

纤维素乙醇研究进展

赵彩云¹, 王异静², 关东明^{1,3}

(1. 中国矿业大学(北京)化学与环境工程学院, 北京 100083, 2. 中国食品发酵工业研究院酿酒工程部, 北京 100027, 3. 纽约州立大学, 美国 纽约)

摘要: 燃料乙醇的研究对于缓解能源危机, 保护环境具有重要的意义。由于粮食危机的加剧, 以玉米等粮食为原料生产燃料乙醇的研究逐渐被非粮作物所替代。主要从微生物代谢产纤维素酶降解纤维素生产乙醇、戊糖发酵产乙醇及纤维素降解生产乙醇的工艺优化等几方面介绍了纤维素乙醇生产的发展情况。简要分析了目前的研究现状及未来发展方向。

关键词: 纤维素乙醇; 纤维素酶; 木糖; 发酵

中图分类号: TS262.2; TS261.4; TQ35; Q55

文献标识码: A

文章编号: 1001-9286(2009)10-0087-04

Research Progress in Cellulosic Ethanol

ZHAO Cai-yun¹, WANG Yi-jing² and GUAN Dong-ming^{1,3}

(1. China University of Mining and Technology (Beijing), Beijing 100083; 2. Chinese Institute of Food and Fermentation Industry, Beijing 100027, China; 3. New York State University, United States)

Abstract: Fuel ethanol is of vital importance in alleviating energy crisis and environmental protection. In recent years, non-grain crops instead of grains such as corn etc. has been used for fuel ethanol production because of food crisis. In this paper, the development status of cellulosic ethanol production was introduced from the aspects including cellulose degradation by cellulase to produce ethanol, pentose fermentation to produce ethanol, and technical optimization for ethanol production by cellulose degradation etc. And the research progress in cellulosic ethanol and its development trend in the future was elaborated.

Key words: cellulosic ethanol; cellulose; xylose; fermentation

随着能源危机、食物短缺、环境污染等问题日益严重, 燃料乙醇作为一种用于现代汽车中的可再生高级生物燃料、重要的生物质能源受到世界各国的广泛重视。同时, 乙醇汽油也是减少燃油和温室气体排放的最经济的方法之一, 在全球范围内呈现出迅猛的发展势头。但粮食乙醇的生产已逐渐被叫停, 经过几年来的研究和探索, 政府、企业和专家学者等各界对于我国燃料乙醇产业的发展已经取得了广泛的共识, 即大力开发纤维素乙醇^[1-2]。木质纤维素是地球上最丰富的可再生资源, 据测算年总产量高达 1500 亿 t, 其中蕴藏着巨大的生物质能。我国每年作物秸秆(如稻草、麦秆等)的产量可达 7 亿 t 左右(相当于 5 亿 t 标煤)。据统计, 大部分只是作为燃料等直接利用。研究以纤维素类资源为原料代替粮食进行酒精发酵, 不仅可以实现废物资源化、无害化、减量化, 而且可以增加农民的收入, 并改善农村环境, 同时可以提供更多的就业机会, 更为重要的是通过纤维素降解生产燃料乙醇形成一个新型的能源资源产业链, 以拉动农业经济和林

业经济, 真正实现循环经济和可持续性发展。

1 国内外研究进展

纤维素乙醇早已成为国内外的研究热点, 它的生产呈现出迅猛的发展势头。世界最大的纤维素乙醇生产线在加拿大的 Iogen 生物技术公司, 采用麦秆、玉米秆等的生物质通过热燃烧、化学和生化技术转化为纤维素乙醇。2006 年, 河南天冠集团与河南农业大学、山东大学、浙江大学和南京林业大学联合, 以玉米秸秆为原料, 一部分采用固体法, 利用气体脉动装置生产纤维素酶; 而另一部分则用来生产燃料乙醇。目前, 该生产技术的固体纤维素酶 FPA 发酵水平达 130 U/g, 生产成本可控制在 3500 元/t; 秸秆粉则采用 2% 硫酸在一定的温度下进行预处理, 再酶解, 纤维素酶解率达 80%。中粮集团于 2006 年 4 月正式在黑龙江启动建设 500 t/年纤维素乙醇试验装置, 从实验结果看, 各项技术指标均达到国际先进水平。该项目的预处理环节采用连续蒸汽爆破技术, 其中酶制剂部分

