

纤维质原料制燃料酒精的研究进展

王 丽 陈卫平

(江西农业大学,江西 南昌 330045)

摘 要: 将纤维素生物质转化为燃料酒精,可以降低传统以粮食为原料的酒精发酵工业的成本,充分利用这种数量巨大的可再生资源。纤维素酶将预处理的纤维质原料降解为酵母可直接利用的 D-葡萄糖,转化为酒精。对纤维质原料制酒精的研究主要有原材料的预处理、如何降低纤维素酶的成本、发酵过程的优化、菌种的合理运用和改造、酒精废糟的综合利用。

关键词: 燃料酒精; 纤维质原料; 纤维素酶; 预处理; 优化

中图分类号:TS262.2;TS261.4 文献标识码:A 文章编号:1001-9286(2005)03-0057-04

Study Progress of Fuel Alcohol Production by Cellulose

WANG Li and CHEN Wei-ping

(Jiangxi Agricultural University, Nanchang, Jiangxi 330045, China)

Abstract Cellulose, instead of traditional grains, was used in fuel alcohol production by biotransformation, which could reduce production cost. And such plentiful renewable resource should be fully utilized. The pretreated cellulose was degraded into D-glucose by cellulase and then converted into alcohol eventually. The research on fuel alcohol production by cellulose mainly included: pretreatment of raw materials; the approaches to reduce the cost of cellulase; optimization of fermentation process; proper use and transformation of microbial species; and comprehensive utilization of waste distiller's grains. (Tran. by YUE Yang)

Key word fuel alcohol; cellulose; cellulase; pretreatment; optimization

我国是个石油短缺国家,每年大约有 6000 万吨左右的石油需要进口,如果按最低添加量的 10% 的酒精掺兑,每年就可以减少大约 600 万吨的石油进口,这将为我国节省一大笔外汇开支。加入一定比例的酒精做燃料,具有节约石油、净化空气、转化剩余粮食等一举多得之效。燃料酒精不仅可以缓解能源短缺的问题,从长远的利益和能源的可再生性来看,燃料酒精又是一种潜力巨大的生物能源,它可以减少燃烧的挥发损失,提高燃烧效率,减少污染物 CO、NO 等及其他污染物的排放,另外它燃烧产生的额外 CO₂ 最少,可最大限度地减少温室效应,缓解日益严重的大气污染。我国将生产燃料酒精项目列为“十五”示范工程重大项目。

纤维素是地球上数量最大的可再生资源,微生物对它的降解、转化是自然界中碳循环的主要环节^[1]。据估计,每年全球通过生物合成可再生性纤维素可达 1000 亿吨以上,但被利用的极少^[2],除少量被用在造纸、建筑、纺织、饲料等行业外,大部分被白白地浪费掉。随着世界

人口的增长和可利用土地的减少,粮食问题日益严峻,长期以来,粮食一直是发酵制酒精的主要原料。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^[3]。随着研究的进行,人们将目光转移到了这种成本低廉、数量巨大的可再生资源——纤维素类物质。因此,纤维素的生物转化对当前世界能源危机、粮食短缺和环境污染等问题具有重要意义^[1]。

1 纤维质原料和纤维素酶的性质

纤维质原料包括纤维素、半纤维素和木质素。在大多数天然植物纤维中,纤维素和半纤维素含量相当,木质素是一种结构复杂的高分子聚合物,它在纤维素束周围形成保护层,使得水解变得很困难^[4]。纤维素在植物细胞壁中常常与半纤维素和木质素等物质以嵌入的形式存在,在常温下不会发生水解作用,温度的提高对其水解程度的影响很小。因此,只有对其进行预处理来破坏木质素、半纤维素对其的保护作用以及自身的结晶结

