

分类号: _____ 密级: _____

U D C: _____

华东理工大学 学位论文

减压精馏方式实现纤维素酶的
生物炼制过程循环利用

雷成

指导教师姓名: 鲍杰 教授

华东理工大学

申请学位级别: 硕士 专业名称: 发酵工程

论文定稿日期: 2015-4-14 论文答辩日期: _____

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

减压精馏方式实现纤维素酶的生物炼制过程循环利用

摘要

纤维素酶成本是阻碍木质纤维素生物炼制技术产业化的重要原因。目前报道的纤维素酶循环利用方法的适用对象是高酶用量、低固体底物和纯净纤维素底物体系，不具备实用价值。本研究通过在位间歇减压精馏方式实现高固含量的玉米芯工业残渣和玉米秸秆原料乙醇生产中纤维素酶的循环利用，将乙醇分离与纤维素酶循环整合到同步糖化与发酵工艺中。减压条件下的低温使得发酵醪中大部分的酶活得以保留，补加新鲜底物以重新吸附纤维素酶后，启动新一轮同步糖化与发酵。循环过程中还监测了纤维素酶系的相对酶活、pNPG 酶活和 CMC 酶活在循环利用过程的变化。通过 Aspen plus 流程模拟模型对常规工艺和减压精馏纤维素酶循环工艺的能耗及成本进行了严格计算，发现减压精馏纤维素酶循环工艺的纤维素酶用量比常规酶用量节省 20-44%，乙醇生产成本降低了 14-27%。在现有高昂的商品纤维素酶成本考虑下，本文提出的纤维素酶循环方法将具有广阔的运用前景。

本文还对脱木质素玉米芯工业残渣进行乙醇发酵性能测试，在常规固含量及酶用量下的同步糖化与发酵过程，乙醇浓度达 75.07 g/L，得率为 89.38%，与玉米粉淀粉原料的发酵技术指标基本一致，具有替代粮食原料的现实竞争力。

关键词：纤维素乙醇；纤维素酶循环利用；减压精馏；同步糖化与发酵；成本估计

Cellulase Recycling via Vacuum Distillation During Cellulosic Ethanol Production

Abstract

High cellulase cost is the main obstacle for commercialization of cellulosic ethanol production. Cellulase recycling is the most efficient method to reduce enzyme cost and ethanol production cost. However, the current reported cellulase recycling methods were related to high enzyme dosage, low solids loading, pure cellulose etc, which were not feasible in practice. In this study, cellulase recycling via vacuum distillation was used during cellulosic ethanol production from delignified corncob residue and pretreated and biodetoxified corn stover. Ethanol was pumped out at lower temperature under vacuum condition, and cellulase activity remained at a high level. Following the first vacuum distillation operation, fresh material was fed into the bioreactor, and the next SSF operation was initiated. This repeated SSF process was conducted for 5 times with the delignified corncob residue and 3 times with the pretreated and biodetoxified corn stover. Meanwhile, enzyme activities against feedstock, pNPG, CMC were measured during the repeated SSF. Energy consumption was calculated through flowsheet simulation model established using Aspen plus software for comparison of ethanol production cost. 20-44% enzyme dosage was saved and 14-27% ethanol production cost was decreased using repeated SSF. Considering the high price of cellulase, recycling via vacuum distillation is a promising strategy.

In addition, delignified corncob residue (DCCR) was used as the feedstock of ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF). The ethanol titer and yield reached 75.07 g/L and 89.38%, respectively, using a regular industrial yeast strain at moderate cellulase dosage and high solids loading. The fermentation performance and cost of DCCR and corn meal was compared as feedstock of ethanol fermentation. The result shows that the DCCR is competitive to corn meal as ethanol production feedstock.

Keywords: Cellulosic ethanol; Cellulase recycling; Vacuum distillation; Simultaneous saccharification and fermentation (SSF); Cost estimation.

目录

第 1 章 文献综述.....	1
1.1 引言.....	1
1.2 木质纤维素及其预处理.....	1
1.3 纤维素酶及其作用机理.....	3
1.4 糖化与发酵.....	4
1.5 纤维素乙醇的分离.....	5
1.6 纤维素酶循环利用研究进展及存在的问题.....	6
1.7 本研究内容与意义.....	7
1.7.1 研究内容.....	7
1.7.2 研究意义.....	8
第 2 章 利用脱木质素玉米芯残渣生产高浓度纤维素乙醇.....	9
2.1 引言.....	9
2.2 材料与方法.....	9
2.2.1 原料及试剂.....	9
2.2.2 培养基.....	10
2.2.3 菌种及其驯化过程.....	10
2.2.4 脱木质素玉米芯残渣的同步糖化与发酵.....	11
2.2.5 玉米粉的同步糖化与发酵.....	11
2.2.6 分析方法.....	11
2.3 结果与讨论.....	12
2.3.1 脱木质素玉米芯残渣的纤维组分和总酚含量.....	12
2.3.2 不同种子培养方式的同步糖化与发酵.....	13
2.3.3 不同固体含量下的同步糖化与发酵.....	14
2.3.4 不同糖化和发酵温度下的同步糖化与发酵.....	15
2.3.5 脱木质素玉米芯残渣和玉米粉的同步糖化与发酵比较.....	16
2.3.6 脱木质素玉米芯残渣和玉米粉生产乙醇成本比较.....	17
2.4 小结.....	19
第 3 章 通过减压精馏实现纤维素乙醇生产中纤维素酶的循环利用.....	20
3.1 前言.....	20
3.2 材料及方法.....	21
3.2.1 原料和酶.....	21
3.2.2 培养基.....	21
3.2.3 菌种及其驯化过程.....	22

3.2.4 同步糖化与发酵设备及操作	22
3.2.5 同步糖化与发酵中纤维素酶循环利用（在位减压精馏）	23
3.2.6 分析方法	23
3.3 结果与讨论	25
3.3.1 通过减压精馏方式循环再利用纤维素酶的可行性	25
3.3.2 脱木质素玉米芯残渣生产乙醇过程中纤维素酶的循环利用	28
3.3.3 玉米秸秆生产乙醇过程中纤维素酶的循环利用	36
3.3.4 减压精馏（酶循环）和常压精馏过程乙醇生产成本的比较	43
3.4 小结	49
第 4 章 结论与展望	50
4.1 结论	50
4.2 展望	50
参考文献	52
攻读硕士期间的研究成果	59
致谢	60

第 1 章 文献综述

1.1 引言

能源一直是制约世界各主要国家经济社会持续健康发展的瓶颈。现如今，随着传统化石燃料日渐枯竭、人口膨胀、环境恶化、全球变暖等问题凸显，开发新的可持续的再生清洁能源日益成为解决这一系列问题的突破口^[1]。我国现已成为能源消费量排全球第一的大国，改革与开放正进一步加速，能源需求仍不断提升；但面对随之而来的环境破坏问题，近日媒体及大众在“穹顶之下”关于 PM2.5、雾霾的讨论，还有节能减排及可持续发展的要求，我们同样迫切需要寻求新的可再生能源并逐步替代传统化石类能源。

在种类繁多的新能源中，生物质能受到越来越多人的重视。近年来，燃料乙醇已部分替代了汽油，且将在未来几十年内逐步成为最主要的可再生的车用能源^[2]。但目前，燃料乙醇主要靠粮食等淀粉类原材料发酵而成（亦称第一代生物乙醇），比如美国^[3]通过优惠政策鼓励大规模种植玉米用以生产酒精，巴西^[4]则通过大量种植甘蔗，用富含糖分的蔗汁生产酒精。对于这些人均种植面积较大的国家而言是可行的，但对于我们人均耕地紧缺而“不与人争粮”的国家来说却不切实际，其产量远远满足不了现有需求。为此，我国国务院于 2013 年 1 月^[5]和 2014 年 11 月^[6]先后发布了生物产业的发展规划和能源发展战略的行动计划，文件中均强调充分利用农林工业废弃物、非粮食淀粉类植物等原料，加大第二代燃料乙醇、生物柴油的开发，加强技术攻关并建设生物质能示范工程，并计划在 5 年内，通过多种新能源（包括生物质能）替代 4,000 万吨以上石油的替代能力。

木质纤维素来源广泛，包括农林工业废弃物（如玉米秸秆、麦秆、稻草、玉米芯工业残渣、甘蔗渣、伐木废弃枝叶、木屑、办公废纸等）及可种植于边际土地的能源作物（如甜高粱、木薯、甜菜等）等。利用木质纤维素原料通过生物转化和生物炼制生产生物乙醇，不仅解决了因不与人畜争粮导致的原材料短缺问题，同时大大减少因直接焚烧产生的大气污染气体，间接降低温室气体排放，还将为广阔的农村地区提升经济活力并提供就业岗位^[7]。

然而，由于现有纤维素乙醇原料预处理、低成本水解糖化等关键技术瓶颈^[8]，致使以木质纤维素为原料发酵所产的第二代生物乙醇价格竞争力还无法与同类化石能源产品相比。木质纤维素炼制中，纤维素酶的高成本是阻碍木质纤维素转化工艺商业化的重要原因，约占总乙醇生产成本的 12-22%，其中占同步糖化与发酵工段成本竟达 50%^[9,10]，如何在现有商品纤维素酶的基础上降低酶用成本将是本文的研究重点。本章将从木质纤维素原料选择、糖化发酵的模式、乙醇分离方法、纤维素酶及其循环利用等方面，针对国内外近年来关于纤维素酶回收和循环利用的最新研究进展进行综述并总结，为本研究开发新的循环策略来降低纤维素酶成本提供参考及理论依据。

1.2 木质纤维素及其预处理

自然选择下，植物因其具有坚固的细胞壁、纤维素管、木质结构等保护才得以抵抗

环境的变化。一般情况下，致密的木质纤维结构不易被纤维素酶直接分解，需通过预处理，破坏生物质中由坚固管束组成的抗降解屏障^[11,12]，暴露可触位点，使得纤维素酶有效进行催化。不同的原料对其进行预处理的方式有所不同，效果及要求有所差异。方法大致分四类：纯物理法、纯化学法、生物法及多方式结合法。各种方式有其各自优缺点，详见表 1.1。总的来说，有效预处理的评价要看：①避免糖损失/降解；②抑制物生成少；③成本/能耗低；④后续水解生成更多糖^[13,14]。

表 1.1 木质纤维素原料不同的预处理方法

Table 1.1 Summary of different pretreatment for lignocellulosic biomass.

方法	处理过程	优点	缺点
物理法	机械粉碎 ^[15,16]	降低纤维结晶度，增加表/孔面积，无抑制物	耗能大，耗时长，木质素未被去除
	热解 ^[17]	直接获得气/液态产品	温度要求高，灰分累积
化学法	酸水解 ^[18,19]	水解半纤维素，破坏木质素结构，增加可接触表面积	成本高，产生有毒抑制物，设备腐蚀严重
	碱水解 ^[18,19]	去除半纤维素及木质素，增加可接触表面积	耗时较长，引入盐离子杂质
	有机溶剂抽提 ^[20]	水解半纤维素，提取木质素作产品	成本高，溶剂需回收再利用
	臭氧分解 ^[21]	常压室温条件反应，无抑制物	臭氧消耗量较大，成本昂贵
生物法	真菌降解 ^[11]	环境友好，降解木质素及半纤维素，无化学试剂，成本低	降解速率低，工业应用受限
结合法	蒸汽爆破 ^[21]	环境友好，葡萄糖损失少，降解半纤维素、木质素	部分木聚糖被破坏，产生抑制物，需水洗去除，耗水多
	二氧化碳爆破 ^[22]	增加表面积，成本低廉，无抑制物	反应压力要求高，对木质素及半纤维素无化学反应
	氨纤维膨爆 ^[22]	增加表面积，降解部分木质素及半纤维素，无抑制物	处理木质素含量高的原料效果差，氨回收成本高
	干式蒸汽稀酸 ^[23]	增加表面积，降解部分木质素及半纤维素，废水少	设备易腐蚀，产生抑制物

木质纤维素种类繁多，但并非所有的原料适合于生物乙醇的经济性生产。作为木质纤维素大宗原料之一，玉米秸秆（Corn stover）正用于第二代燃料乙醇的示范规模工厂的运转，很多研究亦集中于此。目前，较常用的玉米秸秆预处理方式有蒸汽爆破、氨纤维膨爆、蒸汽稀酸等：早在 2006 年中粮集团在肇东开工建设通过蒸汽爆破处理的玉米秸秆年产 5000 吨酒精的工厂，其预处理条件是 205 °C，2.0 MPa，维持 6 min^[24]；美国

密歇根 MBI 生物技术研究开发并完善氨纤维膨爆 (AFEXTM) 专利技术已超过二十年, 该技术应用于多家乙醇示范工程, 其处理玉米秸秆条件较为温和, 温度 100 °C 下停留 30 min, 干物料: 氨: 水=1:1:0.6^[25,26]; Zhang^[23]开发了一种稀酸干式预处理方式处理玉米秸秆, 硫酸浓度 2.5%, 固液比 1:0.5, 反应条件 190 °C 维持 3 min, 极大减少废水量, 配合后续生物快速脱毒, 纤维素的转化率超过 70%。上述这些处理方式虽然部分已在工业上取得运用, 但能耗及成本瓶颈仍制约着玉米秸秆生物炼制的经济性。

玉米芯工业残渣 (Corncob residues) 是玉米芯中木聚糖提取工业的木质纤维废弃物, 我国每年有超过 2,000 万吨的玉米芯可以被利用^[27], 玉米芯经高温 (170-185 °C) 酸条件 (5-8% 稀硫酸) 下蒸煮, 将半纤维素降解出木糖, 将其用于生产木糖醇、糠醛 (广泛应用于合成塑料、医药、农药等行业)^[28]。较之原始玉米芯仅含 37% 纤维素、31% 半纤维素、15% 木质素含量, 经过酸处理降解半纤维素分解出木糖后, 超过 70% 纤维素富集的残渣^[29]又可成为纤维素乙醇生产极佳的原材料。实验室条件下, Cheng^[30]采用浓度 5-10% 亚硫酸盐处理玉米芯获得残渣, 其纤维素转化率达到 72%; Zhang^[31]采用酸、碱分别先后处理, 脱除非纤维素成分自制玉米芯残渣, 分批补料同步糖化与发酵 (固含量为 25%), 乙醇浓度达 84.7 g/L, 纤维素转化率达 79%。而工业生产上, 山东龙力公司^[32]于 2012 年开始建设一条玉米芯的产业链, 综合利用多层次开发, 将提取木糖醇等高价产品后的工业残渣进一步乙醇国家定点生产。与需要高强度预处理原料相比, 利用这种无再需预处理的富含纤维素、抑制物少的工业残渣用于生物燃料乙醇生产将更具优势。

1.3 纤维素酶及其作用机理

纤维素酶, 这种重要的制剂产品在食品业和环境行业有广泛应用, 是继淀粉酶、蛋白酶的另一产业化酶种。现有商业生产是通过微生物 (真菌为主) 进行, 典型有 *Trichoderma*、*Penicillium* 和 *Aspergillus*。与淀粉酶糖化液化酶相比, 多种酶组分组成的纤维素酶复合酶系的产量相对较低, 成本远高于前者。纤维素酶复合酶系主要含: 内切葡聚糖酶 (编号 E.C.3.2.1.4, 简称 EGs)、外切葡聚糖酶 (E.C.3.2.1.91, CBHs) 及 β -葡糖苷酶 (E.C.3.2.1.21, BG); 酶系中多种酶组分协同作用将纤维素链最终分解成单糖葡萄糖^[33]。具体作用机理: 纤维素酶中 EGs 与 CBHs 首先以物理吸附方式结合到水不溶的木质纤维素原料上, 前者将纤维素长链随机打断, 后者协同从断链末端以两个糖为单位水解出纤维二糖, 溶于水的纤维二糖被同样分布于水相的 BG 分解成两分子葡萄糖^[34]。正因为此, 虽然 BG 因溶于水相损失极少, EGs 和 CBHs 逐步被原料残渣中木质素吸附, 此吸附不可逆将导致酶整体催化效率下降, 所有的酶组分需相互协同参与水解^[35]。另外, 一般市购的纤维素酶并不是单纯催化纤维素的酶种, 它还混有木聚糖酶、甘露聚糖酶等半纤维素酶系^[36]以协助更高效降解木质纤维素原料。由于各种纤维素原料的组成和结构不尽相同, 降解其所用的纤维素复合酶的各组分最佳比例也就各不相同, 因此纤维素酶作用机理并重构优化降解酶系还需进一步研究。

1.4 糖化与发酵

纤维素乙醇生产按糖化、发酵同时进行与否可分两种基本方式：分步糖化与发酵（简称 SHF）及同步糖化与发酵（SSF）。其中同步糖化与发酵（SSF），最早由 Gauss^[37]在其 1976 年的发明专利中进行了描述，设计初衷是为解决 SHF 时高的葡萄糖浓度对糖化酶类的强烈抑制，并提高原料的转化率；纤维素酶催化下，糖类从原料分解释放时，立刻被同期接入的微生物代谢发酵，从而被杂菌感染风险降低，于此同时，糖浓度始终处在较低水平，减缓其对纤维素酶的产物抑制效应，提高水解效率，进而提高了整个过程中发酵乙醇速率，获得高的乙醇浓度及得率。该操作方法设备要求较简单，工艺简易；但缺陷在于糖化、发酵两过程同步进行，就不能保证反应均处在各自最优条件，例如纤维素酶的最适催化温度（50 °C 左右）与酵母菌生长最适温度（30 °C 左右）不匹配，多数同步糖化与发酵的温度选择一个折衷的方案，即预糖化采用 50 °C，之后的 SSF 阶段维持 30-37 °C^[38]。近年，文献还报道根据上述两基本操作方式衍生的方法包括：整合生物工艺（简称 CBP）、同步糖化与共发酵（SSCF）和预糖化同步糖化发酵（PSSF）等；各种操作方式优点缺点见表 1.2。

表 1.2 糖化与发酵不同的操作方式

Table 1.2 Summary of different process for saccharification and fermentation.

方式	描述	优点	缺点
SHF	分步糖化与发酵——先高温酶解糖化，后取糖液进行常温发酵 ^[39]	淀粉加工业常用工艺，糖化、发酵处于各自最适条件	易染菌，高糖浓度抑制酶活性，原料转化率较低
SSF	同步糖化与发酵——糖化与发酵在相同条件下（主要是温度）一起进行 ^[40]	染菌风险小，设备投资少，乙醇得率高	糖化和发酵条件需相互妥协
CBP	整合生物工艺——酶生产、物料糖化、乙醇发酵在同一反应器内完成 ^[41]	无需额外的商品酶，成本低廉	发酵周期长，效率低，乙醇得率低
SSCF	同步糖化与共发酵——SSF 基础上，多菌种协同发酵产乙醇 ^[42]	充分利用酶解产生的己糖（葡萄糖）、戊糖（木糖），得率高	协同的菌种组合少，应用范围局限
PSSF	预糖化同步糖化发酵——SHF 结合 SSF，先高温糖化，后降温接种进行 SSF ^[43]	缓解初期糖匮乏，适合高固含量发酵，接种前物料黏度低	较 SSF 增加变温过程，能耗变大

不同的工艺适合于不同发酵特性的菌种：例如耐热的 *K. marxianus* 在 45 °C 温度下进行 SSF，此时纤维素酶活性也处于极佳状态^[44]；Neves^[45]把只利用葡糖的 *S. cerevisiae*

和可利用木糖的 *C. shehatae* 组合, 纤维素酶催化下进行 SSCF 共发酵木质纤维材料, 乙醇得率大幅升高。开发新的操作工艺同时, 也需不断寻求耐高温的微生物和性能更加优越稳定的纤维素酶, 使其糖化、发酵速率均保持高的水平。本文所用 *S. cerevisiae* 将主要采用 PSSF 操作方式以满足研究, 如没有特殊说明, 一律模糊称作 SSF。

1.5 纤维素乙醇的分离

蒸馏是目前最为成熟并广泛用于化工业中 95% 的产品分离工序^[46], 就一个工厂生产而言, 单蒸馏工段的能耗就占总能耗的 40% 之多^[47]。为降低能耗, 新型蒸馏系统被不断开发, 比如多塔精馏、渗透蒸发、负压或真空蒸馏、热泵辅助蒸馏^[48]、薄膜蒸馏^[49]、压差蒸馏^[50]、超声波蒸馏^[51]、太阳热蒸馏^[52]等节能的分离系统。然而, 蒸馏最多只能将乙醇浓缩至共沸点 (约 95.6% w/w), 后序还需要分子筛、共沸精馏、石灰干燥脱水等专业化的分离技术使乙醇达无水燃料级 (99.5% w/w)^[53]。多塔精馏配合分子筛是目前无水乙醇生产的常用标准方法^[54], 该法能够在较低能耗下提取无水乙醇, 化工软件 Aspen plus 可模拟其物料及能量流平衡, 便于放大。但木质纤维素 SSF 后的醪液乙醇含量通常较低^[55], 从乙醇浓度低的水溶液提升至无水乙醇级别, 通过蒸馏将醇类分离出来需要相当高的能耗, 高温还可能导致醪液在塔底结焦, 使得蒸馏分离效率降低。假设通过较低温度分离乙醇时, 将保留有部分菌体的活性, 也为乙醇发酵和分离耦合提供可能: 乙醇生成的同时被及时提取出来, 缓解其对菌体的产物抑制, 生产高速率得以维持, 有效减少能耗量及乙醇成本。目前可行的耦合工艺比如 CO₂ 气提^[56]、渗透蒸发^[57]、薄膜蒸发^[58]、真空蒸馏^[59], 但与传统淀粉原料或者石油化工生产乙醇不同, 并非所有的蒸馏方式都适合于木质纤维素乙醇的提取, 比如薄膜蒸发、渗透蒸发, 物料容易堵塞蒸馏通道。当木质纤维素固体量较高时, 大多分离方法难与其乙醇发酵进行工艺耦合, 通过降压实现的较低温度的蒸馏, 即真空蒸馏 (减压精馏) 耦合发酵将是不错之选。

真空蒸馏 (亦称减压精馏) 技术的开发最初是为了解决高浓度葡萄糖连续发酵而产生高强度的乙醇抑制菌种的问题, 压力下降, 液体沸点降低, 乙醇持续快速从醪液中抽出^[60]。Cysewski^[61]早在 1977 年就研究了在酵母连续发酵葡萄糖液产乙醇的过程中, 在负压 (50 mmHg) 下连续补充 33.4% 的葡萄糖溶液, 乙醇生产率比常压下在补充 10% 葡萄糖连续发酵的极限生产速率快 0.4-1.8 倍, 说明减压精馏出乙醇有效缓解了其对酵母的抑制, 而且, 较低的发醇蒸馏耦合工艺温度 (35 °C) 保留菌种活性并使之得以循环利用; 同一年, Ramalingham^[62]发现 32 mmHg 压力下, 酵母对数生长期虽然较常压下延长了 2 hr, 但其细胞最大密度超过常压下的 1-1.5 倍, 负压状态可能促进细胞繁殖分裂, 但同时减压形成了严格厌氧环境, 若没有新鲜氧补入, 发酵表现将不如预期活跃。上述研究都是通过葡萄糖溶液进行的减压精馏耦合发酵, 而 Ghose^[63]在 1984 年发表用假丝酵母对碱处理水稻秆进行同步糖化与发酵生产乙醇, 输送醪液至罐外的 80 mmHg 蒸室分离乙醇后输回罐内, 初始 10% 固含量, 当产物乙醇达 22 g/L 启动闪蒸, 每蒸两次后补一次新料 (8% 固含量), 共进行 20 次循环 9 次补料, 菌体仍保持较高活性; 但有限的

固含量导致乙醇生成浓度不超过 25 g/L, 并且作者为了追求快速生产速率而不计成本使用极高的纤维素酶用量 (是现今常用浓度的 5-10 倍), 不具实用价值。低温减压精馏后回流醪液以继续利用活菌和酶将面临一些问题, 比如醪液中的难挥发终产物、抑制物 (如乙酸、乳酸)、残渣 (如木质素、灰分) 将不断累积, 需定期去除。另外, Ghose^[64] 早期提到冷却和泵出不凝气 CO₂ 的耗能极高, 接近常规常压乙醇蒸馏耗能的 30 倍, 受当时技术限制, 这也大概是近 30 年没有相关研究与进展报道的原因。如今, 真空技术日益提升, 设备性能及密封性更加完善, 模拟软件计算方法更加简便精确, 有必要再次对减压精馏的能耗进行重新评价。

1.6 纤维素酶循环利用研究进展及存在的问题

纤维素酶用量是木质纤维素转化工工艺工业化所面临的主要挑战之一, 高效的水解过程需要大剂量的酶, 许多因素增加酶用量成本, 包括酶抑制、原料接触位点及木质素。其中, 木质素是纤维素酶的重要抑制物之一, 大量的文献报道木质纤维素原料中的木质素会造成纤维素酶的无效吸附^[65,66,67,68], 从而降低了酶分解纤维素的效率。很多学者对低木质素含量的底物进行酶解和发酵: Hou 等^[69] 考察了新型氨基酸胆碱离子液对稻秆预处理的效果, 发现氨基酸胆碱可以有效地除去稻秆木质素, 提高纤维素和木聚糖的酶解效率, 葡萄糖得率大于 80%, 木糖得率也从 36.1% 增加到 52.2%; Zhao^[70] 通过“福尔马林”预处理法脱除甘蔗渣中木质素, 在补料分批糖化及分批补料的同步糖化与发酵过程中考察纤维素酶的利用效率, 表明木质素的降低提高了酶的利用率。Liu^[71] 通过两次补料分批策略使较低酶用量下 (9.3 FPU/g) 实现 15% 高固含量 SSF 下乙醇得率达到 85.2%, 并通过 SDS-PAGE 检测过程中 CBH I 残留与木质素脱除相关。虽然这些方法间接地略微提高了纤维素酶的利用率, 但未有效减少酶用量。通过循环利用酶是减少酶用量、降低酶成本的有效手段之一。固定化是传统催化行业最为常用的酶循环利用策略, 但木质纤维素生物质炼制过程并不适用: 复杂的反应体系、纤维素酶系吸附底物的特殊性、固液分离困难等因素制约固定化方法的使用。

