

国内外燃料乙醇的生产与研究进展

周爱萍 (平顶山教育学院生物系, 河南平顶山 467000)

摘要 介绍了世界燃料乙醇的生产状况, 并着重介绍了燃料乙醇的研究进展。

关键词 燃料乙醇; 生产; 研究

中图分类号 TQ223.12⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)20-08768-03

Research Progress and Production of Domestic and Overseas Fuel Ethanol

ZHOU Ai-ping (Department of Biology, Pingdingshan Institute of Education, Pingdingshan, Henan 467000)

Abstract The production status of fuel ethanol in the world was introduced. And the research progress of fuel ethanol was emphatically presented.

Key words Fuel ethanol; Production; Research

目前, 液体燃料主要来源于石油资源, 从已探明的石油储量看, 世界石油的开采期乐观地讲有 100 年左右, 而悲观地讲, 只有 30~50 年左右^[1]。世界上大多国家, 包括我国在内, 能源问题都相当严重。同时, 以石油为原料的液体燃料燃烧后排放的废气引起的环境污染也是人类面临的一大问题。因此, 人类必须寻找可替代性的能源, 同时可替代性的能源又需具备可再生、高效、低耗资、安全等特点^[2-3]。在这一形势下, 人们开始关注生物能源如燃料乙醇、生物柴油、生物质气化及液化燃料、生物制氢等。

虽然乙醇的能量仅是汽油的 67%, 但是汽油醇(添加乙醇的汽油)的能量等同甚至高于汽油^[4], 而且, 乙醇可替代汽油中的铅和甲基叔丁基醚(MTBE)作为辛烷值增强剂和汽油增氧剂^[5-6]。乙醇的生产方法包括化学合成法和微生物发酵法。前者用石油裂解产生的乙烯与水合成乙醇, 所以这种方法也受石油资源的限制。而利用微生物发酵糖类生产乙醇, 是古老传统、可利用再生资源的生产方法, 燃料乙醇都由发酵法生产, 其生产与应用每年呈大幅递增效势, 具体情况如图 1 所示^[7]。

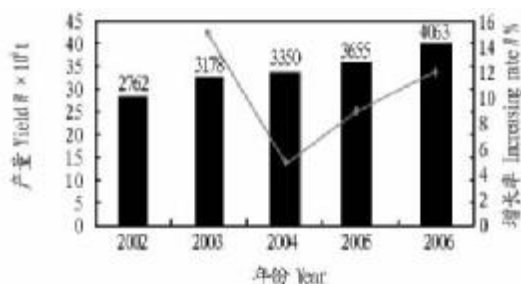


图 1 2002~2006 年世界酒精生产状况

Fig. 1 Production status of alcohol from 2002 to 2006

1 世界燃料乙醇生产状况

1.1 美国与巴西的燃料乙醇生产

美国已是第一大燃料乙醇生产国, 2007 年 8 月美国乙醇产量达到 68.13 亿加仑(277.0 亿 L)。美国燃料乙醇生产主要依靠玉米。通过转基因技术并扩大种植面积, 美国玉米产量近年增长迅速, 目前有 30% 的玉米用于燃料乙醇的生产。除玉米乙醇外, 为促进纤维素乙醇的发展, 2005 年颁布的美国能源政策法案(E-

PACT)为此制定了优惠政策^[8]。

巴西是世界上唯一不供应车用纯汽油的国家, 2006 年其酒精产量达到 170 亿 L, 是第二大燃料乙醇生产国。巴西使用甘蔗生产酒精, 其生产成本低于谷物酒精, 并通过实行蔗糖-酒精-热电联产, 综合利用能源^[9]。在巴西的加油站里含水酒精的售价已经降为汽油的 60%~70%^[10], 在全球率先实现了酒精相对于汽油的经济竞争力。

