

学校代码：10251

学号：Y10210047

华东理工大学

博士学位论文

论文题目： 面向产业化应用的干法生物炼制
关键技术拓展与迭代升级

工程领域： 生物工程

研究方向： 生物炼制

论文作者： 韩涛

学校导师： 鲍杰 教授

定稿日期： 2025 年 12 月 16 日

分类号: _____ 密级: _____

UDC: _____

华东理工大学 博士学位论文

面向产业化应用的干法生物炼制
关键技术拓展与迭代升级

韩涛

指导教师姓名: 鲍杰 教授 生物工程学院
张斌 副研究员 生物工程学院

申请学位级别: 博士 专业名称: 生物工程

论文定稿日期: 2025.12.16 论文答辩日期: 2026.2.10

学位授予单位: 华东理工大学

学位授予日期: _____

答辩委员会主席: 刘荣厚 教授

评 阅 人: 孙付保 教授

徐 勇 教授

王华明 博士

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：

年 月 日

指导教师签名：

年 月 日

国家技术转移中心负责人签名：

（公章）

年 月 日

作者声明

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

论文作者签名：

年 月 日

面向产业化应用的干法生物炼制关键技术拓展与迭代升级

摘要

木质纤维素干法生物炼制技术由干酸预处理、生物脱毒、高固含量酶解糖化与发酵等关键步骤构成。目前该技术在纤维素乙醇、微生物油脂等液体生物燃料和手性乳酸等生物聚合物单体的生产上,不仅展现了与玉米干法加工技术相近的优异转化指标,而且还拥有极具应用潜力的技术经济指标。此外,该技术还具备零废水和有毒抑制物排放、低能耗、低水耗、低腐蚀以及稳定的生物质原料储存等众多优点。在干法生物炼制技术向产业化应用的进程中,需要通过对已有技术中的一系列重要问题进行系统的拓展和迭代升级,包括生物脱毒的速率和可控制性较低、整体生物炼制过程未实现全连续操作、多个生物转化步骤温度不匹配等。本文通过液态生物脱毒及其检测方法建立、生物炼制全过程连续化、生物炼制工程菌株耐高温性强化等研究内容,实现了干法生物炼制技术面向产业化应用的关键技术拓展和迭代升级,使得技术整体向产业化应用。

本文第一部分对干法生物炼制过程中的低速率和难以精确控制脱毒终点的固态生物脱毒进行了技术升级。根据生物脱毒微生物的特殊代谢特征,建立了一种可在线识别脱毒终点的实用方法,实现了高糖浓度木质纤维素水解液浆的精准、快速、极低糖耗的液态生物脱毒。首先,发现了预处理后木质纤维素水解液浆在液态生物脱毒过程中的 pH 值会随着有机酸类抑制物的消耗和脂肪酸代谢产物的生成而发生转折性变化的现象;其次,通过使用在线监测 pH 值达到峰值作为明确、可检测的脱毒终点指示器,不仅实现了对高固体含量、高糖浓度生物质水解液浆中抑制物的快速和高效去除,而且最大限度地保留了其中的可发酵糖(糖损失低于 2%),从而将干法生物炼制加工链(干酸预处理→固态生物脱毒→高固含量酶解糖化与发酵)整合为一条新的生物炼制加工链(干酸预处理→酶解糖化→液态生物脱毒→高固含量发酵);最后,验证了该生物炼制加工链用于生产手性 L-乳酸、乙醇和糖酸等典型木质纤维素基产品的有效性,获得了高产物浓度、得率以及生物转化速率。与固态生物脱毒相比,液态生物脱毒具有脱毒速率快(12-24 h 内可完成脱毒)、糖耗极低(<2%)、反应器体积小、操作简便、能耗降低、物料输送方便等综合优势,为干法生物炼制技术的连续操作提供了理想的抑制物脱毒解决方案。

本文第二部分在新的干法生物炼制加工链平台上,以小麦秸秆为原料、L-乳酸为目标产品进行了详细的快速流态化和连续生物转化研究。首先,采用简洁的混合和中和机制,在不添加酶的情况下实现了干固颗粒形态的高温预处理物料的快速流态化,使其可以通过常规机械设备进行流体输送;其次,在相同的稀释率下对高固含量下的流态化预处理物料进行了连续酶解糖化、连续液态生物脱毒和连续同步糖化与 L-乳酸共发酵操作;最后,在零废水、零固废、零有毒物质排放的前提下,实现了转化技术

指标和技术经济指标均接近玉米干法加工技术的连续生物炼制转化。本研究为工业规模的连续生物炼制加工生产 L-乳酸或其它生物基产品提供了重要的技术支撑。

本文第三部分研究了干法生物炼制加工链中酶解糖化、生物脱毒和 L-乳酸发酵等三个阶段存在的大范围温度切换问题（50 °C→37 °C→42 °C）。为了提高生物炼制过程效率、削减能耗和时间成本，我们对当前的生物脱毒菌株和 L-乳酸发酵菌株进行了耐温性强化，以实现温度一致的糖化、脱毒、L-乳酸发酵过程。首先，对脱毒菌宛氏拟青霉 *Paecilomyces. variotii* FN89 在含有抑制物的麦秆水解液中进行高温适应性进化，获得了可以耐受 45 °C 且具备良好脱毒能力的壮观丝衣霉 *Byssochlamys spectabilis* HT45 工程菌株；其次，对乳酸片球菌工程菌 *Pediococcus acidilactici* ZB220 进行了长周期的高温适应性进化，获得了一株可耐受 45 °C 且发酵性能稳定的乳酸菌 *P. acidilactici* HT150；最后，以两株耐高温生物炼制菌株构建了 L-乳酸生产的高温生物炼制过程，实现了酶解糖化、生物脱毒和 L-乳酸发酵三阶段的温度一致性。与常规温度切换模式下的生物炼制过程相比，这种温度一致的高温生物炼制过程的 L-乳酸转化指标得到了进一步提升。该方法为干法生物炼制的实际工业应用提供了一个简洁和高效的模式，避免大型生物反应器因频繁温度调控而产生的能耗和时间成本。

本文第四部分对干法生物炼制技术生产可发酵秸秆糖浆的过程进行了详细的过程研究和技术经济性分析。首先，通过干酸预处理、酶解糖化、液态生物脱毒，以及固液分离、减压蒸发浓缩等步骤，在零废水产生、零抑制物排放、零外部能量输入的前提下获得了总糖浓度 600 g/L 以上、无糠醛和 5-羟甲基糠醛等抑制物残留的可发酵混合糖秸秆糖浆，其中不含任何固体杂质、长期静置形态稳定，可以在 4 °C 条件下无霉变储存 6 个月，且在室温条件下的表观粘度 < 50 cP，满足罐装运输的粘度要求；其次，以此秸秆糖浆为原料，在乙醇、L-乳酸、微生物油脂等典型生物基化学品的发酵上进行了测试，表明秸秆糖浆具备与淀粉糖相同甚至更佳的可发酵性能；最后，对秸秆糖浆生产的全过程进行了严格流程模拟基础上的详细质量衡算、能量衡算和技术经济性分析，结果表明本研究提出的秸秆糖浆干法生物炼制技术路线完全可以实现全过程无需外部能量输入的能量自给，并且秸秆糖浆（基于干糖）的生产成本（1530.33 元/吨）显著低于玉米来源的葡萄糖销售价格（2880 元/吨）。本文所提出的由非粮木质纤维素生物质原料生产秸秆糖浆的技术路线实现了零排放前提下可发酵糖的碳中和生产，为合成生物技术生产液体生物燃料、可生物降解聚合物单体和生物基化学品提供了廉价、低碳且可持续的可发酵糖原料。

综上，本论文的研究成果对干法生物炼制技术的产业化应用提供了重要的技术解决方案，对于推动生物炼制技术的产业化，促进非粮生物质资源的有效利用，具有重要的科学技术价值和应用前景。随着全球对可持续发展和碳中和的日益重视，干法生物炼制技术必将在未来的生物经济中扮演越来越重要的角色。

关键词：干法生物炼制；液态生物脱毒；连续化生物炼制；高温生物炼制；秸秆糖浆

Expansion and Iterative Upgrading of Key Technologies for Dry Biorefining Toward Industrial Applications

Abstract

Dry biorefining of lignocellulose comprises key steps including dry acid pretreatment, biological detoxification, and high-solids loading enzymatic saccharification coupled with fermentation. Currently, this technology has demonstrated conversion metrics comparable to those of corn dry milling in the production of liquid biofuels such as cellulosic ethanol and microbial lipids, as well as bio-based polymer monomers like chiral lactic acid, along with promising techno-economic indicators. It also offers multiple advantages, including zero wastewater and toxic inhibitor discharge, low energy and water consumption, minimal corrosion, and stable storage of biomass feedstocks. In advancing dry biorefining toward industrial applications, systematic expansion and iterative upgrading are required to address several critical issues, such as the low rate and poor controllability of biodetoxification, the lack of fully continuous operation in the overall biorefinery process, and temperature mismatches among multiple bioconversion steps. This study achieved key technological expansions and iterative upgrades for industrial applications of dry biorefining through the development of liquid-phase biodetoxification and its detection method, realization of fully continuous biorefining, and thermotolerance enhancement of engineering strains. These advancements have collectively propelled the technology toward industrial implementation.

In the first part, the solid-state biodetoxification—characterized by low rates and difficulty in precisely controlling the detoxification endpoint—was upgraded. Based on the unique metabolic features of detoxifying microorganisms, an online method for identifying the detoxification endpoint was established, enabling precise, rapid, and low sugar-consumption liquid-phase biodetoxification of high-sugar-concentration lignocellulosic hydrolysate slurries. Firstly, it was observed that the pH of pretreated lignocellulosic hydrolysate slurry underwent a shift during liquid-phase detoxification due to the consumption of organic acid inhibitors and the production of fatty acid metabolites. Secondly, by using online monitoring of pH peak as a clear, detectable indicator of the biodetoxification endpoint, inhibitors in high-solids loading, high-sugar-concentration biomass hydrolysates were rapidly and efficiently removed while maximally retaining fermentable sugars (sugar loss < 2%). This allowed the integration of the original dry biorefining chain (dry acid pretreatment → solid-state biodetoxification → high-solids loading enzymatic saccharification and fermentation) into a new chain: dry acid pretreatment → enzymatic saccharification → liquid-phase biodetoxification → high-solids loading fermentation. Finally, the effectiveness of this new chain was verified for producing typical lignocellulose-derived products such as chiral L-lactic acid, ethanol, and sugar acids, achieving high product concentrations, yields, and bioconversion rates. Compared with solid-state biodetoxification, liquid-phase biodetoxification offers comprehensive

advantages including faster detoxification rate (completed within 12-24 h), minimal sugar loss (<2%), smaller reactor volume, easier operation, lower energy consumption, and more convenient material handling, thereby providing an ideal solution for continuous operation in dry biorefining.

In the second part, based on the new dry biorefining platform, rapid fluidization and continuous bioconversion were studied in detail using wheat straw as feedstock and L-lactic acid as the target product. Firstly, a simple mixing and neutralization mechanism enabled rapid fluidization of dry solid pretreated materials without enzyme addition, allowing fluid transport via conventional mechanical equipment. Secondly, continuous enzymatic saccharification, continuous liquid-phase detoxification, and continuous simultaneous saccharification and co-fermentation for L-lactic acid were performed on fluidized pretreated materials at high solid content under the same dilution rate. Finally, under the premise of zero wastewater, zero solid waste, and zero toxic emissions, continuous biorefining was achieved with conversion and techno-economic indicators approaching those of corn dry milling. These results provide important technical support for industrial-scale continuous production of L-lactic acid or other bio-based products.

The third part addressed the wide temperature variations (50 °C → 37 °C → 42 °C) among the three stages of enzymatic saccharification, biodetoxification, and L-lactic acid fermentation in the dry biorefining chain. To improve process efficiency and reduce energy and time costs, thermotolerant engineering was applied to both the detoxification strain and the L-lactic acid fermentation strain, enabling a temperature-consistent process for saccharification, detoxification, and fermentation. Firstly, high-temperature adaptive evolution of the detoxification strain *Paecilomyces variotii* FN89 in inhibitor-containing wheat straw hydrolysate yielded the engineered strain *Byssochlamys spectabilis* HT45, which tolerates 45 °C and maintains good detoxification capability. Secondly, long-term high-temperature adaptive evolution of the lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* ZB220 generated *P. acidilactici* HT150, which stably ferments at 45 °C. Finally, a high-temperature biorefinery process for L-lactic acid production was constructed using these two thermotolerant strains, achieving temperature consistency across all three stages. Compared with the conventional temperature-switching mode, this temperature-uniform high-temperature process further improved L-lactic acid conversion metrics. This approach offers a simple and efficient model for industrial application of dry biorefining, avoiding the energy and time costs associated with frequent temperature adjustments in large bioreactors.

In the fourth part, detailed process studies and techno-economic analysis were conducted on the production of fermentable straw syrup via dry biorefining. Firstly, through dry acid pretreatment, enzymatic saccharification, liquid-phase biodetoxification, solid-liquid separation, and vacuum evaporation under conditions of zero wastewater generation, zero inhibitor emission, and zero external heat input, a fermentable mixed-sugar straw syrup was obtained with total sugar concentration > 600 g/L and no residual inhibitors such as furfural or 5-hydroxymethylfurfural. The straw syrup contained no solid impurities, remained stable during long-term storage, could be stored mold-free for six months at 4 °C,

and exhibited an apparent viscosity < 50 cP at room temperature, meeting requirements for tank transportation. Secondly, fermentations of ethanol, L-lactic acid, and microbial lipids using this straw syrup demonstrated performance comparable or superior to that of starch-based sugars. Finally, rigorous process simulation-based mass/energy balances and techno-economic analysis showed that the production cost of the straw syrup is significantly lower than that of corn-derived glucose. The proposed technology for producing straw syrup from non-food lignocellulosic biomass achieves carbon-neutral fermentable sugar production under zero-emission conditions, providing a low-cost, low-carbon, and sustainable sugar feedstock for synthetic biology-based production of liquid biofuels, biodegradable polymer monomers, and bio-based chemicals.

In summary, the findings of this dissertation provide important technical solutions for the industrial application of dry biorefining, offering substantial scientific value and application prospects for advancing biorefinery industrialization and promoting the efficient utilization of non-food biomass resources. With growing global emphasis on sustainable development and carbon neutrality, dry biorefining is poised to play an increasingly significant role in the future bioeconomy.

Keywords: dry biorefining; liquid-phase biorefining; continuous biorefining; high-temperature biorefining; straw syrup

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 木质纤维素生物炼制技术.....	1
1.1.1 木质纤维素原料资源状况.....	1
1.1.2 生物炼制技术.....	4
1.2 生物炼制技术的技术障碍与干法生物炼制技术的建立.....	4
1.2.1 生物炼制技术的技术障碍.....	4
1.2.2 干法生物炼制技术的建立.....	5
1.3 生物炼制过程的强化.....	6
1.3.1 流态化.....	6
1.3.2 连续化.....	7
1.3.3 高温化.....	8
1.4 可发酵糖生产.....	9
1.4.1 淀粉糖、糖蜜生产.....	9
1.4.2 木质纤维素糖浆生产.....	9
1.5 本论文的立题依据和主要研究内容.....	10
第 2 章 面向高糖浓度水解液体系的液态生物脱毒技术与脱毒终点控制	13
2.1 引言.....	13
2.2 材料与方法.....	14
2.2.1 实验原料.....	14
2.2.2 酶和试剂.....	14
2.2.3 菌种和培养基.....	14
2.2.4 干酸预处理.....	15
2.2.5 酶解糖化和液态生物脱毒.....	16
2.2.6 乙醇、L-乳酸和糖酸发酵生产.....	16
2.2.7 气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 分析.....	17
2.2.8 分析方法.....	18
2.3 结果与分析.....	18
2.3.1 液态生物脱毒的可行性及脱毒终点的确定.....	18
2.3.2 液态生物脱毒条件参数的优化.....	22
2.3.3 新型生物炼制模式的发酵潜力评价.....	25
2.3.4 物料衡算与液态生物脱毒工艺评估.....	27
2.4 本章小结.....	33

第 3 章 干法生物炼制的快速流态化及连续化.....	34
3.1 引言.....	34
3.2 材料与方法.....	34
3.2.1 原料.....	34
3.2.2 酶和试剂.....	35
3.2.3 微生物与培养基.....	35
3.2.4 干酸预处理.....	35
3.2.5 预处理后麦秆物料的快速流态化.....	36
3.2.6 流态化麦秆浆料的连续酶解糖化.....	36
3.2.7 麦秆糖化液的连续液态生物脱毒.....	36
3.2.8 已脱毒麦秆糖化液的多级连续 L-乳酸发酵.....	37
3.2.9 分析方法.....	38
3.2.10 Aspen Plus 流程模拟.....	38
3.3 结果与讨论.....	38
3.3.1 干酸预处理小麦秸秆的快速流态化.....	38
3.3.2 流态化麦秆浆料的连续酶解糖化.....	42
3.3.3 麦秆糖化液的连续液态生物脱毒.....	46
3.3.4 脱毒后麦秆水解液的多级连续 L-乳酸发酵.....	49
3.3.5 从快速流态化到 L-乳酸发酵的连续生物转化过程物料衡算.....	52
3.4 本章小结.....	54
第 4 章 生物炼制菌株耐高温性强化与干法生物炼制过程的高温化.....	55
4.1 引言.....	55
4.2 材料与方法.....	56
4.2.1 原料.....	56
4.2.2 酶和试剂.....	56
4.2.3 菌种和培养基.....	56
4.2.4 干酸预处理.....	56
4.2.5 酶解糖化和麦秆水解液的制备.....	56
4.2.6 液态生物脱毒.....	57
4.2.7 L-乳酸发酵.....	57
4.2.8 宛氏拟青霉 FN89 的高温适应性进化.....	57
4.2.9 乳酸片球菌 ZB220 的高温适应性进化.....	57
4.2.10 分析方法.....	58
4.3 结果和讨论.....	58
4.3.1 宛氏拟青霉出发菌株的高温脱毒评价.....	58
4.3.2 <i>P. variotii</i> FN89 的高温适应性进化及高温脱毒性能测试.....	60

4.3.3	<i>P. acidilactici</i> ZB220 的高温适应性进化及高温发酵性能测试.....	65
4.3.4	高温脱毒菌与高温乳酸菌在乳酸发酵期间共存状态下的竞争性评估.....	67
4.4	本章小结.....	68
第 5 章	全过程能量自给的低成本秸秆糖浆的干法生物炼制生产.....	70
5.1	引言.....	70
5.2	材料与方法.....	71
5.2.1	原料.....	71
5.2.2	酶和试剂.....	71
5.2.3	菌种和培养基.....	72
5.2.4	干酸预处理.....	73
5.2.5	酶解糖化.....	73
5.2.6	液态生物脱毒.....	74
5.2.7	糖浆的精制.....	74
5.2.8	乙醇、乳酸及油脂发酵.....	74
5.2.9	麦秆糖浆的长期储存.....	74
5.2.10	分析方法.....	75
5.2.11	过程模拟和技术参数设定.....	75
5.3	结果与讨论.....	76
5.3.1	秸秆糖浆生产技术路线及全过程物料衡算.....	76
5.3.2	秸秆糖浆的发酵性能、稳定性和可运输性能评价.....	84
5.3.3	秸秆糖浆生产工艺的能耗平衡.....	90
5.3.4	秸秆糖浆生产工艺的技术经济性评价.....	96
5.4	本章小结.....	100
第 6 章	结论与展望.....	101
6.1	结论.....	101
6.2	创新点.....	102
6.3	展望.....	103
	参考文献.....	105
	附录 I 主要实验试剂.....	119
	附录 II 主要仪器设备.....	120
	博士期间研究成果.....	121
	致谢.....	123

第 1 章 文献综述

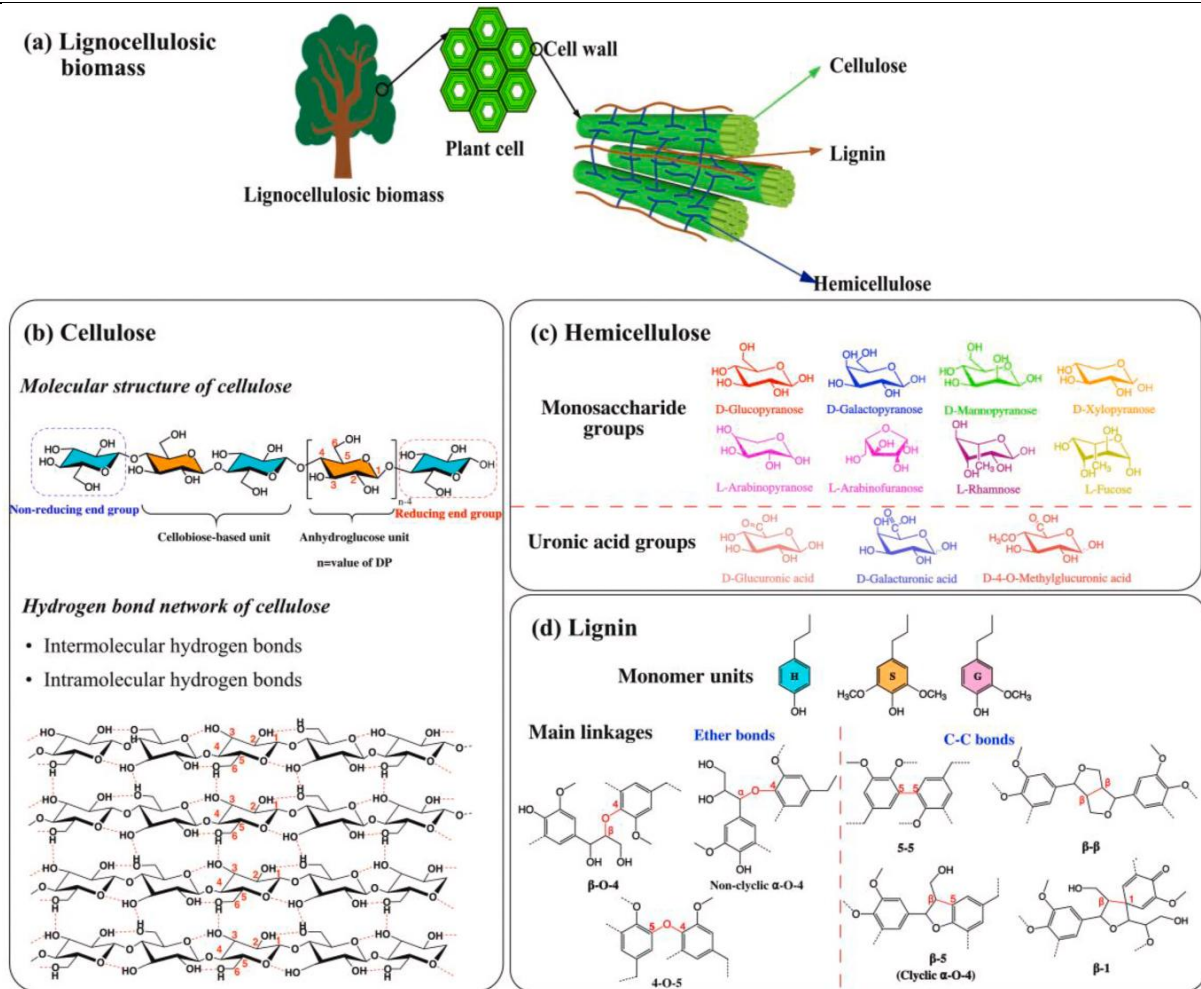
在我国“双碳”目标背景下，生物航煤、聚合材料和化学品等领域无法通过电力实现替代，其可持续、碳中和生产亟需大量的碳水化合物原料供给^[1-4]。然而受粮食安全和饲料安全政策严格限制，以玉米等粮食淀粉生产淀粉糖的深加工产业难以进一步扩张，也难以作为生物航煤等液体生物燃料和聚乳酸等可降解聚合物的大规模制造提供所需的低成本发酵糖。因此，满足生物制造需求的发酵糖的唯一可持续来源是木质纤维素生物质。从资源规模看，全球石油年消费量约 40 亿吨、煤炭约 30 亿吨；而粮食淀粉年产量仅约 20 亿吨、蔗糖约 2 亿吨，显然无法在规模上替代化石资源^[5]。相比之下，来自植物茎秆等木质纤维素生物质年生物圈产量达 1000-2000 亿吨^[6]。故以木质纤维素为原料，通过生物炼制技术生产非粮来源的发酵糖，再进一步制备液体燃料、生物基聚合物或单体、氨基酸和有机酸等大宗化学品，是未来循环经济体系中不可替代的发展路线。

1.1 木质纤维素生物炼制技术

1.1.1 木质纤维素原料资源状况

木质纤维素类原料是地球上来源极广、储量极丰的可再生生物质资源^[7,8]，其主要来自于三大产业——农业、林业和种植业^[9]。作为一种丰富的碳中性可再生资源，其可用于生产生物能源和一定附加值的生物基化学品，加强对它的利用是助力“双碳”目标的重要抓手^[1,2,10]。将木质纤维素原料用于生物炼制应用，有助于推动能源消费结构变革，减少温室气体的排放^[11-13]。此外，木质纤维素原料用途十分广泛。除了可用于生产燃料乙醇、生物柴油等生物类能源之外，还可被用来生产一些高附加值的产品，如药物、生物基材料等等。

木质纤维素主要由纤维素、半纤维素和木质素所构成，是植物细胞壁的重要组成部分^[14-16]。其中，纤维素占比 30%-60%^[17]，组成成分单一，是一种由多个葡萄糖单元通过强化学键（ β -1,4-糖苷键）连接成的线性高分子聚合物。并且由于纤维素分子之间还存在氢键（如图 1.1 所示），故常温下的纤维素非常稳定，这也是纤维素可以构成植物细胞壁骨架的原因之一。在木质纤维素中，半纤维素占比 20%-40%^[17]，其组成非常复杂，是一类由五碳糖（D-木糖、L-阿拉伯糖等）和六碳糖（D-葡萄糖、D-甘露糖、D-半乳糖等）相互连接且具有支链的异质多糖^[18]，因此其水解产物众多。至于木质素，它是一种复杂的三维网状酚类聚合物，性质稳定且不溶于水^[19]。它像“防水胶黏剂”一样渗透并坚固地填充在纤维素和半纤维素之间，赋予植物结构刚性和抗降解能力^[20]。这种精妙而坚韧的结构，被称为“木质素-碳水化合物复合体”，是植物在漫长进化中形成的天然防御屏障。因此要想充分利用木质纤维素中的各个组分，必须要采取一定的技术手段来克服其“顽抗性”，从而打破其固有结构^[21]。

图 1.1 木质纤维素组分化学结构简介^[16]Fig. 1.1 A brief description on the chemical structure of lignocellulose components^[16]

注：(a) 木质纤维素生物质结构概述；(b) 纤维素的分子结构和氢键网络；(c) 半纤维素的单糖基团和醛酸基团；(d) 木质素单体及其主要的连接键。

根据世界粮农组织数据和和中国国家统计局《关于 2024 年粮食产量数据的公告》，2024 年全球粮食总产量超过 28 亿吨 (<https://www.fao.org/>)，创历史新高。我国作为一个农业大国，粮食年产量已经超过 7 亿吨 (<https://www.stats.gov.cn/>)，位居全球粮食年产量榜首，美国和印度分别以 4.4 亿吨和 3.3 亿吨位列之后。与粮食年产量排名类似的是，我国每年所产生的农作物秸秆等农业废弃物的总量在世界秸秆资源总量的排名榜上也是位居前列，并且年产量接近十亿吨级别^[22]。

长期以来，玉米、小麦和水稻一直是我国农业种植结构中最重要三大粮食类作物品种，同时也是我国秸秆资源产量的最主要贡献者。根据国家统计局发布的 2024 年各行政区的玉米、小麦和水稻年产量数据，再结合这三类作物的草谷比（农作物秸秆与谷物的重量比）^[23]，我们制得 2024 年中国三大农作物秸秆资源的区域分布数据地图(图 1.2)。结果显示，我国的农作物秸秆资源主要来自于：华东地区的山东（6039.7 万吨）、安徽（4577.8 万吨）和江苏（4282.5 万吨）等地；东北地区的黑龙江（8652.9 万吨）、吉林（5108.7 万吨）和辽宁（3109.3 万吨）等地；华北地区的内蒙古（4207.1

万吨)、河北(3992.8万吨)等地;华中地区的河南省(6952.3万吨)、湖南省(3772.1万吨)和湖北省(3232.2万吨)等地;以及西南地区的四川省(3549.1万吨)等地。此外,全国只有个别地区小麦秸秆、玉米秸秆和水稻秸秆的全年总产量未达到千万吨级别,如北京、天津、宁夏、青海、福建、海南等地。

根据中华人民共和国农业农村部数据,我国农作物秸秆产生量呈逐年递增趋势,目前全国农作物秸秆产生量为 8.67 亿吨,可收集量为 7.33 亿吨,秸秆综合利用率达 88.3% (<https://www.moa.gov.cn/>)。尽管我国的农作物秸秆资源非常丰富,且综合利用率已高达 88%以上,但秸秆资源利用仍以肥料化(粉碎还田,增加土壤有机质)和饲料化(青贮、氨化后作为牛羊等牲畜饲料)利用为主,用于生物炼制等高附加值资源化利用的比例还比较低。

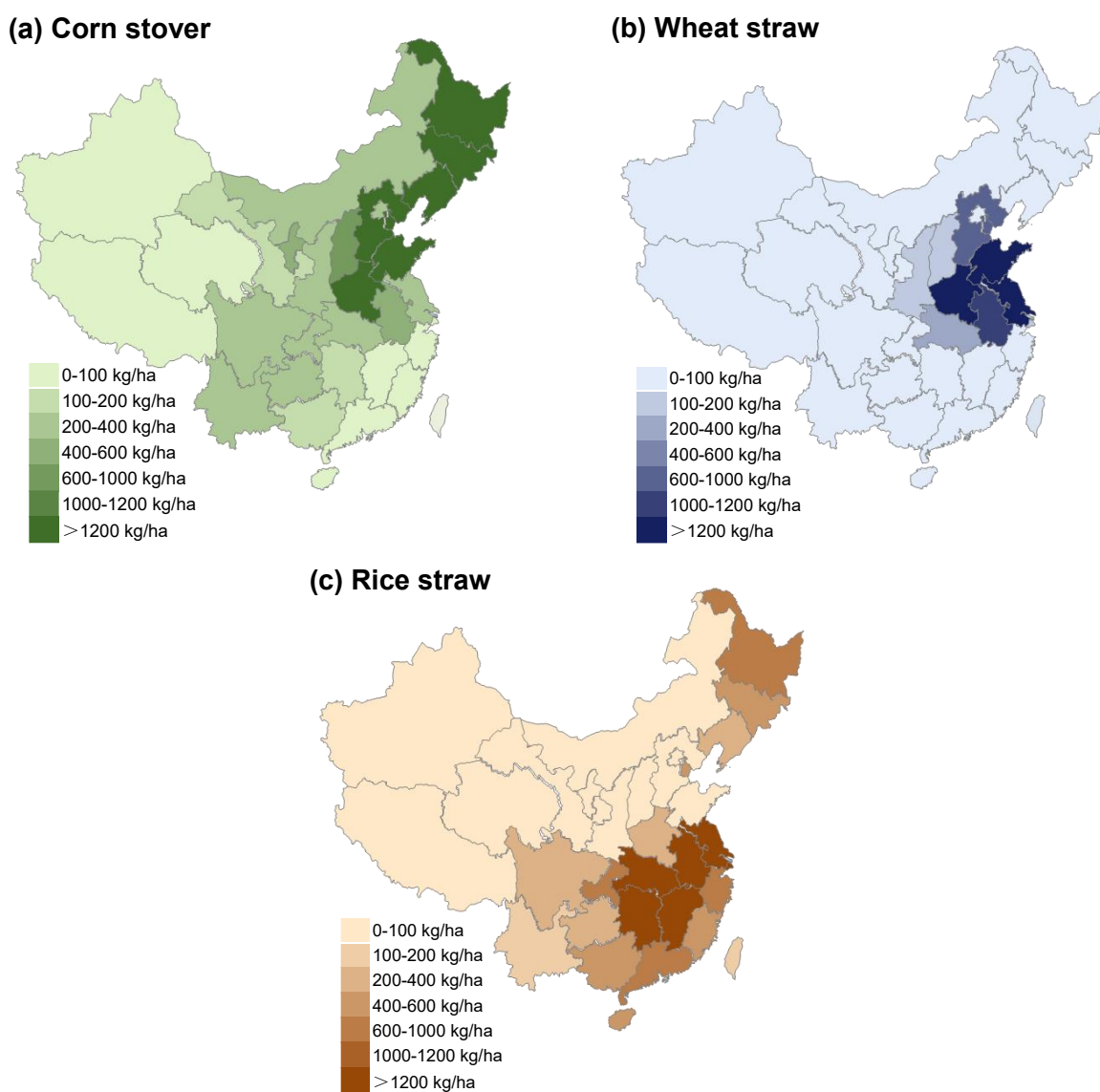


图 1.2 2024 年中国三大农作物秸秆资源的区域分布

Fig. 1.2 Regional distribution of three major crop straw production in China in 2024

注:中国台湾省、香港特别行政区和澳门特别行政区的相关数据未作归纳。首先根据国家统计局发布的 2024 年各地区玉米、小麦和水稻的产量数据并结合文献报道的这三种农作物的草谷比数据

(玉米、小麦和水稻的草谷比分别为 1.25、0.95 和 1.3)^[23] 计算得出秸秆产量数据, 随后用秸秆产量和各地区面积的比值作为每种秸秆资源的分布密度数据, 最后制作出秸秆资源的分布密度地图。

1.1.2 生物炼制技术

木质纤维素生物炼制技术是以非粮的木质纤维素生物质(如农业秸秆、林业废料、能源植物等)为原料, 通过集成化的物理、化学和生物方法, 将主要组分(纤维素、半纤维素和木质素)转化为燃料、化学品、材料及能源的综合性绿色技术^[24-28]。这项技术的核心战略意义在于其能够利用丰富且可再生的非粮资源, 避免与传统粮食生产竞争, 同时将废弃物转化为高价值产品, 从而降低对化石资源的依赖、减少温室气体排放, 并促进循环经济和农村发展。

其技术流程是一个克服木质纤维素天然“顽固性”的系列过程。首先, 预处理是生物炼制过程中最为关键且成本相对较高的环节, 旨在破坏生物质本身的致密结构, 常用蒸汽爆破^[26, 29-31]、酸或碱处理等方法^[31-34]。随后是水解(或糖化)^[35-37], 主要采用高效的纤维素酶将纤维素和半纤维素分解为可发酵的单糖(如葡萄糖和木糖)。接着进入发酵与转化阶段, 通过特别培育或工程化的微生物将混合糖液转化为目标产品, 如乙醇^[38-40]、丁醇^[41]、油脂^[3, 42, 43]、氨基酸^[44, 45]、单细胞蛋白^[46, 47]或有机酸等^[4, 48]。最后, 通过产品分离与纯化得到最终产品, 而残留的木质素等组分可用于燃烧产能或进一步加工成高附加值材料^[19, 24, 49], 实现原料的全组分利用。

该技术的产品谱系十分广泛, 不仅包括纤维素乙醇等第二代生物燃料^[20, 39, 50], 还能生产如乳酸、琥珀酸等平台化学品^[51-56], 进而制造可降解塑料; 此外, 还能产出纳米纤维素、木质素基碳材料等高性能生物基材料^[57-61]。尽管前景广阔, 该技术仍面临技术经济性(如预处理与酶的成本、工艺能耗)、原料收集物流成本高以及复杂工艺集成等挑战^[62-64]。未来, 发展将依赖于过程强化与集成、合成生物学构建高效细胞工厂, 以及向多产品联产的生物精炼模式转型, 在“双碳”目标的政策驱动下, 这项技术正逐步从示范走向规模化商业应用, 成为迈向可持续生物经济的重要支柱。

1.2 生物炼制技术的技术障碍与干法生物炼制技术的建立

1.2.1 生物炼制技术的技术障碍

生物炼制技术面临着环环相扣的多重技术障碍, 共同构成了其商业化进程中的核心挑战。一方面, 原料端的固有特性与供应链是根本性瓶颈。木质纤维素生物质结构顽固, 且具有低体积能量密度、季节性供应和地理分散的特点^[65], 导致其收集、储存和运输的物流成本极高^[64, 66], 原料成分的波动也给稳定生产带来困难^[67]。另一方面, 关键的预处理技术存在严峻的可行性障碍, 如大量有毒废水排放、大量可发酵糖损失、高能耗、高腐蚀等诸多严重问题, 增加了整体过程的复杂性和成本^[34, 62, 68], 也造成了已有纤维素乙醇产业化工业示范的全部失败^[69]。

在核心的生物转化阶段, 效率与整合问题尤为突出。虽然纤维素酶成本已下降,

但其活性和效率仍有提升空间。更关键的障碍在于，缺乏能够高效共利用纤维素衍生的 C6 糖（葡萄糖）和半纤维素衍生的 C5 糖（木糖），并能耐受预处理产生的抑制物及终产物（如乙醇）的工业微生物菌株^[4, 70-75]。同时，糖化与发酵工艺（如分步或同步工艺）在温度、pH 等最佳条件上难以完美匹配，影响了整体转化效率和速率。此外，过程工程与系统集成层面也极具复杂性。将预处理、酶解糖化、发酵、分离纯化等单元操作高效集成是一项巨大的系统工程挑战，涉及能量与水的循环、废物流处理以及热集成。特别是从稀溶液中分离纯化产品（如蒸馏低浓度乙醇或丁醇）能耗巨大，而残留木质素的高值化利用路径尚不成熟。

最终，上述所有技术障碍汇集成严峻的技术经济性挑战。高昂的原料、能耗、排放成本，以及低下的转化技术指标使得以非粮木质纤维素生物质为原料的生物炼制技术和产品成本高昂，难以与石油基产品和淀粉基发酵产品竞争，同时巨大的初始投资和规模化放大风险也令投资者却步。因此，生物炼制技术必须依赖原料供应链创新、过程工程强化和工业发酵微生物的重大改造协同推进，才能跨越从实验室到产业化应用的鸿沟。

1.2.2 干法生物炼制技术的建立

干法生物炼制是一种仅需极低工艺水和能量投入便能实现生物能源和生物基化学品高效生产的糖平台生物转化技术。干法生物炼制以玉米干法加工技术水准为目标，通过技术创新进行生物炼制加工链的重大革新，能够实现与玉米干法加工近似的零废水排放、零有毒抑制物排放、低能耗、低腐蚀前提下的高指标生物转化^[65]。与体系固含量较低（一般不超过 10%(w/w)）、大量废水和有毒物质排放、低生物转化指标的常规生物炼制加工链不同，干法生物炼制加工链由不产生任何预处理废水的高固含量干酸预处理、高选择性特异微生物菌株生物脱毒、高固含量酶解糖化、高固含量发酵或同步糖化与共发酵等步骤构成。干法生物炼制加工链不仅在纤维素乙醇和微生物油脂等液体生物燃料以及手性乳酸等生物聚合物单体的生产上展示了与玉米干法加工相近的优异转化指标^[3, 4, 76, 77]，而且还具备零废水和有毒抑制物排放、低能耗、低水耗、低腐蚀、稳定生物质原料储存以及极具应用潜力的技术经济指标等众多优点。

在干法生物炼制技术向产业化应用的进程中，已有技术中的一系列重要问题需要进行系统的拓展和迭代升级。这些对产业化应用产生重大影响的问题包括生物脱毒的效率和可控制性低、整体生物炼制过程不连续、多个生物转化过程温度不匹配等。首先，干酸预处理过程中产生的发酵抑制物（如乙酸、糠醛、羟甲基糠醛、酚类化合物等）浓度相对较高，而传统固态生物脱毒技术效率有限且脱毒终点难以准确控制，故难以满足后续发酵要求^[77-80]。其次，干法生物炼制体系下的固含量较高（一般至少 20%~30% (w/w)），物料的混合、传热和传质（例如好氧发酵过程的氧传递）效率较低^[81-84]，难以实现连续化、流态化操作。最后，不同工艺环节的最适温度存在着明显差异。例如酶解糖化环节的最适温度为 50 °C 左右，而传统发酵阶段最适温度通常只有 30-37 °C^[76, 85-87]，因此这势必会造成显著且频繁的温度切换，并由此带来整体工艺

过程的能耗和时间成本的增加。除了以上这三个典型的问题，还有一些能够影响干法生物炼制技术产业化应用的问题，如该技术的规模化放大缺乏成熟的理论指导和工程实践，技术经济性仍有待验证。

总体而言，干法生物炼制技术的建立，代表了生物质转化领域向更集约、更可持续、更经济方向发展的前沿探索。它并非单一技术的革新，而是一套涵盖预处理、生物催化、过程工程等多个环节的全新系统解决方案。虽然干法生物炼制技术目前仍处于中试或示范阶段，且仍有一些能够影响其产业化应用的问题需要解决，但该技术在水、节能和降低总成本方面的巨大潜力，使其成为未来突破生物炼制商业化障碍、特别是在水资源和电力资源紧缺地区实现产业化应用的重要技术方向。

1.3 生物炼制过程的强化

生物炼制技术的工艺设计与操作模式对其工业化应用具有决定性影响，其中最为关键的问题是实现生物炼制过程的流态化、连续化以及高温化。

1.3.1 流态化

生物炼制加工链从木质纤维素生物质的预处理开始，经过酶解糖化生产可发酵单糖、脱毒降解预处理生成的发酵抑制物、发酵或同步糖化与发酵生成乙醇、乳酸、微生物油脂等发酵产物，最后经过分离精制获得终产品^[4, 76, 88]。流态化生物炼制要求固体的木质纤维素生物质从预处理反应器出料之后能快速转变为一种具有可控流变特性的非均相浆料。这种浆料能够在管道、泵、阀门和密闭反应容器构成的连续系统中，像流体一样被输送、计量、混合与反应，从而实现全流程的密闭化、连续化与自动化操作，取代依赖输送带、刮板、抓斗等设备的开放式、间歇式固体物料处理模式。

首先，必须明确，在低固含量（例如总固体含量低于 15%）体系下实现物料的流体化输送，在工程技术上是相对容易实现的。目前众多木质纤维素生物炼制加工链从预处理环节开始便均呈现高液固比的特点^[89]。此时，生物质颗粒被大量自由水分散，体系通常表现为近似牛顿流体的特性，泵送和混合能耗较低，故这种低固含量下的流态化很容易实现。然而，从产业化生物炼制的整体经济性和工艺合理性角度审视，这种低固含量的“流态化”路线本质上是不可行的。其根本矛盾在于，它虽然解决了物料输送的形式问题，却放大了自身固有缺陷：（i）巨额的水资源消耗与废水处理负担。低固含量意味着每处理一吨干生物质，需要引入并最终处理数吨乃至数十吨的工艺水，这不仅大幅增加了新鲜水成本，更产生了体积庞大的高浓度有机废水，其后续处理的能耗与成本将成为项目的不可承受之重。（ii）极低的产品浓度与高昂的下游加工成本。酶解或发酵产生的目标产物（如糖、乙醇、有机酸）被高度稀释，导致后续分离、浓缩、纯化单元的操作负荷巨大，能耗极高，严重侵蚀产品利润。（iii）设备体积庞大与投资激增。为了容纳大量的水相，所有反应器、储罐、管道的容积都需要成倍放大，导致基础设施投资急剧上升，空间利用效率低下。因此，低固含量下的流态化，仅仅是一种技术形式上的可行，却因违背了生物炼制追求低能耗、低成本、可持续的

核心经济原则而无法走向产业化。

因此,面向产业化的流态化生物炼制,其必然路径和唯一有意义的攻关方向是高固含量流态化,即追求在总固体含量达到 20%甚至 30%以上的条件下,仍能实现浆料的稳定、可控、低阻力的管道化输送与高效反应。高固含量流态化意味着,必须尽可能在生物炼制过程的最前端进行高固体含量的预处理^[62, 89, 90]。这样做具有压倒性的必要性:(i)它能最大程度地减少工艺用水和废水产量,从源头上实现节水与减排,契合可持续发展的要求。(ii)它能帮助获得高浓度的糖化液或发酵醪,显著降低下游分离浓缩的难度与能耗,提升整体工艺的经济性。(iii)高固含量意味着更小的设备尺寸、更高的容积生产效率和更低的资本投入,这对于降低项目总投资至关重要。可以说,只有实现了高固含量下的流态化操作,流态化生物炼制工艺的先进性和经济性优势才能得到本质的彰显。

然而,要想实现高固含量流态化生物炼制,还需要解决极其严峻的工程与科学挑战,这些挑战主要源于两方面:一是高固含量预处理之后如何快速实现预处理物料的降温以及流变特性的快速转变(高温固体颗粒状→液浆状)。以干酸预处理过程(175 °C 维持 5 min)为例,预处理后的固体颗粒物料温度~100 °C,远高于常规商业纤维素酶的适宜温度(50~55 °C)。二是在含有高固含量、高粘度浆料的生物炼制体系下,混合、传质、传热和在线监测方面都变得异常艰难。例如在高粘度、高固含量的浆料中,无论是酶、营养物、微生物细胞还是热量和(或)氧气,其扩散和分布都变得异常艰难,反应器内极易形成死区,导致局部反应不均、pH 或温度失控,严重时会影响生物转化效率与产品质量。只有克服这些挑战,才能将流态化生物炼制从一种概念设想,转变为真正具备产业竞争力的变革性技术。

1.3.2 连续化

连续操作是大规模工业生产的标准模式和降低操作成本的关键步骤^[91-93]。生物炼制过程需要在连续流态化之后,实现连续酶解、连续脱毒和连续发酵并实现各个步骤的相互匹配,才能实现真正意义上的生物炼制过程连续化操作。以往的木质纤维素生物炼制连续操作均集中在单一步骤的连续化,如酶促水解过程的连续化^[94-96]、脱毒过程的连续化^[97, 98]、发酵过程的连续化^[99-101]。这些研究中最突出问题之一就是生物炼制体系固体含量较低,虽然在技术形式上易于进行连续操作,但不可避免地会导致低下的生物转化指标,同时还会伴随大量废水排放、高能耗、高成本等诸多缺陷,因而不适合产业化生产应用。

面向产业化应用的干法生物炼制连续化要求必须在木质纤维素生物炼制的最前端进行高固含量预处理,并且预处理物料从预处理反应器出料时起便要快速实现流态化处理,包括降温以匹配酶解糖化工段以及完成固体颗粒状至液浆状的流变特性转变,才具备实际工业应用潜力^[62, 89, 90]。上一小节(1.3.1)已经对高固含量生物炼制模式下实现快速流态化处理所要解决的关键问题做出了一些说明,这里不再赘述,接下来对当前高固含量生物炼制模式下实现连续化所要解决的问题进行说明。

目前, 高固含量生物炼制模式下已有单一步骤的连续酶解糖化和连续发酵方面的报道^[102, 103], 尚没有在高糖浓度水解液浆体系下能做到极低糖损失、脱毒终点准确可控的连续脱毒方面的报道。生物炼制高固含量预处理后的生物质物料中存在大量严重影响发酵的抑制物, 因此必须要彻底解决抑制物的连续脱毒问题, 才能实现连续酶解、连续脱毒和连续发酵这三个步骤的相互匹配, 才能实现真正意义上的高固含量连续化生物炼制。这就要求所用的连续脱毒方法: (i) 不能产生废水排放、大量糖损失以及脱毒不完全等问题; (ii) 高抑制含量、高糖浓度水解液浆体系下对抑制物的连续去除效率需要足够高效, 基本的要求是单位时间连续脱毒步骤所能完成脱毒的水解液浆的量至少要能匹配上连续酶解步骤单位时间所产生的水解液浆的量以及连续发酵步骤单位时间所需要的水解液浆的量; (iii) 在连续脱毒期间至少要有一个可以在线准确判断脱毒终点是否来临的标志(如 pH、溶氧水平等), 才能方便在脱毒终点时进行连续性的放料和加料操作, 使得水解液浆体系中的抑制物脱除完全的同时, 糖耗水平也能控制在极低水平。总体而言, 只有解决好连续脱毒的问题并与连续酶解和连续发酵步骤进行契合式的相互匹配, 才能做到真正具备产业应用潜力的高固含量连续化生物炼制生产。

1.3.3 高温化

木质纤维素生物炼制生产工艺过程的高温化, 是指通过将酶解糖化、脱毒和发酵等多个核心单元的操作温度统一提升至一个相对接近纤维素酶糖化的高温范围(例如 45-55 °C), 从而最大限度地减少整个工艺流程中因反复温度切换所带来的能量损耗与操作复杂度。这一技术理念的核心目标, 是打破传统多温阶工艺中“高温酶解糖化→降温至中温脱毒→降温至低温发酵或升温至高温发酵”的固有模式^[80, 85, 104], 将生物炼制系统推向一个热力学集成度更高、能量利用更高效的新阶段。

高温化生物炼制的实现主要依赖于选育或构建耐高温的工业微生物菌株^[105-108], 以用于后续的脱毒和发酵过程^[109-112]。例如, 通过适应性进化或代谢工程改造得到嗜热真菌、细菌或耐高温酵母^[107, 113], 使其能够在与酶解糖化阶段相同或相近的高温条件下高效转化预处理过程产生的抑制物, 随后或同时利用酶解产生的可发酵糖生产目标产品(如乙醇、乳酸等)^[112]。当微生物的工作温度范围与纤维素酶糖化温度范围重叠时, 不仅有可能实现真正意义上的同步糖化、脱毒与发酵, 而且有利于在一个反应器中完成主要的生物转化, 从而大幅简化生物炼制工艺流程。

这一高温化策略具有深刻的技术与经济意义。首先, 最直接的优势是显著降低能耗^[114], 避免了反复升降温的巨大能量消耗, 提高了全系统的热集成效率。其次, 它提升了过程效率与强度。高温通常能提高酶反应速率、降低物料粘度改善传质, 并减少杂菌污染风险^[108, 114], 从而可能缩短生产周期、提高设备利用率。此外, 从工艺工程角度看, 它极大地简化了流程, 减少了换热器、温控系统等辅助设备, 降低了操作复杂性和固定资产投资。最终, 这些效益将共同作用于降低单位产品的生产成本, 增强生物炼制技术与传统石油化工路线的市场竞争力。

当然，高温化生物炼制也面临严峻挑战，主要包括：（i）耐高温工程菌株的生产性能（如产物得率、耐受性）可能部分受损，需要进一步优化；（ii）需要考虑生物转化产物对高温环境的敏感性，是否会发生产物的失活、挥发或者转化为不需要的物质等等；（iii）整个高温集成工艺的过程控制与稳定性的维持。尽管存在这些挑战，推动工艺高温化仍是生物炼制技术走向集约化、低能耗和低成本的关键进化方向之一，代表着从“单元工艺优化”向“系统热力学集成”的深刻转变，对未来进行产业化应用的生物炼制工厂的工业设计具有重要的指导价值。

1.4 可发酵糖生产

1.4.1 淀粉糖、糖蜜生产

淀粉糖^[115]与糖蜜^[116, 117]作为传统的发酵工业核心原料，其生产技术近年来正朝着更高效、更专用、更清洁的方向发展。淀粉糖通过酶技术的深化，不断拓展产品树和价值链；糖蜜（主要是甘蔗糖蜜和甜菜糖蜜）则通过精制技术的升级，实现杂质的资源化利用和原料品质的提升。

然而，对于需要在规模上替代化石资源进行可持续、碳中和工业生产的绿色生物制造而言^[5]，淀粉糖和糖蜜仍存在原料成本较高^[118]、来源受限和供应量不足等缺陷，因此以木质纤维素这类价格低廉、来源广泛、产量巨大的可再生生物质资源为原料进行可发酵糖的生物炼制生产将极具研究价值和应用潜力。

1.4.2 木质纤维素糖浆生产

木质纤维素糖浆生产是指以非粮木质纤维素生物质为原料，通过预处理和糖化工艺，将其中的纤维素和半纤维素转化为以葡萄糖、木糖等为主的可发酵混合糖液的过程。从木质纤维素原料获取可发酵糖浆属于新型生物炼制技术范畴，而从可发酵糖浆生产液体燃料、生物聚合物等则属于成熟的工业发酵技术，仅需在菌株和工艺参数上进行微调即可。若每个发酵工厂均自建完整的木质纤维素预处理和炼制系统，将不可避免地带来高昂的设备投资和运行成本。因此，为提升木质纤维素生物炼制的产业化可行性和灵活性，有必要建设独立的、面向多种下游产业的可发酵糖浆（如秸秆糖浆）生产过程。

木质纤维素糖浆是连接上游生物质资源和下游发酵产业的关键中间平台产品，其生产的成本与质量直接决定了后续生物燃料与生物基化学品的整体经济性。当前主流的生产工艺遵循“预处理-酶水解”的技术路线。首先，通过蒸汽爆破、稀酸处理等预处理方法破坏生物质的顽固结构，分离或暴露纤维素^[26, 81]。随后，在预处理后的物料中加入复合纤维素酶和半纤维素酶进行水解，将多糖链断裂为可溶性的单糖和寡糖，最终通过固液分离获得糖浆。然而，与纯净的淀粉糖浆相比，该过程生产的糖浆成分复杂，其核心技术进步始终围绕“提高得率、降低成本和提升品质”展开，具体体现在开发更高效的预处理技术以减少抑制物生成、使用成本更低且耐抑制物的复合酶制剂，以及尝试将预处理与酶水解进行过程整合（如一体化生物加工）以缩短流程。

尽管技术不断改进,木质纤维素糖浆的大规模商业化生产仍面临一系列严峻挑战。首要挑战是糖浆质量与发酵兼容性问题。预处理过程中不可避免地会产生多种发酵抑制物,如糠醛、羟甲基糠醛(HMF)、乙酸及酚类化合物^[119-122]。这些物质严重影响下游微生物的生长和代谢,必须在糖化后或发酵前增加额外的脱毒净化步骤^[80, 85, 123-125],这增加了成本和复杂性。其次,存在五碳糖难以被传统工业微生物高效利用的难题^[4, 74]。糖浆中含有大量源自半纤维素的木糖等五碳糖,而许多高效生产菌株(如传统酿酒酵母)天然缺乏利用木糖等五碳糖的代谢路径,造成了碳源浪费和整体转化率低下。第三是技术经济性瓶颈依然突出。酶制剂成本虽已下降,但仍占总成本较大比重^[126];预处理环节能耗高、化学品消耗大;且整个工艺的水耗和废水处理负荷较高,影响了综合成本竞争力。最后,原料的波动性带来生产稳定性挑战。生物质原料的季节性、地域性和品种差异导致其成分不一致^[67],使得预处理和糖化工艺参数难以标准化,最终糖浆的品质(如糖的种类和含量、酸度、灰分以及抑制物含量)波动较大,给下游发酵工艺的稳定控制带来困难。