近年来, 纤维素酶循环利用的主要方式可以概括为两种: 直接循环利用固/液相, 或者把酶从固/液相分离出来。水解过后, 纤维素酶在液相 (游离酶) 与固体残渣 (结合酶) 中均有分布, 被吸附在底物残渣上的结合酶可以不经解吸附而直接用于循环水解, 这是因为纤维素酶对木质纤维素有很强亲和力, 在水解过程中, 酶重新吸附在新添加的底物上^[72,73], 这种操作简洁明了。Weiss^[74] 用稀酸预处理的玉米秸秆 (PCS) 通过纤维素水解之后循环利用不溶固体组分来实现酶的循环利用, 作者在不同循环条件下对预处理过的玉米秸秆进行研究, 验证过程变量 (如固体水洗和固体组分循环) 对得率影响的有显著程度, 在保证相同糖得率时循环利用方法可减少 30% 的酶用量, 但固体组分随循环逐步积累, 将受反应体积和木质素含量等限制。这也是多位学者的共识, 这种方法的缺陷在于随着循环次数的增加, 残渣中木质素的富集将对酶回收产生极大不利影响^[75], 而且由于大部分 β -葡糖苷酶不能与纤维素物质结合而不能重新利用, 为避免形成纤维二糖富

集反向对纤维素酶的产物抑制,在每次循环时需要添加新的 β -葡糖苷酶。如果在重复利用酶水解含有较多木质素底物的过程中,解吸吸附在木质素上的酶使其进入溶液十分必要。反应体系悬浮液中的酶同样可以采用添加新的底物吸附液相的酶用于循环,虽然大量 β -葡糖苷酶能溶解于悬液中,但由于大部分纤维素酶仍被吸附在底物残渣上,悬液中仅占初始酶蛋白浓度 30%^[76]的游离酶并不能有效的进行循环,还需补充特定的酶,所以仅通过利用液相中游离酶进行回收的策略并不被学者看好。现有较好循环效果的研究大多是基于高的酶用量、低固含量、长反应时间和循环中 β -葡糖苷酶的补充,均不具实际工业运用意义。

其它研究致力于对底物残渣进行碱洗涤^[77]或添加表面活性剂^[78]从而解吸附酶。由于酶的吸附与解吸特性高度依赖于纤维素原料本身性质,这将导致不同的回收效果。长期以来,学者建立了大量的解吸附方法,包括使用表面活性剂、碱、氨、改变缓冲液的 pH^[79,80,81]。Zhu^[82]建立了一种测定被吸附的纤维素酶的简便方法并研究了多种解吸附方法: pH 变化、洗涤剂运用、高浓度盐溶液、多元醇等,发现当 pH 调至 13.0 或者 72% 乙二醇洗脱的方法均非常有效,但若要提高回收的纤维素酶活性,可将 pH 调 10.0, 结果发现 90% 的纤维素酶被有效回收。Du^[83]考察纤维素酶的吸附与解吸附,不同 pH 影响酶结合的稳定性,酸性条件 (pH <4.8) 时表现更强的吸附作用,而中性 (pH 7) 及碱性 (pH 10) 则表现解吸附,该现象与之前 Zhu 的一致; pH 影响还依赖温度,比如在 pH 7 及 25 °C 时纤维素酶活性仍保持可逆,但 pH 10 及 50 °C 条件下将不可逆失活; pH 4.8 时,温度的改变对酶吸附底物的强度没有显著影响,而 pH 7 和 pH 10 时高温将导致更多的酶解吸附,但通过这种高强度及偏碱性条件的解吸附,回收的纤维素酶活力是否保持高水平还有待商榷。深入研究和理解在水解过程中纤维素酶的吸附-脱附机理,有助于促进酶的循环利用并降低酶用量,但就目前而言,这种方法的缺陷在于成本高,处理复杂,且回收的纤维素酶活力较低等。综上,很多研究为了达到高的酶循环利用效率而不顾处理的强度,大多不具工业实用价值。

至今在高固体含量下进行的 SSF 过程中,还没有关于乙醇分离与纤维素酶循环相耦合过程的研究。本综述探讨的意义即在于寻找将乙醇分离和纤维素酶循环进行整合的策略,以实现纤维素乙醇的连续性工业生产。

1.7 本研究内容与意义

1.7.1 研究内容

纤维素酶成本是阻碍木质纤维素生物炼制工艺商业化的重要原因,占同步糖化与发酵工段成本的 50%,通过循环利用以降低酶用成本是有效手段之一。然而目前被报道的循环处理方式复杂、酶活回收较低,效果较好的循环方式又大多基于高酶用量、低固体底物及长反应时间,不具工业实用价值。本文将采用两种常见木质纤维材料(玉米芯残渣、玉米秸秆),通过酿酒酵母 *S. cerevisiae* 进行同步糖化与发酵生产乙醇。首先对实际工业条件制得的脱过木质素的玉米芯进行实验室条件下的发酵测试,找寻合适发酵条件,

进而探索本论文研究的主要课题内容——纤维素酶的循环利用。在 SSF 生产乙醇过程中，通过间歇在位减压精馏蒸出产物乙醇，补加新鲜物料，让 SSF 继续进行，循环利用此前保留在罐内发酵醪中的纤维素酶，并进行相对应的批次对照实验以考察循环利用的有效性，最后通过软件模拟并估算过程中能耗成本，用以对比节省的酶用成本来评价此循环方式的经济性。具体内容如下：

(1) 用安琪酿酒酵母对脱木质素玉米芯工业残渣进行 SSF 生产乙醇测试，从菌种驯化、固体含量及糖化发酵温度三方面进行考察，并与玉米粉这类淀粉原料进行乙醇发酵性能及生产成本的比较。

(2) 用实验室筛选 *S. cerevisiae* DQ1 对脱木质素玉米芯残渣进行 SSF 乙醇发酵，通过在位减压精馏提取乙醇，补加新料，使得纤维素酶重复利用；同时考察循环 SSF 过程中固液两相残留酶组分及活性变化，全面定量测定残留的酶活：相对酶活、pNPG 酶活、CMC 酶活。

(3) 用 *S. cerevisiae* DQ1 对更为大宗的玉米秸秆进行 SSF 乙醇发酵，通过在位减压精馏实现纤维素酶的重复利用；并同时考察循环 SSF 过程中固液两相残留酶组分及活性变化，同样包括相对酶活、pNPG 酶活、CMC 酶活。

(4) 用软件 Aspen plus 对常压精馏与减压精馏乙醇过程模拟，进行能耗、成本比较，以评价减压精馏实现的纤维素酶循环的经济性。

1.7.2 研究意义

在木质纤维素（玉米芯残渣或玉米秸秆）原料高固体含量下，实现纤维素酶的循环利用；将乙醇分离和纤维素酶循环整合至同步糖化与发酵工艺中，以实现纤维素乙醇的连续性工业生产，提高整个乙醇生产过程的经济性。

第 2 章 利用脱木质素玉米芯残渣生产高浓度纤维素乙醇

2.1 引言

木质纤维素燃料乙醇具有广阔前景,但商业生产所面临最为关键的问题仍旧是产率较低,耗水耗能巨大^[8]。在众多用于纤维素乙醇生产的木质纤维素原材料中,玉米芯因其富含纤维素且无需预处理,而发挥着巨大的潜力^[31,71,84,85,86]。目前,国内玉米芯生物炼制工业已稳步建立^[84],其主要目的是生产木糖、木糖醇、木寡糖和糠醛等高附加值商品。经过这一系列的工业提取工艺后,半纤维素被充分利用,剩下了玉米芯残渣这种固体废弃物。最近,玉米芯工业残渣中的木质素又进一步通过碱处理将其分离提取,用于生产树脂、橡胶掺加剂及混凝土添加剂,最终剩下的富含纤维素的脱木质素玉米芯残渣可以再被进一步充分利用。脱木质素玉米芯残渣中纤维素葡聚糖的含量超过 70%,与玉米粉中淀粉含量基本一致^[87]。不同于传统的木质纤维素原料处理方式,脱木质素玉米芯残渣在酶水解之前不需要进行预处理。

之前已有部分文献报道了实验室自制的脱木质素玉米芯残渣用于乙醇发酵的研究。Liu^[71]对玉米芯先后进行了稀酸及碱处理获取脱木质素玉米芯残渣,在 15% 固体含量下进行补料批次发酵得的乙醇浓度为 57.2 g/L,得率达 85.2%。Zhang^[31]同样用实验室条件下制得的脱木质素玉米芯残渣,在 19% 固含条件的批次同步糖化发酵下获得 69.2 g/L 的乙醇,其得率达 81.2%。然而,仍有两个问题亟待解决:(1) 相比于实验室高强度处理条件自制的玉米芯残渣,我们更应该关注并评估工业玉米芯残渣的乙醇发酵性能;(2) 高固含量的玉米芯残渣同步糖化与发酵时均匀混合问题,应当进行合理的生物反应器设计。

本文将用工业提取木糖及木质素后的玉米芯副产物——脱木质素玉米芯残渣,在含螺旋桨且适合高固含量的生物反应器中,进行不同操作条件的同步糖化与乙醇发酵:对不同菌种驯化条件进行比较,并从固体含量和温度方面考察其对同步糖化发酵效果影响。脱木质素玉米芯残渣的发酵性能还将与玉米粉进行比较。本文将表明脱木质素玉米芯残渣这种深加工后的木质纤维素原料替代玉米粉用于生产生物乙醇的潜力。

2.2 材料与方法

2.2.1 原料及试剂

脱木质素的玉米芯残渣 (Delignified corncob residues, 以下简称 DCCR) 来自山东龙力生物科技公司 (中国,禹城),该原料已通过碱处理去除了大部分木质素及部分酚类抑制物,通过 ANKOM 200 纤维素分析仪测定其纤维素含量为 72.90%,半纤维素 4.63%,木质素只有 7.18%。

商品纤维素酶制剂 Youtell #6 购于湖南尤特尔生化公司 (中国,岳阳),其蛋白含量为 90 mg EP/g,采用美国可再生能源实验室 (National renewable energy laboratory, NREL) 测纤维素酶滤纸酶活的方法^[88]测定其滤纸酶活为 135 FPU/g,采用 Ghose 酶活测定方法

^[89]测定其纤维二糖酶活为 344 IU/g。

玉米粉 (Corn meal) 产自天津, 由未脱胚乳的玉米直接经机械碾磨成粉状, 经 Holm 的双酶法^[90]测定其淀粉含量为 76.89%。

高温淀粉液化酶 HTAA (Lot number 7201455498) 和糖化酶 GA-L NEW (Lot number 7201417190) 均购自杰能科生物工程有限公司 (中国, 无锡)。以可溶性淀粉为底物, HTAA 和 GA-L NEW 的酶活分别为 22,000 U/mL 和 100,000 U/mL。

2.2.2 培养基

合成培养基 (SM medium): 葡萄糖 20 或 100 g/L, 酵母提取物 (YE) 1 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L, pH 自然。

同步糖化发酵营养盐: 酵母提取物 (YE) 10 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L, pH 自然。

水解液培养基: 本研究的菌种培养按逐步增加脱木质素玉米芯残渣水解液浓度进行驯化。50%、75%、100% 水解液培养基分别按对应体积用去离子水稀释, 并以总体积按 SM 培养基 (不包括葡萄糖) 补足对应浓度营养盐, pH 调至 6.0。

上述培养基均经 115 °C 蒸汽灭菌 20 min。

脱木质素玉米芯残渣水解液是通过在本实验室所设计的 5L 体系螺带搅拌生物反应器中制备^[91], 操作条件为 15% (w/w) 的 DCCR 固体含量 (干基)、15 FPU/g DM (干基 DCCR) 的纤维素酶用量, 糖化温度 50 °C, 搅拌转速 150 rpm, 水解 48 hr。水解过程通过 2M 的 H_2SO_4 及 5M 的 NaOH 溶液调节 pH 值至 4.8 (酶解初期加酸, 后期补碱)。水解液浆在 9,000 rcf 转速下离心 15 min, 上清液用滤纸过滤获得水解液。该水解液含 98.16 ± 0.70 g/L 葡萄糖及 6.49 ± 0.79 g/L 木糖。该水解液主要用于不同浓度水解液培养基的配制及菌种驯化。

2.2.3 菌种及其驯化过程

乙醇发酵菌种为市购的安琪酵母公司 (中国, 宜昌) 的酿酒酵母, 菌种活化及扩培参照 Gu^[86] 的四个步骤的短期驯化培养方法, 用水解液浓度逐级提高的培养基扩培后上罐。详细步骤如下:

菌种驯化过程: 取 2 mL 甘油管保种 (-80 °C) 接入 20 mL SM 培养基活化 15 hr ($\text{OD}_{600} \approx 4$); 接着以 10% (v/v) 接种量 (即 2 mL 菌液) 转接入 20 mL 50% 水解液培养基中培养 15 hr; 再以 10% 接种量转接入 20 mL 的 75% 水解液培养基中培养 15 hr; 最后以 10% 接种量 (即 20 mL) 倒入 200 mL 的 100% 水解液培养基中扩大培养 15 hr ($\text{OD}_{600} \approx 6$) 以备上罐, 其中第 6 hr 及 12 hr 处分别添加 300 μL 及 400 μL 5M NaOH 以调节 pH 至 5.5 左右。

对照组 (未驯化) 菌种培养过程: 取 2 mL 甘油管保种 (-80 °C) 接入 20 mL SM 培养基活化 15 hr ($\text{OD}_{600} \approx 4$); 接着以 10% (v/v) 接种量 (即 20 mL 菌液) 倒入 200 mL 的 SM 培养基 (其中葡萄糖浓度设定为 100 g/L) 中扩大培养 15 hr ($\text{OD}_{600} \approx 5$) 以备上罐, 其中同样在第 6 hr 及 12 hr 处分别添加 300 μL 及 400 μL 5M NaOH 以调节 pH 至 5.5

左右。

以上培养过程温度均控制在 30 °C，转速 180 rpm。

2.2.4 脱木质素玉米芯残渣的同步糖化与发酵

DCCR 的 SSF 在本实验室自主设计的 5L 生物反应器^[91]中进行，该反应器安装有一组螺带搅拌桨（包括正螺旋螺带桨、涡轮/翼型桨及底桨），适合高固体含量木质纤维素原料的同步糖化发酵。

本研究进行的 5L 体系发酵实验分为两个阶段：预糖化阶段和同步糖化发酵阶段。预糖化过程中，首先加入所需的全部纤维素酶和相应固体含量所应补充的去离子水，然后以补料的方式加入经灭菌的脱木质素玉米芯残渣（含水率约为 67%，每批实验均精确测定用于乙醇得率计算）至设定的固体含量，条件为 50 °C、pH 4.8、150 rpm，维持 12 hr。在预糖化结束半小时前加入已备的高浓度的营养盐溶液，同时将温度降为 37 °C。种子液（约 220 mL）倒入 5L 生物反应器后，pH 通过自动控制滴加的 5M NaOH 维持 4.8，该阶段持续 60 hr，两阶段共计 72 hr，在同步糖化发酵过程中定时取样。

2.2.5 玉米粉的同步糖化与发酵

本研究的玉米粉乙醇生产按照类似工业酒精生产条件及方式进行^[87]，同样在上述含螺带搅拌桨的 5L 生物反应器中进行。首先，玉米粉（初始含水率约 5%）调至 20% 固含量，用 5 U/g DM 淀粉酶进行 90 °C、0.5 hr 的液化，再用 37.5 U/g DM 糖化酶在 50 °C 下预糖化 5 hr。同样在预糖化结束半小时前加入已备的高浓度的营养盐溶液，同时将温度降为 37 °C，倒入未经过驯化的种子液，pH 通过自动控制滴加的 5M NaOH 维持 4.8，该阶段持续 60 hr，在同步糖化发酵过程中定时取样。

2.2.6 分析方法

样品在 13,200 rpm 转速下离心 5 min，获得的上清液先按适当倍数稀释再经 0.22 μ m 滤膜过滤后通过型号为 LC-20AD 的高效液相色谱 HPLC（日本，岛津公司）进行检测分析葡萄糖、木糖、乳酸、乙醇、糠醛及 HMF 等物质的浓度，其中示差折光检测器为 RID-10A（岛津公司），柱子为 Aminex HPX-87H 糖柱（美国，Bio-Rad 公司），测定条件为 5 mmol/L H₂SO₄ 作流动相，流速 0.6 mL/min，柱温 65 °C。

通过福林酚法^[86,92]测定脱木质素玉米芯残渣中总酚含量，其纤维组分分别通过两种方法测定，包括根据美国可再生能源实验室方法稍作修改的两步酸解法^[93,94]和美国 ANKOM 公司纤维素分析仪的范式洗涤法^[95]，原料中灰分则通过马弗炉测定^[96]。玉米粉中淀粉含量通过稍作修改的双酶法测定^[90]。

福林酚法是根据福林酚试剂（FC，含钨酸钠、钼酸钠等）在碱性条件下（Na₂CO₃）被酚类化合物还原呈蓝色，蓝色深浅与样品滤液中酚类化合物的量成正比，同时以不同已知浓度的没食子酸为标准溶液，经反应后显色在分光光度计 765 nm 波长处的吸光值作出标线，用以定量样品滤液中酚类化合物的浓度。

范式洗涤法是通过中性洗涤剂、酸性洗涤剂、72% 浓硫酸三种溶剂依次处理样品，利用每次洗涤后的差重得出中性洗涤纤维（NDF）、酸性洗涤纤维（ADF）及中酸性洗

涤木质素 (ADL) 这三种组分的含量。根据以下公式计算出纤维素与半纤维素含量:

$$\text{Hemicellulose} = \text{NDF} - \text{ADF} \times \text{NDF} \quad (2-1)$$

$$\text{Cellulose} = \text{ADF} \times \text{NDF} - \text{ADF} \times \text{NDF} \times \text{ADL} \quad (2-2)$$

双酶法测定淀粉含量步骤: 1 mL 的 (2%) 玉米粉溶液 (pH 6.0) 与 20 μL 耐高温淀粉液化酶 HTAA 混合, 90 $^{\circ}\text{C}$ 液化 3 hr, 随后降温并加入 8,880 μL 0.1M 乙酸钠缓冲液 (pH 4.0) 和 100 μL 的糖化酶 GA-L NEW, 在 58 $^{\circ}\text{C}$ 糖化 4 hr, 最后将溶液降至室温, 过滤后经 HPLC 测定葡萄糖浓度。

本文乙醇得率为相应理论得率的百分比, 即按照理论得率为 100% 计算的得率。计算公式如下:

$$\text{Ethanol yield} = \frac{[\text{Ethanol}] \times W}{976.9 - 0.804 \times [\text{Ethanol}]} \times \frac{1}{0.51 \times f \times [\text{Biomass}] \times m \times 1.111} \times 100\% \quad (2-3)$$

式中: [Ethanol], 发酵结束时乙醇的浓度 (g/L); W, 同步糖化与发酵体系的总用水量 (g); f, 根据范式洗涤法测定的脱木质素玉米芯残渣中的纤维素含量 (g/g); [Biomass], 糖化或发酵体系的玉米芯残渣固体含量 (% , w/w); m, 糖化或发酵体系的总质量 (g)。该乙醇得率计算方法是考虑了乙醇-水体系混合时体积缩减等因素后由 Zhang^[97]改进方法。

2.3 结果与讨论

2.3.1 脱木质素玉米芯残渣的纤维组分和总酚含量

表 2.1 脱木质素玉米芯残渣组分

Table 2.1 Composition of delignified corncob residue.

脱木质素玉米芯残渣组分(% , w/w)	范式洗涤法	两步酸解法
纤维素	72.90 \pm 1.42	77.47 \pm 1.79
半纤维素	4.63 \pm 0.29	3.63 \pm 0.25
木质素	7.18 \pm 2.10	N/A
中性洗涤组分*	13.24 \pm 0.26	N/A
灰分	7.16 \pm 0.20	7.16 \pm 0.20

* 中性洗涤组分包括可溶性固体、寡糖、单糖及部分灰分等。

表 2.2 不同处理的玉米芯残渣总酚含量比较

Table 2.2 Total phenolic content of different treated corncob residues.

原料	总酚含量 (mg/g DM)
玉米芯残渣 (CCR)	21.25 \pm 4.96
(醇洗) 脱酚玉米芯残渣	7.12 \pm 1.58
脱木质素玉米芯残渣 (DCCR)	7.79 \pm 0.63

DCCR 的组分分析结果见表 2.1, 其中两步酸解法主要用于测定纤维素和半纤维素

的含量，范式洗涤法则可以测定较为完整的 DCCR 组成。本研究将采用范式洗涤法测定的 DCCR 组成进行乙醇产品的得率计算。

根据福林酚法测定 DCCR 中总酚含量为 7.79 ± 0.63 mg/g DM (物料干重)，相当于 15% 固体含量玉米芯制备的水解液浓度中有 1.38 g/L 的总酚。表 2.2 结果显示最初的 CCR 总酚含量最高，经过乙醇洗涤后的 CCR 总酚含量最低；而通过碱处理的 CCR，即脱木质素玉米芯残渣总酚含量接近乙醇洗涤后的 CCR 总酚含量，说明这种碱处理方法不仅能除去大量木质素，还洗除近 2/3 的总酚，这将有利于缓解该类抑制物对发酵菌种的抑制。对于该种木质纤维素残渣 DCCR，本研究将从菌种驯化、固体含量以及糖化与发酵温度三个方面进行了考察。

2.3.2 不同种子培养方式的同步糖化与发酵

本文首先进行种子驯化对发酵的影响的考察，对安琪酵母菌种在两种不同种子培养方式（驯化方式和直接接种）进行同步糖化与发酵。为尽可能保证种子液中菌量、残留葡萄糖及营养盐成分相似，驯化组采用的由 15% 固体含量 DCCR 制备的水解液培养基葡萄糖浓度接近 100 g/L，故对照组（不驯化）种子液也将葡萄糖补足至 100 g/L，经过同样的 15 hr 培养，过程中同样的两次加碱调节 pH。在预糖化后的第 12 hr (即接种前)，从种子液中取样，测定其菌体 OD₆₀₀ (≈ 5) 及残留葡萄糖 (≈ 50 g/L)，确认两组种子液的这两个指标趋于一致，以此降低初始菌量及残留葡萄糖对同步糖化发酵的影响。

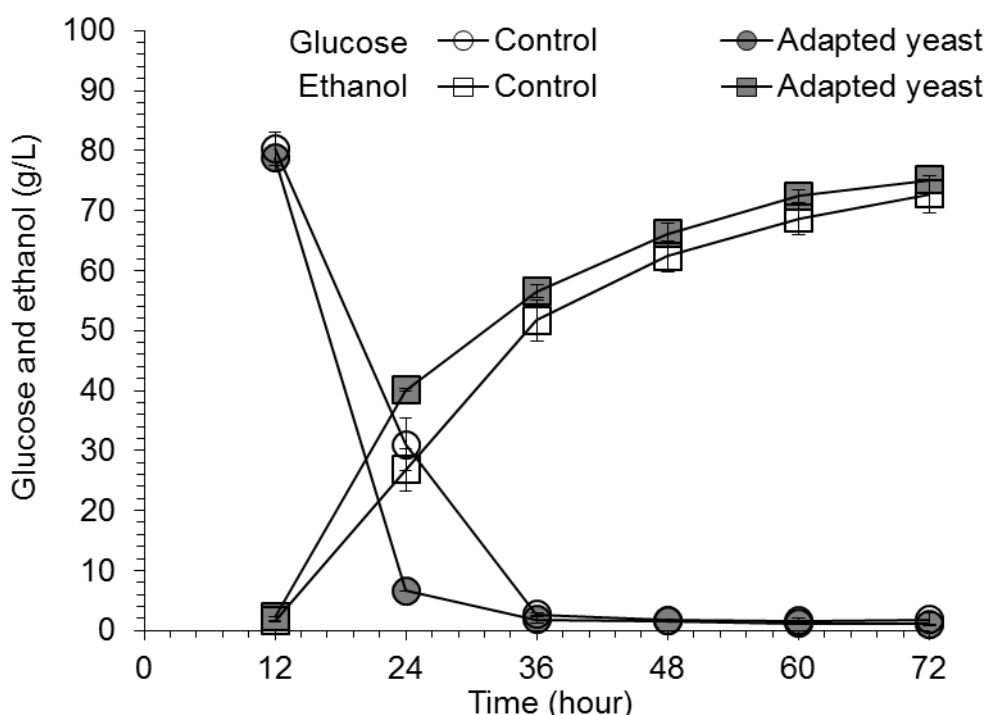


图 2.1 不同菌种培养方式下脱木质素玉米芯残渣的同步糖化与发酵

Fig. 2.1 Effect of short-term yeast adaptation on ethanol fermentation using delignified corncob residue. Conditions: 20% solids loading, 15 FPU/g DM enzyme dosage, pH 4.8, 150 rpm, 10% yeast inoculation ratio, prehydrolysis for 12 hr at 50 °C and SSF for 60 hr at 37 °C. The SSF experiments were duplicated and the error ranges were given in figures.

结果发现驯化组葡萄糖初期代谢速率快于对照组（未驯化），驯化组乙醇最终浓度也略高于对照组，但总体差异不大：驯化组中乙醇浓度、得率、产率分别为 75.07 g/L、89.38%、1.04 g/L/h；而对照组的三指标分别为：72.79 g/L、84.47%、1.01 g/L/h。由于脱木质素玉米芯残渣含有一定酚类抑制物，经过三步浓度升高梯度水解液驯化的菌种对生物反应器中经 12 hr 预糖化后的高浓度酚类抑制物具有一定的适应及耐受性，相应地缩短了菌种生长过程中的延滞期，接种后 12 hr 内（即第 12 hr 至第 24 hr）便将葡萄糖快速代谢至低水平（图 2.1）。对照组在同步糖化发酵第 24 小时才进入最大乙醇生产速率阶段，相对滞后的代谢增加了发酵过程中葡萄糖损耗，致使乙醇最终浓度偏低，得率下降。另外，DCCR 水解液中未检测到糠醛、5-羟甲基糠醛、乙酸这类抑制物，但总酚含量仍然较高（ 1.95 ± 0.16 g/L，图中未显示），虽然略低于未脱除木质素的玉米芯残渣水解液的含量（ 5.31 ± 1.24 g/L）^[86]，说明碱处理脱除玉米芯残渣中木质素的同时，除去了大部分木质素衍生的酚类化合物。

2.3.3 不同固体含量下的同步糖化与发酵

一般而言，固体底物含量的增加对乙醇浓度的提升至关重要，但随之而来的传质传热差的混合问题将导致乙醇得率迅速下降^[91]。本实验室所设计的装有螺带搅拌桨的生物反应器适合高固体含量木质纤维素乙醇生产，与常规 Ruston 型桨相比显著改善混合时间。

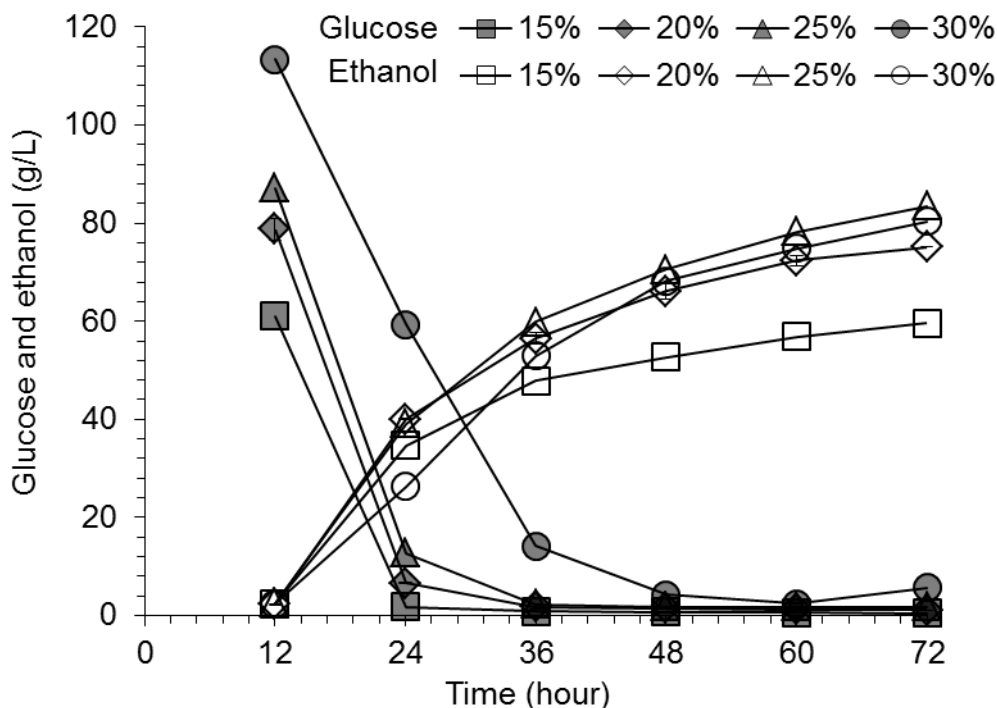


图 2.2 不同固体含量下脱木质素玉米芯残渣的同步糖化与乙醇发酵

Fig. 2.2 Effect of solids loadings on ethanol fermentation using delignified corncob residue.