收稿日期:2004-09-22; 修回日期:2005-01-11

作者简介:王丽(1980-),女,硕士研究生,从事食品微生物研究工作。

构,然后再进行酸水解和纤维素酶水解产生葡萄糖进行乙醇发酵。而半纤维素却很容易水解,有的半纤维素成分即使在冷水中溶解程度也很大,在 100℃以下就能较好地溶解在稀酸中。它的水解液成分主要是木糖,它是不发酵糖,但是在木糖异构酶作用下能够异构成木糖醇,然后可进入酒精发酵途径。若酶解前对木质纤维素进行预处理,那么半纤维素和纤维素再用酶水解会容易些^[5],如物理方法:研磨、蒸汽爆裂法等,化学方法:稀酸、稀碱水解处理以及某些过氧化物酶类、氨、SO₂、CO₂ 处理等,常常是物理方法与化学方法相结合,效果较好。

纤维素酶是一种复杂的复合酶系,主要由 3 个成分组成^[6,7]:葡萄糖内切酶(ED),溶解可溶或不可溶的纤维素链,将线性 β-1,4 葡萄糖链切断;葡聚糖外切酶(CHB),作用于纤维素链的末端,释放纤维二糖和葡萄糖;β-葡萄糖苷酶(GL),将纤维二糖和短链可溶物转化为 D-葡萄糖。产纤维素酶的微生物包括真菌、细菌和放线菌,其中主要是康宁木霉(*Trichoderma Koningii*),黑曲霉(*Aspergillus Niger*),斜卧青霉(*Penicillium decumbens*),芽孢杆菌(*Bacillus sp*)等^[8]。丝状真菌产生的纤维素酶一般在酸性或中性偏酸条件下水解纤维素底物,而嗜碱细菌的纤维素酶一般在碱性范围起作用。

2 酒精发酵的机理和工艺研究

酒精工业常采用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或卡尔酵母(*S.carisbergensis*)进行酒精发酵,而酵母的发酵通常是通过 EMP 途径生成丙酮酸,然后丙酮酸脱羧成乙醛,在脱氢酶的作用下还原成乙醇。另外有发现利用假丝酵母(*candida*)发酵 D-木糖异构化代谢物 D-木酮糖生产酒精。

微生物发酵纤维素类物质产生酒精一般有 3 类,一是直接发酵法,利用产纤维素酶的分解菌直接发酵纤维素生产酒精,原料不需要进行酸解或酶解预处理。这种方法成本低廉,设备简单,发酵周期短,纤维素的降解率也很高,但是酒精的产出率低;二是间接发酵法,纤维素酶将纤维素分解,然后利用酵母发酵酶解液产生酒精。此种方法在工艺上要分两步进行,糖化液要分离收集;三是同步糖化发酵法,就是纤维素酶解过程和酵母的酒精发酵过程同时进行,这种方法酶水解产物葡萄糖能够不断被发酵成酒精,可以解除葡萄糖对纤维素酶的反馈抑制作用,提高发酵效率。

3 燃料酒精生产过程中存在的问题

3.1 酸水解

酸水解可以分为稀酸水解和浓酸水解,可以在较温和的条件下进行。稀酸水解可以将半纤维素转化为单元

糖,原料中的重金属被稀酸溶解,然后以氢氧化物的形式沉淀,最后和石膏一起被过滤掉。稀酸水解糖的转化率只能达到 50%,其水解过程中产生一种络合物,是大多数微生物的抑制剂^[9]。浓酸水解约有 90%的纤维素和半纤维素转化的糖被回收,但是浓酸水解中的酸难以回收。酸水解纤维素类物质早在 19 世纪末就有研究,但是迄今进展不大。传统处理途径是用石灰中和水解液,以调节 pH 值达到发酵生产要求。1987 年, Ladisch 等提出用离子排斥法(LE)分离水解液中酸和糖的方法,据 Nanguneri 等在 1990 年的估算,该法比传统的石灰中和法经济。1998 年 Wooley 等又提出了 9 段模拟移动床 LE 分离酸液和糖液的方法,据称不但能有效地分离硫酸和糖液,还能把水解副产物醋酸去除,已知后者是影响发酵的主要有害物质^[10]。酸水解过程中还要求容器是耐腐蚀、耐酸、耐压的,容器体积也较大。另外,酸解常会伴随生成有毒产物乳糖醛、酚类等物质,需要改善工艺,减少这些物质的产生。