综上所述,木质纤维素糖浆生产是实现生物炼制工业化的技术中枢,其发展正在从追求“出糖”转向追求“出好糖、出稳糖和出低成本糖”。未来的突破将依赖于耐受性及功能性更强的生物炼制工程微生物菌株的开发,能够支持纤维素酶进行低成本在位生产的自主研发或知识产权菌种的转让,以及将糖化、脱毒与糖精制过程无缝耦合的集成工艺创新。只有综合解决这些挑战,木质纤维素糖浆才能真正成为一种可与传统糖源竞争、支撑起庞大生物制造产业的可靠基础原料。

1.5 本论文的立题依据和主要研究内容

随着全球对可持续发展和碳中和的日益重视,接近玉米干法加工技术转化指标的干法生物炼制技术必将在未来的生物经济中扮演越来越重要的角色。然而,目前干法生物炼制技术的产业化进程受限于生物脱毒过程的速率和可控制性低、整体生物炼制过程不连续、多个生物转化过程温度不匹配等关键技术瓶颈。本研究通过研究液态生物脱毒及其脱毒终点检测技术、生物炼制全过程连续化、生物炼制菌株耐高温性强化等内容,旨在突破上述技术障碍,构建面向产业化应用、高效、经济和可持续的干法生物炼制新体系。此外,可发酵秸秆糖浆作为生物炼制的关键中间产品,其干法生产工艺的开发不仅有助于降低生产成本,还能增强生物炼制产业链的灵活性和韧性。通过系统的工艺过程分析和技术经济性评估,将为秸秆糖浆的规模化生产提供科学依据。本论文希望通过多项技术研究来推动干法生物炼制技术从实验室走向产业化,促进农业废弃物的资源化利用,为生物基经济的发展提供技术支撑。本研究技术路线如下图所示:

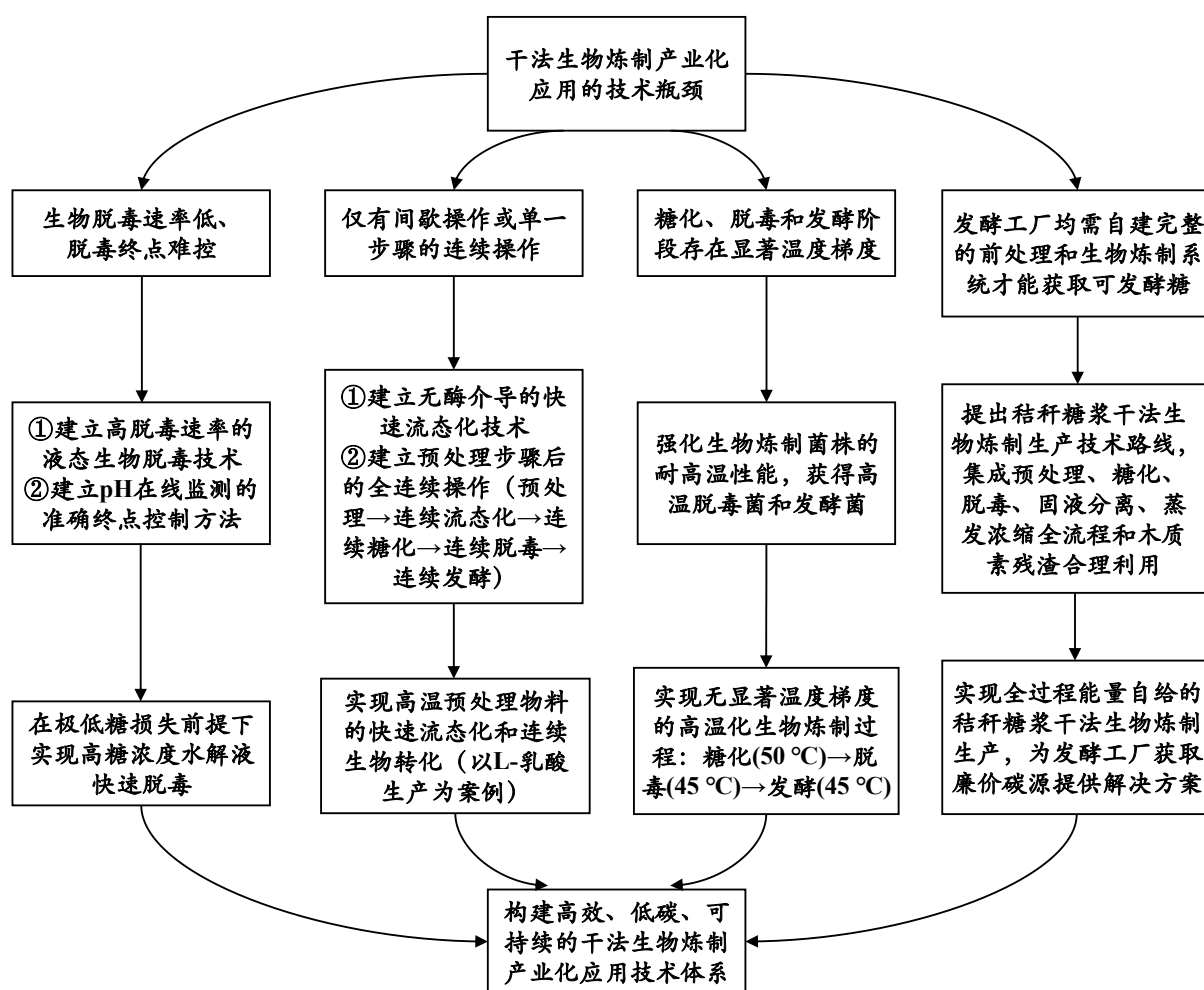


图 1.3 本研究技术路线图

Fig. 1.3 The technical flow sheet in this research

本论文的主要研究内容包括以下几个方面：

(1) 首先，为了解决当前生物脱毒过程速率和可控制性低的问题，对此前的干法生物炼制加工链（干酸预处理→固态生物脱毒→酶解糖化→发酵）中的固态生物脱毒技术进行技术升级，旨在建立一种高效实用、脱毒终点可在线识别和控制的液态生物脱毒方法。随后，验证该方法应用于高糖浓度、高抑制物浓度水解液体系下的可行性。其评价标准包括抑制物的脱除速率、可发酵糖损失情况以及脱毒终点的可识别性和准确性，并与传统的固态生物脱毒法进行综合比较。最后，将该方法应用至重构的干法生物炼制模式中，形成一种新型的生物炼制加工链（干酸预处理→酶解糖化→液态生物脱毒→发酵），并检验其用于生产生物基产品的潜力。

(2) 为了解决整体生物炼制过程不连续的问题，采用生物脱毒技术升级后的干法生物炼制加工链（干酸预处理→酶解糖化→液态生物脱毒→发酵）为技术平台，研究使用小麦秸秆为原料生产 L-乳酸的快速流态化和连续生物转化操作。首先，研究如何将干酸预处理后所获得的远超纤维素酶适宜温度（~50 °C）的高温固体颗粒状预处理

物料 (~100 °C) 进行流态化处理, 使之从预处理反应器出料之后便能快速进行冷却并形成流体液浆状。随后, 研究如何将流态化处理后得到的液浆状物料进行相互匹配的连续酶解糖化、连续生物脱毒和连续多级乳酸发酵。最后, 对从干酸预处理操作之后的流态化和连续化工艺过程进行详细的物料衡算, 并与用于生产生物基产品的常规批次乳酸发酵进行多方面比较。

(3) 为了解决当前木质纤维素干法生物炼制生产乳酸过程中多工段温度不匹配的问题, 即酶解糖化、生物脱毒和乳酸发酵这三个阶段存在明显的大范围的温度切换问题 (50 °C → 37 °C → 42 °C), 首先, 对脱毒和发酵这两个方面的生物炼制菌株的耐高温性强化 (即高温化) 问题进行研究。随后, 对完成耐高温性强化后所获得的生物炼制菌株的生物转化性能进行研究, 并与相应的出发菌株的生物转化性能进行对比。最后, 对这种在酶解糖化、生物脱毒和乳酸发酵步骤几乎零温度切换的高温化生物炼制生产过程的可行性进行综合分析和评价。

(4) 为了提升木质纤维素干法生物炼制的产业化可行性和灵活性, 建设独立的、面向多种下游产业的发酵糖 (如秸秆糖) 生产过程, 首先, 对干法生物炼制工艺用于高糖浓度、极低抑制物残留的可发酵秸秆糖浆生产的可行性进行研究。随后, 对可发酵秸秆糖浆的发酵性能进行探究并将其与常规发酵糖 (如淀粉糖、甘蔗糖蜜等) 在发酵指标、速率和得率等方面进行综合比较。最后, 对可发酵秸秆糖浆的干法生物炼制工艺的能耗和技术经济性进行研究, 并常规淀粉糖的生产进行比较, 以验证其能否实现一个零外部能量输入且低成本的秸秆糖浆生产工艺。

第 2 章 面向高糖浓度水解液体系的液态生物脱毒技术与脱毒终点控制

2.1 引言

木质纤维素生物炼制主要包括预处理、酶解糖化、发酵等过程单元^[76]。其中，预处理是生物炼制加工链的开始和决定性步骤，设置预处理过程是为了克服木质纤维素原料本身强烈的生物顽抗性，并使后续可发酵糖的释放成为可能^[127, 128]。然而，预处理过程会产生众多能够强烈抑制发酵微生物的活力和代谢的抑制物。因此，必须添加抑制物去除（即脱毒）步骤。对于高固含量条件下的实际生物炼制工艺而言，在各种可行脱毒方案中，利用特定微生物进行生物脱毒（或生物脱毒）被认为是唯一恰当的方案，因为它不仅能有效地将上述抑制物彻底降解，还能很好地保留可发酵糖^[129-132]。

对于此前采用生物脱毒法的干法生物炼制技术而言，其采用的生物脱毒方式是通过将树脂枝胞霉 *Amorphotheca resinae* ZN1 (CGMCC #7452) 或者宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* FN89 (CGMCC 17665) 等脱毒菌进行固态脱毒^[76, 77, 79]。这种固态脱毒方法具体是将脱毒菌的孢子或丝状菌丝体接种到预处理后的木质纤维素原料上，以固态发酵的方式进行脱毒^[77, 79]。虽然固态生物脱毒在实验室规模上是有效的，但在大规模操作中并不合适，原因有以下几个方面：（i）大规模好氧固态发酵资金成本高^[133]；（ii）固体物料的混合、供氧、pH 调节和热量移除的耗电量巨大^[133, 134]；（iii）操作时间长（至少 36 h 以上）^[77, 79]；（iv）固体生物质的运输效率低；（v）完成固态脱毒后的物料在出料、保存和输送方面容易被杂菌污染；（vi）无法准确地把握脱毒的终点，易产生局部物料脱毒不完全或者脱毒过度的问题。

克服固态生物脱毒这些固有缺陷的方法之一是采用液体发酵的方式进行生物脱毒。这种方法意味着需要对当前干法生物炼制过程进行技术转型，由预处理后先固态脱毒再酶促糖化的方式调整为预处理后先酶促糖化再液态脱毒的方式，即先将预处理过的固态木质纤维素原料酶解成液态的水解液浆，然后在适当的温度、通气和搅拌条件下将脱毒微生物接种到水解液浆中，启动液态生物脱毒。由此而来，固态生物脱毒的几个缺陷便可通过液态生物脱毒直接克服：（i）糖化和脱毒只需一个生物反应器，故节约了设备投入产生的资金成本；（ii）由于液体环境下的传热和传质效果更好，细胞生长得以改善，抑制物降解速度加快，有利于缩短操作时间^[135]；（iii）脱毒后的水解液浆在密闭容器、管道和泵中运输，可有效防止杂菌污染。

然而，实际的液态生物脱毒操作仍面临着一个重大的挑战，即需要找到一种明显的终点判定标志，以确保在极低可发酵糖损失的前提下迅速消除抑制物。这是因为：一方面，生物脱毒不充分会导致剩余的抑制物仍可以影响后续生物转化步骤，使得发酵性能不佳；另一方面，过度生物脱毒则会导致不必要的可发酵糖的非生产性消耗。因此，最理想的情况是生物脱毒阶段应在抑制物完全消除且可发酵糖损失可忽略不计

的情况下迅速过渡到发酵阶段。宛氏拟青霉是一种常见的全球性真菌，存在于土壤、植物、动物和食品中，并能在低氧环境下生长^[136]。该菌已被用于降解苯酚类物质^[137]或蓖麻子残渣脱毒^[138]，但鲜有关于其降解诸如糠醛、HMF、乙酸和酚醛等复杂的木质纤维素预处理衍生抑制物的报道。本研究使用了此前从受污染的预处理玉米秸秆原料中分离出的宛氏拟青霉 FN89，并建立了使用该菌的实用液态生物脱毒方法。通过可见的在线观察，我们发现体系 pH 值的变化与液体生物脱毒过程完全对应。当体系 pH 值达到峰值后，体系中的抑制物已被完全清除，并且可发酵糖的损失可以忽略不计，此时生物脱毒阶段便能够迅速过渡到发酵阶段，从而可成功地应用于 L-乳酸、乙醇和糖酸等生物化学品的生产。因此，在进行液态生物脱毒时，体系 pH 峰值可以作为判断脱毒是否完成的及时、易于观察且可实时监测的终点标志。至此，液态生物脱毒操作的最后一个重大挑战（即需要找到一种明显的脱毒终点判定标志）已被成功解决。

2.2 材料与方法

2.2.1 实验原料

小麦秸秆产自河南省南阳市，收获于 2021 年 5 月。在打包寄往本实验室之前，麦秆已在当地进行了简单的处理，如晾晒、粉碎和过筛等，最终获得尺寸较为一致的干燥麦秆（圆直径均为 10 毫米左右）。多点取样之后按照美国国家可再生能源实验室（NREL）的组分测定方法^[139]和灰分测定方法^[140]来确定该批河南南阳小麦秸秆的主要组分。结果显示，该批小麦秸秆含有 $35.6\% \pm 0.4\%$ 的纤维素、 $24.3\% \pm 0.2\%$ 的木聚糖、 $18.7\% \pm 0.1\%$ 的木质素和 $9.7\% \pm 0.3\%$ 的灰分（均基于干重）。

2.2.2 酶和试剂

纤维素酶采用诺维信（中国）生物技术有限公司生产的 Cellic CTec 2.0。首先，根据 NREL 的滤纸酶活测定方法（LAP-006），其滤纸酶活为 203 FPU/mL。其次，根据当前广泛认可的蛋白质含量测定方法（Brandford 法）^[141]，其酶蛋白含量为 86.3 ± 4.4 mg/mL。最后，纤维素酶在使用时按照 4 mg 酶蛋白/g 干物料的剂量进行添加。葡萄糖淀粉酶（糖化酶）采用杰能科（中国）生物工程有限公司生产的 GA-L NEW。按照生产商的说明，其酶活为 103,900 U/mL。山梨醇购买于上海麦克林生化科技股份有限公司。酵母提取物（或酵母粉）和蛋白胨均购买于 Oxoid 公司（汉普郡，英国）。硫酸、一水葡萄糖和其他药品或试剂均购买自上海国药集团化学试剂有限公司。

2.2.3 菌种和培养基

液态生物脱毒菌株采用丝状真菌宛氏拟青霉 *P. variotii* FN89。该菌保藏于中国典型微生物保藏中心，编号 CGMCC 17665^[77, 142]。正式使用前，先将 *P. variotii* FN89 在土豆-葡萄糖-琼脂（PDA）培养基（包括 200 g/L 去皮土豆、22 g/L 一水葡萄糖和 25 g/L 琼脂粉）平板上活化 2 次，然后使用 0.05%(w/w) 的吐温-80 溶液洗涤平板上的孢子获取孢子液，最后将孢子液接种于改进的 SM 液体合成培养基中进行培养，以获得成熟的 *P. variotii* FN89 脱毒种子液。SM 液体合成培养基包括 2 g/L 磷酸二氢钾、1 g/L 碳

酸钙、1 g/L 硫酸铵、1 g/L 酵母提取物、1 g/L 硫酸镁七水合物和 22 g/L 一水葡萄糖。

L-乳酸同步糖化共发酵 (SSCF) 所用发酵菌株为经过代谢工程改造的乳酸片球菌——*Pediococcus acidilactici* ZY271 (CGMCC 13611) [4, 143]。该菌可利用多种木质纤维素来源单糖 (如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、甘露糖和半乳糖)。该菌的出发菌株是 *P. acidilactici* DQ2^[144], 经历 *ldhD* 基因敲除之后命名为 *P. acidilactici* TY112^[145]。然后, 通过插入编码木糖异构酶 (*xylA*)、木糖激酶 (*xylB*)、转酮酶 (*tkt*) 和转醛酶 (*tal*) 四个基因, 将戊糖磷酸途径 (PPP) 整合到 *P. acidilactici* TY112 基因组中, 并通过敲除磷酸转酮酶 (*pkt*) 基因来阻断磷酸转酮酶途径 (PK), 从而减少乙酸的产生^[143]。乳酸菌 *P. acidilactici* ZY271 的种子培养采用 Man-Rogosa-Sharp (MRS) 液体合成培养基。该培养基中含有 10 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母提取物、5 g/L 乙酸钠、2 g/L 柠檬酸氢铵、2.6 g/L 磷酸氢二钾三水合物、0.58 g/L 硫酸镁七水合物、0.25 g/L 硫酸锰一水合物和 22 g/L 一水葡萄糖。乳酸发酵时, 每升发酵液所需营养物质包括 20 g 酵母提取物、2 g 柠檬酸氢铵和 0.25 g 硫酸锰一水合物。

乙醇发酵所用发酵菌株为经过代谢工程改造的酿酒酵母——*Saccharomyces cerevisiae* XH7^[74]。该菌是通过将编码木糖异构酶的 *Ru-xylA* 基因、编码内源木酮糖激酶的 *XKSI* 基因以及非氧化性戊糖磷酸途径中的四个基因整合到野生型酿酒酵母菌株 BSIF 中而获得的。此外, 编码醛糖还原酶的 *GRE3* 基因和编码碱性磷酸酶的 *PHO13* 基因也被敲除^[74]。*S. cerevisiae* XH7 在由 10 g/L 酵母提取物、20 g/L 蛋白胨和 22 g/L 一水葡萄糖组成的酵母提取物-蛋白胨-葡萄糖 (YPD) 液体合成培养基中进行活化。乙醇发酵时, 每升发酵液所需营养物质包括 10 g 酵母提取物、2.6 g 磷酸氢二钾三水合物、2 g 硫酸铵和 1 g 硫酸镁七水合物。

用于葡萄糖酸和木糖酸生产的发酵菌株为经过长期适应性进化而得到的氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* RM7 (CGMCC 14801), 该菌的出发菌株是从德国微生物与细胞培养物保藏中心 (DSMZ, 布伦瑞克, 德国) 购得的 *G. oxydans* DSM 2003^[87]。种子培养基中含有 20 g/L 酵母提取物、1.5 g/L 的磷酸氢二钾、1.5 g/L 的硫酸铵、0.5 g/L 的硫酸镁七水合物以及 80 g/L 的山梨醇。糖酸发酵时, 每升发酵液所需的营养物质包括 20 g 酵母提取物、1.5 g 磷酸氢二钾、1.5 g 硫酸铵以及 0.5 g 硫酸镁七水合物。

2.2.4 干酸预处理

在容积为 20 L 的预处理反应器内对小麦秸秆进行干酸预处理^[81, 146]。每批投入麦秆的干重量为 1200 g, 随后按照 38 mg/g 干麦秆的硫酸用量添加酸液 (稀硫酸), 使得整个预处理体系的固含量为~70% (w/w), 即保持固液比 2:1。干酸预处理反应器内部使用螺带搅拌桨, 可以对反应器内的麦秆、酸液和饱和蒸汽进行充分混合。预处理实际维持条件为温度 175 °C、压力 0.8-1.0 MPa 和搅拌转速 50 rpm, 处理 5 min 后进行放料操作, 可以得到质量~2 kg 且固含量~50%(w/w)的预处理麦秆物料。尽管小麦秸秆吸收了蒸汽冷凝水中的所有水分, 但由于其良好的吸湿性, 故预处理后仍保持颗粒状。根据两步酸水解法 (TP-510-42618) 进行标准化组分测定^[139], 干酸预处理后的麦秆物

料的主要成分包括：每克干基物料含 350.2 ± 8.2 mg 纤维素、 14.0 ± 5.7 mg 木聚糖、 36.7 ± 0.8 mg 葡萄糖、 136.8 ± 2.6 mg 木糖、 22.9 ± 0.3 mg 乙酸、 5.4 ± 1.0 mg 5-羟甲基糠醛（HMF）以及 2.8 ± 0.5 mg 的糠醛。

2.2.5 酶解糖化和液态生物脱毒

在 5L 螺带搅拌反应器内对干酸预处理后的麦秆物料进行酶解糖化，以获得可发酵单糖。由于预处理麦秆（pH 为 2~3）中含有硫酸催化剂以及乙酸、乙酰丙酸等弱酸，故首先采用质量分数 20%(w/w)的氢氧化钙液浆对其进行充分中和，直至物料的 pH 达到 5.0~5.5。随后在 30%(w/w)的体系固含量、50 °C、150 rpm 的条件下对中和后的预处理麦秆进行酶解糖化，持续 12 h（后续用于乙醇和 L-乳酸发酵实验）或 48 h（后续用于葡萄糖酸和木糖酸发酵实验）。在 L-乳酸和乙醇生产的情况下，酶解糖化过程分为两步进行。第一步是预处理小麦秸秆的直接水解（称为预糖化），第二步是同步糖化与共发酵（SSCF）。在糖酸生产的情况下，酶解糖化过程是一步完成的（48 h），并且由于中间产物葡萄糖酸- δ -内酯对纤维素酶活性有强烈的抑制作用^[147, 148]，因此在这一步骤中一次性添加全部所需的纤维素酶。所有糖化实验中的纤维素酶用量均为 4 mg 酶蛋白/g 干物料，发酵过程中不再额外添加纤维素酶。

糖化结束后，所获得的麦秆水解液浆被立刻转移至带有 Rushton 搅拌桨的 3L 发酵罐中进行液态生物脱毒。首先，为获得生物脱毒种子液，我们将 *P. variotii* FN89 的孢子悬浮液（孢子量级约为 10^8 每毫升）以 10%(v/v)的比例接种到 SM 液体合成培养基中，然后在 37 °C和 300 rpm 的条件下好氧培养 20~24 小时，此时种子液的干细胞重量(DCW)约为每 8 g/L。将此时的种子液以 1%(w/w)、5%(w/w)、10%(w/w)或 20%(w/w)的比例接种到水解液中开始液态生物脱毒过程，并对液态生物脱毒过程的其他条件参数进行优化，包括初始 pH 值（3.5、4.0、4.6、5.0 或 5.5）、搅拌转速（300、500 或 750 rpm）和通气速率（0.5、1.0 或 1.5 vvm）等等。液态生物脱毒全过程未添加任何营养物质，当有大量泡沫产生时即加入一定量的消泡剂（不超过待脱毒水解液体积的 0.5%）。脱毒期间通过分别使用 pH 电极（D09120016，苏州汉星分析传感器有限公司）和溶氧电极（CH7402，瑞士哈美顿博纳图斯股份公司）在线检测 pH 值和溶解氧含量。然后将生物脱毒后的麦秆水解液浆在无氧条件下以 50 °C和 100 rpm 维持 12 小时，以使菌株 *P. variotii* FN89 失活^[142]。*P. variotii* FN89 在适当的温度（ ≤ 37 °C）和有氧条件下以菌丝体形式在液体培养基或未脱毒的水解物中生长，但在高压环境（如无氧环境和/或较高温度的 50 °C）下则以孢子形式存活^[142]。

2.2.6 乙醇、L-乳酸和糖酸发酵生产

麦秆水解液浆在带有 Rushton 搅拌桨的 3L 发酵罐内完成液态生物脱毒后，直接在位进行多种生物基化学品的发酵生产。其中，用于厌氧发酵生产生物乙醇和 L-乳酸的发酵类型是同步糖化与共发酵（SSCF）；而用于好氧发酵生产葡萄糖酸和木糖酸的发酵类型是分步糖化和发酵（SHF）。

对于乙醇发酵，首先将冷冻保藏的 *S. cerevisiae* XH7 菌液（约 2 mL）接入 20 mL

YPD 培养基中进行初步活化, 活化后以 10%(v/v)的接种量接种至 5%(w/w)固含量的已脱毒麦秆水解液中进行培养, 获得一级种子液。随后按同样的接种量将一级种子液接种至 10%(w/w)固含量的已脱毒麦秆水解液中进行培养, 获得二级种子液。所用的脱毒水解液中还添加了 10 g/L 酵母提取物、2.6 g/L 磷酸氢二钾三水合物、2 g/L 硫酸铵和 1 g/L 硫酸镁七水合物。所有种子液均在 30 °C、180 rpm 的条件下培养 24 h。最后, 将二级种子液以 20%(v/v)的接种量接入装有~1 L 脱毒水解液浆的 3L 发酵罐内, 添加同样剂量的上述营养物质后在 30 °C、300 rpm、pH5.5 (自动添加 5 M NaOH 控制 pH) 的条件下厌氧发酵 48 h。

对于手性 L-乳酸发酵, 首先将冷冻保藏的 *P. acidilactici* ZY271 菌液 (约 2 mL) 接入 20 mL MRS 培养基中进行培养, 获得一级种子液。随后按照 10%(v/v)的接种量接种至新鲜的 100 mL MRS 培养基中进行培养 (同时添加 1.2 g 碳酸钙和 1 mL 糖化酶), 获得二级种子液。所有种子均在 42 °C、150 rpm 的条件下培养 6 h。最后, 将乳酸菌二级种子液以 10%(v/v)的接种量接入装有~1 L 脱毒水解液浆的 3L 发酵罐内, 在 42 °C、300 rpm、pH5.5 (自动添加 20%(w/w)的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 液浆控制 pH) 的条件下厌氧发酵 72 h。

对于葡萄糖酸和木糖酸发酵, 采用了分步糖化和发酵 (SHF) 的方式。这是因为在葡萄糖酸发酵过程中会产生一种名为葡萄糖酸- δ -内酯的中间产物 (氧化葡萄糖酸杆菌氧化葡萄糖时产生, 随后自发水解成葡萄糖酸), 这种物质会强烈抑制纤维素酶活性。因此, 需要纤维素酶持续发挥水解作用的 SSF (同步糖化和发酵) 以及 SSCF (同步糖化与共发酵) 方式均不适用于葡萄糖酸发酵^[148, 149]。在本研究中, 为了最大限度地从预处理麦秆物料中释放出可发酵糖, 将酶解糖化时间设定为 48 h。氧化葡萄糖酸杆菌 *G. oxydans* RM7 的种子液制备及发酵方法如下: 首先, 将冷冻保藏的 *G. oxydans* RM7 菌液 (约 2 mL) 接入 20 mL 种子培养基中在 30 °C、200 rpm 的条件下培养 24 h, 获得一级种子液; 随后, 按照 10%(v/v)的接种量接种至新鲜的 100 mL 种子培养基中在相同条件下培养 24 h, 获得二级种子液; 最后, 将氧化葡萄糖酸杆菌的二级种子液以 10%(v/v)的接种量接入装有~1 L 脱毒水解液浆的 3L 发酵罐内, 在 30 °C、500 rpm、2.4 vvm 和 pH5.5 (自动添加 5 M NaOH 和 2 M H_2SO_4 控制 pH) 的条件下好氧发酵 24 h。

2.2.7 气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 分析

采用 GC-MS 对液态生物脱毒期间可能产生的酸性物质 (如脂肪酸等) 进行定性检测^[150, 151]。在样品处理时, 为避免脂肪酸衍生化对培养液中原始游离酸的测定产生干扰, 采用了硫酸-乙醚提取法 (一种非衍生化方法)^[152]。具体而言, 先将脱毒期间水解液浆的离心上清液 (500 μL) 与 50%(w/w)硫酸 (50 μL) 和无水乙醚 (200 μL) 在 EP 管内进行混合 (比例为 10:1:4), 然后用漩涡振荡器振荡至少 30 分钟后置于高速离心机中离心 (12000 rpm, 5 min), 再置于 4 °C 冰箱内静置冷却 30 分钟。最后用移液管小心吸取上层乙醚溶液用于 GC-MS 检测。

本研究采用的是配备 Agilent DB-WAX 毛细管柱 (30 m \times 250 μm \times 0.25 μm) 的安捷伦 6890N-5975I 气相色谱-质谱联用仪 (美国安捷伦科技有限公司), 对比数据库为

NTST05。所用的载气为氦气，恒定流速为 1.0 mL/min。每次手动进样的体积为 1.0 μ L，分流比为 5:1。溶剂延迟时间 3 min。使用 50-500 m/z 扫描范围在 70 eV 下以电子冲击 (EI) 模式操作质谱仪^[150]。采用程序升温：初始柱温为 60 $^{\circ}$ C，保持 2 分钟；然后以每分钟 10 $^{\circ}$ C/min 的速度升至 170 $^{\circ}$ C，保持 2 分钟；最后以 60 $^{\circ}$ C/min 的速度升至 280 $^{\circ}$ C，保持 5 分钟。进样口和 EI 离子源温度分别设置为 280 $^{\circ}$ C 和 230 $^{\circ}$ C。

2.2.8 分析方法

检测糖酸发酵样品中的葡萄糖和木糖时采用装有 HPX-87P 色谱柱 (Biorad, 美国)、LC-20AD 色谱泵 (日本岛津) 和 RID-10A 示差折光检测器 (日本岛津) 的高效液相色谱 (HPLC)，流动相采用经过灭菌和脱气后的超纯水，流速为 0.6 mL/min，柱温为 80 $^{\circ}$ C^[147]。

检测糖酸发酵样品中的葡萄糖酸和木糖酸时采用 Biorad Aminex HPX-87H 色谱柱 (Biorad, 美国)、LC-20AD 色谱泵 (日本岛津) 和 UV/VIS 检测器 SPD-20A 的 HPLC。检测条件：流动相为 5 mM H₂SO₄，流速 0.4 mL/min，柱温 55 $^{\circ}$ C，波长 210 nm^[153]。

除糖酸发酵产生的样品外，检测其他样品中的小分子物质 (如葡萄糖、木糖、乙酸、糠醛、5-HMF、乙醇和乳酸等) 时，均采用装有 LC-20AD 色谱泵、Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱和 RID-10A 示差折光检测器的 HPLC。检测条件：流动相 5 mM H₂SO₄，流速 0.6 mL/min，柱温 65 $^{\circ}$ C。

2.3 结果与分析

2.3.1 液态生物脱毒的可行性及脱毒终点的确定

以高固含量 (~30%, w/w) 的小麦秸秆糖化液浆为原料，评价了脱毒菌 *P. variotii* FN89 用于液态生物脱毒的可行性和有效性。小麦秸秆水解液浆中的三种代表性抑制物分别是糠醛、HMF 和乙酸。液态生物脱毒的终点被定义为糠醛和 HMF 完全去除且乙酸去除~80%的时间点。除了抑制物的脱除效果之外，我们还将脱毒期间葡萄糖和木糖等可发酵糖的损失率高低作为脱毒可行性的第二个评价指标。

图 2.1 显示，在充分搅拌 (750 rpm) 和通气 (1.5 vvm) 条件下，经过 12.5 h 的液态生物脱毒处理，糠醛和 HMF 分别从 0.47 ± 0.04 g/L 和 1.03 ± 0.02 g/L 降至检测不到的水平，乙酸从 6.02 ± 0.38 g/L 降至 1.08 ± 0.30 g/L (去除率 82.1%) (图 2.1a)。根据终点定义，图 2.1 中液态生物脱毒终点时间为 12.5 h。从脱毒 0 h 至生物脱毒终点 (12.5 h)，由于生物脱毒期间持续的酶水解作用，葡萄糖浓度从初始的 68.21 ± 0.30 g/L 增加到 82.93 ± 1.32 g/L，而木糖浓度基本保持不变 (图 2.1b)。如果在生物脱毒终点 (12.5 小时) 之后继续进行液态生物脱毒，糖损失明显增加，这从实际葡萄糖浓度与水解趋势线之间的差距可以看出 (图 2.1b 和图 2.2)。该实验还表明，在达到生物脱毒终点之前，由脱毒菌 *P. variotii* FN89 引起的可发酵糖损失可忽略不计 (低于总糖的 2%)。小麦秸秆水解液中的总酚含量约为 2~3 g/L，而 *P. variotii* FN89 能够在生物脱毒过程中去除超过 80% 的酚醛类物质^[4, 154]。由于残留的酚类物质对所用发酵菌的毒性较小，故

延长生物脱毒时间以去除残留酚类物质不仅意义不大而且还会导致可发酵糖的过度消耗。另外，在实际测定酚类物质浓度时，由于每种单一酚类物质的浓度非常低，难以进行准确测定，因此本研究通过监测三种主要抑制物（乙酸、糠醛和 HMF）的变化来了解生物脱毒的进程。

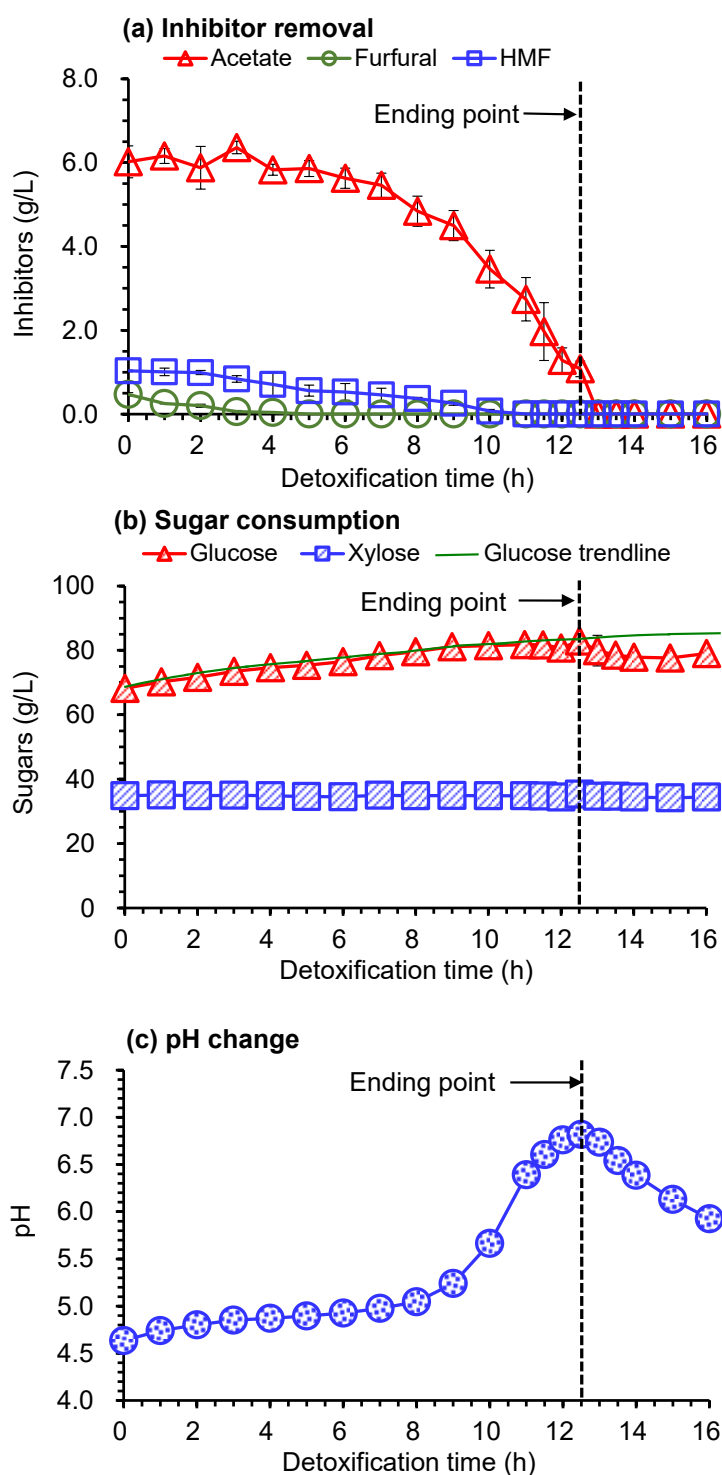


图 2.1 高固含量麦秆糖化液浆在液态生物脱毒期间的抑制物降解、糖消耗及 pH 值的变化

Fig. 2.1 Inhibitors degradation, fermentable sugars consumption, and pH value change during liquid-phase biodetoxification in high-solids loading wheat straw hydrolysate

注：(a)抑制物降解情况；(b)糖耗情况；(c)体系 pH 变化情况。采用 30%(w/w)固含量的麦秆糖化液

浆 (50 °C 下糖化 12 h) 在 3L 脱毒反应器内进行液态生物脱毒。脱毒种子液为 *P. variotii* FN89 的扩培种子液, 脱毒接种量为糖化液浆的 20%(v/v), 温度为 37 °C, 通气速率为 1.5 vvm, 搅拌转速为 750 rpm。

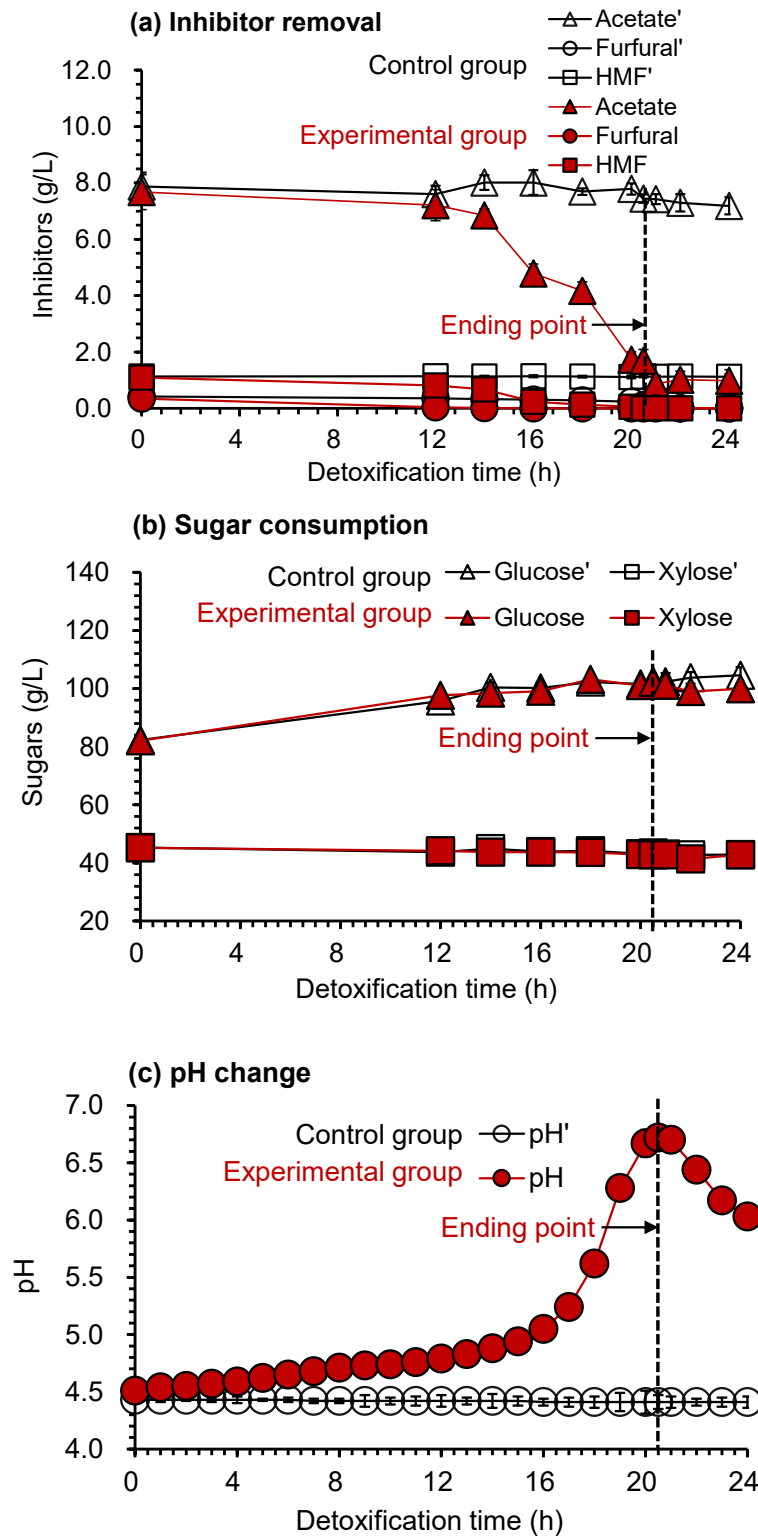


图 2.2 液态生物脱毒阶段接种失活的宛氏拟青霉 FN89 种子液进行脱毒 (对照组) 以及接种正常存活的宛氏拟青霉 FN89 种子液进行脱毒 (实验组)

Fig. 2.2 Liquid-phase biodetoxification with inoculation of inactivated *P. variotii* FN89 seed (Control group) and of activated *P. variotii* FN89 seed (Experimental group)

注：(a)抑制物降解情况；(b)糖耗情况；(c)体系 pH 变化情况。对照组和实验组均采用 30%(w/w) 固含量的麦秆糖化液浆（50 °C下糖化 12 h）在 3L 脱毒反应器内进行液态生物脱毒，脱毒种子液为 *P. variotii* FN89 的扩培种子液（实验组直接使用，对照组先将种子液在 121 °C下灭活处理 20 分钟后使用），脱毒接种量均为糖化液浆的 10%(v/v)，脱毒起始 pH 均接近 4.5，温度均为 37 °C，通气速率均为 1.0 vvm，搅拌转速均为 750 rpm。

在液态生物脱毒过程中我们观察到了体系 pH 值呈规律性波动的现象。在脱毒终点前（0-12.5 h），pH 值从初始的 4.64 ± 0.05 逐渐上升至峰值 6.82 ± 0.01 ；在终点后，pH 值于 4.5 个小时内从峰值 6.82 ± 0.01 快速下降至 5.93 ± 0.01 （图 2.1c）。此外，我们在脱毒体系初始 pH 值从 4.6 到 5.5、接种量从 1% (w/w)到 20% (w/w)、搅拌速率从 300 rpm 到 750 rpm、通气量从 0.5 vvm 到 1.5 vvm 等多个不同条件的液态生物脱毒实验中也观察到了这一现象。

针对这一现象，我们通过 HPLC、GC-MS 对液态生物脱毒过程中酸性化合物的变化进行分析（图 2.3），以对 pH 值产生规律性波动的原因进行解释。本研究所用的生物脱毒菌株 *P. variotii* FN89 具有特殊的底物代谢顺序，能够优先将抑制物（糠醛、HMF、乙酸等）作为底物，而非葡萄糖和木糖^[77]。如图 2.3 所示，达到脱毒终点（12.5 h）之前，伴随乙酸被 *P. variotii* FN89 稳定消耗直至达到低浓度水平（约 1 g/L）而出现 pH 值的逐渐升高（图 2.3a）。达到脱毒终点后，根据 GC-MS 分析结果（图 2.3b），在 *P. variotii* FN89 进行的液态生物脱毒过程中产生了多种有机酸，包括糠酸（呋喃甲酸）和苯甲酸，以及几种长链脂肪酸，如十六烷酸和十八烷酸等。这些有机酸在达到脱毒终点前含量虽然极低，但在达到终点后不久便迅速增加到较高水平且变得可测。显然，脱毒终点后小麦秸秆水解液 pH 值的下降是由于这些有机酸的积累（图 2.3b）。因此，通过监测在线 pH 值的变化可以很容易地识别生物脱毒终点。当水解液体系 pH 值达到峰值时，生物炼制过程便可以很容易地从生物脱毒阶段转移到发酵或同步糖化与共发酵（SSCF）阶段。由于该脱毒终点识别方法的原理不受特定条件的限制，故其适用于木质纤维素水解液体系进行脱毒的一般情况。此外，木质纤维素预处理过程的乙酸生成是半纤维素中乙酰基水解断裂的自然结果（木质纤维素中的乙酰基占整体生物质重量的 2%-3%），与糠醛和 HMF 降解产生的乙酸无关。这一特性确保了在 *P. variotii* FN89 对木质纤维素水解液进行生物脱毒的早期阶段，随着乙酸的消耗，pH 值会升高。另一方面，一旦乙酸、糠醛和 HMF 等主要抑制物被 *P. variotii* FN89 降解完全，*P. variotii* FN89 便会生成糠酸和苯甲酸等酸性物质，并立刻转向利用可发酵糖等能够维持细胞存活的碳水化合物作为碳源，从而生成诸如长链脂肪酸之类的酸性化合物，进而导致体系 pH 值的下降。

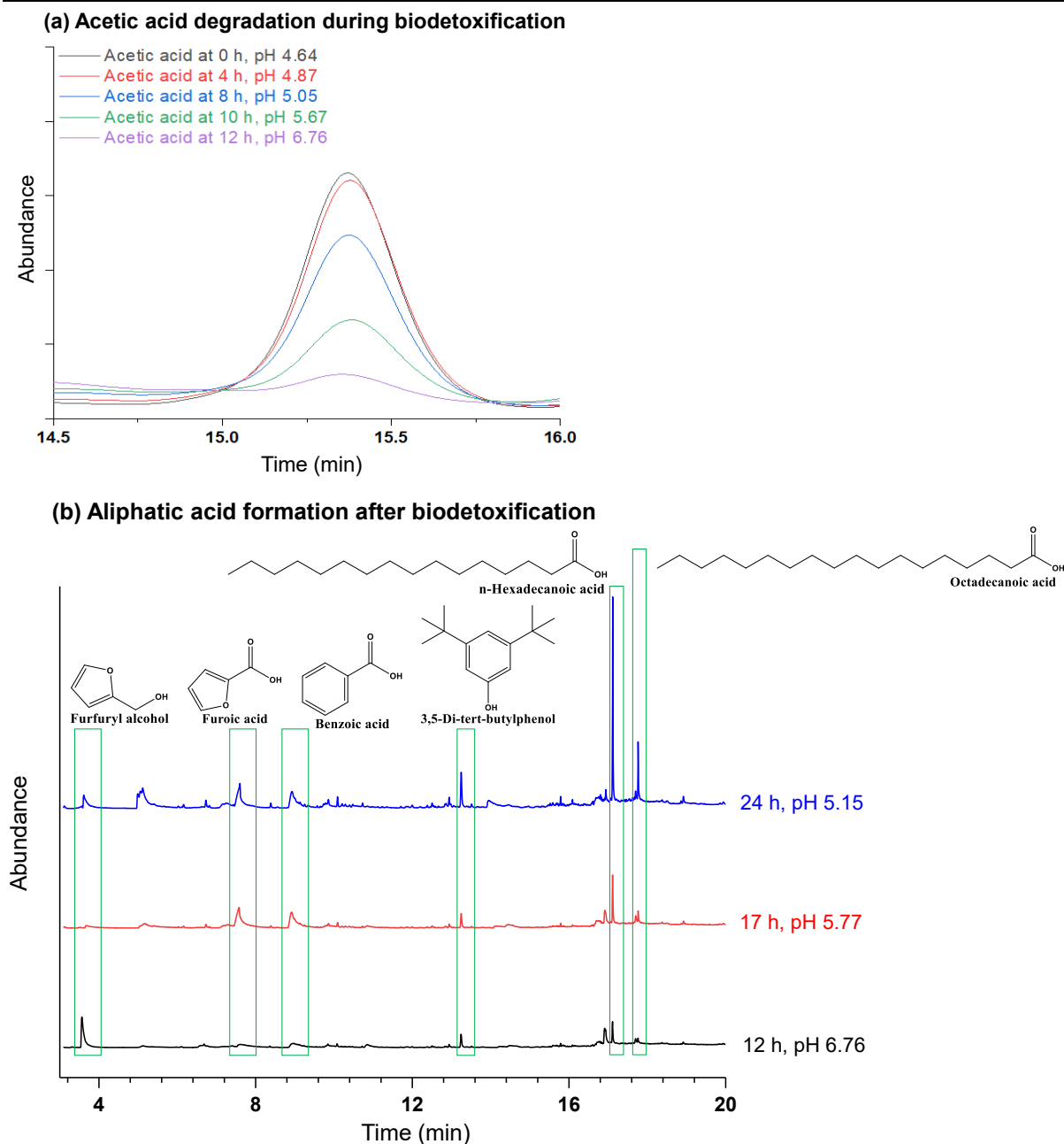


图 2.3 液态脱毒期间乙酸的降解情况和酸类化合物的生成情况

Fig. 2.3 Acetic acid degradation and acidic components formation during the liquid-phase biodetoxification

注：(a) 液态脱毒期间的乙酸降解情况（HPLC 分析结果）。(b) 液态脱毒后期的酸类化合物生成情况（GC-MS 分析结果）。液态脱毒条件：采用固含量 30%(w/w)的预处理麦秆糖化液（50 °C 下糖化 12 h），脱毒接种量为麦秆糖化液的 20%(v/v)，通气速率为 1.5 vvm，搅拌转速 750 rpm，pH 自然。HPLC 谱图数据来源于液态脱毒 0 h、4 h、8 h、10 h 和 12 h 样品上清液的检测结果。HPLC 主要检测条件包括流动相 5mM H₂SO₄、流速 0.6 mL/min 和柱温 65 °C。GC-MS 主要对三种脱毒状态下的糖化液样品进行检测：液态脱毒终点（~12 h，pH=6.76）；轻微脱毒过度（~17 h，pH=5.77）；严重脱毒过度（~24 h，pH=5.15）。

2.3.2 液态生物脱毒条件参数的优化

液态生物脱毒是一个耗氧过程，需要通过各种氧化还原酶催化的途径对多种醛类

进行生物脱毒^[155]。尽管宛氏拟青霉 FN89 能在低氧水平下生长并在消耗可发酵糖之前降解抑制物^[77, 110, 136]，但高固含量麦秆水解液浆体系下的液态生物脱毒过程仍面临着高粘度性质的阻碍，易导致体系的溶氧传递不良^[84]。为了提高液态生物脱毒的效率，我们对细胞培养和气-液-氧传递相关的条件参数进行了优化，主要包括脱毒体系初始 pH 值、脱毒种子液接种量、搅拌转速和通气速率等方面（如图 2.4 所示）。液态脱毒条件优化实验均使用固含量为 30%(w/w)的预处理麦秆糖化液（50 °C 下糖化 12 h）。

图 2.4a 显示的是液态脱毒体系的起始 pH 值对脱毒速率的影响。可见，若对脱毒起始体系 pH 不作任何调整的话（即保持 pH 自然，此时 pH~4.6），脱毒完成时间为 14.5 h。当调整液态脱毒初始 pH 至 5.0 和 5.5 时，相应的脱毒完成时间分别为 13.5 h 和 16 h。然而，当初始 pH 被调整至 3.5 和 4.0 时，脱毒过程难以进行。我们发现：当脱毒起始 pH 为 3.5 和 4.0 时，脱毒期间的体系 pH 基本保持恒定，且后续经 HPLC 检测后发现脱毒 24 h 的抑制物水平基本与脱毒 0 h 的保持一致。这说明低 pH 条件下 *P. variotii* FN89 不能正常完成液态脱毒工作。值得注意的是，当液态脱毒初始 pH 高于 5.0 时，随着脱毒的进行，体系 pH 甚至会超过 7。由于此种情况下脱毒体系的 pH 长时间高于酸性纤维素酶 CTec 2.0 的适宜 pH (~4.8)，故其极大程度上会对纤维素酶的活性造成不利影响，进而不利于后续发酵过程中可发酵糖的同步释放。因此，对于 *P. variotii* FN89 参与的液态脱毒过程而言，较为合适的脱毒起始 pH 范围大致为 4.5~5.0。

从图 2.4b 中可以看出，脱毒菌的接种量大小对脱毒速度影响很大。例如接入 20%(v/v)的 *P. variotii* FN89 种子液进行液态脱毒时，仅需要 12.5 h 左右的时间就能将体系中的抑制物几乎脱除完全，而同等情况下接种量为 10% (v/v)时需要 14.5 h 左右的时间才能脱除完全，接种量为 5% (v/v)或 1% (v/v)时则需要更长的时间（分别为 26 h 和 31 h）。尽管增加 *P. variotii* FN89 的接种量能够加快脱毒速率，但考虑到成本和产物浓度的稀释问题，实际脱毒接种量选定为 10% (v/v)。

液态生物脱毒过程类似于好氧发酵，主要的能源成本来自通气和搅拌。优化这两个因素的目的是为了给 *P. variotii* FN89 的生长和代谢提供足够的溶氧。图 2.4c 和图 2.4d 显示了通过调节通气流量和搅拌速率可以调节溶解氧的传递。小麦秸秆糖化液是一种粘稠的浆料，含有大量木质素固体颗粒。这些特性使得氧气从空气泡传递到液体中相当困难^[84, 156]。增加通气流量或搅拌速率均能显著加快脱毒速率，表明氧传递是液态生物脱毒速率的决定性因素。为了适当控制成本和保证较高的脱毒速率，我们决定采用 500-750 rpm 的转速以及 1.0 vvm 的通气量作为后续液态脱毒的基本条件。

此外，为了找出液态生物脱毒期间所需的合适溶氧水平范围，我们还进行了一定的拟合分析。30%(w/w)的麦秆糖化液在接种了 10%(v/v)脱毒种子液后，体系固含量被稀释至 27%(w/w)左右，根据 Hou 等对木质纤维素预糖化液的氧传递规律的研究^[84]，我们拟合出一条体积氧传递系数 (k_{La}) 随脱毒转速变化的趋势线，如图 2.5 所示。可以看出，在固含量约为 27%(w/w)且高粘度的麦秆糖化液体系中，当调整搅拌转速为 500~750 rpm 且通气量为 1.0 vvm 时，此时的 k_{La} 大致在 10-40 h⁻¹。因此，保守而言，

要想获得较为良好的液态脱毒效果，至少应保持待脱毒体系的 k_{La} 在 10 h^{-1} 以上。

总的来说，为了保证液态生物脱毒过程在拥有较高脱毒速率的同时，还能避免对最终的发酵体系造成过大的稀释以及适当节约溶氧供给的能量成本，我们最终决定采用 4.5-5.0 的脱毒起始 pH、10% (v/v) 的脱毒菌接种量、500-750 rpm 的脱毒转速以及 1.0 vvm 的通气速率作为后续液态生物脱毒的基本条件参数。

