

木质纤维素预处理抑制物产生及脱除方法的研究进展

杨莉¹, 谭丽萍^{1,2}, 刘同军^{1,2}

1 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 生物工程学院, 山东 济南 250353

2 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 生物材料与绿色造纸国家重点实验室, 山东 济南 250353

杨莉, 谭丽萍, 刘同军. 木质纤维素预处理抑制物产生及脱除方法的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(1): 15-29.

Yang L, Tan LP, Liu TJ. Progress in detoxification of inhibitors generated during lignocellulose pretreatment. Chin J Biotech, 2021, 37(1): 15-29.

摘要: 利用纤维素酶将木质纤维素降解成可发酵性糖, 然后发酵生产氢气、乙醇、丁醇等生物燃料及高附加值产品, 是当今全球研究的热点。预处理是生物质转化过程中至关重要的步骤, 而预处理过程中产生的抑制物对木质纤维素后续的酶解和发酵微生物有负面影响。因此了解预处理方法及其过程中产生的抑制物及脱除方法是能否高效转化生物质的基础。文中首先介绍了木质纤维素常用的两类预处理方法即化学法和物理化学法。随后阐述了不同抑制物的产生及其抑制机制, 并重点介绍了多种脱毒方法。最后展望了脱除木质纤维素预处理抑制物的研究趋势: 应用交联聚乙烯亚胺和金属有机骨架化合物等新型材料脱除抑制物或通过基因工程、代谢工程技术等构建抑制物耐受性菌株等。

关键词: 木质纤维素, 预处理, 脱毒, 耐受性菌株

Progress in detoxification of inhibitors generated during lignocellulose pretreatment

Li Yang¹, Liping Tan^{1,2}, and Tongjun Liu^{1,2}

1 Department of Bioengineering, Qilu University of Technology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250353, Shandong, China

2 State Key Laboratory of Biobased Materials and Green Papermaking, Qilu University of Technology, Shandong Academy of Sciences, Jinan 250353, Shandong, China

Abstract: Lignocellulose can be hydrolyzed by cellulase into fermentable sugars to produce hydrogen, ethanol, butanol and other biofuels with added value. Pretreatment is a critical step in biomass conversion, but also generates inhibitors with negative impacts on subsequent enzymatic hydrolysis and fermentation. Hence, pretreatment and detoxification methods are the basis of efficient biomass conversion. Commonly used pretreatment methods of lignocellulose are chemical and physic-chemical processes. Here, we introduce different inhibitors and their inhibitory mechanisms, and summarize various detoxification

Received: April 20, 2020; **Accepted:** August 3, 2020

Supported by: Natural Science Foundation of Shandong Province, China (No. ZR2014BM031), International Cooperation Research Program of Qilu University of Technology, Shandong Academy of Science (No. QLUTGJHZ2018012).

Corresponding author: Tongjun Liu. Tel/Fax: +86-531-89631901; E-mail: liutongjun@outlook.com

山东省自然科学基金 (No. ZR2014BM031), 齐鲁工业大学 (山东省科学院) 国际合作研究专项资金计划 (No. QLUTGJHZ2018012) 资助。

网络出版时间: 2020-08-31

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20200828.1619.003.html>

methods. Moreover, we propose research directions for detoxification of inhibitors generated during lignocellulose pretreatment.

Keywords: lignocellulose, pretreatment, detoxification, inhibitor-resistant strains

石油煤炭等化石燃料在促进经济发展、社会进步的同时也导致了极严重的环境污染。人类日益增长的能源需求与化石能源日渐枯竭、不可再生等的矛盾使寻找绿色环保、可再生的替代能源成为世界各国的紧迫任务。地球上最丰富的可再生碳源——木质纤维素作为石油等其他化石能源的潜在替代品受到了广泛关注^[1-2]。木质纤维素经酶作用后降解为可发酵性单糖，再由微生物发酵生成乙醇、丁醇、氢气等生物质燃料^[3-4]。这些生物质燃料的应用能够减少化石燃料的消耗，减少环境污染^[5]。因此，利用秸秆、蔗渣等农林废弃物替代传统农作物生产生物质燃料也是如今一些科学研究的热点^[6]。

木质纤维素因其产量大、可利用性好、成本低、易加工、生长和采收周期短等特点，被认为是一种比较理想的生产生物燃料的环境友好型原料^[7]。木质纤维素在向生物质燃料的转化过程中，仍存在高成本、低效率等一些问题，预处理过程中产生的抑制物是限制其高值化利用的瓶颈之一，因此，了解预处理过程中产生的抑制物种类和抑制机制及各种脱毒方法是实现农林废弃物高效转化的基础。本文介绍了两类常用的预处理技术，总结了抑制物的种类、抑制机制及脱除方法，同时展望了木质纤维素生物质转化过程中抑制物脱除的主要发展方向及前景。

1 木质纤维素预处理的必要性

木质纤维素是一种非均质聚合物，由纤维素、半纤维素和木质素组成。纤维素是由 β -1,4-糖苷键连接的线性多糖，半纤维素是由戊糖（木糖和阿拉伯糖）和己糖（甘露糖、葡萄糖、半乳糖）组成的支链多聚杂合物，木质素是分子结构中含有氧代苯丙醇或其衍生物结构单元的芳香型、无定形高聚杂合物^[8]。木质素与纤维素、半纤维素直

接交联，还与碳水化合物发生酯化的阿魏酸（Ferulic acid, FA）交联，形成碳水化合物-阿魏酸酯-木质素交联结构^[9]。FA通过酯键和醚键分别与半纤维素和木质素连接，构成半纤维素-酯键-阿魏酸-醚键-木素桥；而对香豆酸（*p*-coumaric acid, *p*-CA）不仅通过酯键和木质素侧链相连，还通过氢键和范德华力粘附在纤维素表面^[10]。这进一步加剧木质纤维素细胞壁的复杂性和抗降解性，严重阻碍了其生物转化。另外，木质素对纤维素酶的无效吸附降低了酶的利用率，增加生产成本。因此在利用木质纤维素生产燃料的过程中，预处理是第一步也是至关重要的一步。预处理的目的是去除或减少阻碍糖化和发酵的木质素，打破木质素形成的致密结构，使纤维素从木质素与半纤维素的包覆中暴露出来，降低纤维素的结晶度和聚合度，提高酶对纤维素的可及性，从而提高酶解效率，降低生产成本，实现生物质燃料的产业化生产^[11]。

2 预处理的种类及抑制物的产生

由图1可知预处理方法有多个类别，主要分为物理法预处理、化学法预处理、生物法预处理和物理化学法预处理4类，每一类又分为多种不同的预处理方法^[12-13]。每一种预处理方法所采用的试剂、处理条件、对应的底物以及作用的底物位点和断裂的化学键各不相同，因此最后的预处理效果和产生的抑制物也不相同。表1是不同预处理方法处理木质纤维素的过程中产生的主要抑制物及抑制物的主要来源，每种预处理方法产生的抑制物不止一种，多种抑制物的同时存在对进一步的酶解和发酵还有着协同抑制作用。化学法预处理与物理化学法预处理是两类应用最广泛的预处理方式，本文重点描述了这两类预处理方法及产生的抑制物^[14-15]。

