

利用木质纤维素生产燃料酒精的研究进展

张继泉,王瑞明,孙玉英

(山东轻工业学院食品工程系,山东 济南 250100)

摘要: 利用木质纤维素生产燃料酒精可改善能源保障,实现能源供应的可持续发展,同时拉动农业及其他相关行业的经济发展。木质纤维素中含有丰富的可发酵生成乙醇的纤维素和半纤维素,利用产纤维素酶的微生物或纤维素酶(C_x酶、C₁酶、 β -葡萄糖苷酶)将纤维素水解成可发酵性糖,再通过酵母发酵生成乙醇。常用菌株有热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*),能分解纤维素,但乙醇产率较低(50%)。热硫化氢梭菌(*Clostridium thermohydrosulphairum*),不能利用纤维素,但乙醇产率相当高,将两株菌混合发酵,产率可达70%。发酵方法有直接发酵法、间接发酵法、混合菌种发酵法,同时糖化发酵法(Simultaneous Saccharification and Fermentation)和非等温同时糖化发酵法(Nonisothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation)以及固定化细胞发酵法等。(庞晓)

关键词: 燃料乙醇; 木质纤维素; 木糖异构酶

中图分类号: TS262.2 2Q93

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2003)01-0039-04

Research on the Production of Fuel Alcohol by Lignocellulose

ZHANG Ji-quan, WANG Rui-ming and SUN Yu-ying

(Food Engineering Department of Shandong Light Industry Academy, Ji'nan, Shandong 250100, China)

Abstract: The production of fuel alcohol by lignocellulose is an effective way to improve energy supply structure, realize sustainable development of energy supply and advance agricultural development and the relative industries. Lignocellulose contains affluent cellulose and hemicellulose which change into alcohol through fermentation. By the application of microbes producing cellulase or cellulase (C_xenzyme, C₁ enzyme, β -glucosaccharase), lignocellulose hydrolyzed into fermentative sugar and then changed into alcohol by yeast fermentation. The usual strain was *Clostridium thermocellum* which could decompose cellulose but the alcohol output was relatively low (50%). *Clostridium thermohydrosulphairum*, which could not decompose cellulose but made higher alcohol output. And the mixed fermentation of the two strains could make 70% alcohol output. The fermentation methods included direct fermentation, indirect fermentation, mixed microbes fermentation, simultaneous saccharification and fermentation, nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation, and immobilized cell fermentation etc. (Tran. by YUE Yang)

Key words: fuel alcohol; lignocellulose; xylose isomerase

随着人口的迅猛增长,资源危机、食物短缺、环境污染等问题越来越严重地困扰着人类社会,引起了人们广泛的关注^[1-4]。地球上每年大约形成1000亿吨植物有机物,是自然界分布最广、含量最多、价格低廉,而又未得到充分利用的可再生资源^[5,6],除少量用于造纸、建筑、纺织等行业或用作粗饲料、薪柴外,大部分未被有效利用,而白白烂掉或烧掉,有些还造成环境污染(例如焚烧)。通过生物技术将这些纤维废弃物转化为能源、化工产品等,可一举数得,同时缓解上述几个问题,因而成为世界各国近年来可变性燃料乙醇和汽油以一定比例混配形成的一种汽车燃料,乙醇的燃料辛烷值高于直馏汽油^[7],在炎热高温的天气里,汽油里不允许添加芳香烃添加剂,而要添加10%无水酒精来提高其抗爆性能。

乙醇(俗称酒精)是一种重要的工业原料,广泛应用于化工、食品、饮料工业、军工、日用化工和医药卫生等领域,还能作为能源工业的基础原料、燃料(燃烧值为26900 kJ/kg)。当今世界面临着环境与发展的挑战,为避免交通给城市带来的污染,要求使用无铅汽油的呼声日益高涨^[7]。将乙醇进一步脱水再添加适量汽油后形成变性燃料乙醇,在国外乙醇被视为替代和节约汽油的最佳燃料,具

有廉价、清洁、环保、安全、可再生等优点。作为一种生物能源,乙醇有望取代日益减少的化石燃料(如石油和煤炭)。然而,目前汽油主要还是以石油为原料通过化学工艺生产,这对于经济的可持续性发展战略是不利的。因此,世界上许多经济发达国家都注重以碳水化合物为原料发酵生产乙醇的生物技术开发,并期望由此稳定能源供应,改善能源保障,拉动农业及其他相关传统经济的发展。

