

# 木质纤维素乙醇发酵研究中的关键点及解决方案

路 鹏<sup>1</sup>, 江 滔<sup>1,2</sup>, 李国学<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094; 2. 乐山师范学院化学与生物系, 四川 乐山市 614011)

**摘 要:** 该文综述了近年来木质纤维素材料发酵生产乙醇的研究进展, 提出了在木质纤维素原料发酵生产乙醇过程中的两大关键点, 一是减少和消除原料预处理过程中抑制物及其有害影响; 二是含木糖、葡萄糖、甘露糖、半乳糖等多种物质的混合物同时作为底物的乙醇发酵。在对已有研究结果比较和分析基础上, 提出相应的解决方案。首先要采取综合的预处理过程, 达到提高木质纤维素水解率的同时减少发酵抑制物; 然后是提高发酵菌种对混合糖底物的利用能力和发酵生成乙醇的能力以及对抑制物的耐受性, 以提高木质纤维素发酵生产乙醇的转化率。

**关键词:** 木质纤维素; 水解; 抑制物控制; 乙醇发酵

**中图分类号:** TK6

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-6819(2006)09-0237-04

路 鹏, 江 滔, 李国学. 木质纤维素乙醇发酵研究中的关键点及解决方案[J]. 农业工程学报, 2006, 22(9): 237-240.

Lu Peng, Jiang Tao, Li Guoxue. Key points of ethanol fermentation of lignocellulose and resolving methods[J]. Transactions of the CSAE, 2006, 22(9): 237-240. (in Chinese with English abstract)

## 0 引 言

乙醇是生物质液体能源物质的主要形式, 也是化石燃料最可能的替代品。以淀粉类和糖类作为发酵原材料, 采用微生物法发酵生产乙醇是一项成熟的技术, 但高昂的原料成本使发酵法生产乙醇的工业应用受到限制。为了降低发酵生产乙醇的成本, 人们把目光投向木质纤维素材料。它成本低廉、来源广泛, 不仅包括秸秆等农业废弃物, 还包括城市固体废弃物、办公废纸、杂草、锯末等<sup>[1]</sup>以及市政废水中的固体部分<sup>[2]</sup>。

早在 1997 年 Lee 就根据木质纤维素物质的结构特点, 提出利用它发酵生产乙醇的三个关键方面(1)如何打破纤维素与木质素之间的紧密结合;(2)如何使纤维素与半纤维素(超分子聚合物)解聚, 释放出游离的糖分子;(3)如何进行戊糖与己糖的混合糖发酵<sup>[1,3]</sup>。因此, 如何使木质纤维素这种抗微生物降解的天然植物高分子结构解聚成易被微生物利用的底物是采用预处理方法的目标。学者们对预处理方法提出了以下要求:(1)有利于提高水解得糖率, 或有利于提高随后的微生物酶解作用产糖量;(2)避免或减少水解过程中碳水化合物进一步降解带来的损失;(3)减少抑制性作用的物质产生, 避免对随后水解发酵过程有害影响;(4)具有经济上可行性<sup>[4]</sup>。在现有的预处理方式中, 稀酸水解处理法是较具有现实意义的方法。它解决了 Lee 提出的木质纤维素物质生产乙醇的前两个关键方面。

人们对各种木质纤维素物质的乙醇发酵进行了广泛的探索性研究, 所使用的原材料包括玉米穗轴<sup>[5]</sup>、向日葵秸秆<sup>[6]</sup>、葵花籽壳<sup>[7]</sup>、造纸厂的纸浆废液<sup>[8]</sup>、甘蔗榨糖后的废渣<sup>[9]</sup>、木材加工废料<sup>[10]</sup>等。存在的问题主要为: 一方面预处理过程产生的抑制物种类较多数量大, 过多的底物转化为抑制物质, 某些方法虽然有效降低了抑制物产生, 但成本过高, 难以实用。另一方面, 发酵菌种的研究常常针对单一底物, 对复杂底物混合物的发酵研究力度不够, 与大规模的工业化生产脱节, 难以达到工业生产的要求, 取得的成果大多停留于试验室阶段<sup>[2]</sup>, 据此本文将结合两方面的研究进展探讨可能的解决方案。

