

学校代码: 10251
学 号: 010070164

華東理工大學

博 士 学 位 论 文

高温发酵木质纤维素生产

题 目 乙醇和乳酸

专 业 生物化工

研究方向 生物质能源

姓 名 楚德强

导 师 鲍杰

定稿时间: 2012 年 4 月 27 日

分类号: Q815 _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学

博士专业学位论文

高温发酵木质纤维素生产乙醇和乳酸

楚德强

指导教师姓名:

鲍杰 教授

华东理工大学生物工程学院

申请学位级别: 博士 _____ 专业名称: 生物化工 _____

论文定稿日期: 2012. 4. 27 _____ 论文答辩日期: 2012. 5. 5 _____

学位授予单位: 华东理工大学 _____

学位授予日期: _____

答辩委员会主席:

评 阅 人:

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

高温发酵木质纤维素生产乙醇和乳酸

摘要

木质纤维素原料同步糖化与发酵的主要不足是微生物发酵温度与纤维素酶最适温度不匹配。接近纤维素酶最适温度的高温发酵是木质纤维素生物转化过程的主要难点之一。本论文首先研究了商业纤维素酶的水解行为并提出一种简化的纤维素酶活评价方法,然后对高温高固含量下不同发酵参数对酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 同步糖化与发酵玉米秸秆生产乙醇进行了研究,同时发现并分离了一株用于发酵玉米秸秆的木质纤维素依赖型嗜热乳酸菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2,成功实现了高温条件下从木质纤维素原料生产高浓度乙醇和乳酸。

本文的第一部分提出了基于高效液相色谱分析的简化的纤维素酶活分析方法。研究发现,纤维素酶活的对数值能够很好的关联液相色谱测定的水解产物中葡萄糖和纤维素二糖浓度。基于此发现,本方法创新地使用了具有准确定量能力的液相色谱分析工具来获得水解产物中葡萄糖和纤维二糖浓度之比,从而表征纤维素酶水解纤维素生成单糖的能力。不同的商业纤维素酶水解玉米秸秆时表现差异很大,添加葡萄糖苷酶能够提高纤维素酶水解获得单糖的能力。

第二部分研究了高温高固含量下 *Sacharomyces cerevisiae* DQ1 同步糖化与发酵玉米秸秆生产乙醇。玉米秸秆进行稀酸预处理,然后一次水洗降低抑制物浓度后作为发酵基质,在有螺带浆的 5 升发酵罐中进行发酵实验,考察发酵参数对酿酒酵母 *Sacharomyces cerevisiae* DQ1 高温同步糖化乙醇发酵的影响。*S. cerevisiae* DQ1 在 YPD 培养基中的培养时,能够生长的温度可达 44 °C,但是培养温度超过 40 °C 时生长和发酵能力降低。在固含量 20% (w/w) 和纤维素酶 5 FPU/g 干基质条件下,发酵温度从 30 °C 升到 40 °C 都能够生产乙醇,在高温时有更好的表现。但是在 40 °C 直接同步糖化与发酵,随着发酵固含量或者纤维素酶浓度的提高,乙醇发酵变的缓慢,或者发酵停滞,这可能是由于 40 °C 时酵母的生长能力弱,同时抑制物和纤维素酶对酵母生长的抑制作用加强。在 40 °C 发酵即使额外添加营养,也不能够改善发酵行为。发酵工艺模式能够影响发酵的结果,采用变温发酵模式时,能够很好地克服直接发酵的问题。在固含量 30%, 15 FPU/g 干基质,采用变温同步糖化与发酵,乙醇的浓度和得率分别是 48 g/L 和 61%。实验表明,*S. cerevisiae* DQ1 能够在高温下发酵纤维素基质生产乙醇;高温乙醇发酵的微生物要在高温下有强的生长能力和耐受性,而且必须在真实纤维素基质和发酵条件下检验。本研究的创新在于使用耐高温的酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1,在高固含量下同步糖化与发酵真实的纤维素基质原料生产乙醇。

第三部分报道了分离和鉴定嗜热乳酸菌以及乳酸菌应用于木质纤维素生产高浓度乳酸。当高温发酵生物脱毒处理的玉米秸秆生产乙醇时,发现有乳酸大量积累。从含乳

酸的乙醇发酵液中分离到一株嗜热产乳酸菌，鉴定并命名为乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2，分离的微生物能够在高温（48 °C）下同步糖化与发酵生物脱毒的玉米秸秆迅速生产乳酸，乳酸浓度和得率分别到 75 g/L 和 63%。高温、厌氧发酵、低营养需求，木制纤维素依赖的特点，使 *P. acidilactici* DQ2 为同步糖化转化纤维素原料生产乳酸提供了良好的机遇，这一研究的创新点为首次分离到能够产乳酸的嗜热菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 并在高温下成功实现同步糖化与发酵木质纤维素原料生产乳酸。

本论文分别使用酵母 *S. cerevisiae* DQ1 和 *P. acidilactici* DQ2，高固含量下对稀酸预处理的玉米秸秆进行同步糖化与发酵，分别获得 48 g/L 乙醇和 75 g/L 乳酸，这一结果为木质纤维素高温加工提供了重要的技术保障，在纤维素高温发酵领域具有重要的应用价值。

关键字：玉米秸秆；纤维乙醇；纤维乳酸；高温同步糖化与发酵；纤维素酶活分析

Fermentation of Lignocellulose at High Temperature for Ethanol and Lactate Production

Abstract

One of the major technical barriers in the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulose is the mismatch of the optimal temperature between the fermenting microorganisms and the cellulolytic enzymes. In the present study, a simplified method of cellulase activity determination based HPLC assay was proposed. And, effects of different fermentation parameters on the SSF of the dilute acid pretreated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 at high solids loadings at elevated temperatures were detailed carried out. Furthermore, a lignocellulose-dependent thermophilic lactate producing strain *Pediococcus acidilactici* DQ2 was discovered and employed in the SSF of corn stover for lactate production. High titre ethanol and lactate were successfully achieved by the SSF of lignocellulose at high temperatures.

At the part one of the research work, a simplified cellulase assay method was presented based on HPLC assay. The method was according to the good linear relationships between logarithms of filter paper units measured by DNS method and sum concentrations of glucose and cellobiose measured by HPLC. Furthermore, the ratio of glucose to cellobiose could be obtained to characterize a cellulase for the capacity of enzymatic hydrolysis of cellulose into monomeric sugars. The innovative point of the method was the application of the specifically analytical tool HPLC for measuring the sugar concentrations which could give a meaningful index –the ratio of glucose to cellobiose. The performance of commercial cellulases had significant difference when enzymatic hydrolysis of the corn stover. The ratio of glucose to

cellobiose in the hydrolysate could be increased with supplementation of cellobiase to the cellulase.

At the part two of the research work was on the SSF of corn stover for ethanol production at elevated temperatures. The corn stover before use was pretreated with a method of dilute acid pretreatment and then washed with water once to reduce the inhibitors. The SSF experiments were conducted with the strain *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 in a 5 L helical stirring reactor. Temperature characteristics of *S. cerevisiae* DQ1 was firstly evaluated in YPD medium. The results indicated the strain could grow at 44 °C while the ethanol yield and grow ability of the strain were reduced greatly when cultured at the temperature over 40 °C. SSF experiments at different temperature without prehydrolysis were conducted when solid loadings and enzyme loading were 20 % (w/w), 5 FPU/g DM. The results indicated that *S. cerevisiae* could be employed in SSF at 40 °C which gave better performance than SSF at 30-37 °C. However, the fermentation was slowed or stuck when SSF experiments at 40 °C without prehydrolysis as increased solid loadings (~ 30%) and/or increased enzyme loadings (~ 15 FPU/g DM). This may due to the weak growth ability of *S. cerevisiae* DQ1 at 40 °C, and the inhibition of the inhibitors and cellulase were augmented as increased solid and/or enzyme loadings. Even supplementation with external nutrients into SSF experiments could not enhance the fermentation performance of *S. cerevisiae* DQ1 at 40 °C. The modes of SSF could significantly affect the fermentation performance. And SSF with temperature swing could overcome the problems related with SSF without prehydrolysis at 40 °C. SSF with temperature swing conducted at 30% solids loading with an enzyme loading of 15 FPU/g DM gave ethanol concentration 48 g/L and ethanol yield 61%. The research demonstrated that *S. cerevisiae* DQ1 could be used for ethanol fermentation from lignocellulose at elevated temperatures. Furthermore, the stain for cellulosic ethanol fermentation at elevated temperatures should be capable of robust growth and stress tolerance at high temperature and tested in the practical lignocellulose and conditions. The main innovative point of the research was using a thermotolerant *Saccharomyces* strain for SSF of high loadings of the practical lignocellulosic substrate at elevated temperatures.

At the part three of the research was on the discovery and isolation of a thermophilic lactate producing bacterium and its application in the SSF of corn stover for lactate production. The phenomena of lactate formation was observed when studying the ethanol fermentation from the bioabated dilute acid pretreated corn stover at high temperature. A thermophilic lactate producing was isolated from cellulosic ethanol broth and identified belong to *Pediococcus acidilactici*, named as DQ2. The SSF of bioabated corn stover using *P. acidilactici* DQ2 for lactate production could be conducted at the temperature up to 48 °C, and lactate concentration 73 g/L and yield 63% were obtained. With the characteristics of high

temperature tolerance, anaerobic fermentation, low nutrients requirements and lignocellulose-dependence, *P. acidilactici* DQ2 brought a great opportunity for the SSF of lignocellulose for lactate production. The main innovative point of the research was the first report of a thermophilic lactate producing *Pediococcus* strain souring from the lignocellulose and high titre lactate production by SSF of the dilute acid corn stover using *P. acidilactici* DQ2 at high temperature.

In this thesis, the SSF of the dilute acid pretreated corn stover at high temperatures using *S. cerevisiae* DQ1 and *P. acidilactici* DQ2 was carried out. The ethanol titer of 48 g/L and the lactate titre of 75 g/L were obtained, respectively, which provided the fundamental technology for the biorefinery of the lignocellulose and had great significance for application to the high temperature fermentation of lignocellulose.

Keywords: Corn stover; Cellulosic ethanol; Cellulosic lactate; Simultaneous saccharification and fermentation at elevated temperature; Cellulase activity assay

目录

第 1 章 绪论.....	1
1.1 前言.....	1
1.2 纤维素酶.....	2
1.3 纤维素酶滤纸活性的评价.....	3
1.4 高温乙醇发酵微生物.....	5
1.5 高温同步糖化与发酵木质纤维素生产乙醇的研究进展.....	7
1.6 高温乳酸发酵微生物.....	10
1.7 高温同步糖化与发酵木质纤维素原料生产乳酸的研究进展.....	12
1.8 论文研究的技术路线和目标.....	13
第 2 章 纤维素酶滤纸活性分析方法的改进.....	15
2.1 引言.....	15
2.2 实验材料与方法.....	15
2.2.1 纤维素酶与滤纸.....	15
2.2.2 纤维素酶的滤纸活性分析方法.....	15
2.2.3 纤维二糖酶活 (CBU) 的测定.....	16
2.2.4 基于 HPLC 分析的纤维素酶滤纸酶活测定.....	16
2.2.5 稀酸预处理玉米秸秆的方法.....	17
2.2.6 纤维素酶水解稀酸预处理的玉米秸秆.....	17
2.2.7 高效液相色谱分析.....	17
2.3 结果与讨论.....	17
2.3.1 基于 HPLC 分析的纤维素酶滤纸活性测定方法.....	17
2.3.2 不同纤维素酶水解滤纸生成的葡萄糖和纤维二糖的比较.....	19
2.3.3 三种商业纤维素酶水解稀酸预处理的玉米秸秆.....	22
2.3.4 添加纤维二糖酶对纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 水解能力的影响.....	24
2.3.5 基于滤纸单位 (FPU) 和 Glucose/cellobiose 评价纤维素酶.....	25
2.4 本章小结.....	26
第 3 章 高温高固含量下同步糖化与发酵玉米秸秆生产乙醇.....	27
3.1 引言.....	27
3.2 材料与方法.....	28
3.2.1 玉米秸秆原料.....	28
3.2.2 发酵微生物与纤维素酶.....	28
3.2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DQ1 发酵温度的评价.....	28

3.2.4 稀酸预处理玉米秸秆的方法.....	28
3.2.5 一次水洗玉米秸秆脱除抑制物.....	28
3.2.6 生物脱毒处理稀酸预处理后的玉米秸秆.....	29
3.2.7 纤维素酶水解稀酸预处理的玉米秸秆.....	29
3.2.8 酿酒酵母发酵种子液的驯化培养.....	29
3.2.9 同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆.....	29
3.2.10 分析方法.....	30
3.3 结果与讨论.....	31
3.3.1 稀酸预处理玉米秸秆的一次水洗液和水解液组成.....	31
3.3.2 温度对 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> DQ1 在 YPD 培养基中发酵的影响.....	31
3.3.3 温度对直接同步糖化与发酵玉米秸秆的影响.....	33
3.3.4 纤维素酶用量对高温直接同步糖化与发酵的影响.....	35
3.3.5 预处理玉米秸秆固含量对高温直接同步糖化与发酵的影响.....	37
3.3.6 营养物对高温直接同步糖化与发酵的影响.....	38
3.3.7 直接同步糖化与发酵和三步同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆.....	42
3.3.8 三步同步糖化与发酵与常规同步糖化与发酵稀酸预处理玉米秸秆.....	46
3.3.9 纤维素酶用量对变温同步糖化与发酵 30%固含量稀酸预处理的玉米秸秆的影响.....	48
3.3.10 比较固含量提高和纤维酶用量增加对同步糖化与发酵影响.....	52
3.3.11 高温直接同步糖化与发酵生物脱毒处理物料.....	53
3.3.12 发酵升温对同步糖化与发酵生物脱毒处理基质的影响.....	55
3.4 本章小结.....	56
第 4 章 嗜热乳酸菌的发现以及应用于木质纤维素生产高浓度乳酸.....	57
4.1 引言.....	57
4.2 材料与方法.....	57
4.2.1 试剂和药品.....	57
4.2.2 乳酸菌的分离.....	57
4.2.3 16S rDNA 序列分析及构建系统进化树.....	58
4.2.4 乳酸菌的保藏和培养.....	58
4.2.5 玉米秸秆的稀酸预处理和生物脱毒.....	58
4.2.6 生物脱毒玉米秸秆的发酵.....	59
4.2.7 分析方法.....	59
4.3 结果与讨论.....	59
4.3.1 高温发酵不灭菌生物脱毒秸秆生产乙醇过程伴随乳酸的形成.....	59
4.3.2 高温发酵灭菌后的生物脱毒秸秆生产乙醇伴随乳酸的形成.....	61
4.3.3 乳酸生成的验证：不接种酿酒酵母和 121 °C 高温灭菌发酵原料.....	62

4.3.4 乳酸生成的验证：稀酸预处理的玉米秸秆和生物脱毒处理秸秆的混合	64
4.3.5 乳酸生成验证：氨水过碱处理生物脱毒玉米秸秆	65
4.3.6 乳酸生成验证：在摇瓶中玉米秸秆水解液发酵	67
4.3.7 乳酸菌的分离与鉴定	68
4.3.8 <i>Pediococcus acidilactici</i> DQ2 的生长曲线和培养基优化	69
4.3.9 <i>Pediococcus acidilactici</i> DQ2 高温同步糖化与发酵玉米秸秆生产乳酸	71
4.3.10 <i>Pediococcus acidilactici</i> DQ2 在不同培养基发酵的比较	73
4.4 本章小结	74
第 5 章 结论与展望	76
参考文献	78
附录 I 主要实验试剂与仪器和设备	91
附录 II 分析图谱	93
学术成果	94
致谢	95

第 1 章 绪论

1.1 前言

木质纤维素（约 2000 亿吨/年）是地球上最丰富的可再生有机资源^[1,2]，通过工业技术可以把这些资源转化为能源和化学品^[3-5]，为人类经济社会可持续发展提供坚实的基础。在木质纤维素原料的转化技术中，基于纤维素酶水解和微生物发酵的生物炼制技术，具有低能耗、环保、高效等优势一直是研究的重要方向^[6,7]。

如图 1 所示，木质纤维素加工过程一般包括原料收集、预处理、抑制物脱除、酶解/同步糖化与发酵，产品纯化等单元，尽管每个技术单元的研究都取得了进展，但是商业化木质纤维素炼制依然面临着许多挑战，包括先进的原料预处理技术，更高效低成本的纤维素酶，以及适合于木质纤维素体系发酵的微生物^[7-10]。纤维素酶能否高效地水解纤维素为可利用的糖是生物炼制过程的关键之一，而纤维素酶的评价方式会影响到纤维素酶的开发和在纤维素水解中的应用^[2,11-13]。特别是，木质纤维素加工常采用同步糖化与发酵工艺，这就希望微生物的发酵温度能够与纤维素酶最适水解温度（50 °C 及以上）相匹配，因此，纤维素原料的高温发酵是重要的研究热点和方向^[14-19]。乙醇和乳酸是发酵木质纤维素原料生产的代表性产品，也是本文的研究内容。本章对纤维素酶及其评价方式，高温乙醇发酵微生物和纤维素乙醇发酵，以及高温乳酸发酵微生物和纤维素乳酸生产的研究进展进行了综述。

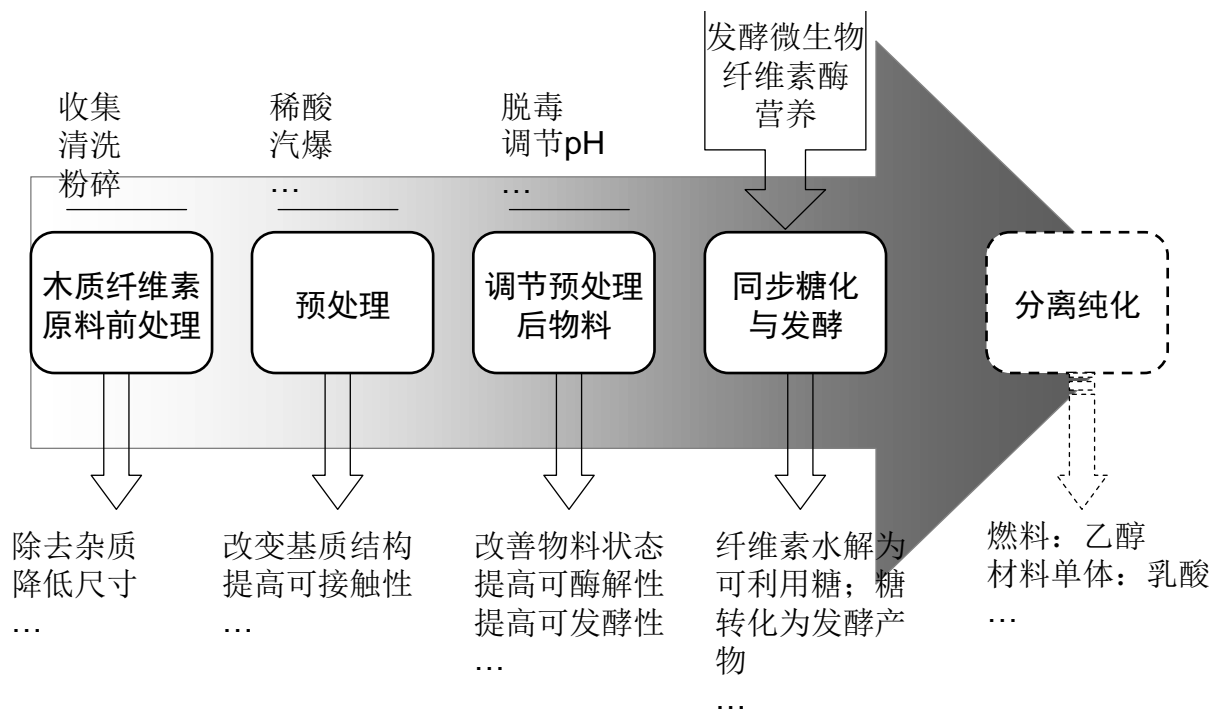


图 1.1 木质纤维素生物炼制流程示意图

Fig. 1.1 Schematic flow diagram showing the biorefinery of lignocellulosic feedstocks

1.2 纤维素酶

纤维素酶是降解木质纤维素的重要催化剂，其成本和效能显著影响木质纤维素的生物加工，是生物炼制的瓶颈之一。一般纤维素酶制剂是酶的混合物，各组分酶的协同作用才能够转化纤维素为可利用的糖。纤维素酶复合物主要包括三种糖苷水解酶即内切- β -(1, 4)-葡聚糖酶 (EC 3.2.1.4)、外切- β -(1, 4)-纤维二糖水解酶 (EC 3.2.1.91) 和 β -葡萄糖苷酶 (EC 3.2.1.21)。内切葡聚糖酶通过随机切断纤维素链内部 β -1, 4-糖苷键，把纤维素链分解为更小的单元，从而降低纤维素的聚合度；外切纤维二糖水解酶催化纤维素链的还原和非还原端，降解生成寡糖和葡萄糖； β -葡萄糖苷酶能够水解纤维糊精和纤维二糖生成葡萄糖，解除对外切纤维二糖水解酶的抑制作用，这种不同酶的连续性的作用，实现了纤维素的完全降解^[2, 20, 21]。

纤维素酶与纤维素基质的水解反应是在固液态物质混合的非均相体系进行，这决定了纤维素水解的复杂性，特别是当水解真实的木质纤维素基质时，除了受到纤维素基质来源和组成，基质预处理方式和处理强度，底物浓度，产物抑制等因素影响外，还要受使用的纤维素酶制剂的影响，包括纤维酶制剂组成，生产和调配方式，酶稳定性和耐受性等^[2, 22]。一般工业纤维素酶和半纤维素酶的生产用菌株主要是里氏木霉 (*Trichoderma reesei*)^[23]，属于中温生长的软腐真菌，具有很强的蛋白分泌能力，是研究最深入的产纤维素酶微生物，但是其分泌酶系中含有较高的外切和内切葡聚糖酶，纤维二糖酶比例低，

表 1.1 具有代表性的水解木质纤维素的商业酶制剂

Table 1.1 Typical commercial cellulase enzymes for degrading lignocellulose

纤维素酶	来源	特点	温度 °C, pH	生产公司
Accellerase™ 1500	GM- <i>Trichoderma reesei</i>	更高糖苷酶活	50-65, 4.0-5.0	Genencor
Accellerase™ 1000	GM- <i>Trichoderma reesei</i>	适合纤维质	50-65, 4.0-5.0	Genencor
Accellerase™ XC	<i>Penicillium funiculosum</i>	高半纤维素酶	45-65, 3.5-6.5	Genencor
Spezyme™ CP	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	缺葡萄糖苷酶	50-65, 4.0-5.5	Genencor
Cellic® CTec2	-	适应多种原料 适应高固含量	45-50, 5.0-5.5	Novozymes
Cellic® HTec2	-	高半纤维素酶	45-50, 5.0	Novozymes
Novozyme® 188	<i>Aspergillus niger</i>	纤维二糖酶	45-50, 5.0	Novozymes
AlternaFuel® 200P	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	缺葡萄糖苷酶	35-80, 3.5-5.5 最优 50, 4.5	Dyadic
AlternaFuel® CMAX	<i>Myceliophthora thermophila</i>	耐热酶复合物	35-80, 3.5-8.0 最优 55, 6.0	Dyadic
Youtell	-	缺葡萄糖苷酶	50-65, 4.0-5.0	Youtell

GM, 基因工程改造; -, 未知; 数据源自产品官网, 杰能科 (www.genencor.com), 诺维信 (www.bioenergy.novozymes.com), Dyadic (www.dyadic.com), 优特尔 (www.youtell.com)

需要额外添加葡萄糖苷酶^[4],但是,不同来源葡萄糖苷酶有不同的最适温度和 pH 范围^[2],这会影响到整体纤维素酶体系的活性。有多种方式提高纤维素酶的效能,或者对微生物做基因工程,使其自身能够分泌均衡的酶系,或者用产酶细菌生产新型纤维素酶^[4],或用耐热或嗜热微生物生产纤维素酶^[24],以增强热稳定性,一般酶水解反应温度提高 10 °C,酶活性增加一倍^[25]。为了有效水解真实的木质纤维素,纤维素酶中除了包含几种主要的酶蛋白,添加木聚糖酶系如内切木聚糖酶、木二糖水解酶、乙酰酯酶、漆酶等^[26, 27]能够解除纤维素水解产物中木寡糖的抑制,从而显著提高整体的水解,这就需要针对不同纤维素基质的高通量优化和筛选纤维素酶^[28]。

纤维乙醇的迅猛发展,促进了商业纤维素酶的生产 and 提高,大量的科研者投入到纤维素酶的研究中,以开发低成本和高效的纤维素酶制剂,满足实际应用。表 1.1 展示的是主要纤维素酶生产商近年来开发的纤维素水解酶,可以看出纤维素酶制剂最适温度几乎都在 50 °C 以上,并且朝低成本,多种酶复合,高温度和高底物浓度耐受的方向开发。但是,不同来源或不同方式生产的酶制剂,水解木质纤维素时,差异很大。当纤维素酶不是在最适温度使用时,酶活性会降低很多如纤维素酶 Cellic[®] Ctec2 在 35 °C 作用时,只有 50 °C 酶活性 40%,使用成本就会增加。2010 年纤维素酶制造商杰能科公司与诺维信公司报道,生产 1 加仑乙醇,纤维素酶的成本与两年前相比降低 80%,约是 0.5 美元^[9],然而当前纤维素酶成本仍然较高,需要加大投入和研究,进一步降低成本^[29]。

1.3 纤维素酶滤纸活性的评价

木质纤维素的酶水解是一个复杂的过程,依赖于所用纤维素酶制剂中不同酶组分的协同作用。纤维素酶的作用底物成分复杂,结构多变,不溶于水,这种基质的不均一性,酶体系的复杂性,酶可接触的基质表面的有限和不断变化等都对评价纤维素酶提出了挑战^[30],导致纤维素酶的评价方法步骤复杂,不统一,评价方式经历了逐步演进和提高^[13]。

纤维素酶主要有内切酶、外切酶和纤维二糖酶组成,最初主要评价其中的单一组分包括羧甲基纤维素做基质的内切葡聚糖酶,微晶纤维素做基质的外切葡聚糖酶和纤维二糖做基质的纤维二糖酶,这样测试用的基质种类就很多,包括可溶的,不可溶的;另外的缺点是,这种评价难以反映纤维素酶在实际木质纤维素水解中的能力。采用标准易得的不可溶纤维素作为基质,能够比较准确测定纤维素酶体系的总体滤纸酶活,反映其水解能力^[30, 31]。20 世纪 70 年代美国的 Mandels 等人^[31]提出并逐步完善纤维素酶滤纸活性分析(Filter paper activity, FPA)方法,1987 年这种滤纸活性分析方法被国际纯粹和应用化学联合会采用和推荐^[32],1996 年美国能源部国家可再生能源实验室的 Adney 和 Baker^[33]编撰发布这种滤纸活性分析方法,为标准物质领域分析方法。滤纸活性分析方法基于纤维素酶转化固定比例(4%)的纤维素基质,即在 50 °C, pH 4.8 用 0.5 mL 纤维素酶 60 min 水解 50 mg 滤纸条(1×6 cm)生成 2 mg 还原糖。纤维素酶水解表现为非线性的水解规律,因此纤维素酶活定义没有遵循国际单位(IU)。纤维素酶活单位采用滤纸单位(Filter paper units)表示,即每毫升未稀释酶液中有多少个 FPU。滤纸活

性分析方法的优点是选择水不溶纤维素做为反应基质例如 Whatman #1 滤纸；水解转化固定比例的标准滤纸，达到能够同时水解滤纸中结晶和无定形纤维素组分，考察纤维素酶协同作用；该方法所用材料和试剂便宜，在实验室较常见。但是，纤维素酶的滤纸活性分析方法（FPA）有不少缺点，耗费时间，实验强度大，结果重现性低，主要体现在其操作的复杂性和容易受到外界因素^[11, 32, 34]，包括分析方法的步骤和还原糖测定方法。滤纸活性分析过程必须严格按照标准的程序操作，但是由于过程复杂，非常容易受到人为因素的影响包括裁剪滤纸的形状、滤纸的重量、纤维素酶稀释的准确性、水解和煮沸的温度控制、吸光值测定等；滤纸分析方法的条件决定了该方法不适合非常低活性的纤维素酶活分析。滤纸酶水解，产生了包括葡萄糖等的还原糖，采用 3, 5-Dinitrosalicylic acid (DNS) 分析方法^[35]，DNS 试剂配制过程复杂，试剂消耗量大，且有毒害；DNS 储存和使用有条件限制，易造成浪费；DNS 测定易受到操作，以及反应体系中其他物质干扰；DNS 虽能够测定液体中还原性的糖，但不能准确定量测定生成的各种组分，即不具备专一性；在以葡萄糖为还原糖标准时，测定纤维二糖或木糖有大的偏差。

鉴于纤维素酶滤纸活性分析的局限和存在的问题，纤维素酶活的评价方法是个重要的研究方向，因为纤维素评价方法会显著影响纤维素酶制剂的优化、开发和实际应用。如图 1.2 所示滤纸分析方法也一直在改进和优化，这包括分析方法，步骤以及水解产物的分析，评价方法朝着操作简单、高通量、更准确，以及实际纤维原料作为测试基质的方向发展。目前，微生物可发酵利用的糖主要是单糖（葡萄糖），因此采用专一性强，定量分析的工具检测水解产物，能更真实反映纤维素酶的实际水解能力，因为只有当纤维素酶具备水解纤维素基质成为单糖的能力时，才能够真正用于实际纤维素应用。近年来，高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography, HPLC）在分析液体样品中的糖组分的领域，以其高效，定量，精确，已取代传统的还原糖分析方法^[36]。HPLC 已经成为实验室常用仪器，在纤维素基质转化领域分析中能够快速，准确定量水解产物，新分析工具的应用能够更有效分析纤维素酶的活性。

1980-1989	Ghose ^[32] , Wood 和 Bhat ^[37] 进一步完善纤维素酶滤纸活性分析 Schwald 等 ^[34] 对比 HPLC 与 DNS 分析; Breuil ^[38] 比较还原糖测定方法的对酶活影响
1990-1999	Johnston 等 ^[39] 使用 BCA 试剂分析还原糖测定酶活
2000-2009	Coward-Kelly 等 ^[34] : 滤纸活性分析方法的改进; Nordmark 等 ^[40] : 滤纸活性分析方法用于低活性酶液; King 等 ^[41] , Decker 等 ^[42] , Xiao 等 ^[43] : 自动化, 微板高通量分析; Kabel 等 ^[44] 标准滤纸分析方法的不足, 用实际纤维素基质评价; Wu 等 ^[45] 基于实际纤维素基质水解分析酶活; Zhang 等 ^[46] 基于实际水解能力测定残留酶活; Hu 等 ^[47] 使用石英晶体微天平技术用于纤维素酶酶活分析
2010-2011	Pryor 和 Nahar ^[48] 标准滤纸分析方法的不足; Navarro 等 ^[49] 基于实际纤维素分析酶活

图 1.2 纤维素酶滤纸活性分析方法的研究和演进

Fig. 1.2 Typical researchs and evolution of filter paper activity (FPA) assay for cellulases

1.4 高温乙醇发酵微生物

纤维素乙醇发酵的重要挑战之一是寻求适合于纤维素体系发酵的生物催化剂^[50], 特别是能够在纤维素酶最优水解条件下生长的微生物^[9, 51], 因为同步糖化与发酵纤维素过程中纤维素糖化始终是限速步骤。如前所述商业纤维素酶最适作用温度一般在 50 °C 及以上, 常温发酵导致纤维素酶成本在纤维素加工中增加^[23]。耐受高温的微生物应用于发酵有许多优点, 随着纤维乙醇研究的发展, 以及面向商业化生产的成本控制, 迫切希望寻求高温发酵微生物以充分发挥纤维素酶效能和高温发酵的优势, 提高发酵能力, 降低生产过程的成本。

表 1.2 为近年来文献报道的乙醇发酵温度在 40 °C 及以上的微生物。微生物生长温度的范围和上限, 与微生物菌株有很大关系, 能够发酵产乙醇的微生物菌株很多, 其中酿酒酵母是酒精发酵行业最常用的菌株。所有物理因素中, 对酵母生命周期影响最大的就是发酵温度。在工业发酵中, 大多数酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 菌株, 最适的发酵温度 30-35 °C, 有的也能够在 37 °C 生长发酵; 但与之相比, 克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 具有更强耐热性, 大多数菌株能够在 45 °C 生长, 但是其产物耐受性能较差, 比如对乙醇的耐受性酿酒酵母达 13.7% (v/v), 而克鲁维酵母只有 9.4% (v/v)^[74]。为了获得在更高温度下能够发酵的微生物, 某些古生嗜热菌在生物能源领域应用中受到重视^[17, 73, 75], 这是因为其能够耐温, 耐受极端环境的特性, 但是, 这类微生物代谢复杂, 产物产率低, 应用受限。鉴于酿酒酵母菌株有良好的应用实践经验, 所以在酿酒酵母属筛选耐高温酵母是一个重要的选择途径。

微生物所能耐受的温度范围不是一成不变的, 发酵环境以及微生物的状态对此影响很大, 比如发酵体系低水活性, 低的 pH, 高的底物以及乙醇浓度等都会降低微生物的生长温度范围。同样, 如果微生物不是在最优温度生长或发酵, 那么其耐受环境压力的能力会相应降低^[74]。一般酿酒酵母若在其生长温度范围内, 随着培养温度的升高发酵得率和生长能力会下降, 只有在合适温度范围符合线性关系, 若超过某一温度, 生长能力就突然降低, 甚至不能够消耗完基质^[53, 55, 65]。相比淀粉类基质, 纤维素基质发酵的有其特殊性如预处理产生的多种抑制物、体系黏度大、营养贫乏、离子浓度高等这必然对微生物的耐受性特别耐温性提出更高的要求。随着温度升高, 多数抑制物的抑制能力增强, 甚至纤维素酶也能够显著影响微生物的生存^[54, 76], 因此大多数高温纤维乙醇发酵研究只是停留在诱变与筛选耐热微生物^[52, 56, 58]。由于微生物温度耐受的复杂性, 因此高温纤维乙醇发酵能否成行, 必须在真实的纤维素原料及发酵条件下检验。

微生物的耐温性, 主要取决于其自身属性, 在高温发酵应用中, 除了提高微生物内在耐温性外, 有的研究也希望通过改变外部因素提高发酵过程微生物耐温能力。高温和压力能够诱导微生物的响应, 通过改变细胞膜的脂肪酸组成, 增加了细胞膜的流动性, 也能够引起细胞结构的变化, 从而提高对应条件下的耐受性, 但这使微生物的生长和发酵能力下降^[57]。Menon 等^[53]发现细胞固定化技术能够提高酿酒酵母 40 °C 发酵地衣淀粉

表 1.2 高温发酵产乙醇的微生物

Table 1.2 Typical microorganisms for producing ethanol by fermentation at elevated temperatures

微生物	温度 °C	发酵基质	文献
酿酒酵母			
<i>S. cerevisiae</i> HU-TY-1	~40	葡萄糖	Jin 等 ^[52]
<i>S. cerevisiae</i> sp.	40-45	葡萄糖	Menon 等 ^[53]
<i>S. cerevisiae</i> KNU 5377	30-40	葡萄糖	Park 等 ^[54]
<i>S. cerevisiae</i> NFRI3225	30-42	葡萄糖	Watanabe 等 ^[55]
<i>S. cerevisiae</i> VS	~42	葡萄糖	Sridhar 等 ^[56]
<i>S. cerevisiae</i> IR2-9a	~42	葡萄糖	Edgardo 等 ^[57]
<i>S. cerevisiae</i> MT15	~40	糖蜜	Rajoka 等 ^[58]
<i>S. cerevisiae</i> sp.	~40	葡萄糖	Kadar 等 ^[59]
<i>S. cerevisiae</i> NRRL-Y-132	~43	葡萄糖	Krishna 等 ^[60]
<i>S. cerevisiae</i> UT1	~40	葡萄糖	邹建忠 ^[61]
<i>S. cerevisiae</i> B ₁₆	~42	葡萄糖	李振林等 ^[62]
<i>S. cerevisiae</i> FE-B	~42	葡萄糖	王娜娜等 ^[63]
克鲁维酵母			
<i>K.marxianus</i> IMB	~45	葡萄糖, 木糖	Faga 等 ^[64]
<i>K.marxianus</i> DMKU3-1042	~45	己糖, 戊糖	Rodrussamee 等 ^[65]
<i>K.marxianus</i> ECET10875	~42	葡萄糖	Garcia-Aparicio 等 ^[66]
<i>Kluyveromyces</i> sp. II PE453	~50	葡萄糖, 木糖	Kumar 等 ^[67]
<i>K.marxianus</i> DSMZ7239	~45	奶酪	Ozmihci 和 Kargi ^[68]
<i>K.marxianus</i> Y01070	~40	葡萄糖	Kadar 等 ^[59]
<i>K.fragilis</i> NCIM3358	~43	葡萄糖	Krishna 等 ^[60]
其他酵母			
<i>Isaatchenkia orientalis</i>	42-44	葡萄糖	Gallardo 等 ^[69]
Yeast RND13	~43	葡萄糖	Urano 等 ^[70]
<i>Candida acidothermophilum</i>	~45	葡萄糖	Kadam 和 Schmidt ^[71]
其他菌种			
<i>Clostridium phytofermentans</i>	~40	纤维素	Jin 等 ^[72]
<i>Thermoanaerobacterium saccharolyticum</i> ALK2	~50	纤维素	Shaw 等 ^[17]
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	~70	己糖, 戊糖	Cripps 等 ^[73]

水解液生产乙醇的效率。Faga 等^[64]实验发现发酵初始 pH 从 4.8 调高到 5.5 能够增加克鲁维酵母的乙醇发酵得率。Suryawati 等^[77]同样发现, 提高初始 pH 能够延长微生物发酵时间, 但是提高至 45 °C 发酵, 即使培养基中营养物浓度提高 3 倍, 也没能够延长发酵和提高乙醇得率。Urano 等^[70]报道增加细胞的接种量, 可以提高 40 °C 发酵时葡萄糖利用速率, 但是发酵温度提高到 43 °C, 即使增加细胞接种量, 也不能够完全消耗葡萄糖, 可能是高温导致的细胞死亡超过增加接种量所带来的细胞存活。Anderson 等^[78]报道通过添加脂质营养如酵母粉、不饱和脂肪酸、麦角甾醇等可能提升高温乙醇发酵性能, 但是由于微生物细胞的耐热机理不明^[52], 通过改善发酵条件的方法存在应用限制, 未必适合不同发酵基质和微生物。

即使在传统乙醇发酵体系, 酵母细胞也受到高产物浓度、低营养以及 pH 变化等影响, 而高温条件是一个更苛刻的环境压力^[16], 尽管高温发酵从机理到应用面临许多问题, 但是研究温度对发酵的影响特别重要, 特别是高温纤维质发酵有巨大前景。

1.5 高温同步糖化与发酵木质纤维素生产乙醇的研究进展

高温发酵是强化木质纤维素原料同步糖化与发酵重要途径之一, 这种优势主要表现在以下方面:

1. 纤维素酶方面. 纤维素酶是纤维素乙醇发酵成本重要的构成部分。如前所述, 目前纤维素酶最适作用温度都在 50 °C 以上, 而且朝着更耐温方向发展。在常规 (35 °C) 温度同步发酵, 降低了纤维素酶活性, 从而需要增加纤维素酶用量^[77]。一般纤维素酶的酶活 45 °C 时是 35 °C 的两倍, Bollok 等^[79]报道如果以 37 °C 为对照发酵温度, 温度升高到 40 和 50 °C 纤维素酶成本分别可以节约 16%, 50%。同样, Shaw 等^[17]报道在 50 °C 发酵, 纤维素酶用量与 37 °C 相比, 降低了 2.5 倍。

2. 发酵性能方面. 高温条件带来更加迅速的纤维素体系糖化, 更快的物质, 能量传递, 这对发酵体系改善尤为重要^[80]。高温微生物能够耐受大型反应器所造成的温度分别不均和波动, 也可以降低对发酵体系可能染菌的风险^[58]。

3. 设计运行方面. 高温发酵能够带来冷却成本的明显降低, 特别是在高温季节和热带地区, 这也降低相关设备的资产投资^[16]。生物质原料主要在高温地区和季节, 产量大, 高温发酵技术有利在这些地区推广纤维素乙醇生产。

4. 产物分离方面. 乙醇的蒸馏能量消耗与蒸馏进料的温度和产物浓度关系很大, 提高发酵的温度有利于产品乙醇的回收^[81], 以及边发酵边萃取产物技术的实现^[16]。

Abdel-Banat 等^[16]分析计算如果发酵温度从 35 提高到 40 °C, 年产 3 万吨淀粉乙醇的发酵厂, 在能量和酶制剂的使用方面, 每年就可节约 60 万美元。经过换算, 这个乙醇厂生成 1 加仑乙醇, 成本中酶制剂约占 0.06 美元, 如果以纤维素原料为基质, 效果会更加显著, 因为现在最低成本预测的每加仑纤维素乙醇, 成本中酶约占 0.5 美元, 几乎是淀粉基质发酵成的 10 倍, 因此高温发酵对利用纤维素乙醇更加有效和实际应用价值。

尽管高温纤维素乙醇发酵潜力巨大, 但是由于高温微生物的限制, 真正用于实际纤

表 1.3 高温同步糖化与发酵纤维素基质生产乙醇的研究进展

Table 1.3 Progress on simultaneous saccharification ethanol fermentation of lignocellulose at elevated temperatures

原料	微生物类型	温度(°C)	预处理、脱毒	发酵规模, 固含量%	酶用量 (FPU/g DM)	酵母粉 (g/L)	乙醇 (g/L)	文献
大麦秆	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	42	汽爆, 水洗	摇瓶, 15	7	5	26	Garcia-Aparicio 等 ^[66]
							24.1	Garcia-Aparicio 等 ^[66]
小麦秆	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	42	汽爆, 水洗	摇瓶, 14	6	5	30.2	Tomas-Pejo 等 ^[82]
柳枝稷	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	45	水热, 水洗	摇瓶, 8	8	0.5	15-20	Faga 等 ^[64]
柳枝稷	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	45	水热, 水洗	摇瓶, 7	8.5	0.5	16.6	Suryawati 等 ^[77]
废报纸	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40	dry-defibrated	发酵罐, 25	140	10	84	Park 等 ^[54]
甘蔗叶	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40	氢氧化钠+双氧	摇瓶, 10	40	-	22	Krishna 等 ^[60]
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	43	水				28	Krishna 等 ^[60]
白杨木	<i>Candida acidothermophilum</i>	40	稀酸, 水洗	摇瓶, 6	25	7	18.9	Kadam 和 Schmidt ^[71]
	<i>Candida acidothermophilum</i>	42					18.1	Kadam 和 Schmidt ^[71]
幅射松	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40	有机溶剂处理	摇瓶, 10	20	5	22	Tomas-Pejo 等 ^[82]
小麦秆	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	42	汽爆, 水洗	摇瓶, 10	15	5	19	Ballesteros 等 ^[83]
白杨木							18	
玉米秆	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41	汽爆	摇瓶, 10	25	10	21.1	王娜娜等 ^[63]
稻草粉	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40	碱溶液处理	摇瓶, 8	25	15	10	刘海臣等 ^[84]
云杉	<i>Kluyveromyces marxianus</i>	42	汽爆, Overliming	发酵罐, 5	18	1	9	Bollok 等 ^[79]

纤维素基质发酵的非常有限, 表 1.3 从原料, 微生物, 处理方式等方面概括了高温同步糖化与发酵木质纤维素原料生产乙醇的研究进展。由于发酵微生物, 发酵基质及处理方式, 发酵控制条件的差异, 很难比较这些发酵研究的优劣。但是, 这些研究基本上存在发酵基质浓度低, 产物浓度低, 营养成本高等问题, 这与实际生产所需要的低营养, 高基质, 高产物浓度相去甚远。

从使用微生物角度看, 克鲁维酵母的应用较多, 可能只是考虑到这属菌温度耐受性相对较好; 选择的纤维素原料种类属于相对小众, 还没有关于代表性纤维质原料如玉米秸秆以及比较实用的稀酸预处理方式, 这方面高温乙醇发酵还没有报道; 几乎没有在发酵罐规模的研究, 大多停留在摇瓶水平的同步糖化与发酵方式, 由于纤维体系的搅拌困难, 摇瓶发酵很难反映真实的应用条件。