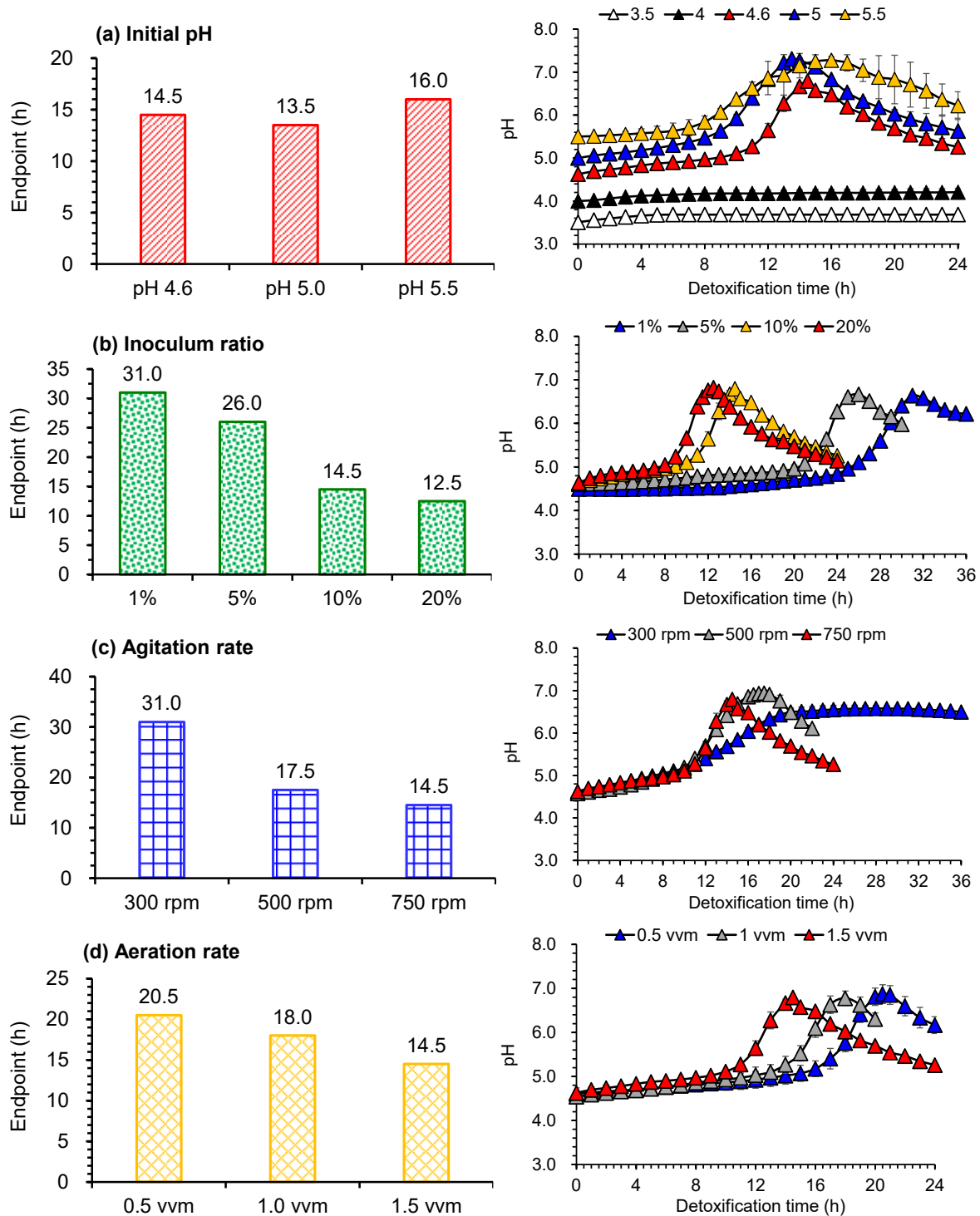


图 2.4 不同条件下到达液态生物脱毒终点的时间及脱毒期间 pH 的变化

Fig. 2.4 Endpoints and related pH changes during liquid-phase biodetoxification at varying operation parameters

注: (a)起始 pH。探究起始 pH 值 (3.5, 4.0, 4.6, 5.0, 5.5) 时, 控制其他条件不变: 1.5 vvm、750 rpm 和 10%(v/v)接种量; (b)脱毒接种量。探究接种量 (v/v: 1%, 5%, 10%, 20%) 时, 控制其他条件不变: 1.5 vvm、750 rpm 和自然 pH; (c)搅拌转速。探究搅拌转速 (300 rpm, 500 rpm, 750 rpm) 时, 控制其他条件不变: 1.5 vvm、20%(v/v)接种量和自然 pH; (d)通气速率。探究通气速率 (0.5 vvm, 1.0 vvm, 1.5 vvm) 时, 控制其他条件不变: 750 rpm、20%(v/v) 接种量和自然 pH。液态脱毒条件优化实验均使用 30%(w/w)预处理麦秆糖化液 (50 °C下糖化 12 h)。

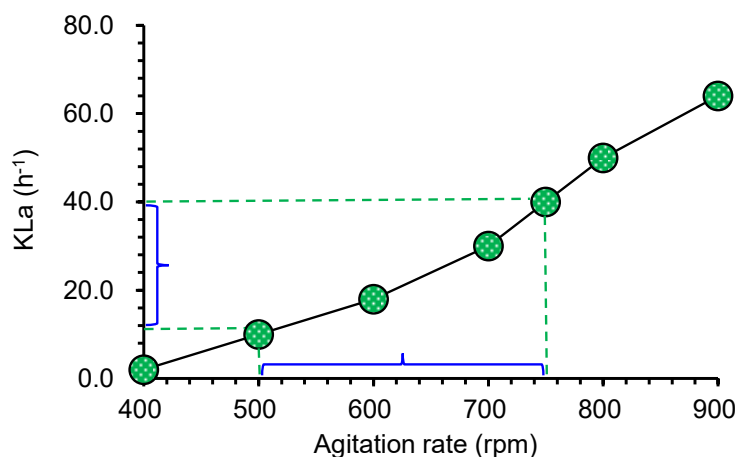


图 2.5 麦秆糖化液通气条件下体积氧传递系数与转速的拟合变化关系^[84]

Fig. 2.5 The fitting variation relationship between the gas-liquid oxygen transfer coefficients (k_{La} values) and the rotational speed under the aeration condition of wheat straw hydrolysate^[84]

2.3.3 新型生物炼制模式的发酵潜力评价

基于上述对液态生物脱毒过程的条件优化结果, 我们对所提出的新型生物炼制模式 (干酸预处理→酶解糖化→液态生物脱毒→发酵) 用于生产 L-乳酸、乙醇和糖酸等具有代表性的生物基产品的潜力进行了评价, 以帮助判断该模式的可行性。

图 2.6a 显示了小麦秸秆经过干酸预处理、酶解糖化、液态生物脱毒和 SSCF 后的 L-乳酸生产情况。经过 72 h 的 SSCF 达到了 110.1 ± 0.7 g/L 的 L-乳酸浓度, 总残留糖为 5.2 ± 0.7 g/L (葡萄糖 3.3 ± 0.7 g/L, 木糖 1.8 ± 0.6 g/L), L-乳酸得率为 0.760 g 乳酸/g 秸秆糖, 手性纯度为 99.5%。L-乳酸的产量和手性纯度均符合 L-丙交酯合成的要求, 并且与常规生物炼制模式生产 L-乳酸的得率 (0.775 g 乳酸/g 秸秆糖) 和手性纯度 (99.6%) 相当^[4]。图 2.6b 显示, 麦秆在相同生物炼制加工步骤下, 经过 48 h 的 SSCF 达到了 51.9 ± 0.4 g/L 的乙醇浓度, 葡萄糖和木糖分别残留 1.6 ± 0.1 g/L 和 5.0 ± 0.5 g/L。此时的乙醇得率接近于常规生物炼制模式下相同发酵时间的乙醇得率 (~ 0.3 g 乙醇/g 秸秆糖)^[77]。图 2.6c 显示的是糖酸生产 (葡萄糖酸和木糖酸同步生产) 的结果。小麦秸秆经过预处理、充分酶解糖化和液态生物脱毒后, 得到含有 107.7 ± 0.5 g/L 葡萄糖和 40.6 ± 0.9 g/L 木糖的麦秆水解液, 随后经过 24 h 的糖酸发酵, 获得了 139.7 ± 12.6 g/L 总糖酸, 发酵得率为 0.76 g 糖酸/g 总糖。这一结果与本实验室此前基于常规干法生物炼制模式 (干酸预处理→固态脱毒→酶解糖化→发酵) 使用氧化葡萄糖酸杆菌 *G. oxydans* DSM 2003 进行 32 h 糖酸发酵的结果相近 (136.3 g/L 的总糖酸)^[87]。多项研究表明, 氧化葡萄糖酸杆菌在糖酸生产过程中会不可避免地发生从葡萄糖酸生成副产

物酮基葡萄糖酸 (KGA) 的反应并伴随糖酸得率的降低^[87, 157]。然而, 在当前研究中我们未观察到糖酸浓度的下降(图 2.6c), 这表明本研究所进行的糖酸生产过程的 KGA 生成可忽略不计。

总的来说, 通过新型生物炼制模式(干酸预处理→酶解糖化→液态生物脱毒→发酵)生产木质纤维素基产品不仅极具高指标发酵应用潜力, 而且完全能够替代常规生物炼制模式(干酸预处理→固态脱毒→酶解糖化→发酵)进行生物基产品的生产。

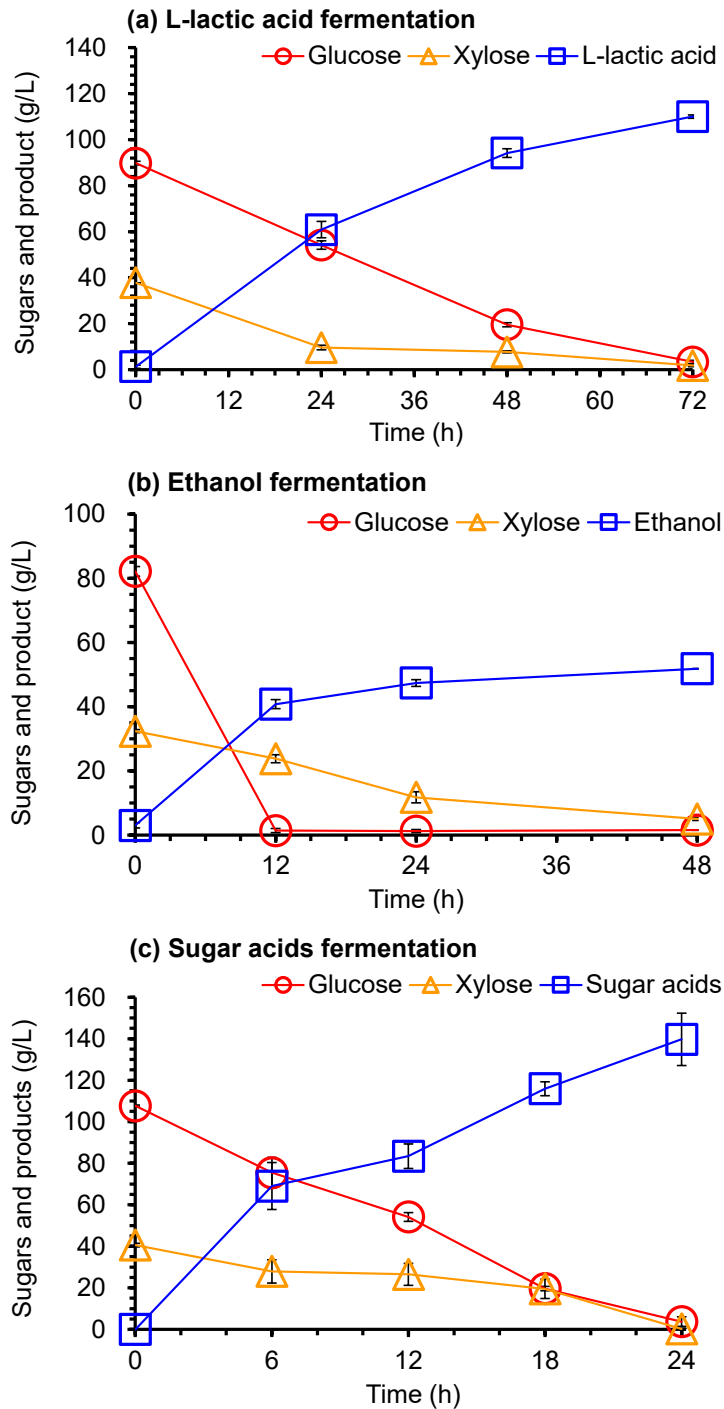


图 2.6 麦秆糖化液完成液态生物脱毒后的发酵性能评价

Fig. 2.6 Evaluation of the fermentation performance of wheat straw hydrolysate after liquid-phase biotodetoxification

注：(a) L-乳酸发酵性能评价；(b) 乙醇发酵性能评价；(c)糖酸发酵性能评价。L-乳酸发酵使用完成液态脱毒的 30% (w/w)麦秆糖化液（50 °C下糖化 12 h），达到脱毒终点时立刻停止通气、降低搅拌转速至 300 rpm，同时升温至 42 °C并接种 L-乳酸发酵菌种 *P. acidilactici* ZY271，发酵接种量为 10% (v/v)，发酵温度 42 °C，pH5.5，搅拌转速 300 rpm，发酵 72 h。乙醇发酵使用完成液态脱毒的 30% (w/w)麦秆糖化液（50 °C下糖化 12 h），达到脱毒终点时立刻停止通气、降低搅拌转速至 300 rpm，同时升温至 50 °C维持 12 h，随后降温至 30 °C并按照 20% (v/v)的接种量接种乙醇发酵菌 *S. cerevisiae* XH7，发酵温度 30 °C，pH5.5，搅拌转速 300 rpm，发酵 48 h。糖酸发酵使用完成液态脱毒的 30% (w/w)麦秆糖化液（50 °C下糖化 48 h），达到脱毒终点时立刻停止通气、降低搅拌转速至 300 rpm，同时升温至 50 °C维持 12 h，随后降温至 30 °C并按照 10% (v/v)的接种量接种糖酸发酵菌 *G. oxydans* RM7，发酵温度 30 °C，pH5.5，通气量 2.4 vvm，搅拌转速 500 rpm，发酵 24 h。

2.3.4 物料衡算与液态生物脱毒工艺评估

在新型生物炼制模式下，我们对涉及干酸预处理、酶解糖化、液态生物脱毒和发酵的整个干法生物炼制加工过程进行了详细的物料衡算，以显示整个生物炼制加工链条的总糖回收率和转化效率（图 2.7）。物料衡算基于 L-乳酸、乙醇和糖酸生产的实验结果，以一吨小麦秸秆原料为基础，其中含有 0.305 吨葡聚糖和 0.208 吨木聚糖。在干酸预处理步骤中，葡聚糖保存良好，而大部分木聚糖被水解，生成了 2.28 kg 糠醛、4.36 kg HMF 和 18 kg 乙酸。在当前的干酸预处理工段，没有任何废水流产生，所有抑制性化合物都积累在预处理的固体物料中。尽管酵母菌株对一种或几种低浓度抑制物相对耐受，但若处于高固含量预处理麦秆糖化液环境中，其细胞生长和代谢势必会受到高浓度抑制物的严重抑制^[158, 159]。因此，抑制物的完全去除是确保后续发酵菌株细胞正常生长和高发酵性能的先决条件和关键步骤。在酶解糖化步骤中，12 小时可产生 0.221 吨游离葡萄糖（图 2.7a,b），48 小时可产生 0.311 吨游离葡萄糖（图 2.7c）。随后在液态生物脱毒步骤对酶解糖化后所得的小麦秸秆糖化液浆进行抑制物的脱除。达到脱毒终点时 *P. variotii* FN89 脱除了体系中所有的糠醛和 HMF 以及~80%的乙酸，期间仅损失可发酵糖 1.0% (w/w)（图 2.7a,b）和 1.7% (w/w)（图 2.7c）。最后在发酵步骤中，最终分别产生了 0.530 吨乳酸钙（约含 0.377 吨乳酸）、0.178 吨乙醇、0.392 吨葡萄糖酸钠和 0.139 吨木糖酸钠。

表 2.1 总结了在新型生物炼制模式下使用液态生物脱毒的几种生物炼制过程的性能，并将其与常规生物炼制模式下使用固态生物脱毒的性能进行了比较。使用液态生物脱毒方法的最终目标产物浓度、生产速率和得率与使用固态生物脱毒方法的结果接近。与使用固态生物脱毒的过程相比，基于液态生物脱毒过程的总生物转化时间（脱毒时间+发酵时间）减少了约 30%。相应地，生产速率提高了 15%-40%，尽管由于在液态生物脱毒中接种了脱毒种子培养液，产物浓度与固态生物脱毒相比有所稀释。

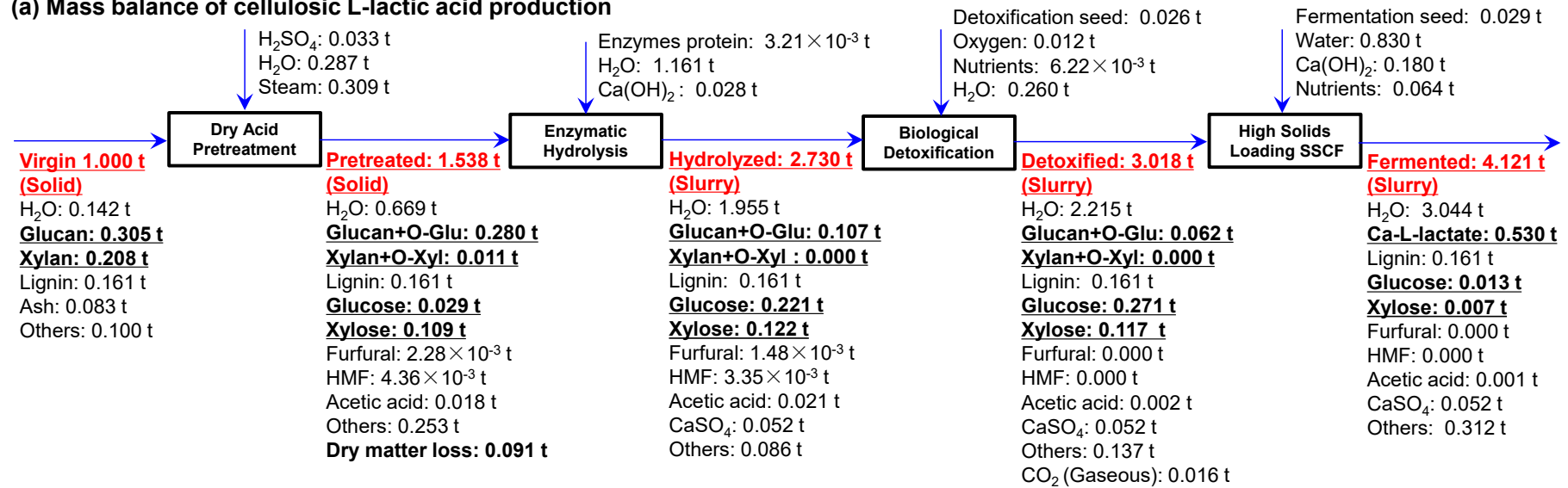
液态生物脱毒法相较于固态生物脱毒法具有多重优势，这归因于液态工艺的固有特性及其与现有生物炼制加工链的兼容性。首先，预处理后的固体木质纤维素原料经过纤维素酶糖化或水解成高固体含量液浆后，密度从~380 kg/m³增加到~1030 kg/m³，

设备空间利用效率显著上升，成本相应降低^[3, 64]。其次，液体环境中容易通过充分的混合来改进热量和质量传递，从而有利于细胞生长和抑制物代谢，并且与固态生物脱毒相比，极大降低了电力消耗并缩短了脱毒时间。另外，在中等通气速率（1.0 vvm）下，使用宛氏拟青霉 FN89 对典型的预处理后麦秆物料进行液态生物脱毒可在短短的 18.0 小时内完成（远低于固态生物脱毒的完成时间），且可发酵糖损失极低（约 1-2%）。最后，液态生物脱毒的另一个显著优势是它给予了一个可在线准确监测的脱毒终点标志——pH 峰值。这一优势极大克服了先前在确定生物脱毒终点和避免脱毒过程中高可发酵糖损失方面遇到的困难。

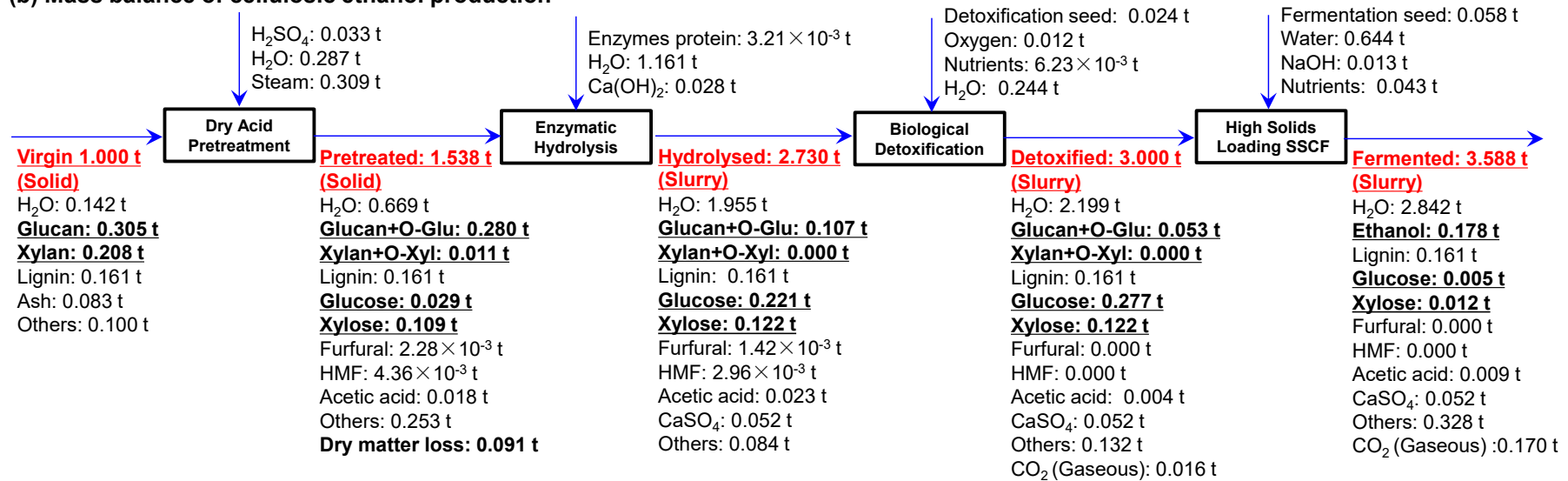
此外，固态生物脱毒后所得固体物料在出料和运输方面十分困难。与之不同的是，液态生物脱毒后所得的高固含量水解液浆的流动性良好（其表观粘度仅为 0.11–0.56 Pa·s），允许通过重力作用以及常规泵种在密闭的容器和管道中进行快速且有效的运输^[102]，故出料和运输十分方便。通过在封闭容器、管道和输送泵中进行操作，还可以有效防止脱毒后水解液浆发生染菌。

总之，本研究所提出的液态生物脱毒技术在设备成本、效率和可控性方面相较于固态生物脱毒技术而言具有显著优势，尤其是在干法生物炼制模式中。因此，可以预计在未来的干法生物炼制的实际工业应用过程中，液态生物脱毒法将取代固态生物脱毒法，成为生物脱毒操作方法的优先选择。

(a) Mass balance of cellulosic L-lactic acid production



(b) Mass balance of cellulosic ethanol production



(c) Mass balance of cellulosic sugar acids production

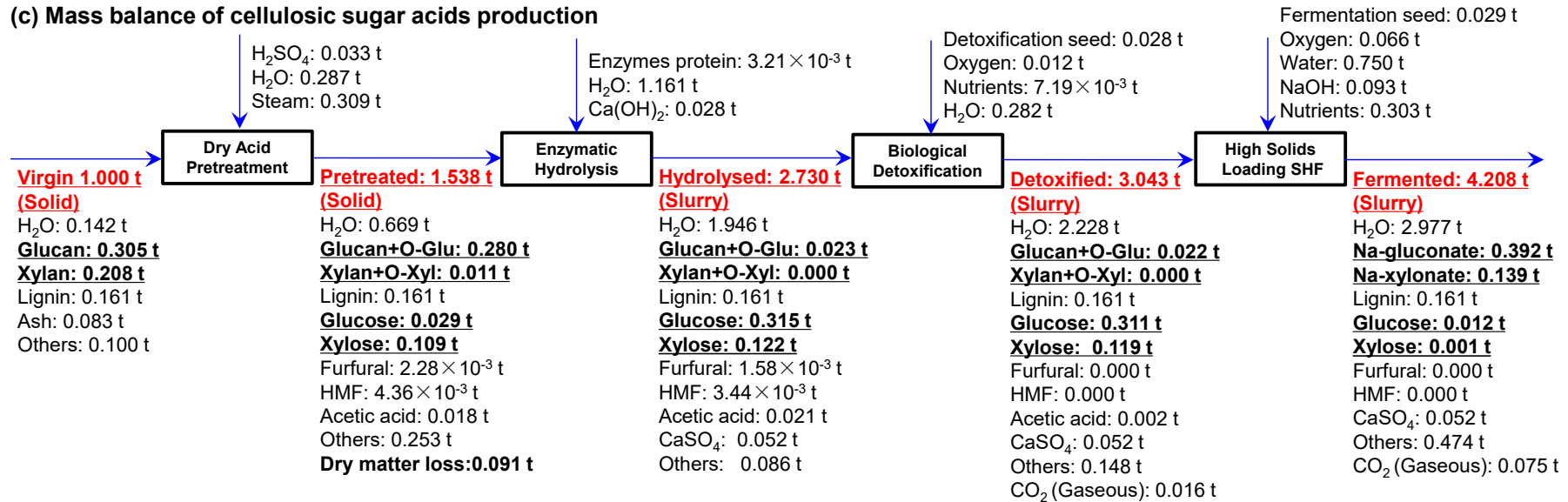


图 2.7 用于生产纤维素 L-乳酸(a)、纤维素生物乙醇(b)和纤维素糖酸(c)的整体生物炼制加工过程的物料衡算

Fig. 2.7 Mass balances of overall biorefining chain for production of cellulosic L-lactic acid (a), cellulosic bioethanol (b) and cellulosic sugar acids (c)

注：物料衡算均从 1.0 吨麦秆原料（基于湿重）开始，其含有 0.305 吨纤维素和 0.208 吨木聚糖，相当于纤维素含量 35.6%和木聚糖含量 24.3%（基于干重）。

表 2.1 涉及液态生物脱毒或固态生物脱毒的木质纤维素生物炼制的生产性能

Table 2.1 Production performances of lignocellulosic biorefinery involving liquid-state or solid-state biotransformation.

Biotransformation methods	Products & feedstocks	Initial solids ^a (%, w/w)	Detoxification + fermentation (h)	Titer (g/L)	Yield ^b (g/g)	Productivity ^c (g/L/h)	Sources
Liquid-state by <i>P. variotii</i> FN89	L-lactic acid using wheat straw	~25%	90 (18 + 72)	110.1	0.76	1.22	This study
Solid-state by <i>A. resinae</i> ZN1	L-lactic acid using wheat straw	~27%	132 (72 + 72)	129.4	0.77	0.98	[4]
Liquid-state by <i>P. variotii</i> FN89	Ethanol using wheat straw	~23%	66 (18 + 48)	51.9	0.29	0.79	This study
Solid-state by <i>P. variotii</i> FN89	Ethanol using corn stover	~27%	96 (48 + 48)	56.5	0.28	0.59	[77]
Liquid-state by <i>P. variotii</i> FN89	Sugar acids using wheat straw	~25%	42 (18 + 24)	139.7	0.76	3.33	This study
Solid-state by <i>A. resinae</i> ZN1	Sugar acids using corn stover	~27%	64 (32 + 32)	148.4	0.78	2.31	[87]

注：^a 由于接种了发酵种子液和/或生物脱毒种子液，原本 30%(w/w)的体系固含量会相应降低一部分。在采用液态生物脱毒的生物炼制模式中，两种种子液均加入；在采用固态生物脱毒的生物炼制模式中，仅添加发酵种子液；^b 得率是根据每克秸秆糖所能产生的乳酸、乙醇或糖酸的质量来计算的；^c 生产速率是根据脱毒和发酵（或 SSCF）期间平均每小时每升发酵液产生的乳酸、乙醇或糖酸的质量来计算的。

2.4 本章小结

本章对干法生物炼制过程中的高成本且难以准确控制脱毒终点的固态生物脱毒技术进行了技术升级。根据生物脱毒微生物的特殊代谢特征，建立了一种可在线识别脱毒终点的实用方法，实现了高糖浓度水解液快速且极低糖耗的液态生物脱毒。

(1) 首先，发现了预处理后木质纤维素水解液浆在脱毒菌宛氏拟青霉 FN89 参与的液态生物脱毒过程中的 pH 值会随着有机酸类抑制物的消耗和代谢产物糠酸及脂肪酸的生成而发生转折性变化的现象。

(2) 其次，通过使用在线监测 pH 值达到峰值作为明确、可检测的脱毒终点指示器，不仅实现了对高固体含量生物质水解液浆中抑制物（糠醛、HMF、乙酸及酚类）的快速和高效去除，而且最大限度地保留了其中的可发酵糖（糖损失低于 2%），从而将干法生物炼制加工链的干酸预处理→固态生物脱毒→高固含量酶解糖化与发酵，整合为一条新的生物炼制加工链，即干酸预处理→酶解糖化→液态生物脱毒→高固含量发酵。

(3) 最后，验证了该新型生物炼制加工链用于生产手性 L-乳酸、乙醇和糖酸等典型木质纤维素基产品的有效性，获得了高产物浓度、得率以及生物转化速率。与固态生物脱毒相比，液态生物脱毒具有反应器体积小、传质和传热效率高、操作简便、易于放大和自动化、终点明确、能耗降低、污染风险低以及物料输送方便等综合优势，为干法生物炼制技术的工业应用提供了一种更具经济性和可控性的抑制物脱毒解决方案。

第 3 章 干法生物炼制的快速流态化及连续化

3.1 引言

连续操作是高效工业过程的标准形式^[91-93]。运行连续生物炼制过程的先决条件是木质纤维素生物质以可输送的流体形式通过管道、泵、阀门和密闭容器进行物料流动，而不是以固体形式通过开放式输送带。生物炼制工艺链从预处理破坏坚固的木质纤维素结构开始，随后进行酶法糖化生产可发酵糖，脱毒去除预处理产生的抑制物，发酵（或同步糖化共发酵，SSCF）生产目标产品，然后纯化得到精制目标产品^[4, 76, 88]。当前生物炼制加工的趋势是从起始预处理到最终纯化都保持高固含量状态，以实现目标产品的高浓度、高生产率和高得率。高固含量预处理不仅能够避免废水的产生，以固体形式产出预处理物料，而且还能大幅减少能源需求、有毒物质排放和固液分离成本^[62, 89, 90]。然而，预处理后以固体形式存在的木质纤维素物料流也将对全连续生物转化操作的建立带来巨大挑战。

先前关于连续生物炼制过程的研究主要集中在酶解糖化^[94-96]、脱毒^[97, 98]或发酵^[99-101]的单个步骤。这些研究的主要缺点之一是体系固含量低，这不可避免地导致产物浓度和生产率低，并产生大量废水。为了在高固体含量条件下实现连续生物炼制过程，预处理的固体木质纤维素原料应从预处理反应器排出后便要尽快转化为流体形式。这种液体流体或液体浆料可以通过重力作用和机械泵在密闭管道或容器中进行输送，不仅有利于确保精确的定量流量控制，并且还将有利于在后续连续酶解糖化、脱毒、发酵和纯化操作过程中防止发生染菌。为了实现高固含量预处理条件下的木质纤维素原料的快速流态化和后续连续操作，需要解决的关键挑战至少应包括以下几点：(i) 如何将高温预处理固体物料（100-110 °C）快速流态化为均匀的流体浆料；(ii) 在连续生物脱毒过程中，如何在极低可发酵糖损失的前提下实现抑制物的完全去除；(iii) 如何在达到满意的产物浓度、得率和最低残糖水平的同时减少发酵罐的使用数量。

干法生物炼制过程从起始的干酸预处理步骤到后续的酶解糖化、生物脱毒和发酵步骤均具有高固体含量的特点，其生物转化效率和技术经济性能与以玉米为原料的干法加工技术相当^[76, 77]。本研究以干法生物炼制技术为技术平台，研究使用小麦秸秆为原料生产 L-乳酸的快速流态化和连续生物转化操作^[62, 80]。结果表明：干酸预处理后的高温麦秆固体颗粒物料可以在不添加任何酶的情况下转化为可泵送的流态化浆料；随后，利用该流态化浆料可通过相互匹配的连续糖化、连续脱毒和连续发酵过程实现高指标的 L-乳酸的连续生产。本研究为未来利用木质纤维素原料进行工业规模的 L-乳酸或其他生物基产品的连续生物炼制加工生产提供了一定的技术支撑。

3.2 材料与方法

3.2.1 原料

小麦秸秆#1 收获于 2022 年 8 月的山东济宁，经简单粉碎处理至颗粒长度 10 mm

左右装袋保存。按照美国国家可再生能源实验室 (NREL) 的两步酸解法^[139, 140], 小麦秸秆#1 (基于干重) 的组成包括纤维素 32.33% ± 0.13%, 木聚糖 21.25% ± 1.78%, 木质素 19.27% ± 4.85%, 灰分 10.63% ± 1.89%。

小麦秸秆#2 收获于 2022 年秋季的山西阳曲, 由凯赛生物技术有限公司在山西省综改区的工业示范工厂提供, 经过粉碎、除尘后至麦秆颗粒长度约为 10-30 mm, 其组成包括纤维素 35.42% ± 0.31%, 木聚糖 24.91% ± 0.34%, 木质素 19.20% ± 1.23%, 灰分 9.57% ± 1.74%。

3.2.2 酶和试剂

纤维素酶 Cellic CTec3 HS, 购自诺维信 (中国) 生物技术有限公司, 其蛋白浓度为 90.1 ± 4.4 mg/mL^[141]。

糖化酶 (葡萄糖淀粉酶) GA-L NEW 购自杰能科 (中国) 生物工程有限公司, 根据生产商的数据, 其酶活为 103,900 U/mL。该酶仅用于乳酸菌种子液的培养过程 (起到防止絮凝的作用)^[160]。

酵母粉和蛋白胨均购自 Oxoid 公司 (汉普郡, 英国)。一水葡萄糖等化学试剂均购自上海泰坦科技股份有限公司。

3.2.3 微生物与培养基

生物脱毒菌株为宛氏拟青霉 *P. variotii* FN89 (CGMCC 17665)^[77, 80]。将该菌在 PDA 平板上活化 2~3 天后, 用 0.05% Tween-80 溶液洗下其孢子, 将孢子洗脱液接入种子培养基中在 37 °C、300 rpm 下培养 24 h 即可作为脱毒种子液使用。*P. variotii* FN89 的种子培养基包括: 2 g/L KH₂PO₄、1 g/L CaCO₃、(NH₄)₂SO₄ 1 g/L、1 g/L 酵母粉、1 g/L MgSO₄·7H₂O、22 g/L 一水葡萄糖。

L-乳酸生产菌株采用乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZB220 (CGMCC M 2023151)^[161]。将-80 °C保藏的冻存菌液 (约 2 mL) 在 MRS 液体合成培养基中以 45 °C、150 rpm 的条件活化 6 h 后, 再以 10%(v/v)的接种量接种至新鲜的 MRS 合成培养基内继续在相同条件下培养 6 h, 即可获得 L-乳酸发酵的种子液。乳酸发酵种子培养基包括: 22 g/L 一水葡萄糖、10 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母提取物、5 g/L 乙酸钠、2 g/L 柠檬酸氢二铵和 2.6 g/L 磷酸氢二钾三水合物、0.58 g/L 硫酸镁七水合物、0.25 g/L 硫酸锰一水合物。种子培养过程中添加 1%(v/v)的糖化酶和 12 g/L 的碳酸钙。发酵营养盐包括: 蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 15 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L 和硫酸锰一水合物 0.25 g/L。

3.2.4 干酸预处理

采用小麦秸秆#1 为原料, 在实验室内的微型预处理反应器 (容积为 20 L) 内进行预处理, 所得预处理物料为预处理小麦秸秆#1 (PWS#1)。具体预处理条件为: 硫酸用量为 38 mg/g 干秸秆, 固液比 2:1(w/w), 实际维持温度为 175 ± 0.5 °C, 反应停留时间为 5 min^[81, 146], 使用螺带搅拌桨以 50 rpm 转速进行搅拌, 反应期间保持蒸汽压力为 1.0 MPa。两步酸解法 (TP-510-42618) 测定结果显示, 基于干重 (DM), PWS#1 的组成包括: 葡聚糖 30.07% ± 0.39%、木聚糖 1.39% ± 0.33%、葡单糖 29.20 ± 0.21 mg/g

DM、木单糖 129.10 ± 11.89 mg/g DM、乙酸 17.73 ± 2.80 mg/g DM、5-羟甲基糠醛 1.94 ± 1.28 mg/g DM、糠醛 1.40 ± 1.26 mg/g DM^[139]。

采用小麦秸秆#2 为原料，在凯赛生物技术有限公司位于山西综改区工厂的 10 m^3 工业规模预处理反应器内进行，所得预处理物料为预处理小麦秸秆#2 (PWS#2)。具体预处理条件为：硫酸用量为 40 mg/g 干秸秆，固液比 $2:1$ (w/w)，实际维持温度为 175 ± 1 °C，反应停留时间为 5 min，使用螺带搅拌桨以 10 rpm 转速进行搅拌，反应期间保持蒸汽压力为 1.0 MPa。工业反应器预处理所得的 PWS#2 的组成包括：葡聚糖 $32.42\% \pm 0.95\%$ 、木聚糖 $4.39\% \pm 0.33\%$ ，以及葡单糖 30.83 ± 0.57 mg/g DM、木单糖 136.70 ± 1.98 mg/g DM、葡寡糖 5.67 ± 0.68 mg/g DM、木寡糖 20.38 ± 0.58 mg/g DM、乙酸 30.46 ± 0.23 mg/g DM、HMF 3.62 ± 0.01 mg/g DM、糠醛 8.94 ± 0.06 mg/g DM^[139]。

3.2.5 预处理后麦秆物料的快速流态化

利用一套螺旋混合装置（昆山科信橡塑机械设备有限公司）对高温预处理物料进行快速流态化处理（包括降温、中和、混合等）。在该装置中，有三股物料的投入，一是降温所需的自来水（ ~ 25 °C）；二是中和物料所需的氢氧化钙液浆（ 20% (w/w)， ~ 25 °C）；三是来自预处理反应器的高温预处理麦秆物料（ ~ 100 °C）。将这三股物料同时连续地喂入螺杆混合机内，进行快速流态化，生成固含量约为 30% (w/w)、pH 值约为 5.1 的流态化小麦秸秆浆料。

3.2.6 流态化麦秆浆料的连续酶解糖化

在 5L 螺带式搅拌反应器中进行连续酶解糖化过程，具体通过每 8 小时从反应器排出糖化后的麦秆糖化液，并补入等质量的流态化麦秆浆料和纤维素酶来实现。连续酶解糖化体系的稀释度为 0.0375 h^{-1} ，固含量接近 30% (w/w)，温度为 50 °C，转速为 200 rpm，纤维素酶添加量为 4 mg 酶蛋白/g 干秸秆。糖化 8 h 后，开始进行第一次取补料操作，具体是通过真空泵抽取糖化体系总质量 30% 的糖化液（相当于平均每小时抽取糖化体系总质量的 3.75% ），随后立即向反应器内补加流态化麦秆液浆以及纤维素酶（取料总质量等于补料总质量）。后续每 8 h 重复该取补料操作，并留样分析。连续糖化期间无论采用的流态化麦秆浆料是来自实验室预处理反应器制备的预处理物料 (PWS#1) 还是工业预处理反应器制备的预处理物料 (PWS#2)，均分别保持相同的连续糖化取补料操作。需要说明的是，由于实验室条件有限和连续实验周期较长，无法连续制备新鲜的高温预处理物料作流态化处理并将其保持 63 °C 以作为连续糖化过程的原料，故实际上在连续糖化实验过程中，我们将每次（即每 8 h）所要补加的流态化麦秆浆料拆分为相应的预处理麦秆物料（已调节 pH ~ 5.5 ）和水，并且分别在烘箱和水浴摇床上短时预热至 63 °C 以上（考虑散热，预热至 65 °C 左右），二者快速混合之后再用于补料，以此来模拟流态化处理所得的温度接近 63 °C 的流态化麦秆浆料。

3.2.7 麦秆糖化液的连续液态生物脱毒

在 3L 直叶式搅拌反应器中对连续酶解糖化获得的麦秆糖化液进行连续生物脱毒处理。连续脱毒期间的体系温度为 37 °C，转速为 750 rpm，通气量为 1 vvm，按照

10%(w/w)的接种量接种脱毒菌 *P. variotii* FN89 的扩培种子液启动连续生物脱毒。种子液只在第一次添加, 后续连续脱毒过程不再添加种子液且脱毒全程无需添加任何营养盐。在连续脱毒过程中, 脱毒终点的判断是根据体系 pH 的变化确定的^[80]。基于 pH 计对体系 pH 值进行在线测定 (D09120016, 苏州汉星分析传感器有限公司)。当发现 pH 先快速上升随后缓慢上升并接近峰值时即意味着到达了脱毒终点, 此时体系中糠醛和 HMF 已基本脱除完全, 仅剩余 0~3 g/L 的乙酸, 即可开始连续取补操作。

对于采用 PWS#1 经流态化处理、连续酶解糖化后获得的 PWS#1 糖化液而言, 其连续脱毒操作为每 8 小时在每次生物脱毒终点排出相当于总体系质量 60% 的麦秆糖化液 (相当于每小时排放 7.5%, 或稀释率 0.075 h^{-1}), 随后补加等质量的新鲜 PWS#1 糖化液, 后续重复该操作。对于采用 PWS#2 经流态化处理、连续酶解糖化后获得的 PWS#2 糖化液而言, 其连续脱毒操作有所不同, 为每 8 小时在每次生物脱毒终点排出相当于总体系质量 30% 的麦秆糖化液 (相当于每小时排放 3.75%, 或稀释率 0.0375 h^{-1}), 随后连续补加等质量且温度接近 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的新鲜 PWS#2 糖化液, 后续重复该操作。

3.2.8 已脱毒麦秆糖化液的多级连续 L-乳酸发酵

将连续脱毒反应器连续产生的已脱毒麦秆糖化液用于多级连续 L-乳酸发酵。使用三个串联的 5 L 厌氧发酵罐, 发酵温度、pH 和转速分别为 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、5.5 和 180 rpm。为了快速实现连续的乳酸发酵操作, 先使得一个一级发酵罐和一个发酵补充罐同时运行起来 (二者发酵体积一致), 即按照 10%(w/w) 的接种量接种 *P. acidilactici* ZB220 种子液后启动乳酸发酵过程。发酵种子液只在刚开始时一次性加入, 后续不再补充种子液。一级发酵罐和补充罐运行 24 h 后开始取补料操作, 即通过真空泵抽取一级发酵罐内发酵液体系总质量的 30% 以及补充罐内发酵液体系总质量的 50% 并将这两部分发酵液共同加入二级发酵罐内。随后向一级发酵罐内补入相同质量的且温度为 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的已脱毒糖化液 (此时体系液位与取料前相近), 并添加一定量的发酵用营养盐以满足菌体的生长和乳酸生产的需求。不对补充罐进行任何补料操作。待二级发酵罐运行 8 h 后, 用真空泵抽出二级发酵罐内体系总质量 30% 的发酵液并转入三级发酵罐内, 同时将补充罐内剩余的发酵液全部转入三级发酵罐中并撤去补充罐。由于向三级发酵罐进行补料而导致二级发酵罐的发酵液亏损, 则由一级发酵罐的发酵液来进行连续补充, 具体为每 8 h 补入来自一级发酵罐的且相当于一级发酵体系总质量 30% 的发酵液。之后, 针对一级发酵罐因取料而亏损的部分进行补料操作 (取料质量等于补料质量), 补料来自于连续脱毒罐的已脱毒糖化液和按照补料体积所添加的一定量的发酵营养盐 (蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 15 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L、硫酸锰一水合物 0.25 g/L)。

一级发酵罐和二级发酵罐分别从发酵 24 h 和 32 h 开始进行连续取补料操作 (每 8 小时取出并补加体系总质量的 30%), 待三级发酵罐的发酵液液位与一级发酵罐的接近时再对三级发酵罐进行同样条件的连续操作, 从第三个反应器排出的发酵液作为最终发酵产物。对于来自 PWS#1 和 PWS#2 的已脱毒麦秆糖化液, 二者分别进行多级连续发酵过程时的稀释率均保持在 0.0375 h^{-1} (相当于单个反应器平均发酵时间 26.7 h,

三个串联反应器总平均发酵时间 80.0 h)。

3.2.9 分析方法

依据先前报道的检测方法^[4,76], 使用 HPLC 系统对葡萄糖、木糖、乙酸、糠醛、HMF 和乳酸进行测定。该系统配备 LC-20AD 色谱泵、Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱和示差折光检测器 RID-10A, 以 5 mM H₂SO₄ 溶液为流动相, 流速 0.6 mL/min, 柱温 65 °C^[4,76]。

麦秆水解液样品的表观粘度使用 Brookfield DV2TLVTJ0 粘度计 (Stoughton, 美国) 进行测量^[102], 样品体积 5 mL, 剪切速率 43.5 s⁻¹。连续糖化阶段水解液样品进行表观粘度测定时的设定温度为 50 °C, 连续脱毒时设为 37 °C, 连续发酵时设为 45 °C。

对于乳酸发酵样品中的 L-乳酸手性纯度, 使用 Megazyme D-/L-乳酸检测试剂盒 (Megazyme, 爱尔兰) 进行测定^[4]。

3.2.10 Aspen Plus 流程模拟

基于此前的 Aspen Plus 模型^[13,162], 我们建立了一个新的 Aspen Plus 模型用于计算工业预处理反应器 (10 m³ 规模) 中排出的固体预处理麦秆物料在与 Ca(OH)₂ 液浆和水混合进行快速流态化过程中的热交换。将混合前计算得到的温度数据与工业操作现场实验测量的数据进行了比较, 确保模拟结果的实际可行性和工程应用的可靠性。

模型从小麦秸秆原料的粉碎和除尘等前处理步骤 (WS-FEED) 开始。首先, 将硫酸溶液 (物流 H₂SO₄SOL, ~4% w/w) 和新鲜水喷洒到预处理反应器 (R201) 中的小麦秸秆原料 (P202) 上, 使固液比达到 2:1 (w/w)。其次, 将蒸汽流 (STEAM-IN, ~1.6 MPa) 喷射到预处理反应器中的小麦秸秆原料上。预处理过程中的主要反应包括木糖过度降解为糠醛、葡萄糖过度降解为 HMF, 以及半纤维素组分水解和脱乙酰生成乙酸。随后, 经过预处理后的麦秆物料通过两级闪蒸 (S201 和 S202) 释放并回收抑制物。最后, 使用螺旋混合器 (M205) 通过混合 Ca(OH)₂ 浆液和水对固体预处理麦秆物料进行快速流态化处理并在此过程中发生硫酸中和反应 (R202), 然后泵送至连续加工的下一步骤。需要说明的是, 模型并未考虑快速流态化过程中的散热情况。

3.3 结果与讨论

3.3.1 干酸预处理小麦秸秆的快速流态化

基于干法生物炼制技术, 我们设计了一个集成快速流态化和连续生物转化的生物炼制流程, 如图 3.1a 所示。流程简述如下: (i) 干酸预处理后的麦秆固体颗粒从预处理反应器沿密闭管道排出; (ii) 随后依靠重力进入螺旋混合器中进行快速流态化, 即按照一定比例与氢氧化钙液浆和水进行混合、降温以及中和, 最终形成具有一定流动性的液浆物料; (iii) 流态化麦秆液浆通过离心泵或其他适用于高粘度液体浆料输送的泵沿密闭管道输送至糖化反应器, 并在纤维素酶的作用下进行连续酶解糖化; (iv) 麦秆糖化液浆通过离心泵或其他泵种沿密闭管道输送至连续脱毒反应器, 在脱毒菌 *P. variotii* FN89 的作用下对体系中的抑制物进行连续的生物降解; (v) 去除抑制物后的麦

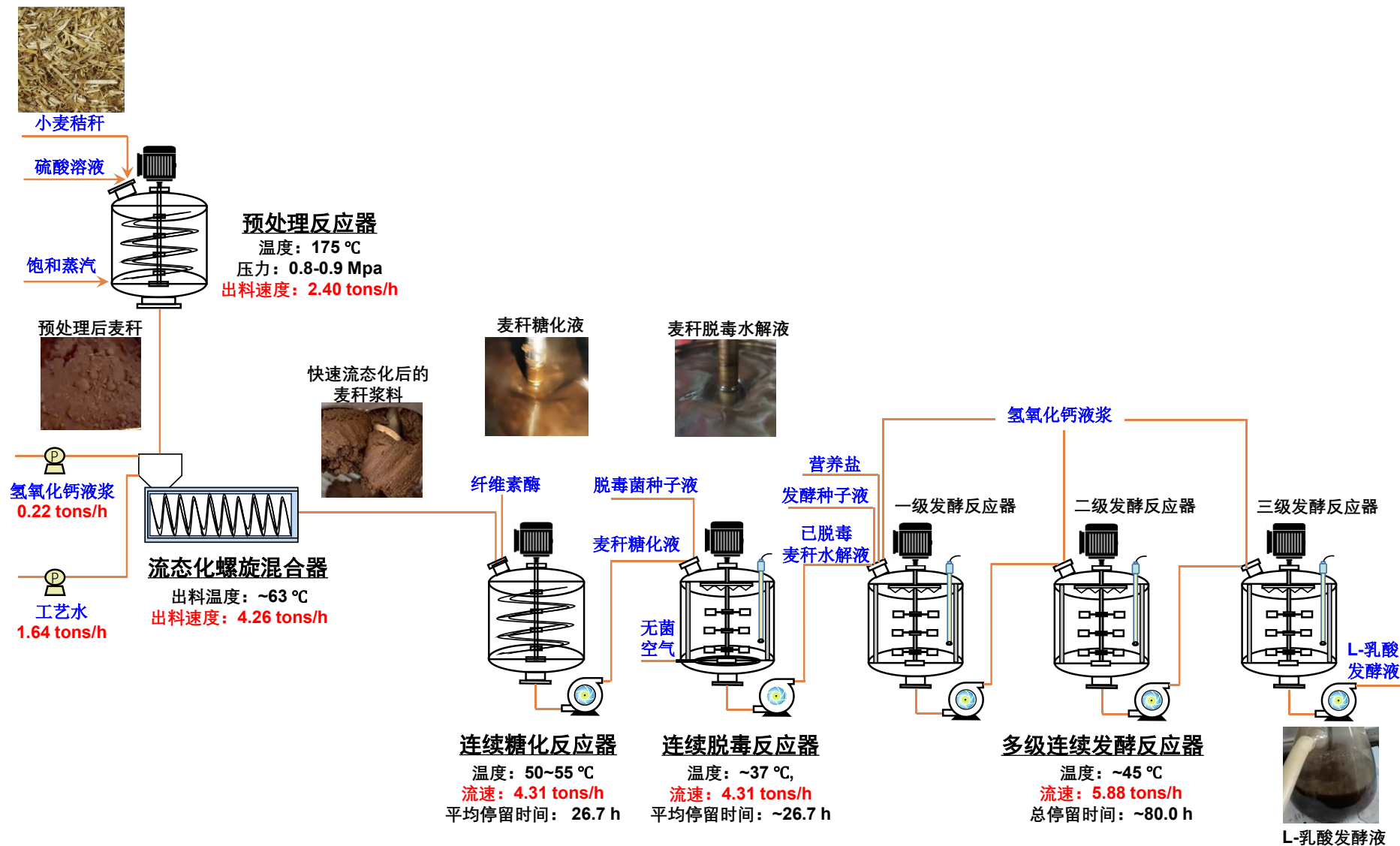
秆糖化液浆通过离心泵或其他泵种沿密闭管道输送至连续发酵反应器，在乳酸菌 *P. acidilactici* ZB220 的作用下利用体系中的可发酵糖进行多级连续 L-乳酸发酵生产。

由于工业现场生产预处理麦秆物料的散热控制不精确，我们通过 Aspen Plus 模型来模拟计算快速流态化后预处理麦秆浆料的温度，如图 3.1b 所示。通过模拟计算，从预处理反应器（R201）排出的固体预处理麦秆物料温度为 102 °C，这与工业预处理现场实验的温度数据（98 ± 3 °C）大致吻合，从而证实了模拟的大致正确。最终的模拟计算结果显示：干酸预处理后所得的高温麦秆物料在与 Ca(OH)₂ 浆液和水进行混合（M204 和 M205）、中和（R202）和螺旋输送（P203 和 P204）后所得的流态化麦秆液浆的温度约为 63 °C（即进入后续连续糖化反应器的浆料温度）。

快速流态化是指通过一个特殊设计的螺旋混合器（昆山科信橡塑机械设备有限公司）将干酸预处理后的高温麦秆物料（100-130 °C）转化为固含量约为 30% (w/w) 的可输送浆料的过程。图 3.2a 显示了预处理麦秆固体物料在快速流态化前后从固体颗粒形态转变为粘稠浆料形态的形态变化。图 3.2b 展示的是快速流态化期间物料的混合情况评价，可以看出：在短时间内（约 3 分钟）便可得到充分混合且均一性良好的小麦秸秆浆料。流态化麦秆浆料的平均固体含量~30% (w/w)，平均 pH 值~5.1，与通过手动混合彻底均质化的麦秆浆料对照样品的固体含量和 pH 非常接近。图 3.2c 显示，流态化前后预处理麦秆物料的总糖和抑制物含量基本保持不变，表明没有糖和抑制物释放到环境中。此外，流态化混合后浆料的酶水解得率也与手动彻底混合的均质浆料样品基本一致。这些结果一致表明：经过快速流态化处理后，小麦秸秆浆料的形态和物理化学性质处于适合用于后续连续糖化的状态，此时物料由固体颗粒状转化为可输送的流态液浆状，固体含量从~70% (w/w) 变为~30% (w/w)，温度从~110 °C 变为~63 °C，pH 从~2.4 变为~5.1。

通常而言，在没有纤维素酶参与的情况下，将预处理的木质纤维素原料从难以流动的固体颗粒形式流态化为可输送的流态液浆形式具有相当的难度。目前市售酸性纤维素酶的耐热上限基本不超过 55 °C，而新鲜排出的预处理木质纤维素物料的出口温度远高于此上限（图 3.1b, ~100 °C）。因此，目前通过纤维素酶辅助来实现流态化不仅在经济上无效，而且在技术上也无效。在本研究中，实现干酸预处理后高温麦秆物料的成功快速流态化的有利因素可能有以下几个：(i) 预处理固体物料中含有大量的糖和抑制物，包括单糖（木糖，13%-14%；葡萄糖，2%-3%）、寡糖（1%-3%）、糠醛（0.5%-1%）、HMF（0.1%-0.5%）、乙酸（1%-3%）等。由于干酸预处理具备零废水产生的独特性能，故这些糖和抑制物没有被洗脱到液体流中^[65, 76, 77, 81]，而是充当了不溶性固体和水之间的结合剂，从而有利于生成可输送的粘稠液浆；(ii) 新鲜排出的预处理固体物料仍保持高温（高于 100 °C），当加水调节固体含量时（从~70% 到 ~30%），半纤维素和纤维素在预处理物料中剩余的硫酸催化剂的催化下进一步水解成寡糖或单糖；(iii) 螺旋混合促进了不溶性固体（纤维素、木质素等）与可溶性糖、硫酸催化剂、碱性中和剂的有效机械均质化，形成了相对均匀的、具有可泵送流体特性的粘稠浆料。