## 1 木质纤维素水解物发酵研究中的关键点

木质纤维素水解物发酵的研究中主要的关键点有两个: 首先, 如何解决木质纤维素水解过程中产生的抑制物质对发酵的抑制作用; 其次, 木质纤维素水解物包括五碳糖(木糖)、六碳糖(葡萄糖、甘露糖、半乳糖)和纤维寡糖在内的多种糖的混合物, 如何高效利用混合糖类物质进行发酵。上述这两点也是目前生物质能源转化研究中的热点问题。

## 2 木质纤维素水解的抑制物控制

### 2.1 抑制物质的产生与作用

木质纤维素原料在高温高压预处理(水解)过程中产生三大类发酵抑制物质, 分别为脂肪酸、糠醛和芳香族化合物<sup>[11]</sup>(图 1)。抑制性物质随着预处理温度升高和处理时间的延长而增加。同时抑制性物质的生成与木质纤维素材料的质地相关。木质纤维素材料不同, 产生的抑制物质的数量与比例也不同。通过对烟草秸秆水解液分析, 发现同样条件下烟草秸秆水解后产生的抑制物质比玉米秸秆少<sup>[12]</sup>。

存在多种抑制物时, 对发酵的影响比仅存在单一抑制物时要强烈<sup>[3,5]</sup>。如松柏醛与羟甲基糠醛同时存在, 发

收稿日期: 2005-12-31 修订日期: 2006-03-18

基金项目: “十五”国家科技攻关课题(2004BA516A03); 985 工程”农业资源及其高效利用创新平台

作者简介: 路 鹏(1969-), 男, 博士研究生, 研究方向: 废弃物处理与资源化。北京 中国农业大学资源与环境学院, 100094。

Email: lupeng531@163.com

\*通讯作者: 李国学(1963-), 男, 教授, 博士生导师, 从事废弃物处理和资源化利用、环境影响与评价、绿色食品生产和土壤污染治理技术研究。北京 中国农业大学资源与环境学院, 100094。

Email: ligx@cau.edu.cn

酵作用几乎完全终止,酿酒酵母对于抑制物质的抗性取决于它对抑制物的转化能力;实验发现酿酒酵母不同菌株对上述两种抑制物的混合物转化能力极低<sup>[3, 4, 13]</sup>。

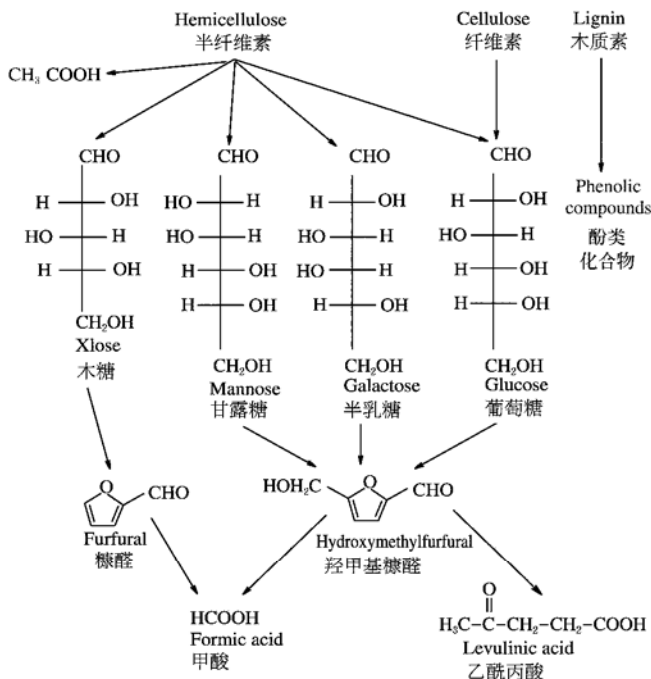


图1 木质纤维素的水解产物及产生的发酵抑制物<sup>[11]</sup>

Fig. 1 Hydrolyzed products of lignocellulose and hydrolysis-derived fermentation inhibitors