木质纤维素原料一般必须经过预处理才能够用于加工, 预处理作用打开了纤维素致密的结构, 进而提高了纤维素酶对纤维素的接触性, 但是预处理过程产生有毒害的抑制物包括甲酸, 乙酸等弱酸, 5-羟甲基糠醛, 糠醛等呋喃类, 以及羟基苯甲醛等酚类抑制物, 抑制物的存在会降低酶解和发酵性能, 甚至使微生物发酵不能启动^[85]。常用的抑制物脱除方法包括水洗, 过碱处理, 生物脱毒等, 这些方法各有优缺点, 虽然提高了纤维素基质的可酶解性和发酵性, 但也增加了生产成本。Kumar 和 Wyman^[86]研究发现预处理后物料进行水洗处理能显著提高纤维素的酶解得率, 对稀酸处理的白杨木在室温水洗增加了 18.8% 葡萄糖和 5.3% 木糖转化; Bollok 等^[79]报道基质过碱脱毒 (overliming) 处理物料增加了克鲁维酵母同步糖化与发酵乙醇 27% 的得率。如果发酵木质纤维素中使用能够在位脱毒的微生物, 就会非常有利于发酵, 因为这样即使发酵体系中有一定程度的抑制物, 也能够先转化抑制物为毒性弱的物质, 从而使发酵顺利进行。一般酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 具有内在的抑制物转化能力, 能够把醛类转化为对应的醇类, 代谢酚类, 基于这种能力, 可以把发酵微生物种子在含抑制物的水解液中预先驯化培养, 提高微生物的耐受性和发酵能力, 缩短同步糖化与发酵木质纤维素的时间^[87, 88]。

在高温条件下随着乙醇发酵的进行, 微生物存活能力逐步下降, 导致发酵后期葡萄糖积累^[64, 66, 77], 这种现象在高基质和高纤维素酶浓度下表现更加明显。一般高基质浓度增加了微生物发酵的延滞期^[89], 高乙醇浓度, 以及发酵过程抑制物和副产物都会对微生物的有抑制作用^[77]。在提高纤维素基质浓度时, 体系中抑制物的浓度会相应随之提高^[90], 恶化发酵环境, 降低微生物生存能力^[91]。同时, 升高发酵温度普遍导致的微生物生长能力降低, 微生物生长能力又对抑制物的转化能力^[87, 85]相关, 这就导致高温条件下抑制物转化时间的延长; 纤维素酶浓度也会随着体系中基质浓度提高而增加, 纤维素酶浓度升高能够显著影响微生物的生长, 比如 1.5 FPU/mL 的纤维素酶浓度降低微生物 70% 存活能力^[76]。

同步糖化与发酵工艺的操作方式在具体实施中有不少变化包括全过程同步糖化与发酵、先高温预糖化再同步糖化与发酵, 以及补料同步糖化方式等, 不同的发酵工艺条件会影响发酵行为和结果。当高基质浓度时, 在纤维素酶最适合温度进行预糖化操作能

够加快初期水解速度,降低体系黏度,从而有利于搅拌^[66];补料操作也能够降低体系搅拌问题,但是当有充足搅拌时,应尽可能在发酵初始加入纤维素酶和物料,从而获得最好的产率^[46]。

总之,高温纤维素发酵的问题实质在于微生物能否在纤维体系中保持存活能力,这不仅要求微生物有宽泛的生长温度,而且能够耐受纤维体系环境压力及其叠加的影响如预处理原料中的有机酸类,呋喃类,酚类抑制物以及纤维素糖化后形成的具有高粘性的体系,低溶氧水平,低水活,低传递效率等环境因素^[92];产物乙醇浓度,纤维素酶等因素。高温发酵微生物必须应用于实际纤维素基质检验,特别是在高纤维素基质浓度下,基于真实应用的发酵条件中,需要进行深入广泛的研究。

1.6 高温乳酸发酵微生物

木质纤维素炼制可以共享相同的糖平台技术,只需要采用不同的发酵微生物,就能够生产不同的产品。乳酸是最具代表和竞争力的生物基大宗化学品,在葡萄糖转化为乳酸过程没有二氧化碳释放,因此更加经济高效。乳酸有许多用途包括食品、化妆品、溶剂、材料单体等。全球聚乳酸市场在 2010 达 50 万吨^[93],到 2020 年生产能力将突破 100 万吨^[94],乳酸需求持续扩大。乳酸菌不是一个菌属名称,只是一种俗称,自然界中存在的乳酸菌种类和分布很广。选择用于乳酸发酵的微生物有几个标准如适合于低成本基质、高的生产速率、宽泛的温度、pH 和产物耐受性等^[93],相比乙醇发酵微生物,高温产乳酸的微生物比较多,甚至有嗜热微生物,为生物转化乳酸提供了很好的催化剂^[95]。乳酸菌的微生物多样性,为发现适合于木质纤维素发酵的微生物提供了很好的基础,在这归纳具有代表性的有潜力应用于高温同步糖化乳酸发酵的微生物,如表 1.4 所示。

表 1.4 高温发酵产乳酸微生物

Table 1.4 Microorganisms for producing lactate at elevated temperatures

微生物	温度 °C	基质	分离来源	文献
<i>Bacillus coagulans</i> 36D1	50	己糖, 戊糖	温泉泥浆	Patel 等 ^[96]
<i>Bacillus coagulans</i> MXL-9	50	己糖, 戊糖	牧场堆肥	Bischoff 等 ^[95]
<i>Enterococcus mundtii</i> QU25	~45	木糖	绵羊粪便	Abdel-Rahman 等 ^[97]
<i>Rhizopus microsporus</i> TISTR 3518	~45	淀粉	loog-pang	Sakai 等 ^[98]
<i>Lactobacillus</i> sp. RKY2	~45	葡萄糖	黄豆酱	Wee 等 ^[99]
<i>Bacillus coagulans</i> DSM2134	50	己糖, 戊糖	-	Maas 等 ^[100]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> sp.	45-47	葡萄糖	-	Hofvendahl 和
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> sp.	45-47	糖蜜	-	Hahn-Hagerdal ^[101]
<i>Lactobacillus</i> sp. ZJU-1	45	己糖, 戊糖	-	陈育如等 ^[102]
<i>Lactobacillus delbrueckii</i> L1	~60	己糖	-	崔国艳等 ^[103]
<i>Sporolactobacillus</i> sp. CASD	42	葡萄糖	-	Zhao 等 ^[104]

常用于乳酸发酵的微生物，如能够在 40 °C 以上发酵的乳杆菌 (*Lactobacillus*)，发酵温度是中温 (35 °C) 的米根霉菌^[93, 105]，它们较少见于用纤维质原料的发酵报道，可能存在某些限制比如耐受性，营养需求等。因此，以发酵木质纤维素原料为目标的产乳酸微生物分离，希望具备高温发酵，多基质利用，低营养需求等发酵特性。近年新型的发酵产乳酸微生物也被分离得到，比如美国科学家在研究高温生物催化剂时分离到的格兰氏阳性菌 *Bacillus coagulans* 36D1，它应用于木质纤维素原料乳酸发酵报道较多。*B. coagulans* 36D1 能够在 50 °C 发酵，它可以利用多种碳源基质，但代谢产物复杂，而且发酵受氧水平影响大，有氧条件下发酵乳酸是主产物，在厌氧条件下有乙醇、乙酸、甲酸等代谢副产物生成^[96]，为了适合厌氧发酵以及获得单一产物，可能需进行基因工程改造^[106]。日本科学家分离的肠道球菌 *Enterococcus mundtii* QU25，是第一个报道可高效同型发酵木糖生产乳酸^[97]的野生菌，能够在相对低营养条件发酵，具有高的产品得率和纯度，为经济地利用木质纤维素原料中的半纤维素组分提供了好的发酵微生物。米根霉菌也是常用于微生物发酵的微生物，一般在中温发酵，然而 Sakai 等^[98]首次发现了可在 40 °C 以上发酵的耐高温霉菌 *Rhizopus microsporus* TISTR 3518，为转化生物质资源提供了好的工具，但是霉菌形态易成丝状物，且耗氧发酵，这可能会限制在木质纤维素原料中的应用。

乳酸发酵调控受到的许多因素影响，微生物种类，复杂的营养需求，发酵基质，控制条件等都能够显著影响发酵行为^[93, 101]。pH 的控制高低影响纤维素酶的活性以及调控过程用碱量的多少。不合适的 pH 控制对细胞生长和发酵都有毒害，例如通过添加固体碳酸钙，从而限制液体中乳酸的浓度；当添加氨水调节发酵 pH，在乳酸再生时可以得到肥料硫酸铵，避免硫酸钙的堆积。在 pH 控制的反应器中，使用微生物 *Bacillus coagulans* 发酵，当 pH 从 6.0 降低到 5.0，乳酸得率就降低一半^[95]。原料基质中添加的营养组分和过程 pH 调控成本占乳酸发酵成本的 60%。单一的营养盐一般不能满足乳酸菌营养需求，通常要添加复杂的复合营养物，如添加酵母粉，但是其成本高，因此添加低成本的替代品如玉米浆，奶酪水解物等。不像淀粉，奶酪，糖蜜等发酵基质，纤维素原料营养相比贫乏，需要添加更丰富的营养以增强乳酸的生成。锰元素对乳酸菌发酵产乳酸有刺激能力^[107]，纤维素原料在生长过程中从土壤里富集了氮、磷、钾以及钙、镁、锰等微量元素，在生物加工过程释放这些组分，形成了一种有利的复杂营养体系^[108, 109]。

一般来说发酵接种量是 10% (v/v)，这样在发酵前期微生物有明显的生长竞争优势，可以消除初期可能的染菌，以及缩短发酵的延滞期，提高发酵效率。但是由于种子培养基成本较高，希望尽可能的减少接种的量 (如 5% 以下)，这样可能会增加发酵染菌的风险。然而高温发酵，能够内在的缩短延滞期和降低杂菌几率，可以做到低接种量，这从另一个角度降低了生产成本。商业化的乳酸发酵生产，如果发酵温度在 44 °C 以上，杂菌污染就相对容易被控制了^[93]。

除了温度的耐受性，乳酸发酵微生物必须与纤维素基质加工的预处理和糖化的条件

与体系相兼容，木质纤维素预处理有利于糖的释放，同时也产生了抑制物，乳酸菌必须有一定的抑制物耐受性。就纤维素酶而言，Bischoff 等^[95]报道在同步糖化与发酵纤维素生产乳酸时，发酵温度 55 °C 与 35 °C 相比，纤维素酶用量减少 3-4 倍。*Bacillus coagulans* 能够分别耐受糠醛，5-羟甲基糠醛，香兰素达 2.5 g/L，可以耐受 1.2 g/L 羟基苯甲醛^[95]。环境压力的耐受性，对微生物的生长很重要，微生物在环境压力下生长与分离环境有较好的相关性，例如 Parente 等^[110]发现在分离到的微生物中，只有从啤酒中分离的微生物能够耐受 10% (v/v) 的乙醇，从橄榄发酵卤水中分离到的乳酸菌能够在高盐环境生长。因此，必须广泛筛选和比较微生物，选择具有一定抑制物耐受的微生物，才能满足特定发酵条件要求。

1.7 高温同步糖化与发酵木质纤维素原料生产乳酸的研究进展

乳酸的发酵原料正从淀粉、奶酪、糖蜜类等传统基质转向丰富的木质纤维素原料，以满足乳酸低成本生产，以及市场需求的增加。目前，95%的乳酸产品是通过微生物发酵生产，其成本的 70% 来自于原料成本，采用资源丰富的，价格低廉的木质纤维素原料为基质，具有巨大的应用潜力^[93, 111]；乳酸是最具成本竞争力的生物塑料单体，以木质纤维素原料代替粮食生产乳酸，能够进一步降低生产成本以及增强聚乳酸发展的可持续性，日益引起人们重视^[94, 112, 113]。相比乙醇，乳酸对纤维素酶抑制能力小，价格约是乙醇的 5 倍^[114]，因此，以纤维素原料同步糖化与发酵生产乳酸更为经济。但是目前从木

表 1.5 高温同步糖化与发酵木质纤维素生产乳酸

Table 1.5 Simultaneous saccharification and lactate fermentation of lignocellulose at high temperatures

纤维质原料	预处理方法	固含量% (w/w)	微生物, 温度 °C	营养 (g/L)	浓度 (g/L)	引用文献
玉米皮	稀酸	10%	<i>Bacillus coagulans</i> , 50	10 CSL	45.6	Bischoff 等 ^[95]
	碱法			10 YE	37.2	
玉米芯	汽爆	8	<i>Lactobacillus sp.</i> , 45	5 YE	45.3	陈育如等 ^[102]
麦秸秆	碱法	27%	<i>Bacillus coagulans</i> , 50	15 YE	40.7	Maas 等 ^[100]
纸浆	-	10%	<i>Bacillus coagulans</i> , 42	5 CSL	92.6	Budhavaram 和 Fan ^[117]
桉树	溶剂法	10%	<i>Lactobacillus</i>	5 YE	62	Moldes 等 ^[118]
		16%	<i>delbrueckii</i> , 45		108	Moldes 等 ^[119]
葡萄藤	溶剂法	2%	<i>Lactobacillus</i>	MRS	21.8	Bustos 等 ^[120]
大麦壳		10%	<i>rhamnosu</i> , 45		70	Cruz 等 ^[121]

CSL, 玉米浆; YE, 酵母粉; MRS, MRS 培养基中除葡萄糖外的其他营养。

质纤维素发酵乳酸存在许多困难，比淀粉质原料成本要高许多。表 1.5 总结了高温同步糖化与发酵纤维素原料生产乳酸的研究进展。

Abe 和 Takagi^[115]提出同步糖化与发酵生产的概念之后，1991 年第一个报道了同步糖化与发酵纤维素生产乳酸，随后开启了纤维素同步糖化乳酸发酵的研究^[116]。纤维素酶是影响纤维素经济水解的限制因素，因此，正如前述所提到的高温对于大规模发酵的优势，高温同步糖化与发酵纤维素更加能够体现“同步”的意义。乳酸发酵菌株对成功实现木质纤维素同步糖化与发酵至关重要，一般木质纤维素原料除了含有葡萄糖等己糖，还存在大量的木糖类的戊糖，因此为了高效利用多种碳源，就需要筛选获得能够同时发酵己糖和戊糖的微生物；同时为了提高木质纤维素基质的发酵能力，微生物也需要能够耐受高的环境压力比如抑制物等，从而有利于纤维素基质的经济转化。因此，选用新的适合木质纤维素发酵的多基质利用微生物特别重要。以木质纤维素为基质的乳酸发酵研究可能遇到新的问题，比如微生物的抑制物耐受性，营养的需求，生长能力，不同发酵方式等。Maas 等^[100]提出用碱性的预处理后物料调整发酵过程的 pH 降低，同时加入的纤维基质还可以作为补料；但是，增加基质固含量后，乳酸得率会明显下降，发酵后期还有残留糖浓度；不断增加了的乳酸浓度可能抑制了纤维素酶和发酵细菌的活性^[119]。如表 1.5 所示，当前一般纤维素乳酸发酵过程都添加了丰富的营养组成，这会显著增加生产成本。Budhavaram 和 Fan^[117]发现应用营养丰富的培养基发酵，比营养贫乏的培养基，发酵时间能够缩短一半；另外，低营养发酵时，乳酸浓度也低很多，这说明发酵的基质或营养水平能够显著影响发酵。Moldes 等^[119]在用木屑为原料乳酸发酵时采用多级补料模式，即发酵过程中不断添加纤维素基质、纤维素酶以及营养，结合乳酸回收工艺从而提高发酵水平。目前，没有见以丰富的农业废弃物玉米秸秆为原料的乳酸发酵的报道。

由于木质纤维素原料质量密度小，为了提高发酵乳酸的终浓度，必然需要增加纤维素基质在体系中的含量，这不仅会带来混合问题，还会显著影响微生物功能以及其他浓度相关问题。高纤维素基质发酵需要使用特殊搅拌如螺带型搅拌桨^[122]，或发酵过程补纤维质原料或纤维素酶，以提高地物和产物浓度^[118, 119]，或添加表明活性剂改善酶水解效果^[123]；纤维素原料通气的成本更高，需要能够在厌氧条件发酵的微生物^[114]。在生物可降解材料中，乳酸会有大规模应用，分离新型乳酸发酵微生物以及研究高固含量下发酵木质纤维素资源生产乳酸的工艺具有重要的科学和产业价值。

1.8 论文研究的技术路线和目标

本论文的总研究框架以及技术路线和目标如图 1.3 所示。本论文研究分析了纤维素酶对滤纸以及预处理秸秆的水解，并提出了基于高效液相色谱的纤维素酶活分析方法。高温纤维素原料生物转化是生物炼制的一个研究难点，本论文以玉米秸秆作为纤维素原料，采用极低用水和低流酸浓度的预处理技术对玉米秸秆进行预处理，预处理后的秸秆无论分别采用了一次水洗和生物脱毒降低其中的抑制物浓度，用于纤维素酶解和微

生物发酵，在 5 L 发酵罐中研究高温高固含量纤维素乙醇发酵，本研究旨在使用耐高温酿酒酵母发酵真实的木质纤维素物料，实现高浓度乙醇的生产。在以生物脱毒方式处理原料为基质研究高温纤维素乙醇发酵时，发现发酵醪液中有大量乳酸的生成。本研究分析了乳酸产生的现象和阐述乳酸的分离发现过程，纯化并鉴定了乳酸菌，同时优化了乳酸菌的培养，并成功用于玉米秸秆原料在高温下生成乳酸，本论文实现了高温下转化微生物发酵纤维素原料生产高浓度乙醇和乳酸。

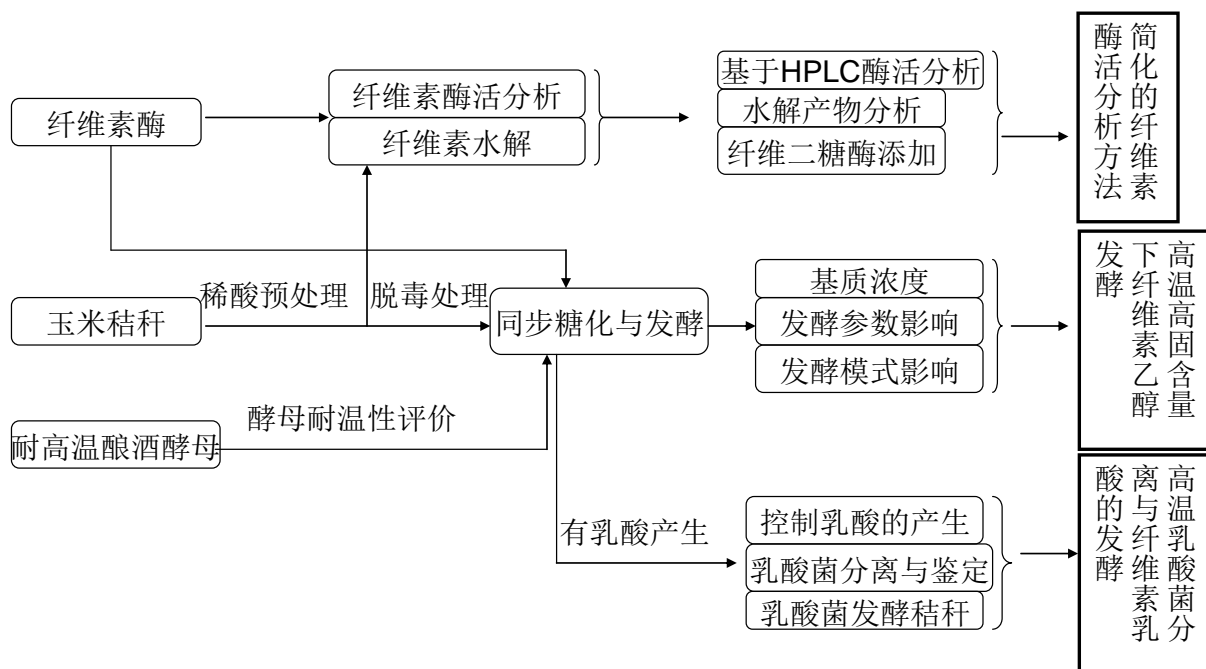


图 1.3 总体研究技术路线

Fig. 1.3 The overall research technology roadmap

第 2 章 纤维素酶滤纸活性分析方法的改进

2.1 引言

在发酵木质纤维素生产乙醇或其他化学品的过程中纤维素酶起着极其关键的作用，纤维素能否高效酶解为可利用的糖，是经济利用木质纤维素原料的瓶颈之一。自纤维素酶发现以来，纤维素酶活性的评价方法就是困扰研究者的一个问题，一方面是由于纤维素酶是多组分的复合酶系；另一方面纤维素的酶水解是一个非均相的体系。寻求一种简单易操作，重复性好，又能反映纤维素酶水解实际纤维素能力的酶活测定方法就变得非常重要，这不仅有利于比较不同来源的纤维素酶的效能，而且有利于筛选、优化和提高纤维素酶的表现，同时也有利于经济地应用纤维素酶在实际纤维质原料水解中。目前通用的纤维素酶活的分析方法是 1987 年国际纯粹和应用化学联合会 (IUPAC) 推荐的方法，使用滤纸单位 (FPU)^[32] 表征，这种方法采用标准的滤纸作底物，使用 DNS 的方法测定还原糖，通过酶水解滤纸生成还原糖的能力来评价纤维素酶。

本章提出利用高效液相色谱 (HPLC) 准确测定纤维素酶水解生成的葡萄糖和纤维二糖，并用两者浓度之比来表征纤维素酶水解纤维素获得单糖的能力。同时，建立纤维素酶水解获得葡萄糖和纤维二糖量之和与之对应的纤维素酶滤纸单位之间的关系，该方法目的在于提出葡萄糖和纤维二糖浓度之比这一指标，并通过建立的关系估算纤维酶滤纸酶活单位，从而表征纤维素酶的水解能力，期望实现快速准确评价纤维素酶。本章研究了三种商业纤维素酶 Accellerase 1000、Spezyme CP 和 Youtell #5，分析和建立 HPLC 测定三种商业纤维素酶的酶水解产物和纤维素酶活滤纸单位之间的关系，分析并对比了三种商业纤维素酶水解滤纸和水解稀酸预处理玉米秸秆产物的差异，通过在纤维素酶中添加葡萄糖苷酶来改变水解产物葡萄糖和纤维二糖相对浓度。

2.2 实验材料与方法

2.2.1 纤维素酶与滤纸

商业纤维素酶 Accellerase 1000 和 Spezyme CP (Lot: 3016295230) 购自杰能科公司 (Genencor International, Rochester, NY, USA); 商业纤维素酶 Youtell #5 购自湖南尤特尔生物工程公司; 葡萄糖苷酶 Novozyme 188 (Cat. No. C6105; batch No. 079K1446) 购自于西格玛奥德里奇公司 (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA); Whatman No.1 定性滤纸购自沃特曼公司 (Whatman International, Maidstone, UK)。其他用到的化学试剂、设备和仪器见附录 I，纤维素酶活见表 2.1。

2.2.2 纤维素酶的滤纸活性分析方法

滤纸活性测定方法根据 IUPAC 与美国国家可再生能源实验室 (NREL) 描述的方法和步骤^[32, 33]。纤维素酶的滤纸活性测定基于在特定条件下用纤维素酶水解 50 mg

Whatman No.1 滤纸得到一定量的还原糖（相当于 2 mg 的葡萄糖）。操作步骤为：

1. 用 pH 4.8 50 mM 柠檬酸缓冲溶液稀释原始的纤维素酶；
2. 取 0.5 mL 稀释的纤维素酶样品在试管中与 50 mg 滤纸，另加 1 mL 柠檬酸缓冲溶液，50 °C 反应 1 h；
3. 利用 DNS 方法测定酶水解产物中还原糖浓度，并通过计算得到原始纤维素酶的滤纸单位。

纤维素酶的滤纸单位 (FPU) 定义为：
$$FPU = \frac{0.37}{\text{纤维素酶稀释倍数}} \text{ units mL}^{-1} \quad (2-1)$$

纤维素酶稀释倍数是指在反应条件下获得 2 mg 还原糖量时原始纤维素酶的稀释倍数

表 2.1 商业酶样品的活性

Table 2.1 The activities of commercial enzyme preparations

商业纤维素酶	滤纸酶活 (FPU/mL)	纤维二糖酶活 (CBU/mL)
Accellerase 1000	50	140
Spezyme CP	48	31
Youtell #5	64	15
Novozyme 188	-	1004

2.2.3 纤维二糖酶活 (CBU) 的测定

酶样品中纤维二糖酶活测定根据 IUPAC 推荐的方法和步骤^[32]。纤维二糖酶活测定基于在特定条件下用稀释的纤维二糖酶样品水解转化纤维二糖得到 1 mg 葡萄糖。操作步骤为：

1. 用 pH 4.8 50 mM 柠檬酸缓冲溶液梯度稀释纤维二糖酶样品；
2. 取 1 mL 稀释的含纤维二糖酶样品在试管中与纤维二糖柠檬酸缓冲溶液 50°C 反应 30 min；
3. 利用葡萄糖试剂盒测定生成的葡萄糖，并通过计算得到原始含纤维二糖酶样的纤维二糖酶活单位 (CBU)。

纤维二糖酶活单位 (CBU) 定义为：
$$CBU = \frac{0.0926}{\text{酶稀释倍数}} \text{ units mL}^{-1} \quad (2-2)$$

酶稀释倍数是指在反应条件下获得 1 mg 葡萄糖时原始酶样品所稀释的倍数。

2.2.4 基于 HPLC 分析的纤维素酶滤纸酶活测定

为建立纤维素酶的滤纸酶活单位与其对应水解滤纸生成糖浓度之间关系，三种商业纤维素酶稀释特定倍数 (1, 2, 3, 4×)，根据纤维素酶滤纸活性比标准分析方法测定某一特定稀释倍数的纤维素酶的滤纸单位 (FPU)，同时针对每一特定稀释倍数酶样再稀释 100 倍按照 2.2.2 节中的步骤 2 水解滤纸，用 HPLC 分析生成的葡萄糖和纤维二糖浓度。

2.2.5 稀酸预处理玉米秸秆的方法

粉碎的玉米秸秆首先与稀硫酸混合预浸，方法为：称量 800 g 玉米秸秆与 400 g 5% (w/w) 硫酸在塑料箱中搅拌混合，玉米秸秆完全浸润。然后，装入塑料袋，浸润 12 h。预处理操作过程：首先加热蒸汽发生器，把 1200 g 浸润过稀硫酸的玉米秸秆装入预处理反应釜，蒸汽发生器产生的高温蒸汽通入预处理反应釜，使反应釜内温度升到 190 °C，通过控制蒸汽流量维持温度 3 min^[124]，预处理后的原料冷藏备用。

2.2.6 纤维素酶水解稀酸预处理的玉米秸秆

纤维素酶水解稀酸预处理秸秆在 250 mL 摇瓶中进行，根据秸秆含水量按照预先计算，加入需要的固体秸秆、纤维素酶、柠檬酸缓冲溶液，达到 10% (w/w) 固体秸秆含量，纤维素酶 10 FPU/g DM (干物质的量)，工作体积约为 50 mL。摇瓶在水浴摇床中 50 °C，150 rpm，pH 4.8 酶水解 24 h。样品 13000 rpm，离心 5 min，上清液体在 -20 °C 保存用于分析。水解生成的葡萄糖和纤维二糖浓度用高效液相色谱 (HPLC) 分析。摇瓶，预处理秸秆，柠檬酸缓冲液分别在 115 °C，灭菌 20 min。

2.2.7 高效液相色谱分析

高效液相色谱配备 RID-10A 型示差检测计，使用 Bio-rad Aminex HPX-87H 色谱柱，柱温箱温度 65 °C，流动相为 5 mM H₂SO₄，流速 0.6 mL/min。样品经 0.22 μm 滤膜过滤后，用进样针注入约 40 μL 用于分析。

2.3 结果与讨论

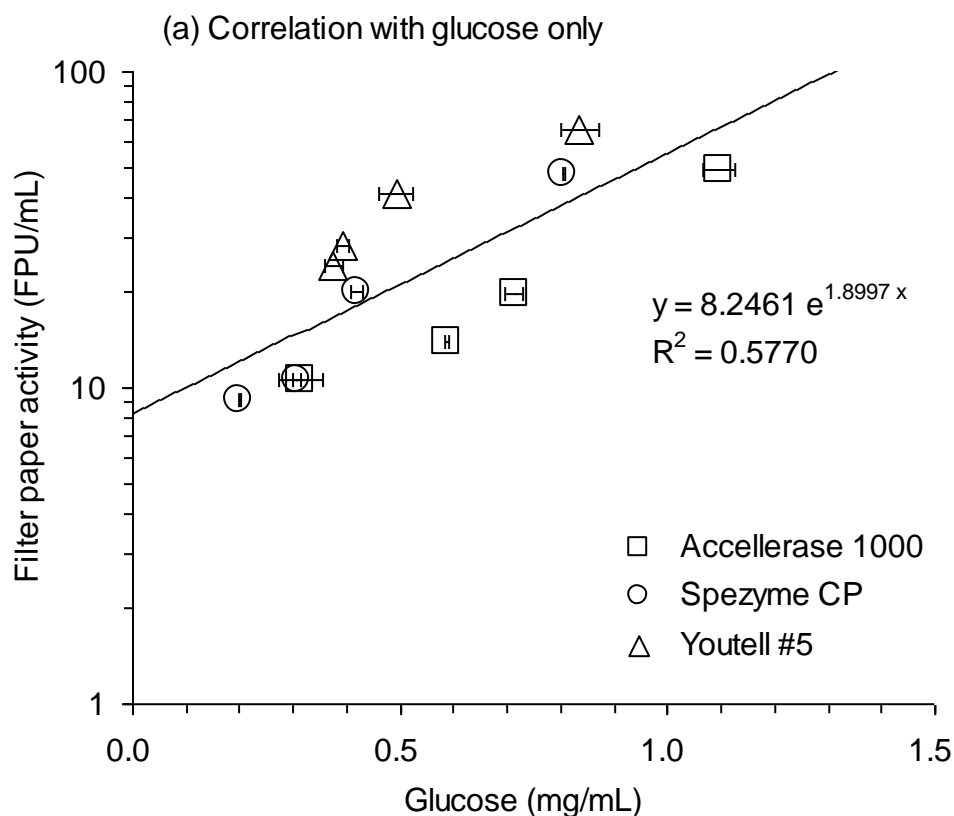
2.3.1 基于 HPLC 分析的纤维素酶滤纸活性测定方法

商业纤维素酶 Accellerase 1000、Spezyme CP 和 Youtell #5 是实验中常用到的纤维素酶制剂，它们分属于国内外不同的公司，组成差异较大，以其作为酶活分析的研究对象，具有较广泛的意义。三种纤维素酶分别在柠檬酸缓冲液中进行梯度稀释，测得不同酶样的滤纸单位 (FPU) 与对应的用 HPLC 测得的糖浓度的关系如图 2.1 所示。在图 2.1 (a) 半对数坐标系中，当纤维素酶的酶活对数值只与水解对应生成的葡萄糖相关联，回归性较差，而当与葡萄糖和纤维二糖浓度之和进行回归 (图 2.1 (b))，发现两者呈良好的线性关系。三种不同来源的纤维素酶的酶活都能够分布在拟合线两侧，表明这一关系在纤维素活性分析中有普遍意义。尽管各种寡糖组分不可避免都会存在在纤维素水解液中，利用 HPLC 完全定量它们不是容易的事情，从图 2.1 (b) 可以发现滤纸水解液中葡萄糖和纤维二糖浓度之和 (Glucose+cellobiose) 正比于纤维素酶滤纸酶活单位的 log 值，能够给出比较满意的回归，这意味着可以通过快速准确测定酶水解滤纸生成产物这两种产物的浓度，借助建立的关系 (2-3)，来估算纤维素酶的 FPU 值。相比传统纤维素酶活测定中用 DNS 方法测还原糖浓度，HPLC 能更准确地测定生成的葡萄糖和纤维二糖，能够表明纤维素酶的实际水解获得单糖的能力。图 2.1 (b) 中纤维素酶滤纸单位 FPU 与对应生成糖浓度的关系可以写为：

$$\text{FPU} = 5.576 \times \ln (1.149 \times ([\text{Glu}] + [\text{Cel}])) \quad (2-3)$$

FPU, 纤维素酶滤纸酶活; [Glu]和[Cel]分别表示用 HPLC 测得的稀释了 100 倍的酶样品水解滤纸生成的葡萄糖和纤维二糖浓度。

基于液相色谱的分析方法主要是在于测定水解产物中的纤维二糖和葡萄糖浓度。特定的纤维素酶样品用柠檬酸缓冲液稀释 100 倍水解滤纸, 这样水解获得的糖量在 0.5-2.5 mg 之间, 这在滤纸活性测定方法所要的 2 mg 上下, 生成的糖量浓度范围不足以影响纤维素酶的活性。在实际应用中采用单一种纤维素酶构建酶活与糖浓度关系时, 可能需要调整稀释倍数, 从而能够更加准确反映纤维素酶滤纸单位与其水解生成葡萄糖和纤维二糖的关系。基于 HPLC 分析的滤纸活性测定方法, 本质上是 Glucose+cellobiose 这一指标来估算纤维素酶活, 反映了酶水解滤纸转化为这两种糖的能力。Ghose 曾指出给定时间下的纤维素酶水解纤维素, 生成的糖量与酶浓度的 log 值成线性关系, 可以据此预测达到希望获得的糖浓度时所需要的纤维素酶量^[32], 这与本研究中的 Glucose+cellobiose 指标与所用纤维素酶活滤纸单位 log 值呈线性是一致的。Zhang 等^[46]提出了一种分析 SSF 发酵液中残留纤维素酶活的方法, 这种方法是基于纤维素 SSF 过程中生产的乙醇浓度与酶浓度的 log 值呈正比的关系。首先通过一系列已知酶浓度的 SSF 过程与乙醇的产量构建关系, 然后把纤维素酶替换为 SSF 发酵残留液, 通过产出的乙醇, 借助构建的关系计算出对应的残留纤维素酶活, 这佐证了通过当量关系来估算纤维素酶活是可行的。IUPAC 推荐的测定方法是基于固定的反应时间, 变化的纤维素酶浓度, Nordmark 等^[40]提出了与 IUPAC 方法相反的测定原理, 其基于固定酶浓度, 变化滤纸水解时间, 水解产物的浓度和水解时间 t 的 log 值成正比, Normark 等提出的方法主要是为了解决 IUPAC



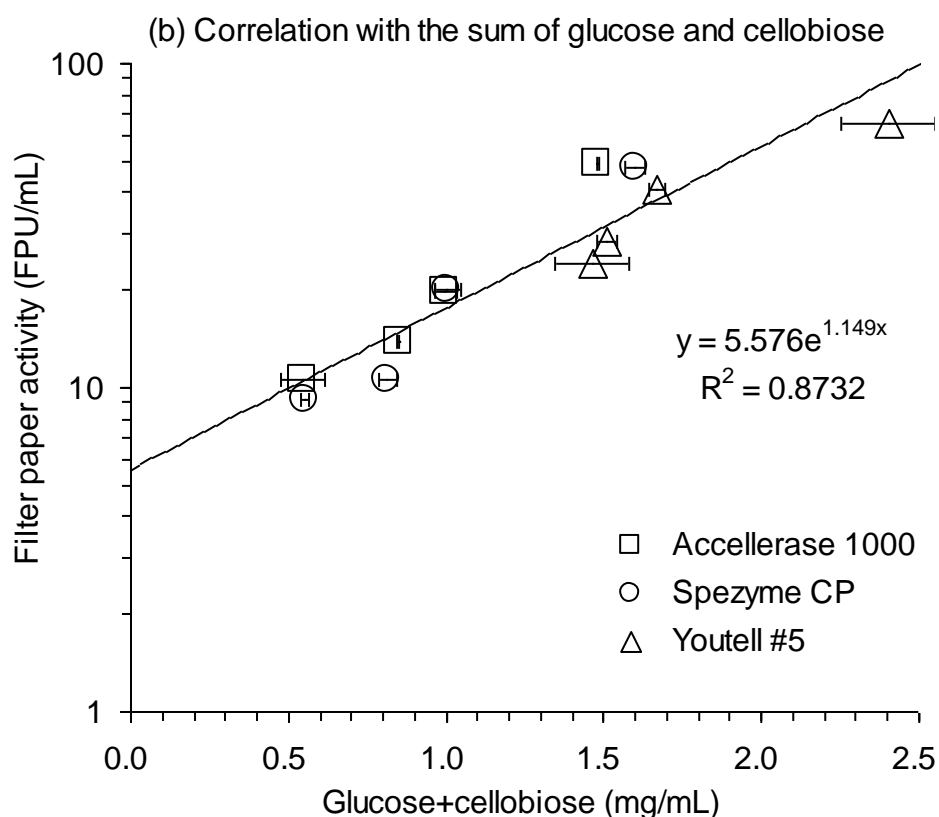


图 2.1 纤维素酶活对 HPLC 测定的酶水解生成的糖浓度

Fig. 2.1 Filter paper units of cellulase enzymes determined by the standard FPA method versus its corresponding sugars concentrations from enzymatic hydrolysis measured by HPLC

图 2.1 是纵坐标为对数坐标的坐标体系，在该体系中对 FPU 和 Glucose+cellobiose 做了线性回归。

Filter paper activity 表示标准纤维素活性分析方法测定的纤维素酶滤纸单位 (FPU)；

Glucose+cellobiose 表示用 HPLC 测得的不同纤维素酶水解滤纸生成的葡萄糖和纤维二糖浓度之和。

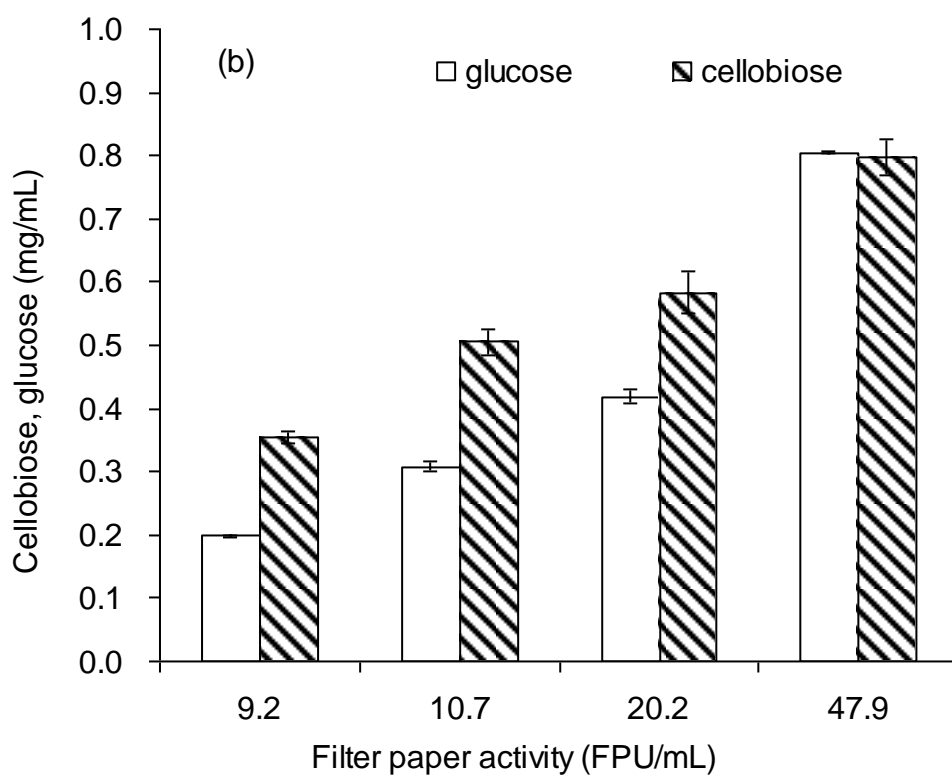
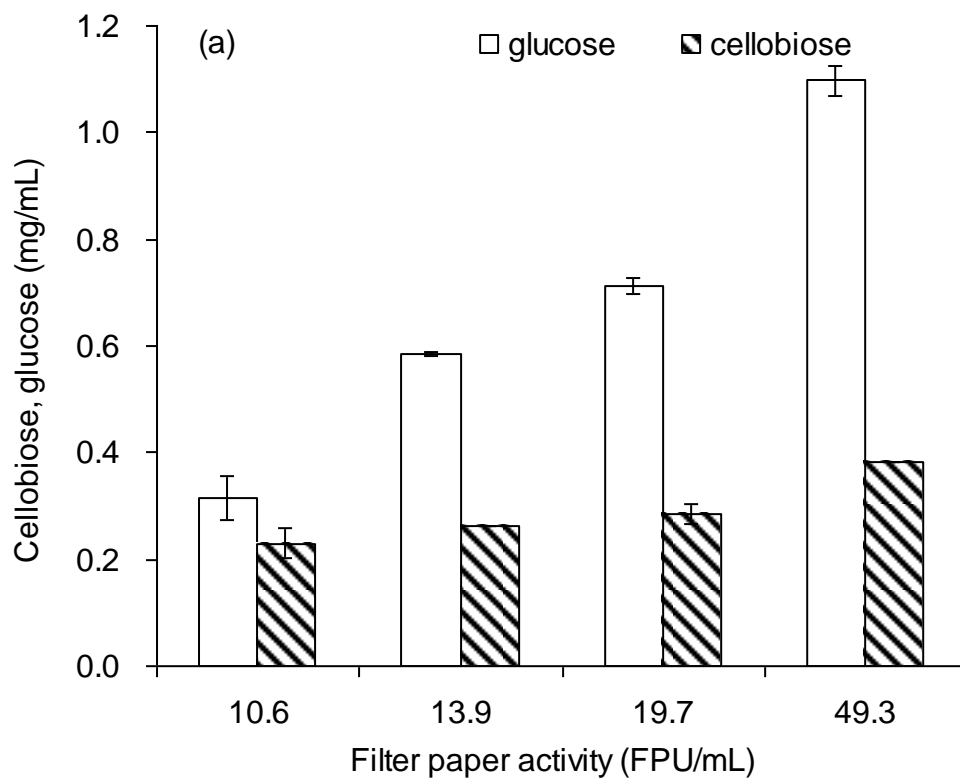
(a) 只与水解生产的葡萄糖相关联，(b) 与水解生成的葡萄糖和纤维二糖之和相关联

推荐的方法不能适用于低活性纤维素酶的测定。在利用对数关系测定纤维酶活的方法中，本研究提出的测定方法以滤纸为基准在标准条件操作下，具有普遍意义；另一个要点是相比 DNS 测定方法，HPLC 测定水解产物能够更加方便，精确，不易受样品中其他物质干扰^[36, 125]。基于 HPLC 的液相分析方法可以用于低纤维素酶活性的样品，因为 HPLC 能够测定纤维素水解液中很低浓度的糖组成。例如，当要测定野生型微生物所产的纤维素酶活性或者发酵醪液中残留的纤维素酶活时，基于某种已知商业纤维素酶建立的回归关系，我们可以得到低纤维酶活样品的当量滤纸单位值。

2.3.2 不同纤维素酶水解滤纸生成的葡萄糖和纤维二糖的比较

为了研究不同来源纤维素酶水解滤纸生成产物浓度的差异，图 2.2 展现了纤维素酶 Accellerase 1000、Spezyme CP 和 Youtell #5 在不同滤纸酶活水平下水解滤纸生成葡萄糖和纤维二糖浓度。图 2.2 (a) (b) (c) 中的四个 FPU 值分别对应于三种商业纤维素酶 Accellerase 1000、Spezyme CP 和 Youtell #5 的四个稀释倍数 (1, 2, 3, 4×) 的滤纸酶

活。当不同的纤维素酶都稀释一倍时， Accellerase 1000、Spezyme CP 的酶活减少了超过原来的 50%，而 Youtell #5 的纤维素酶活只减少了原来的 15%。当纤维素酶稀释 2-4 倍时，三种纤维素酶的酶活降低量都明显减小，特别是稀释 3 倍和 4 倍获得的纤维素酶