(a)



(b)

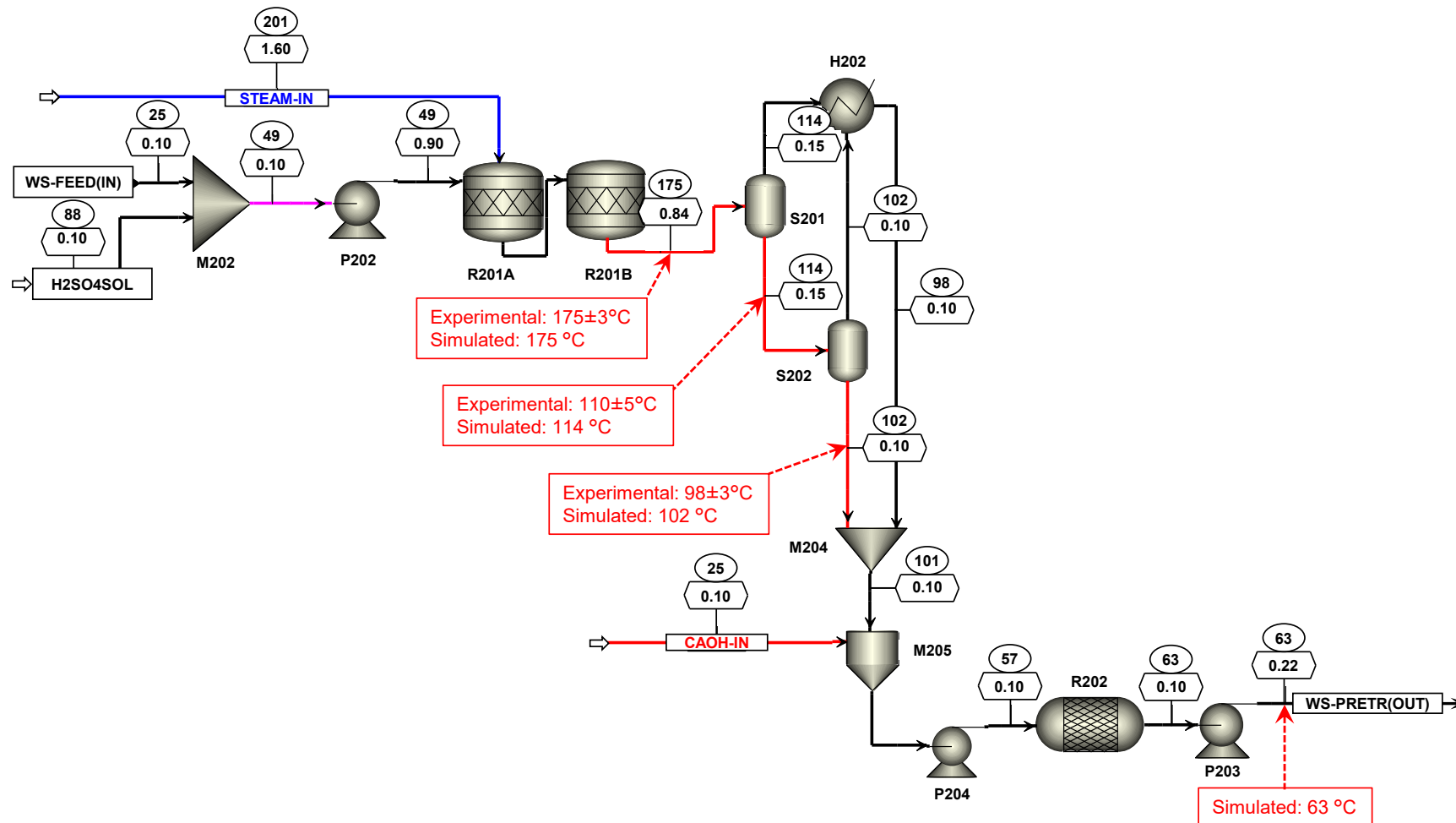


图 3.1 以麦秆为原料的干法生物炼制生产 L-乳酸的连续流态化生物转化流程示意图

Fig. 3.1 Diagram of continuous fluidization and bioconversion flowsheet of dry biorefining process for production of L-lactic acid from wheat straw feedstock
 注：(a)生产 L-乳酸的干法生物炼制工艺连续生物转化流程图；(b)用于模拟计算干酸预处理麦秆固体物料流态化为麦秸液浆过程温度变化的 Aspen Plus 流程模拟工艺流程图。实验条件见材料和方法部分。预处理温度基于 10 m³ 工业反应器的实测温度数据，连续糖化温度变化基于 5 L 的实验室小型反应器。

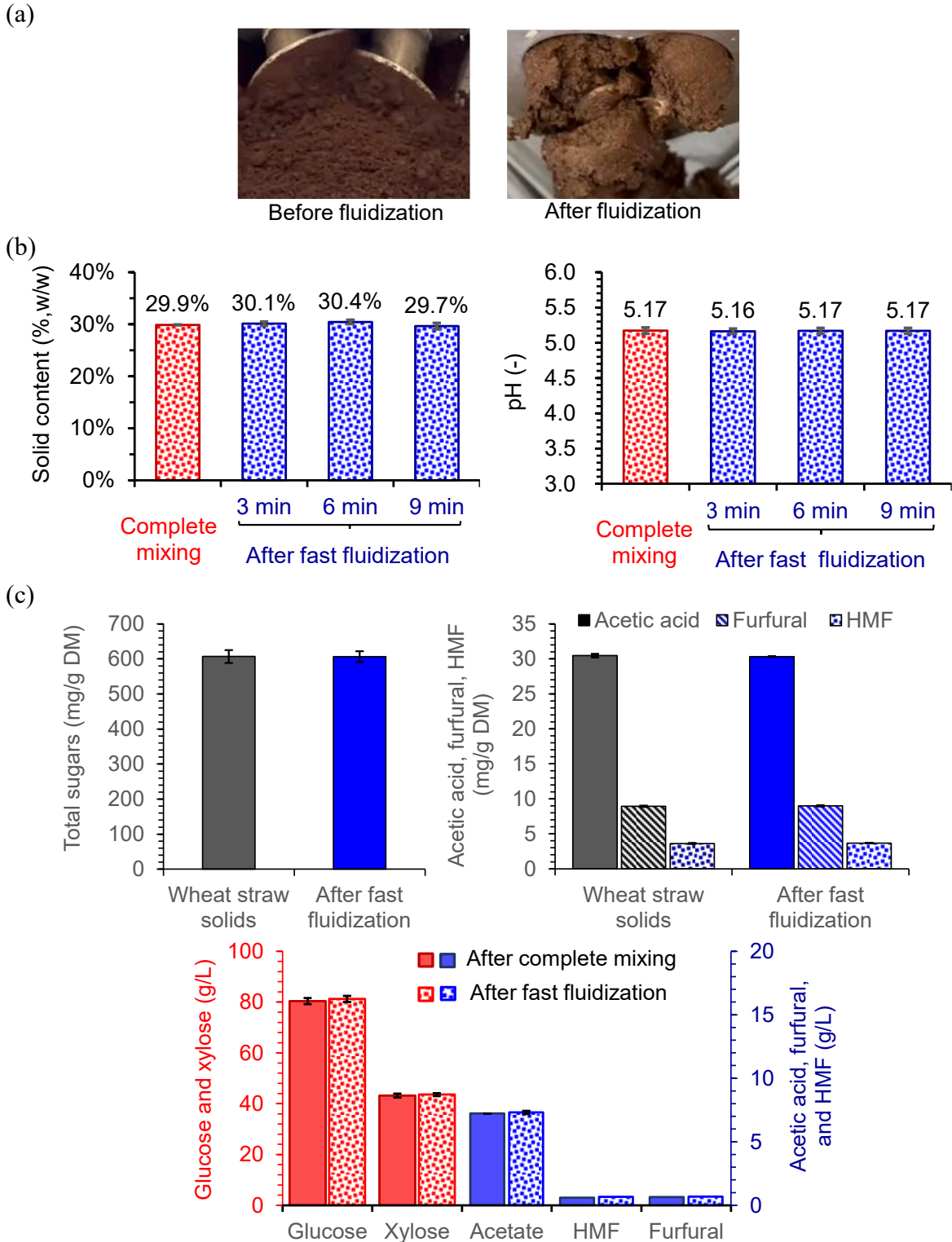


图 3.2 干酸预处理后的麦秆固体物料在快速流态化前后的形态及性质变化

Fig. 3.2 Morphology and property changes of dry acid pretreated wheat straw solids before and after fast fluidization

注：(a)形态变化；(b)螺杆混合效率评价；(c)理化性质变化。以工业预处理反应器所制备的干酸预处理麦秆(PWS #2)为原料进行流态化实验。在 9 min 内将 PWS#2 高温固体物料 (~100 °C, pH ~2.4)、氢氧化钙浆 (20%, w/w) 和自来水 (~25 °C) 同时连续加入螺旋混合器中进行流态化实验。每 3 分钟采集一次螺杆混合后的样品，每次 1 kg，然后进行多点 (至少 10 点) 取样分析，包括固含量和

pH 值的测定。固体含量的测定采用差重法(105 °C过夜烘干)。完全混合是指手动彻底混合 PWS#2、水和氢氧化钙浆(总重量为 500 g)所得的均质麦秆液浆。总糖包括单糖(葡萄糖和木糖)及其低聚物。在固体含量为 20% (w/w)、温度为 50 °C、转速为 200 rpm、纤维素酶用量为 4 mg 酶蛋白/g DM 的条件下,对两种混合方式(完全混合后和快速流态化后)所得的浆料分别进行酶解评价。

3.3.2 流态化麦秆浆料的连续酶解糖化

为了检验高温预处理物料经流态化处理后所得的麦秆浆料(~63 °C)能否用于后续连续生物转化过程,首先对其连续糖化效果进行实验探究。我们在 5L 螺带式搅拌反应器上进行了连续糖化实验,连续糖化体系的稀释率为 0.0375 h⁻¹,固含量接近 30% (w/w),温度为 50 °C,转速为 200 rpm,纤维素酶添加量为 4 mg 酶蛋白/g 干秸秆。

图 3.3a 显示了流态化麦秆浆料(~63 °C)的连续投入对糖化体系温度变化的热冲击情况。结果表明:每次补料后,体系温度虽然迅速上升 3 °C 左右(~50 °C → ~53 °C),但仍在纤维素酶最适温度范围之内(50~55 °C),且短时间内可以重新回到纤维素酶的最适温度(~50 °C)。因此,可以初步判断高温预处理物料经流态化处理后所得的~63 °C 的麦秆浆料在连续糖化期间并不会在温度方面对纤维素酶活性造成负面影响。

图 3.3b 显示了使用流态化处理后的工业反应器预处理麦秆(PWS#2)在稀释率 0.0375 h⁻¹(相当于平均糖化时间~26.7 h)条件下的连续糖化情况。连续操作在~24 h 达到稳态,所得麦秆糖化液含有~96 g/L 葡萄糖、~61 g/L 木糖、~12 g/L 乙酸、~0.9 g/L 糠醛和~0.9 g/L HMF,表观粘度约为 0.2 Pa·s。图 3.3c 显示了使用流态化处理后的实验室小型反应器预处理麦秆物料(PWS#1)在相同稀释率 0.0375 h⁻¹下的连续糖化情况。连续操作在~36 h 后达到稳态,所得麦秆糖化液含有~85 g/L 葡萄糖、~46 g/L 木糖、~8 g/L 乙酸、~0.6 g/L 糠醛和~0.7 g/L HMF,表观粘度约为 0.3 Pa·s。对于使用 PWS#2 的连续糖化过程,所得的糖化液具有相对较高的单糖释放浓度和相对较低的表观粘度。这表明即使在相同操作参数下,工业反应器中的预处理强度(或对木质纤维素原料的破坏程度)也要高于实验室反应器,这有利于实现更高的纤维素酶可及性。预处理强度较高的主要原因可能来自大型工业反应器(10 m³)比小型实验室反应器(20 L)散热减少,从而导致反应器内部平均温度分布更高。连续酶解糖化后所得的麦秆糖化液的粘度为 0.2~0.3 Pa·s,这使得其能够通过标准离心泵(最高可输送的流体粘度~0.5 Pa·s)进行密闭管道输送,并确保连续将糖化液转移至后续生物脱毒阶段。连续糖化稳态期间,体系的总葡萄糖和木糖浓度达到~152 g/L(图 3.3b)或~131 g/L(图 3.3c),这与完全去除抑制物的分批糖化结果(总糖浓度~135 g/L)相当^[147, 163, 164],表明在高固含量连续糖化过程中,高抑制物水平对纤维素酶活性和糖化效率的影响可忽略不计。

综上,高温预处理物料经流态化处理后虽然其温度(~63 °C)高于纤维素酶适宜糖化温度(50~55 °C),但补料引起的体系温度的变化不会对连续糖化过程带来不利影响,可以在 24~36 h 内快速实现连续糖化过程的整体稳态,并且低表观粘度的糖化体系(0.2~0.3 Pa·s)完全可以使用离心泵(可输送粘度小于 0.5 Pa·s 的流体)等泵种进行密闭式的管泵式输送,从而有利于实现糖化液向连续脱毒阶段的快速连续化输送。

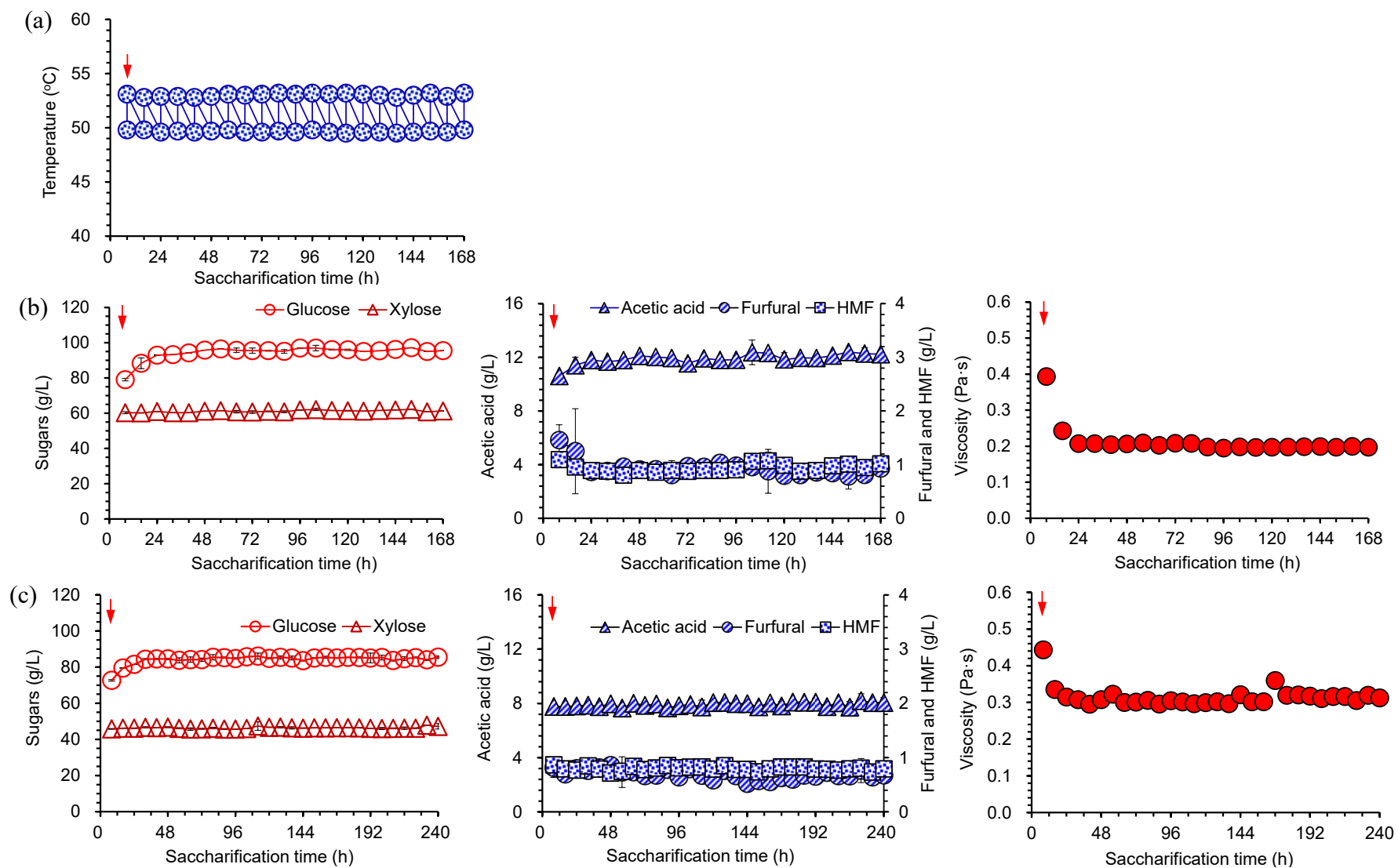


图 3.3 流态化麦秆浆料的连续糖化

Fig. 3.3 Continuous saccharification of the fluidized wheat straw slurry

注：(a)连续添加热的流态化麦秆浆料时糖化体系的温度变化；(b)工业预处理物料流态化后的麦秆液浆进行连续糖化期间的糖、抑制物和表观粘度随时间的变化；(c)实验室小型反应器预处理物料流态化后的麦秆液浆进行连续糖化期间的糖、抑制物和表观粘度随时间的变化。通过快速流态化得到的麦秸浆料如图 3.2 所示。在稀释率 0.0375 h^{-1} 、30% (w/w) 固体含量、 $50 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、搅拌速度 200 rpm、纤维素酶添加量为 4 mg 酶蛋白/g DM 的条件下进行连续糖化操作。反应器配有 pH 值和温度控制装置，以及螺带式搅拌桨。红色箭头 (↓) 表示连续糖化操作的起始点，即从此时开始排出糖化后的麦秸糖化液（出料）并加入流态化麦秆液浆（补料）。后续每 8 h 重复取补料操作，每次加入和排出糖化液的质量分别占体系总质量的 30% (w/w)。

3.3.3 麦秆糖化液的连续液态生物脱毒

由于干酸预处理过程并未产生任何游离水相，所有抑制物均集中在预处理固体物料中，故预处理物料流态化、连续糖化后得到的糖化液浆中积累了大量乙酸、糠醛和 HMF 等严重影响发酵微生物发酵的抑制物，必须通过脱毒对上述抑制物进行脱除。本文使用 *P. variotii* FN89^[64, 77]对连续糖化后所获得的糖化液进行了连续液态生物脱毒，以对其中抑制物进行快速和完全的生物降解。在衡量所用连续脱毒方法的可行性时着重检验以下两点：一是连续生物脱毒能否保证抑制物基本脱除完全并尽快进行稳定状态；二是能否可以准确判断脱毒终点避免过度脱毒所造成的非生产性糖耗。

图 3.4 展示了在 3 L 生物脱毒反应器中对来自连续糖化阶段的麦秆糖化液浆进行连续生物脱毒的结果。连续生物脱毒仅在脱毒起始阶段接种 10%(v/v)的 *P. variotii* FN89 孢子培养液，维持脱毒温度在 37 °C 并通过调整通气量和直叶桨搅拌转速使 k_{La} 高于 10 h^{-1} 。如图 3.4a 所示，使用来自 PWS#2 的麦秆糖化液（抑制物浓度相对较高）进行连续脱毒过程的稀释度为 0.0375 h^{-1} （相当于平均脱毒时间~26.7 h），通过每 8 h 排出体系总质量 30%的总脱毒麦秆糖化液并重新补充新鲜的等质量的~37 °C 糖化液来实现。采用 PWS#2 糖化液时，初始脱毒体系中含有 10.29 g/L 乙酸、1.11 g/L 糠醛和 0.92 g/L 羟甲基糠醛。通过监测体系 pH 峰值来确定脱毒终点^[80, 165]，pH 在脱毒 24 h 到达峰值（pH 4.44 → pH 6.88），伴随糠醛和羟甲基糠醛的脱除完全以及残留 3.82 g/L 的乙酸。此时将到达脱毒终点的糖化液取出（用于后续连续发酵过程），并立刻向罐内补加相同质量 PWS#2 糖化液，利用第一次脱毒终点体系中剩余的脱毒糖化液作为脱毒种子液进行第二次生物脱毒，经过 8h 体系 pH 再次到达峰值（即再次到达脱毒终点），此时仍检测不到糠醛和羟甲基糠醛，仅检测到 3.39 g/L 的乙酸。此后重复上述脱毒取补料操作，共维持 168 h 的连续脱毒时间。

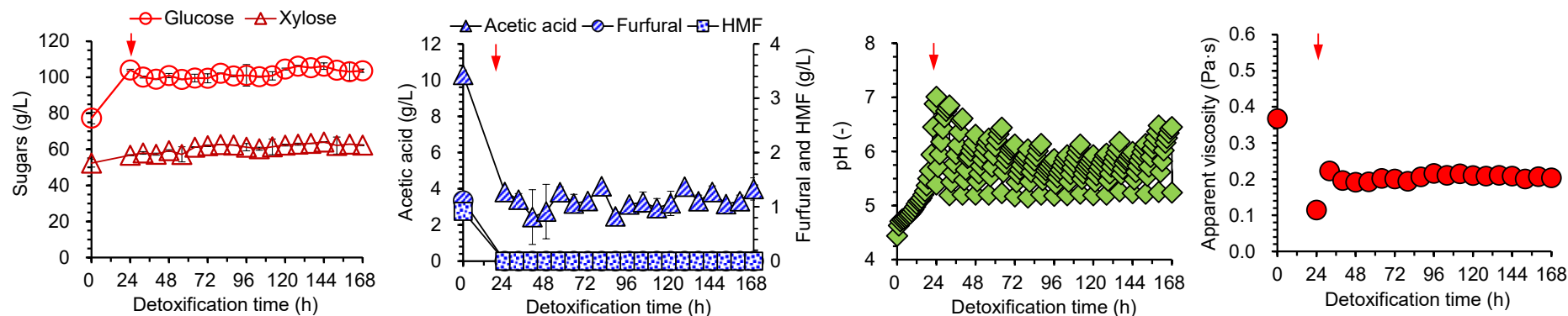
如图 3.4b 所示，使用来自 PWS#1 的麦秆糖化液（抑制物浓度相对较低）进行连续脱毒过程的稀释度为 0.075 h^{-1} （相当于平均脱毒时间~13.3 h），通过每 8 h 排出体系总质量 60%的总脱毒麦秆糖化液并重新补充新鲜的等质量的~37 °C 糖化液来实现。采用 PWS#1 糖化液时，初始脱毒体系中含有 6.65 g/L 乙酸、0.54 g/L 糠醛和 0.69 g/L 羟甲基糠醛。同样地，通过监测体系 pH 峰值来确定脱毒终点，pH 在脱毒 15 h 到达峰值（pH 4.71 → pH 6.51），伴随糠醛和羟甲基糠醛的脱除完全以及残留 0.68 g/L 的乙酸。此时将到达脱毒终点的糖化液取出（用于后续连续发酵过程），并立刻补加相同质量 PWS#2 糖化液，利用第一次脱毒终点体系中剩余的脱毒糖化液作为脱毒种子液进行第二次生物脱毒，经过 8h 体系 pH 再次到达峰值（即再次到达脱毒终点），此时仍检测不到糠醛和羟甲基糠醛，仅检测到 0.41 g/L 的乙酸。此后重复上述脱毒取补料操作，共维持 183 h 的连续脱毒时间。

此外，我们发现完成连续脱毒之后麦秆糖化液中的总糖（尤其是葡萄糖）浓度相对连续糖化结束而言有所提高。这主要是因为本研究的连续糖化过程实际上是不充分

的酶解糖化过程，不能将全部的纤维素组分彻底水解，故纤维素酶在相对低温的连续生物脱毒阶段仍可发挥持续得酶解作用。另一方面，与实验室小型预处理反应器预处理麦秆（PWS#1）相比，使用工业反应器预处理麦秆（PWS#2）得到的脱毒后糖化液表现出相对较低的表观粘度，故更容易输送至后续连续发酵过程。

相对而言，PWS#2 糖化液比 PWS#1 糖化液含有更高的抑制物浓度（尤其是乙酸，高达 11~13 g/L），故如果要像 PWS#1 糖化液的脱毒过程那样将前者的乙酸去除到极低水平（<1 g/L），势必需要更多的脱毒时间。实际上，为了确保 PWS#2 糖化液连续生物脱毒期间的连续操作间隔均为 8 小时，每次排出的脱毒后糖化液中确实残留了 2-4 g/L 的乙酸。不过，该浓度水平下的乙酸不再被视为对大多数发酵菌株细胞生长和代谢的主要抑制物。值得注意的是，根据之前报道的 pH 检测方法，在连续生物脱毒终点产生的糖损失基本上可以忽略不计（<总糖的 2%）^[80]，这与使用宛氏拟青霉 FN89 的分批液态生物脱毒结果相似^[80, 142]。

(a) Industrial reactor pretreated wheat straw hydrolysate



(b) Bench reactor pretreated wheat straw hydrolysate

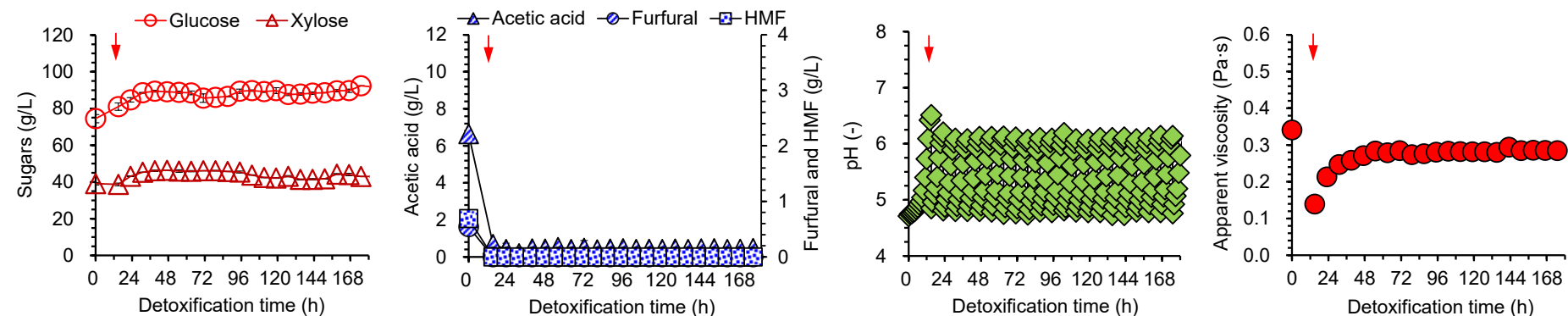


图 3.4 麦秆糖化液的连续生物脱毒

Fig. 3.4 Continuous biodegradation of the saccharified wheat straw hydrolysate

注：(a)工业反应器预处理麦秆（PWS#2）糖化液在连续生物脱毒期间的糖、抑制物、pH 值和表观粘度随时间的变化。稀释率 0.0375 h^{-1} ，每 8 小时取补脱毒体系总质量的 30% (w/w)；(b)实验小型反应器预处理麦秆（PWS#1）糖化液在连续生物脱毒期间的糖、抑制物、pH 值和表观粘度随时间的变化。稀释率 0.075 h^{-1} ，每 8 小时取补脱毒体系总质量的 60% (w/w)。红色箭头 (\downarrow) 表示通过糖化水解液进料和脱毒水解液出料的连续生物脱毒过程的起始时间节点。在一个 3L 的生物反应器中，采用 2 个六直叶搅拌桨和 1 个消泡桨，在固体含量 $\sim 30\%$ (w/w)、 37°C 、通气速率 1.0 vvm 、搅拌速度 750 rpm 和脱毒种子液接种量 10% (v/v) 的条件下进行生物脱毒操作。

3.3.4 脱毒后麦秆水解液的多级连续 L-乳酸发酵

针对预处理物料在流态化处理、连续糖化、连续脱毒后产生的已脱毒麦秆水解液，以 L-乳酸生产为案例对其连续发酵性能进行了评估。在评价连续乳酸发酵的可行性时着重检验以下两点：①连续乳酸发酵能否很快实现过程的稳态；②能否实现用最小的发酵罐级数去获得高发酵指标、高发酵速率（或得率）以及低残糖水平的最终乳酸发酵产品。

多级连续乳酸发酵实验在带有螺带搅拌桨的 5L 发酵罐中进行，采用三个发酵罐串联厌氧发酵的方式进行，乳酸菌种子液仅在发酵起始时添加，发酵温度均控制在 45 °C，仅向第一个发酵罐接种乳酸片球菌 ZB220 种子液。所有三个发酵罐的稀释率均调节至 0.0375 h^{-1} ，通过每 8 小时从第一个发酵罐排放 30% 的总发酵液至下一个发酵罐，直至最后一个发酵罐，并重新补充已脱毒的麦秆水解液至第一个发酵罐中。关于等效平均发酵时间，对于三个发酵罐中的每一个约为 26.7 小时，三个发酵罐的总发酵时间约为 80.0 小时。

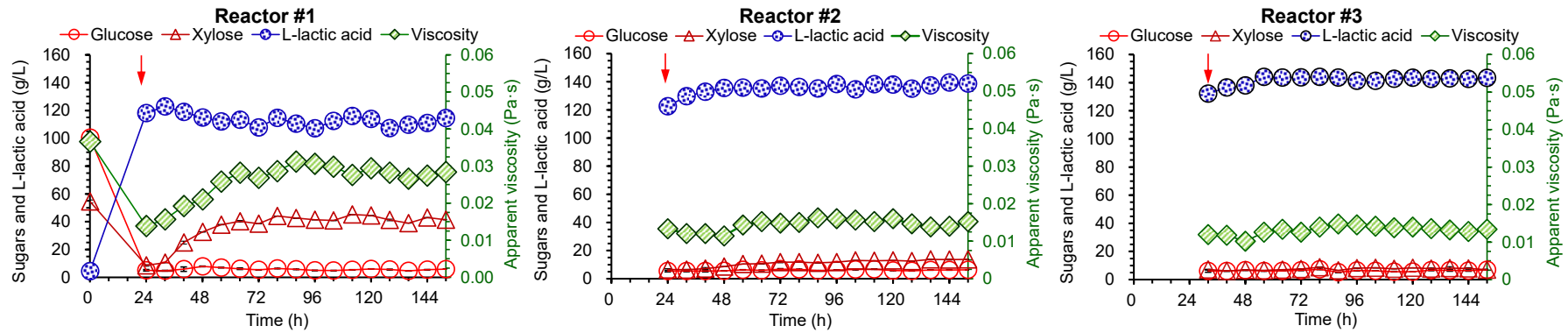
图 3.5 展示的是两种预处理物料（PWS#1 和 PWS#2）分别在流态化处理、连续糖化、连续脱毒后进行三级连续乳酸发酵的结果。图 3.5a 显示的是采用 PWS#2 的连续乳酸发酵结果。一级发酵 64 h 后达到稳态，L-乳酸浓度稳定至 111 g/L 左右，残留的葡萄糖和木糖浓度分别稳定至 6 g/L 和 42 g/L 左右，粘度则稳定至 0.029 Pa·s 左右；二级发酵则在发酵 56 h 后达到稳态，L-乳酸浓度稳定至 137 g/L 左右，残留的葡萄糖和木糖浓度分别稳定至 6 g/L 和 12 g/L 左右，粘度则稳定至 0.015 Pa·s 左右；三级发酵在 56 h 后进入稳态，L-乳酸浓度稳定至 143 g/L 左右，残留的葡萄糖和木糖浓度分别稳定至 6 g/L 和 7.7 g/L 左右，粘度则稳定至 0.014 Pa·s 左右。此时整体 L-乳酸发酵速率为 1.79 g/L/h，最终连续发酵的关键生物转化性能指标（浓度 143.0 g/L，速率 1.79 g/L/h，得率 78.8%）与 L-乳酸分批发酵（浓度 130.8 g/L，速率 1.82 g/L/h，得率 67.7%）相当^[143]。最终发酵罐中 L-乳酸的手性纯度测定约为 99.3%^[4]。图 3.5b 展示的是采用 PWS#1 的连续乳酸发酵结果。一级和二级 L-乳酸发酵在发酵 112 h（第 12 次取补）之后达发酵稳态，三级乳酸发酵在发酵 104 h（第 10 次取补）之后到达发酵稳态。一级发酵稳态期间，L-乳酸浓度为 118 g/L 左右，残留的葡萄糖和木糖浓度分别在 4 g/L 和 14 g/L 左右，粘度在 0.15 Pa·s 左右；二级发酵稳态期间，L-乳酸浓度为 125 g/L 左右，残留的葡萄糖和木糖浓度分别在 4 g/L 和 8 g/L 左右，粘度在 0.13 Pa·s 左右；三级乳酸发酵稳态期间，残留的葡萄糖和木糖浓度分别在 4 g/L 和 6 g/L 左右，粘度在 0.11 Pa·s 左右，整体 L-乳酸生产率为 1.61 g/L/h，得率为 0.800 g L-乳酸/g 糖。最终发酵罐中 L-乳酸的手性纯度测定约为 99.5%^[4]。

以上结果表明：①无论是基于工业预处理物料还是实验室预处理物料，一级连续乳酸发酵期间在乳酸浓度、残糖水平、表观粘度等方面均产生了明显且长时间的波动；②至少进行二级连续乳酸才能减少这种剧烈波动的产生并且使得发酵体系的稳态在短

时间内实现成为可能；③基于工业预处理物料（PWS#2）进行二级和三级乳酸连续发酵，均相对容易在短时间内（仅需要发酵 56 h）实现在乳酸指标、残糖水平和表观粘度等参数方面较为稳定的连续乳酸发酵体系稳态，而基于实验室预处理物料（PWS#1）进行二级和三级乳酸连续发酵，至少需要 104-112 h 才能实现相似的稳态表现；④基于高预处理强度物料进行连续乳酸发酵，发酵液表观粘度相对更低（0.01-0.03 Pa·s vs 0.11-0.15 Pa·s），因而更有利于在乳酸多级发酵的管线中进行快速输送。

综上所述，以 L-乳酸生产为例，高温预处理物料在流态化处理、连续糖化、连续脱毒后完全能够用于连续乳酸发酵过程并且仅发酵 56 h 便能快速实现发酵体系的稳态。另外，本研究中基于工业预处理物料的多级连续乳酸发酵结果显示：一级乳酸发酵稳态时的得率仅为 60.73%，二级乳酸发酵得率为 76.24%，三级乳酸发酵得率为 78.83%。因此相对一级发酵而言，采用至少二级以上的发酵罐级数进行连续乳酸发酵将在提高发酵得率方面具有明显优势。然而，当连续乳酸发酵罐级数从二级升为三级时，乳酸发酵得率仅提高了 2.59%，故本质上仅需两级发酵（而非三级发酵）即可以快速获得稳定的、高发酵指标、高发酵速率、高发酵得率以及低残糖水平的连续乳酸发酵产品，同时也减少了发酵反应器的设备投资成本。如果发酵罐投资成本允许的话，为了进一步降低后续乳酸纯化步骤的难度，可以采用三级连续乳酸发酵以进一步降低发酵液中的残糖水平。

(a) Industrial reactor pretreated wheat straw hydrolysate



(b) Bench reactor pretreated wheat straw hydrolysate

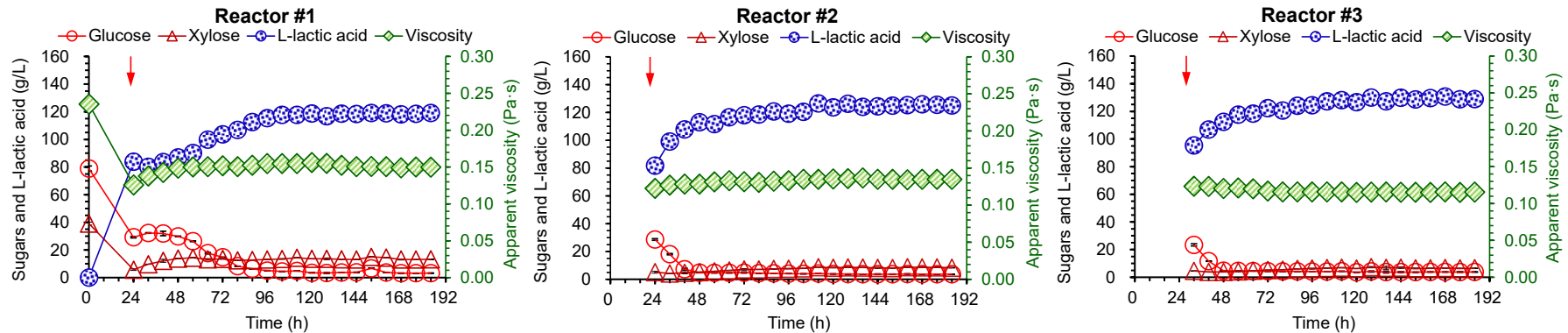


图 3.5 麦秆脱毒水解液的多级连续同步糖化和共发酵 (SSCF) 生产 L-乳酸

Fig. 3.5 Multi-stage continuous simultaneous saccharification and co-fermentation of the biodetoxified wheat straw hydrolysate for L-lactic acid production
 注：(a)利用工业预处理麦秆 (PWS#2) 脱毒水解液进行多级连续乳酸发酵期间的糖、L-乳酸和表观粘度的变化；(b)利用实验室预处理麦秆 (PWS#1) 脱毒水解液进行多级连续乳酸发酵期间的糖、L-乳酸和表观粘度的变化；。红色箭头 (↓) 表示生物脱毒麦秆水解液进料和发酵液出料连续运行的开始。每个反应器每 8 小时进料和出料的质量均占体系总质量的 30% (w/w)。多级连续乳酸 SSCF 过程在三个串联的 5L 生物反应器 (配备螺带搅拌桨) 中进行，发酵体系固含量~30% (w/w)，温度 45 °C，转速 180 rpm，乳酸菌种子液接种量 10% (v/v)，pH 5.5。发酵期间通过自动流加 25%(w/w) Ca(OH)₂ 液浆控制体系 pH。

3.3.5 从快速流态化到 L-乳酸发酵的连续生物转化过程物料衡算

本研究提出了从高温预处理物料快速流态化到 L-乳酸发酵的连续生物转化生产工艺流程。为了对其可行性进行整体评价，我们进行了详细的全过程物料衡算，如图 3.6 所示。从 1000 kg 原始麦秆出发，依次进行干酸预处理（采用工业预处理反应器）、流态化处理、连续酶解糖化、连续生物脱毒和多级连续 L-乳酸发酵。其中，关于连续酶解糖化和连续生物脱毒过程中糖、抑制物的质量衡算均是基于达到稳态时的糖和抑制物的实验平均浓度；关于多级连续发酵过程中糖、抑制物和乳酸初级产品（乳酸钙）的质量衡算则是基于末级乳酸发酵罐（三级发酵罐）达到稳态时的糖、抑制物和乳酸的实验平均浓度。

如图 3.6 所示，1000 kg 原始麦秆经干酸预处理后得到 1752 kg 的高温预处理麦秆（干固体含量 53.71%），损失了 47 kg 的干物质（相当于~5%的干小麦秸秆原料），对应的葡萄糖/葡聚糖回收率为 99.64%，木糖/木聚糖回收率为 73.14%，总糖回收率为 88.56%。随后高温预处理麦秆经过流态化（包括降温、中和和螺杆混合）后形成流态化的麦秆液浆，然后泵送至连续糖化阶段，共得到 3072 kg 的麦秆糖化液（干固体含量 36.49%）。连续糖化阶段在纤维素酶的作用下，69.72%的葡萄糖聚合物（葡聚糖和葡寡糖）以及 65.45%的木糖聚合物（木聚糖和木寡糖）被水解为相应的可发酵单糖。连续糖化阶段的葡萄糖/葡聚糖回收率和木糖/木聚糖回收率分别为 99.63%和 72.78%，总糖回收率为 88.40%。对比预处理后的总糖回收率（88.56%），仅下降了 0.16%，故快速流态化和连续糖化阶段的总糖损失是微不足道的。随后，3072 kg 含有乙酸、糠醛和羟甲基糠醛等抑制物的连续糖化液进入连续脱毒阶段，在脱毒菌 *P. variotii* FN89 的作用下脱除了全部的糠醛和羟甲基糠醛以及 70%的乙酸，产生了 3358 kg 的脱毒糖化液。连续生物脱毒之后，葡萄糖/葡聚糖回收率、木糖/木聚糖回收率和总糖回收率均表现为略微下降，分别为 99.53%、72.24%和 87.41%，这是由于脱毒菌 *P. variotii* FN89 在脱毒过程中需要维持自身生长而不得利用一点可发酵糖，不过由此造成的非生产性总可发酵糖消耗仅为~1%。最后，连续脱毒后的糖化液泵送至多级连续乳酸发酵阶段进行连续乳酸发酵生产。以实际发酵实验所得的第三级乳酸发酵的稳态结果为例进行计算，共得到 4497 kg 的 L-乳酸发酵液，其中 L-乳酸以 L-乳酸钙的形式存在，共有 564 kg（相当于~466 kg 纯的 L-乳酸），残留的葡萄糖和木糖分别为 21 kg 和 25 kg。三级连续乳酸发酵稳态期间的乳酸浓度达到了 143.1 g/L，发酵得率达到了 0.788 g L-乳酸/g 秸秆糖，相当于理论 L-乳酸得率的 78.83%。

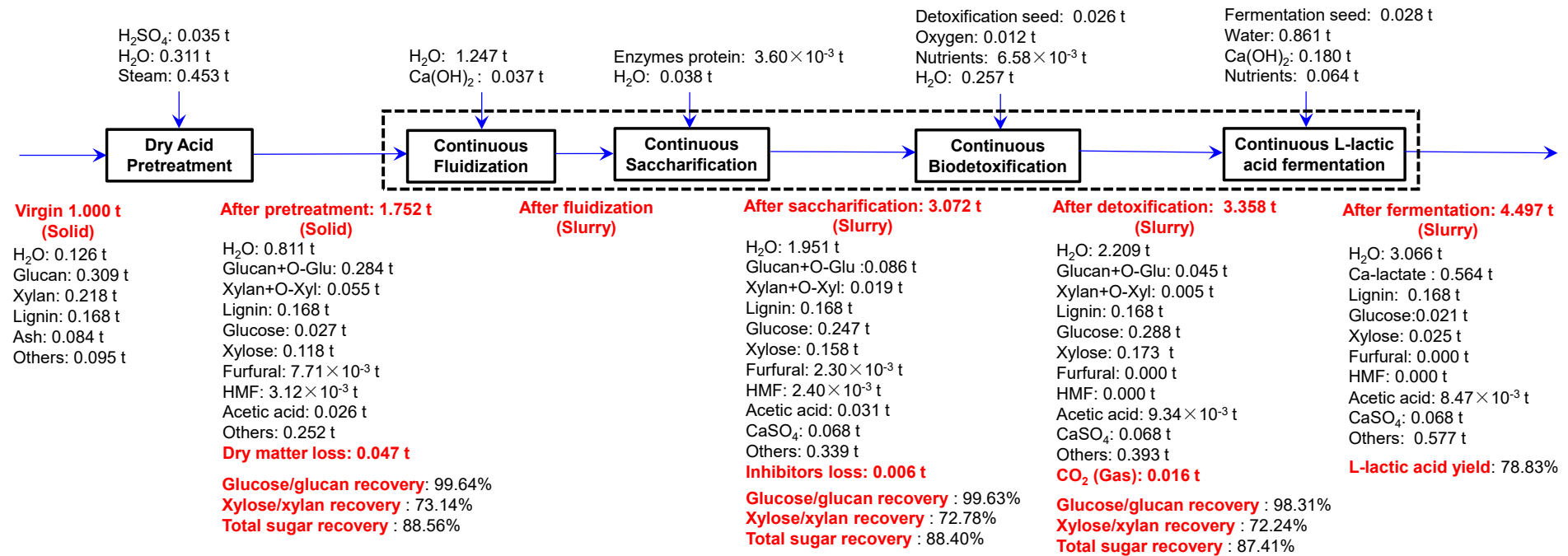


图 3.6 生产 L-乳酸的整体连续生物转化过程物料衡算

Fig. 3.6 Mass balance of the overall continuous bioconversion for L-lactic acid production

注：这些数据均基于采用工业反应器预处理麦秆（PWS#2）进行连续生物转化过程并达到稳态阶段的实验数据。葡萄糖/葡聚糖和木糖/木聚糖的回收率计算方法为：对应工段所得物料中的总葡萄糖或木糖含量除以原始麦秆中的总葡萄糖或木糖的质量（多糖和低聚糖均转化为单糖进行计算）。总糖回收率的计算方法为：对应工段所得物料中的总糖除以原始麦秆中的总糖（所有碳水化合物均转化为单糖）。L-乳酸得率的计算方法是：第三级乳酸发酵反应器中发酵液的 L-乳酸质量除以原始麦秆中所含总糖可转化的理论 L-乳酸质量（所有碳水化合物在计算前都转化为单糖）。

3.4 本章小结

本章以新型干法生物炼制加工链（即干酸预处理→酶解糖化→液态生物脱毒→发酵）为技术平台，研究了基于小麦秸秆实现 L-乳酸生产的快速流态化和连续生物转化。本章主要的结论如下：

（1）借助螺旋混合器、工艺水和氢氧化钙液浆，可在不添加任何酶的情况下连续将高温的干酸预处理固体麦秆物料（ $\sim 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）快速流态化为可泵送的流态化浆料（ $\sim 63\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH}\sim 5.1$ 、固含量 $\sim 30\%(\text{w/w})$ ），有利于通过管泵系统快速且连续地输送至后续连续生物转化阶段。

（2）这种封闭式的快速流态化处理完全避免了预处理物料中有毒抑制物的逸散和糖损失，尤其是废水相的形成。

（3）高温预处理物料经流态化处理后所得的小麦秸秆浆料，尽管其温度（ $\sim 63\text{ }^{\circ}\text{C}$ ）高于纤维素酶适宜的糖化温度（ $50\sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ），但连续补料引起的体系温度的变化不会对连续糖化过程带来不利影响，可以在 24~36 h 内快速实现连续糖化过程的整体稳态。

（4）在高固含量连续糖化稳态期间，高抑制物水平对纤维素酶活性和糖化效率的影响可忽略不计，体系的总葡萄糖和木糖浓度高达 $\sim 152\text{ g/L}$ 或 $\sim 131\text{ g/L}$ ，并且这种低表观粘度的连续糖化液浆（ $0.2\sim 0.3\text{ Pa}\cdot\text{s}$ ）完全可以使用离心泵（可输送粘度小于 $0.5\text{ Pa}\cdot\text{s}$ 的流体）等泵种进行密闭式的管泵式输送，从而有利于实现糖化液向连续脱毒阶段的快速流态化、连续化供应。

（5）本研究成功实现了高固含量连续生物炼制模式下的连续脱毒，并且可以与连续糖化和连续发酵阶段相互匹配。基于宛氏拟青霉 FN89 参与的液态生物脱毒技术，不仅可以连续、高效、彻底地去除连续糖化所得麦秆糖化液中的糠醛和 HMF，同时将乙酸脱除至较低水平，而且连续脱毒期间的脱毒终点是可控的，可以通过观察规律性的 pH 变化对连续脱毒终点进行准确识别并快速实施连续出料和补料操作，极大保证了连续脱毒期间的极低可发酵糖损失率。此外，连续生物脱毒阶段的稀释率与连续酶解糖化和连续乳酸发酵阶段一致，有利于进行相互匹配的稳定连续生物转化。

（6）使用三个串联发酵罐完全足够实现稳态、连续、高效的 L-乳酸发酵生产。不仅获得了理想的 L-乳酸浓度（ $>140\text{ g/L}$ ）和 L-乳酸得率（相当于理论得率的 78.8%）以及较低的残糖水平（ $<14\text{ g/L}$ ），而且最终获得的乳酸发酵液中的 L-乳酸手性纯度高于 99.3%，有利于降低后续乳酸纯化步骤的难度和发酵罐的投资。

第 4 章 生物炼制菌株耐高温性强化与干法生物炼制过程的高温化

4.1 引言

目前, 以乳酸这种生物基产品为导向的木质纤维素干法生物炼制过程主要包括预处理、糖化、液态生物脱毒、乳酸发酵等步骤^[13, 80, 165]。在糖化阶段, 考虑到商业酸性纤维素酶的最适作用温度为 50~55 °C, 故合适的糖化温度需要选择在此温度范围之内。在液态生物脱毒阶段, 常用的生物脱毒菌是宛氏拟青霉 (*P. variotii*) FN89 或 ZW70, 其脱毒适宜温度为~37 °C, 故糖化结束有必要进行大范围的降温 (至少 13 °C) 才能满足上述脱毒菌对脱毒环境的温度要求^[13, 80, 166]。另外, 目前以乳酸菌 (如 *P. acidilactici* ZY271 或 ZB220) 为底盘细胞的常规发酵过程的温度一般至少 42 °C 以上^[161], 故要想实现良好的发酵性能, 脱毒结束至少要将体系温度升高 5 °C 以上。由此可见, 当前纤维素乳酸的干法生物炼制生产, 在预处理之后的生物转化阶段 (糖化、脱毒和发酵) 存在着明显且大范围的温度切换问题 (50 °C 糖化 → 37 °C 脱毒 → 42 °C 乳酸发酵)。可以确定的是, 乳酸等大宗型生物基产品的商业化规模生产势必需要体积非常庞大的生物反应器 (至少数百立方米)。因此, 如果频繁对这种大型生物反应器进行连续且大范围的降温和升温操作将不仅产生巨大的能耗成本, 还将在缓慢降温和升温的过程中产生额外的时间成本, 由此势必会极大挫伤乳酸的干法生物炼制生产效率。

因此, 为了削减能耗成本和时间成本并提高干法生物炼制过程的整体生产效率, 有必要通过生物炼制菌株耐温性强化等手段来改进当前的液态生物脱毒和乳酸发酵过程, 以尽可能地使生物脱毒和乳酸发酵过程的工作温度区间向纤维素酶糖化过程的工作温度区间靠拢, 从而形成一个整体高温的乳酸生物转化过程。本研究将具备优良脱毒性能的宛氏拟青霉 *P. variotii* FN89 作为生物脱毒过程耐温性强化的出发菌株, 先是对其耐高温能力进行初步探究以确定其耐温上限, 然后以此温度为基础进化温度 (后续逐渐提高温度), 在含有抑制物 (乙酸、糠醛和 HMF 等) 的木质纤维素水解液体系下对其进行长期的高温适应性进化实验。以期得到一株甚至多株不仅可以耐受~50 °C 高温同时也能在高温、高抑制物浓度、高固含量的木质纤维素水解液体系下实现抑制物快速完全降解的高温化生物脱毒菌株。此外, 我们将具备优良发酵性能且能够高效利用多种木质纤维素来源糖的乳酸片球菌 *P. acidilactici* ZB220 作为乳酸过程耐温性强化的出发菌株, 在已脱毒的木质纤维素水解液体系下对其进行长期的高温适应性进化实验, 以期得到一株甚至多株不仅可以耐受~50 °C 的高温同时也能在高温、高糖浓度、高固含量的木质纤维素水解液体系下实现高产物浓度、高发酵速率、高得率和极低残糖水平的高温化乳酸发酵菌株。本研究希望通过对当前生物炼制菌株的耐温性进行强化, 促成一个高温化的乳酸生物转化过程, 从而进一步推动干法生物炼制技术向高效、低能耗、低成本的产业化之路迈进。

4.2 材料与方法

4.2.1 原料

本研究使用的木质纤维素原料为小麦秸秆，采购自中国河南省南阳市，于 2023 年 5 月收获。为了保持麦秆的原有特性，不做除尘步骤，只粗磨并通过圆直径为 10 毫米的筛网，最后在室温下储存于透明塑料袋中以备将来使用。根据美国国家可再生能源实验室 (NREL) 关于木质纤维素原料的组分测定方法，该批麦秸原料在干重基础上主要含纤维素 $35.60\% \pm 0.41\%$ ，木聚糖 $24.29\% \pm 0.21\%$ ，木质素 $18.75\% \pm 0.07\%$ ，灰分 $9.70\% \pm 0.28\%$ 。

4.2.2 酶和试剂

纤维素酶 Cellic CTec 2.0，用于酶糖化过程，购自 Novozymes (北京，中国)。纤维素酶 Cellic CTec 2.0 的测定结果表明，滤纸活性、纤维二糖活性和蛋白质含量分别为 256.0 ± 2.5 FPU/mL、 4653.3 ± 18.1 FPU/mL 和 86.3 ± 4.4 mg/mL。糖化酶 GA-L NEW 购自 Genencor (北京，中国)，其酶活为 103,900 U/mL。酵母膏和蛋白胨均购自 Oxoid 公司 (汉普郡，英国)。一水葡萄糖等化学试剂均购自上海泰坦科技股份有限公司，等级为分析纯。

4.2.3 菌种和培养基

生物脱毒过程耐温性强化的出发菌株为宛氏拟青霉 (*P. variotii*) FN89^[77]。活化阶段所用的 PDA 培养基和扩培阶段所用的 SM 液体合成培养基的配方详见 2.2.3。

L-乳酸发酵过程耐温性强化的出发菌株为乳酸片球菌 (*P. acidilactici*) ZB220 (CGMCC M 2023151)^[161]。种子活化阶段所用的 MRS 培养基配方和乳酸 SSCF 阶段的营养盐配方详见 2.2.3。

4.2.4 干酸预处理

小麦秸秆干酸预处理过程的具体操作条件详见 3.2.4，预处理麦秆的组分测定方法为两步酸水解法 (TP-510-42618)^[139]。测定结果表明，实验室小型预处理反应器 (容积 20 L) 制备的干酸预处理小麦秸秆的组成包括：葡聚糖 $30.07\% \pm 0.39\%$ 、木聚糖 $1.39\% \pm 0.33\%$ 、葡单糖 29.20 ± 0.21 mg/g DM、木单糖 129.10 ± 11.89 mg/g DM、乙酸 17.73 ± 2.80 mg/g DM、5-羟甲基糠醛 (HMF) 1.94 ± 1.28 mg/g DM 和糠醛 1.40 ± 1.26 mg/g DM。

