X_1 (%) 为木质纤维素的纤维素含量； X_2 (%) 为木质纤维素的半纤维素含量。

2.2.5 糖类分析方法

葡萄糖及木糖采用配备 RID-10A 检测器和 HPX-87H 型色谱柱进行高效液相测定。其中 5 mM 硫酸溶液作为流动相，流速为 0.6 mL/min。

2.3 结果与讨论

2.3.1 使用残渣二次糖化法提高糖化得率的探究

为了验证高浓度可发酵糖对于纤维素酶的产物抑制，探究在 2、4 mg/g DM 纤维素酶用量下，对不同固含量的预处理小麦秸秆进行长时间的糖化。检测糖化期间葡萄糖及木糖浓度，同时对其糖得率的变化进行分析（见图 2.2）。

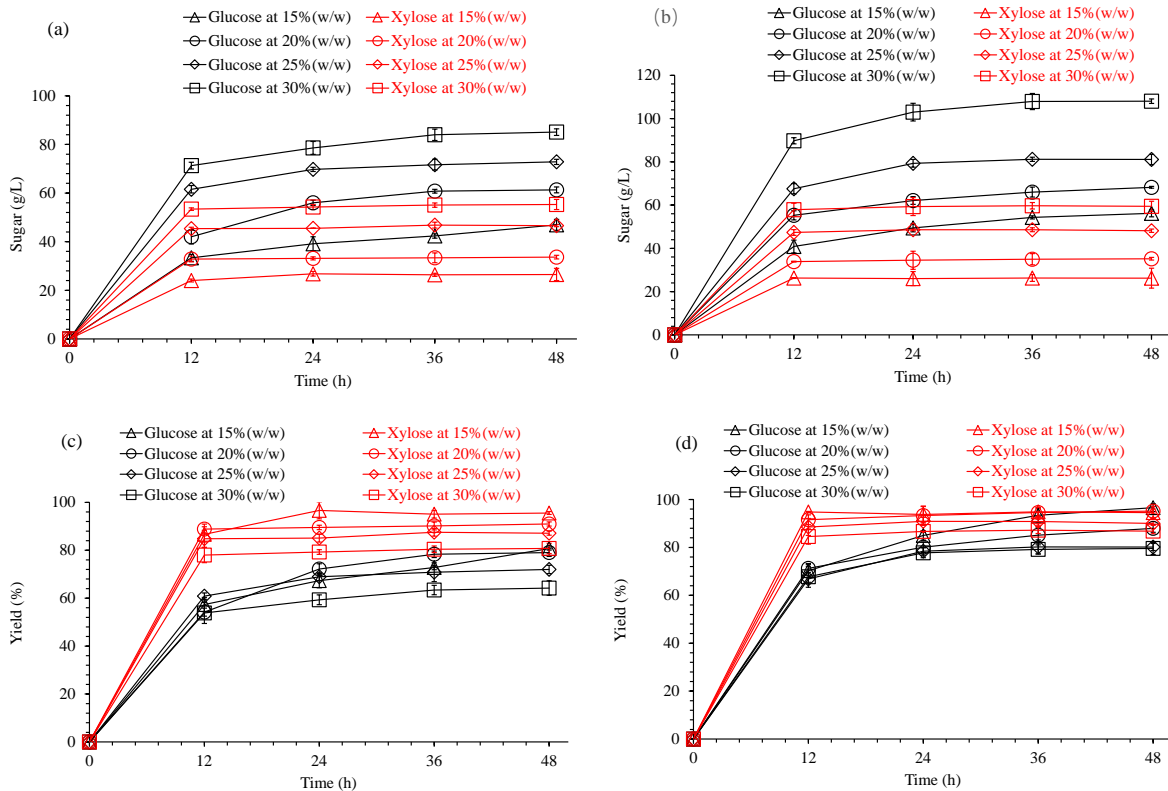


图 2.2 对不同固含量及纤维素酶用量预处理小麦秸秆进行糖化得到的糖浓度及得率

(a) 在 2 mg/g DM 纤维素酶用量下得到的糖浓度；(b) 在 4 mg/g DM 纤维素酶用量下得到的糖浓度；
(c) 在 2 mg/g DM 纤维素酶用量下得到的糖得率；(d) 在 4 mg/g DM 纤维素酶用量下得到的糖得率。

Fig.2.2 Sugar concentration and yield obtained by saccharification of wheat straw pretreated wheat straw with different solids loadings and cellulase dosages

对预处理后的小麦秸秆进行糖化，糖化条件：糖化温度 50°C、搅拌 200 rpm、预处理物料通过 CaCO₃ 调至 pH 5.5。

对于两组不同纤维素酶用量实验组，经过 12 h 的糖化，木糖的浓度基本不再上升，这是由于木聚糖相较于纤维素更快水解，后续木糖浓度变化不大，意味着大部分的木聚糖已被水解；高纤维素酶用量的实验组的糖化优势主要体现在糖化前 24 h，尤其是前 12 h。在糖化时间超过 24 h 之后，不同纤维素酶用量实验组的葡萄糖浓度上升缓慢，高浓度可发酵糖的产物抑制效果十分强烈。

在葡萄糖得率上，糖化 24 h 至 48 h 之间，对于葡萄糖得率的提升均不到 2%，因此在糖化时间超过 24 h 之后，后续的糖化对于糖化总糖的提升影响变小，可能是以下几个方面：(1) 由于大部分的纤维素酶及木聚糖已被水解成葡萄糖和木糖，纤维素酶与纤维素的接触减少；(2) 部分的纤维素酶吸附在木质素上，无法提供水解作用；(3) 在较高的糖浓度下，纤维素酶的活性降低，水解作用减弱。

高浓度的葡萄糖对于纤维素酶具有产物抑制的效果，这一现象会对纤维素酶的活性造成影响，可以考虑将糖化得到的高浓度可发酵糖进行收集，从而避免高浓度的葡萄糖对纤维素酶的产物抑制作用。因此可以通过离心的方法，来将糖化出来的高浓度葡萄糖与未水解的木质纤维素组分进行分离，这一步骤可以避免产物抑制的现象，恢

复纤维素酶的活性，进而提高糖化效率。由于大量纤维素酶吸附在木质素残渣上，因此在不额外添加纤维素酶的情况下，对于残渣实现二次糖化，提高糖化得率，节省糖化的成本。

为了探究利用残渣二次水解上清液的可行性，需要连续进行多次的残渣糖化实验，从而判断该过程对下一次糖化造成影响。选择 25% (w/w) 固含量的预处理后小麦秸秆进行糖化实验。对糖化后的沉淀残渣二次糖化，糖化后离心，得到的离心上清液作为新一轮糖化体系中加入的水，重复进行此步骤。在进行实验后，发现采用残渣二次糖化法第 2 次、第 3 次及第 4 次的糖化结果与第 1 次得到的糖浓度非常接近。通过残渣二次糖化法连续进行 4 次糖化后，糖化得到的糖浓度并没有明显变化，得到的可发酵糖浓度已经趋于稳定。对 25% (w/w) 固含量的糖化体系进行残渣二次糖化探究，常规糖化对照组及 4 次残渣二次糖化法得到的葡萄糖浓度及其得率与木糖浓度及其得率结果见图 2.3。

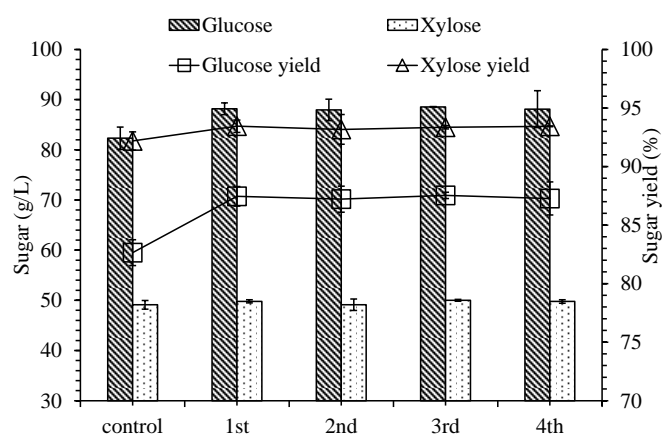


图 2.3 加入残渣二次水解的上清液得到的糖浓度与得率

Fig.2.3 Sugar concentration and yield were obtained by adding the supernatant of the re-hydrolysis residue

其中，“control”：未进行残渣二次糖化得到的水解清液；“1st”：进行残渣二次糖化得到的水解上清液应用于下一次糖化得到的水解液；“2nd”：对“1st”最后糖化得到的残渣进行残渣二次糖化得到的水解上清液用于下一次糖化得到水解上清液；“3rd”：对“2nd”得到的残渣进行残渣二次糖化法得到的水解上清液；“4th”：对“3rd”得到的残渣进行二次糖化法得到的水解上清液。预处理物料糖化参数为：固含量为 25 % (w/w)、搅拌 200 rpm、50°C、pH 5.5、4 mg/g DM 纤维素酶用量、24 h。在糖化后进行离心后对残渣进行再次糖化，糖化参数：固含量为 20 %、搅拌 200 rpm、50°C、pH 5.5、不额外添加纤维素酶、12 h。随后对残渣糖化得到的水解液在 8000 rpm 下离心 10 min，取上清液添加到下一轮糖化中，连续进行 4 次这样的操作。

在 25% (w/w) 固含量糖化体系下，与对照组的水解液相比，残渣二次糖化法得到的水解液葡萄糖浓度上升了约 6 g/L，木糖浓度上升了约 0.7 g/L，总糖多了约 6.7 g/L；在糖得率方面，采用残渣二次糖化法得到的水解液相较于对照组糖化的葡萄糖得率提高了 4.81%，木糖提高了 1.26%，后续的糖化情况均与第一次利用残渣二次糖化上清液

结果类似。通过连续四次的利用残渣二次糖化上清液，在高固含量的糖化体系下，进行该策略是实际可行的，对于最终糖化得到的总糖一定程度上有所提升。

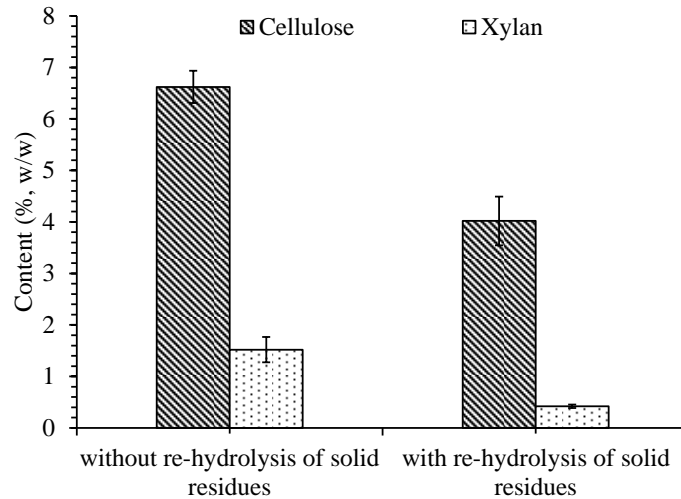


图 2.4 残渣二次糖化前后组分

Fig.2.4 The re-hydrolysis residue components

对 25% (w/w) 固含量的预处理小麦秸秆进行糖化，得到的残渣进行二次糖化。糖化参数为：20% (w/w) 固含量、200 rpm、50°C、pH 5.5、不添加纤维素酶。

在残渣二次糖化前后，对固体残渣进行组分分析，主要是其纤维素和木聚糖的含量（图 2.4），即使在不额外添加纤维素酶，仅靠吸附在残渣上的纤维素酶进行糖化后，纤维素也得到水解，其含量有所下降，从 6.62% 降至 4.02%，下降了 2.60%；而木聚糖也从 1.52% 降至 0.42%，下降了 1.10%，相较于纤维素水解较差，可能是木聚糖在第一次糖化后，所剩含量就已经很低，从而纤维素酶与其接触水解的概率远低于纤维素。

本研究所选择的利用残渣二次糖化上清液并不是对于糖化过程中的纤维素酶的回收，仅仅是对于吸附在木质素残渣上的纤维素酶的再利用，相较于对纤维素酶进行回收，该方法仅通过离心，并不涉及过滤。以 25% (w/w) 固含量的小麦秸秆进行糖化实验，结果证明对于高固含量的糖化体系是切实可行的，具有实际应用价值。因此后续将对不同糖化参数的糖化体系继续进行残渣二次糖化法的探究。

2.3.2 使用残渣二次糖化法对不同糖化参数的探究

通过对干式酸法预处理后的小麦秸秆进行长时间的糖化，探究发现糖化时间超过 24 h 后，糖浓度并未显著上升，因此将糖化时间设置为 24 h。为了有效的提高糖化得到的可发酵糖浓度及得率，将糖化液进行离心，对残渣中未水解的木质纤维素进行二次糖化。通过上述实验，验证了残渣二次糖化具有可行性，接下来通过改变糖化过程中纤维素酶的用量或者糖化体系的固含量这两种方法，对糖化关键参数进行研究，检验糖化得到可发酵单糖的浓度及得率，验证该方法的普适性。

糖化过程中，纤维素酶用量和糖化固含量是影响糖化效率及糖浓度的关键参数。

本小节对糖化的不同固含量和纤维素酶用量进行探究。在低固含量下糖化得到的可发酵单糖浓度较低且最终发酵得到的产量也较低，因此为了使糖化后的总糖浓度高于 100 g/L，糖化的固含量参数从 20% (w/w) 开始，由于过高的糖化固含量使得糖化液粘度变大，从而影响传质效率，且最终得到的离心清液量会随着固含量的增加而降低，不利于后续进行残渣糖化，因此将糖化的最高固含量设置为 35% (w/w)。

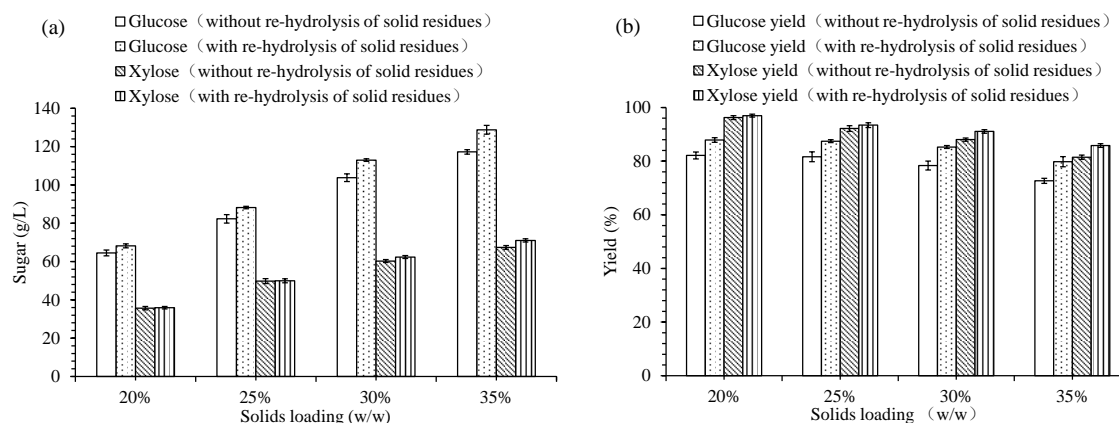


图 2.5 在不同固含量下进行及未进行残渣二次糖化得到的糖浓度及得率

(a) 可发酵糖浓度; (a) 可发酵糖得率.

Fig.2.5 Sugar concentrations and yields obtained with and without re-hydrolysis of residues at different solids loadings

对不同固含量预处理小麦秸秆进行糖化，糖化参数为 50°C、200 rpm、纤维素酶用量为 4 mg/g DM。随后对糖化液进行离心，离心后的残渣进行二次糖化，不添加纤维素酶得到的残渣水解液继续离心取上清，作为下一次糖化过程加入的水，进行新一轮糖化。将未进行残渣二次糖化的实验组作为对照组。

随着固含量的增加，糖化液中的木质素含量也会增加，吸附在木质素上的纤维素酶变多，游离的纤维素酶含量下降，导致糖化效率低下。不同固含量的小麦秸秆利用残渣二次糖化法对其进行糖化，与对照组相比，葡萄糖浓度显著提升，在 20% (w/w)、25% (w/w)、30% (w/w) 及 35% (w/w) 固含量条件下糖化后，葡萄糖浓度分别为 68.18 g/L、88.16 g/L、112.94 g/L 及 128.76 g/L (图 2.5)，相比于对照组的葡萄糖浓度分别提高了 5.72%、7.12%、8.82% 及 9.84%。不同固含量实验组在进行残渣循环糖化后，对于葡萄糖得率的提升均在 5% 以上，木糖得率提升效果并不显著。以上结果表明，通过残渣二次糖化法，可以有效提高小麦秸秆在较高固含量条件下糖化效率低下的不足。

采用残渣二次糖化法对小麦秸秆进行糖化可以有效提高葡萄糖的得率，高葡萄糖浓度得到的发酵产物浓度更高。葡萄糖浓度及得率的提升反映了吸附在木质素残渣上的纤维素酶在进行再次糖化时，对于未水解的纤维素进行再次水解，在第一次糖化时得率越低，那么再次糖化的效果越好，这也是由于未水解的纤维素越多，那么吸附在残渣上的纤维素酶的水解效果越明显。

在探究了不同固含量预处理物料进行利用残渣二次糖化法后，继续研究不同纤维素酶用量，纤维素酶的用量从 2 mg/g DM 开始，低于这个用量，高固含量的糖化无法很好液化成糖化液。比较纤维素酶用量对于糖化液浓度及得率的影响。

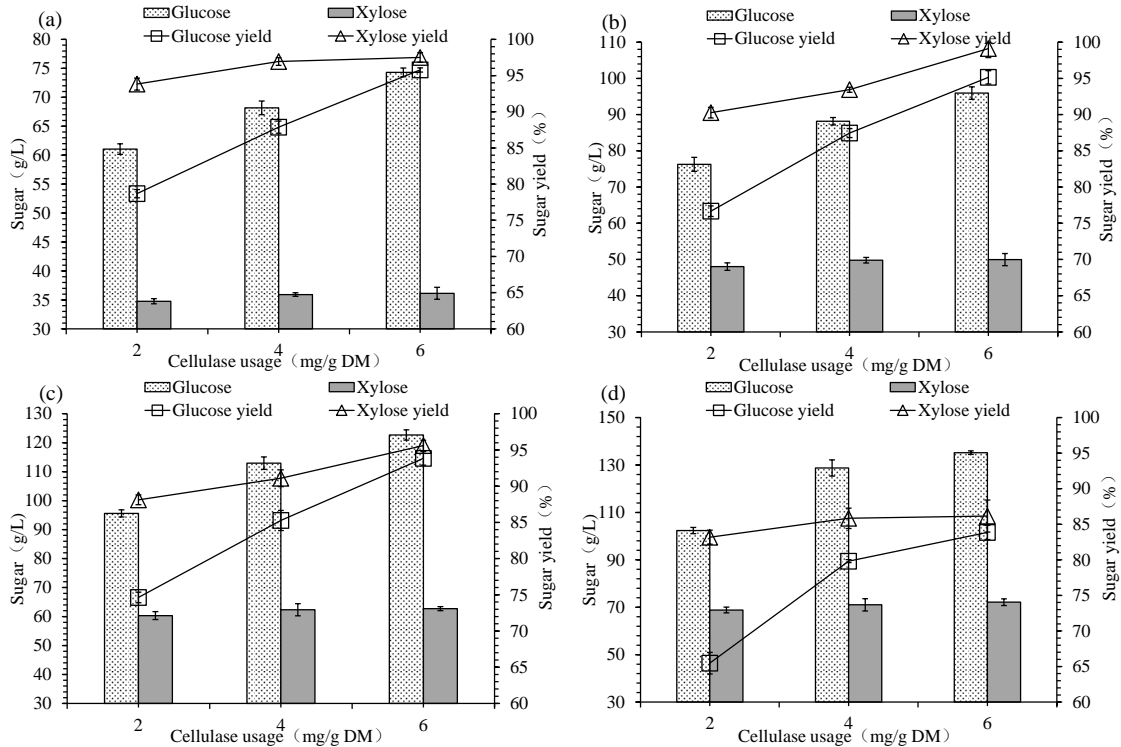


图 2.6 不同固含量及纤维素酶用量进行残渣二次糖化获得的糖浓度及得率

(a) 20% (w/w) 固含量; (b) 25% (w/w) 固含量; (c) 30% (w/w) 固含量; (d) 35% (w/w) 固含量.

