

甘蔗生产燃料乙醇发酵技术的进展

黄祖新¹, 陈由强¹, 张彦定¹, 陈如凯², 许莉萍²

(1.福建师范大学生命科学学院, 福建 闽侯 350108; 2.农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点实验室, 福建 福州 350001)

摘要: 乙醇是来自生物质资源的最有发展前景的液态燃料。以甘蔗原料生产燃料乙醇的产出量最具优势, 发酵技术是甘蔗生产燃料乙醇的关键技术。详述了国内外甘蔗生产燃料乙醇的发酵技术的现状及进展。

关键词: 燃料乙醇; 甘蔗; 发酵; 生物质能源

中图分类号: TS262.2; TS261.4 文献标识码: A 文章编号: 1001- 9286(2007) 10- 0081- 04

Advances on Fermenting Technology of Fuel Ethanol Production from Sugarcane

HUANG Zu-xin¹, CHEN You-qiang¹, ZHANG Yan-ding¹, CHEN Ru-kai² and XU Li-ping²

(1.College of Life Science, Fujian Normal University, Minhou, Fuzhou, Fujian 350108; 2.Key Lab of Eco-physiology & Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fuzhou, Fujian 350002, China)

Abstract: The ethanol is a biomass energy liquid fuel which has the most potential future. The sugarcane products fuel ethanol, which is the most advantage. The fermenting technology is key of sugarcane products fuel ethanol. This text discussed the ferment technology of sugarcane produces fuel ethanol and its present conditions and the progress.

Key words: fuel ethanol; sugarcane; fermentation; biomass energy

20 世纪后期, 由于受食糖市场高度不稳定和石油危机的影响, 最大的甘蔗生产国巴西因石油短缺, 开始把目光投向该国丰富的甘蔗资源, 投资 39.6 亿美元的巨额资金实施了“生物能源计划”, 巴西建立糖酒联产机制, 开发蔗汁直接生产燃料乙醇工艺。目前, 该国有 2/3 的甘蔗用来生产燃料乙醇, 已经有燃烧纯乙醇的车辆投入使用, 摆脱了石油长期受制于人的局面, 被誉为“绿色能源之国”。

近年来国际油价大幅度上涨, 能源问题又彰显其重要性。国内外对燃料乙醇生产的新技术的研究甚为活跃。发酵技术无疑是甘蔗生产燃料乙醇的关键技术。以下介绍国内外甘蔗生产燃料乙醇的发酵技术的现状及发展趋势。

1 选育甘蔗发酵生产燃料乙醇的优良性能的酵母

我国生产甘蔗都是地处热带及亚热带地区, 环境温度较高, 普通酵母菌发酵受到温度的影响, 导致酒精发酵效率的降低。蔗汁高浓度发酵技术是生产燃料乙醇发酵工艺的重大进步技术之一。它提高了发酵强度,

在发酵罐体积不变的条件下, 提高蔗汁发酵酒精浓度。其次, 大幅度降低能耗和水耗。高浓度发酵技术使用耐高温、耐高浓度酒精酵母是关键。因此, 选育耐高温、耐高浓度发酵的酵母, 缩短发酵时间, 提高蔗汁发酵酒精浓度, 提高发酵效率, 降低发酵成本, 以达到解决当前生物质原料低成本、大规模生产燃料酒精的目的。

1.1 传统诱变筛选法

通过传统诱变技术处理酵母的原始菌株, 对诱变后的菌株进行筛选目的菌株。传统诱变产生的效果往往不显著。如分离耐乙醇的突变菌株, 在分离平板上加不同浓度的乙醇, 从而选择生长速度快的菌落。但是, 用上述方法分离到的突变菌株不一定能在高浓度的乙醇中保持较高的发酵速度。主要是乙醇抑制酵母生长和抑制酵母的乙醇发酵的机制是不相同的。