收稿日期: 2009-07-06

作者简介: 赵彩云(1985-), 女, 山东省莱芜市人, 在读硕士。

通讯作者: 王异静, 中国食品发酵工业研究院酿酒工程部。

与世界上最大的酶制剂公司诺维信公司联合, 据了解纤维素乙醇是目前诺维信公司的最大研发项目, 其研发中心设在中国。纤维素降解生产乙醇的原料主要集中在纸、锯屑、木材、油菜籽残渣、甘蔗渣、玉米芯、大豆壳、稻壳、农作物的秸秆、城市生活垃圾以及木薯渣等。此外, 还包括一些酿酒厂和蒸馏厂产生的废麦糟等。所有这些物料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。

2 微生物生物酶及生产工艺研究

目前, 对于纤维素降解生产乙醇的研究, 主要集中在以下几个方面。

2.1 微生物代谢产纤维素酶降解纤维素生产乙醇

纤维素降解为葡萄糖的过程是木质纤维素资源酶法生物转化技术实用化的重要方面。与传统的酸水解相比, 利用纤维素酶降解纤维素具有反应条件温和、不生成有毒降解产物、糖得率高和设备投资低等优点。要实现纤维素物质到再生能源的转化就要寻找适合于工业生产的高活力的纤维素酶。

丝状真菌是纤维素降解类群, 该类微生物能产生大量的纤维素酶, 研究较多的有里氏木霉 (*Trichoderma viride*)、康氏木霉 (*Trichoderma konigii*)、拟康氏木霉 (*Trichoderma pseudokonigii*)、绿色木霉 (*Trichoderma viride*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 等活性较高的代表菌种。木霉属虽具有产酶量大和酶系比较齐全等优点, 对结晶纤维素有较好的酶解活性, 但其纤维素酶比活力及 β -葡萄糖苷酶活力不高, 近几十年来对真菌木霉属里氏木霉产纤维素酶的基因做了比较透彻的研究, 目前人们已经克隆了 *cbh1*、*cbh2*、*eg1*、*eg2*、*eg3*、*eg4*、*eg5*、*bg1*、*bg2* 等纤维素酶基因^[3]。南昌航空大学筛选获得了一株具有高纤维素酶活的黑曲霉 No.5.1 突变株, 以内切葡萄糖苷酶 (*CMCase*) 和 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase) 为主, 安全可靠不产生毒素, 活力较高, 尤其 β -葡萄糖苷酶活力较高, 生产周期短, 可将其与其他来源的纤维素酶配合进行纤维素的水解, 解除纤维二糖抑制, 提高水解度^[4]。

产纤维素酶的细菌类群目前研究较多的是热纤梭菌 (*Clostridium thermocellum*)、嗜酸纤维分解菌 (*Acidithiobacillus acacelluloliticus*)、*Cellulomonas fimi*、*Pseudomonas fluorescens subsp. Themon onospra fusca* 等。细菌产生的纤维素酶主要是内切葡聚糖酶 (*endo-1,4-D-glucanase*, *EC3.2.1.4*, 简称 EG), 一般不分泌到胞外, 而是处于细胞壁“固定化的状态”, 可在细胞壁上形成一种突起物。酶系的均衡程度直接影响着纤维素酶系分解纤维素成分功能的发挥, 因为纤维素酶系分解纤维素成分是一个多酶协