1996年,美国国家地质综合考察部的一份研究报告^[8]指出:作为汽油增氧剂的MTBE(甲基叔丁基醚)在减少空气污染的同时却增加了水质污染。为此,1999年美国环保局与国会合作,针对MTBE对水资源的污染,研究制订了2002-2010年期间新的国家“清洁燃料替代计划”,2000年3月21日,美联邦政府发表了取消使用MTBE的声明。推广使用车用乙醇汽油,不但在一定程度上可以缓解石油供求的矛盾,同时还有效地降低了汽车尾气中的有害气体排放,改善了生态环境和空气质量,经济效益显著。福特公司已于1998年率先推出15万辆既可以乙醇为燃料,也可以汽油为燃料的通用型汽车,这意味着乙醇将成为一种越来越重要的燃料。

收稿日期:2002-07-17

作者简介:张继泉(1975-),男,山东人,助理工程师,硕士研究生在读,主要从事微生物酶技术的研究,发表论文10余篇。

在世界范围内,粮食供应仍是一大问题。以粮食为原料生产燃料乙醇必将受到限制^[9]。在国内,随着粮食价格的逐渐放开,以粮食为原料的乙醇发酵工业成本剧增,生产难以为继,急需寻找能取代粮食的廉价原料^[10]。从开辟新能源和解决环境污染考虑,以废纤维为原料生产乙醇的研究近年来日益受到重视。

1 木质纤维素发酵生产乙醇的原理

所有植物来源的木质纤维素均含有丰富的纤维素、半纤维素和木质素^[11-13],纤维素和半纤维素可作为乙醇发酵的原料^[14](见图1)。

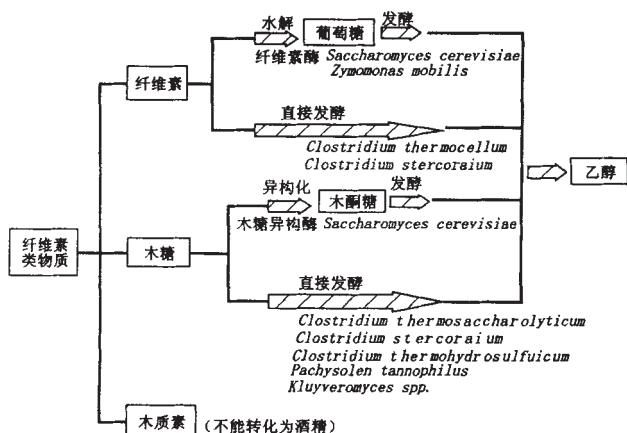


图1 木质纤维素发酵生产乙醇的路线

纤维素是一种有100~1000个 β -D-吡喃型葡萄糖单体以 β -1,4-糖苷键连接的直链多糖,多个分子平行紧密排列成丝状不溶性微小纤维。在工业上,纤维素经酸解或酶解预处理后,释放出的葡萄糖可进入乙醇发酵途径。半纤维素是由多种多糖分子组成的支链聚合物,不同来源的半纤维素其单糖的组成各异。经测算,木质纤维素原料中半纤维素组分的有效利用有可能使乙醇燃料的生产成本降低25%,这显然应当归功于D-木糖。木糖是自然界中含量仅次于葡萄糖的糖分,仅仅从美国垃圾场的废纸和垃圾中微生物转化的残留糖分,每年就可生产4亿吨乙醇,这相当于在输气管线中以10%份量混合的燃料乙醇(由谷物发酵生产)的10倍量^[9]。

利用产纤维素酶的微生物或纤维素酶先将纤维素水解成可发酵性糖,再利用酵母将其发酵成乙醇。产纤维素酶的微生物有真菌、酵母菌和细菌。典型的真菌产纤维素酶是由葡聚糖内切酶(E.C.3.2.1.4,也称 C_x 酶)、葡聚糖外切酶(E.C.3.2.1.91,也称 C_1 酶)、 β -葡萄糖苷酶(E.C.3.2.1.21,也称CB酶或纤维二糖酶)3个主要成分组成的诱导型复合酶系。EG和CBH主要溶解纤维素,BG主要将纤维二糖转化为葡萄糖,当3个主要成分的活性比例适当时,就能完成纤维素的降解。一般地,嗜热厌氧细菌在生长速度和纤维素代谢速度上比其他菌株快,同时它所产生的纤维素酶的稳定性也有很大的提高。