Conditions: 15%, 20%, 25% and 30% solids loading, respectively, 15 FPU/g DM enzyme dosage, pH 4.8, 150 rpm, yeast seeds adapted, 10% yeast inoculation ratio, prehydrolysis for 12 hr at 50 °C and SSF for 60 hr at 37 °C.

由于脱木质素玉米芯残渣初始含水率约为 67%，考察从 15% 至 30% 固体含量对同步糖化发酵的影响。不同 DCCR 固体含量下的同步糖化与发酵实验结果见图 2.2。结果显示随着固含量从 15%、20% 增至 25% 时，72 hr 处乙醇浓度分别从 56.64 g/L、75.07 g/L 增至 83.53 g/L，当增至 30% 时，乙醇浓度略微下降至 80.36 g/L。随着固含量增大，乙醇得率急剧下降，分别为 96.41%、89.38%、78.24%、57.37%。

其中，随着固含量增大，预糖化 12 hr 后葡萄糖初始浓度逐渐升高（图 2.2）。当固体含量为 30% 时，安琪酵母对该体系中葡萄糖代谢速率明显减缓，在第 48 hr 才将发酵醪中葡萄糖浓度消耗至低水平，而其他三组固含量均在第 24 hr 至 36 hr 之间便将葡萄糖消耗至低水平。30% 固含量时在发酵后期出现葡萄糖浓度回升，其乙醇最终浓度略低于在 25% 固含量条件获得的最高乙醇终浓度。由于脱木质素玉米芯残渣中含有一定的酚类抑制物，固含量高低直接决定液相中抑制物浓度，30% 固体含量中酚类抑制物浓度可能超过菌种的耐受极限，导致发酵速率明显减慢。虽然安琪酵母对 25% 固含 DCCR 发酵所得乙醇最高，达到 83.53 g/L，但乙醇得率仅为 78.24%。与之相比，20% 固含量时乙醇得率相对较高，乙醇浓度和得率分别为 75.07 g/L 和 89.38%。15% 固含量时乙醇得率最高，但浓度最低。综合考虑这两个指标，在既保证高乙醇浓度又有高得率情况下，本研究选择在 20% 最佳固体含量条件下对后续的温度影响进一步考察。

2.3.4 不同糖化和发酵温度下的同步糖化与发酵

由于同步糖化发酵是在添加纤维素酶情况下进行，而纤维素酶的最适温度（50 °C 左右）与酵母菌生长最适温度（30 °C 左右）不匹配，因此传统的同步糖化与发酵的温度选择是按一个折衷的方案，即增设一个较高温度（45-55 °C）的预糖化阶段，之后的同步糖化发酵阶段维持 30-37 °C^[38,98]。然而，在工业大型发酵罐上进行的操作经验表明，变温操作在实际过程中有诸多困难，从糖化温度 45-55 °C 降至发酵温度 30-37 °C 的过程耗时长，传热速率慢。尽管对于大多数木质纤维素原料的同步糖化与发酵这是一个不得不采用的策略，但本研究所使用的 DCCR 是一种经过高度处理的特殊纤维素原料，在较低温度下的糖化和较高温度下的发酵有可能达成一致，从而使同步糖化与发酵可以在同一个温度下进行。本研究的乙醇发酵菌株采用国内乙醇工业发酵的常用耐热菌安琪酵母，由于在 37 °C 下该酵母生长及发酵性能最佳，37 °C 将作为一个测试温度，同时设置一个较低的 30 °C 作为对照，在 37 °C 和 30 °C 两个恒定温度下进行的同步糖化与发酵结果，并与常规的 50 °C 至 37 °C 的变温同步糖化与发酵进行比较，结果见图 2.3。

图 2.3 比较了传统变温 SSF 与恒温 SSF：变温组中先后进行了 12 hr 的 50 °C 预糖化及 60 hr 的 37 °C 同步糖化与发酵，最终的乙醇浓度及得率这两个指标分别为 75.07 g/L、89.38%；37 °C 恒温组中只进行了 72 hr 的同步糖化与发酵，没有预糖化过程，最终乙醇两指标分别为 73.62 g/L、87.37%，该结果与传统变温组没有本质区别；然而当恒温组设为 30 °C 时，最终乙醇的两指标分别降至 66.47 g/L、79.78%。恒温 30 °C 的条件下乙醇最终浓度明显较低，但恒温 37 °C 条件组的综合指标与 50 °C 至 37 °C 变温组相差无几，这可能与本研究采用的含纤维素较高的 DCCR 原料有关，较少的木质素含量对纤维素酶

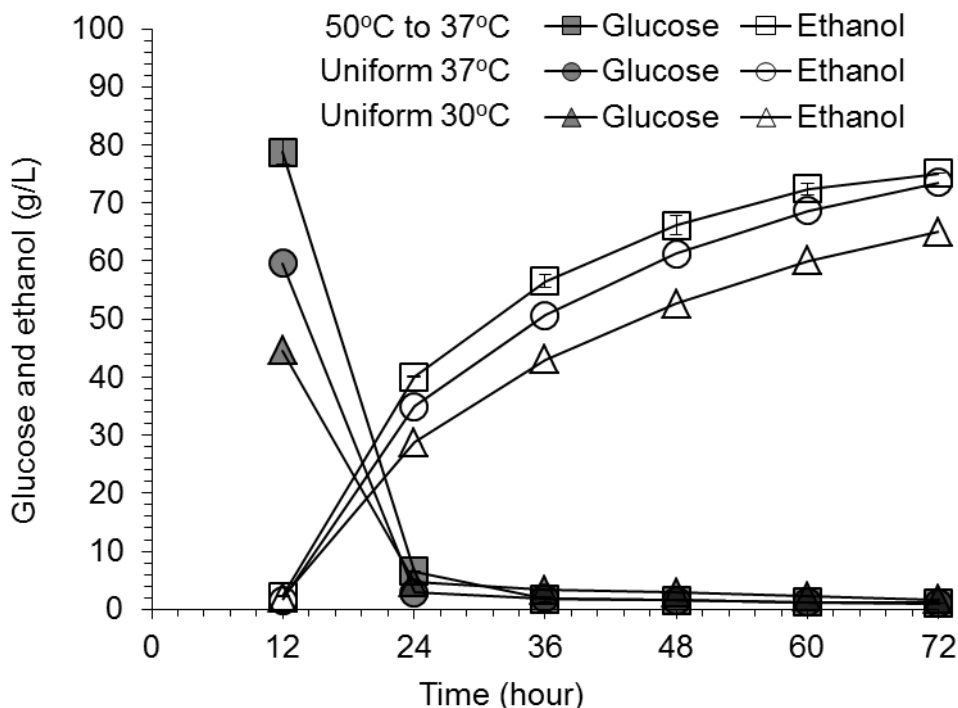


图 2.3 不同温度下脱木质素玉米芯残渣的同步糖化与发酵

Fig. 2.3 Effect of temperature profiles in SSF on ethanol fermentation using delignified corncob residue. Conditions: 20% solids loading, 15 FPU/g DM enzyme dosage, pH 4.8, 150 rpm, yeast seeds adapted, 10% yeast inoculation ratio. Prehydrolysis for 12 hr at 50 °C and SSF for 60 hr at 37 °C in the temperature shifting SSF process, while temperature in prehydrolysis and SSF stages was both kept at 37 °C or 30 °C in the uniform temperature profile, respectively.

吸附较弱，尤其是在发酵后期，纤维素酶高效发挥催化作用，使葡萄糖在 37 °C 情况下亦能源源不断分解出来。这个结果同样在工业应用上意义非凡：相比于工业上费时地将 50 °C 降温至 37 °C，考虑到相近的乙醇浓度及得率结果，恒温 37 °C 显然是一个更好的选择，可建议取消变温，这将在保证高产的同时有效减少能耗，对工业化生产起到相当的积极作用。

2.3.5 脱木质素玉米芯残渣和玉米粉的同时糖化与发酵比较

玉米粉是目前被用作商业燃料乙醇生产的主要原料。一般在现存的淀粉生物乙醇生产工厂中^[87]， α -淀粉酶常规用量在 5-10 U/g starch，温度在 90 °C 以上，糖化酶常规用量在 25-100 U/g starch, 50-60 °C。通过实验室现有的高温淀粉液化酶 HTAA 及糖化酶 GA-L NEW 在上述的酶用量范围内进行玉米粉的同时糖化与发酵生产乙醇，来模拟工业生产。

根据双酶法测定玉米粉中淀粉含量为 76.89% \pm 2.14%。在相同 20% 固含量条件下，各自经过一定时间（6 或 12 hr）的预糖化，使得初始葡萄糖浓度达到 80-100 g/L，以接种开始同步糖化与发酵为 0 时刻。图 2.4 显示，在经过 0.5 hr 的 HTAA 酶液化及 5 hr 的 GA-L NEW 酶糖化后，玉米粉组产生 100.50 g/L 的葡萄糖，比经过 12 hr 预糖化的脱木质素玉米芯残渣组产生的 78.73 g/L 浓度的葡萄糖高出约 21 g/L。发酵终止时，玉米芯残渣组获得的乙醇浓度及得率分别为 75.07 g/L、89.38%，而玉米粉组得乙醇浓度及得率

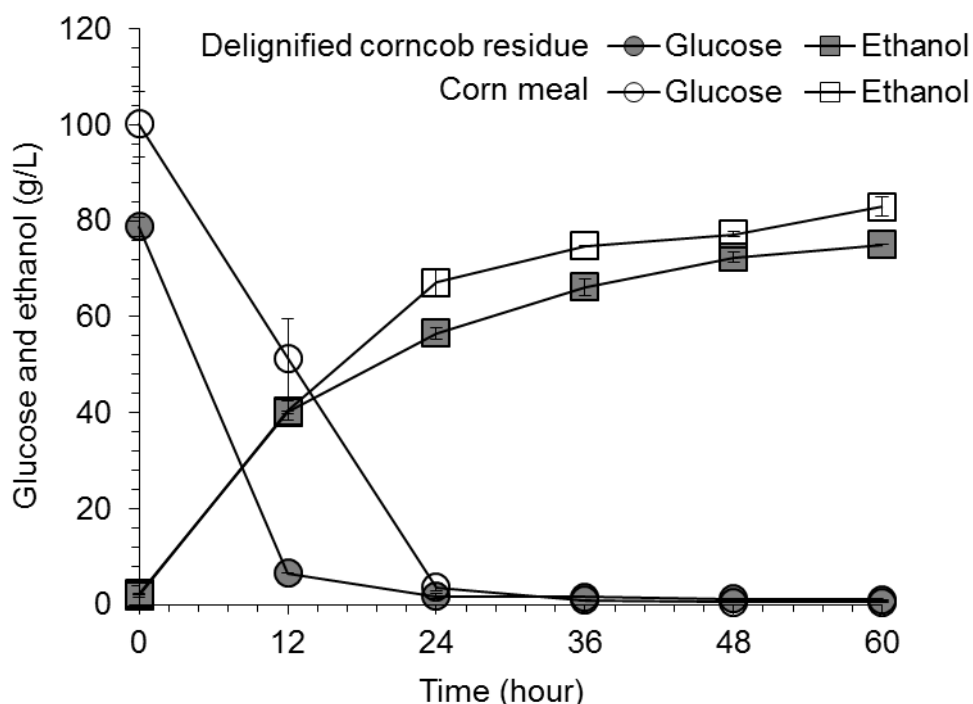


图 2.4 脱木质素玉米芯残渣与玉米粉的同时糖化与发酵对比

Fig. 2.4 Comparison of ethanol fermentation performance using delignified corncob residue and corn meal. Conditions for both feedstock: 20% solids loading, 150 rpm. Prehydrolysis stage for DCCR: 15 FPU/g DM cellulase enzyme, pH 4.8 for 12 hr at 50 °C, yeast seeds adapted; for corn meal: 5 U/g DM α -amylase HTAA, pH natural (pH 6.3) for 0.5 hr at 90 °C, and followed 37.5 U/g DM glucoamylase GA-L NEW, pH 4.6 for 5 hr at 50 °C, yeast seeds non-adapted. SSF stage for both feedstock: 10% inoculation ratio, pH 4.8 for 60 hr at 37 °C. The initial point (0 hr) refers to the inoculation of the yeast seeds. The experiments were duplicated and the error ranges were given in figures.

分别为 82.95 g/L、92.20%。结果显示安琪酵母在两种原料的发酵性能、乙醇生产速率接近，乙醇得率均在 90% 左右。该结果表明，DCCR 这种原料用于乙醇发酵具有极其优越的表现，性能接近淀粉原料。

2.3.6 脱木质素玉米芯残渣和玉米粉生产乙醇成本比较

为进一步比较玉米芯与玉米粉在生产乙醇上的异同，本文进行初步的成本分析，主要从物料及酶两种原材料的成本考虑，该两种原材料的价格按成文时最新报价计算。

2.3.6.1 物料成本计算（以生产每吨无水乙醇为基准）

$$\text{Feedstock consumed} = \frac{1 \text{ ton}}{[\text{Ethanol yield}] \times [\text{theoretical ethanol from 1 ton feedstock}]} \quad (2-4)$$

对于 DCCR 组：

$$\text{DCCR consumed} = \frac{1 \text{ ton}}{89.38\% \times 1 \times 72.90\% \times 1.111 \times 0.51} = 2.71 \text{ ton} \quad (2-5)$$

当脱木质素玉米芯残渣被认为是一种没有实用价值的固体废弃物时，对于脱木质素玉米芯残渣 Case 1: $2.71 \times 0 = 0$ (¥)；而当参考国内“阿里巴巴”全球采购批发平台 www.1688.com 上每吨玉米芯的平均售卖价格为 ¥ 600 时，对于脱木质素玉米芯残渣

Case 2: $2.71 \times 600 = 1626.0$ (¥)。

对于玉米粉组:

$$\text{Corn meal consumed} = \frac{1 \text{ ton}}{92.20\% \times 1 \times 76.89\% \times 1.111 \times 0.51} = 2.49 \text{ ton} \quad (2-6)$$

同样参考“阿里巴巴”上每吨玉米粉的平均售卖价格为¥ 2000 时,对于玉米粉 Case 3: $2.49 \times 2000 = 4980.0$ (¥)。

2.3.6.2 酶成本计算 (以生产每吨无水乙醇为基准)

$$\text{Enzyme consumed} = \frac{[\text{Enzyme dosage}] \times [\text{Feedstock consumed}]}{[\text{Enzyme activity}]} \quad (2-7)$$

对于 DCCR 组:

$$\text{Cellulase consumed} = \frac{15 \text{ FPU} \times 2.71 \text{ ton}}{135 \text{ FPU}} = 301.11 \text{ kg} \quad (2-8)$$

纤维素酶 Youtell #6 价格参考尤特尔生化公司信息,其平均售卖价为¥ 10/kg,则脱木质素玉米芯残渣 (Cases 1 and 2): $301.11 \times 10 = 3011.1$ (¥)。

对于玉米粉:

$$\begin{aligned} \text{Enzyme consumed} = \text{HTAA} + \text{GAL NEW} &= \frac{5 \text{ U} \times 2.49 \text{ ton}}{22000 \text{ U}} + \frac{37.5 \text{ U} \times 2.49 \text{ ton}}{100000 \text{ U}} \\ &= 0.57 \text{ kg}(\alpha\text{-amylase HTAA}) + 0.93 \text{ kg}(\text{glucoamylase GAL NEW}) = 1.50 \text{ kg} \quad (2-9) \end{aligned}$$

参考杰能科公司信息,淀粉液化酶 α -amylase HTAA 及糖化酶 GA-L NEW 的平均售卖价分别为¥ 20/kg、¥ 30/kg,则对于玉米粉 (Case 3): $0.57 \times 20 + 0.93 \times 30 = 39.3$ (¥)。
生产成本为物料成本及酶成本之和,详见表 2.3。

表 2.3 脱木质素玉米芯残渣与玉米粉生产乙醇的成本比较 (物料及酶方面)

Table 2.3 Comparison of ethanol production cost from delignified corncob residue and corn meal in view of enzyme and feedstock.

	DCCR (Case 1)	DCCR (Case 2)	玉米粉 (Case 3)
乙醇浓度 (g/L)	75.07 ±0.00	75.07 ±0.00	82.95 ±2.01
乙醇得率 (%)	89.38 ±1.90	89.38 ±1.90	92.20 ±2.40
物料 (ton/ton ethanol)	2.71	2.71	2.49
酶 (kg/ton ethanol)	301.11	301.11	1.50
物料成本 (¥/ton ethanol)	0	1626.0	4980.0
酶成本 (¥/ton ethanol)	3011.1	3011.1	39.3
生产成本 (¥/ton ethanol)	3011.1	4637.1	5019.3

表 2.3 中结果显示,仅从物料价格及酶价格考虑,DCCR 生产乙醇成本与玉米粉生产成本接近。进一步比较,如果把脱木质素玉米芯残渣仅考虑为木糖提取工艺后的单纯

的固体废弃物 (Case 1)^[99], 这将极大降低乙醇的生产成本, 比玉米粉组 (Case 3) 生产乙醇成本节省了近 40%。如果脱木质素玉米芯残渣的价格按原始的玉米芯价格来计算 (Case 2), 乙醇生产成本与玉米粉 (Case 3) 生产乙醇成本接近。另外, Case 2 中纤维素酶成本占乙醇生产成本的 65%, 而 Case 3 中淀粉液化酶及糖化酶成本占生产成本不足 1%。

在木质纤维素炼制工艺中, 纤维素酶的成本比重之大而不容小觑。通过改善纤维素酶生产菌株的性状, 提高酶的生产率, 从而降低酶的成本。Humbird^[100]通过在 20% 固含量及 90% 纤维素转化率条件下生产乙醇, 估算酶成本为 \$ 0.34/加仑乙醇 (约合 ¥ 2.14/加仑乙醇)。如果按照此操作条件计算^[101], Case 1 中通过脱木质素玉米芯残渣生产每吨乙醇的成本将降至 ¥ 714.04。

该初步成本估算仅仅考虑了物料用量成本及酶用量成本, 乙醇生产成本还应包括劳动力、能耗、日常维护、折旧等其他方面^[87]。但通过这两种不同的原料生产乙醇时, 由于原料具有相似的葡聚糖含量、相近的生化反应途径、相像的生产设备, 致使获得相当的乙醇最终浓度。而且, 从玉米芯中提取的木糖及木质素产物的价值远远高于玉米粉加工发酵过程所得副产物玉米酒精糟及可溶物 (DDGS) 的价值, 所以, 以玉米芯为原料工业提取木糖后的固体废弃物——脱木质素玉米芯残渣 (DCCR) 来生产乙醇, 具有替代玉米粉生产燃料乙醇的潜力。

2.4 小结

本研究对脱木质素玉米芯残渣的实际发酵性能进行考察, 通过市购安琪酵母对其进行同步糖化与发酵生产燃料乙醇, 分别从菌种驯化、固体含量及温度三方面进行研究, 并与玉米粉这种淀粉类的原料发酵性能进行比较。结果发现: 菌种驯化对 DCCR 的同步糖化与发酵初期时的速率有一定的提升, 但总体差异不大; 固含量为 20% 时乙醇产品得率较高 (89.38%), 同时乙醇浓度达到 75.07 g/L, 乙醇浓度和得率均达到较高水平, 综合指标最佳; 与常规的变温同步糖化与发酵 (50 °C → 37 °C) 相比, 全过程恒定在 37 °C 下的同步糖化与发酵的乙醇得率与浓度结果与之非常接近; 与玉米粉这种淀粉类原料进行发酵性能比较, 在相同固含量 (20%) 条件下, DCCR 发酵性能 (乙醇终浓度 75.07 g/L) 与玉米粉发酵性能 (82.95 g/L) 接近, 得率相当, 且在初步成本分析中, DCCR 生产乙醇的成本甚至低于玉米粉, 具有替代淀粉类原料生产燃料乙醇的潜力。

第 3 章 减压精馏方式实现纤维素酶的生物炼制过程循环利用

3.1 前言

纤维素乙醇商业生产过程中,纤维素酶成本高一直是产业发展的瓶颈。Zacchi 研究团队分别于 2002 年^[101]、2008 年^[102]、2012 年^[9]对木质纤维素乙醇生产过程中纤维素酶成本占乙醇生产成本比重进行估计:Galbe 在通过软木生产乙醇过程中估算纤维素酶成本,占总乙醇生产成本的 12%,仅在 SSF 工段竟占大约 50%;Macrelli 在蔗渣生产乙醇的技术经济评价中估计纤维素酶成本占乙醇最低售卖价的 22%。相比于玉米淀粉生产第一代生物乙醇中酶成本占生产成本不到 1%相比^[103],第二代生物乙醇生产过程中纤维素酶成本是影响产业化的重要因素之一。

为了降低纤维素酶用成本,从源头上通过改善酶生产效率、提高酶活性是策略之一^[104]。杰能科、诺维信等几家主要的商品酶制剂生产商在过去的十年通过蛋白工程改造及提纯工艺改善,大大降低了纤维素酶的生产成本,但现有的酶活水平还远远不能满足生物乙醇产业化发展。在现有酶活水平下,通过循环利用纤维素酶使得其成本降低同样是一个不错的选择^[105]。

很多学者已在木质纤维素水解体系中研究纤维素酶的回收与循环利用。纤维素酶是多种酶组分组成的复合酶系,各组分因特异催化作用位点不同,对底物亲和力不同。水解完成后,纤维素酶在液相与固体残渣中均有分布,循环利用的对象分三种情况:(1)固液分离后只取上清,(2)固液分离后只取固体残渣,(3)取全醪液。目前被报道的循环利用的方法又可概况为两类:(a)添加新鲜底物直接利用纤维素酶,(b)添加促解吸附物质回收纤维素酶后再利用。例如前者(a)方法包括循环利用不溶固体组分^[74,76]、用新鲜底物再吸附液体组分及沉淀中纤维素酶^[106]等方式;方法(b)包括超滤方法回收液相中纤维素酶、添加表面活性剂(吐温 80)解吸附^[106,107]、碱洗脱^[77]或其他溶剂使纤维素酶解吸附于固体残渣。通过后者(b)方法的这类高强度及偏碱性条件的解吸附,回收的纤维素酶是否保留酶活力还需商榷,且这类方法的缺陷也在于成本高,处理复杂,对后续发酵菌株有毒害作用等。纤维素酶的循环利用还面临着另一个重要问题:不断积累的木质素是纤维素酶的重要抑制物之一,它会无效地吸附纤维素酶而降低酶分解纤维素的效率,而很多循环利用方法为了达到理想的回收效果而不顾预处理成本以降低木质素含量。另外,现有的有关纤维素酶的循环利用方法大多是针对底物固体含量较低的酶解体系,同步糖化与发酵生产乙醇过程中,尤其是在高底物固体含量体系中,纤维素酶的循环则较少涉及。目前缺乏切实可行的方法实现同步糖化与发酵生产乙醇过程中,尤其是高底物含量条件下纤维素酶的循环利用。

SSF 过程中能否实现纤维素酶的循环利用,这关系到纤维素乙醇的连续快速生产。Ghose 于 1984 年首先提出减压精馏在木质纤维素原料稻秆进行 SSF 过程中的应用^[63],他认为 SSF 可以有效改善水解过程产生的葡萄糖对纤维素酶的反馈抑制,但生成的乙醇又会对酶抑制,这就需要减少乙醇。一方面,减压精馏降低了浓度升高的乙醇对酵母和

纤维素酶的抑制；另一方面，补加的新鲜物料可以在之前较低温度蒸馏后残液中保留的纤维素酶作用下进一步催化。但由于固含量较低，使得乙醇发酵浓度较低，小于 $40 \text{ g/L}^{[108]}$ ，乙醇的分离不具实际运用前景；且纤维素酶占发酵体系的成本、循环利用的效果及维持真空的能耗也并未做进一步研究，之后也鲜有相关报道。由于受设备的限制，早期维持真空的成本较高，但随着技术进一步发展，设备密封性及真空泵能效提高，维持真空成本随之大幅降低，通过减压精馏方式使得纤维素酶在木质纤维素 SSF 过程中循环利用可能仍具有运用前景。