4.2.5 酶解糖化和麦秆水解液的制备

预处理麦秆的酶解糖化在 5L 带有螺带搅拌桨的糖化反应器内进行。预处理麦秆在酶解糖化前，先用 CaCO_3 粉末调至 pH 5.0-5.5 后进行磨浆。随后根据糖化体系 30%(w/w)固含量来向 5L 糖化反应器内加入预处理麦秆物料、水和纤维素酶(按照 4 mg 酶蛋白/g 干物料添加)。麦秆水解液的制备条件为温度 50 °C，转速 150 rpm，糖化时间 12-48 h。在加料过程中需要实时观察糖化效果，预处理物料的加料一般在 1 h 内完成。高温脱毒适应性进化前期阶段所需的 10%(w/w)和 20%(w/w)固含量的含抑制物麦

秆水解液均是通过无菌水稀释所得。

4.2.6 液态生物脱毒

在 3L 直叶浆搅拌反应器中对酶解糖化后的麦秆水解液进行生物脱毒处理。脱毒期间的体系温度为 37 °C、42 °C 或 45 °C，转速为 750 rpm，通气量为 1 vvm，按照 10%(w/w)的接种量接种 *P. variotii* FN89 出发菌株或其高温进化菌株的扩培种子液启动连续生物脱毒。脱毒全程无需添加任何营养盐。在液态生物脱毒过程中，基于在线监测体系 pH 峰值的方法来识别脱毒终点。

4.2.7 L-乳酸发酵

在带有 Rushton 搅拌桨的 3L 发酵罐内进行 L-乳酸发酵测试实验。从-80°C冰箱中取出 *P. acidilactici* ZB220 或其高温进化菌株 *P. acidilactici* HT150 的冷冻保存管（约含 2 mL 菌液），随后将解冻后的菌液倒入 20 mL MRS 培养基中并置于 42 °C、150 rpm 孵育 6 h（视为第一次活化）。将 10 mL 第一次活化的种子液转入 100 mL 新鲜 MRS 培养基中，同时加入 1.0% (v/v)的葡萄糖淀粉酶和 1.2 g（0.6 g/g 糖）的碳酸钙粉末，然后在相同温度和速度下培养 6 h（视为第二次活化）。将第二次活化后的种子液作为 L-乳酸发酵的种子液。向 3L 发酵罐内到达生物脱毒终点的 1 L 麦秆水解液中依次加入乳酸发酵营养盐和乳酸发酵二次活化种子液，在 42~48 °C、pH 5.5、300 rpm 的条件下进行 72 h 的 L-乳酸厌氧发酵。发酵期间通过自动添加 25(w/w) Ca(OH)₂ 液浆来保持体系 pH 为 5.5。

4.2.8 宛氏拟青霉 FN89 的高温适应性进化

基于含抑制物的麦秆水解液对宛氏拟青霉(*P. variotii*)FN89 进行高温适应性进化。适应性进化期间的体系温度为 42 °C、45 °C 和 48 °C。前期所用的含抑制物麦秆水解液的体系固含量以 10%(w/w)和 20%(w/w)为主，后期逐渐调整至 30%(w/w)。生物脱毒菌的高温适应性进化过程是在摇床内的 100 mL 三角瓶（瓶口带透气膜）中进行的，装液量为 20 mL 左右，初期传代接种量为 10% (v/v)，后续逐步调整至 15%、20%和 25% (v/v)。脱毒菌高温适应性进化过程不对 pH 进行调整，使用的摇床转速恒定为 300 rpm。

4.2.9 乳酸片球菌 ZB220 的高温适应性进化

基于液体合成培养基和经过液态生物脱毒、离心（12000 rpm、15 min）、活性炭脱色（5%-10%(w/v)添加量、60 °C、1-2 h）、过滤后所得的麦秆水解清液对乳酸片球菌（*P. acidilactici*）ZB220 进行高温适应性进化。所用的液体合成培养基包括：10 g/L 蛋白胨，15 g/L 酵母提取物，5 g/L CH₃COONa，2 g/L 柠檬酸氢二铵，2 g/L K₂HPO₄，0.58 g/L MgSO₄·7H₂O，0.25 g/L MnSO₄·H₂O，70 g/L 葡萄糖和 40 g/L 木糖。小麦秸秆水解清液中还添加了与合成培养基几乎一样的营养物质，只是不添加葡萄糖和木糖。

适应性进化期间的体系温度为 45 °C。乳酸发酵菌的高温适应性进化过程是在摇床内的 100 mL 三角瓶（瓶口加塞）中进行的，装液量为 20 mL 左右，传代接种量为 10%-25% (v/v)。乳酸菌高温适应性进化过程通过添加碳酸钙粉末调节 pH，使用的摇床转速恒定为 300 rpm。

4.2.10 分析方法

葡萄糖、木糖、乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛和乳酸的测定参照以往报道的方法^[4]。采用高效液相色谱 (HPLC) 装配示差折光检测器 RID-10A (岛津) 和 MCI GELTM 填充柱 (CRS10W), 在 25 °C 下测定 L-乳酸的手性纯度。流动相为 2 mM CuSO₄, 流速为 0.5 mL/min。

此外, 通过平板稀释涂布法来评估耐高温性能强化后所获得的高温脱毒菌株 *Byssochlamys spectabilis* HT45 和高温乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* HT150 在乳酸发酵过程中的共生情况。所用的平板含有 SM 琼脂培养基或 MRS 琼脂培养基 (琼脂添加量为 1%-2%)。

4.3 结果和讨论

4.3.1 宛氏拟青霉出发菌株的高温脱毒评价

以高温适应性进化的方式对宛氏拟青霉出发菌株 *P. variotii* FN89 进行耐高温性强化。考虑到 *P. variotii* FN89 的适宜脱毒温度为 37 °C, 为了给后续生物脱毒耐高温性强化过程选择一个合适的适应性进化基础温度条件, 我们首先在 42 °C (乳酸发酵的基本温度) 条件下进行了摇瓶内的脱毒实验测试。使用两种相对较低固含量 (10%(w/w) 和 20%(w/w)) 的含抑制物麦秆水解液, 分别监测出发菌株 *P. variotii* FN89 在高温的水解液体系中的抑制物脱除、糖耗和生长情况。

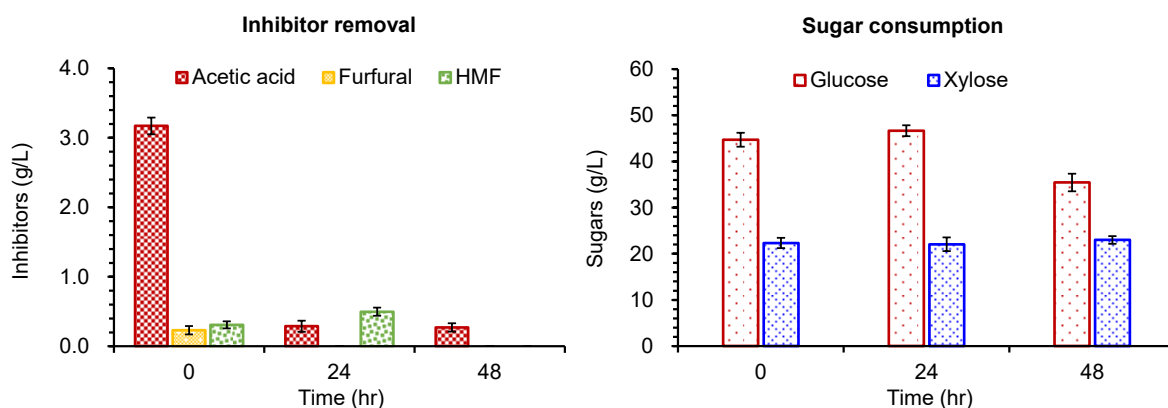
如图 4.1 所示, 在 42 °C 高温麦秆水解液体系下, 出发菌株 *P. variotii* FN89 完全可以脱除 10%(w/w) 麦秆水解液中的乙酸、糠醛和 HMF, 脱毒 24 h 便可消耗 90% 以上的乙酸和 100% 的糠醛, 但 HMF 要在 48 h 左右才消耗完全, 并且还可以看出糠醛脱除完全后糖耗明显。另外, 在 42 °C、20%(w/w) 麦秆水解液体系下, 出发菌株 *P. variotii* FN89 虽然仍可完全脱除体系中的乙酸和糠醛, 但很难对体系中的 HMF 进行脱除, 脱毒 48 小时仅消耗了 20% 的 HMF (0.57 g/L → 0.45 g/L)。不过, 值得注意的是, 尽管宛氏拟青霉出发菌株 *P. variotii* FN89 已经处于 42 °C 这个相对不适宜的温度环境下, 但菌体的生长并没有我们想象中的那么差。在 42 °C、20%(w/w) 麦秆水解液脱毒 48 h 时, 我们从脱毒体系中取出了部分水解液样品并在 PDA 平板上划线后置于 42 °C 培养 48 h, 发现 *P. variotii* FN89 仍然长势良好 (如图 4.1b 所示)。

随后, 我们用 0.05%(w/w) 的吐温-80 溶液将该 PDA 平板上的 *P. variotii* FN89 孢子尽数洗出, 并对获得的孢子液进行扩培处理, 以进一步测试该菌在 45 °C、20%(w/w) 麦秆水解液体系下进行高温生物脱毒的脱毒性能、糖耗情况, 结果如图 4.2 所示。可以看出, 平板划线筛出的 *P. variotii* FN89 能够适应 45 °C 的脱毒温度, 并且可以在 48 h 内完全脱除 20%(w/w) 水解液中的乙酸、糠醛和 HMF。有所不足的是, 脱毒 24 h 之后体系开始出现糖 (主要是葡萄糖) 的损失, 此时乙酸残留 64% (6.45 g/L → 4.13 g/L), HMF 残留 12% (0.59 g/L → 0.07 g/L)。值得注意的是, 从 45 °C、20%(w/w) 麦秆水解液脱毒期间取出部分水解液并在 PDA 平板上划线后置于 45 °C 培养 48 h, *P. variotii*

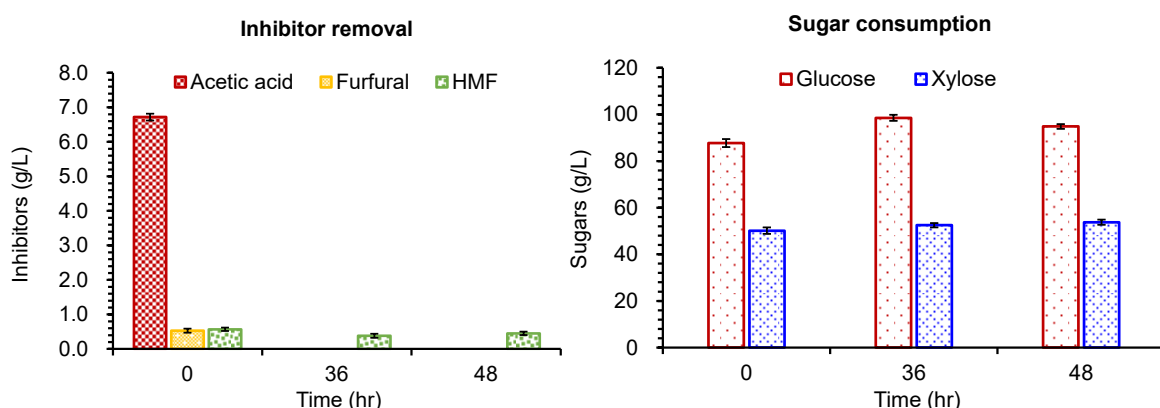
FN89 仍可存活，但菌体生长情况明显差于相同条件下 42 °C 的生长情况（图 4.1b）。

总的来说，宛氏拟青霉 FN89 出发菌株可以耐受 42 °C 的高温且在 42 °C 菌体生长情况良好，但该菌在 42 °C、20%(w/w) 麦秆水解液体系下对 HMF 的脱除速度很慢。经过 42 °C 高温脱毒和在 PDA 平板上进行高温培养后，出发菌株的耐温性和脱毒性能获得了一定的提升，甚至可以在 45 °C、20%(w/w) 麦秆水解液体系下完成抑制物的脱除。不过菌体生长情况不佳，因此有必要进行进一步的进化培养以优化菌体生长情况。

(a) 10% (w/w) wheat straw hydrolysate



(b) 20% (w/w) wheat straw hydrolysate



Growth under 42 °C

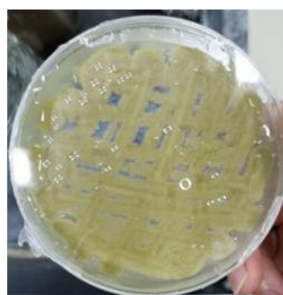


图 4.1 42 °C 条件下 *P. variotii* FN89 出发菌株在麦秆水解液中的脱毒、糖耗和生长情况

Fig. 4.1 Detoxification and sugar consumption of the starting strain *P. variotii* FN89 under 42 °C in wheat straw hydrolysates with different solid contents

注：(a) 10% (w/w) 麦秆水解液；(b) 20% (w/w) 麦秆水解液；(c) 42 °C 条件下 *P. variotii* FN89 的生长情况。脱毒条件如下：接种量 15%(v/v)，温度 42 °C，转速 300 rpm，装液量 20 mL/100 mL。将 42 °C、20% 水解液脱毒 48 h 的水解液原液在 PDA 平板上划线并置于 42 °C 培养 48 h 后观察其生长情况。

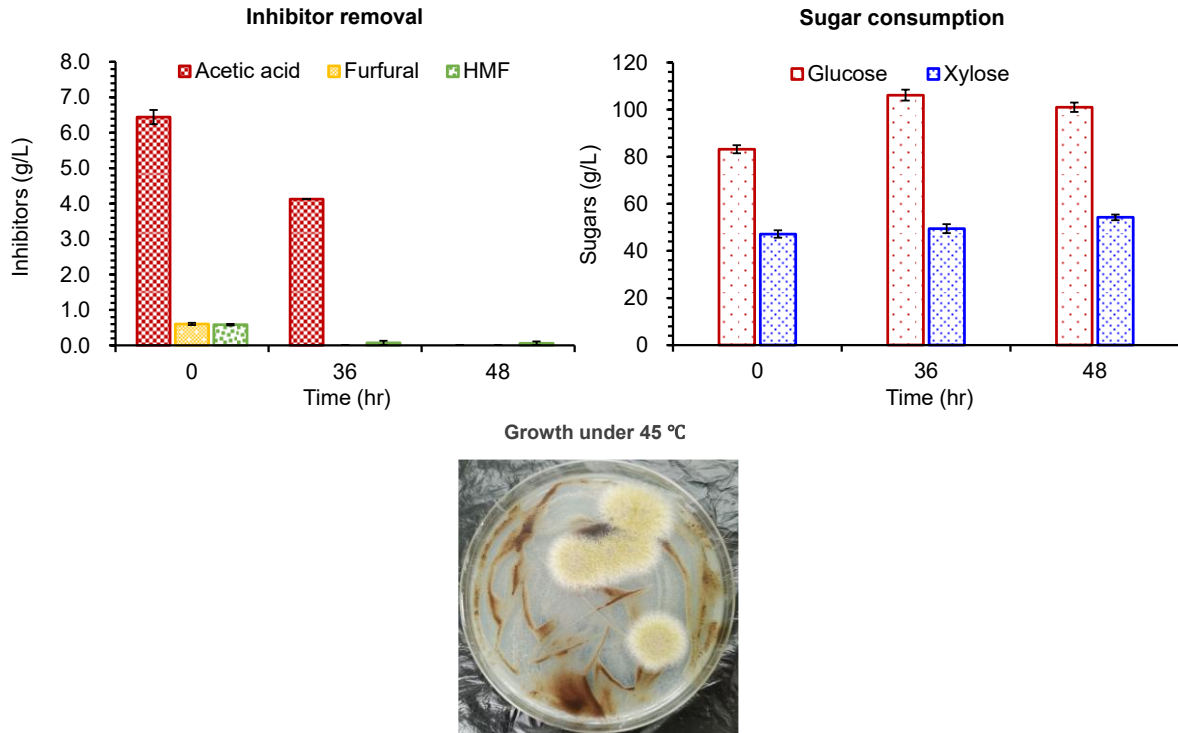


图 4.2 42 °C 脱毒期间获得的 *P. variotii* FN89 在 45 °C 麦秆水解液中的脱毒、糖耗和生长情况
Fig. 4.2 Detoxification, sugar consumption, and growth of *P. variotii* FN89 in wheat straw hydrolysate under 45 °C obtained during the detoxification period at 42 °C

注：取 42 °C、20% (w/w) 麦秆水解液脱毒期间划线培养后得到的 *P. variotii* FN89 平板（图 4.1b），将平板上洗脱后的孢子液置于 SM 培养基中，在 42 °C、300 rpm 条件下培养 24 h。脱毒条件如下：脱毒温度 45 °C，接种量 15% (v/v)，转速 300 rpm，装液量 20 mL。将 45 °C、20% 水解液脱毒 48 h 的水解液原液在 PDA 平板上划线并置于 42 °C 培养 48 h 后观察其生长情况。

4.3.2 *P. variotii* FN89 的高温适应性进化及高温脱毒性能测试

考虑到 *P. variotii* FN89 在 45 °C、20% (w/w) 麦秆水解液体系下脱毒时菌体的生长情况不佳（图 4.2），乙酸降解速度很慢，36 h 仅脱除了 36%（6.45 g/L → 4.13 g/L），以及在 36 h 至 48 h 期间出现了明显的耗糖行为，我们在 45 °C 条件下的高固含量、高抑制物浓度麦秆水解液体系中对该菌进行了长期的适应性进化实验，如图 4.3 所示。

生物脱毒菌高温适应性进化的第一阶段是在 45 °C、20% (w/w) 麦秆水解液体系下进行了一个长达 20 天的短期适应性进化实验（共进化了 10 代）。每代 *P. variotii* FN89 在转接至下一批新鲜麦秆水解液之前基本上均可以将体系中的乙酸、糠醛和 HMF 脱除至极低水平（<0.1 g/L），并且在该期间菌体浓度有逐渐提高的趋势（图 4.4a 所示）。

生物脱毒菌高温适应性进化的第二阶段是在 45 °C、30% (w/w) 麦秆水解液体系下进行了一个长达 20 天的短期适应性进化实验（共进化了 10 代）。与第一阶段类似，虽然整体进化体系的抑制物浓度有了一定的提升，但脱毒菌同样可以将所有抑制物脱除至低水平（<0.1 g/L），且进化期间菌体生长始终保持良好（如图 4.4b 所示）。此外，在脱毒适应性进化第二阶段，我们可以看出葡萄糖的消耗变得愈加明显，这说明体系中的抑制物在以愈来愈快的速度被 *P. variotii* FN89 所降解，故长期适应性进化对高温脱毒能力的提高有益。考虑到第二阶段后期，菌株已明显耗糖（此时体系中基本

已无抑制物的存在），为保持后续的高温脱毒适应性进化过程仍能对 *P. variotii* FN89 的脱毒能力产生胁迫作用，我们将转接时间从 48 h 缩短至 24 h。

生物脱毒菌高温适应性进化的第三阶段（21-56 代）也是在 45 °C、30%(w/w) 麦秆水解液体系下进行。由于传代时间的大幅缩短（48 h→24 h），*P. variotii* FN89 的菌体生长情况在该阶段的前期出现了明显的劣势（如图 4.4c 所示）。不过，对于适应性进化体系中毒性相对较强的糠醛和 HMF，基本均能被脱除至极低水平，但在乙酸的脱除方面波动非常明显。这说明 *P. variotii* FN89 在传代时间降至 24 h 之后，的确受到了高温和抑制物的胁迫，同时也说明该进化实验还是需要继续进行下去，直至进化菌株在该条件下达到一个较为稳定的状态。在 45 °C、30% 麦秆水解液体系下继续保持每 24 h 传代一次的频率连续进化一段时间后，特别是在进化 40 代之后，我们发现生物脱毒高温进化菌株的菌体生长情况明显得到了改善（如图 4.4c 所示）。并且我们还发现水解液体系中的糖浓度水平在进化 46 代之后出现了逐渐下降的趋势，说明此时体系中的抑制物浓度水平已不足以对进化菌株产生胁迫作用，菌株在优先利用完抑制物这种碳源之后开始利用可发酵糖作为碳源，故我们在观察到进化体系中的乙酸、HMF、糠醛全部消失时选择停止生物脱毒高温适应性进化实验并开始进行脱毒进化菌种的保藏。最终我们将在 45 °C 麦秆水解液体系下适应性进化 56 代后所获得的耐受 45 °C 且具备良好脱毒能力的脱毒菌株命名为壮观丝衣霉 *Byssochlamys spectabilis* HT45（CCTCC M 20251081），并将其用于后续的高温生物炼制转化过程。

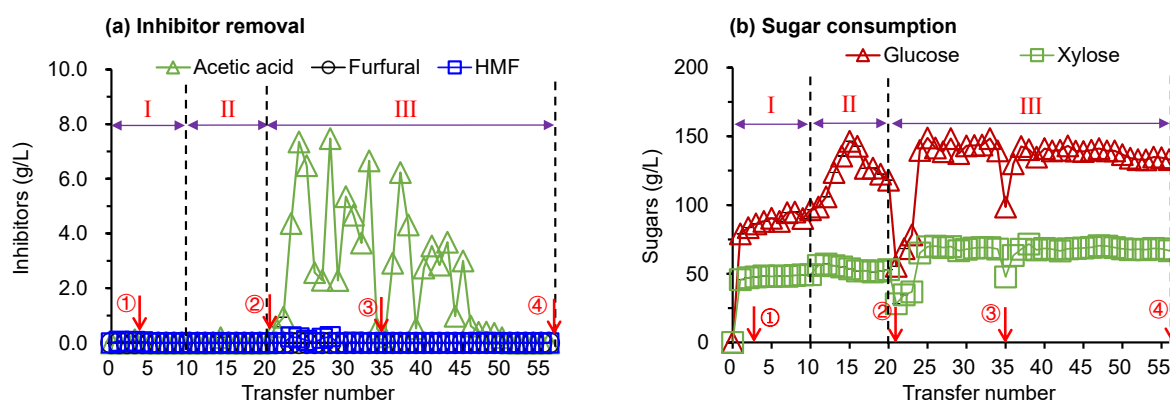
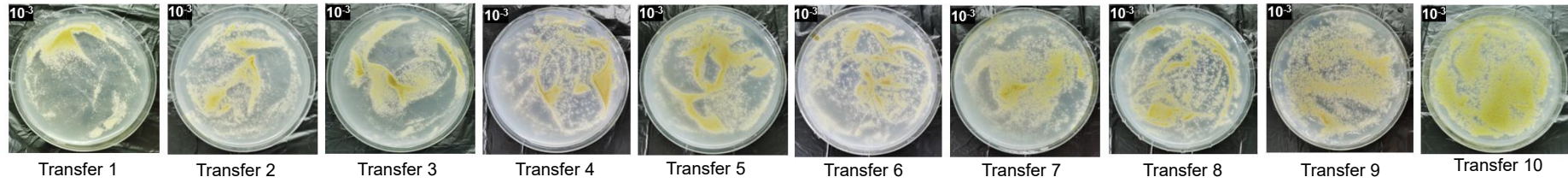


图.4.3 *P. variotii* FN89 高温脱毒适应性进化期间的抑制物脱除情况和糖耗变化

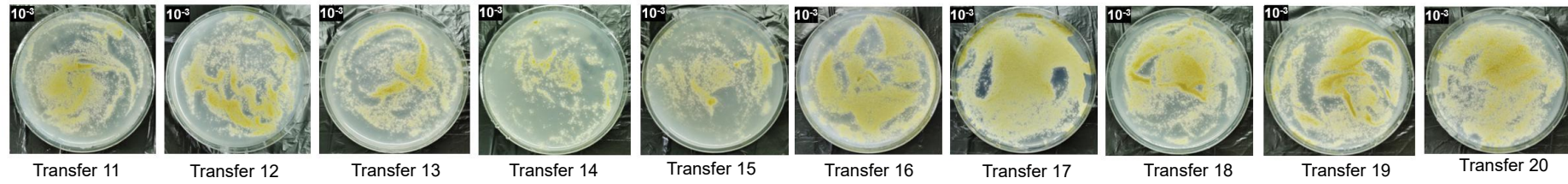
Fig. 4.3 Inhibitors removal and sugar consumption during adaptive evolution of *P. variotii* FN89 for high-temperature detoxification

注：(a)抑制物脱除情况；(b)糖耗情况。I 阶段（第 1-10 代）：在 45 °C、20%(w/w) 麦秆水解液体系中进行，每 48 h 转接一代，接种量为 15%(v/v)；II 阶段（第 11-20 代）：在 45 °C、30%(w/w) 麦秆水解液体系中进行，每 48 h 转接一代，接种量为 20%(v/v)；III 阶段（第 21-56 代）：在 45 °C、30%(w/w) 麦秆水解液体系中进行，每 24 h 转接一代，接种量为 25%(v/v)。箭头①（第 4 代处）：将高温进化第 4 代 *P. variotii* FN89 在 3L 发酵罐中进行 45 °C 脱毒测试，达到脱毒终点时取少量罐内的水解液在 PDA 平板上划线培养（45 °C）48 h 后用平板上的新菌株进行后续的适应性进化；箭头②（第 21 代处）：当传代时间从 48 h 改为 24 h 时，重新启动适应性进化实验；箭头③（第 35 代处）：因暑假暂停适应性进化实验，将此时的进化菌株进行了低温保藏；箭头④（第 56 代处）：停止适应性进化实验，并将第 56 代的进化菌株进行低温保藏。

(a) Growth of *Paecilomyces variotii* at adaptive evolution stage I



(b) Growth of *Paecilomyces variotii* at adaptive evolution stage II



(c) Growth of *Paecilomyces variotii* at adaptive evolution stage III

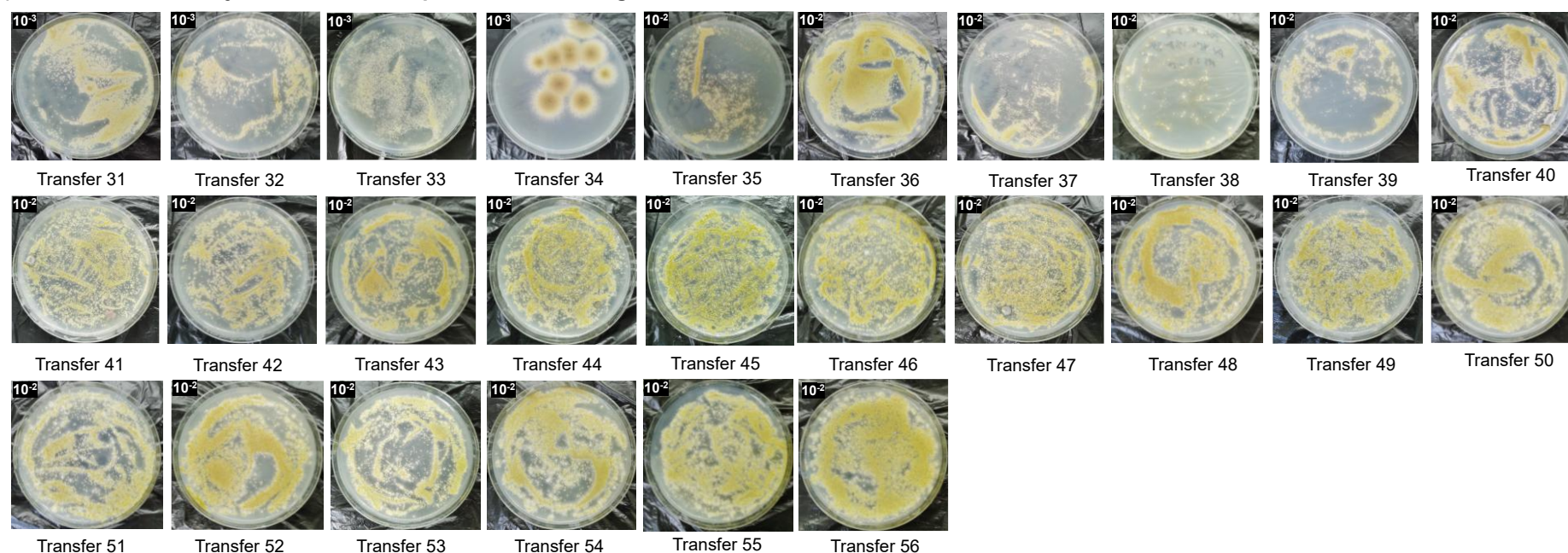


图 4.4 *P. variotii* FN89 高温脱毒适应性进化期间的菌体生长情况

Fig. 4.4 Growth status of *P. variotii* FN89 during adaptive evolution for high-temperature detoxification

注：(a)第 I 阶段（第 1-10 代）的菌体生长情况；(b)第 II 阶段（第 11-20 代）的菌体生长情况；(c) 第 III 阶段（第 21-56 代）的菌体生长情况。取进化期间脱毒水解液的原液用超纯水稀释 $10^2\sim 10^3$ 倍后在 PDA 平板上涂布，然后置于 $45\text{ }^\circ\text{C}$ 下培养 24 h（特例：第 4 代涂布后在平板上培养了 48 h）。

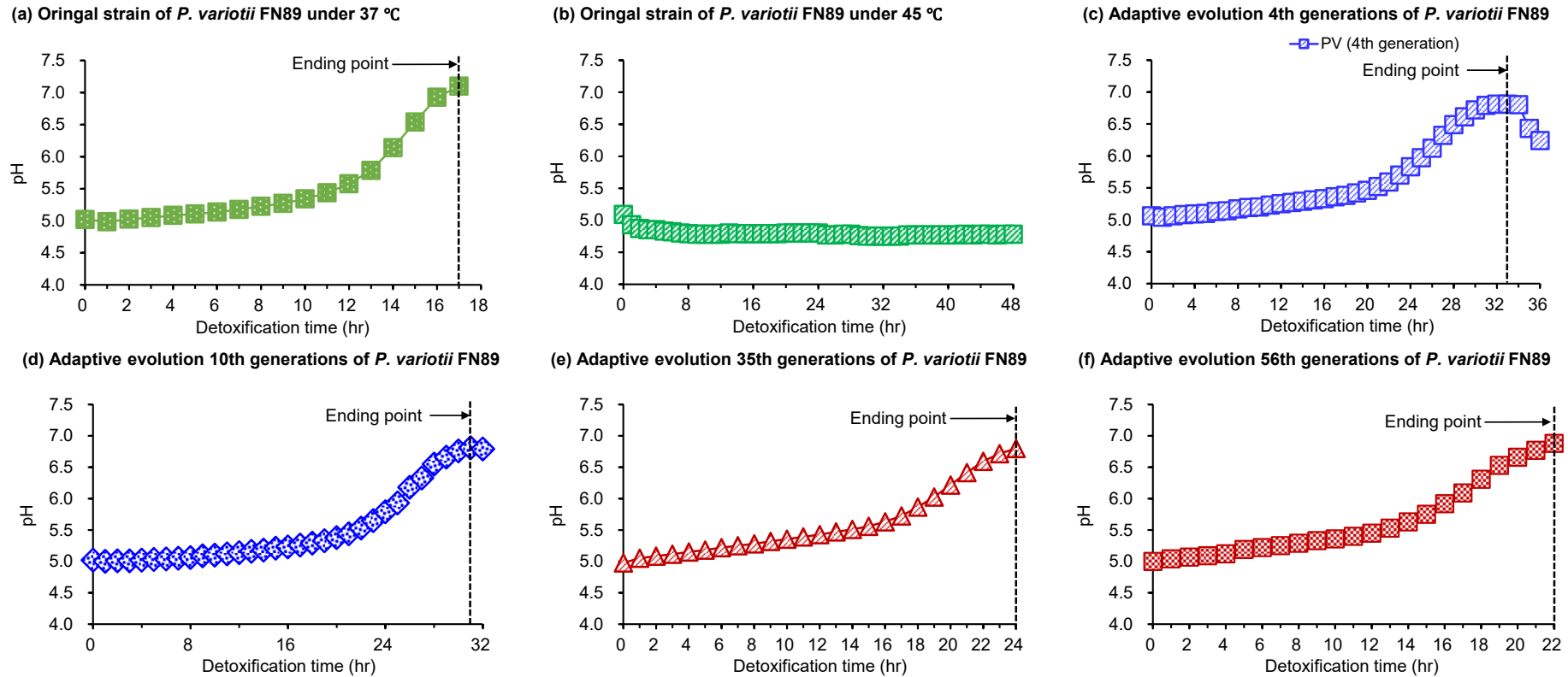


图 4.5 *P. variotii* FN89 原始菌株和高温适应性进化菌株的脱毒性能测试

Fig. 4.5 Growth status of *P. variotii* FN89 during adaptive evolution for high-temperature detoxification

注: (a) *P. variotii* FN89 原始菌株在 37 °C、30%麦秆水解液中的脱毒情况; (b) *P. variotii* FN89 原始菌株在 45 °C、30%麦秆水解液中的脱毒情况; (c) *P. variotii* FN89 高温进化第 4 代菌株在 45 °C、30%麦秆水解液中的脱毒情况; (d) *P. variotii* FN89 高温进化第 10 代菌株在 45 °C、30%麦秆水解液中的脱毒情况; (e) *P. variotii* FN89 高温进化第 35 代菌株在 45 °C、30%麦秆水解液中的脱毒情况; (f) *P. variotii* FN89 高温进化第 56 代菌株在 45 °C、30%麦秆水解液中的脱毒情况。所有菌株的液态生物脱毒性能测试均在带有 1 个 Rushton 搅拌桨和 1 个消泡桨的 3L 脱毒反应器内进行,脱毒温度 37-45 °C,接种量均为 10%(v/v),转速均为 750 rpm,脱毒体系均为 1 L。

此外,我们在 *P. variotii* FN89 进行高温适应性进化的不同阶段对进化菌株在高温 (45 °C) 条件下脱毒性能进行了上罐放大测试,并与原始菌株进行了比较,结果如图 4.5 所示。根据我们之前研究的木质纤维素水解液体系中的液态生物脱毒终点检测方法^[80],即脱毒期间出现 pH 峰值即意味着脱毒终点的来临,我们发现:(i) *P. variotii* FN89 原始菌株在 37 °C、30%(w/w)麦秆水解液体系下的脱毒速率很高,仅 17 h 便可将体系中高达 6-7 g/L 的乙酸、~1.2 g/L 的糠醛和~1.0 g/L 的 HMF 全部脱除完全,不过该原始菌株无法在 45 °C、30%(w/w)麦秆水解液的体系下进行脱毒(图 4.5b,脱毒期间体系 pH 未发生变化)。(ii) *P. variotii* FN89 在适应性进化第一阶段的 45 °C、30%(w/w)麦秆水解液体系中仅培养四代,便能初步实现高温脱毒(图 4.5c,33 h 左右到达脱毒终点)。培养至第一阶段第 10 代时,高温脱毒的能力进一步提高,同样情况下~31.5 h 便能达到脱毒终点(如图 4.5d)。在 *P. variotii* FN89 高温适应性进化过程进行至第三阶段的第 35 代和第 56 代时,同样情况下的 45 °C、30%(w/w)麦秆水解液体系分别仅需要 24 h 和 22 h 便能实现抑制物的基本完全脱除(图 4.5ef),仅残留低浓度的乙酸 (< 2 g/L)。这意味着生物脱毒菌 *P. variotii* FN89 在经历了长期的高温适应性进化之后不仅显著提高了菌株的耐高温性,而且其在高温下的抑制物脱除性能也获得了极大的提升,并且有接近原始菌株在适宜温度下的生物脱毒性能的趋势(图 4.5a 和图 4.5f)。

4.3.3 *P. acidilactici* ZB220 的高温适应性进化及高温发酵性能测试

如图 4.6 所示,采用 MRS 合成培养基和麦秆水解清液对当前干法生物炼制所用的乳酸发酵原始菌株 *P. acidilactici* ZB220 进行了共 150 代的高温适应性进化。进化第一阶段(1-64 代)采用的是 MRS 液体合成培养基,我们发现 *P. acidilactici* ZB220 在 45 °C 适应性进化初期(1~4 代),乳酸浓度有些许下降且葡萄糖、木糖残留增多,第 9 代至 64 代,乳酸、葡萄糖和木糖的浓度及 pH 逐渐稳定;进化第二阶段(65 代~110 代),乳酸浓度以及残糖浓度波动较为明显。我们发现,*P. acidilactici* ZB220 在 45 °C 适应性进化过程中一旦切换至真实的木质纤维素水解液体系下(即麦秆水解清液)进行适应性进化培养,就会表现出糖耗和乳酸生产水平的减少,故我们在第二阶段采用了合成培养基和小麦秸秆水解清液两种体系交替进化的方式,以提高乳酸菌 *P. acidilactici* ZB220 在高温下对真实木质纤维素水解液的耐受性和乳酸发酵性能。进化第二阶段(111 代~150 代),将 45 °C 下已经交替进化稳定的第 110 代菌株切换至麦秆水解清液中进行连续的适应性进化,发现乳酸产量逐渐变好且残糖水平逐渐降低。最终,我们将 *P. acidilactici* ZB220 进行高温适应性进化 150 代后所得的进化菌株命名为乳酸片球菌 *P. acidilactici* HT150 (CCTCC M 20251092),并将其用于后续的高温 L-乳酸发酵生物转化过程。

在完成乳酸发酵菌的高温适应性进化之后,我们对进化菌株和原始菌株在 45 °C 下的发酵性能进行了对比,如图 4.7 所示。结果表明,相对于乳酸发酵原始菌株 *P. acidilactici* ZB220 在 45 °C 的乳酸发酵性能,经过 45 °C 长期适应性进化的 *P. acidilactici* HT150 在 45 °C 下的 L-乳酸发酵情况明显更具优势,不仅最终乳酸发酵指标较高,且

发酵后的残糖较少（无葡萄糖剩余）。经过长期的高温适应性进化，显著弱化了生物炼制生产乳酸过程的温度切换，并且乳酸发酵结果更好。

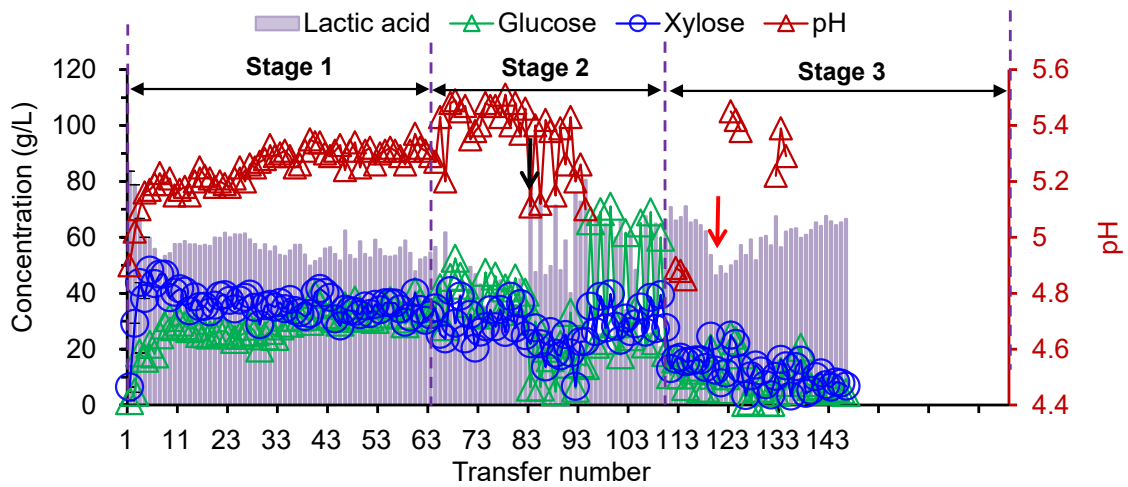


图 4.6 *P. acidilactici* ZB220 高温适应性进化期间的 pH、乳酸和糖浓度的变化

Fig. 4.6 Changes in pH, lactic acid, and sugar concentrations during high-temperature adaptive evolution of *P. acidilactici* ZB220

注：*P. acidilactici* ZB220 高温适应性进化采用合成培养基和小麦秸秆水解清液，进化温度和转速分别为 45 °C 和 300 rpm，摇瓶中的装液量体积为 20 mL，碳酸钙添加量为 2.4 g。高温适应性进化第 1 阶段（1-64 代）：采用 MRS 液体合成培养基进行连续转接（传代采用 25% (v/v) 接种量）；高温适应性进化第 2 阶段（65-110 代）：采用合成培养基和麦秆水解清液交替适应性进化（传代采用 25% (v/v) 接种量）；高温适应性进化第 3 阶段（111-150 代）：111 代之后，采用脱色后的脱毒水解液进行适应性进化（传代采用 25% (v/v) 接种量）。黑色箭头：从 83 代之后转接时间从 24 h 调整为 48 h；红色箭头：因暑假暂停适应性进化，返校后重新开始进化（从 120 代开始）。液体合成培养基：10 g/L 蛋白胨，15 g/L 酵母提取物，5 g/L CH₃COONa，2 g/L 柠檬酸氢铵，2 g/L K₂HPO₄，0.58 g/L MgSO₄·7H₂O，0.25 g/L MnSO₄·H₂O，70 g/L of 葡萄糖，40 g/L 木糖。小麦秸秆水解清液中还添加了与合成培养基几乎一样的营养物质，只是不添加葡萄糖和木糖。

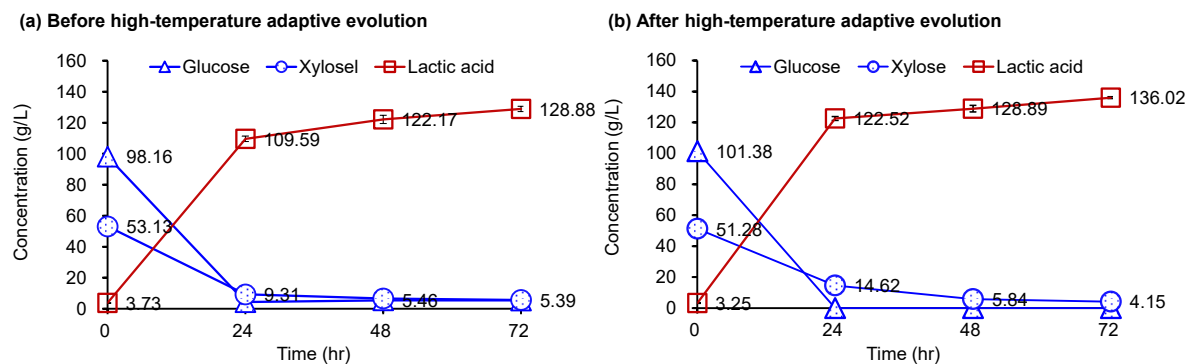


图 4.7 *P. acidilactici* ZB220 高温适应性进化前后的 L-乳酸发酵性能对比

Fig.4.7 Comparison of L-lactic acid fermentation by *P. acidilactici* ZB220 before and after high-temperature adaptive evolution

注：麦秆水解液固含量为 30%(w/w)，使用 *P. variotii* FN89 原始菌株在 37 °C、750 rpm、1 vvm、接种量 10% 的条件下进行液态生物脱毒。达到脱毒终点后分别直接接种原始菌株 *P. acidilactici* ZB220 和经过 45 °C 长期适应性进化的 *P. acidilactici* HT150 在 45 °C 条件下进行 L-乳酸发酵。L-乳酸发酵条件均为 45 °C、300 rpm、接种量 10% 和 pH 5.5。

4.3.4 高温脱毒菌与高温乳酸菌在乳酸发酵期间共存状态下的竞争性评估

经过高温长期适应性进化后所得的生物脱毒菌株——壮观丝衣霉 *Byssochlamys spectabilis* HT45 已具备了明显的耐高温性能，并且其耐受温度与常规乳酸发酵温度一致（均为 45 °C），故为了探究高温脱毒菌是否会对后续的高温乳酸发酵过程产生不利影响，尤其是观察其是否产生与高温适应性进化后的乳酸发酵菌（*P. acidilactici* HT150）竞争可发酵糖的行为，我们在高温脱毒之后进行了后续的乳酸发酵测试，并对这两种菌在发酵共存期间的生长情况进行了表征，结果如图 4.8 所示。图 4.8a 是对照组，展示的是高温适应性进化前的生物炼制脱毒菌和乳酸发酵菌（均为原始菌株）在乳酸发酵期间共存状态下的乳酸发酵情况和菌体生长情况，并且所进行的乳酸生物转化过程是极高温切换的过程（50 °C糖化→37 °C脱毒→42 °C发酵）。图 4.8b 是实验组，展示的是高温适应性进化后的生物炼制脱毒菌（*B. spectabilis* HT45）和乳酸发酵菌（*P. acidilactici* HT150）在乳酸发酵期间共存状态下的乳酸发酵情况和菌体生长情况，并且所进行的乳酸生物转化过程是极低温度切换的过程（50 °C糖化→45 °C脱毒→45 °C发酵）。我们发现，极低温度切换模式下采用高温适应性进化菌株在乳酸发酵共存期间，取得了优异的发酵结果（72 h 的乳酸发酵浓度高达 137.87 g/L）^[4, 80]，而且发酵期间乳酸菌明显更具生长优势。对比之下，极高温切换模式下的对照组，发酵期间乳酸菌同样更具生长优势，但“低温”脱毒之后在发酵起始损失了~7 g/L 葡萄糖和~5 g/L 木糖，最终的乳酸发酵指标也会低于实验组~10 g/L。

综上所述，生物脱毒菌 *P. variotii* FN89 在经历长周期高温适应性进化之后，即使拥有了良好的耐高温性能和脱毒性能，也基本不会在与高温适应性进化的乳酸菌共存的乳酸发酵期间对乳酸生产指标带来不利影响，并且脱毒菌的生长会受到乳酸菌的显著抑制。此外，实验组获得的更为优异的乳酸发酵结果也证明了这种通过对生物炼制菌株进行耐高温性强化（高温适应性进化）而实现的几乎零温度切换的生物转化模式（50 °C酶解糖化→45 °C生物脱毒→45 °C乳酸发酵），明显要优于目前干法生物炼制转化过程中的大范围温度切换模式（50 °C酶解糖化→37 °C生物脱毒→42 °C乳酸发酵）。该部分研究不仅为未来面向产业化应用的木质纤维素生物炼制倡导高温化生物转化生产提供了有利依据，也为未来的高温化、连续化生物转化生产提供了重要的生物炼制工程菌株和技术基础。

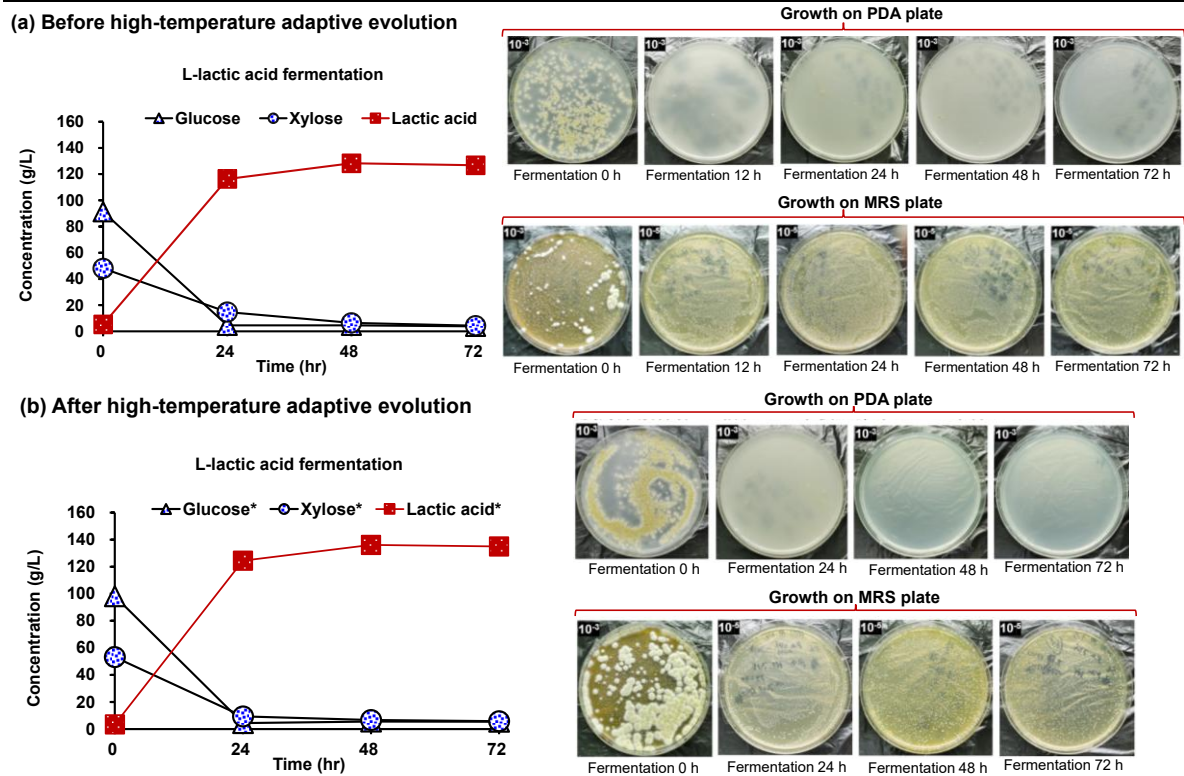


图 4.8 高温适应性进化前后的脱毒菌与乳酸菌在乳酸发酵期间共存状态下的竞争性评估

Fig.4.8 Competitive evaluation of biotransformation strain and lactic acid bacteria during co-cultivation in lactic acid fermentation before and after high-temperature adaptive evolution

注：(a) 生物脱毒和乳酸发酵出发菌株在乳酸发酵期间的竞争性评价；(b) 高温适应性进化后的生物脱毒和乳酸发酵菌株在乳酸发酵期间的竞争性评价。前者采用 30%(w/w)的麦秆糖化液，使用 *P. variotii* FN89 原始菌株在 37 °C、750 rpm、1 vvm、接种量 10%的条件下进行液态生物脱毒，到达脱毒终点后直接按照 10%(v/v)的接种量接种乳酸发酵原始菌株 *P. acidilactici* ZB220 的种子液在 42°C、300 rpm、pH 5.5 条件下发酵。后者采用 30%(w/w)的麦秆糖化液，使用经过高温适应性进化后获得的高温脱毒菌株壮观丝衣霉 *B. spectabilis* HT45 在 45 °C、750 rpm、1 vvm、接种量 10%的条件下进行液态生物脱毒，到达脱毒终点后直接按照 10%(v/v)的接种量接种经过高温适应性进化后获得的乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* HT150 的种子液在 45°C、300 rpm、pH 5.5 条件下发酵。生物脱毒菌和乳酸发酵菌共存期间取发酵原液用灭菌后的超纯水稀释 10³-10⁵ 倍后分别在 PDA 平板和 MRS 平板上进行涂布，随后将 PDA 平板置于 37 °C培养 24 h 后进行形态学观察并拍照，将 MRS 平板置于 42 °C培养 48 h 后进行形态学观察并拍照。

4.4 本章小结

本章为了解决当前木质纤维素干法生物炼制生产乳酸过程中出现的多工段温度不匹配的问题，即糖化、脱毒和乳酸发酵这三个阶段存在的大范围温度切换问题（50 °C→37 °C→42 °C），对目前的生物炼制脱毒菌株和乳酸发酵菌株的耐温性分别进行了强化，以实现整体温度几乎与糖化温度一致的糖化、脱毒、乳酸发酵生产过程。本章主要的结论如下：

（1）首先，在含有抑制物的麦秆水解液体系下通过高温梯度适应性进化的方式能够有效对生物脱毒出发菌株——宛氏拟青霉 *P. variotii* FN89 进行耐高温性强化，短时间内（进化 56 代，共 75 天）便可获得一株既耐受 45 °C 又具备良好脱毒能力的生物脱毒高温化菌株。

（2）其次，以高温适应性进化的方式交替使用液体合成培养基体系和已脱毒麦秆水解清液体系对乳酸发酵菌株 *P. acidilactici* ZB220 进行耐高温性强化（进化 150 代，共 218 天），最终获得了一株可耐受 45 °C 且发酵性能优异的乳酸菌 *P. acidilactici* HT150。

（3）利用这两株经过耐温性强化的生物炼制菌株进行 L-乳酸的高温生物炼制生产，几乎实现了从酶解糖化到生物脱毒再到 L-乳酸发酵阶段的温度的一致性（50 °C→45 °C→45 °C）。除此以外，与常规大范围温度切换模式下的生物炼制过程相比，这种极低温度切换模式下还能够获得相对较高的乳酸生产指标。

（4）这种通过适应性进化对生物炼制菌株的耐温性实现强化的手段进一步推进了干法生物炼制的连续化、产业化进程，有利于避免大型生物反应器因频繁温度调控而产生的巨大能耗和时间成本。

第 5 章 全过程能量自给的低成本秸秆糖浆的干法生物炼制生产

5.1 引言

为了实现碳中和经济和避免与人、畜争粮，未来众多的微生物发酵工厂将在国家政策和行业规范的引导下选择木质纤维素来源的可发酵糖（或糖浆）作为碳源。木质纤维素生物炼制加工链一般包括原料收集、预处理、糖化、脱毒、发酵和产物提纯等步骤^[65, 80, 167-169]。

目前基于木质纤维素原料生产可发酵糖浆的最为重要的挑战主要包括：(i) 预处理工段如何避免大量有毒废水的排放。常规的预处理技术固含量极低从而产生巨大的有毒废水排放^[33, 34, 170-173]，随之而来的是高难度的废水生化处理、高糖损失、大量抑制物外逸、高能耗以及设备腐蚀问题，从而形成生物炼制工业应用的直接障碍；(ii) 不消耗可发酵糖前提下选择性的抑制物有效去除。发酵糖中若含有高浓度的抑制物则会严重影响其发酵性能的核心指标，故必须彻底脱除影响发酵的抑制物才能使其拥有与淀粉糖相同的可发酵性能；(iii) 无需外部能量输入的生物炼制过程能量自给。对于木质纤维素糖浆的生产，需要经过诸多耗能工序（尤其是耗能明显的提浓工段），如果所需的能耗全部依靠外部能量输入将意味着高昂的发酵糖生产成本。如果提出的木质纤维素糖浆生产工艺技术不能彻底解决以上这些挑战，那么最终必定会归结到一个最为关键的问题上，即木质纤维素糖浆的高生产成本。

为了解决第一个大量有毒废水排放的挑战，本研究采用干法生物炼制技术中的高固含量干酸预处理技术来避免大量有毒废水的排放^[62, 76]。首先，干酸预处理的固液比高达 2:1（反应体系固含量~70%），是一个干料进、干料出的过程，因此整个过程无任何游离废水产生；其次，干酸预处理过程不使用任何有毒溶剂，仅使用少量酸催化剂（20-40 mg/g 干物质）和饱和蒸汽，并且所用的酸催化剂以及反应期间产生的抑制物最终都均匀分布于预处理后的干固物料当中，不会产生任何液体相或固体相的有毒废物，所造成的设备腐蚀水平也是极低的^[62, 68, 80, 81, 146, 174]。因此，基于木质纤维素原料生产可发酵糖浆时，在预处理工段使用干酸预处理技术完全可以避免大量有毒废水的排放。