2 木质纤维素发酵生产乙醇的工艺

2.1 木质纤维素的预处理

由于木质纤维素的组成成分复杂、稳定,使得其生物降解难于迅速进行。依据波尔屯克模型,在秸秆类纤维素的微小构成单位周围被半纤维素,其次是木质素层的鞘所包围。木质素虽然对纤维素分解物质(如酶等)反应没有阻碍作用,但它阻止纤维素分解物对纤维素的作用,因此人们不得不借助化学的、物理的方法进行预处

理,使纤维素与木质素、半纤维素等分离开,使纤维素内部氢键打开,使结晶纤维素成为无定型纤维素,以及进一步打断部分 β -1,4-糖苷键,降低聚合度;半纤维素被水解成木糖、阿拉伯糖等单糖。经预处理后,有的纤维素的酶法降解速率甚至可以与淀粉水解相比。常见的预处理方法见表1。

表1 木质纤维素材料的几种预处理方法

方法	例 证
热机械法	碾磨,粉碎,抽提
自动水解法	蒸汽爆破(steam explosion)、超临界 CO_2 爆破
酸处理法	稀酸(H_2SO_4 , HCl),浓酸(H_2SO_4 , HCl),乙酸等
碱处理法	$NaOH$,碱性过氧化氢,氨水
有机溶剂处理法	甲醇,乙醇,丁醇,苯
生物法	木素过氧化酶,木糖依赖过氧化酶

2.2 纤维素发酵生产乙醇

纤维素是一种有100~1000个 β -D-吡喃型葡萄糖单体以 β -1,4-糖苷键连接的直链多糖,多个分子平行紧密排列成丝状不溶性微小纤维。在工业上,纤维素经酸解或酶解预处理后,释放出的葡萄糖可进入乙醇发酵途径。

2.3 木糖发酵生产乙醇

木糖过去一直被认为不能被微生物发酵成乙醇。Karczewski于1959年第一次提出了用木糖发酵乙醇^[15],但这个发现未引起人们的足够重视。直到1980年,Wang等人提出,木糖可被一些微生物发酵成乙醇。此后,在国际上掀起了一股戊糖乙醇发酵菌种的研究热潮,迄今为止已发现100多种微生物能代谢木糖发酵生成乙醇^[5],包括细菌、真菌、酵母菌。其中酵母的木糖发酵能力最强,目前人们研究最多且最有工业应用前景的木糖发酵产乙醇的微生物有3种酵母菌种即管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)、树干干赤酵母(*Pichia stipitis*)和休哈塔假丝酵母(*Candida shechatae*)。这些菌属对木糖代谢的途径^[14]见图2。

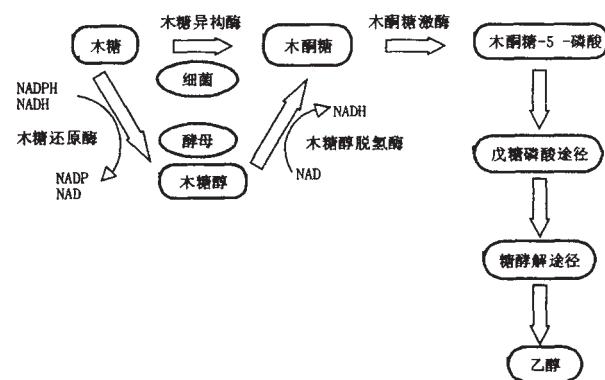


图2 酵母菌属的木糖代谢途径

2.4 发酵方式

2.4.1 直接发酵法

本方法的特点是基于纤维分解细菌直接发酵纤维素生产乙醇,不需要经过酸解或酶解前处理过程。吕福英等^[15]分离出能直接发酵纤维素生产乙醇的高纯富集物,利用其能直接将木质纤维素材料发酵成乙醇。该工艺方法设备简单,成本低廉,但乙醇产率不高,产生有机酸等副产物。利用混合菌直接发酵,可部分解决这些问题。例如热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)能分解纤维素,但乙醇产率较低(50%),热硫化氢梭菌(*Clostridium thermohydrosulphircum*)不能利用纤维素,但乙醇产率相当高,进行混合发酵,产

率可达70%,提高乙醇/乙酸比值10倍以上。

2.4.2 间接发酵法

先用纤维素酶水解纤维素,酶解后的糖液作为发酵碳源。乙醇产物的形成受以下因素限制:末端产物抑制,低细胞浓度以及基质抑制。为了克服乙醇产物的抑制,必须不断的从发酵罐中移出,采取的方法有:减压发酵法、快速发酵法、阿尔法-拉伐公司的Biotile法。对细胞进行循环利用,可以克服细胞浓度低的问题。筛选在高糖浓度下存活并能利用高糖的微生物突变株,以及使菌体分阶段逐步适应高基质浓度,可以克服基质抑制。