本研究将用实验室筛选菌种 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1 对木质纤维素原料（包括脱木质素玉米芯工业残渣和预处理并脱毒玉米秸秆）进行高固含量的同步糖化与发酵生产乙醇，通过在位间歇减压精馏方式，把产物乙醇抽出，补入新鲜物料，循环利用低温蒸馏后残留在醪液中的纤维素酶，从而启动新一轮同步糖化与发酵，以实现纤维素酶的循环利用。并监测循环 SSF 过程中，纤维素复合酶系的三个酶活指标（相对酶活、pNPG 酶活、CMC-Na 酶活）分别在三个循环利用的对象（全发酵醪（W）、固体沉淀（S）、上清液体（L））中的活性，以考察总纤维素酶活和单组分酶活的残留及分布情况。对该循环 SSF 过程进行等酶用量及高酶用量下的批次对照实验，以验证纤维素酶的循环利用效果。最后以本文实验数据为基础，通过 Aspen plus 流程模拟纤维素乙醇的工业生产模型，对常规工艺和减压精馏纤维素酶循环工艺的能耗及成本进行了严格计算。本文将乙醇分离与纤维素酶的循环整合到同步糖化与发酵工艺中，实现纤维素乙醇的连续性生产，提高整个乙醇生产过程的经济性，为工业生产开发新的循环策略来降低纤维素酶成本提供参考及理论依据。

3.2 材料与方法

3.2.1 原料和酶

脱木质素的玉米芯残渣（Delignified corncob residues，以下简称 DCCR）来自山东龙力生物科技公司（中国，禹城），该原料与 2.2.1 节介绍的 DCCR 生产批次不同而成分有所不同，其组分为纤维素 81.63%，半纤维素 3.12%，木质素 1.69%，灰分 6.69%。

玉米秸秆（Corn stover，以下简称 CS）来自河南郸城，原始组分纤维素为 36.18%，半纤维素 19.83%。通过本实验室发明的干式蒸汽稀酸预处理^[23] $175 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min，其中硫酸浓度为 2.5%，再经过本实验室筛选的树脂枝孢霉菌 *Amorphotheca resinae* ZN1 生物脱毒 7 天，机械磨浆处理后，其纤维素组分变为 39.98%，冻存备用。

纤维素酶制剂 Youtell #6 购于湖南尤特尔生化公司（中国，岳阳），详见 2.2.1 节。

3.2.2 培养基

合成培养基（SM medium）：葡萄糖 20 g/L ， KH_2PO_4 2 g/L ， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L ， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L ，YE 1 g/L ，pH 自然。

同步糖化发酵营养盐： KH_2PO_4 2 g/L ， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L ， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L ，酵母

提取物 (YE) 10 g/L (用于 DCCR 发酵体系) 或者 2 g/L (用于 CS 发酵体系), pH 自然。

DCCR 水解液培养基: 本研究的菌种培养按逐步增加脱木质素玉米芯残渣水解液浓度进行驯化。50%、75%、100% 水解液培养基分别按对应体积用去离子水稀释, 并以总体积按 SM 培养基 (不包括葡萄糖) 补足对应浓度营养盐, pH 调至 6.0。

CS 水解液培养基: 本研究的菌种培养按逐步增加玉米秸秆水解液浓度进行驯化。50%、50%、100% 水解液培养基分别按对应体积用去离子水稀释, 并以总体积按 SM 培养基 (不包括葡萄糖) 补足对应浓度营养盐, pH 调至 5.5。

上述培养基均经 115 °C 蒸汽灭菌 20 min。

脱木质素玉米芯残渣水解液的制备详见 2.2.2 节, 该批含葡萄糖 108.37 g/L, 木糖 5.63 g/L, 其中抑制物浓度极低。该水解液主要用于不同浓度水解液培养基的配制及菌种驯化。

玉米秸秆水解液制备的操作条件与 2.2.2 节 DCCR 水解液制备一致, 固含量同为 15% (w/w), 所获水解液含葡萄糖 64.39 g/L, 木糖 15.12 g/L, 乙酸 2.14 g/L, 其他抑制物浓度较低。该水解液同样主要用于不同浓度水解液培养基的配制及菌种驯化。

3.2.3 菌种及其驯化过程

乙醇发酵菌种为本实验室筛选的 *Saccharomyces cerevisiae* DQ1, 经过超过 1000 小时水解液培养基每 12 hr 的转接培养长期驯化。

DCCR 体系中菌种驯化过程: 详见本文 2.2.3 节菌种驯化过程。

CS 体系中菌种驯化过程: 与 DCCR 体系菌种驯化步骤基本一致, 取 2 mL 甘油管保种 (-80 °C) 接入 20 mL SM 培养基活化 15 hr ($OD_{600} \approx 4$); 接着以 10% (v/v) 接种量 (即 2 mL 菌液) 转接入 20 mL 50% 水解液培养基中培养 12 hr; 再以 10% 接种量转接入 20 mL 的 50% 水解液培养基中培养 12 hr; 最后以 10% 接种量 (即 20 mL) 倒入 200 mL 的 100% 水解液培养基中扩大培养 12 hr ($OD_{600} \approx 6$) 以备上罐。

以上培养过程温度均控制在 30 °C, 转速 180 rpm。

3.2.4 同步糖化与发酵设备及操作

本研究的 SSF 实验仍在实验室自行设计的 5L 生物反应器中进行, 不同物料采用的 SSF 方式略有不同: (1) DCCR 的 SSF (不含预糖化); (2) CS 的 SSF (含预糖化工段)。

(1) 首先倒入营养盐溶液, 再倒入该批物料 DCCR, 加入所需的全部纤维素酶, 最后迅速倒入种子液 (此为 0 时刻), 条件为 37 °C、pH 4.2、150 rpm, 在同步糖化发酵过程中定时取样。

(2) 分为两个阶段: 预糖化阶段和同步糖化发酵阶段。预糖化过程中, 首先倒入营养盐溶液, 加入所需的全部纤维素酶, 然后以补料的方式加入经灭菌的 CS 至设定的固体含量, 条件为 50 °C、pH 4.8、150 rpm, 维持 12 hr。在预糖化结束前半小时往夹套注入冷却水, 将温度降为 37 °C。种子液 (约 220 mL) 倒入 5L 生物反应器后, pH 维持 4.8, 开始 SSF 阶段, 在同步糖化发酵过程中定时取样。

3.2.5 同步糖化与发酵中纤维素酶循环利用（在位减压精馏）

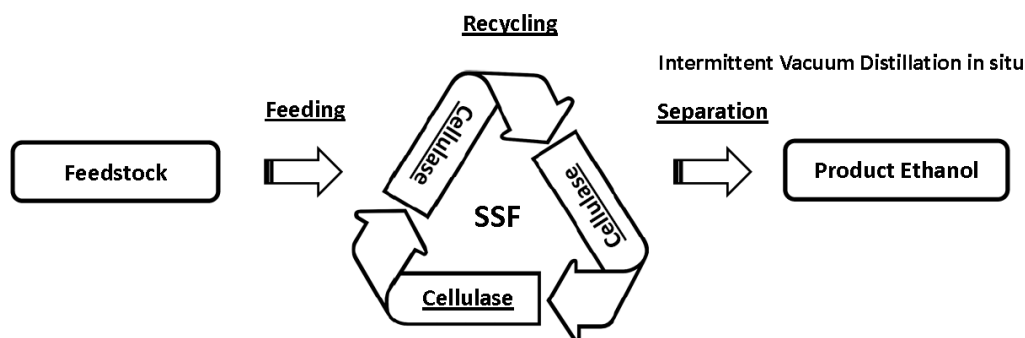


图 3.1 同步糖化与发酵过程纤维素酶循环利用技术路线图

Fig. 3.1 Schematic diagram of cellulase recycling during cellulosic ethanol production.

在位间歇减压精馏实现 SSF 中纤维素酶循环利用的具体步骤为：

- (1) 纤维素乙醇的生产：向乙醇发酵反应器中加入木质纤维素原料、纤维素酶、乙醇生产菌种，开始同步糖化与发酵生产乙醇；
- (2) 间歇减压精馏分离乙醇：待反应器发酵醪中乙醇积累到一定浓度后，在特定条件下通过减压精馏将乙醇进行在位分离；
- (3) 纤维素酶的循环：减压精馏结束后，补加新鲜木质纤维素原料，并采取必要的通气、增加预酶解工段、补加乙醇生产菌种等措施，继续同步糖化与发酵过程；
- (4) 循环进行上述（2）和（3）的步骤，SSF 体系中纤维素酶将继续被利用。

3.2.6 分析方法

样品中物质（葡萄糖、木糖、乳酸、乙醇、糠醛及 HMF 等）浓度测定方法、原料的纤维素组分及灰分的测定方法详见本文 2.2.6 节。

酶活测定准备：用已知重量的离心管 M_1 装适量样品（共约 5 mL），称总重 M_2 ，经 4,000 rcf 离心 5 min，吸取全部上清液至已称重的新离心管 M_3 ，称总重 M_4 。此时，根据数据计算，

$$\text{全发酵醪 (W):} \quad W = M_2 - M_1 \quad (3-1)$$

$$\text{上清液体 (L):} \quad L = M_4 - M_3 \quad (3-2)$$

$$\text{固体沉淀 (S):} \quad S = W - L = M_2 - M_1 - M_4 + M_3 \quad (3-3)$$

此时液固各自占全醪比重分别为：

$$L\% = \frac{L}{W} = \frac{M_4 - M_3}{M_2 - M_1} \times 100\% \quad (3-4)$$

$$S\% = \frac{S}{W} = \frac{M_2 - M_1 - M_4 + M_3}{M_2 - M_1} \times 100\% \quad (3-5)$$

按上述重量，用柠檬酸缓冲液（pH 4.8）将 L 及 S 分别补足至与 W 一致的重量后，混匀，及时测定 W、S、L 对应的酶活：相对酶活、 β -葡糖苷酶酶活、内切- β -1,4-葡聚糖酶酶活。

其中, 相对酶活(表征总的酶活)测定通过 10 mL 酶解体系测得, 其中包括 0.5 g 样品, 0.45 g 物料, 9 mL 柠檬酸缓冲液(pH 4.8)及 10 μ L 四环素溶液。经水浴摇床 48 hr, 50 $^{\circ}$ C, 150 rpm 酶解测得葡萄糖浓度。

β -葡糖苷酶酶活(表征单组分酶活)由 pNPG 法测定^[109](简称 pNPG 酶活)。该法步骤: 备好 50 mM pH 4.8 柠檬酸缓冲液, 并用该缓冲液配制 8 mM 对硝基苯- β -D-吡喃葡萄糖苷(pNPG)溶液; 取 0.1 mL 经过适当倍数稀释的酶醪液, 加入 0.4 mL 柠檬酸缓冲液及 0.5 mL pNPG 溶液, 在 37 $^{\circ}$ C 下水浴 10 min, 再加 0.5 mL 1M Na_2CO_3 溶液终止反应, 经 13,200 rpm 离心 5 min, 取上清, 测定其在 405 nm 下的吸光值。

内切- β -1,4-葡聚糖酶酶活(表征另一单组分酶活)由 CMC-Na 法测定^[89,110](简称 CMC 酶活)。该法步骤: 备好 50 mM pH 4.8 柠檬酸缓冲液, 并用该缓冲液配制 1% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶液; 取 0.5 mL 经过适当倍数稀释的酶醪液, 加入 0.5 mL CMC-Na 溶液, 在 50 $^{\circ}$ C 下水浴 30 min, 再加 3 mL DNS 溶液并煮沸 5 min, 冰浴终止反应, 冷却后取 0.4 mL 显色液, 加 2 mL 去离子水稀释, 最后测定其在 540 nm 下的吸光值。

上述 pNPG 酶活及 CMC 酶活测定方法所得结果为残留量, 三组分 W、S、L 分别再除以各自比重值 1、S%、L%, 折算出三者对应的单位质量酶活浓度, 用以考察后序实验中酶活浓度的变化。

乙醇得率为相应理论得率的百分比, 即按照理论得率为 100% 计算的得率。计算公式如下:

$$\text{Ethanol yield} = \left(\frac{[\text{Eth}] \times W}{976.9 - 0.804 \times [\text{Eth}] + \sum_{i=1}^n C_i V_i} \right) \times \frac{1}{0.51 \times f \times (m + \sum_{i=1}^n m_i) \times 1.111} \times 100\% \quad (3-6)$$

式中: [Ethanol], 发酵结束时醪液乙醇浓度 (g/L); W, SSF 结束时体系的水量 (g), 因过程考虑蒸出及补入水至 SSF 初始的水量, 略有差别需校正; C_i , 第 i 次减压精馏获得的蒸馏液中乙醇浓度 (g/L); V_i , 第 i 次减蒸获得的蒸馏液体积 (L); f, 根据范式洗涤法测定物料中的纤维素含量 (g/g); m, SSF 体系初始物料干重 (g); m_i , 第 i 次补加新料干重 (g)。该乙醇得率计算方法是在 Zhang^[97]基础上由包艳文^[111]修改的方法。

循环 SSF 过程减蒸前后需进行乙醇物质衡算, 误差范围控制在 $\pm 5\%$ 之内。

$$[\text{Ethanol}] \times W = [\text{Ethanol}]_1 \times (W - V_i) + C_i V_i \quad (3-7)$$

式中: [Ethanol], 发酵结束时(即减蒸前)醪液乙醇浓度 (g/L); W, 同步糖化与发酵过程体系的总用水量 (g); C_i , 第 i 次减压精馏获得的蒸馏液中乙醇浓度 (g/L); V_i , 第 i 次减蒸获得的蒸馏液体积 (L); $[\text{Ethanol}]_1$, 减蒸后(补水补料前)醪液乙醇浓度 (g/L)。

3.3 结果与讨论

3.3.1 通过减压精馏方式循环再利用纤维素酶的可行性

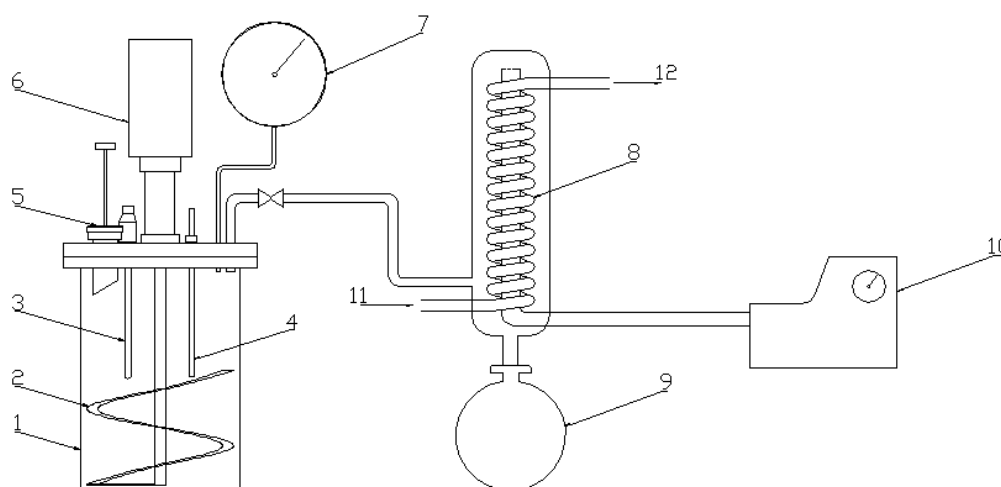


图 3.2 在位减压精馏装置示意图

Fig. 3.2 Schematic diagram of cellulase recycling during cellulosic ethanol production via in-situ vacuum distillation. (1) Bioreactor for SSF, (2) helical impeller, (3) pH sensor, (4) temperature sensor, (5) feeding inlet, (6) motor, (7) pressure gauge, (8) graham condenser, (9) receiving flask, (10) water ring vacuum pump, (11) condensate inlet, (12) condensate outlet.

在位减压精馏装置如图 3.2 所示，图中标记分别为：（1）同步糖化与发酵生物反应器，（2）螺带搅拌桨，（3）pH 电极，（4）温度电极，（5）物料进料口，（6）电机，（7）压力表，（8）蛇形冷凝管，（9）乙醇收集瓶，（10）循环水真空泵，（11）冷凝液入口，（12）冷凝液出口。

原理：通过在位的间歇减压精馏在较低温度（一般不超过 55 °C）将 SSF 发酵醪中的产物乙醇蒸出，纤维素酶在此温度下仍保留绝大部分酶活，为纤维素酶的循环利用提供前提条件；补加新鲜物料，SSF 体系中残留的纤维素酶和部分菌体将被再次利用，新一轮 SSF 开启。

为说明本文所采用的减压精馏操作方式使得纤维素酶循环利用的可行性，本文从：乙醇分离效果、对纤维素酶酶活影响、乙醇浓度的影响、对酵母的影响，共 4 个方面阐述。

图 3.3a 显示在循环设备中测试了 37 °C 至 55 °C（5 个温度），15 至 45 分钟（3 个时间）条件下，减压精馏分离乙醇的效果。温度及时间变化均与乙醇分离效果（又称乙醇收率）呈正相关趋势，随着减压精馏温度的升高或者减蒸时间的延长，乙醇分离效果越好，乙醇收率越高。

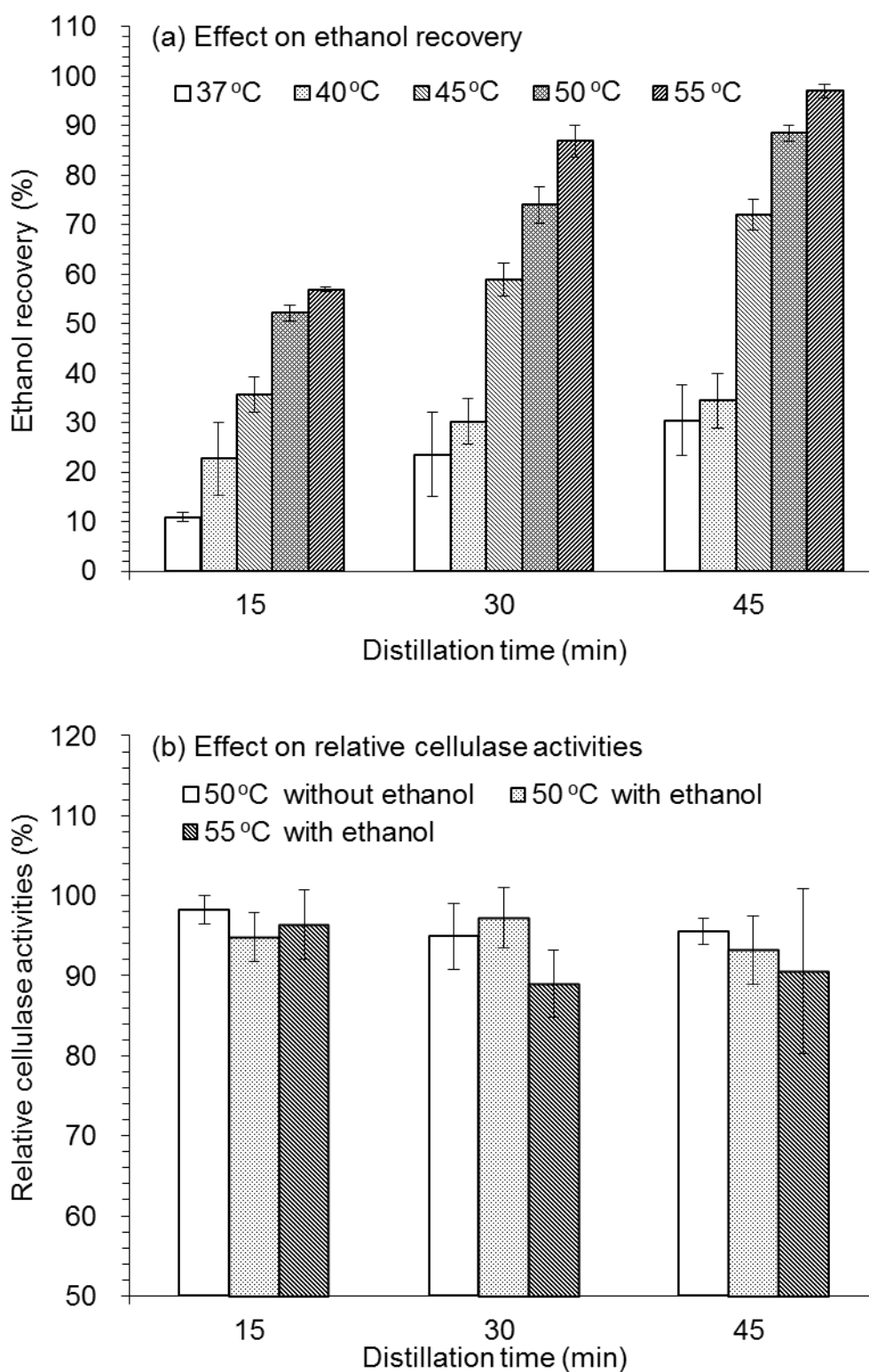


图 3.3 减压精馏方式实现乙醇生产中纤维素酶循环再利用的可行性^[111] (a) 时间和温度对乙醇回收率 (b) 时间、温度和乙醇对纤维素酶的相对酶活的影响

Fig. 3.3 Feasibility of cellulase recycling via vacuum distillation during ethanol production. (a) Effect on ethanol recovery, (b) effect on relative cellulase activities.

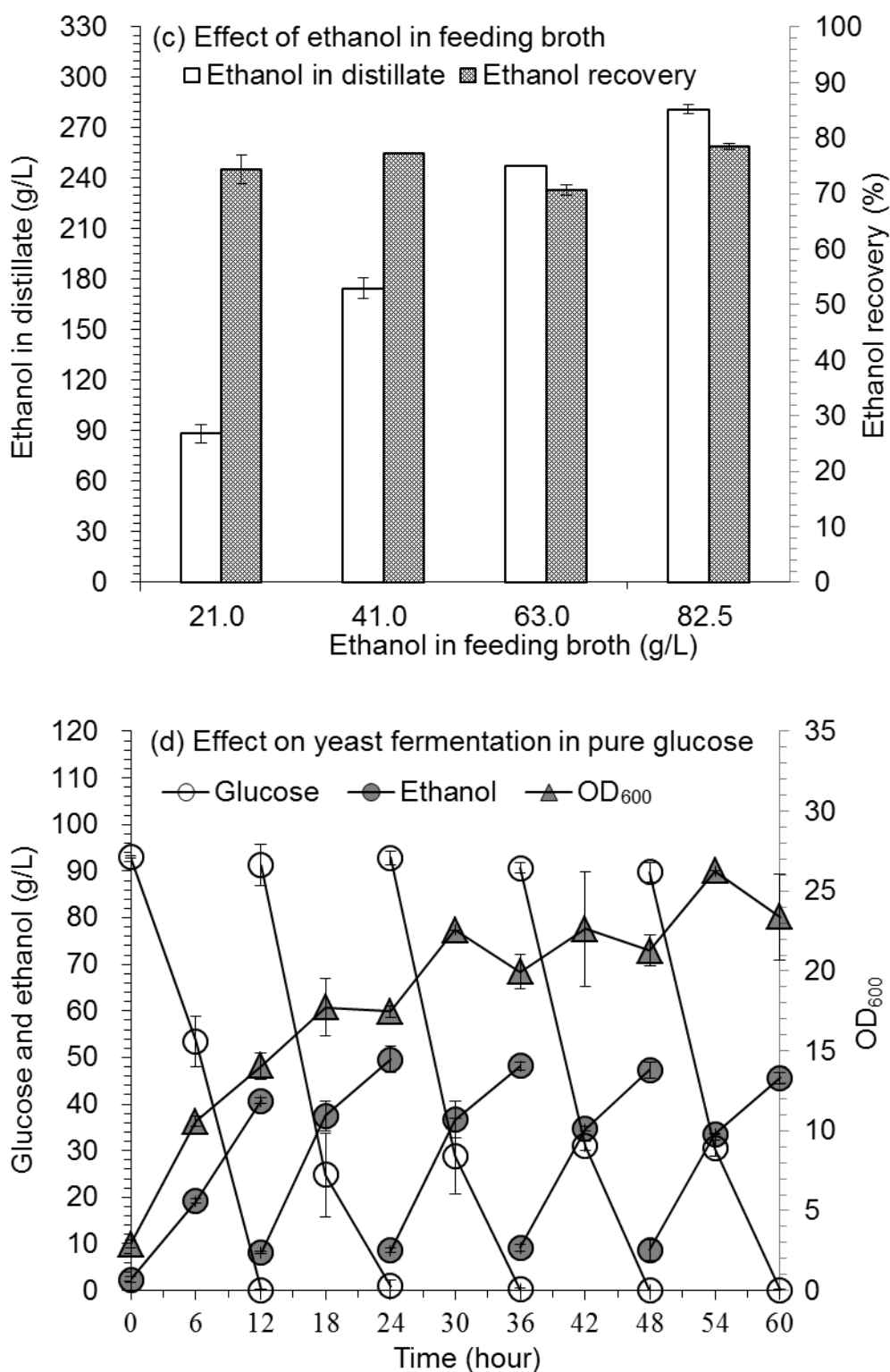


图 3.3 减压精馏方式实现乙醇生产中纤维素酶循环再利用的可行性^[111] (c) 醪液乙醇浓度对蒸液乙醇浓度及回收率 (d) 减蒸方式对酵母活性的影响

Fig. 3.3 Feasibility of cellulase recycling via vacuum distillation during ethanol production. (c) Effect of ethanol in feeding broth, (d) effect on yeast fermentation in pure glucose.