## 2.2 减少或消除抑制物及其抑制作用的方法

通过吸附、中和的方式使抑制物降解或减量。如在水解液中加入 CaO 或沸石可以中和或吸附抑制物<sup>[5]</sup>。用碱或亚硫酸盐处理也可以除去水解液中的抑制物<sup>[14]</sup>。这些方法在大规模工业化生产上不经济。

改变预处理方法,采用纤维素分解真菌预处理,可以大大减少发酵抑制物产生。如将葵花籽壳水解物用里氏木霉处理之后,再用酿酒酵母进行发酵<sup>[7]</sup>。另外直接利用酶制剂水解纤维素,同样可以在一定程度上减少有害物质的产生<sup>[2]</sup>。当采用多菌种复合处理木质纤维素物质时,纤维素酶活大幅度提高,并且作用时间延长<sup>[15]</sup>。另外,对采用物理化学方法得到的木质纤维素水解液,用木质素降解酶或漆酶可以将抑制物中的一部分降解<sup>[14]</sup>。总之,采用生物酶解法可以有效避免因高温产生的糠醛,羟甲基糠醛和酚类等发酵抑制物,但是木霉培养及生产纤维素酶的高昂成本,使得该项技术实用性受到怀疑。

改变发酵过程中微生物的培养方式与发酵工艺也能够减弱抑制物质的影响。如利用固定化细胞培养方法用戊糖和己糖的不同微生物细胞固定于凝胶中共培养,完成混合糖的乙醇发酵<sup>[16]</sup>,是减轻抑制物质对发酵菌体有害影响的一种方法;将生物水解过程与乙醇发酵过程耦联,即将纤维素分解菌或水解酶直接与发酵菌株混合进行发酵,也就是SSF法(同时糖化发酵)。它解决了水解糖化和发酵两步生化反应中所产生的纤维二糖和

葡萄糖的反馈抑制作用,可获得较高的乙醇产率。SSF法一般采用的是木霉分泌的纤维素酶,需要解决的主要问题是酶解与酵母发酵过程之间存在的温度差异<sup>[17]</sup>;连续细胞循环发酵法中的膜分离技术<sup>[18]</sup>也是消除抑制物影响的有效方法。

## 3 混合糖底物的乙醇发酵

### 3.1 混合糖发酵的特殊性

当对木质纤维素材料预处理时(水解),使纤维素、半纤维素的超分子结构遭到破坏,产生五碳糖和六碳糖两类不同的单糖,其中半纤维素水解产生木糖、甘露糖、半乳糖和葡萄糖,纤维素水解产生葡萄糖<sup>[11]</sup>。如造纸厂的纸浆废液(木质纤维素的水解液),是含多种糖的复合物,其中含有62%的葡聚糖和11.5%木聚糖<sup>[8]</sup>。底物的多样性使其难以被一种微生物所转化。特别是木糖,虽然可被许多细菌、酵母菌、真菌吸收利用,但却不能被发酵转化成乙醇<sup>[8, 19, 20]</sup>。有实验证明,随着底物中木糖浓度增加,乙醇的收率下降,在相同的浓度范围内使用葡萄糖底物却没有这种现象<sup>[20]</sup>。

通过对代谢途径的研究表明:木糖的发酵转化具有特殊性,它是一个需氧的生化过程。在利用基因重组酿酒酵母发酵木糖的研究中,发现氧气含量对木糖发酵具有重要影响。它的作用有两个方面,一方面,从电子传递链上接受来自NADH的电子,维持氧化还原反应的平衡性。随着供氧量的增加,木糖醇的产量下降。另一方面,氧促使乙醇进一步氧化。因此木糖发酵就存在最佳供氧量问题<sup>[21]</sup>。如利用木糖进行乙醇发酵毕赤酵母菌在完全厌氧条件下,在木糖培养基上生长停止<sup>[22]</sup>。