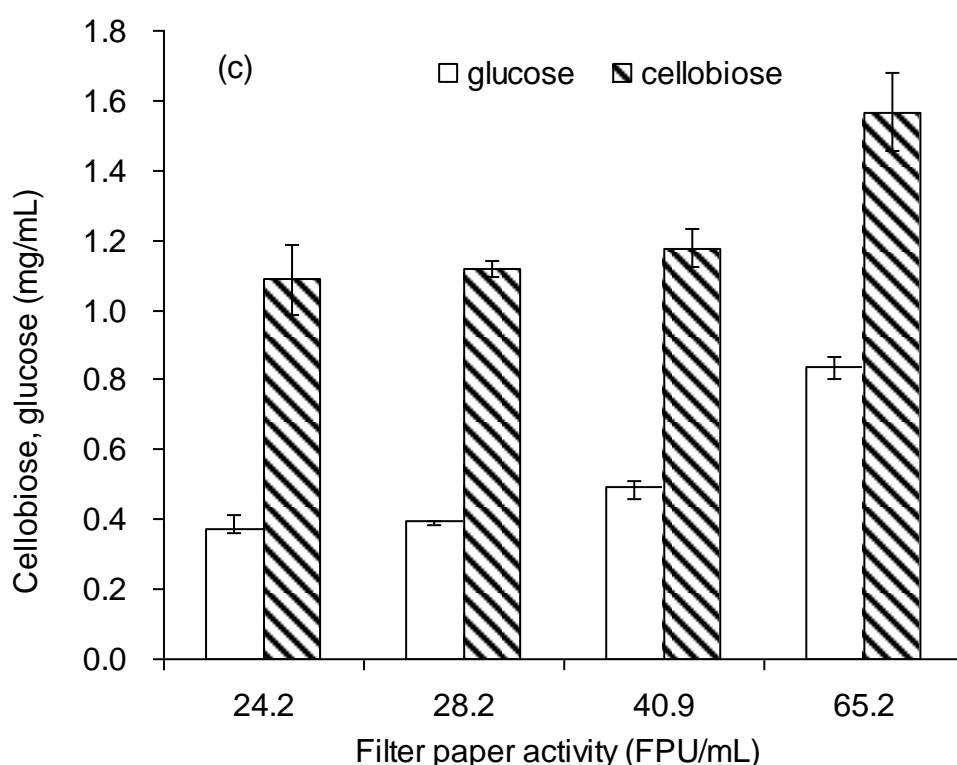


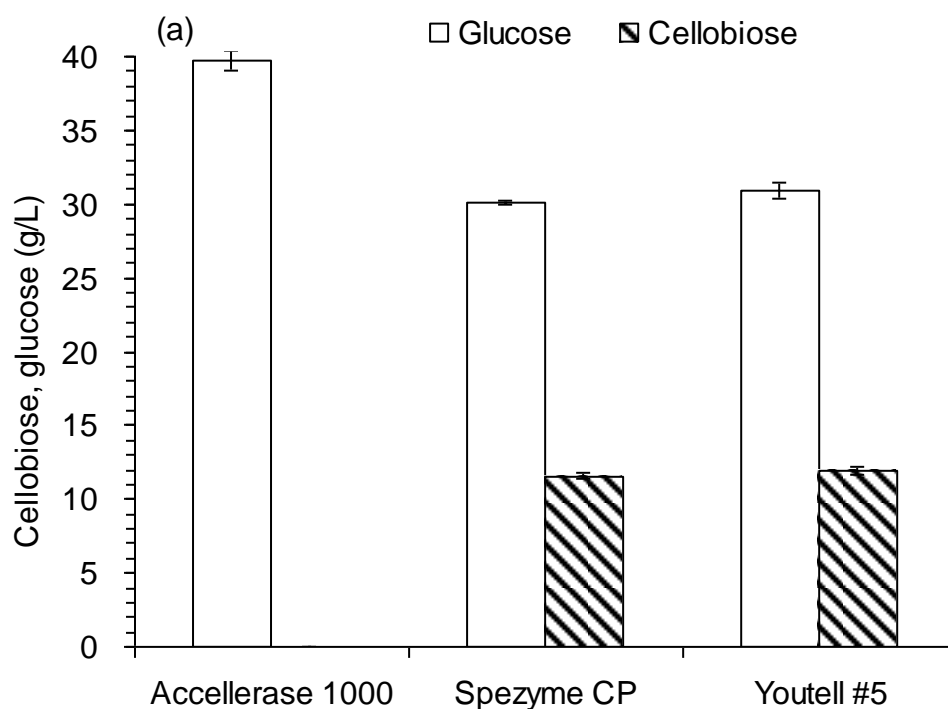
图 2.2 具有不同滤纸酶活的纤维素酶水解滤纸生成的葡萄糖和纤维二糖

Fig. 2.2 Concentrations of glucose and cellobiose resulting from enzymatic hydrolysis of filter paper using cellulase with different filter paper units (FPU)

实验方法见 2.2.2 节。(a), (b) 和 (c) 分别表示纤维素酶 Accellerase 1000、Spezyme CP 和 Youtell #5。Cellobiose, glucose 分别表示用 HPLC 测得的纤维素酶水解滤纸生成的葡萄糖, 纤维二糖浓度。样品, 它们的酶活相差不大。从纤维素酶水解滤纸生成的总体葡萄糖和纤维二糖量看, 随着水解所用纤维素酶滤纸活性的提高, 葡萄糖和纤维二糖浓度都随着增加。就水解生成的产物葡萄糖和纤维二糖浓度相对高低而言, 三种纤维素酶水解能力表现差异很大。纤维素酶 Accellerase 1000 在四个不同纤维素酶活水平下水解滤纸, 葡萄糖浓度均高于纤维二糖浓度。随着所用纤维素酶活的提高, 葡萄糖浓度的增幅明显高于对应的纤维二糖。然而纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 的水解情况却与之不同, 这两种酶在四个酶活水平下水解生成的产物中纤维二糖浓度都高于葡萄糖。随着滤纸酶活单位的提高, 纤维素酶 Spezyme CP 水解生成的葡萄糖浓度接近于纤维二糖浓度, Youtell #5 水解生成的纤维二糖浓度始终保持在高于葡萄糖浓度水平, 而且随着滤纸活性增加, 浓度差异变大。总体上看, 在不同的酶活条件下, 纤维素酶 Accellerase 1000 水解生成的葡萄糖与纤维二糖浓度之比均大于 1, 另外两种纤维素酶水解产物的葡萄糖和纤维浓度之比小于或接近于 1。在商业纤维素酶生产中, 产酶菌株、生产工艺以及酶中其他添加组成的不同都会显著影响的纤维素酶解效果^[126, 127]。正是由于酶生产方式的不同, 研究者希望探索好的纤维素酶评价方式, 进而有利于提高纤维素酶的生产 and 优化^[11], 更经济地使用纤维素酶转化木质纤维素。

2.3.3 三种商业纤维素酶水解稀酸预处理的玉米秸秆

在相同纤维素酶活 10 FPU/g DM 下, 水解 10% (w/w) 稀酸预处理的玉米秸秆, 考察三种不同纤维素酶水解真实纤维素类原料的生成产物差异, 结果如图 2.3 所示。图 2.3 (a) 所示秸秆在摇瓶中酶水解 24 h 时, 纤维素酶 Accellerase 1000 水解获得 40 g/L 葡萄糖, 没有纤维二糖残留; Spezyme CP 和 Youtell #5 则生成约 30 g/L 葡萄糖和 10 g/L 纤维二糖, 这表明纤维素酶 Accellerase 1000 水解稀酸预处理秸秆的潜力好于另外两种纤维素酶, 更适用实际纤维素原料水解。摇瓶中添加固含量 10% (w/w) 秸秆水解时, 由于高的秸秆固含量对液体的吸收, 初始体系成粘稠的浆状, 无法取出有代表性的适合分析样品, 因此待水解 4 h 后, 用削去尖头的枪头取样。如图 2.3 (b) (c) 所示纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 在 4-24 h 水解秸秆过程纤维二糖浓度都始终在 10 g/L 上下, 但是 Accellerase 1000 水解样品在 4 h 时纤维二糖浓度只有 2 g/L, 随后水解过程就没有纤维二糖了 (数据未给出), 这一现象可能是由于 Spezyme CP 和 Youtell #5 中的纤维二糖酶活性低, 又可能受葡萄糖的抑制造成纤维二糖积累^[128], 但是随着水解时间的延长, 两种水解产物中的纤维二糖酶也没有能够把纤维二糖持续转化, 这可能与纤维二糖酶的来源^[129]或酶制剂中的其他组分如半纤维素酶有关^[26]。酶水解预处理后的木质纤维素是一个受多重因素影响的过程, 包括纤维素原料来源, 预处理的方式以及所选用的纤维素酶组成, 纤维素酶对预处理降解产物的耐受性^[28, 86]。例如稀酸预处理后的纤维素原料, 所选用的纤维素酶就不需要高比例的半纤维素酶, 而碱法预处理的原料, 进行水解时纤维素酶必须含有较多半纤维素酶, 才能够有好的酶水解效果, 这是由于酸法预处理溶解了半纤维素, 而碱法只是改变了原料结构, 半纤维素依然附着在纤维素上。因为这种基质复杂性, 现在倾向于针对特定预处理条件的特定原料, 优化所需要的纤维素酶。



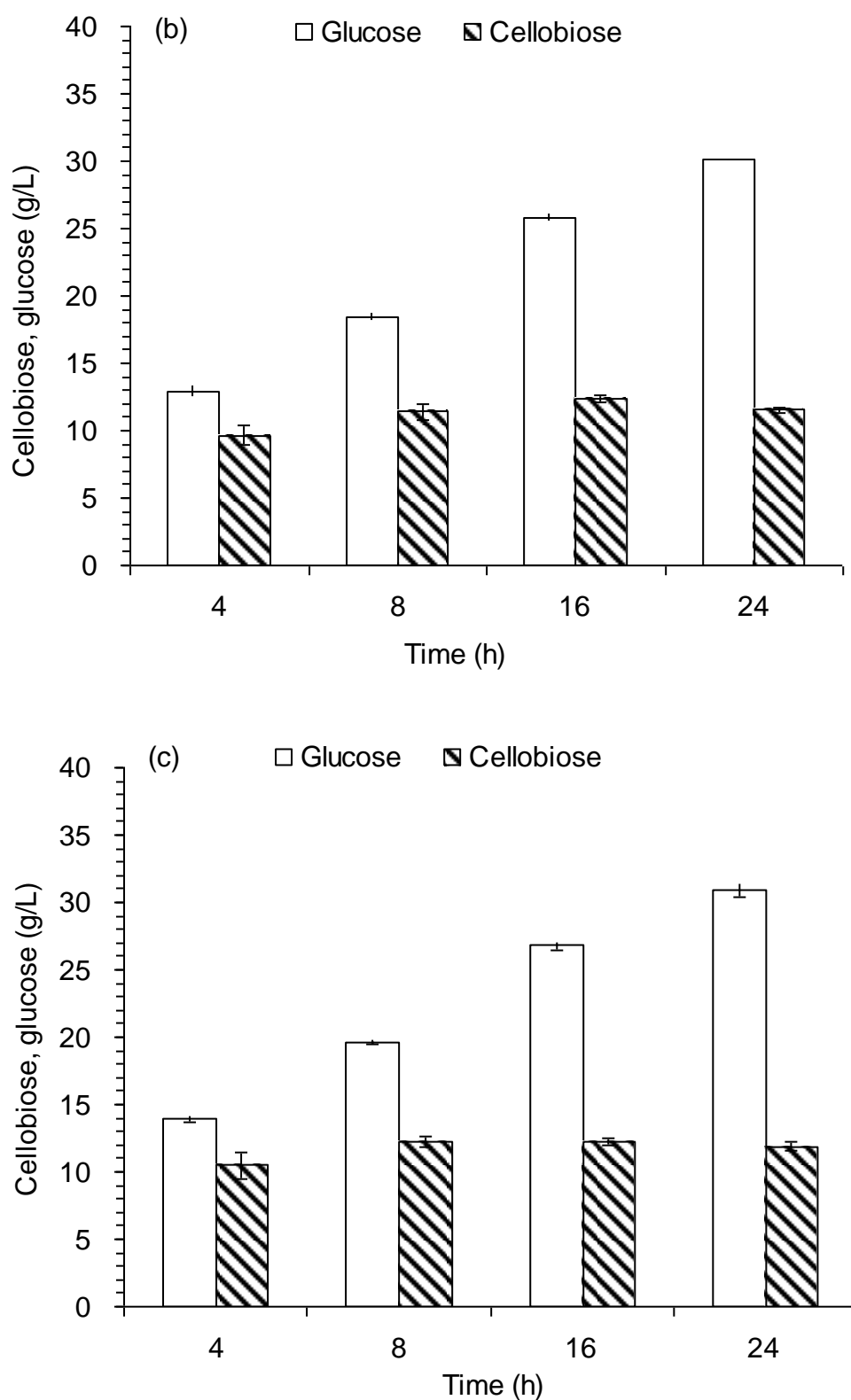


图 2.3 纤维素酶水解纤维素原料生成的葡萄糖和纤维二糖

Fig. 2.3 Concentrations of cellobiose and glucose during enzymatic hydrolysis of cellulose materials

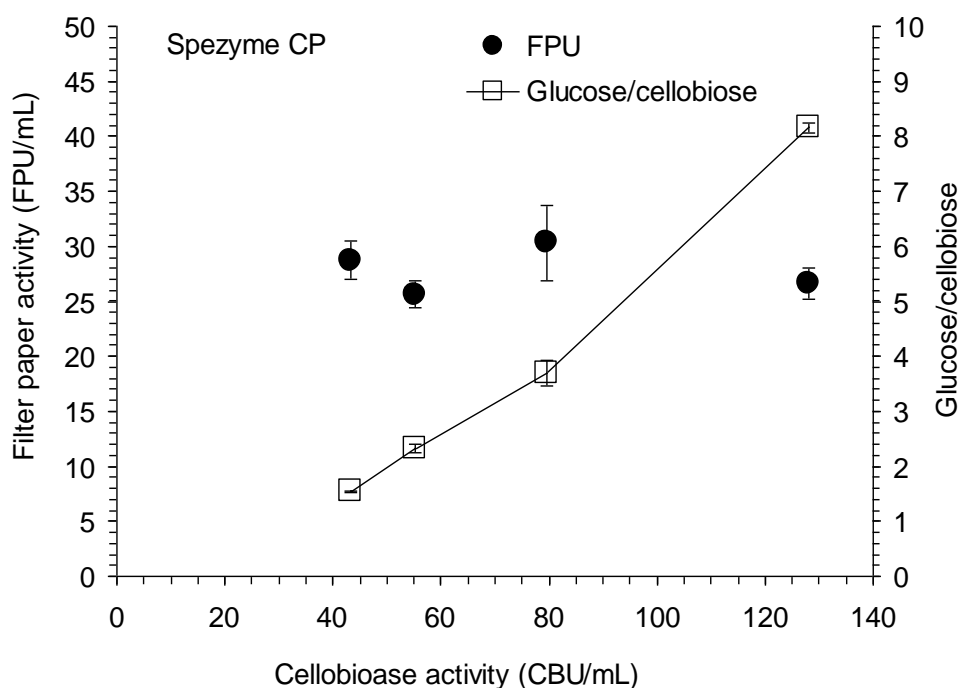
(a) 水解秸秆 24 h; (b) 和 (c) 分别表示纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 水解秸秆。水解在 250 mL 摇瓶中进行, 用柠檬酸缓冲液调节秸秆固含量为 15% (w/w), 纤维素酶量 10 FPU/g DM, pH 4.8。

摇瓶放在振荡水浴摇床中 50 °C, 150 rpm 水解 24 h。玉米秸秆预处理条件为: 190 °C, 3 min, 2.5 g 硫酸/100 g 干秸秆。

就水解生成葡萄糖和纤维二糖浓度相对浓度而言, 水解滤纸和玉米秸秆两者结果不同, 这与两者水解条件有关不同如用酶量、底物类型、和水解时间。但可以肯定的是相同滤纸酶活, 滤纸水解产物中葡萄糖与纤维二糖之比高的纤维素酶 Accellerase 1000, 水解秸秆原料的能力也更强。

2.3.4 添加纤维二糖酶对纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 水解能力的影响

鉴于纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 水解滤纸时葡萄糖与纤维二糖之比小于 1, 希望通过添加纤维二糖酶 Novozyme 188 改善纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 水解能力, 希望水解能够获得更多的单糖, 提高水解产物葡萄糖与纤维二糖之比。葡萄糖苷酶 Novozyme 188 按照 1/10, 1/20, 1/40, 1/80 体积添加到纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 中按照 2.2.2 节方法进行实验, 结果如图 2.4 所示。图 2.4 表明纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 在添加 Novozyme 188 后纤维二糖酶活性显著增加, 水解滤纸产物的葡萄糖和纤维二糖浓度 Glucose/cellobiose 也随着增加, 分别从接近 1 升高到 8 和 6。而添加 Novozyme 188 后纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 的 FPU 值则有不同的变化趋势, Spezyme CP 添加 Novozyme 188 后 FPU 值在 27 上下波动, 没有随着纤维二糖酶活提高而增加, 说明 Novozyme 188 添加只是改变了水解生成糖的组分, 没能显著提高纤维素酶滤纸酶活。当向 Youtell #5 添加 Novozyme 188, 在低水平添加 (1/40, 1/80 体积) 时, 纤维素酶的 FPU 没有大的变化, 在高水平添加 (1/10, 1/20 体积) FPU 值有 50% 的提高。总体来看, Youtell #5 的滤纸酶活水平高于 Spezyme CP, 但水解的产物 Glucose/cellobiose 低于 Spezyme CP。在选择纤维素酶时, 要综合考虑滤纸酶活单位高时



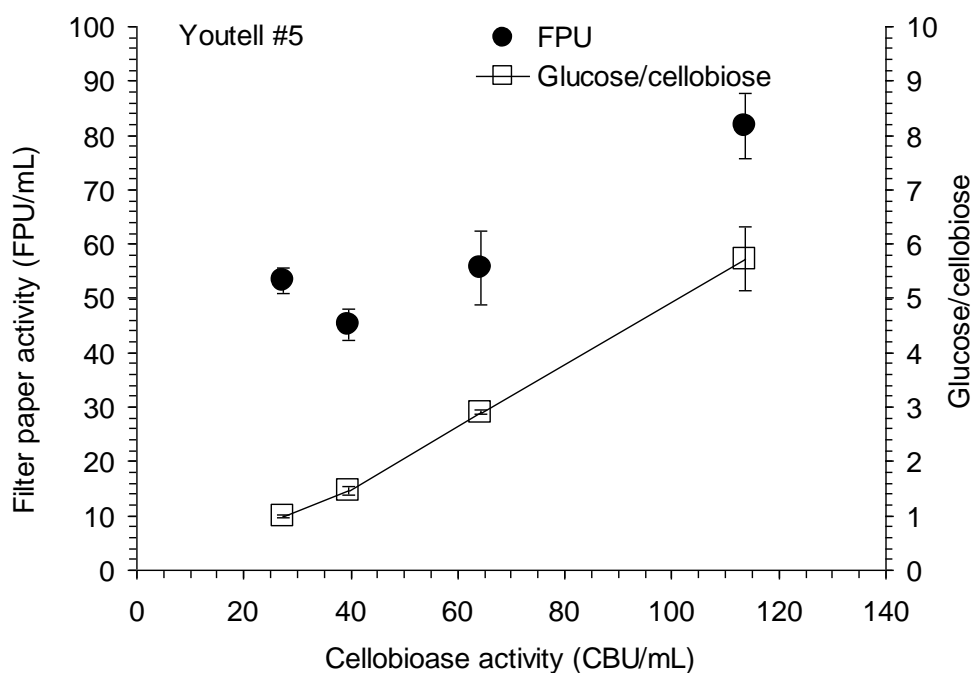


图 2.4 添加 Novozyme 188 对纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 的滤纸酶活 FPU 和水解产物葡萄糖与纤维二糖之比的影响

Fig. 2.4 Effect of supplementation of Novozyme 188 on the FPU and Glucose/cellobiose of Spezyme CP and Youtell #5

Novozyme 188 按照不同比例添加到纤维素酶 Spezyme CP 和 Youtell #5 中；FPU 通过 2.3.1 节建立的方法估算；Glucose/cellobiose 表示对应纤维素酶稀释 100 倍后水解滤纸生成的葡萄糖和纤维二糖浓度之比。

纤维素酶所具有强纤维素水解能力和高 Glucose/cellobiose 指标，能够水解获得高的单糖水平。在纤维素酶中添加纤维二糖酶能够一定程度改变水解产物的响应^[34]，但是在滤纸酶活水平不高的情况，对总的滤纸酶活影响不大，比如 Spezyme CP。纤维素酶 Youtell #5 原始就有较高的滤纸酶活水平和低的纤维二糖酶活，在补充了纤维二糖酶后，不仅能够提高 Glucose/cellobiose，也能够进一步提升滤纸酶活。

2.3.5 基于滤纸单位 (FPU) 和 Glucose/cellobiose 评价纤维素酶

从表 2.2 可以看出商业纤维素酶 Youtell #5 的滤纸酶活 (63.7 FPU/mL) 高于 Accellerase 1000 和 Spezyme CP (48.8, 45.2 FPU/mL)，但是 Youtell #5 的 Glucose/cellobiose 指标只有 0.54，远低于 Accellerase 1000 的 2.87，Spezyme CP 的 Glucose/cellobiose 的值刚好在 1，从 FPU 和 Glucose+cellobiose 两个指标可以看出三种纤维素酶实际水解能力的差异，通过在 Spezyme CP 和 Youtell #5 中添加 Novozyme 188，可以达到与 Accellerase 1000 相似的 Glucose/cellobiose 水平。IUPAC 采纳的纤维素酶滤纸活性分析方法存在不足^[2, 34, 41]，特别是当商业纤维素酶应用于真实的纤维素原料时，往往不能给出准确的预测^[44]，研究者不断完善纤维素酶的评价方法，以满足木质纤维素生物精炼产业的应用。

表 2.2 用滤纸单位 (FPU) 与 Glucose/cellobiose 表征纤维素酶样品

Table 2.2 Characterization of enzyme preparations by filter paper units (FPU) and Glucose/cellobiose

酶样品	滤纸单位 (FPU/mL)	Glucose/cellobiose
Accellerase 1000	48.8±0.5	2.87±0.0
		7
Spezyme CP	45.2±2.7	1.01±0.0
		3
Youtell #5	63.7±1.5	0.54±0.0
		2
Spezyme CP added Novozyme 188 (40) ^a	30.4±2.1	2.33±0.0
		7
Youtell #5 added Novozyme 188 (20)	45.9±4.6	2.91±0.0
		5

Glucose/cellobiose 表示酶样品稀释 100 倍水解滤纸产物中 HPLC 测定的葡萄糖和纤维二糖浓度之比;

^a 所示括号中数值表示添加 (1/40, 1/20 体积) Novozyme 188 到 Spezyme CP 和 Youtell #5 中

与图 1.2 所述的其他纤维素酶活分析方法相比, 本方法使用较先进的 HPLC 分析水解产物, 能够准确测定水解产物浓度, 同时获得葡萄糖浓度与纤维二糖浓度之比, 反映纤维素酶水解获得可利用单糖的能力, 同时该方法适用于低活性的纤维素酶样品, 也可适用于使用真实纤维素基质用于纤维素酶活分析, 因此本方法有一定的先进性和较好的适用性。

2.4 本章小结

1. 本章研究了基于 HPLC 分析的纤维素酶滤纸活性的测定方法。纤维素酶活的对数值能够很好的关联液相色谱测定的水解产物中葡萄糖和纤维素二糖浓度。基于此发现, 本方法创新地使用了能准确定量的液相色谱分析工具来获得水解产物中葡萄糖和纤维二糖浓度之比, 反映纤维素酶水解获得单糖能力。该方法能够用于低纤维素酶活性样品分析 HPLC 分析方法能够准确、迅速、定量地测定纤维素水解所希望获得的单糖, 这适合于测定酶水解真实纤维基质。

2. 本章研究发现不同来源的纤维素酶在相同条件下水解滤纸和预处理玉米秸秆, 水解产物差异很大。单以纤维素酶的滤纸酶活单位不能够反应纤维素酶水解产物的组成。水解产物中纤维二糖积累时, 添加纤维二糖酶能够显著提高 Glucose/cellobiose 之比。

第 3 章 高温高固含量下同步糖化与发酵玉米秸秆生产乙醇

3.1 引言

木质纤维素是地球上最丰富的有机资源, 不同于淀粉质原料, 木质纤维素原料结构复杂, 难以分解转化, 目前加工过程主要包括原料预处理、抑制物脱除、酶水解以及微生物发酵。为了提高过程效率, 节约投资和降低生产成本, 纤维素乙醇生产主要采用同步糖化与发酵的工艺 (SSF), 其中的一个主要问题是: 纤维素酶的最适酶解温度和微生物最适发酵温度不一致。为了能够实现发酵同步糖化与发酵, 只有降低水解温度以满足微生物生长和发酵的要求, 过程温度降低则纤维素酶活性降低, 意味着纤维素酶量增加或延长酶解时间, 糖化就成为 SSF 过程限制步骤。因此, 研究者希望能够在高温同步糖化与发酵, 从而充分发挥纤维素酶的性能, 解除纤维素糖化限制。高温同步糖化与发酵相比传统发酵具有许多优点, 过程包括糖化速率提高和纤维素酶量的降低, 发酵过程缩短; 高温发酵提高了发酵基质的溶解性, 更快的体系粘度降低提高了扩散速率等。尽管高温纤维乙醇发酵的重要性显而易见, 是一个重要的研究方向, 但是研究者目前集中在耐高温乙醇发酵菌株的筛选, 并在合成培养基, 微晶纤维素等基质中测试菌种。但是, 高温发酵技术的应用必须在接近实际的条件下进行检验, 特别是乙醇生产, 更是期望实现真实原料, 低的酶用量, 高固含量及高乙醇浓度来提高过程产能及降低下游分离的成本。从研究现状来看, 高温纤维素乙醇发酵, 在发酵微生物耐温性和基质浓度、乙醇得率、产物浓度方面都有待提高。

本章研究了高温下酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* DQ1) 同步糖化与发酵高固含量稀酸预处理的玉米秸秆生产乙醇, 研究了发酵过程三个关键因素: 发酵温度、玉米秸秆含量以及纤维素酶用量的影响, 考察了不同营养物添加到高温同步糖化与发酵过程对酿酒酵母发酵行为的影响, 对比了不同发酵模式在高温纤维乙醇发酵中的应用。

3.2 材料与amp;方法

3.2.1 玉米秸秆原料

玉米秸秆收获于吉林省，晒干后粉碎至 5 cm 左右，运送至实验室。在实验室用自来水水洗玉米秸秆，去除泥土和沙石，自然晾干，然后在 105 °C 烘箱中烘干玉米秸秆 8 h 至恒重，室温储存备用。玉米秸秆用粉碎机粉碎至 0.5 cm 尺寸以下，装入密封袋，室温储存备用，含水量约 5% (w/w)。玉米秸秆组分使用 Foss 2021 纤维素分析仪测定，秸秆中纤维素，半纤维素和木质素含量分别为 32.6%，26.4% 和 8.1% (基于基质量分数)。

3.2.2 发酵微生物与纤维素酶

本实验中用的发酵微生物是酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae* DQ1)，保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号 CGMCC No.2528，这是一株具有良好抑制物耐受性和耐温性的酵母。酵母 *S. cerevisiae* DQ1 菌种保存在 -80 °C 冰箱甘油管中，保存方法为：*S. cerevisiae* DQ1 接种在含有 100 mL YPD 培养基的 250 mL 摇瓶中培养 15 h，OD 大约是 6 (培养基中有 1-5 g/L 葡萄糖残留)，然后与 100 mL 60% (w/w) 甘油混匀，用移液枪分装 2 mL 到冻存管中，可以制作 100 个冻存管，保存于 -80 °C 冰箱^[130]。YPD 培养基 (g/L)：葡萄糖 20，蛋白胨 20，酵母粉 10。摇瓶，甘油，冻存管以及培养基都在 115 °C 灭菌 20 min。纤维素酶是 Accellerase 1000 (纤维素滤纸酶活 65 FPU/mL) 是杰能科公司的产品。

3.2.3 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 发酵温度的评价

在装有 YPD 培养基的摇瓶中，不同温度培养 *S. cerevisiae* DQ1，考察培养温度对其发酵和生长的影响。从 -80 °C 冰箱中取一支 *S. cerevisiae* DQ1 种子甘油冻存管，在 YPD 培养基中 30 °C，150 rpm 培养 12 h 作为种子液。发酵实验在 100 mL 摇瓶中，装 20 mL YPD 培养基，每个摇瓶接种 1 mL *S. cerevisiae* DQ1 YPD 种子液，分别在 30，35，37，40，42，44 °C 培养 24 h，取样，样品在 13000 rpm 离心 5 min，菌体稀释后测吸光度，-20 °C 保存上清液用于分析组分。

3.2.4 稀酸预处理玉米秸秆的方法

玉米秸秆稀酸预处理操作方法如下^[124]：玉米秸秆首先与稀硫酸混合预浸，称量 800 g 玉米秸秆与 400 g 5% (w/w) 硫酸在塑料箱中搅拌混合，玉米秸秆完全浸润，没有物料结块。然后，装入塑料袋，浸润 12 h。预处理操作过程：首先加热蒸汽发生器，把 1200 g 浸润过稀硫酸的玉米秸秆装入预处理反应釜，蒸汽发生器产生的高温蒸汽通入预处理反应釜，使反应釜内温度升到 190 °C，通过控制蒸汽流量维持温度 3 min。最后，迅速释放蒸汽，把预处理后物料卸到铁桶中，在水中冷却物料，转入塑料袋中，-4 °C 冰箱保存，预处理后玉米秸秆含水量约 50% (w/w)。预处理实验进行多批次，混合，以满足实验需要。

3.2.5 一次水洗玉米秸秆脱除抑制物

一次水洗的方式降低稀酸预处理的玉米秸秆在稀酸预处理过程中产生的抑制物，具

体操作步骤：稀酸预处理的玉米秸秆与蒸馏水按照 1: 3 (w/w) 混合，按照这个比例混合水刚好能够浸润物料，在室温下手动搅拌并浸泡 1 h，然后装入缜密的帆布袋，用压榨机下挤压出物料中水分，压榨后物料含水量到达约 52 %。多批次水洗的稀酸预处理的玉米秸秆，放在一起混合均匀，-4 °C 储藏备用。实验中若无特别说明，同步糖化与发酵稀酸预处理秸秆原料都是一次水洗后的稀酸预处理的玉米秸秆。

3.2.6 生物脱毒处理稀酸预处理后的玉米秸秆

稀酸预处理的玉米秸秆可以用固态培养霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 的方式脱除固体中的抑制物，具体操作步骤为：用蒸馏水和 5 M 氢氧化钠溶液调节稀酸预处理后玉米秸秆含水量为 60% (w/w)，pH 为 5.5 左右，接入 *A.resinae* ZN1 孢子悬浮液与秸秆混合，把霉菌 *A. resinae* 的孢子悬浮液混匀于秸秆中，盖上塑料盒盖子，不做进一步密封，在大批量脱毒时，把生长有霉菌的固体接入扩大培养的玉米秸秆中^[131]。25 °C 固态培养 10 天，脱除抑制物后秸秆冷冻储藏。大批量秸秆固态脱毒培养是在空调控温的房间进行，属于较开放培养方式，同时预处理后玉米秸秆为强酸性，因而玉米秸秆原料，塑料盒，蒸馏水，氢氧化钠溶液在这一步都没有高温灭菌。

3.2.7 纤维素酶水解稀酸预处理的玉米秸秆

为了获得玉米秸秆水解液用于酵母种子驯化培养，在发酵罐中进行纤维素酶水解玉米秸秆，操作步骤为：烘干称重测定稀酸预处理的玉米秸秆含水量，用于计算所需物料用量，把稀酸预处理后玉米秸秆，蒸馏水，加入到发酵罐中，用 5 M 氢氧化钠溶液调整体系 pH 到 5.0，再加入纤维素酶，玉米秸秆达固含量 15% (w/w)，纤维素酶活 15 FPU/g DM (秸秆干物质)，50 °C 酶水解 24 h，玉米秸秆酶水解成浆状水解液，把水解液在离心机中 10000 rpm 离心 10 min，获得黄褐色的水解液上清液。水解液上清液保存在 -4 °C 冰箱。发酵罐，玉米秸秆，蒸馏水，氢氧化钠溶液分别在 115 °C 灭菌 20 min。

3.2.8 酿酒酵母发酵种子液的驯化培养

每批次发酵罐同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆的种子液是经过玉米秸秆水解液驯化培养酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 而获得，具体步骤：从 -80 °C 冰箱取一支甘油管保藏的酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1，接种到装有 20 mL 合成培养基 (g/L)：葡萄糖 20，磷酸二氢钾 2，硫酸铵 1，七水合硫酸镁 1，酵母粉 1，100 mL 摇瓶中 35 °C，150 rpm 活化培养 16 h。再按照 10% 体积的接种量，把合成培养种子接入水解液培养基。水解液培养基是把原始的水解液用水稀释一倍，除葡萄糖外，其他组分和合成培养中浓度相同，这步培养也是在含有 20 mL 培养基 100 mL 摇瓶中 35 °C，150 rpm 培养 16 h。第三级种子扩大培养，在 500 mL 摇瓶中装入 200 mL 上述水解液培养基 35 °C，150 rpm 培养 12 h 用于罐上接种发酵。发酵种子液在 600 nm 处的吸光值约为 11，1 个单位吸光值约为 0.5，按照合成培养基，水解液培养基，摇瓶都分别在 115 °C，灭菌 20 min。

3.2.9 同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆

木质纤维素同步糖化与发酵实验总体实验操作流程如图 3.1 所示。同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆在自行设计的 5 L 发酵罐中进行，置于发酵罐顶部的小型马达为

螺带型搅拌桨提供搅拌动力^[122]。发酵罐使用前，在位 115 °C，灭菌 20 min。另外，即使水洗一次后的稀酸预处理物料仍然表现强酸性，为了保证发酵体系的 pH 不受外加物料较大程度的扰动，物料都预先用氢氧化钠溶液调节。如 1.2 kg 水洗后的稀酸预处理的玉米秸秆加 5 M 氢氧化钠 30 mL，相当于 6 g 固体碱，可中和物料的 pH 接近 5。每次发酵实验根据预先计算的量准备玉米秸秆物料，以及调节发酵固含量的蒸馏水。在添加预处理后物料到发酵罐时，考虑到发酵罐搅拌能力，逐步批次加入物料，至达到预先设定固含量，加入纤维素酶，酵母种子液。预处理后的玉米秸秆物料，营养物，蒸馏水分别在 115 °C，灭菌 20 min。营养盐的添加除特别说明外，按照合成培养基中相同组分和浓度添加。每个实验具体的发酵条件和参数见各个实验的说明。实验过程取的样品在 13000 rpm 离心 5 min，-20 °C 保存上清液用于分析组分浓度。在 30% 固含量的操作体系中初始的糠醛，羟甲基糠醛和乙酸的浓度分别是 0.6 g/L，0.25 g/L 和 4.0 g/L。预处理后的秸秆物料逐步加入发酵罐中，一般需要 4-8 h 才能够把原料完全加入，这时的样品没有代表性，因此在操作 0 时刻没有取样。当全部纤维素原料基质都加入发酵罐后，才开始周期性取样。

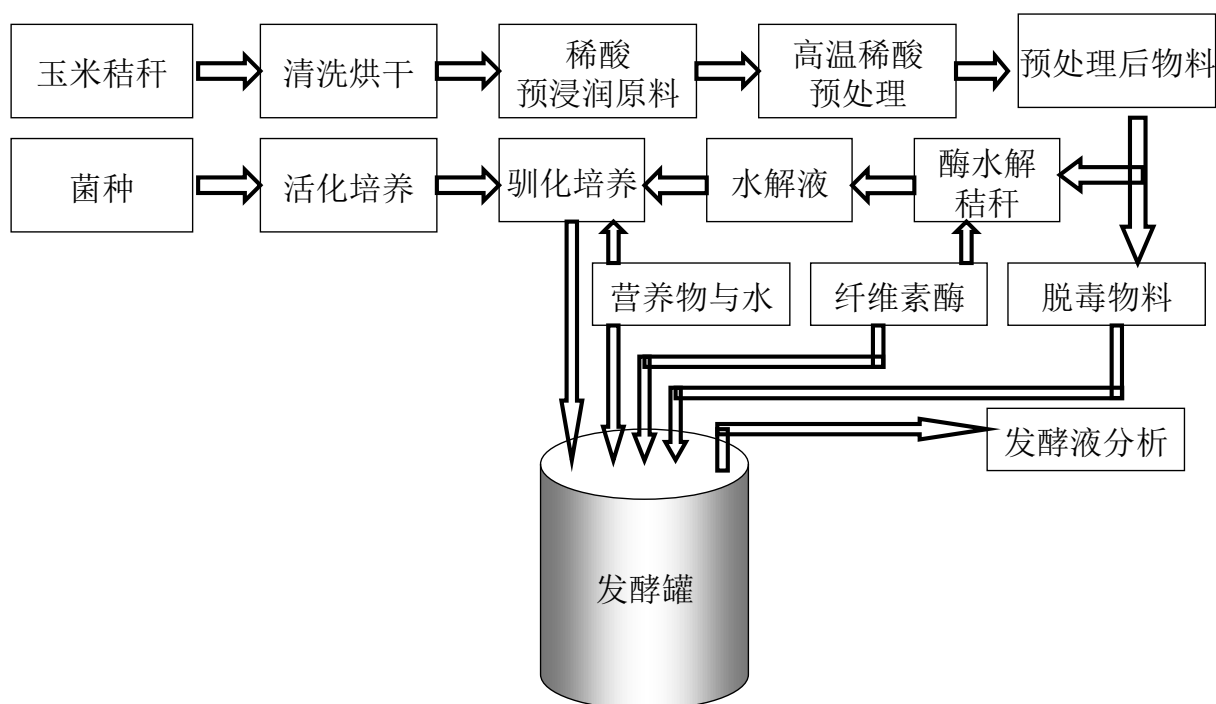


图 3.1 木质纤维素同步糖化与发酵实验总体操作流程

Fig. 3.1 The overall procedures of the SSF of lignocellulose

3.2.10 分析方法

菌体生物量用 Beckman DU800 分光光度计，在 600 nm 测定菌体的吸光值 (Optical Density, OD)。样品中葡萄糖、木糖、乙酸、5-羟甲基糠醛、糠醛和乙醇的浓度用高效液相色谱(HPLC)测定。高效液相色谱配置 RID-10A 型示差检测计，使用 Bio-rad Aminex HPX-87H 色谱柱，柱温箱温度 65 °C，5 mM H₂SO₄ 作为流动相，流速 0.6 mL/min。样品经 0.22 μm 滤膜过滤，进样大约 40 μL。

3.3 结果与讨论

3.3.1 稀酸预处理玉米秸秆的一次水洗液和水解液组成

纤维素酶水解稀酸预处理的玉米秸秆获得含有葡萄糖、木糖和抑制物的水解液，可以用做酵母种子液的驯化和扩大培养。稀酸预处理秸秆在 15% 固含量，15 FPU/g DM 酶用量 50 °C 水解 24 h，结果如表 3.1 所示。水解液中葡萄糖浓度约 40 g/L，是木糖浓度的 3 倍，同时有低浓度的抑制物。水洗液中木糖浓度几乎是葡萄糖的 4 倍，说明稀酸预处理对半纤维素的分解效果明显，只有很少量的纤维素分解产生葡萄糖。木质纤维素是纤维素，半纤维素，木质素及果胶等较链成的缜密结构，原料预处理是进行后续加工的必需步骤。稀酸预处理目的主要是溶解玉米秸秆中的半纤维素，改变木质纤维素结构，从而增加纤维素组分的酶可接触性。稀酸预处理后的玉米秸秆在纤维素酶作用，酶水解其中的纤维素转变为葡萄糖，而水解液中的木糖则是在稀酸预处理玉米秸秆高温酸性过

表 3.1 稀酸预处理的玉米秸秆酶水解液和水洗液中组分的浓度

Table 3.1 Components in enzymatic hydrolysate and washing liquor of dilute acid pretreated corn stover

组分 (g/L)	葡萄糖	木糖	乙酸	5-羟甲基糠醛	糠醛
水解液	42.3±2.51	15.1±0.15	3.61±0.19	0.32±0.06	0.56±0.03
水洗液	1.47±0.04	5.52±0.45	1.59±0.16	0.46±0.01	0.92±0.07

稀酸预处理的玉米秸秆酶水解条件是固含量 15% (w/w)，15 FPU/g DM，pH 5.0，搅拌转速 150 rpm，50 °C 水解 24 h，浆状水解液 10000 rpm 离心 10 min 获得上清液；水洗液是指稀酸预处理秸秆与水质量 1: 3 混合水洗，然后经压榨机压滤出的液体。预处理条件是：190 °C，处理 3 min，2.5% 硫酸。过程中，酸溶解半纤维素分解而来，因而水洗液中木糖浓度相对较高。同时，稀酸预处理过程在高温和酸催化下伴随着木质纤维素原料组分的破坏，乙酰基转化成乙酸；葡萄糖和木糖脱水分解成 5-羟甲基糠醛，糠醛，这些降解产物会影响发酵的微生物^[8, 108, 132]。稀酸预处理方法是一种工业上操作相对可行，成本较低的加工技术^[133-135]，本实验采用的稀酸预处理方式^[124]，具有更加显著优点：预处理酸用量低，抑制物浓度低，对设备腐蚀小；预处理物料固含量高，预处理后几乎没有废液产生。水洗操作方便，能够迅速地降低预处理原料中的抑制物含量，分离出预处理后可溶性组分^[133, 135-137]，本实验中一次水洗操作就能够满足酵母发酵要求，节约了用水。当然，水洗后压榨秸秆中仍含有 50% 水分，水洗过的预处理玉米秸秆仍然包含有可溶性组分，因提高发酵体系固含量势必造成抑制物的累积，仍然可能影响微生物的发酵行为。由于实验中所用的酵母 *S. cerevisiae* DQ1 不能够利用木糖等戊糖组分，因此半纤维素组分的利用在实验中没有考虑。在木质纤维素原料中，半纤维素占有相当大的比重，可以利用其他微生物发酵半纤维组分的水解液生成乙醇或沼气，从而提高纤维素原料的整体的利用率^[138, 139]。

3.3.2 温度对 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 在 YPD 培养基中发酵的影响

在 YPD 培养基中，不同温度 (30, 35, 37, 40, 42, 44 °C) 培养 *S. cerevisiae* DQ1，以了解酵母能够生长和发酵的温度范围，结果如图 3.2 所示。图 3.2 中所示为培养 24 h

不同温度条件下 *S. cerevisiae* DQ1 菌体 600 nm 吸光值和基于葡萄糖的乙醇得率。从生长情况看, *S. cerevisiae* DQ1 的 600 nm 吸光值随着培养温度从 30 °C 升高到 44 °C 呈下降趋势。但是, 当培养温度从 30 °C 到 40 °C, 菌体吸光值都在 10 以上, 培养温度超过 40 °C, 菌体生长能力下降, 菌体吸光值急剧下降至 2, 在 44 °C 培养 *S. cerevisiae* DQ1 只有微弱的生长。在 24 h 内, 在 30-40 °C 培养, YPD 培养基中的葡萄糖都消耗完毕, 但是在 42 °C 和 44 °C, 葡萄糖分别只消耗了 35% 和 13%。与生长情况一致, 乙醇的得率也随着温度升高而降低, 但得率下降过程比较平稳。从 30-40 °C 乙醇得率略有下降, 但是培养基中的葡萄糖都完全消耗, 在 42 °C 和 44 °C 培养基中残留葡萄糖增加, 乙醇得率降低。总之, *S. cerevisiae* DQ1 在 40 °C 以下时能够正常生长和发酵, 而温度高于 40 °C 时尽管能够生长, 但是生长和发酵受到显著影响。从 OD₆₀₀ 和乙醇得率随温度变化曲线发现, 温度对 *S. cerevisiae* DQ1 的生长影响更大。需要指出, YPD 培养基按照 20 g/L 葡萄糖配制, 高温灭菌后液相色谱测定一般只有 15 g/L, 可能是因为葡萄糖中含有结晶水, 以及高温灭菌造成的葡萄糖的分解。*S. cerevisiae* DQ1 与文献报道酵母菌株^[59, 55, 57]相比, 具有较好或相当的耐温性, 同时在常温木质纤维素发酵具有较好的耐受性和适用性^[131, 125], 使其具有潜力应用于高温高固含量的玉米秸秆发酵。

