

## 研究报告

# 常压甘油自催化预处理麦草浓醪发酵纤维素乙醇

王亮<sup>1</sup>, 刘建权<sup>1</sup>, 张喆<sup>2</sup>, 张斐阳<sup>2</sup>, 任俊莉<sup>3</sup>, 孙付保<sup>1</sup>, 张震宇<sup>1</sup>, 丁灿灿<sup>1</sup>, 林巧文<sup>1</sup>

1 江南大学生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室 糖化学与生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 河南天冠企业集团有限公司 车用生物燃料技术国家重点实验室, 河南 南阳 473000

3 华南理工大学制浆造纸工程国家重点实验室, 广东 广州 510640

王亮, 刘建权, 张喆, 等. 常压甘油自催化预处理麦草浓醪发酵纤维素乙醇. 生物工程学报, 2015, 31(10): 1468-1483.

Wang L, Liu JQ, Zhang Z, et al. High titer ethanol production from an atmospheric glycerol autocatalytic organosolv pretreated wheat straw. Chin J Biotech, 2015, 31(10): 1468-1483.

**摘要:** 目前纤维素乙醇成本偏高的根本原因在于没有达到淀粉质乙醇发酵水平的“三高”(高浓度、高转化率和高效率)指标, 提高水解糖液浓度和避免发酵抑制物来实现浓醪发酵, 是解决问题的关键。文中以常压甘油自催化预处理麦草为底物, 尝试采用不同发酵策略, 探讨其浓醪发酵产纤维素乙醇的可行性。在优化培养条件(15%底物浓度, 加酶量 30 FPU/g 干底物, 温度 37 °C, 接种量 10%) 下同步糖化发酵 72 h, 纤维素乙醇产量为 31.2 g/L, 转化率为 73%, 发酵效率 0.43 g/(L·h); 采用半同步(预酶解 24 h)糖化发酵 72 h, 纤维素乙醇浓度达到 33.7 g/L, 转化率为 79%, 发酵效率为 0.47 g/(L·h), 其中(半)同步糖化发酵中 90%以上纤维素已被糖化水解用于发酵; 采用分批补料式半同步糖化发酵, 补料到基质浓度相当于 30%, 发酵 72 h 时纤维素乙醇产量达到 51.2 g/L, 转化率为 62%, 发酵效率为 0.71 g/(L·h)。在所有浓醪发酵中乙酸不足 3 g/L, 无糠醛和羟甲基糠醛等发酵抑制物。以上结果表明, 常压甘油自催化预处理木质纤维素基质适用于纤维素乙醇发酵; 分批补料式半同步糖化发酵策略可用于进行浓醪纤维素乙醇发酵; 未来工作中提高基质纯度和强化酶解产糖是浓醪纤维素乙醇达到“三高”指标的关键。

**关键词:** 常压甘油自催化预处理, 木质纤维质原料, 同步糖化发酵, 乙醇, 分批补料

**Received:** January 20, 2015; **Accepted:** March 18, 2015

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (Nos. 21176106, 31200023), Open Projects of State Key Laboratory of Motor Vehicle Biofuel Technology (No. KFKT2013010), State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering (No. 201231).

**Corresponding author:** Fubao Sun. Tel/Fax: +86-510-85327026; E-mail: fubaosun@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 21176106, 31200023), 车用生物燃料技术国家重点实验开放课题 (No. KFKT2013010), 制浆造纸工程国家重点实验室开放课题 (No. 201231) 资助。

# High titer ethanol production from an atmospheric glycerol autocatalytic organosolv pretreated wheat straw

Liang Wang<sup>1</sup>, Jianquan Liu<sup>1</sup>, Zhe Zhang<sup>2</sup>, Feiyang Zhang<sup>2</sup>, Junli Ren<sup>3</sup>, Fubao Sun<sup>1</sup>, Zhenyu Zhang<sup>1</sup>, Cancan Ding<sup>1</sup>, and Qiaowen Lin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Key Laboratory of Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

<sup>2</sup> State Key Laboratory of Motor Vehicle Biofuel Technology, Henan Tianguan Group Co., Ltd, Nanyang 473000, Henan, China

<sup>3</sup> State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510640, Guangdong, China

**Abstract:** The expensive production of bioethanol is because it has not yet reached the ‘THREE-HIGH’ (High-titer, high-conversion and high-productivity) technical levels of starchy ethanol production. To cope with it, it is necessary to implement a high-gravity mash bioethanol production (HMBP), in which sugar hydrolysates are thick and fermentation-inhibitive compounds are negligible. In this work, HMBP from an atmospheric glycerol autocatalytic organosolv pretreated wheat straw was carried out with different fermentation strategies. Under an optimized condition (15% substrate concentration, 10 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 30 FPU/g dry matter, 10% (V/V) inoculum ratio), HMBP was at 31.2 g/L with a shaking simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at 37 °C for 72 h, and achieved with a conversion of 73% and a productivity of 0.43 g/(L·h). Further by a semi-SFF with pre-hydrolysis time of 24 h, HMBP reached 33.7 g/L, the conversion and productivity of which was 79% and 0.47 g/(L·h), respectively. During the SSF and semi-SSF, more than 90% of the cellulose in both substrates were hydrolyzed into fermentable sugars. Finally, a fed-batch semi-SFF was developed with an initial substrate concentration of 15%, in which dried substrate (= the weight of the initial substrate) was divided into three portions and added into the conical flask once each 8 h during the first 24 h. HMBP achieved at 51.2 g/L for 72 h with a high productivity of 0.71 g/(L·h) while a low cellulose conversion of 62%. Interestingly, the fermentation inhibitive compound was mainly acetic acid, less than 3.0 g/L, and there were no other inhibitors detected, commonly furfural and hydroxymethyl furfural existing in the slurry. The data indicate that the lignocellulosic substrate subjected to the atmospheric glycerol autocatalytic organosolv pretreatment is very applicable for HMBP. The fed-batch semi-SFF is effective and desirable to realize an HMBP.

**Keywords:** atmospheric glycerol autocatalytic organosolv pretreatment, lignocellulosic substrate, simultaneous saccharification and fermentation, bioethanol, fed-batch

随着当今资源能源危机、温室效应和环境  
污染等问题日益突出，利用丰富的木质纤维素  
生物质可再生资源，生物炼制可全方位替代石  
化生产的生物液体燃料和生物基化学品，是当  
前世界生物能源产业的主流<sup>[1-2]</sup>。在众多生物基  
产品中以纤维素燃料乙醇作为典型代表，其常  
见的技术路线包括原料的预处理、酶水解、乙

醇发酵和分离提纯等步骤，尽管纤维素乙醇的  
生产工艺已经打通，而且国内外已建立了 10 多  
套试装置或示范生产线，但过高的生产成本严  
重阻碍了纤维素乙醇的商业化步伐<sup>[3-5]</sup>。其根本  
的技术原因在于没有达到淀粉质乙醇发酵常见  
的“三高”（高浓度、高转化率和高效率）指标，  
具体表现在<sup>[5-8]</sup>：1) 目前绝大多数预处理后的纤

维质原料仍含有大量杂质(木质素、灰分和半纤维素等),导致基质纤维素纯度普遍偏低;2)在原料水解糖化方面,纤维素酶比活力有限,产物抑制较敏感,导致难以高基质浓度( $<100\text{ g/L}$ )液化,存在水解糖液浓度普遍偏低的现象<sup>[9]</sup>;3)由于糖液浓度偏低和发酵抑制物问题,常见乙醇浓度均在 $40\text{ g/L}$ 以下,进一步提高乙醇产量甚为困难<sup>[10-11]</sup>。