Fig.2.6 Sugar concentration and yield obtained by re-hydrolysis of residue with different solids loadings and cellulase dosages

对不同固含量的预处理小麦秸秆进行糖化，糖化参数为：搅拌 200 rpm、50°C、pH 5.5、4 mg/g DM 纤维素酶用量。在糖化后对糖化液进行离心后，得到残渣对其进行再次糖化，糖化参数：固含量为 20%、搅拌 200 rpm、50°C、pH 5.5、不额外添加纤维素酶。将残渣糖化液进行离心，取上清液作为新一轮糖化过程加入的水。

比起固含量对糖化所得可发酵糖浓度与得率的影响，纤维素酶用量的影响更加明显（图 2.6），但是对于 35% (w/w) 固含量，由于过高的固含量导致糖化效果受到严重影响，即使在高纤维素酶用量下，35% (w/w) 固含量预处理小麦秸秆糖化后的葡萄糖得率仅为 83.85%。其他固含量的预处理小麦秸秆在 6 mg/g DM 纤维素酶用量下糖化后，均能使得葡萄糖得率在 90%以上。对于低纤维素酶用量和高纤维素酶用量，有的实验组葡萄糖得率差距能达到约 20%。但是对于高固含量糖化体系，提高纤维素酶用量，对于得率基本没有影响，可能是由于高固含量糖化出更高浓度的糖，高浓度的可发酵糖对纤维素酶造成产物抑制的作用，降低了纤维素酶的活性。

即使高纤维素酶用量意味着高糖浓度及高糖得率，但是同时更意味着更高的糖化成本，因此从经济角度综合分析不同糖化参数下使用残渣二次糖化法的成本。

2.3.3 不同糖化参数下残渣二次糖化法的物耗成本

对于不同固含量及纤维素酶用量的糖化体系使用残渣二次糖化法对预处理小麦秸秆进行糖化，最终糖浓度及得率都取得了不同程度的提升，但是进行大规模生产和工业化应用，高可发酵糖浓度及得率不是唯一标准，糖化所需要的纤维素酶成本以及所使用的物料成本也同样重要，只有符合经济学效益，该工艺才能进行推广。因此以最终糖化得到 1 t 可发酵糖所需要的成本作为指标，对各糖化参数下的残渣循环进行比较。对于成本，这里主要计算糖化过程所需的物料和纤维素酶成本。物料使用的是小麦秸秆，按照目前市场上 1 t 小麦秸秆售价区间在 580 CNY 至 680 CNY 之间，取平均值即 630 CNY；各实验组进行糖化使用的纤维素酶都是 Cellic CTec3 HS，按照目前市场价格为每千克售价 21 CNY。计算结果见表 2.1。

表 2.1 不同糖化体系的物耗成本

Table.2.1 The cost of different saccharification systems

Solids loading (w/w)	Cellulase dosage (mg/g DM)	Cellulase addition (kg enzyme protein/t sugar)	Cellulase cost (CNY/t sugar)	Raw material addition (t wheat straw/t sugar)	Raw material cost (CNY/t sugar)	Total cost (CNY/t sugar)
20%	4	10.06	2347.33	2.23	1406.29	3753.62
25%	2*	6.00	1400.00	2.51	1581.30	2981.30
25%	4	10.03	2340.33	2.23	1407.35	3747.68
25%	6	14.11	3233.33	2.11	1330.56	4563.89
30%	2*	5.67	1323.00	2.64	1663.20	2986.20
30%	4	10.21	2383.78	2.37	1493.10	3876.88
30%	6	14.26	3327.33	2.25	1417.50	4744.83
35%	4	11.06	2580.67	2.53	1593.90	4174.57

其中“*”说明 2 mg/g DM 的实验组最终获得的可发酵糖浓度及得率偏低，不利于后续发酵产物的积累。此外，在后续的残渣二次糖化过程中，可发酵糖得率较低。

在 20% (w/w) 固含量体系下, 糖化出的总糖浓度为 104.10 g/L, 葡萄糖得率为 87.88%, 最终总糖得率为 90.91%, 生产 1 t 的可发酵糖所需要的纤维素酶成本为 2347.33 CNY, 同时需要小麦秸秆 2.23 t, 总成本一共是 3753.62 CNY; 对于 25% (w/w) 固含量体系, 糖化出的总糖为 137.95 g/L, 葡萄糖得率为 87.45%, 最终总糖得率为 88.43%, 生产 1 t 的可发酵糖所需要的纤维素酶成本为 2340.33 CNY, 总成本一共是 3747.68 CNY; 对于 30% (w/w) 固含量体系, 糖化出的总糖浓度为 175.31 g/L, 葡萄糖得率为 85.26%, 最终总糖得率为 86.18%, 生产 1 t 的可发酵糖所需要纤维素酶成本为 2383.78 CNY, 总成本一共是 3876.88 CNY; 对于 35% (w/w) 固含量体系, 糖化出的总糖为 199.78 g/L, 葡萄糖得率为 79.82%, 最终总糖得率为 82.13%, 生产 1 t 的可发酵糖所需要纤维素酶成本为 2580.67 CNY, 总成本一共是 4174.57 CNY, 由于其糖得率较低, 因此总成本最高, 较其它实验组成本提高了 7.69%以上。

比较 35% (w/w) 固含量和其他的固含量, 纤维素酶成本提高了约 10%。随着固含量的提升, 总糖浓度也随着提高, 这就不可避免的对纤维素酶产生产物抑制, 对于纤维素酶的活性造成负面影响。对 20% (w/w)、25% (w/w) 及 30% (w/w) 固含量实验组进行研究发现, 它们的纤维素酶成本十分接近, 因此它们最终成本取决于所使用的原料成本, 而原料成本取决于可发酵糖得率, 得率高的实验组, 则所需要的小麦秸秆原料成本就越低。从经济角度, 35% (w/w) 固含量的糖化体系不具备优势, 因此后续不再探究, 对 20% (w/w) 固含量的糖化体系, 总糖仅有 104.10 g/L, 作为发酵初始糖浓度偏低, 相较于其它实验组不利于后续发酵产物的积累。

与其他固含量相比, 25% (w/w) 及 30% (w/w) 固含量的实验组的在可发酵糖浓度及成本方面有一定优势, 接下来主要分析这两个固含量在不同纤维素酶用量下得到的糖浓度、得率及其成本。对于 25% (w/w) 固含量, 2 mg/g DM 纤维素酶用量实验组最终糖化出的总糖约为 125 g/L, 较 4 mg/g DM 实验组少了约 13 g/L, 少了约 9.4%, 葡萄糖得率为 76.66%, 低了 10.79%, 总糖得率为 78.17%, 少了约 10.26%, 但是此时生产 1 t 总糖所需的酶成本仅为 1400.00 CNY, 较 4 mg/g DM 实验组节省 44.5%; 而 6 mg/g DM 纤维素酶用量实验组最终糖化出的总糖约为 146 g/L, 较 4 mg/g DM 实验组仅提升 8 g/L, 约 5.80%, 此时葡萄糖得率为 95.16%, 提升 7.71%, 总糖得率为 95.52%, 提高了 7.09%, 但是此时生产 1 t 总糖所需的酶成本达到了 3233.33 CNY, 提高了 40.67%。

对于 30% (w/w) 固含量糖化体系下, 2 mg/g DM 纤维素酶用量实验组最终糖化出的总糖约为 158 g/L, 较 4 mg/g DM 实验组少了约 17 g/L, 少了约 9.6%, 葡萄糖得率为 74.63%, 低了 10.63%, 总糖得率为 79.35%, 少了约 6.83%, 但是此时生产 1 t 总糖所需的酶成本仅为 1323.00 CNY, 较 4 mg/g DM 实验组节省 40%; 而 6 mg/g DM 纤维素酶用量实验组最终糖化出的总糖约为 185 g/L, 较 4 mg/g DM 实验组提升 10g/L, 约 5.7%, 此时葡萄糖得率为 93.84%, 提升了 8.58%, 总糖得率为 95.52%, 提高了 7.09%, 但是此时生产 1 t 总糖所需酶的成本达到了 3327.33 CNY, 也提高了大约 40%。

不同纤维素酶用量对于糖化的成本影响更大, 即使多添加纤维素酶可以获得更高

的糖得率，可以使得原料的用量减少，但纤维素酶的成本远高于原料成本，综合分析糖化液的糖浓度、糖得率及成本，仍然选择 4 mg/g DM 的纤维素酶用量作为工业应用参数。

2.3.4 生物炼制糖化环节的物料衡算

以预处理小麦秸秆为原料，在糖化参数为 25% (w/w) 固含量、4 mg/g DM 纤维素酶用量下，通过残渣二次糖化法得到的 1 t 总糖，既能保证较高的可发酵糖浓度和得率，又能使所需要的小麦秸秆和纤维素酶成本最低，因此以该实验组为例进行物料衡算（图 2.7）。

糖化过程的物料衡算以 100 kg 的小麦秸秆干重作为标准，根据两步酸解法测定小麦秸秆组分，每 100 kg 的小麦秸秆含有 34.55 kg 纤维素、21.91 kg 半纤维素、20.36 kg 木质素及 9.57 kg 灰分。对小麦秸秆进行干酸预处理，按照每 100 kg 小麦秸秆干重添加 4 kg 的浓硫酸，固液比为 2:1 的添加量加入 44 kg 的水进行预处理，期间通入了大概 58.02 kg 的水蒸汽。预处理结束后，每 100 kg 小麦秸秆获得 206.02 kg 的预处理物料，期间无废水产生。预处理结束之后，部分纤维素、半纤维素及其他聚糖水解形成了葡萄糖和木糖。

为了糖化水解时，保证纤维素酶的活性，使用 CaCO_3 将预处理物料的 pH 调至 5.5。为了保证糖化参数为 25% (w/w) 固含量和 4 mg/g DM 纤维素酶用量，需要加入 0.4 kg 的纤维素酶和 44 kg 的水，经过 24 h 的糖化水解，最终获得了 27.69 kg 葡萄糖和 16.53 kg 木糖。

当使用残渣二次糖化法进行糖化时，需要对上述得到的糖化液进行离心，沉淀残渣带着 4.22 kg 的葡萄糖和 2.51 kg 的木糖进入到第二次糖化。添加 198.90 kg 的水使得残渣的固含量为 20% (w/w)，在不额外添加纤维素酶下糖化 12 h，最终得到了 6.19 kg 的葡萄糖和 2.81 kg 的木糖。此时对残渣的糖化液进行离心，最终得到 5.10 kg 的葡萄糖、2.28 kg 的木糖及 202.75 kg 的水进入下一轮的糖化体系，当添加 206.02 kg 的预处理小麦秸秆物料后，待 pH 调至 5.5，仅需要额外补充 31.25 kg 的水，加入纤维素酶即可进行新一轮糖化。通过残渣二次糖化法的糖化最终获得了 32.79 kg 葡萄糖和 18.81 kg 的木糖。相较于未进行循环利用残渣上清液的糖化，每 100 kg 小麦秸秆多获得了 5.10 kg 的葡萄糖和 2.28 kg 的木糖。

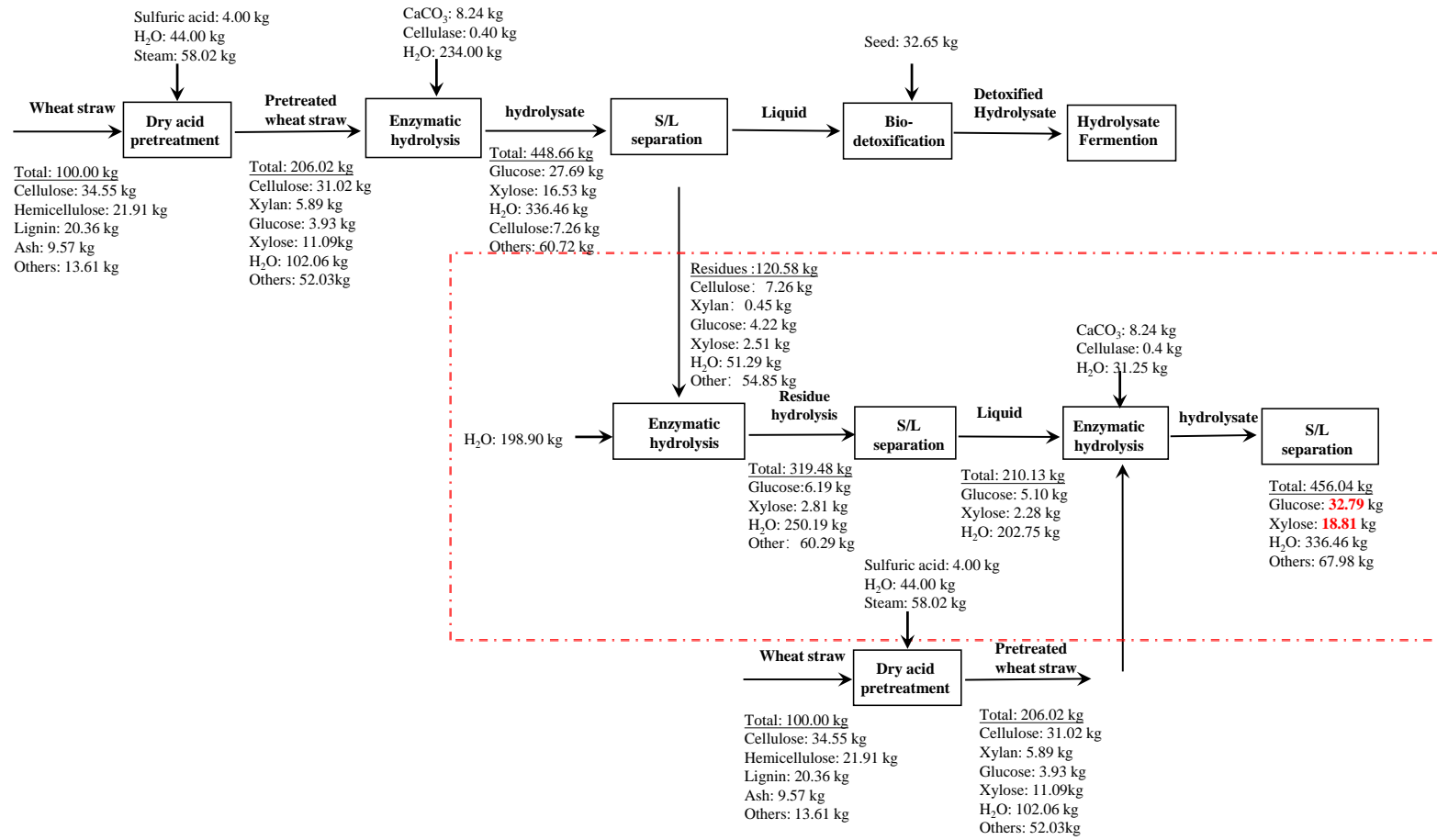


图 2.7 小麦秸秆生物炼制生产可发酵糖的物料衡算

Fig.2.7 Mass balance of wheat straw biorefining for fermentable sugar

2.4 本章小结

对干法酸预处理的小麦秸秆进行长时间糖化，确定了最终的糖化时间后提出了一种新型提高糖化液糖浓度及得率的策略，即残渣二次糖化法。在验证了其可行性之后，对不同糖化参数下的残渣糖化进行了研究，最终对这些参数下的糖浓度、糖得率及成本进行综合分析。

(1) 对预处理后的小麦秸秆进行长时间糖化，选择 24 h 作为糖化时间。提出了通过离心来使得吸附在未水解组分上的纤维素酶摆脱高糖浓度对于纤维素酶活性的抑制。在不添加纤维素酶的前提下，利用吸附的纤维素酶对木质纤维素残渣进行二次糖化。选择了 25% (w/w) 固含量的糖化体系验证了该方法，最终使用残渣循环糖化的实验组较对照组葡萄糖浓度上升了约 7 g/L，木糖浓度上升了约 0.8 g/L，葡萄糖得率提高了 4.81%，木糖得率提高了 1.26%，验证了该方法对于高固含量糖化体系的可行性。

(2) 在不同固含量及不同纤维素酶用量的糖化体系下，以残渣二次糖化法对小麦秸秆进行糖化，与对照组进行对比，随着固含量的增加，采用残渣二次糖化法获得的水解液中葡萄糖浓度也随着提高，弥补了高固含量糖化对纤维素酶的抑制作用。

(3) 为了实现残渣二次糖化法进行大规模生产，需要从经济成本角度对各实验组进行分析，按照生产 1 t 的可发酵糖作为标准，首先从获得的可发酵糖分析，对于 20% (w/w) 实验组最终得到可发酵糖浓度较其他组偏低，仅有 104 g/L，且总成本没有明显优势；其次从生产成本角度分析，对于 35% (w/w) 实验组，由于固含量太高，糖得率较其它组偏低，因此生产的总成本最高，提高了 7.69%。在可发酵糖浓度与生产 1 t 可发酵糖的物料成本上，25% 及 30% (w/w) 固含量参数更有优势。在不同纤维素酶用量下，最终选择 4 mg/g DM 作为后续的实验参数。

(4) 对生物炼制糖化阶段进行物料衡算，使用 100 kg 的小麦秸秆可以得到 206.02 kg 的预处理物料，直接糖化最终获得了 27.69 kg 葡萄糖和 16.53 kg 木糖。通过残渣二次糖化法获得的水解液最终得到了 32.79 kg 葡萄糖和 18.81 kg 的木糖，与对照组相比，每 100 kg 小麦秸秆多获得了 5.10 kg 的葡萄糖和 2.28 kg 的木糖。

第3章 利用残渣二次水解清液生产单细胞蛋白及油脂

3.1 引言

在进行干法酸预处理过程中，在对木质纤维素造成破坏的同时，也不可避免地产生了一些有害物质，例如乙酸、糠醛及 5-羟甲基糠醛（HMF），对于优化后的预处理小麦秸秆水解液，含有一定量的这些物质，由于它们可能对微生物的生长代谢产生直接的抑制作用，统称为抑制物。抑制物会影响到发酵过程中微生物的数量和活性，从而影响产物的质量和产量。同时也可能干扰微生物的代谢途径，阻碍关键酶的活性或导致代谢产物的累积。以上的现象都会影响最终产物的形成。此外，发酵菌株在受到抑制物的影响，会需要更长的时间来完成发酵过程，这会增加生产周期，降低生产效率，增加生产成本。

为了将这些抑制物进行去除或者降低到不影响发酵菌株的生长生产，需要进行脱毒，其中生物脱毒方法（如使用生物酶或微生物）相比化学消毒剂更环保，有助于减少有害化学物质的使用和排放，因此选择生物脱毒方法对抑制物进行去除。在用生物脱毒法对抑制物进行去除后，脱毒菌株会继续生长，并与发酵菌株形成竞争关系，最终影响发酵效率。因此需要对于脱毒菌株进行适当灭活。以往对于脱毒菌株进行高温（115°C）灭活，会造成大量的能耗，并且对小麦秸秆水解液中的营养物质造成影响。

本研究首先选择次氯酸钠^[105]对脱毒菌株进行灭活，之后使用皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 利用木质纤维素水解上清液生产单细胞蛋白及微生物油脂，对残渣二次糖化法得到的水解清液进行发酵验证。在发酵时，菌株需要大量时间来生长，为了提高单细胞蛋白的产量，进行连续补料发酵，验证发酵菌株 *T. cutaneum* MP11 利用木质纤维素清液生产单细胞蛋白是否可以实现连续补料发酵。最后，通过生产单细胞蛋白和微生物油脂对不同固含量的木质纤维素水解上清液进行发酵验证，比较了 SSF、SHF 以及进行残渣二次糖化得到的高糖得率 SHF 的发酵产量与得率。最终计算两种产物的生产所需要的物料及纤维素酶成本。