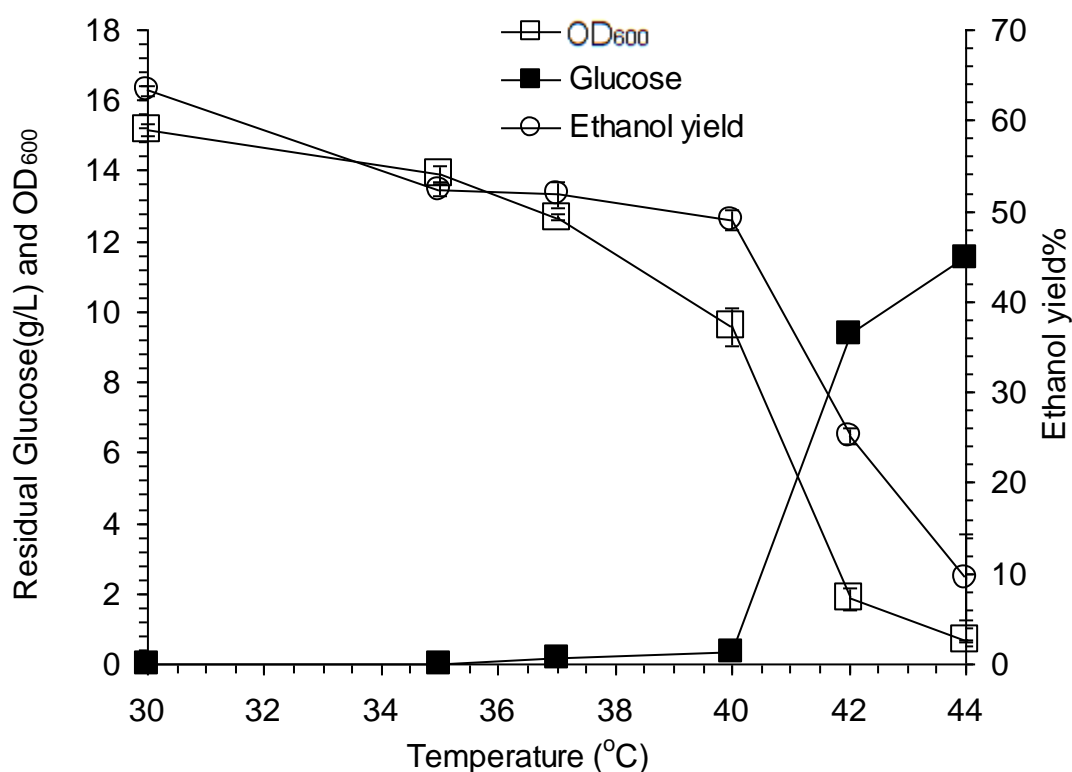


图 3.2 温度对 *S. cerevisiae* DQ1 在 YPD 培养基中 24 h 生长, 葡萄糖和乙醇得率的影响

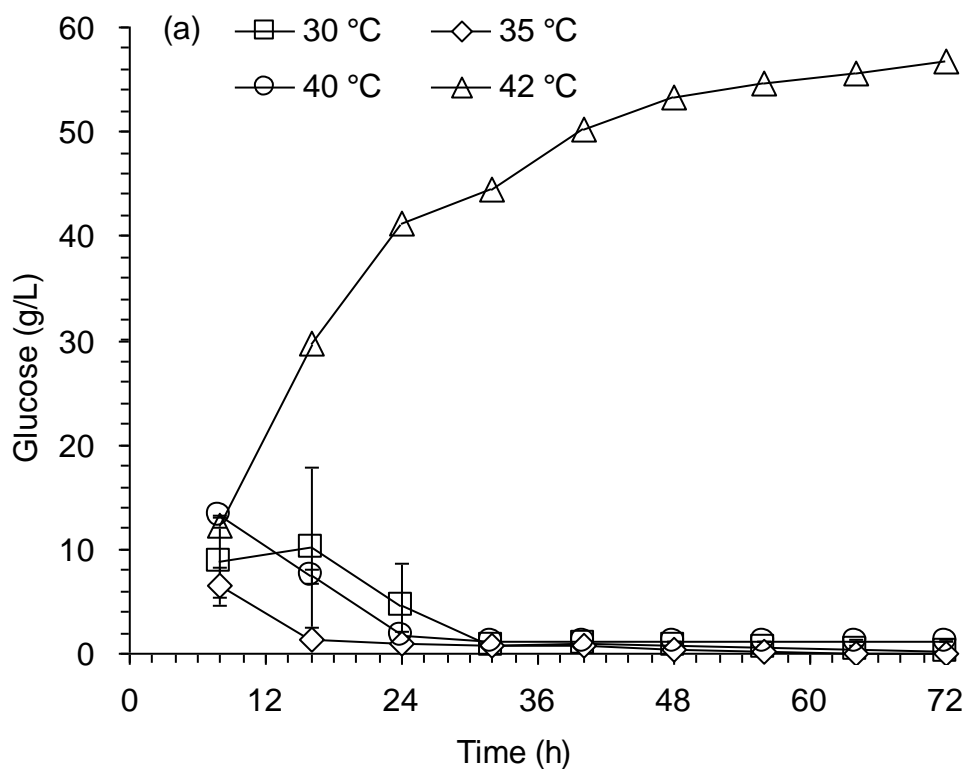
Fig. 3.2 Effect of temperature on the growth and ethanol yield of *S. cerevisiae* DQ1 after 24 h cultivation in YPD medium

发酵在装液量 20 mL 的 100 mL 摇瓶中进行, 150 rpm 培养 24 h。每个培养温度 3 组平行实验, 图中数据为三组数据平均。OD₆₀₀, 菌体在 600 nm 时的吸光值; Glucose, 24 h 的葡萄糖浓度, Ethanol

yield%, 乙醇得率%; 乙醇得率% = $\frac{C_{eth,24h}}{C_{glu,0h} \times 0.511}$ % $C_{eth,24h}$, 24 h 的乙醇浓度; $C_{glu,0h}$, 0 h 的葡萄糖浓度

3.3.3 温度对直接同步糖化与发酵玉米秸秆的影响

为了考察 *S. cerevisiae* DQ1 在不同温度同步糖化与发酵稀酸预处理秸秆的表现, 在实验条件固含量 20% (w/w), 纤维素酶用量 5 FPU/g DM, 发酵结果如图 3.2 所示。直接同步糖化与发酵的“直接”是指发酵操作零时刻就接种发酵种子, 物料, 纤维素酶开始同步糖化与发酵。如图 3.3 (a) 所示, 尽管从零时刻开始接种发酵, 发酵温度为 30, 35, 40 °C 时, 但 24 h 内葡萄糖有不同程度 (~10 g/L) 积累, 说明酶水解产生糖的速率大于酵母生长和发酵能够利用的速率。发酵进入 36 h 后, 在 30, 35 °C 条件, 几乎检测不到葡萄糖, 但是 40 °C 发酵至 72 h, 约有 1 g/L 的葡萄糖残留, 乙醇得率随着发酵温度升高而增加, 这得益于温度升高纤维素酶的水解能力增强, 因为乙醇基于葡萄糖的



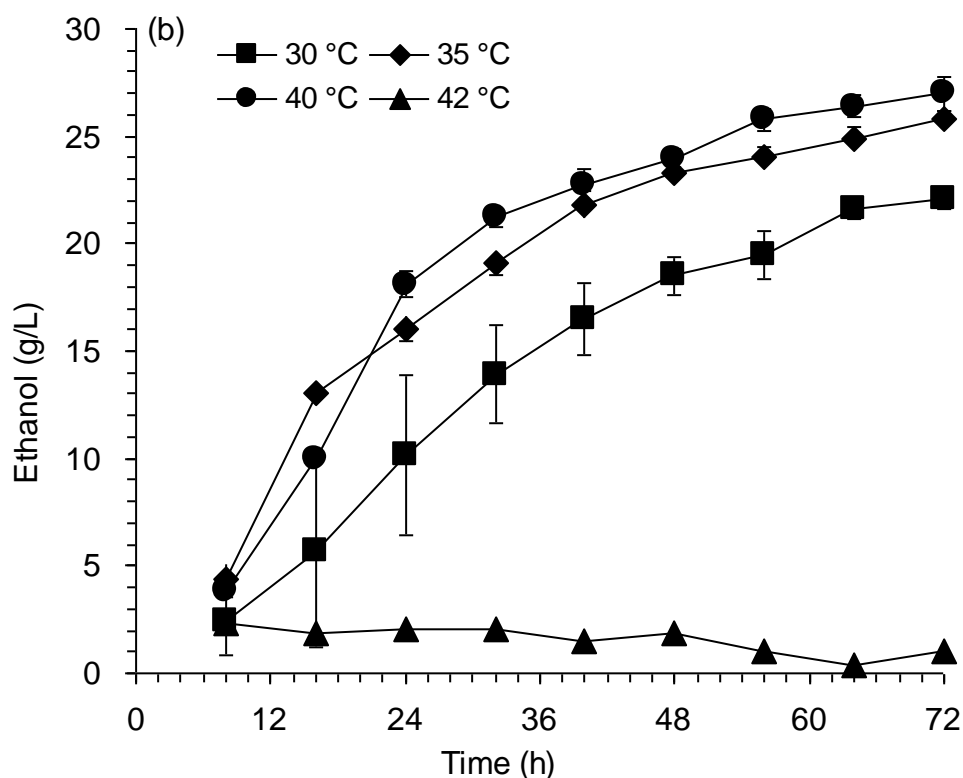


图 3.3 温度对直接同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆的影响

Fig. 3.3 Effect of temperatures on the SSF of the dilute acid pretreated corn stover

同步糖化与发酵实验在有螺旋型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，固含量 20% (w/w)，纤维素酶量 5 FPU/g DM，转速 150 rpm，过程 pH 5.0。纤维素酶，酵母种子在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，取样，发酵温度分别设定在 30, 35, 40, 42 °C，发酵过程的葡萄糖 (a) 和乙醇 (b)。稀酸预处理条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄

得率没有随温度增加。然而，但发酵温度为 42 °C，发酵不能够启动，葡萄糖在同步糖化过程持续积累，36 h 后积累速度变慢，最终葡萄糖浓度积累接近 60 g/L。对应于葡萄糖的变化，乙醇的生成如图 3.3 (b) 所示，从乙醇的变化曲线中能够清晰的看出随着发酵温度的升高，生成乙醇的速率和浓度都在增加，结果表明在 20% 固含量，5 FPU/g DM，使用 *S. cerevisiae* DQ1 能够在 40 °C 直接同步糖化与发酵一次水洗的稀酸预处理的玉米秸秆，这与 YPD 培养基发酵结果相一致。在提高温度进行发酵时，微生物自身的生长能力会降低；同时也会加剧产物乙醇以及发酵环境应力对微生物发酵的表现^[55, 140, 141, 78]。本实验设定的直接同步糖化与发酵的条件主要考虑如何能够更好地体现温度对同步糖化与发酵的影响，基于以下几点考虑：纤维素酶水解纤维素的初水解速度最快，然后由于产物抑制，或酶失活，或非生产型吸附，以及纤维素基质含量降低而逐步变缓，也就是说水解主要集中在开始的一段时间，因此如果有预糖化步骤可能无法体现温度对整个过程的影响；一般乙醇生产过程希望，纤维素酶用量要尽可能低，本实验选择的纤维素酶量是比较低的，这也同时考虑到如果用纤维素酶量过大，同样不能够体现温度带来水解能力的差异；为获得高的纤维乙醇发酵浓度，必须提高纤维素基质在体系中的浓度，

选择较高的 20% 固含量，能够考察纤维素酶与高固含量作用，进而体现温度对水解的过程影响。

3.3.4 纤维素酶用量对高温直接同步糖化与发酵的影响

为了提高木质纤维素的转化效果，特别是在高固含量下，提高纤维素酶用量是一种常用的选择。本实验考察在 40 °C 使用 *S. cerevisiae* DQ1 直接同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆，提高纤维素酶用量对同步糖化与发酵行为的影响，结果如图 3.4。图 3.4

(a) 为同步糖化与发酵过程中葡萄糖浓度的变化，当纤维素酶用量从 5 FPU/g DM 提高到 15 FPU/g DM，水解生成葡萄糖的速度明显增加，在 8 h 内葡萄糖浓度从 13 g/L 提高到 22 g/L，而此时生成的乙醇浓度几乎相同。特别在 15 FPU/g DM，葡萄糖浓度在 12 h 和 24 h 之间达到最高点。随着发酵的进行，葡萄糖浓度不断降低，5 和 10 FPU/g DM 条件在发酵 24 h 后葡萄糖浓度迅速降至最低点，15 FPU/g DM 下葡萄糖消耗比较缓慢。尤其明显的是，同步糖化与发酵后期残留葡萄糖浓度有随着用酶量增加而增加的趋势（1 g/L，3 g/L，9 g/L）。同步糖化与发酵过程乙醇的生成如图 3.4 (b) 所示，从乙醇生产看 10 FPU/g DM 酶量条件下的发酵效果最好。5 和 10 FPU/g DM 用酶量条件，初始 24 h 乙醇生成速度接近，发酵后期可能受制于 5 FPU/g DM 纤维素酶用量导致水解不足，最终产量低于 10 FPU/g DM 条件。在三个酶用量中 15 FPU/g DM 的条件乙醇生产速度最慢，而且最终只达到 5 FPU/g DM 酶用量的发酵结果。从纤维素到葡萄糖和乙醇总的转化看，纤维素酶用量的增加并没有明显提高这一转化，表明在 20% 高含量下，5 FPU/g DM 的酶用量能够满足水解。纤维素酶是包含有许多种酶的混合酶，对微生物的存活可能产生影响，特别是在酶浓度较高的时候。Tomas-Pejo 等^[76]在研究同步糖化与发酵中发现纤维酶的存在总是影响酵母细胞的存活，在酶浓度 0.5 FPU/mL 时微生物细胞的生长不受影响，当升高到 3.5 FPU/mL 时，微生物存活能力下降了 70%。本实验中纤维素用量 15 FPU/g DM 时酶浓度超过 4 FPU/mL，必然造成不利影响，导致同步糖化与发酵过程微生

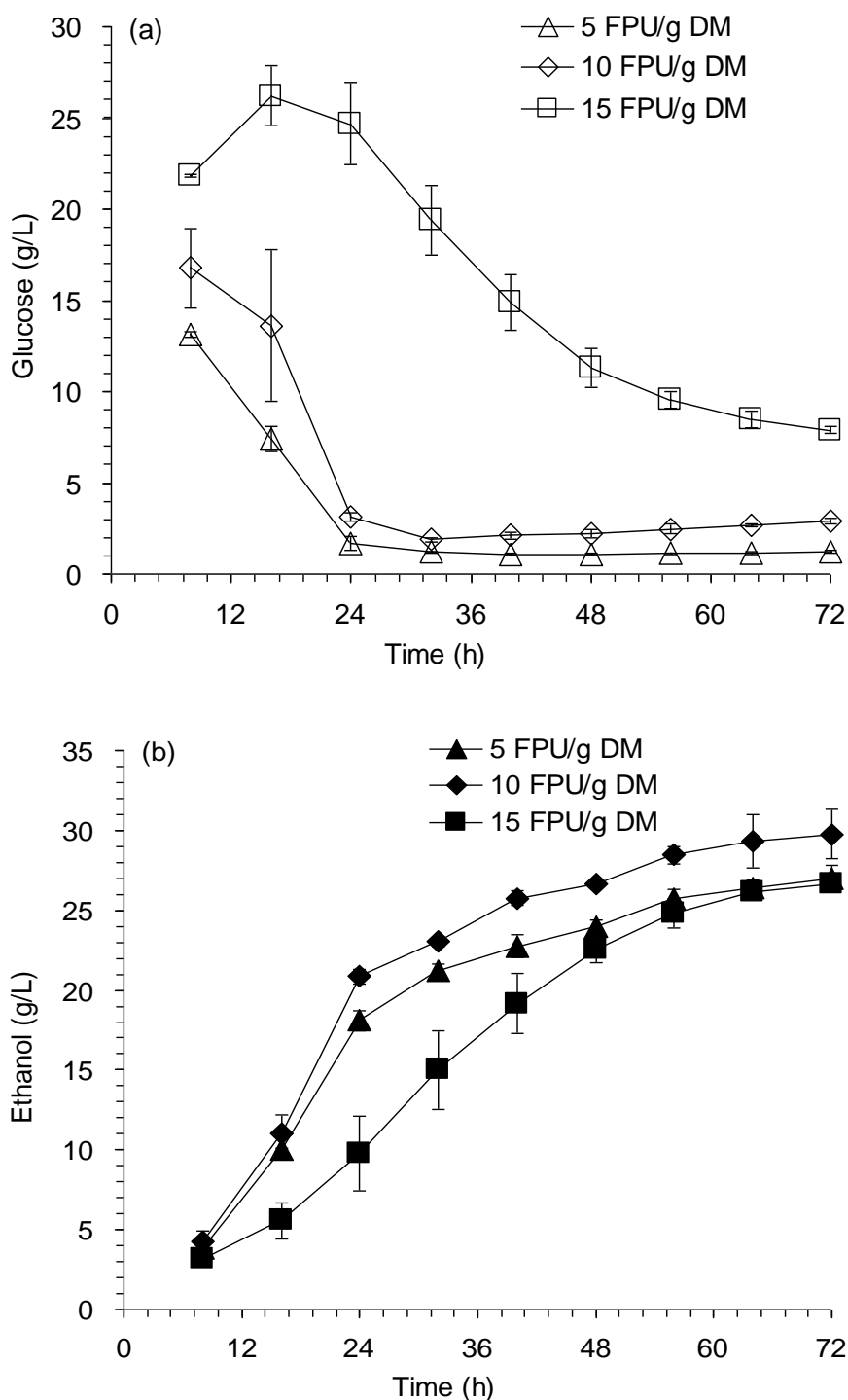


图 3.4 纤维素酶用量对 40 °C 同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆的影响

Fig. 3.4 Effect of cellulase loadings on SSF of dilute acid pretreated corn stover at 40 °C

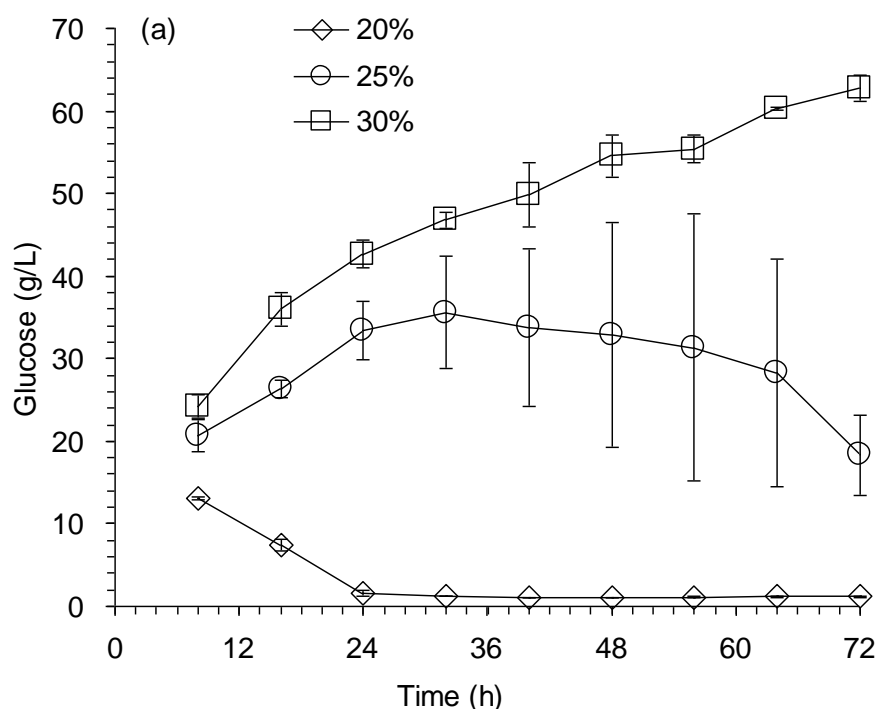
实验在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，固含量 20% (w/w)，温度 40 °C，转速 150 rpm，过程 pH 5.0，纤维素酶用量分别 5，10，15 FPU/g DM。纤维素酶，酵母种子在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，取样，发酵过程的葡萄糖 (a) 和乙醇 (b)。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。

物的存活能力下降。Golias 等^[142]也同样报道纤维素酶中包含的蛋白酶和保存剂可能会

影响微生物的发酵。纤维素酶的生产和调配可能主要针对中常温发酵微生物，这时如果微生物生长能力强，则抑制作用表现不大。纤维素酶对微生物发酵的影响，这可能会是个比较重要的问题，值得研究，特别在高温发酵条件，需要深入研究，同时改进纤维素酶的性能以广泛适应于微生物的发酵。

3.3.5 预处理玉米秸秆固含量对高温直接同步糖化与发酵的影响

同步糖化与发酵过程中纤维素基质含量的增加，可以降低过程用水，提高装置生产能力从而提高产品浓度，同时降低下游加工处理成本^[81]。同步糖化与发酵过程过程预处理玉米秸秆浓度对高温发酵行为的影响，如图 3.5 所示。图 3.5 (a) 为不同固含量同步糖化与发酵过程中葡萄糖浓度的时间曲线。随着秸秆固含量提高 (20%，25%，30%)，发酵过程中的酿酒酵母消耗葡萄糖能力下降，积累程度增加。初始 8 h 时，30% 固含量条件的葡萄糖浓度比 25% 固含量仅略有增加，而且在 30% 固含量，发酵不能启动，葡萄糖浓度随着水解时间一直增加达 65 g/L。当在 20% 固含量条件，葡萄糖明显消耗迅速，24 h 后基本没有葡萄糖积累。25% 固含量的条件介于两者之间，葡萄糖浓度在 24 h 增至高点，然后缓慢下降，在发酵 72 h 时，还积累有 18 g/L 葡萄糖。图 3.5 (b) 为不同固含量同步糖化发酵中乙醇生成的时间曲线，20% 固含量乙醇浓度最高达 27 g/L，30% 固含量发酵没能启动，乙醇一直保持的水平状态。在 25% 固含量条件，由于延滞期长，虽然在发酵 36 h 后乙醇生产速率加快，终止发酵时发酵液中乙醇浓度只有 17 g/L。正如方法与材料部分所述预处理玉米秸秆经过一次水洗，在节约用水的条件下，降低了预处理



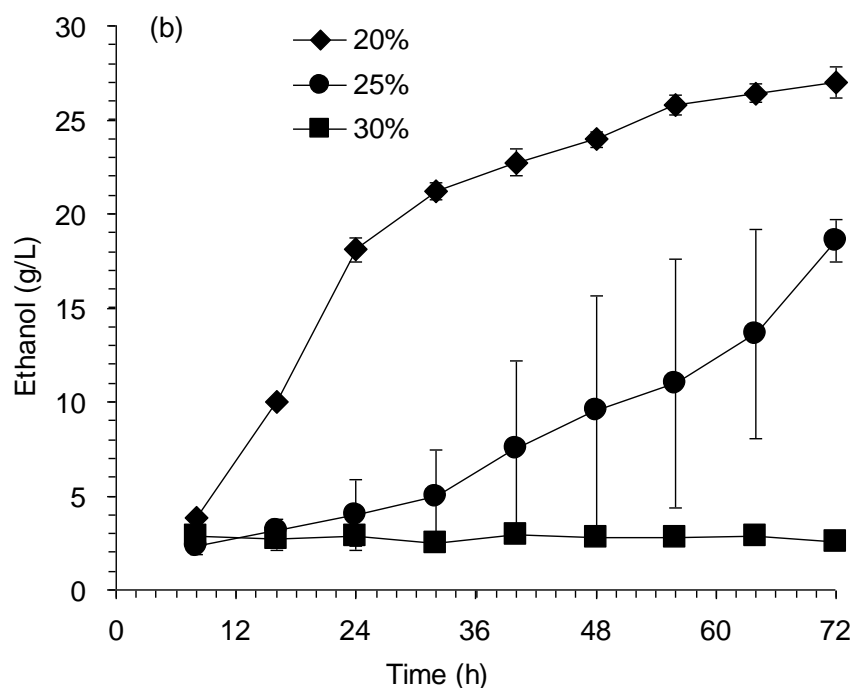


图 3.5 固含量对 40 °C 同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆的影响

Fig. 3.5 Effect of solids loading on the SSF of the dilute acid pretreated corn stover at 40 °C

实验在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，纤维素酶用量 5 FPU/g DM，发酵温度 40 °C，转速 150 rpm，过程 pH 5.0，固含量分别为 20%，25%，30% (w/w)。纤维素酶，酵母种子在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，取样，发酵过程葡萄糖 (a) 和乙醇 (b)。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。

玉米秸秆中的抑制物浓度。压榨物料含有约 50% 水分，仍然含有一定程度的抑制物，在提高固体含量条件下，抑制物的累积，会恶化酵母的发酵能力。在 YPD 培养基中，40 °C 的生长能力只是 30 °C 和 35 °C 条件的 60% 和 70%，由于 5-羟甲基糠醛和糠醛等抑制物的降解与微生物的生长能力相关^[87, 143, 144]，在抑制物的浓度和培养温度升高时，抑制物的可被降解能力减弱，必然延缓发酵或使发酵停滞。在提高含量 (~30%) 过程 5-羟甲基糠醛浓度从约 0.05 g/L 升高到 0.2 g/L，糠醛从 0.2 g/L 升高到 0.7 g/L，乙酸浓度从 2 g/L 增加到 5 g/L，因此固含量提高会综合抑制微生物的发酵。另外，随着固含量升高，水解初始阶段，发酵体系的黏度降低缓慢，体系自由水含量少，溶解氧水平低，都不利于微生物的生长^[114, 92]。同样，随着固含量升高发酵体系的酶浓度亦增加，进一步影响发酵能力。与 20% 固含量条件的酶用量提高至 15 FPU/g DM 相比，显然，固含量升高至 30% 的负面影响更大。

3.3.6 营养物对高温直接同步糖化与发酵的影响

一般认为酵母发酵性能的提高如缩短延滞期，更快速和彻底的发酵可以通过添加营养物进行提高。厌氧环境中，氮源对酵母的增殖以及乙醇的生产非常重要^[108, 145, 146]。在同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆中添加了基本营养物 (g/L)：磷酸二氢钾 2，硫

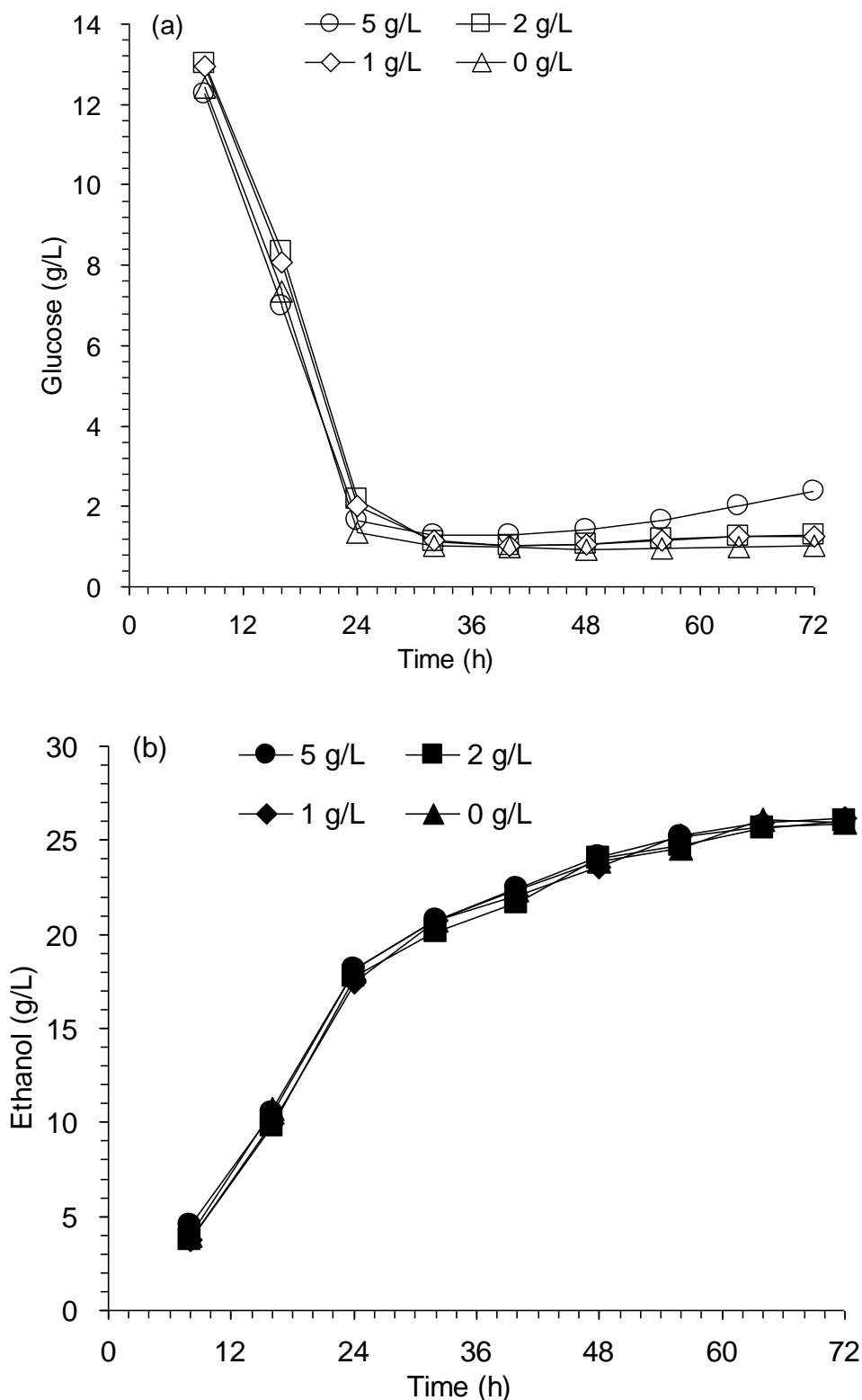


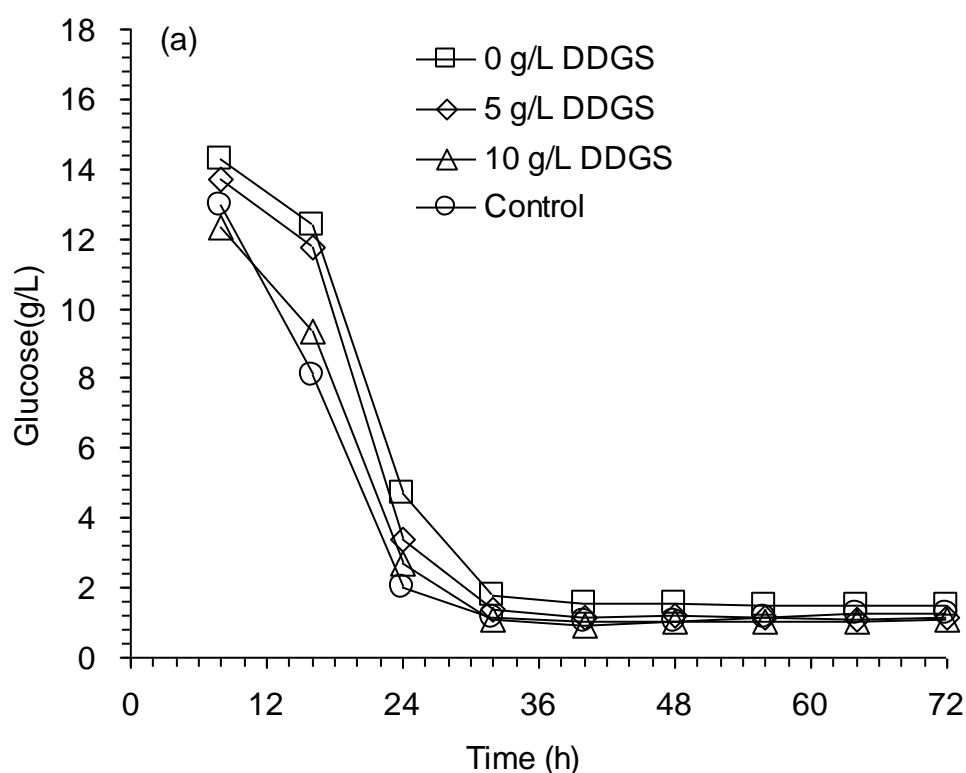
图 3.6 不同浓度硫酸铵对 40 °C 直接同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆的影响

Fig. 3.6 Effect of ammonium sulfate on SSF of the dilute acid pretreated corn stover at 40°C

实验在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行, 工作体积 2.5 L, 固含量 20% (w/w), 纤维素酶用量 5 FPU/g DM, 发酵温度 40 °C, 转速 150 rpm, 过程 pH 5.0, 营养物质添加中硫酸铵的浓度分别添加 0, 1, 2, 5 g/L; 其他营养浓度保持不变。纤维素酶, 酵母种子在 0 时刻加入, 玉米秸秆原料从 0 时刻

开始逐步加入，8 h 内补加完毕，取样，发酵过程的葡萄糖 (a) 和乙醇 (b)。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。

酸铵 1，七水合硫酸镁 1，和酵母粉 1，但是发现在高温直接同步糖化与发酵中即使在发酵效果较好的固含量 20% (w/w)，纤维素酶用量 5 FPU/g DM 条件下，至少存在两个问题：需要 24 h 才能够把积累的葡萄糖消耗；发酵后期以至到 72 h，始终有约 1 g/L 葡萄糖残留。硫酸铵是一种价格便宜氮源，是在实验室配制培养基和工业上常用的氮源，首先考虑利用添加硫酸铵来改善发酵性能。在 40 °C 同步糖化与发酵添加不同浓度硫酸铵的过程曲线如图 3.6 所示，添加不同浓度 (0-5 g/L) 硫酸铵，生成的乙醇浓度随时间变化几乎完全一致 (图 3.6 (b))，而随着硫酸铵浓度的增加，葡萄糖的初始消耗速度并没有增加，如图 3.6 (a) 所示，发酵前 36 h 葡萄糖浓度变化曲线也几乎一致。在发酵后期，残留葡萄糖呈增加趋势，5 g/L 硫酸铵的条件发酵残留葡萄糖超过 2 g/L。结果表明硫酸铵的添加无助于改善实验条件下的酵母发酵性能，即使不添加硫酸铵的状况发酵也能够进行。鉴于硫酸铵的添加无助于改善乙醇发酵，因此考察无任何营养添加时的同步糖化与发酵实验作为最低程度的对比，同时与基本营养添加情况做对比。淀粉酒精厂的副产品玉米酒糟 (Dry Distillery Grain's with Soubles, DDGS) 含有比较丰富的氨基酸，蛋白质及微量元素，与酵母粉成分较类似，可以添加到纤维乙醇发酵过程中改善发酵^[147]，由于酒精产量激增，玉米酒糟价格便宜也较低。图 3.7 为外部营养添加与否对同步糖化与发酵的影响。不同的营养条件下葡萄糖浓度变化如图 3.7 (a)。发酵前 24 h，添加营



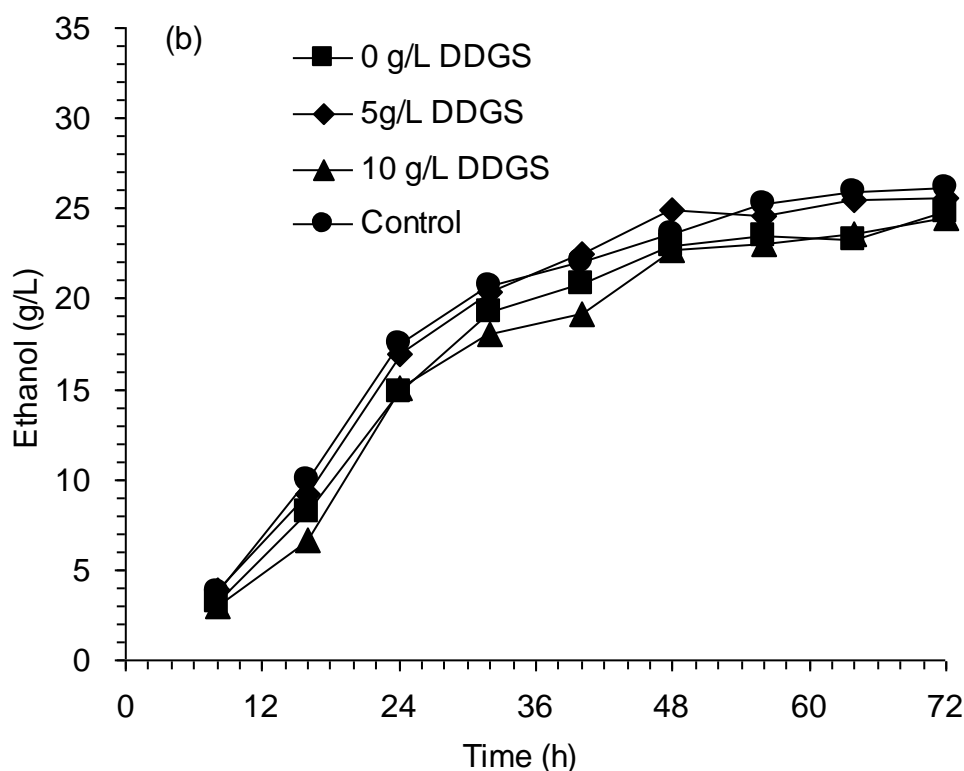


图 3.7 外部营养添加对 40 °C 直接同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆的影响

Fig. 3.7 Effect of external nutrients supplementation on SSF of dilute acid pretreated corn stover at 40 °C 实验在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行, 工作体积 2.5 L, 固含量 20% (w/w), 纤维素酶用量 5 FPU/g DM, 发酵温度 40 °C, 转速 150 rpm, 过程 pH 5.0。without, 不添加任何外部营养; 5, 10 g/L DDGS, 分别只添加 5, 10 g/L DDGS, 没有其他营养物添加; control, 添加基本营养物。纤维素酶, 酵母种子在 0 时刻加入, 玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入, 8 h 内补加完毕, 取样, 发酵过程的葡萄糖 (a) 和乙醇 (b)。玉米秸秆稀酸预处理的条件: 190 °C, 3 min, 2.5% H₂SO₄。

养发酵的消耗速度较快, 没有添加任何营养的消耗相对较慢, 但是葡萄糖消耗速度略有差异, 发酵后期葡萄糖都有 1g/L 的积累。乙醇的生成 (图 3.7 (b)) 在发酵过程中浓度变化略有差异, 但最终乙醇浓度几乎一致, 结果表明 DDGS 营养的添加有助于酵母的生长, 同时在不添加任何营养的情况下, *S. cerevisiae* DQ1 40 °C 同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆能够正常进行。表 3.2 对比了不同营养或营养组合添加的 40 °C 同步糖化与发酵的稀酸预处理的玉米秸秆的结果。添加不同营养成分, 与不添加任何营养的同步糖化与发酵相比, 乙醇发酵得率 54~57.3%, 乙醇终浓度 24.5~26.2 g/L, 表明不同营养组合对发酵结果没有显著影响; 发酵终止时残留葡萄糖浓度在 0.93~2.37 g/L, 表明不同营养添加也没能够消除葡萄糖积累。结果表明营养物不是限制发酵的最主要的限制因素, 影响高温发酵另有其他关键性因素, 这一结果与其它提高营养添加同步糖化与发酵的结果类似^[64, 77], 即随着发酵进行发酵微生物失活, 残糖积累增加。尽管有些报道认为提高营养有助于在纤维素或水解液中发酵^[145, 148], 不同的结论可能是发酵微生物和发酵条件差异所致。一般认为稀酸预处理物料营养贫乏, 必须添加外源营养才能够正常发酵

[108]，但是本实验在不添加外部营养的条件能够在 40 °C，较高固含量（20%）实现同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆，能够与不添加营养发酵的氨气爆破预处理^[149]以及亚硫酸盐预处理^[150]工艺相比。本实验能够实现无外部营养添加同步糖化与发酵可能是由于 *S. cerevisiae* DQ1 本身具有很好的耐受性和适应性，微生物经过梯度浓度的水解液多级驯化培养，使其更好的适应了木质纤维素体系发酵^[122, 87, 151]；玉米秸秆在生长中不仅合成了碳水化合物，也从土壤中富集了氮，钾以及其他微量元素^[109]，这些营养在预处理中得到释放和一定程度保存，可被微生物利用；接种的种子液里可能带入的微量外部营养。发酵的营养添加在大规模发酵中也占有较大的成本^[81, 152]，如果能够实现低营养或不添加外部营养则能够进一步提高纤维乙醇生产优势。例如，美国可再生能源实验室在设计稀酸预处理秸秆乙醇工艺示范时，营养就选择较廉价的玉米浆，同时也希望寻找更加廉价的替代品，以满足大规模需求^[135]，比如添加玉米酒糟（DDGS）^[147, 153]。

表 3.2 添加不同营养物 40 °C 同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆结果的对比

Table 3.2 Comparison of various nutrients addition on SSF of dilute acid pretreated corn stover at 40 °C

发酵参数	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/L) ^a				Yeast extract (g/L) ^b		DDGS (g/L) ^c			DDGS (g/L) ^d		w/o ^e
	5	2	1	0	1	0	12.5	10	5	10	5	-
Final ethanol (g/L)	25.9	26.0	26.2	26.0	26.2	24.5	25.5	25.8	24.9	24.5	25.6	24.9
Residual glucose (g/L)	2.37	1.30	1.27	1.03	1.27	1.48	0.93	1.35	1.67	1.08	1.12	1.47
Ethanol yield (%)	57.3	57.2	56.8	57.3	56.8	54.0	56.1	56.6	54.8	54.7	56.1	54.5

实验在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，固含量 20% (w/w)，纤维素酶用量 5 FPU/g DM，发酵温度 40 °C，转速 150 rpm，过程 pH 5.0。^a添加 (NH₄)₂SO₄ 0, 1, 2, 5 g/L 到发酵罐中，其他基本营养物不变；^bYeast extract，酵母粉添加 0, 1 g/L 到发酵罐，其他基本营养保持不变；^c添加 5, 10, 12.5 g/L DDGS 到发酵罐，其他基本营养保持不变；^d只添加 5, 10 g/L DDGS，没有其他营养物添加；^ew/o, without，不添加任何营养物。纤维素酶，酵母种子在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，取样，发酵过程的葡萄糖 (a) 和乙醇 (b)。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。Final ethanol，最终乙醇浓度；Residual glucose，发酵 72 h 残留葡萄糖；Ethanol yield，基于预处理后玉米秸秆中纤维素的乙醇得率。

3.3.7 直接同步糖化与发酵和三步同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆

前面几组实验表明尽管酵母 *S.cerevsiae* DQ1 能够直接高温同步糖化与发酵稀酸预处理秸秆，但是在提高固含量和纤维素酶用量条件下，发酵缓慢甚至不能够发酵，这一现象的本质在于微生物在高温下生长能力减弱，从而不能够抵抗纤维素酶、抑制物以及

体系环境的影响。如图 3.8 所示，我们提出两种发酵模式：直接（一步）-同步糖化与发酵（图 3.8 (a)）与三步-同步糖化与发酵（图 3.8 (b)），前述几组实验采用的就是 40 °C 直接同步糖化与发酵模式（图 3.8 (a)）。两种发酵模式差异主要在于直接同步糖化与发酵的整个过程发酵温度维持不变，而三步同步糖化与发酵模式包括 50 °C 预酶解 12 h，35 °C 中温同步糖化与发酵 24 h，以及 36 h 高温同步糖化与发酵。在升高固含量（20%，25%，30%）的条件下，对比两种发酵模式同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆，结果如图 3.9 所示。