1.2 细胞融合法

由于工业用酵母菌株优良性能特性的遗传控制背景十分复杂, 同时长期人为培养使用等种种原因, 很多菌株已丧失产生孢子能力或成为孢子不育株。这使得传

基金项目: 农业部“948”项目资助 项目号: 2006G37。

收稿日期: 2007- 05- 29

作者简介: 黄祖新(1956-), 男, 福建福州人, 大学本科, 高级工程师, 发表论文 20 余篇。

统的诱变杂交育种和基因工程改造育种手段都受到不同程度的限制。从技术成熟度和成功几率看,细胞融合法较为适宜。特别是原生质体融合技术可克服细胞壁的天然屏障,排除接合型的限制,实现多基因重组,并且可以直接采用生产性能好的菌株作为亲株。原生质体融合技术是国内外选育优良酵母比较常用的研究方法。原生质体融合选育工作分为几个试验阶段: 选择出发菌株; 进行原生质体融合; 融合菌株评价与选育; 融合菌株发酵性能试验; 融合菌株遗传学试验。据研究报道^[1]: 日本三井造船株式会社用细胞融合法选育酵母新菌株。亲株酿酒酵母 TJ1 在 35℃ 下发酵良好,具有絮凝性; 另一亲株 N1 酿酒酵母耐高温和耐乙醇性均强,但无絮凝性。将上述两亲株通过原生质体融合后,获得融合菌株 AM12 兼有两亲株的特性,在 72 h 能生成 20 % 的乙醇,发酵速度比原亲株 N1 快 1 倍。融合菌株 AM12 具有耐高温,耐乙醇性和絮凝性。

1.3 基因工程改造法

由于发酵产物乙醇及次级产物对酵母细胞的毒性,酵母细胞内的关键酶类的活性,酵母对底物利用的局限性,副产物的产生等种种原因,使得酵母细胞发酵产生乙醇产率不高。利用 DNA 重组技术,通过操纵酵母细胞内的酶,转运及调控功能,对细胞内特定生化反应进行修饰,以定向改变产品的生成或细胞性能,以达到提高酵母细胞发酵乙醇的产率。这已成为酵母发酵生产乙醇的世界性研究热点。

1.3.1 引入外源基因构建基因工程菌

甘蔗渣水解发酵生产乙醇是研究的热点。甘蔗渣富含纤维素和半纤维素,木糖是半纤维素水解液除葡萄糖外另外一个主要成分。如何将木糖转化成乙醇是实现甘蔗渣生物转化成乙醇的关键环节。袁振宏等^[2]研究采用方法克隆得到树干毕赤氏酵母(*pichia stipitis*)木糖醇脱氢酶基因 *xyl2*, 与克隆得到的休哈塔假丝酵母(*candida shehatae*)木糖还原酶基因 *xyl1*,一起连接到酵母表达载体的强启动子 *GALF*, 得到融合表达载体 *PYESZ-P12*, 通过醋酸锂转化法将 *PYESZ-P12* 转入酿酒酵母(*S. cerevisiae*)构建成酿酒酵母重组工程菌发酵木糖产生乙醇,木糖利用率高达 81.3 %。纤维素分解过程常因纤维素酶类中的 β -葡萄糖苷酶含量低,纤维二糖的积累而抑制纤维素的分解。洪剑辉等^[7]通过 PCR 技术获得 β -葡萄糖苷酶基因 *bgl*, 经过 *EcoR*, *BanH* 双酶切,并和经相同酶切的穿梭表达载体 *pYX212* 连接,构建了重组质粒 *pYX-Sbgl*, 转化酿酒酵母 *W303-1A*, *bgl* 基因获得活性表达, β -葡萄糖苷酶酶活达到 0.504 u/mL, 酵母基因工程菌能以纤维二糖作为唯一碳源,进行 SSF

法发酵纤维素底物生成乙醇。

1.3.2 基因敲除技术改变代谢途径^[3]

在酵母发酵生产乙醇过程中,产生副产物甘油的消耗碳源在整个发酵过程约占 4 %。主要原因在厌氧条件下,酵母细胞呼吸链不起作用,为维持细胞内氧化还原电势的平衡, *NADH* 还原成 *NAD*⁺ 只能通过生成甘油醇的途径。通过酵母细胞的氨基酸合成过程中,来改变辅助因子(*NAD*⁺)的需求,达到转移代谢途径降低甘油形成。据研究报道: 在酿酒酵母野生型的菌株中存在由 *GDH1* 基因编码的 *NADPH* 依赖型的谷氨酸脱氢酶催化完成的反应: α -酮戊二酸 + *NH*₄⁺ + *NADPH* → 谷氨酸 + *NADP*⁺; 而酿酒酵母中存在另外两种分别由 *GDH2* 和 *GDH3* 基因编码的 *NADH* 依赖型的谷氨酸脱氢酶催化完成的反应: α -酮戊二酸 + *NH*₄⁺ + *NADH* → 谷氨酸 + *NAD*⁺, 因此,构建了一株敲除 *GDH1* 基因,过量表达 *GDH2* 基因的菌株 *TN19*, 其结果产物甘油的产率降低了 38 %,乙醇的产率提高 10 %。酿酒酵母还存在另外一种合成谷氨酸的系统。 2α -酮戊二酸 + 谷氨酰胺 + *NADPH* → 谷氨酸 + *NADP*⁺(由 *GLT1* 基因编码的谷氨酰氨合酶催化); 谷氨酸 + *NH*₄⁺ + *ATP* → 谷氨酰胺 + *ADP* + *Pi*(由 *GLN1* 基因编码的谷氨酰氨合酶催化)。同理构建了一株敲除 *GDH1* 基因,过量表达 *GLT1* 和 *GLN1* 基因的菌株,也可以强化铵盐的代谢流来达到提高乙醇产量的目的。利用基因敲除技术国内研究报道有: 史文慧等^[4]和赵丽娟等^[9]通过 PCR 技术获得一段带有筛选标识和酵母 *ADH2* 基因同源区域的目的基因,通过醋酸锂转化法,使目的基因与酵母 *ADH2* 基因发生 ORF 同源重组,使 *ADH2* 基因失去作用,获得一株 *ADH2* 基因被删除的突变单倍体菌株,其不利用乙醇做碳源,在发酵后期从而减少了乙醇的消耗,乙醇产率得以提高。

