

文章编号: 1673-1689(2011)02-0161-05

纤维乙醇发酵和脱水工艺的发展前景

湛含辉¹, 黄丽霖²

(1. 中国矿业大学 环测学院, 江苏 徐州 221008; 2. 湖南工业大学 土木学院, 湖南 株洲 412008)

摘要: 纤维乙醇发酵菌株的选育影响糖的利用率, 特别是木糖利用率的提高有利于乙醇产量的增加。作者综述了纤维乙醇发酵中发酵菌株、发酵工艺和脱水工艺的研究现状, 分析它们的优缺点, 并提出了未来纤维乙醇发酵和脱水工艺的研究方向。

关键词: 纤维乙醇; 木糖发酵; 工程菌; 发酵工艺; 乙醇脱水

中图分类号: TS 261.4

文献标识码: A

Prospects in Fermentation and Dehydration Lignocellulosic Ethanol

ZHAN Hairhui¹, HUANG Lirilin²

(1. School of Environment Science and Spatial Informatics, China University of Mining and Technology, Xuzhou 221008, China; 2. School of Civil Engineering, Hunan University of Technology, Zhuzhou 412008, China)

Abstract: The breeding of fermentation strains affect the efficiency of sugar utilization on lignocellulosic ethanol, especially for increasing the xylose utilization efficiency to improve ethanol yield. This review summarized the development of fermentation strains, processes optimization and ethanol dehydration on lignocellulosic ethanol, and their advantages were discussed. Moreover, the future on the development of fermentation and ethanol dehydration are proposed.

Key words: lignocellulosic ethanol, xylose fermentation, genetic strains, fermentative process, ethanol dehydration

木质纤维原料组分的结构复杂, 其主要是纤维素、半纤维素和木质素等的聚合物, 一般需要经过预处理和水解过程将其转化为单糖的形式后, 通过酵母菌或细菌发酵得到乙醇和 CO₂。葡萄糖和木糖是纤维素(30%~40%)和半纤维素(25%~35%)能够转化为单糖的主要形式。自然界中大部分的细菌、真菌和酵母菌都能代谢葡萄糖, 最为典型的是酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)。它们都能很好

地利用葡萄糖, 其中在生物乙醇的工业生产中, 大多数利用酿酒酵母作为生产菌株。它的发酵工艺成熟, 乙醇耐受性好, 但是不能发酵木糖等五碳糖。如今, 大部分的研究都集中于将能代谢葡萄糖的优良菌株进行代谢改造, 使其能够发酵木糖。然而在自然菌株中, 能直接发酵木糖的菌株由于乙醇耐受性差、发酵生产效率低而未能达到工业化生产的要求。

目前, 根据实际发酵条件的特点, 发酵中采用

收稿日期: 2010-04-16

* 作者简介: 湛含辉(1961-), 男, 湖南汨罗人, 博士后, 教授, 主要从事环境工程及水处理技术与设备方面的研究。Email: zhanhhh@263.net

不同的发酵工艺。同时为了减小乙醇脱水过程中消耗的能耗,国外学者对蒸馏、分子筛吸附和膜分离等乙醇脱水工艺进行了大量的研究。此外,在针对发酵过程中酵母对乙醇的耐受性差,发酵效率低和乙醇浓度不高等问题上,研究利用发酵与分离过程的耦合来解决这些问题。作者主要介绍了纤维乙醇发酵过程和脱水工艺的研究现状及其优缺点,并提出了今后的发展方向。

1 发酵菌株

木糖是木质纤维素水解物中含量仅次于葡萄糖的单糖,是半纤维素的主要成分之一^[1]。自然界能发酵木糖的菌种主要是嗜鞣管囊酵母(*Pachysolen tannophilus*)、树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)和休哈塔假丝酵母(*Candida shehatae*)。它们是在限制性供氧下进行发酵,乙醇耐受性和发酵能力都不如酿酒酵母和运动发酵单胞菌。到目前为止,自然界中还没有一种微生物发酵木糖的能力能够满足工业化生产的需要。因此选育优良的发酵菌株是提高木糖转化率的关键之一。