图 3.3b 显示在纤维素酶最适温度 (50 °C) 范围测试, 真空操作时长及乙醇的存在对纤维素酶酶活是否有影响。测试了 50 °C 及 55 °C 下, 15 至 45 min, 添加乙醇或不添加情况下, 检测相对酶活。结果发现, 减压精馏操作方式并不会对纤维素酶酶活产生显著影响。残留的相对酶活均在 90% 以上。48 g/L 浓度的乙醇存在并不对纤维素酶酶活产生影响, 只有当温度从 50 °C 提高至 55 °C 下, 纤维素酶活损失稍稍增加。

图 3.3c 显示蒸馏液中的乙醇浓度与原发酵醪乙醇浓度呈正相关, 随着发酵醪中乙醇浓度升高, 获得的蒸馏液中乙醇浓度越高。在不同乙醇浓度条件下, 乙醇回收率均在 70% 左右, 并没有明显影响。

图 3.3d 显示酿酒酵母在合成培养基 (初糖浓度约 90 g/L) 培养, 减压精馏后补充葡萄糖, 经过 5 轮连续批次发酵, 发现菌体的 OD₆₀₀ 值随循环次数增加而有所增加, 葡萄糖消耗速率及乙醇生产速率均未受较大影响, 说明酵母可耐受本文所介绍的减压精馏过程。

经过上述可行性考察, 确定减压精馏条件及操作步骤: 同步糖化发酵末期, 将罐体温度从 37 °C 提高至 50 °C。开启循环水真空泵, 打开截止阀, 使得罐内空气逐步被抽出, 从负压表上监测该过程, 真空度需达到 0.093 MPa。尽可能使温度和压力在同一时间达到要求值, 此时发酵醪开始剧烈沸腾, 乙醇蒸出, 经管路进入蛇形冷凝器中, 蛇形冷凝管将乙醇蒸发气体冷凝并收集于圆底烧瓶中, 维持该温度及真空度, 蒸馏 30 min。后停止减压精馏, 首先将罐体冷却水打开, 截止阀关上, 再将真空泵关上, 拔出连接管。包括前期升温、蒸后降温、补料及补水过程在内的总时间控制在 1 hr 之内。如无特殊说明, 减压精馏操作均按上述条件进行。

开始减压精馏操作的时间点设置在每次 SSF 循环后期, 即当乙醇浓度达 40 g/L 时, 开始该减蒸操作。由于 40 g/L 乙醇浓度一般被认为是经济性蒸馏 (能耗较少) 的最低浓度阈值^[108,112], 这也是本文研究时设定的一个基准线, 以备固定减蒸操作时段。

3.3.2 脱木质素玉米芯残渣生产乙醇过程中纤维素酶的循环利用

3.3.2.1 通过减压精馏实现的循环实验

本文首先考察富含纤维素的脱木质素玉米芯残渣原料, 进行通过减压精馏实现的纤维素酶循环利用的发酵实验 (以下简称循环实验)。由于脱木质素玉米芯残渣纤维素含量高达 81%, SSF 在低固含量下 (10%) 预计能满足乙醇浓度 (40 g/L) 要求, 且该原料极低的木质素含量为纤维素酶循环效果及次数大大增加提供可能性。经过初期适当的条件摸索, 确定 SSF 各项操作条件, 以实现纤维素酶的循环利用。开始 SSF 循环实验, 初始固含量调至 10%, 初始酶用量 20 FPU/g DM (基于初始物料干重), 温度 37 °C, pH 4.2, 搅拌转速 150 rpm。鉴于 3.3.1 节减压精馏可行性分析, 纤维素酶及菌体在经过减压精馏操作后仍留有大部分活性, 故不再添加, 减蒸后仅补入与初始相同质量的新鲜物料, 再补入适当体积的水使得罐内发酵醪液体体积与减蒸前体积一致, 通气 1 hr, 流速 50 L/h。启动新一轮循环, 共循环 5 次, 基于总质量的原料干重, 最终酶用量仅为 4 FPU/g DM。

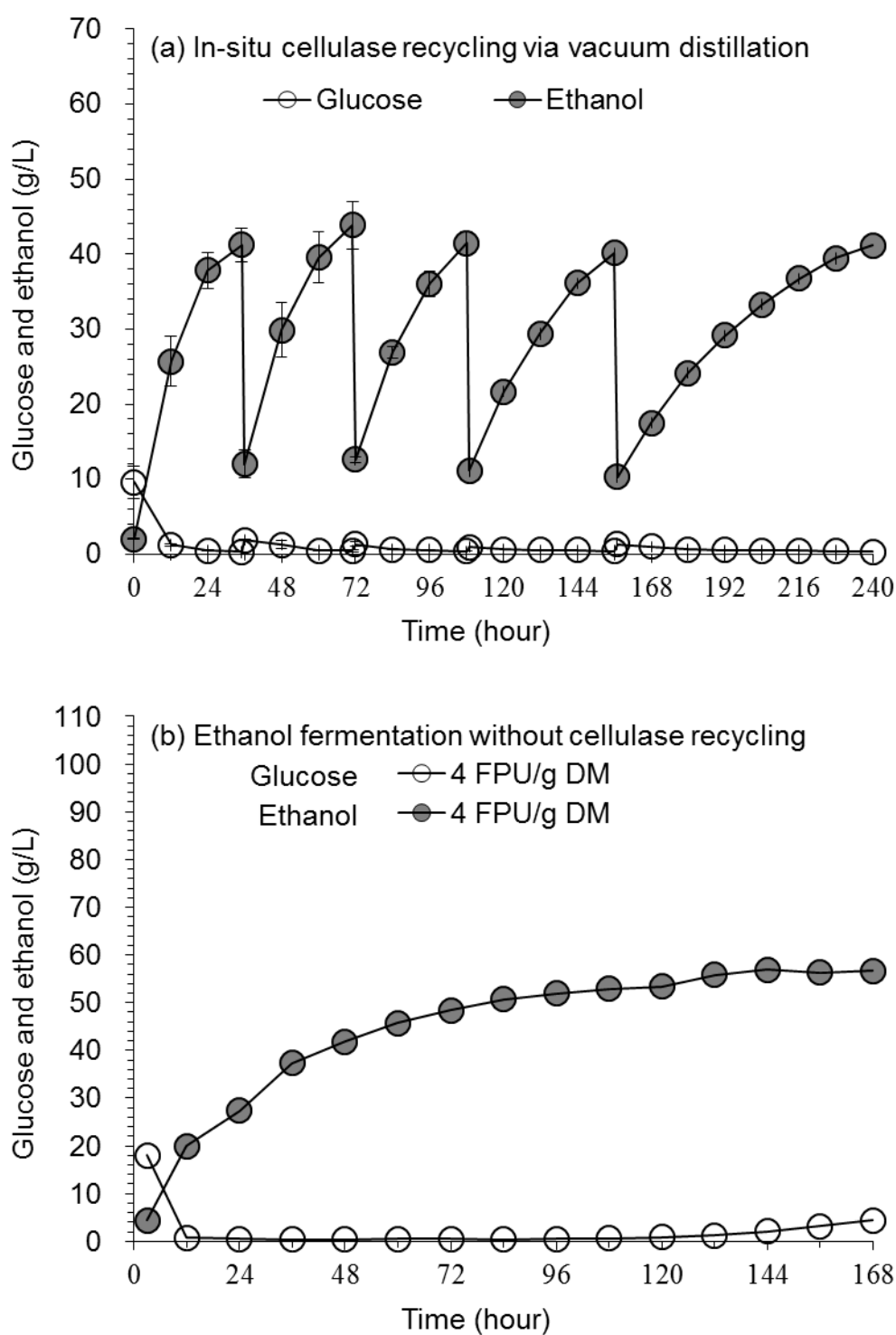


图 3.4 脱木质素玉米芯残渣生产乙醇过程中纤维素酶的循环利用 (a) 在位减压精馏实现酶的循环利用 (b) 相同酶用量下的对照批次发酵

Fig. 3.4 In-situ cellulase recycling during ethanol fermentation from delignified corncob residues. (a) In-situ cellulase recycling via vacuum distillation, (b) ethanol fermentation without cellulase recycling at same enzyme dosage.

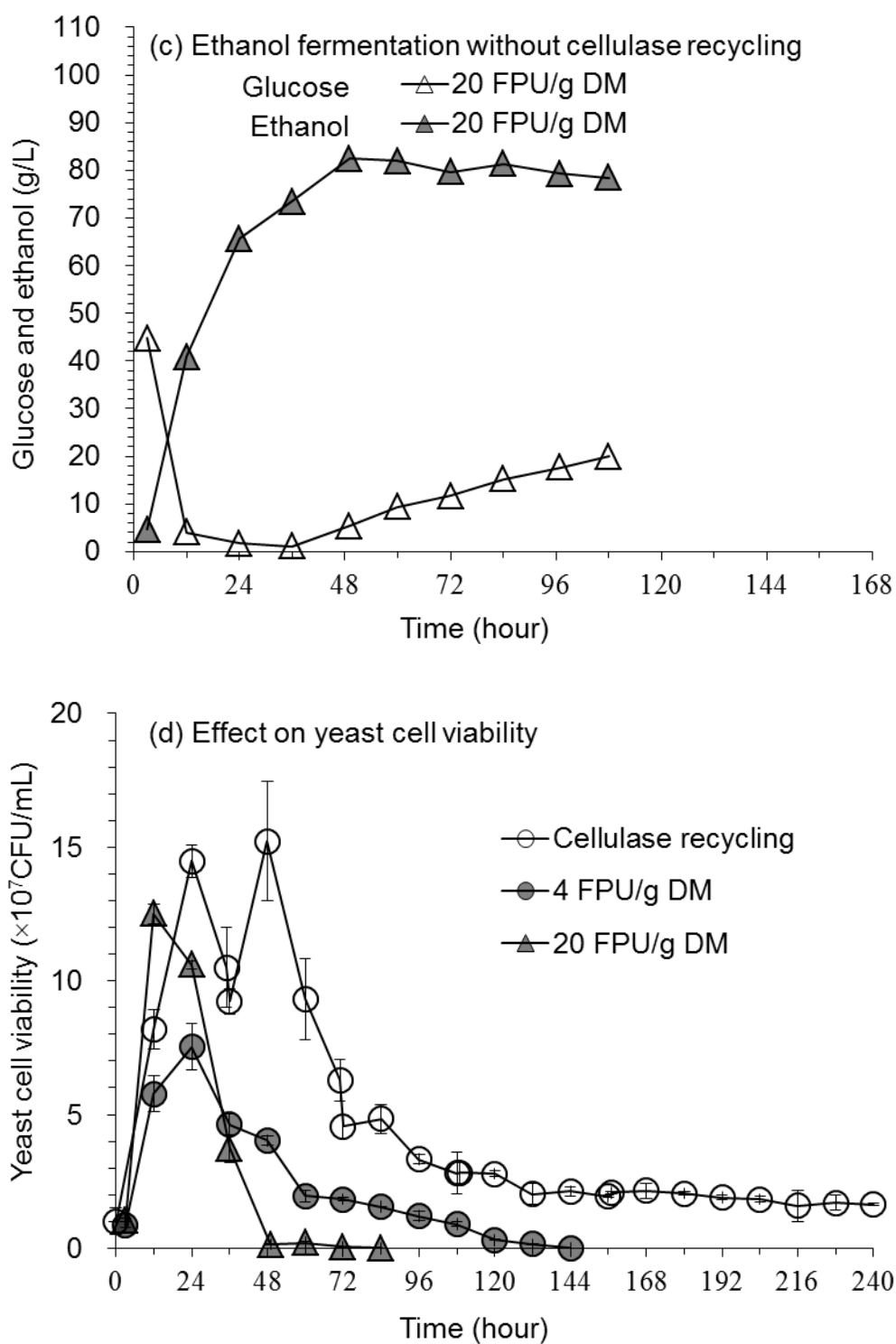


图 3.4 脱木质素玉米芯残渣生产乙醇过程中纤维素酶的循环利用 (c) 较高酶用量下的对照批次发酵 (d) 不同操作条件对酵母活性的影响

Fig. 3.4 In-situ cellulase recycling during ethanol fermentation from delignified corncob residues. (c) Ethanol fermentation without cellulase recycling at high enzyme dosage, (d) effect on yeast cell viability.

图 3.4a 中显示, 当乙醇浓度达 40 g/L 时进行减蒸, 共循环 5 次, 各批次发酵时长分别为 35、35、36、47、83 hr, 其中不含批次发酵间减压精馏操作的时间。每次循环末期, 即减压精馏操作前, 乙醇的浓度分别为 41.27、43.84、41.45、40.17、41.16 g/L; 随着循环次数增加, 乙醇生产速率逐步降低, 后两次循环 SSF 时间适当延长。多方面原因可能导致速率减缓, 包括: 纤维素酶的自然降解、固体残渣增加、酚类抑制物浓度增加、营养盐的缺乏等。发酵终止时 (240 hr), 乙醇得率为 72.69%, 不溶固含量 WIS 为 11.29%。

3.3.2.2 两组不同酶用量的对照批次实验

为说明通过减压精馏实现的纤维素酶循环利用的效果, 设置对照实验。将循环中所加的所有物料、水、营养盐、纤维素酶同时加入, 折算固含量约为 24%, 进行该条件下的批次同步糖化与发酵。SSF 条件: 温度 37 °C, pH 4.2, 搅拌转速 150 rpm, 未设置预糖化工段, 物料、营养液、纤维素酶、种子液均在零时刻加入。在相同酶用量 (4 FPU/g DM) 条件下进行的对照实验, 图 3.4b 显示: 本 SSF 过程不含预糖化工段, 第 3 hr 点为第一个取样点, 之后每隔 12 hr 取样检测, 乙醇浓度随着时间增加而缓慢升高, 在 144 hr 处达到最大值 56.96 g/L, 此时乙醇得率仅为 43.24%。在高酶用量 (20FPU/g DM) 条件下进行的对照实验, 图 3.4c 显示: 第 3 hr 为第一个取样点, 在 49 hr 时, 乙醇浓度达到最大值 82.48 g/L, 此时乙醇得率为 66.43%, 随着 SSF 进一步进行, 乙醇浓度维持一定后略有下降, 罐内葡萄糖开始积累, 在 108 hr 时达 19.97 g/L。

3.3.2.3 不同操作下菌体活性及乙醇生产的比较

该对照组与循环组相比, 区别在于前者将总质量的物料一次性加入, 而后者是将总物料分 5 等份依次加入并在每次循环末期通过减压精馏方式及时提取产物乙醇。

图 3.4d 显示循环实验与对照实验中菌体活性的比较, 结果显示: 相同酶用量对照组的菌体在 24 hr 处达最大值 7.53×10^7 活菌数/mL, 之后随着时间增加而逐步下降, 并在 132 hr 后迅速降低。高酶用量对照组中, 在 12 hr 时迅速达到最大值, 达 1.25×10^8 活菌数/mL, 由于脱木质素玉米芯残渣的纤维素含量较高, 导致最终乙醇浓度较高, 高浓度的乙醇对酵母有严重的抑制作用而导致大量死亡。而循环实验组中, 活菌数 CFU 结果显示, 在 0 时刻接入新鲜种子液后, 在 24 hr 时迅速达到最大值, 达 1.45×10^8 活菌数/mL, 但随着循环次数增加, CFU 值逐步降低, 并在后期维持在 2×10^7 个左右, 另外可以发现, 短时间 (30 min) 的减压精馏操作对活菌数并未有较大影响, 说明酵母在该温度、真空度条件下具有一定的耐受性。与高酶用量组相比, 循环实验组有效缓解了高浓度乙醇对酵母活性的抑制。

表 3.1 显示: 当循环实验与高酶用量对照组相比时, 虽然循环实验的乙醇平均生产速率不及后者, 但单位质量酶蛋白对应产生乙醇的质量 (Ethanol mg/mg EP), 前者是后者的 5.5 倍。当酶用量相同时, 无论是乙醇平均生产速率, 还是单位质量酶蛋白对应乙醇质量, 循环实验的上述指标均接近对照组的 2 倍, 乙醇得率从对照组的 43.24% 提高至循环 SSF 的 72.69%, 也就是说, 在相同酶用量情况下, 减压精馏及补料方式提高了

表 3.1 脱木质素玉米芯残渣在不同操作条件下生产乙醇的比较

Table 3.1 Comparison of ethanol fermentation from delignified corncob residues under different operating conditions.

操作条件	乙醇得率	基于干物料的乙醇 产量(g/g DM)	基于酶蛋白的乙醇 产量(mg/mg EP)	平均生产率 (g/L/h)
循环 SSF	72.69%	0.337	125.27	0.682
批次 SSF (4 FPU/g DM)	43.24%	0.200	69.87	0.362
批次 SSF (20 FPU/g DM)	66.43%	0.308	22.60	1.572

纤维素酶的利用效率，乙醇生产效率翻了一番。

3.3.2.4 循环实验中纤维素酶酶活的残留与分布

不同于其他文献在木质纤维素酶解体系中进行酶蛋白含量测定或分离，由于本文纤维素酶循环建立在 SSF 过程中，部分营养物或菌体的蛋白均会影响纤维素酶蛋白的测定，故不采用。在循环 SSF 中同时检测了纤维素酶各组分的三组酶活指标：全发酵醪 (W)、固体沉淀 (S)、上清液体 (L) 均测定其相对酶活、pNPG 酶活、CMC-Na 酶活以考察总纤维素酶活和单组分酶活的残留及分布情况。

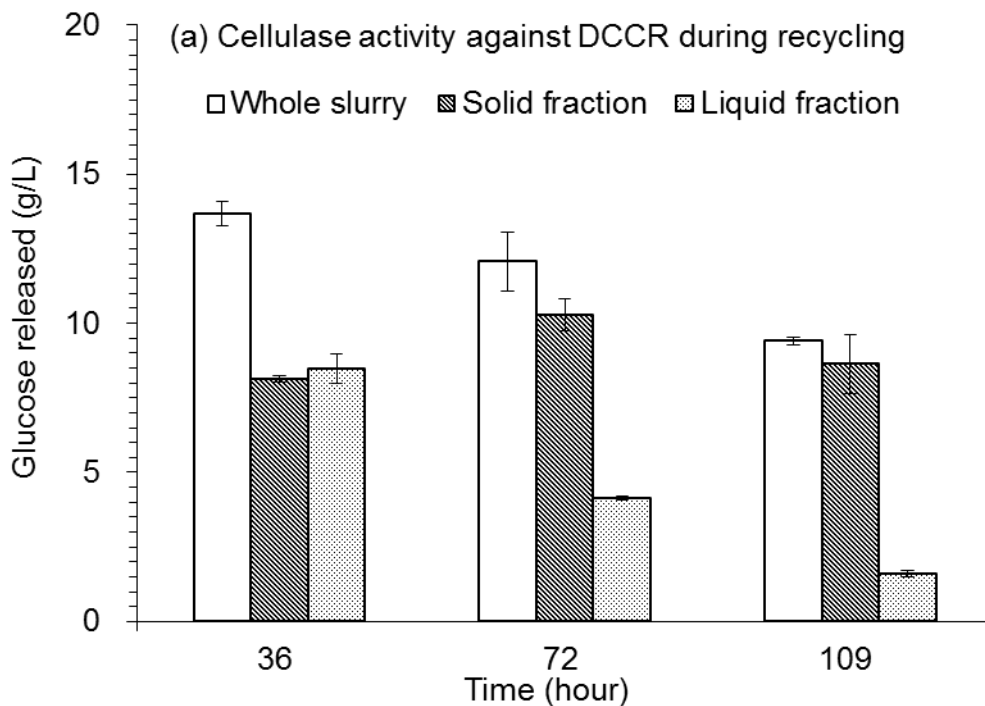


图 3.5 脱木质素玉米芯残渣在位减压精馏循环生产乙醇中各相在减蒸点的纤维素酶酶活的变化(a)

以脱木质素玉米芯残渣为底物的相对酶活分别在总醪液、固体组分及液体组分中的变化

Fig. 3.5 Cellulase activity during recycling-SSF via vacuum distillation from delignified corncob residues.

(a) Cellulase activity against DCCR in whole slurry, solid fraction and liquid fraction, respectively.

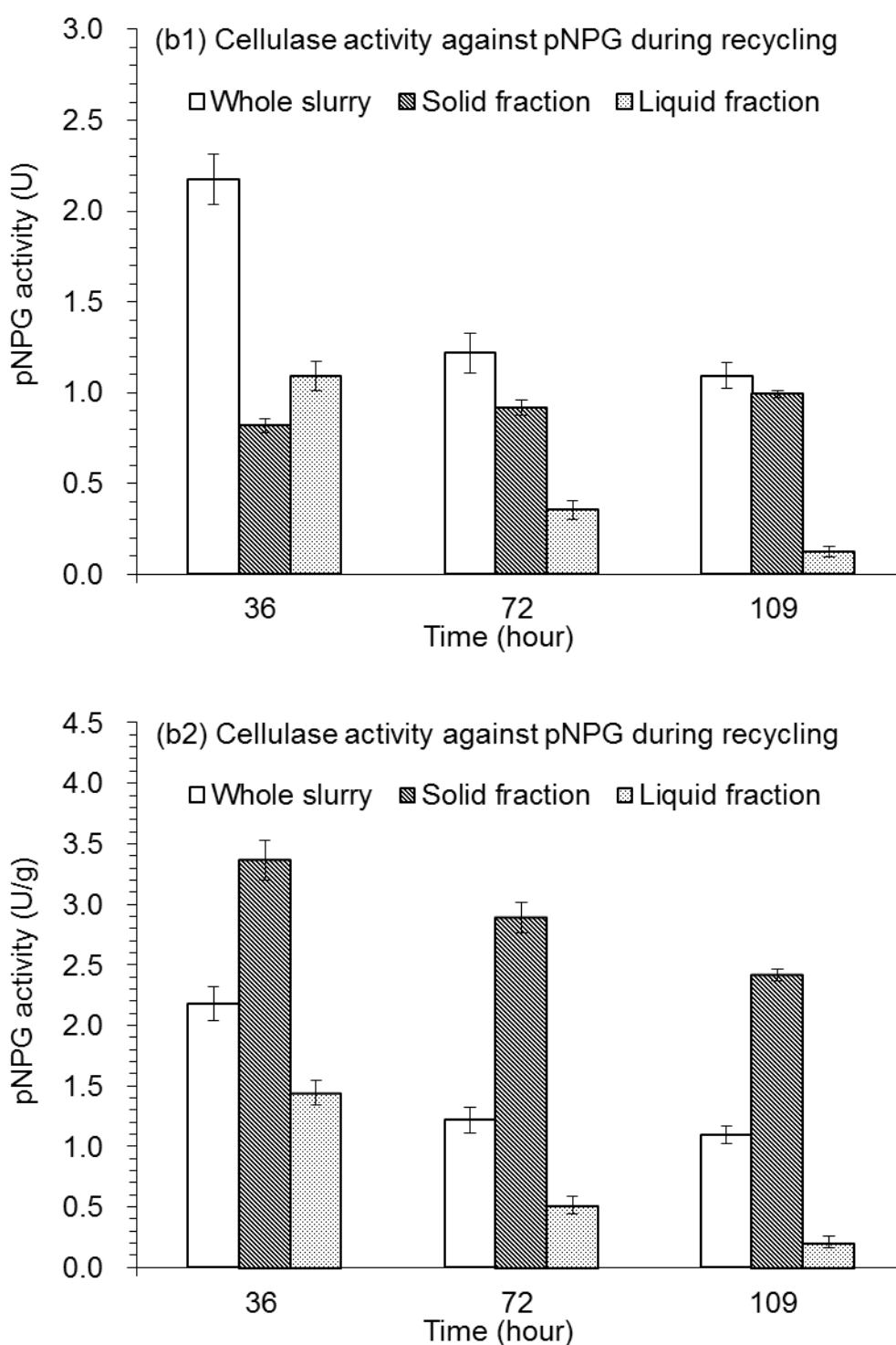


图 3.5 脱木质素玉米芯残渣在位减压精馏循环生产乙醇中各相在减蒸点的纤维素酶酶活的变化(b1) pNPG 酶活残留 (b2) pNPG 酶活浓度分别在总醪液、固体组分及液体组分中的变化
 Fig. 3.5 Cellulase activity during recycling-SSF via vacuum distillation from delignified corncob residues. (b1) cellulase activity against pNPG, (b2) pNPG activity concentration in whole slurry, solid fraction and liquid fraction, respectively.

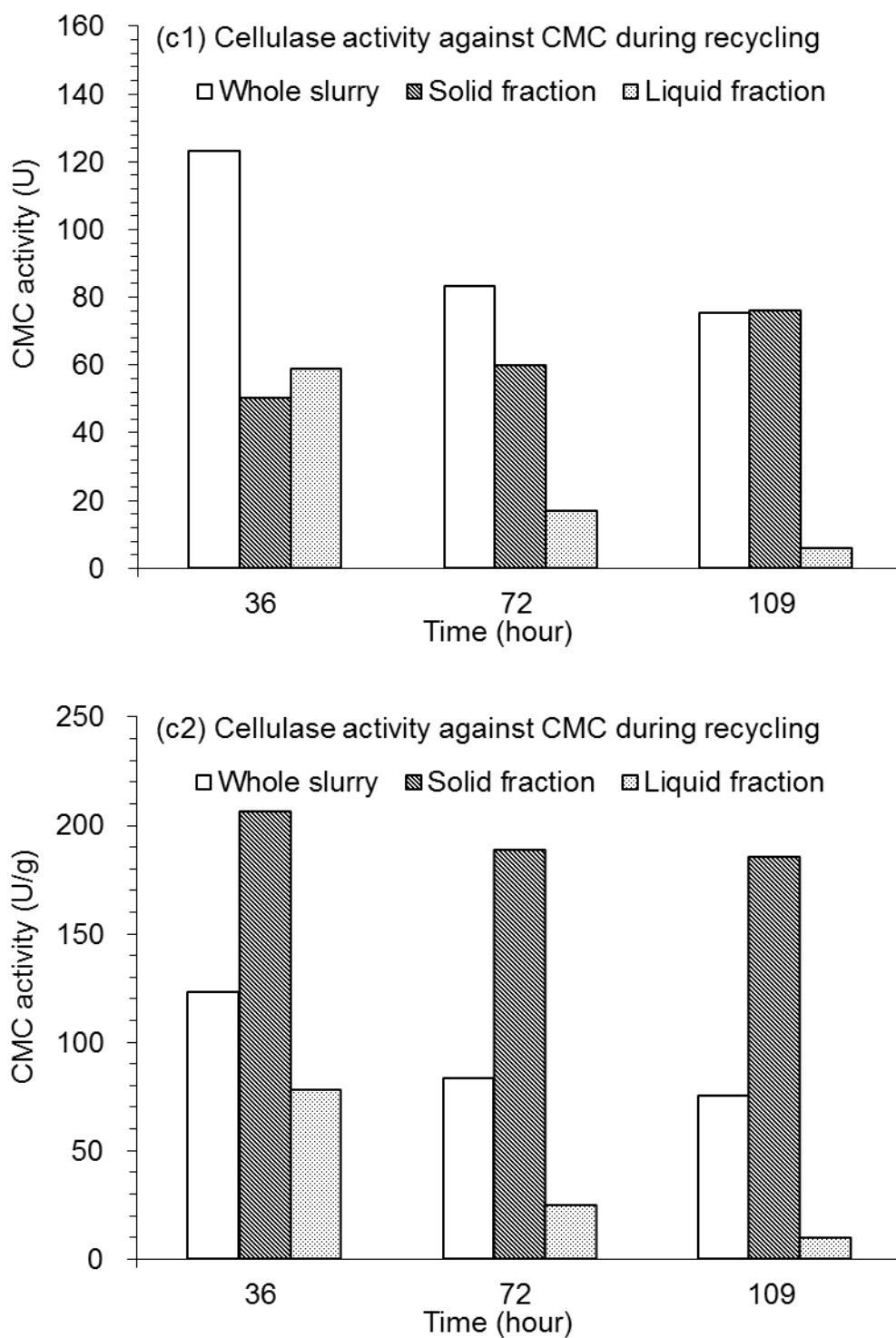


图 3.5 脱木质素玉米芯残渣在位减压精馏循环生产乙醇中各相在减蒸点的纤维素酶酶活的变化 (c1) CMC 酶活残留 (c2) CMC 酶活浓度分别在总醪液、固体组分及液体组分中的变化
 Fig. 3.5 Cellulase activity during recycling-SSF via vacuum distillation from delignified corncob residues. (c1) cellulase activity against CMC, (c2) CMC activity concentration in whole slurry, solid fraction and liquid fraction, respectively.