针对上述存在的问题,国内外研究者围绕纤维素乙醇浓醪发酵开展了一系列的研究工作。Fan等<sup>[12]</sup>通过反复分批补料发酵策略发酵,使得终产物乙醇浓度可达 $50\text{ g/L}$ 以上,发酵效率为 $1.11\text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ ,乙醇浓度及发酵效率均高于经济蒸馏的基本指标(分别为 $40\text{ g/L}$ 和 $1\text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ ),除酶解产糖另外进行外,发酵时间长达 $120\text{ h}$ 。Zhang等<sup>[13]</sup>运用酸碱耦合预处理玉米芯作发酵基质,在初始底物浓度 $19\%$ (酶载量 $30\text{ FPU/g}$ 葡聚糖)时通过分批同步糖化发酵 $96\text{ h}$ ,乙醇浓度接近 $70\text{ g/L}$ ,进一步通过分批补料至基质浓度 $25\%$ ,发酵 $96\text{ h}$ 后乙醇浓度为 $84.7\text{ g/L}$ ,发酵效率为 $0.88\text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ ,该方法采用酸碱耦合预处理的方法提高了处理后基质的纤维素纯度进而提高终产物乙醇浓度,但是存在着酸碱预处理污染环境的缺点。鉴于浓醪糖化发酵时物料粘度和传质传热困难等问题,一些研究者尝试通过增强机械搅拌来强化传质传热,在取得明显进展的同时能耗也明显增加。Zhang等<sup>[14]</sup>利用新型设计的螺带浆生物反应器在 $30\%$ 基质浓度时发酵汽爆玉米秸秆,发酵 $96\text{ h}$ 后乙醇浓度接近 $70\text{ g/L}$ ,发酵效率为 $0.73\text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ ;Jørgensen等<sup>[15]</sup>设计了一种自由落体混合式卧式反应器,发酵 $35\%$ (W/W)基质浓度 $144\text{ h}$ 可获得约 $5\%$ (W/W)乙醇,发酵效率为 $0.35\text{ g/(L}\cdot\text{h)}$ ;紧接着 Cannella

等<sup>[16]</sup>还利用该卧式发酵反应器开展了软木高浓发酵纤维素乙醇的研究, $30\%$ 干基质浓度发酵 $120\text{ h}$ 时乙醇浓度可达 $50\text{ g/kg}$ ,创造了杉木纤维素乙醇发酵的历史性新高。总之,目前国内外研究工作在基质浓度、纤维素纯度、传质传热和发酵抑制物等纤维素乙醇浓醪发酵各个方面均取得了明显进展,发酵基质浓度可达 $30\%$ ,乙醇浓度可达 $50\text{--}60\text{ g/L}$ 以上。但综合指标还不理想,比如机械搅拌能耗加大、发酵时间明显延长和基质纤维素纯度提高后损失较高等,有待开展更进一步的研究工作。

基于此,本文尝试开展常压甘油自催化预处理木质纤维素浓醪发酵纤维素乙醇的研究工作。在前期工作中,课题组相关人员建立了一种常压甘油自催化预处理木质纤维素原料方法,该方法使用生物柴油生产副产物低值甘油作为蒸煮剂,在避免低沸点有机溶剂预处理时常见的高压操作、易燃易爆和有毒易泄露等风险外,有助于同时推进生物柴油和生物乙醇的商业化<sup>[17-18]</sup>,所以该方法一经报道即引起国际上 $10$ 多个课题组的研究兴趣,他们相继开展了该方法适用于不同木质纤维素原料的研究。该方法作为一种高沸点有机溶剂,具有简单经济、安全高效和环境友好的优点,在保留原料中 $90\%$ 纤维素含量的同时溶解脱出 $70\%$ 以上半纤维素和 $65\%$ 以上木质素;预处理后基质纤维素含量可达 $60\%$ 以上,湿基水解 $48\text{ h}$ 酶解率可达 $90\%$ 以上,基质可酶解性较好<sup>[18-19]</sup>。本文以常压甘油自催化预处理麦草为底物,在优化发酵培养基和糖化发酵条件基础上,通过采用同步糖化发酵、半同步糖化发酵和分批补料式半同步糖化发酵等探讨常压甘油自催化预处理麦草浓醪发酵纤维素乙醇的可行性,并对发酵特征进

行了跟踪分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与仪器

风干麦草, 取自于河南省南阳市, 用自来水清洗干净, 然后沥除水分, 在 105 °C 下烘干; 工业甘油 (质量分数 95%) 购自江苏扬州飞扬化工有限公司; 纤维素酶 GC-220 购自无锡杰能科公司, 酶活力为 77.85 FPU/mL; 高效液相色谱仪购自日本 HITACHI 公司。

### 1.2 常压甘油自催化预处理

麦草经常压甘油自催化预处理, 即获得预处理木质纤维素基质。准确称取 10 g 干麦草, 放入带有振荡桨的 500 mL 三孔烧瓶内, 然后加入 200 g 浓度为 70% 的甘油水溶液, 220 °C 保温蒸煮 3 h, 蒸煮结束后冷却约 15 min, 加入 150 g 沸水, 快速振荡使纤维充分解离, 趁热用 G1 砂芯漏斗过滤, 用 500 g、50% 甘油溶液洗涤 2 次, 用 400 g 沸水洗涤 2 次即获得常压甘油自催化预处理麦草纤维<sup>[18]</sup>。

### 1.3 菌种与培养条件

安琪耐高温型酿酒高活性干酵母购自湖北安琪酵母股份有限公司。

2% 蔗糖溶液: 称取 10 g 蔗糖用蒸馏水定容至 500 mL, 121 °C 灭菌 20 min 后置于 4 °C 保存待用。

活化培养基 (g/L): 葡萄糖 10, 胰蛋白胍 10, 酵母膏 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3,  $\text{MgSO}_4 \cdot 2$ , 琼脂粉 15, pH 自然, 115 °C 灭菌 20 min。

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 50, 胰蛋白胍 5, 酵母膏 5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,  $\text{MgSO}_4 \cdot 0.3$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2, pH 自然, 115 °C 灭菌 20 min。

菌种复水活化: 干酵母在使用前需复水活化制成酵母乳液, 以便恢复酵母细胞的正常功能。采用 2% 的预先灭菌 (以防感染杂菌) 的蔗糖溶液对干酵母进行复水活化, 在 38 °C 下活化 15 min, 然后在 32 °C 下活化 1.5 h 后接种在平板培养基上, 放置于 37 °C 培养箱培养 2-3 d, 待斜面上长出白色菌苔, 即培养成熟。挑取菌苔划线为单菌落即可保存使用。

酵母在斜面培养基上于 37 °C 培养 48 h, 挑取一环活化的酿酒酵母接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 在恒温振荡培养箱中 37 °C、120 r/min 培养 12 h。

### 1.4 同步糖化发酵

同步糖化发酵在内装 50 mL 发酵液的 250 mL 三角瓶中进行, 准确称取相当于 7.5 g 干重的常压甘油自催化预处理麦草湿基, 加入一定量的氮源, 初始 pH 4.8, 瓶口处塞有带玻璃弯管的橡胶塞, 弯管处装有一定量的无菌水以控制厌氧条件。发酵在恒温振荡培养箱中进行, 振荡速度为 120 r/min, 定时取样, 离心分离, 经适当稀释后测定乙醇、葡萄糖、木糖以及抑制物乙酸、糠醛、5-羟甲基糠醛的含量。

### 1.5 分析测定方法

麦草原料、经常压甘油自催化预处理后物料以及发酵后物料三大组分的测定采用美国能源实验室的 NREL 法测定<sup>[20]</sup>; 滤纸酶活力 (FPA) 按照国际理论和应用化学协会 (IUPAC) 推荐的国际标准法测定<sup>[21]</sup>; 葡萄糖、木糖、乙醇、乙酸、糠醛以及 5-羟甲基糠醛的浓度采用高效液相 (HPLC) 法检测, 流动相为 5 mmol/L 硫酸, 流速为 0.6 mL/min, 柱温 60 °C, 示差检测器。葡萄糖的保留时间大约为 9.3 min, 木糖的

保留时间大约为 9.9 min, 乙醇的保留时间大约为 21.7 min, 乙酸的保留时间大约为 15.1 min, 糠醛的保留时间大约为 44.1 min, 5-羟甲基糠醛的保留时间大约为 29.6 min。纤维素-乙醇转化率按式 (1) 计算。

纤维素-乙醇转化率=实际乙醇产量/理论乙醇产量 $\times 100\%$ ;

$$\text{理论乙醇产量 (g/L)} = \text{原料质量} \times \text{纤维素含量} \times 56.79\% / 0.05; \quad (1)$$