### 3.2 木质纤维素水解物乙醇发酵对菌种的要求

根据木质纤维素水解物本身的特殊性,Dien于2003年提出了利用木质纤维素工业化发酵生产乙醇的菌种的标准<sup>[17]</sup>(表1),在这个表中,有一点他并未提到,就是微生物对底物作用专一性问题。通常在发酵工业中,所用的菌株对底物和环境条件都有严格的要求,特别是底物的范围。这种趋势随着人工选育作用的增强而加强;单一菌株适用于特定的培养基和培养条件,当条件稍有变动就会大大影响其发酵功能,并且还存在着菌种退化与污染的问题。自然界有少数菌种能够发酵多种单糖,如汉逊酵母,它对木糖、纤维二糖、葡萄糖混合物可在高温下发酵,但对酒精的耐受性差<sup>[23]</sup>。

表1 乙醇工业化生产用菌株应具备的重要特征<sup>[17]</sup>

Table 1 Important traits of microorganism in ethanol producing process

特点	要求
乙醇产量	> 90% 理论生产值
对乙醇耐受性	> 40 g · L <sup>-1</sup>
乙醇产率	> 1 g · L <sup>-1</sup> · h <sup>-1</sup>
旺盛生长并只需要简单培养要求	便宜的培养基配方
能在未经稀释的水解液中生长	可以抵抗抑制因子
培养物生长条件能降低污染	在酸性 pH 值下或高温下生长

### 3.3 混合糖发酵的解决方案

突破微生物对底物转化的局限性,关键是在原来单

一底物发酵系统中引入多种酶,构建利用多种底物的酶系统以转化不同底物。采用基因工程手段可对某一菌株转化为多种底物的酶系统,即基因重组菌株是一条途径。并按照重组菌株自身酶系统的不同分为两类。

一种是改造已有的发酵菌种。利用基因工程手段将编码不同酶的基因导入同一发酵微生物体内,增强其对多种底物的转化效率。使本来具有发酵功能的菌种,增加利用新的底物的能力。也就是要得到一个乙醇产率高,分支代谢产物少,并且能够利用包括葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖和甘露糖的菌株<sup>[24]</sup>。在传统以淀粉物质为主要成分的乙醇发酵工业中,成功的例子有:将野生型酵母体内缺乏的淀粉酶基因导入,使之直接利用淀粉,糖化并发酵生成乙醇<sup>[25]</sup>。与之类似,将木糖发酵基因导入菌株,在代谢过程中表达,可以直接利用木质纤维素水解物中的混合糖。据近期研究结果,当采用此种方法处理造纸生产中的含亚硫酸盐纸浆废液,菌株发酵获得的乙醇产量比基因工程改造前提高了130%<sup>[26]</sup>。

另一种是选取原本不具备发酵能力,但易于基因工程改造,同时具高蛋白表达量的菌株。将关键酶的表达基因导入该菌株,使之具备发酵生产乙醇的能力<sup>[27]</sup>。通常都采用容易操作的原核生物,典型代表是大肠杆菌。如通过将运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶的基因转入大肠杆菌,使菌株具有发酵戊糖和己糖生成乙醇的能力,当用蛋白胨和酵母浸提物做辅助氮源时,使甘蔗渣水解物获得了最大理论生产值91.5%的转化率。当采用玉米浆浸粉做补充氮源,达到相同的转化率需要多一倍的时间<sup>[9]</sup>。

在利用基因重组菌进行乙醇发酵的过程中,也存在着一些问题。如采用基因工程改造的大肠杆菌对秸秆纤维素水解物进行乙醇发酵时,存在着一定的停滞期<sup>[28]</sup>。这个停滞期比对照要长约30 h。同时转基因微生物存在着对葡萄糖(己糖)优先利用的现象<sup>[29]</sup>。菌种退化问题在基因重组菌上也较为突出。经过继代培养或连续培养后,往往乙醇的产量下降,其它代谢产物增加<sup>[30]</sup>。