作的过程。

放线菌中产量稍高的主要是黑红旋丝放线菌 (*Actinomyces melanocyclus*)、玫瑰色放线菌 (*Actinomyces roseodiataticus*) 和纤维放线菌 (*Actinomyces cellulose*) 等。

酵母虽不产纤维素酶, 但可以利用酵母表达系统表达纤维素酶基因, 其产物高度糖基化, 经正确加工修饰后可直接分泌到培养基中, 表达水平高, 并且具有正常的生物学活性。也有利用 *E.coli* 表达系统表达纤维素酶基因, 但是纤维素酶在 *E.coli* 中的表达分泌水平很低, 而且提取很困难, 故目前该技术应用较少^[5-9]。纤维素酶系是一个动态变化的复合酶体系, 不同菌种不同培养时期, 纤维素酶系各组分的均衡性很不一致。

根据不同真菌的纤维素酶系在各组分均衡性方面有互补的现象, 国外有人提出, 混合微生物发酵法是解决纤维素酶系均衡性的新途径^[10], 将 2 类甚至 2 类以上的真菌混合在一起发酵, 寻求能大量分泌纤维素酶的发酵方法和工艺条件, 生产出优质高效的混合纤维素酶系^[11]。但是由于细菌和真菌产生的纤维素酶系的分子量十分巨大, 并且单个组分又不具有水解微晶纤维素的能力, 所以人们一直试图从其他物种中寻找更符合工业应用以及更具有应用前景的纤维素酶。日本一家实验室从甲虫中得到一种葡聚糖内切酶, 水解羧甲基纤维素 (*CMC-Na*) 的活力可高达 150 U/mg。中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物所的研究人员从福寿螺中发现了一种纤维素酶 EGX, 它不仅具有很高的活力, 而且具有多种酶的活性。也有人利用微生物酶工程技术提高纤维素酶的活性^[12]。

2.2 戊糖发酵产酒精

纤维质原料中的半纤维素在预处理阶段, 几乎完全直接水解为以木糖为主、还包括少量的阿拉伯糖等的五碳糖。因此, 寻求将五碳糖高效转化为酒精的菌种成为纤维素降解产乙醇研究的关键步骤之一。

迄今为止, 人们已经通过直接从自然界中筛选^[13]、原生质体诱变以及分子生物学等各种手段获得了 100 多种能够代谢木糖产生酒精的菌种^[14]。由于生产条件的限制以及菌种的生长特性等各方面的原因, 目前对代谢木糖菌种的研究主要以酵母菌为主。酵母菌属于兼性微生物, 在好氧条件下, 酵母菌主要以有氧呼吸为主, 菌株主要进行同化作用, 其底物木糖主要用于菌体合成, 而在厌氧条件下, 酵母菌主要进行发酵作用, 其作用底物木糖除少部分用于菌体合成外, 大部分经厌氧发酵生成酒精和其他发酵副产物。目前人们研究最多且最有工业应用前景的木糖发酵微生物有 3 种酵母菌种, 即嗜单宁管囊酵母 (*Pachysolen tannophilus*)、树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*)、

休哈塔假丝酵母(*Candida shechatae*),它们的木糖发酵酒精转化率和生产能力分别达 0.2 g/g(酒精/消耗的糖)左右和 0.04 g/L·h 左右^[2,13-15]。另外,根据木糖在细菌中的代谢机理,木糖在木糖异构酶的作用下可以转化为木酮糖,而酿酒酵母可以直接利用木酮糖,但酵母菌不能产生这种酶,可以采用木糖异构酶与酿酒酵母相结合的方式,最终将木糖发酵产酒精。国外有人对木酮糖发酵生产酒精进行了研究,并且效果显著^[16]。

2.3 生产工艺优化

由于纤维质原料成分的复杂性也决定了纤维素乙醇的生产工艺不同于粮食乙醇生产工艺。纤维素乙醇的生产工艺主要有 3 种:分步水解与发酵工艺(SHF)、同步糖化发酵工艺(SSF)和直接微生物转化工艺(DMC)。