式中, 56.79% 为纤维素到乙醇理论转化率; 0.05 为发酵液体积。

## 2 结果与分析

业内普遍认为纤维素乙醇浓度只有高于 40 g/L 以上时才适于考虑商业化, 高于此浓度时酒精蒸馏才比较经济, 达到该乙醇浓度时糖液浓度至少 80 g/L 以上, 而基质浓度要求在 10%–15%<sup>[22-23]</sup>。当纤维素乙醇浓度更高时, 纤维基质水解的基质和糖液浓度均较高, 物料明显粘稠和流动性差, 会发生糖产物和酶解抑制物的明显抑制现象<sup>[24]</sup>。为此, 许多研究者把同步糖化发酵作为解决该问题的常用技术策略<sup>[25]</sup>。该策略通过把水解和发酵结合在一起, 酶解过程产生的葡萄糖迅速被微生物利用, 因此解除了酶解产生的糖的反馈抑制, 提高了酶解效率; 同时, 减少了反应容器数量, 缩短了生产工艺, 降低了投资成本; 此外, 缩短了反应时间, 降低了能耗和染菌机会, 所以最终降低了运行成本。而且许多研究结果也证明了同步糖化发酵明显比分批发酵的乙醇产量高。因此, 本文直接采用同步糖化发酵来探讨常压甘油自催化预处理基质浓醪发酵纤维素乙醇的可行性, 并进一步对之改进, 探讨它的半同步糖化发酵以及分批补料

式-半同步糖化发酵等等, 以期进一步提高纤维素乙醇发酵浓度。

### 2.1 同步糖化发酵培养基的优化

在微生物发酵方面, 培养基营养组成 (氮源种类和添加量, 以及碳源添加量等)、接种 (方式和接种量等)、培养条件 (温度、pH 和溶氧等) 和发酵时间等是早期进行微生物所需要考虑的基本参数<sup>[26-27]</sup>。为此, 下面首先从培养基方面考察了基质浓度、氮源种类和浓度以及纤维素酶载量等对常压甘油自催化预处理麦草发酵乙醇的影响。

#### 2.1.1 不同氮源对同步糖化发酵的影响

在 15% 基质浓度中按酶载量 25 FPU/g 干底物加入纤维素酶后, 37 °C 发酵 72 h 来考察不同氮源在相同添加量 (g/L) 时对纤维质同步糖化发酵纤维素乙醇的影响, 结果如图 1 所示。未添加氮源时基质发酵 72 h 时乙醇产量为 27.6 g/L, 添加相同质量的各种氮源后均能提高乙醇

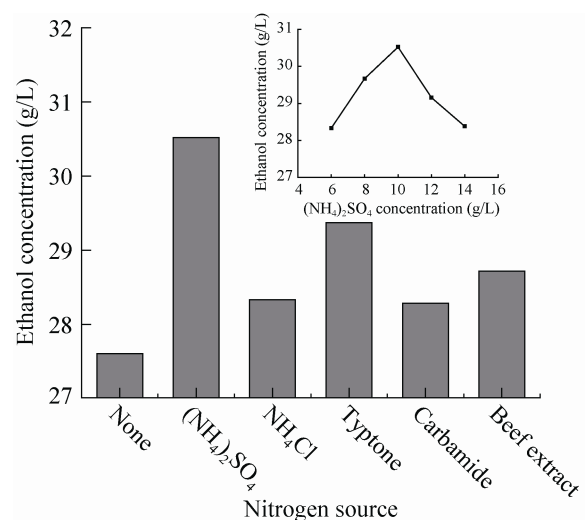


图 1 氮源种类及浓度对同步糖化发酵产乙醇的影响  
Fig. 1 Effect of the nitrogen source on the ethanol production with SSF.

产量,其中无机氮源  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  提高乙醇产量更加明显,乙醇产量达到 30.5 g/L。因此,在下一步实验中选择  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  作为常压甘油自催化预处理基质浓醪发酵乙醇的氮源。本实验接着对  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  添加量进一步优化,从图中可以看出,在  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  浓度较低时,随着添加量的增加,乙醇发酵浓度不断提高,在 10 g/L 时乙醇发酵产量达到最高水平 30.5 g/L,进一步提高添加量时乙醇浓度反而下降,这可能是由于当硫酸铵浓度大于 10 g/L 时菌体的生长开始受到抑制,产物乙醇的浓度也相应减少,所以硫酸铵的最佳浓度为 10 g/L。本实验结果显示有机氮源并不比无机氮源效果显著,尤其牛肉膏富含生长因子,但是在本实验中并没有导致最高的乙醇产量,这似乎表明麦草类天然木质纤维素物质中本身已富含酵母所需的生长因子,额外再添加是没必要的,该结果也与先前有些报道<sup>[12]</sup>一致。因此,在下面实验中选择  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  作为氮源,添加量为 10 g/L。

### 2.1.2 底物浓度对同步糖化发酵的影响

为了增强纤维基质发酵乙醇蒸馏的经济性,发酵时需要考虑尽可能提高培养基中基质浓度,但随着基质浓度过高溶液较粘稠,导致溶氧困难、传质传热不均以及发酵液中有毒有害物质严重积累等问题,将会最终影响发酵正常运行,因此寻找合适的底物浓度显得十分重要<sup>[13,24]</sup>。因而,本实验按接种量 10%和加酶量 25 FPU/g 干底物在糖化发酵温度 37 °C 条件下发酵 72 h,考察不同初始底物浓度对同步糖化发酵的影响。结果如图 2 所示,随着基质浓度增加,终产物乙醇产量显著增加,其中当基质浓度大于 15%时的乙醇产量尽管明显提高,但提高量有所减少;另一方面,随着基质浓度增加,

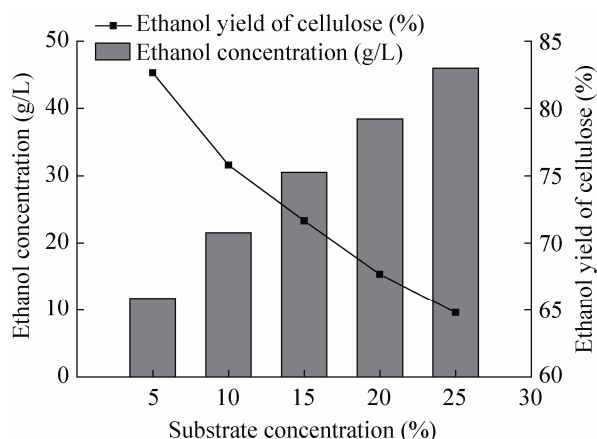


图 2 底物浓度对同步糖化发酵的影响

Fig. 2 Effect of the substrate concentration on ethanol production with the SSF.

纤维素乙醇转化率明显降低,其中在底物浓度为 15%时,乙醇浓度为 30.5 g/L,纤维素乙醇转化率由 82.7% (对应基质浓度 5%) 降低到 71.7%。当基质浓度大于 15%时,随着基质浓度的增加,尽管乙醇浓度明显增加,但增幅明显减小,而且纤维素乙醇转化率快速下降到 70% 以下。实验中还观察到初始基质浓度大于 15% 时,液化时间明显延长而不利于后面的分批补料实验。综合乙醇浓度、纤维素乙醇转化率以及液化时间,选择 15%为初始发酵底物浓度。

### 2.1.3 加酶量对同步糖化发酵的影响

纤维素酶用量是酶解糖化和发酵效率的决定性因素,同时纤维素酶用量也是影响生产成本的重要因素之一,因此本实验对同步糖化发酵过程中酶用量进行了初步选择<sup>[28]</sup>。在 15% 基质浓度和硫酸铵添加量 10 g/L 条件下,37 °C 发酵 72 h 时考察不同加酶量对同步糖化发酵的影响。起初酶载量较低时,随着酶载量增加,酵母发酵乙醇的产量明显提高,当纤维素酶用量达到 30 FPU/g 干基质时终产物乙醇产量浓度达到 31.2 g/L,此后继续增加纤维素酶用量,对乙