3.2 材料与amp;方法

3.2.1 物料与酶

详情见 2.2.1

3.2.2 菌株培养

宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89（CGMCC 17665）是本实验室在含有多种抑制物的预处理玉米秸秆物料中筛选得到的生物脱毒菌株。脱毒菌株将预处理过程形成的乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛（HMF）作为生长碳源，首先代谢糠醛及 HMF，当糠醛类化合物代谢完，菌株开始代谢乙酸，当抑制物完全耗尽后，生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 会开始代谢木糖同时产生乙酸等酸性化合物。该脱毒菌株在固态或液态环

境下都可以进行脱毒。在液态脱毒过程中，通过监测 pH 来控制脱毒过程的进行。在脱毒过程中，由于酸类物质的消耗，糖化液的 pH 会缓慢地上升。抑制物耗尽，脱毒菌株会产生大量游离脂肪酸造成水解液 pH 的下降。因此在生物脱毒过程中，当监测到糖化液的 pH 最高点时，即说明脱毒结束。此时测定糖化液中的糠醛、5-羟甲基糠醛浓度为零，乙酸浓度在 0.2 g/L 以下。以下是 *P. variotii* FN89 所用培养基及培养方法。

(1) PDA 培养基：200 g/L 马铃薯提取液（将马铃薯切至 1 cm 小块后加水煮沸 20 min 后，过滤获取滤液）、20 g/L 葡萄糖和 25 g/L 琼脂。

(2) SM 培养基：20 g/L 葡萄糖、2 g/L 磷酸二氢钾、1 g/L 七水硫酸镁、1 g/L 硫酸铵、1 g/L 酵母提取物和 0.5 g/L 氯化钙。

将 *P. variotii* FN89 的孢子涂布在 PDA 固体培养基，放在温度为 37°C 的恒温培养箱中培养 4-5 天，待培养结束后将固体培养基上的孢子刮至含有 100 mL SM 培养基的 500 mL 摇瓶中，培养参数为：300 rpm、37°C、24 h，培养结束后直接用于生物脱毒。

皮状丝孢酵母 *Trichosporon. Cutaneum* MP11 (CGMCC 20481) 作为生产单细胞蛋白和微生物油脂的发酵菌株，该菌株是在严格限氮的环境下进行超离心力适应性驯化筛选得到的。该菌株所用培养基为 YPD 培养基，配置方法及培养方法如下：

(1) YPD 平板：10 g/L 酵母提取物、20 g/L 葡萄糖、20 g/L 蛋白胨和 20 g/L 琼脂。

(2) YPD 培养基：10 g/L 酵母提取物、20 g/L 葡萄糖和 20 g/L 蛋白胨。

培养方法：第一步对菌株进行冻存管活化，拿出保存在 -80°C 冰箱的冻存管，待解冻后，在超净台中进行接种实验；将接种环放在酒精灯外焰处进行灼烧，待 30 s 后，稍稍冷却蘸取冻存管内菌液；第二步将菌液通过平板划线法在 YPD 平板上进行活化，将平板放在设置温度为 30°C 的恒温培养箱中培养 48 h。最后将平板上生长的单菌落通过接种环或者无菌枪头接种到含有 20 ml YPD 培养基的 100 mL 摇瓶中进行培养，培养参数为：200 rpm、30°C、24 h。接下来将液体培养基中的活化液进行扩培，吸取 10 ml 转接至放有 100 ml YPD 培养基的 500 mL 的摇瓶中，培养参数仍为 200 rpm、30°C、24 h。

3.2.3 生物脱毒

对预处理小麦秸秆进行水解之后，需要通过生物脱毒将水解液中的糠醛、5-羟甲基糠醛浓度降为零，乙酸浓度降至 0.2 g/L 以下。使用脱毒菌株 *P. variotii* FN89 消耗水解液中的抑制物，脱毒参数为：接种量为 10 %、温度为 37°C、转速 750 rpm、通气量 1.0 vvm。当 pH 上升到最高点时，即脱毒结束。

皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 进行温度为 30 °C 的好氧发酵，在此发酵条件下，脱毒菌株仍能继续生长并且在抑制物消耗完，会开始消耗可发酵单糖；在发酵阶段，脱毒菌株和发酵菌株为竞争关系，会使得发酵菌株的生长受到抑制。这些都会造成最终发酵产量的降低。因此，在发酵前，需要对脱毒菌株进行灭活，在 115°C 的高温下对脱毒菌株进行灭活，此过程会对可发酵单糖造成损耗，同时生成黑色固体杂质，需要进一步的过滤再用于发酵。

本研究采用次氯酸钠化学灭活法^[105,106]来代替高温灭活法, 方法为: 添加一定浓度的次氯酸钠, 同时关闭通气, 避免次氯酸钠的挥发, 将温度升至 50°C、搅拌转速降至 150 rpm 维持 6 h。待 6 h 后, 通气量设置为 1.0 vvm 等待 10 min, 之后可以直接用于后续发酵。其中升温到 50°C 的目的是使得罐壁上脱毒菌株孢子的活性降低, 以防飘落到发酵液中对发酵过程造成影响。

3.2.4 同步糖化与发酵生产单细胞蛋白与油脂

SSF 生产单细胞蛋白在 3 L 生物反应器中进行, 对预处理后的小麦秸秆物料进行固态脱毒, 直接将脱毒菌株的孢子撒在预处理后的物料上, 在 37°C 培养箱中进行脱毒, 待糠醛和 5-羟甲基糠醛浓度为 0 g/L, 乙酸含量低于 0.2 g/L 时, 脱毒结束。进行糖化发酵, 预糖化 12 h 后, 将培养好的菌液按照 10% (v/v) 的接种量接入 3 L 生物反应器进行发酵, 发酵温度 30°C、转速 600 rpm、通气量 1.0 vvm, 发酵时间为 96 h。发酵不同产物添加的营养盐不同:

(1) 发酵单细胞蛋白添加的营养盐: 1 g/L 磷酸二氢钾、1 g/L 七水硫酸镁及 24 g/L 硫酸铵;

(2) 发酵微生物油脂添加的营养盐: 1 g/L 磷酸二氢钾、1 g/L 七水硫酸镁、0.44 g/L 硫酸铵及 1 g/L 酵母提取物。

对于单细胞蛋白在发酵时使用 2M H₂SO₄ 及 5M NaOH 调节 pH 至 5.0, 对于微生物油脂发酵时使用 6M HCl 调节 pH 至 5.0。

3.2.5 分步糖化与发酵生产单细胞蛋白与油脂

将培养好的脱毒菌株按照 10% (v/v) 的接种量接入 3 L 生物反应器进行脱毒, 待脱毒结束后关闭通气升温到 50°C, 降低转速至 150 rpm, 加入一定浓度的次氯酸钠菌液维持 12 h, 之后打开通气约 10 min, 此过程目的是对脱毒菌株进行灭活。将发酵菌株按照 10% (v/v) 的接种量接入 3 L 生物反应器进行发酵, 发酵温度 30°C、转速 600 rpm、通气量 1.0 vvm, 发酵时间 96 h。

3.2.6 菌体干重的测定

根据差重法对发酵所得菌体干重进行计算, 在发酵时对于发酵液进行取样, 取样量一般不低于 25 mL, 精确量取 25 mL 菌液放置在已灭菌烘干至恒重的 50 mL 离心管, 离心管事先进行称重, 进行离心, 离心参数为: 12000 rpm、3 min。当离心结束, 去除上清液, 加入 25 mL 无菌水对沉淀菌体进行冲洗, 摇晃均匀, 重复离心洗涤三次, 洗涤的目的主要是去除发酵液中的杂质、营养盐和无机氮源。将装有洗涤后离心菌体的 50 mL 离心管放置在 65°C 烘箱中烘干至恒重, 进行称重, 实验结束两次重量之差即为 25 mL 发酵液中的菌体干重。

$$DCW (g/L) = \frac{W_1 - W_0}{25} \times 1000 \quad (3-1)$$

公式 (3-1) 中, DCW (g/L) 为每升发酵液中含有的菌体干重; W_0 (g) 为已灭菌烘干至恒重的离心管重量; W_1 (g) 为含有已洗涤烘干至恒重的 25 mL 发酵液菌体的离心

管。

3.2.7 单细胞蛋白的测定

对测定完细胞干重的菌体进行单细胞蛋白的测定，采用凯氏定氮法：

$$\text{Nitrogen content (\%): } w_1 = \frac{C \times (V_1 - V_0) \times 14}{m_1} \times 100\% \quad (3-2)$$

公式 (3-2) 中， w_1 (%) 为样品消化后测定含氮量； C (mol/L) 为滴定所用盐酸的浓度，即 0.09993 mol/L； V_1 (L) 为样品滴定标准酸消耗量； V_0 (L) 为空白样滴定标准酸消耗量； m_1 (g) 为样品烘干至恒重的质量；其中，14 为氮元素摩尔质量，单位为 g/mol。

$$\text{SCP content (\%): } w_{\text{SSF}} = F \times (w_1 - w_2 - w_3) \quad (3-3)$$

$$\text{SCP content (\%): } w_{\text{SHF}} = F \times w_1 \quad (3-4)$$

公式 (3-3) 中， w_{SSF} (%) 为 SSF 过程中样品的蛋白含量； w_{SHF} (%) 为 SHF 过程中样品的蛋白含量； w_1 (%) 为发酵样品消化后测定含氮量； w_2 (%) 为不消化样品，研磨至粉末状测定氮含量，即发酵液中残留硫酸铵的氮含量； w_3 (%) 为对糖化结束后的样品经消化后测定含氮量； F 为氮含量换算为蛋白质含量的系数 6.25。

$$\text{SCP titer (g/L): } C_{\text{SCP}} = w \times \frac{m_1}{V} \quad (3-5)$$

公式 (3-5) 中， C_{SCP} (g/L) 为发酵液中单细胞蛋白的产量； w (%) 为产物单细胞蛋白含量； m_1 (g) 为样品烘干至恒重的质量； V (L) 为指发酵液样品的体积。

3.2.8 微生物油脂的测定

测完细胞干重后对微生物油脂含量进行测定，首先需要对菌体细胞进行裂解，本研究中选择盐酸裂解细胞，将 3.2.4 得到的烘干菌体放在玻璃皿上，随后加入 5-7 mL 的浓度为 4 mol/L 的盐酸溶液，用玻璃棒将菌体与盐酸充分混合，确保添加的盐酸量能完全浸没菌体。浸没 4 h 后将菌体盐酸混合液转移至 50 mL 离心管，在通风橱内进行沸水浴，在沸水内至少 10 min，这是为了使得菌体进一步裂解同时使得盐酸挥发，沸水浴后进行冰浴降温至少 10 min。向冷却的离心管加入氯仿及甲醇，氯仿和甲醇的体系为 2:1，添加量为 20 mL 包括 13.3 mL 氯仿、6.7 mL 甲醇。添加结束盖紧离心管进行在摇床中进行萃取，设置参数为 30°C、200 rpm。萃取 1-2 h 后对离心管进行离心，参数为 12000 rpm、3 min。离心后，观察到离心管已经分层，使用针筒吸取最下层含有油脂的氯仿相，此时注意不要吸到上层，否则会导致油脂含量偏高。对吸取出来的氯仿相在 80°C 水浴下进行旋转蒸发。旋蒸至氯仿完全挥发后放置 65°C 恒温烘箱至恒重，进行称重，油脂的计算公式如下：

$$\text{Lipid content (\%): } w_{\text{Lipid}} = \frac{m_2 - m_1}{m_0} \times 100\% \quad (3-6)$$

公式 (3-6) 中， w_{Lipid} (%) 为菌体内油脂的含量； m_2 (g) 为烘干至恒重含有油脂的旋转蒸发瓶的重量； m_1 (g) 为烘干至恒重的旋转蒸发瓶重量； m_0 (g) 为进行油脂萃取的菌体干重。

$$\text{Lipid titer (g/L): } C_{\text{Lipid}} = w_{\text{Lipid}} \times \text{DCW} \quad (3-7)$$

公式 (3-7) 中, C_{Lipid} (g/L) 为发酵液中的油脂产量; w_{Lipid} (%) 为菌体内油脂的含量; DCW (g/L) 为发酵液中的菌体干重。

3.2.9 单细胞蛋白、油脂得率及成本的计算

$$\text{Yield}_{\text{SCP}} \text{ (g/g): } \text{yield}_{\text{SCP}} = \frac{V_{\text{total}} \times C_{\text{SCP}}}{V_0 \times (C_{\text{glucose}} + C_{\text{xylose}})} \quad (3-8)$$

公式 (3-8) 中, $\text{yield}_{\text{SCP}}$ (g/g) 为单细胞蛋白的得率即每克糖可以生产多少克的单细胞蛋白; V_{total} (L) 为发酵结束时发酵液总体积; C_{SCP} (g/L) 为单细胞蛋白产量; V_0 (L) 为发酵开始总体积; C_{glucose} (g/L) 为发酵阶段消耗的葡萄糖浓度; C_{xylose} (g/L) 为发酵阶段消耗的木糖浓度。

$$\text{Yield}_{\text{Lipid}} \text{ (g/g): } \text{yield}_{\text{Lipid}} = \frac{V_{\text{total}} \times C_{\text{Lipid}}}{V_0 \times (C_{\text{glucose}} + C_{\text{xylose}})} \quad (3-9)$$

公式 (3-9) 中, $\text{yield}_{\text{Lipid}}$ (g/g) 为微生物油脂的得率即每克糖可以生产多少克的油脂; V_{total} (L) 为发酵结束时发酵液总体积; C_{Lipid} (g/L) 为油脂产量; V_0 (L) 为发酵开始时总体积; C_{glucose} (g/L) 为发酵阶段消耗的葡萄糖浓度; C_{xylose} (g/L) 为发酵阶段消耗的木糖浓度。

$$\text{Cost}_{\text{SCP}} \text{ (CNY/g SCP)} = \text{Cost}_{\text{sugar}} \times \text{yield}_{\text{SCP}} \quad (3-10)$$

$$\text{Cost}_{\text{Lipid}} \text{ (CNY/g Lipid)} = \text{Cost}_{\text{sugar}} \times \text{yield}_{\text{Lipid}} \quad (3-11)$$

公式 (3-10) 及 (3-11) 中 Cost_{SCP} (CNY/g SCP) 为每克单细胞蛋白在糖化过程的物耗成本; $\text{Cost}_{\text{Lipid}}$ (CNY/g lipid) 为每克油脂在糖化过程的物耗成本; $\text{Cost}_{\text{sugar}}$ (CNY/g sugar) 为每克可发酵糖在糖化过程的物耗成本; $\text{yield}_{\text{SCP}}$ (g/g) 为单细胞蛋白的得率; $\text{yield}_{\text{Lipid}}$ (g/g) 为微生物油脂的得率。

3.3 结果与讨论

3.3.1 低剂量的次氯酸钠实现生物脱毒与发酵的快速切换

用于发酵的小麦秸秆水解液必须经过生物脱毒处理, 将其中的抑制物控制在不影响发酵菌株正常生长代谢的水平才可用于发酵。但是在生物脱毒结束之后, 如果不对脱毒菌株灭活, 脱毒菌株会开始代谢水解液中的葡萄糖及木糖, 并影响发酵菌株的生长。对于水解液中脱毒菌株进行的灭活通常需要经过高温灭菌, 但高温过程会造成可发酵糖的损失以及高能耗, 因此不利于工业化应用。

选择添加次氯酸钠的方式可以有效对微生物进行灭活^[105,106]。首先在摇瓶中探究不同浓度的次氯酸钠对脱毒菌株 *P. variotii* FN89 进行灭活, 之后进行上罐验证。在生长旺盛的脱毒菌株 *P. variotii* FN89 的摇瓶中, 选择 0.5、1、1.5 g/L 作为浓度梯度, 加入次氯酸钠继续培养 1 h 后, 进行划线涂布, 观察菌落情况。其中平板菌落生长情况见图 3.1。

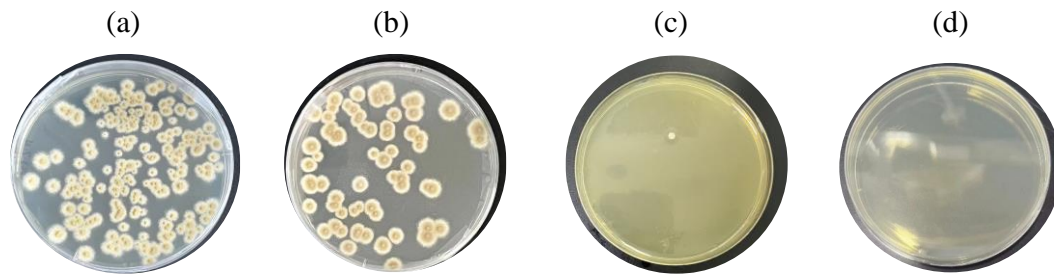


图 3.1 脱毒菌株 *P. variotii* FN89 在添加不同浓度次氯酸钠后的生长情况

(a) *P. variotii* FN89 在不添加次氯酸钠的 SM 培养基中生长；(b) *P. variotii* FN89 在含有 0.5 g/L 次氯酸钠的 SM 培养基中生长；(c) *P. variotii* FN89 在含有 1 g/L 次氯酸钠的 SM 培养基中生长；(d) *P. variotii* FN89 在含有 1.5 g/L 次氯酸钠的 SM 培养基中生长。

Fig.3.1 The growth of *P. variotii* FN89 after addition of different concentrations of sodium hypochlorite. *P. variotii* FN89 在 SM 培养基中进行培养，培养条件：37°C、300 rpm、24 h。在 24 h 之后，加入不同浓度梯度的次氯酸钠，厌氧环境下培养 1 h，培养结束对各培养基进行划线涂布。

与未添加次氯酸钠对照组的涂布平板相比，随着添加次氯酸钠的浓度越来越高，脱毒菌株 *P. variotii* FN89 的菌落数越来越少。在添加了 1 g/L 的次氯酸钠后进行培养 1 h，仅观察到 1 个菌落数。当次氯酸钠的浓度提升到 1.5 g/L 时，未观察到菌落数，初步认为脱毒菌株 *P. variotii* FN89 已经完全灭活。

在生物反应器中验证摇瓶实验结果，进行脱毒及发酵实验，使用 1.5 g/L 的次氯酸钠对脱毒菌株 *P. variotii* FN89 进行灭活，关闭通气，期间将温度升至 50°C 维持 6 h。升温是为了使发酵罐上的脱毒菌株 *P. variotii* FN89 的孢子活性降低。6 h 之后将发酵罐温度降至发酵菌株的生长温度 30°C，打开通气，以使得次氯酸钠挥发。后续进行发酵实验，接种发酵菌株 *T. cutaneum* MP11 每 24 h 进行取样进行镜检，镜检结果如图 3.2。

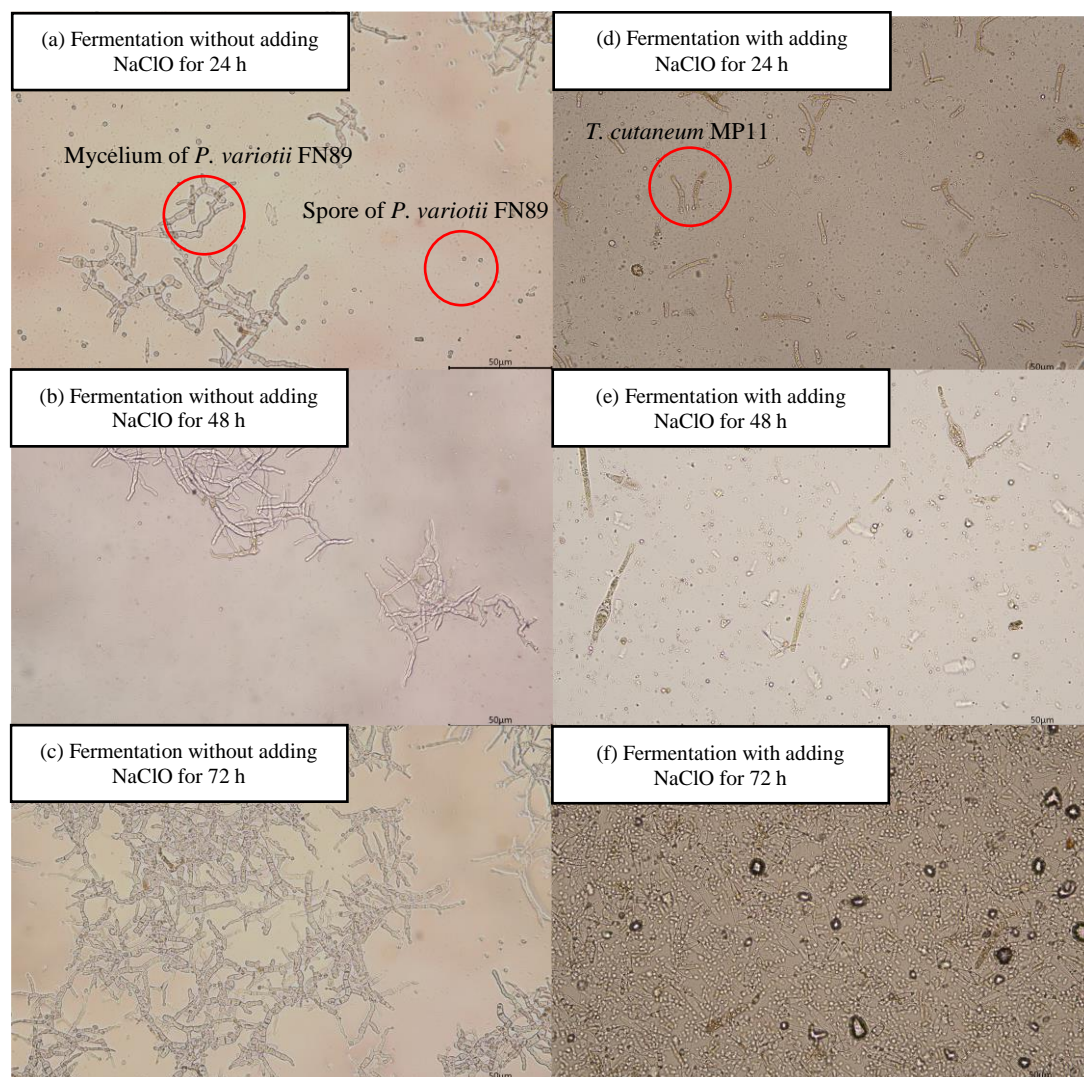


图 3.2 添加与未添加次氯酸钠进行单细胞发酵的镜检结果

(a) 未添加次氯酸钠后发酵 24 h; (b) 未添加次氯酸钠后发酵 48 h; (c) 未添加次氯酸钠后发酵 72 h;
 (d) 添加次氯酸钠后发酵 24 h; (e) 添加次氯酸钠后发酵 48 h; (f) 添加次氯酸钠后发酵 72 h.

