

树干毕赤酵母发酵半纤维素稀酸水解液 生产乙醇的研究进展

王艳敏,丁长河,李里特,张亚云

(河南工业大学粮油食品学院,河南 郑州 450052)

摘要: 木质纤维原料经稀酸预处理后可得半纤维素水解液,水解液中主要含有木糖、葡萄糖和少量的其他糖,另外还含有一些乙酸、糠醛和羟甲基糠醛等发酵抑制物。综述了稀酸预处理条件、脱毒方法和树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)发酵水解液生产乙醇的国内外研究进展。

关键词: 乙醇; 树干毕赤酵母; 半纤维素; 木糖; 脱毒; 发酵

中图分类号:TS262.2;TS261.4;TS261.1

文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2008)12-0097-03

Research Progress in Ethanol Production from Hemicelluloses Dilute Hydrolyzate by *Pichia stipitis* Fermentation

WANG Yan-min, DING Chang-he, LI Li-te and ZHANG Ya-yun

(Grains and Food College, He'nan University of Technology, Zhengzhou, He'nan 450052, China)

Abstract: Hemicellulose hydrolyzate could be produced by lignocellulose by dilute acid pretreatment. The hydrolyzate mainly contains xylose, glucose, other sugars, and fermentation inhibitors including acetic acid, furfural and hydroxymethyl furfural. In this paper, the dilute acid pretreatment conditions, the detoxification methods, and the research progress in ethanol production from hemicellulose dilute hydrolyzate by *P. stipitis* domestically and abroad were reviewed.

Key words: ethanol; *P.stipitis*; hemicellulose; xylose; detoxification; fermentation

现今的液体燃料(如发动机燃料汽油、柴油等)主要来自于石油资源,而地球上可利用的石油资源将在今后几十年内耗尽。我国人均可开采石油资源只占世界平均水平的12%,在未来的30年中,中国将继续作为第二大能源消费国,世界能源需求增长量的20%和石油需求增长的16%将来自中国^[1]。近年来,乙醇作为一种燃烧效率高、污染物排放少的理想可再生替代能源而受到世界各国的重视。发展燃料乙醇不仅可以缓解能源短缺问题和地球环境污染日益严重的趋势,还可以促进许多工业部门的发展,而且也将很大程度上影响到农业的发展,从而成为新的经济增长点^[2]。

木质纤维原料,包括农业废弃物、废纸和废弃树木等都是已经产生且亟待处理的,同时也是地球上最丰富、最廉价的再生资源。因此,利用木质纤维原料生产燃料乙醇不仅可以解决人类所受能源危机的威胁,还可以减少环境污染^[3]。木质纤维原料主要由纤维素、半纤维素和木质素组成。其中半纤维素占20%~30%,木糖是

植物纤维原料中半纤维素的主要成分,占植物纤维原料水解液中糖含量的30%左右。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)可以利用木质纤维原料发酵乙醇,但只能利用其中的葡萄糖而不能利用木糖。因此,利用微生物转化木质纤维原料生产乙醇,其关键问题是木糖能否被高效转化为乙醇^[4]。能进行木糖乙醇发酵的天然菌种很少,研究较为深入的只有3种酵母,即休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*),嗜鞣管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)和树干毕赤酵母(*P.stipitis*)。这3种酵母都可发酵葡萄糖和木糖生成乙醇,其中树干毕赤酵母发酵木糖乙醇产量高且不产生大量副产物,表现出了较好的工业应用前景^[1]。本文介绍了对半纤维素稀酸水解及树干毕赤酵母发酵木糖产乙醇的研究进展。

1 半纤维素稀酸预处理和水解

半纤维素是戊糖(木糖、阿拉伯糖)、己糖(甘露糖、葡萄糖、半乳糖)和糖酸所组成的不均一聚糖,为异质多

基金项目:河南省杰出人才创新基金(0621000900)。

收稿日期:2008-09-08

作者简介:王艳敏(1982-),女,在读硕士研究生,E-mail: yanmin328@yahoo.cn。

通讯作者:丁长河,男,副教授,硕士生导师,E-mail: dch@haut.edu.cn。

糖,结构与纤维素不同^[5]。木质纤维原料具有较大的结晶性,需经适当预处理后才能使用。其目的是破坏木质纤维素的组织结构,去除包裹的木质素从而提高可消化性。通常预处理使得半纤维素首先被降解成单糖,接着水解才使纤维素进一步降解成葡萄糖,而木质素几乎不被降解。半纤维素水解液和纤维素水解液可以同步或分二步发酵成乙醇^[6]。