醇产量提高无显著影响。造成该现象的原因可能是由于在发酵基质中除了纤维素组分外,还存在少量的木质素组分,该组分会对纤维素酶产生不可逆吸附,同时纤维素酶在纤维素及木质素上的分配是一定的,当纤维素酶的添加量达到一定值时,暴露的纤维素表面已经被纤维素酶饱和,剩余的纤维素酶则被木质素无效吸附<sup>[29]</sup>。从同步糖化发酵生产乙醇的成本上来看,酶的成本占较大比例。所以在满足生产要求的前提下酶的用量越少越好。因此本实验中选择纤维素酶的最适用量为 30 FPU/g 干底物。

## 2.2 同步糖化发酵条件的优化

在发酵条件方面,同步糖化发酵过程受发酵时间、温度、接种量、振荡时间等诸多因素的影响<sup>[14,29-30]</sup>,优化上述条件可提高乙醇产量以及纤维素-乙醇转化率。于是在发酵条件方面,本文尝试从上述几个因素对常压甘油自催化预处理麦草同步糖化发酵产乙醇进行优化。

### 2.2.1 发酵时间的确定

既然发酵时间直接影响到同步糖化发酵乙醇的生产效率,因而本实验对常压甘油自催化预处理麦草浓醪发酵乙醇的同步糖化发酵时间进行选择。在 15% 基质浓度 (25 FPU/g 干底物) 和 37 °C 条件下考察不同发酵时间对同步糖化发酵的影响。随着发酵时间的增加乙醇浓度逐渐增加,到 72 h 时乙醇产量基本达到最高水平 30.5 g/L,进一步延长发酵时间,乙醇浓度没有明显提高甚至有所下降的趋势。这是因为发酵初期,酵母能快速地发酵醪中获得碳源,随着发酵时间的延长纤维素酶失活较快,从而致使发酵液中可发酵糖含量大幅下降,酵母菌株因养分不充足而可能利用发酵产物——乙醇来维持自身生长和繁殖,致使发酵液中乙醇含量降低<sup>[30]</sup>。因

此,实验中选择 72 h 为合适的发酵时间,此时乙醇浓度为 30.5 g/L,纤维素乙醇转化率为 71.7%。

### 2.2.2 温度对同步糖化发酵的影响

温度是影响微生物酶反应过程的一个重要因素,在纤维素乙醇同步糖化发酵过程中它不仅影响糖化时纤维素酶的酶解效率,而且还影响酵母生长代谢过程。既然纤维素酶的最适酶解温度为 45–50 °C,而酵母发酵乙醇的常见温度为 30–35 °C,所以本实验在 31–43 °C 温度范围内考察温度对同步糖化发酵产乙醇的影响。在 15% 浓度基质中按酶载量 25 FPU/g 干底物添加纤维素酶制剂,同时按 10% 接种量接入种子液发酵时间 72 h (图略)。当温度较低时,随着发酵温度升高,常压甘油自催化预处理麦草同步糖化发酵乙醇产量也增加,直到在 37 °C 时达到最高产量 30.5 g/L,随后发酵温度进一步增加,纤维素乙醇产量明显降低。因此,实验中选择 37 °C 作为最适发酵温度。

### 2.2.3 接种量对同步糖化发酵的影响

酵母接种量的大小对乙醇浓度及发酵周期影响较大。接种量太小,酵母生长缓慢,发酵周期长,同时酵母活力下降,不利于乙醇的生产;接种量过大带来成本的增加,同时接种过程会带入大量的代谢废物,不利于发酵过程<sup>[29]</sup>。选择适宜的接种量既能合理缩短发酵周期,又能提高乙醇浓度,因此探索了接种量对同步糖化发酵产乙醇的影响。在 15% 基质浓度中按 30 FPU/g 干基质加入纤维素酶制剂,于 37 °C 发酵时间 72 h 来考察不同接种量对同步糖化发酵的影响。当接种量低于 10% 时,随着接种量增加基质发酵乙醇产量逐步提升,在 10% 接种量时达到最高水平 31.2 g/L,其后进一步加大接种量乙醇产量反而下降。该研究表明:当接种量过低时,的确

由于菌浓增长缓慢, 发酵活力低, 乙醇产量偏低; 但接种量过高时菌浓增长过快, 酵母菌株消耗发酵液中过多糖分来维持自身的生长繁殖, 而且菌体过浓时产生过多的代谢产物容易使菌体衰老, 影响酵母活力, 最终影响了乙醇发酵产量<sup>[13]</sup>。因此, 适宜的接种量既能保证适当的缩短发酵周期又能得到较高的乙醇产量, 本实验中选择 10% 发酵醪液质量作为最适接种量。

#### 2.2.4 振荡时间对同步糖化发酵的影响

由于纤维质基质是水不溶性, 其酶解通常需要振荡来强化纤维素酶与底物的接触; 然而, 乙醇发酵属于厌氧发酵, 过分振荡对酿酒酵母发酵乙醇是不利的<sup>[29]</sup>。因此接下来考察振荡时间对同步糖化发酵产乙醇的影响。本实验在 15% 基质浓度培养基上, 按加酶量 30 FPU/g 干底物加入纤维素酶的同时接入 10% 种子液, 于 37 °C 发酵 72 h, 分别以不同振荡时间来考察振荡对同步糖化发酵的影响。结果如图 3 所示, 在整个同步发酵过程中, 振荡对纤维素乙醇发酵是有益的, 随着振荡时间的延长, 乙醇发酵产量也不断增加, 当发酵全程振荡时乙醇产量

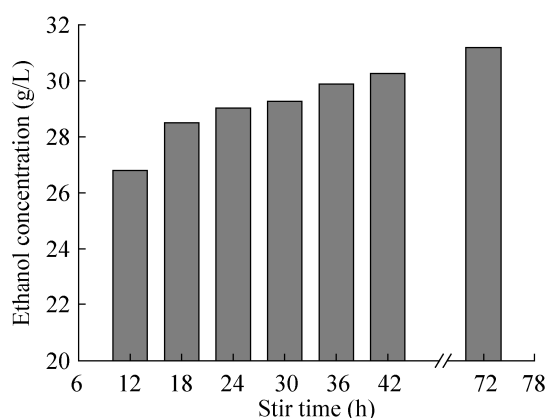


图 3 振荡时间对同步糖化发酵的影响

Fig. 3 Effect of the oscillating time on ethanol production with SSF.

达到最高水平, 接近 31.2 g/L, 与只振荡 12 h 相比, 乙醇产量提高了将近 20%。这可能是由于: 1) 在同步糖化发酵过程中, 发酵基质本身由于是水不溶性底物而需要振荡来强化酶与底物充分接触; 2) 发酵基质浓度较高 (15%), 较粘稠的物料体系中也需振荡来强化传质传热来促进酵母的生长代谢; 3) 本发酵实验中采用了发酵栓装置, 所以在振荡条件下也较好地保证了发酵过程的厌氧环境, 从而避免无需考虑振荡对酿酒酵母生长以及发酵的影响。因此, 在基质浓醪发酵乙醇过程中拟选择全程振荡。

前面对同步糖化发酵的培养基和培养条件初步优化显示: 在以 15% 浓度基质为碳源和 10 g/L 硫酸铵为氮源的培养基中, 按 30 FPU/g 干基质加入纤维素酶制剂, 同时按 10% 培养基质量接入种子液, 在 37 °C 全程振荡培养 72 h 时, 乙醇发酵浓度达到 31.2 g/L, 生产效率为 0.43 g/(L·h)。研究结果表明, 常压甘油自催化预处理木质纤维素原料能够用来发酵产纤维素乙醇, 利用该原料进行纤维素乙醇浓醪发酵是可行的。

#### 2.3 半同步糖化发酵

尽管前面采用同步糖化发酵开展的纤维素乙醇发酵实验工作, 表明了常压甘油自催化预处理木质纤维素基质浓醪发酵乙醇的可行性。然而, 乙醇浓度 (<32 g/L) 和发酵效率 (0.43 g/(L·h)) 均较低, 尚未达到纤维素乙醇商业化蒸馏时最低要求 (乙醇浓度 40 g/L, 发酵效率 1.0 g/(L·h))。鉴于纤维素酶解糖化 (45–50 °C) 和乙醇发酵 (30–35 °C) 温度的不一致性, 许多研究者开展了半同步糖化发酵的研究, 在发酵培养基中预先加入纤维素酶使其在最适酶解温度下水解一段时间, 然后再接入种子液进行发酵, 该策略有助于提高纤维素酶解效率, 缩短乙醇发酵周