结果显示：图 3.5a 所示总醪液 (W) 固体组分 (S) 液体组分 (L) 通过 DCCR 原料进行酶解反应所表示的相对酶活，总醪液(W)所残留的相对酶活值接近固体组分(S)的相对酶活值与液体组分(L)相对酶活值之和，由于测定时酶解底物浓度受限，固液两相酶活值之和与总醪液酶活值存在一定误差。随着循环次数增加，(W)和(L)的值逐步降低；而(S)占(W)的比例明显增加。

图 3.5b1 所示三组分通过 pNPG 为底物测定的 β -葡糖苷酶酶活，(W)酶活值接近(S)酶活与(L)酶活值之和。随着循环次数增加，(W)和(L)的酶活值逐步降低，(S)酶活值维持一定；(S)占(W)比例随循环次数增加而变大，比如酶活从第一次循环时 37.63%增至第三次循环时的 90.79%，说明纤维素酶中葡糖苷酶逐步被吸附于固体残渣中。由于固体残渣本身质量也随着循环次数增加而增多，不能说明(S)中酶活浓度变化，为此(S)与(L)组校正为单位质量浓度，图 3.5b2 所示三组分的单位葡糖苷酶酶活浓度，可清晰地发现三组分酶活浓度均随循环次数增加而降低。

图 3.5c1 所示三组分通过 CMC-Na 为底物测定的内切- β -1,4-葡聚糖酶酶活，(W)酶活值接近(S)酶活与(L)酶活值之和。随着循环次数增加，(W)和(L)的酶活值逐步降低，(S)酶活值略微上升；(S)占(W)比例随循环次数增加而变大，说明纤维素酶中内切葡聚糖酶逐步被吸附于固体残渣中，(L)占(W)的比例迅速降低，比如酶活从第一次循环时 47.89%降至第三次循环时的 7.88%。图 3.5c2 所示三组分的单位内切葡聚糖酶酶活浓度，发现三组分酶活浓度与上述 β -葡糖苷酶酶活浓度结果类似，均随循环次数增加而降低。由于内切葡聚糖酶酶活测定方法，酶稀释度与酶解释放葡萄糖量属于非线性关系(指数型)，取样测定时内部设定了空白与对照组，故结果柱形图上并未显示标准差。

β -葡糖苷酶及内切- β -1,4-葡聚糖酶在固液相分布并没有明显区别，随着循环增加，两者被残留底物吸附得越多。由于 DCCR 这种原料的特殊性，在第一次循环中，极少残留的底物对纤维素酶吸附较弱，固液相分布均等，此时，相比于固液分离方法循环(固相循环，或新鲜底物重吸附液相残留酶循环，或两者并用)，减压精馏方法能保留更多的酶活，原位在线操作更为简便。

该 SSF 实验实现了纤维素酶和酵母菌的循环再利用，极大地降低了纤维素酶用量，节约了用酶成本，从而降低乙醇的生产成本。另外，减压精馏出的乙醇溶液浓度(一般为 15-20%，v/v)与常规乙醇蒸馏工段的粗馏工段提取的乙醇浓度(20-30%，v/v)接近，因此可以说，在位的减压精馏方式是把乙醇提取工艺(粗馏工段)整合到 SSF 中。后文将通过软件 Aspen plus 对减压粗馏与传统常压粗馏工艺进行能耗比较，并结合节省的酶成本进行经济性分析，以验证该减压精馏方式使 SSF 过程中纤维素酶循环利用的策略的经济可行性。

3.3.3 玉米秸秆生产乙醇过程中纤维素酶的循环利用

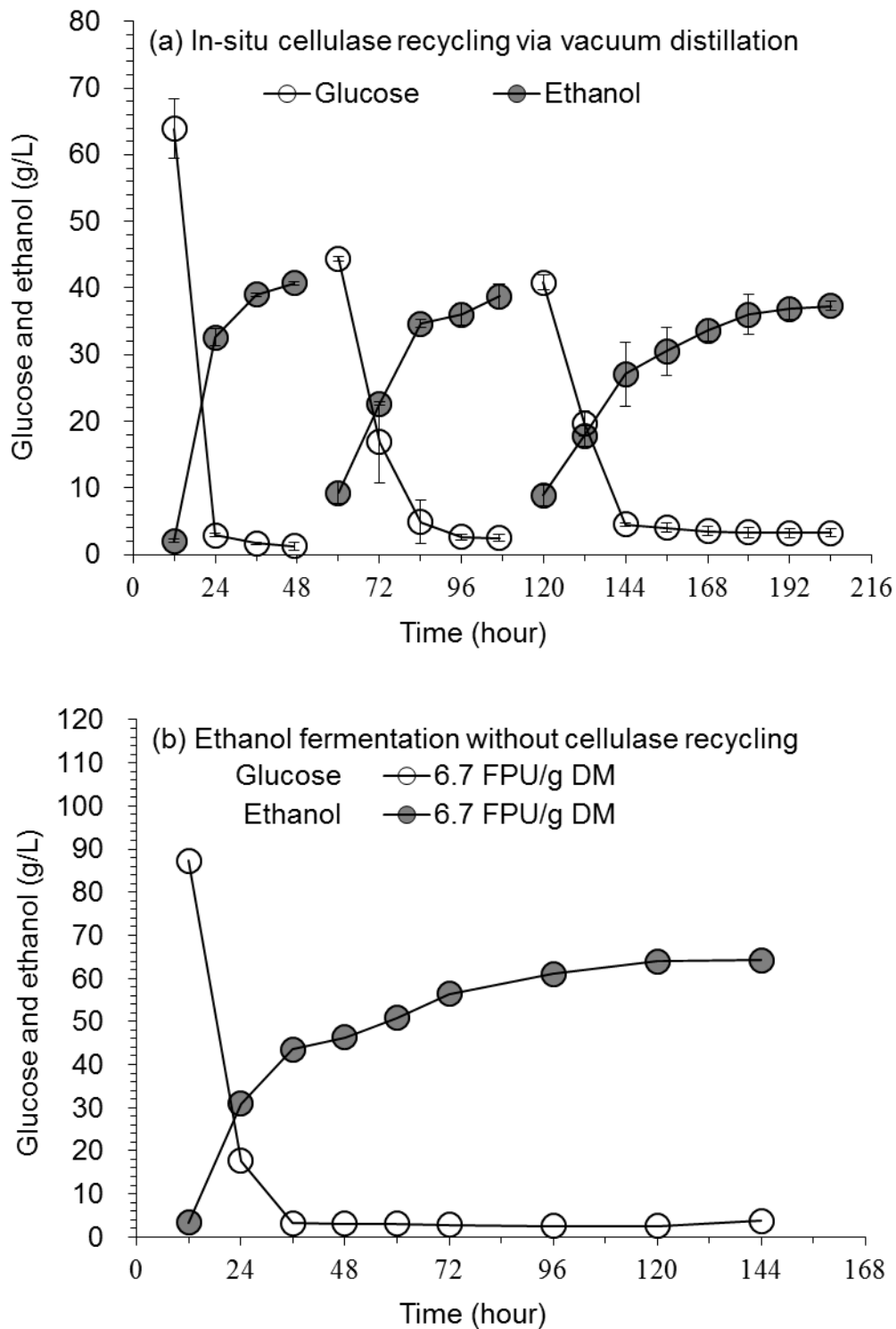


图 3.6 玉米秸秆生产乙醇过程中纤维素酶的循环利用 (a) 在位减压精馏实现酶的循环利用 (b) 相同酶用量下的对照批次发酵

Fig. 3.6 In-situ cellulase recycling during ethanol fermentation from pretreated and biodetoxified corn stover. (a) In-situ cellulase recycling via vacuum distillation, (b) ethanol fermentation without cellulase recycling at same enzyme dosage.

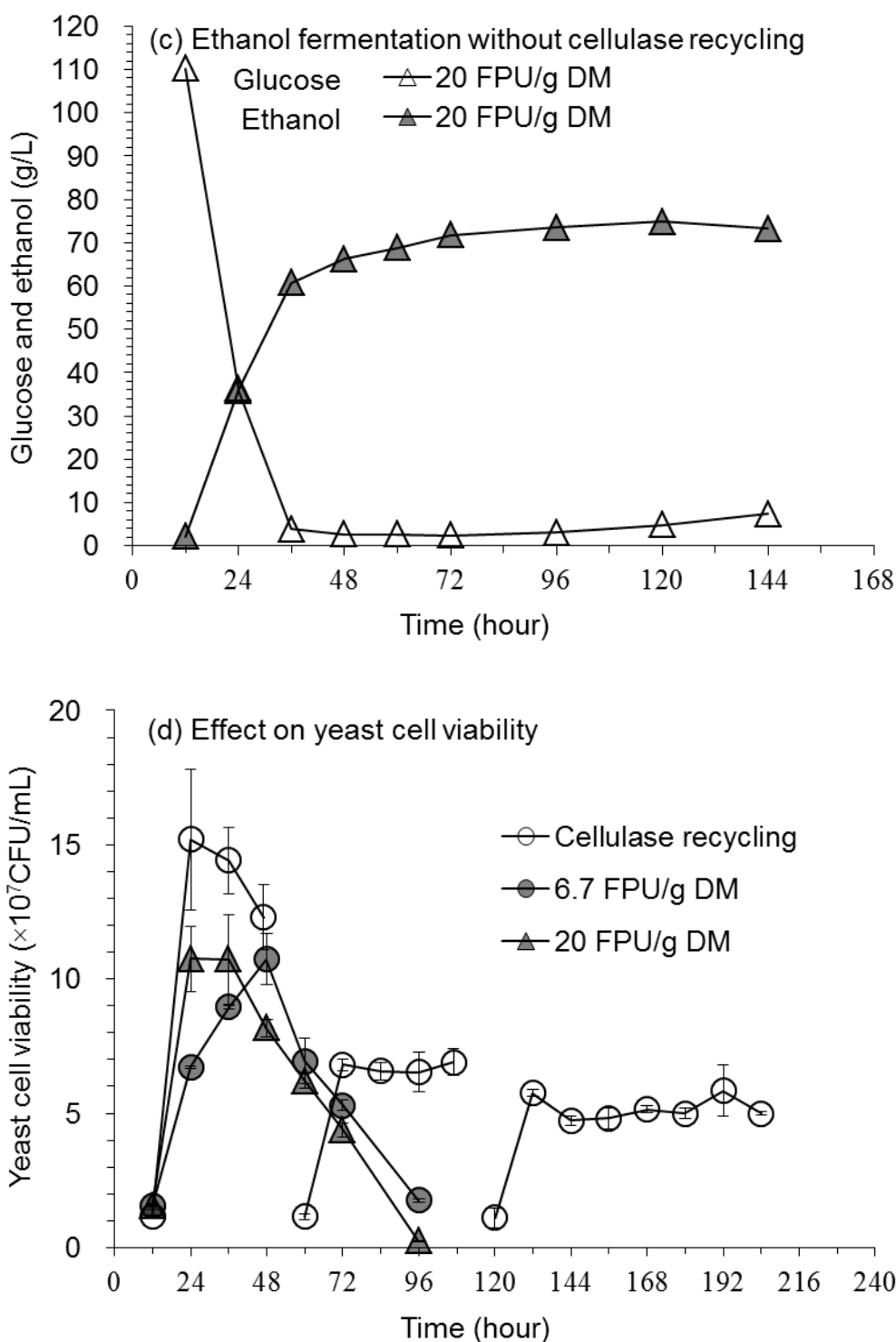


图 3.6 玉米秸秆生产乙醇过程中纤维素酶的循环利用 (c) 较高酶用量下的对照批次发酵 (d) 不同操作条件对酵母活性的影响

Fig. 3.6 In-situ cellulase recycling during ethanol fermentation from pretreated and biodetoxified corn stover. (c) Ethanol fermentation without cellulase recycling at high enzyme dosage, (d) effect on yeast cell viability.

3.3.3.1 通过减压精馏实现的循环实验

根据之前脱木质素玉米芯残渣循环 SSF 结果总结的规律, 猜想减压精馏方式实现纤维素酶的循环利用, 可能同样适用于玉米秸秆这类更为大宗的木质纤维素原料的循环同步糖化与发酵生产乙醇。经过初期适当的条件摸索, 确定 SSF 各项操作条件, 以实现纤维素酶的循环利用。

开始循环 SSF 实验, 初始固含量调至 20%, 初始酶用量 20 FPU/g DM (基于初始物料干重), 进行 50 °C pH 4.8, 时长 12 hr 的预糖化过程, 随后降温至 37 °C, 补入新鲜种子液 (10% 接种量), pH 维持 4.8, 搅拌转速 150 rpm, 每轮循环以乙醇浓度达 40 g/L 终止, 进行减压精馏操作。由于经过前期试验发现, 纤维素酶在经过减压精馏操作后仍留有大部分活性, 而不再补加, 减蒸后仅补入与初始相同质量的新鲜玉米秸秆物料, 以启动新一轮循环: 维持 50 °C pH 4.8 再次进行 12 hr 的预糖化过程, 随后降温至 37 °C 再补入新鲜种子液 (10% 接种量), 使得罐内发酵醪液体体积与减蒸前原发酵醪液体体积一致, 通气 1 hr, 流速 50 L/h。

图 3.6a 显示玉米秸秆循环 SSF 进行 204 hr, 共计 3 轮, 此时, 基于总质量的玉米秸秆, 最终酶用量仅为 6.7 FPU/g DM。0 至 12 hr、48 hr 至 60 hr、108 hr 至 120 hr 的断开区域为预糖化工段, 经过 12 hr 的预糖化, 每次循环开始时初糖浓度随循环次数增加而降低, 依次为 63.90, 44.38, 40.84 g/L, 多方面因素导致初糖浓度降低, 影响酶解效率, 包括纤维素酶失活、木质素积累等。每次循环末期, 即减压精馏操作前, 乙醇浓度依次为 40.73, 38.78, 37.29 g/L, 乳酸、乙酸终浓度均未超过 2 g/L (图中未显示)。SSF 204 hr 终止时, 乙醇得率为 70.00%。

3.3.3.2 两组不同酶用量的对照批次实验

为说明通过减压精馏实现的纤维素酶循环利用的效果, 设置对照实验。将循环中所加的所有物料、水、营养盐、纤维素酶同时加入, 折算固含量约为 33%, 进行该条件下的批次同步糖化与发酵。SSF 条件: 设置预糖化工段, 温度 50 °C, pH 4.8, 搅拌转速 150 rpm, 12 hr 后, 降温至 37 °C, pH 维持 4.8, 补入新鲜种子液。在相同酶用量 (6.7 FPU/g DM) 条件下进行的对照实验, 图 3.6b 显示: 第 12 hr 初始葡萄糖浓度达 87.31 g/L, 乙醇浓度随着时间增加而缓慢升高, 在 144 hr 处达到最大值 64.25 g/L, 此时乙醇得率为 65.29%。在高酶用量 (20 FPU/g DM) 条件下进行的对照实验, 图 3.6c 显示: 第 12 hr 初始葡萄糖浓度达 110.19 g/L, 随后的 24 hr 内, 乙醇浓度迅速增加到 60.78 g/L, 在 120 hr 时, 乙醇浓度达到最大值 74.86 g/L, 此时乙醇得率为 76.96%, 随着 SSF 进一步进行, 罐内葡萄糖开始积累, 在 144 hr 时达 7.41 g/L。

3.3.3.3 不同操作下菌体活性及乙醇生产的比较

该对照组与循环组相比, 区别在于前者将总质量的物料一次性加入, 而后者是将总物料分 3 等份依次加入并在每次循环末期通过减压精馏方式及时提取产物乙醇。

图 3.6d 显示循环实验与对照实验中菌体活性的比较, 结果显示: 相同酶用量对照组 (6.7 FPU/g DM) 的菌体在 48 hr 处达最大值 1.07×10^8 活菌数/mL, 之后随着时间增加而

迅速下降。而高酶用量对照组 (20 FPU/g DM) 的菌体在第 24 hr 便达最大值 1.08×10^8 活菌数/mL, 之后随着时间增加而迅速下降。循环实验的 CFU 结果显示, 经过预糖化后降温补入新鲜种子液, 在 SSF 开始后的 12 hr 内活菌数达到该轮循环的最大值 1.52×10^8 活菌数/mL, 之后随着 SSF 进行, 略有下降; 但就每轮循环比较来看, 随着循环次数增加, 循环末期活菌数也在逐步降低。随着循环次数增加, 菌体活性下降而导致其乙醇得率及生产速率下降, 说明发酵体系中多方面因素影响酵母活性, 包括纤维素酶的自然失活、木质素的积累、营养物的缺乏、抑制物浓度升高。

表 3.2 玉米秸秆在不同操作条件下生产乙醇的比较

Table 3.2 Comparison of ethanol fermentation from pretreated and biodetoxified corn stover under different operating conditions.

操作条件	乙醇得率	基于干秸秆的乙醇 产量(g/g DM)	基于酶蛋白的乙醇 产量(mg/mg EP)	平均生产率 (g/L/h)
循环 SSF	70.00%	0.159	36.22	0.577
批次 SSF (6.7 FPU/g DM)	56.67%	0.129	28.93	0.904
批次 SSF (20 FPU/g DM)	73.41%	0.167	12.50	1.158

对照组均取第 72 hr 为 SSF 终止点, 与循环实验进行各参数指标的比较。表 3.2 显示: 当循环实验与高酶用量对照组相比时, 虽然循环实验的乙醇平均生产速率不及后者, 但就单位质量酶蛋白对应产生乙醇的质量 (Ethanol mg/mg EP) 而言, 前者是后者的 2.8 倍; 同时发现, 该高酶用量对照实验中, 约 70 g/L 的乙醇浓度并未对菌体活性产生强烈抑制, SSF 后期并未出现大量的葡萄糖积累 (小于 10 g/L), 该对照组的乙醇得率略高于循环实验组。当酶用量相同时, 就单位质量干物料或单位质量酶蛋白对应的乙醇质量而言, 循环实验的指标均是对照组的 1.2 倍, 乙醇得率从对照组的 56.67% 提高至循环 SSF 的 70.00%。该玉米秸秆 SSF 循环利用纤维素酶的效果不如脱木质素玉米芯残渣的 SSF 循环实验的明显, 可能与原料本身特性有关: 由于 DCCR 较少的木质素残渣使得纤维素酶更少被无效吸附, 在相同酶用量下可循环使用 5 次, 多于玉米秸秆 SSF 循环的 3 次。

3.3.3.4 循环实验中纤维素酶酶活的残留与分布

同时对玉米秸秆循环 SSF 过程检测纤维素酶各组分的三种酶活指标: 全发酵醪 (W)、固体沉淀 (S)、上清液体 (L) 均测定其相对酶活、pNPG 酶活、CMC-Na 酶活以考察总纤维素酶活和单组分酶活的残留及分布情况。

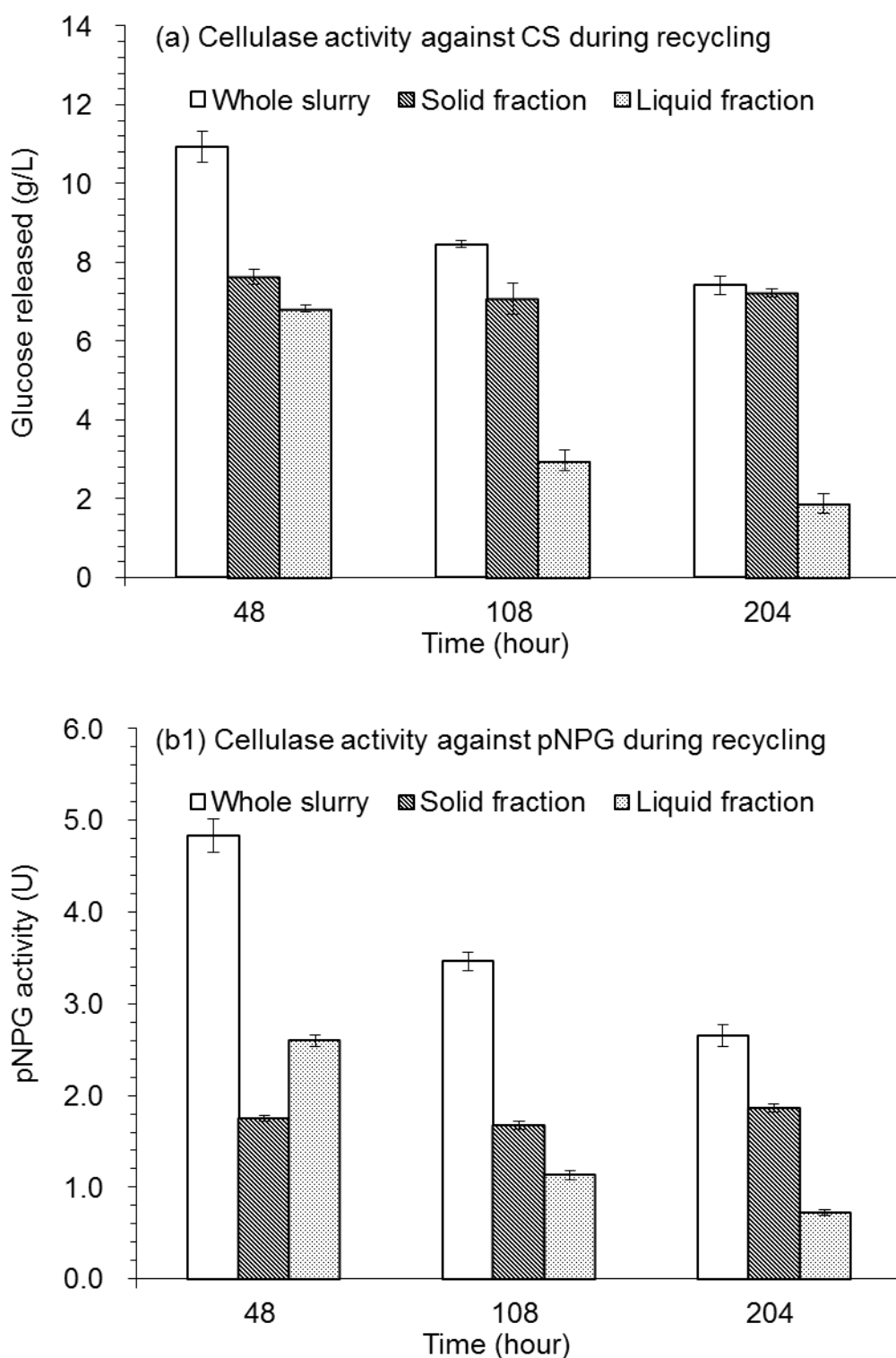


图 3.7 玉米秸秆在位减压精馏循环生产乙醇中各相在减蒸点的纤维素酶酶活的变化 (a) 以玉米秸秆为底物的相对酶活 (b1) pNPG 酶活残留分别在总醪液、固体组分及液体组分中的变化

Fig. 3.7 Cellulase activity during recycling-SSF via vacuum distillation from pretreated and biodetoxified corn stover. (a) Cellulase activity against CS, (b1) cellulase activity against pNPG in whole slurry, solid fraction and liquid fraction, respectively.

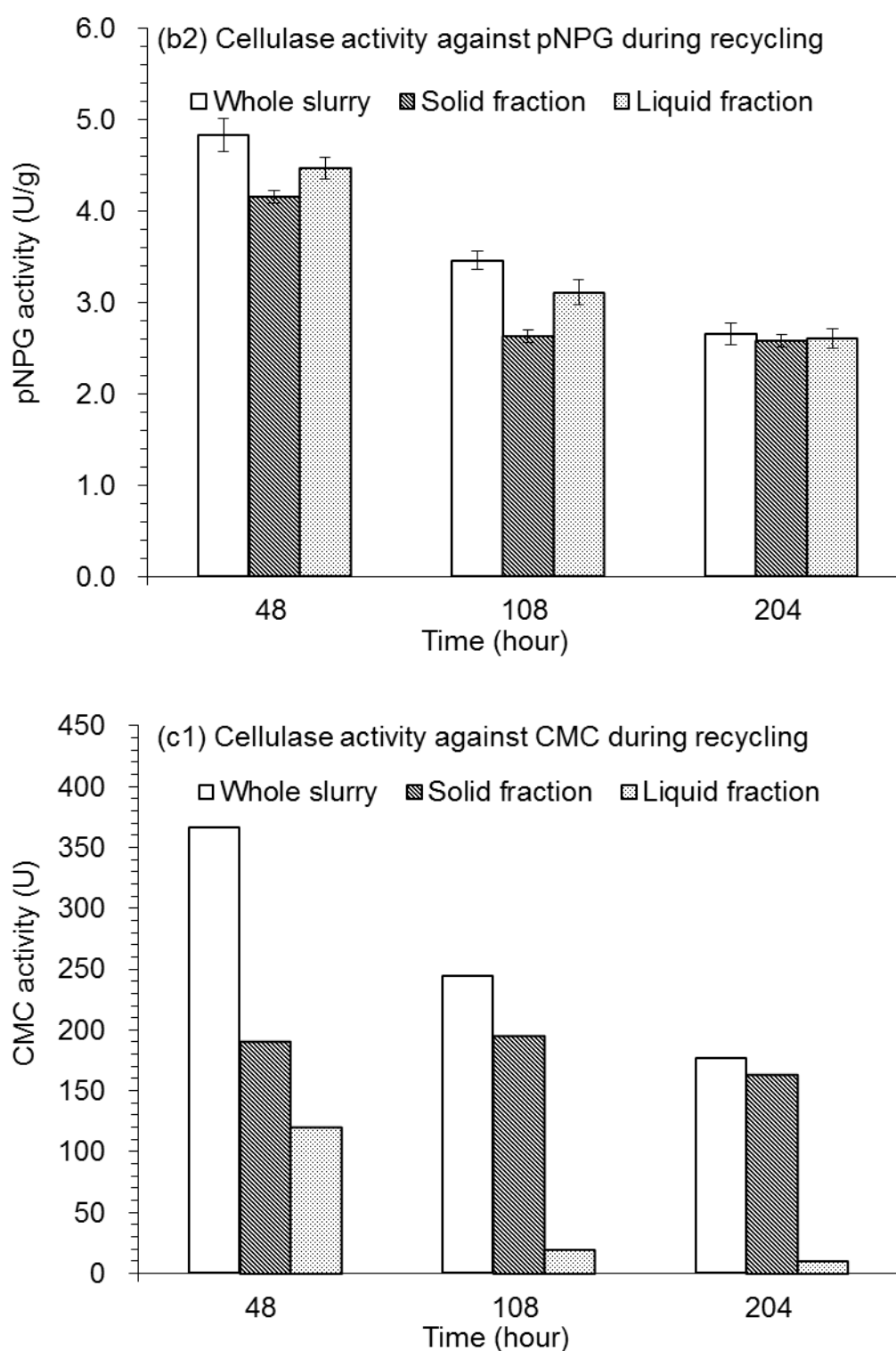


图 3.7 玉米秸秆在位减压精馏循环生产乙醇中各相在减蒸点的纤维素酶酶活的变化 (b2) pNPG 酶活浓度 (c1) CMC 酶活残留分别在总醪液、固体组分及液体组分中的变化

Fig. 3.7 Cellulase activity during recycling-SSF via vacuum distillation from pretreated and biodetoxified corn stover. (b2) pNPG activity concentration, (c1) cellulase activity against CMC in whole slurry, solid fraction and liquid fraction, respectively.