Fig.3.2 Microscopic results of single-cell fermentation with and without sodium hypochlorite addition 对离心后的预处理小麦秸秆水解上清液进行脱毒, 脱毒参数: 10% (v/v) 接种量、37°C、750 rpm、1.0 vvm; 在脱毒结束, 关闭通气, 加入 1.5 g/L 次氯酸钠, 转速调至 300 rpm, 温度设置为 50°C, 维持 6 h 后降温至发酵稳定, 设置通气为 1.0 vvm, 通气 10 min 后接种 *T. cutaneum* MP11; 发酵参数: 10% (v/v) 接种量; 30°C、600 rpm、1.0 vvm、2M H₂SO₄ 及 5M NaOH 调节 pH 至 5.0。

在对照组中, 发酵 24 h 时镜检发现脱毒菌株 *P. variotii* FN89 的菌丝及一些形态较小的球状体 (图 3.2a 中圆圈标出), 这些球状体可能是脱毒菌株 *P. variotii* FN89 的孢子形态, 随着发酵的进行, 脱毒菌株 *P. variotii* FN89 的菌丝越发生长。因此确定最初发现的绝大多数球状体为 *P. variotii* FN89 的孢子, 期间仅观察到少量 *T. cutaneum* MP11, 生长不佳。添加了 1.5 g/L 次氯酸钠的实验组, 能清楚的观察到 *T. cutaneum* MP11 生长正常, 并且随着后续发酵的进行, *T. cutaneum* MP11 生长旺盛, 在发酵 48 h 至 72 h 期间, 生长繁殖迅速。对发酵液中的葡萄糖、木糖、单细胞蛋白及油脂浓度进行检测, 结果

见图 3.3。

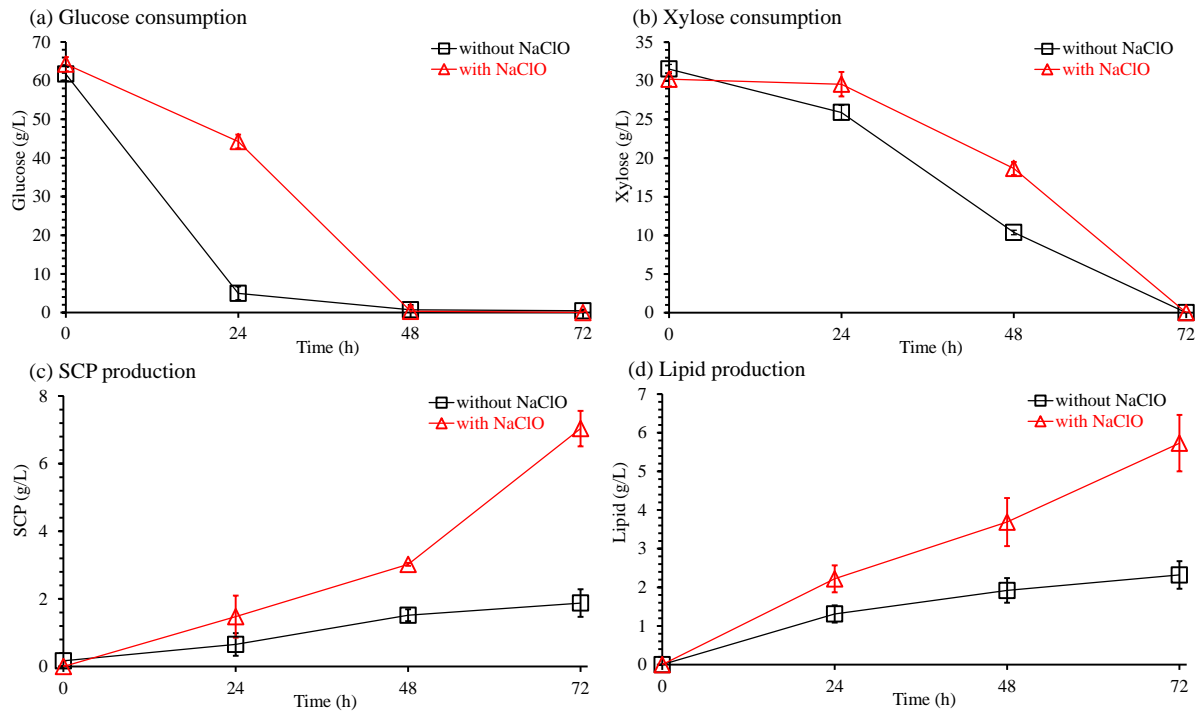


图 3.3 *T. cutaneum* MP11 利用 20% 固含量小麦秸秆水解液生产单细胞蛋白

(a) 葡萄糖浓度；(b) 木糖浓度；(c) 单细胞蛋白产量；(d) 油脂产量。

Fig3.3 Production of single-cell protein by *T. cutaneum* MP11 using 20% (w/w) solids loading wheat straw hydrolysate

发酵参数：10% (v/v) 接种量；30°C、600 rpm、1.0 vvm、96 h、2M H₂SO₄ 及 5M NaOH 调节 pH 至 5.0。

在不添加次氯酸钠的情况下，脱毒菌株 *P. variotii* FN89 生长旺盛，严重抑制了发酵菌株 *T. cutaneum* MP11 的生长，并且消耗可发酵单糖。在发酵前 24 h 先大量消耗葡萄糖，在 24-48 h 内葡萄糖基本被消耗完，菌株开始代谢木糖。由于 *P. variotii* FN89 的生长且消耗大量碳源，发酵菌株 *T. cutaneum* MP11 的生长受到抑制，因此导致单细胞蛋白及微生物油脂的产量不高，在发酵 72 h 时，仅仅生成 1.88 g/L 的单细胞蛋白及 2.32 g/L 的微生物油脂。

在添加 1.5 g/L 的次氯酸钠的实验组中，发酵前 24 h 内，发酵液的葡萄糖消耗较慢，在发酵 24-48 h 内葡萄糖消耗加快，到 48 h 时葡萄糖完全耗尽。而木糖则是前 24 h 内基本没有消耗，随后开始消耗并且消耗速率逐渐增大，根据镜检结果分析在发酵 24-48 h 期间，*T. cutaneum* MP11 大量生长繁殖。在前 24 h 内，发酵菌株在接种之后需要一段时间进行生长繁殖，因此对于葡萄糖的消耗逐渐加剧，并且对于葡萄糖的代谢优先于木糖，这也很好的解释了未加次氯酸钠的实验组葡萄糖及木糖消耗明显比添加 1.5 g/L 的实验组要快，这是在发酵过程中，脱毒菌株对于可发酵单糖进行消耗。最终得到单细胞蛋白及油脂的产量分别为 7.04 g/L 及 5.73 g/L，远远高于未添加次氯酸钠的实验组。

通过摇瓶实验对菌株进行平板涂布，来确定灭活脱毒菌株所需要添加次氯酸钠的剂量，之后进行上罐验证 1.5 g/L 的次氯酸钠是否对脱毒菌株有效灭活，确保了发酵菌株 *T. cutaneum* MP11 可以正常生长以及后续积累胞内产物，保证产物单细胞蛋白及微生物油脂的产量，最终确定了添加 1.5 g/L 次氯酸钠来代替高温来灭活脱毒菌株，对于在发酵过程中弱化脱毒菌株提供了一个新的方法，便于脱毒后的水解液用于后续的发酵。

3.3.2 探究连续补料发酵生产单细胞蛋白的可行性

在进行 20% (w/w) 固含量的小麦秸秆水解液时发现，最终发酵产物单细胞蛋白及微生物油脂的产量较低，这主要是由于可发酵糖浓度较低导致的，并且可能会使后续优化发酵参数得到的产量变化并不显著，因此需要高浓度可发酵糖。选择 30% (w/w) 固含量小麦秸秆水解液进行发酵。在之前的发酵中，发现 *T. cutaneum* MP11 需要 24 h 的生长繁殖，猜测可能是由于该菌株需要一定时间适应小麦秸秆水解液体系，因此考虑降低接种量，避免发酵总糖的进一步稀释，在进行连续补料发酵前，先探究接种量对于生产单细胞蛋白的影响，设立一组接种发酵菌株量为 5% (v/v) 的实验组，比较最终的发酵结果的差异。每 24 h 进行取样监测 5% (v/v) 和 10% (v/v) 接种量实验组的葡萄糖、木糖、单细胞蛋白及微生物油脂的浓度，同时测定单细胞蛋白及微生物油脂的含量，发酵情况如图 3.4。

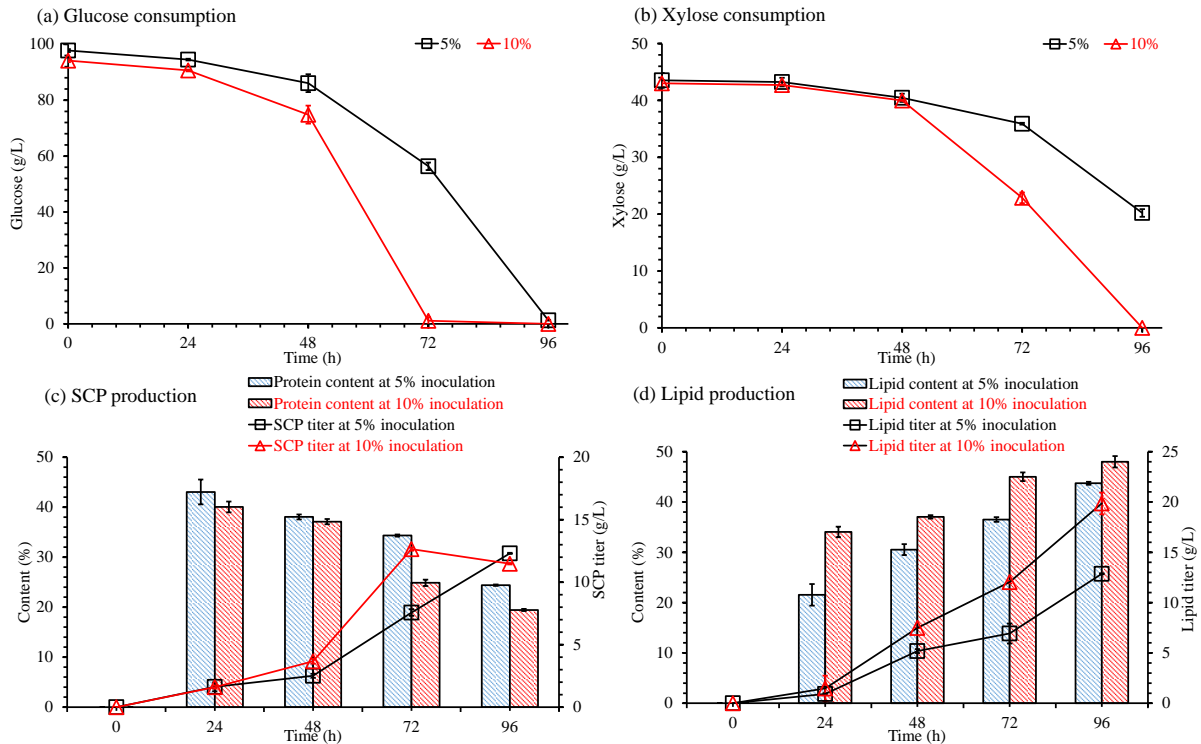


图 3.4 在 30% (w/w) 固含量水解液下 *T. cutaneum* MP11 以 5% (v/v) 和 10% (v/v) 接种量生产单细胞蛋白

(a) 葡萄糖浓度; (b) 木糖浓度; (c) 单细胞蛋白浓度及含量; (d) 油脂浓度及含量。

Fig.3.4 Production of single-cell protein by *T. cutaneum* MP11 using 30% (w/w) solids loading hydrolysate at 5% (v/v) and 10% (v/v) inoculations

发酵条件: 发酵温度 30°C、转速 600 rpm、通气量 1.0 vvm、发酵时间 96 h、使用 2M H₂SO₄ 及 5M NaOH 调节 pH 至 5.0。

对于可发酵糖的消耗, 无论是葡萄糖还是木糖, 5% (v/v) 接种量的实验组都远远低于 10% (v/v) 实验组; 当 72 h 时, 10% (v/v) 接种量实验组的葡萄糖已经耗尽, 此时另一组仍还有 60 g/L 的葡萄糖; 当发酵进行到 96 h 时, 10% (v/v) 接种量实验组的木糖已经耗尽, 另一组仍剩下大约 20 g/L。发酵总糖消耗速率降低导致需要更多的发酵时间, 意味着需要更多能耗及对生物反应器的占用。

在发酵产物方面, 发酵 24 h 时, 初始的高氨氮条件对发酵菌株的胁迫作用明显, 两组实验组发酵菌株 *T. cutaneum* MP11 在 30% (w/w) 固含量小麦秸秆水解液的蛋白含量均达到了 40% 以上, 在 48 h 时蛋白含量仍能保持 35% 以上; 在发酵 72 h 时, 10% (v/v) 接种量实验组的单细胞蛋白产量达到最高为 12.64 g/L, 5% (v/v) 接种量实验组的单细胞蛋白在 96 h 的产量为 12.29 g/L, 此时该实验组的蛋白含量呈现降低的趋势, 后续单细胞蛋白会向微生物油脂方向积累, 因此两组实验组的单细胞蛋白产量差距不大。

从糖耗及发酵产物累积两方面考虑, 降低接种量对于最终发酵产物的积累帮助不大, 并且还需要更久的发酵时间, 相较于高接种量, 5% (v/v) 接种量的实验组大约需要多 24 h 的发酵时长, 因此需要更多的生产成本, 最终仍选择 10% (v/v) 接种量作为

后续的发酵参数。

在生物反应器中，使用皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 利用木质纤维素水解上清液进行发酵，一般在发酵 72 h 获得最高的单细胞蛋白产量。在前 48 h 内，发酵菌株处于生长繁殖阶段，葡萄糖及木糖代谢较慢，需要较长时间达到生长旺盛期，然而单细胞蛋白只有在 *T. cutaneum* MP11 处于生长旺盛期才会大量积累。为了避免发酵前期发酵菌株需要太久的时间用于生长繁殖，同时延长发酵菌株的生长旺盛期，因此需要探究生产单细胞蛋白能否可以进行连续补料发酵。

由于发酵菌株在生长旺盛期的糖耗较快，选择补料量为总发酵体系的 30% (v/v)，在发酵过程，发酵菌株首先代谢葡萄糖，之后才开始利用木糖，因此以葡萄糖的浓度为标准，当葡萄糖浓度降至 5 g/L 时，立即进行补料。补料发酵过程中葡萄糖、木糖、菌体干重、产物浓度和含量见图 3.5。

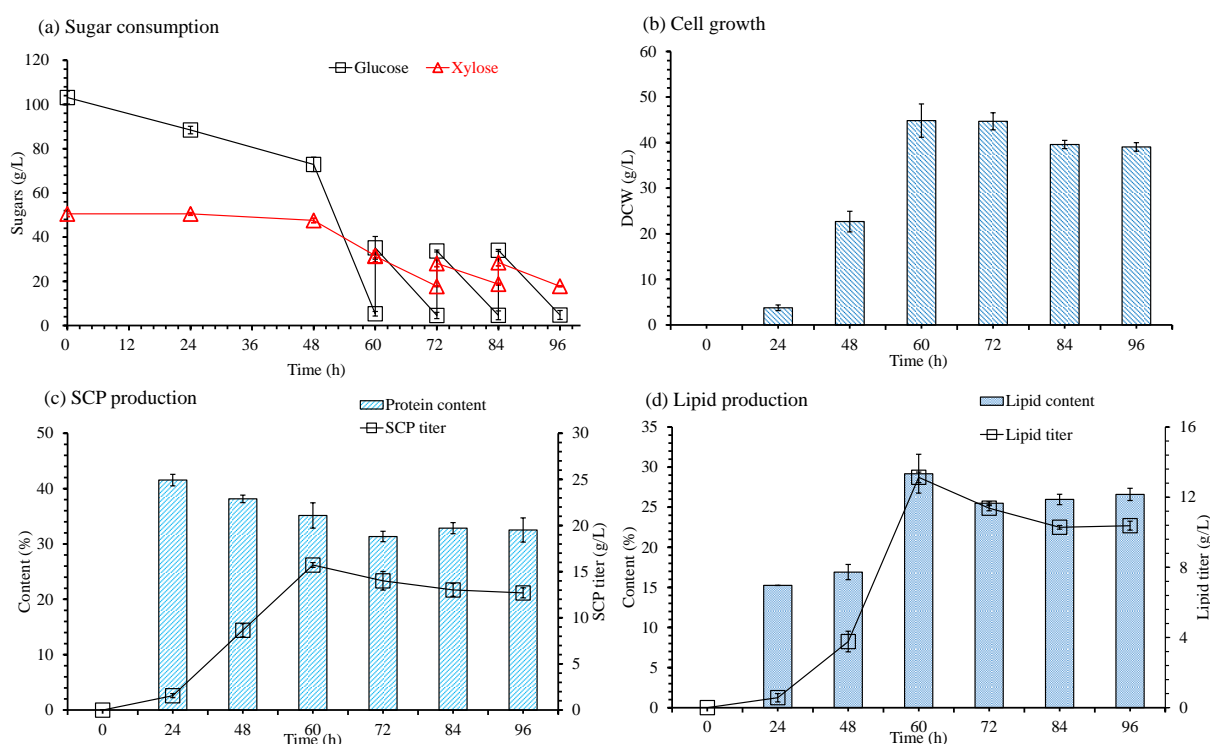


图 3.5 *T. cutaneum* MP11 利用 30% (w/w) 固含量水解液通过连续补料发酵进行单细胞蛋白生产 (a) 可发酵糖浓度; (b) DCW; (c) 单细胞蛋白浓度及含量; (d) 油脂浓度及含量。