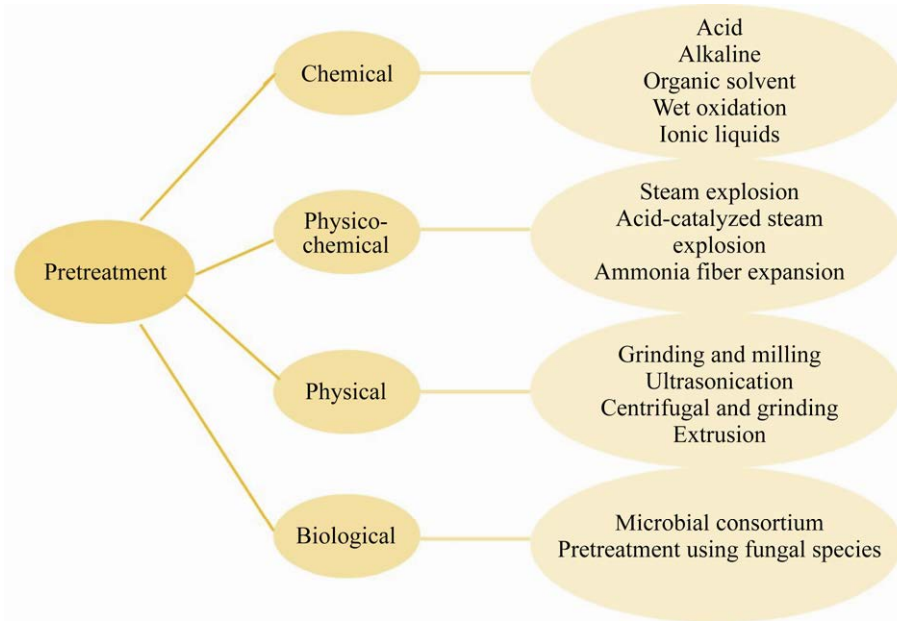


图 1 木质纤维素生物质的预处理方法分类 (引自 Ravindran 等^[12])

Fig. 1 Classification of pretreatments methods for lignocellulosic biomass (from Ravindran^[12]).

表 1 不同预处理方法产生的抑制剂及其来源

Table 1 Inhibitors produced by different pretreatment methods and their sources

Pretreatment methods	Major inhibitors	Sources	References
Acid pretreatment	Furans, organic acids	Hemicellulose	[16]
Alkaline pretreatment	Organic acids, phenolics	Lignin, hemicellulose	[17]
Organic solvent pretreatment	Furans, organic acids	Hemicellulose	[18]
Liquid hot water pretreatment	Furans, organic acids, phenolics	Hemicelluloses, lignin	[15]
Steam explosion pretreatment	Furans, organic acids, phenolics	Hemicellulose	[19]
Acid-catalyzed steam explosion pretreatment	Furans, organic acids, phenolics	Hemicelluloses, lignin	[20]
Ammonia fiber expansion pretreatment	Phenolics, furans	Lignin, hemicellulose	[21]
Wet oxidation pretreatment	Organic acids, phenolics	Hemicellulose	[16]
Ionic liquids pretreatment	Ionic liquids, phenolics, furans	Ionic liquids, lignin, hemicellulose	[22]

2.1 化学法预处理及产生的抑制物

酸法、碱法、有机溶剂法是化学法预处理中研究最多的 3 种预处理方法^[18,23-27], 使用化学试剂能够快速有效地降低木质纤维素的抗降解性, 这 3 种方法有相同之处, 也存在差异。

2.1.1 酸法预处理及产生的抑制物

酸法预处理是用稀酸或浓酸, 在一定温度和

压力下断裂纤维素和半纤维素间的氢键, 使半纤维素部分或全部被溶解, 降低纤维素的结晶度, 使纤维素充分暴露出来, 增强酶的可及性从而提高酶解效率^[23]。酸法预处理因其反应快速、操作简便、成本低、处理效果好等优点而被广泛应用^[24]。Song 等^[28]用 2% HCl、2% H₂SO₄、4% CH₃COOH 这 3 种酸处理的木质纤维素发酵生产

甲醇, 甲醇产量分别比未经预处理的木质纤维素高 62.4%、74.6% 和 44.2%。目前来看, 酸法已经发展成一种比较成熟、效果较好的预处理技术, 但是预处理过程中产生的抑制物也影响了其发展和应用。

酸预处理过程中抑制物的产生主要是因为酸对半纤维素降解。半纤维素在酸的作用下生成戊糖、己糖和乙酸, 戊糖和己糖脱水形成糠醛和 5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF) 等化合物^[29-30]。糠醛和 5-HMF 分解又会产生甲酸^[31]; 另外 5-HMF 分解还会生成乙酰丙酸^[16]。这些物质的存在会抑制酶和微生物的活性, 影响酶解和发酵。

2.1.2 碱法预处理及产生的抑制物

碱法预处理是用 NaOH、Ca(OH)₂ 和氨等碱性物质破坏纤维素和半纤维素间的氢键与半纤维素和木质素间的酯键, 降低纤维素的结晶度和聚合度来达到预处理的目的。在所有的碱性试剂中, NaOH 是研究最多也是用量最大的。为了减少 NaOH 的用量, 提高碱法预处理的经济竞争力, Liu 等^[32]尝试寻找一种能够替代 NaOH 的碱, 用于生物质的预处理, 使用传统的水电解法-双室电化学电池, 在阴极一侧形成的碱性溶液作为碱法预处理的碱性源, 用于玉米秸秆碱预处理, 结果表明能够去除 56.6% 的木质素, 将葡聚糖转化率提高了 3.8 倍, 体现了综合生物资源的概念。而 Wang 等^[18]在 NaOH 预处理的基础上再使用臭氧联合预处理木质纤维素, 在降低 NaOH 用量的同时, 还能使木质素的去除率达到 84.35%, 最大酶解效率达到 91.73%。Owolabi 等^[25]在纯碱预处理基础上, 加入 10% H₂O₂, 反应条件为 30 °C、101 kPa、pH 11.6 左右, 木质纤维素中的木质素能够最大限度地被去除, 这种方法称为碱过氧化氢法预处理 (Alkali hydrogen peroxide pretreatment, AHP 预处理)。Liu 等^[33]为优化 AHP 预处理的条件, 提出两步预处理的观念, 在 AHP 预处理前先经过 NaOH 预浸

提, 结果表明碱浸提不仅能够提高 AHP 预处理的效果, 还能减少 NaOH 和 H₂O₂ 的用量。碱法预处理反应条件温和, 对设备要求不严格, 生产成本较低, 预处理效果好、酶解转化率高且多糖损失率低, 因此被认为是最有发展前景的预处理方法之一^[32]。

与酸法不同, 碱预处理主要去除的是木质素和半纤维素。因此碱法预处理产生的抑制物种类主要是甲酸、乙酸和酚类, 甲酸和乙酸是由半纤维素的降解和酚类物质的皂化形成。酚类物质主要是碱攻击木质素的降解产物, 根据苯环 R 支链上的官能团类型, 将酚类物质分为以松柏醛、银槭醛及对羟基苯甲醛为代表的酚醛; 以 p-CA、FA、芥子酸为代表的酚酸; 以 4'-羟基苯乙酮、乙酰丁香酮、乙酰香草酮为代表的酚酮; 以松柏醇、芥子醇、对羟基苯甲醇为代表的酚醇^[13,34-36]。木质纤维素 AHP 预处理浓度最高的抑制物是 p-CA 和 FA, 而且酿酒酵母抑制物耐受性实验表明, FA 对酿酒酵母菌株的抑制作用强于 p-CA^[13,37]。所以碱法预处理产生的抑制物中 p-CA 和 FA 等酚类物质的研究较多^[10,13,32-33]。

2.1.3 有机溶剂预处理及产生的抑制物

有机溶剂预处理是用有机溶剂或其水溶液有效溶出木质纤维原料中的木质素的工艺, 常用的有机溶剂包括: 甲醇、乙醇、乙二醇、丙酮、甲醛、苯酚等^[26-27]。有机溶剂预处理后可通过蒸馏回收再循环使用, 分离后的木质素固体和纤维素糖液都可再作为化学原料等优点使有机溶剂预处理成为一种应用广泛、很有前途的预处理技术^[38-39]。而乙醇因为沸点低、易回收、毒性小、成本低、易与水混溶、损耗可由后续发酵补充等优点成为研究最多的有机溶剂。另外, 与碱法预处理相比, 乙醇溶出的木质素变性较少、分子量比较均一, 而且带有较多活性基团。但乙醇有机溶液预处理也存在着挥发性高、所需压力大、温度高、对设备要求高、预处理时间长等缺点^[39]。

有机溶剂预处理破坏的是半纤维素和木质素之间的化学键,产生的抑制物主要为甲酸、乙酸、乙酰丙酸等弱酸类物质与糠醛、5-HMF 等呋喃醛类物质,还有一些酚类物质^[16,40]。