目前,在木糖发酵中对发酵葡萄糖性能好的菌株构建的工程菌已取得较大进展,主要是对大肠杆菌、运动发酵单胞菌和酿酒酵母通过细胞融合技术或构建工程菌等技术对菌种进行代谢改造,进一步拓宽菌株对底物的利用率。大肠杆菌缺乏高产乙醇的酶系,使丙酮酸被其他途径分解,且代谢副产物醛类和有机酸等较多。Ingram等^[2]将运动发酵单胞菌的丙酮酸脱氢酶(PDC)和乙醇脱氢酶基因(ADHII)构建了PET操纵子,将其导入大肠杆菌中,促使它提高乙醇的产量。运动发酵单胞菌发酵糖的速率高于酿酒酵母,但发酵效率不如酿酒酵母,耐乙醇性较差,而且缺乏木糖转化到木酮糖等途径的酶的基因。Zhang等^[3]在1995年首次成功地将木糖异构酶基因(*xyIA*)、木酮糖激酶基因(*xyIB*)、转酮酶基因(*tktA*)和转醛酶基因(*talB*)导入运动发酵单胞菌中,使其在以木糖为碳源的培养基上生长,同时得到乙醇产量达到理论产率的86%。但是它在发酵中易发生染菌现象,得到较多的副产物,还不能大规模应用。

酿酒酵母是工业发酵应用最为广泛的菌株,发酵乙醇效率高和耐乙醇性强,由于缺乏木糖转化为木酮糖的酶的基因而不能代谢木糖。通常构建木糖发酵的酿酒酵母工程菌种主要有两种方法:一是向宿主菌株中转入木糖异构酶基因(*xyIA*),二是向宿主菌株中转入木糖还原酶基因(XYL1)和木糖脱

氢酶基因(XYL2)。Kotter等^[4]将树干毕赤酵母的XYL1和XYL2共同导入到酿酒酵母中,并使其活性表达。从理论上讲,导入以上两种基因的酿酒酵母可以代谢生成乙醇,但是在实验中发现下游代谢中还存在木酮糖激酶、转醛醇酶和转酮醇酶等部分酶系发酵活性低而不能得到高产量的乙醇。Karhumaa等^[5]将XYL1、XYL2、TKL1和TAL1等导入酿酒酵母并过量表达,从而增加了重组菌的生长速度和乙醇产量。尽管构建的工程菌能在木糖培养基上生长,并发酵木糖生成乙醇,然而要实现工程菌的商业化,还需要解决外源基因在重组菌株中的表达稳定性、细胞内氧化还原平衡、乙醇产量和乙醇的耐受性等问题。

2 发酵工艺

纤维乙醇发酵工艺主要有统合生物工艺(Consolidated bioprocessing, CBP)、同步糖化发酵(Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)、分步水解发酵(Separate hydrolysis and fermentation, SHF)和固定化细胞发酵。

CBP是用一种微生物在一个反应器中直接发酵制取乙醇。它在发酵前原料要经过预处理,但发酵菌株不一定是能产纤维素酶的微生物,而是需要一种能较好利用底物的工程菌来完成多步反应。目前研究较多的是热纤维梭菌(*Clostridium thermocellum*)^[6]。它严格厌氧,能产生纤维素酶和半纤维素酶,具有发酵葡萄糖和木糖的能力,但乙醇产率低,副产物多,发酵周期长,乙醇耐受性差。最近美国国家可再生能源实验室提出里氏木霉(*Trichoderma reesei*)解决了乙醇产率低、耐乙醇性差、氧的供给和糖的跨膜转运等问题后,将会是CBP中能有效水解和发酵的微生物^[7]。SSF是酶水解和发酵过程在同一装置下进行,从而解除了酶解中产生的纤维二糖和葡萄糖对纤维素酶的抑制作用,来提高水解效率。然而在SSF中由于水解和发酵所需的温度不协调,以及乙醇对酶的抑制作用,易降低工艺的反应速率。通常水解在50℃下进行,而发酵在35℃下完成。因此,选育耐高温的发酵菌株,实现高温发酵有利于提高同步糖化发酵工艺的效率。此外,为了避免葡萄糖阻遏木糖的发酵过程和水解与发酵中温度的不协调,可采取葡萄糖和木糖的同步糖化共发酵的工艺(Simultaneous saccharification and cofermentation, SSCF)。目前美国国家可再生能源实验室对同步糖化共同发酵葡萄糖和木糖进行研究^[8],而发酵的菌种主要是基

因工程菌, 主要是将能够转化木糖的酶基因转入到本身能够产生纤维素酶的菌株中(主要是大肠杆菌和克雷伯氏菌), 同时再由这两种菌株发酵水解的糖转化为乙醇, 其中克雷伯氏菌能够将 100 g/L 的木糖转化为 48 g/L 的乙醇。