通过人工加入外源木糖异构酶,使木糖转化为木酮糖。可以利用酵母菌自身的磷酸戊糖途径生成一部分乙醇,可在一定木糖浓度范围内正常发酵<sup>[31]</sup>,但只是部分经过酶转化的木酮糖能发酵生成乙醇,它对木糖的利用有限。

多菌种混合可以提高底物的转化效率。已有报道证明:基因重组菌 *Klebsiella oxytoca* 与其它不同菌组合在一起对微晶纤维素发酵,所获得的乙醇产量比其中任何一个菌株单独培养条件下都要高<sup>[32]</sup>,但对菌种退化问题未作探讨。

#### 4 结 语

木质纤维素水解物发酵法生产乙醇是逐渐实用化的一项技术,解决有效降低水解过程产生的抑制物质以及混合糖发酵难题,是提高木质纤维素水解物发酵法生产乙醇生产效率的关键。这些技术的可操作性及降低使用成本必然对生物乙醇的生产带来重大的影响。

在利用木质纤维素物质发酵生产乙醇的工艺中,抑制物的产生是木质纤维素物质水解过程中的必然因素,在现有技术水平下可以通过各种理化综合手段减少抑制物的种类与数量。在此前提下筛选和培养对抑制物具有一定抗性,同时高效利用木质纤维素水解液的工程菌或复合菌系是提高乙醇产率的途径。

#### [参 考 文 献]

- [1] Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol[J]. *Journal of Biotechnology*, 1997, 56: 1.
- [2] Cheung S W, Anderson B C. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater solids[J]. *Bioresource Technology*, 1997, 59: 81- 96.
- [3] Lohmeier-Vogel E M, Sopher C R, Lee H. Intracellular acidification as a mechanism for the inhibition by acid hydrolysis-derived inhibitors of xylose fermentation by yeasts[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1998, 20: 75- 81.
- [4] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83: 1- 11.
- [5] Eken-Saracoglu N, Arslan Y. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae* [J]. *Biotechnology Letters*, 2000, 22: 855- 858.
- [6] Sharma S K, Kalra K L, Grewal H S. Fermentation of enzymatically saccharified sunflower stalks for ethanol production and its scale up[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 85: 31- 33.
- [7] Sharma S K, Kalra K L, Kocher G S. Fermentation of enzymatic hydrolysate of sunflower hulls for ethanol production and its scale-up[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2004, 27: 399- 402.
- [8] Fan Z, South C, Lyford K, et al. Conversion of paper sludge to ethanol in a semicontinuous solids-fed reactor [J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2003, 26: 93- 101.
- [9] Takahashi C M, Katia Gianni de Carvalho Lima, Debora Fumie, et al. Fermentation of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate and sugar mixtures to ethanol by recombinant *Escherichia coli* KO11[J]. 2000(16): 829- 834.
- [10] Palmqvist E, Bärbel Hahn-Hägerdal, Mats Galbe, et al. The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 19: 470- 477.
- [11] Palmqvist E, Bärbel Hahn-Hägerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 74: 25- 33.
- [12] Martin C, Fernández T, García R, et al. Preparation of hydrolysates from tobacco stalks and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 2002, 18: 857- 862.
- [13] C Martin, Leif J Jönsson. Comparison of the resistance of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces* and