2.2 物理化学法预处理及产生的抑制物

物理化学法预处理中应用最广泛的是蒸汽爆破预处理和氨纤维膨胀/爆破预处理 (Ammonia fiber expansion/explosion, AFEX),这两种预处理方法不仅能够快速破坏木质纤维素的致密结构,达到较好的预处理效果,而且对环境十分友好^[19,41-45]。

2.2.1 蒸汽爆破预处理及产生的抑制物

蒸汽爆破是一种对环境友好的预处理技术,在高温高压下饱和蒸汽快速加热木质纤维素然后快速释放压力,导致生物质细胞壁之间的交联断裂,半纤维素被溶解,使得木质纤维素的复杂结构被打破,从而提高酶解效率和生物燃料的产量^[41-42]。例如,He 等^[19]对蒸汽爆破预处理提高沙棘酶解效果的实验条件进行了优化,在压力为 1.5 MPa、pH 4.01 时反应 20 min 能去掉 77.16% 的半纤维素,酶解后的糖产量是未处理的 4.54 倍。也有研究利用蒸汽爆破预处理后的稻草水解液厌氧发酵甲烷,该实验对比了预处理与未预处理的水解液发酵生成的甲烷产量,结果表明蒸汽爆破预处理后的稻草水解液比未处理的甲烷产量提高了 32%^[43]。

蒸汽爆破能够显著降低半纤维素和木质素的含量,降低纤维素的聚合度,是改善酶解效率最有效的预处理方法之一。但是蒸汽爆破预处理过程伴随着半纤维素和木质素的降解产生的一些酚类和糠醛类物质使得预处理的利用率变低^[19]。

2.2.2 AFEX 预处理及产生的抑制物

AFEX 预处理是一种应用前景十分广阔的预处理技术,通过物理(高压和高温)和化学(氨)作用,来改变木质素/半纤维素的结构,降低纤维素结晶度,增加细胞壁孔隙率,从而降低木质纤维素对酶的顽固性^[44-45]。Gómez 等^[46]在龙舌兰固

体残渣转化为液体生物燃料的过程中利用 AFEX 预处理来改善酶解和发酵效果,并通过响应面设计实验优化预处理条件,实验表明温度在 100–120 °C 时 AFEX 预处理的效果最好,酶解后糖转化率能达到 85%,发酵的乙醇产率超过 90%。AFEX 预处理具有许多优点,例如可以在高固体物含量时反应,产生的抑制剂浓度很低,糖回收率高(比理论值高>90%),且目前已经在中试规模进行了研究实验。Campbell 等^[47]是在实验室规模 90 倍大的中规模填充床 AFEX 反应器系统中进行性能研究,该系统能够在 5 年内预处理 36 t 农作物残渣,能够回收再利用 76% 的未反应氨。中试规模的预处理效果与实验室规模相当,实验室测试中葡萄糖和木糖产率分别为 74% 和 75%,对应于中试规模中则分别为 71% 和 73%。不过 AFEX 预处理也存在一些缺点,例如对木本木质素的去除率低,而且目前在微藻类生物质水解方面的适用性非常低,另外,氨由于其吸湿和低温等特性,存在安全风险^[45,48]。

AFEX 预处理虽然产生的抑制物少,但预处理过程中化学键的断裂仍然会产生一些物质,木质纤维素生物质与氨的主要反应是醚键的断裂,木质素与碳水化合物复合物中醚/酯键的断裂会产生不利于后续反应的酚类物质和弱酸类物质^[45]。

图 2 是木质纤维素预处理过程中弱酸类、呋喃醛类和酚类这 3 类抑制物生成的过程,这 3 种物质产生的条件、来源与机制,所对应的预处理方式各不相同,对酶和微生物的抑制作用和抑制机制及相对应的脱除方法也存在区别。

3 抑制物对酶及微生物的抑制机制

3.1 呋喃醛类化合物

糠醛和 5-HMF 等呋喃醛类化合物对纤维素酶没有明显的抑制作用,而主要抑制微生物。呋喃醛类化合物对微生物可能的抑制机制^[15,49-52]是:(1)破坏细胞膜的通透性,抑制细胞内一些

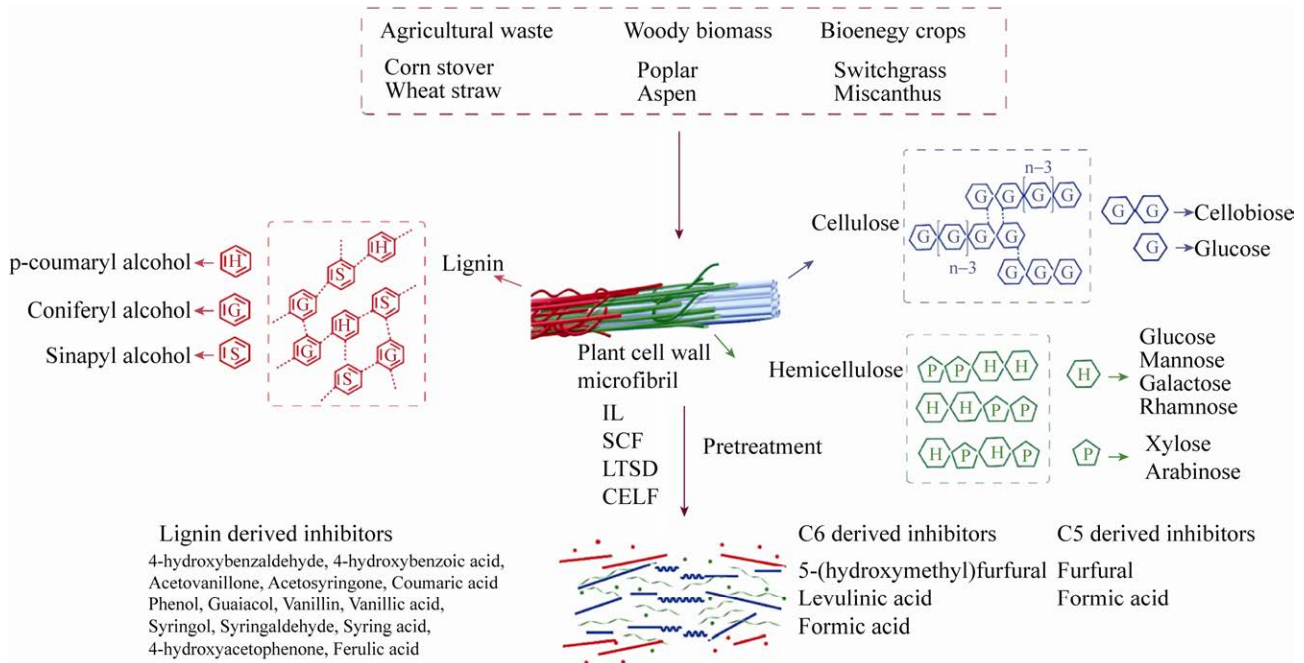


图 2 木质纤维素预处理产生的抑制物 (引自 Song 等^[22])

Fig. 2 Inhibitors produced by lignocellulose pretreatment (from Song et al.^[22]).