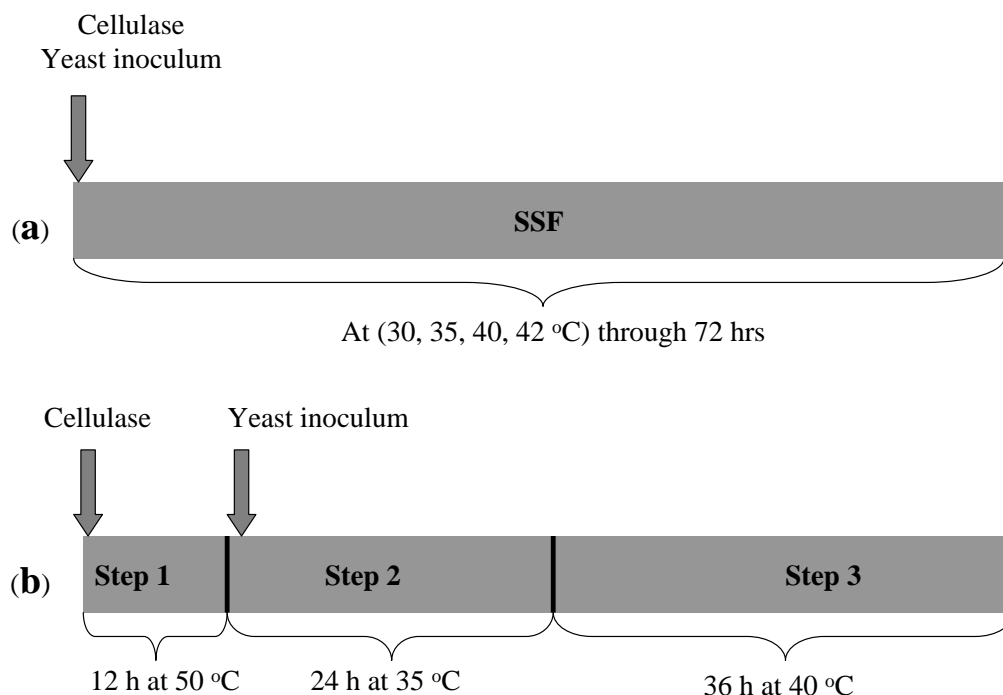


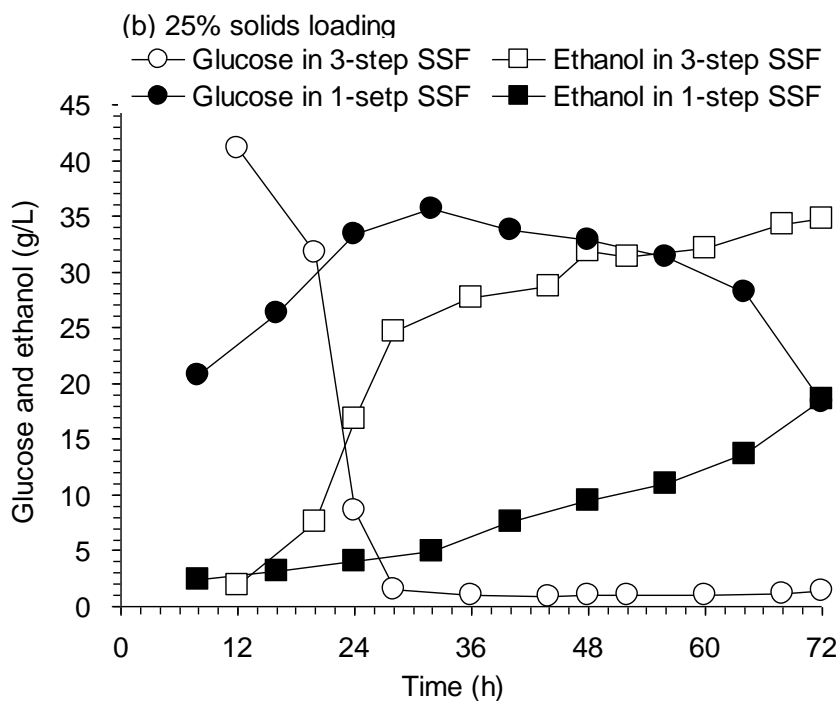
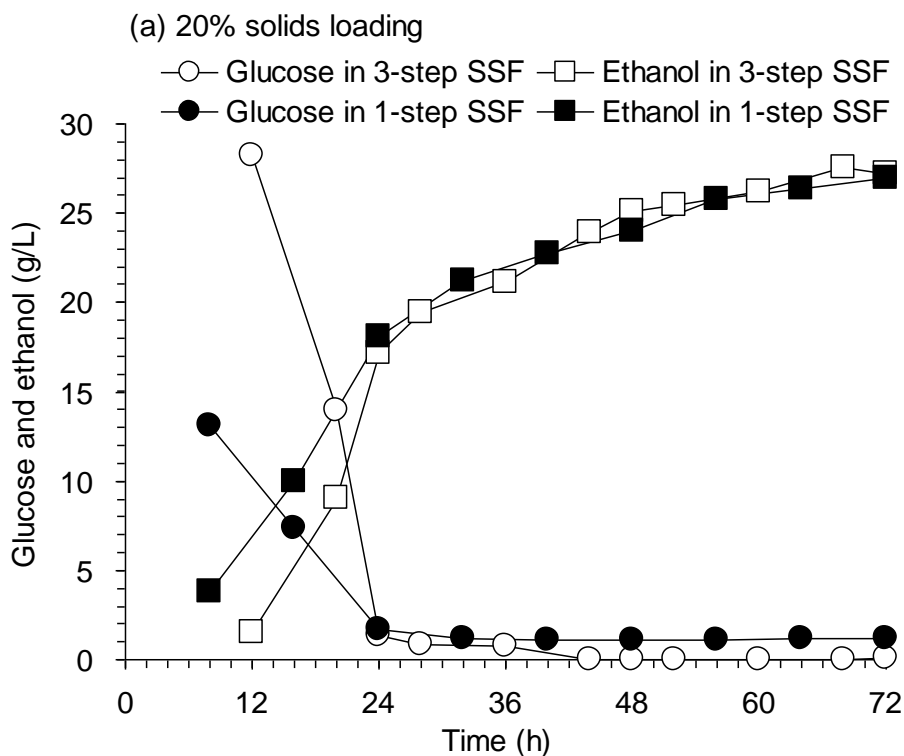
图 3.8 直接同步糖化与发酵 (a) 和三步同步糖化与发酵 (b) 的示意图

Fig. 3.8 Schematic diagram of direct SSF(a) and three-step SSF (b)

Step 1, 预酶解; SSF (**Step 2**), 第一阶段同步糖化与发酵; SSF (**Step 3**), 第二阶段同步糖化与发酵

图 3.9 明显地表明当提高同步糖化与发酵体系中固含量（20%，25%，30%），直接同步糖化与发酵模式不能够正常进行的 25 % 和 30% 固含量，采用三步同步糖化与发酵模式就能够比较完好的进行发酵。在 20% 秸秆固含量时（图 3.9 (a)），直接同步糖化与发酵模式 0 时刻就开始发酵，葡萄糖浓度低于三步同步糖化与发酵模式，故在 24 h 内乙醇浓度高于三步发酵模式；三步发酵模式预糖化 12 h 后，葡萄糖浓度 28 g/L，接种酵母后 12 h 后葡萄糖接近 1 g/L，表明在 35 °C 酵母能够迅速代谢葡萄糖。在 24 h 之后，这两种发酵模式生成的乙醇变化规律一样，但是发酵终止时，葡萄糖在三步同步糖化与发酵模式中没有残留。在 25% 固含量（图 3.9 (b)）条件下，直接同步糖化与发酵模式尽管能够启动发酵，但是发酵速率缓慢，导致发酵过程葡萄糖积累，发酵终止时，残留葡萄糖 18 g/L，而三步发酵模式 50 °C 在预糖化 12 h，水解生成葡萄糖 41 g/L，同样在接种 12 h 内酵母迅速消耗葡萄糖到 1 g/L，之后葡萄糖浓度保持在 1 g/L。在三步-同步糖

化与发酵模式中的第三步 40 °C，乙醇浓度依然能够增加，说明变温后发酵活性仍然存在，但发酵后期葡萄糖残留略有上升至 2 g/L，乙醇浓度 35 g/L。在 30% 固含量 ((图 3.9 (c))), 40 °C 直接同步糖化与发酵模式，发酵不能够启动，随着水解进行葡萄糖持续积累。三步同步糖化与发酵的模式，在 30 % 固含量能够正常进行，在 50 °C 酶解 12 h，葡



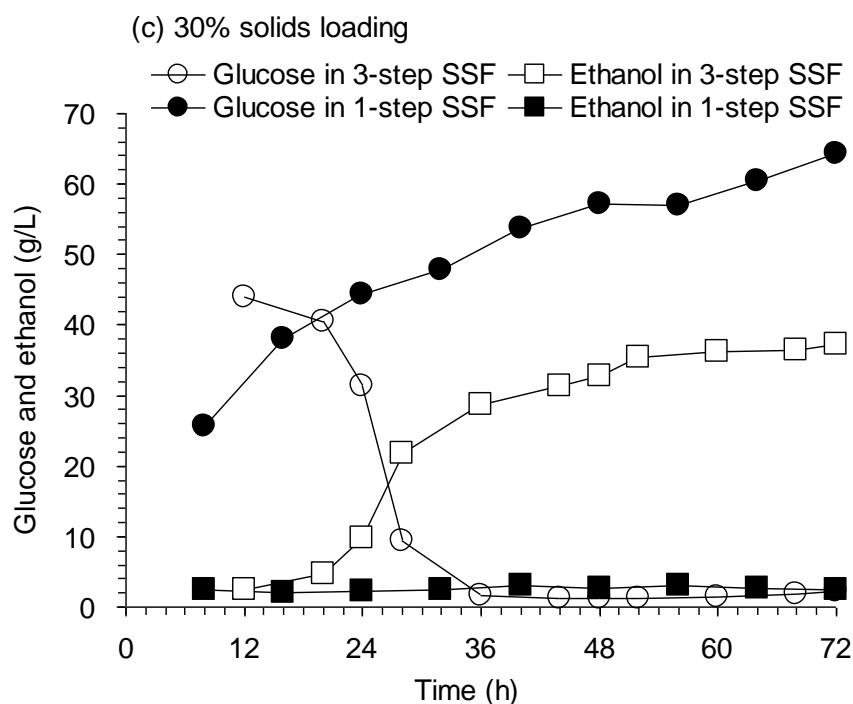


图 3.9 在不同固含量对比直接（一步）同步糖化和三步-同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆

Fig. 3.9 Comparison of one-step SSF and three-step SSF of dilute acid pretreated corn stover at various solids loading

1-step SSF, 一步 40 °C 同步糖化与发酵; 3-step SSF, 三步同步糖化与发酵, 50 °C 预酶解 12 h, 35 °C 发酵 24 h, 40 °C 发酵 36 h。实验在有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行, 工作体积 2.5 L, 纤维素酶用量 5 FPU/g DM, 转速 150 rpm, 过程 pH 5.0, 固含量分别为 (a) 20%, (b) 25%, (c) 30% (w/w)。直接 40 °C 同步糖化与发酵时, 纤维素酶和酵母种子在 0 时刻加入, 玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入, 8 h 内补加完毕后取样。用两步同步糖化与发酵模式时, 纤维素酶在 0 时刻加入, 玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入, 8 h 内补加完毕, 水解至 12 h, 降低温度至 35 °C 加入酵母种子, 然后取样。玉米秸秆稀酸预处理的条件: 190 °C, 3 min, 2.5% H₂SO₄。

葡萄糖 42 g/L, 接种后 36 h 葡萄糖消耗到 1 g/L, 而在接种后 12 h 内葡萄糖仍积累 30 g/L, 相比 25% 固含量, 葡萄糖消耗明显变慢。在发酵过程的第三步, 残留葡萄糖浓度仍然会增加, 而乙醇浓度增加不明显。实验结果表明, 发酵操作模式能够显著影响微生物的发酵行为, 在评价微生物的发酵能力, 特别是利用预处理木质纤维素为基质发酵时, 必须采用真实的原料以及符合实际应用的发酵条件来测试。相比直接高温发酵, 变温发酵有几个优点: 酶水解纤维素, 初始水解速度快, 短时间预糖化能够发挥纤维酶活性, 在生成葡萄糖的同时迅速降低体系黏度, 为微生物生长创造较好的传质体系; 中温酵母生长能力强, 能够迅速转化抑制物, 有利于后续发酵; 后期升温可以兼顾纤维素水解和酵母能够承受的温度。当发酵温度从 35 °C 升高到 40 °C, 在 YPD 培养基中可以看出生长能力降低 30%, 但是在木质纤维素环境中可能降低的更多, 这种程度的生长能力降低就能够导致发酵的不能进行, 因此在高温纤维素乙醇发酵中, 需要的微生物应该有更加宽泛

的温度范围和耐受性。

3.3.8 三步同步糖化与发酵与常规同步糖化与发酵稀酸预处理玉米秸秆

木质纤维素原料首先在 50 °C 预酶解，再接入微生物同步糖化与发酵是比较常见的同步糖化与发酵^[124, 154]模式。图 3.10 (a) 传统发酵模式与三步同步糖化与发酵模式 (图 3.10 (b))，这两种发酵模式都包括 50 °C 预糖化 12 h，35 °C 同步糖化与发酵 24 h，只是在发酵后期的 36 h 同步糖化与发酵中，常规同步糖化与发酵模式保持在 35 °C，而三步同步糖化与发酵模式的发酵温度提高到 40 °C，以考察升温对发酵行为的影响。提高固含量 (20%，25%，30%)，对比常规同步糖化与发酵和三步同步糖化与发酵稀酸预处

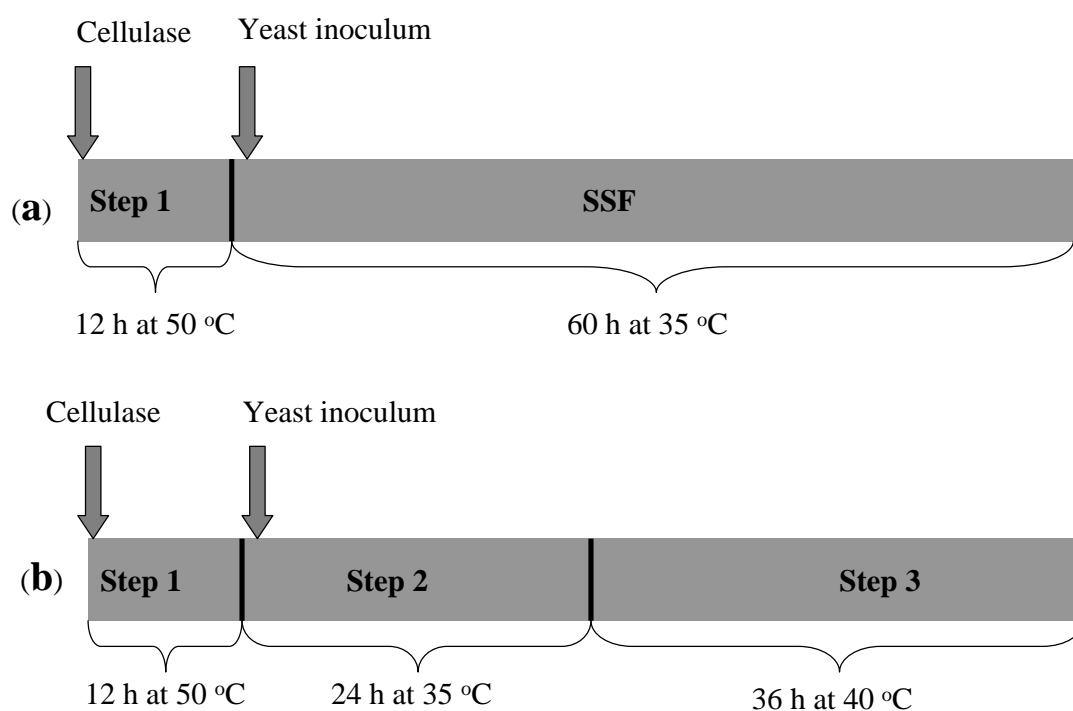
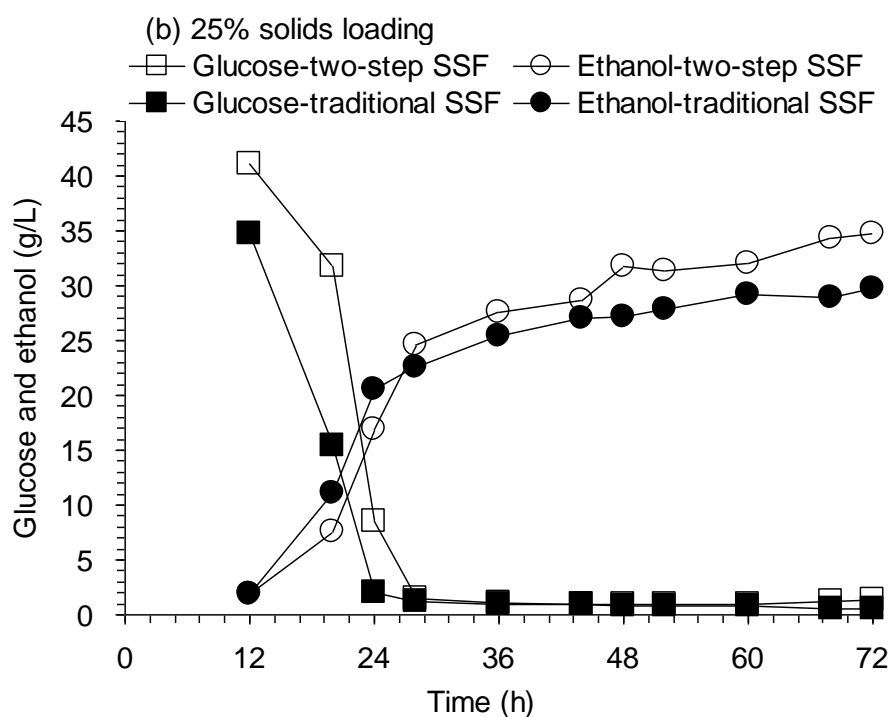
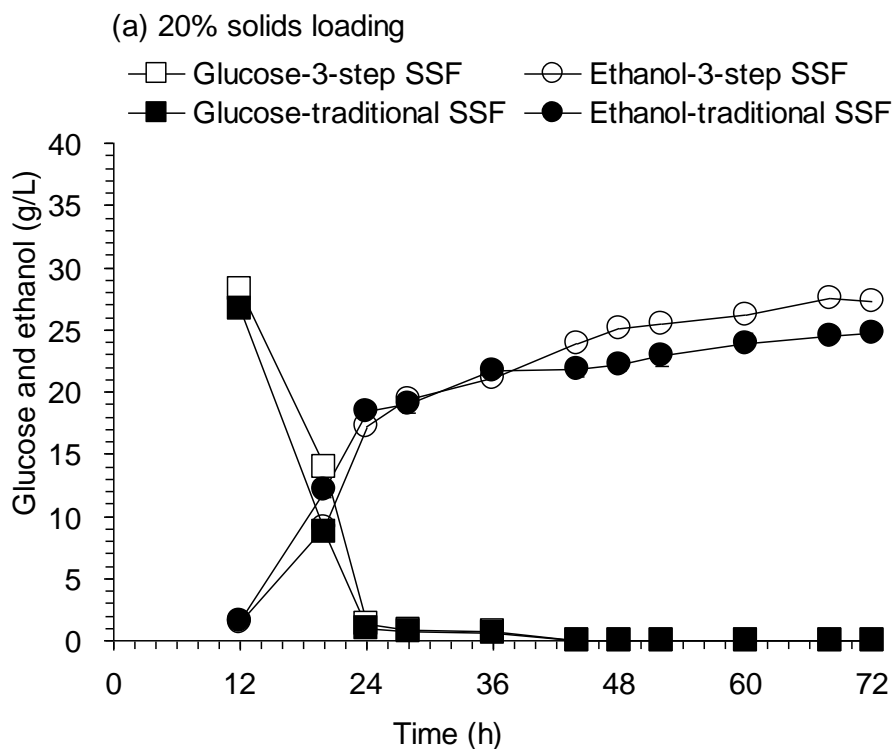


图 3.10 传统同步糖化与发酵 (a) 和三步同步糖化与发酵 (b) 的示意图

Fig. 3.10 Schematic diagram of traditional SSF (a) and three-step SSF (b)

Step 1, 预酶解; SSF (**Step 2**) 和 SSF (**Step 3**) 分别表示第一阶段和第二阶段同步糖化与发酵的玉米秸秆生产乙醇, 结果如图 3.11, 表明在不同固含量 (20%, 25%, 30% (w/w)) 发酵条件下, 常规同步糖化与发酵和三步-同步糖化与发酵模式都能够正常进行发酵, 只是在变温发酵 (**Step 3**) 阶段, 乙醇的生成规律和残留葡萄糖程度略有差异。在 20% 秸秆固含量时 (图 3.11 (a)), 常规模式与三步同步糖化与发酵模式 50 °C 预糖化 12 h 后葡萄糖 27 g/L, 然后接种酵母, 发酵 12 h 葡萄糖迅速消耗至 1 g/L, 表明在 35 °C 酵母能够迅速代谢葡萄糖; 在后期 36 h 发酵中, 采用三步同步糖化与发酵模式生成乙醇浓度高于常规模式, 而且两种模式中都没有残留葡萄糖。在 25% 固含量 (图 3.11 (b)) 条件下, 常规同步糖化与发酵模式和三步同步糖化与发酵模式 50 °C 预糖化 12 h, 然后接种发酵 12 h 后酵母迅速消耗葡萄糖。在两种发酵模式的后期, 乙醇持续能够增加, 三步同步糖化与发酵模式的乙醇浓度略高于常规发酵模式, 但发酵后期三步同步发酵模式葡萄糖残留在 2 g/L, 常规发酵模式则没有葡萄糖残留。在 30% 固含量 ((图 3.11 (c)) 条

件，常规同步糖化与发酵和两步同步糖化与发酵模式能够正常实现同步糖化与发酵，两种模式在 50 °C 酶解 12 h，葡萄糖 45 g/L，接种酵母后 36 h，葡萄糖消耗至 1 g/L。在发酵后期 36 h，两种模式发酵生成的乙醇浓度几乎都是 36 g/L，只是相比于三步同步糖化与发酵模式，常规发酵模式最后没有残留葡萄糖。在三个固含量条件下，当同步糖化与发酵温度一直维持在 35 °C 时，发酵中止时都没有残留葡萄糖，说明酵母在这个发酵温



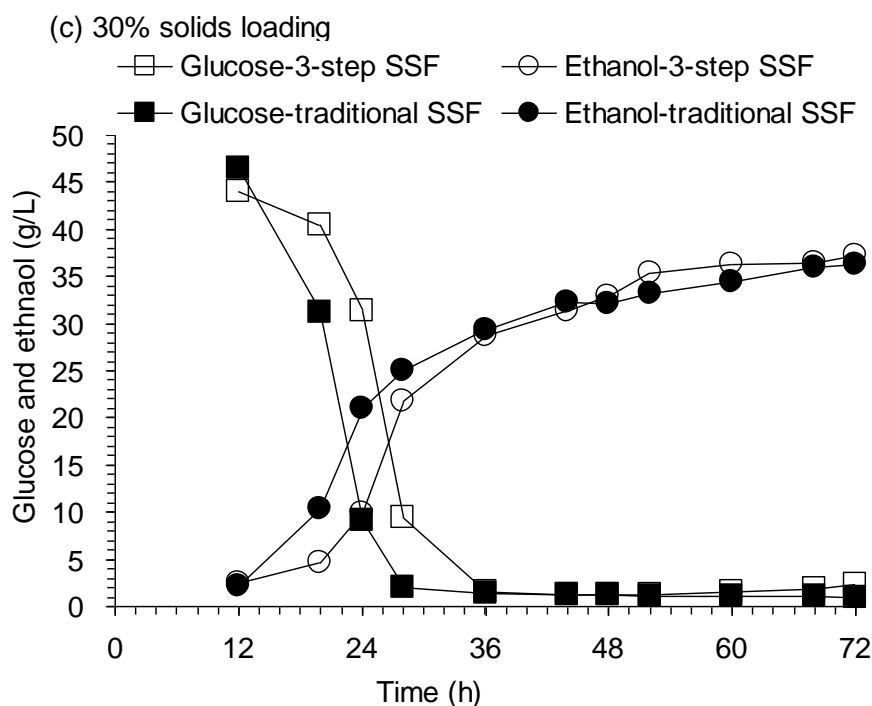


图 3.11 不同固含量对比传统和三步同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆

Fig. 3.11 Comparison of traditional SSF and three-step SSF of dilute acid pretreated corn stover at various solid loadings

traditional SSF, 50 °C 预酶解 12 h, 35 °C 发酵 60 h; 3-step SSF, 三同步糖化与发酵, 50 °C 预酶解 12 h, 35 °C 发酵 24 h, 40 °C 发酵 36 h。实验在有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行, 工作体积 2.5 L, 纤维素酶用量 5 FPU/g DM, 搅拌转速 150 rpm, 过程 pH 5.0, 固含量分别为 (a) 20%, (b) 25%, (c) 30% (w/w)。传统同步糖化与发酵实验时, 纤维素酶在 0 时刻加入, 玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入, 8 h 内补加完毕, 水解至 12 h, 降低温度至 35 °C 加入酵母种子。用两步同步糖化与发酵模式时, 纤维素酶在 0 时刻加入, 玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入, 8 h 内补加完毕, 水解至 12 h, 降低温度至 35 °C 加入酵母种子, 然后取样。玉米秸秆稀酸预处理的条件: 190 °C, 3 min, 2.5% H₂SO₄。

度一直都保有较高的生存能力, 使得水解生成的葡萄糖能够被迅速代谢。然而, 当第三步同步糖化与发酵温度提高至 40 °C, 只有 20% 固含量时, 发酵最后没有残留葡萄糖; 在 25% 和 30% 固含量, 残留葡萄糖浓度随着升高, 至少说明发酵后期升温导致了酵母活性降低, 同时也在于温度升高水解带来的更多葡萄糖的生成。总体来看, 变温发酵相比传统发酵较好, 除了具有高温发酵所带来的节约冷却水和下游分离操作能量^[16]外, 从纤维素到乙醇和葡萄糖的总体转化来看, 变温模式的纤维素转化率更高, 如果能够实现残留葡萄糖的转化, 可进一步提高乙醇浓度。

3.3.9 纤维素酶用量对变温同步糖化与发酵 30% 固含量稀酸预处理的玉米秸秆的影响

在发酵体系固含量 30% (w/w) 条件下, 采用三步同步糖化与发酵模式, 提高纤维素酶用量从 5 FPU/g DM 到 15 FPU/g DM, 考察纤维素酶用量对微生物发酵行为的影响,

发酵过程葡萄糖变化和乙醇生成如图 3.12 所示。随着纤维素酶用量的增加，玉米秸秆预水解 12 h 时生成的葡萄糖浓度，从 41 g/L (5 FPU/g DM) 增加至 54 g/L (10 FPU/g DM)，在 12.5 FPU/g DM 和 15 FPU/g DM 酶用量生成的葡萄糖浓度均为 68 g/L (图 3.12 (a))。随着纤维素酶用量的增加，酶解积累的葡萄糖消耗速率减慢，在 36 h 时，纤维素酶量 5 FPU/g DM 和 10 FPU/g DM 条件下葡萄糖消耗至 1 g/L 左右，12.5 FPU/g DM 需要 48 h 才能达到 1 g/L，15 FPU/g DM 条件葡萄糖消耗最慢，消耗最低至 5 g/L 之后浓度又开始

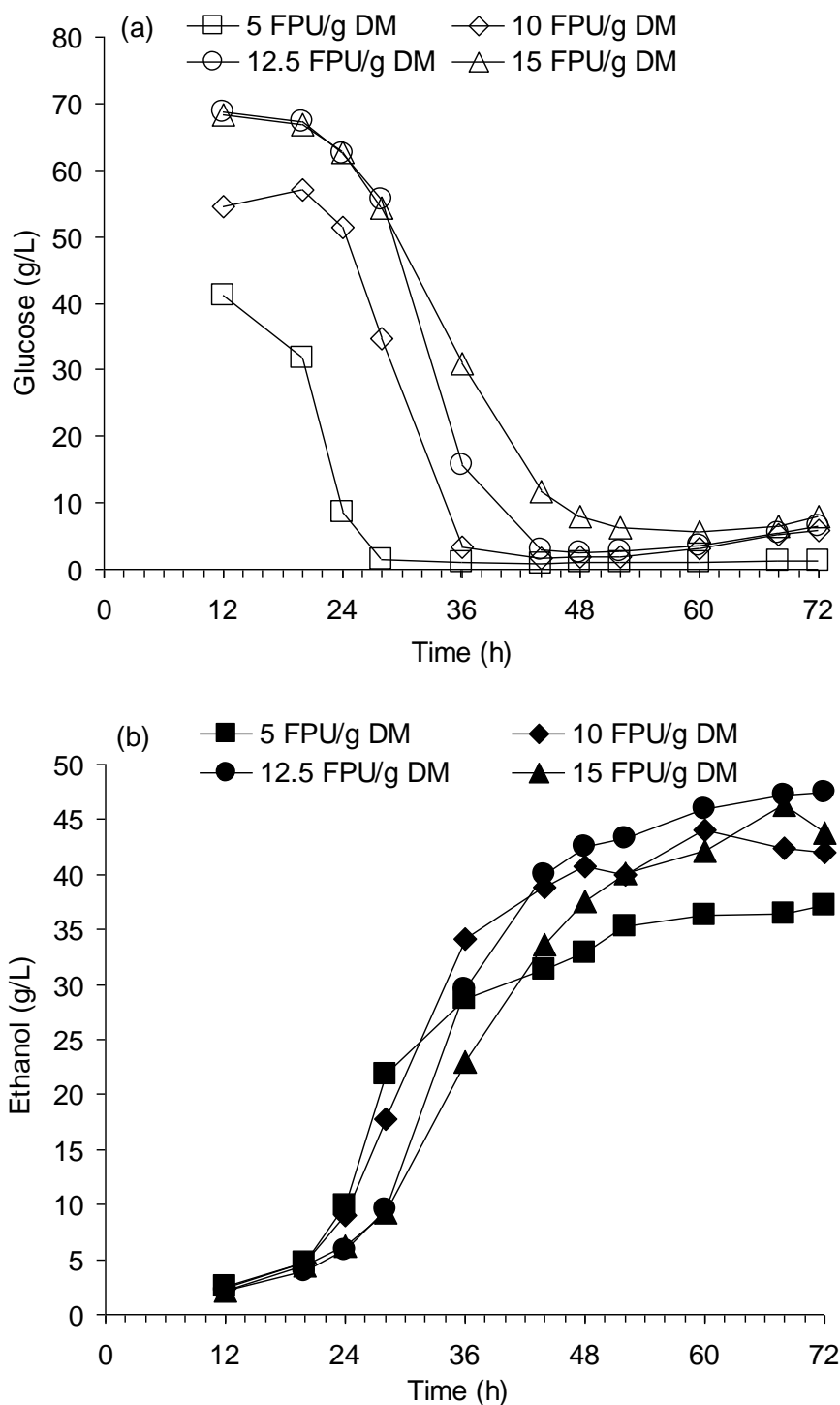


图 3.12 纤维素酶用量对变温同步糖化与发酵 30%固含量稀酸预处理玉米秸秆的影响

Fig. 3.12 Effect of cellulase loadings on 3-step SSF of the dilute acid pretreated corn stover at 30% solid loadings

实验在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，固含量 30% (w/w)，纤维素酶用量分别是 5, 10, 12.5, 15 FPU/g DM，转速 150 rpm，过程 pH 5.0。采用三步变温同步糖化与发酵模式时，纤维素酶在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，水解至 12 h，降低温度至 35℃加入酵母种子，然后取样，发酵过程中葡萄糖的变化 (a) 和乙醇的生成 (b)。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。

增加。同步糖化与发酵终了时，用量的范围从 5 FPU/g DM 到 15 FPU/g DM，考察纤维素酶用量对发酵行为的影响，发酵过程葡萄糖变化和乙醇生成如图 3.12 所示。随着纤维素酶用量的增加，玉米秸秆预水解 12 h 时生成的葡萄糖浓度，从 41 g/L (5 FPU/g DM) 增加至 54 g/L (10 FPU/g DM)，在 12.5FPU/g DM 和 15 FPU/g DM 酶用量生成的葡萄糖浓度均为 68 g/L (图 3.12 (a))。随着酶用量的增加，酶解积累的葡萄糖消耗速率减慢，在 36 h 时，5 FPU/g DM 和 10 FPU/g DM 条件的积累的葡萄糖消耗至 1 g/L 以下，纤维素酶 12.5 FPU/g DM 需要 48 h 才能达到 1 g/L，15 FPU/g DM 条件葡萄糖消耗最慢，消耗最低至 5 g/L 之后浓度又开始增加。同步糖化与发酵终了时，残留葡萄糖浓度随着纤维酶用量增加而升高，5 FPU/g DM 在 1 g/L，另三个酶用量条件残留葡萄糖都在 6-8 g/L。乙醇的生成和葡萄糖的消耗对应 (图 3.12 (b))，在接种酵母后，纤维素酶用量 5 FPU/g DM 条件乙醇生成速率最快，发酵 28 h 内，5 FPU/g DM 条件生成的乙醇浓度高于其他三个纤维素酶用量条件，而之后 10 FPU/g DM 纤维素酶生成的乙醇高于另外 12.5FPU/g DM 和 15 FPU/g DM 纤维酶用量。在发酵 36 h 后，5 FPU/g DM 酶用量的条件生成乙醇浓度 (35 g/L) 明显低于其他三个酶用量，12.5 FPU/g DM 酶用量乙醇浓度最高达 48 g/L。结果表明在当前稀酸预处理条件玉米秸秆，提高发酵体系的固含量，需要提高纤维素酶量，但并非纤维素酶量越高越好。在 30% 固含量，5 FPU/g DM 纤维素酶用量明显偏低，而 10-15FPU/g DM 水解差异就不大，限制纤维素转化的因素较多比如纤维素来源，纤维素预处理程度，酶的组成和稳定性等^[8, 28, 155]，纤维素酶用量只是其中之一。发酵残留葡萄糖浓度随着纤维素酶用量的增加而升高，可能是由于酶用量增加水解出了更多的葡萄糖，另一方面纤维素酶用量提高，酵母生存能力减低，消耗葡萄糖的能力降低。

一次水洗后的稀酸预处理玉米秸秆仍然含有可溶性物质，主要包括的抑制物是乙酸，5-羟甲基糠醛和糠醛等，随着发酵体系固含量的增加会逐步积累。在 30% 固含量下，抑制物积累变得明显。酿酒酵母能够在一定条件下转化 5-羟甲基糠醛和糠醛^[87, 88]，乙酸虽然不能被转化，但是酵母能够耐受比较高的乙酸浓度。在 30% 固含量体系中，不同纤维素酶用量下，5-羟甲基糠醛和糠醛的转化如图 3.12 所示。发酵体系中 5-羟甲基糠醛和糠醛初始浓度分别在 0.20-0.25 g/L，0.5-0.6 g/L。从代谢启动上看，酵母代谢这两种物质是同步的，但是糠醛代谢比 5-羟甲基糠醛明显要快，糠醛在不同纤维素酶量下接种 8 h 几乎代谢完毕，说明酵母不同抑制物响应差异较大。相比之下，5-羟甲基糠醛在 24 h 内没能够完全转化，特别是在纤维素酶用量较高的情况，延滞效果更加明显。随着酶用量

的增加，抑制物代谢变慢，这一点在 5-羟甲基糠醛上表现更明显。另外，抑制物的代谢

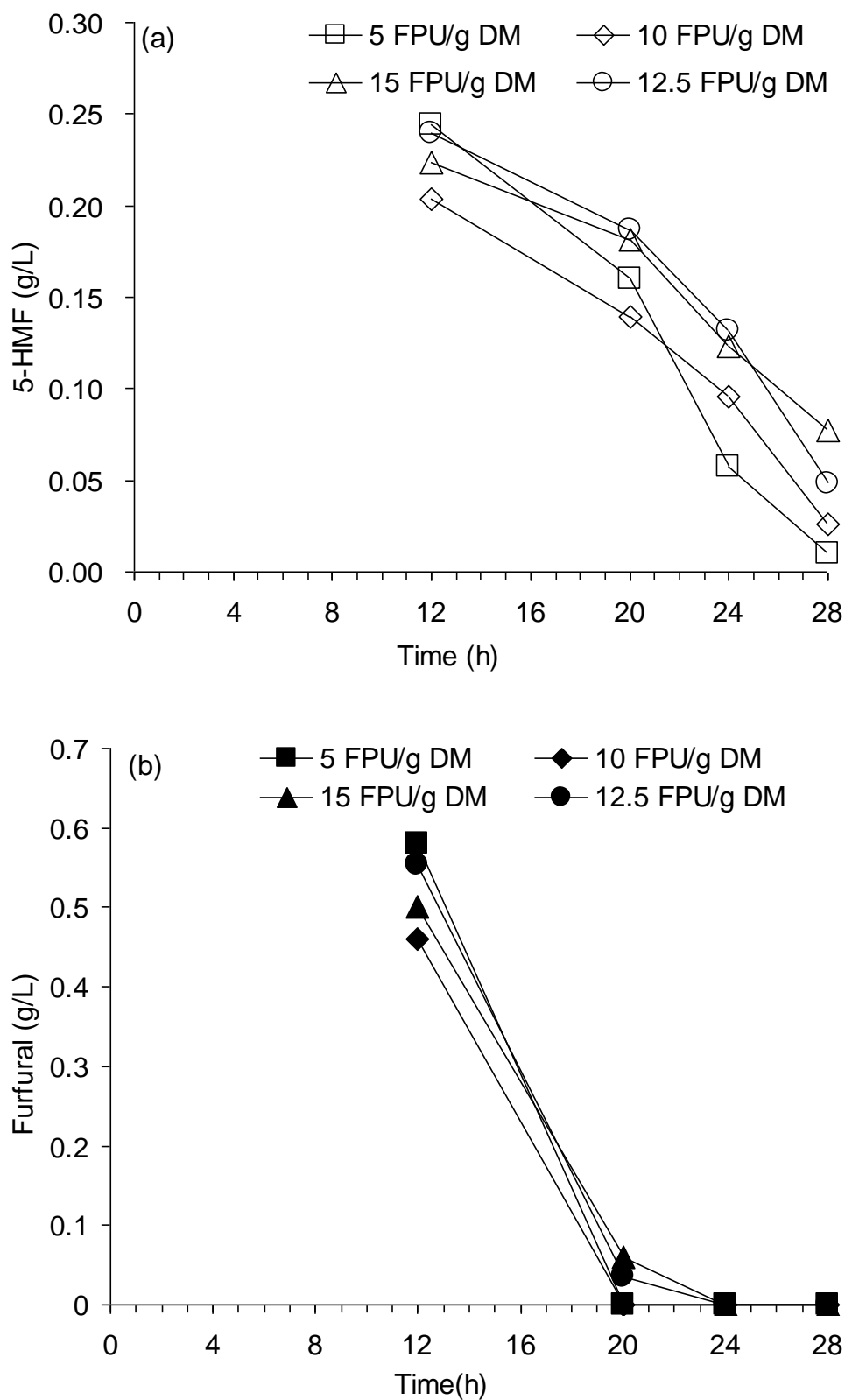


图 3.13 三步同步糖化与发酵 30%固含量稀酸预处理的玉米秸秆中 5-羟甲基糠醛 (a) 和糠醛 (b) 变化

Fig. 3.13 Conversion of 5-HMF (a) and furfural (b) in the two-step SSF of dilute acid pretreated corn

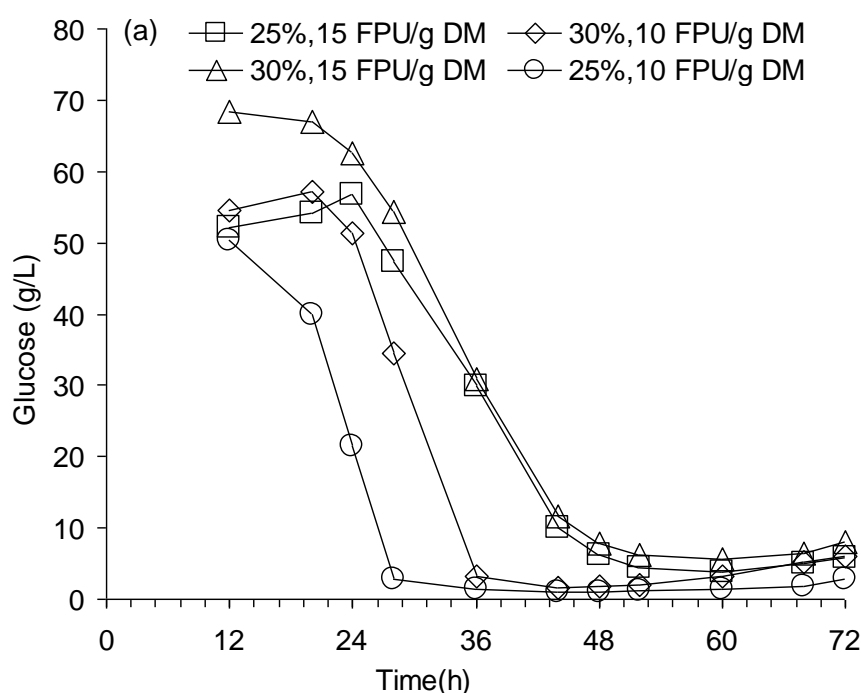
stover at 30% solid loadings

5-HMF, 5-羟甲基糠醛; Furfural, 糠醛。实验在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行, 工作体积 2.5 L, 发酵实验纤维素酶用量分别是 5, 10, 12.5, 15 FPU/g DM, 转速 150 rpm, 过程 pH 5.0。采用两步同步糖化与发酵模式时, 纤维素酶在 0 时刻加入, 玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入, 8 h 内补加完毕, 水解至 12 h, 降低温度至 35 °C 加入酵母种子, 然后取样 (12, 20, 24, 28 h) 分析 5-羟甲基糠醛和糠醛浓度。

和葡萄糖的消耗相关联, 只有当抑制物代谢完毕后, 葡萄糖消耗最快。不同的酵母耐受性差异大, 在高固含量, 多种抑制物并存的环境中, 酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 具有强的在位脱毒能力, 是一株生存能力强的微生物, 适合于含有一定程度抑制物的一次水洗稀酸预处理物料的发醇。

3.3.10 比较固含量提高和纤维酶用量增加对同步糖化与发酵影响

为了比较发酵固含量提高与纤维素酶用量增加, 对同步糖化与发酵的影响的轻重, 分别在两个固含量下提高酶用量, 发酵结果如图 3.14。如图 3.14 (a) 所示, 在 50 °C 初始预水解 12 h, 25% 固含量在 10 FPU/g DM 和 15 FPU/g DM 酶用量, 与 30% 固含量, 10 FPU/g DM 水解生成的葡萄糖浓度在 53 g/L; 只有在 30% 固含量, 15 FPU/g DM 水解生成的葡萄糖达 68 g/L。25%, 15 FPU/g DM 条件与 30%, 10 FPU/g DM 相比, 尽管初始水解生成葡萄糖浓度相似, 纤维素酶用量提高到 15 FPU/g DM, 葡萄糖代谢相对相比较慢。各个实验条件, 发酵终止时, 葡萄糖的积累随着固含量和纤维素酶量增加而增加。从乙醇的生成上看 (图 3.14 (b)), 最终浓度依赖于发酵体系固含量, 无论用酶量是 10 或 15 FPU/g DM, 可以分成两个水平。从发酵速度上看, 固含量低, 酶用量低的条件, 乙醇生产速率快。因此在选择固含量和纤维素酶量时要综合考虑乙醇浓度和转化率。



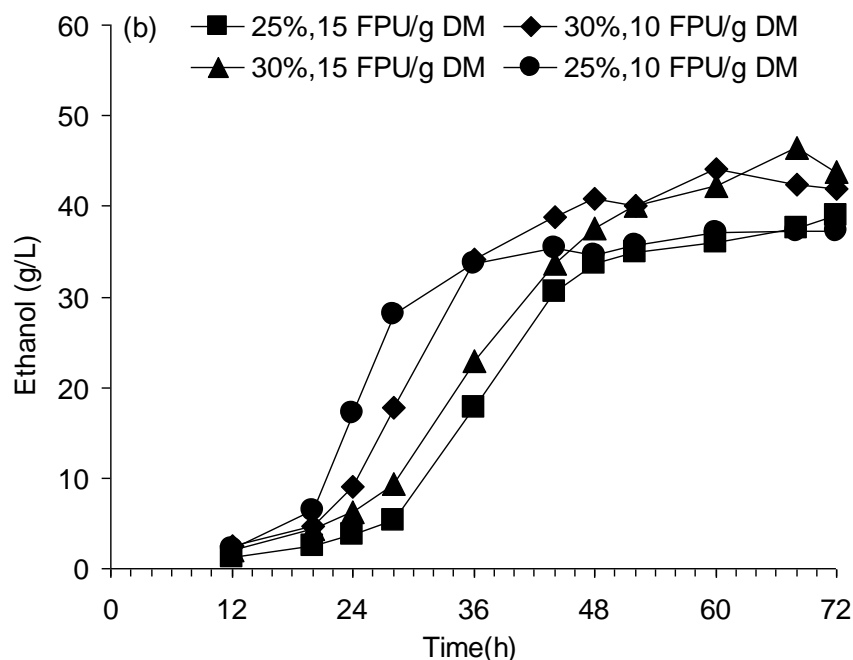


图 3.14 纤维素酶用量对三步同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆增加固含量的影响

Fig. 3.14 Effect of cellulase loadings on three-step SSF of the dilute acid pretreated corn stover at increased solids loadings

实验在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，固含量 25%，30% (w/w)，纤维素酶用量分别是 10，15 FPU/g DM，转速 150 rpm，过程 pH 5.0。采用两步同步糖化与发酵模式时，纤维素酶在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，水解至 12 h，降低温度至 35 °C 加入酵母种子，然后取样，发酵过程葡萄糖变化 (a) 和乙醇的生成 (b)。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。

3.3.11 高温直接同步糖化与发酵生物脱毒处理物料

以生物脱毒原料为基质，在 25% 固含量条件，随着酶用量增加，同步糖化与发酵的结果如图 3.15 所示。50 °C 水解 10 h，5 FPU/g DM 酶用量葡萄糖浓度只有 12 g/L，而 10 FPU/g DM 酶用量生成 20 g/L，与酶用量升高至 15 FPU/g DM 水解生成的糖一样。在 5 和 10 FPU/g DM 酶用量条件，葡萄糖能够迅速消耗，但是酶用量升高到 15 FPU/g DM，葡萄糖消耗变得非常缓慢，发酵后期残留葡萄糖随着酶用量增加而升高 (图 3.15 (a))。在 10 FPU/g DM 酶用量生成的乙醇浓度最高达 27 g/L，而在 15 FPU/g DM 条件乙醇生产呈直线缓慢增加，乙醇最终浓度不到 10 g/L。霉菌固态培养脱毒能够除去原料中的多种抑制物包括糠醛，5-羟甲基糠醛和乙酸等^[131]，以及其他包含在原料中的预处理所产生的物质。在生物脱毒物料作为基质用于在高温下乙醇的发酵时，随着纤维素酶用量的增加，发酵后期仍有葡萄糖残留，说明酿酒酵母的发酵活性依然受到抑制，这与一次水洗脱毒处理的秸秆作为发酵原料的现象相似，说明在高温条件下，即使发酵原料中没有预处理所形成的抑制物存在，纤维素酶的浓度的确能够影响微生物生存，从而导致发酵不能够正常进行。