植物纤维原料预处理的方法很多,包括物理法、化学法、生物化学法^[7-9]及以上几种方法的联合使用。常用的物理方法有:机械研磨法、蒸汽爆破法、冷冻处理法和微波处理法。物理法预处理需要较多的能量,预处理成本高,而且水解得率低;常用的化学方法有氢氧化钠处理法、稀酸处理法和溶剂处理法。稀酸预处理可以和纤维素稀酸水解方法相结合使用,工艺较为成熟。

稀酸预处理可溶解半纤维素糖并增加植物细胞壁的多孔性,从而为酶水解做准备。预处理技术已经发展的比较完善。稀酸预处理主要包括两种方法:对于较少的固体量(5%~10%),采取高温(>160℃)连续流程法;对于较多的固体量(10%~40%),采取低温烘烤^[10]。在高温条件下,稀酸预处理降低了反应条件,且可以提高木聚糖转化成木糖的转化率。处理后的固态组分主要包括纤维素和木质素,液态组分主要含有木糖和少量的其他糖如阿拉伯糖、葡萄糖和半乳糖等^[3]。2003年 Daniel J. Schell 等人在一个特制反应器中进行了玉米秸秆的酸处理研究,在20%(w/w)固体量;H₂SO₄浓度为0.5%~1.4%(w/w);反应时间3~12 min;反应温度165~195℃条件下,得出木糖总转化率(单体+低聚物)为70%~77%;经同步糖化发酵(SSF)后葡萄糖总转化率为80%~87%^[11]。2001年 J.N. Nigam 用0.5%(v/v)硫酸溶液浸泡过9 mm筛的红橡木4 h,然后将干物料用1212 kpa蒸汽处理4 min,释放压力提取半纤维素糖,得到26.7±1.30 g/L木糖,3.0±0.18 g/L葡萄糖和少量的半乳糖、甘露糖和阿拉伯糖,还有一些抑制物如乙酸、糠醛和羟甲基糠醛^[12]。

2 乙酸、糠醛和羟甲基糠醛对水解液发酵乙醇的影响

木质纤维原料半纤维素的稀酸水解液中还含有一

定浓度的乙酸、糠醛、羟甲基糠醛和酚类物质等发酵抑制物。乙酸是在半纤维素水解过程中脱乙酰基产生,糠醛是水解生成的木糖在高温酸性条件下进一步分解的产物,羟甲基糠醛由葡萄糖降解生成,木质素降解生成酚类物质^[3]。乙酸和糠醛对酵母细胞有较强的毒害作用,是半纤维素水解液乙醇发酵的主要抑制剂。当pH在接近或低于乙酸的解离常数pKa为4.76时,乙酸主要以游离形式存在,游离的乙酸渗入细胞内部致使细胞内部pH降低,影响酵母的生理特性和发酵特性。提高发酵液的pH值可减轻乙酸的抑制作用,但随着pH的上升,杂菌污染的可能性也增加^[13]。研究得出,细胞内pH的降低会破坏细胞膜两侧的质子梯度,从而造成能量产生和运输系统的分开^[14]。实验证明,利用木糖的树干毕赤酵母(*P.stipitis*)在糠醛浓度为0.5 g/L、1.0 g/L和2.0 g/L时生长速率分别降低了25%、47%和99%。当羟甲基糠醛浓度为0.50 g/L、0.75 g/L和1.50 g/L时,*P.stipitis*的生长速率分别降低了43%、70%和100%^[15]。2001年 J.N. Nigam 研究了乙酸、糠醛和木质素衍生物对*P.stipitis* NRRL Y-7124 发酵生产乙醇的影响^[16]。结果见表1。

从以上研究可以看出,半纤维素稀酸水解液中乙酸、糠醛和羟甲基糠醛等发酵抑制物的存在不仅使*P.stipitis*的生长速度降低,还会影响总糖利用率和乙醇得率。所以,在发酵水解液生产乙醇前,应进行有效的脱毒处理。

3 半纤维素稀酸水解液的脱毒处理

原料经过预处理后,水解液中不仅包括可发酵的单糖,还包括了许多复杂的发酵抑制物,这些抑制物的存在,使发酵过程缓慢、不完全且导致较低的乙醇浓度和得率。为获得高的糖转化率和乙醇产量,需要采取有效简便的脱毒方法来减少或去除半纤维素稀酸水解液中的发酵抑制物。除去水解液中的发酵抑制物的方法有很多,主要包括活性炭吸附、有机溶剂萃取、离子交换、分子筛、蒸汽气提和石灰过量中和法^[17]等,这些方法大多操作成本较高。其中以石灰过量中和法较为经济且简便有效。