SHF 是把酶水解和发酵生产乙醇过程分开进行。这种方法保证了在 45~50 °C 下进行酶解和在 30~35 °C 下进行发酵。然而它的不足之处是在酶解中产生的糖会抑制纤维素酶的活性^[9]。固定化细胞发酵可提高细胞浓度, 使细胞连续使用, 常用海藻酸钠、卡拉胶和多空玻璃等作为固定化载体。此外, 还可以利用酵母细胞自絮凝性得到无载体的固定化细胞。宋向阳^[10]等人用海藻酸铝凝胶将树干毕赤酵母细胞固定, 使凝胶表面细胞密集, 减少了传递阻力, 有利于酵母在限氧下发酵产乙醇。此外, 白凤武等^[11]人用自絮凝酵母颗粒进行无载体的细胞固定化, 并将木质纤维糖化后的残渣过滤去除, 使发酵过程在清液中进行。这种方法使得发酵废液中不含酵母细胞, 废液的 COD 值降低, 同时精馏后的废液可以实现全循环使用。因此, 在解决废液污染问题的同时, 还节约工艺用水。

CBP、SSF、SHF 和固定化细胞发酵各工艺在发展中都有各自的优势和不足。尽管 CBP 能直接用一种微生物完成多步反应, 工艺设备简化, 但是在达到工业化应用上仍需要一段时期的对工艺进行优化和改进, 并进一步提高发酵效率。对 SSF 而言, 把水解和发酵集于一个反应器中进行, 使工艺设备得以简化, 但是在同一个反应器中需要解决代谢产物对发酵过程、酶水解的抑制, 工程菌的构建能够满足工业应用, 以及保证两个过程在各自适宜的反应温度下进行等问题。因此, 选育具有高糖利用率和耐抑制物的发酵菌种是提高此工艺发酵效率的研究方向之一。SHF 在发酵中的应用还较为普遍, 它不受纤维素酶水解温度的影响, 同时木糖发酵过程中也不受产生葡萄糖效应等问题的影响, 只需选育高效发酵木糖的菌种和提高发酵效率就能使此工艺得到很好地发展。目前, 固定化细胞发酵技术在工业上的应用较少, 主要是存在载体的重复利用、成本和营养、氧气在发酵中的传质等问题。将固定化技术用于 SSF 和 SHF 工艺中, 同时解决它在发酵中还存在的问题, 可以缩短发酵周期, 解决酵母和产物分离等工艺过程, 同时还提高整个工艺的发酵效率。因此, 固定化技术在发酵工业的应用是今后发酵的主要研究方向之一。

3 乙醇脱水

木质纤维素发酵后乙醇浓度低, 需要对其进行脱水才能用于燃料乙醇。工业上用于乙醇脱水的技术有精馏法、吸附法和膜分离。表 1 比较了几种主要制备无水乙醇的方法^[12-13], 图 1 表明了从高乙醇浓度制备无水乙醇的能耗分析和从低浓度制备无水乙醇的能耗分析^[13]。

传统精馏法要得到无水乙醇, 其最大的能耗来于共沸点附近的乙醇-水的分离过程。在乙醇体积分数为 95.57% 时, 乙醇和水物系存在共沸组成, 当蒸馏发酵液中乙醇浓度达到 92% 时, 蒸馏的能耗将成倍增加, 且精馏过程中由于使用苯、环己烷和戊烷等作为共沸剂时会带来二次污染。

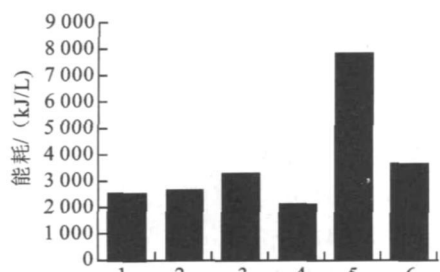
吸附法是根据水-乙醇分子大小的差异选择性地吸附水。它具有自动化程度高、无污染的特点。目前研究较多的是生物质吸附和分子筛吸附, 其中分子筛吸附剂再生时需要较大能耗。在生物质作为吸附剂时, 一般是将发酵液先蒸馏到 75%~90% 的乙醇溶液, 再用生物质吸附。有研究表明^[14], 采用混合式方法提纯乙醇的能耗比仅用精馏的小。

膜分离是膜技术与蒸发过程相结合的膜蒸馏, 在分离水-乙醇等共沸物时具有高效节能的特点。它主要包括渗透汽化法和蒸汽渗透法, 其中渗透汽化法是膜分离中研究较多的一种方法。相比于蒸馏和萃取等方法来说, 渗透汽化法技术的操作简单、提纯的产物浓度较高, 无污染, 且能耗为恒沸精馏过程的 1/3 左右, 因而得到了广泛的研究和应用^[15-16]。渗透汽化技术中膜材料的开发是研究的重点。而优先透水膜相对于优先透醇膜的研究较为广泛。