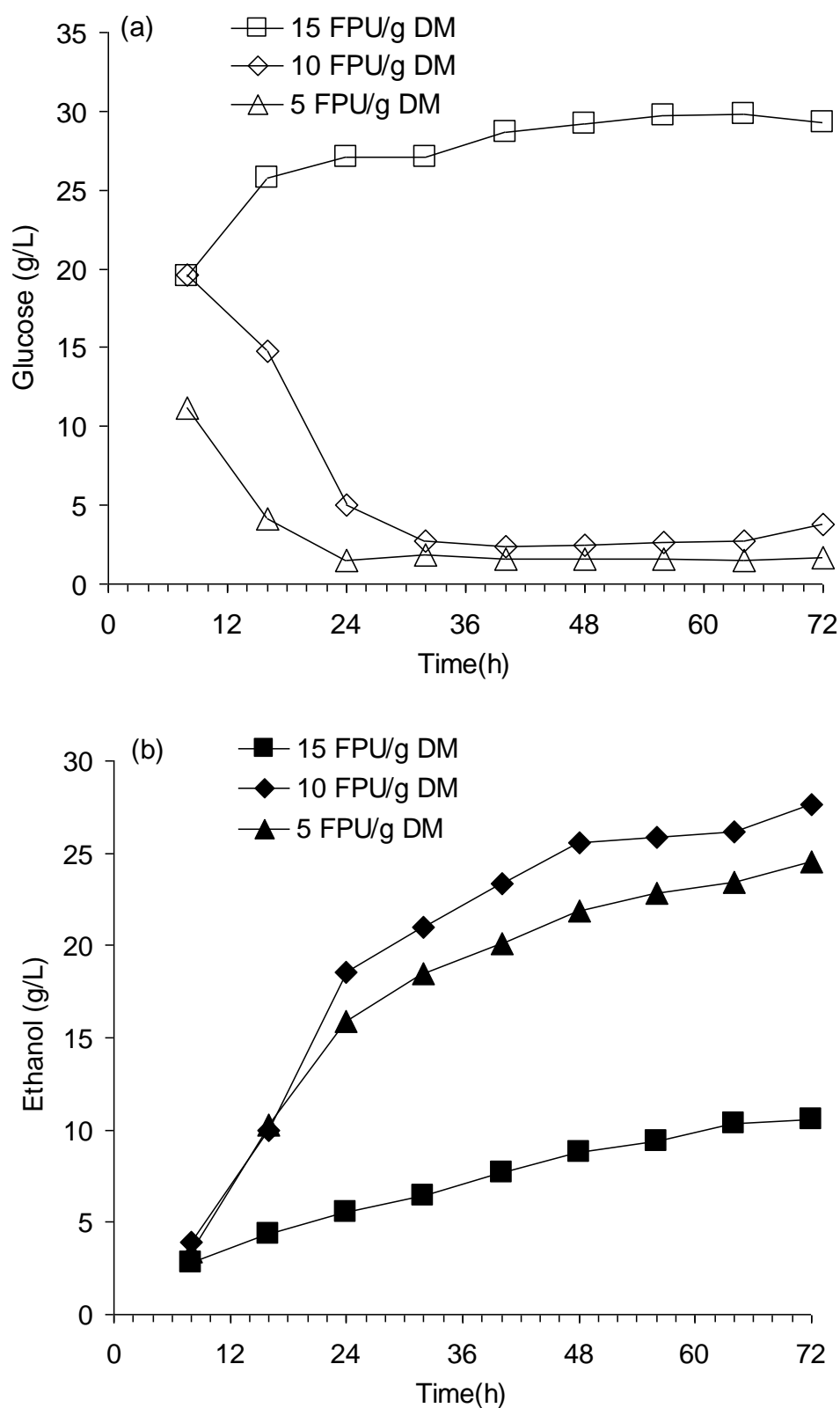


图 3.15 酶用量对 40°C 同步糖化与发酵生物脱毒稀酸预处理的玉米秸秆的影响

Fig. 3.15 Effect of cellulase loadings on SSF of bioabated dilute acid pretreated corn stover at 40 °C
实验在配有螺旋型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行, 工作体积 2.5 L, 固含量 25% (w/w), 温度 40 °C, 转速 150 rpm, 过程 pH 5.0, 纤维素酶用量分别 5, 10, 15 FPU/g DM。纤维素酶, 酵母种子在 0 时

刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕取样，发酵过程的葡萄糖 (a) 和乙醇 (b)。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。预处理玉米秸秆使用生物方法脱毒。

3.3.12 发酵升温对同步糖化与发酵生物脱毒处理基质的影响

以 30% (w/w) 固含量生物脱毒处理秸秆为基质，采用变温发酵，考察升温对发酵行为的影响，结果如图 3.16 所示。15 FPU/g DM 酶用量 50 °C 水解 10 h，生成葡萄糖约

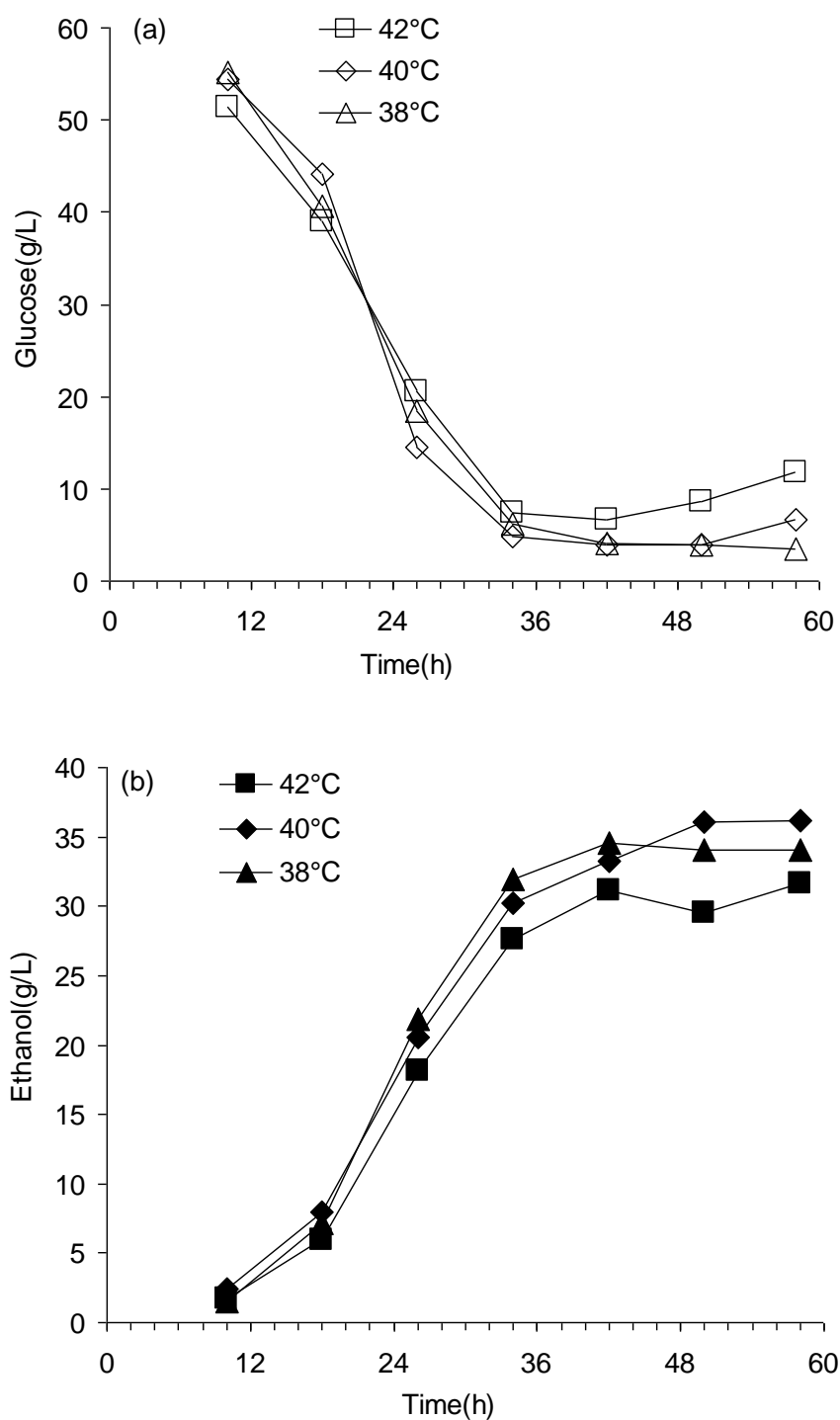


图 3.16 发酵温度升高对同步糖化与发酵生物脱毒稀酸预处理的玉米秸秆的影响

Fig. 3.16 Effect of increased temperature on two-step SSF of bioabated dilute acid pretreated corn stover

实验在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，固含量 30% (w/w)，纤维素酶用量 15 FPU/g DM，转速 150 rpm，过程 pH 5.0。同步糖化与发酵时，纤维素酶在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，水解至 10 h，降低温度至 37 °C 加入酵母种子发酵至 26 h，然后提高到不同温度 38, 40, 42 °C 继续发酵，整个过程葡萄糖变化 (a) 和乙醇的生成 (b)。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。预处理玉米秸秆用生物脱毒方法处理。55 g/L，之后中温发酵 16 h 葡萄糖迅速消耗，后期发酵调整发酵温度，当升高温度至 38 °C 葡萄糖持续降低，升高发酵温度至 40 和 42 °C 时葡萄糖反而开始升高 (图 3.16 (a))，乙醇的生成和葡萄糖的消耗相对应 (图 3.16 (b))，发酵前期乙醇的浓度变化一致，38 °C 发酵乙醇速率略快，发酵后期乙醇浓度继续上升，调整温度至 40 °C 发酵效果较好；升温至 42 °C 时，微生物发酵能力严重降低，不能生成乙醇。实验表明在使用生物脱毒基质发酵时，在发酵后期升温超过 40 °C 时，微生物的生存能力仍然受到抑制，微生物具有更加宽泛的生长温度是保证高温纤维乙醇发酵的先决条件。

3.4 本章小结

1. 本研究的创新在于使用耐高温的酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1，在高固含量下同步糖化与发酵真实的纤维素基质原料生产乙醇。在固含量 30%，15 FPU/g 干基质，采用变温同步糖化与发酵，乙醇的浓度和得率分别是 48 g/L 和 61%。

2. 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 可以应用于高温 (40 °C) 直接同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆生产乙醇，在固含量 20% (w/w)，纤维素酶用量 5 FPU/g DM 下，发酵效果优于常温发酵。提高发酵体系固含量 (~30% wt.) 和纤维素酶用量 (~15 FPU/g DM) 时，*S. cerevisiae* DQ1 发酵或缓慢，或停滞，发酵体系葡萄糖明显积累，这原因至少在于以下几点：酵母在 40 °C 生存能力相对较弱，只有 35 °C 的 70%，长时间高温培养酵母逐步活性；纤维素酶对酵母的存活有负面作用，固含量和酶用量的提高，都升高了体系的酶浓度；固含量的提高，使体系中的抑制物积累增加，抑制酵母代谢，延长发酵周期。

3. 稀酸预处理的玉米秸秆即使在不添加外源营养的条件也能够进行高温发酵，而且，不同营养组合的添加也无助于进一步提高酵母的发酵能力，说明营养并不是高温发酵过程最重要的限制因素。

4. 纤维素乙醇生产的发酵模式能够显著影响发酵效果。变温发酵模式克服了直接同步发酵模式存在的问题，温度设计兼顾了微生物最适温度和纤维素酶活性。变温模式能够更高的转化纤维素到乙醇和葡萄糖，若进一步提高微生物耐温性，则能够获得更高的产物浓度。

5. 本研究与国内外研究相比在发酵基质浓度，工艺操作和乙醇浓度都有明显的提高，特别是选择酿酒酵母发酵真实的纤维素基质原料，为高温纤维素乙醇的研究提供了重要基础。

第 4 章 嗜热乳酸菌的发现以及应用于木质纤维素生产高浓度乳酸

4.1 引言

面对社会可持续发展的需求, 开发替代性的可再生燃料和生物基化学品日益重要。在生物基化学品中, 以乳酸为单体加工制造的生物可降解材料聚乳酸, 具有优良的特性, 是替代聚乙烯和聚丙烯等石化基塑料的新一代生物可降解塑料, 用途广泛, 具有巨大的社会和经济价值。目前, 95%的乳酸是通过粮食淀粉的发酵生产的, 考虑到人口与粮食问题, 采用粮食原料深加工生产大宗化学品的技术路线已经受到了国家政策的严重遏制。发酵生产乳酸的原料正从淀粉质转向更加丰富的木质纤维质资源。中国是乳酸生产大国, 但是发酵几乎都是以淀粉为基质, 以纤维素为原料生产乳酸以及聚乳酸发展都处于初步阶段。因此, 利用丰富的农作物秸秆类纤维质为原料, 通过生物加工路线生产乳酸是一个极为重要的研究热点和产业方向。目前国内外以木质纤维素原料生产乳酸都处于实验室阶段, 尚不具备产业化应用要求。

纤维素原料生产乳酸面临许多挑战, 包括纤维素原料的解构, 纤维素预处理产生抑制物, 纤维素酶的有效性和成本, 以及发酵微生物在纤维素原料中的存活能力和耐受性。乳酸发酵生产 70%的成本来自发酵基质, 若能够以低成本具有丰富来源的纤维素基质为原料, 必然具有重大的意义。尽管能够产乳酸的微生物有许多种, 但是对于纤维素原料这非淀粉类基质, 筛选和构造新的发酵微生物仍然非常重要。在大规模酒精生产过程, 偶有杂菌污染, 杂菌一般是乳酸菌。但是, 在以纤维素原料生产乙醇过程污染杂菌, 并分离出产乳酸菌的鲜见报道。本章在研究高温同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆生产乙醇过程中, 发现并分离到一株能够在高温下高效产乳酸细菌。本章介绍和描述了研究高温纤维乙醇发酵中的染菌现象和应对措施, 以及乳酸菌的发现与分离的背景和过程。本章用 16S rDNA 方法鉴定了分离到的乳酸菌并构建进化树, 优化了培养基, 并应用在生物脱毒处理的玉米秸秆进行高浓度乳酸发酵。

4.2 材料与方法

4.2.1 试剂和药品

乳酸标准品 L(+)-Lactic acid, 纯度 90%, Lot: LUB0J06, 购自百灵威化学公司 (J&K Chemical Ltd.); 分子生物学试剂, 购自德国 QIAGEN 公司; 纤维素酶 Accellerase 1000 (纤维素酶活性 65 FPU/mL) 是杰能科公司产品; 酵母粉购买自英国 Oxoid 公司; 其他药品和试剂购于上海凌峰化学试剂有限公司, 见附录 I。

4.2.2 乳酸菌的分离

用于分离乳酸菌的原始样品取自产乳酸的乙醇发酵液以及对应批次的生物脱毒处理玉米秸秆。菌种分离使用 YPD 琼脂平板 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 10, 酵母粉 10, 琼脂粉 15。分离步骤为: 取 1 mL 发酵液, 无菌水梯度稀释, 涂布 YPD 琼脂平板, 分

别在 25, 37, 42 °C 培养箱中培养 2 d; 另外, 取对应批次的生物脱毒秸秆 5 g, 搅拌分散溶于无菌水中, 也涂布在 YPD 琼脂平板, 分别在 25, 37, 42 °C 培养 2 d。分别挑取在 42 °C 平板上长出的单菌落, 在 YPD 琼脂平板上再划线, 根据菌落周围是否显酸性初步鉴别。若菌落周围 pH < 3 的单菌落, 42 °C 在 YPD 平板上划线培养 3 代得到的单菌落分别接入有 20 mL YPD 培养基的 100 mL 三角摇瓶, 42 °C, 150 rpm 培养 24 h, 用高效液相色谱分析样品确认乳酸的生成。

4.2.3 16S rDNA 序列分析及构建系统进化树

提取乳酸菌 DQ2 的基因组 DNA, 以 DNA 为模板进行 16S rRNA 的 PCR 扩增, 得到约长 1.6 kb 片段, 将 PCR 产物回收后克隆到 pMD19-T 载体酶连接, 转化至 DH5 α 筛选阳性克隆, 质粒酶切验证, 根据 16S rRNA 的测序结果, 在 NCBI (美国国立生物技术信息中心) 核苷酸数据库 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行同源性比较, 下载相似性高的序列和 DQ2 序列在 MEGA 4 (<http://www.megasoftware.net/>) 软件中利用 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树。

4.2.4 乳酸菌的保藏和培养

分离的乳酸菌 DQ2 在 YPD 培养基中 42 °C, 150 rpm 培养 24 h, 与 60% 的灭菌甘油混合, 然后向冻存管移取 2 mL 菌液, 在 -80 °C 冰箱菌种长期保存。每次发酵取一支菌种甘油冻存管, 在 YPD 培养基 42 °C, 150 rpm, 培养 24 h, 用于摇瓶和发酵罐接种发酵, 接种量 10%。MRS 培养基^[156] (g/L): 葡萄糖 20, 牛肉膏 10, 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 乙酸钠 5, 柠檬酸氢二铵 2, 磷酸氢二钾 2, 七水合硫酸镁 0.58, 四水合硫酸锰 0.25, 吐温 80 1; SM 合成培养基 (g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10, 磷酸二氢钾 2, 硫酸铵 1, 七水合硫酸镁 1。培养基灭菌条件 115 °C, 20 min。培养基实验在 250 mL 摇瓶中进行, 装液量 50 mL, 接种量 5% (v/v), 摇瓶中加入固体碳酸钙控制发酵液 pH, 发酵温度 42 °C, 转速 150 rpm, 每个条件做 3 个平行实验。乳酸得率计算基于 1 g 葡萄糖转化为 1 g 乳酸, 摇瓶发酵 24 h 时计算乳酸得率。

4.2.5 玉米秸秆的稀酸预处理和生物脱毒

玉米秸秆原料收集于吉林省, 运至本实验室。在实验室内进行秸秆洗净, 烘干, 粉碎, 分装, 真空储存备用。玉米秸秆的稀酸预处理和生物脱毒^[124, 26]如下所述, 玉米秸秆首先与稀硫酸混合预浸, 方法为: 称量 800 g 玉米秸秆与 400 g 5% (w/w) 硫酸在塑料箱中搅拌混合, 玉米秸秆完全浸润, 没有物料结块。然后, 转入塑料袋, 浸润 12 h。预处理操作过程: 首先加热蒸汽发生器, 把 1200 g 浸润过稀硫酸的玉米秸秆装入预处理反应釜, 这装料量已经把 10 L 的预处理器填满; 把蒸汽发生器产生的高温蒸汽通入预处理反应釜, 使反应釜内温度升到 190 °C, 通过控制蒸汽流量维持这个温度 3 min。最后迅速释放釜内蒸汽, 然后把预处理后物料到入桶中, 在水中冷却预处理后物料, 转入塑料袋中, -4 °C 冰箱保存, 预处理后玉米秸秆含水量约 50% (w/w)。预处理实验进行多批次, 然后物料混合以满足实验需要。稀酸预处理的玉米秸秆可以通过在秸秆固态培养霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 的方式脱除其中包含的抑制物, 具体操作步骤: 首先用

蒸馏水和 5 M 氢氧化钠调整稀酸预处理后玉米秸秆含水量 60% (w/w), pH 约为 5.5, 接入预先培养的 *A.resinae* ZN1 孢子悬浮液与秸秆混合, 把霉菌 *A. resinae* ZN1 的孢子悬浮液混匀于秸秆中, 盖上塑料盒盖子, 不做进一步密封, 进行培养; 在大批量物料生物脱毒时, 预先培养生长有霉菌的固体物料, 按照固体与固体混合的方式, 接入扩大培养的玉米秸秆中。25 °C 固态培养 5-10 天, 脱除抑制物后秸秆冷冻储藏。大批量秸秆固态脱毒培养是在空调控温的房间进行, 属于较开放培养方式, 同时初始玉米秸秆为强酸性, 因而玉米秸秆原料, 塑料盒, 蒸馏水, 氢氧化钠溶液在这一步骤都没有高温灭菌。

4.2.6 生物脱毒玉米秸秆的发酵

在自行开发设计的适合于纤维质原料发酵的螺带桨 5 L 生物反应器中^[122]进行秸秆同步糖化与发酵生产乙醇或乳酸。每次实验前, 生物反应器 115 °C 在位灭菌 30 min。发酵操作开始时, 加入部分生物脱毒秸秆原料, 无菌水, 相应营养盐和纤维素酶 15 FPU/g DM (干秸秆), 逐步补料加入剩余的生物脱毒秸秆; 接入发酵微生物种子液, 在设定条件下进行同步糖化与发酵, 5 M 氢氧化钠调节发酵过程 pH。如无特别说明, 脱毒后秸秆, 蒸馏水, 营养物质, 氢氧化钠溶液单独灭菌 115 °C, 20 min。如无特别说明, 发酵中添加了基本营养物 (g/L): 磷酸二氢钾 2, 硫酸铵 1, 七水合硫酸镁 1 和酵母粉 1。

4.2.7 分析方法

样品中的葡萄糖、乙醇、乳酸、乙酸以及糠醛和 5-羟甲基糠醛的浓度用高效液相色谱 (日本岛津公司) 分析, 液相色谱配备示差检测计, Bio-rad Aminex HPX-87H 色谱柱, 5 mM 硫酸作为流动相, 流速 0.6 mL/min, 柱温箱温度 65 °C。样品 13000 rpm, 离心 5 min 冷冻保存上清液待测。样品用超纯水稀释, 0.2 μm 膜过滤后进样 40 μL。根据相应的标准曲线计算样品中物质的浓度。

4.3 结果与讨论

4.3.1 高温发酵不灭菌生物脱毒秸秆生产乙醇过程伴随乳酸的形成

高温同步糖化与发酵生物脱毒处理 5 天或 8 天的玉米秸秆物料, 发酵操作首先在 50 °C 纤维素酶水解玉米秸秆 12 h, 然后接种酵母, 发酵过程时间曲线如图 4.1 所示。实验原本是接入酿酒酵母高温发酵木质纤维素生产乙醇, 令人惊讶的是分析实验结果时, 发现有大量乳酸的积累, 而乙醇的产量则非常低 (图 4.1 (b))。图 4.1 (a) 是发酵过程的葡萄糖浓度变化曲线, 在酵母接种 (纤维素 50 °C 预水解 12 h) 后, 由于在该温度下, 酿酒酵母生长和发酵能力降低, 消耗葡萄糖的能力弱, 随着纤维素酶继续水解玉米秸秆中的纤维素生成葡萄糖, 葡萄糖浓度反而在增加如图 4.1 (a) 所示。在 12 h 和 24 h, 5 天脱毒物料和 8 天脱毒物料水解的葡萄糖都迅速消耗, 最终都消耗完毕。乙醇和乳酸的生成如图 4.1 (b), 乙醇的生成一直维持在较低的水平, 在发酵后期乙醇发酵已经停止。而对于乳酸的生成, 5 天脱毒物料在 0-16 h 取样分析还没有发现乳酸的形成, 在 16-24 h, 只有 1-2 g/L 乳酸的生成。但是在 24-36 h 乳酸浓度迅速积累。而脱毒 8 天脱毒物料, 乳酸迅速积累要比脱毒 5 天物料提前了 16 h, 在发酵开始后 8 h 就能迅速生成, 这对应

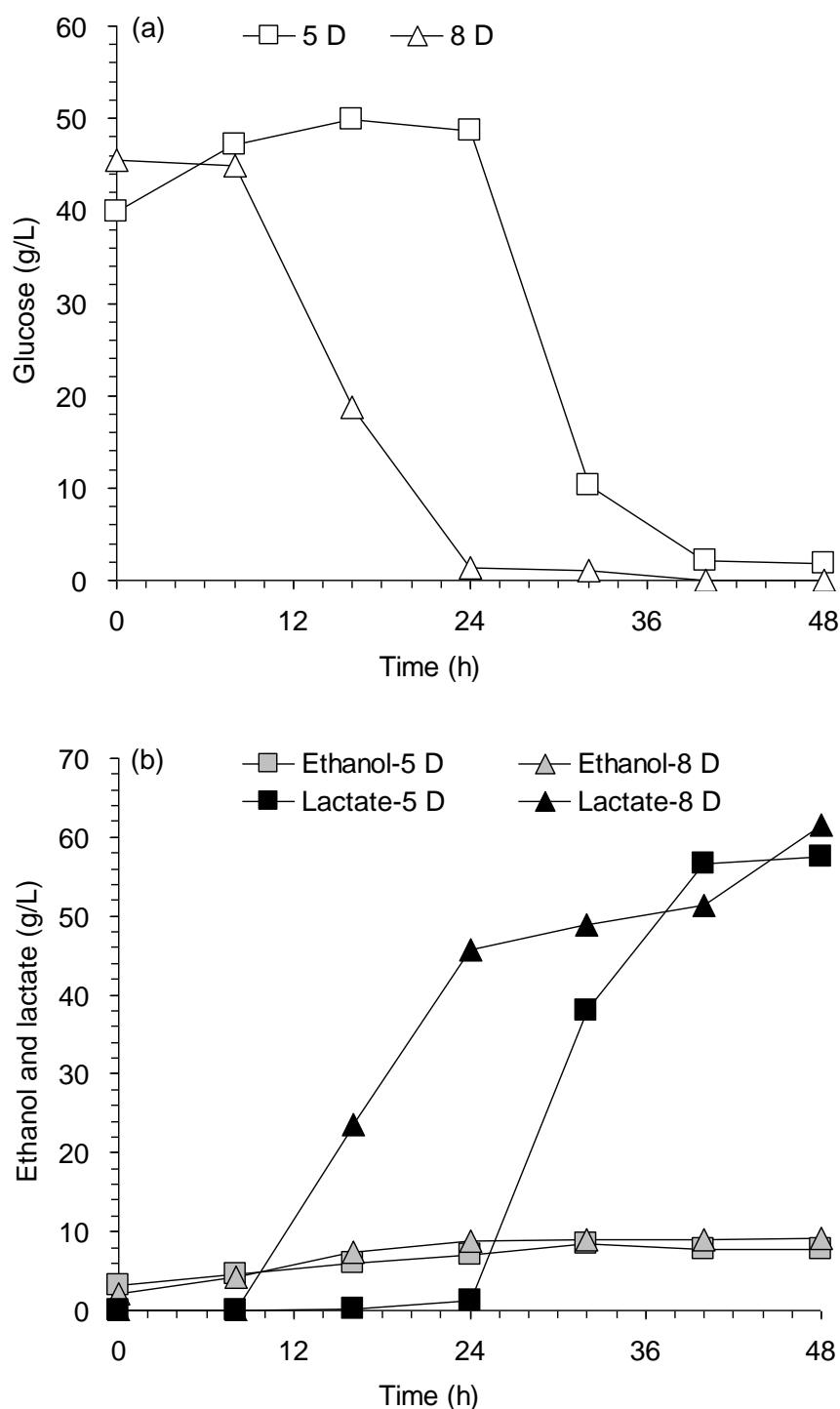


图 4.1 同步糖化与发酵不灭菌脱毒秸秆生产乙醇过程伴随乳酸的生成

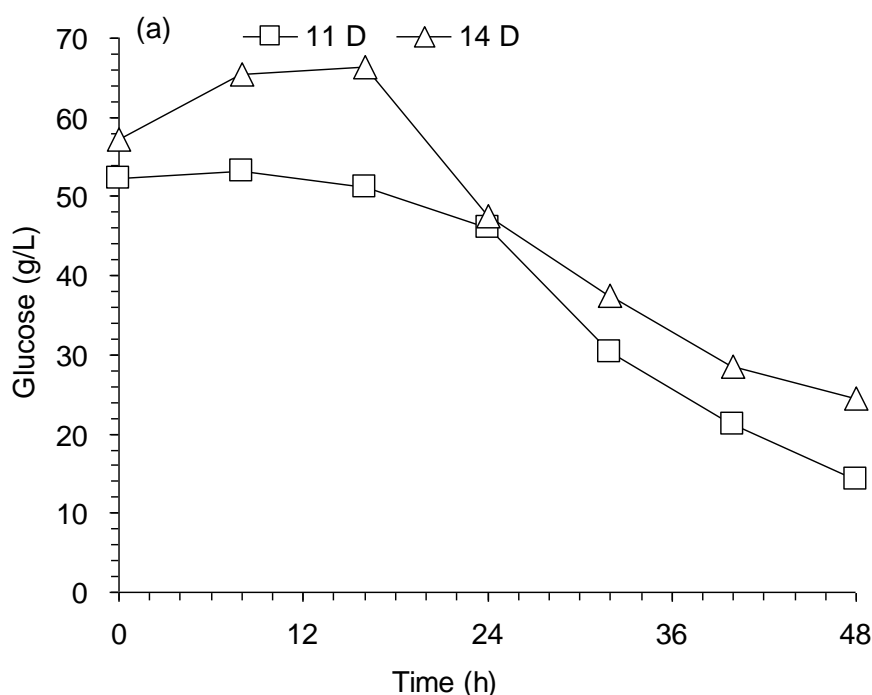
Fig. 4.1 Lactate formation along with ethanol production using SSF of non-sterilized BCS
发酵有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，纤维素酶用量 15 FPU/g DM，搅拌转速 150 rpm，过程 pH 5.5，设定固含量 30% (w/w)。纤维素酶在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，50 °C 水解至 12 h，降低温度至 40 °C 加入酵母种子，发酵 48 h。BCS, Bioabated Corn Stover, 生物脱毒秸秆；(a) 葡萄糖，(b) 乙醇和乳酸；5 D, 8 D 分别指稀酸预处理的玉米秸秆脱毒 5 天和 8 天。预处理物料进行生物脱毒，物料没有进行高温灭菌。稀酸预处

理的玉米秸秆条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。

于葡萄糖更加迅速的消耗。两种物料在发酵 48 h 内，葡萄糖都能够消耗完毕，最后生成约 60 g/L 乳酸。实验结果表明，在该实验体系下具有很强的乳酸生成能力。在高温稀酸预处理作用下，玉米秸秆的结构被破坏，半纤维素分解，提高了纤维素的可解触性，但是，也降解产生了呋喃类，有机酸类和酚类物质^[90]，这些物质降低纤维素酶解效率，抑制微生物的生长和发酵。因此，必须在发酵之前降低或脱除生物质原料中的抑制物。本文的生物脱毒方式，能够有效的除去物料体系中的各种抑制物。之前实验发现，生物脱毒玉米秸秆物料或水洗物料，在用于发酵时，即使不高温灭菌也能够进行发酵，没有不正常现象，同时物料也避免了在高温灭菌过程可能造成的影响，因而这批实验物料没有灭菌。因此对于乳酸形成这个现象，首先尝试玉米秸秆物料高温灭菌看能否避免。

4.3.2 高温发酵灭菌后的生物脱毒秸秆生产乙醇伴随乳酸的形成

随着延长霉菌固态培养，生物脱毒物料中抑制物浓度会进一步降低，脱毒 11 天和 14 天物料，在发酵前 115 °C 高温灭菌 20 min，同时降低发酵 pH 至 5.0，同步糖化与发酵结果如图 4.2 所示。生物脱毒物料在高温灭菌后，进行乙醇发酵，但是仍然有大量乳酸的产生。与没有做高温灭菌的玉米秸秆物料（图 4.1 (a)）发酵相比，发酵高温灭菌物料比较明显的现象是在发酵终止时葡萄糖有大量积累（图 4.2 (a)）。从乙醇和乳酸的生成看，灭菌后生物脱毒原料的乳酸发酵启动变得缓慢，不同时间脱毒物料都需要 16 h 后才能迅速发酵。11 天脱毒物料，可能物料中没有抑制物，以及灭菌对乳酸形成的遏制，乙醇生成相对明显，乳酸只有不到 30 g/L。而 14 天脱毒的物料，由于接种的是 42 °C 培养的酵母种子，乙醇几乎没有生成，大部分葡萄糖转化为乳酸，浓度达 50 g/L。结果表明，即使降低发酵体系 pH，生物脱毒物料高温灭菌不能够避免乳酸的形成。



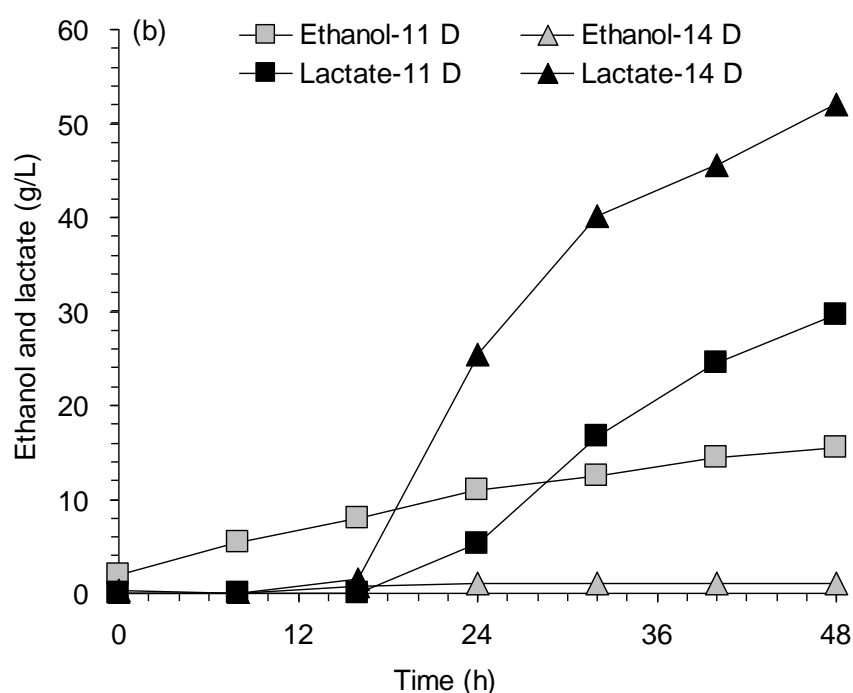


图 4.2 同步糖化与发酵灭菌脱毒秸秆生产乙醇过程伴随乳酸的生成

Fig. 4.2 Lactate formation along with ethanol production using SSF of sterilized BCS

发酵在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，搅拌转速 150 rpm，过程 pH 5.0，设定固含量 30% (w/w)，纤维素酶用量 15 FPU/g DM。纤维素酶在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，50 °C 水解至 12 h，降低温度至 40 °C，加入酵母种子发酵 48 h。BCS, Bioabated Corn Stover, 生物脱毒秸秆；(a) 葡萄糖，(b) 乙醇和乳酸；11 D 和 14 D 分别指预处理后玉米秸秆生物脱毒处理 11 天和 14 天。预处理物料进行生物脱毒，物料高温灭菌 (115 °C, 20 min)。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C, 3 min, 2.5% H₂SO₄。

4.3.3 乳酸生成的验证：不接种酿酒酵母和 121 °C 高温灭菌发酵原料

一般酵母不能够发酵葡萄糖产生乳酸，需要进行代谢工程改造^[157]，但不确定实验用酿酒酵母菌株能否在某特定条件下产乳酸，为了考察酵母是否在实验发酵特定条件下产乳酸以及更强程度的灭菌生物脱毒物料对乳酸形成的影响，使用生物脱毒 5 天玉米秸秆物料在不接种酿酒酵母和 121 °C 高温灭菌后进行发酵，结果如图 4.3 所示。不接种酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1，在同样实验条件下进行生物脱毒玉米秸秆同步糖化与发酵，结果表明初始阶段没有乳酸形成，发酵 16 h 后，乳酸仍然会产生，乳酸浓度迅速积累，成线性增长 (图 4.3 (b))，生成约 50 g/L 乳酸，说明乳酸的生成与接种的酿酒酵母无关，主要依赖于发酵所用的经过生物脱毒的稀酸预处理的玉米秸秆。发酵过程葡萄糖浓度持续升高从 50 g/L 升高到超过 60 g/L，在 16 h 开始降低，最后大约 20 g/L 葡萄糖残留。同样，即使在物料灭菌 121 °C, 60 min，随着物料发酵的进行依然能够积累乳酸，而且两个实验的葡萄糖和乳酸变化几乎一致 (图 4.3 (a))，说明对含水量约 60% 的固体物料进行高温蒸汽灭菌，灭菌效果可能不理想^[158]。

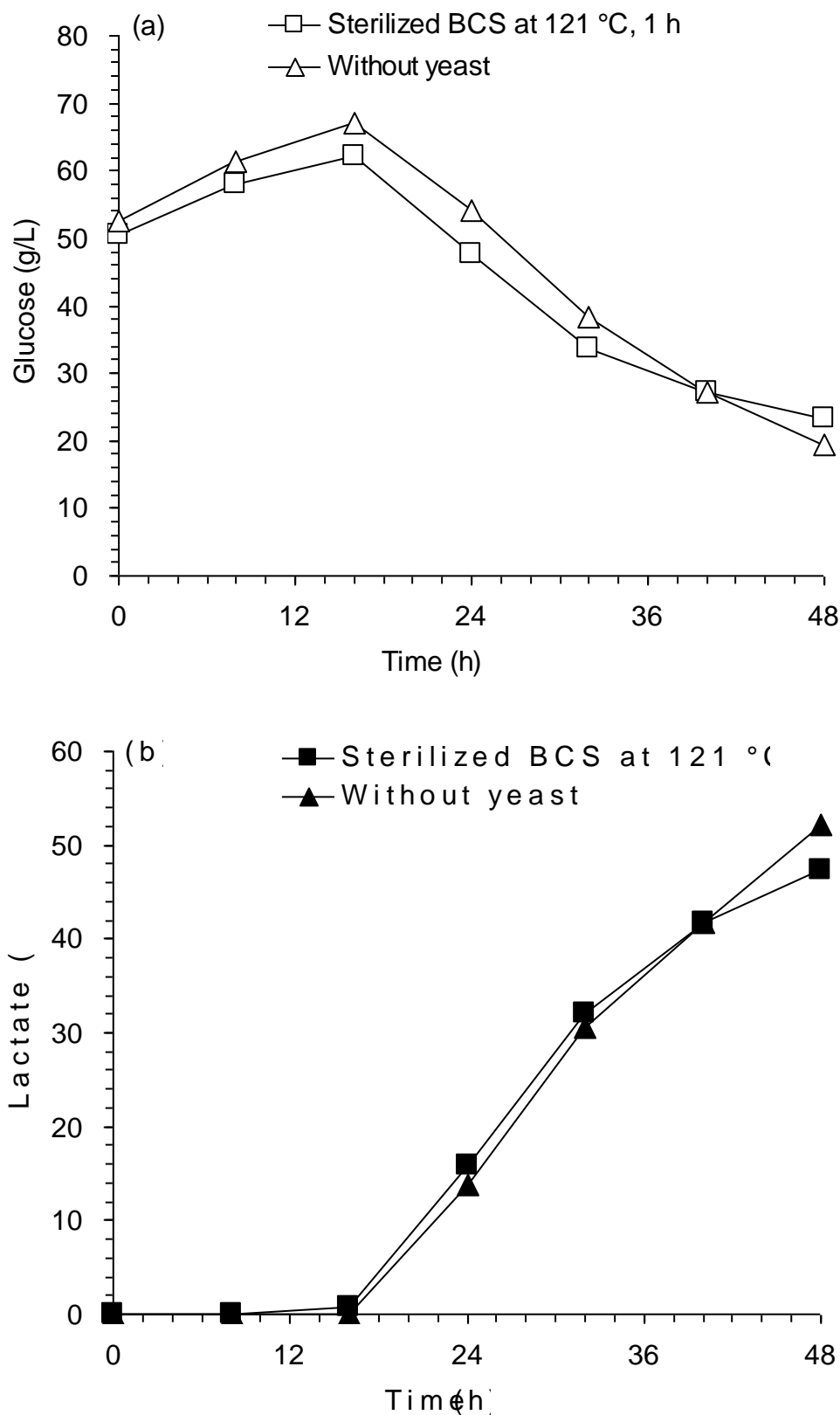


图 4.3 同步糖化与发酵灭菌脱毒秸秆过程乳酸的生成

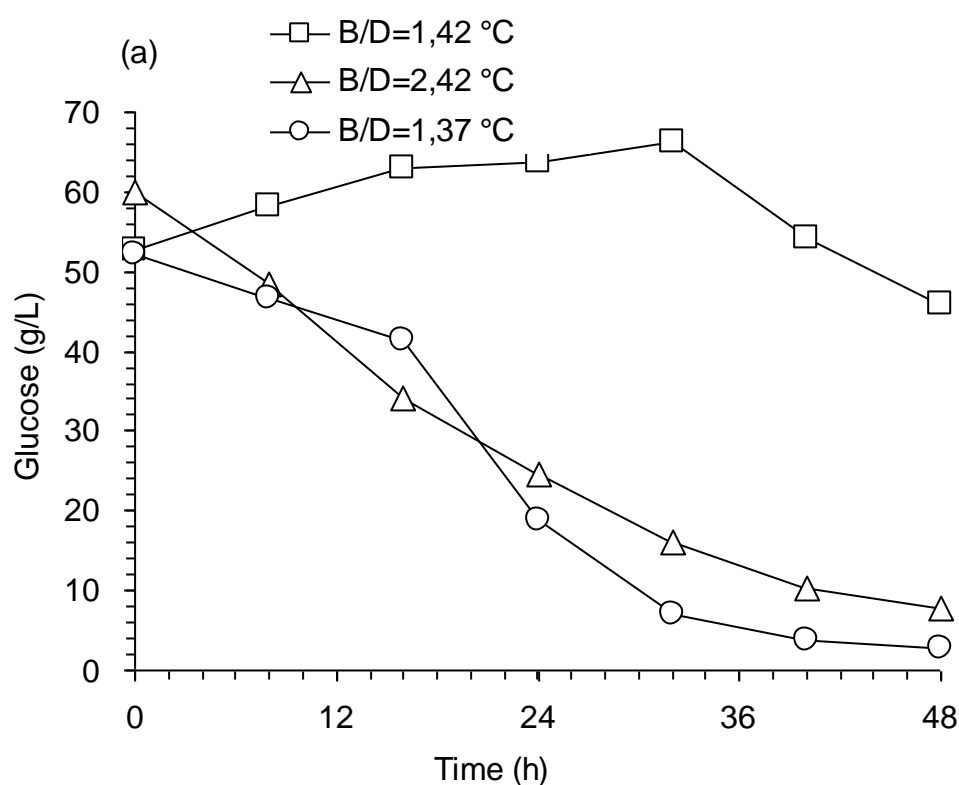
Fig. 4.3 Lactate formation during SSF of BCS

发酵在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，纤维素酶用量 15 FPU/g DM，搅拌转速 150 rpm，过程 pH 5.0，设定固含量 30% (w/w)。纤维素酶在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0

时刻开始逐步加入, 8 h 内补加完毕, 50 °C 水解至 12 h, 降低温度至 40 °C 加入酵母种子, 发酵 48 h。BCS, Bioabated Corn Stover, 生物脱毒秸秆; (a) 葡萄糖, (b) 乳酸; sterilized BCS at 121 °C, 1 h, 生物脱毒 121 °C 高温灭菌 1 h; without yeast, 不接种酿酒酵母, 生物脱毒物料 5 天高温灭菌 (115 °C, 20 min)。玉米秸秆稀酸预处理的条件: 190 °C, 3 min, 2.5% H₂SO₄。

4.3.4 乳酸生成的验证: 稀酸预处理的玉米秸秆和生物脱毒处理秸秆的混合

综合实验结果发现这批次生物脱毒玉米秸秆在不同的实验条件下都能够发酵产生乳酸, 产生乳酸的能力主要来源于生物脱毒玉米秸秆。那么, 减少脱毒物料在发酵罐中的相对量应该可以减少产乳酸的能力以及与酵母乙醇发酵的竞争。生物脱毒玉米秸秆 BCS) pH 在 5.5 左右, 而稀酸预处理 (Dilute acid pretreated corn stover, DACS) pH 小于 1, 两种物料混合调配能够接近发酵合适 pH 5.0, 这样可以同时减少用碱量和生物脱毒玉米秸秆用量。采用两种比例混合物料及不同温度发酵的结果如图 4.4 所示。如图 4.4 混合物料验证乳酸发酵最明显的结果是当发酵基质中混入预处理物料后, 乳酸的产生能力虽然变弱, 但是发酵后期乳酸仍有产生, 而且在相同条件当发酵温度为 37 °C, 只产生了乙醇, 没有乳酸的生成。当稀酸预处理物料和生物脱毒物料混合, 两者质量之比是 2: 1 时, 体系中抑制物浓度低, 乙醇的生成比较明显, 乳酸只是在发酵后期开始生成; 当两者质量比是 1: 1 时, 42 °C 发酵生成的乙醇很低, 同时发酵后期有乳酸生成, 37 °C 发酵乙醇达到 38 g/L, 且没有乳酸的形成。采用不同酸性的物料相互中和 pH, 类似于 Maas 等^[100]报道的用碱性预处理物料中和发酵产生的乳酸。通过两种物料混合, 一方面减少了可能脱毒物料所带杂菌的量, 另一方面稀酸预处理物料中的抑制物抑制了杂菌的生长。在 37 °C 能够正常产乙醇, 说明只有在高温发酵下, 产乳酸杂菌明显占竞争优势。