参与微生物代谢的关键酶的活性,抑制菌体生长,降低发酵过程中葡萄糖和木糖的转化率。(2) 在细胞内,脱氢酶将糠醛还原成糠醇要比将磷酸二羧丙酮还原成甘油优先进行。糠醛的还原不仅消耗细胞内还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH),使细胞内 NADH 水平降低,还与乙醇还原共同竞争乙醇脱氢酶 (Alcohol dehydrogenase, ADH),这直接导致乙醇在胞内积累,从而抑制菌体生长,延迟乙醇生成。5-HMF 的转化与氨基酸、核酸的合成竞争还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH),使得微生物的代谢活动被延迟或抑制。(3) 一些研究证明糠醛和 5-HMF 的同时存在会导致酿酒酵母体内大量翻译活动衰减,以及非翻译信使核糖核酸 (Messenger ribonucleic acid, mRNAs) 积累;对于细胞质信使核糖核蛋白 (Messenger ribonucleoprotein, mRNP) 颗粒和应急颗粒 (Stress granules, SGs) 聚集有明显的抑制

作用,从而使得酵母细胞生理状态退化。(4) 另外,糠醛还能够诱导酿酒酵母中活性氧 (Reactive oxygen species, ROS) 的积累,导致线粒体、液泡膜、肌动蛋白骨架与核染色质的损伤,甚至引发细胞死亡。

呋喃醛类的抑制机制涉及微生物细胞结构的完整性、合成和代谢过程等方面,对微生物的抑制作用较强,严重影响了生物转化率。

3.2 弱酸类化合物

甲酸、乙酸和乙酰丙酸等属于弱酸类物质,细胞内弱酸类物质的积累会打破微生物细胞内的 pH 平衡,造成胞内环境酸化,若要维持胞内的中性环境必须通过消耗 ATP 将多余的质子泵出,这影响细胞正常的能量供给,从而抑制菌体的生长^[53]。细胞内阴离子堆积或者与酸直接接触都有可能破坏细胞膜,导致细胞活性下降甚至死亡^[54-55]。

弱酸类物质只对微生物有抑制作用,而且抑制作用不明显,一般情况下,弱酸类化合物不会单独存在,是与呋喃醛类物质或酚类物质同时存在。

3.3 酚类化合物

与弱酸类和呋喃醛类物质不同, 酚类物质不仅对微生物的生长有明显的抑制作用, 还可显著降低纤维素酶、半纤维素酶的活性^[56]。分子量和取代基的位置(对位、邻位、间位)是影响酚类物质抑制作用大小的主要因素^[57]。酚类物质的抑制作用主要体现在^[56-59]在: (1) 酚类支链上的羟基具有吸附蛋白质的能力, 与酶结合使其沉淀、失活; (2) 破坏细胞的完整性; (3) 导致基因突变; (4) 破坏细胞的抗氧化防御系统; (5) 酚类化合物结构上的官能团如酮基、酚羟基、羧基、醛基等取代基对酒精发酵有抑制作用。

3.4 不溶性木质素

与上述 3 种物质不同, 预处理残留的少量不溶性木质素主要对酶作用。抑制机制^[60-63]为: (1) 不溶性木质素通过物理屏障限制纤维素酶的渗透, 并有可能对酶进行无效吸附; (2) 不溶性木质素通过直接与纤维素酶接触而覆盖酶的催化位点或防止纤维素膨胀阻止底物进入催化位点; (3) 还有一些研究认为, 纤维素酶、半纤维素酶能够直接连接到木质素的一些特征功能基团上导致纤维素酶的活性降低甚至失活。

在呋喃醛、弱酸、酚类、不溶性木质素这 4 类抑制物中, 弱酸和不溶性木质素的抑制作用较弱, 一般伴随呋喃醛或酚类协同抑制, 呋喃醛和酚类物质的抑制作用比较明显, 因此对它们的抑制机制和脱除方法的研究较多^[32-33,57-58], 其中对呋喃醛类的研究更多^[16,29-31,49-52]。

4 抑制物的降低或脱除

木质纤维素预处理抑制物对酶和微生物有明显的抑制作用, 是木质纤维素生产乙醇、丁醇等生物燃料的主要瓶颈之一。为降低抑制物的负面影响, 提高木质纤维素利用率及发酵产物的得率, 实现生物燃料的规模化生产, 近年来研究者们围绕着如何脱毒尝试了多种方法, 也取得了一些成

就。一般将脱毒方法分为化学法脱毒、物理法脱毒和生物法脱毒 3 类。

4.1 化学法脱毒

化学法脱毒主要是利用化学试剂与木质纤维素预处理抑制物反应生成低毒或无毒的物质, 应用较多的化学试剂是碱和还原剂, 氨基酸脱毒是最近几年研究较多的一种脱毒方法^[62,64-65]。

4.1.1 碱法脱毒

碱法脱毒是向预处理液中加入碱性物质从而减少预处理抑制物的一种脱毒方法。Persson 等^[62]利用挪威云杉稀酸预处理液和由 6 种已知抑制物(甲酸、乙酸、糠醛、5-HMF、松柏醛、FA)组成的混合物, 研究了 NaOH、Ca(OH)₂、KOH、NH₄OH 4 种碱的脱毒效果, 结果表明 40%呋喃醛类化合物被转化成了其他无毒物质。Haq 等^[66]用 NaOH、Ca(OH)₂、NH₄OH 三种碱对麦草预处理液进行脱毒实验。结果表明使用 Ca(OH)₂ 在 pH 12、80 °C 条件下反应 2 h, 可以除去 60%的酚类物质, 使糖化率提高 2.4 倍。经过预处理和过石灰处理的底物的扫描电镜结果表明, 木质纤维素结构发生了很大的变化, 更易酶解。碱法脱毒的优点是碱与呋喃醛类物质、酚类物质和弱酸类物质都能反应, 还能降解木质素, 所用碱较为普遍, 操作比较简单; 缺点是碱用量大, 碱和抑制物都不能回收^[40,66-67]。

4.1.2 还原剂脱毒

脱除预处理抑制物常使用的还原剂有亚硫酸盐和 H₂O₂。Xiros 等^[64]用 Na₂S₂O₄ 对高底物浓度的云杉预处理液进行脱毒, 从脱毒前无法发酵到脱毒后乙醇产率提高为最大理论产率的 57%。Soudham 等^[68]在预处理后的云杉水解液中加入 2.5 mmol/L FeSO₄ 和 150 mmol/L H₂O₂ 能够去除 29%的 5-HMF、34%的糠醛和 24%的酚类物质, 将最大乙醇产量从 0.4 g/L 提高至 8.3 g/L。Zhong 等^[69]的研究与以往在 140–160 °C 下利用亚硫酸盐处理软木蒸汽预处理液中的可溶性抑制物不同,

该研究选取高底物浓度的软木蒸汽预处理液全浆(含 20% 水不溶性物质), 在 70 °C 时, 加入亚硫酸盐进行反应。结果表明, 亚硫酸盐磺化后的预处理液酶解效率从 55% 提高到了 67%。还原剂脱毒是一种比较常用的脱毒方法, 选取合适的还原剂将呋喃醛类、酚类物质还原成对酵母等微生物毒害较小的物质。还原剂种类繁多, 选择性较大, 成本较低, 能够与多种抑制物反应, 但脱毒率和精准度不高。

4.1.3 氨基酸脱毒

大多数氨基酸中有伯氨基及一些重要的侧链官能团, 是亲核试剂, 能够与呋喃醛、芳香醛、羧基肉桂酸和羧酸等羰基化合物发生反应, 削弱这些物质对酶和微生物的抑制作用。在 20 种氨基酸中, 研究最多且脱毒效果最好的是半胱氨酸^[67,70]。Xie 等^[70]用 20 种氨基酸处理小叶松预处理液, 发现在测试的氨基酸中, 半胱氨酸效果最好, 96% 的 5-HMF 被消耗掉, 乙醇产量得以大幅度提升。而 Li 等^[40]的研究中, 在松木预处理液中加入半胱氨酸将糖利用率提高至 40.67%, 有效提高了丁酸梭菌的发酵能力, 但对丙酮-丁醇-乙醇产量的提升微乎其微, 这其中的原因可能是半胱氨酸刺激丁酸梭菌的代谢途径将醇变成酸。Xie^[65]研究了半胱氨酸对火炬松水解液的脱毒效果和机制, 脱毒后的乙醇产量从 0.02 g/g 提升至 0.42 g/g。半胱氨酸的脱毒机制在于它含有巯基和胺基, 能够与醛反应生成噻唑烷衍生物, 同时, 胺基还可通过亲电取代作用攻击醛或酮形成对微生物没有抑制作用的亚胺。