2 固定化酵母连续发酵技术

固定化细胞技术为一项先进的生物技术,该技术在近代微生物发酵工业上的应用和发展,大大提高了酶促反应效率,并能进行自动化、管道化等连续化生产。固定化酵母连续发酵技术就是将发酵性能优良酵母固定化,应用于传统酒精发酵工业^[6]。利用发酵优良性能的酵母,以新型的载体进行固定,采用固定化酵母进行连续发酵。因载体内包埋着大量高活性优良酵母菌种,酵母活性高、繁殖速度快、不需任何菌种生长适应期。其对数生长期长,载体内的酵母不断地大量向外繁殖活性高的游离酵母,载体在发酵罐内形成一个强大的酵母种源。在适宜的工艺条件下不断繁殖发酵。与传统的发酵技术相比,省去菌种逐级扩大培养的工段,避免因培

过程带来的染菌机会, 发酵罐内酵母数高达 $1.5 \sim 2.6$ 亿个 /mL, 发酵适应能力强, 发酵速度快而彻底, 具有耐高酒精度 ($10\% \sim 12\%$ vol)、低残糖 (残余总糖 $1.2\% \sim 1.8\%$)、耐高渗 (28 Bx 直接发酵)、耐高温 ($33 \sim 37^\circ\text{C}$)、pH 适应范围广的优点。固定化酵母连续发酵法即可满足甘蔗生产燃料乙醇的高效发酵要求。但因其使用寿命长, 仍然存在着染菌问题。一旦染菌, 将给酒精生产带来严重危害, 如酵母活性降低, 耗糖缓慢, 醪液酸度上升, 酒精度下降等。解决固定化酵母发酵过程中的染菌问题非常关键。

3 甘蔗生产燃料乙醇的发酵新技术

甘蔗发酵生产酒精从时间连续性上可以将发酵技术划分为间歇发酵和连续发酵。人们不断地进行发酵技术的改造革新, 其目的是提高酒精转化率和发酵速率, 以及有利于发酵废液的再利用资源化。目前, 甘蔗生产燃料乙醇比较成熟的发酵新技术有:

3.1 酵母细胞再循环法发酵生产酒精

酵母细胞再循环法发酵生产酒精是最为可行的技术之一。利用高絮凝性酵母, 在短时间发酵后, 酵母沉降于发酵罐底部, 采用高速离心机分离回收酵母, 返回发酵罐供循环发酵使用。酵母细胞再循环法可节省酵母培养工序, 减少杂菌污染, 提高发酵罐中酵母的浓度, 发酵直接进入主发酵期, 缩短发酵周期 ($20 \sim 24$ h 发酵时间), 提高发酵罐利用率, 达到增产降耗。瑞典 Alfa-Laval AB 实验室研究开发糖蜜连续发酵生产酒精的 Biotil 法^[7], 利用高速离心机高效分离回收酵母, 使用酵母回用技术, 酒精产率可提高 5% 。

3.2 抽提与发酵并行法

巴西直接利用甘蔗发酵生产酒精的方法, 即将整株甘蔗茎洗净, 切成片段, 烘干待用, 生产时直接加水, 接种酵母进行发酵后, 蒸馏生产酒精。抽提与发酵并行法生产时一边通过水抽提甘蔗片段中的糖分, 酵母一边发酵糖分。省去压榨甘蔗获取蔗汁的工序, 节约设备投资, 且可以贮存甘蔗, 实现甘蔗生产燃料乙醇的全年均衡生产。