2.3.1 分步水解与发酵工艺(SHF)

分步水解与发酵工艺(SHF)是最原始也是简单的一种纤维素乙醇的生产方式,即纤维质原料首先利用纤维素酶法在 45~50 °C 水解后再在 30~35 °C 下进行乙醇发酵,两种工艺在各自最适宜的条件下分步进行。

2.3.2 同步糖化发酵工艺(SSF)

随着研究的进一步深入,中外研究者逐渐倾向于采用同步糖化发酵(SSF),即纤维素酶解与葡萄糖的乙醇发酵在同一个反应器中进行^[17],酶解过程中产生的葡萄糖被微生物迅速利用,解除了葡萄糖对纤维素酶的反馈抑制作用,提高了酶解效率。SSF 是目前典型的木质纤维素生产乙醇的方法,被认为是木质纤维素生物法转化为乙醇的最有效方法,国内外的中试基本都采用此法。

在工艺上采用一步糖化法,酶解之后,不需要将葡萄糖从木质素馏分中分离出来,避免了糖的损失,简化了工艺,水解和发酵的结合减少了容器的需要量,减少了设备投资,降低了生产中的能耗。目前,美国国家可再生能源实验室(NREL)还在进行同时糖化和共发酵工艺(SSCF)的研究,即把葡萄糖和木糖的发酵液放在一起,用于发酵的微生物是转基因的运动发酵单孢菌,与单纯用葡萄糖发酵菌和单纯利用五碳糖发酵菌相比,乙醇的产量分别提高 30%~38%和 10%~30%^[15]。

2.3.3 直接微生物转化工艺(DMC)

木质纤维素的酶水解和同步糖化发酵过程是多相、多酶催化过程,在 SSF 过程中还同时存在微生物的生长,是一个复杂的体系,而直接微生物转化(DMC)法,将作物秸秆中的纤维素成分通过某些微生物的直接发酵可以转换为酒精。这些微生物既能产生纤维素酶系水解纤维素又能发酵糖产生乙醇。仅一步就包含了纤维素酶生产、纤维素水解和糖发酵生产酒精 3 个步骤。目前,粗糙脉孢菌和尖镰孢菌是直接转化木质纤维素材料为乙醇研

究较多的两种真菌。这两种菌都能同时具有产生纤维素酶、半纤维素酶,发酵葡萄糖和木糖产生乙醇的能力,在有氧条件下产生纤维素酶水解底物,在半通氧条件下发酵糖产生乙醇。

3 展望

自 20 世纪 80 年代前期燃料乙醇的研究热潮以来,纤维素乙醇的生产已经取得了巨大的成就,但就目前发展的水平来看,还存在着一些缺点和不足。纤维素酶方面,纤维素酶的生产效率和比活力低,成本较高,单位原料用酶量很大,酶解效率低,产酶和酶解技术都需要改进。除了要继续筛选高产纤维素酶菌种外,可以从纤维素酶制剂分子结构的角度出发,人工合成纤维素酶。戊糖酒精发酵方面,由于木糖的代谢机理比较复杂,大多能够利用木糖的菌种,因为发酵过程产生许多副产物,酒精产率不高。采用分子生物学手段得到的转基因菌种的遗传稳定性较差,由于酶解温度与菌种生长温度的不适宜,使得木糖异构酶与酿酒酵母的协同作用也没有取得较好的效果。