期<sup>[23,31]</sup>。因此,本文接下来采用半同步糖化发酵方式继续探索常压甘油自催化预处理麦草浓醪发酵纤维素乙醇的可行性。

### 2.3.1 预酶解时间对发酵的影响

本实验在 15% 基质浓度培养基中按酶载量 30 FPU/g 干底物加入纤维素酶制剂后,在 50 °C 预先酶解 0–36 h,然后接入 10% 种子液在 37 °C 发酵 72 h,以考察不同预酶解时间对半同步糖化发酵纤维素乙醇的影响(图略)。发酵基质预酶解明显提高了浓醪发酵乙醇产量,起始时随着预酶解的进行,浓醪发酵乙醇产量逐步增加,在预酶解 24 h 时,乙醇产量达到 33.7 g/L,此后进一步延长预酶解时间,发酵乙醇浓度无明显增加。这可能是由于:预酶解少于 24 h 时,基质尽管预先进行了水解糖化,但预备糖和后续发酵时水解产糖的比例不是最适的,在酵母细胞生长代谢的某个时段可能存在碳源不充分状态,最终影响了乙醇发酵产量;预酶解 24 h 时产糖是最适的,基本保证了酵母菌株生长代谢碳源充分供应,所以再延长预酶解时间对后续糖化发酵影响不大。因此,后续实验中选择 24 h 为半同步糖化发酵的最适预酶解时间。

### 2.3.2 纤维素乙醇的半同步糖化发酵

以常压甘油自催化预处理麦草为基质,探讨其 24 h 预酶解的半同步糖化发酵运行状况。在以 15% 基质浓度作碳源的培养基中,按酶载量 30 FPU/g 干底物添加纤维素酶制剂后于 50 °C 振荡 (120 r/min) 酶解 24 h,然后降温至 37 °C,按 10% 接入种子液,全程振荡发酵 72 h,结果如图 4 所示。发酵开始时,刚接入酵母种子活力旺盛,在 24 h 葡萄糖被迅速消耗至 1 g/L 以下,酵母发酵产乙醇量也迅速增加;此后尽管基质还在酶解产糖,但碳源明显不足,可能

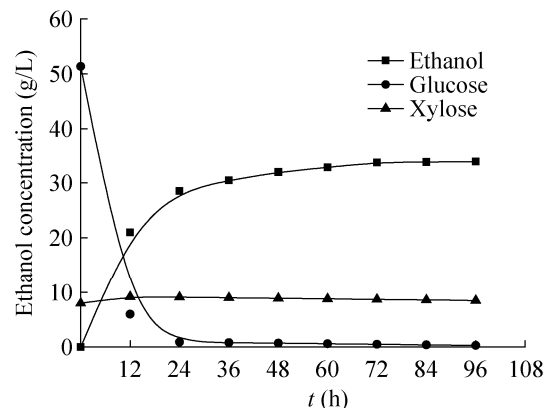


图 4 优化条件下半同步糖化发酵过程

Fig. 4 Characterization of the semi-SSF under an optimized condition.

导致了酵母菌株生长代谢缓慢,尽管乙醇产量还在提高,但增长放缓,直至 72 h 时菌株发酵产乙醇浓度为 33.7 g/L,发酵效率为 0.47 g/(L·h);由于发酵基质中含有少量半纤维素,在半同步糖化发酵过程中逐步被纤维素酶制剂中相应酶水解,但酿酒酵母菌株不能利用该水解糖,所以木糖在发酵液中逐步累积至 8.0 g/L 以上。从整个半同步糖化发酵过程可以看出,发酵 24 h 后葡萄糖不足影响了纤维素乙醇产量,导致发酵效率偏低。未来工作中有必要考虑通过增加基质浓度和强化水解产糖等措施来促进纤维素乙醇发酵的高产。

为了进一步了解半同步糖化发酵运行特征,本实验接着考察了发酵基质在整个纤维素乙醇生产工艺的组分变化情况。结果见表 1,麦草原料经常压甘油自催化预处理后,主要组分明显发生了改变,在较好地保留纤维素 (90.3%) 同时脱出了大量的半纤维素 (65%) 和木质素 (60%),使预处理后基质中纤维素纯度达到 50%。以预处理基质作碳源,经半同步糖化发酵后剩余基质量为投入基质 25%,该基质中 91.1%

表 1 常压甘油自催化预处理前后及半同步糖化发酵后物料中三大组分变化

Table 1 Characterization on the main composition of substrates in the process of AAGAOP and semi-SSF

Substrates	Content (%)			
	Pretreatment yield	Cellulose	Hemicelluloses	Lignin
The original	100.0	35.9	27.1	22.0
The pretreated	64.8	50.0	14.5	13.9
The spent	16.1	17.9	7.4	52.1

纤维素和 87.3%半纤维素已被水解糖化,而木质素基本上没什么变化,这与上面的半同步糖化发酵产乙醇特征是一致的:在 24 h 预酶解的半同步糖化发酵中,纤维素几乎全部水解产糖(> 90%);水解的葡萄糖被酵母菌株用于生长代谢和乙醇发酵,纤维素乙醇转化率达到理论值 87%;半纤维素也发生了显著水解,水解产生的木糖不能被酵母菌株利用,所以遗留在发酵醪液中高达 8.0 g/L 以上。该数据也印证了前面对半同步糖化发酵结果的推测,目前的半同步糖化发酵中发酵基质浓度低(纤维素纯度低)导致水解产糖量少,是限制乙醇发酵产量的直接原因。另外,发酵基质中含有高达 15%半纤维素,水解产生高达 8.0 g/L 以上木糖,未来考虑这部分 C<sub>5</sub>糖利用是值得关注的方向。

## 2.4 分批补料-半同步糖化发酵

上面采用半同步糖化发酵对常压甘油自催化预处理基质发酵乙醇的研究表明,该策略对纤维素乙醇发酵浓度提高具有一定的积极作用,但提高仍很有限(< 10%)。通过分析乙醇发酵前后基质中主要组分变化显示,已有 90%以上纤维素发生水解,纤维素乙醇转化率已接近理论值的 90%。表明在半同步糖化发酵中,基

质中纤维素已几乎全部被水解转化,若想进一步提高乙醇浓度,必须提高纤维素浓度,即提高基质中纤维素纯度或直接提高发酵基质浓度。因此,在接下来实验中,探讨通过增加基质浓度来提高纤维素乙醇的发酵水平。前面的实验(图 2)表明,若在发酵起始直接增加底物浓度,发酵物料会变得粘稠,普通机械振荡很难达到有效的传质传热,不但会延长同步糖化时间,甚至会因酶解产糖受限而导致菌体饥饿死亡的现象<sup>[27,32]</sup>。所以本实验在半同步发酵中采用分批补料方式来增加基质浓度以提高乙醇发酵浓度的可行性。

### 2.4.1 分批补料方式的选择

以常压甘油自催化预处理麦草为基质,通过分批补料式半同步糖化发酵来探讨浓醪纤维素乙醇发酵,以提高其产量的可行性。在以 15%基质浓度作初始碳源的培养基中,按酶载量 30 FPU/g 干底物添加纤维素酶制剂后于 50 °C 振荡(120 r/min)酶解 24 h,然后降温至 37 °C,按 10%接入种子液,全程振荡发酵 96 h,其中补料在发酵 24 h 内完成,每次补加 1/3 初始基质干重及相应酶载量,使得物料总量分别为 20%、25%、30%和 35%,结果如表 2 所示。在补料初始时,随着补料量增加,乙醇产量不断提高,在 24 h 内补加 1 倍干重物料使基质浓度相当于 30%时发酵 96 h 后,乙醇产量达到 52.8 g/L,补料 4/3 初始基质干重使基质浓度相当于 35%时直至 96 h,发酵基质不能完全液化。另一方面,尽管随着分批补料启动,纤维素乙醇转化率明显降低,由未补料时的 80%迅速下降至补料到底物浓度为 30%时的 62%。尽管纤维素乙醇转化率降低,但考虑到纤维素产量在明显上升,因此仍考虑选取 24 h 内补加 1 倍干重物料使基质浓度相当于