4.2 物理法脱毒

物理法脱毒包括使用半透膜将木质纤维素预处理抑制物与单糖分离的膜脱毒与使用树脂等吸附剂对抑制物吸附从而达到脱毒目的的吸附剂脱毒^[71-72]等。

4.2.1 膜脱毒

纳米过滤技术是一种高效的膜分离技术, 具有能耗低、分离性能独特等特点, 适用多种抑制

物的脱除。目前研究较多的是酸法预处理产生抑制物的脱除。Brás 等^[73]利用纳滤膜对橄榄渣水解液脱毒, 能去除 99% 的呋喃醛类、乙酸和甲酸, 但单糖损失也达到了 40%。Pan 等^[74]进行了关于纳米过滤 (Nanofiltration, NF) 和反渗透 (Reverse osmosis, RO) 间歇循环同时分离抑制物并浓缩糖以提高稀酸预处理后稻草水解液发酵性的研究。结果表明, 在 NF/RO 杂化膜中应用三聚磷酸钠能达到最好的浓缩和分离效果。葡萄糖、木糖和阿拉伯糖的截留率分别为 96.2%、85.7% 和 92.7%, 甲酸、乙酸、糠醛、5-HMF 和香草醛的去除率分别为 99.5%、98.7%、99.2%、93.4% 和 92.2%, 实现了木质纤维素水解物同时脱毒和浓缩的目的。另外, 最近的研究中, Jiang 等^[71]在前人的基础上研究了稀酸预处理液经过纳滤膜时溶液 pH、渗透通量、Na₂SO₄ 浓度对单糖和抑制物截留率的影响。在 pH 足够低的条件下提高 Na₂SO₄ 浓度使弱酸和呋喃类的截留率更低, 具体实验来说, 处理 6 L 水解液需要 35 min, 该过程可以去掉 90% 的抑制物, 而葡萄糖、木糖、阿拉伯糖的回收率可分别达到 93.55%、90.75%、90.53%。利用纳米滤膜脱毒是膜技术在脱除预处理抑制物等领域的应用尝试, 抑制物的脱除率较高, 同时单糖的损失率也比较高, 所需压力还较大, 对于仪器设备的要求也随之增加, 另外纳米滤膜成本较高, 不利于工厂大规模生产。

4.2.2 吸附剂脱毒

除具有节能、环保、高效、易搬运等优点外, 吸附树脂和交联聚乙烯亚胺 (Polyethylenimine, PEI) 等吸附剂还以其独特的结构和优异的吸附性能, 引起广泛关注。吸附树脂和 PEI 等物质能够选择性地吸附木质纤维素预处理液中的呋喃、脂肪酸和酚类物质, 然后再利用解吸机制回收这些物质^[72]。Deng 等^[75]利用 PEI 和聚二烯丙基二甲基氯化铵 (Poly-diallyldimethylammonium chloride, pDADMAC) 吸附和回收稀氨预处理后的甘蔗渣

酶解液中的甲酸、乙酸、乙酰丙酸、糠醛、5-HMF 和酚类化合物。结果表明, pH 4.5 时 PEI 和 pDADMAC 的添加量为 15 g/L 时效果最好, 能够去除 43% 的有机酸、73% 的总酚类化合物和 100% 的呋喃醛类化合物, 同时还使可发酵糖的损失率低于 10%。虽然有机酸和总酚类化合物的回收率仅有 20%, 但呋喃醛的回收率可达到 80%。Huang 等^[76]研究了油水法制备的苯乙烯-二乙烯基苯 (Styrene-divinylbenzene, St-DVB) 吸附树脂并测试了对稻秸预处理液中呋喃醛及其衍生物、酸溶性木质素等抑制物的吸附性能。结果表明, 共聚合条件下制得的 St-DVB 吸附树脂在酸溶性木质素、糠醛和 5-HMF 上的分配系数和选择性系数均较高。López-Linares 等^[77]利用硫酸酸解菜籽秸秆, 再利用离子交换树脂吸附预处理抑制物, 酚类物质和乙酸几乎全部去除, 而呋喃醛类化合物和甲酸也降到了非常低的水平。在这种情况下发酵, 乙醇产率达到了理论值的 85%。PEI、pDADMAC、St-DVB 和离子交换树脂等一些具有选择性吸附能力的新型材料的应用, 不仅能够最大限度提高抑制物的去除率, 还能通过解吸机制脱附抑制物, 用作生产其他化学品的原料, 实现秸秆资源的最大化利用。

4.3 生物法脱毒

生物法脱毒主要指通过微生物产生的酶与抑制物反应生成低毒或无毒的物质或者通过抑制物高耐受性微生物实现原位脱毒, 能够缩减操作单元, 减少生产成本, 实现快速有效提高发酵能力的目的^[17,78]。

4.3.1 酶法脱毒

Tramontina 等^[78]用过氧化物酶和超氧化物歧化酶等酶的混合物有效除去甘蔗渣半纤维素水解液中的抑制物。结果表明, 与未脱毒的半纤维素水解产物相比, 细菌梭状芽孢杆菌发酵产生的丁醇和裂殖酵母产生的乙醇产量分别增加了 24 倍和 2.4 倍。也有人在漆酶的基础上建立一套生物

电化学解毒系统 (Bioelectrochemical detoxification system, BEDS) 用于木质纤维素预处理抑制物的脱除, 稻草稀酸催化蒸汽爆破预处理产生的酚类物质经过 BEDS 系统, 90% 被还原成对纤维素酶和微生物没有毒性的物质, 而且还原糖的损失率较低, 还原糖的回收率可达到 85%, 远高于未经脱毒的还原糖回收率^[79]。

4.3.2 抑制物高耐受性菌株

Sato 等^[17]通过对 AHP 预处理抑制物存在下酵母菌株的生长能力进行表型鉴定, 筛选出一株可耐受 Na^+ 、乙酸、p-CA 和 FA 四种抑制物的杂合子二倍体菌株, 经过 149 代培养后, 分离出一株进化菌株 GLBRC Y87, 在未脱毒预处理液酶解后表现出较快的木糖吸收率, 乙醇的转化率提高到 70%。近些年来, 关于抑制物耐受性菌株对于多抑制物共存的研究有了一定的进展, Liu 等^[80]通过比较转录组分析对已经获得糠醛和 5-HMF 耐受性的工业酿酒酵母基于途径的耐受表型进行研究, 发现耐受性菌株 NRRLY-50049 的耐受表型涉及到含硫氨基酸的生物合成、还原-氧化反应、细胞壁反应以及内源性和外源性细胞排毒等过程。还有研究发现受糠醛和 5-HMF 诱导的菌株 Y-50049 在糖酵解和戊糖磷酸途径中存在葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Zwf1) 的独特蛋白质表达, Zwf1 的激活表达产生 NADPH, 辅助醛还原酶还原糠醛和 5-HMF, 实现菌株 Y-50049 对呋喃醛类物质的原位脱毒^[81]。耐受性表型的鉴定和相关蛋白质表达的分析为研究基因组水平上的酵母耐受性和适应性机制之间的相互作用和途径相互作用提供了基础, 也为利用基因工程等技术构建高耐受性菌株提供了基础。Wu 等^[82]通过常温和室温等离子体诱变技术, 对肠杆菌进行诱变, 获得对玉米芯酸性水解液中的抑制物具有较高耐受性的突变株 M22。突变株 M22 在未脱毒的水解液中发酵, 发酵产物 2,3-丁二醇的浓度为 24.32 $\mu\text{g/L}$, 有机酸的浓度为 14.93 $\mu\text{g/L}$, 与野生型菌株相比, 突变

株 M22 对抑制剂的耐受性提高了一倍, 2,3-丁二醇和有机酸的产量分别提高了 114% 和 90%。

利用传统基因表达与合成生物学、基因组学、代谢工程等技术提高菌株的抑制物耐受性, 构建高耐受性菌株或者利用酶工程和基因工程根据人们的需求设计并生产能够与抑制物反应的酶是木质纤维素水解液脱毒的新趋势^[83]。