为了解决第二个抑制物脱除的挑战，本研究采用干法生物炼制技术中的液态生物脱毒法^[80]。首先，我们采用的是一些优先利用抑制物而不是可发酵糖的高效脱毒微生物（如宛氏拟青霉 ZW70 和壮观丝衣霉 HT45 等）；其次，这些脱毒微生物能够将抑制物终极降解为二氧化碳和水，而非简单地将抑制物脱除至低毒形态；最后，整个抑制物去除过程是一个低成本且可控的过程，无需添加任何营养物质，不仅脱毒时间很短（12~36 h），而且脱毒终点可通过 pH 的变化来实时监测，因此可极大程度上将抑制物去除阶段的可发酵糖损失控制在极低水平^[80]。

为了解决第三个能量自给挑战,本研究通过利用木质纤维素原料干法生物炼制过程所产生的具有高热值的木质素残渣来满足糖浆生产整体工艺过程的蒸汽和电能消耗。过去研究中的能量衡算结果显示,通过生物质锅炉燃烧木质素固体残渣产生的碳中性热能(存在形式为饱和或过热蒸汽)在满足干法生物炼制过程和废水全蒸发处理的所有热能需求后,还能产生额外的热量输出(每吨干麦秸(DM)产生 1.098 ~ 4.772 GJ)^[162]。根据能量等效换算,1 GJ 相当于 277.8 kWh 的电,如果按照锅炉燃烧效率 80%和发电效率 85%来算,这部分热能可以产生 207.4~901.4 kWh 的电^[13, 49, 175]。因此,基于干法生物炼制技术的糖浆生产工艺过程有望通过木质素残渣的利用实现能量自给。

最后,本研究根据所提出的秸秆糖浆生产技术路线为案例,对整体过程进行了详细的能量衡算和技术经济性分析,并与工业上常规的葡萄糖生产工艺成本进行比较,发现结果极具可比性。因此,本研究所提出的秸秆糖浆生产的整体技术路线的可行性良好,实现了由废弃秸秆生物质低碳、环保、可持续地生产高浓度可发酵秸秆糖浆,并且所生产的秸秆糖浆可以应用于各类生物基化学品和液体燃料的碳中和生产。

5.2 材料与amp;方法

5.2.1 原料

本研究中使用的木质纤维素原料为小麦秸秆,产自山西阳曲县,收获于 2024 年。将麦秆在凯赛生物技术有限公司位于山西综改区工厂的 10 m³ 工业规模预处理反应器内进行干酸预处理操作之后再运往本实验室。按照 NREL 的两步酸解法(TP-510-42618)对该批预处理麦秆的组分进行测定^[139],结果显示:其可发酵糖组分及含量为葡聚糖 34.85% ± 0.94%、木聚糖 2.80% ± 0.29%、葡寡糖 4.50 ± 3.30 mg/g DM、木寡糖 15.33 ± 7.71 mg/g DM、葡萄糖 63.94 ± 0.21 mg/g DM 和木糖 123.90 ± 0.56 mg/g DM; 主要抑制物组分及含量为乙酸 26.95 ± 3.91 mg/g DM、5-羟甲基糠醛 4.17 ± 0.13 mg/g DM 和糠醛 11.47 ± 0.29 mg/g DM。

甘蔗糖蜜产自广西南宁,购于 2025 年 3 月。总糖质量占比 47.49% ± 0.45%,其中蔗糖质量占比 38.98% ± 0.17%,葡萄糖和果糖等还原糖的质量占比合计为 8.51% ± 0.28%。使用比重瓶测得甘蔗糖蜜在常温条件下的密度为 1.423 ± 0.004 g/cm³。

玉米于 2024 年春季收获于中国吉林省长春市,经干磨、过筛(60 目,筛孔直径 0.3 mm)后成玉米粉后装入密封塑料袋中储存。玉米粉的淀粉含量经 Ewers 偏振法(国际标准方法:ISO 10520)测定为 76.9%,蛋白质含量经 Bradford 法测定为 16.1% (均基于干重)^[141]。

5.2.2 酶和试剂

纤维素酶 Cellic CTec 3.0,购自 Novozymes(北京,中国),其蛋白质浓度为 90.1 mg/mL^[141]。耐高温 α -淀粉酶 HTAA 和糖化酶(葡萄糖淀粉酶) GA-L NEW 均购自

Genencor (江苏, 中国), 其酶活分别为 22,000 U/mL 和 103,900 U/mL (根据生产商的产品规格说明)。

酵母膏和蛋白胨均购自 Oxoid 公司 (汉普郡, 英国)。葡萄糖等化学试剂购自上海泰坦科技股份有限公司。

总酚测定试剂盒和还原糖测定试剂盒均购自苏州格锐思生物科技有限公司。

5.2.3 菌种和培养基

生物脱毒所用的脱毒菌株为宛氏拟青霉 *Paecilomyces variotii* ZW70 (CCTCC M 20241863), 该菌是出发菌株宛氏拟青霉 *P. variotii* FN89 (CGMCC 17665) 长期处于抑制物体系进行适应性进化后得到的进化菌株^[166]。*P. variotii* ZW70 先在 PDA 固体培养基平板上进行初步的活化 (37 °C 培养 2~3 天), 然后在改进的 SM 液体合成培养基中以 37 °C、300 rpm 的条件进一步扩培 *P. variotii* ZW70。菌株的扩培过程如下: (i) 用 10 mL 0.05%(w/w) 的 Tween-80 溶液洗脱 PDA 平板上的 *P. variotii* ZW70 孢子, 然后转移到装有 100 mL SM 液体培养基的 500 mL 摇瓶内; (ii) 置于 37 °C、300 rpm 好氧培养 24 h, 从而获得成熟的 *P. variotii* ZW70 种子液。脱毒阶段使用的种子培养基如下: (1) PDA 固体培养基: 去皮马铃薯 200 g/L, 一水葡萄糖 22 g/L, 琼脂 25 g/L; (2) 改进的 SM 液体合成培养基: KH_2PO_4 2 g/L、 CaCO_3 1 g/L、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L、酵母粉 1 g/L、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L、一水葡萄糖 22 g/L。

乙醇发酵所用的发酵菌株为在麦秆水解液中经过 91 天温度适应性进化的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* Z100^[112], 其出发菌株为具备多种糖共利用能力的 *S. cerevisiae* XH7^[74, 176]。将 -80 °C 冰箱保存的 *S. cerevisiae* Z100 菌株取出并用 YPD 培养基活化 24 h (30 °C, 200 rpm 摇床内培养), 随后取出 10%(v/v) 的种子液在新鲜的 YPD 培养基内继续活化 24 h (30 °C, 200 rpm 摇床内培养)。在种子三次活化阶段, 采用 15% 固含量的脱毒后的秸秆糖化液作为发酵前的活化培养基, 接种量为 10%(v/v), 仍在 30 °C、200 rpm 摇床内培养 24 h。乙醇发酵的种子培养基和发酵营养盐配方如下: (1) 种子活化阶段 YPD 培养基配方: 22 g/L 一水葡萄糖、10 g/L 蛋白胨、20 g/L 酵母粉; (2) 乙醇 SSCF 阶段营养物质: 酵母粉 10 g/L、磷酸氢二钾三水合物 2.6 g/L、硫酸铵 2 g/L、硫酸镁七水合物 1 g/L。

L-乳酸发酵所用的发酵菌株为经过高温适应性进化的乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* HT150 (CCTCC M 20251092)。该菌的出发菌株是 *P. acidilactici* ZY271 (CGMCC #13611)^[143], 首先在多种单糖共存的液体合成培养基体系下进行 220 代的适应性进化^[161], 然后置于 45 °C 的麦秆脱毒水解液中进行 150 代的适应性进化后获得该发酵菌株。它是一株可以完全协调地利用木质纤维素衍生的可发酵单糖来高效合成 L-乳酸的发酵菌株。将 -80 °C 冰箱保存的 *P. acidilactici* HT150 菌株取出并用 MRS 培养基活化 6 h (42 °C, 150 rpm 摇床内培养), 随后取出 10%(v/v) 的一级种子液在新鲜的 MRS 培养基内继续活化 6 h (42 °C, 150 rpm 摇床内培养)。在种子二次活化阶段, 加入 1%(v/v) 的糖化酶以防止絮凝现象的发生, 并加入相当于二次

活化培养基中总糖质量 60%的碳酸钙粉末。乳酸发酵的种子培养基和发酵营养盐配方如下：(1) 种子活化阶段 MRS 培养基配方：22 g/L 一水葡萄糖、10 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母粉、5 g/L 乙酸钠、2 g/L 柠檬酸氢二铵和 2.6 g/L 磷酸氢二钾三水合物、0.58 g/L 硫酸镁七水合物、0.25 g/L 硫酸锰一水合物；(2) 乳酸 SSCF 阶段营养物质：酵母粉 20 g/L、柠檬酸氢二铵 2 g/L、硫酸锰一水合物 0.25 g/L。

油脂发酵所用的发酵菌株为经过超离心力长期适应性进化的皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* YY52E。将-80℃冰箱保存的 *T. cutaneum* YY52E 菌株取出并用 YPD 固体培养基平板活化 2 天（30 °C 培养箱培养），随后挑取单菌落在新鲜的 YPD 液体培养基内活化 12 h（30 °C，200 rpm 摇床内培养）。随后以 10%(v/v) 接种量接种于液体合成培养基中，并在 30 °C，200 rpm 摇床内培养 5 天，然后用于 3L 罐发酵，发酵条件为 30 °C、600 rpm、1 vvm。油脂发酵的种子培养基和发酵营养盐配方如下：(1) 种子活化阶段 YPD 培养基配方：22 g/L 一水葡萄糖、20 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母粉；(2) 种子活化阶段液体合成培养基配方：110 g/L 一水葡萄糖、1.0 g/L KH_2PO_4 、1.0 g/L 酵母粉、1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ，and 0.44 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ；(3) 油脂发酵阶段营养物质：1.0 g/L KH_2PO_4 、1.0 g/L 酵母粉、1 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，and 0.44 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 。

5.2.4 干酸预处理

干酸预处理操作在凯赛生物有限公司位于山西太原综改区的工厂内进行，所用预处理反应器的容积为 10 m³，包含一个螺带式搅拌装置。通过基准 pH 法确定预处理过程中所需酸催化剂（硫酸）的用量为 38 mg/g 干秸秆^[67]。预处理的固液比，即预处理反应器中固体部分（干秸秆）与液体部分（秸秆中的水分和硫酸溶液）的质量比接近 2:1(w/w)，实际工作时反应器内部填充率接近 100%。每次预处理结束可得到 800~900 kg 的预处理物料，固含量均在 50%左右（具体为 53.40%）。预处理工艺的具体操作参数为：实际维持温度为 175 °C ± 1 °C，实际维持压力为 0.8-0.9 MPa，反应停留时间为 3 min，螺带桨搅拌转速为 10 rpm，初始蒸汽的绝对压力为 1.1 MPa^[81, 146]。

5.2.5 酶解糖化

在 5L 螺带式搅拌反应器中对预处理麦秆进行酶解糖化。糖化之前，用 20%(w/w) 的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 液浆将预处理麦秆的 pH 调至 5.5 左右，然后根据预糖化体系所要达到的固含量水平（15%~30%(w/w)），计算糖化过程中预处理物料、水和纤维素酶的用量。糖化温度为 50 °C，转速为 200 rpm，纤维素酶的用量为 4 mg 酶蛋白/g 干麦秆。在预处理物料的加料过程中需要实时观察糖化效果，一般在 1~2 h 内完成加料，总糖化时间控制在 72 h。

在 1L 锥形瓶中对玉米粉进行酶水解（体系固含量为 20%-25%(w/w)），包括液化和糖化这两个步骤。其中，液化过程采用 α -淀粉酶 HTAA，酶用量为 44 FPU/mL，在 90 °C、200 rpm 条件下反应 12 h；糖化过程采用葡萄糖淀粉酶 GA-L NEW，酶用量为

200 FPU/mL, 在 60 °C、200 rpm 条件下反应 24 h^[77]。

5.2.6 液态生物脱毒

在 3L 六直叶 Rushton 搅拌桨反应器中对糖化 72h 后所得的含有乙酸、糠醛和 HMF 等抑制物的糖化液进行生物脱毒。采用 *P. variotii* ZW70 作为生物脱毒菌, 具体的脱毒参数包括: 温度 37 °C, 脱毒转速 750 rpm, 无菌空气通气速率 1 vvm, 接种量为 10% (v/v), pH 不做任何调整和控制。待设定的反应器参数稳定后, 接入成熟的宛氏拟青霉 *P. variotii* FN89 扩培种子液, 启动液态生物脱毒。脱毒过程中实时监测体系 pH 的变化, 以 pH 即将达到峰值作为脱毒终点的判断标准^[80]。当发现 pH 上升迅速且一段时间后上升缓慢时, 即意味着 pH 即将达到峰值, 此时脱毒已经结束。

5.2.7 糖浆的精制

立刻将达到脱毒终点的脱毒水解液进行离心处理, 离心转速为 8000 rpm, 离心时间为 15 min。使用旋转蒸发仪配合真空泵对离心后获得的低糖浓度的清液进行减压蒸发浓缩以生产高糖浓度的秸秆糖浆。旋转蒸发所用的旋蒸玻璃瓶容积为 3 L (使用时的装液体积为 1L), 废液收纳瓶体积为 1L。旋转蒸发所用的温度为 110 °C, 使用真空泵进行减压操作, 工作期间的最大真空度可保持为绝对压力 0.003-0.005 MPa 左右。

5.2.8 乙醇、乳酸及油脂发酵

乙醇发酵在 3L 六直叶 Rushton 搅拌桨反应器中进行。将上述所制得的浓缩秸秆糖浆用无菌水稀释至总糖浓度为~180 g/L 后加入 3L 罐中, 装液体积为 1L。设置发酵温度 30 °C、转速 300 rpm, 参数稳定后加入乙醇发酵营养盐和酿酒酵母菌的二级活化种子液, 开始乙醇发酵。在乙醇批次发酵过程中, 发酵体系将根据设定的 pH 值 (5.5) 自动添加 6M NaOH 溶液。

L-乳酸发酵在 3L 六直叶 Rushton 搅拌桨反应器中进行。将上述所制得的浓缩秸秆糖浆用无菌水稀释至总糖浓度为 180 g/L 后加入 3L 罐中, 装液体积为 1L。设置发酵温度 45 °C、转速 300 rpm, 参数稳定后加入乳酸发酵营养盐和乳酸菌的二级活化种子液, 开始乳酸发酵。在乳酸批次发酵过程中, 发酵系统将根据设定的 pH 值 (5.5) 自动添加 25(w/w) Ca(OH)₂ 液浆。

油脂发酵在 3L 六直叶 Rushton 搅拌桨反应器中进行。将上述所制得的浓缩秸秆糖浆用无菌水稀释至总糖浓度为 180 g/L 后加入 3L 罐中, 装液体积为 1L。设置发酵温度 30 °C、转速 600 rpm, 参数稳定后加入油脂发酵营养盐和 *T. cutaneum* YY52E 的二级活化种子液, 开始油脂发酵。在油脂批次发酵过程中, 发酵系统将根据设定的 pH 值 (5.0) 自动添加 2 M H₂SO₄ 和 6 M NaOH。

5.2.9 麦秆糖浆的长期储存

将制得的麦秆糖浆 (总糖浓度~600 g/L) 混匀后分装于 6 个容积均为~2 L 的乳白色食品级高密度聚乙烯塑料桶 (长 157 mm×宽 104 mm×高 203 mm), 每桶装 1 kg 左右糖浆, 随后拧紧盖子静置存放于 4 °C 冰箱内进行为期 6 个月的储存。储存期间每隔 1 个月取出一桶糖浆进行形态学观察 (观察是否染菌) 并拍照记录, 随后采用 HPLC

对糖浆的可发酵糖（葡萄糖和木糖）浓度进行测定，再采用 pH 计和比重瓶分别对糖浆的 pH 和密度进行测定（密度测定方法参考中华人民共和国国标 GB 5009.2-2024），最后采用粘度计（Brookfield, DV2TLVTJ0）对其表观粘度进行测定（样品量 5 mL、剪切速率 43.5 s^{-1} ）^[102]。

5.2.10 分析方法

使用 HPLC 测定甘蔗糖蜜及其发酵样品中的蔗糖、葡萄糖、果糖的浓度。配备的是 LC-20AD 色谱泵，RID-10A 示差折光检测器和 HPX-87P 色谱柱（Biorad, Hercules, CA, USA），流动相采用超纯水（已高温灭菌且超声脱气），流速为 0.6 mL/min，柱温为 80 °C。其他样品中的葡萄糖、木糖、乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛、乳酸和乙醇的浓度均通过高效液相色谱法进行测定^[4, 76]，所用的 HPLC 装配有 LC-20AD 色谱泵（岛津，日本）、Aminex HPX-87H 色谱柱（Bio-Rad）和 RID-10A 示差折光检测器（岛津，日本）。流动相采用 5mM H₂SO₄，流速为 0.6 mL/min，柱温为 65 °C。

乳酸发酵液样品中的 L-乳酸含量通过高效液相色谱法测定。液相色谱仪型号为 SPD-20A（岛津，日本），手性色谱柱型号为 MCI GEL CRS10W（日本三菱，4.6 mm×50 mm），UV 检测器检测波长为 254 nm，柱温为 25 °C，流动相为 2 mM 的 CuSO₄ 水溶液，流速为 0.5 mL/min。

将 10 mL 皮状丝孢酵母 *Trichosporon cutaneum* YY52E 油脂发酵液在 12,000 rpm 的条件下离心 3 min，随后采用超纯水洗涤菌体后置于 65 °C 条件下烘干至恒重，测得细胞干重（DCW）。对于油脂提取的方法，取 10 mL 发酵液在 80 °C 下加热 3 h，随后采用超声波细胞粉碎机（JY92-IIN，宁波新芝生物科技股份有限公司）在 360 W、功率 60%、20 °C、变幅杆直径 6 mm 的参数下进行细胞破碎。破碎 6 min 后添加 14 mL 氯仿和 7 mL 甲醇在 30 °C、200 rpm 摇床振荡 3 h 后离心（12,000 rpm, 3 min），然后收集氯仿层后进行真空旋蒸和烘干。根据油脂质量/发酵液体积可计算出发酵液的油脂浓度指标（g/L），根据油脂质量/DCW × 100% 可计算出油脂含量（%）。

收集糖化、脱毒、固液分离后的带有大量水分的木质素残渣。首先用去离子水对其进行洗涤后再次离心取残渣，随后将湿残渣置于 65 °C 烘箱烘至恒重，最后将烘干后的残渣研磨成细粉后装袋。根据中国国家标准 GB/T 30727-2014，使用恒温式氧弹量热仪（MMC 274 multi-module, Netzsch Co, Fresitaat Bayerm, Germany）测定木质素残渣的发热值^[49]。

5.2.11 过程模拟和技术参数设定

采用 Aspen Plus 对秸秆糖浆生产工艺全过程的能耗和成本进行分析^[162]。计算过程涵盖秸秆糖浆生产路线中的预处理、糖化、脱毒、固液分离、蒸发浓缩等步骤。其中，前处理（A100）、干法生物炼制（A200）和纤维素酶生产（A400）等阶段的流程模拟参考了 Wang 等的研究结果^[13]。简而言之，A100（Pre-handling）包括原料拆包、粉碎、除尘等步骤，最终得到圆直径 10mm 的秸秆；A200（Dry biorefining）包括干酸预处理、酶解糖化、液态生物脱毒、固液分离等步骤，最终得到木质素残渣和去除抑

制物的低糖浓度秸秆水解清液；A400 (Enzyme production) 包括纤维素酶生产菌株的培养和发酵，制备纤维素酶粗酶液。A500 和 A600 分别模拟的是糖液精制过程和木质素残渣燃烧供热的生物质锅炉。基于 Aspen Plus 流程模拟，可以计算麦秆糖浆生产工艺的各主要工段的电耗和蒸汽能耗。

5.3 结果与讨论

5.3.1 秸秆糖浆生产技术路线及全过程物料衡算

本研究提出了一条从小麦秸秆出发生产可发酵麦秆糖浆的干法生物炼制生产路线，主要包括干酸预处理、酶解糖化、液态生物脱毒、固液分离、减压蒸发浓缩等步骤，如图 5.1 所示。具体而言：(i) 经过前处理（如粉碎和除尘）后的小麦秸秆原料与硫酸溶液进入带有螺带搅拌结构的预处理反应器内，随后配合饱和蒸汽在 $\sim 175\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行干酸预处理，得到干固颗粒状的预处理麦秆物料（固含量高达 $\sim 50\%$ ）。整个干酸预处理过程没有任何溶剂或者复杂化合物添加，同时也没有任何有毒废水和固废产生，因此彻底解决了糖浆生产的第一个挑战，即完全避免了预理工段大量有毒废水的排放。(ii) 干酸预处理后的麦秆物料进入糖化反应器，与氢氧化钙液浆和水混合后在纤维素酶的作用下进行充分的酶解糖化以释放可发酵单糖，得到一种含有可发酵糖以及发酵抑制物的低粘度糖化液。(iii) 含有糖和抑制物的糖化液进入脱毒反应器内，在脱毒真菌的作用下选择性地对抑制物进行快速脱除，得到无味喃醛抑制物残留的低糖浓度糖化液，且脱毒期间糖损失极低。(iv) 低糖浓度糖化液经过板框压滤等固液分离手段得到木质素残渣和澄清的低糖水解液。(v) 木质素残渣在适当干燥后具有很高的燃烧热值（相当于原煤燃烧热值， 20.9 GJ/ton ）^[49, 177]，可以用于蒸汽生产和发电等。(vi) 低糖水解液经过多效蒸发浓缩等提浓手段得到高糖浓度秸秆糖浆，用于后续的乙醇、乳酸和油脂等生物基化学品的发酵生产。

为了对所提出的秸秆糖浆生产工艺进行初步评价，我们进行了完整的实验室规模的秸秆糖浆生产实验。首先，对干酸预处理后的麦秆进行为期 3 天的酶解糖化实验（糖化体系固含量分别为 15%、20%、25% 和 30% (w/w)）；随后，对所获得不同体系固含量的麦秆糖化液分别进行液态生物脱毒、固液分离实验操作；最后，通过减压蒸发浓缩实验对应获得 4 份总糖浓度均接近 600 g/L 的麦秆糖浆。

随后在所获得的实验数据基础之上对秸秆糖浆生产工艺全过程进行严格的物料衡算，结果如图 5.2 所示。以 15% (w/w) 的酶解糖化体系固含量为例来说明整体秸秆糖浆生产工艺过程的物料衡算结果。从原始小麦秸秆（含水量 20%，秸秆总糖占比 47.3%）出发，经预处理、酶解糖化（72 h）和液态生物脱毒（25 h）后得 2.228 kg 的麦秆脱毒液，其中的葡萄糖和木糖得率分别占原始秸秆总糖的 94.4% 和 64.8%。随后经过固液分离得低糖浓度麦秆水解清液 1.748 kg 以及湿木质素残渣 0.476 kg ，总糖得率降低至 70%，约有 14% 的秸秆总糖进入了木质素残渣中，无法以低成本的手段进行回收利用。最终， 1.748 kg 的 15% 水解清液经蒸发浓缩得到 0.292 kg 浓缩糖浆和 1.448 kg 蒸馏水，

所得糖浆中的总糖含量为 46.82%，其中葡萄糖和木糖含量分别为 34.72%和 12.10%。

为了在秸秆糖浆生产过程中获得相对较高的总糖回收率，我们计算并比较了不同糖化体系固含量条件下进行糖浆生产过程各工段的总糖回收率，结果如图 5.2 所示。可见：（i）无论在酶解糖化阶段采用哪种体系固含量，预处理阶段均会损失秸秆总糖的~10%（其中主要是木糖的损失，约占总糖损失的 98%）；（ii）酶解糖化和液态生物脱毒阶段的秸秆总糖损失均比较低，分别损失 1%-2%和 1.5%-3.5%；（iii）固液分离均是整个秸秆糖浆生产工艺中发生糖损失率最高的阶段（损失秸秆总糖的 14%-27%），并且随着酶解糖化阶段所用体系固含量的升高，固液分离阶段所产生的糖损失率也在逐渐升高。例如，当酶解体系固含量为 15%(w/w)时，固液分离阶段的总糖损失为 14.2%，而当固含量为 30%(w/w)时高达 27%。我们认为发生这一现象是因为木质素残渣对体系中的可发酵糖具有很强的吸附能力，并且木质素残渣产生量随着固含量的升高而增加，故因吸附作用所带离的糖总量也随之增加。

总体而言，本研究提出的麦秆糖浆干法生物炼制生产路线有效解决了糖浆生产的第一个挑战，即完全避免了预理工段大量有毒废水的排放，并且不论采用何种酶解体系固含量进行糖浆生产，若对固液分离产生的木质素残渣中的糖进行回收均是不经济的，因为这样不仅会增加额外的分离步骤和操作成本，而且还会大量增加新鲜水投入和废水处理成本。此外，随着酶解体系固含量的降低，虽然生产秸秆糖浆的总糖回收率会逐渐提高，但同时也会伴随设备固定投资的增加和蒸发浓缩阶段能耗的增加（即总体成本的增加），因此在酶解体系固含量的选择上可能存在一个兼具高总糖回收率和低生产成本的合适平衡点。

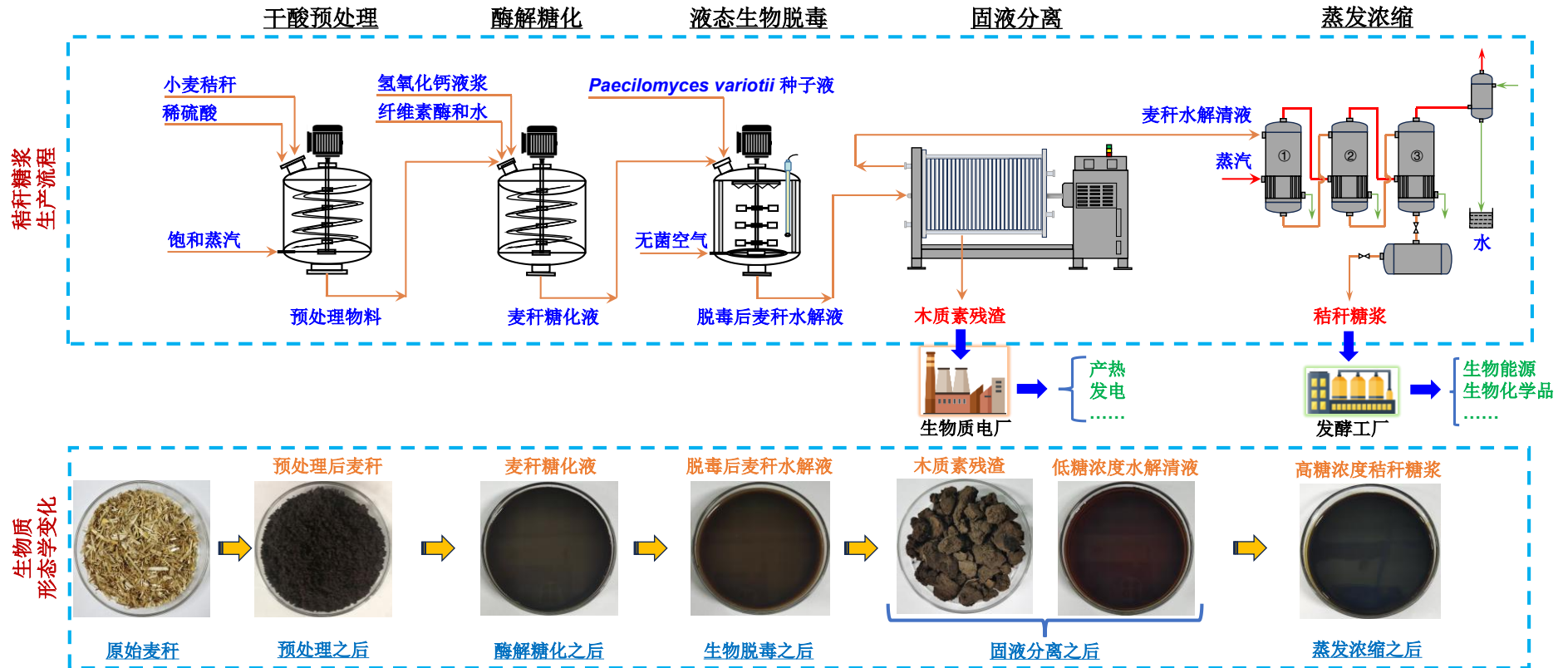
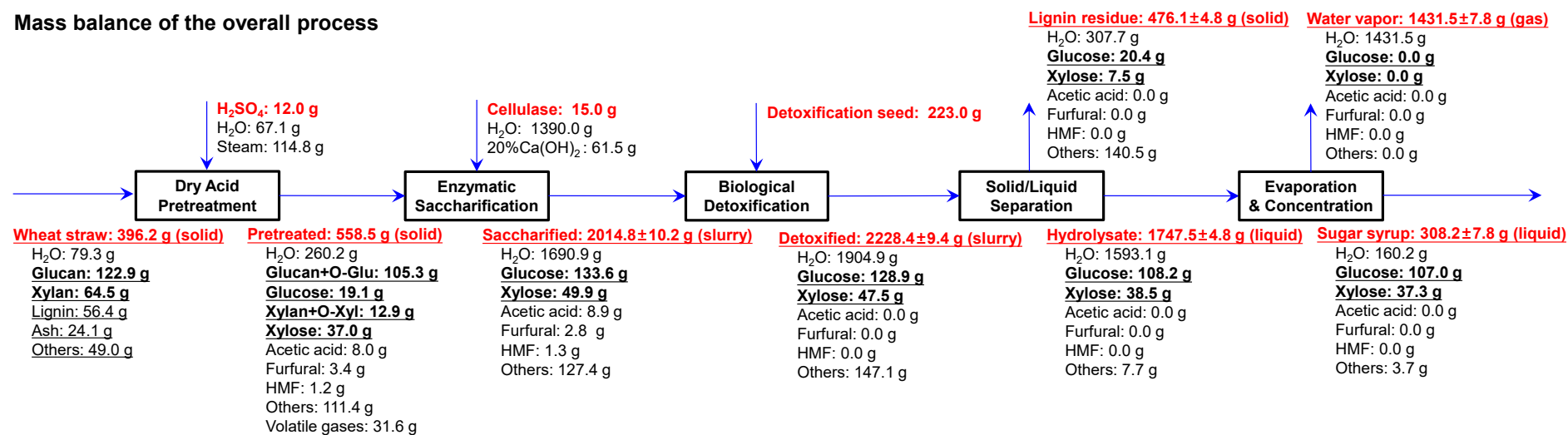


图 5.1 基于干法生物炼制过程的秸秆糖浆生产流程示意图

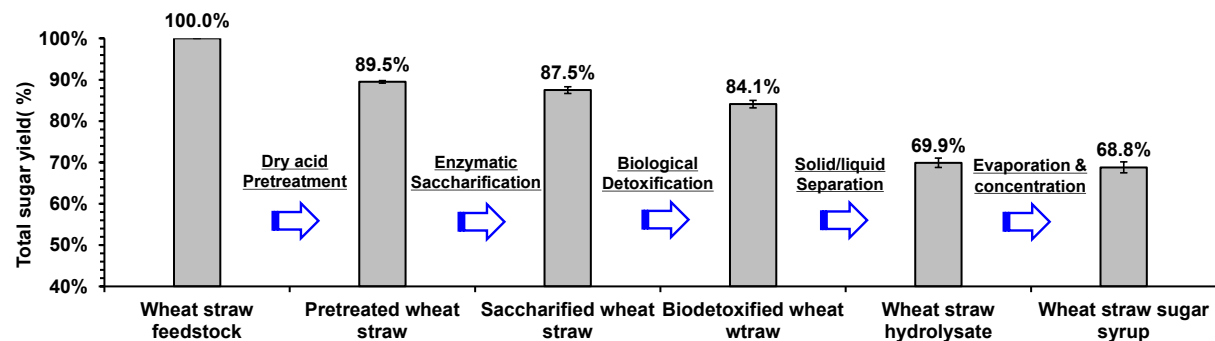
Fig. 5.1 Schematic diagram of straw syrup production process based on dry biorefining process

(A) Wheat straw sugar syrup production by dry biorefining under 15% (w/w) solids loading of saccharification

Mass balance of the overall process

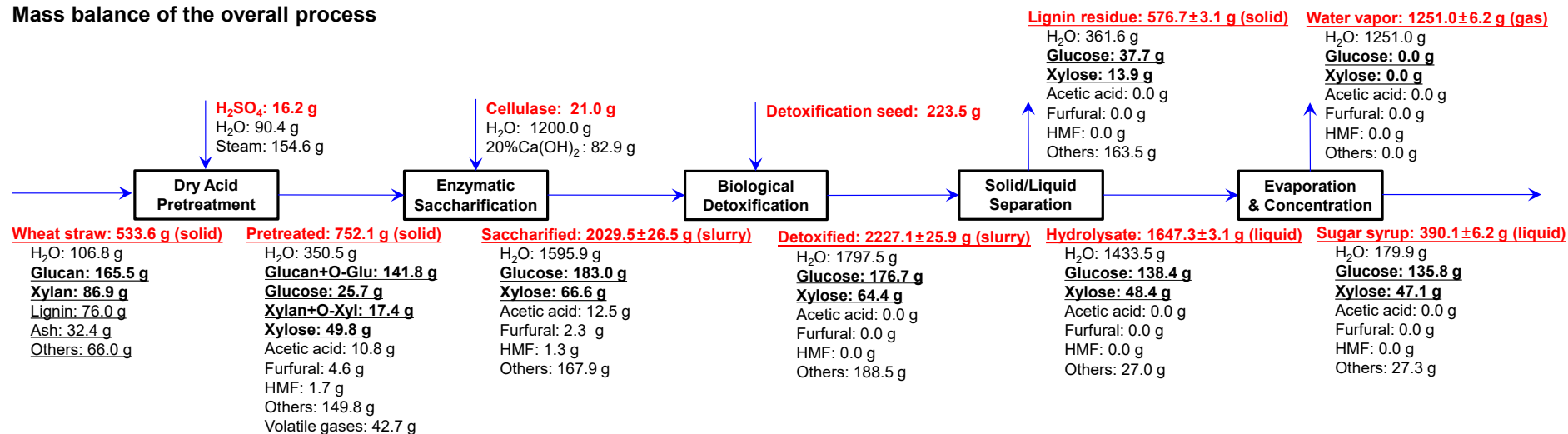


Total sugar yields at each stage

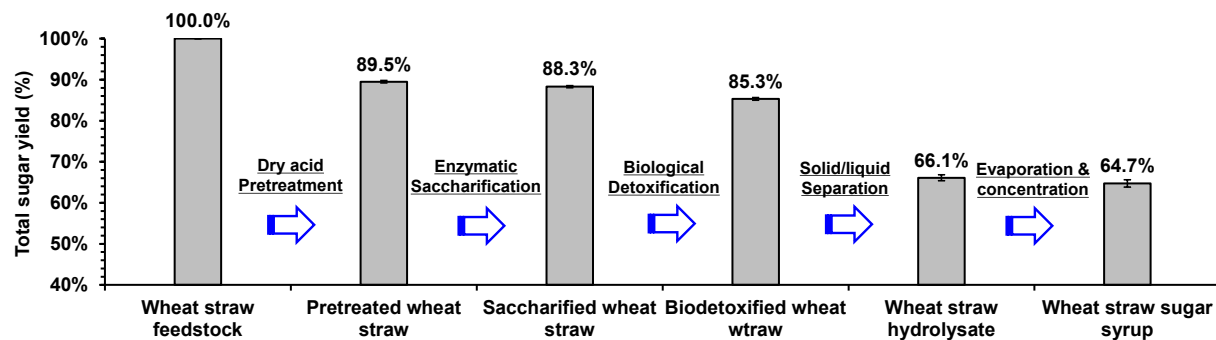


(B) Wheat straw sugar syrup production by dry biorefining under 20% (w/w) solids loading of saccharification

Mass balance of the overall process

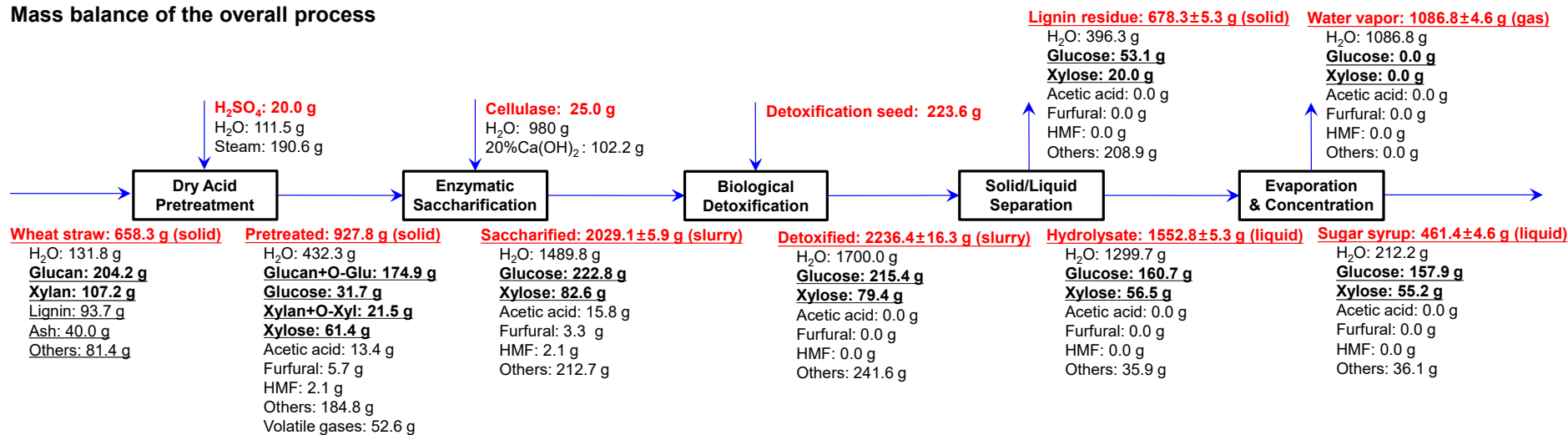


Total sugar yields at each stage

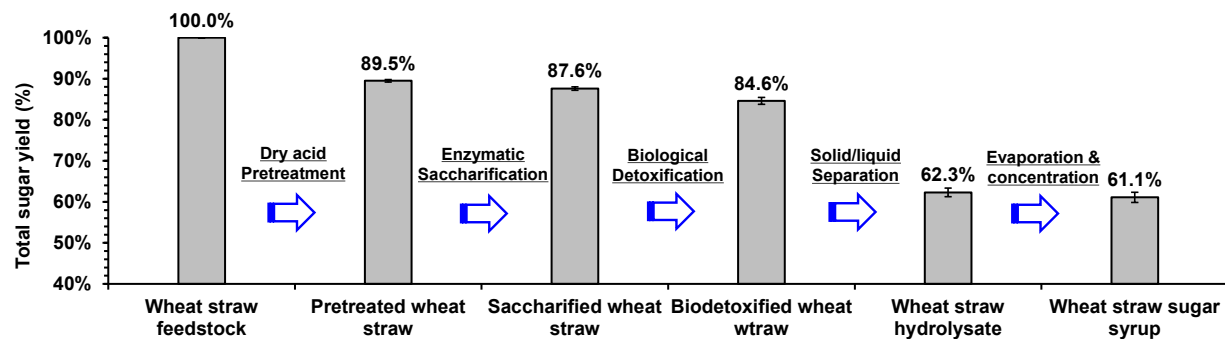


(C) Wheat straw sugar syrup production by dry biorefining under 25% (w/w) solids loading of saccharification

Mass balance of the overall process

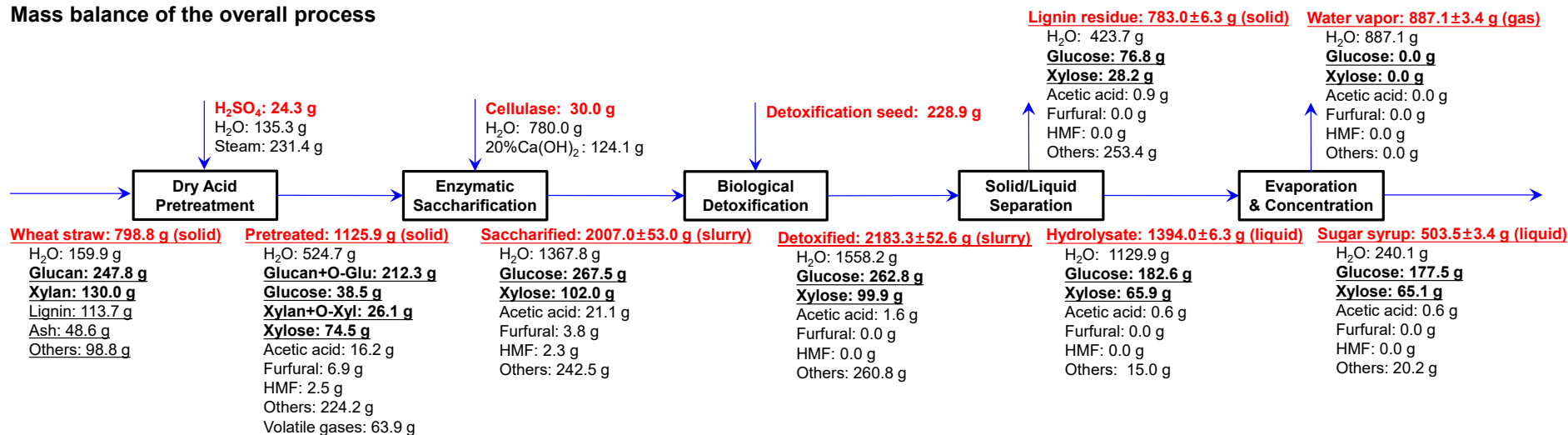


Total sugar yields at each stage



(D) Wheat straw sugar syrup production by dry biorefining under 30% (w/w) solids loading of saccharification

Mass balance of the overall process



Total sugar yields at each stage

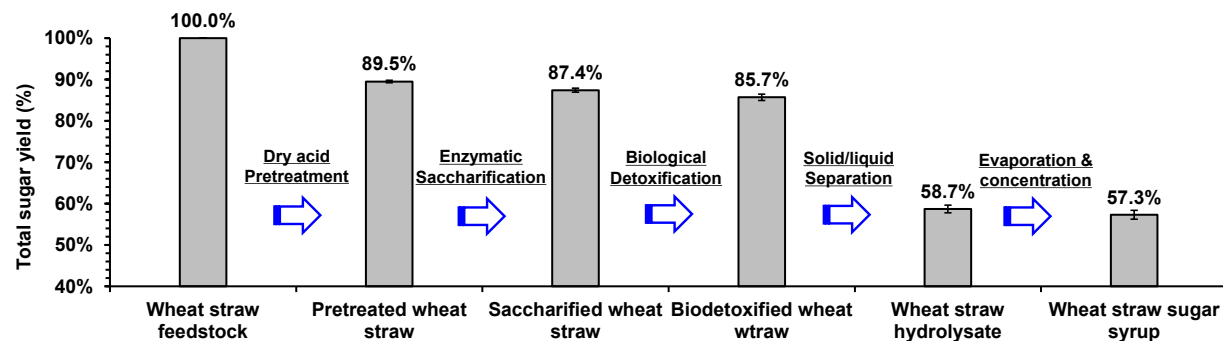


图 5.2 不同起始糖化固含量条件下分别进行秸秆糖浆生产的全过程物料衡算及各工段的糖回收率

Fig. 5.2 Whole-process mass balance and sugar yields at each stage during wheat straw syrup production with varied solid content saccharification system

注: (A) 15%(w/w)固含量糖化条件下生物炼制生产麦秆糖浆; (B) 20%(w/w)固含量糖化条件下生物炼制生产麦秆糖浆; (C) 25%(w/w)固含量糖化条件下生物炼制生产麦秆糖浆; (D) 30%(w/w)固含量糖化条件下生物炼制生产麦秆糖浆。具体实验条件: (i) 基于 5L 螺旋桨式糖化反应器在 50 °C、200 rpm、纤维素酶用量 4 mg 酶蛋白/g 干物料的条件下对干酸预处理后的麦秆进行为期 3 天的酶解糖化实验(糖化体系固含量分别为 15%、20%、25%和 30%(w/w))，

获得不同糖浓度和抑制物浓度的麦秆糖化液(糖和抑制物浓度随糖化体系固含量梯度增加);(ii) 基于 3L 六直叶桨式脱毒反应器采用脱毒真菌 *Paecilomyces variotii* ZW70 在接种量 10%(v/v)、37 °C、750 rpm、通气速率 1 vvm 的条件下分别对这些麦秆糖化液进行液态生物脱毒, 获得无味喃醛残留的不同糖浓度的麦秆脱毒液; (iii) 基于高速离心机在 8,000 rpm、15 min 的条件下分别对上述麦秆脱毒液进行固液分离操作, 获得不同糖浓度的麦秆脱毒清液和相应的木质素残渣; (iv) 基于旋转蒸发仪和真空泵在 110 °C、工作期间最大真空度保持为绝对压力 0.003-0.005 MPa 的条件下分别对上述麦秆脱毒清液进行减压蒸发浓缩操作, 最终对应获得 4 份总糖浓度均接近 600 g/L 的麦秆糖浆。计算某一步骤的总糖得率, 具体方法是将该步骤得到的物料中葡聚糖/葡萄糖和木聚糖/木糖的总质量之和除以麦秆中葡聚糖/葡萄糖和木聚糖/木糖的总质量之和。

5.3.2 秸秆糖浆的发酵性能、稳定性和可运输性能评价

为了评价所制得的高糖浓度麦秆糖浆的可发酵性能，我们将其与甘蔗糖蜜、葡萄糖（来自于玉米粉水解）等常见发酵原料进行对比，分别以这三种可发酵原料为基础碳源进行乙醇发酵、乳酸发酵和油脂发酵（如图 5.3abc 所示），随后从发酵指标、发酵速率以及发酵得率这三个维度来综合评价秸秆糖浆的发酵性能。将所制得的秸秆糖浆和市售甘蔗糖蜜稀释至总糖浓度为 180 g/L 后分别用于乙醇发酵、乳酸发酵和油脂发酵，玉米粉则按照 20%-25%的体系固含量进行酶水解（得到~180 g/L 葡萄糖）后再同样进行上述三种发酵过程。

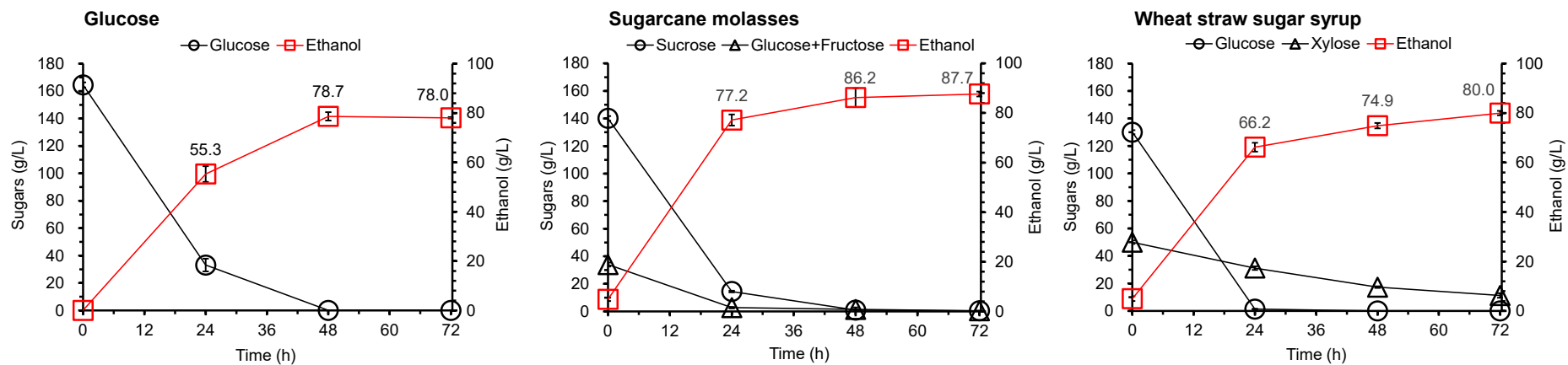
如图 5.3a 所示，以乙醇发酵为例，秸秆糖浆与甘蔗糖蜜以及玉米粉水解液的发酵性能基本一致，发酵终点的乙醇浓度差距和发酵速率的差距均不超过 10%，发酵得率（g 乙醇/g 糖）的差距不超过 7%。不过，由于酿酒酵母 Z100 虽然具备葡萄糖木糖共利用的代谢通路，但木糖代谢能力相对较弱，对于秸秆糖浆中的木糖的利用速率相对葡萄糖而言要弱上很多，且发酵结束木糖仍有 11.3 g/L 的残留。如图 5.3b 所示，以 L-乳酸发酵为例，秸秆糖浆与玉米粉水解液的 L-乳酸发酵性能相对接近，不仅均实现了 130+ g/L 的 L-乳酸浓度以及高达~1.85 g/L/h 的发酵速率，而且还能获得~0.8 g 乳酸/g 糖的发酵得率（接近理论得率的 80%）。不过，我们发现以甘蔗糖蜜为基础发酵碳源，其发酵性能低下，这主要是因为甘蔗糖蜜中主要的糖类为蔗糖，而我们所用的乳酸发酵菌（即乳酸片球菌）缺乏相应的蔗糖分解酶系，故无法进行高指标乳酸发酵。如图 5.3c 所示，以油脂发酵为例，在 120 h 的发酵时间内以秸秆糖浆为基础发酵碳源获得了相对最高的发酵性能指标。不仅获得了高达 46.7 g/L 的油脂产量以及 0.389 g/L/h 的油脂发酵速率，而且获得了高达 0.257 g 油脂/g 糖的发酵得率，三个发酵指标均分别比甘蔗糖蜜和玉米粉水解液高出~28%和~21 %。

为了评价所制得的高糖浓度麦秆糖浆的稳定性和可运输性能，我们以 15%(w/w) 的初始糖化体系生产麦秆糖浆，随后将最终制得的高糖浓度秸秆糖浆（总糖浓度~600 g/L）置于塑料桶内，加盖后在 4 °C 环境下进行为期 6 个月的存放（2024.11.1-2025.5.1），期间每隔一个月进行取样，观察麦秆糖浆是否染菌并进行拍照记录，同时对糖浆的可发酵单糖（葡萄糖和木糖）浓度、室温下的 pH 和密度以及不同温度下的粘度进行测定，结果如图 5.4 所示。我们发现，在为期 6 个月的储存期间，秸秆糖浆未发生任何的染菌现象，且糖浆在室温条件下的可发酵糖浓度、pH、密度以及表观粘度基本不变。此外，我们还发现，所生产的高糖浓度麦秆糖浆的表观粘度随环境温度变化而变化，当环境温度从低温（5 °C）变为高温（50 °C）时，表观粘度明显降低（~100 cP→~30 cP）。另外，根据美国水力协会发布的 ANSI/HI 9.6.7-2015——《旋转动力泵液体粘度对性能影响的导则》，本研究所生产的高糖浓度麦秆糖浆在室温（25 °C）条件下的粘度不超过 50 cP，因此完全满足流体输送的需求。若未来在寒冷天气进行糖浆的运输，仅需要使用基本的加热装置以维持一定的管道输送温度即可。本研究所生产出的高糖浓度可发酵麦秆糖浆除了含有葡萄糖和木糖等单糖之外，还含有微量的钙盐、灰分和脂肪酸

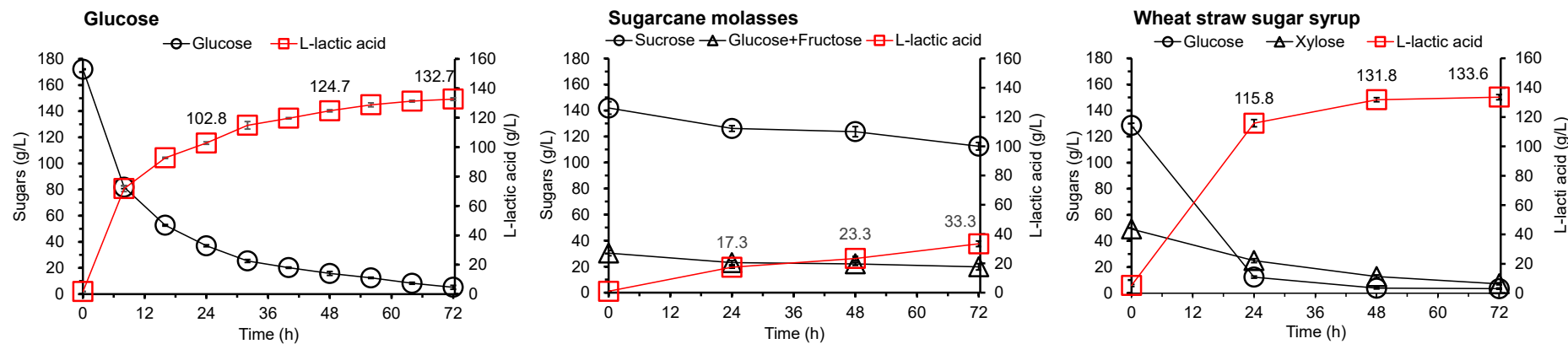
等等，因此属于非牛顿流体（剪切稀化型）。为了进一步验证麦秆糖浆这种非牛顿流体产品在寒冷环境（如 5°C）输送不会对常规输送泵（如离心泵）的效率产生显著影响，我们根据 Yu 等^[178]关于非牛顿流体粘度对离心泵性能的研究结果拟合了离心泵泵送效率随泵送流体粘度变化的曲线（如图 5.4d 所示）。该文献中所用的离心泵参数包括额定转速为 1450 rpm、额定可泵送流量为 80 m³/h 和额定扬程为 28 m 等等。可以看出，若离心泵使用至少 40%以上的额定可泵送流量对粘度~100 cP 的非牛顿流体（如 5 °C 下的麦秆糖浆）进行泵送的话，其泵送效率仍高达 84%-90%（将离心泵泵送水时的效率定为 100%）；若同样条件下对粘度~50 cP 的非牛顿流体（如 25 °C 下的麦秆糖浆）进行泵送的话，其泵送效率高达 90%-96%。以上结果表明，本研究生产的高糖浓度麦秆糖浆具有良好的稳定性和可运输性。

总而言之，基于本研究的秸秆糖浆生产工艺，在选择性地进行抑制物的有效去除之后所生产的浓缩麦秆糖浆具有极高的可发酵糖浓度（总糖浓度~600 g/L），不仅拥有良好的长期储存稳定性（可以在 4 °C 条件下无霉变储存 6 个月），而且其可运输性能也十分良好，符合目前流体运输的基本要求。最为重要的是，所生产的高糖浓度麦秆糖浆还具备优良的可发酵性能（优于葡萄糖），可以广泛用于乙醇、乳酸、微生物油脂等绝大多数生物基产品的微生物发酵生产。至此，木质纤维素可发酵糖浆生产的第二个挑战已被成功解决。