30%的分批补料-半同步糖化发酵方式。

#### 2.4.2 间隔补料时间的确定

在上面选取 24 h 内补加 1 倍初始干重物料使基质浓度相当于 30%的分批补料-半同步糖化发酵方式基础上,进一步考察间隔补料时间对终产物乙醇浓度的影响。分别考察了时间间隔 2、4、6、8、12 h 下的发酵效果,每次操作时按间隔时间和所需要补料次数,把待补料平均分配,补料方式和结果如表 3 所示,在间隔补料时间短于 8 h 时,随着间隔时间缩短,补料次数频繁,基质发酵乙醇的产量和转化率有逐步降低趋势,分析原因可能是由于人工补料次数增加,致使发酵正常运行中断(温度波动,振荡停止),反而不利于纤维素乙醇发酵;当补料间隔大于 8 h 时,间隔时间延长,补料次数减少,但批次基质加量过大导致基质浓度过高,水解糖化较慢,最终影响了发酵乙醇的产量和转化率。因此,在今后的分批补料式半同步糖化发酵中,选择每 8 h 补料一次,每次补料量为 1/3

初始基质干重使发酵基质浓度相当于 30%的补料方式。

#### 2.4.3 纤维素乙醇的分批补料-半同步糖化发酵运行特征

以常压甘油自催化预处理麦草为底物,通过分批补料-半同步糖化发酵方式开展纤维素乙醇浓醪发酵的实验工作。初始基质浓度 15%,按酶载量 30 FPU/g 干底物加入纤维素酶制剂 50 °C 预酶解 24 h 后降温至温度 37 °C 接入 10% 种子液后进行全程振荡发酵,在发酵 24 h 内每隔 8 h 补加 1/3 初始基质干重的干物料及相应酶载量,使基质浓度相当于 30%,运行 96 h 的结果如图 5 所示。经 24 h 预酶解,发酵启动时醪液中葡萄糖浓度为 51.4 g/L,为酵母菌发酵提供了良好的碳源;发酵启动后 24 h 内,葡萄糖被迅速消耗,尽管进行了 3 次补料,发酵同步的糖化酶解产生葡萄糖也难以满足菌株生长代谢需要,24 h 左右葡萄糖浓度下降到 2 g/L 以下,36 h 后发酵醪液中葡萄糖消耗到 1 g/L 以下;在木糖生成方

表 2 分批补料方式对乙醇发酵的影响

Table 2 Effect of the fed-batch mode on the ethanol production with semi-SSF

Number	DM (%)	Interval time (h)	Feed-batch	Ethanol concentration (g/L)	Conversion of cellulose-to-ethanol (%)
1	15	---	---	33.7	80.0
2	15+5	24	1	41.0	72.3
3	15+10	12	2	47.3	66.6
4	15+15	8	3	52.8	62.0
5	15+20	6	4	Not liquefied completely	

表 3 补料间隔时间对分批补料式半同步糖化发酵的影响

Table 3 Effect of the interval fed-batch time on semi-SSF

Number	Interval time (h)	Feed batch	Substrate (%)	Ethanol titer (g/L)	Conversion of cellulose-to-ethanol (%)
1	2	12	15+15	50.4	59.1
2	4	6	15+15	51.7	60.6
3	6	4	15+15	52.2	61.3
4	8	3	15+15	52.8	62.0
5	12	2	15+15	51.6	60.5

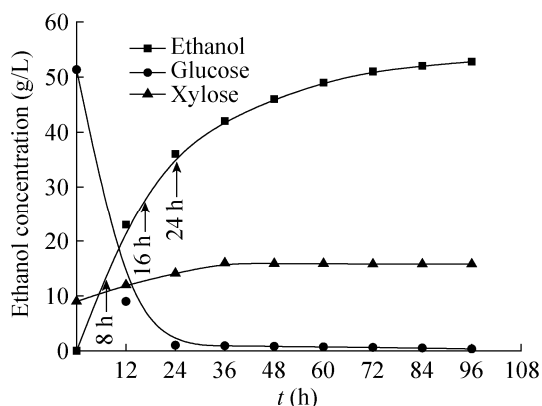


图5 分批补料-半同步糖化发酵分析

Fig. 5 Fed-batch semi-SSF under the optimized condition.

面, 24 h 预酶解后醪液中木糖含量达到 8.9 g/L, 由于酵母菌株不能利用木糖作碳源, 加之分批补料强化酶解产糖的作用, 醪液中木糖浓度逐步积累提升直至 36 h 左右时达到 15.8 g/L, 如此高的木糖含量存在于发酵醪液中是今后值得关注和研究的一个方向; 在乙醇产量方面, 随着发酵启动, 乙醇产量迅速增加, 发酵 24 h 时乙醇产量已达 35.7 g/L, 此后尽管乙醇浓度提高速度稍有放缓, 但菌株发酵产乙醇水平增加仍然很快, 在 72 h 时乙醇产量达到 51.2 g/L, 72 h 后由于葡萄糖的匮乏, 产乙醇后劲不足, 直到发酵 96 h 时, 乙醇浓度稍有增加, 达到 52.8 g/L。该结果表明, 常压甘油自催化预处理木质纤维素基质适用于纤维素乙醇的浓醪发酵。

在分批补料-半同步糖化发酵中, 纤维素乙醇转化率为 62.0%, 96 h 发酵效率为 0.55 g/(L·h), 72 h 发酵效率为 0.71 g/(L·h)。相比较前面的同步糖化发酵和半同步糖化发酵, 乙醇产量 (72 h) 提高了 50%–60% 以上, 发酵效率提高了 65% 以上。这些数据表明: 分批补料式的半同步糖化发酵方式是非常有效的。相似的发酵方式也曾被其他研究者所采用, Zhang 等<sup>[13]</sup>运用酸碱耦

合预处理玉米芯作发酵基质, 在初始底物浓度 19% (酶载量 30 FPU/g 葡聚糖) 时通过分批同步糖化发酵 96 h, 乙醇浓度接近 70 g/L, 进一步通过分批补料至基质浓度 25%, 发酵 96 h 后乙醇浓度为 84.7 g/L; Park 等<sup>[33]</sup>运用碱处理的棕榈果串纤维, 在初始底物浓度 10% (酶载量 15 FPU/g 干基质) 的基础上, 通过分批补料至 30%, 发酵 95 h 后乙醇浓度为 62.5 g/L; 辛崇博等<sup>[29]</sup>运用酸碱耦合预处理玉米芯作发酵基质, 在初始底物浓度 20% (酶载量 35 FPU/g 干基质) 的基础上, 通过分批补料至 30%, 发酵 96 h 后乙醇浓度为 65.56 g/L; Chang 等<sup>[34]</sup>运用碱预处理麦草作发酵基质, 在初始底物浓度 16% 的基础上, 通过分批补料至 22%, 发酵 72 h 后乙醇浓度为 41.5 g/L。这些研究也都显示分批补料策略是非常适用于木质纤维素基质的浓醪发酵, 该发酵方式将在纤维素乙醇商业化中呈现出独特优势。另一方面, 相比前面的同步糖化发酵和半同步糖化发酵, 目前分批补料式半同步糖化发酵的纤维素乙醇转化率偏低 (62%), 远低于前两者的数据 (90%)。因此未来工作中应采取相应措施强化酶解, 提高纤维素水解, 从而将有助于提高纤维素乙醇发酵水平和发酵效率。

## 2.5 各种发酵方式中发酵抑制物分析

许多文献显示, 在乙醇发酵过程中会存在乙酸、糠醛和羟甲基糠醛等代表性发酵抑制物, 这些糠醛和羟甲基糠醛类细胞毒性物质通常是在前期预处理过程中产生的, 而乙酸在前期预处理和后期发酵过程中均会产生, 这些物质的存在会明显影响酵母细胞的生长代谢, 对乙醇发酵有不利影响<sup>[35-36]</sup>。因此, 本文对前面各发酵方式中可能存在的这些发酵抑制物进行了分析。在以常压甘油自催化预处理麦草为基质的