4.4 复合脱毒方法

由于木质纤维素预处理液中抑制物成分复杂, 且有协同抑制作用, 单一的脱毒方法可能达不到预期的效果, 一些研究转向了使用两种及两种以上方法脱毒。Yücel 等^[84]比较了几种方法脱毒后的预处理液用于毕赤酵母发酵酒精的效果。结果表明在 CaO 存在的条件下, 酚类和呋喃类化合物经活性炭处理后, 含量降低了 42%。另外 Santos 等^[85]提出的一种利用离子交换树脂与活性炭相结合的连续柱体系, 作为抑制物去除的新途径。在温度为 30 °C、流速为每小时 2.5 柱床体积(柱层析填充物为 400 mL 活性炭和离子交换树脂), 糠醛、5-HMF 与酚类物质的浓度大幅度降低。同样, Cheng 等^[86]以木质纤维素为碳源, 采用有机酸预处理液, 经活性炭和离子交换树脂脱毒处理后, 供木醋杆菌合成细菌纤维素, 结果表明这种脱毒方法非常有效, 细菌纤维素的产量达到了 2.86 g/L。Tomek 等^[87]将酚酸脱羧酶和液-液萃取结合起来实现木质纤维素预处理液中抑制物的原位脱毒, 原位脱毒这一概念的出现, 不仅不会增加生物质转化过程中的操作单元, 还能有效去除抑制物, 提高酶解和发酵效率。

这些脱毒方法各有特点, 在实际生产过程中选择脱毒方法不仅要根据抑制物的种类、脱毒效果进行选择, 也要考虑实际生产条件、脱毒方法的成本以及是否容易操作等因素。

5 总结与展望

利用木质纤维素生产乙醇、丁醇、氢气等生

物质燃料是解决化石能源危机的途径, 而预处理过程中产生的抑制物是限制其高底物、高产率、规模化发展的瓶颈之一。在木质纤维素深加工过程中, 要针对实际情况选择合适的预处理技术及成本较低、效果明显的脱毒方法或者抑制物高耐受性菌株来提高产率、增加收益。笔者课题组明确测定了木质纤维素 AHP 预处理液中 p-CA 和 FA 的浓度, 研究了 p-CA 和 FA 在 AHP 预处理过程中的释放行为及对纤维素酶和酿酒酵母的抑制作用和机制^[37,88], 并正在研究金属有机骨架化合物 (Metal-organic frameworks, MOFs) 和氨基酸对 FA 和 p-CA 的去除效果及 MOFs 对 FA 和 p-CA 的解吸附效果。随着科学技术的发展, 越多成本低廉的新型材料不断应用于木质纤维素预处理液的脱毒, 既能达到最好的脱毒效果, 又能将糖损失降至最低。抑制物脱除的未来发展方向也可能是利用基因工程技术和代谢工程技术改造或构建抑制物高耐受性菌株或微生物产生的酶的应用。

REFERENCES

- [1] Sui M. *Bacillus amyloliquefaciens* uses mixed sugar to synthesize γ -PGA. IOP Conf Ser Mater Sci Eng, 2018, 394(2): 022069.
- [2] Abo BO, Gao M, Wang YL, et al. Lignocellulosic biomass for bioethanol: an overview on pretreatment, hydrolysis and fermentation processes. Rev Environ Health, 2019, 34: 57-68.
- [3] Cai D, Li P, Luo ZF, et al. Effect of dilute alkaline pretreatment on the conversion of different parts of corn stalk to fermentable sugars and its application in acetone-butanol-ethanol fermentation. Bioresour Technol, 2016, 211: 117-124.
- [4] Theiri M, Chadjaa H, Marinova M, et al. Development of sequential and simultaneous bacterial cultures to hydrolyse and detoxify wood pre-hydrolysate for enhanced acetone-butanol-ethanol (ABE) production. Enzyme Microb Technol, 2020, 133: 109438.
- [5] Ndubuisi IA, Qin QJ, Liao GY, et al. Effects of various inhibitory substances and immobilization on

- ethanol production efficiency of a thermotolerant *Pichia kudriavzevii*. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 91-103.
- [6] Yu XJ, Bao XJ, Zhou CS, et al. Ultrasound-ionic liquid enhanced enzymatic and acid hydrolysis of biomass cellulose. *Ultrason Sonochem*, 2018, 41: 410-418.
- [7] 赵晨, 崔馨月, 刘广青, 等. 提高玉米秸秆厌氧消化产气能力的预处理技术研究进展. *生态与农村环境学报*, 2015, 31(5): 640-646.
- Zhao C, Cui XY, Liu GQ, et al. Recent progress in study on technology for pretreating corn stalk to improve biogas production capacity of anaerobic digestors. *J Ecol Rural Environ*, 2015, 31(5): 640-646 (in Chinese).
- [8] Diwan B, Parkhey P, Gupta P. Platform study on the development of a nondetoxified rice straw hydrolysate to its application in lipid production from *Mortierella alpina*. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2017, 6(1): 1225-1234.
- [9] 谭晓华, 张爱萍, 谢君. 碳水化合物-阿魏酸酯-木质素交联结构及其形成机理研究进展. *造纸科学与技术*, 2015, 34(3): 32-37.
- Tan XH, Zhang AP, Xie J. Cross-linkages and their mechanism of carbohydrate-ferulate-lignin in plant cell wall. *Paper Sci Technol*, 2015, 34(3): 32-37 (in Chinese).
- [10] 李明富, 万广聪, 贾转, 等. 蔗渣原料中阿魏酸和对香豆酸的定量分析. *中国造纸学报*, 2019, 34(2): 1-7.
- Li MF, Wan GC, Jia Z, et al. Determination of ferulic acid and p-coumaric acid in sugarcane bagasse. *Trans. China Pulp Paper*, 2019, 34(2): 1-7 (in Chinese).
- [11] Tan LP, Liu ZY, Zhang TT, et al. Enhanced enzymatic digestibility of poplar wood by quick hydrothermal treatment. *Bioresour Technol*, 2020, 302: 122795.
- [12] Ravindran R, Jaiswal AK. A comprehensive review on pre-treatment strategy for lignocellulosic food industry waste: challenges and opportunities. *Bioresour Technol*, 2015, 199: 92-102.
- [13] 丁驰. 利用定量构效关系方法评价稻秸碱预处理水解液中抑制物的抑制性能[D]. 上海: 华东师范大学 2016.
- Ding C. Inhibition evaluation of inhibitory compounds in alkali-pretreated rice straw hydrolysate by using OSAR method[D]. Shanghai: East China Normal University, 2016 (in Chinese).
- [14] Vieira S, Barros MV, Sydney CAN, et al. Sustainability of sugarcane lignocellulosic biomass pretreatment for the production of bioethanol. *Bioresour Technol*, 2020, 299: 122635.
- [15] Kim D. Physico-chemical conversion of lignocellulose: inhibitor effects and detoxification strategies: a mini review. *Molecules*, 2018, 23(2): 309.
- [16] van der Pol EC, Bakker RR, Baets P, et al. By-products resulting from lignocellulose pretreatment and their inhibitory effect on fermentations for (bio) chemicals and fuels. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, 98(23): 9579-9593.
- [17] Sato TK, Liu TJ, Parreiras LS, et al. Harnessing genetic diversity in *Saccharomyces cerevisiae* for fermentation of xylose in hydrolysates of alkaline hydrogen peroxide-pretreated biomass. *Appl Environ Microbiol*, 2014, 80(2): 540-554.
- [18] Wang WH, Zhang CY, Tong SS, et al. Enhanced enzymatic hydrolysis and structural features of corn stover by NaOH and ozone combined pretreatment. *Molecules*, 2018, 23(6): 1300-1313.
- [19] He LW, Wang C, Shi HH, et al. Combination of steam explosion pretreatment and anaerobic alkalization treatment to improve enzymatic hydrolysis of *Hippophae rhamnoides*. *Bioresour Technol*, 2019, 289: 121693.
- [20] Na Ayutthaya PP, Charoenrat T, Krusong W, et al. Repeated cultures of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava processing waste hydrolysis for bioethanol production. *3 Biotech*, 2019, 9: 76.
- [21] Parreiras LS, Breuer RJ, Narasimhan RA, et al. Engineering and two-stage evolution of a lignocellulosic hydrolysate-tolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain for anaerobic fermentation of xylose from AFEX pretreated corn stover. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e107499.
- [22] Bhatia SK, Jagtap SS, Bedekar AA, et al. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: Effect of key parameters,