3.3 减少乙醇抑制发酵法^[9]

酒精发酵法是依赖于酵母发酵生产酒精, 酒精发酵过程酒精对酵母发酵产生抑制作用, 在酒精发酵过程中随酒精的生成不断将酒精及时从发酵醪中分离出, 达到去除反应产物的阻遏抑制, 以提高酒精的转化率。从发酵醪中分离酒精的措施有几种: 真空蒸发法; 闪蒸式发酵法; 溶剂抽提法; 吸附乙醇法; 选择性膜分离法。其中, 具有发展前景的是选择性膜分离乙醇技术, 发酵生产区域分为透析区和发酵区, 发酵区有固定化酵

母, 采用培养基或发酵未完全的醪液由泵送入透析液区通过透析膜, 除去乙醇和其他次级产物后, 又回到发酵区, 如此循环, 直至发酵完全后醪液才排出。其优点: 酵母固定化省去酵母培养繁殖所需的养料; 可以提高发酵液的发酵基质糖的浓度; 可以连续排出乙醇和其他次级产物; 排出液中没有酵母细胞, 提高酵母发酵力; 培养基或透析液进入发酵区得到灭菌, 减少染菌几率。

4 甘蔗渣分解生产燃料酒精技术

4.1 巴西 Dedini 快速水解 (DHR) 方法^[9]

由巴西 Dedini, copersugars (联产糖-乙醇工厂) 合作并出资研究, 已建成 $5\text{ m}^3/\text{d}$ 蔗渣快速水解中试工厂, 处理工艺为以乙醇-水的混合物作为溶剂; 加稀硫酸 $0.1\% \sim 0.25\%$ 作反应催化剂, 在 $170 \sim 185^\circ\text{C}$, $2.0 \sim 2.5\text{ MPa}$ 的条件下, 在水解锅煮 $10 \sim 12\text{ min}$ 后, 总还原糖转化率为 59% , 水解液含糖 80 g/L (该水解锅能力为 20 kg/h 粗蔗渣), 再用酵母转化为乙醇, 乙醇连续发酵罐为 10 L 。中试产率: $1\text{ t } 50\%$ 蔗渣产乙醇 100 L 左右, 成本 427.4 美元 / m^3 乙醇。

4.2 加拿大 Ecpulp 工艺^[10]

加拿大 Lignot 公司与澳大利亚 SRI 合作以蔗渣为原料建立中试生产装备, 特点是: 用有机溶剂——乙醇在 185°C , 2.5 MPa 压力下蒸煮脱木质素及半纤维素, 用有机溶剂乙醇溶解木质素, 能使木质素不被过度破坏而保持其活性状态, 而更好地利用其生产高附加值产品。除木质素和半纤维素后的浆料, 更适合生产高质量纸或更利于水解变糖。蒸煮后脱水的净纤维浆料, 可以再水解获得六碳糖发酸制乙醇, 或用此净纤维浆造纸。

4.3 蔗渣二段水解制糠醛及酒精工艺

广州甘蔗糖业研究所 (即前轻工业部甘蔗糖业研究所) 开展过 '蔗渣二段水解制糠醛及酒精' 的中间工厂试验^[11]。蔗渣二段水解制糠醛及酒精项目的规模为: 耐酸水解锅容积 700 kL 2 个, 200 kL 1 个; 2.7 m^3 酒精发酵罐 4 个; 蒸馏塔: 粗馏塔直径 250 cm , 16 层; 精馏塔直径为 200 cm , 49 层; 后蒸馏塔直径 200 cm ; 每日能产酒精 200 L 。中试结果, 1 t 干蔗渣产糠醛 60 kg , 酒精 80 kg 。采用稀酸串连多级水解 ($4 \sim 5$ 级) 蒸汽消耗: 糠醛每吨耗汽 50 t , 酒精每吨耗汽 5 t 。

4.4 美国的蔗渣分解生产酒精工艺^[10]

1980 年, 美国普度大学 Tsao 教授主持的再生资源实验室 (LORRE) 研究成功了采用 D-木糖异构酶将木糖异构化成木酮糖, 再用酵母将木酮糖发酵生成酒精, 为大规模利用半纤维素生产酒精开辟了新途径。美国 BC International 公司计划投资 9000 万美元, 建立一个年产酒精 7600 万 L 的燃料酒精生产厂。以甘蔗残渣为