表 1 制备无水乙醇方法的比较

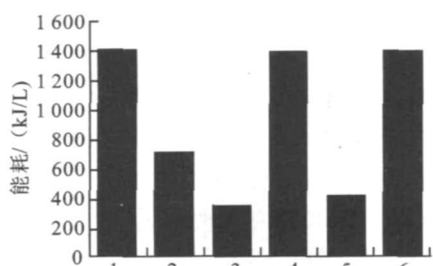
Tab. 1 Compare of the method to produce dehydrated ethanol

方法	特点	存在问题及发展
共沸蒸馏	产量大, 质量好, 生产稳定, 技术成熟	分离能耗高, 需要对设备进行技术升级
膜分离	选择性好, 能耗低	研发高性能(渗透性和稳定性)的膜材料
分子筛吸附	自动化程度高, 产品质量好	分子筛再生的能耗大
生物质吸附	生物质廉价丰富, 分离能耗低, 无污染	在最佳吸附速度时的吸附性能最佳



(a)乙醇体积分数10%~99%制备无水乙醇的能耗

1. CO₂ 超临界萃取; 2. 丙烷接近超临界萃取; 3. 传统精馏+玉米粉吸附水; 4. 玉米粉吸附水; 5. 液相树脂乙醇的吸附与脱附; 6. 传统精馏+膜精馏



(b)乙醇体积分数从85%~99.99%制备无水乙醇的能耗

1. 分子筛吸附(沸石); 2. CaO 气相吸附; 3. 纤维素气相吸附; 4. 气相玉米粉吸附(液相进料); 5. 气相玉米粉吸附(气相进料); 6. 液相聚合物水吸附+汽油萃取乙醇

图1 由高浓度(a)和低浓度(b)制备无水乙醇消耗的能耗

Fig. 1 Energy consumption for preparing anhydrous ethanol from high ethanol concentration(a) and low ethanol concentration(b)

由图1中的a和b可以看出,从较低体积分数制备无水乙醇的过程的能耗比从较高体积分数制备无水乙醇的能耗大,因此,在提纯乙醇时,可以先用传统的精馏方法将较低浓度的乙醇蒸馏到体积分数为90%的乙醇,再选用膜分离等有效且又节能的分离技术制备无水乙醇。

总的来说,传统的蒸馏方法在提纯无水乙醇

时,能耗过大而不适于乙醇脱水中的应用。而膜分离技术相对于其它脱水方法来说,膜分离的能耗较低。在寻找到经济实用、稳定性和通透性好的膜材料后,其会具有较大的工业发展前景。

4 发酵与分离过程的耦合

针对发酵生产过程的效率低,产生的乙醇对发酵过程产生抑制作用,使得到的乙醇体积分数不高(在8%~10%左右)等缺点,提出发酵与分离过程相结合的工艺,如:乙醇气提发酵、乙醇发酵与吸附耦合、乙醇发酵与膜分离耦合等。其中真空发酵渗透汽化膜技术由于它具有分离效率高、对发酵微生物无毒害作用等特点。此外,由于它在分离过程的能耗较低而具有一定的优势。因此,发酵过程与分离过程的结合避免乙醇对发酵过程的抑制和微生物的毒害作用,从而实现发酵过程的连续进行。目前,发酵与分离的耦合系统还处于研究阶段,相信今后真空发酵渗透汽化膜技术中研究选取稳定性好、选择性高的优先透醇膜材料有利于提高发酵生产乙醇的效率。

5 发展前景

今后在纤维乙醇的发展中,通过运用基因工程技术对酿酒酵母等发酵菌株进行改造,并解决工程菌在应用中存在限制性供氧、发酵效率低、表达基因不稳定等问题,使其成为今后纤维乙醇发酵技术中研究的主要方向之一。此外,进一步研究将固定化发酵技术用于发酵中,提高发酵液中细胞浓度,同时通过研发性能较好的膜分离材料解决乙醇对发酵细胞的抑制问题,保证发酵的持续进行,使得发酵和膜分离过程的耦合来优化发酵工艺,解决发酵耐乙醇性差和发酵效率低的问题,并能够在工业上得到应用。

参考文献(References):