2.4.3 混合菌种发酵

一般的废弃纤维水解液都是葡萄糖、木糖、阿拉伯糖等单糖和寡糖混合物。杨斌^[16](1997年)等针对多碳源发酵乙醇的菌株不多,工艺及设备满足代谢上有一定困难,碳源利用率低,酒精产率低等问题,提出了采用气升柱发酵木糖和溢流柱发酵葡萄糖的串联发酵工艺。串联发酵是首先经*P. stipitis*酵母的限氧发酵后,再经*S. cerevisiae*的厌氧过程而结束。

2.4.4 同时糖化发酵法(SSF法)

由于纤维素水解和乙醇发酵所需的酶通常来自不同的微生物,最适反应条件各不相同。所以,最初的水解和发酵过程一般是分开进行的。在水解系统中,为了克服可溶性糖的反馈抑制作用,要么增加纤维素酶的用量,要么扩大容积降低反应液中可溶性糖的浓度。这都要增加酶解过程的生产成本。为了克服反馈抑制作用,Gauss等^[3](1976年)提出了在同一个反应罐中进行纤维素糖化和乙醇发酵的同步糖化发酵法^[17-24](Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)。这样纤维素酶对纤维素的酶水解和发酵糖化过程在同一装置内连续进行,水解产物葡萄糖由菌体的不断发酵而被利用,消除了葡萄糖因基质浓度对纤维素酶的反馈抑制作用。在工艺上采用一步发酵法,简化了设备,节约了总生产时间,提高了生产效率,但也存在一些抑制因素,如木糖的抑制作用、糖化和发酵温度不协调等。

纤维素类物质中大多含有木质素、半纤维素。木质素在预处理过程中绝大部分已经被除去。但半纤维素产生的木糖存留在反应液中,当浓度达到5%时,木糖对纤维素酶的抑制作用可达10%。消除木糖抑制的方法是利用能转化与利用木糖为乙醇的菌株,如,假丝酵母、管囊酵母等。现在研究较多的是能用利用葡萄糖与利用木糖的菌株混合发酵,与单纯利用葡萄糖发酵菌和单纯利用戊糖发酵菌相比,乙醇的产量分别提高30%~38%和10%~30%。

2.4.5 非等温同时糖化发酵(NSSF法)

在纤维素酶糖化过程中,纤维素酶的最适温度为50℃左右,而酵母发酵的控制温度是31~38℃。ZHANGWEN WU等^[25](1998年)提出了利用非等温同时糖化发酵法(Nonisothermal Simultaneous Saccharification and Fermentation, NSSF)生产乙醇的工艺流程(见图1)。利用NSSF法很好地解决了纤维素酶糖化与酵母发酵两个过程中温度不协调的矛盾。图3为NSSF法的流程图。

2.4.6 固定化细胞发酵

固定化细胞发酵具有能使发酵器内细胞浓度提高,细胞可连续使用,使最终发酵液乙醇浓度得以提高。研究最多的是酵母和运动发酵单孢菌的固定化。常用的载体有海藻酸钠、卡拉胶、多孔玻璃等。研究结果表明,固定化运动发酵单孢菌比酵母更具优越性。最近有将微生物固定在汽液界面上进行发酵的研究报道,微生物活性比固定在固体介质上高。固定化细胞的新动向是混合固定细胞发酵,如酵母与纤维二糖酶一起固定化,将纤维二糖基质转化成