石灰过量中和法是首先加氧化钙调水解液pH至

表1 乙酸、糠醛和木质素衍生物对*P.stipitis* NRRL Y-7124 发酵生产乙醇的影响

影响因素	总糖利用率 (%)	乙醇产率 (g/L)	乙醇得率 (g/g)	乙醇平均生产速率 (g/L·h)	总糖转化率 (%)
无	85.8±0.72	22.±0.20	0.43±0.01	0.47±0.01	84.3±0.41
乙酸(6.9 g/L)	45.1±0.60	11.2±0.66	0.30±0.03	0.19±0.01	58.8±0.71
糠醛(0.27 g/L)	82.6±0.61	20.1±0.58	0.39±0.01	0.41±0.01	76.5±0.46
糠醛(1.5 g/L)	8.2±0.17	1.8±0.13	0.04±0.01	0.07±0.02	7.8±0.21
木质素衍生物	40.7±0.75	9.3±0.65	0.36±0.01	0.26±0.01	70.6±0.86
乙酸(6.9 g/L)+糠醛(0.15 g/L)	41.2±0.54	9.8±0.47	0.20±0.01	0.16±0.01	51.0±0.63
乙酸(6.9 g/L)+木质素衍生物	32.6±0.51	7.4±0.28	0.18±0.02	0.14±0.02	35.3±0.20
糠醛(0.15 g/L)+木质素衍生物	37.1±0.51	8.2±0.21	0.19±0.02	0.18±0.02	37.3±0.41
乙酸(6.9 g/L)+糠醛(0.15 g/L)+木质素衍生物	14.3±0.41	2.4±0.24	0.11±0.01	0.08±0.01	21.6±0.70

9~11,然后加热水解液至 50~60 °C,持续 30 min。然后过滤去除氧化钙中的二价钙和水解液中的硫酸生成的硫酸钙,最后再用硫酸回调 pH 至 5.5~6.0。2004 年 Agblevor 等人用 ^{13}C -NMR 光谱学研究得出,石灰过量中和去除了脂肪族和芳香族酸和其他脂肪族芳香族化合物。石灰水和作用的放热和脱毒过程中的加热降低了硫酸钙的溶解性,并且有利于去除不稳定性的化合物如糠醛^[18]。该法脱毒有效,但损失了水解液中的部分糖。2001 年 Nigam 采用了将水解液先煮沸 15 min 再石灰过量中和处理方法,利用 *P.stipitis* 发酵麦秸半纤维素水解液,乙醇产量和乙醇生产速率分别提高了 2.4±0.10 和 5.7±0.24 倍^[16]。2001 年 Martinez 等全面研究了石灰过量中和的脱毒方法。对多批木质纤维素水解液进行了石灰过量中和处理,得出乙酸含量没有变化,总醛类物质含量下降(51%±9%),苯酚类物质含量下降(41%±6%)^[19]。离子交换法脱毒效果最好,但该法成本太高。2006 年 Binbing Han 等人用离子交换膜和离子交换树脂对比处理半纤维素水解液,得出离子交换膜乙酸容量比离子交换树脂更高一些,浓缩洗提的乙酸效果也更好,糖损失量少,且有利于乙酸的回收再利用^[20]。

为了提高经济效益,未来水解液发酵的必然趋势,是通过定向培育具有抗抑制物能力的戊糖己糖同步发酵菌种直接发酵糖液。有文献报道,*P.stipitis* CBS 5776 经过 12 次水解循环定向培育,均能发酵山杨木水解液。同时,试验表明,经过定向培育的 *P.stipitis* R 菌种,酒精得率从 0.41 g 乙醇/g 糖上升到 0.47 g 乙醇/g 糖^[13]。

4 树干毕赤酵母发酵半纤维素水解液

半纤维素水解液是由木糖、葡萄糖和少量半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖等组成的混合物。*P.stipitis* 发酵乙醇产率高,可发酵多种糖且没有绝对的维生素需求^[12]。*P.stipitis* 对不同的原料半纤维素稀酸水解液发酵产乙醇情况不同,结果见表 2^[20]。