- technological improvements, and challenges. *Bioresour Technol*, 2020, 300: 122724.
- [23] 谭丽萍. 油棕空果壳预处理、糖化发酵产乙醇及预处理机制研究[D]. 济南: 山东大学, 2015.
Tan LP. Pretreatment and saccharification fermentation of oil palm empty fruit bunch (EFB) for ethanol production and mechanism of pretreatment[D]. Ji'nan: Shandong University, 2015 (in Chinese).
- [24] Jönsson LJ, Martín C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. *Bioresour Technol*, 2016, 199: 103-112.
- [25] Owolabi AF, Haafiz MKM, Hossain MS, et al. Influence of alkaline hydrogen peroxide pre-hydrolysis on the isolation of microcrystalline cellulose from oil palm fronds. *Int J Biol Macromol*, 2016, 95: 1228-1234.
- [26] Hijosa-Valsero M, Paniagua-García AI, Díez-Antolínez R. Biobutanol production from apple pomace: the importance of pretreatment methods on the fermentability of lignocellulosic agro-food wastes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2017, 101(21): 8041-8052.
- [27] Zhang K, Pei ZJ, Wang DH. Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for biofuels and biochemicals: a review. *Bioresour Technol*, 2016, 199: 21-33.
- [28] Song ZL, Yang GH, Liu XF, et al. Comparison of seven chemical pretreatments of corn straw for improving methane yield by anaerobic digestion. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): e93801.
- [29] 林贝, 李健秀, 刘雪凌. 木质纤维素水解副产物对乙醇发酵的影响及应对措施. *生物技术通报*, 2018, 34(3): 23-30.
Lin B, Li JX, Liu XL. The effects of by-products of hydrolyzing lignocellulose on ethanol fermentation and relevant countermeasures. *Biotechnol Bull*, 2018, 34(3): 23-30 (in Chinese).
- [30] Kumar V, Yadav SK, Kumar J, et al. A critical review on current strategies and trends employed for removal of inhibitors and toxic materials generated during biomass pretreatment. *Bioresour Technol*, 2020, 299: 122633.
- [31] Todhanakasem T, Yodsanga S, Sowatad A, et al. Inhibition analysis of inhibitors derived from lignocellulose pretreatment on the metabolic activity of *Zymomonas mobilis* biofilm and planktonic cells and the proteomic responses. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(1): 70-81.
- [32] Liu TJ, Li ZL. An electrogenerated base for the alkaline oxidative pretreatment of lignocellulosic biomass to produce bioethanol. *RSC Adv*, 2017, 7(75): 47456-47463.
- [33] Liu TJ, Williams DL, Pattathil S, et al. Coupling alkaline pre-extraction with alkaline-oxidative post-treatment of corn stover to enhance enzymatic hydrolysis and fermentability. *Biotechnol Biofuels*, 2014, 7: 48.
- [34] Luo HZ, Zheng PL, Bilal M, et al. Efficient bio-butanol production from lignocellulosic waste by elucidating the mechanisms of *Clostridium acetobutylicum* response to phenolic inhibitors. *Sci Total Environ*, 2020, 710: 136399.
- [35] Cunha JT, Romani A, Costa CE, et al. Molecular and physiological basis of *Saccharomyces cerevisiae* tolerance to adverse lignocellulose-based process conditions. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2019, 103(1): 159-175.
- [36] Patrick CA, Webb JP, Green J, et al. Proteomic profiling, transcription factor modeling, and genomics of evolved tolerant strains elucidate mechanisms of vanillin toxicity in *Escherichia coli*. *mSystems*, 2019, 4(4): e00163-19.
- [37] 刘彬. 碱性预处理抑制物对酶解和发酵抑制作用机理[D]. 济南: 齐鲁工业大学, 2019.
Liu B. Inhibitory mechanism of alkaline pretreatment inhibitors on enzymatic hydrolysis and fermentation[D]. Ji'nan: Qilu University of Technology, 2019 (in Chinese).
- [38] Zhou ZY, Lei FH, Li PF, et al. Lignocellulosic biomass to biofuels and biochemicals: A comprehensive review with a focus on ethanol organosolv pretreatment technology. *Biotechnol Bioeng*, 2018, 115(11): 2683-2702.
- [39] Chin DWK, Lim S, Pang YL, et al. Dataset of alkaline ethylene glycol pretreatment and two-staged acid hydrolysis using oil palm empty fruit bunch. *Data Brief*, 2020, 30: 105431.
- [40] Li J, Shi S, Tu MB, et al. Detoxification of

- organosolv-pretreated pine prehydrolysates with anion resin and cysteine for butanol fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 2018, 186(3): 662-680.
- [41] Yu GW, Guo TT, Huang QD. Preparation of rapeseed oil with superhigh canolol content and superior quality characteristics by steam explosion pretreatment technology. *Food Sci Nutr*, 2020, 8(5): 2271-2278.
- [42] Cubas-Cano E, González-Fernández C, Ballesteros I, et al. Efficient utilization of hydrolysates from steam-exploded gardening residues for lactic acid production by optimization of enzyme addition and pH control. *Waste Manag*, 2020, 107: 235-243.
- [43] Steinbach D, Wüst D, Zielonka S, et al. Steam explosion conditions highly influence the biogas yield of rice straw. *Molecules*, 2019, 24(19): 3492.
- [44] Islam MK, Wang HM, Rehman S, et al. Sustainability metrics of pretreatment processes in a waste derived lignocellulosic biomass biorefinery. *Bioresour Technol*, 2019, 298: 122558.
- [45] Zhao C, Shao QJ, Chundawat SPS. Recent advances on ammonia-based pretreatments of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 2020, 298: 122446.
- [46] Flores-Gómez CA, Silva EME, Zhong C. et al. Conversion of lignocellulosic agave residues into liquid biofuels using an AFEX™-based biorefinery. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 7.
- [47] Campbell T, Bals B, Teymouri F, et al. Scale-up and operation of a pilot-scale ammonia fiber expansion reactor. *Biotechnol Bioeng*, 2020, 117(4): 1241-1246.
- [48] Chundawat SPS, Pal RK, Zhao C, et al. Ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment of lignocellulosic biomass. *J Vis Exp*, 2020, 158: e57488.
- [49] Jung HR, Lee JH, Moon YM, et al. Increased tolerance to furfural by introduction of polyhydroxybutyrate synthetic genes to *Escherichia coli*. *J Microbiol Biotechnol*, 2019, 29(5): 776-784.
- [50] Da Silva TL, Santo R, Reis A, et al. Effect of furfural on *Saccharomyces carlsbergensis* growth, physiology and ethanol production. *Appl Biochem Biotechnol*, 2017, 182(2): 708-720.
- [51] Iwaki A, Kawai T, Yamamoto Y, et al. Biomass conversion inhibitors furfural and 5-hydroxymethylfurfural induce formation of messenger RNP granules and attenuate translation activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(5): 1661-1667.
- [52] Song HS, Jeon JM, Kim HJ, et al. Increase in furfural tolerance by combinatorial overexpression of NAD salvage pathway enzymes in engineered isobutanol-producing *E. coli*. *Bioresour Technol*, 2017, 245: 1430-1435.
- [53] Wang WT, Wu B, Qin H, et al. Genome shuffling enhances stress tolerance of *Zymomonas mobilis* to two inhibitors. *Biotechnol Biofuels*, 2019, 12: 288.
- [54] Cola P, Procópio DP, de Castro Alves AT, et al. Differential effects of major inhibitory compounds from sugarcane-based lignocellulosic hydrolysates on the physiology of yeast strains and lactic acid bacteria. *Biotechnol Lett*, 2020, 42(4): 571-582.
- [55] Chen HQ, Li J, Wan C, et al. Improvement of inhibitor tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the quinone oxidoreductase family gene YCR102C. *FEMS Yeast Res*, 2019, 19(6): foz55.
- [56] Qin L, Li WC, Liu L, et al. Inhibition of lignin-derived phenolic compounds to cellulase. *Biotechnol Biofuels*, 2016, 9: 70.
- [57] Ázar RISL, Morgan TL, Dos Santos ACF, et al. Deactivation and activation of lignocellulose degrading enzymes in the presence of laccase. *Enzyme Microb Technol*, 2018, 109: 25-30.
- [58] Chen XX, Zhai R, Li Y, et al. Understanding the structural characteristics of water-soluble phenolic compounds from four pretreatments of corn stover and their inhibitory effects on enzymatic hydrolysis and fermentation. *Biotechnol Biofuels*, 2020, 13: 44.
- [59] Rahikainen JL, Martin-Sampedro R, Heikkinen H, et al. Inhibitory effect of lignin during cellulose bioconversion: The effect of lignin chemistry on non-productive enzyme adsorption. *Bioresour Technol*, 2013, 133: 270-278.
- [60] Cui M, Duan YH, Ma YY, et al. Real-time QCM-D monitoring of the adsorption-desorption of expansin on lignin. *Langmuir*, 2020, 36(16): 4503-4510.
- [61] Chu QL, Song K, Wang J, et al. Improving enzymatic saccharification of hardwood through lignin modification by carbocation scavengers and