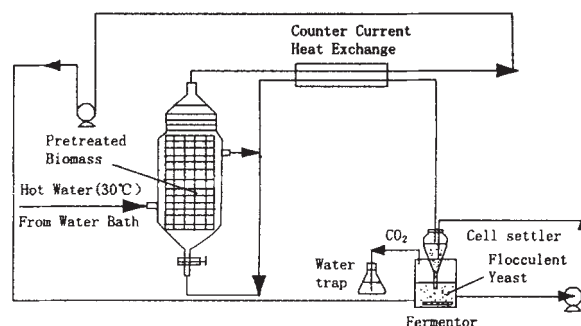


图3 NSSF法生产乙醇的流程图

乙醇,此法引人注目,被看作是纤维素生产乙醇的重要阶段。夏黎明等^[26]采用海藻酸钠包埋进一步增殖培养,将休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae* R)的细胞密集固定在凝胶珠表层,大大减小了传递阻力,为该菌的‘半好气’发酵创造了有利条件。固定化增殖酵母能利用己糖和戊糖及80 g/L的混合糖(己糖和戊糖各占一半),经12 h发酵,糖的利用率为90.5%以上(而相同条件下的游离细胞发酵需要48 h)。邓旭等^[27](1995年)提出了利用固定化啤酒酵母和固定化毕赤酵母串联发酵混合糖制取酒精这一种具有工业前景的新工艺,它实现了发酵过程的连续化操作,又消除了葡萄糖效应对木糖发酵的影响,保证了木糖发酵与葡萄糖发酵在串联流程中的同步性,从而大大缩短了混合糖发酵的周期,保证了整体发酵速率。同时,邓旭等^[28](1997年)还对固定化啤酒酵母和固定化毕赤酵母在两个串联的固定床内连续发酵由葡萄糖和木糖组成的混合糖制取酒精的过程,建立了连续发酵的非结构动力学模型,并成功地引入了一个综合考虑颗粒相内外传质的总有效因子简化模型的计算。

3 展望

3.1 基因技术对发酵木糖菌株进行改良

针对木质纤维素发酵生产酒精中木糖不能被有效地转化成乙醇的问题,鲍晓明(1999年)等^[29]采用PCR技术克隆*Clostridium thermohydrosulfuricum*木糖异构酶基因xylA,成功转移至酿酒酵母H158受体菌中,得到重组酵母转化子H612,实现了在酿酒酵母中得到木糖异构酶的活性表达,为进一步在酿酒酵母中建立新的木糖代谢途径打下了基础。山东大学的汪天虹(1999年)等^[30]采用双载体系统,将携带有瑞氏木霉木糖脱氢酶基因的表达式粒pAJ401-xdh1转化成已带有树干毕赤氏酵母木糖还原酶基因的重组酿酒酵母H475,构建了同时带有毕赤氏酵母木糖还原酶基因和瑞氏木霉木糖醇脱氢酶基因的重组酿酒酵母HX1。

3.2 对产纤维素酶菌株的改良

当前限制木质纤维素发酵生产燃料乙醇的主要原因是成本太高,降低成本的主要措施是降低纤维素酶的价格,对纤维素酶生产菌株进行改良以降低纤维素酶的价格是当务之急。

4 结论

木质纤维素发酵生产燃料酒精的研究已经成为全世界研究的热点课题之一。随着液体燃料乙醇的广泛应用,利用木质纤维素发酵生产乙醇不但可以生产出辛烷值高、对大气无污染的液体燃料乙醇,而且还可以增加社会效益,改善环境。