- [1] 孙万里,陶文沂. 木质素与半纤维素对稻草秸秆酶解的影响[J]. 食品与生物技术学报, 2010, 29(1): 18- 22.
SUN Wair li, TAO Wei yi. Effect of lignin and hemicellulose on enzymatic hydrolysis of cellulose from rice straw[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2010, 29(1): 18- 22. (in Chinese)
- [2] Ingram L O, Conway T, Clark D P, et al. Genetic Engineering of ethanol production in *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1987, 53: 2420- 2425.
- [3] Zhang M, Eddy C, Deanda K, et al. Metabolic Engineering of a pentose metabolism pathway in ethanologenic *Zymomonas mobilis*[J]. *Science*, 1995, 267: 240- 243.
- [4] Kotter P, Amore R, Hollenberg C P, et al. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, XYL2, and construction of a xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant[J]. *Curr Genet*, 1990, 18: 493

- 500.

- [5] Karhumaa K, Fromanger R, Hahn Hagerdal B, et al. High activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase improves xylose fermentation by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. **J Appl Microbial Biotechnol**, 2007, 73: 1039-1046.
- [6] Tyurin M, Desai S G, Lynd L R. Electrot ransformat ion of *Clostridium thermocellum* [J]. **App l Environ Microbio**, 2004, 70: 883- 890.
- [7] Qi Xu, Arjun S, Michael E H. Perspectives and new directions for the production of bioethanol using consolidated bioprocessing of lignocellulose [J]. **Current Opinion in Biotechnology**, 2009, 20: 1- 8.
- [8] Bauchhardt G, Ingram L O. Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* [J]. **Appl Environ Microbiol**, 1992, 58(11): 1128- 1133.
- [9] Cantarella M, Alfani F, Cantarella L, et al. Biosaccharification of cellulosic biomass in immiscible solvent - water mixtures [J]. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 2001, 11: 867- 875.
- [10] 宋向阳, 勇强, 毛连山, 等. 树干毕赤酵母固定化细胞的酒精发酵 [J]. 南京林业大学学报, 2002, 26(3): 1- 4.
SONG Xiang yang, YONG Qiang, MAO Liang shan, et al. Fermentation of ethanol by immobilized cells of *Pichia stipitis* [J]. **Journal of Nanjing Forestry University**, 2002, 26(3): 1- 4. (in Chinese)
- [11] 谢健, 白凤武, 云战友, 等. 自絮凝酵母颗粒连续发酵生产酒精的新工艺 [J]. 微生物学报, 1999, 39(4): 367- 372.
XIE Jian, BAI Feng wu, YUN Zhan you, et al. Industrial scale up of continuous ethanol fermentation using yeast flocs [J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 1999, 39(4): 367- 372. (in Chinese)
- [12] 李沫林, 陈砺, 严宗诚, 等. 燃料乙醇脱水工艺的研究与展望 [J]. 食品工业科技, 2010, 31(5): 410- 413.
LI Mo lin, CHEN Li, YAN Zong chen, et al. Study and prospect of dehydration processing of fuel ethanol [J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2010, 31(5): 410- 413. (in Chinese)
- [13] 赵淑芳, 刘宗章, 张敏华. 节能型乙醇脱水技术研究进展 [J]. 酿酒科技, 2006, 1: 110- 113.
ZHAO Shu fang, LIU Zong zhang, ZHANG Min hua. Research advance in energy saving ethanol dehydration techniques [J]. **Liquor Making Science and Technology**, 2006, 1: 110- 113. (in Chinese)
- [14] 王秀道, 尹卓容. 分子筛吸附法生产无水酒精 [J]. 酿酒科技, 2002, 109: 24- 25.
WANG Xiu dao, YIN Zhuo rong. Anhydrous alcohol production by molecular sieve absorption process [J]. **Liquor Making Science and Technology**, 2002, 109: 24- 25. (in Chinese)
- [15] 马晓建, 吴勇, 牛青川. 无水乙醇制备的研究进展 [J]. 现代化工, 2005, 25(1): 26- 29.
MA Xiao jian, WU Yong, NIU Qing chuan. Progress in manufacture of anhydrous ethanol [J]. **Modern Chemical Industry**, 2005, 25(1): 26- 29. (in Chinese)
- [16] 张艳艳, 熊兴耀, 谭兴和, 等. 燃料乙醇渗透蒸发脱水研究进展 [J]. 酿酒科技, 2009, 4: 87- 90.
ZHAN Yan yan, XIONG Xing yao, TAN Xing he, et al. Research progress in fuel ethanol dehydration by pervaporation [J]. **Liquor Making Science and Technology**, 2009, 4: 87- 90. (in Chinese)