同步糖化发酵和半同步糖化发酵 (15%基质浓度) 中, 均检测到乙酸的存在, 它们的含量差不多在 1.4 g/L 左右, 没有检测到糠醛和 5-羟甲基糠醛类抑制物; 在相当于 30%基质浓度的分批补料式-半同步糖化发酵中, 乙酸浓度为 2.9 g/L, 仍然没有检测到糠醛和 5-羟甲基糠醛类抑制物。这些结果表明, 以常压甘油自催化预处理木质纤维素原料作基质进行浓醪发酵纤维素乙醇时, 发酵醪液中不存在常见的糠醛和羟甲基糠醛类抑制物, 只有少量有机酸类抑制物存在。可能原因是: 常压甘油自催化预处理过程中产生了这些发酵抑制物, 但是由于本身含量不高, 在基质洗涤过滤时大部分已被洗涤脱除掉, 因此发酵液中糠醛和羟甲基糠醛类物质含量极少, 用目前的示差检测器未能检出, 后面工作中将会采用较为敏感的紫外检测器进行测定; 而乙酸尽管在基质洗涤很少, 但酵母发酵过程中也会代谢产生乙酸。因此, 未来工作中, 有必要通过双检测器来准确分析预处理液、抽滤液和发酵液中这些发酵抑制物含量, 以评估这些发酵抑制物的来去成因。木质纤维素基质发酵乙醇时, 可能由于预处理工艺和发酵前基质处理上的差异, 导致对乙醇发酵抑制情况存在不同报道。Silverstein 等<sup>[37]</sup>的研究结果表明, 稀酸 (1.25% (V/V) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 160 °C, 80 min) 预处理棉花秸秆进行进行纤维素乙醇发酵时糠醛浓度可高达 4.9 g/L, 明显影响了后续发酵; Jørgensen 等<sup>[38]</sup>报道了 AFEX 处理过程中会产生糠醛这类抑制物抑制后续的酶解以及发酵过程; Zhang 等<sup>[13]</sup>运用酸碱耦合预处理方法处理玉米芯高基质底物浓度发酵时发酵液中也没有检测到乙酸、糠醛和 5-HMF 这几种常见的抑制物; Wang 等<sup>[39]</sup>利用 SRORL 法处理硬木产生微不足道的

糠醛和 HMF 这 2 种抑制物不会影响后续的酶解以及发酵。尽管由于前期预处理和发酵过程中不可避免会产生有机酸、糠醛类抑制物, 但这些物质浓度若不高, 可能对酶解糖化和发酵并不会显著影响, 比如乙酸浓度 < 6 g/L 和糠醛类物质 < 1 g/L<sup>[40]</sup>。因此, 本研究中产生的乙酸浓度较低 (3.0 g/L), 几乎不会对浓醪发酵乙醇产生不利影响。

### 3 讨论

近年来国内外许多研究者对各种预处理基质的高浓酶解和乙醇浓醪发酵进行了广泛研究, 本文则首次报道了以高沸点有机溶剂甘油进行预处理的木质纤维素基质进行乙醇发酵。在对发酵培养基和发酵条件等优化选择基础上, 通过采用同步糖化发酵、半同步糖化发酵和分批补料式半同步糖化发酵等策略最终实现了常压甘油自催化预处理木质纤维素基质的浓醪发酵。目前基质浓度相当于 300 g/L, 尽管仍可提高基质浓度至 350–400 g/L, 但该基质浓度也已属于国际上较高浓度; 在此基质浓度下纤维素乙醇理论产量为 85 g/L, 但由于纤维素水解产糖较慢, 导致乙醇转化率较低 (62%) 和乙醇产量不高 (51–53 g/L)。下一步工作中, 通过改进补料方式 (比如延长补料完成时间至 36 h 或 48 h) 和强化酶解糖化 (如采用内置桨叶机械振荡、添加辅助酶 (木聚糖酶,  $\beta$ -葡萄糖苷酶、木二糖酶和 GH61)<sup>[14-16,41]</sup>和酶促因子 (表面活性剂/聚电解质等)<sup>[16,42-43]</sup>, 有希望使该发酵的纤维素乙醇转化率达到 80%以上, 纤维素乙醇达到 70 g/L。

在农作物秸秆通过常见预处理后进行纤维素乙醇发酵方面: 由于天然原料 (稻草、油菜秆、玉米秸、花生壳和麦草) 中纤维素含量本身偏低 (32%–37%), 各种常见的预处理 (汽爆、稀酸、

稀碱、热水、离子液和有机溶剂) 在保留纤维素 85%以上时, 预处理后基质中纤维素纯度均不高, 通常在 50%左右<sup>[44]</sup>; 若纤维素纯度要达到 60%甚至 70%以上时, 纤维素损失较多, 保留率会降至 80%以下<sup>[13]</sup>; 另一方面, 在纤维素乙醇发酵中若要纤维素乙醇含量在 50 g/L 以上, 浓醪发酵是关键, 基质浓度必须在 20%以上, 基质浓度按国际上最高水平 35%–40%计算, 则农作物秸秆纤维素乙醇发酵水平也不过 100 g/L。因此, 对于未来的农作物秸秆纤维素乙醇发酵工业, 努力提高基质纤维素纯度和发酵基质浓度是实现纤维素乙醇达到“三高”指标的关键。在基质浓度日益接近目前技术极限水平 (35%–40%) 时, 采用各种新型预处理在纤维素高保留率时提高纤维素纯度是未来值得关注的研究方向。

## 4 结论

本文以常用甘油自催化预处理麦草作为基质, 进行了纤维素乙醇浓醪发酵的探索。在对发酵培养基和发酵条件等优化选择基础上, 通过采用同步糖化发酵、半同步糖化发酵和分批补料式半同步糖化发酵等策略, 逐步实现了该基质的浓醪发酵。在同步糖化发酵条件 (15%基质浓度、加酶量 30 FPU/g 干底物、硫酸铵 10 g/L; 接种量 10%, 温度 37 °C 全程振荡发酵) 下发酵 72 h 时乙醇产量为 31.2 g/L, 发酵效率 0.43 g/(L·h); 改用半同步糖化发酵方式, 预酶解时间 24 h 时乙醇产量提高到 33.7 g/L, 纤维素乙醇转化率将近 80%, 发酵效率 0.47 g/(L·h); 进一步采用分批补料式半同步糖化发酵, 24 h 内每 8 h 补加 1/3 发酵初始基质干重的干料, 使基质浓度相当于 30%, 发酵 72 h 时乙醇产量达到 51.2 g/L, 纤维素乙醇转化率为 62%, 发酵效率为 0.71 g/(L·h),

该发酵抑制物很少, 无糠醛和 5-羟甲基糠醛类发酵抑制物, 乙酸含量不足 3 g/L。常压甘油自催化预处理木质纤维素原料适用作基质, 进行纤维素乙醇浓醪发酵, 采用高纤维素纯度的基质和新型补料方式来提高发酵液中纤维素浓度, 并强化其酶解糖化, 是未来实现纤维素乙醇浓醪发酵产业化的关键。

## REFERENCES

- [1] Ragauskas AJ, Williams CK, Davison BH, et al. The path forward for biofuels and biomaterials. *Science*, 2006, 311(5760): 484–489.
- [2] Yue GJ, Wu GQ, Lin X. Insights into engineering of cellulosic ethanol. *Chin J Biotech*, 2014, 30(6): 816–827 (in Chinese).  
岳国君, 武国庆, 林鑫. 纤维素乙醇工程化探讨. *生物工程学报*, 2014, 30(6): 816–827.
- [3] Galbe M, Sassner P, Wingren A, et al. Process engineering economics of bioethanol production. *Biofuels*, 2007, 108(6): 303–327.
- [4] Gray KA, Zhao L, Emptage M. Bioethanol. *Curr Opin Chem Biol*, 2006, 10(2): 141–146.
- [5] Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 2007, 315(5813): 804–807.
- [6] Hodge DB, Karim MN, Schell DJ, et al. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biores Technol*, 2008, 99(18): 8940–8948.
- [7] Hodge DB, Karim MN, Schell DJ, et al. Model-based fed-batch for high-solids enzymatic cellulose hydrolysis. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 152(1): 88–107.
- [8] Cazetta ML, Celligoi M, Buzato JB, et al. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. *Biores Technol*, 2007, 98(15): 2824–2828.
- [9] Song AD, Ren TB, Zhang LL, et al. Optimization