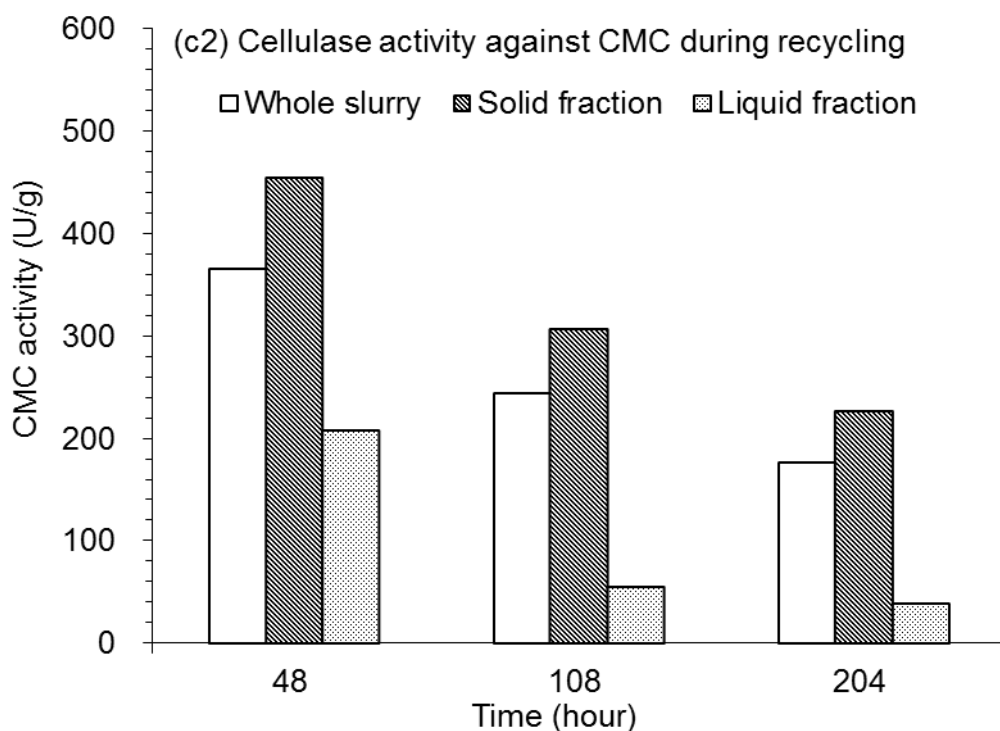


图 3.7 玉米秸秆在位减压精馏循环生产乙醇中各相在减蒸点的纤维素酶酶活的变化 (c2) CMC 酶活浓度分别在总醪液、固体组分及液体组分中的变化

Fig. 3.7 Cellulase activity during recycling-SSF via vacuum distillation from pretreated and biodetoxified corn stover. (c2) CMC activity concentration in whole slurry, solid fraction and liquid fraction, respectively.

结果显示：图 3.7a 所示总醪液 (W) 固体组分 (S) 液体组分 (L) 中通过玉米秸秆原料进行酶解反应所表示的相对酶活；随着循环次数增加，(W) 和 (L) 的值逐步降低，而 (S) 占 (W) 的比例明显增加，变化趋势和 DCCR 循环实验的相对酶活监测结果相似。

图 3.7b1 所示三组分通过 pNPG 为底物测定的 β -葡糖苷酶酶活，(W) 酶活值接近 (S) 酶活与 (L) 酶活值之和。随着循环次数增加，(W) 和 (L) 的酶活值逐步降低，(S) 酶活值维持一定；(S) 占 (W) 比重随循环次数增加而变大，比如酶活比重从第一次循环 (第 48 hr) 的 36.16% 增至第三次 (第 204 hr) 的 66.04%，说明纤维素酶中葡糖苷酶逐步被吸附于固体残渣中。由于固体残渣本身质量也随着循环次数增加而增多，不能说明 (S) 中酶活浓度的变化，为此 (S) 与 (L) 组校正为单位质量浓度，图 3.7b2 所示三组分的单位葡糖苷酶酶活浓度，可清晰地发现三组分酶活浓度均随循环次数增加而降低。

图 3.7c1 所示三组分通过 CMC-Na 为底物测定的内切- β -1,4-葡聚糖酶酶活，(W) 酶活值接近 (S) 酶活与 (L) 酶活值之和。随着循环次数增加，(W) 和 (L) 的酶活值逐步降低，(S) 酶活值维持一定；(S) 占 (W) 比例随循环次数增加而变大，说明纤维素酶中内切葡聚糖酶逐步被吸附于固体残渣中，(L) 占 (W) 的比例迅速降低，比如 CMC-Na 酶活比重从第一次循环时的 32.88% 降至第三次的 5.68%。图 3.7c2 所示三组分的单位内

切葡聚糖酶酶活浓度,发现三组分酶活浓度均随循环次数增加而降低。由于内切葡聚糖酶酶活测定方法,取样测定时内部设定了空白与对照组,故结果柱形图上并未显示标准差。

β -葡糖苷酶及内切- β -1,4-葡聚糖酶在固液相分布并没有明显区别,随着循环增加,两者被残留底物吸附得越多,且结果与之前 DCCR 的极为相似。第一次循环中,少量残留的底物对纤维素酶吸附较弱,固液相分布均等,此时,相比于固液分离方法循环(固相循环,或新鲜底物重吸附液相残留酶循环,或两者并用),减压精馏方法能保留更多的酶活,原位在线操作更为简便。

3.3.4 减压精馏(酶循环)和常压精馏过程乙醇生产成本的比较

常规的乙醇蒸馏过程经过两步,首先将发酵醪粗馏得到 30-40% (v/v) 的低浓度乙醇溶液,再经过精馏塔得到 95% (v/v) 以上的较高浓度的乙醇溶液,最后将达到共沸状态的乙醇溶液经过分子筛进一步脱水得到无水乙醇(99.5%)。常压时,粗馏塔塔内温度较高,使发酵醪中的纤维素酶失活,而减压在较低的塔内温度下就能够达到需要的分离效果,从而使纤维素酶循环使用成为可能。但是除了消耗较多的热量外,减压精馏时还需要使用真空泵使塔内维持较低的压力。为此,通过 Aspen plus (AspenTech Co., Cambridge, MA, USA) 流程模拟软件首先对脱木质素玉米芯残渣 SSF 循环生产乙醇过程进行建模,比较减压精馏和常压精馏的能量消耗,以验证通过减压精馏使 SSF 过程中纤维素酶循环利用策略的可行性。

3.3.4.1 Aspen plus 模拟乙醇生产过程

模拟的对象是年处理 200,000 ton/a (干基)脱木质素玉米芯残渣,年操作时间 8,000 hr 的纤维素乙醇工厂。常压粗馏生产流程如图 3.8a 所示,减压粗馏生产流程如图 3.8b 所示,脱木质素玉米芯残渣(组成见 2.1)经过 SSF (R404A/R404B)后,发酵醪(Stream 27)与水洗塔(T504)回收的乙醇溶液混合进入粗馏塔(T501),经过减压粗馏或者常压粗馏后进入精馏塔(T502),最后经分子筛(T503)脱水得到无水乙醇(Stream EtOH)。模型均设置粗馏塔塔板数 14,摩尔回流比 4,冷凝器类型为部分冷凝;设置精馏塔塔板数 33,质量回流比 3.7,冷凝器类型为部分冷凝。

图 3.8b 所示减压粗馏时,冷凝器温度设置为 15 °C,使得粗馏塔(T501)塔顶气体 CO₂ 体积比例与常压粗馏接近;乙醇蒸气从粗馏塔(T501)流出,通过换热器(H01)将气体冷凝至液体状态,后通过输送泵(P01)将乙醇液体泵入精馏塔(T502);粗馏塔塔底出料的固体部分循环回到发酵罐(R404A)中,以循环利用其中的纤维素酶(模拟中未给出)。如表 3.3,模拟过程中的参数输入是根据前述的实际实验数据,其中发酵醪的乙醇浓度为 40 g/L,减压精馏和常压精馏过程的区别在于粗馏塔再沸器温度及冷凝器温度的不同,其他参数均相同,减压粗馏塔操作压力选取 0.008 MPa 及 0.012 MPa 两个例子用于比较。通过 Aspen plus 计算,减压和常压下粗馏塔和精馏塔的热负荷比较见表 3.3。

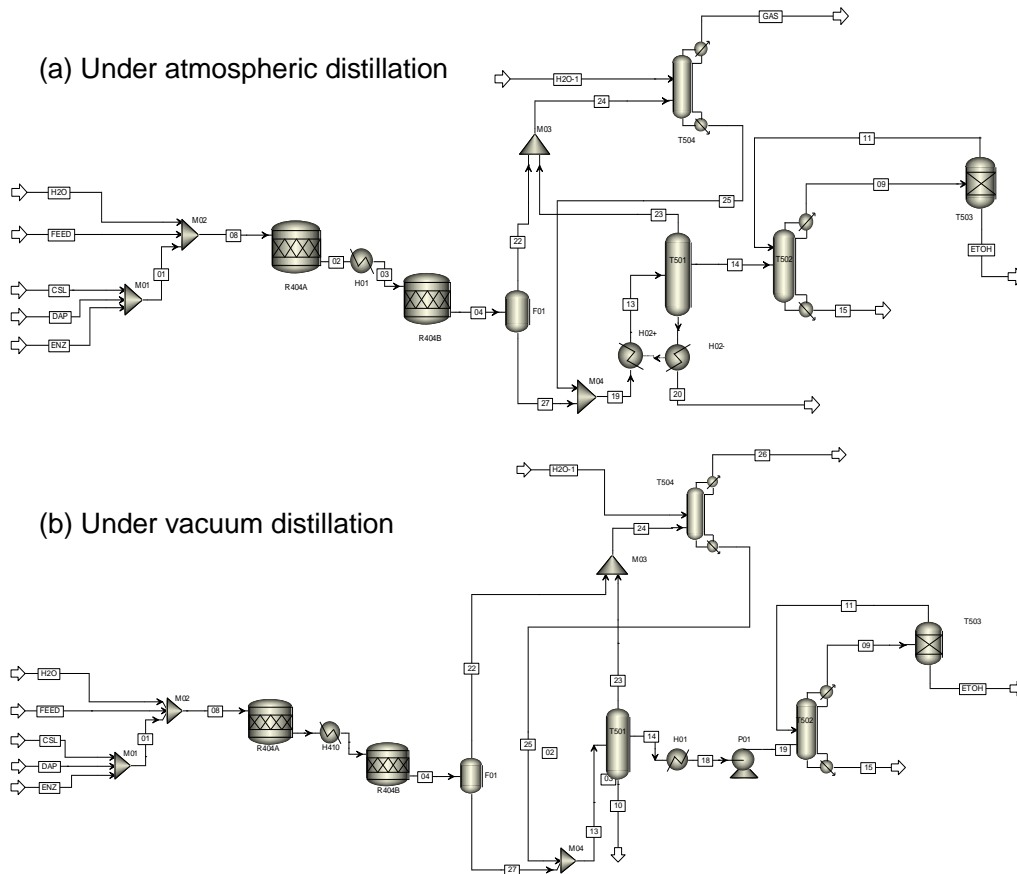


图 3.8 纤维素乙醇工业生产过程简图 (a) 常压精馏方式 (b) 减压精馏方式

Fig. 3.8 Flowsheet of industrial cellulosic ethanol production. (a) Under atmospheric distillation, (b) under vacuum distillation.

3.3.4.2 蒸汽用量成本计算

由表 3.3 可知，减压精馏 Case 1 中粗馏塔再沸器的温度只有 42.1 °C，纤维素酶蛋白在此温度下保留绝大部分活性。每吨乙醇需消耗 12,242 MJ 的热能，高于常压精馏过程的 9,015 MJ。根据低压蒸汽的平均低位发热量 3,763 MJ/吨蒸汽^[113]，减压精馏和常压精馏过程每吨乙醇消耗的蒸汽用量分别为 $12242 \div 3763 = 3.25$ 吨和 $9015 \div 3763 = 2.40$ 吨。国内工业用低压蒸汽（1.0 MPa）的价格约为 ¥ 130/吨蒸汽，即减压精馏和常压精馏过程单位乙醇的蒸汽能耗成本分别为 $3.25 \times 130 = ¥ 423$ 和 $2.40 \times 130 = ¥ 312$ 。

3.3.4.3 酶用量成本计算

由表 3.1 知，在脱木质素玉米芯残渣同步糖化发酵过程中进行纤维素酶循环使用时，生产每吨乙醇需要 88.7 kg 的纤维素酶，而对照试验中每吨乙醇需要消耗 159.0 kg 的纤维素酶。计算如式(3-8)(3-9)，其中纤维素酶蛋白含量为 90 mg EP/g：

$$\text{减压精馏: } \frac{1 \text{ mg proteins}}{125.27 \text{ mg ethanol}} = \frac{\frac{1}{0.09 \times 10^6} \text{ kg youtell}}{\frac{125.27}{10^9} \text{ ton ethanol}} = \frac{10^9 \text{ kg youtell}}{0.09 \times 10^6 \times 125.27 \text{ ton ethanol}} = 88.7 \text{ kg} \quad (3-8)$$

$$\text{常压精馏: } \frac{1 \text{ mg proteins}}{69.87 \text{ mg ethanol}} = \frac{\frac{1}{0.09 \times 10^6} \text{ kg youtell}}{\frac{69.87}{10^9} \text{ ton ethanol}} = \frac{10^9 \text{ kg youtell}}{0.09 \times 10^6 \times 69.87 \text{ ton ethanol}} = 159.0 \text{ kg} \quad (3-9)$$

表 3.3 减压精馏和常压精馏过程能耗的比较

Table 3.3 Comparison of energy consumption between cellulase recycling via vacuum distillation and non cellulase recycling process.

	减压 Case 1	减压 Case 2	常压 Case 3
发酵醪乙醇浓度 (g/L)	40	40	40
T501 侧线出料乙醇质量浓度	35%	35%	35%
T501 操作压力 (MPa)	0.008	0.012	0.101
冷凝器温度 (°C)	15	15	50
第一块塔板温度 (°C)	37.9	44.9	92.7
T501 再沸器温度 (°C)	42.1	49.5	100.1
T501 塔顶气体质量 (kg/h)	435.55	377.03	330.66
T501 塔顶气体体积 (m ³ /h)	3206.09	1776.86	211.63
T501 塔顶气体 CO ₂ 体积分数	62.94%	74.98%	76.00%
真空泵电机功率 (kW)	250	110	N/A
T501 冷凝器热负荷 (MJ/h)	-1963.50	-1597.88	-1407.56
T501 再沸器热负荷 (MJ/h)	55939.97	62158.04	78101.34
H01 冷凝器热负荷 (MJ/h)	-49763.07	-49389.32	N/A
P01 电耗 (kW)	1.35	1.30	N/A
T502 冷凝器热负荷 (MJ/h)	-42546.98	-42568.27	-42451.23
T502 再沸器热负荷 (MJ/h)	58916.14	58241.47	6352.90
乙醇产量 (kg/h)	9382.14	9382.14	9368.00
每吨乙醇所需热负荷 (MJ)	12242.00	12832.84	9015.19
循环冷却水交换的热负荷 (MJ)	-9838.91	-9801.35	-4681.77
冷冻水交换的热负荷 (MJ)	-209.28	-170.31	N/A
每吨乙醇所需电耗 (kW h)	26.79	11.86	N/A

根据实验室纤维素酶的采购价格¥ 13/kg 酶粉, 纤维素乙醇成本中纤维素酶的成本分别为 $88.7 \times 13 = ¥ 1,153$ 和 $159.0 \times 13 = ¥ 2,067$ 。

3.3.4.4 维持真空系统的耗电成本计算

虽然减压精馏过程消耗的热能比常压精馏低, 但是减压操作需要维持低于大气压强的压强, 也就是说需要使用真空泵对粗馏塔进行抽真空。为了维持需要的压强, 真空泵消耗比较多的电能, 所以这里对减压精馏过程真空泵消耗的电能进行估算。减压精馏时, 粗抽泵用于真空系统的预抽, 可使系统内压力迅速达到要求的真空度范围, 之后通过维持泵维持减压精馏系统的真空度。由于 Aspen plus 模拟的减压精馏工段属连续过程, 在此主要考虑维持泵的功耗。

根据 Aspen plus 模拟结果, 图 3.8b 所示减压精馏时, 醪液 (Stream 13) 进入粗馏

塔 (T501) 进行处理, 带有少量乙醇蒸气的不凝气体 (Stream 23) 从塔顶排出, 低浓度的乙醇和水的混合气体 (Stream 14) 从塔侧排出, 塔底出料是含有纤维素酶的固含量较高的醪液 (Stream 10)。

表 3.3 减压精馏 Case 1 中, 为维持塔内负压(粗馏塔内工作压力为 0.08 atm, 即 8 kPa), 粗馏塔 (T501) 塔顶不凝气被抽真空系统不断地抽走, 根据 Aspen plus 模拟结果, 带有少量乙醇蒸气的不凝气体 (Stream 23) 从塔顶排出, 其体积流率 S_1 为 3,206 m³/h。根据减压粗馏塔容积及装置密封情况考虑气体泄漏量为抽气量 S_1 的 10%, 总抽气速率

$$S_e = 1.1S_1 = 3526.6 \text{ m}^3/\text{h} \quad (3-10)$$

由于对于工业常用的液环真空泵, 泵厂样本的标准进气温度是 20 °C, 进水温度为 15 °C。需将 S_e 换算成泵厂样本规定条件下的抽气速率 S'_e , 真空泵设计进水温度为 30 °C。

k_1 、 k_2 分别为工作水温度、气体温度的不同引起的修正, 单级液环真空泵

$$k_1 = \frac{p_s(0.27\ln p_s + 0.543) - 1.05p_v}{p_s(0.27\ln p_s + 0.543) - 1.05[p_v]} = \frac{8(0.27\ln 8 + 0.543) - 1.05 \times 4.2455}{8(0.27\ln 8 + 0.543) - 1.05 \times 1.7056} = 0.621 \quad (3-11)$$

$$k_2 = 1 + \frac{0.66(T_s - 20)}{273 + T_w} = 1 + \frac{0.66 \times (15 - 20)}{273 + 30} = 0.989 \quad (3-12)$$

式中, p_s 为泵进气压力, kPa; T_s 为泵进气温度, °C; T_w 为泵进水温度, °C; p_v 为 T_w 下的汽化压力, kPa;

故此时,

$$S'_e = \frac{S_e}{k_1 k_2} = \frac{3526.6}{0.621 \times 0.989} \text{ m}^3/\text{h} = 5742.1 \text{ m}^3/\text{h} \quad (3-13)$$

根据真空度及抽气速率要求, 拟选工业常用 2BE1 型单级液环真空泵, 该泵广泛用于化工、食品、医药、纺织等行业的真空蒸发、脱水、干燥、浓缩、送料等工艺过程。选用型号 2BE1 403-0 的真空泵 1 台, 其主要技术参数为: 转速 530 rpm, 电机功率为 250 kW。其抽气速率 S 在 8kPa 下达 7,750 m³/h, 此时

$$\frac{S}{S'_e} = \frac{7750}{5742.1} = 1.35 \quad (3-14)$$

$$S > (20-30\%) S'_e \quad (3-15)$$

满足工艺条件。

为维持真空度, 该系统所需的真空泵电机功率为 250 kW。粗馏塔 (T501) 侧线乙醇蒸气需通过冷凝器 (H01) 液化, 再通过输送泵 (P01) 将此浓度为 35% 的乙醇液体泵入精馏塔 (T502), 通过 Aspen plus 模型计算输送泵 (P01) 功率仅为 1.35 kW。该流程的乙醇产量为 9.38 ton/h, 故生产每吨乙醇所需电耗为 $(250+1.35) \div 9.38 = 26.79 \text{ kW h}$ 。根据工业用电价格为 ¥ 0.48/(kW h) 计算, 减压精馏 Case 1 中用电成本为 ¥ 13。

3.3.4.5 乙醇蒸气冷却时交换热负荷的成本计算

减压精馏过程中, 粗馏塔顶端不凝气主要为 CO₂, 此时冷凝器温度设置为 15 °C。为满足该温度要求, 一般工业常用的循环冷却水 (温度 33-37 °C) 不能对其进行冷却,

需用温度更低但成本相对较高的冷冻水(温度 4-15 °C)。减压精馏 Case 1 生产每吨乙醇，通过冷却水（换热温度从 33 °C 变为 37 °C，即-4 K 的温度差）交换的热负荷为-9838.91 MJ，即需要的冷却水量为

$$m_1 = \frac{Q_1}{c \cdot \Delta T_1} = \frac{-9838.91 \text{ MJ}}{4.2 \text{ kJ} \cdot (\text{kg} \cdot \text{K})^{-1} \times (-4 \text{ K})} = 585.6 \text{ ton} \quad (3-16)$$

冷冻水（换热温度从 4 °C 变为 15 °C，即-11 K 的温度差）热交换的热负荷为-209.28 MJ，即需要的冷冻水量为

$$m_2 = \frac{Q_2}{c \cdot \Delta T_2} = \frac{-209.28 \text{ MJ}}{4.2 \text{ kJ} \cdot (\text{kg} \cdot \text{K})^{-1} \times (-11 \text{ K})} = 4.5 \text{ ton} \quad (3-17)$$

根据华北地区部分企业公用工程价格表^[114]，循环冷却水及冷冻水价格分别为 ¥ 0.32/ton 及 ¥ 4.5/ton，则减压精馏 Case 1 中循环冷却水、冷冻水成本分别为 ¥ 187、¥ 20。

由于减压精馏 Case 2 的热负荷及电耗计算方法一致，在此不做赘述。综上，脱木质素玉米芯残渣生产每吨无水乙醇时，减压精馏与常压精馏过程主要能耗及成本比较如表 3.4。

3.3.4.6 减压精馏和常压精馏乙醇生产成本的比较

表 3.4 脱木质素玉米芯残渣减压精馏和常压精馏过程乙醇生产成本的比较

Table 3.4 Comparison of ethanol production cost between cellulase recycling via vacuum distillation and non cellulase recycling process from delignified corncob residues.

乙醇生产成本 (¥/ton)	减压 Case 1	减压 Case 2	常压 Case 3
蒸汽	423	443	312
电	13	6	0
循环冷却水	187	187	89
冷冻水	20	17	0
纤维素酶	1153	1153	2067
总计	1796	1806	2468

本文同时通过 Aspen plus 软件模拟玉米秸秆生产乙醇流程，模拟的对象是年处理 440,000 ton/a (干基)玉米秸秆，年操作时间 8,000 hr 的纤维素乙醇工厂，常压粗馏生产流程与图 3.8a 所示一致，减压粗馏生产流程与图 3.8b 所示一致。结合实际实验数据，发酵醪乙醇浓度亦为 40 g/L，以该浓度出发，后序蒸馏工艺的能耗及成本与 DCCR 生产乙醇流程完全一致，乙醇产量亦一致，纤维素酶用量成本根据表 3.2 数据进行计算，计算方法与 DCCR 生产乙醇中酶用量成本计算一致，故在此不做赘述。预处理玉米秸秆生产每吨无水乙醇时，减压精馏与常压精馏过程主要能耗及成本比较如表 3.5。

表 3.5 玉米秸秆减压精馏和常压精馏过程乙醇生产成本的比较

Table 3.5 Comparison of ethanol production cost between cellulase recycling via vacuum distillation and non cellulase recycling process from pretreated and biodetoxified corn stover.