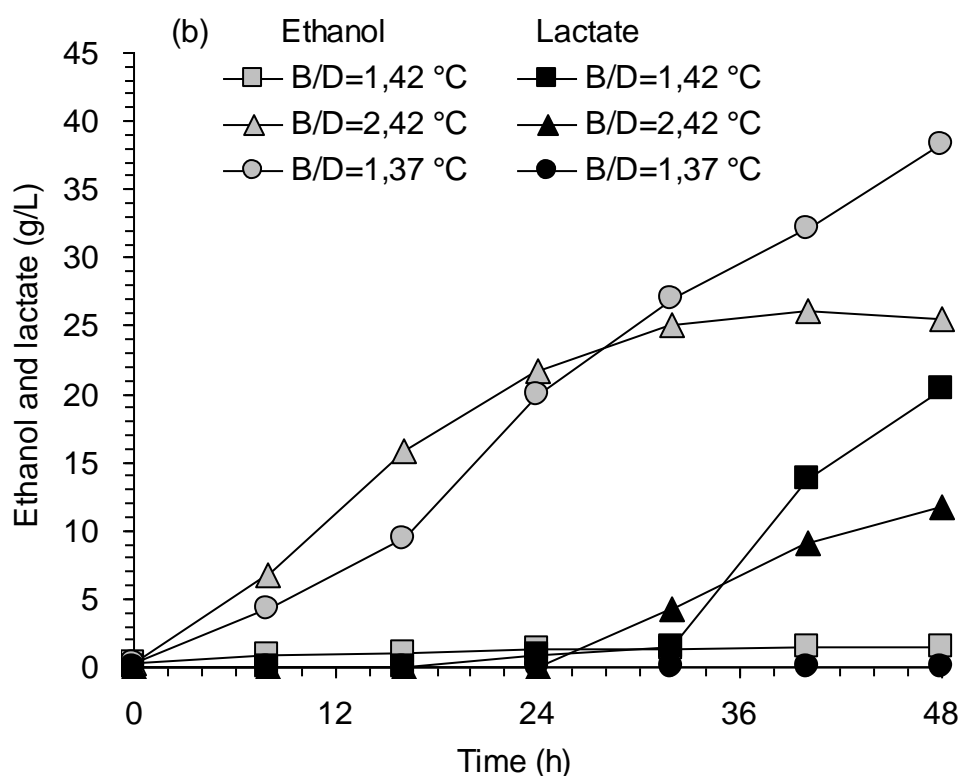


图 4.4 同步糖化与发酵混合脱毒秸秆过程乳酸的生成

Fig. 4.4 Lactate formation during SSF of substrate mixtures of BCS and DACS

发酵在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，纤维素酶用量 15 FPU/g DM，搅拌转速 150 rpm，过程 pH 5.0，设定固含量 30% (w/w)。纤维素酶在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，50 °C 水解至 12 h，降低温度加入酵母种子，发酵 48 h。BCS, Bioabated Corn Stover, 生物脱毒秸秆；DACs, 稀酸预处理的玉米秸秆；B/D=BCS/DACS, 两种物料质量比混合；(a) 葡萄糖，(b) 乳酸和乙醇。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。

4.3.5 乳酸生成验证：氨水过碱处理生物脱毒玉米秸秆

在玉米秸秆生物脱毒中使用的是一株新分离的霉菌 *Amorphotheca resiniae* ZN1，而据报道某些霉菌能够发酵产有机酸如 *Rhizopus oryzae* 产乳酸^[93]，*Aspergillus niger* 产柠檬酸^[159]，*Aspergillus terreus* 产衣康酸^[160]，因此不知乳酸的形成是否与这一特定环境下物料含有的霉菌有关。前面实验发现高温蒸汽直接灭菌生物脱毒物料的效果不理想，因此设想利用氨水先处理物料，再在碱性条件下高温灭菌杀死物料中的杂菌和霉菌孢子^[161]，然后用酸性的预处理物料调节灭菌后的氨水处理物料，例如 1500 g 生物脱毒的物料，用溶有 8 mL 氨水的 60 mL 蒸馏水混匀，生物脱毒物料的 pH 达 10-11，灭菌后与 300 g 预处理料混合，调节整个体系 pH 在 5，用于发酵。试验结果如图 4.5 所示，结果表明氨水的处理物料，即使生物脱毒原料占发酵基质 80% 的情况，也没用乳酸形成，而同批次生物脱毒玉米秸秆若没有经过氨水处理，仍能够大量积累乳酸。相比于 B/D=1 条件，生物脱毒物料占有发酵基质比例高者有利于乙醇的发酵 (B/D=4)，这可能是物料

体系抑制物浓度低的缘故，因为不经过生物脱毒的稀酸预处理物料中含有大量抑制物。同批次的原料在 42 °C 直接同步糖化与发酵，发现在 18 h 时就已经有乳酸形成，在 24 h 时乳酸迅速积累，说明这批原料长期冰箱储藏后中仍有发酵乳酸的能力，实验结果说明利用氨水处理生物脱毒物料的控制是个简便有效的方式，在碱性的条件下能够杀死物料中的杂菌。选择氨水一方面是在于游离态的小分子 (NH_3) 化合物对细胞有很大的伤害作用，因而可以用于抑制杂菌，另一方面是因为氨分子与酸性的预处理物料中和成为硫酸铵，可以作为微生物的氮源。

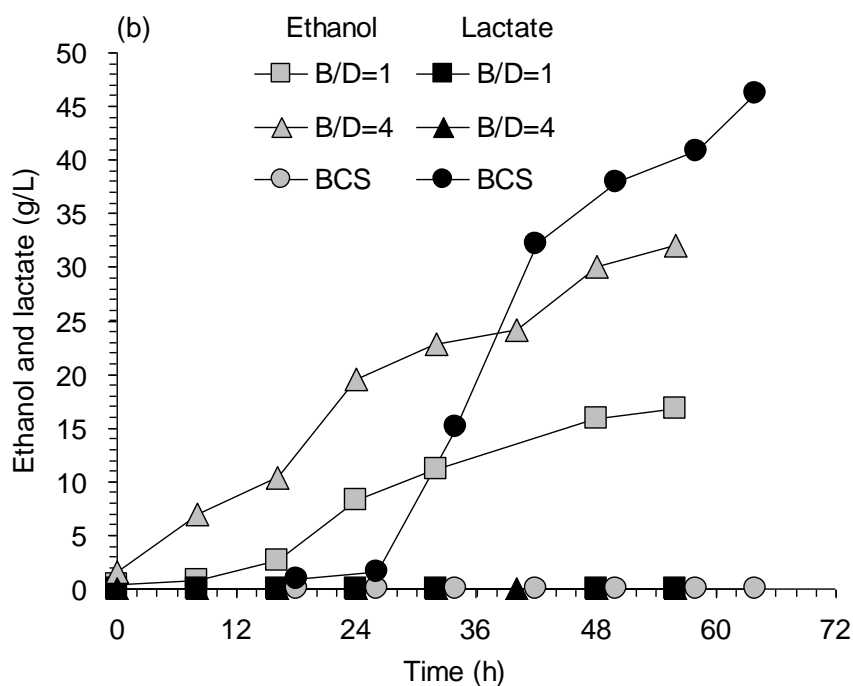
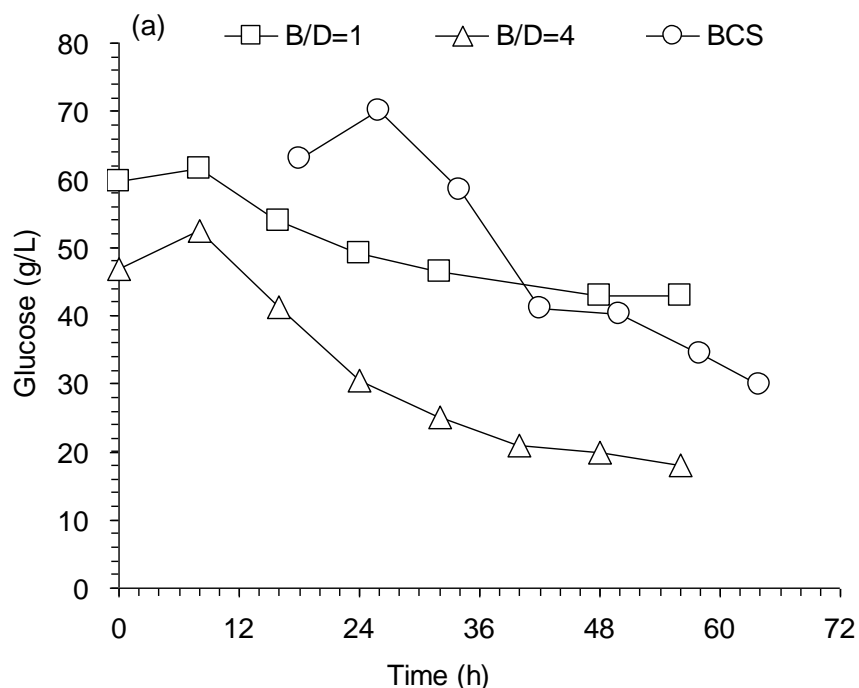


图 4.5 同步糖化与发酵混合脱毒秸秆过程乳酸的生成

Fig. 4.5 Lactate formation during SSF of substrate mixtures of BCS and DACS

发酵在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，纤维素酶用量 15 FPU/g DM，搅拌转速 150 rpm，过程 pH 5.0，设定固含量 30% (w/w)。纤维素酶在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，对于 B/D=1 或 4 者，50 °C 水解至 12 h，降低温度加入酵母 37 °C 发酵 16 h，然后调高温度至 42 °C。BCS, Bioabated Corn Stover, 生物脱毒秸秆; DACS, 稀酸预处理秸秆; B/D=BCS/DACS, 两种物料质量比; 用于混合的 BCS 用氨水调节过碱，灭菌。对于 BCS 发酵，物料没有灭菌，没有预水解，直接在 42 °C 发酵，18 h 取样。(a) 葡萄糖，(b) 乳酸和乙醇。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。

4.3.6 乳酸生成验证：在摇瓶中玉米秸秆水解液发酵

在摇瓶实验验证中，通过向玉米秸秆水解液中添加不同来源物质验证乳酸产生的可能原因，这样可以排除固态组分在发酵中的干扰。所用的水解液是经过生物脱毒的原料或未经过生物脱毒的预处理秸秆的水解液，以水解液作为对照 (control)，分别向水解液中添加脱毒后的秸秆 (BCS)，在秸秆生长的菌丝体 (Ar)，发酵醪液 (Broth)，分析对比了培养 24 h 和 72 h 摇瓶中乳酸浓度的变化，结果如图 4.6。对于用作对照的未脱毒水解液在 24 h 以及经过 72 h 都没有乳酸生成，说明单纯的秸秆水解液不能产生乳酸，而对于用作对照

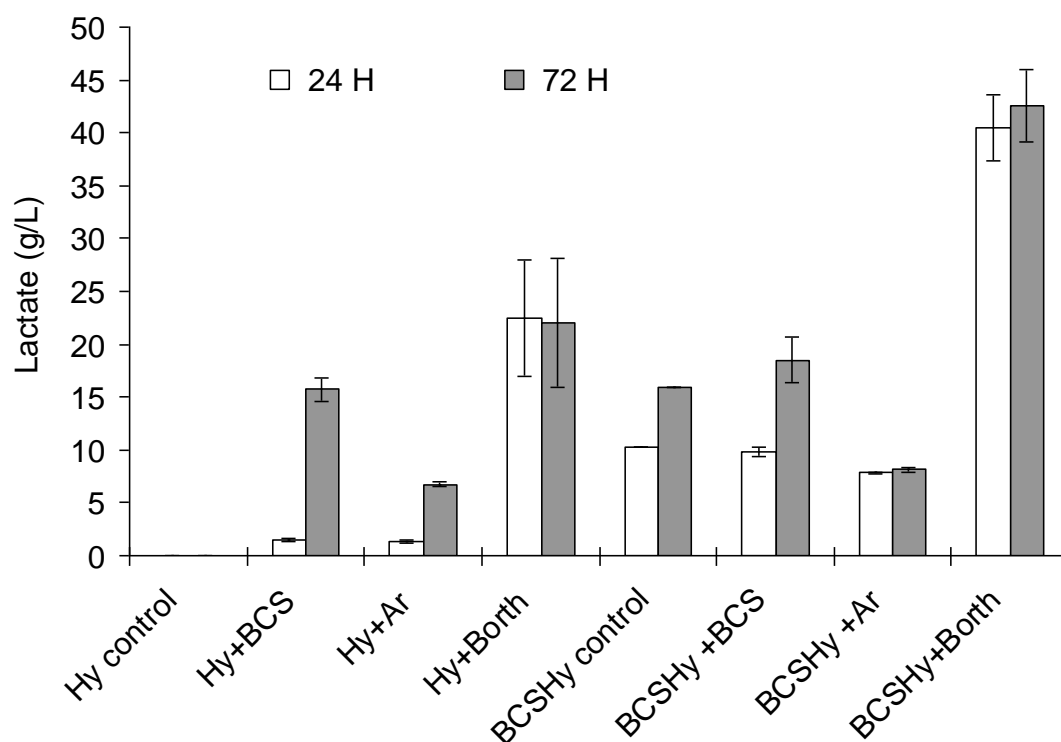


图 4.6 摇瓶水解液中乳酸的验证

Fig. 4.6 Lactate formation evaluated in the hydrolysate in shake flask

实验在 150 mL 摇瓶中进行，装液量约 30 mL，培养温度 42 °C，转速 150 rpm; Hy, hydrolysate, 未经过生物脱毒秸秆的水解液; BCSHy, 生物脱毒原料的水解液; control, 对照; BCS, 生物脱毒

秸秆; Ar, 秸秆上生长的 *A. resinae* ZN1 菌丝; Borth, 含大量乳酸的发酵液; +, 指添加。24 H 和 72 H, 指摇瓶培养 24 h 和 72 h。

的生物脱毒秸秆的水解液在 24 h 和 72 h 都能检测到乳酸, 且 72 h 乳酸浓度有增加, 说明生物脱毒秸秆水解液会产生乳酸。两种水解液中添加生物脱毒的秸秆 (+ BCS), 乳酸的浓度增加都表现很明显, 说明这是主要乳酸形成来源因素。添加 Ar 菌丝, 因为是生物脱毒培养过程的菌丝, 所以菌丝也带有秸秆, 在添加到两种水解液中, 都有乳酸的增加, 但是生物脱毒水解液增加不明显。添加含有大量乳酸发酵醪液的实验, 因为自身含有较高浓度乳酸, 因此添加后生成的乳酸增加不明显。分析实验现象和现有乳酸发酵对比, 发现本实验乳酸产生既有霉菌发酵又有细菌发酵产乳酸的特征。在预处理过程物料即使可能含有的杂菌, 也应该会被完全杀死。玉米秸秆物料经过预处理, 生物脱毒处理到同步糖化与发酵, 周期较长。随着脱毒过程进行, 生物脱毒体系中含有的糖分和抑制物, 以及中性偏酸的环境, 抑制物被降解, 物料体系能够适应更多微生物的存活, 而且过程不是在完全无菌情况下操作, 这个过程中物料的微生物是什么状态也比较模糊, 可能成为混合微生物培养过程。鉴于乳酸是高价值产品, 所用纤维素物料体系确实能够发酵产酸, 因此从最初设法抑制乳酸的生成, 到希望能够分离纯化菌株, 把偶然发酵产酸过程变为可控制的工艺过程。

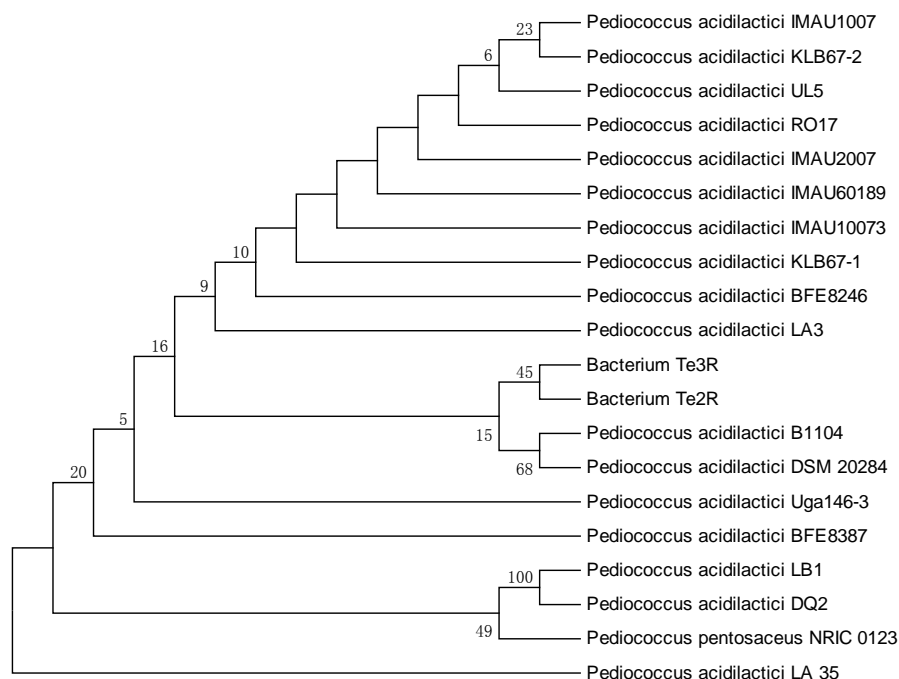
4.3.7 乳酸菌的分离与鉴定

脱毒玉米秸秆在进行高温同步糖化与发酵生产乙醇时, 获得的含有高浓度乳酸的发酵醪液在 YPD (组分 (g/L) 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10, 琼脂粉 15) 平板上进行了微生物分离, 分别在 25 °C, 37 °C 和 42 °C 培养, 不同温度下都有微生物而且菌落形态单一, 这可能是由于发酵自然筛选和富集的结果, 因为在高温条件发酵, 同时有大量的乳酸生成, 可能抑制了其他的微生物。经过多代纯化培养, 获得微生物菌落 (图 4.7a), 呈白色, 圆形, 不透明, 表面凸起光滑, 有光泽。根据菌株 16S rDNA 序列对比



(a) 微生物菌落形态

(a) Morphology of the isolated bacterium



(b) 基于 16S rDNA 序列分析的系统进化树

(b) Phylogenetic tree based on 16S rDNA sequence

图 4.7 从木质纤维素发酵体系中获得乳酸菌的微生物形态和鉴定

Fig. 4.7 Isolation and identification of the lactic acid bacterium from lignocellulosic fermentation system 进行系统发育分析，用 MEGA 4 软件中的 Kimura 2-parameter 模型计算进化距离，用 Neighbor-Joining 方法构建系统进化树（图 4.7b）。根据分离到的菌落形态以及与 NCBI（美国国立生物技术信息中心）核苷酸数据库中 *Pediococcus acidilactici* 序列 99.9% 相似性，获得的菌株鉴定为乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici*，并命名为 *P. acidilactici* DQ2。*Pediococcus acidilactici* 这类微生物菌落成对出现，对氧分子不敏感，能够兼性厌氧发酵葡萄糖，具有宽泛的温度和低 pH，高渗透压耐受范围^[162]，这与实验过程的现象相符。

4.3.8 *Pediococcus acidilactici* DQ2 的生长曲线和培养基优化

一般乳酸菌的生长和发酵有复杂的营养需求^[101]，常选用 MRS 培养基用于微生物筛选和培养，如图 4.8 所示，在 MRS 培养基中 42 °C 培养 *P. acidilactici* DQ2 经过 1 h 的培养后，就进入对数期，OD₆₀₀ 在 8 h 内从 0.5 增加到 5，然后进入生长平稳期，生长曲线表明该乳酸菌生长迅速，适合于高温发酵。初步培养 *P. acidilactici* DQ2 发现，该菌株能够在秸秆同步糖化中快速发酵生成乳酸，甚至只是在该微生物偶然进入秸秆发酵体系中也能够迅速发酵，但在普通合成培养基中没有类似迅速发酵的现象。因此，在摇瓶实验中比较了 MRS 培养基与发酵罐中用营养组分对该菌株乳酸发酵得率的影响。由表 4.1 可见，与使用 SM 培养基相比，使用 MRS 培养基发酵乳酸得率提高 35%，说明 MRS 培养基的确提供了更加丰富的营养，能够促进葡萄糖的消耗和乳酸的生成，适合乳酸菌培养。MRS 培养基是含有多种组分的复杂培养基，能够满足细菌对氨基酸，生长因子，金属离子的需求，但 MRS 配制复杂，成本较高，不适合大规模应用，所以考察了 MRS

培养基组份的去除对乳酸得率的影响。

考虑到 MRS 培养基中存在乙酸钠组分，而玉米秸秆在预处理过程结构破坏能够产生不同程度的乙酸，乙酸在用氢氧化钠调节 pH 后以乙酸钠的形式存在，因此，在秸秆固态脱毒培养过程和发酵罐上同步糖化与发酵中都存在不同程度（1~10 g/L）的乙酸盐。添加不同浓度的乙酸钠到 SM 培养基中，与没有乙酸盐的培养基相比，发现存在乙酸盐的培养基乳酸发酵效果较好，而乙酸钠浓度高低对 *P. acidilactici* DQ2 发酵影响差异不大。乙酸盐在乳酸菌生长和发酵中能够起缓冲作用，同时也可能作为乳酸菌某些脂类合成的前体，促进微生物生长^[163]。MRS 培养基含有复杂的组分，分别去除培养基中某一单因素，考察了 MRS 组分对乳酸发酵的影响，发现除硫酸锰外，其他某一组分的缺失并不影响发酵速率，24 h 乳酸得率在 70% 以上，缺失硫酸锰培养基的发酵乳酸得率不到 50%。添加不同浓度的硫酸锰时，发现硫酸锰浓度高低对发酵影响不大，但是硫酸锰的微量存在非常有利于乳酸的生成。葡萄糖消耗完的发现，乳酸浓度有所降低，这可能是乳酸被作为基质利用^[164]。锰离子在有些微生物代谢中起重要的调控作用，是乳酸菌脱氢酶等微生物酶的辅因子，是发酵必不可少^[107, 165]。与之相反，在霉菌柠檬酸发酵中锰离子的微量存在，会导致柠檬酸不能够大量积累^[159]。

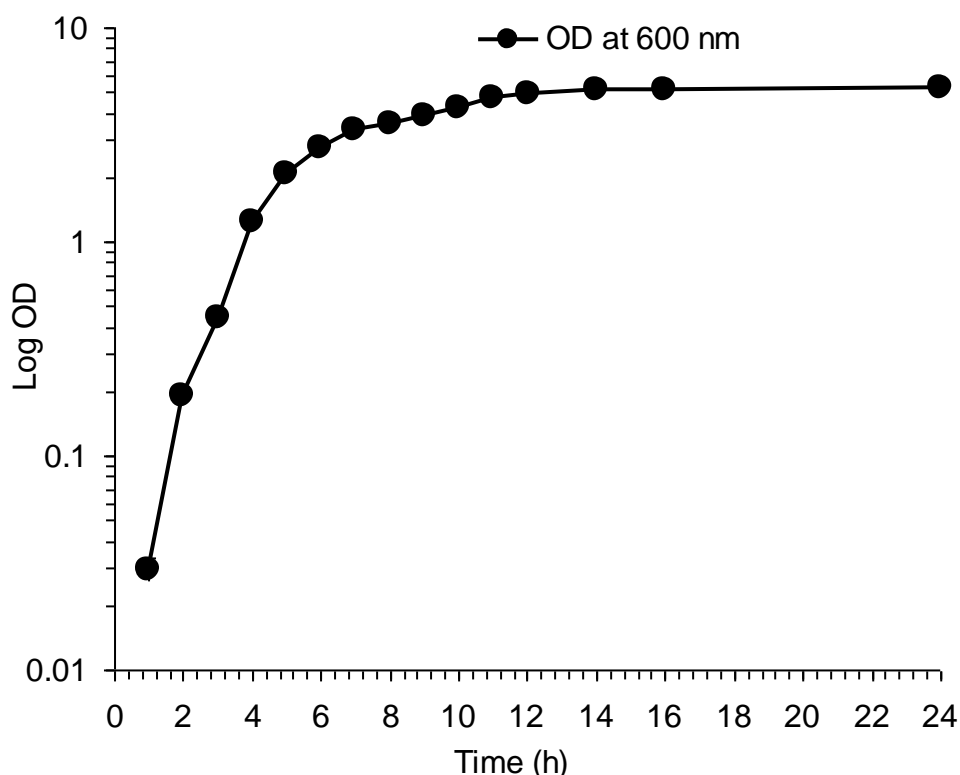


图 4.8 *P. acidilactici* DQ2 在 MRS 培养基中 42 °C 培养生长曲线

Fig. 4.8 Growth curve of *P. acidilactici* DQ2 in MRS medium at 42 °C

P. acidilactici DQ2 在 100 mL 摇瓶中培养，装液量 20 mL，单菌落接种；42 °C，150 rpm 培养，每个点取两个摇瓶，检测 600 nm 吸光值。

表 4.1 *P. acidilactici* DQ2 在不同培养基中的乳酸得率

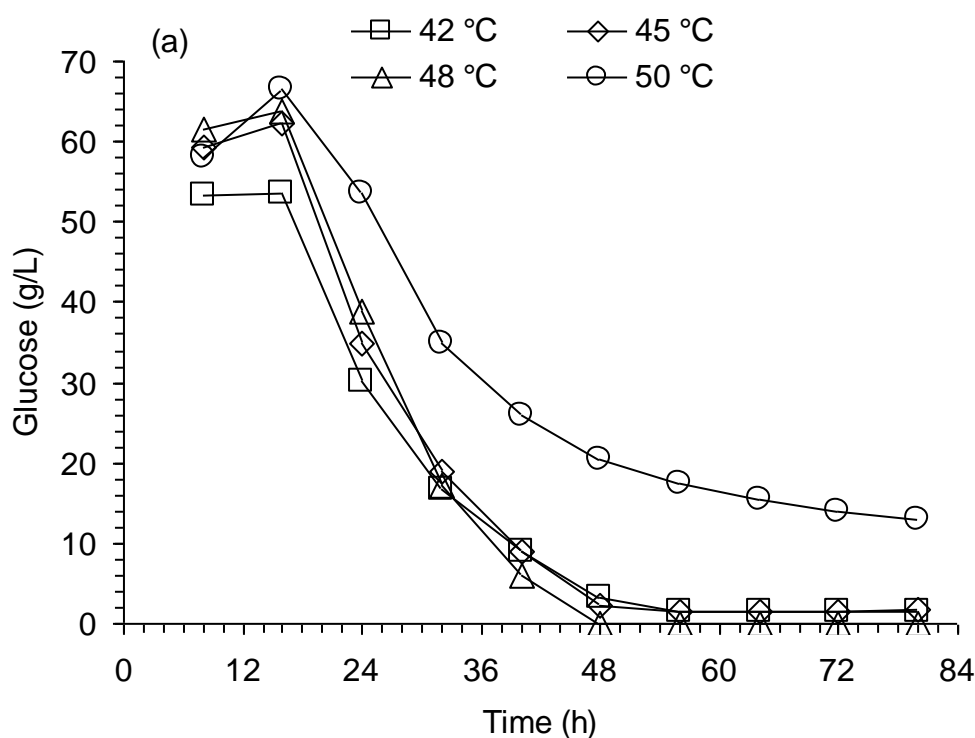
Table 4.1 Lactate yield of *P. acidilactici* DQ2 cultured in different medium

培养基	乳酸得率 %	培养基	乳酸得率 %
SM 培养基	52.7 ±5.4	MRS 去除柠檬酸氢二铵	69.6±2.8
MRS 培养基	87.5±2.9	MRS 去除吐温	71.8±0.5
无乙酸钠	20.6 ±0.1	MRS 去除牛肉膏	82.0±3.5
2 g/L 乙酸钠	27.4 ±1.5	MRS 去除酵母膏	71.7±5.7
5 g/L 乙酸钠	31.5 ±0.1	MRS 去除四水合硫酸锰	49.2±0.6
8 g/L 乙酸钠	33.0±1.5	0.1 g/L 四水合硫酸锰	87.9±3.0
10g/L 乙酸钠	34.4±1.5	0.25 g/L 四水合硫酸锰	79.5±1.1
		0.5 g/L 四水合硫酸锰	82.4±1.8
		0.75 g/L 四水合硫酸锰	80.4±3.0

培养基实验在 250 mL 摇瓶中进行，装液量 50 mL，接种量 5% (v/v)，摇瓶中加入固体碳酸钙控制发酵液 pH，发酵温度 42 °C，转速 150 rpm，每个实验条件做 3 个平行实验。乳酸得率计算基于 1 g 葡萄糖理论转化为 1 g 乳酸，摇瓶发酵 24 h 时计算乳酸得率。四水合硫酸锰实验：在 MRS 培养基中添加不同浓度硫酸锰；乙酸钠实验：在 SM 培养基添加不同浓度乙酸钠，其中没有加碳酸钙。

4.3.9 *Pediococcus acidilactici* DQ2 高温同步糖化与发酵玉米秸秆生产乳酸

一般真菌商业纤维素酶的最适作用温度是 50 °C 和 pH 4.0-5.0^[126]，因此在同步糖化利用木质纤维素原料时，研究者都希望尽可能提高温度，以充分发挥纤维素酶的最佳效



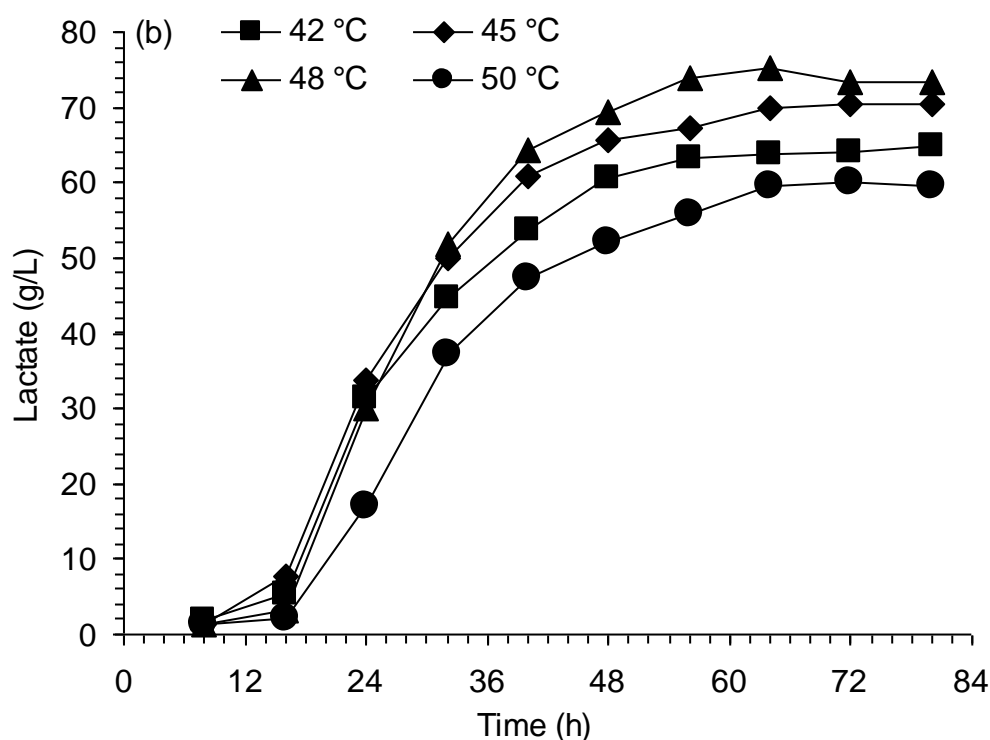


图 4.9 *P.acidilactici* DQ2 在不同温度同步糖化与发酵生物脱毒玉米秸秆生产乳酸

Fig. 4.9 Lactate production by SSF of bioabated corn stover using *P.acidilactici* DQ2

同步糖化与发酵实验在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行，工作体积 2.5 L，纤维素酶用量 15 FPU/g DM，设定固含量 25%，搅拌转速 150 rpm，过程 pH 5.5，纤维素酶在 0 时刻加入，玉米秸秆原料从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，50 °C 预酶解 8 h，调整到不同温度（42, 45, 48, 50 °C）接种乳酸菌发酵。（a）葡萄糖，（b）乳酸。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。能。*P. acidilactici* DQ2 在不同温度（42, 45, 48, 50 °C）同步糖化与发酵生物脱毒秸秆，结果见图 4.9，表明在宽泛的高温发酵范围（42-50 °C），*P. acidilactici* DQ2 能够很好的适用于同步糖化与发酵生物脱毒秸秆生产乳酸。各温度条件同步糖化与发酵实验都在 50 °C 预水解 12 h，因此发酵初始葡萄糖浓度约在 60 g/L。对于发酵过程葡萄糖消耗而言，只有在 50 °C 发酵时，葡萄糖的消耗变缓，最后有 15 g/L 残留，而在其他发酵温度葡萄糖变化曲线几乎一致即接种 8 h 后葡萄糖开始迅速降低，最后葡萄糖完全消耗（图 4.9 (a)）。同样，乳酸的生成也是在 50 °C 发酵时略差，乳酸浓度低于其他发酵温度，在 42-48 °C 随着发酵温度的升高，乳酸浓度增加，在 48 °C 乳酸的浓度最高，这可能得益于在 48 °C 最大化纤维素酶的水解能力以及乳酸 *P. acidilactici* DQ2 高温耐受性和发酵能力。在利用真实的木质纤维素原料生产乳酸的报道中，还未见高温发酵获得这样高乳酸浓度的。一般乳酸菌复杂的营养需求限制了乳酸的生产和应用，特别是在发酵木质纤维素原料时，成本控制变得非常关键。*P. acidilactici* DQ2 能够在低营养的条件下发酵有利用生产乳酸的成本降低，能够如酵母在厌氧条件下发酵，这也能够降低成本^[114]，因为高黏纤维体系中通气的难度和成本很高；高温发酵不仅能够降低纤维素酶用量，还能提高传递速率，节约冷水成本等许多优势^[16]。提高固体纤维素含量、纤维素酶用量以

及改变发酵策略如补料, pH 控制, 边分离乳酸边发酵等^[93]进一步提高乳酸发酵水平。

4.3.10 *Pediococcus acidilactici* DQ2 在不同培养基发酵的比较

乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 分别应用于同步糖化与发酵生物脱毒秸秆以及发酵生物

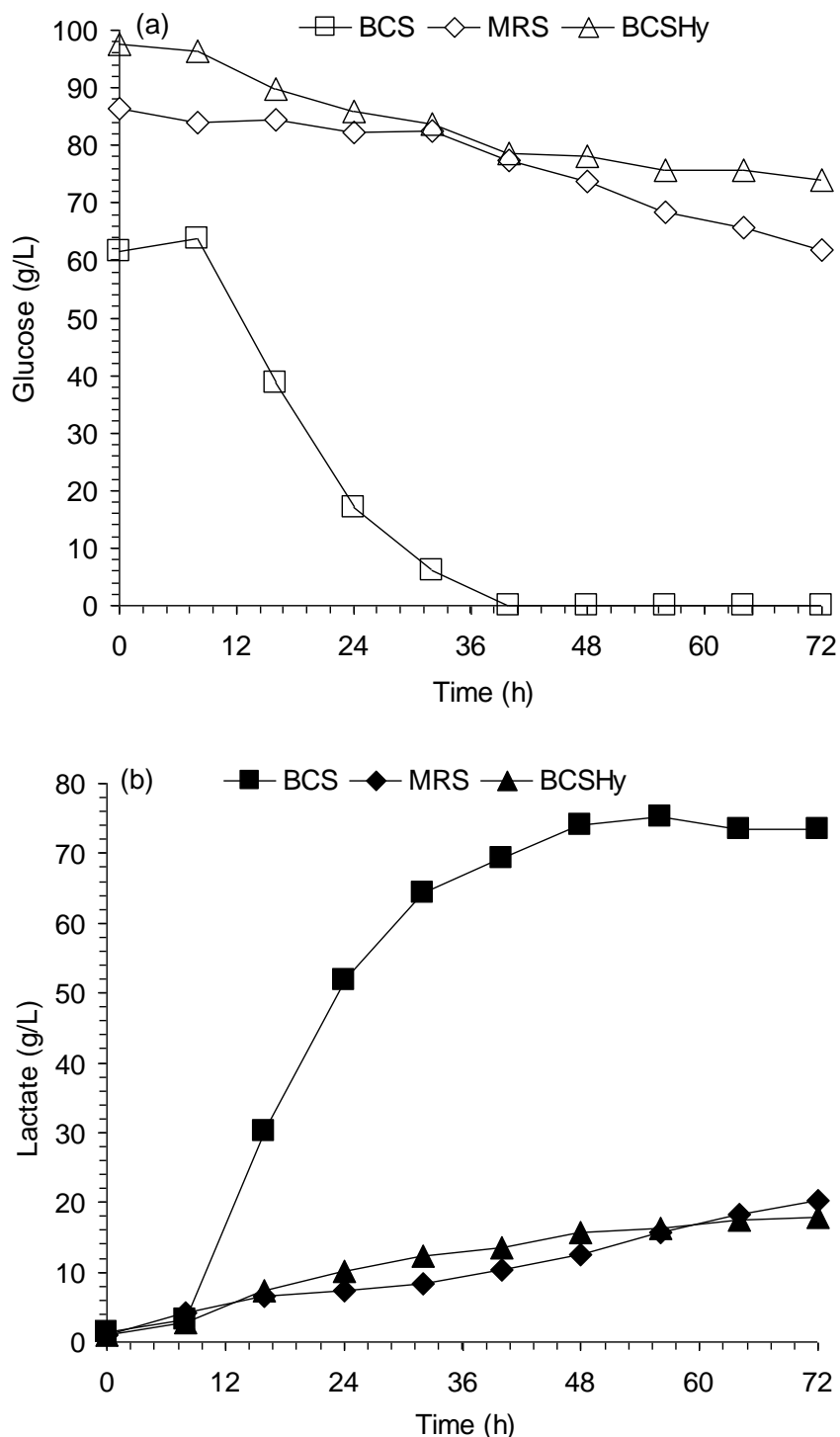


图 4.10 *P. acidilactici* DQ2 应用在不同的发酵基质中生产乳酸

Fig. 4.10 Comparison of lactate production by using *P. acidilactici* DQ2 in BCS, MRS, and BCSHy 同步糖化与发酵生物脱毒玉米秸秆 (BCS) 在配有螺带型搅拌桨的 5 L 发酵罐中进行, 工作体积 2.5 L, 纤维素酶用量 15 FPU/g DM, 设定固含量 25%, 搅拌转速 150 rpm, 过程 pH 5.5, 纤维素酶在 0

时刻加入，原料基质从 0 时刻开始逐步加入，8 h 内补加完毕，50 °C 预酶解 8 h，48 °C 接种乳酸菌发酵。MRS，BCSHy 分别是指 MRS 培养基，生物脱毒秸秆酶水解液的上清液，发酵在 3L 玻璃发酵罐中，磁力搅拌，装液量 1.5 L，维持 pH 5.5，0 时刻即接种乳酸菌开始发酵。(a) 葡萄糖，(b) 乳酸。玉米秸秆稀酸预处理的条件：190 °C，3 min，2.5% H₂SO₄。

脱毒秸秆酶水解的上清液和 MRS 培养基，考查不同培养基对 *P. acidilactici* DQ2 发酵性能的影响实验结果见图 4.10。同步糖化与发酵生物脱毒处理的玉米秸秆操作过程首先在 50 °C 预水解 12 h，再降低发酵温度至 48 °C 接种乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2，发酵 8 h 后初始积累的葡萄糖开始迅速消耗，乳酸大量生成；发酵 36 h 后纤维素糖化成为限制步骤，葡萄糖生成不足，造成乳酸生成缓慢，浓度趋于稳定，乳酸最高浓度 75.3 g/L，基于秸秆中的纤维素乳酸得率为 63%。在含有相近浓度葡萄糖的 MRS 培养基和脱毒秸秆水解液中，*P. acidilactici* DQ2 乳酸发酵缓慢，而且没有出现发酵速度剧增的阶段，发酵 72 h 时还残留有 75% 的初始葡萄糖量，乳酸约为 20 g/L，这两种培养基的发酵曲线几乎完全一致。尽管发酵初始糖浓度有差异，但是由于秸秆是同步糖化发酵过程，因此总糖浓度差别不大。初始糖浓度差异并不是造成不同培养基发酵差别的原因，因为在对微生物初始糖浓度影响实验中发现，不同初始糖浓度对微生物发酵没有影响（数据未给出）。*P. acidilactici* DQ2 在利用木质纤维素原料发酵时表现明显优于用 MRS 培养基或水解液。还可以通过进一步强化秸秆预处理，提高秸秆固体的含量，改变发酵策略，纤维素酶浓度等，从而提高乳酸浓度和得率。无论是利用淀粉类或纤维素基质，同步糖化与发酵工艺都有利于生产成本的降低，因此受到研究者的关注。以秸秆为原料同步糖化与发酵产乳酸，还没有这么高浓度的报道^[116]。乳酸菌的种类很多，且有各种各样的分离来源，不同来源的微生物生理性能差异很大。一般来说，来源于某栖息地的微生物，就在对应的环境下生长能力会更强，这可能是因为在对应条件下更容易利用基质和营养物质^[110]，也可能是微生物的基因在环境诱导下发生适应性变化^[166]。*P. acidilactici* DQ2 分离于生物脱毒的玉米秸秆，自然能够耐受这种环境，因而在同步糖化与发酵秸秆过程，微生物存活能力强，延滞期短，乳酸发酵迅速。纤维素原料如秸秆在生长过程不仅合成大量的碳水化合物，同时也积累了氮，钾以及镁，锰，钙等微量元素^[108, 109]，预处理后转化为复杂的营养基质，为乳酸菌的生长和发酵提供了多种营养补给和刺激因素。*P. acidilactici* DQ2 可能是一种典型的木质纤维素依赖型菌种。

4.4 本章小结

1. 在研究高温同步糖化与发酵生物脱毒处理的玉米秸秆生产乙醇的过程，有乳酸的生成。乳酸的生成原因主要来源于生物脱毒物料，因为即使在高温灭菌、不接种酵母，以及混合物料发酵时都能产生乳酸。氨水处理物料能够一定程度控制乳酸的形成。实验发现高温发酵条件下，乳酸的形成具有显著优势，因此用物料分离出产乳酸微生物具有积极意义。

2. 在含有乳酸的乙醇发酵醪液中，分离出一株产乳酸菌，根据 16S rDNA 鉴定是

乳酸片球菌 (*Pediococcus acidilactici*), 并命名菌株为 *Pediococcus acidilactici* DQ2, 该菌株 42 °C 在 MRS 培养, 能够迅速生长, 同时发现 MRS 培养基中的乙酸钠和硫酸锰组分能够促进乳酸的发酵。

3. *P. acidilactici* DQ2 能够在宽泛的温度 (~50 °C) 同步糖化与发酵玉米秸秆生产乳酸, 在高温 (48 °C) 下同步糖化与发酵生物脱毒的玉米秸秆迅速生产乳酸, 乳酸浓度和得率分别到 75 g/L 和 63%。这个温度能匹配商业纤维素酶最适水解温度, 而且还有下述特点: 营养需求低, 耐受性好, 厌氧发酵, 这些特点使 *P. acidilactici* DQ2 非常适合于大规模纤维素乳酸发酵并具有工业应用的潜力。

4. 本研究的创新点为首次分离了源自木质纤维素的嗜热乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 并在高温下实现木质纤维素乳酸生产, 与国内外研究相比, 在该微生物具有突出的优势, 可以同步糖化和发酵工艺转化高浓度真实纤维素原料生产高浓度乳酸, 为该领域首次报道。

第 5 章 结论与展望

同步糖化与发酵木质纤维素原料中的纤维素糖化过程是整个工艺的限制因素，寻求能够匹配纤维素酶最适温度的高温发酵微生物是解决这个瓶颈的方法之一。高温发酵是纤维素原料生物加工的难点和热点，本研究得出如下结论：