Fig3.5 Production of single-cell proteins by *T. cutaneum* MP11 using 30% (w/w) solids loading hydrolysate by continuous feed fermentation

发酵参数：30% (w/w) 固含量水解液、10%接种量、30°C、600 rpm、1.0 vvm、2M H₂SO₄ 及 5M NaOH 调节 pH 至 5.0。当葡萄糖浓度低至 5 g/L 时进行补料，连续补料发酵补料为总体系的 30% (v/v)，期间补料 3 次。

在发酵前 24 h 到 48 h 内，发酵菌株 *T. cutaneum* MP11 缓慢代谢葡萄糖，木糖基本没有消耗；从发酵 48-60 h 期间，葡萄糖快速消耗，到 60 h 时，葡萄糖的浓度为 5.33 g/L，开始进行第一次补料，此时木糖浓度为 17.73 g/L，补料后的葡萄糖浓度为 35.15

g/L，木糖浓度为 28.09 g/L，后续大概每 12 h 进行一次补料，补料后的葡萄糖浓度维持在 35 g/L 左右，木糖浓度维持在 28 g/L 左右，糖浓度趋于稳定；木糖的消耗远远低于葡萄糖的消耗，可能是在高氨氮条件下存在葡萄糖阻遏现象。

在发酵 60 h 时，第一次补料前，发酵液的单细胞蛋白的产量及含量分别为 15.7 g/L 及 35.14%，微生物油脂的产量及含量分别为 13.13 g/L 及 29.18%，当补料后，继续进行发酵，到第二次补料前，单细胞蛋白产量和含量与第一次相比均有所下降，其中单细胞蛋白浓度下降了 1.7 g/L，第二次及第三次补料后发酵 12 h，发现单细胞蛋白产量与第一次相比下降了大约 2.7 g/L 及 3.1 g/L；副产物微生物油脂的产量也有所下降，三次补料发酵 12 h 后与第一次补料前相比分别降低了 3.69 g/L、3.21 g/L、2.58 g/L；与产量相比，单细胞蛋白和微生物油脂的含量变化并不大，产量的下降是由于菌体量下降导致的，这可能是由于随着发酵时间的进行，发酵菌株逐渐退化，但是降低的产量完全可以弥补发酵前期菌株需要大量时间生长繁殖。

在补料发酵期间，单细胞蛋白含量及浓度、油脂含量及浓度皆是趋于稳定，因此对 *T. cutaneum* MP11 进行补料是可行的，SCP 含量维持在 30% 左右，产量维持在 13 g/L 左右。根据发酵结果分析菌株一直保持在一个生长旺盛时期，补料发酵可以避免发酵初期，*T. cutaneum* MP11 需要大概 48 h 的菌株生长时期，因此对于 *T. cutaneum* MP11 采用补料发酵这一策略是可行的，并且该发酵方式可以实现工业化应用。

3.3.3 探究不同糖化体系下生产单细胞蛋白

在使用皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 进行单细胞蛋白及微生物油脂发酵时，发酵初期的可发酵糖浓度至关重要，直接决定了最终的产量。由于菌体在发酵过程中，利用一部分碳源用于自身的生长繁殖，另外一部分则用于胞内产物的积累，因此在发酵时不同浓度的可发酵糖也会导致最终产物的得率也不同，在高浓度糖下，或许能获得更高的得率，接下来在不同固含量糖化体系下进行生产单细胞蛋白的生产。

选择前章研究的利用残渣二次糖化上清液的小麦秸秆水解清液进行 SHF。探究不同浓度的可发酵糖对于最终产物的产量及得率的影响。发酵情况见图 3.6。

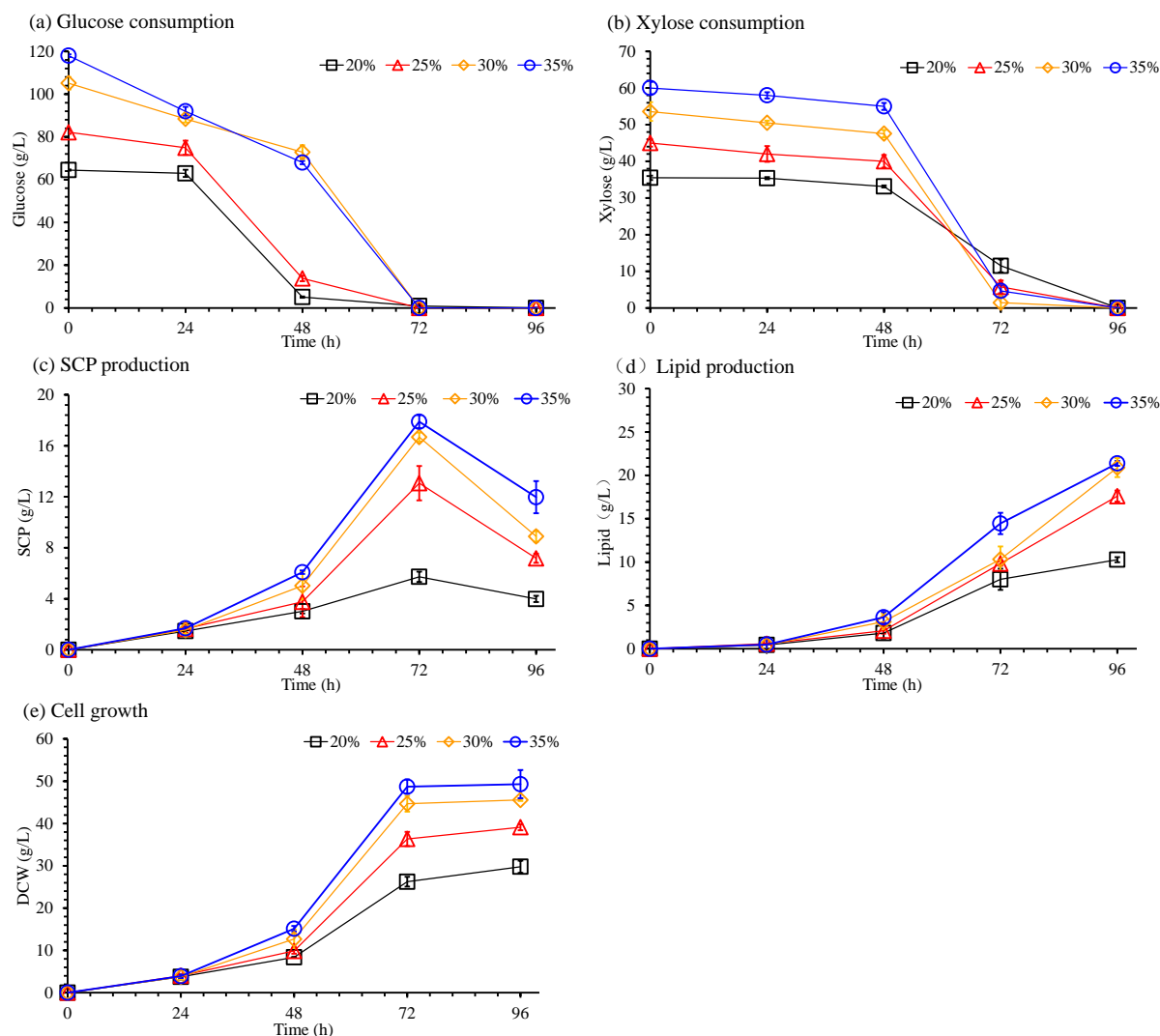


图 3.6 *T. cutaneum* MP11 利用不同固含量水解液生产单细胞蛋白

(a) 葡萄糖浓度；(b) 木糖浓度；(c) 单细胞蛋白产量；(d) 油脂产量；(e) DCW。

Fig.3.6 Production of single-cell protein by *T. cutaneum* MP11 using hydrolysates with different solids loading

所用的发酵液是利用残渣二次糖化得到的水解清液加入到新一轮的 SHF 所得的水解清液，在 3 L 生物反应器中进行 SHF，SHF 条件：发酵温度 30°C、转速 600 rpm、通气量 1.0 vvm、发酵时间 96 h、2M H₂SO₄ 及 5M NaOH 调节 pH 至 5.0。

对于不同固含量的水解清液，葡萄糖均在 72 h 耗尽，而木糖则是在葡萄糖耗尽后开始快速消耗，并在 96 h 耗尽，20% (w/w) 固含量的实验组木糖消耗明显慢与其他实验组，可能是由于 20% (w/w) 固含量实验组菌体量较少，因此代谢木糖慢；与 SSF 在 48 h 获得最高单细胞蛋白产量这一现象不同，使用水解清液发酵单细胞蛋白的最高产量在 72 h 达到，20% (w/w)、25% (w/w)、30% (w/w) 及 35% (w/w) 固含量实验组的最高单细胞蛋白产量分别为 8.34 g/L、13.07 g/L、16.68 g/L 及 17.89 g/L，此时它们的蛋白含量均保持在 30% 以上，分别为 31.82%、35.95%、37.35%、36.72%；各实验组获得单细胞蛋白最高产量时，副产物微生物油脂的产量分别 8.01 g/L、9.83 g/L、10.32 g/L 及

14.45 g/L；一般生长环境中可发酵糖越多，菌体的生物量越多，因此菌体干重随着固含量的提升而提升。

20% (w/w)、25% (w/w)、30% (w/w) 及 30% (w/w) 固含量的进行高糖浓度的 SHF 获得的单细胞蛋白得率分别为 0.0953 g/g sugar、0.1076 g/g sugar、0.1061 g/g sugar 及 0.1032 g/g sugar。因此在 25% (w/w) 固含量下获得了最高得率的单细胞蛋白，得率并没有随着可发酵浓度提高而提升的原因可能是除了发酵初期加入的营养盐，水解清液本身除了葡萄糖、木糖等碳源物质，还含有其他的营养元素，例如维生素、镁钙等矿物质，都会影响菌株的生长。当这些物质耗尽后，即使含有碳源，发酵菌株也不能高效率的利用碳源来生产单细胞蛋白。

对于制备利用残渣二次糖化的水解上清液用于新一轮的 SHF，相较于 20% (w/w) 及 35% (w/w) 固含量实验组，25% (w/w) 及 30% (w/w) 固含量的实验组在综合考虑可发酵糖浓度以及糖化环节物料成本方面更具优势。因此对这两个固含量的实验组与 SSF、SHF 生产单细胞蛋白进行比较。首先对于 25% (w/w) 固含量下生产单细胞蛋白进行分析，见图 3.7。

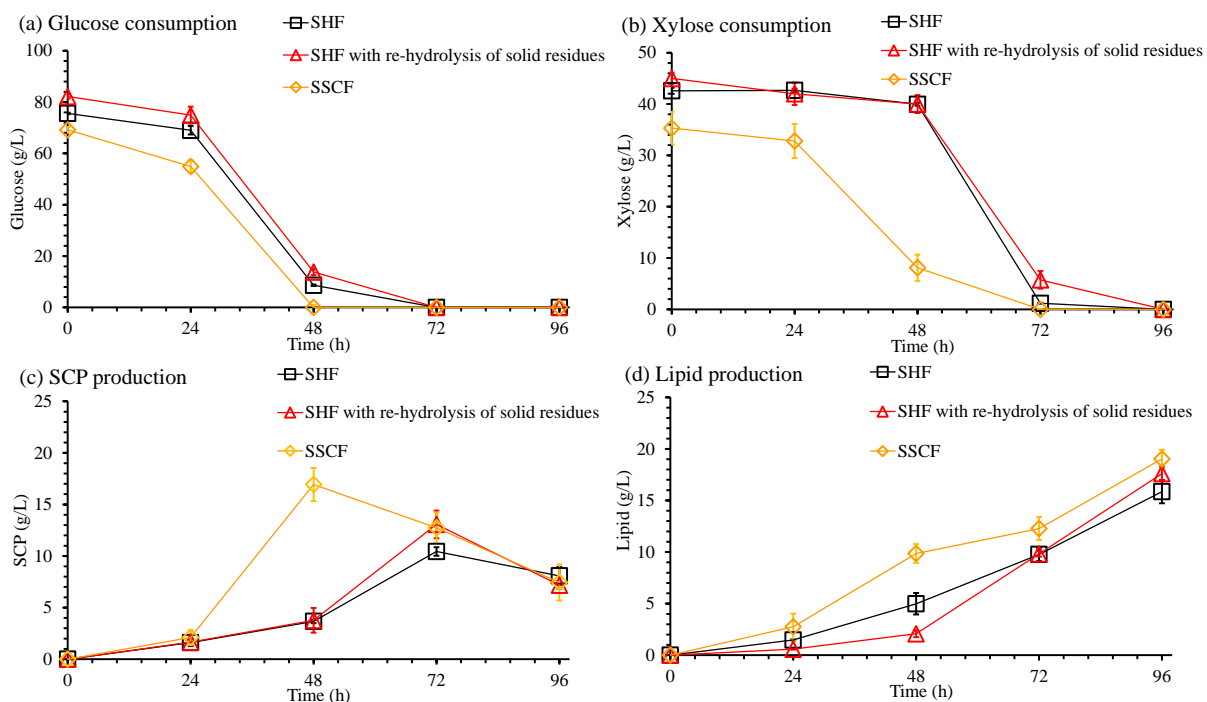


图 3.7 在 25% (w/w) 固含量下通过同步糖化与发酵、分步糖化与发酵以及对残渣进行二次糖化的分步糖化与发酵进行单细胞蛋白生产

(a) 葡萄糖浓度；(b) 木糖浓度；(c) 单细胞蛋白产量；(d) 油脂产量。

Fig.3.7 Single-cell protein by simultaneous saccharification and fermentation, separated hydrolysis and fermentation, separated hydrolysis and fermentation with re-hydrolysis of solid residues at 25% (w/w) solids loading

对 SSF、SHF 以及高糖浓度的 SHF（将残渣二次水解上清液加入到新一轮的 SHF）进行生产单细胞蛋白。发酵条件：发酵温度 30°C、转速 600 rpm、通气量发酵时间 1.0 vvm、96 h、使用 2M H₂SO₄ 及 5M NaOH 调节 pH 至 5.0。此外由于 SSF 含有木质素残渣，无法进行菌体干重比较。

由于 SSF 只有 12 h 的预糖化，因此初始可发酵糖浓度较 SHF 低。在发酵前 48 h，三种方式的葡萄糖消耗速率接近。区别在于木糖，SSF 率先利用木糖，并且在发酵 48 h 时，木糖只剩约 8 g/L，另外两个实验组在 48 h 之后才开始快速代谢木糖。在单细胞蛋白产量上，SSF 在 48 h 时获得最高产量为 16.93 g/L，另外两组则是在 72 h 时获得最高产量，SHF 和高糖浓度的 SHF 的产量分别为 10.44 g/L 和 13.07 g/L。各实验组均是在达到最高单细胞蛋白产量之后开始快速下降，由蛋白向油脂积累。在 96 h 时，SSF、SHF 及高糖浓度的 SHF 的油脂产量分别为 15.85 g/L、17.61 g/L 和 19.03 g/L，由于在发酵过程中没有可发酵糖的释放，积累代谢产物，因此 SHF 相较于 SSF，单细胞蛋白浓度下降的更快。SHF 和高糖浓度 SHF 的最高单细胞蛋白产量较 SSF 的最高产量低了 6.49 g/L 和 3.86 g/L。而利用残渣二次糖化的水解上清液加入新一轮糖化的高糖浓度的 SHF 较 SHF 提高了 2.63 g/L 单细胞蛋白产量，提升了 25.19%，此时油脂产量提升了 0.49%。一定程度上弥补了 SHF 的单细胞蛋白产量低于 SSF。接下来比较 30% (w/w) 固含量下的三种方法生产单细胞蛋白。见图 3.8。

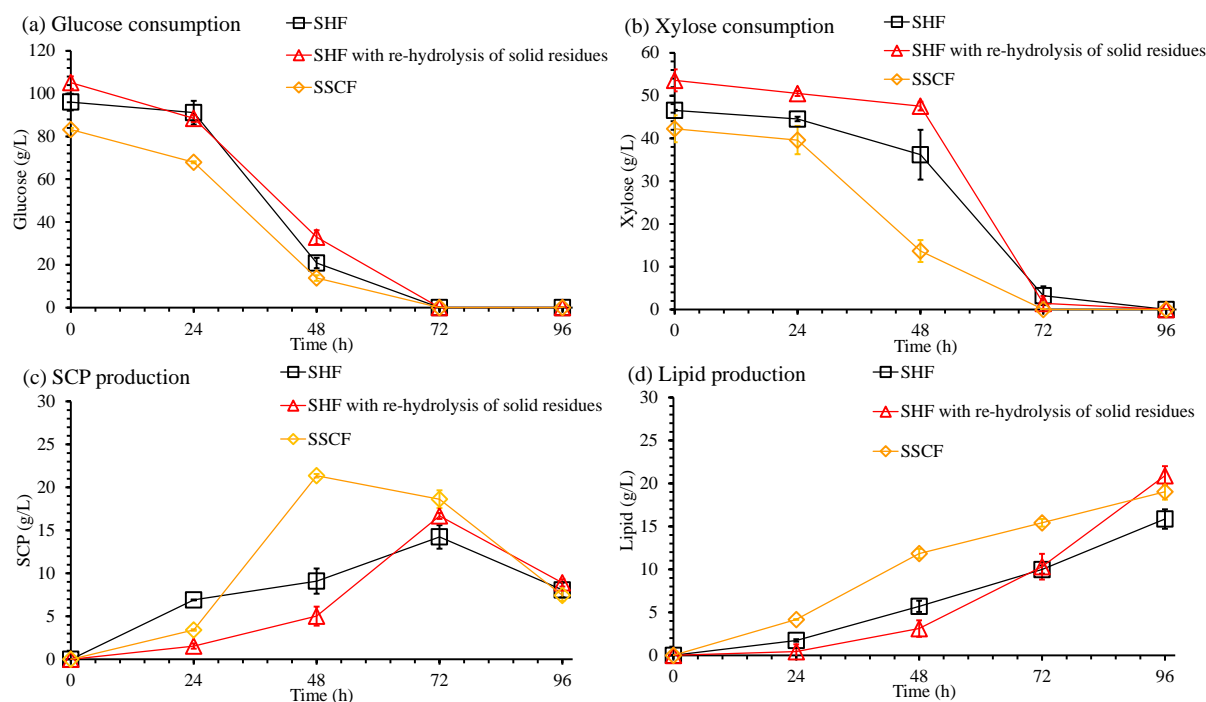


图 3.8 在 30% (w/w) 固含量下通过同步糖化与发酵、分步糖化与发酵以及对残渣进行二次糖化的分步糖化与发酵进行单细胞蛋白生产

(a) 葡萄糖浓度；(b) 木糖浓度；(c) 单细胞蛋白产量；(d) 油脂产量。

Fig.3.8 Single-cell protein by simultaneous saccharification and fermentation, separated hydrolysis and fermentation, separated hydrolysis and fermentation with re-hydrolysis of solid residues at 30% (w/w) solids loading

对 SSF、SHF 以及高糖浓度的 SHF（将残渣二次水解上清液加入到新一轮的 SHF）进行生产单细胞蛋白。发酵条件：发酵温度 30°C、转速 600 rpm、通气量发酵时间 1.0 vvm、96 h、使用 2M H₂SO₄ 及 5M NaOH 调节 pH 至 5.0。此外由于 SSF 含有木质素残渣，无法进行菌体干重比较。