(a) Ethanol fermentation



(b) L-lactic acid fermentation



(c) Microbial lipid fermentation

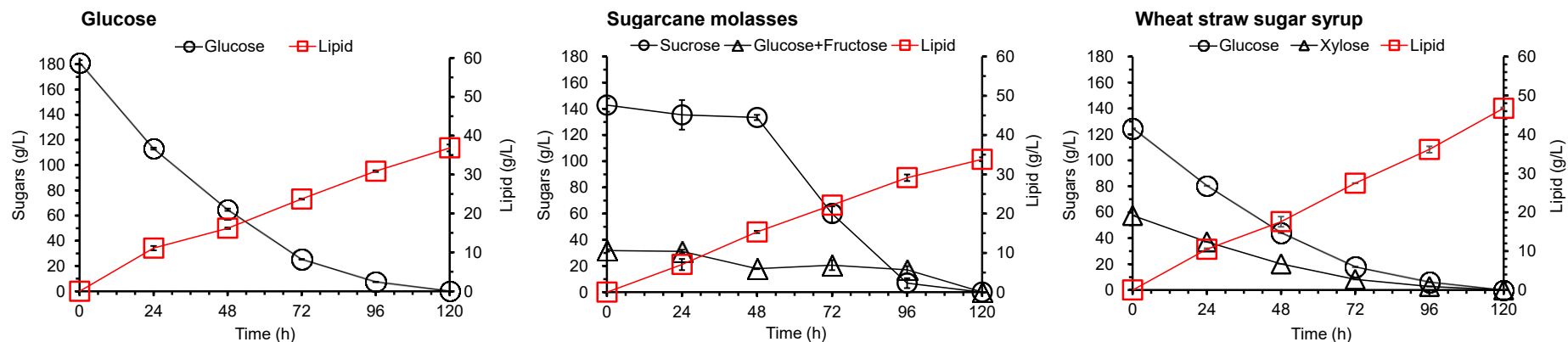
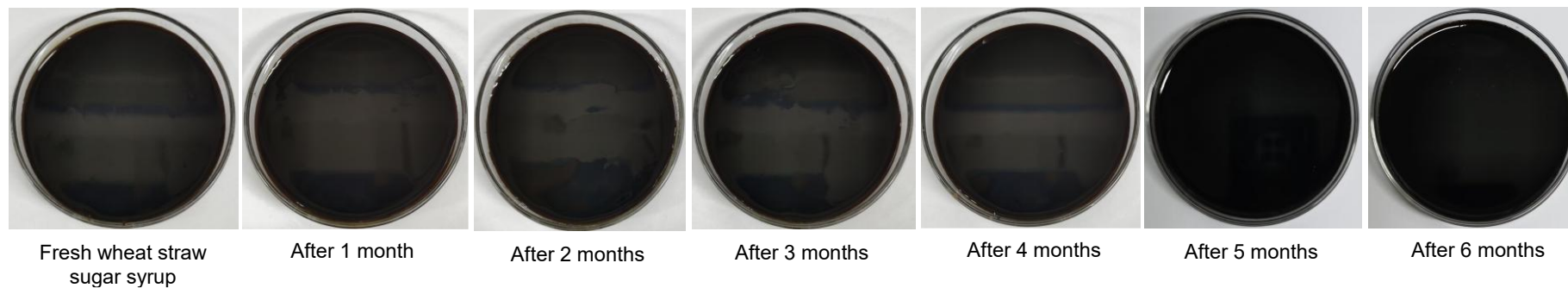


图 5.3 基于秸秆糖浆、甘蔗糖蜜和葡萄糖的乙醇发酵、L-乳酸发酵和油脂发酵性能评价

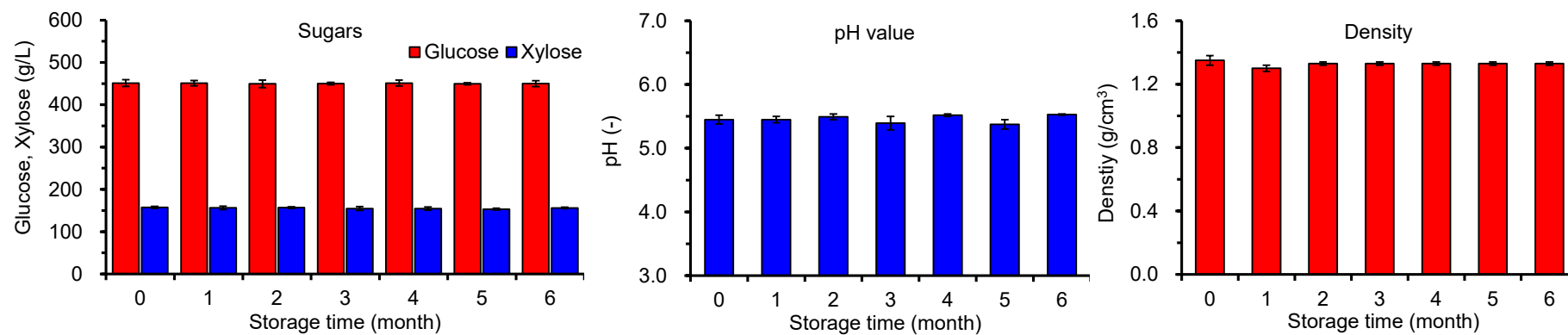
Fig. 5.3 Evaluation of ethanol fermentation, L-lactic acid fermentation, and lipid fermentation performance using wheat straw syrup, sugarcane molasses, and glucose

注：A：基于秸秆糖浆、甘蔗糖蜜和葡萄糖的乙醇发酵；B：基于秸秆糖浆、甘蔗糖蜜和葡萄糖的 L-乳酸发酵；C：基于秸秆糖浆、甘蔗糖蜜和葡萄糖的油脂发酵。乙醇发酵的菌种为酿酒酵母 XH7，接种量为 10%(v/v)，发酵温度为 30 °C，pH 为 5.5，总发酵时间为 72 h；L-乳酸发酵的菌种为乳酸片球菌 HT150，接种量为 10%(v/v)，发酵温度为 42 °C，pH 为 5.5，总发酵时间为 72 h；油脂发酵的菌种为皮状丝孢酵母 YY52E，接种量为 10%(v/v)，发酵温度为 30 °C，pH 为 5.0，总发酵时间为 120 h。

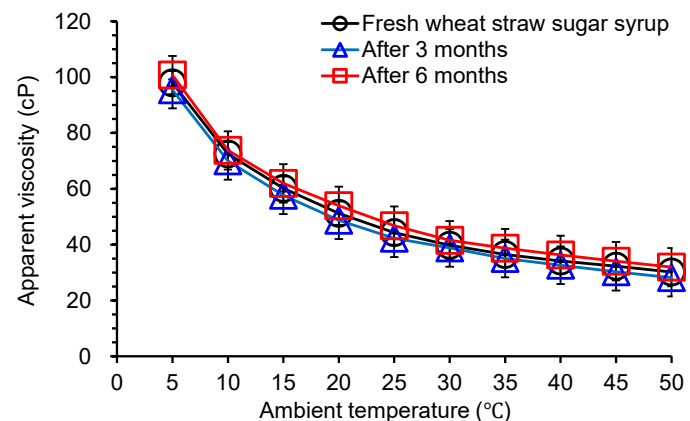
(a) Morphology change during wheat straw sugar syrup storage



(b) Property change during wheat straw sugar syrup storage



(c) Viscosity change under varying storage temperature



(d) Influence of fluid viscosity on the performance of centrifugal pump

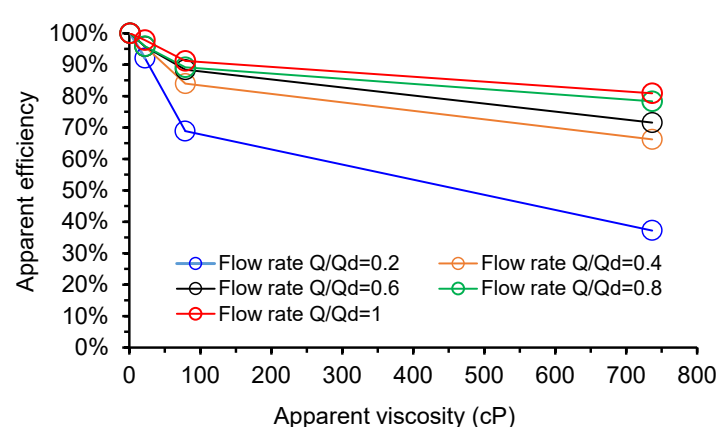


图 5.4 麦秆糖浆长期储存期间的稳定性和可运输性能评价

Fig. 5.4 Evaluation of the stability and transportability of wheat straw syrup during long-term storage

注：（a）秸秆糖浆长期储存期间形态学变化；（b）秸秆糖浆长期储存期间性质变化（可发酵糖、密度、pH）；（c）秸秆糖浆长期储存期间表观粘度变化；（d）非牛顿流体粘度对离心泵性能的影响^[178]。用于长期储存测试的麦秆糖浆（总糖浓度~600 g/L）是从 15%(w/w)糖化体系固含量进行干法生物炼制生产的。将制得的~6 kg 麦秆糖浆分装于 6 个塑料桶内（每个桶装 1 kg 左右糖浆）并拧紧盖子，随后置于 4 °C 冰箱内静置存放 6 个月。期间每隔 1 个月取出一桶，对桶内的糖浆进行形态学观察（看是否染菌）并拍照记录，随后采用 HPLC 对室温下糖浆的可发酵糖（葡萄糖和木糖）浓度进行测定，再采用 pH 计和比重瓶分别对室温下糖浆的 pH 和密度进行测定，最后采用粘度计对糖浆在不同温度下的表观粘度进行测定。根据 Yu 等^[178]关于非牛顿流体粘度对离心泵性能的研究结果拟合了离心泵效率（泵送水时的效率定为 100%）随泵送流体粘度变化曲线，根据离心泵实际使用的流量 Q 与额定最大可泵送流量 Q_d 的比值的不同共拟合了 5 条离心泵效率随泵送流体粘度变化曲线（Flow rate Q/Q_d 范围为 0.2~1.0）；所用的离心泵参数包括额定转速为 1450 rpm、额定最大可泵送流量为 80 m³/h 和额定扬程为 28 m 等等。

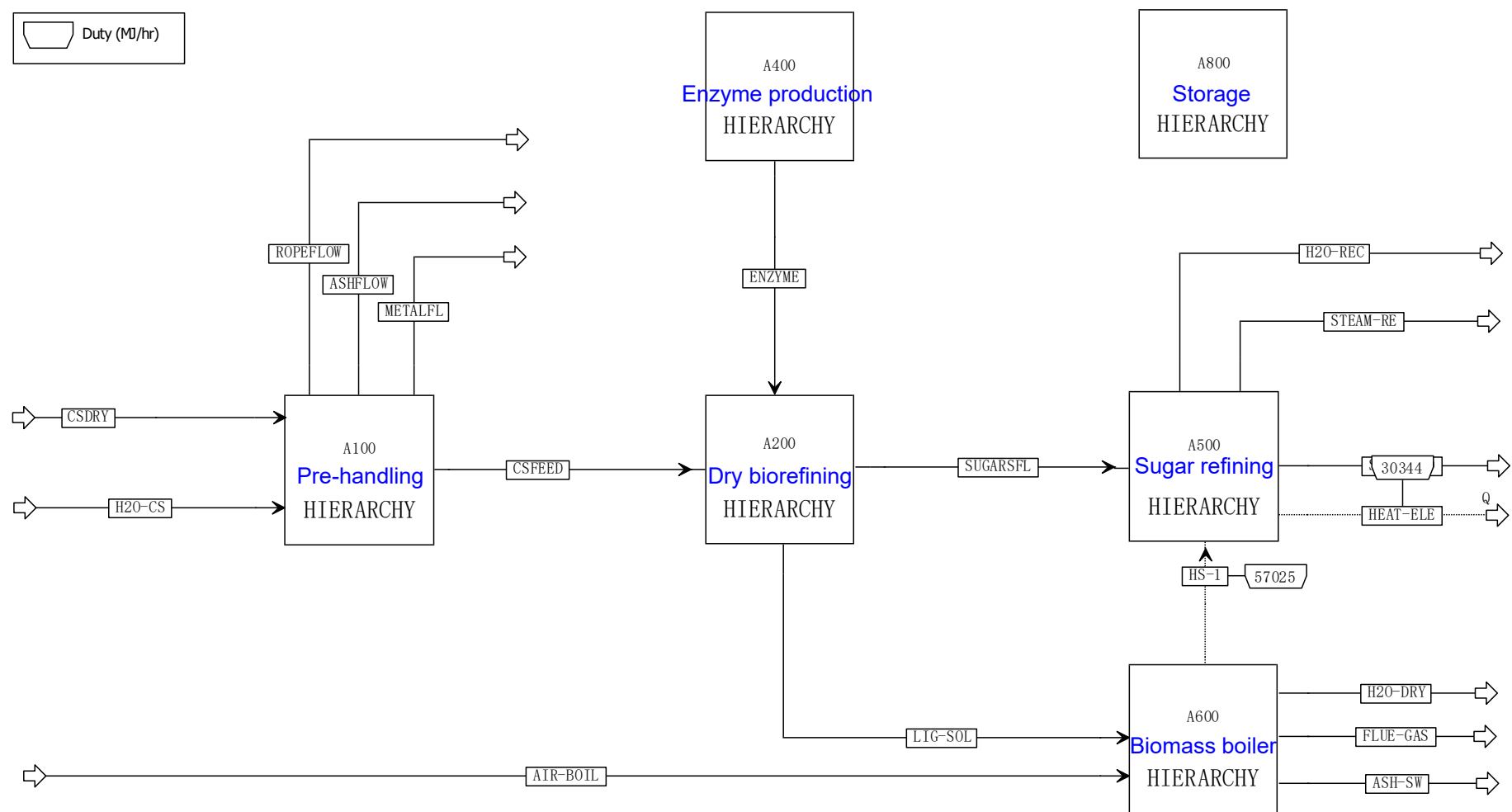
5.3.3 秸秆糖浆生产工艺的能耗平衡

为了检验本研究提出的秸秆糖浆生产技术路线能否实现无需外部能量输入的能量自给,我们采用 Aspen Plus 对整体工艺流程的物料流和能量流进行了模拟,如图 5.5 所示。其中,前处理(A100)、干法生物炼制(A200)和纤维素酶生产(A400)等阶段的流程模拟参考了前人的研究结果^[13]。简而言之,A100 包括原料拆包、粉碎、除尘等步骤,最终得到圆直径 10 mm 的秸秆;A200 包括干酸预处理、酶解糖化、液态生物脱毒、固液分离等步骤,最终得到木质素残渣和去除抑制物的低糖浓度秸秆水解清液;A400 包括纤维素酶生产菌株的培养和发酵,制备纤维素酶粗酶液^[89, 175]。

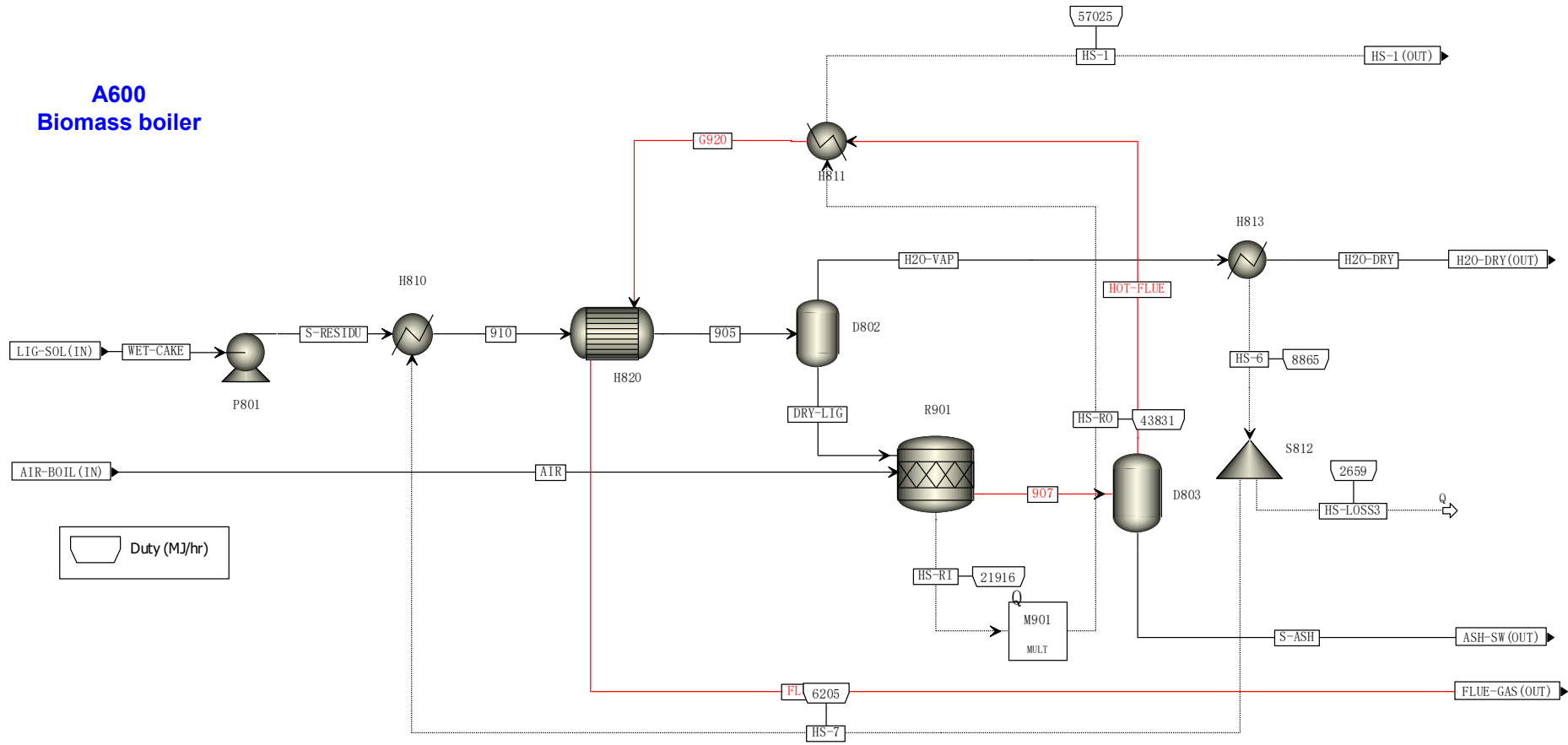
本研究着重对木质素残渣燃烧供热的生物质锅炉(A600)以及糖液提浓过程(A500)的能量流模拟结果进行说明(图 5.6bc)。A500 模拟的是对来自 A200 的低糖浓度秸秆水解清液进行多效蒸发浓缩(提浓)的过程。麦秆糖浆生产工艺的各主要工段的电耗和蒸汽能耗结果如图 5.6 所示。可以看出,从每吨麦秆原料出发生产秸秆糖浆(酶解糖化体系固含量采用 20%(w/w)),前处理(A100)共需要耗电 27.11 kWh;干法生物炼制(A200)共需要耗电 41.56 kWh(其中预处理需要消耗电 33.44 kWh 和蒸汽 0.59 GJ,糖化需要耗电 0.44 kWh,脱毒需要耗电 4.89 kWh,固液分离需要耗电 2.79 kWh);采用多效蒸发的糖精制工段(A500)需要消耗电 3.23 kWh 和蒸汽 2.40 GJ。相应地,工艺过程产生的木质素残渣经过生物质锅炉(A600)燃烧共产热 9.12 GJ。总的来说,从每吨麦秆原料(干基)出发生产麦秆糖浆共需要消耗电 71.90 kWh 和蒸汽 2.99 GJ,同时联产热量 9.12 GJ;若按照生产一吨麦秆糖浆(基于干糖)来算(计算显示约 2.24 吨干麦秆产 1 吨干糖浆),则需要消耗电 161.32 kWh 和蒸汽 6.70 GJ,同时联产热量 20.46 GJ。值得注意的是,来自 A600 的热能进入 A500 后除了用于蒸发糖液(能耗约占总热能的 26%)、补充预处理所需蒸汽至蒸汽压力达到 1.6 MPa(能耗约占总热能的 0.4%)和能量损失(约占总热能的 20%)之外,还剩余相当一部分热能(占总热能的 53.21%),如图 5.6c 所示。根据能量等效换算(1 kWh=3.6×10⁶J),理论上 1 GJ 的热值相当于 ~277.8 kWh 的电。考虑到生物质锅炉燃烧效率(80%)和利用木质素残渣进行发电的发电机效率(85%)^[175],实际上 1 GJ 的热值可产生 277.8×85%×80%≈188.9 kWh 的电^[13, 49]。因此,按照生产一吨麦秆糖浆(基于干糖)来算,剩余 10.89 GJ 的热能(20.46 GJ×53.21%≈10.89 GJ)可转化为 2057.12 kWh 的电(10.89×188.9 kWh≈2057.12 kWh),完全能够支撑起整个糖浆生产工艺过程的电耗(161.32 kWh),并且在实现全过程能量自给后还剩余 1895.80 kWh 的电可进行售卖。

综上所述,本研究提出的秸秆糖浆生产工艺完全能够通过联产木质素残渣的利用实现工艺过程无需外部能量输入的能量自给,故成功解决了木质纤维素可发酵糖浆生产的第三个挑战。此外,Aspen 流程模拟计算结果显示,上述秸秆糖浆生产工艺过程能够实现废水全循环、零废水排放和极少量工艺水添加等目标,进一步避免了在糖浆生产过程中大量有毒废水的排放。

(a) Aspen simulation of the mass and energy flows for the overall straw syrup production process.



(b) Aspen simulation of the mass and energy flows for a biomass boiler utilizing lignin residue.



(c) Aspen simulation of the mass and energy flows for the straw syrup refining process.

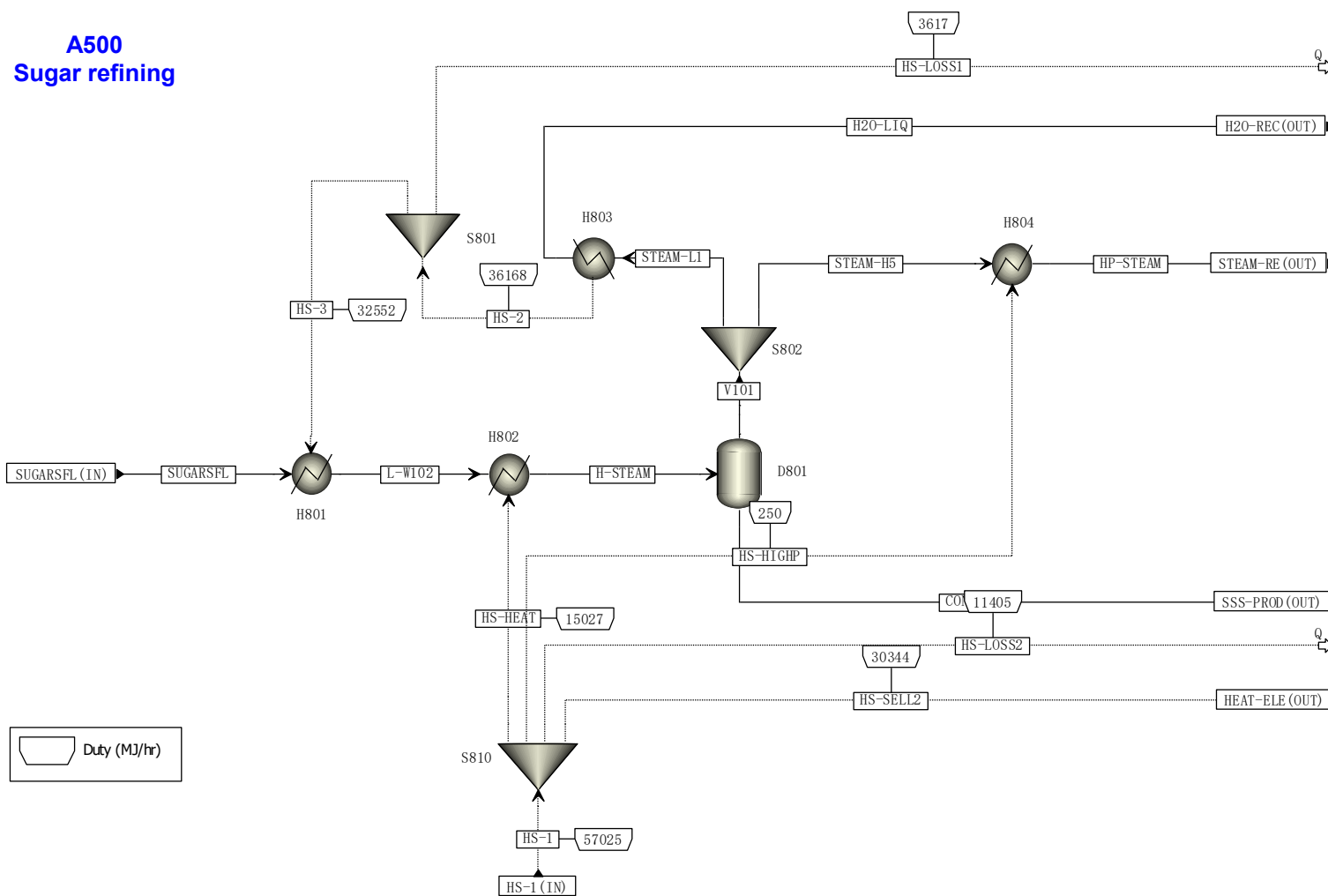
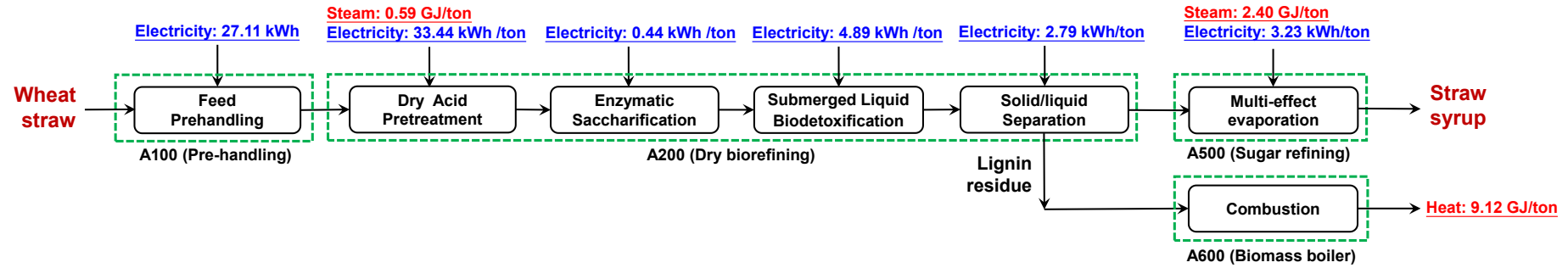


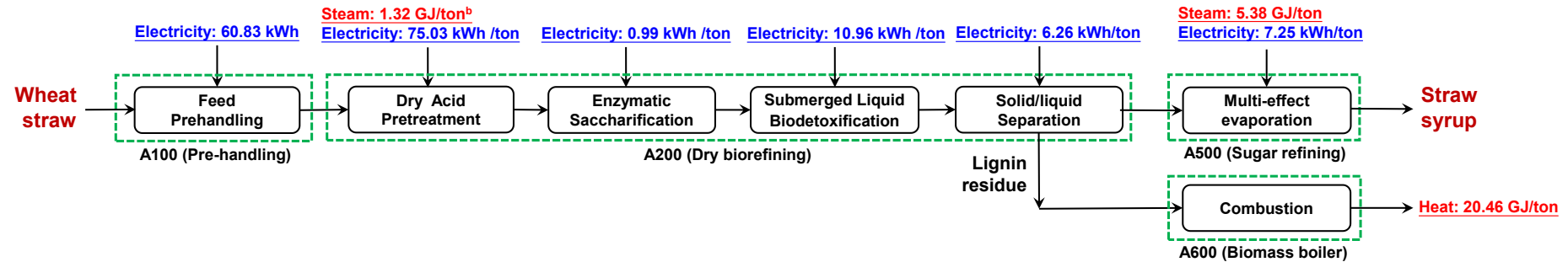
图 5.5 秸秆糖浆生产工艺的 Aspen Plus 流程模拟

Fig. 5.5 Process simulation of straw syrup production using Aspen Plus

(a) Based on one metric ton of wheat straw (dry base): **Electricity: 71.90 kWh /ton WS (dry), Steam: 2.99 GJ/ton (dry)**



(b) Based on one metric ton of wheat straw sugar syrup (dry base): **Electricity: 161.32 kWh /ton Syrup (dry), Steam: 6.70 GJ/ton (dry)**



(c) Distribution of thermal energy generated from lignin combustion

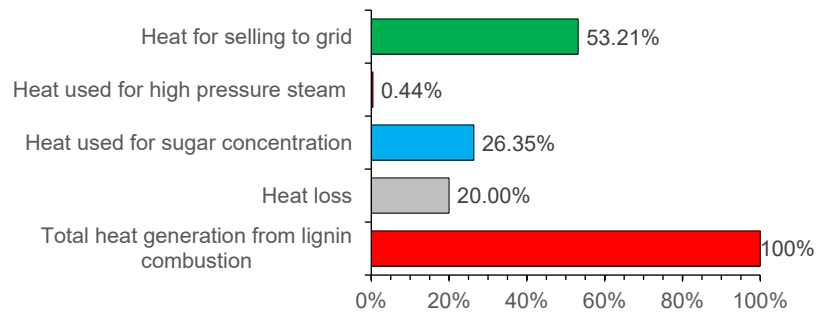


图 5.6 秸秆糖浆生产工艺过程的电和蒸汽消耗以及木质素残渣燃烧热能分配

Fig. 5.6 Electricity and steam consumption in the production process of straw syrup and the utilization of thermal energy from the combustion of lignin residue

注：（a）消耗 1 吨麦秆（基于干重）进行糖浆生产过程的电和蒸汽消耗；（b）生产 1 吨麦秆糖浆（基于干糖）过程的电和蒸汽消耗；（c）木质素残渣燃烧热能的利用和分配比例。糖浆生产工艺中的酶解糖化固含量为 20%(w/w)，前处理、预处理、糖化、脱毒和固液分离工段的相关电耗计算参考了 Wang 等的数据^[13]。采用多效蒸发的糖精制工段（A500）的电耗计算参考了齐春华等人的论文数据^[179]，即多效蒸发产生 1 吨水的耗电量为 1.2 kWh。基于 Aspen 流程模拟数据的计算，当干麦秆处理量为 6.250 t/h 时，相应的糖浆产量为~5.804 t/h，干糖浆产量为~2.786 t/h，多效蒸发水产量为 16.835 t/h，故每处理一吨干麦秆在多效蒸发的耗电量为~3.23 kWh $((16.835 \text{ t/h}) / (6.250 \text{ t/h}) * 1.2 \text{ kWh} \approx 3.23 \text{ kWh})$ ，通过多效蒸发每产 1 吨糖浆（基于干糖）的耗电量为~7.25 kWh $((16.835 \text{ t/h}) / (2.786 \text{ t/h}) * 1.2 \text{ kWh} \approx 7.25 \text{ kWh})$ 。Heat for selling to grid: 能量自给后剩余可售卖的热能（可用于生产电或蒸汽）；Heat used for high pressure steam: 辅助提升预处理阶段蒸汽压力至 1.6 MPa 所需的热能；Heat used for sugar concentration: 糖液蒸发浓缩阶段所需热能；Heat loss: 热能的损失；Total heat generation from lignin combustion: 糖浆生产过程中联产木质纤维素残渣的燃烧热能。

5.3.4 秸秆糖浆生产工艺的技术经济性评价

对于秸秆糖浆的生产，评价其工艺过程的技术经济性至关重要。本研究以 20%(w/w)的起始固含量酶解糖化体系为案例，对该情况下基于通用模式进行麦秆糖浆生产工艺过程的技术经济性进行了分析。该通用模式要求秸秆糖浆生产工厂兼具成熟的生物质收集能力以及完备的生物质粉碎、除尘、焚烧、废物处理等能力，可以自主向秸秆糖浆生产工艺过程需要蒸汽供应的工段直接提供所需的蒸汽而不依赖外界。基于此模式，主要的操作参数、总资金投入、可变操作成本、固定操作成本和总成本估算如表 5.1 所示。

首先，表 5.1 a 展示的是糖浆生产的主要操作参数。我们设定工厂运行年限为 10 年，年处理量 5 万吨干秸秆，操作时间为 8000 h。根据 Aspen 流程模拟计算结果，每年可以产生 46429.68 吨的糖浆，相应的干糖产量为 22286.25 吨/年（干糖浆得率为 0.446 ton/ton 干秸秆），每年联产干的木质素残渣 25952.96 吨（得率为 0.519 ton/ton 干秸秆）。

表 5.1 b 展示的是总资金投入成本（合计 7661.3 万元），其中占比最大的部分是固定资产投入成本（4714.64 万元，占比 61.54%），其次是 10 年贷款利息（1767.99 万元，占比 23.08%），再次是厂房、周转资金等其他成本（1178.66 万元，占比 15.38%）。固定资产总投入成本包括总直接成本 4622.2 万元和间接成本 92.44 万元。总直接成本由界区内设备与安装成本、仓库和管道系统的资金投入构成，间接成本是指维护与现场管理的成本，占总直接成本的 2%。界区内设备与安装成本涉及前处理工段、预处理工段、糖化和脱毒工段、糖精制工段、生物质锅炉工段以及纤维素酶生产工段的所有设备购买资金及安装成本（安装成本设定为设备成本的 20%）。工厂运行 10 年的干糖产量为 222862.5 吨，将总资金投入成本（合计 7661.3 万元）平摊到干糖产量上，则资金投入成本为 343.77 元/吨干糖。

表 5.1 c 中展示的是可变操作成本的组成，包括原料购买，纤维素酶在位生产，硫酸、氢氧化钙、工艺水的使用以及用电的成本，合计为 1070.34 元/吨干糖。其中原料和纤维素酶占可变操作成本的绝大部分。由于秸秆糖浆生产工艺过程无任何废水产生，故废水处理成本为零。值得注意的是，在计算操作成本时利用能量自给后剩余的 53.21%的木质素残渣的售卖利润来抵消部分操作成本（木质素残渣热值与标准煤相当，故按照标准煤的价格计算其售卖价格）。另外，根据图 5.6 B 的电耗计算结果，生产 1 吨干糖的电耗为 161.32 kWh，按照工业发达地区常见的平时段基础电价（0.59 元/kWh）来算，其用电成本为~95 元/吨干糖。

表 5.1 d 展示的是固定操作成本的组成。由于秸秆糖浆生产工厂的运行需要厂长、车间主任、工程师、生产操作人员和行政人员的共同参与，故需要支付这些人员的薪酬。按照生产 1 吨干糖来算，固定操作成本为 116.22 元/吨干糖。总操作成本（可变操作成本+固定操作成本）为 1186.56 元/吨干糖。

表 5.1 e 展示的是秸秆糖浆生产的总成本估算。总的来说，秸秆糖浆生产成本由

两部分组成，一个是资金投入，另一个是包括可变操作成本和固定操作成本的总操作成本。可以看出，按照每生产 1 吨麦秆糖浆（基于干糖）来算，资金成本为 343.77 元/吨干糖，总操作成本为 1186.56 元/吨干糖，总成本为 1530.33 元/吨干糖。参照国际市场上的葡萄糖（通常指一水葡萄糖）价格（至少 400 \$/ton），美元兑人民币汇率取 7.2，则国际市场上葡萄糖价格至少合人民币 2880 元。可见本研究的秸秆糖浆生产成本显著低于目前国际市场上的葡萄糖价格，说明了本研究所提出的秸秆糖浆生产工艺是低成本且极具可行性的。其次，若将秸秆糖浆产品（基于干糖）的售价定为葡萄糖的价格（人民币 2880 元），总体的投资回报年限显示，投资回收期仅为 2.55 年（采用 20%(w/w)起始固含量进行麦秆糖浆生产时）。

表 5.1 技术经济性分析
Table 5.1 Technical and economic analysis

(a) 主要操作参数	
(a) Main Operation parameters	
操作参数	
实际原料用量（吨/年，湿度 20%）	62500.000
干原料用量（吨/年）	50000.000
糖浆产量（吨/年）	46429.680
干糖产量（吨/年）	22286.250
木质素固体产量（吨/年）	25952.960
糖浆得率（吨糖浆/吨干原料）	0.929
干糖得率（吨干糖/吨干原料）	0.446
木质素得率（吨干木质素/吨干原料）	0.519
年操作时间（h）	8000.000
工厂运行年限（年）	10.000

注：麦秆糖浆的干糖含量为 48%，Aspen 模拟数据显示总干糖的得率为 0.446 ton/ton 干麦秆，与实验数据（0.429 ton/ton 干麦秆）基本吻合。模拟数据的总干糖得率略高于实验数据的原因在于：进行 Aspen 模拟时还考虑了糖浆中其他单糖以及杂质的存在（实验数据仅考虑葡萄糖和木糖），设定干糖纯度为 98%（盐、脂肪酸等杂质占 2%），其中葡萄糖和木糖共占总干糖的 92%，甘露糖、阿拉伯糖和半乳糖等非主要单糖共占总干糖的 6%，故基于模拟数据的最终实际总糖得率为 0.437 ton/ton 干麦秆。

(b) 总资金投入

(b) Total capital investment

	技术参数或规格	单价 (万元)	数量	总价 (万元)
前处理工段				
叉车	6.25 ton/h	20	1	24.00
拆包机	6.25 ton/h	10	1	12.00
粉碎机	6.25 ton/h	100	1	120.00
振动筛	6.25 ton/h	20	1	24.00
传送带	6.25 ton/h	50	1	60.00
旋风分离器	6.25 ton/h	20	1	24.00
合计				228.00
预处理工段				
预处理反应器	10 m ³	60	5	360.00
进料器	10 ton/h	10	5	60.00
稀硫酸储罐	500 L	5	1	6.00
计量泵	5 m ³ /h	5	5	30.00
合计				456.00
糖化与脱毒工段				
预处理物料储罐	20 m ³	20	1	24.00
液化中和反应器	15 ton/h	30	1	36.00
糖化反应器	200 m ³	120	7.5	1152.00
脱毒反应器	150 m ³	100	7.2	960.00
脱毒菌种扩培系统	10 m ³	30	4	144.00
提升机	12.5 ton/h	20	1	22.00
20%Ca(OH) ₂ 储罐	500 L	10	1	12.00
计量泵	5 m ³ /h	5	8	48.00
合计				2398.00
糖精制工段				
糖化液储罐	200 m ³	20	2	48.00
板框压滤机	40 ton/h	80	1	96.00
多效蒸馏	20 ton/h	100	1	120.00
糖浆储罐	250 m ³	30	1	36.00
合计				300.00
生物质锅炉工段				
				400.00
纤维素酶工段				
				300.00
界区内设备与安装成本				
无菌空气系统	100 Nm ³ /min	40	2	120.00
地磅	40 t	10	1	12.00
合计				132.00
总的设备及安装成本				
				4214.00
仓库	界区内设备与安装成本 5%			204.10
管道系统	界区内设备与安装成本 5%			204.10
总直接成本				4622.20
维护与现场管理	总直接成本 2%			92.44
固定资产总投入				4714.64
厂房	固定资产总投入 20%			942.93
周转资金	固定资产总投入 5%			235.73
总资金投入 (不含利息)				5893.31
贷款利息	年利息 3% , 共贷款 10 年			1767.99
工厂运行年限	10 年			7661.30
总资金投入 (含利息)				343.77

注：秸秆糖浆生产所选用的酶解糖化体系固含量为 20%(w/w)。设备安装系数均按 1.2 计算。

(c) 可变操作成本

(c) Variable Operating Costs

物流	流量 (kg/h)	单价 (元/吨)	成本 (元/h)	成本 (元/吨干糖)
秸秆 (干)	6250.00	300.00	1875.00	673.06
纤维素酶蛋白	25.00	57500.00	1437.50	516.01
硫酸	191.33	360.00	68.88	24.72
氢氧化钙	141.77	400.00	56.71	20.36
工艺水	7017.50	1.50	10.53	3.78
木质素残渣	1726.20	-425.00	-733.63	-263.35
废水处理	0.00	40.00	0.00	0.00
用电	耗电量 (kWh/h)	电价 (元/kWh)	成本 (元/h)	成本 (元/吨干糖)
	449.40	0.59	266.77	95.76
总可变操作成本				1070.34

注: ^a按照年处理 50000 吨小麦秸秆 (基于干重)、运行时间 8000 h 进行计算, 处理流量为 6250 kg/h; ^b纤维素酶按照就地生产模式提供 (成本减少 75%)^[89], 酶添加标准为 4mg 酶蛋白/g 干物料, 酶制剂单价为 23 元/kg, 酶蛋白浓度为 10%; ^c预处理硫酸用量为 30 mg/g 干物料 (即干物料的 3%), 采用质量分数 98% 的浓硫酸稀释配制; ^d氢氧化钙用来中和预处理物料, 价格为 400 元/吨; ^e工艺水来自糖浆生产工艺自身循环产生以及少量添加的新鲜水; ^f木质素残渣热值与标准煤相当, 故按照标准煤的价格计算其售卖价格, 此外, 木质素残渣的燃烧热能在完成工艺过程能量自给 (主要是蒸汽自给) 后剩余 53.21% 的热能, 故计算操作成本时利用能量自给后剩余的 53.21% 的木质素残渣的售卖利润来抵消部分成本; ^g秸秆糖浆生产工艺过程无任何废水产生, 故废水处理成本为 0; ^h电耗为 161.32 kWh/吨干糖 (根据图 5.6 (B) 的电耗计算结果), 电的价格定为 0.59 元/kWh, 这是一个在不少工业发达地区常见的平时段基础电价。

(d) 固定操作成本

(d) Fixed Operating Costs

职位	人数	薪酬标准 (元/年)	薪酬合计 (元/年)
工厂厂长	1	200,000	200,000.00
车间主任	1	150,000	150,000.00
工艺工程师	3	150,000	450,000.00
设备工程师	3	150,000	450,000.00
分析工程师	2	120,000	240,000.00
生产操作工	10	100,000	1,000,000.00
行政人员	1	100,000	100,000.00
总固定操作成本(元/年)			2,590,000.00
固定操作成本 (元/吨干糖)			116.22
总操作成本 (元/吨干糖)			1186.56

(e) 总成本估算

(e) Total Cost Estimation

资金成本 (元/吨干基糖)	343.77
操作成本 (元/吨干基糖)	1186.56
总成本 (元/吨干基糖)	1530.33
葡萄糖价格 (元/吨)	2880.00
干糖售价 (元/吨) #	2880.00
吨干糖利润 (元/吨)	1349.67
年干糖利润 (元/吨)	30079135.91
投资回收期 (年) (通用模式)	2.55

注: 糖浆基于干糖的定价参考了国际葡萄糖销售价格 (400 美元/吨, 美元兑人民币取汇率 7.2)。

5.4 本章小结

木质纤维素来源的糖浆生产至少应能应对工艺废水减排, 极低糖耗条件下去除抑制物, 工艺过程能量自给, 技术经济性, 糖浆产品的高效运输、稳定储存和高性能发酵等方面的挑战。本章提出了高糖浓度可发酵秸秆糖浆的干法生物炼制生产路线, 并对干法生物炼制技术生产可发酵秸秆糖浆的过程进行了详细的过程研究和技术经济性分析。

(1) 首先, 通过干酸预处理、酶解糖化、液态生物脱毒, 以及固液分离、减压蒸发浓缩等步骤, 获得了总糖浓度 600 g/L 以上、无糠醛和 5-羟甲基糠醛等抑制物残留的可发酵混合糖秸秆糖浆, 其中不含任何固体杂质、长期静置形态稳定, 可以在 4 °C 条件下无霉变储存 6 个月, 且在室温条件下的表观粘度 < 50 cP, 完全能够满足罐装运输和使用离心泵等常规泵种输送的粘度要求。

(2) 其次, 以此高糖浓度秸秆糖浆为原料, 在乙醇、L-乳酸、微生物油脂等典型生物基化学品的发酵上进行了测试, 并与甘蔗糖蜜和葡萄糖 (来自玉米粉水解) 的发酵结果进行对比, 结果表明秸秆糖浆具备与淀粉糖相同甚至更佳的可发酵性能。

(3) 最后, 对秸秆糖浆生产的全过程进行了严格流程模拟基础上的详细质量衡算、能量衡算和技术经济性分析, 结果表明: 仅利用糖浆生产过程中所联产的木质素残渣的燃烧热能便能实现秸秆糖浆干法生物炼制生产全过程的能量自给, 无需外部能量输入, 并且能量自给后的剩余热能还可以通过蒸汽或发电的方式进行售卖; 最终的技术经济性分析结果显示秸秆糖浆的干法生物炼制生产成本仅为 ~1530 元/吨糖浆 (基于干糖), 显著低于玉米来源的葡萄糖价格 (2880 元/吨)。

(4) 本文所提出的非粮木质纤维素生物质原料生产秸秆糖浆的技术路线实现了由零排放前提下可发酵糖的碳中和生产, 为合成生物技术生产液体生物燃料、可生物降解聚合物单体和生物基化学品提供了廉价、低碳且可持续的可发酵糖原料。

第 6 章 结论与展望

6.1 结论

在干法生物炼制技术向产业化应用的进程中，需要通过对已有技术中的一系列重要问题进行系统的拓展和迭代升级。这些对产业化应用产生重大影响的问题包括生物脱毒的速率和可控制性低、整体生物炼制过程不连续、多个生物转化过程温度不匹配等。本文通过液态生物脱毒及其脱毒终点检测技术建立、生物炼制全过程连续化、生物炼制工程菌株耐高温性强化等研究内容，实现了干法生物炼制技术面向产业化应用的拓展和升级迭代。

现将本论文的主要成果及重要结论总结如下：

(1) 本文第一部分对干法生物炼制过程中的高成本且难以精确控制脱毒终点的固态生物脱毒进行了技术升级，根据生物脱毒微生物的特殊代谢特征，建立了一种可在线识别生物脱毒终点的实用方法，实现了高糖浓度水解液快速且极低糖耗的液态生物脱毒。首先，发现了预处理后木质纤维素水解液浆在液态生物脱毒过程中的 pH 值会随着有机酸类抑制物的消耗和代谢产物脂肪酸的生成而发生转折性变化的现象；其次，通过使用在线监测 pH 值达到峰值作为明确、可检测的脱毒终点指示器，不仅实现了对高固体含量生物质水解液浆中抑制物的快速和高效去除，而且最大限度地保留了其中的可发酵糖（糖损失低于 2%），从而将干法生物炼制加工链的干酸预处理→固态生物脱毒→高固含量酶解糖化与发酵，整合为一条新的生物炼制加工链，即干酸预处理→酶解糖化→液态生物脱毒→高固含量发酵；最后，验证了该生物炼制加工链用于生产手性 L-乳酸、乙醇和糖酸等典型木质纤维素基产品的有效性，获得了高产物浓度、得率以及生物转化速率。与固态生物脱毒相比，液态生物脱毒具有反应器体积小、传质和传热效率高、操作简便、易于放大和自动化、终点明确、能耗降低、污染风险低以及物料输送方便等综合优势，为干法生物炼制技术的工业应用提供了一种更具经济性和可控性的抑制物脱毒解决方案。

(2) 本文第二部分在新的干法生物炼制加工链平台上，实现了干酸预处理麦秆物料的快速流态化及后续的 L-乳酸连续生物转化生产。首先，采用简洁的混合和中和机制，在不添加任何酶的情况下完全能够实现干固颗粒形态的高温预处理麦秆物料（100-110 °C）的快速流态化，使其转化为温度适中（约 63 °C）、pH 适中（约 5.1）的均质可泵送流体浆料，可以通过常规机械设备进行流体输送；其次，在相同的稀释率下对高固含量下的流态化麦秆浆料进行了连续酶解糖化和连续液态生物脱毒，可以得到低表观粘度（0.2~0.3 Pa·s）和高单糖浓度（葡萄糖+木糖, 130~170 g/L）的小麦秸秆水解液；最后，在相同的稀释率下进行多级连续 L-乳酸 SSCF，仅三个串联发酵罐便足以实现了 L-乳酸的高指标生产，最终浓度为 143 g/L，生产速率为 1.79 g/L/h，得率为 78.8%，手性纯度约 99.3%。这项工作为未来木质纤维素生物质的商业化连续生

物炼制进行低成本 L-乳酸和聚乳酸 (PLA) 生产提供了技术基础。

(3) 本文第三部分针对干法生物炼制加工链中酶解糖化、生物脱毒和 L-乳酸发酵等三个阶段存在明显的大范围的温度切换问题 (50 °C→37 °C→42 °C), 对当前的生物脱毒菌株和 L-乳酸发酵菌株进行了耐温性实验室定向进化, 实现了温度一致的糖化、脱毒、L-乳酸发酵。首先, 在含有抑制物的麦秆水解液体系下以高温梯度适应性进化的方式对脱毒菌宛氏拟青霉 *P. variotii* FN89 进行耐高温性强化 (进化 56 代, 共 75 天), 获得了可以耐受 45 °C 且具备良好脱毒能力的工程菌株壮观丝衣霉 *B. spectabilis* HT45; 其次, 以高温适应性进化的方式交替使用液体合成培养基体系和已脱毒麦秆水解清液体系对乳酸片球菌工程菌株 *P. acidilactici* ZB220 进行耐高温性强化 (进化 150 代, 共 218 天), 获得了一株可耐受 45 °C 且发酵性能稳定的乳酸菌 *P. acidilactici* HT150; 最后, 以两株经过高温强化的生物炼制菌株构建了 L-乳酸生产的高温生物炼制过程, 极大促进了酶解糖化、生物脱毒和 L-乳酸发酵的温度一致性 (50 °C→45 °C→45 °C)。与常规温度切换模式下的生物炼制过程相比, 这种温度几乎一致的高温生物炼制过程更具优势, 其 L-乳酸转化指标得到了进一步提升。该方法为干法生物炼制的实际工业应用提供了一个简洁和高效的模式, 避免大型生物反应器因频繁温度调控而产生的巨大能耗和时间成本。

(4) 本文第四部分对干法生物炼制技术生产可发酵秸秆糖浆的过程进行了详细的过程研究和技术经济性分析。首先, 通过干酸预处理、酶解糖化、液态生物脱毒, 以及固液分离、减压蒸发浓缩等步骤, 获得了总糖浓度 600 g/L 以上、无糠醛和 5-羟甲基糠醛等抑制物残留的可发酵混合糖秸秆糖浆, 其中不含任何固体杂质、长期静置形态稳定, 可以在 4 °C 条件下无霉变储存 6 个月, 且在室温条件下的表观粘度 < 50 cP, 故能够满足罐装运输的粘度要求; 其次, 以此秸秆糖浆为原料, 在乙醇、L-乳酸、微生物油脂等典型生物基化学品的发酵上进行了测试, 表明秸秆糖浆具备与淀粉糖相同甚至更佳的可发酵性能; 最后, 对秸秆糖浆生产的全过程进行了严格流程模拟基础上的详细质量衡算、能量衡算和技术经济性分析, 结果表明本研究提出的秸秆糖浆干法生物炼制技术路线完全可以实现全过程无需外部能量输入的能量自给, 并且秸秆糖浆 (基于干糖) 的生产成本 (1530.33 元/吨) 显著低于玉米来源的葡萄糖销售价格 (2880 元/吨)。本文所提出的由非粮木质纤维素生物质原料生产秸秆糖浆的技术路线实现了零排放前提下的可发酵糖的碳中和生产, 为合成生物技术生产液体生物燃料、可生物降解聚合物单体和生物基化学品提供了廉价、低碳且可持续的可发酵糖原料。

6.2 创新点

(1) 根据生物脱毒微生物的特殊代谢特征, 建立了一种可在线识别脱毒终点的实用方法, 实现了高固含量、高糖浓度木质纤维素水解液浆的精准、快速、极低糖耗的液态生物脱毒。为干法生物炼制技术面向产业化应用的连续操作提供了理想的抑制物脱毒解决方案。

(2) 基于重新整合后的新型干法生物炼制加工链(预处理→酶解糖化→液态生物脱毒→高固含量发酵)为平台,以无酶介导的螺旋混合方式实现了高温预处理麦秆物料的快速流态化,并在一致的稀释度(0.0375 h^{-1})条件下实现了后续 L-乳酸连续生物转化的高指标、稳定生产,为未来木质纤维素生物质的商业化连续生物炼制进行低成本 L-乳酸和聚乳酸(PLA)生产提供了技术基础。

(3) 以长周期高温适应性进化的方式对当前的生物炼制脱毒菌株和 L-乳酸发酵菌株进行了耐高温性强化,实现了温度几乎一致的 L-乳酸生物转化过程($50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 酶解糖化→ $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生物脱毒→ $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ L-乳酸发酵),有利于在未来基于木质纤维素生物质进行商业化连续生物炼制生产乳酸的过程中提高整体过程效率和降低能耗和时间成本,为未来面向产业化应用的木质纤维素生物炼制倡导高温化生物转化生产提供了有利依据,也为未来的高温化、连续化生物转化生产提供了重要的生物炼制工程菌株和技术基础。

(4) 提出的秸秆糖浆干法生物炼制技术路线完全可以实现全过程无需外部能量输入的能量自给式的可发酵糖的碳中和生产,并且秸秆糖浆的生产成本显著低于玉米来源的葡萄糖,可以为未来商业化生产液体生物燃料、可生物降解聚合物单体和生物基化学品的合成生物技术提供廉价、低碳且可持续的可发酵糖原料。

6.3 展望

本文为木质纤维素类原料的干法生物炼制产业化生产问题进行了技术层面的推进。在研究的过程中,某些技术的普适性以及在未来工艺的放大上或多或少存在着不足之处。因此为面对未来实际应用时可能遇到的挑战,现进行后续的展望:

(1) 为了进一步提高液态生物脱毒的效率以及追求脱毒期间可发酵糖非生产性消耗的最小化,未来可以在以下三个方面进行进一步研究:①对现有脱毒菌株进行脱毒性能强化或尝试筛选新的脱毒高效且几乎零糖耗的脱毒微生物。②继续深入研究 pH 监测脱毒终点法,或尝试研究其他在线监测分析液态生物脱毒终点的方法,研究这些方法是否比 pH 监测脱毒终点法更为准确。例如可以尝试气体分析法,即分别采用顺磁氧分析仪和红外二氧化碳分析仪对脱毒过程进气和排气中的 O_2 和 CO_2 含量进行分析,也许一旦脱毒菌在脱毒期间的碳源利用发生切换(例如从抑制物切换至糖),摄氧率(OUR)、二氧化碳释放率(CER)和呼吸商(RQ)就会存在某种规律性变化,可能允许用来帮助准确识别脱毒终点。③脱毒终点来临时如何快速且强势地终止生物脱毒进程(如菌株灭活等),防止脱毒菌在切换至发酵阶段或用于多工段生产高糖浓度可发酵糖浆的过程中对可发酵糖产生消耗。

(2) 在完成生物转化连续化之后,后续的分离纯化基本是已有发酵产品的常规流程,是成熟的连续化技术。至此为止,生物炼制全过程连续化的最后一块拼图就是预处理操作技术的连续化。连续预处理反应器已有报道^[180, 181],但所进行的连续预处理操作过程的体系固含量较低(仅 5%-10%(w/w)),由大量水或溶剂相与少量生物质物

料混合，形成相对连续相，故连续化操作相对容易实现。但是，低固含量预处理不可避免的会伴随着大量废水产生、大量有毒抑制物溢出、大量可溶性糖和固体物料损失等缺陷^[62]，其连续化操作因这些缺陷存在而不具备实际意义。本文采用的干酸预处理技术无任何废水、废弃物产生，同时预处理反应器的腐蚀问题也非常微弱^[68]，是极有潜力可以解决上述问题的底盘预处理技术。然而，干酸预处理面对的生物质物料都是疏松的颗粒状物料，是完全无法密封的非连续相。因此，如何将常压输送带上的疏松固体颗粒状物料连续地输送至处于高压状态的预处理反应器，并保持反应器的高温高压蒸汽相不向外泄露，存在技术上的难题。同时，如何在维持反应器压力的前提下，实现预处理物料连续向外卸出，也是一个同等难度的技术难题。而且，与生物转化过程的连续化实验不同，预处理操作的连续化测试须在较大规模的尺度上进行，例如中试或工业示范规模尺度上。

(3) 还有一个与生物炼制流态化和连续化相关的技术难题值得进行进一步研究，即耐高温纤维素酶的研发。连续生物转化过程必须要在预处理后快速实现液化或者流态化，然而，目前绝大部分木质纤维素原料预处理方法所用的预处理条件通常表现严苛（例如温度一般高达 100~200 °C），故预处理结束后必定会产生温度很高的预处理物料，远远超出了现有纤维素酶的适宜酶解温度范围（50~55 °C）。因此，未来如果能开发出像耐高温淀粉酶那样的在高温条件下（90~95 °C）仍能快速实现底物流态化的纤维素酶^[182]，将会进一步提高木质纤维素预处理物料连续生物转化效率。在课题研究过程中，我们也在约 100 °C 或更高温度下尝试了多种耐高温纤维素酶欲将高温预处理物料快速液化（流态化），但均未成功；目前没有办法像玉米淀粉那样在高温下借助耐高温酶实现原料的迅速液化。因此，开发耐受约 100 °C 或更高温度的耐热纤维素酶应是未来纤维素酶研究的一个重要课题。

(4) 高温生物炼制菌株用于连续化操作的稳定性有待验证，生物炼制菌株高温化前后的组学变化和耐高温的机制还有待探究。

(5) 当前经过耐高温性强化后的生物脱毒和乳酸发酵过程仍与纤维酶解糖化过程的温度差距 5 °C，因此为了进一步减少乃至避免生物炼制各工段的温度切换，还需要进一步强化当前生物炼制菌株的耐温性或者额外筛选一些具备高效脱毒、发酵能力的其他耐高温生物炼制菌株。如果条件成熟的话，将来的生物转化过程甚至可以是温度一致性的、“一锅法”的同步糖化、脱毒和发酵。

(6) 本研究制得的秸秆糖浆中，总糖的 20-30% 是五碳糖（主要为木糖），然而目前大多数传统工业发酵微生物均难以高效利用五碳糖，短时间难以改变现状，因此未来可以考虑如何低成本地生产糖组分更为纯粹的秸秆糖浆（不含任何五碳糖或仅存在极低浓度五碳糖），甚至可以拓展生产结晶葡萄糖，以充分开拓出秸秆糖浆的应用市场。

参考文献

- [1] Lynd LR, Beckham GT, Guss AM, Jayakody LN, Karp EM, Maranas C, McCormick RL, Amador-Noguez D, Bomble YJ, Davison BH, Foster C, Himmel ME, Holwerda EK, Laser MS, Ng CY, Olson DG, Román-Leshkov Y, Trinh CT, Tuskan GA, Upadhayay V, Vardon DR, Wang L, Wyman CE. Toward low-cost biological and hybrid biological/catalytic conversion of cellulosic biomass to fuels. *Energy & Environmental Science*. 2022, 15(3): 938–990.
- [2] Velvizhi G, Goswami C, Shetti N, Ahmad E, Pant K, Aminabhavi T. Valorisation of lignocellulosic biomass to value-added products: Paving the pathway towards low-carbon footprint. *Fuel*. 2022, 313: 16.
- [3] Liu Q, Lu M, Jin C, Hou W, Zhao L, Bao J. Ultra-centrifugation force in adaptive evolution changes the cell structure of oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum* into a favorable space for lipid accumulation. *Biotechnology and Bioengineering*. 2022, 119(6): 1509–1521.
- [4] He N, Jia J, Qiu Z, Fang C, Lidén G, Liu X, Bao J. Cyclic l-lactide synthesis from lignocellulose biomass by biorefining with complete inhibitor removal and highly simultaneous sugars assimilation. *Biotechnology and Bioengineering*. 2022, 119(7): 1903–1915.
- [5] Wyman C, Dale B. Producing biofuels via the sugar platform. 2015, 111: 45–57.
- [6] Singh N, Singhanian RR, Nigam PS, Dong C-D, Patel AK, Puri M. Global status of lignocellulosic biorefinery: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*. 2022, 344.
- [7] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006, 69(6): 627–642.
- [8] Ahmad A, Banat F, Taher H. A review on the lactic acid fermentation from low-cost renewable materials: Recent developments and challenges. *Environmental Technology & Innovation*. 2020, 20(4): 101138.
- [9] Mujtaba M, Fernandes Fraceto L, Fazeli M, Mukherjee S, Savassa SM, Araujo de Medeiros G, do Espírito Santo Pereira A, Mancini SD, Lipponen J, Vilaplana F. Lignocellulosic biomass from agricultural waste to the circular economy: a review with focus on biofuels, biocomposites and bioplastics. *Journal of Cleaner Production*. 2023, 402.
- [10] Arantes V, Saddler JN. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3(1): 4.
- [11] Nahak BK, Preetam S, Sharma D, Shukla SK, Syväjärvi M, Toncu D-C, Tiwari A. Advancements in net-zero pertinency of lignocellulosic biomass for climate neutral energy production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2022, 161.
- [12] Vera I, Hoefnagels R, van der Kooij A, Moretti C, Junginger M. A carbon footprint assessment of multi-output biorefineries with international biomass supply: a case study for the Netherlands. *Biofuels Bioproductions & Biorefining-Biofpr*. 2020, 14(2): 198–224.