乙醇生产成本 (¥/ton)	减压 Case 1	减压 Case 2	常压 Case 3
蒸汽	423	443	312
电	13	6	0
循环冷却水	187	187	89
冷冻水	20	17	0
纤维素酶	3988	3988	4993
总计	4631	4641	5394

结果显示, 减压精馏事例中随着粗馏塔操作压力从 0.008 MPa 增至 0.012 MPa, 再沸器温度亦从 42 °C 升至 50 °C 时, 蒸汽用量成本逐步增加, 电耗成本逐步降低, 冷冻水用量逐步减少。商品纤维素酶的最适温度一般在 50 °C 左右, 随着温度进一步升高, 酶失活速度开始加快, 这势必增加纤维素酶用量成本, 最终导致乙醇的生产成本增加。

减压精馏与常压精馏比较而言, 由于减压粗馏塔获得的 35%乙醇溶液的温度较低, 输送至精馏塔内再次升温, 精馏塔再沸器热负荷远高于常压精馏过程的热负荷, 减压精馏过程所耗的总蒸汽量比常压精馏所耗高; 但在酶用量成本上, 通过减压精馏循环利用纤维素酶, 极大节约了酶成本。冷却用水也是本文考察方面之一, 结果发现, 循环冷却水用量成本基本一致; 减压精馏过程冷凝器温度需降至 15 °C, 所耗的冷冻水虽然价格昂贵, 但用量非常有限。就上述乙醇生产成本几方面因素考虑, 表 3.4 所示脱木质素玉米芯残渣生产乙醇中, 减压精馏方式的成本(纤维素酶循环利用)明显低于常压精馏方式的成本(纤维素酶未循环利用), 酶成本降低了 44%, 乙醇生产成本节约比例高达 27%; 表 3.5 所示玉米秸秆生产乙醇中, 减压精馏方式的成本(纤维素酶循环利用)亦低于常压精馏方式的成本(纤维素酶未循环利用), 酶成本降低了 20%, 乙醇生产成本节约比例达 14%。

但同时, 我们也清楚地知道, 由于现有技术水平限制, 减压精馏对设备密封要求高, 在生产固定投资上比常压精馏的投资多, 实际电耗成本也比本文所估计的理想值高, 这些均可能增加维持真空的成本。

本文通过减压精馏方式使得 SSF 乙醇生产过程中纤维素酶得以循环利用, 纤维素酶用量(4-6.7 FPU/g DM)在工业批次发酵的常用酶量(10-15 FPU/g DM)的基础上节省了 20-44%的成本, 乙醇生产成本降低了 14-27%。在现有高昂的商品纤维素酶成本考虑下, 随着低成本的真空技术进一步发展, 本文的纤维素酶循环方法将具有广阔的运用前景。

3.4 小结

本章研究了酿酒酵母对木质纤维素原料（包括脱木质素玉米芯工业残渣和预处理并脱毒玉米秸秆）进行高固含量的同步糖化与发酵生产乙醇，通过在位间歇减压精馏方式，把产物乙醇抽出，补入新鲜物料，循环利用低温蒸馏后残留在醪液中的纤维素酶，从而启动新一轮同步糖化与发酵，实现纤维素酶的循环利用：与批次对照实验相比，循环实验使得纤维素酶的利用率大幅提升；相对酶活、pNPG 酶活、CMC-Na 酶活测定显示，随着循环次数增加，固相分布残留酶活所占总酶活比例增加；通过 Aspen plus 模拟乙醇生产过程能耗，结果发现循环实验比工业批次发酵的乙醇生产成本降低了 14-27%，本文的纤维素酶循环方法具有广阔的运用前景。

第 4 章 结论与展望

4.1 结论

纤维素酶成本高是木质纤维素生物炼制工艺商业化的瓶颈，通过循环利用以降低酶用成本是目前有效手段之一。本研究通过在位间歇减压精馏方式实现酿酒酵母对高固含量木质纤维素原料（包括脱木质素玉米芯工业残渣、预处理并生物脱毒玉米秸秆）乙醇生产中纤维素酶的循环利用，将乙醇分离与纤维素酶循环整合到同步糖化与发酵工艺中。减压下的低温使得发酵醪中大部分的酶活得以保留，补加新鲜底物以重新吸附纤维素酶，从而启动新一轮同步糖化与发酵。分别从实验数据及软件模拟验证了该减压精馏实现的纤维素酶循环利用方法的技术经济可行性。本研究获得结论如下：

(1) 对脱木质素玉米芯工业残渣 (DCCR) 进行同步糖化与发酵的性能测试，在 20% 固含量下获得了 75.07 g/L 的高浓度乙醇，此时得率为 89.38%；另外，在 25% 固含量条件下获得的 83.53 g/L 浓度乙醇是目前已报道文献中玉米芯残渣类原料获得的最高浓度之一；该脱木质素玉米芯残渣原料具有极佳的发酵性能；DCCR 发酵测试发现，与常规高温预糖化再常温同步糖化与发酵的操作相比，37 °C 恒温的预糖化同步糖化与发酵表现基本一致，该结果具有实际运用价值，以降低因费时费能降温而产生的能耗；DCCR 发酵性能与玉米粉淀粉类的性能相比，仍具有相当的乙醇成本优势。

(2) 用 DCCR 进行 SSF 过程中，通过在位间歇减压精馏把乙醇蒸出，补加新料，循环利用低温蒸馏后残留在醪液中的纤维素酶，以启动新一轮 SSF；每次新加入折合 10% 固体含量的 DCCR，以初始 20 FPU/g DM 酶用量下循环了共 5 次，最终酶用量折算仅为 4 FPU/g DM；与对照批次实验比较，酶量节省了 44%，同时监测循环 SSF 中，纤维素复合酶系的三个酶活指标，酶活综合指标显示大部分酶活均保留在 SSF 体系中得以循环利用。

(3) 用更为大宗的预处理玉米秸秆 (CS) 进行上述类似条件的 SSF 循环实验，每次新加入折合 20% 固含量的 CS，以初始 20 FPU/g DM 酶用量下循环了共 3 次，最终酶用量折算仅为 6.7 FPU/g DM，比相应对照实验节省酶量 20%，酶活综合指标检测结果与上述 DCCR 循环 SSF 过程类似。

(4) Aspen plus 软件模拟乙醇生产过程，比较减压粗馏与常规常压粗馏的能耗，和各自酶用量成本进行核算，发现两种原料的循环实验的乙醇生产成本分别比工业批次发酵的成本降低了 27%（以 DCCR 为原料）及 14%（以 CS 为原料）。

(5) 本文分别通过实验及软件模拟验证了通过减压精馏实现木质纤维素原料 SSF 中纤维素酶的循环方法的技术经济可行性。

4.2 展望

纤维素乙醇即将成为燃料乙醇的主流，但在此之前，主要的瓶颈问题仍然需要突破，乙醇生产成本需进一步降低：①木质纤维素原料的高效预处理技术的开发与完善；②纤

纤维素酶高产菌种的定向改造与筛选；③乙醇发酵菌种的抗抑制物、耐热性的提高；④适配高固含量原料水解与发酵的新型反应器设计；⑤连续化预处理及生产的技术与装置的开发等。

参考文献

- [1] Lund H. Renewable energy strategies for sustainable development. *Energy*. 2007, 32: 912-919.
- [2] Badwal S. P. S., Giddey S., Kulkarni A. Direct ethanol fuel cells for transport and stationary applications - a comprehensive review. *Appl. Energ.* 2015, 145: 80-103.
- [3] Condon N., Klemick H., Wolverton A. Impacts of ethanol policy on corn prices: A review and meta-analysis of recent evidence. *Food Policy*. 2015, 51: 63-73.
- [4] Moraes B. S., Zaiat M., Bonomi A. Anaerobic digestion of vinasse from sugarcane ethanol production in Brazil: Challenges and perspectives. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2015, 44: 888-903.
- [5] 中华人民共和国国务院. 国务院关于印发生物产业发展规划的通知. 国发〔2012〕65号. 2013-01-06.
- [6] 中华人民共和国国务院办公厅. 国务院办公厅关于印发能源发展战略行动计划(2014-2020年)的通知. 国办发〔2014〕31号. 2014-11-19.
- [7] Galbe M., Sassner P., Wingren A., et al. Process engineering economics of bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2007, 108: 303-327.
- [8] Gnansounou E., Dauriat A. Techno-economic analysis of lignocellulosic ethanol: A review. *Bioresour. Technol.* 2010, 101(13): 4980-4991.
- [9] Macrelli S., Mogensen J., Zacchi G. Techno-economic evaluation of 2nd generation bioethanol production from sugar cane bagasse and leaves integrated with the sugar-based ethanol process. *Biotechnol. Biofuels*. 2012, 5: 22.
- [10] Galbe M., Zacchi G. A review of the production of ethanol from softwood. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2002, 59: 618-628.
- [11] Agbor V. B., Cicek N., Sparling R., et al. Biomass pretreatment: Fundamentals toward application. *Biotechnol. Adv.* 2011, 29(6): 675-685.
- [12] Ofori-Boateng C., Lee K. T. Comparative thermodynamic sustainability assessment of lignocellulosic pretreatment methods for bioethanol production via exergy analysis. *Chem. Eng. J.* 2013, 228: 162-171.
- [13] Saxena R. C. Ā., Adhikari D. K., Goyal H. B. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2009, 13: 167-178.
- [14] Gupta A., Verma J. P. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2015, 41: 550-567.
- [15] Balat M. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. *Energ. Convers. Manage.* 2011, 52: 858-875.
- [16] Hendriks A. T. W. M., Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass. *Bioresour. Technol.* 2009, 100: 10-18.
- [17] Zheng Y., Pan Z., Zhang R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *Int. J. Agric. Biol. Eng.* 2009, 2: 51-68.
- [18] Kumar R., Barrett D. M., Delwiche D. M., et al. Methods for pretreatment of

lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2009, 48: 3713-3729.

[19] Galbe M., Zacchi G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2007, 108: 41-65.

[20] Zhao X., Cheng K., Liu D. Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for enzymatic hydrolysis. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009, 82: 815-827.

[21] Alvira P., Tomás-Pejó P., Ballesteros M., et al. 2010. Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: A review. *Bioresour. Technol.* 2010, 101(13): 4851-4861.

[22] Sánchez Ó. J., Cardona C. A. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.* 2008, 99(13): 5270-5295.

[23] Zhang J., Wang X. S., Chu D. Q., et al. Dry pretreatment of lignocellulose with extremely low steam and water usage for bioethanol production. *Bioresour. Technol.* 2011, 102: 4480-4488.

[24] Feng Y. J., Yu Y. L., Wang X., et al. Degradation of raw corn stover powder (RCSP) by an enriched microbial consortium and its community structure. *Bioresour. Technol.* 2011, 102(2): 742-747.

[25] Bals B., Rogers C., Jin M., et al. Evaluation of ammonia fibre expansion (AFEXTM) pretreatment for enzymatic hydrolysis of switchgrass harvested in different seasons and locations. *Biotechnol. Biofuels.* 2010, 3:1.

[26] Jin M. J., Bothfeld W., Austin S., et al. Effect of storage conditions on the stability and fermentability of enzymatic lignocellulosic hydrolysate. *Bioresour. Technol.* 2013, 147: 212-220.

[27] Bai D. M., Li S. Z., Liu Z. L., et al. Enhanced L-(+)-lactic acid production by an adapted strain of *Rhizopus oryzae* using corncob hydrolysate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2008, 144: 79-85.

[28] Bu L. X., Xing Y., Yu H. L., et al. Comparative study of sulfite pretreatments for robust enzymatic saccharification of corn cob residue. *Biotechnol. Biofuels.* 2012, 5: 87.

[29] Guo H., Zou S. L., Liu B. S., et al. Reducing β -glucosidase supplementation during cellulase recovery using engineered strain for successive lignocellulose bioconversion. *Bioresour. Technol.* 2015, 187: 362-368.

[30] Cheng K. K., Wang W., Zhang J. A., et al. Statistical optimization of sulfite pretreatment of corncob residues for high concentration ethanol production. *Bioresour. Technol.* 2010, 102: 3014-3019.

[31] Zhang M. J., Wang F., Su R. X., et al. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. *Bioresour. Technol.* 2010, 101: 4959-4964.

[32] 中华人民共和国国家发展和改革委员会. 国家发展改革委关于山东龙力生物科技股份有限公司 5 万吨/年纤维燃料乙醇项目核准的批复. 发改能源〔2012〕987 号. 2012-05-14.

- [33] Herrera S. Bonkers about biofuels. *Nat. Biotechnol.* 2006, 24: 755-760.
- [34] Paulo A. C. Mechanism of cellulase action in textile processes. *Carbohydr. Polym.* 1998, 37(3): 273-277.
- [35] Ryu D. D. Y., Kim C., Mandels M. Competitive adsorption of cellulase components and its significance in a synergistic mechanism. *Biotechnol. Bioeng.* 1984, 26: 488-496.
- [36] Bhatia L., Johri S., Ahmad R. An economic and ecological perspective of ethanol production from renewable agro waste: A review. *AMB Express.* 2012, 2: 65.
- [37] Gauss W. F., Suzuki S., Takagi M. Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments. US Patent: 33990944. 1976-11-09.
- [38] Mutturi S., Lidén G. Effect of temperature on simultaneous saccharification and fermentation of pretreated spruce and arundo. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2013, 52(3): 1244-1251.
- [39] Chen A., Zhang X., Zhang S., et al. Enhanced enzymatic xylose/cellulose fractionation from alkaline liquor-pretreated corn cob by surfactant addition and separate fermentation to bioethanol. *Turk. J. Biol.* 2014, 38: 478-484.
- [40] Kim T. H., Choi C. H., Oh K. K. Bioconversion of sawdust into ethanol using dilute sulphuric acid-assisted continuous twin screw-driven reactor pretreatment and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresour. Technol.* 2013, 130: 306-313.
- [41] Bjerre A. B., Olesen A. B., Fernqvist T. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicelluloses. *Biotechnol. Bioeng.* 1996, 49: 568-577.
- [42] Novy V., Krahulec S., Longus K., et al. Co-fermentation of hexose and pentose sugars in a spent sulfite liquor matrix with genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresour. Technol.* 2013, 130: 439-448.
- [43] Lopéz-Linares J. C., Romero I., Cara C., et al. Bioethanol production from rapeseed straw at high solids loading with different process configurations. *Fuel.* 2014, 122: 112-118.
- [44] 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(5): 894-902.
- [45] Neves M. A., Kimura T., Shimizu N., et al. State of the art and future trends of bioethanol production, dynamic biochemistry, process biotechnology and molecular biology. *Glob. Sci. Books.* 2007: 1-13.
- [46] Engelién H. K., Skogestad S. Selecting appropriate control variables for a heat integrated distillation system with prefractionator. *Comput. Chem. Eng.* 2004, 28: 683-691.
- [47] Humphrey J. Separation process technology. McGraw-Hill, New York. 1997.
- [48] Jana A. K. Advances in heat pump assisted distillation column: A review. *Energ. Convers. Manage.* 2014, 77: 287-297.
- [49] Wang P., Chung T. S. Recent advances in membrane distillation processes: Membrane development, configuration design and application exploring. *J. Membrane. Sci.* 2015, 474: 39-56.
- [50] Dong D. D., Zhao D. Q., Liao C. P., et al. Energy consumption of fuel ethanol production and review of energy-saving technologies. *Chem. Ind. Eng. Prog.* 2007, 26 (11): 1596-1601.

- [51] Spotar S., Rahman A., Gee O. C. A revisit to the separation of a binary mixture of ethanol-water using ultrasonic distillation as a separation process. *Chem. Eng. Process.* 2015, 87: 45-50.
- [52] Jareanjit J., Siangsukone P., Wongwailikhit K., et al. Management of ethanol waste from the solar distillation process: Experimental and theoretical studies. *Energ. Convers. Manage.* 2015, 89: 330-338.
- [53] Maity S. K. Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part II. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 2015, 43: 1446-1466.
- [54] Vane L. M. Separation technologies for the recovery and dehydration of alcohols from fermentation broths. *Biofuel. Bioprod. Bior.* 2008, 2: 553-588.
- [55] Stephanopoulos G. Challenges in engineering microbes for biofuels production. *Science.* 2007, 315: 801-804.
- [56] Gapes J. R., Nimcevic D., Friedl A. Long-term continuous cultivation of *Clostridium beijerinckii* in a two-stage chemostat with on-line solvent removal. *Appl. Environ. Microbiol.* 1996, 62: 3210-3219.
- [57] Ding W. W., Wu Y. T., Tang X. X., et al. Continuous ethanol fermentation in a closed-circulating system using an immobilized cell coupled with PDMS membrane pervaporation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 2011, 57: 7771-7778.
- [58] Abu-Zeid M. A. E., Zhang Y. Q., Dong H. A comprehensive review of vacuum membrane distillation technique. *Desalination.* 2015, 356: 1-14.
- [59] Roychoudhury P. K., Ghose T. K., Ghosh P. Operational strategies in vacuum-coupled SSF for conversion of lignocellulose to ethanol. *Enzyme Microb. Technol.* 1992, 14: 518-585.
- [60] Nguyen V. D., Kosuge H., Auresenia J., et al. Effect of vacuum pressure on ethanol fermentation. *J. Appl. Sci.* 2009, 9: 3020-3026.
- [61] Cysewski G. R., Wilke C. R. Rapid ethanol fermentations using vacuum and cell recycle. *Biotechnol. Bioeng.* 1977, 19(8): 1125-1143.
- [62] Ramalingham A., Finn R. K. The vacuform process: A new approach to fermentation alcohol. *Biotechnol. Bioeng.* 1977, 19(4): 583-589.
- [63] Ghose T. K., Roychoudhury P. K., Ghosh P. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of lignocellulosics to ethanol under vacuum cycling and step feeding. *Biotechnol. Bioeng.* 1984, 26: 377-381.
- [64] Ghose T. K., Tyagi R. D. Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. I. Batch versus continuous systems. *Biotechnol. Bioeng.* 1979, 21: 1387-1400.
- [65] Várnai A., Viikari L., Marjamaa K., et al. Adsorption of monocomponent enzymes in enzyme mixture analyzed quantitatively during hydrolysis of lignocellulose substrates. *Bioresour. Technol.* 2011, 102(2): 1220-1227.
- [66] Kumar L., Arantes V., Chandra R., et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility. *Bioresour. Technol.* 2012, 103(1): 201-208.
- [67] Yu Z. Y., Jameel H., Chang H. M., et al. The effect of delignification of forest biomass on enzymatic hydrolysis. *Bioresour. Technol.* 2011, 102(19): 9083-9089.
- [68] Berlin A., Balakshin M., Gilkes N., et al. Inhibition of cellulase, xylanase and

- β -glucosidase activities by softwood lignin preparations. *J. Biotechnol.* 2006, 125: 198-209.
- [69] Hou X. D., Smith T. J., Li N., et al. Novel renewable ionic liquids as highly effective solvents for pretreatment of rice straw biomass by selective removal of lignin. *Biotechnol. Bioeng.* 2012, 109: 2484-2493.
- [70] Zhao X. B., Dong L., Chen L., Liu D. H. Batch and multi-step fed-batch enzymatic saccharification of Formiline-pretreated sugarcane bagasse at high solid loadings for high sugar and ethanol titers. *Bioresour. Technol.* 2013, 135: 350-356.
- [71] Liu K., Lin X. H., Yue J., et al. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy. *Bioresour. Technol.* 2010, 101(13): 4952-4958.
- [72] Castanon M., Wilke C. R. Adsorption and recovery of cellulases during hydrolysis of newspaper. *Biotechnol. Bioeng.* 1980, 22: 1037-1053.
- [73] Mandels M., Kostick J., Parizek R. The use of adsorbed cellulase in the continuous conversion of cellulose to glucose. *J. Polym. Sci. Pol. Symp.* 1971, 36(1): 445-459.
- [74] Weiss N., Börjesson J., Pedersen L. S., et al. Enzymatic lignocellulose hydrolysis: Improved cellulase productivity by insoluble solids recycling. *Biotechnol. Biofuels.* 2013, 6: 5.
- [75] Lee D., Yu A. H. C., Saddler J. N. Evaluation of cellulose recycling strategies for the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 1995, 45: 328-336.
- [76] Ouyang J., Liu B. T., Zhang M., et al. Enzymatic hydrolysis, adsorption, and recycling during hydrolysis of bagasse sulfite pulp. *Bioresour. Technol.* 2013, 146: 288-293.
- [77] Rodrigues A. C., Leitão A. F., Moreira S., et al. Recycling of cellulases in lignocellulosic hydrolysates using alkaline elution. *Bioresour. Technol.* 2012, 110: 526-533.
- [78] Zhang X., Paice M., MacFarlane P., et al. The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of a mixed softwood feedstock. *Bioresour. Technol.* 2009, 100: 6407-6415.
- [79] Deshpande M. V., Eriksson K. E. Reutilization of enzymes for saccharification of lignocellulosic materials. *Enzyme Microb. Technol.* 1984, 6: 338-340.
- [80] Jackson L. S., Joyce T. W., Heitmann J. A., et al. Enzyme activity recovery from secondary fiber treated with cellulase and xylanase. *J. Biotechnol.* 1996, 45: 33-44.
- [81] Otter D. E., Munro P. A., Scott G. K., et al. Desorption of *Trichoderma reesei* cellulase from cellulose by a range of desorbents. *Biotechnol. Bioeng.* 1989, 34: 291-298.
- [82] Zhu Z. G., Sathitsuksanoh N., Zhang Y. H. P. Direct quantitative determination of adsorbed cellulase on lignocellulosic biomass with its application to study cellulase desorption for potential recycling. *Analyst.* 2009, 134: 2267-2272.
- [83] Du R. Y., Su R. X., Li X., et al. Controlled adsorption of cellulase onto pretreated corncob by pH adjustment. *Cellulose.* 2012, 19: 371-380.
- [84] Fang X., Shen Y., Zhao J., et al. Status and prospect of lignocellulosic bioethanol production in China. *Bioresour. Technol.* 2010, 101: 4814-4819.
- [85] Fan C., Qi K., Xia X. X., et al. Efficient ethanol production from corncob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. *Bioresour. Technol.* 2013, 136: 309-315.
- [86] Gu H. Q., Zhang J., Bao J. Inhibitor analysis and adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* for simultaneous saccharification and ethanol fermentation from industrial waste

- corn cob residues. *Bioresour. Technol.* 2014, 157: 6-13.
- [87] McAloon A., Taylor F., Yee W. Determining the cost of producing ethanol from corn starch and lignocellulosic feedstocks. Technical Report NREL/TP- 580-28893. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2000.
- [88] Adney B., Baker J. Measurement of cellulase activities. Laboratory Analytical Procedure. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO (LAP-006). 1996, 6.
- [89] Ghose T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* 1987, 59(2): 257-268.
- [90] Holm J., Björck I., Drews A., et al. A rapid method for the analysis of starch. *Starch Stärke.* 1986, 38(7): 224-226.
- [91] 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. *Biotechnol. Bioeng.* 2010, 105(4): 718-728.
- [92] Ainsworth E. A., Gillespie K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. *Nat. Protoc.* 2007, 2(4): 875-877.
- [93] Sluiter A., Hames B., Ruiz R., et al. Determination of sugars, byproducts, and degradation products in liquid fraction process samples. Golden, CO: National Renewable Energy Laboratory. 2006.
- [94] Sluiter A., Hames B., Ruiz R., et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. National Renewable Energy Laboratory. Laboratory Analytical Procedure. 2008.
- [95] Van Soest P. V., Robertson J., Lewis B. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *J. Dairy Sci.* 1991, 74(10): 3583-3597.
- [96] Sluiter A., Hames B., Ruiz R., et al. Determination of ash in biomass. National Renewable Energy Laboratory. Laboratory Analytical Procedure. 2005.
- [97] Zhang J., Bao J. A modified method for calculating practical ethanol yield at high lignocellulosic solids content and high ethanol titer. *Bioresour. Technol.* 2012, 116: 74-79.
- [98] Mutturi S., Lidón G. Model-based estimation of optimal temperature profile during simultaneous saccharification and fermentation of *Arundo donax*. *Biotechnol. Bioeng.* 2014, 111: 866-875.
- [99] Zhou H. F., Zhu J. Y., Luo X. L., et al. Bioconversion of beetle-killed lodgepole pine using SPORL: Process scale-up design, lignin coproduct, and high solids fermentation without detoxification. *Ind. Eng. Chem. Res.* 2013, 52: 16057-16065.
- [100] Humbird D., Davis R., Tao L., et al. Process design and economics for biochemical conversion of lignocellulosic biomass to ethanol. Technical Report NREL/TP-5100-47764. National Renewable Energy Laboratory, Golden, CO. 2011.
- [101] Humbird D., Mohagheghi A., Dowe N., et al. Economic impact of total solids loading on enzymatic hydrolysis of dilute acid pretreated corn stover. *Biotechnol. Prog.* 2010, 26(5): 1245-1251.
- [102] Wingren A., Galbe M., Zacchi G. Energy considerations for a SSF-based softwood ethanol plant. *Bioresour. Technol.* 2008, 99(7): 2121-2131.
- [103] Lei C., Zhang J., Xiao L., et al. An alternative feedstock of corn meal for industrial fuel

ethanol production: Delignified corncob residue. *Bioresour. Technol.* 2014, 167: 555-559.

[104] Merino S. T., Cherry J. Progress and challenges in enzyme development for biomass utilization. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2007, 108: 95-120.

[105] Tu M. B., Chandra R. P., Saddler J. N. Evaluating the distribution of cellulases and the recycling of free cellulases during the hydrolysis of lignocellulosic substrates. *Biotechnol. Prog.* 2007, 23: 398-406.

[106] Tu M. B., Zhang X., Paice M., et al. The potential of enzyme recycling during the hydrolysis of a mixed softwood feedstock. *Bioresour. Technol.* 2009, 100(24): 6407-6415.

[107] Tu M. B., Saddler J. N. Potential enzyme cost reduction with the addition of surfactant during the hydrolysis of pretreated softwood. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010, 161: 274-287.

[108] Wingren A., Galbe M., Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol. Prog.* 2003, 19: 1109-1117.

[109] Yanase H., Yamamoto K., Sato D., et al. Ethanol production from cellobiose by *Zymobacter palmae* carrying the *Ruminococcus albus* β -glucosidase gene. *J. Biotechnol.* 2005, 118(1): 35-43.

[110] Mandels M., Andreotti R., Roche C. Measurement of saccharifying cellulase. *Biotechnol. Bioeng. Symp.* 1976, 6: 21-33.

[111] 包艳文. 木质纤维素乙醇同步糖化与发酵过程中纤维素酶循环利用的研究[D]. 上海: 华东理工大学. 2013: 25-32.

[112] Zacchi G., Axelsson A. Economic evaluation of preconcentration in production of ethanol from dilute sugar solutions. *Biotechnol. Bioeng.* 1989, 34(2): 223-233.

[113] 中华人民共和国国家标准 GB/T 2589-2008, 综合能耗计算通则. 北京: 中国标准出版社. 2008-02-03.

[114] 中国石油化工集团公司经济技术研究院. 中国石油化工项目可行性研究技术经济参数与数据. 北京: 中国石油化工集团公司研究院. 2014.

攻读硕士期间的研究成果

论文:

[1] Cheng Lei¹, Jian Zhang¹, Lin Xiao, Jie Bao. An alternative feedstock of corn meal for industrial fuel ethanol production: Delignified corncob residue. *Bioresource Technology*. 2014, 167: 555-559.

专利申请:

[1] 鲍杰, 雷成, 张建. 一种纤维素乙醇生产中纤维素酶的循环利用方法. 申请号: 201410625638.4

致谢

本硕士学位论文是在导师鲍杰教授悉心指导下完成，鲍老师专注学术，严谨治学，事必躬亲，工作兢业。三年时光里，鲍老师对我的治学研究严格要求，为我的课题研究和论文完成付出了大量心血，培养我严谨的科研作风，为顺利取得一定研究成果奠定坚实基础，在日常生活中给予我无私的帮助。在此特向鲍老师表达我真挚的谢意！

感谢张建老师和高秋强老师，亲自指导我实验操作，与我讨论分享实验思路，对我论文写作及修改帮助上细致认真，关心我学习与生活情况，遇到困难时及时给予我帮助与建议。

感谢包艳文师兄，在我初入实验室时手把手教学，耐心指导我的研究实验，对我实验思路给予极大的启发。

感谢实验室团队的易霞老师、何燕青师兄、顾翰琦师兄、王霞师姐、Qureshi Abdul Sattar、张宏森师兄、王娟师姐，在我学习、研究及生活中给予的帮助与建议。

感谢与我共同走进实验室的刘克、刘刚、张鹏、孙娇娥同学，让我获得珍贵的友谊。

感谢师弟韩昀身、张竞生，在我研究实验进行到最艰难的时刻给予我的帮助。

感谢同寝室兄弟全聪、李连伟、毛黎明，让我的三年研究生活变得丰富多彩。由衷感谢我所有的好友、同学。

最后，感谢父母对我的养育之恩，父亲、母亲、姐姐给予我最坚实的后盾，让我能奋力拼搏去迎接未来全新的挑战。