要进一步提高纤维素乙醇的产量,一方面要通过筛选、诱变转基因等方法继续寻找优良菌种;另一方面,还要继续探索木糖异构酶与酿酒酵母协同作用的最佳条件,以进一步提高木糖的酒精产率。工艺方面,分步水解和发酵(SHF)中,酶解过程产生的糖抑制纤维素酶的活性,同步糖化发酵工艺(SSF)虽然克服了糖对酶的反馈抑制作用,但由于采用的是酶解与发酵的折中温度,使酶的活性和发酵效率都不能达到最大。Zhangwen 等设计了非等温的 SSF 工艺(NSSF),其包含一个水解塔和一个发酵罐,不含酵母细胞的流体在两者之间循环。该设计使水解和发酵可在各自最佳的温度下进行,也可消除水解产物对酶水解的抑制作用,但显然也使流程复杂化了。粗糙脉孢菌和尖镰孢菌因能使木质纤维质原料直接转化而备受关注,但直接法(DMC)的转化率仍低于酵母,因此对于它们在不同预处理原料下的产酶及发酵能力的研究还有待于进一步的探索。

纤维素乙醇以资源丰富的纤维质资源作为原料,一直是世界各国研究开发的主要方向并已取得了一些重要的进展。随着预处理、纤维素酶生产及纤维素酶解、戊糖发酵等技术的突破,以及发酵工艺的进一步改进,在不远的将来,将成功实现纤维素乙醇的大规模、高效率生产。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家发展和改革委员会.能源发展“十一五”规划[EB/OL].(2007-04-10)[2007-07-18].<http://www.ndrc.gov.cn/zjgx/P020070410516458967992.pdf>.

- [2] Gnansounou E, Dauriat A, Wyman C E. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: economic trade-offs in the context of North China [J]. *Bioresource Technol*, 2005, 96: 985-1002.
- [3] Masahiro Nogawa, Masahiro Goto, Hirofumi Okada, Yasushi-Morikawa. L-Sorbose induces cellulose gene transcription in the cellulolytic fungus *Trichoderma reesei* [J]. *Curr Genet*, 2001, 38: 329-334.
- [4] 谢宇, 王平宇, 汪月华. 一株高活力纤维素酶产生菌—黑曲霉 No.5.1 产酶条件研究[J]. *南昌航空大学学报(自然科学版)*, 2007, 121: 55-58.
- [5] 陈阿娜, 汤斌. 纤维素酶高产菌株选育研究进展[J]. *安徽农学通报*, 2006, 12(10): 64.
- [6] Nadja Auer, John N. Hedrer, Christine S. Evans. Degradation of nitrocellulose by fungi [J]. *Biodegradation*, 2005, 16: 229-236.
- [7] Luis Sanz, Manuel Montero, Isabel Grondona, et al. Cell wall-degrading isoenzyme profiles of *Trichoderma* biocontrol strains show correlation with tDNA taxonomic species [J]. *Curr Genet*, 2004, 46: 277-286.
- [8] M. L. Rabinovich, M. S. Melnik, A. V. Bolobova. Microbial Cellulases (Review) [J]. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 2002, 38(4): 305-321.
- [9] M. Piontek á J., Hagedorn, C. P. Hollenberg, et al. Two novel gene expression systems based on the yeasts *Schwanniomyces occidentalis* and *Pichia stipitis* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, 50: 331-338.
- [10] Ljungdahl L G., Eriksson K E. *Advances in Microbial Ecology* [M]. New York: K C Marshall Plenum Press, 1985. 5-238.
- [11] 吴石金, 等. 里氏木霉产纤维素酶系各组分分泌特性[J]. *浙江林学院学报*, 2003, 20(2): 146-150.
- [12] 木质纤维素类原料燃料乙醇生产技术研究进展[EB/OL]. [http://www.xlresin.com/r/27/342265\\$6.html](http://www.xlresin.com/r/27/342265$6.html)
- [13] 刘天霞. 戊糖酒精发酵[D]. 北京: 北京化工大学, 2005.
- [14] Kiran L Kadam, James D McMillan. Availability of corn stover as a sustainable feedstock for bioethanol production [J]. *Bioresource Technol*, 2003, 88: 17-25.
- [15] N·W·Y·何, G·T·曹. 能有效发酵葡萄糖和木糖的重组酵母[P]. 美国: CN95194767.X, 1997. 01. 22.
- [16] CHENG-SHUNG, LI-FU CHEN, MICHAEL C. FLCKINGER, LIN-CHANG CHIANG, GEPRGE T, TSAO, Production of ethanol from D-xylose by using D-xylose isomerase and yeasts [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, Feb. 1981, 430-436.
- [17] 刘梅. 康氏木霉与酿酒酵母混菌发酵玉米秸秆产乙醇的研究[D]. 长春: 吉林大学, 2007.