- [13] Wang Y, Zhang B, Bao J. Rigorous Calculation of Greenhouse Gases (GHG) in Sustainable L-lactic Acid Production from Lignocellulosic Biomass based on Advanced Biorefinery Processing Technology. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2025, 13(17): 6186–6196.
- [14] Klemm D, Heublein B, Fink HP, Bohn A. Cellulose: Fascinating biopolymer and sustainable raw material. *Angewandte Chemie-International Edition*. 2005, 44(22): 3358–3393.
- [15] Sun XF, Sun RC, Fowler P, Baird MS. Extraction and characterization of original lignin and hemicelluloses from wheat straw. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 53(4): 860–870.
- [16] Zhou Z, Liu D, Zhao X. Conversion of lignocellulose to biofuels and chemicals via sugar platform: An updated review on chemistry and mechanisms of acid hydrolysis of lignocellulose. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2021, 146.
- [17] Dahadha S, Amin Z, Lakeh AAB, Elbeshbishy E. Evaluation of Different Pretreatment Processes of Lignocellulosic Biomass for Enhanced Biomethane Production. *Energy & Fuels*. 2017, 31(10): 10335–10347.
- [18] Hosseini Koupaie E, Dahadha S, Baziyar Lakeh AA, Azizi A, Elbeshbishy E. Enzymatic pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biomethane production-A review. *Journal of Environmental Management*. 2019, 233: 774–784.
- [19] Chio C, Sain M, Qin W. Lignin utilization: A review of lignin depolymerization from various aspects. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019, 107: 232–249.
- [20] Rezania S, Oryani B, Cho J, Talaiekhosani A, Sabbagh F, Hashemi B, Rupani PF, Mohammadi AA. Different pretreatment technologies of lignocellulosic biomass for bioethanol production: An overview. *Energy*. 2020, 199.
- [21] Sankaran R, Parra Cruz RA, Pakalapati H, Show PL, Ling TC, Chen W-H, Tao Y. Recent advances in the pretreatment of microalgal and lignocellulosic biomass: A comprehensive review. *Bioresource Technology*. 2020, 298.
- [22] 郭冬生, 黄春红. 近 10 年来中国农作物秸秆资源量的时空分布与利用模式. *西南农业学报*. 2016, 29(04): 948–954.
- [23] Qiu H, Sun L, Xu X, Cai Y, Bai J. Potentials of crop residues for commercial energy production in China: A geographic and economic analysis. *Biomass and Bioenergy*. 2014, 64: 110–123.
- [24] Abu-Omar MM, Barta K, Beckham GT, Luterbacher JS, Ralph J, Rinaldi R, Roman-Leshkov Y, Samec JSM, Sels BF, Wang F. Guidelines for performing lignin-first biorefining. *Energy & Environmental Science*. 2021, 14(1): 262–292.
- [25] Chen Z, Chen L, Khoo KS, Gupta VK, Sharma M, Show PL, Yap P-S. Exploitation of lignocellulosic-based biomass biorefinery: A critical review of renewable bioresource, sustainability and economic views. *Biotechnology Advances*. 2023, 69.
- [26] Hoang AT, Nguyen XP, Duong XQ, Agbulut U, Len C, Nguyen PQP, Kchaou M, Chen W-H. Steam explosion as sustainable biomass pretreatment technique for biofuel production: Characteristics and challenges. *Bioresource Technology*. 2023, 385.

- [27] Jonsson LJ, Martin C. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 103–112.
- [28] Okolie JA, Nanda S, Dalai AK, Kozinski JA. Chemistry and Specialty Industrial Applications of Lignocellulosic Biomass. *Waste and Biomass Valorization*. 2021, 12(5): 2145–2169.
- [29] Sarker T, Pattnaik F, Nanda S, Dalai A, Meda V, Naik S. Hydrothermal pretreatment technologies for lignocellulosic biomass: A review of steam explosion and subcritical water hydrolysis. *Chemosphere*. 2021, 284: 16.
- [30] Yu Y, Wu J, Ren X, Lau A, Rezaei H, Takada M, Bi X, Sokhansanj S. Steam explosion of lignocellulosic biomass for multiple advanced bioenergy processes: A review. *Renew Sust Energ Rev*. 2022, 154: 19.
- [31] Singh J, Suhag M, Dhaka A. Augmented digestion of lignocellulose by steam explosion, acid and alkaline pretreatment methods: A review. *Carbohydr Polym*. 2015, 117: 624–631.
- [32] du Pasquier J, Paës G, Perré P. Principal factors affecting the yield of dilute acid pretreatment of lignocellulosic biomass: A critical review. *Bioresource Technology*. 2023, 369: 128439.
- [33] Kim JS, Lee YY, Kim TH. A review on alkaline pretreatment technology for bioconversion of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*. 2016, 199: 42–48.
- [34] Loow Y-L, Wu TY, Md. Jahim J, Mohammad AW, Teoh WH. Typical conversion of lignocellulosic biomass into reducing sugars using dilute acid hydrolysis and alkaline pretreatment. *Cellulose*. 2016, 23(3): 1491–1520.
- [35] Zhou Z, Liu D, Zhao X. Conversion of lignocellulose to biofuels and chemicals via sugar platform: An updated review on chemistry and mechanisms of acid hydrolysis of lignocellulose. *Renew Sust Energ Rev*. 2021, 146: 24.
- [36] Seo D-J, Sakoda A. Assessment of the structural factors controlling the enzymatic saccharification of rice straw cellulose. *Biomass & Bioenergy*. 2014, 71: 47–57.
- [37] Woo WX, Tan JP, Wu TY, Yeap SK, Luthfi AAI, Manaf SFA, Jamali NS, Hui YW. An overview on the factors affecting enzymatic saccharification of lignocellulosic biomass into fermentable sugars. *Reviews in Chemical Engineering*. 2024, 40(2): 279–303.
- [38] Broda M, Yelle DJ, Serwanska K. Bioethanol Production from Lignocellulosic Biomass-Challenges and Solutions. *Molecules*. 2022, 27(24).
- [39] Liu CG, Xiao Y, Xia XX, Zhao XQ, Peng LC, Srinophakun P, Bai FW. Cellulosic ethanol production: Progress, challenges and strategies for solutions. *Biotechnology Advances*. 2019, 37(3): 491–504.
- [40] Zabed H, Sahu JN, Boyce AN, Faruq G. Fuel ethanol production from lignocellulosic biomass: An overview on feedstocks and technological approaches. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* 2016, 66: 751–774.

- [41] Xu GC, Ding JC, Han RZ, Dong JJ, Ni Y. Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation. *Bioresource Technology*. 2016, 203: 364–369.
- [42] Xue SJ, Li XC, Liu J, Zhang XT, Xin ZZ, Jiang WW, Zhang JY. Efficient sugar utilization and high tolerance to inhibitors enable *Rhodotorula toruloides* C23 to robustly produce lipid and carotenoid from lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technology*. 2024, 407.
- [43] Yook SD, Kim J, Gong G, Ko JK, Um Y, Han SO, Lee SM. High-yield lipid production from lignocellulosic biomass using engineered xylose-utilizing *Yarrowia lipolytica*. *Global Change Biology Bioenergy*. 2020, 12(9): 670–679.
- [44] Chen ZY, Liu G, Zhang J, Bao J. A preliminary study on L-lysine fermentation from lignocellulose feedstock and techno-economic evaluation. *Bioresource Technology*. 2019, 271: 196–201.
- [45] Wen JB, Xiao YQ, Liu T, Gao QQ, Bao J. Rich biotin content in lignocellulose biomass plays the key role in determining cellulosic glutamic acid accumulation by *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology for Biofuels*. 2018, 11.
- [46] Zhang B, Ren DY, Liu Q, Liu XC, Bao J. Coproduction of single cell protein and lipid from lignocellulose derived carbohydrates and inorganic ammonia salt with soluble ammonia recycling. *Bioresource Technology*. 2023, 384.
- [47] Zhong PX, Chen PY, Huo PJ, Ma L, Xu ZX, Li FG, Cai CG. Characterization of cotton stalk as a lignocellulosic feedstock for single-cell protein production. *Bioresource Technology*. 2025, 417.
- [48] Dörsam S, Fessler J, Gorte O, Hahn T, Zibek S, Syldatk C, Oehsenreither K. Sustainable carbon sources for microbial organic acid production with filamentous fungi. *Biotechnology for Biofuels*. 2017, 10.
- [49] Liu G, Bao J. Evaluation of electricity generation from lignin residue and biogas in cellulosic ethanol production. *Bioresource Technology*. 2017, 243: 1232–1236.
- [50] Raj T, Chandrasekhar K, Naresh Kumar A, Rajesh Banu J, Yoon J-J, Kant Bhatia S, Yang Y-H, Varjani S, Kim S-H. Recent advances in commercial biorefineries for lignocellulosic ethanol production: Current status, challenges and future perspectives. *Bioresource Technology*. 2022, 344.
- [51] Liang LY, Liu RM, Li F, Wu MK, Chen KQ, Ma JF, Jiang M, Wei P, Ouyang PK. Repetitive succinic acid production from lignocellulose hydrolysates by enhancement of ATP supply in metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioresource Technology*. 2013, 143: 405–412.
- [52] Lu JS, Lv Y, Jiang YJ, Wu M, Xu B, Zhang WM, Zhou J, Dong WL, Xin FX, Jiang M. Consolidated Bioprocessing of Hemicellulose-Enriched Lignocellulose to Succinic Acid through a Microbial Cocultivation System. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2020, 8(24): 9035–9045.
- [53] Zhou SZ, Zhang MM, Zhu LY, Zhao XL, Chen JY, Chen W, Chang C. Hydrolysis of lignocellulose to succinic acid: a review of treatment methods and succinic acid applications. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts* 2023, 16(1).

- [54] Guo XM, Li ZB, He NL, Zhang B, Liu XC, Bao J. Detection and elimination of trace d-lactic acid in lignocellulose biorefining chain: Generation, flow, and impact on chiral lactide synthesis. *Biotechnology and Bioengineering*. 2024, 121(2): 670–682.
- [55] Wu RF, Yang JH, Jiang YJ, Xin FX. Advances and prospects for lactic acid production from lignocellulose. *Enzyme and Microbial Technology*. 2025, 182.
- [56] Yi X, Zhang P, Sun JE, Tu Y, Gao QQ, Zhang J, Bao J. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer L- and D-lactic acid production from corn stover feedstock. *Journal of Biotechnology*. 2016, 217: 112–121.
- [57] Jedrzejczak P, Collins MN, Jesionowski T, Klapiszewski L. The role of lignin and lignin-based materials in sustainable construction-A comprehensive review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, 187: 624–650.
- [58] Supanchaiyamat N, Jetsrisuparb K, Knijnenburg JTN, Tsang DCW, Hunt AJ. Lignin materials for adsorption: Current trend, perspectives and opportunities. *Bioresource Technology*. 2019, 272: 570–581.
- [59] Zhao XL, Gao P, Shen BX, Wang XQ, Yue T, Han ZB. Recent advances in lignin-derived mesoporous carbon based-on template methods. *Renew Sust Energ Rev*. 2023, 188.
- [60] Espinosa E, Rol F, Bras J, Rodríguez A. Production of lignocellulose nanofibers from wheat straw by different fibrillation methods. Comparison of its viability in cardboard recycling process. *Journal of Cleaner Production*. 2019, 239.
- [61] Tong JQ, Hu WC, Qin YZ, Liu Y. Deep eutectic solvent pretreatment for green preparation of nanocellulose. *Cellulose*. 2023, 30(8): 4773–4792.
- [62] Zhang B, Liu X, Bao J. High solids loading pretreatment: The core of lignocellulose biorefinery as an industrial technology – An overview. *Bioresource Technology*. 2023, 369.
- [63] Zhao L, Sun ZF, Zhang CC, Nan J, Ren NQ, Lee DJ, Chen C. Advances in pretreatment of lignocellulosic biomass for bioenergy production: Challenges and perspectives. *Bioresource Technology*. 2022, 343.
- [64] Han T, Zhang B, Li H, Zhang H, Yang Y, Hu L, Ren X, Wang S, Zheng L, Han X, Liu G, Zhang J, Fei Q, Tang Y, Yang S, Bao X, Bao J. Year-Round Storage Operation of Three Major Agricultural Crop Residue Biomasses by Performing Dry Acid Pretreatment at Regional Collection Depots. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2021, 9(13): 4722–4734.
- [65] Liu G, Bao J. Constructing super large scale cellulosic ethanol plant by decentralizing dry acid pretreatment technology into biomass collection depots. *Bioresource Technology*. 2019, 275: 338–344.
- [66] Zhang J, Shao S, Bao J. Long term storage of dilute acid pretreated corn stover feedstock and ethanol fermentability evaluation. *Bioresource Technology*. 2016, 201: 355–359.
- [67] Han X, Bao J. General Method to Correct the Fluctuation of Acid Based Pretreatment Efficiency of Lignocellulose for Highly Efficient Bioconversion. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2018, 6(3): 4212–4219.

- [68] Shao S, Zhang J, Bao J. Reduction of Reactor Corrosion by Eliminating Liquid-Phase Existence in Dry Dilute Acid Pretreatment of Corn Stover. *Energy & Fuels*. 2017, 31(6): 6140–6144.
- [69] Rosales-Calderon O, Arantes V. A review on commercial-scale high-value products that can be produced alongside cellulosic ethanol. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12(1).
- [70] Abdel-Rahman MA, Sonomoto K. Opportunities to overcome the current limitations and challenges for efficient microbial production of optically pure lactic acid. *Journal of Biotechnology*. 2016, 236: 176–192.
- [71] Zaldivar J, Nielsen J, Olsson L. Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001, 56(1-2): 17–34.
- [72] Abdel-Rahman MA, Hassan SE-D, Alrefaey HMA, Elsakhawy T. Efficient Co-Utilization of Biomass-Derived Mixed Sugars for Lactic Acid Production by *Bacillus coagulans* Azu-10. *Fermentation*. 2021, 7(1): 28.
- [73] Campos J, Bao J, Lidén G. Optically pure lactic acid production from softwood-derived mannose by *Pediococcus acidilactici*. *Journal of Biotechnology*. 2021, 335: 1–8.
- [74] Li H, Shen Y, Wu M, Hou J, Jiao C, Li Z, Liu X, Bao X. Engineering a wild-type diploid *Saccharomyces cerevisiae* strain for second-generation bioethanol production. *Bioresources and Bioprocessing*. 2016, 3(1).
- [75] Ko JK, Um Y, Woo HM, Kim KH, Lee S-M. Ethanol production from lignocellulosic hydrolysates using engineered *Saccharomyces cerevisiae* harboring xylose isomerase-based pathway. *Bioresource Technology*. 2016, 209: 290–296.
- [76] Liu G, Zhang Q, Li H, Qureshi AS, Zhang J, Bao X, Bao J. Dry biorefining maximizes the potentials of simultaneous saccharification and co-fermentation for cellulosic ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2017, 115(1): 60–69.
- [77] Zhang B, Khushik FA, Zhan B, Bao J. Transformation of lignocellulose to starch-like carbohydrates by organic acid-catalyzed pretreatment and biological detoxification. *Biotechnology and Bioengineering*. 2021, 118(10): 4105–4118.
- [78] Ran H, Zhang J, Gao QQ, Lin ZL, Bao J. Analysis of biodegradation performance of furfural and 5-hydroxymethylfurfural by *Amorphotheca resinae* ZN1. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7.
- [79] He Y, Zhang J, Bao J. Acceleration of biodetoxification on dilute acid pretreated lignocellulose feedstock by aeration and the consequent ethanol fermentation evaluation. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9(1).
- [80] Han T, Zhang B, Yang H, Liu X, Bao J. Changes in pH Values Allow for a Visible Detection of the End Point in Submerged Liquid Biodetoxification during Biorefinery Processing. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2023, 11(46): 16608–16617.

- [81] He YQ, Zhang LP, Zhang J, Bao J. Helically agitated mixing in dry dilute acid pretreatment enhances the bioconversion of corn stover into ethanol. *Biotechnology for Biofuels*. 2014, 7.
- [82] Zhang L-P, Zhang J, Li C-H, Bao J. Rheological characterization and CFD modeling of corn stover–water mixing system at high solids loading for dilute acid pretreatment. *Biochemical Engineering Journal*. 2014, 90: 324–332.
- [83] Hou W, An R, Zhang J, Bao J. On-site measurement and modeling of rheological property of corn stover hydrolysate at high solids content. *Biochemical Engineering Journal*. 2016, 107: 61–65.
- [84] Hou W, Li L, Bao J. Oxygen Transfer in High Solids Loading and Highly Viscous Lignocellulose Hydrolysates. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*. 2017, 5(12): 11395–11402.
- [85] Wang A, Han T, Zhang B, Bao J. Minor Phenolic Compounds in Detoxified Lignocellulosic Hydrolysates Are the Determinant Factor on Cell Growth and Metabolic Activity of *Escherichia coli*. *Biotechnology Journal*. 2025, 20(11).
- [86] Zhang H, Zhang J, Bao J. High titer gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* from dry dilute acid pretreated corn stover without detoxification. *Bioresource Technology*. 2016, 203: 211–219.
- [87] Zhang H, Liu G, Zhang J, Bao J. Fermentative production of high titer gluconic and xylonic acids from corn stover feedstock by *Gluconobacter oxydans* and techno-economic analysis. *Bioresource Technology*. 2016, 219: 123–131.
- [88] Duan Y, Chen LM, Ma LX, Amin FR, Zhai YD, Chen GF, Li DM. From lignocellulosic biomass to single cell oil for sustainable biomanufacturing: Current advances and prospects. *Biotechnology Advances*. 2024, 77.
- [89] Liu G, Bao J. Maximizing cellulosic ethanol potentials by minimizing wastewater generation and energy consumption: Competing with corn ethanol. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 18–26.
- [90] Shiva, Barba FC, Rodríguez-Jasso RM, Sukumaran RK, Ruiz HA. High-solids loading processing for an integrated lignocellulosic biorefinery: Effects of transport phenomena and rheology-A review. *Bioresource Technology*. 2022, 351.
- [91] Ruiz HA, Conrad M, Sun SN, Sanchez A, Rocha GJM, Romani A, Castro E, Torres A, Rodríguez-Jasso RM, Andrade LP, Smirnova I, Sun RC, Meyer AS. Engineering aspects of hydrothermal pretreatment: From batch to continuous operation, scale-up and pilot reactor under biorefinery concept. *Bioresource Technology*. 2020, 299.
- [92] López-Gómez JP, Alexandri M, Schneider R, Venus J. A review on the current developments in continuous lactic acid fermentations and case studies utilising inexpensive raw materials. *Process Biochemistry*. 2019, 79: 1–10.
- [93] Brethauer S, Studer MH, Wyman CE. Application of a slurry feeder to 1 and 3 stage continuous simultaneous saccharification and fermentation of dilute acid pretreated corn stover. *Bioresource Technology*. 2014, 170: 470–476.
- [94] Brunecky R, Li YD, Decker SR, Himmel ME. Advancing continuous enzymatic hydrolysis for improved biomass saccharification. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2025, 18(1).

- [95] Brethauer S, Studer MH, Yang B, Wyman CE. The effect of bovine serum albumin on batch and continuous enzymatic cellulose hydrolysis mixed by stirring or shaking. *Bioresource Technology*. 2011, 102(10): 6295–6298.
- [96] Lischeske JJ, Stickel JJ. A two-phase substrate model for enzymatic hydrolysis of lignocellulose: application to batch and continuous reactors. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12(1).
- [97] Singh A, Bedore SR, Sharma NK, Lee SA, Eiteman MA, Neidle EL. Removal of aromatic inhibitors produced from lignocellulosic hydrolysates by *Acinetobacter baylyi* ADP1 with formation of ethanol by *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology for Biofuels*. 2019, 12.
- [98] Fayet A, Teixeira ARS, Allais F, Bouix M, Lameloise ML. Detoxification of highly acidic hemicellulosic hydrolysate from wheat straw by diafiltration with a focus on phenolic compounds. *Journal of Membrane Science*. 2018, 566: 112–121.
- [99] Ahring BK, Traverso JJ, Murali N, Srinivas K. Continuous fermentation of clarified corn stover hydrolysate for the production of lactic acid at high yield and productivity. *Biochemical Engineering Journal*. 2016, 109: 162–169.
- [100] Wirawan F, Cheng CL, Lo YC, Chen CY, Chang JS, Leu SY, Lee DJ. Continuous cellulosic bioethanol co-fermentation by immobilized *Zymomonas mobilis* and suspended *Pichia stipitis* in a two-stage process. *Applied Energy*. 2020, 266.
- [101] Ma KD, Hu GQ, Pan LW, Wang ZC, Zhou Y, Wang YW, Ruan ZY, He MX. Highly efficient production of optically pure L-lactic acid from corn stover hydrolysate by thermophilic *Bacillus coagulans*. *Bioresource Technology*. 2016, 219: 114–122.
- [102] Wang Y, Yang HC, Zhang B, Liu XC, Bao J. Continuous enzymatic saccharification and its rheology profiling under high solids loading of lignocellulose biomass. *Biochemical Engineering Journal* 2022, 186.
- [103] Zhang B, Li J, Liu X, Bao J. Continuous simultaneous saccharification and co-fermentation (SSCF) for cellulosic L-lactic acid production. *Industrial Crops and Products*. 2022, 187.
- [104] Zhang B, Han Y, Bao J. Formulating the racemic lactic acids-free nitrogen ingredients from plant proteins for cellulosic chiral lactic acid fermentation. *Industrial Crops and Products*. 2024, 217.
- [105] Costa CE, Moller-Hansen I, Romani A, Teixeira JA, Borodina I, Domingues L. Resveratrol Production from Hydrothermally Pretreated Eucalyptus Wood Using Recombinant Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Strains. *ACS Synthetic Biology*. 2021, 10(8): 1895–1903.
- [106] Khatun MM, Yu X, Kondo A, Bai F, Zhao X. Improved ethanol production at high temperature by consolidated bioprocessing using *Saccharomyces cerevisiae* strain engineered with artificial zinc finger protein. *Bioresource Technology*. 2017, 245: 1447–1454.
- [107] Li P, Fu X, Zhang L, Li S. CRISPR/Cas-based screening of a gene activation library in *Saccharomyces cerevisiae* identifies a crucial role of OLE1 in thermotolerance. *Microbial Biotechnology*. 2018, 12(6): 1154–1163.

- [108] Tu WL, Ma TY, Ou CM, Guo GL, Chao Y. Simultaneous Saccharification and Co-fermentation with a Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* to Produce Ethanol from Sugarcane Bagasse under High Temperature Conditions. *Bioresources*. 2021, 16(1): 1358–1372.
- [109] Galanopoulou AP, Haimala I, Georgiadou DN, Mamma D, Hatzinikolaou DG. Characterization of the Highly Efficient Acid-Stable Xylanase and β -Xylosidase System from the Fungus *Byssoschlamys spectabilis* ATHUM 8891 (*Paecilomyces variotii* ATHUM 8891). *Journal of Fungi*. 2021, 7(6).
- [110] Houbraken J, Varga Jn, Rico-Munoz E, Johnson S, Samson RA. Sexual Reproduction as the Cause of Heat Resistance in the Food Spoilage Fungus *Byssoschlamys spectabilis* (Anamorph *Paecilomyces variotii*). *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, 74(5): 1613–1619.
- [111] Samson RA, Houbraken J, Varga J, Frisvad JC. Polyphasic taxonomy of the heat resistant ascomycete genus *Byssoschlamys* and its *Paecilomyces* anamorphs. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*. 2009, 22(1): 14–27.
- [112] Zhang B, Gebrekidan M, Yan Z, Yi X, Bao J. Very High Thermotolerance of an Adaptive Evolved *Saccharomyces cerevisiae* in Cellulosic Ethanol Fermentation. *Fermentation*. 2023, 9(4).
- [113] Hua SK, Wang YQ, Wang LY, Zhou QX, Li ZT, Liu P, Wang K, Zhu YY, Han D, Yu YJ. Regulatory mechanisms of acetic acid, ethanol and high temperature tolerances of acetic acid bacteria during vinegar production. *Microbial Cell Factories*. 2024, 23(1).
- [114] Chamnipa N, Thanonkeo S, Klanrit P, Thanonkeo P. The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018, 49(2): 378–391.
- [115] Li ZX, Kong HC, Li ZF, Gu ZB, Ban XF, Hong Y, Cheng L, Li CM. Designing liquefaction and saccharification processes of highly concentrated starch slurry: Challenges and recent advances. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2023, 22(3): 1597–1612.
- [116] Chacón SJ, Matias G, Vieira CFD, Ezeji TC, Maciel R, Mariano AP. Enabling butanol production from crude sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by batch-feeding it into molasses fermentation. *Industrial Crops and Products*. 2020, 155.
- [117] Mustafa G, Arshad M, Bano I, Abbas M. Biotechnological applications of sugarcane bagasse and sugar beet molasses. *Biomass Conversion and Biorefinery* 2023, 13(2): 1489–1501.
- [118] Cheng MH, Huang HB, Dien BS, Singh V. The costs of sugar production from different feedstocks and processing technologies. *Biofuels Bioproductions & Biorefining-Biofpr*. 2019, 13(3): 723–739.
- [119] Cao GL, Ximenes E, Nichols NN, Zhang LY, Ladisch M. Biological abatement of cellulase inhibitors. *Bioresource Technology*. 2013, 146: 604–610.
- [120] Guo HL, Zhao Y, Chang JS, Lee DJ. Inhibitor formation and detoxification during lignocellulose biorefinery: A review. *Bioresource Technology*. 2022, 361.

- [121] Sjulander N, Kikas T. Origin, Impact and Control of Lignocellulosic Inhibitors in Bioethanol Production-A Review. *Energies*. 2020, 13(18).
- [122] Wang SZ, Sun XX, Yuan QP. Strategies for enhancing microbial tolerance to inhibitors for biofuel production: A review. *Bioresource Technology*. 2018, 258: 302–309.
- [123] Chen JW, Zhang YQ, Wang YF, Ji XS, Zhang L, Mi XG, Huang H. Removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolyzates by vacuum membrane distillation. *Bioresource Technology*. 2013, 144: 680–683.
- [124] Wierckx N, Koopman F, Bandounas L, de Winde JH, Ruijsenaars HJ. Isolation and characterization of *Cupriavidus basilensis* HMF14 for biological removal of inhibitors from lignocellulosic hydrolysate. *Microbial Biotechnology*. 2010, 3(3): 336–343.
- [125] Xia J, Qiu ZY, Ma SB, Liu QQ, Han RX, Liu XY, Xu JX. Efficient polyamic acid production from corn straw hydrolysate by detoxification of phenolic inhibitors. *Frontiers In Bioengineering and Biotechnology*. 2023, 11.
- [126] Liu G, Zhang J, Bao J. Cost evaluation of cellulase enzyme for industrial-scale cellulosic ethanol production based on rigorous Aspen Plus modeling. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2015, 39(1): 133–140.
- [127] Chandel A, Garlapati V, Singh A, Antunes F, da Silva S. The path forward for lignocellulose biorefineries: Bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization. *Bioresource Technology*. 2018, 264: 370–381.
- [128] Bhatia SK, Jagtap SS, Bedekar AA, Bhatia RK, Patel AK, Pant D, Banu JR, Rao CV, Kim YG, Yang YH. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*. 2020, 300.
- [129] Guo H, Zhao Y, Chang J-S, Lee D-J. Inhibitor formation and detoxification during lignocellulose biorefinery: A review. *Bioresource Technology*. 2022, 361: 127666.
- [130] Raj T, Chandrasekhar K, Morya R, Kumar Pandey A, Jung J-H, Kumar D, Singhania RR, Kim S-H. Critical challenges and technological breakthroughs in food waste hydrolysis and detoxification for fuels and chemicals production. *Bioresource Technology*. 2022, 360: 127512.
- [131] Suryadi H, Judono JJ, Putri MR, Eclessia AD, Ulhaq JM, Agustina DN, Sumiati T. Biodelignification of lignocellulose using ligninolytic enzymes from white-rot fungi. *Heliyon*. 2022, 8(2): e08865.
- [132] Xie Y, Hu Q, Feng G, Jiang X, Hu J, He M, Hu G, Zhao S, Liang Y, Ruan Z, Peng N. Biodetoxification of Phenolic Inhibitors from Lignocellulose Pretreatment using *Kurthia huakuii* LAM0618T and Subsequent Lactic Acid Fermentation. *Molecules*. 2018, 23(10): 2626.
- [133] Robinson T, Nigam P. Bioreactor design for protein enrichment of agricultural residues by solid state fermentation. *Biochemical Engineering Journal* 2003, 13(2-3): 197–203.
- [134] Santiago AM, Conrado LS, Mélo BCA, Sousa CAB, Oliveira PL, Lima FCS. Solid State Fermentation: Fundamentals and Application [M]//DELGADO J M P Q,

- BARBOSA DE LIMA A G. Transport Phenomena and Drying of Solids and Particulate Materials. Cham; Springer International Publishing. 2014: 117–139.
- [135] Baldwin EL, Karki B, Zahler JD, Rinehart M, Gibbons WR. Submerged vs. Solid-State Conversion of Soybean Meal into a High Protein Feed Using *Aureobasidium pullulans*. *Journal of The American Oil Chemists Society*. 2019, 96(9): 989–998.
- [136] de Laguna IHB, Marante FJT, Mioso R. Enzymes and bioproducts produced by the ascomycete fungus *Paecilomyces variotii*. *Journal of Applied Microbiology*. 2015, 119(6): 1455–1466.
- [137] Wang LM, Li Y, Yu P, Xie ZX, Luo YB, Lin YW. Biodegradation of phenol at high concentration by a novel fungal strain *Paecilomyces variotii* JH6. *Journal of Hazardous Materials*. 2010, 183(1-3): 366–371.
- [138] Madeira JV, Macedo JA, Macedo GA. Detoxification of castor bean residues and the simultaneous production of tannase and phytase by solid-state fermentation using *Paecilomyces variotii*. *Bioresource Technology*. 2011, 102(15): 7343–7348.
- [139] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templaton D, Crocker D. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, Technical Report NREL/TP-510-42618, National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2010.
- [140] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Sluiter J, Templeton D. Determination of Ash in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP) Issue Date : 7 / 17 / 2005 Determination of Ash in Biomass Laboratory Analytical Procedure (LAP). 2008.
- [141] 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): 248–254.
- [142] Zhang B, Zhan B, Bao J. Reframing biorefinery processing chain of corn fiber for cellulosic ethanol production. *Industrial Crops and Products*. 2021, 170.
- [143] Qiu Z, Gao Q, Bao J. Engineering *Pediococcus acidilactici* with xylose assimilation pathway for high titer cellulosic l-lactic acid fermentation. *Bioresource Technology*. 2018, 249: 9–15.
- [144] Zhao K, Qiao QG, Chu DQ, Gu HQ, Dao TH, Zhang J, Bao J. Simultaneous saccharification and high titer lactic acid fermentation of corn stover using a newly isolated lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* DQ2. *Bioresource Technology*. 2013, 135: 481–489.
- [145] Yi X, Zhang P, Sun J, Tu Y, Gao Q, Zhang J, Bao J. Engineering wild-type robust *Pediococcus acidilactici* strain for high titer l- and d-lactic acid production from corn stover feedstock. *Journal of Biotechnology*. 2016, 217: 112–121.
- [146] He Y, Zhang J, Bao J. Dry dilute acid pretreatment by co-currently feeding of corn stover feedstock and dilute acid solution without impregnation. *Bioresource Technology*. 2014, 158: 360–364.
- [147] Hou W, Zhang M, Bao J. Cascade hydrolysis and fermentation of corn stover for production of high titer gluconic and xylonic acids. *Bioresource Technology*. 2018, 264: 395–399.

- [148] Kim M, Day DF. Use of Cellulase Inhibitors to Produce Cellobiose. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 162(5): 1379–1390.
- [149] Liu W, Wang Y, Yu Z, Bao J. Simultaneous saccharification and microbial lipid fermentation of corn stover by oleaginous yeast *Trichosporon cutaneum*. *Bioresource Technology*. 2012, 118: 13–18.
- [150] Arain A, Sherazi STH, Mahesar SA, Sirajuddin. Spectroscopic and chromatographic evaluation of solvent extracted guava seed oil. *International Journal of Food Properties*. 2017, 20(sup1): S556–S563.
- [151] Xu YY, Hua KJ, Huang Z, Zhou PP, Wen JB, Jin C, Bao J. Cellulosic hydrocarbons production by engineering dual synthesis pathways in *Corynebacterium glutamicum*. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*. 2022, 15(1).
- [152] 贾益群, 叶福媛, 王双, 张钰泉, 白姗姗. 生物样品中短链脂肪酸的快速提取与分析方法. *实验室研究与探索*. 2012, 31(07): 262–264.
- [153] Jin C, Hou W, Yao R, Zhou P, Zhang H, Bao J. Adaptive evolution of *Gluconobacter oxydans* accelerates the conversion rate of non-glucose sugars derived from lignocellulose biomass. *Bioresource Technology*. 2019, 289.
- [154] Zhang B, Wu L, Wang Y, Li J, Zhan B, Bao J. Re-examination of dilute acid hydrolysis of lignocellulose for production of cellulosic ethanol after de-bottlenecking the inhibitor barrier. *Journal of Biotechnology*. 2022, 353: 36–43.
- [155] Yi X, Gao QQ, Zhang L, Wang X, He YQ, Hu FX, Zhang J, Zou G, Yang SH, Zhou ZH, Bao J. Heterozygous diploid structure of *Amorphotheca resinae* ZN1 contributes efficient biodegradation on solid pretreated corn stover. *Biotechnology for biofuels*. 2019, 12.
- [156] Chen Z, Liu H, Zhang H, Ying W, Fang D. Oxygen mass transfer coefficient in bubble column slurry reactor with ultrafine suspended particles and neural network prediction. *Canadian Journal of Chemical Engineering*. 2013, 91(3): 532–541.
- [157] Dai L, Jiang WF, Jia RQ, 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, 348.
- [158] Oliva JM, Negro MJ, Alvarez C, Manzanares P, Moreno AD. Fermentation strategies for the efficient use of olive tree pruning biomass from a flexible biorefinery approach. *Fuel*. 2020, 277.
- [159] Pangsang N, Rattanapan U, Thanapimmetha A, Srinopphakhun P, Liu C-G, Zhao X-Q, Bai F-W, Sakdaronnarong C. Chemical-free fractionation of palm empty fruit bunch and palm fiber by hot-compressed water technique for ethanol production. *Energy Reports*. 2019, 5: 337–348.
- [160] Liu G, Sun JE, Zhang J, Tu Y, Bao J. High titer L-lactic acid production from corn stover with minimum wastewater generation and techno-economic evaluation based on Aspen plus modeling. *Bioresource Technology*. 2015, 198: 803–810.
- [161] Li Z, Zhang L, Zhang B, Bao J. pH shifting adaptive evolution stimulates the low pH tolerance of *Pediococcus acidilactici* and high L-lactic acid fermentation efficiency. *Bioresource Technology*. 2025, 416.

- [162] Wang Y, Zhang B, Liu X, Bao J. Balanced water and heat energy recycling by full evaporation of wastewater (FEW) in dry biorefining processes of lignocellulose biomass. *Waste Management*. 2025, 193: 307–316.
- [163] Hou W, Kan J, Bao J. Rheology evolution of high solids content and highly viscous lignocellulose system in biorefinery fermentations for production of biofuels and biochemicals. *Fuel*. 2019, 253: 1565–1569.
- [164] Jin C, Bao J. Lysine Production by Dry Biorefining of Wheat Straw and Cofermentation of *Corynebacterium glutamicum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2021, 69(6): 1900–1906.
- [165] Li Z, Zhang L, He N, Zhang B, Bao J. Competition between biodegradation fungus and lactic acid bacterium in the biorefinery processing chain for production of cellulosic L-lactic acid. *Bioresources and Bioprocessing*. 2024, 11(1).
- [166] Chen A, Zhang B, Bao J. Adaptive evolution of *Paecilomyces variotii* enhanced the biodegradation of high-titer inhibitors in pretreated lignocellulosic feedstock. *Bioresource Technology*. 2024, 411.
- [167] Tembo G, Epplin FM, Huhnke RL. Integrative Investment Appraisal of a Lignocellulosic Biomass-to-Ethanol Industry. *Western Journal of Agricultural Economics*. 2003, 28(3).
- [168] Kumar A, Sokhansanj S. Switchgrass (*Panicum virgatum*, L.) delivery to a biorefinery using integrated biomass supply analysis and logistics (IBSAL) model. *Bioresource Technology*. 2007, 98(5): 1033–1044.
- [169] Dale B. A sober view of the difficulties in scaling cellulosic biofuels. *Biofuels Bioproductions & Biorefining-Biofpr*. 2017, 11(1): 5–7.
- [170] Lloyd TA, Wyman CE. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresource Technology*. 2005, 96(18): 1967–1977.
- [171] Kumar L, Chandra R, Saddler J. Influence of steam pretreatment severity on post-treatments used to enhance the enzymatic hydrolysis of pretreated softwoods at low enzyme loadings. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011, 108(10): 2300–2311.
- [172] Sewsynker-Sukai Y, Naomi David A, Gueguim Kana EB. Recent developments in the application of kraft pulping alkaline chemicals for lignocellulosic pretreatment: Potential beneficiation of green liquor dregs waste. *Bioresource Technology*. 2020, 306.
- [173] Kinnarinen T, Golmaei M, Jernström E, Häkkinen A. Separation, treatment and utilization of inorganic residues of chemical pulp mills. *Journal of Cleaner Production*. 2016, 133: 953–964.
- [174] Shao S, Zhang J, Hou W, Qureshi AS, Bao J. Lower pressure heating steam is practical for the distributed dry dilute sulfuric acid pretreatment. *Bioresource Technology*. 2017, 238: 744–748.
- [175] Humbird D, Davis R, Tao L, Kinchin C, Hsu D, Aden A, Schoen P, Lukas J, Olthof B, Worley M, Sexton D, Dudgeon D. Process design and economics for conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Report NREL/TP-5100-47764. 2011.

- [176] Li HX, Wu ML, Xu LL, Hou J, Guo T, Bao XM, Shen Y. Evaluation of industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains as the chassis cell for second-generation bioethanol production. *Microbial Biotechnology*. 2015, 8(2): 266–274.
- [177] Archambault-Léger V, Losordo Z, Lynd LR. Energy, sugar dilution, and economic analysis of hot water flow-through pre-treatment for producing biofuel from sugarcane residues. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*. 2014.
- [178] Yu H, Pan Y, Wang Y, Li Z, Tian L. Influence of non-Newtonian fluid viscosity on the performance and energy loss mechanisms of centrifugal pumps. *Physics of Fluids*. 2025, 37(10).
- [179] 齐春华. 低温多效海水淡化装置性能评价指标确立及典型工程数据分析. *工业水处理*. 2025, 45(10): 219–226.
- [180] Cha YL, Yang J, Park Y, An GH, Ahn JW, Moon YH, Yoon YM, Yu GD, Choi IH. Continuous alkaline pretreatment of *Miscanthus sacchariflorus* using a bench-scale single screw reactor. *Bioresource Technology*. 2015, 181: 338–344.
- [181] Cheng MH, Dien BS, Lee DK, Singh V. Sugar production from bioenergy sorghum by using pilot scale continuous hydrothermal pretreatment combined with disk refining. *Bioresource Technology*. 2019, 289.
- [182] Xu QS, Yan YS, Feng JX. Efficient hydrolysis of raw starch and ethanol fermentation: a novel raw starch-digesting glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*. 2016, 9.

附录I 主要实验试剂

实验试剂	试剂规格	生产商
蛋白胨	BC	Oxoid 公司
酵母提取物 (YE)	BC	Oxoid 公司
琼脂	BC	上海阿拉丁生化科技股份有限公司
一水葡萄糖	AR	上海泰坦科技股份有限公司
磷酸二氢钾	AR	上海泰坦科技股份有限公司
磷酸氢二钾三水合物	AR	上海泰坦科技股份有限公司
硫酸镁七水合物	AR	上海泰坦科技股份有限公司
硫酸铵	AR	上海泰坦科技股份有限公司
氢氧化钙	AR	上海泰坦科技股份有限公司
氢氧化钠	AR	上海泰坦科技股份有限公司
盐酸	AR	上海泰坦科技股份有限公司
硫酸	AR	上海泰坦科技股份有限公司
山梨醇	AR	上海麦克林生化科技股份有限公司
柠檬酸	AR	上海泰坦科技股份有限公司
柠檬酸钠	AR	上海泰坦科技股份有限公司
碳酸钙	AR	上海泰坦科技股份有限公司

AR: 分析纯; 生化试剂: BC

附录II 主要仪器设备

名称	型号	生产商
预处理反应器	PCF20-1.6	烟台科立化工设备有限公司
糖化罐	BIOTECH-5L-4BG	上海保兴生物设备工程有限公司
脱毒罐	BIOTECH-3L-4BG	上海保兴生物设备工程有限公司
发酵罐	BIOTECH-3L/5L-4BG	上海保兴生物设备工程有限公司
旋转蒸发器	RE-301	上海力辰仪器科技有限公司
立式振荡培养箱	HZ-2111KB	江苏华利达实验设备厂
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器有限公司
超净工作台	SJ-CJ-1FD	苏洁医疗器械（苏州）有限公司
恒温水浴振荡器	HZ-9212S	江苏华利达实验设备厂
pH 电极	G301K	苏州汉星分析传感器有限公司
粉碎机	SF-300	上海科太粉碎设备厂
高效液相色谱	LC-20AD、LC-20AT	日本岛津公司
紫外检测器	SPD-20A	日本岛津公司
示差检测器	RID-10A	日本岛津公司
蒸汽发生器	HX-36D-2.5	上海华征特种锅炉制造有限公司
高压蒸汽灭菌锅	TOMY SX	TOMY（日本）
超低温冰箱	Forma-86C	Thermo Scientific. LTD.（美国）
超纯水制备仪	Milli-Q Synthesis	德国默克密理博公司
台式小型高速离心机	5415D	Eppendorf. LTD.（德国）
落地离心机	Avanti J-26SXP	Beckman Coulter（美国）
电子天平	BS223S	瑞士梅特勒利多仪器有限公司
真空泵	SHZ-D	上海力辰仪器科技有限公司
旋转蒸发器	RE-301	上海力辰仪器科技有限公司
粘度计	DV2TLVTJ0	Brookfield（Stoughton, 美国）

博士期间研究成果

已发表论文:

1. **Tao Han**, Bin Zhang, Hucheng Yang, Xicai Liu, Jie Bao*. Changes in pH values allow for a visible detection of the end point in submerged liquid biodetoxification during biorefinery processing. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2023, 11, 16608–16617. (对应本论文第二章)
2. **Tao Han**, Ya Wang, Bin Zhang, Jie Bao*. Fast fluidization of dry acid pretreated wheat straw and consequent continuous bioconversions for L-lactic acid production. *Bioresource Technology*, 2026, 447, 134254. (对应本论文第三章)
3. An Wang, **Tao Han**, Bin Zhang, Jie Bao*. Minor Phenolic Compounds in Detoxified Lignocellulosic Hydrolysates Are the Determinant Factor on Cell Growth and Metabolic Activity of *Escherichia coli*. *Biotechnology Journal*, 2025; 20:e70155.

已投稿论文:

韩涛, 向志强, Eric Principe Umutumwa, 张斌, 鲍杰*. 零排放、零外部能量输入的低成本可发酵秸秆糖浆的干法生物炼制生产及其应用. *生物工程学报*. (对应本论文第五章)

学术会议论文:

Tao Han, Jie Bao*. Fast Fluidization of Wheat Straw Feedstock and the Consequent Continuous Biorefinery Conversions of Wheat Straw Slurry to L-Lactic Acid Production. The 17th Asian Congress on Biotechnology (ACB2025) "Student Presentation (English)". September 23, 2025, Grand Hyatt Incheon, Incheon, South Korea. (**Oral presentation**)

已公开或申请的专利:

1. **韩涛**、张斌、鲍杰、徐敏、刘修才, 一种降解木质纤维素来源抑制物的方法及应用 (已转让) (专利公开号: CN118773266A)
2. 鲍杰、**韩涛**、张斌, 一种在线快速判断木质纤维素水解液中抑制物脱除终点的方法 (专利公开号: CN119101710A)
3. 鲍杰、**韩涛**、张斌, 一种流态化连续生物转化的生物炼制方法 (专利申请号: 202511002995.X)
4. 张斌, **韩涛**, 王安, 鲍杰, 一种零废水排放和呋喃醛抑制物残余的秸秆糖浆制备方法 (专利申请号: 202510056916.7)
5. 鲍杰、**韩涛**、张斌, 一种高温生物炼制方法及耐高温生物炼制菌株和应用 (专利申请号: 202511004088.9)
6. 鲍杰、**韩涛**、张斌, 基于 pH 切线轨迹实时监测生物质高浓度抑制物降解终点的方法

法（专利申请号：202511323418.0）

7.鲍杰、王安、**韩涛**、张斌，一种提高木质纤维素水解液发酵性能的方法（专利申请号：202511547357.6）

致谢

四年多的“花梨”时光一闪即逝。回过头来，自己能够来到华理，能够来到生物能源与生物炼制实验室，是兴趣的选择，更是命运的眷顾。

感谢鲍杰老师对我科研能力的训练。从课题方向的把握、实验方案的提出、研究进展的讨论、实验数据的整理，到论文和专利的草稿撰写和反复修改，都离不开鲍老师的辛勤付出和耐心指导。因此，在生物炼制与生物能源实验室的这段时间里，衷心感谢鲍杰老师为我们提供的学习和成长环境，以及对我科研工作和生活上的帮助和照顾。希望老师未来身体健康，在悦于科研之时也要多多保重自己的身体！

感谢张斌老师在论文和专利写作以及实验数据的分析和整理上给予我的重要帮助。斌哥是我学习和生活上的榜样，是我见过的为数不多的天赋与努力同在、幽默与厨艺兼具的科研达人和生活达人。此外，我要感谢两位饭搭子好朋友——Eric Principe Umutumwa 和向志强，感谢他们在实验和生活上对我的帮助和关心。还要感谢课题组里的众多同门，感谢大家的帮助和陪伴让我们共同进步、共同成长。

感谢凯赛生物有限公司刘修才董事长提供的工业预处理麦秆物料。感谢华东理工大学材料学院的夏浙安老师帮助联系螺杆设备厂家，并亲自开车载我们前往该公司与企业负责人共谈合作事宜。感谢昆山科信橡塑机械设备有限公司的刘丰田总经理提供螺旋混合设备进行流态化课题实验研究。

此外，我要感谢曾在我求学期间为我提供诸多帮助和宝贵建议的汪军爷爷和韩贤菊姑姑；感谢沈莉华、丁名珂、杨正武、罗辉、夏颖、张怡文、马育兰、邓睿轩、吴宵、高毫等好友对我的关心和帮助。

感谢周杰伦为我们一众歌迷朋友创作的众多美妙的音乐和电影作品，它们是陪伴我走过学生生涯的重要的精神食粮和情感避风港。唯一有些可惜的是，杰伦的演唱会门票太难抢了，从来没去过演唱会现场的我只好成为一名“假粉丝”。

感谢羽毛球、唱歌、练字、钓鱼、rua 猫等爱好一直以来对我的不离不弃，为我带来成长、快乐、慰藉和宁静。

感谢故乡的田野、松林、日出、晚霞、星空和袅袅炊烟给我留下美好回忆；感谢爸爸、妈妈、爷爷、奶奶和弟弟一直以来对我的关心、照顾和陪伴，感谢你们让我在想家的时候可以感受家的味道，希望我毕业之后能够努力让你们过上幸福安康的生活。

最后，感谢祖国母亲多年来对我的培育之恩！祝愿祖国繁荣昌盛，国泰民安！祝愿有生之年我能和我爱的人坐上直通台北的高铁，在统一后的台湾四处游玩，去看看我小时候语文课本上的日月潭；祝愿以后不仅可以前往被灭掉军国主义的日本打卡靖国神厕废墟，还能去解放军驻东京基地看五星红旗升旗仪式。相信，我们定能如愿！

韩涛

2025 年 12 月 8 日于上海