表 2 *P.stipitis* 发酵半纤维素稀酸水解液产乙醇情况

原料	酵母	乙醇得率 (g/g)	最大乙醇浓度 时的生产速率 (g/L·h)
麦秸	<i>P.stipitis</i> NRRL Y-7124	0.35	0.30
麦秸	<i>P.stipitis</i> A	0.41	0.54
红橡木	<i>P.stipitis</i> CBS 5773	0.46	-
甘蔗渣	<i>P.stipitis</i> CBS 5773	0.35	0.48
甘蔗渣	<i>P.stipitis</i> CBS 7126	0.37	0.57
玉米秸秆	<i>P.stipitis</i> CBS 6054	0.37	-

2007 年 Frank K 等人用 *P.stipitis* CBS 6054 发酵玉米秸秆稀酸预处理后的半纤维素水解液,1 L 水解液中含有木糖 34 g、葡萄糖 8 g、乙酸 8 g、糠醛 0.73 g 和羟甲基糠醛 1 g。在没有经过脱毒处理的条件下发酵水解液

72 h 后乙醇浓度为 15 g/L,乙醇得率为 0.37~0.44 g 乙醇/g(葡萄糖+木糖)^[3]。1999 年 Sreenath HK 等人用电渗析方法使木头水解液中乙酸降至 0.431 g/L,用 *P.stipitis* 发酵水解液,乙醇得率达 0.44±0.02 g/g^[21]。酵母驯化也是提高酵母耐毒性物质发酵、提高水解液转化率和乙醇得率的有效方法。2001 年 Nigam 用不同浓度的水解糖液对 *P.stipitis* NRRL Y-7124 进行连续驯化,结果表明,经过驯化的 *P.stipitis* 的乙醇发酵能力大大提高,发酵麦秸半纤维素稀酸水解液,最大乙醇产率 0.41±0.01 g/g,达理论产率的(80.4±0.55)%,乙醇生产速率为 0.44 g/L·h^[20]。

从以上研究结果可以看出,*P.stipitis* 发酵半纤维素稀酸水解液不仅解决了传统的酿酒酵母只能利用葡萄糖而不能利用木糖发酵产乙醇的缺陷,大大提高了木质纤维原料的利用率,而且表现出了乙醇产率高、转化率高、快等优点,对生物乙醇的生产具有重要意义。

5 展望

植物纤维资源如稻草、玉米秸秆、麦秸、甘蔗渣及森林工业副产品等具有来源丰富、品种多、再生时间短等优点,尤其是在我国产量大且污染环境。以木质纤维原料生产燃料乙醇成为国内外热点研究课题之一。目前,已经取得了较大进展,但离大规模的工业化和商业化还有一定的距离。因此,仍需进一步研究预处理新技术,经济有效的脱毒处理,培育高效快速发酵水解液中糖类物质为乙醇的新菌株,提高对水解液中毒性物质的耐受性。另外,随着基因工程研究手段的快速发展,也可通过基因工程的方法对代谢途径进行调节,构建出更高效快速发酵木质纤维原料为乙醇的菌株。

参考文献:

- [1] 袁振宏,吴创之,马隆龙.生物质能利用原理与技术[M].北京:化学工业出版社,2005.1-8.
- [2] 章克昌.发展“燃料酒精”的建议[J].中国工程科学,2000,2(6):89-93.
- [3] Agbogbo FK, Wenger KS. Production of ethanol from corn stover hemicellulose hydrolyzate using *P.stipitis*[J]. Microbiol Biotechnol, 2007, 34: 723-727.
- [4] Jeffries TW, Kurtzman CP. Strain selection, taxonomy, and genetics of xylose-fermenting yeasts[J]. Enzyme Microb Technol, 1994, 16: 922-932.
- [5] Ssha BC. Hemicellulose bioconversion[J]. Microbiol Biotechnol, 2003, 30: 279-291.
- [6] Olsson L, Hagerdal B. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production[J]. Enzyme and Microb Technol., 1996, 18, 312-331.
- [7] Fan LT, Lee YH, Gharpuray MM. The nature of lignocellulosics

(下转第 103 页)

降低生产成本的目的,而且降低生产成本的效果很明显。从我厂成功应用该技术后,使以前弃之不用的副产物变废为宝,增加了企业的经济效益。明显增加了酒中的总酯含量,使酒质明显改变,提高了优品率。减少环境污染带来了显著的社会效益,该技术不增加工人的劳动强度,且投资少、见效快,值得推广。