- of corn stover hydrolysis by fed-batch process. *Chin J Biotech*, 2011, 27(3): 393–397 (in Chinese).  
宋安东, 任天宝, 张玲玲, 等. 玉米秸秆分批补料获得高还原糖浓度酶解液的条件优化. *生物工程学报*, 2011, 27(3): 393–397.
- [10] Shen Y, Ge XM, Bai FW. Impact of fermentation system initial status on oscillations in very high gravity ethanol continuous fermentation process and analysis of fermentation efficiency improvement. *Chin J Biotech*, 2010, 26(5): 604–609 (in Chinese).  
申渝, 葛旭萌, 白凤武. 初始条件对高浓度乙醇连续发酵过程的影响及振荡行为提高发酵效率的机理分析. *生物工程学报*, 2010, 26(5): 604–609.
- [11] Xu HX, Duan G. Dry solid staging fermentation. *Chin J Biotech*, 2009, 25(2): 200–206 (in Chinese).  
许宏贤, 段钢. 固态间歇补料乙醇生料发酵新工艺. *生物工程学报*, 2009, 25(2): 200–206.
- [12] Fan C, Qi K, Xia XX, et al. Efficient ethanol production from corncob residues by repeated fermentation of an adapted yeast. *Biores Technol*, 2013, 136(5): 309–315.
- [13] Zhang M, Wang F, Su R, et al. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment. *Biores Technol*, 2010, 101(13): 4959–4964.
- [14] Zhang J, Chu D, 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.
- [15] Jørgensen H, Vibe-Pedersen J, Larsen J, et al. Liquefaction of lignocellulose at high-solids concentrations. *Biotechnol Bioeng*, 2007, 96(5): 862–870.
- [16] Cannella D, Jørgensen H. Do new cellulolytic enzyme preparations affect the industrial strategies for high solids lignocellulosic ethanol production? *Biotechnol Bioeng*, 2014, 111(1): 59–68.
- [17] Sun F, Chen H. Organosolv pretreatment by crude glycerol from oleochemicals industry for enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Biores Technol*, 2008, 99(13): 5474–5479.
- [18] Sun FB, Chen HZ. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment. *Biores Technol*, 2008, 99(14): 6156–6161.
- [19] Romani A, Ruiz HA, Pereira FB, et al. Fractionation of eucalyptus globulus wood by glycerol-water pretreatment: optimization and modeling. *Ind Eng Chem Res*, 2013, 52(40): 14342–14352.
- [20] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. NREL laboratory analytical procedure “determination of structural carbohydrates and lignin in biomass”. [EB/OL]. [2012-09-28]. [http://www.nrel.gov/biomass/analytical\\_procedures.html](http://www.nrel.gov/biomass/analytical_procedures.html). 42618.
- [21] Ghose T. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl Chem*, 1987, 59(2): 257–268.
- [22] Lau MW, Dale BE. Cellulosic ethanol production from AFEX-treated corn stover using *Saccharomyces cerevisiae* 424A (LNH-ST). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(5): 1368–1373.
- [23] Wingren A, Galbe M, Zacchi G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks. *Biotechnol Progr*, 2003, 19(4): 1109–1117.
- [24] Modenbach AA, Nokes SE. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings—review. *Biomass Bioenergy*, 2013, 56(9): 526–544.
- [25] Tian S, Li Y, Wang Z, et al. Evaluation of simultaneous saccharification and ethanol fermentation of undetoxified steam-exploded corn stover by *Saccharomyces cerevisiae* Y5. *Bioenergy Res*, 2013, 6(4): 1142–1146.
- [26] Liu ZH, Qin L, Zhu JQ, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-exploded corn stover at high glucan loading and high temperature. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7(1): 167–182.
- [27] Zhang J, Chu DQ, Yu ZC, et al. Process strategy for ethanol production from lignocellulose feedstock under extremely low water usage and high solids loading conditions. *Chin J Biotech*, 2010, 26(7): 950–959 (in Chinese).  
张建, 楚德强, 于占春, 等. 低水用量约束条件

- 下的高固体含量纤维乙醇生物加工技术策略. 生物工程学报, 2010, 26(7): 950–959.
- [28] Wyman CE. Ethanol from lignocellulosic biomass—technology, economics, and opportunities. *Biores Technol*, 1994, 50(1): 3–15.
- [29] Xin CB, Zi LH, Liu CG, et al. Response surface methodology application for optimizing corncobs pretreatment conditions during simultaneous saccharification and ethanol production. *J Agric Sci Technol*, 2013, 15(5): 173–180 (in Chinese).  
辛崇博, 孜力汗, 刘晨光, 等. 响应面法优化玉米芯同步糖化发酵预处理条件. 中国农业科技导报, 2013, 15(5): 173–180.
- [30] Liu HC, Qian TT, Wang YH, et al. Primary study on simultaneous saccharification and fermentation of high temperature tolerance yeast and straw powder. *Liquor-making Sci Technol*, 2008, 7(11): 25–28 (in Chinese).  
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, 2008, 7(11): 25–28.
- [31] Shen J, Agblevor FA. Modeling semi-simultaneous saccharification and fermentation of ethanol production from cellulose. *Biomass Bioenergy*, 2010, 34(8): 1098–1107.
- [32] Bayrock D, Ingledew WM. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2001, 27(2): 87–93.
- [33] Park JM, Oh BR, Seo JW, et al. Efficient production of ethanol from empty palm fruit bunch fibers by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2013, 170(8): 1807–1814.
- [34] Chang C, Xu GZ, Ma XJ. Optimization of process parameters for ethanol production from alkaline-pretreated wheat straw by fed-batch simultaneous saccharification and fermentation. *Adv Mater Res*, 2011, 236(5): 922–925.
- [35] Kim Y, Ximenes E, Mosier NS, et al. Soluble inhibitors/deactivators of cellulase enzymes from lignocellulosic biomass. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 48(4): 408–415.
- [36] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Biores Technol*, 2000, 74(1): 25–33.
- [37] Silverstein RA, Chen Y, Sharma-Shivappa RR, et al. A comparison of chemical pretreatment methods for improving saccharification of cotton stalks. *Biores Technol*, 2007, 98(16): 3000–3011.
- [38] Jørgensen H, Kristensen JB, Felby C. Enzymatic conversion of lignocellulose into fermentable sugars: challenges and opportunities. *Biofuels, Bioprod Biorefin*, 2007, 1(2): 119–134.
- [39] Wang G, Pan X, Zhu J, et al. Sulfite pretreatment to overcome recalcitrance of lignocellulose (SPORL) for robust enzymatic saccharification of hardwoods. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(4): 1086–1093.
- [40] Olofsson K, Bertilsson M, Lidén G. A short review on SSF—an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol Biofuels*, 2008, 1(7): 1–14.
- [41] Hu J, Arantes V, Pribowo A, et al. The synergistic action of accessory enzymes enhances the hydrolytic potential of a “cellulase mixture” but is highly substrate specific. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6(8): 112–123.
- [42] Yang B, Wyman CE. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnol Bioeng*, 2006, 94(4): 611–617.
- [43] Chen N, Fan JB, Xiang J, et al. Enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose in reverse micelles. *BBA-Proteins Proteom*, 2006, 1764(6): 1029–1035.
- [44] Njoku SI, Uellendahl H, Ahring BK. Comparing oxidative and dilute acid wet explosion pretreatment of cocksfoot grass at high dry matter concentration for cellulosic ethanol production. *Energy Sci Eng*, 2013, 1(2): 89–98.

(本文责编 陈宏宇)