在 30% (w/w) 固含量的预处理小麦秸秆下进行单细胞蛋白的发酵，其中通过 SSF

在 48 h 达到最高单细胞蛋白产量为 21.36 g/L，而 SHF 与高糖浓度 SHF 在 72 h 达到最高单细胞蛋白产量，分别为 14.24 g/L 和 16.68 g/L，相较于 SSF 低了 7.12 g/L 和 4.68 g/L。但高糖浓度 SHF 较 SHF 提高了 2.44 g/L，相当于提升了 17.13%，此时油脂产量提升了 3.4%。相较于 SHF，发酵菌株 *T. cutaneum* MP11 在 SSF 过程中可以更快的生长代谢，这可能是由于木质素残渣中含有更多的营养物质，例如维生素和钙镁等矿物质。同时，SSF 可以获得更高的产量，这是因为 SSF 将糖化与发酵两个过程结合在一起，即在发酵时，纤维素酶仍对糖化底物进行水解，仍有葡萄糖、木糖或其他糖产出，可以获得更高的产量。因此还需要从生产单细胞蛋白的得率上进行探究。

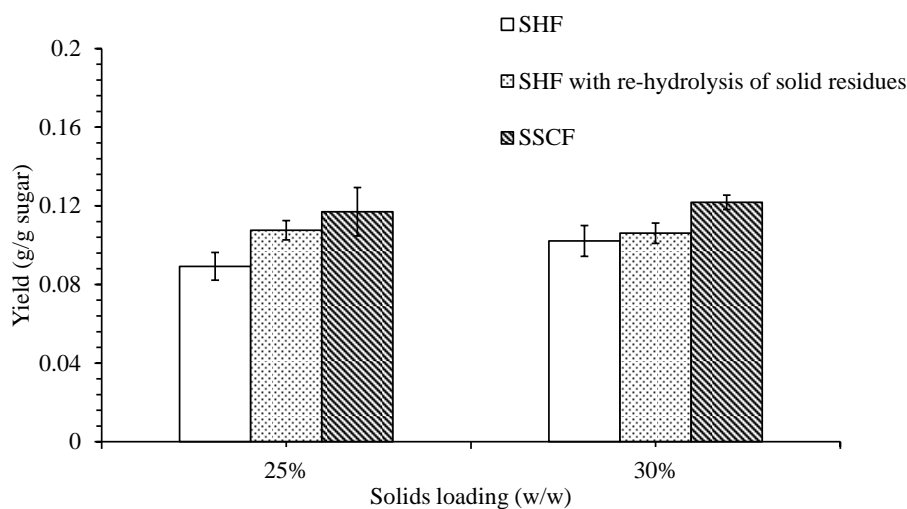


图 3.9 通过同步糖化与发酵、分步糖化与发酵以及对残渣进行二次糖化的分步糖化与发酵生产单细胞蛋白的得率

Fig.3.9 Yield of Single-cell protein by simultaneous saccharification and fermentation, separated hydrolysis and fermentation, separated hydrolysis and fermentation with re-hydrolysis of solid residues 其中 SSF 的得率为发酵 48 h 所得单细胞蛋白的得率，其他实验组为发酵 72 h 所得单细胞蛋白的产量。

使用 25%及 30% (w/w) 固含量的预处理后小麦秸秆物料，SSF 生产单细胞蛋白的得率分别为 0.1170 g/g sugar 和 0.1218 g/g sugar (图 3.9); 高糖浓度 SHF 实验组分别为 0.1076 g/g sugar 及 0.1061 g/g sugar; SHF 实验组分别为 0.0892 g/g sugar 和 0.1022 g/g sugar。在单细胞蛋白的得率方面，仍是 SSF 的得率最高，但是比起 SHF，通过提高糖浓度的获得的 SHF 在 25% (w/w) 和 30% (w/w) 在单细胞蛋白得率上分别提升了 20.62% 及 3.82%。因此在 25% (w/w) 下，利用残渣二次糖化法获得的高糖浓度 SHF 进行单细胞蛋白生产更佳。

使用 SSF 与 SHF 两种方法进行单细胞蛋白及微生物油脂的生产，SSF 的得率要高于 SHF，在后续对发酵液进行离心后，发酵菌体位于离心下层沉淀，位于底部沉淀的微生物油脂可以通过盐酸裂解细胞 (SSF 相较于 SHF 会多消耗盐酸)，最终使用氯仿-甲醇萃取出来。但是单细胞蛋白无法与木质纤维素固体残渣有效分离，难以实现产物的

纯化，因此必须采用 SHF，利用残渣二次糖化上清液加入到新一轮 SHF 中，有效的提高了糖化过程的葡萄糖得率，获得了更高浓度的发酵总糖，减少了 SHF 与 SSF 产量的差距，一定程度上弥补了 SHF 产量较低的短板。

在高固含量下，SHF 的单细胞蛋白产量始终低于 SSF，除了木质纤维素残渣中含有更多的营养物质外，SSF 体系下的糖化液与 SHF 体系下的水解液粘度也不同。因此它们的溶氧速率也不相同，相较于粘度更大的糖化液，600 rpm 的转速对于水解液发酵的强度太大，影响了菌株的生长以及后续产物的积累，需要在水解液体系下对于不同转速进行探究。发酵结果见图 3.10。

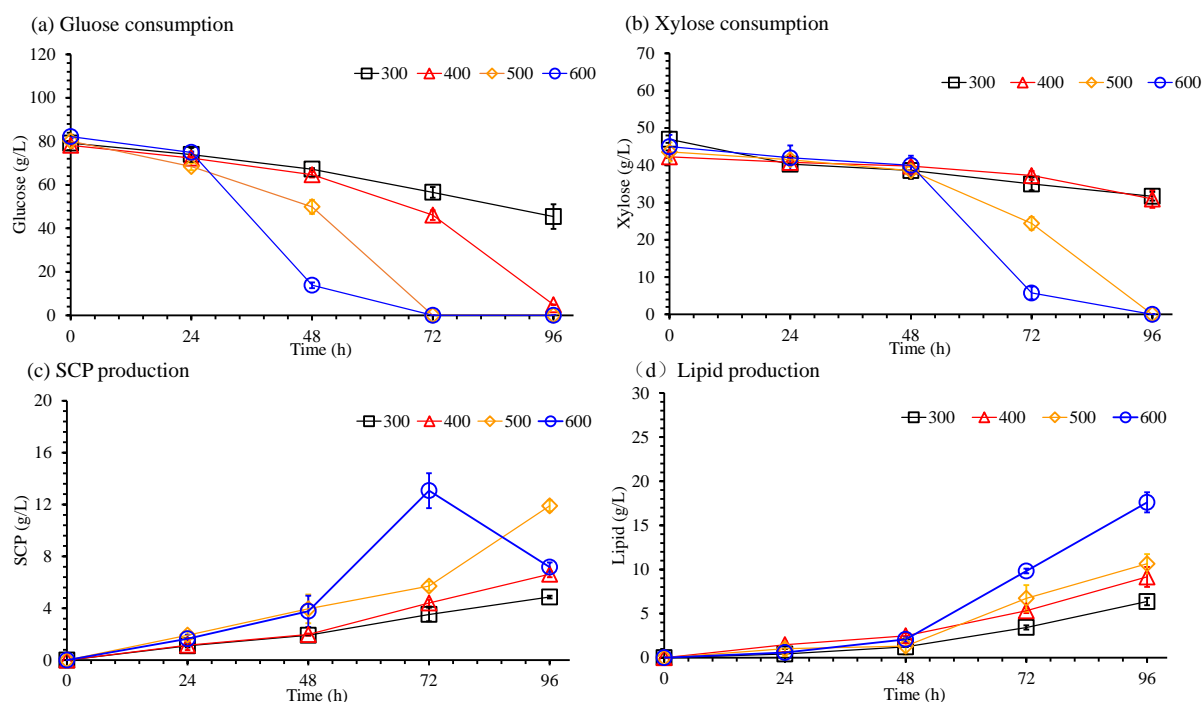


图 3.10 *T. cutaneum* MP11 在不同转速下生产单细胞蛋白

(a) 葡萄糖浓度；(b) 木糖浓度；(c) 单细胞蛋白产量；(d) 油脂产量。

Fig.3.10 Production of single cell protein by *T. cutaneum* MP11 at different rotational speeds
 发酵条件：25% (w/w) 固含量糖化液、发酵温度 30°C、通气量发酵时间 1.0 vvm、96 h、使用 2M H₂SO₄ 及 5M NaOH 调节 pH 至 5.0。

在降低转速后发现，发酵菌株在发酵前期的生长所需时间更久，其中 300 rpm 转速下，发酵 96 h 时葡萄糖还没有耗尽；400 rpm 转速下，发酵 96 h 后木糖还没有耗尽；观察到转速降至 500 rpm，仍然落后于 600 rpm 转速的实验组接近 24 h。分析原因可能是由于转速降低，导致发酵菌株在前期的生长繁殖受到严重影响，延缓了生长期，其次搅拌转速并不仅仅影响了溶氧速率，还改变了菌株生长环境中的剪切力，对于酵母来说，转速剪切力对于生长也会产生影响。

单纯调节转速来改变发酵过程中的溶氧水平远远不够，应该通过调节转速以及改变通气量协同控制溶氧水平，同时，对于皮状丝孢酵母在生产单细胞蛋白时可以尝试

分段调控发酵过程的溶氧水平，在发酵前期，保持高溶氧水平来使得菌株快速生长，在旺盛生长期，可以降低溶氧水平来延缓菌株的生长，维持菌株在一个高蛋白含量的阶段，以此来保证单细胞蛋白的产量。

3.3.4 探究不同糖化体系下生产微生物油脂

利用皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 生产的微生物油脂，可以用作生物柴油的原料，使用小麦秸秆作为微生物油脂的生产原料可以实现其经济可行性和可持续生产。在限氮的条件下，皮状丝孢酵母的发酵可以生产更多的油脂，因此仅需要改变硫化铵的添加量，就可以使得皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 利用小麦秸秆生产微生物油脂。探究了使用高糖浓度的小麦秸秆水解液进行单细胞蛋白生产后，接下来进行微生物油脂发酵，发酵结果见图 3.11。

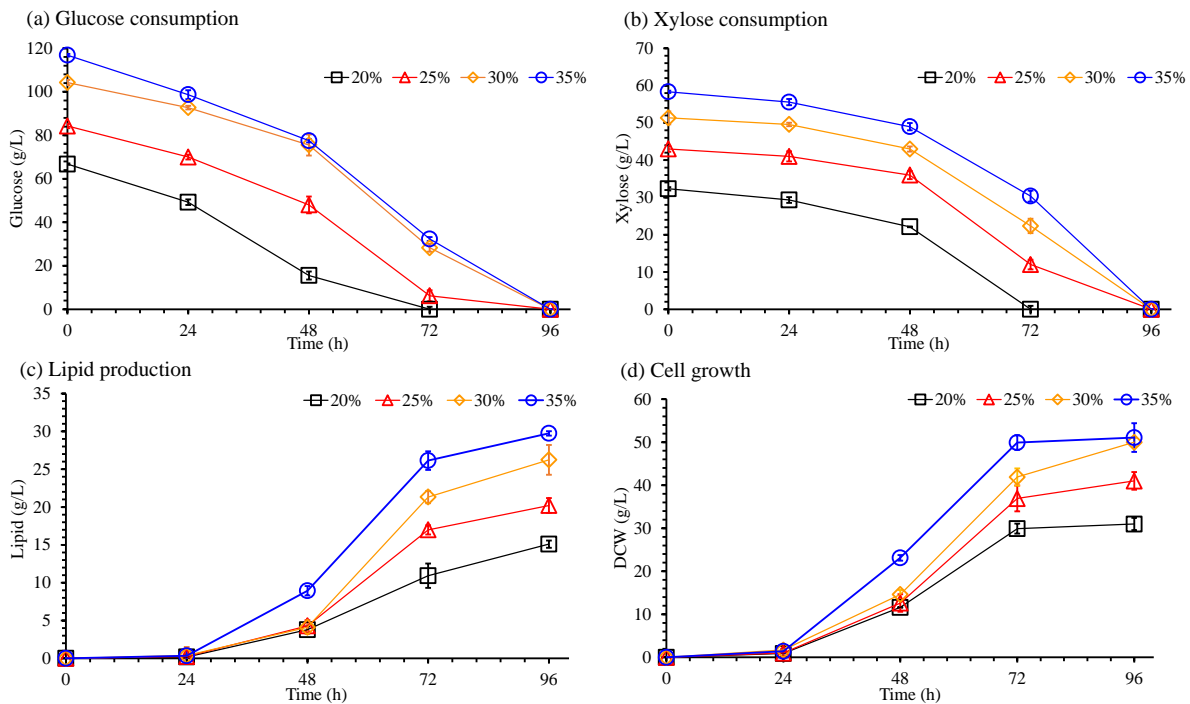


图 3.11 *T. cutaneum* MP11 利用不同固含量水解液生产微生物油脂

(a) 葡萄糖浓度；(b) 木糖浓度；(c) 油脂产量；(d) DCW.

Fig.3.11 Production of lipid by *T. cutaneum* MP11 using hydrolysates with different solids loadings
发酵条件：发酵温度 30°C、转速 600 rpm、通气量发酵时间 1.0 vvm、96 h；使用 6M HCl 调节 pH 至 5.0。

与 SHF 生产单细胞蛋白相比，生产油脂时的糖耗速率明显下降，当发酵 72 h 时，30% (w/w) 和 35% (w/w) 固含量的葡萄糖浓度还剩大约 30 g/L，仅仅利用了大约 70% 的葡萄糖；到 96 h 时，葡萄糖及木糖皆消耗完；在发酵期间，油脂的产量不断提升，在 96 h 时，各实验组的油脂产量分别为 15.10 g/L、21.21 g/L、26.24 g/L 及 29.74 g/L，油脂的含量分别是 48.72%、51.72%、52.49% 及 58.21%，油脂的得率分别为 0.1524 g/g

sugar、0.1609 g/g sugar、0.1686 g/g sugar、0.1698 g/g sugar，随着固含量的提升，微生物油脂的得率也不断提升，最高得率相较于最低得率提高了 0.0174 g/g sugar，相当于提高了 11.42 %，因此为了节省生产成本，必须保证高浓度的可发酵单糖用于微生物油脂的生产。

综合考虑可发酵糖浓度以及糖化环节物料成本方面，25% (w/w) 及 30% (w/w) 固含量的实验组更具有优势。因此对 25% (w/w) 和 30% (w/w) 固含量下三种方式进行微生物油脂发酵。25% (w/w) 固含量发酵结果见图 3.12。

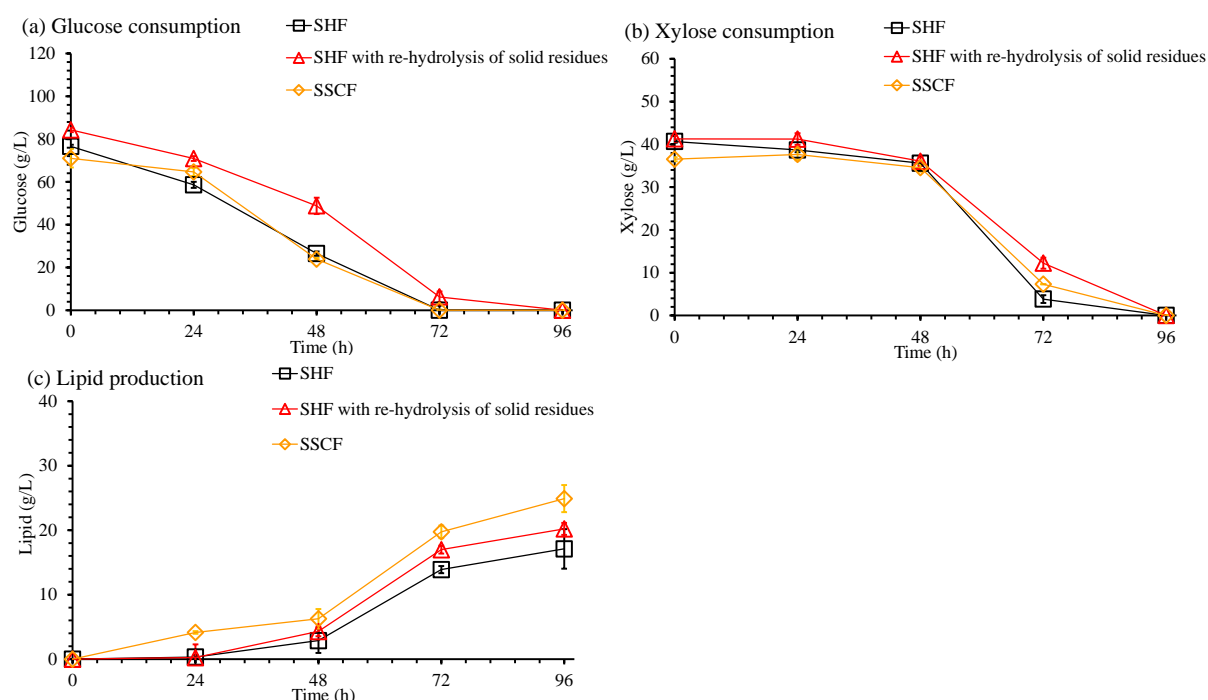


图 3.12 在 25% (w/w) 固含量下通过同步糖化与发酵、分步糖化与发酵以及对残渣进行二次糖化的分步糖化与发酵进行油脂生产

(a) 葡萄糖浓度; (b) 木糖浓度; (c) 油脂产量.