贵州茅台集团将斥资 200 亿元扩产近一倍

本刊讯 贵州茅台集团计划斥资 200 亿元人民币, 在未来 5 至 10 年将产量扩大近一倍。

中共仁怀市委宣传部副部长杨方明介绍说, 2008 年茅台酒产量为 2.3 万吨, 预计扩产后将达到 4 万吨。贵州省仁怀市政府从 2009 年 5 月起已先期投资 30 多亿元对茅台酒产地——茅台镇进行环境整治与城镇规划建设, 以扩大茅台酒工业园区和改善赤水河中上游流域的生态环境。举措包括: 在 5 年之内, 逐步搬迁 1 万余居民, 使茅台镇城镇人口控制在 1.5 万人左右; 全面关闭和取缔 400 余个露天堆积发酵的酿酒作坊企业; 严格控制煤炭、水泥等重污染企业发展规划。赤水河为长江上游支流, 地处云南、贵州、四川三省接壤地区, 是茅台酒主要的水源地。以上举措能有效解决赤水河中上游地区工业生产、城镇居民生活、农村污染以及植被破坏和水土流失日益加剧等一系列威胁茅台可持续发展的环境问题。他还表示, 居民搬迁安置费用将视土地用途由茅台酒厂和政府承担。生产费时费力是茅台酒产量较低的重要原因, 一瓶茅台酒从采集原料到包装出售至少需要 5 年时间, 而且许多工序需要人工操作。2008 年茅台酒销量为 8000 吨, 销售额达 103 亿元, 在国际金融危机影响下仍保持两位数增长。未来的 5 至 10 年将是茅台酒发展的黄金期。(江源)

玉林泉酒获中国白酒小曲香型代表殊荣

本刊讯 中国白酒小曲香型代表授牌仪式暨玉林泉大经典上市发布会于 2009 年 9 月 19 日上午在昆明举行。

据了解, 由中国酿酒工业协会评选出的 12 种中国白酒香型代表, 主要有酱香型代表贵州茅台, 浓香型代表四川五粮液、泸州老窖, 清香型代表山西汾酒, 以及小曲香型代表云南玉林泉酒, 这标志着云南玉林泉酒从此荣登中国“国”字头白酒品牌系列, 改变了云南无名酒、无好酒的历史。

中国酿酒工业协会白酒分会秘书长赵建华表示, 玉林泉酒采用传统的小曲小罐发酵工艺, 古法木甑蒸煮、蒸馏, 发酵周期长达近 40 天, 品质优异, 风格突出, 展现出了与众不同的个性魅力, 是中国白酒行业的一朵奇葩。业内人士认为, 中国小曲白酒接近国际品味, 云南白酒应把握眼前的机会, 打好小曲香型白酒优势牌, 在品牌文化的差异性上做文章。

为庆祝国庆 60 周年, 由中国酿酒工业协会召集 12 种白酒香型代表订制国礼酒用于赠送国家领导及国外嘉宾。玉林泉酒作为中国小曲香型代表, 成为国家礼品酒。玉林泉酒业经过精心打造, 隆重推出了玉林泉国礼酒业代表——玉林泉“大经典”, 大经典采用玉林泉上等好酒经 26 年时光凝练, 陈酿而成, 酒香醇厚, 清雅甘冽, 成为云南名酒的上乘之作。(小小)