1. 纤维素酶的滤纸单位与酶水解滤纸产物之间存在指数关系，根据这一关系建立基于液相色谱分析的纤维素酶活分析。基于此发现，本方法创新地使用了具有准确定量能力的液相色谱分析工具来获得水解产物中葡萄糖和纤维二糖浓度之比，从而表征纤维素酶水解纤维素生成单糖的能力。不同的商业纤维素酶水解玉米秸秆时表现差异很大，添加葡萄糖苷酶能够提高纤维素酶水解获得单糖的能力。

2. 商业纤维素酶水解滤纸和预处理的玉米秸秆差异很大。单以纤维素酶的滤纸单位为指标不能够反应纤维素酶实际水解产物的组成。在水解产物中纤维二糖积累时，通过添加纤维二糖酶能够显著提高葡萄糖和纤维二糖浓度之比。

3. 本研究的创新在于使用耐高温的酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1，在高固含量下同步糖化与发酵真实的纤维素基质原料生产乙醇。酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 能够在 40 °C 以上生长和发酵，可以应用于高温（40 °C）直接同步糖化与发酵稀酸预处理的玉米秸秆生产乙醇，在固含量 20% (w/w)，纤维素酶用量 5 FPU/g DM，发酵效果优于常温发酵。若提高温度（40 °C）直接同步糖化与发酵高固含量（~30% wt.）和高纤维素酶用量（~15 FPU/g DM）的体系时，*S. cerevisiae* DQ1 发酵或缓慢，或停滞，发酵体系葡萄糖明显积累，至少在于以下几点：酵母在 40 °C 生存能力相对较弱，只有 35 °C 生长能力的 70%，长时间高温培养酵母逐步失去活性；纤维素酶浓度对酿酒酵母的存活有负面作用，固含量和酶用量的提高，都会升高体系的酶浓度；固含量的提高使体系中的抑制物积累增加，抑制酵母代谢，延长发酵周期。

4. 发酵模式能够显著影响纤维素乙醇同步糖化与发酵效果。变温发酵模式克服了直接同步发酵模式存在的问题，温度设计兼顾了微生物最适温度和纤维素酶活性。酿酒酵母 *S. cerevisiae* DQ1 是一株生存能力强的酵母菌株，具有抑制物和温度的双重耐受性，同时具有强的在位脱毒能力，适合于纤维乙醇发酵。

5. 在研究生物脱毒玉米秸秆高温同步糖化与发酵生产乙醇的过程，发现有乳酸的形成。从乙醇发酵液中分离出一株产乳酸菌，根据 16S rDNA 鉴定是乳酸片球菌 *Pediococcus acidilactici*，并命名菌株为 *P. acidilactici*DQ2，该菌株在 42 °C，MRS 培养中能够迅速生长，MRS 培养基中的乙酸钠和硫酸锰组分能够促进乳酸生成。

6. *Pediococcus acidilactici* DQ2 同步糖化玉米秸秆生产乳酸到 75 g/L，得率到 63%，能够在宽泛的温度（~50°C）发酵，这个温度匹配商业纤维素酶最适水解温度，且有下述特点：营养需求低，耐受性好，厌氧发酵，使其适合于大规模以及工业化纤维素乳酸发酵。这是首次分离到能够产乳酸的嗜热菌 *Pediococcus acidilactici* DQ2 并在高温下成

功实现同步糖化与发酵木质纤维素原料生产乳酸。

基于当前研究的后续展望：

1. 基于液相色谱分析的纤维素酶活测定方法，可以推广到其他种类纤维素酶，以及分析发酵液低纤维素酶活性的样品如野生型菌株所产的粗酶液和发酵醪液中的残留酶活，也可用于以实际木质纤维素原料为基质的纤维素酶活优化和评价。

2. 从研究现状看高温发酵是个热点但是仍停留在初步阶段，高温联合生物加工（consolidated bioprocessing, CBP）是一个巨大的应用前景。微生物在高温下具备强的生长能力且高的压力耐受性是高温发酵的先决条件，这就需要广泛地筛选的微生物；同时，由于高温下，微生物的耐受能力会降低，高温微生物必须在实际纤维素基质和发酵条件下检验，特别是如高基质浓度，纤维素酶用量和抑制物水平等。另外，微生物温度耐受的机理，以及在升温情况下抑制物、纤维素酶、乙醇对微生物的影响规律需要探明。

3. 嗜热乳酸菌 *P. acidilactici* DQ2 能够高温发酵木质纤维素成功地生产乳酸，为纤维素原料高温发酵提供了范例。乳酸菌能够迅速发酵背后的机理探明，可能为改善发酵工艺以及为使用其他微生物作高温发酵提供借鉴。*P. acidilactici* DQ2 高的温度耐受和发酵性能为高温乙醇发酵、多基质利用、CBP 菌株等提供了良好的基因改造母株。

参考文献

- [1] Chandel A K, Singh O V. Weedy lignocellulosic feedstock and microbial metabolic engineering: advancing the generation of 'Biofuel'. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 89: 1289-1303
- [2] Dashtban M, Maki M, Leung K T, *et al.* Cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2010, 30: 302-309
- [3] Bozell J J, Petersen G R. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the US Department of Energy's "Top 10" revisited. *Green Chemistry*. 2010, 12: 539-554
- [4] Kumar R, Singh S, Singh O V. Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2008, 35: 377-391
- [5] 孙逸, 贺稚非. 纤维素发酵生产酒精的研究进展. *农产品加工: 创新版*. 2009, 4: 70-73
- [6] Sheehan J, Himmel M. Enzymes, energy, and the environment: A strategic perspective on the U.S. department of energy's research and development activities for bioethanol. *Biotechnology Progress*. 1999, 15: 817-827
- [7] Lynd L R, Laser M S, Brandsby D, *et al.* How biotech can transform biofuels. *Nature Biotechnology*. 2008, 26: 169-172
- [8] Chundawat S P S, Beckham G T, Himmel M E, *et al.* Deconstruction of lignocellulosic biomass to fuels and chemicals. *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2011, 2: 121-145
- [9] Geddes C C, Nieves I U, Ingram L O. Advances in ethanol production. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011, 22: 312-319
- [10] Huber G W. 2008. Breaking the chemical and engineering barriers to lignocellulosic biofuels: Next generation hydrocarbon biorefineries. University of Massachusetts Amherst. National Science Foundation. Chemical, Bioengineering, Environmental, and Transport Systems Division. Washington D.C. PP. 1-181.
- [11] Zhang Y H P, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies. *Biotechnology Advances*. 2006, 24: 452-481
- [12] Cherry J, Merino S T. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Biofuels*. 2007, 108: 95-120
- [13] 康纪婷, 吴翔, 甘炳成, 等. 纤维素酶活力测定方法. *河北农业科学*. 2010, 14: 151-153

- [14] Liden G, Olofsson K, Bertilsson M. A short review on SSF-an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*. 2008, 1: 7
- [15] Folkert G. 2011. Biocatalyst for fermenting hydrolyzate at low pH and high temperature. Catgill Inc. <http://obpreview2011.govtools.us/presenters/public/InSecureDownload.aspx?filename=Cargill%20Ethanolgen%20DOE%20Update%20Feb.%202011.pdf>.
- [16] Abdel-Banat B M A, Hoshida H, Ano A, *et al.* High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 85: 861-867
- [17] Shaw A J, Podkaminer K K, Desai S G, *et al.* Metabolic engineering of a thermophilic bacterium to produce ethanol at high yield. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008, 105: 13769-13774
- [18] Ou M S, Ingram L O, Shanmugam K T. *L(+)*-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2011, 38: 599-605
- [19] 赖智乐, 常春, 马晓建. 同步糖化发酵在纤维乙醇生产中的研究进展. *酿酒科技*. 2009, 7: 86-90
- [20] Wilson D, Irwin D. 1999. Genetics and properties of cellulases. in: *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*, (Eds.) G. Tsao, A. Brainard, H. Bungay, *et al.*, Vol. 65, Springer Berlin / Heidelberg, pp. 1-21.
- [21] 方翎, 曲音波. 纤维素酶在木质纤维素转化产糖技术中的开发与应用. *生物产业技术*. 2010, 4: 48-51
- [22] Gregg D J, Saddler J N. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnology and Bioengineering*. 1996, 51: 375-383
- [23] Martinez D, Berka R M, Henrissat B, *et al.* Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nature Biotechnology*. 2008, 26: 553-560
- [24] Voutilainen S P, Puranen T, Siika-Aho M, *et al.* Cloning, expression, and characterization of novel thermostable family 7 cellobiohydrolases. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, 101: 515-528
- [25] Rosgaard L, Pedersen S, Cherry J R, *et al.* Efficiency of new fungal cellulase systems in boosting enzymatic degradation of barley straw lignocellulose. *Biotechnology Progress*. 2006, 22: 493-498
- [26] Gao D H, Uppugundla N, Chundawat S P S, *et al.* Hemicellulases and auxiliary enzymes

- for improved conversion of lignocellulosic biomass to monosaccharides. *Biotechnology for Biofuels*. 2011, 4: 5
- [27] Sanchez C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances*. 2009, 27: 185-194
- [28] Arantes V, Sessler J N. Cellulose accessibility limits the effectiveness of minimum cellulase loading on the efficient hydrolysis of pretreated lignocellulosic substrates. *Biotechnology for Biofuels*. 2011, 4: 3
- [29] Klein-Marcuschamer D, Oleskowicz-Popiel P, Simmons B A, *et al.* The challenge of enzyme cost in the production of lignocellulosic biofuels. *Biotechnology and Bioengineering*. 2012, 109: 1083-1087
- [30] Zhang Y H, Hong J, Ye X. 2009. *Cellulase Assays*, Vol. 581, pp. 213-231.
- [31] Eveleigh D E, Mandels M, Andreotti R, *et al.* Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnology for Biofuels*. 2009, 2: 21
- [32] Ghose T K. Measurement of cellulase activities. *Pure and Applied Chemistry*. 1987, 59: 257-268
- [33] Adney B, Baker J. 1996. Measurement of cellulase activity. National Renewable Energy Laboratory. Technical Report NREL/TP-510-42628, available from: <http://www.nrel.gov/biomass/pdfs/42628.pdf>.
- [34] Coward-Kelly G, Aiello-Mazzari C, Kim S, *et al.* Suggested improvements to the standard filter paper assay used to measure cellulase activity. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003, 82: 745-749
- [35] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*. 1959, 31: 426-428
- [36] Schwald W, Chan M, Breuil C, *et al.* Comparison of HPLC and colorimetric methods for measuring cellulolytic activity. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1988, 28: 398-403
- [37] Wood T M, Bhat K M. 1988. Methods for measuring cellulase activities. in: *Methods in Enzymology*, (Ed.) S. T. K. Willis A. Wood, Vol. Volume 160, Academic Press, pp. 87-112
- [38] Breuil C S, J.N. Comparison of the 3,5-dinitrosalicylic acid and Nelson-Somogyi methods of assaying for reducing sugars and determining cellulase activity *Enzyme and Microbial Technology*. 1985, 7: 327-332
- [39] Johnston D B, Shoemaker S P, Smith G M, *et al.* Kinetic measurements of cellulase activity on insoluble substrates using Disodium 2, 2' bichinoninate. *Journal of Food Biochemistry*. 1998, 22: 301-319
- [40] Nordmark T, Bakalinsky A, Penner M. Measuring cellulase activity: Application of the f

- ilter paper assay to low-activity enzyme preparations. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2007, 137-140: 131-139
- [41] King B C, Donnelly M K, Bergstrom G C, *et al.* An optimized microplate assay system for quantitative evaluation of plant cell wall-degrading enzyme activity of fungal culture extracts. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009, 102: 1033-1044
- [42] Decker S R, Adney W S, Jennings E, *et al.* Automated filter paper assay for determination of cellulase activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2003, 105: 689-703
- [43] Xiao Z Z, Storms R, Tsang A. Microplate-based filter paper assay to measure total cellulase activity. *Biotechnology and Bioengineering*. 2004, 88: 832-837
- [44] Kabel M A, van der Maarel M J E C, Klip G, *et al.* Standard assays do not predict the efficiency of commercial cellulase preparations towards plant materials. *Biotechnology and Bioengineering*. 2006, 93: 56-63
- [45] Wu B, Zhao Y, Gao P J. A new approach to measurement of saccharifying capacities of crude cellulase. *Bioresources*. 2006, 1: 189-200
- [46] Zhang J Y, Shao X J, Lynd L R. Simultaneous saccharification and co-fermentation of paper sludge to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* RWB222. Part II: Investigation of discrepancies between predicted and observed performance at high solids concentration. *Biotechnology and Bioengineering*. 2009, 104: 932-938
- [47] Hu G, Heitmann J A, Rojas O J. Quantification of Cellulase Activity Using the Quartz Crystal Microbalance Technique. *Analytical Chemistry*. 2009, 81: 1872-1880
- [48] Pryor S W, Nahar N. Deficiency of cellulase activity measurements for enzyme evaluation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 162: 1737-1750
- [49] Navarro D, Couturier M, da Silva G, *et al.* Automated assay for screening the enzymatic release of reducing sugars from micronized biomass. *Microbial Cell Factories*. 2010, 9: 58
- [50] 王林凤, 付天松. 纤维乙醇用酵母菌的驯化. *中国酿造*. 2011, 8: 141-143
- [51] 庞会利, 李景原, 秦广雍. 耐高温乙醇酵母的研究现状及进展. *酿酒科技*. 2008, 2: 99-102
- [52] Jin C T, Han N, Wu X C, *et al.* Isolation and characterization of a highly thermotolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*. 2005, 55: 57-61
- [53] Menon V, Divate R, Rao M. Bioethanol production from renewable polymer lichenan using lichenase from an alkalothermophilic *Thermomonospora* sp and thermotolerant yeast. *Fuel Processing Technology*. 2011, 92: 401-406
- [54] Park I, Kim I, Kang K, *et al.* Cellulose ethanol production from waste newsprint by simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*

- KNU5377. *Process Biochemistry*. 2010, 45: 487-492
- [55] Watanabe T, Srichuwong S, Arakane M, *et al.* Selection of stress-tolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash to ethanol. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 9710-9714
- [56] Sridhar M, Sree N K, Rao L V. Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. *Bioresource Technology*. 2002, 83: 199-202
- [57] Edgardo A, Carolina P, Manuel R, *et al.* Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*. 2008, 43: 120-123
- [58] Rajoka M I, Ferhan M, Khalid A M. Kinetics and thermodynamics of ethanol production by a thermotolerant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* in a microprocessor-controlled bioreactor. *Letters in Applied Microbiology*. 2005, 40: 316-321
- [59] Kadar Z, Szengyel Z, Reczey K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Industrial Crops and Products*. 2004, 20: 103-110
- [60] Krishna S H, Reddy T J, Chowdary G V. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. *Bioresource Technology*. 2001, 77: 193-196
- [61] 邹建忠. 耐高温酵母的选育及其生长特性的研究. *酿酒科技*. 2009, 6: 52-56
- [62] 李振林, 夏海华, 吕伟民. 耐高温酒精酵母的选育. *酿酒*. 2011, 38: 77-79
- [63] 王娜娜, 姚秀清, 张全, 等. 耐热酿酒酵母 FE-B 的分离筛选及应用研究. *应用化工*. 2011, 40: 1215-1218
- [64] Faga B A, Wilkins M R, Banat I M. Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D₅A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 2273-2279
- [65] Rodrussamee N, Lertwattanasakul N, Hirata K, *et al.* Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugars and glucose effect under various conditions in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2011, 90: 1573-1586
- [66] Garcia-Aparicio M P, Oliva J M, Manzanares P, *et al.* Second-generation ethanol production from steam exploded barley straw by *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Fuel*. 2011, 90: 1624-1630
- [67] Kumar S, Singh S P, Mishra I M, *et al.* Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by *Kluyveromyces* sp. IIPE453. *Journal of Industrial*

- Microbiology & Biotechnology. 2009, 36: 1483-1489
- [68] Ozmihci S, Kargi F. Ethanol fermentation of cheese whey powder solution by repeated fed-batch operation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, 41: 169-174
- [69] Gallardo J C M, Souza C S, Cicarelli R M B, *et al.* Enrichment of a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* with the yeast *Issatchenkia orientalis* in the production of ethanol at increasing temperatures. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2011, 38: 405-414
- [70] Urano N, Ueno R, Kimura S. Effect of temperature and cell density on ethanol fermentation by a thermotolerant aquatic yeast strain isolated from a hot spring environment. *Fisheries Science*. 2002, 68: 571-578
- [71] Kadam K L, Schmidt S L. Evaluation of *Candida acidothermophilum* in ethanol production from lignocellulosic biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997, 48: 709-713
- [72] Jin M J, Balan V, Gunawan C, *et al.* Consolidated bioprocessing (CBP) performance of *Clostridium phytofermentans* on AFEX-treated corn stover for ethanol production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011, 108: 1290-1297
- [73] Cripps R E, Eley K, Leak D J, *et al.* Metabolic engineering of *Geobacillus thermoglucosidasius* for high yield ethanol production. *Metabolic Engineering*. 2009, 11: 398-408
- [74] Deak T. 2006. Environmental factors influencing yeasts. in: *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, (Eds.) G. Péter, C. Rosa, Springer Berlin Heidelberg, pp. 155-174.
- [75] 蒋西然, 刘纪文, 李文利. 嗜热菌在纤维素乙醇中的研究进展及应用前景. *生命科学研究*. 2010, 14: 449-455
- [76] Tomas-Pejo E, Garcia-Aparicio M, Negro M J, *et al.* Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes. *Bioresource Technology*. 2009, 100: 890-895
- [77] Suryawati L, Wilkins M R, Bellmer D D, *et al.* Simultaneous saccharification and fermentation of kanlow switchgrass pretreated by hydrothermolysis Using *Kluyveromyces marxianus* IMB4. *Biotechnol Bioeng*. 2008, 101: 894-902
- [78] Anderson P J, McNeil K, Watson K. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40 °C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. *Applied and Environmental Microbiology*. 1986, 51: 1314-1320
- [79] Bollok M, Reczey K, Zacchi G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2000, 84-6: 69-80

- [80] 康聪聪, 马晓建. 纤维乙醇发酵醪流变特性研究. 中国酿造. 2011, 6: 100-103
- [81] Galbe M, Sassner P, Wingren A, *et al.* Process economics engineering of bioethanol production. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2007, 108: 303-327
- [82] Tomas-Pejo E, Oliva J M, Gonzalez A, *et al.* Bioethanol production from wheat straw by the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 in a simultaneous saccharification and fermentation fed-batch process. *Fuel.* 2009, 88: 2142-2147
- [83] Ballesteros M, Oliva J M, Negro M J, *et al.* Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875. *Process Biochemistry.* 2004, 39: 1843-1848
- [84] 刘海臣, 钱甜甜, 王玉慧, 等. 耐高温酵母利用稻草粉同步糖化发酵的初步研究. 酿酒科技. 2007, 11: 25-28
- [85] Almeida J R M, Modig T, Petersson A, *et al.* Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology.* 2007, 82: 340-349
- [86] Kumar R, Wyman C E. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnology Progress.* 2009, 25: 302-314
- [87] Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Critical Reviews in Biotechnology.* 2011, 31: 20-31
- [88] Tian S, Zhu J, Yang X. Evaluation of an adapted inhibitor-tolerant yeast strain for ethanol production from combined hydrolysate of softwood. *Applied Energy.* 2011, 88: 1792-1796
- [89] Sassner P, Galbe M, Zacchi G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content. *Enzyme and Microbial Technology.* 2006, 39: 756-762
- [90] Hodge D B, Karim M N, Schell D J, *et al.* Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Bioresource Technology.* 2008, 99: 8940-8948
- [91] Ballesteros M, Oliva J M, Negro M J, *et al.* Effects of acetic acid, furfural and catechol combinations on ethanol fermentation of *Kluyveromyces marxianus*. *Process Biochemistry.* 2006, 41: 1223-1228
- [92] Ehrhardt M R, Monz T O, Root T W, *et al.* Rheology of dilute acid hydrolyzed corn stover at high solids concentration. *Applied Biochemistry and Biotechnology.* 2010, 160: 1102-1115
- [93] Yadav A K, Chaudhari A B, Kothari R M. Bioconversion of renewable resources into

- lactic acid: an industrial view. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2011, 31: 1-19
- [94] Jem K, van der Pol J, de Vos S. 2010. Microbial Lactic Acid, Its Polymer Poly(lactic acid), and Their Industrial Applications. in: *Plastics from Bacteria*, (Ed.) G. G.-Q. Chen, Vol. 14, Springer Berlin / Heidelberg, pp. 323-346.
- [95] Bischoff K M, Liu S Q, Hughes S R, *et al.* Fermentation of corn fiber hydrolysate to lactic acid by the moderate thermophile *Bacillus coagulans*. *Biotechnology Letters*. 2010, 32: 823-828
- [96] Patel M A, Ou M S, Harbrucker R, *et al.* Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006, 72: 3228-3235
- [97] Abdel-Rahman M A, Tashiro Y, Zendo T, *et al.* Efficient homofermentative L-(+)-lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium, *Enterococcus mundtii* QU 25. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77: 1892-1895
- [98] Sakai K, Kitpreechavanich V, Maneeboon T, *et al.* Comparative characterization of L-lactic acid-producing thermotolerant *Rhizopus* fungi. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008, 106: 541-546
- [99] Wee Y J, Yun J S, Park D H, *et al.* Isolation and characterization of a novel lactic acid bacterium for the production of lactic acid. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2004, 9: 303-308
- [100] Maas R H W, Bakker R R, Jansen M L A, *et al.* Lactic acid production from lime-treated wheat straw by *Bacillus coagulans*: neutralization of acid by fed-batch addition of alkaline substrate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, 78: 751-758
- [101] Hofvendahl K, Hahn-Hagerdal B. Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology*. 2000, 26: 87-107
- [102] 陈育如, 夏黎明, 岑沛霖. 一株乳杆菌对蒸汽爆破处理纤维物料的乳酸发酵研究. *生物加工过程*. 2003, 1: 26-29
- [103] 崔国艳, 陈五岭, 张雄鹰, 等. 耐高温乳酸菌的分离与鉴定. *长治医学院学报*. 2009, 23: 102-104
- [104] Zhao B, Wang L, Li F, *et al.* Kinetics of d-lactic acid production by *Sporolactobacillus* sp. strain CASD using repeated batch fermentation. *Bioresource Technology*. 2010, 6499-6505
- [105] 陈育如, 夏黎明. 纤维素酶和米根霉同时糖化发酵纤维素为 L-乳酸. *食品与发酵工业*. 2000, 26: 6-9
- [106] Shanmugam K T, Su Y, Rhee M S, *et al.* Physiological and fermentation properties of

- Bacillus coagulans and a mutant lacking fermentative lactate dehydrogenase activity. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 2011, 38: 441-450
- [107] Fitzpatrick J J, Ahrens M, Smith S. Effect of manganese on *Lactobacillus casei* fermentation to produce lactic acid from whey permeate. Process Biochemistry. 2001, 36: 671-675
- [108] Chundawat S P S, Vismeh R, Sharma L N, *et al.* Multifaceted characterization of cell wall decomposition products formed during ammonia fiber expansion (AFEX) and dilute acid based pretreatments. Bioresource Technology. 2010, 101: 8429-8438
- [109] Penny A. Cellulosic ethanol from corn stover-Calculating and improving the bottom line. Agricultural Research Magazine. 2008, 56: 14-15
- [110] Parente E, Ciocia F, Ricciardi A, *et al.* Diversity of stress tolerance in *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus paraplantarum*: A multivariate screening study. International Journal of Food Microbiology. 2010, 144: 270-279
- [111] 齐祥, 苏肇秦, 唐勇, 等. 木质纤维素发酵转化乳酸研究进展. 现代农业科技. 2010, 5: 11-13
- [112] 张景强, 林鹿, 孙勇, 等. 木质纤维素发酵乳酸制备生物质塑料的研究. 橡塑资源利用. 2009, 1: 3-8
- [113] 唐勇, 苏肇秦, 赵丹青, 等. 木质纤维素生物炼制及乳酸制备研究进展. 绿色科技. 2011, 1: 169-173
- [114] Weusthuis R A, Lamot I, van der Oost J, *et al.* Microbial production of bulk chemicals: development of anaerobic processes. Trends in Biotechnology. 2011, 29: 153-158
- [115] Abe S, Takagi M. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid. Biotechnology and Bioengineering. 1991, 37: 93-96
- [116] John R P, Anisha, Nampoothiri K M, *et al.* Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. Biotechnology Advances. 2009, 27: 145-152
- [117] Budhavaram N K, Fan Z L. Production of lactic acid from paper sludge using acid-tolerant, thermophilic *Bacillus coagulans* strains. Bioresource Technology. 2009, 100: 5966-5972
- [118] Moldes A B, Alonso J L, Parajo J C. Multi-step feeding systems for lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of processed wood. Bioprocess Engineering. 2000, 22: 175-180
- [119] Moldes A B, Alonso J L, Parajo J C. Strategies to improve the bioconversion of processed wood into lactic acid by simultaneous saccharification and fermentation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology. 2001, 76: 279-284
- [120] Bustos G, Moldes A B, Cruz J M, *et al.* Production of lactic acid from vine-trimming

- wastes and viticulture lees using a simultaneous saccharification fermentation method. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2005, 85: 466-472
- [121] Cruz J M, Moldes A B, Bustos G, *et al.* Integral utilisation of barley husk for the production of food additives. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2007, 87: 1000-1008
- [122] Zhang J, Chu D Q, Huang J, *et al.* Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105: 718-728
- [123] 姚日生, 邓胜松, 齐本坤, 等. Tween80 对稻草水解及同步糖化与发酵产乳酸的影响. *精细化工*. 2008, 25: 155-158
- [124] Zhang J, Wang X S, Chu D Q, *et al.* Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 4480-4488
- [125] Fox D J, Gray P P, Dunn N W, *et al.* An explanation of the discrepancy between the results of h.p.l.c. and DNS assays in the analysis of lignocellulosic hydrolysates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 1984, 34: 171-175
- [126] Dashtban M, Schraft H, Qin W S. Fungal bioconversion of lignocellulosic residues: Opportunities & perspectives. *International Journal of Biological Sciences*. 2009, 5: 578-595
- [127] Wilson D B. Cellulases and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009, 20: 295-299
- [128] Xiao Z Z, Zhang X, Gregg D J, *et al.* Effects of sugar inhibition on cellulases and beta-glucosidase during enzymatic hydrolysis of softwood substrates. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004, 113-16: 1115-1126
- [129] Chauve M, Mathis H, Huc D, *et al.* Comparative kinetic analysis of two fungal β -glucosidases. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 3
- [130] Dowe N, McMillan J. SSF experimental protocols-Lignocellulosic biomass hydrolysis and fermentation. National Renewable Energy Laboratory. 2008, Technical report NREL/TP-510-42630
- [131] Zhang J, Zhu Z N, Wang X F, *et al.* Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1, and the consequent ethanol fermentation. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 26
- [132] Alvira P, Tomas-Pejo E, Ballesteros M, *et al.* Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4851-4861
- [133] Aden A, Ruth M, Ibsen K, *et al.* 2002. Lignocellulosic biomass to ethanol process

- design and economics utilizing co-current dilute acid prehydrolysis and enzymatic hydrolysis for corn stover. National renewable energy laboratory.
- [134] Kazi F K, Fortman J A, Anex R P, *et al.* Techno-economic comparison of process technologies for biochemical ethanol production from corn stover. *Fuel*. 2010, 89: S20-S28
- [135] Humbird D, Davis R, Tao L, *et al.* 2011. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol: dilute-acid pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. National Renewable Energy Laboratory. Technical Report NREL/LTP-5100-47764.
- [136] Soderstrom J, Galbe M, Zacchi G. Effect of washing on yield in one- and two-step steam pretreatment of softwood for production of ethanol. *Biotechnology Progress*. 2004, 20: 744-749
- [137] Martin C, Gonzalez Y, Fernandez T, *et al.* Investigation of cellulose convertibility where science meets business and ethanolic fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2006, 81: 1669-1677
- [138] Girio F M, Fonseca C, Carvalho F, *et al.* Hemicelluloses for fuel ethanol: A review. *Bioresource Technology*. 2010, 101: 4775-4800
- [139] Carvalho F, Duarte L C, Girio F M. Hemicellulose biorefineries: a review on biomass pretreatments. *Journal of Scientific & Industrial Research*. 2008, 67: 849-864
- [140] Ling Z Y, Morimura S, Kida K. Effect of fermentation temperature on relationship between cell viability and trehalose content of *Saccharomyces cerevisiae* KF-7 in repeated-batch fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1995, 80: 204-207
- [141] Zhang J Y, Lynd L R. Ethanol production from paper sludge by simultaneous saccharification and co-fermentation using recombinant xylose-fermenting microorganisms. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 107: 235-244
- [142] Golias H, Dumsday G J, Stanley G A, *et al.* Characteristics of cellulase preparations affecting the simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to ethanol. *Biotechnology Letters*. 2000, 22: 617-621
- [143] Allen S A, Clark W, McCaffery J M, *et al.* Furfural induces reactive oxygen species accumulation and cellular damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2010, 3: 2
- [144] Yuan Y J, Lin F M, Qiao B. Comparative proteomic analysis of tolerance and adaptation of ethanologenic *Saccharomyces cerevisiae* to furfural, a lignocellulosic inhibitory compound. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75: 3765-3776

- [145] Jorgensen H. Effect of nutrients on fermentation of pretreated wheat straw at very high dry matter content by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2009, 153: 44-57
- [146] Joslyn M A. Nutrient requirement of yeast. *Mycopathologia*. 1951, 260-276
- [147] Bi D X, Chu D Q, Zhu P, *et al.* Utilization of dry distiller's grain and solubles as nutrient supplement in the simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high solids loading of corn stover. *Biotechnology Letters*. 2011, 33: 273-276
- [148] Jorgensen H, Sanadi A R, Felby C, *et al.* Production of ethanol and feed by high dry matter hydrolysis and fermentation of palm kernel press cake. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010, 161: 318-332
- [149] Lau M W, Dale B E. Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A(LNH-ST). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009, 106: 1368-1373
- [150] Zhu J Y, Gleisner R, Scott C T, *et al.* High titer ethanol production from simultaneous enzymatic saccharification and fermentation of aspen at high solids: A comparison between SPORL and dilute acid pretreatments. *Bioresource Technology*. 2011, 102: 8921-8929
- [151] Martin C, Marcet M, Almazan O, *et al.* Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource technology*. 2007, 98: 1767-1773
- [152] Kadam K L, Newman M M. Development of a low-cost fermentation medium for ethanol production from biomass. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1997, 47: 625-629
- [153] Lau M W, Dale B E, Balan V. Ethanolic fermentation of hydrolysates from ammonia fiber expansion (AFEX) treated corn stover and distillers grain without detoxification and external nutrient supplementation. *Biotechnology and Bioengineering*. 2008, 99: 529-539
- [154] Ohgren K, Vehmaanpera J, Siika-Aho M, *et al.* High temperature enzymatic prehydrolysis prior to simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated corn stover for ethanol production. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007, 40: 607-613
- [155] Chandra R P, Au-Yeung K, Chanis C, *et al.* The influence of pretreatment and enzyme loading on the effectiveness of batch and fed-batch hydrolysis of corn stover. *Biotechnology Progress*. 2011, 27: 77-85
- [156] De Man J C, Rogosa M, Sharpe M E. A medium for the cultivation of lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*. 1960, 23: 130-135

- [157] Okano K, Tanaka T, Ogino C, *et al.* Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010, 85: 413-423
- [158] Boca B M, Pretorius E, Gochin R, *et al.* An overview of the validation approach for moist heat sterilization, Part I. *Pharmaceutical technology*. 2002, 26: 62-71
- [159] Max B, Salgado M J, Rodriguez N, *et al.* Biotechnological production of citric acid. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010, 41: 862-875
- [160] Okabe M, Lies D, Kanamasa S, *et al.* Biotechnological production of itaconic acid and its biosynthesis in *Aspergillus terreus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009, 84: 597-606
- [161] Sparringa R A, Owens J D. Inhibition of the tempe mould, *Rhizopus oligosporus*, by ammonia. *Letters in Applied Microbiology*. 1999, 29: 93-96
- [162] Tanasupawat S, Okada S. Characterization of *Pediococcus pentosaceus* and *Pediococcus acidilactici* strains and replacement of the type strain of *P. acidilactici* with the proposed neotype DSM 20284. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1993, 43: 860-863
- [163] L. R J, B. D G, Johnston P E, *et al.* Acetate-replacing factors for lactic acid bacteria. I: nature, extraction, and distribution. *Journal of Biological and Chemistry*. 1951, 192: 851-858
- [164] Williams A G, Withers S E, Banks J M. Energy sources of non-starter lactic acid bacteria isolated from Cheddar cheese. *International Dairy Journal*. 2000, 10: 17-23
- [165] Oh Y K, Freese E. Manganese requirement of phosphoglycerate phosphomutase and its consequences for growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 1976, 127: 739-746
- [166] Siezen R J, Tzeneva V A, Castioni A, *et al.* Phenotypic and genomic diversity of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from various environmental niches. *Environmental Microbiology*. 2010, 12: 758-773

附录 I 主要实验试剂与仪器和设备

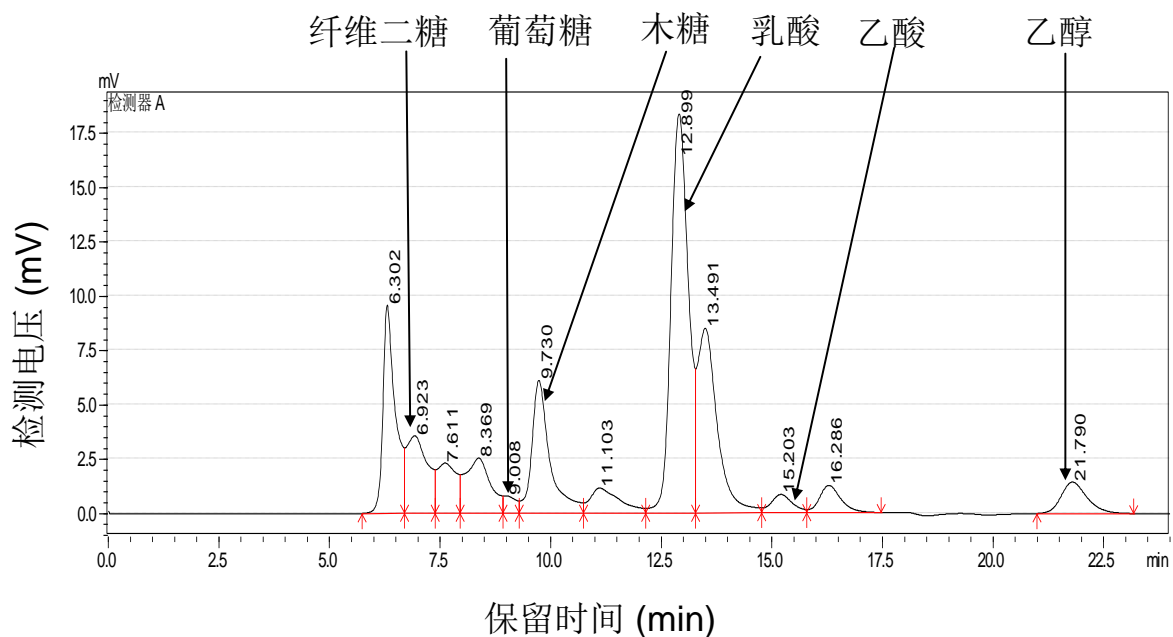
主要试剂

试剂	规格	生产厂家
葡萄糖	食品级	秦皇岛骊骅淀粉股份有限公司
葡萄糖	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
柠檬酸氢二铵	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
乙酸钠	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸氢二钾	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
磷酸二氢钾	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
碳酸钙	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
七水合硫酸镁	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
硫酸锰	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
吐温 80	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
牛肉膏	生化试剂	上海天莲精细化工有限公司
蛋白胨	生化试剂	上海化学试剂采购供应站中心化工厂
酵母膏	生化试剂	国药集团化学试剂有限公司
酵母粉	生化试剂	牛津公司 (OXOID LTD.)
硫酸	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
柠檬酸	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
柠檬酸钠	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
木糖	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
纤维二糖	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
氢氧化钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
3, 5-二硝基水杨酸	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
酒石酸钾钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
硫酸铵	分析纯	上海凌峰化学试剂有限公司
苯酚	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
亚硫酸钠	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
玉米酒糟	饲料级	吉林燃料乙醇有限公司
糠醛	分析纯	Acros organics
5-羟甲基糠醛	分析纯	Acros organics
乙醇	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
甘油	分析纯	国药集团化学试剂有限公司
葡萄糖液体试剂盒	分析试剂	上海科欣生物技术研究

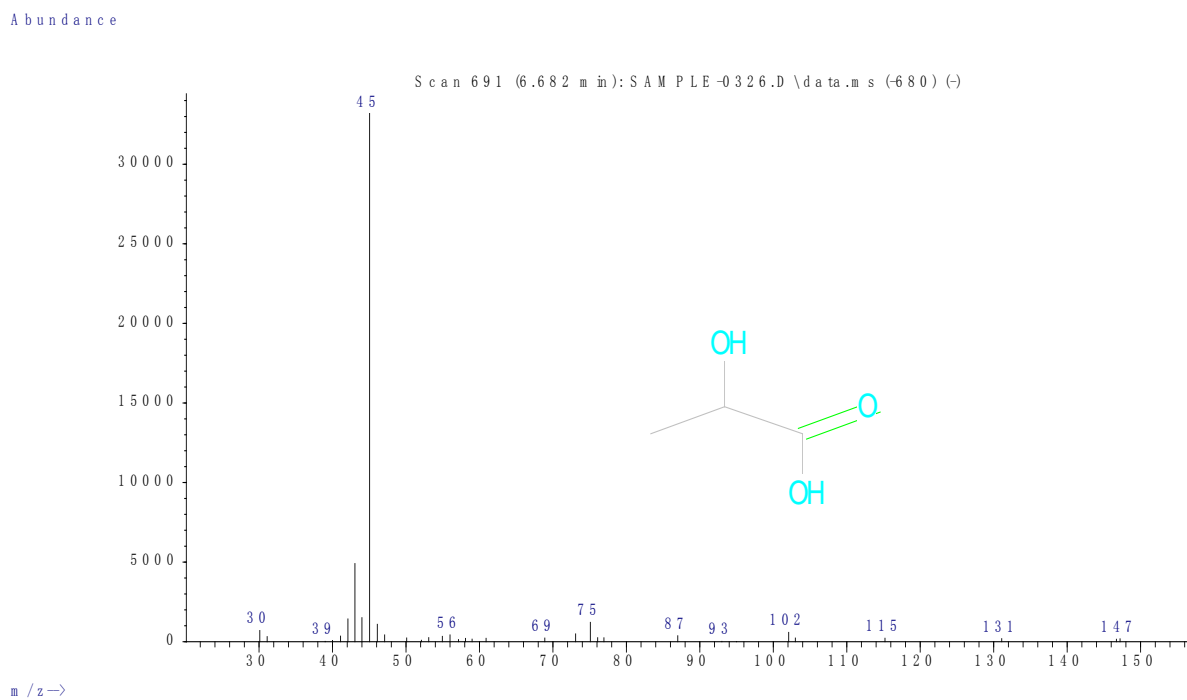
主要仪器和设备

名称	型号	生产厂家
电子天平	PL602-L	瑞士梅特勒托利多仪器有限公司
立式压力蒸汽灭菌器	YXQ-LS-75S II	上海博迅实业有限公司医疗设备厂
超净工作台	SW-CJ-1FD	苏州苏洁净化
可见分光光度计	722N	上海精科
立式振荡培养箱	HZ-2111KB	江苏华利达
超声波脱气机	KWT-100A	科伟达
台式小型高速离心机	5415D	德国 Eppendorf 公司
超低温冰箱	Forma-86C	美国 Thermo scientific 有限公司
高效液相色谱	LC-20AD	岛津公司
超纯水纯化系统	Milli-Q Synthesis	Millipore
稀酸酸预处理反应器	2008-F39	上海东亚压力容器制造有限公司
电热恒温鼓风干燥箱	DHG-9140A	上海一恒科学仪器有限公司
高速冷冻离心机	Avanti J-26	美国 Beckman Coulter 有限公司
电子天平	PL602-L	瑞士梅特勒托利多仪器有限公司
生物反应器	BIOTECH-5L	上海保兴生物设备工程有限公司
高压蒸汽发生器	DZFZ4.5C	上海蒸源机电有限公司
示差检测器	RID-10A	日本岛津
色谱柱	HPX-87H	Bio-rad Aminex
恒温水浴振荡器	HZ-9212S	江苏华利达实验设备厂
粉碎机	SF-300	上海科太粉碎设备厂
电子计重器	E5-YD3	上海三积分电子有限公司
四联发酵罐	BIOTECH-3BG	上海保兴生物设备工程有限公司
pH 计	PHS-3C	上海雷磁仪器厂
恒温水浴槽	ZC-18Q	宁波天恒仪器厂
压榨机	P-204	上海大张环保设备有限公司
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器
显微镜	XSP-8C	上海精密仪器仪表有限公司
小型气浴摇床	SHZ-82	江苏华利达
移液枪	0.1-5 mL	德国 Eppendorf 公司
纤维素分析仪	Foss 2021	福斯中国有限公司

附录 II 分析图谱



附图 1. 高效液相分析木制纤维素发酵液



附图 2. GC-MS 鉴定纤维素发酵液中乳酸

学术成果

发表论文:

1. Deqiang Chu, Jian Zhang, Jie Bao. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of corn stover at high temperature and high solids loading by a thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioenergy Research*, 2012. DOI: 10.1007/s12155-012-9219-x
2. Deqiang Chu, Hongbo Deng, Xiaoxi Zhang, Jian Zhang, Jie Bao. A simplified filter paper assay method of cellulase enzymes based on HPLC Analysis. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2012. DOI: 10.1007/s12010-012-9673-0
3. 楚德强, 赵凯, 吴倩, 陶泰河, 鲍杰. 一株高耐受性乳酸菌的分离及其在木质纤维素发酵生产高浓度乳酸中的应用. *华东理工大学学报(自然科学版)*. 2011, 37(5): 521-523
4. Dexi Bi, Deqiang Chu, Pei Zhu, Chenyang Lu, Chao Fan, Jiang Zhang, Jie Bao. Utilization of dry distiller's grain and solubles as nutrient supplement in the simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high solids loading of corn stover. *Biotechnology Letters*. 2011, 33(2): 273-276
5. Jian Zhang, Deqiang Chu, Juan Huang, Gance Dai, Jie Bao. Simultaneous saccharification and ethanol fermentation at high corn stover solids loading in a helical stirring bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 2010, 105(4): 718-728
6. Jian Zhang, Xiusheng Wang, Deqiang Chu, Yanqing He, Jie Bao. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresource Technology*. 2011, 102(6): 4480-4488

申请专利:

1. 鲍杰, 楚德强, 张建. 一种酿酒酵母菌株及其发酵秸秆生产乙醇的方法
申请日:2008.12.12, 专利号: ZL200810204496.9, 授权日: 2011.01.19
2. 鲍杰, 楚德强, 张建, 毕德熙, 朱培, 芦晨阳, 范超. 一种以固体秸秆为碳源培养发酵种子液的方法, 公开日: 2010.09.18, 公开号: CN101824395A
3. 鲍杰, 楚德强, 张建, 毕德熙, 朱培, 芦晨阳, 范超. 一种以玉米酒糟作为营养物用于纤维乙醇发酵的方法, 公开日:2010.11.27, 公开号: CN101886092A
4. 鲍杰, 楚德强, 赵凯, 张建, 董宏伟. 一种木质纤维素糖化与发酵生产乳酸的方法
申请日: 2011.1.14 申请号: 201110007649.2
5. 鲍杰, 张建, 楚德强, 毕德玺, 朱培, 芦晨阳, 范超. 一种改进的木质纤维素原料的预处理方法, 公开日: 2010.09.1, 公开号: CN101824436A
6. 鲍杰, 赵凯, 楚德强, 张建, 胡凤仙. 一种高温条件下由木质纤维素生产高浓度乳酸的方法, 申请号: 201110184748.8

致谢

本论文是在导师鲍杰教授的精心指导下完成的，在研究过程始终得到了鲍老师的悉心教诲和卓有成效的指导，鲍老师严谨求实的治学态度，创新拼搏的科研精神，勤奋忘我的工作作风使我受益匪浅。在此，衷心感谢导师鲍杰教授。

感谢实验室的胡凤仙副研究员的指导和帮助，感谢实验室的董宏伟、张建、赵凯、国立浩、刘威、安克红、王玉梅、涂毅、何燕青、吴倩、陶泰河等在实验中给予的帮助。

特别感谢我的父亲母亲，我的姐姐和哥哥以及我的亲朋挚友，在我求学路上一直以来给予的关爱和支持！

特别感谢我的爱人岳玉英女士对我的鼓励，理解和付出。