Fig.3.12 Production of lipid by simultaneous saccharification and fermentation, separated hydrolysis and fermentation, separated hydrolysis and fermentation with re-hydrolysis of solid residues at 25% (w/w) solids loading

对 SSF、SHF 以及高糖浓度的 SHF（将残渣二次水解上清液加入到新一轮的 SHF）进行微生物油脂的生产。发酵条件：发酵温度 30°C、转速 600 rpm、通气量发酵时间 1.0 vvm、96 h、使用 6M HCl 调节 pH 至 5.0。此外由于 SSF 含有木质素残渣，无法进行菌体干重比较。

对三个实验组进行油脂发酵时，葡萄糖基本在 72 h 耗尽，而木糖则都是在 96 h 耗尽。随着发酵的进行，油脂的产量不断提高，在 96 h 到达最大值，SSF、SHF 以及高糖浓度的 SHF 的油脂产量分别为 24.89 g/L、17.10 g/L 和 20.21 g/L。高糖浓度的 SHF 相较于 SHF 的油脂产量提升了 18.19%。接下来继续对 30% (w/w) 固含量下通过 SSF、SHF 以及对残渣进行二次糖化的 SHF 都进行微生物油脂发酵，比较其发酵结果。发酵结果见图 3.13。

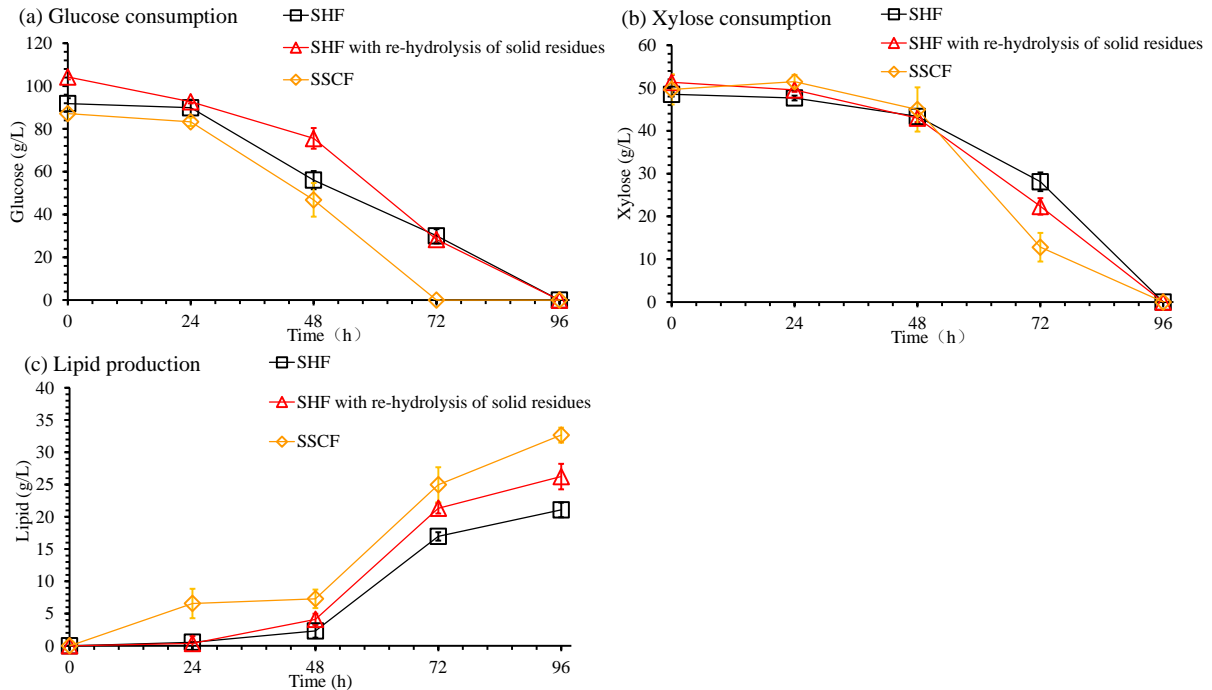


图 3.13 在 30% (w/w) 固含量下通过同步糖化与发酵、分步糖化与发酵以及对残渣进行二次糖化的分步糖化与发酵进行微生物油脂生产

(a) 葡萄糖浓度; (b) 木糖浓度; (c) 油脂产量。

Fig.3.13 Production of lipid by simultaneous saccharification and fermentation, separated hydrolysis and fermentation, separated hydrolysis and fermentation with re-hydrolysis of solid residues at 30% (w/w) solids loading

对 SSF、SHF 以及高糖浓度的 SHF (将残渣二次水解上清液加入到新一轮的 SHF) 进行微生物油脂的生产。发酵条件: 发酵温度 30 °C、转速 600 rpm、通气量发酵时间 1.0 vvm、96 h、使用 6M HCl 调节 pH 至 5.0。此外由于 SSF 含有木质素残渣, 无法进行菌体干重比较。

在 30 (w/w) 固含量下, SSF 的糖耗明显高于其他两个实验组, 这可能是由于木质纤维素残渣含有更多的营养物质, 因此菌株生长更加旺盛。发酵 96 h 时, 各实验组的可发酵糖都耗尽, 此时 SSF、SHF 以及高糖浓度的 SHF 的油脂产量分别为 32.66 g/L、21.08 g/L 和 26.24 g/L。高糖浓度的 SHF 相较于 SHF 的油脂产量提升约了 24.48%。因此对残渣二次糖化的 SHF 相较于一次糖化 SHF 可以获得更高的产量, 一定程度缩小了与 SSF 的差距, 接下来继续比较三种方法的油脂得率。

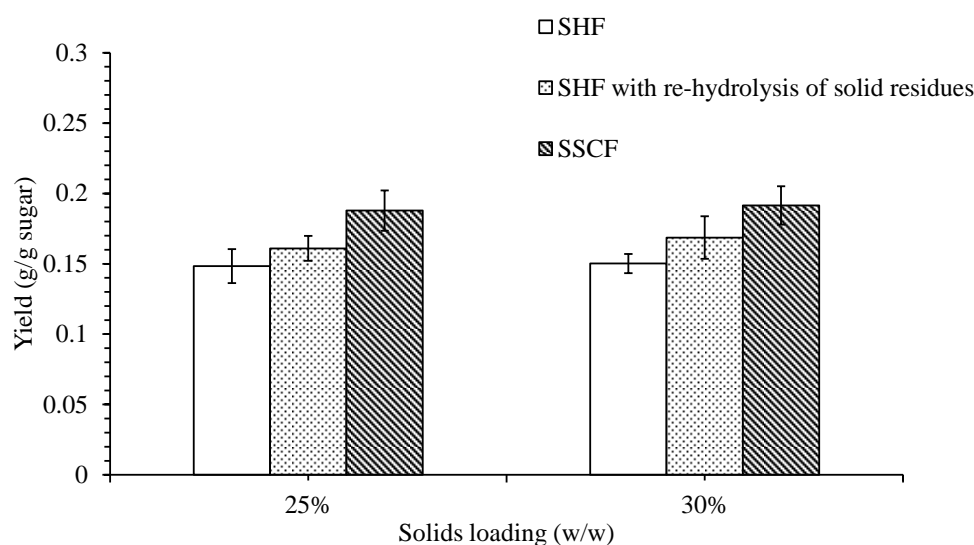


图 3.14 通过同步糖化与发酵、分步糖化与发酵以及对残渣进行二次糖化的分步糖化与发酵生产油脂的得率

Fig.3.14 Yield of lipid produced by simultaneous saccharification and fermentation, separated hydrolysis and fermentation, separated hydrolysis and fermentation with re-hydrolysis of solid residues at 30% (w/w) solids loading

其中得率为发酵 96 h 的油脂得率。

使用 25%及 30% (w/w) 固含量的预处理后小麦秸秆物料, SSF 生产油脂的得率分别为 0.1878 g/g sugar 和 0.1914 g/g sugar (图 3.14); 高糖浓度 SHF 实验组分别为 0.1609 g/g sugar 及 0.1686 g/g sugar; SHF 实验组分别为 0.1439 g/g sugar 和 0.1502 g/g sugar。在油脂的得率方面, 仍是 SSF 的得率最高, 但是比起 SHF, 通过提高糖浓度的获得的 SHF 在 25% (w/w) 和 30% (w/w) 固含量下获得的油脂得率都提升了约 12%。

因此, 对于微生物油脂的发酵, SSF 可以获得更高的产量与得率, 但是在 SSF 过程中, 木质素残渣会对终产物油脂造成影响。不仅需要更多的盐酸对细胞进行裂解, 而且也会耗费更多的氯仿用来提取油脂。最重要的是提取到的油脂还会有固体残渣残留, 需要进一步过滤。为了节省下游提取分离纯化的成本, 同时使油脂发酵实现大规模生产, 因此需要通过 SHF 生产微生物油脂。通过残渣二次糖化法得到的高糖浓度的水解清液不单单含有更多的可发酵糖, 还带有游离的其他营养物质, 例如维生素。这种营养物质可以使得发酵菌株更好的生长代谢。在 25% (w/w) 和 30 (w/w) 固含量下, 分别提高 18.19%和 24.48%的油脂产量, 进一步缩小与 SSF 生产油脂的差距。

3.3.5 评价不同固含量下 SHF 生产单细胞蛋白及油脂成本

对采用残渣二次糖化法得到的高糖浓度的小麦秸秆水解液进行单细胞蛋白及油脂发酵, 在之前计算了糖化得到可发酵糖的成本, 因此通过生产可发酵糖的小麦秸秆及纤维素酶成本来计算不同固含量的高糖浓度 SHF 生产得到的单细胞蛋白及油脂的成本。

表 3.1 单细胞蛋白及油脂成本

Table.3.1 Cost of single cell protein and lipid

Solids loading(w/w)	g SCP/g sugar	g lipid/g sugar	CNY/kg SCP	CNY/kg lipid
20%	0.0676	0.1420	55.51	25.14
25%	0.0734	0.1537	51.04	22.49
30%	0.0782	0.1497	49.58	22.99
35%	0.0802	0.1576	52.10	23.22

注：这里的成本只包括小麦秸秆及纤维素酶成本（小麦秸秆按照每吨 630 CNY；纤维素按照每千克 21 CNY，详情见 2.3.3。）

在工业化生产中，能耗成本也需要进行计算，这里仅仅将糖化过程中的物料成本进行计算以作参考。在 25% (w/w) 固含量下进行高糖浓度 SHF 获得的单细胞蛋白得率最高，为 0.1076 g/ g sugar，但是综合分析各固含量下的可发酵糖得率以及产物得率后，结果表明在 30% (w/w) 固含量下进行单细胞蛋白生产时所需成本最低，为 49.58 CNY/kg。在进行微生物油脂发酵时，即使在 35% (w/w) 固含量下能获得最高的微生物油脂得率，但是在 25% (w/w) 固含量下进行油脂发酵时可以达到最低的小麦秸秆与纤维素酶成本，为 22.49 CNY/kg。

3.4 本章小结

将小麦秸秆水解清液应用于发酵，便于实现大规模的生产才是关键。在本章开始对于小麦秸秆水解液进行生物脱毒，尝试了一种生物脱毒与发酵的快速切换方式。其次探究了接种量对于发酵菌株生长生产的影响，接下来又对小麦秸秆水解液生产单细胞蛋白验证了连续补料发酵这个方式的可行性。比较了 SSF 及 SHF 对于单细胞蛋白发酵结果的影响，之后尝试改变转速来探究对于单细胞蛋白生产的影响。同时也对不同固含量提高残渣二次糖化得到的高糖浓度 SHF 生产微生物油脂进行探究。最后联系前章将糖化得率与产物得率进行综合分析，通过糖化过程的小麦秸秆与纤维素酶成本大致计算了每千克单细胞蛋白和每千克微生物油脂生产过程中糖化环节需要的物耗成本。

(1) 在生物反应器中添加 1.5 g/L 次氯酸钠可以代替原先采用的高温灭菌，且省去了灭菌后的过滤工序，避免了脱毒菌株对于发酵过程的影响，最终的单细胞蛋白及微生物油脂产量远远高于未添加次氯酸钠的实验组。

(2) 对发酵菌株 *T. cutaneum* MP11 的接种量进行探究，选择 10% (v/v) 接种量进行单细胞蛋白的发酵，相较于 5% (v/v) 接种量实验组可以节省大约 24 h 的发酵时长。以小麦秸秆水解液作为发酵液时，发酵菌株 *T. cutaneum* MP11 在发酵前期需要 24 h 的时间进行适应及生长繁殖，同时，该菌株只有在生长旺盛期才进行单细胞蛋白的大量累积，为了获得更高的产量及减少前期的生长时长，选择进行连续补料发酵，验证了该发酵方式的可行性。在补料期间，菌株的蛋白含量均在 30% 以上。

(3) 对不同固含量利用残渣二次糖化的上清液加入新一轮糖化获得的高糖浓度水解液生产单细胞蛋白，其中在 25% (w/w) 固含量下获得了最高得率的单细胞蛋白，为

0.1076 g/g sugar; 在 25%、30% (w/w) 固含量下, 对 SSF、SHF 及高糖浓度的 SHF 都进行生产单细胞蛋白, SSF 的产量最高。相较于 SHF, 25% (w/w) 和 30% (w/w) 固含量下, 高糖浓度的 SHF 的单细胞蛋白产量分别提高了 25.19% 和 17.13%。为了提高单细胞蛋白产量, 尝试降低搅拌转速, 结果表明降低转速不能促进单细胞蛋白的积累, 反而会减慢发酵菌株的生长, 延缓发酵时间。

(4) 对不同固含量利用残渣二次糖化的上清液加入新一轮糖化获得的高糖浓度水解清液生产微生物油脂, 随着固含量提升, 可发酵糖浓度越高, 油脂的得率也越高。在 25%、30% (w/w) 固含量下, 对 SSF、SHF 及利用残渣二次糖化的水解上清液加入新一轮糖化的高糖浓度的 SHF 进行微生物油脂的发酵, 高糖浓度 SHF 较 SHF 的油脂产量分别提高了 18.19% 和 24.48%, 但仍低于 SSF 获得的油脂产量。

(5) 比较不同固含量的对残渣进行二次糖化得到的高糖浓度 SHF, 用于生产单细胞蛋白和微生物油脂在糖化环节的物耗成本, 其中 30% (w/w) 固含量生产每千克蛋白所需成本最低, 为 49.58 CNY/kg; 25% (w/w) 固含量生产每千克微生物油脂所需成本最低, 为 22.49 CNY/kg。

第4章 结果与展望

4.1 结果和创新点

在木质纤维素生物炼制中，一般选择同步糖化与发酵以及分步糖化与发酵来进行生产。其中使用同步糖化与发酵可以获得更多的可发酵糖，但是对于胞内产物例如单细胞蛋白和油脂时，由于菌体难以与木质素残渣进行分离，不利于后续产物的分离纯化。因此需要通过分步糖化与发酵进行胞内产物的生产。为了获得高糖浓度及高糖得率的小麦秸秆水解液，提出了一种新型提高糖化得率的方法即对糖化残渣进行二次糖化，同时为了实现大规模的生产，便于工业化应用，对后续的脱毒灭活环节进行改进。探究不同固含量水解液下的单细胞蛋白及油脂产量，并对其糖化环节的物耗成本进行计算。本论文的主要研究内容如下：

(1) 探究了利用残渣二次糖化上清液对于提升可发酵糖浓度及得率的可行性后，对不同糖化参数进行了残渣二次糖化，比较其糖化后的可发酵糖浓度及得率，使用该方法在一定程度上可以弥补随着固含量的提升，糖化效果越差的现象，在 25% (w/w) 和 30% (w/w) 固含量下，进行残渣二次糖化的水解液相较于一次糖化的水解液，可发酵糖浓度分别提高了 6.04 g/L 和 11.24 g/L，得率提高了约 4.57% 及 6.85%。

(2) 对脱毒菌株的灭活进行了优化，选择 1.5 g/L 的次氯酸钠作为灭活剂，在验证其可行性之后，应用于后续发酵。随后尝试对皮状丝孢酵母 *T. cutaneum* MP11 生产单细胞蛋白进行连续补料发酵，最终确定进行补料可以使得菌体的蛋白含量维持在 30% 左右。

(3) 对 25% (w/w) 及 30% (w/w) 固含量下的 SSF、SHF 及残渣二次糖化的 SHF 进行单细胞蛋白和微生物油脂的生产。结果表明：残渣二次糖化的 SHF 比起 SHF 提高了 25.19% 和 17.13% 的单细胞蛋白产量，而进行油脂发酵时，残渣二次糖化的 SHF 较 SHF 的产量分别提高了 18.19% 和 24.48%。

本文的创新点如下：

以往的水解液制备仅仅是对糖化液进行离心取上清液，本研究设计了一种新的无酶添加二次糖化未水解纤维素组分的方法，即在不额外添加纤维素酶的前提下，利用一次糖化后木质纤维素物料中木质素组分所吸附的纤维素酶，对残余的纤维素和半纤维素组分进行二次酶促糖化。同时，将二次糖化获得的低糖浓度水解液作为一次糖化添加的工艺水循环使用，从而提高可发酵糖浓度和得率。

4.2 展望

本研究提出了对残渣进行二次糖化的方法进一步提高了糖化得率，获得了更高糖浓度的小麦秸秆水解液，并用于后续生产单细胞蛋白及微生物油脂。之后添加次氯酸钠对脱毒菌株进行灭活，最后对不同糖化体系进行单细胞蛋白和微生物油脂的发酵，对其产量及得率进行比较。通过残渣二次糖化的方法相较于一次糖化法，最终单细胞

蛋白和油脂的产量都有所提升。但本研究仍有需要进行研究和探讨的地方：

(1) 使用残渣二次糖化法，相较于可发酵糖得率的提升，最终发酵产量的提升明显更高，这可能是由于木质素残渣中含有一些营养物质，例如维生素和钙镁等矿物质^[107]。而比起一次糖化的水解清液，通过残渣二次糖化获得水解清液，不仅含有更多的可发酵糖，还含有更多的上述营养物质，因此对于最终产量的提升更加明显。后续需要探究补充上述营养物质来加速水解液中发酵菌株的生长繁殖，更重要的是提高单细胞蛋白和油脂的产量。

(2) 在高固含量下，SHF 生产单细胞蛋白的得率要低于 SSF，猜测可能和发酵液的溶氧不同有关。之前探究了改变转速对于产物的影响，但是最终并没有获得更高的产量，相反使得菌株的糖耗更慢了。在之后的研究中，需要将通气量这个因素也考虑进去，将通气量与搅拌转速同时进行调整来改变发酵时的溶氧水平，此外可以进行分段调控来改变溶氧水平，在菌株发酵初期，保持较高溶氧水平，当菌株大量繁殖开始进行产物积累时，将溶氧水平降低，减缓合成代谢产物的过程，使菌体维持在一个高产蛋白的水平。

(3) 对于单细胞蛋白及微生物油脂的成本计算还需要进行完善，目前的成本计算仅仅是针对糖化过程中所需的小麦秸秆和纤维素酶的成本，仅限于糖化阶段的物耗，除此之外，需要将脱毒、灭活、发酵及下游产物的提取的成本进行汇总计算。

参考文献

- [1] Williams C L, Emerson R M, Tumuluru J S. Biomass compositional analysis for conversion to renewable fuels and chemicals [M]. 2017.
- [2] Singh N, Singhania R R, Nigam P S, Dong C D, Patel A K, Puri M. Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 344.
- [3] Devi A, Bajar S, Kour H, Kothari R, Pant D, Singh A. Lignocellulosic biomass valorization for bioethanol production: A circular bioeconomy approach [J]. *Bioenergy Research*, 2022, 15(4): 1820-1841.
- [4] De Buck V, Polanska M, Van Impe J. Modeling biowaste biorefineries: A review [J]. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 2020, 4.
- [5] Shaikh H M, Adsul M G, Gokhale D V, Varma A J. Enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by partial modification of its chemical structure [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2011, 86(2): 962-968.
- [6] Preece I A. Studies on hemicelluloses: The hemicelluloses of maize cobs [J]. *The Biochemical journal*, 1930, 24(4): 973-9.
- [7] Zoghalmi A, Paës G. Lignocellulosic biomass: Understanding recalcitrance and predicting hydrolysis [J]. *Frontiers in Chemistry*, 2019, 7: 874.
- [8] Wang W Y, Zhang C, Sun X X, Su S S, Li Q, Linhardt R J. Efficient, environmentally-friendly and specific valorization of lignin: Promising role of non-radical lignolytic enzymes [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2017, 33(6): 1-14.
- [9] Usmani Z, Sharma M, Awasthi A K, Lukk T, Tuohy M G, Gong L, Nguyen-Tri P, Goddard A D, Bill R M, Nayak S C, Kumar V. Lignocellulosic biorefineries: The current state of challenges and strategies for efficient commercialization [J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2021, 148: 111258.
- [10] Meng X Z, Wang Y X, Conte A J, Zhang S Y, Ryu J, Wie J J, Pu Y Q, Davison B H, Yoo C G, Ragauskas A J. Applications of biomass-derived solvents in biomass pretreatment - Strategies, challenges, and prospects [J]. *Bioresource Technology*, 2023, 368: 128280.
- [11] Minster J-F, Wertz J L, Bedue O. Lignocellulosic biorefineries introduction [M]. 2013.
- [12] Zhao J K, Wang D H, Lee J. A critical review on water overconsumption in lignocellulosic biomass pretreatment for ethanol production through enzymic hydrolysis and fermentation [J]. *Energy & Fuels*, 2023, 37(4): 2667-2680.
- [13] Alvira P, Tomás-Pejó E, Ballesteros M, Negro M J. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4851-4861.
- [14] Shastri Y N, Miao Z W, Rodríguez L F, Grift T E, Hansen A C, Ting K C. Determining optimal size reduction and densification for biomass feedstock using the BioFeed optimization model [J]. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, 2014, 8(3): 423-437.
- [15] Venturi P, Gigler J K, Huisman W. Economical and technical comparison between

- herbaceous (*Miscanthus x giganteus*) and woody energy crops (*Salix viminalis*) [J]. *Renewable Energy*, 1999, 16(1-4): 1023-1026.
- [16] Brownell H H, Yu E K C, Saddler J N. Steam-explosion pretreatment of wood effect of chip size acid moisture content and pressure drop [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1986, 28(6): 792-801.
- [17] Sundaram V, Muthukumarappan K, Gent S. Understanding the Impacts of AFEX™ pretreatment and densification on the fast pyrolysis of corn stover, prairie cord grass, and switchgrass [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 181(3): 1060-1079.
- [18] Aden A, Foust T. Technoeconomic analysis of the dilute sulfuric acid and enzymatic hydrolysis process for the conversion of corn stover to ethanol [J]. *Cellulose*, 2009, 16(4): 535-545.
- [19] Silverstein R A, Chen Y, Sharma-Shivappa R R, Boyette M D, Osborne J. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks [J]. *Bioresource Technology*, 2007, 98(16): 3000-3011.
- [20] Wagner A O, Lackner N, Mutschlechner M, Prem E M, Markt R, Illmer P. Biological pretreatment strategies for second-generation lignocellulosic resources to enhance biogas production [J]. *Energies*, 2018, 11(7): 1797.
- [21] Agbor V B, Cicek N, Sparling R, Berlin A, Levin D B. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application [J]. *Biotechnology Advances*, 2011, 29(6): 675-685.
- [22] Periyasamy S, Karthik V, Kumar P S, Isabel J B, Temesgen T, Hunegnaw B M, Melese B B, Mohamed B A, Vo D V N. Chemical, physical and biological methods to convert lignocellulosic waste into value-added products. A review [J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2022, 20(2): 1129-1152.
- [23] Mahalaxmi S, Jackson C R, Williford C, Burandt C L. Estimation of treatment time for microbial preprocessing of biomass [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2010, 162(5): 1414-1422.
- [24] Maeda R N, Serpa V I, Rocha V A L, Mesquita R A A, Santa Anna L M M, de Castro A M, Driemeier C E, Pereira N, Polikarpov I. Enzymatic hydrolysis of pretreated sugar cane bagasse using *Penicillium funiculosum* and *Trichoderma harzianum* cellulases [J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(5): 1196-1201.
- [25] Hu L, Lin L, Wu Z, Zhou S Y, Liu S J. Chemocatalytic hydrolysis of cellulose into glucose over solid acid catalysts [J]. *Applied Catalysis B-environmental*, 2015, 174: 225-243.
- [26] Sun Y, Cheng J Y. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83(1): 1-11.
- [27] Saini J K, Patel A K, Adsul M, Singhania R R. Cellulase adsorption on lignin: A roadblock for economic hydrolysis of biomass [J]. *Renewable Energy*, 2016, 98: 29-42.
- [28] Bhati N, Shreya, Sharma A K. Cost-effective cellulase production, improvement strategies, and future challenges [J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2021, 44(2): 13623.
- [29] Bhatia S K, Jagtap S S, Bedekar A A, Bhatia R K, Patel A K, Pant D, Banu J R, Rao C V, Kim Y G, Yang Y H. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges [J].