2.11 该技术项目应用前景好,通过该技术在我厂从试验到推广应用,均取得了明显的效果。一方面能有效降低曲酒生产的用汽量,直接降低吨酒生产的能耗和生产成本。另一方面加强对黄浆水和甑底水的综合利用,变废为宝,减少了废水的排放,对我厂的环保工作支持较大。同时解决了我厂的人工窖泥易老化的这一长期难题,提高了人工培养窖泥的质量,从而打破了原来曲酒的微量成分的比例,提高曲酒的优质率。综合来看,该项技术的推广应用,有效降低了曲酒生产成本,同时减少了黄浆水和甑底水的排放,改变了大曲酒酯类物质的含量,增强了浓香型大曲酒主体风格,并使口感较为协调、柔和、圆润、丰满。对各酒厂而言,该技术项目应用前景十分广阔。

3 存在问题及改进措施

3.1 气温较低时,对高温堆积有影响。注意做好料堆的

外表面的保温工作,减少热量的损失。

3.2 该项技术在实验过程中,由于各班组人员素质方面存在差异,在执行工艺时有偏差,致使实验效果有差别。有待进一步改进工艺,加强管理,促进班组之间协调平衡。

3.3 由于各窖池发酵的不均衡,产生黄浆水的量不一样,对实验阶段的黄浆水的使用存在影响。将增大黄浆水储备装置的容器,以便统一按照工艺要求使用。

参考文献:

- [1] 张培芳,李冰,夏秀梅,张敏.浅谈黄浆水的综合利用[J].酿酒科技,2006,(8):108-109.
- [2] 李大和,李国红.民族传统工艺白酒特点与发展的思考[J].酿酒科技,2005,(9):109-113.
- [3] 袁学明,刘景致.黄浆水在新型白酒酒质中修饰的研究[J].酿酒科技,2003,(4):64-64.
- [4] 张守财.堆积发酵对酱香型白酒风味形成的作用及其控制[J].福建轻纺,2006,(11):17-18.
- [5] 唐现洪,钟雨,谢旭,谢宜辉,余永柱,靳宝常.高温堆积发酵工艺在浓香型双沟大曲酒生产中的应用[J].酿酒科技,2006,(8):59-62.
- [6] and their pretreatments for enzymatic hydrolysis, Adv[J]. Biochem. Eng/Biotechnol., 1982, 23,158-187.
- [7] Vallander L, Eriksson KEL. Production of ethanol from lignocellulosic materials, Adv[J]. Biochem. Eng/Biotechnol., 1990, 42, 63-95.
- [8] 章克昌.酒精与蒸馏酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1995.
- [9] 张宇昊,王颀,张伟,等.半纤维素发酵生产燃料乙醇的研究进展[J].酿酒科技,2004,(5):72-74.
- [10] Schell DJ, Farmer J, Newman M, et al. Dilute-sulphuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2003, 105-108: 69-85.
- [11] Nigam JN. Development of xylose-fermenting yeast *P.stipitis* for ethanol production through adaptation on hardwood hemicellulose acid prehydrolysate[J]. Journal of Applied Microbiology, 2001, 90:208-215.
- [12] 宋向阳.树干毕赤酵母固定化戊糖、己糖同步乙醇发酵[D].南京:南京林业大学,2002.
- [13] Herrero AA, Gomez RF, snedecor B, et al. Growth inhibition of *Clostridium thermocellum* by carboxylic acid: A mechanism based on uncoupling by weak acids[J]. Appl. Microbiol Biotechnol, 1985, 22: 53-62.
- [14] 田沈,姚莹秋,蔺增曦,等.木质纤维素水解糖液乙醇发酵研究进展[J].微生物学通报,2007, 34(2):355-358.
- [15] Nigam JN. Ethanol production from wheat staw hemicellulose hydrolysate by *P.stipitis*[J]. Journal of Biotechnol, 2001, (87): 17-27.
- [16] Mohagheghi A, Ruth M, Sshell DJ. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effects of overliming pH on sugar and ethanol yields[J]. Process Biochemistry, 2006, 41:1806-1811.
- [17] Agblevor FA, Hames B, McMillan JD. Identification of microbial inhibitory functional groups in corn stover hydrolysate by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2004, 119(2):97-120.
- [18] Martinez A, Rodriguze ME, Wells MI, et al. Detoxification of dilute acid hydrolysates of lignocellulose with lime[J]. Biotechnol Progress, 2001, (17):287-293.
- [19] Han B, Carvalho W, Canilha L, et al. Adsorptive membranes vs. resins for acetic acid removal from biomass hydrolysates [J]. Desalination, 2006, 193:361-366.
- [20] Sreenath HK, Jeffries TW. Production of ethanol from wood hydrolyzate by yeast[J]. Bioresource Technology, 2000, 72: 253-260.

(上接第99页)