3.2 酶水解

现在所使用的纤维素酶都是由真菌产生的。纤维素酶的研究首先着眼于厌氧性分解菌,由于这些细菌一般不分泌胞外酶,产能低,多数对结晶纤维素没活性。接着又有人提出使用好气性分解菌,如李氏木霉,后来又分离到酶活性相似的正青霉和能分解棉花的疣孢青霉。

由于酶具有底物高度专一性,所以产率很高,而且副产物很少,所以对于进一步的乙醇发酵减轻了提纯的工作量。但是,酶的成本较高,纤维素的酶解又需要大量的酶,在实际应用过程中对之加以有效地回收利用是必要的措施,研究较多的是采用超滤膜回收技术。另外,通过对微生物菌株的选择、诱变,以挑选能够增加酶的产率和提高酶的活性的突变株,达到降低酶用量的目的。工业化酒精发酵需要必需的营养成分量巨大,因此,降低营养物质的成本,寻求廉价资源是研究的方向。

影响纤维素转化酒精的因素还有原料的高结晶态使酶解速度减慢^[5],由于其对纤维素酶的强吸附作用,对酶的重复利用以及酶的固定化技术难以应用,致使酶解糖化工艺酶的耗量过多,而纤维素酶的合成需要不溶性纤维素诱导,生长周期长,生产效率低,结果使纤维素酶的费用占到总成本的 60%,因此,成本问题是阻碍纤维素类物质转化为燃料酒精进行工业化生产的主要因素之一。

3.3 发酵工艺的优化和菌种改造

3.3.1 同时糖化发酵

同时糖化法的优点是显而易见的,但同时也有明显的限制因素,一是木糖的抑制作用,二是糖化和发酵时

的最适温度不协调,三是酒精的抑制作用。同时糖化发酵法(SSF法)具有可解除葡萄糖因浓度过高对纤维素酶的反馈抑制的优点。糖化的结果产物是酒精发酵的前提和基础,但是往往由于糖化过程积累的许多可溶性产物如葡萄糖、纤维二糖、纤维三糖等抑制了酶的水解,间接地影响了酒精的发酵。此过程中通过添加高水平的 β -葡萄糖酶可减少纤维二糖和纤维三糖的积累,但是成本会相应增加。在SSF法过程中,采用短时间的超声波处理,可增加纤维素酶的作用效果^[11],进而可使真菌酶的用量降低10%~20%。另外,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。最近许多研究者将同时糖化发酵和分批补料技术相结合,使纤维素酶得到重复利用,发酵液中酒精浓度显著提高。

3.3.2 木糖的转化

将木糖及时转化为酒精,对高效率的酒精发酵是非常重要的。木糖的存在对纤维素酶水解纤维素有抑制作用,它本身对纤维素酶并无抑制作用,当木糖浓度达到5%时,木糖对纤维素酶的抑制可以达到10%。消除木糖抑制的办法是找到一个能将木糖转化为酒精的酵母,然后和利用葡萄糖转化为酒精的酵母混合培养。Karczewska于1959年第一次提出了木糖发酵乙醇。主要代谢途径是用木糖异构酶将木糖异构成木酮糖,再将木酮糖发酵成酒精。转化和利用木糖为乙醇的菌株主要有假丝酵母、管囊酵母。美国太阳能研究所开发出通过遗传子组换的大肠菌获得木糖异构酶的方法,将此酶与酵母并用,可使原料中木糖得到利用,酒精成本可下降25%。Hallborn将木糖异构酶基因转入酿酒酵母中,使其能发酵木糖^[12]。

现在木糖的发酵多与葡萄糖的发酵混合进行,与单纯利用葡萄糖发酵菌和单纯利用戊糖发酵菌相比,乙醇产量分别提高了30%~38%和10%~30%。运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶基因和乙醇脱氢酶基因均已成功地在大肠杆菌中表达,并能发酵葡萄糖、木糖,产生酒精。又如NREL的研究者在一种原来只能发酵葡萄糖的细菌*Z. Mobilis*中植入另一细菌*E. coli*的基因,使前者获得能够代谢木糖的酶,从而使*Z. Mobilis*菌既能发酵葡萄糖也能发酵木糖,酒精产率达到40%。