- Bioresource Technology, 2020, 300.
- [30] Modig T, Liden G, Taherzadeh M J. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase [J]. Biochemical Journal, 2002, 363: 769-776.
- [31] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates.: II:: inhibitors and mechanisms of inhibition [J]. Bioresource Technology, 2000, 74(1): 25-33.
- [32] Sreenath H K, Jeffries T W. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeasts [J]. Bioresource Technology, 2000, 72(3): 253-260.
- [33] Shobana S, Kumar G, Bakonyi P, Saratale G D, Al-Muhtaseb A H, Nemestóthy N, Bélafi-Bakó K, Xia A, Chang J S. A review on the biomass pretreatment and inhibitor removal methods as key-steps towards efficient macroalgae-based biohydrogen production [J]. Bioresource Technology, 2017, 244: 1341-1348.
- [34] Zhang B, Zhan B R, Bao J. Reframing biorefinery processing chain of corn fiber for cellulosic ethanol production [J]. Industrial Crops and Products, 2021, 170.
- [35] Zhang J, Zhu Z, Wang X, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation [J]. Biotechnology for Biofuels, 2010, 3: 1-15.
- [36] López M J, Nichols N N, Dien B S, Moreno J, Bothast R J. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(1): 125-131.
- [37] Téllez-Téllez M, Fernández F J, Montiel-González A M, Sánchez C, Díaz-Godínez G. Growth and laccase production by *Pleurotus ostreatus* in submerged and solid-state fermentation [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(4): 675-679.
- [38] Bratosin B C, Darjan S, Vodnar D C. Single cell protein: A potential substitute in human and animal nutrition [J]. Sustainability, 2021, 13(16).
- [39] Quevedo-Amador R A, Escalera-Velasco B P, Arias A M R, Reynel-Avila H E, Moreno-Piraján J C, Giraldo L, Bonilla-Petriciolet A. Application of waste biomass for the production of biofuels and catalysts: a review [J]. Clean Technologies and Environmental Policy, 2024.
- [40] Hetényi K, Németh A, Sevela B. Investigation and modeling of lactic acid fermentation on wheat starch via SSF, CHF and SHF technology [J]. Periodica Polytechnica-Chemical Engineering, 2011, 55(1): 11-16.
- [41] Tlustý M, Rhyne A, Szczebak J T, Bourque B, Bowen J L, Burr G, Marx C J, Feinberg L. A transdisciplinary approach to the initial validation of a single cell protein as an alternative protein source for use in aquafeeds [J]. Peerj, 2017, 5: 3170.
- [42] Jones S W, Karpol A, Friedman S, Maru B T, Tracy B P. Recent advances in single cell protein use as a feed ingredient in aquaculture [J]. Current Opinion in Biotechnology, 2020, 61: 189-197.
- [43] Chen H Z, Li G H. An industrial level system with nonisothermal simultaneous solid state saccharification, fermentation and separation for ethanol production [J]. Biochemical

- Engineering Journal, 2013, 74: 121-126.
- [44] Anuradha R, Suresh A K, Venkatesh K V. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid [J]. Process Biochemistry, 1999, 35(3-4): 367-375.
- [45] López-Contreras, A.M.; Gabor, K.; Martens, A.A.; Renckens, B.A.; Claassen, P.A.; Van Der Oost, J.; De Vos, W.M. Substrate-induced production and secretion of cellulases by *Clostridium acetobutylicum*[J]. Appl. Environ. Microbiol. 2004, 70, 5238–5243.
- [46] Liu J, Yang J C. Cellulase production by *Trichoderma koningii* AS3.4262 in solid-state fermentation using lignocellulosic waste from the vinegar industry [J]. Food Technology and Biotechnology, 2007, 45(4): 420-425.
- [47] Cai C, Zhan X J, Zeng M J, Lou H M, Pang Y X, Yang J, Yang D J, Qiu X Q. Using recyclable pH-responsive lignin amphoteric surfactant to enhance the enzymatic hydrolysis of lignocelluloses [J]. Green Chemistry, 2017, 19(22): 5479-5487.
- [48] Reihani S F S, Khosravi-Darani K. Influencing factors on single-cell protein production by submerged fermentation: A review [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2019, 37: 34-40.
- [49] Huang C, Luo M T, Chen X F, Qi G X, Xiong L, Lin X Q, Wang C, Li H L, Chen X D. Combined "de novo" and "ex novo" lipid fermentation in a mix-medium of corncob acid hydrolysate and soybean oil by *Trichosporon dermatis* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2017, 10.
- [50] Arias-Roblero M, Mora-Villalobos V, Velazquez-Carrillo C. Evaluation of fed-batch fermentation for production of polyhydroxybutyrate with a banana pulp juice substrate from an agro Industrial By-Product [J]. Frontiers in Sustainable Food Systems, 2021, 5.
- [51] Chen X K, Zheng X T, Pei Y B, Huang J G, Tang J H, Hou P Z, Han W. Ethanol production from the mixture of waste french fries and municipal wastewater via separate hydrolysis and fermentation [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2022, 194(12): 6007-6020.
- [52] Vintila T, Vintila D, Neo S, Tulcan C, Hadaruga N. Simultaneous hydrolysis and fermentation of lignocellulose versus separated hydrolysis and fermentation for ethanol production [J]. Romanian Biotechnological Letters, 2011, 16(1): 106-112.
- [53] Annamalai N, Al Battashi H, Anu S N, Al Azkawi A, Al Bahry S, Sivakumar N. Enhanced bioethanol production from waste paper through separate hydrolysis and fermentation [J]. Waste and Biomass Valorization, 2020, 11(1): 121-131.
- [54] Berlowska J, Cieciora-Wloch W, Kalinowska H, Kregiel D, Borowski S, Pawlikowska E, Binczarski M, Witonska I. Enzymatic conversion of sugar beet pulp: A comparison of simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation for lactic acid production [J]. Food Technology and Biotechnology, 2018, 56(2): 188-196.
- [55] Zhang B, Yang H C, Wang Y, Bao J. Improving the dissolved oxygen level in high solids loading cellulosic sugar acids fermentation by restructuring the biorefinery chain [J]. Biochemical Engineering Journal, 2023, 200.
- [56] Liu Y S, Tang Y H, Gao H Y, Zhang W M, Jiang Y J, Xin F X, Jiang M. Challenges and future perspectives of promising biotechnologies for lignocellulosic biorefinery [J]. Molecules, 2021, 26(17).

- [57] Zhang J, Chu D Q, Huang J, Yu Z C, Dai G C, Bao J. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2010, 105(4): 718-728.
- [58] Shao S, Zhang J, Bao J. Reduction of reactor corrosion by eliminating liquid-phase existence in dry dilute acid pretreatment of corn stover [J]. *Energy & Fuels*, 2017, 31(6): 6140-6144.
- [59] Liu G, Bao J. Maximizing cellulosic ethanol potentials by minimizing wastewater generation and energy consumption: Competing with corn ethanol [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245: 18-26.
- [60] Pu Y Q, Hu F, Huang F, Ragauskas A J. Lignin structural alterations in thermochemical pretreatments with limited delignification [J]. *Bioenergy Research*, 2015, 8(3): 992-1003.
- [61] Wierckx N, Koopman F, Ruijsenaars H J, de Winde J H. Microbial degradation of furanic compounds: biochemistry, genetics, and impact [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(6): 1095-1105.
- [62] Zhang J, Zhu Z N, Wang X F, Wang N, Wang W, Bao J. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resiniae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3.
- [63] Zhang B, Khushik F A, Zhan B R, Bao J. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2021, 118(10): 4105-4118.
- [64] Han T, Zhang B, Yang H C, Liu X C, Bao J. Changes in pH values allow for a visible detection of the end point in submerged liquid biodetoxification during biorefinery processing [J]. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 2023, 11(46): 16608-16617.
- [65] Liu G, Bao J. Evaluation of electricity generation from lignin residue and biogas in cellulosic ethanol production [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 243: 1232-1236.
- [66] Mensah J K M, Twumasi P. Use of pineapple waste for single cell protein (SCP) production and the effect of substrate concentration on the yield [J]. *Journal of Food Process Engineering*, 2017, 40(3).
- [67] Trigo E, Chavarria H, Pray C, Smyth S J, Torroba A, Wesseler J, Zilberman D, Martinez J F. The bioeconomy and food system transformation [J]. *Science and Innovations for Food Systems Transformation*. 2023, 2: 849-868.
- [68] Thiviya P, Gamage A, Kapilan R, Merah O, Madhujith T. Single cell protein production using different fruit waste: A review [J]. *Separations*, 2022, 9(7).
- [69] Anupama, Ravindra P. Studies on production of single cell protein by *Aspergillus niger* in solid state fermentation of rice bran [J]. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2001, 44(1): 79-88.
- [70] Bajpai P, Bajpai P. Single-cell protein from lignocellulosic wastes [M]. *Single Cell Protein Production from Lignocellulosic Biomass*. 2017: 41-58.
- [71] Jones A D, Boundy-Mills K L, Barla G F, Kumar S, Ubanwa B, Balan V. Microbial lipid alternatives to plant lipids [M]. *Balan V. Microbial Lipid Production: Methods and*

- Protocols. 2019: 1-32.
- [72] Patel A, Sartaj K, Pruthi P A, Pruthi V, Matsakas L. Utilization of clarified butter sediment waste as a feedstock for cost-effective production of biodiesel [J]. *Foods*, 2019, 8(7).
- [73] Thliveros P, Kiran E U, Webb C. Microbial biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous biomass [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 157: 181-187.
- [74] Liu B, Zhao Z. Biodiesel production by direct methanolysis of oleaginous microbial biomass [J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2007, 82(8): 775-780.
- [75] Zheng X H, Hu R F, Chen D, Chen J N, He W J, Huang L Q, Lin C T, Chen H B, Chen Y Q, Zhu J M, Qi F, Xue T. Lipid and carotenoid production by the *Rhodospiridium toruloides* mutant in cane molasses [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 326.
- [76] Chen L, Qian X J, Zhang X Y, Zhou X H, Zhou J, Dong W L, Xin F X, Zhang W M, Jiang M, Ochsenreither K. Co-production of microbial lipids with valuable chemicals [J]. *Biofuels Bioproducts & Biorefining-Biofpr*, 2021, 15(3): 945-954.
- [77] Kumar R, Dhanarajan G, Bhaumik M, Chopra J, Sen R. Performance evaluation of a yeast biorefinery as a sustainable model for co-production of biomass, bioemulsifier, lipid, biodiesel and animal-feed components using inexpensive raw materials [J]. *Sustainable Energy & Fuels*, 2017, 1(4): 923-931.
- [78] Mitra D, Rasmussen M L, Chand P, Chintareddy V R, Yao L X, Grewell D, Verkade J G, Wang T, van Leeuwen J. Value-added oil and animal feed production from corn-ethanol stillage using the oleaginous fungus *Mucor circinelloides* [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 107: 368-375.
- [79] Duong V T, Ahmed F, Thomas-Hall S R, Quigley S, Nowak E, Schenk P M. High protein- and high lipid-producing microalgae from northern Australia as potential feedstock for animal feed and biodiesel [J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2015, 3.
- [80] Wang X, Wu Y B, Zhou Y. Transglycosylation, a new role for multifunctional cellulase in overcoming product inhibition during the cellulose hydrolysis [J]. *Bioengineered*, 2017, 8(2): 129-132.
- [81] McCarthy T, Hanniffy O, Savage A V, Tuohy M G. Catalytic properties and mode of action of three endo- β -glucanases from *Talaromyces emersonii* on soluble β -1,4- and β -1,3;1,4-linked glucans [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2003, 33(1-3): 141-148.
- [82] Wang H L, Squina F, Segato F, Mort A, Lee D, Pappan K, Prade R. High-temperature enzymatic breakdown of cellulose [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(15): 5199-5206.
- [83] Jia H X, Sun W, Li X Z, Zhao J. Cellulose induced protein 1 (Cip1) from *Trichoderma reesei* enhances the enzymatic hydrolysis of pretreated lignocellulose [J]. *Microbial Cell Factories*, 2021, 20(1).
- [84] Cai C, Zhan X J, Lou H M, Li Q, Pang Y X, Qian Y, Zhou H F, Qiu X Q. Recycling cellulase by a pH-responsive lignin-based carrier through electrostatic interaction [J]. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(8): 10679-10686.
- [85] Zhu J Y, Pan X J. Efficient sugar production from plant biomass: Current status,

- challenges, and future directions [J]. *Renewable & Sustainable Energy Reviews*, 2022, 164.
- [86] Yu Z Y, Jameel H, Chang H M, Philips R, Park S. Quantification of bound and free enzymes during enzymatic hydrolysis and their reactivities on cellulose and lignocellulose [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 147: 369-377.
- [87] Gomes D, Domingues L, Gama M. Valorizing recycled paper sludge by a bioethanol production process with cellulase recycling [J]. *Bioresource Technology*, 2016, 216: 637-644.
- [88] Lu Y P, Yang B, Gregg D, Saddler J N, Mansfield S D. Cellulase adsorption and an evaluation of enzyme recycle during hydrolysis of steam-exploded softwood residues [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2002, 98: 641-654.
- [89] Qi B K, Chen X R, Su Y, Wan Y H. Enzyme adsorption and recycling during hydrolysis of wheat straw lignocellulose [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(3): 2881-2889.
- [90] Al-Mardeai S, Elnajjar E, Hashaikeh R, Kruczek B, Van der Bruggen B, Al-Zuhair S. Membrane bioreactors: A promising approach to enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose [J]. *Catalysts*, 2022, 12(10).
- [91] Rahikainen J L, Martin-Sampedro R, Heikkinen H, Rovio S, Marjamaa K, Tamminen T, Rojas O J, Kruus K. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 133: 270-278.
- [92] Lindedam J, Haven M Ø, Chylenski P, Jørgensen H, Felby C. Recycling cellulases for cellulosic ethanol production at industrial relevant conditions: potential and temperature dependency at high solid processes [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 148: 180-188.
- [93] Tu M B, Chandra R P, Saddler J N. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates [J]. *Biotechnology Progress*, 2007, 23(2): 398-406.
- [94] Xin D L, Yang M, Chen X, Zhang Y, Wang R, Wen P Y, Zhang J H. Improving cellulase recycling efficiency by decreasing the inhibitory effect of unhydrolyzed solid on recycled corn stover saccharification [J]. *Renewable Energy*, 2020, 145: 215-221.
- [95] Rodrigues A C, Leitão A F, Moreira S, Felby C, Gama M. Recycling of cellulases in lignocellulosic hydrolysates using alkaline elution [J]. *Bioresource Technology*, 2012, 110: 526-533.
- [96] Chen M, Malaret F, Firth A E J, Verdía P, Abouelela A R, Chen Y Y, Hallett J P. Design of a combined ionosolv-organosolv biomass fractionation process for biofuel production and high value-added lignin valorisation [J]. *Green Chemistry*, 2020, 22(15): 5161-5178.
- [97] Kim J K, Yang J, Park S Y, Yu J H, Kim K H. Cellulase recycling in high-solids enzymatic hydrolysis of pretreated empty fruit bunches [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12.
- [98] Zheng W Q, Qin Y Y, Zhuang X S, Xiao H X, Liu C, Fu X J, Lin Q L, Lan T Q. Recycling enzymatic hydrolysis lignin residues saved cellulase in enzymatic hydrolysis of lignocellulose: An insight from cellulase adsorption mechanism [J]. *Industrial Crops and Products*, 2024, 208.

- [99] Weiss N, Börjesson J, Pedersen L S, Meyer A S. Enzymatic lignocellulose hydrolysis: improved cellulase productivity by insoluble solids recycling [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6: 1-14.
- [100] Yoo C G, Meng X Z, Pu Y Q, Ragauskas A J. The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 301.
- [101] Rosales-Calderon O, Trajano H L, Posarac D, Duff S J B. Enzyme recycling by adsorption during hydrolysis of oxygen-delignified wheat straw [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(11): 9701-9708.
- [102] Li M L, Wang L, Zhao Q H, Chen H Z. High concentration of fermentable sugars prepared from steam exploded lignocellulose in periodic peristalsis integrated fed-batch enzymatic hydrolysis [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2022, 194(11): 5255-5273.
- [103] Sluiter A, Hames B, Ruiz R O, Scarlata C, Templeton D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass [J]. 2004.
- [104] Zhang J, Wang X S, Chu D Q, He Y Q, Bao J. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4480-4488.
- [105] Rutala WA, Weber DJ. Uses of inorganic hypochlorite (bleach) in health care facilities [J]. *Clin Microbio Rev*, 1997, 10(4): 597-610.
- [106] Pereira VJ, Marques R, Marques M, Benoliel MJ, Crespo MB. Free chlorine inactivation of fungi in drinking water sources [J]. *Water research*. 2013, 47(2): 517-523.
- [107] Han X, Li L, Wei C, Zhang J, Bao J. Facilitation of L-lactic acid fermentation by lignocellulose biomass rich in vitamin B compounds [J]. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2019, 67(25): 7082-7086.

学术成果

致谢

我要衷心地感谢鲍杰老师和张斌老师在这三年科研生涯里对我的谆谆教导，让我不断地进步。

感谢已经毕业的杨虎成和任大宇师兄、郭晓梦师姐以及其他已经毕业的师兄师姐对我实验提供的建议；感谢王雅师姐、刘祺师姐、韩涛师兄、何妮玲师姐、徐迎迎师姐、张翼师兄、李治斌师兄、王安师兄、宋卓琳师姐以及 Eric 对我的指导。感谢张凌霄、韩莹、陈峙苇、韩庆美和刘娇的陪伴。祝王新茹、王洁、张兵言师妹以及渠超龙、黄意程、李少凯及郭海润师弟科研顺利。

最后感谢我的父母和女朋友朱影对我的支持和鼓励。希望大家每天开心，再次感谢大家三年来对我的陪伴和帮助，让我感到如此的温暖！