参考文献：

- [1] 黄忠乾,龙章富,彭卫红.农作物秸秆资源的综合利用[J].资源开发与市场,1999,15(1):32-34.
- [2] Jeewon Lee. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol[J].Journal of Biotechnology,1997,(56):1-24.
- [3] 曲音波,高培基.造纸厂废物发酵生产纤维素酶、酒精和酵母综合工艺的研究进展[J].食品与发酵工业,1993,19(6):62-65.
- [4] NICK NAGIE, KELLY IBSEN, EDWARD JENNINGS. A process economic approach to develop a dilute-acid cellulose hydrolysis process to produce ethanol from biomass[J].Applied Biochemistry and Biotechnology,1999,(77-79):599-607.
- [5] 陈艳萍,勇强,刘朝纲等.戊糖发酵微生物及其选育[J].纤维素科学与技术,2001,9(3):57-61.
- [6] 萧炳,李佐虎.纤维素制酒精的分散、偶合、并行系统[J].生物技术通讯,1999,(4):27-29.
- [7] 王桂强.浅谈从生物质制取液体燃料乙醇工艺[J].辽宁化工,1999,28(5):271-276.
- [9] 傅其军.燃料酒精的发展前景[J].广西轻工业,2001,(2):6-10.
- [10] 邓良伟.纤维素类物质生产燃料酒精研究进展[J].食品与发酵工业,1995,21(5):69-72.
- [11] THOMAS W.JEFFRIES AND RICHARD SCHARTMAN. Bioconversion of Secondary Fiber Fines to Ethanol Using Counter-Current Enzymatic Saccharification and Co-Fermentation[J].Applied Biochemistry and Biotechnology,1999,(77-79):435-444.
- [12] 胡代泽.我国农作物秸秆资源的利用现状与前景[J].资源开发与市场,2000,16(1):19-20.
- [13] 高寿清.生物量制燃料酒精的发展和需要解决的问题[J].食品与发酵工业,1991,17(1):54-59.
- [14] 张惠展.途径工程—第三代基因工程[M].北京:中国轻工业出版社,1997.
- [15] 吕福英,闵航,陈美慈等.一个高温厌氧直接转化纤维素成乙醇的高纯富集物[J].浙江大学学报(农业与自然科学版),2000,26(1):56-60.
- [16] 杨斌,吕燕萍,高孔荣等.蔗渣水解液发酵乙醇的研究[J].生物工程学报,1997,13(4):380-386.
- [17] C.R.South, D.A.L.Hogsett, and L.R.Lynd. Modeling simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol in batch and continuous reactors[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1995,(17):797-803.
- [18] GEORGE P.PHILIPPIDIS AND TAMMY K. SMITH. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol[J].Applied Biochemistry and Biotechnology,1995,(51-52):117-124.
- [19] T.K.Ghose, P.K.Roychoudhury, P.Ghosh. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosics to ethanol under vacuum cycling and step feeding[J].Biotechnology and Bioengineering, 1984,(26):377-381.
- [20] I.BALLESTEROS, J.M.OLIVA, J.CARRADCO, et al. Effect of surfactants and on simultaneous saccharification and fermentation of stream-exposed poplar biomass to ethanol[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,1998,(70-72):369-381.
- [21] JAMES D.MCMILLAN, MILDRED M.NEWMAN, DAVID W.TEMPLTON. Simultaneous saccharification and cofermentation of dilute-acid pretreated yellow poplar hardwood to ethanol using xylose-fermenting *Zymomonas mobilis*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,1999,(77-79):649-665.
- [22] S.Hari Krishna, K.Prasanthi, G.V.Chowdary, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of pretreated sugar cane leaves to ethanol[J].Process Biochemistry,1998,33(8):825-830.
- [23] Robert Eklund and Guido Zacchi. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow[J].Enzyme and Microbial Technology, 1995,(17):255-259.
- [24] YUN-CHIN CHUNG,ALAN BAKALINSKY, AND MICHAEL H.P-EMMER. Analysis of Biomass Cellulose in Simultaneous Saccharification and Fermentation Processes[J].Applied Biochemistry and Biotechnology,1997,(66):249-262.
- [25] ZHANGWEN WU, Y.Y.Lee. Nonisothermal simultaneous saccharification and fermentation for direct conversion of lignocellulosic biomass to ethanol[J].Applied Biochemistry and Biotechnology,1998,(70-72):479-492.
- [26] 夏黎明,丁红卫,余世袁.固定化增殖酵母发酵半纤维素糖类研究[J].食品与发酵工业,1994,20(1):1-6.
- [27] 邓旭,郑重鸣,岑沛霖等.固定化酵母的双底物乙醇连续发酵[J].化学反应工程与工艺,1995,11(3):297-301.
- [28] 邓旭,岑沛霖.固定化细胞的混合糖连续发酵动力学模型[J].生物工程学报,1997,13(3):246-251.
- [29] 鲍晓明,高东,王祖农.嗜热细菌木糖异构酶基因 $xylA$ 在酿酒酵母中的高效表达[J].微生物学报,1999,39(1):49-54.
- [30] 汪天虹,Merja Penttila,李波.带有木糖还原酶基因和木糖脱氢酶基因的重组酿酒酵母的构建[J].菌物系统,1999,18(3):311-315.

2000 年日本酒类消费量

类别	2000 年(kl)	1999 年(kl)	较上年比(%)	类别	2000 年(kl)	1999 年(kl)	较上年比(%)
清 酒	977441	1029854	94.9	威士忌	123642	131850	93.8
合成清酒	58308	54676	106.6	白兰地	21507	25260	85.1
甲类烧酒	410511	404644	101.4	烈酒小计	145142	157100	92.4
乙类烧酒	323588	316508	102.2	酒 精	26841	23035	116.5
烧酒小计	734105	721153	101.8	利口酒	381279	343861	110.9
味淋酒	138286	125763	110.0	发泡酒	1574404	1277906	123.2
啤 酒	5185492	5508143	94.1	其他酒	16107	19335	83.3
果 酒	266068	277824	95.8	杂酒小计	1590521	1297232	122.6
甜味果酒	16027	15226	105.3	合 计	9519513	9553845	99.6
果酒小计	282094	293046	96.3				

小雨摘自日本酿造协会志,2002,97(3):218.