3.3.3 SSF法中糖化和发酵温度的协调

在纤维素酶糖化过程中,纤维素酶最适温度在50℃左右,而酵母发酵控制温度在37~40℃。如何使这两个过程的温度尽可能协调一致,是高效率生产酒精的重要因素。解决这两个过程温度不协调的方法有:采用耐热酵母(如假死酵母,克劳森氏酵母),进一步选育耐热

酵母,耐热酵母与普通酵母混合发酵。研究表明,耐热微生物对酒精的忍受力较差,且生产效率低^[10]。Zhangwen Wu等提出了非等温同时糖化发酵法生产乙醇,很好地解决了两个过程温度不协调的矛盾。

3.3.4 固定化细胞发酵工艺

固定化细胞发酵可以使细胞连续利用,提高发酵器内细胞浓度,从而使发酵液酒精浓度得到提高。研究最多的是酵母和运动发酵单胞菌的固定化,常用的载体有卡拉胶、多孔玻璃、海藻酸钙等,最近有研究发现将微生物固定在气液界面上进行发酵,其活性比固定在固体介质上高。另外,混合固定化细胞发酵也可以提高纤维质原料发酵产生酒精的效率,例如,将酵母和纤维二糖酶一起固定,将纤维二糖转化为酒精。

3.3.5 固态发酵技术

固态发酵就是使微生物在没有或几乎不存在游离水的固体培养基上生长代谢的过程,固态基质上水分以吸附水的形式存在。它的发酵过程中无需严格的消毒,无需消耗大量能量分离提纯产品并且产率很高。由于基质中水分很少,所以会大大降低染菌的机率,发酵结束无废水废渣产生,不会造成二次污染。但是,固态发酵也有很多不足之处,发酵过程会产生大量的代谢热,水分含量要求比较严格,固体培养基需要进行预处理以利于菌体吸附生长。

3.3.6 混合菌种和基因工程菌的应用

纤维质原料糖化液中都是葡萄糖、木糖、阿拉伯糖等单糖和寡糖混合物。现在的趋势是利用多种酒精发酵菌混合发酵,利用其间的优势,使得效率更高。如直接发酵法中,研究者力求找到能直接分解纤维素生成酒精的菌株以解决酒精产率低、副产物多的问题。热纤梭菌(*Clostridium thermocellum*)能分解纤维素,但乙醇产率低(50%),热硫化(*Clostridium thermohydrosulphairum*)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。又如,毕赤酵母是发酵戊糖的优良菌,而克劳森酵母是发酵纤维二糖的优良菌,Wayman将两者混合发酵经SO₂预处理纤维素类物质,取得十分理想的效果。

尽管进行了大量的研究,还没有发现哪一种微生物能将所有的糖快速有效地全部转化为乙醇,近来,基因工程菌的开发和应用部分解决了这个问题,采用基因工程的方法可很简单地制备出新的生物催化剂。*Klebsiella oxytoca*用于纤维素的发酵,具有代谢纤维二糖的能力,*K. oxytoca* P2已被广泛用于实验室规模的SSF发酵实验中,它还能代谢木二糖和木三糖^[13]。*Erwinia carotovora*和*E. chrysanthemi*菌株已被成功地用于乙醇的生

产中^[14],这两种菌株具有快速将糖发酵成乙醇的能力,还能分泌内切葡萄糖酶、果胶酶和半纤维素酶,辅助生物质转化。

3.3.7 酒精废糟的综合利用

酒糟虽然对环境是一种有机污染物,但是其中有丰富的营养物,因此对酒精综合利用的研究对于酒精工业的可持续发展和发展燃料酒精计划顺利进行具有重要意义。酒糟固液分离后一部分是酒精废液,另一部分是固态滤渣。为了避免或减少废糟对环境的污染以及实现资源的可循环利用,酒精废糟的处理回收技术很受关注。综合利用的途径有:酒糟干燥生产饲料、制备饲料酵母、厌氧发酵制取沼气、酒精废液生产菌体蛋白、酒精废液的全回流等。