- the underlying mechanisms. *Bioresour Technol*, 2019, 294: 122216.
- [62] Persson P, Andersson J, Gorton L, et al. Effect of different forms of alkali treatment on specific fermentation inhibitors and on the fermentability of lignocellulose hydrolysates for production of fuel ethanol. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(19): 5318-5325.
- [63] Lambert E, Aguié-Béghin V, Dessaint D, et al. Real time and quantitative imaging of lignocellulosic films hydrolysis by atomic force microscopy reveals lignin recalcitrance at nanoscale. *Biomacromolecules*, 2019, 20(1): 515-527.
- [64] Xiros C, Olsson L. Comparison of strategies to overcome the inhibitory effects in high-gravity fermentation of lignocellulosic hydrolysates. *Biomass Bioenergy*, 2014, 65: 79-90.
- [65] Xie R. Carbonyl inhibition and detoxification in microbial fermentation of biomass hydrolysates[D]. Alabama: Auburn University, 2014.
- [66] Haq I, Arshad Y, Nawaz A, et al. Removal of phenolic compounds through overliming for enhanced saccharification of wheat straw. *J Chem Technol Biotechnol*, 2018, 93(10): 3011-3017.
- [67] Zhang Y, Xia CL, Lu MM, et al. Effect of overliming and activated carbon detoxification on inhibitors removal and butanol fermentation of poplar prehydrolysates. *Biotechnol Biofuels*, 2018, 11: 178.
- [68] Soudham VP, Brandberg T, Mikkola JP, et al. Detoxification of acid pretreated spruce hydrolysates with ferrous sulfate and hydrogen peroxide improves enzymatic hydrolysis and fermentation. *Bioresour Technol*, 2014, 166: 559-565.
- [69] Zhong N, Chandra RP, Saddler JN. Sulfite post-treatment to simultaneously detoxify and improve the enzymatic hydrolysis and fermentation of a steam-pretreated softwood lodgepole pine whole slurry. *ACS Sustainable Chem Eng*, 2019, 7(5): 5192-5199.
- [70] Xie R, Tu MB, Carvin J, et al. Detoxification of biomass hydrolysates with nucleophilic amino acids enhances alcoholic fermentation. *Bioresour Technol*, 2015, 186: 106-113.
- [71] Jiang KK, Kuang H, Qin TT, et al. Recovery of monosaccharides from dilute acid corncob hydrolysate by nanofiltration: modeling and optimization. *RSC Adv*, 2018, 8(23): 12672-12683.
- [72] Carter B, Squillace P, Gilcrease PC, et al. Detoxification of a lignocellulosic biomass slurry by soluble polyelectrolyte adsorption for improved fermentation efficiency. *Biotechnol Bioeng*, 2011, 108(9): 2053-2060.
- [73] Brás T, Guerra V, Torrado I, et al. Detoxification of hemicellulosic hydrolysates from extracted olive pomace by diananofiltration. *Process Biochem*, 2014, 49(1): 173-180.
- [74] Pan LW, He MX, Wu B, et al. Simultaneous concentration and detoxification of lignocellulosic hydrolysates by novel membrane filtration system for bioethanol production. *J Cleaner Product*, 2019, 227: 1185-1194.
- [75] Deng F, Aita GM. Detoxification of dilute ammonia pretreated energy cane bagasse enzymatic hydrolysate by soluble polyelectrolyte flocculants. *Ind Crops Prod*, 2018, 112: 681-690.
- [76] Huang QL, Zhang HR, Xiong L, et al. Controllable synthesis of styrene-divinylbenzene adsorption resins and the effect of textural properties on removal performance of fermentation inhibitors from rice straw hydrolysate. *Ind Eng Chem Res*, 2018, 57(14): 5119-5127.
- [77] López-Linares JC, Romero I, Cara C, et al. Bioconversion of rapeseed straw: enzymatic hydrolysis of whole slurry and cofermentation by an ethanologenic *Escherichia coli*. *Energy Fuels*, 2016, 30(11): 9532-9539.
- [78] Tramontina R, Brenelli LB, Sousa A, et al. Designing a cocktail containing redox enzymes to improve hemicellulosic hydrolysate fermentability by microorganisms. *Enzyme Microb Technol*, 2020, 135: 109490.
- [79] Kondaveeti S, Pagolu R, Patel SKS, et al. Bioelectrochemical detoxification of phenolic compounds during enzymatic pre-treatment of rice straw. *J Microbiol Biotechnol*, 2019, 29(11): 1760-1768.
- [80] Liu ZL, Ma MG. Pathway-based signature transcriptional profiles as tolerance phenotypes for the adapted industrial yeast *Saccharomyces*

- cerevisiae* resistant to furfural and HMF. Appl Microbiol Biotechnol, 2020, 104(8): 3473-3492.
- [81] Liu ZL, Huang XQ, Zhou Q, et al. Protein expression analysis revealed a fine-tuned mechanism of *in situ* detoxification pathway for the tolerant industrial yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Appl Microbiol Biotechnol, 2019, 103(14): 5781-5796.
- [82] Wu J, Zhou YJ, Zhang W, et al. Screening of a highly inhibitor-tolerant bacterial strain for 2,3-BDO and organic acid production from non-detoxified corncob acid hydrolysate. AMB Express, 2019, 9: 153.
- [83] Chen R, Dou J. Biofuels and bio-based chemicals from lignocellulose: metabolic engineering strategies in strain development. Biotechnol Lett, 2016, 38(2): 213-221.
- [84] Yücel HG, Aksu Z. Ethanol fermentation characteristics of *Pichia stipitis* yeast from sugar beet pulp hydrolysate: use of new detoxification methods. Fuel, 2015, 158: 793-799.
- [85] Santos JC, Marton JM, Felipe MGA. Continuous system of combined columns of ion exchange resins and activated charcoal as a new approach for the removal of toxics from sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate. Ind Eng Chem Res, 2014, 53(42): 16494-16501.
- [86] Cheng Z, Yang RD, Liu X, et al. Green synthesis of bacterial cellulose via acetic acid pre-hydrolysis liquor of agricultural corn stalk used as carbon source. Bioresour Technol, 2017, 234: 8-14.
- [87] Tomek KJ, Saldarriaga CRC, Velasquez FPC, et al. Removal and upgrading of lignocellulosic fermentation inhibitors by *in situ* biocatalysis and liquid-liquid extraction. Biotechnol Bioeng, 2015, 112(3): 627-632.
- [88] Liu TJ, Yang L, Liu B, et al. Hydroxycinnamic acids release during bioconversion of corn stover and their effects on lignocellulolytic enzymes. Bioresour Technol, 2019, 294: 122116.

(本文责编 陈宏宇)