- Zygosaccharomyces* to lignocellulose-derived fermentation inhibitors[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32: 386– 395.
- [14] Palmqvist E, Bärbel Hahn-Hägerdal. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. I: inhibition and detoxification[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 74: 17– 24.
- [15] Yang Y H, Wang B C, Wang Q H, et al. Research on solid-state fermentation on rice chaff with a microbial consortium[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2004, 34: 1– 6.
- [16] Lebeau T, Jouenne T, Junter G A. Continuous alcoholic fermentation of glucose xylose mixtures by co-immobilized *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida shehatae* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 50: 309– 313.
- [17] Dien B S, Cotta M A, Jeffries T W. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 63: 258– 266.
- [18] Kargupta K, Datta S, Sanyal S K. Analysis of the performance of a continuous membrane bioreactor with cell recycling during ethanol fermentation[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 1998, 1: 31– 37.
- [19] Skoog K. Xylose fermentation [J]. *Enzyme Microb. Technol.*, 1988, 10: 66– 90.
- [20] Laci S, Lawford H G. Thermoanaerobacter ethanololiscus growth and product yield from elevated levels of xylose or glucose in continuous cultures[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1991, 57(2): 579– 585.
- [21] Jin Y, Jeffries T W. Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Metabolic Engineering*, 2004, 6: 229– 238.
- [22] Shi N Q, Jeffries T W. Anaerobic growth and improved fermentation of *Pichia stipitis* bearing a URA1 gene from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 50: 339– 345.
- [23] Ryabova O B, Chmil O M, Sibirny A A. Xylose and cellobiose fermentation to ethanol by the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*[J]. *FEMS*, 2003, 4: 157– 164.
- [24] Wiseloge A. Biomass feedstock resources and composition [A]. In: Tyson S, Wyman CE (ed) *Handbook on bioethanol: production and utilization*. *Applied Energy Technology Series*[M]. Washington, D. C.; 1996: 105– 118.
- [25] Ülgen K Ö, Saygı B, Önsan Z N, et al. Bioconversion of starch into ethanol by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain YPG-AB [J]. *Process Biochemistry*, 2002, 37: 1157– 1168.
- [26] Golias H, Dumsday G J, Stanley G A, et al. Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation [J]. *Journal of Biotechnology*, 2002, 96: 155– 168.
- [27] Ingram L O, Doran J B. Conversion of cellulosic materials to ethanol [J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 1995, 16: 235– 241.
- [28] Dien B S, Iten L B, Bothast R J. Conversion of corn fiber to ethanol by recombinant *E. coli* strain FBR3 [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 1999, 22: 575– 581.
- [29] Leksawadi N, Joachimsthal E L, Rogers P L. Mathematical modelling of ethanol production from glucose xylose mixtures by recombinant *Zymomonas mobilis* [J]. *Biotechnology Letter*, 2001, 23: 1087– 1093.
- [30] Dien B S, Hespell R B, Wyckoff H A, et al. Fermentation of hexose and pentose sugars using a novel ethanologenic *Escherichia coli* strain [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1998, 23: 366– 371.
- [31] Chandrakant P, Bisaria V S. Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53: 301– 309.
- [32] Helle S S, Murray A, Lam J, et al. Xylose fermentation by genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* 259ST in spent sulfite liquor [J]. *Bioresource Technology*, 2004, 92: 163– 171.

## Key points of ethanol fermentation of lignocellulose and resolving methods

Lu Peng<sup>1</sup>, Jiang Tao<sup>1,2</sup>, Li Guoxue<sup>1\*</sup>

(College of Resource and Environment, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Department of Chemistry and Biology, Leshan Normal College, Leshan, Sichuan 614011, China)

**Abstract:** This article reviews development of ethanol fermentation using lignocellulose material. It put forward two key points in the fermentation process. One is how to reduce or eliminate inhibitor in lignocellulose hydrolyzed pretreatment process and removing its deleterious influence to next fermentation process; the other is to use monosaccharide mixture including xylose, glucose, mannose and galactose etc. obtained after hydrolyzing pretreatment in fermentation process. Through comparison and analysis of previous research results, this article presents two methods to resolve the problems, one is to use integrative pretreatment method to improve hydrolysis rate and reduce inhibitors synchronously; the other is to improve fermenting microorganism ability to use monosaccharide mixture substance and converting it into ethanol and tolerating fermentation inhibitors. So bioconversion rate of lignocellulose to ethanol was improved.

**Key words:** lignocellulose; hydrolysis; inhibitor control; ethanol fermentation