原料,采用稀硫酸水解,其核心技术是佛罗里达大学开发的转基因的 E.coli 菌株,可发酵水解液中的全部单糖(包括五碳糖和六碳糖)。

4.5 日本超级甘蔗生产酒精工艺

日本朝日公司与日本农业研究中心合作研究的超级甘蔗,这种超级甘蔗的正式名称是“高生物质甘蔗”,每公顷土地将出产 37.4 t 超级甘蔗,可以加工出 7.1 t 糖、4.3 kL 乙醇和 24 t 甘蔗渣。而对于普通品种而言,这 4 个数字分别是 17.4 t、6.9 t、1.4 kL 和 7.8 t。日本 3 家公司建成一个新型的拥有最先进设备的酒精厂^[10]。他们将蔗渣粉碎,然后用产生纤维素酶的细菌处理,将纤维素分解为糖,再用固定化酵母连续发酵生产酒精。每天利用 720 kg 甘蔗渣可以生产 200 L 的酒精。

5 能源甘蔗清汁发酵燃料乙醇的清洁生产新工艺

新工艺流程:



能源甘蔗清汁发酵燃料乙醇的新工艺是以酒精清洁生产为出发点,排除甘蔗混合汁中影响正常发酵的非糖分胶体物质及无机固体悬浮物,防止其经高温蒸馏形成难降解的化合物,以利于酵母回收循环使用时正常发酵。采用甘蔗清汁作为发酵基质,连续发酵缩短了发酵周期,有利于进行高浓度发酵,提高发酵液酒精浓度。新工艺产生的酒精废液具有良好的生物可降解性,经生物处理可达标排放,酒精废液可浓缩后制作动物蛋白饲料,解决生物质原料发酵生产酒精的废液污染的难题。蔗渣可以作为燃料发电或生产纸浆,蔗汁的滤泥可作为

有机肥料,各种副产物进行综合利用和深加工,做到“榨干吃尽”,将整体预防的环境战略持续应用于酒精生产过程和酒精产品中,以期减少对人类和环境的危害。福建师范大学生命科学学院与农业部甘蔗重点实验室通过几年的研究,成功开发出能源甘蔗清汁发酵燃料乙醇的新工艺,已获得国家发明专利。该工艺生产技术已经成熟,具有明显经济效益,可以推广利用。

参考文献:

- [1] 陈陶声.传统和最新的酒精生产技术[M].北京:化学工业出版社,1990.
- [2] 袁振宏,潘亚平,刘继开,等.代谢木糖和葡萄糖的重组酿酒酵母的构建[J].微生物通报,2006,33(3):104-108.
- [3] 尤蓉.燃料乙醇的代谢工程研究进展[J].微生物通报,2005,32(3):113-116.
- [4] 史文慧,林会兰,张广,等.用分子生物学法提高酵母菌产乙醇的研究[J].工业微生物,2002,32(1):31-34.
- [5] 赵丽娟,王德显,程玉来,等.利用基因敲除技术破坏酿酒酵母乙醇脱氢酶基因的研究[J].食品与发酵工业,2005,31(11):30-33.
- [6] 陈学鹏.固定化酵母在(糖蜜)酒精连续发酵生产中的应用[J].酿酒科技,2001,(2):43-44.
- [7] 程曦(译).Biosil 法-一个连续发酵蒸馏系统[J].甘蔗糖业,1992,(3):52-55.
- [8] 梁刚.酒精发酵中代谢终产物抑制消除方法进展[J].酿酒科技,1999,(2):38-40.
- [9] 保国裕.依靠新技术提高用甘蔗生产燃料酒精的经济效益[J].广西蔗糖,2004,(4):46-48.
- [10] 黄祖新,陈由强,陈如凯,等.甘蔗渣的酶降解研究进展[J].甘蔗,2005,(4):52-56.
- [11] 保国裕.蔗渣二段水解制低聚木糖及酒精的探讨[J].广西蔗糖,2001,(3):25-29,41.

为酿酒行业提供各种规格的鲜人参

每瓶酒里装入一棵鲜人参,成本几角钱(如 180~200 棵 1 公斤的,每棵成本 0.2 元),可使每瓶酒的售价提高 2~5 元。同时出售各种规格的干品人参和大规格的鲜人参。购量大价格优惠,来场购货或场里去人送货均可,有意者请来函来电联系。

供货单位:吉林省抚松县西岗乡东江沿爱林参场

场 长:吕启东

电 话:(0439) 6318265 (0) 13644393406

邮 编:134504