酒精废液中酵母可吸收性氮含量较高,有利于酵母的生长和酒精发酵,使得酒精废液回用初期发酵醪中的酒精含量有所增高^[15]。另外,废液经多次循环利用后,一部分可溶性营养物质保留在滤渣中,使得干燥后的饲料中也会有部分营养成分,提高了饲料的经济价值。提高酒糟固液分离的效率,降低废液中固形物含量是提高酒精废液回用比例的关键。

4 结论

燃料酒精是一种潜力巨大的生物能源,纤维质原料具有来源广泛、成本低廉、可再生等优点,因此,用纤维质原料制燃料酒精具有其他淀粉原料不可比拟的优势。但是,转化过程中纤维素酶的成本降低问题、发酵工艺的优化问题以及酒精废糟的综合利用问题尚未得到完善,值得我们深入的研究解决。

参考文献:

[1] 肖春玲,等.微生物纤维素酶的应用研究[J].微生物学杂志,2002(2):33-35.
[2] 张新武,等.纤维素酶在饲料工业的应用现状和展望[J].饲料广角,2002(10):23-24.
[3] 张继泉,等.利用木质纤维素生产燃料酒精的研究进展[J].

酿酒科技,2003(1):39-42.
[4] 章克昌.酒精与蒸馏酒工艺学[M].北京:中国轻工业出版社,1995.310-344.
[5] Grohmann, K.Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulosic Substrates to Ethanol [M].J.N.Saddler(ed.),1993.183-209.
[6] Lee Y.-H.;Fan L.T.Properties and Mode of Action of CellulaseIn, Advances in Biochemical Engineering[M].New York: Springer-Verlag,1980.342-351.
[7] Kuhad, R.C.; Singh. A.; Ericksson. K.-E. Microorganisms and Enzymes Involved in the Degradation of Plantd Fiber Cell Wall. In Advance in Biochemical Engineering;Biotechnology in the Pulp and Paper Industry[M].Eriksson.K.-E., Eds., New York: Springer-Verlag, 1997.
[8] 那安,等.康氏木霉纤维素酶系的研究[J].微生物学报,1985,25(1):31-39.
[9] du Preez. C.Process Parameters and Environmental Factors Affecting D-xylose Fermentation by Yeasts [J].Enzyme Microb.Technol,1994(16):944-956.
[10] 王倩,等.生物质生产酒精的研究进展[J].酿酒科技,2003(3):56-58.
[11] 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.
[12] Wood, B. E., Aldrich, H.C., Ingram, L.O. Ultrasound Stimulates Ethanol Production During the Simultaneous Saccharification and Fermentation of Mixed Waste Office Paper [J]. Biotechnol. Prog, 1997(13):232-237.
[13] Bauchhardt, G., Ingram L.O.Conversion of Xylan to Ethanol by Ethanol Logenic Strains of Escherichia Coli and Klebsiella Oxytoca [J]. Appl. Environ. Microbiol, 1992,(58):1128-1133.
[14] Beall D.S., Ingram, L.O. Genetec Engineering of Soft-rot Bacteria for Ethanol Production from Lignocellulose [J]. J. Indust. Microbiol,1993,(11):151-155.
[15] 照华,周海燕.对酒糟综合治理的思考[J].酒精工业,1998,(2):56-60.

酒企开始寻找新突破口

本刊讯:多年来被通道层层“盘剥”的白酒企业,正在悄然寻求新的通道“突破口”。五粮液集团与中国烟草联手在广州推出的新子品牌金叶神酒,就是借助中国烟草在全国 2.8 万个销售网点的渠道优势。由此在产品推广方面将节约至少 30 %左右的费用,从而其产品零售价格比同类产品低 100~200 元,这部分费用就会作为明明白白的优惠“返还”给消费者。广东名酒专卖行有限公司采用了与目前其他酒类销售渠道不同的方式,对所有入场的酒将全部免租金和进场费,采用厂家直供渠道。

业内人士指出,白酒业销售终端所出现的新形式目前对行业还不会产生太大影响,但等发展起规模后可能会促使销售格局发生变化,一些白酒企业可能会因为流通成本的缩减而降低销售价格。(小江)