1.2 我国的燃料乙醇生产

世界 4 大酒精生产国除巴西和美国之外, 就是我国和俄罗斯^[11]。我国主要利用玉米生产燃料乙醇, 也有利用薯类和甘蔗生产的报道。我国原发酵酒精生产能力达 450 万~500 万 t, 约有 1 100 家生产企业, 其中 80% 以上是年产量在万吨以下的小企业。根据国家“十五”规划, 2003 年改造和建成了年生产能力为 102 万 t 的 4 个大型燃料乙醇生产项目: 吉林燃料乙醇有限责任公司 30 万 t/年、河南天冠集团 30 万 t/年、安徽丰原生物化学股份有限公司 32 万 t/年、黑龙江华润酒精有限公司 10 万 t/年^[12]。

1.3 欧洲与其他国家的燃料乙醇生产

欧洲的燃料乙醇生产较之北美要晚, 而且发展速度也比较慢, 2003 年欧洲的燃料乙醇产量仅 37.5 万 t。

日本虽然是世界上最大汽油消费国之一, 但没有额外的农产品用于生产燃料乙醇, 政府积极鼓励开发利用农林生产废弃物资源发酵生产酒精。东南亚国家也在积极开发利用甘蔗生产燃料乙醇的研究。

2 国内外燃料乙醇的研究现状

目前, 燃料乙醇研究可分为 3 大类: 菌种筛选及育种研究、发酵工艺研究、特殊需要的基因工程菌构建及发酵研究。

2.1 菌种筛选及育种研究

为了实现发酵工业生产的低成本、高转化率和高产率, 菌种是整个生产流程的核心。因此, 菌种的选育也必须以降低生产耗资与高产出为原则。燃料乙醇发酵就需要菌种具备耐高酒精度、耐高底物浓度、耐高温、高转化率及具备絮凝性能等特点。酵母菌对乙醇的耐受能力不仅仅是由于酵母细胞自身对不同水平的乙醇耐受的内在能力, 而且与酵母原生质膜的脂类组成及功能、发酵营养状况、环境参数、碳水化合物基质补充方式等因素密切相关。乙醇毒性的简要机制是: 临界乙醇浓度导致质膜磷脂裂解, 如果菌株质膜或发酵时具备相当营养而且环境条件适宜, 酵母就使乙醇毒性有所降低并抵抗, 特别是在温度变化

作者简介 周爱萍(1964-), 女, 河南汝州人, 讲师, 从事生物工程方面的研究。

收稿日期 2008-05-08

时尤为明显。随着温度的升高,酵母质膜的磷脂量很快降低,以维持质膜的流动性并保护胞间活性。

2.1.1 耐酒精酵母的选育。当发酵醪中酒精浓度低于 30 g/L 时,酒精对酵母的抑制作用可忽略不计;高于 40 g/L 时,酵母出芽受到明显影响,随着酒精浓度的继续增加,它对酵母的生长和发育能力的抑制作用急剧增加;当高于 120 g/L 时,一般酵母不再生长和发酵^[13]。耐酒精酵母的筛选方法如下:从自然界直接分离筛选耐高温菌种,用含高浓度酒精的培养基连续培养筛选,用物理或化学诱变剂诱变筛选 2-D_{DOG}(2-脱氧-D-葡萄糖)抗性突变株,并分离。酵母菌耐酒精能力是受多基因系统调节的,因而通过基因工程的方法提高其耐酒精能力是非常困难的。目前比较理想的方法是原生质体融合技术^[11]。

2.1.2 耐高温酵母的选育。一般情况下,产乙醇酿酒酵母的最适生长温度 28 ℃,发酵温度 30 ℃ 左右,不超过 34 ℃^[11,14]。刘建军等筛选并用传统的诱变育种方法获得 1 株高产酒精酵母菌株,在总糖浓度 31.2%、32 ℃ 条件下发酵 70 h,酒精度达到 17.2% (V/V),耐酒精度 20% 以上;后又以该菌株和絮凝性强的葡萄汁酵母原生质融合育种,获得 1 株酵母菌株,32 ℃ 发酵 60 ~ 68 h,可产酒精度 17.5% ~ 18.5% (V/V),耐酒精度 20% (V/V) 以上^[15-16]。中国科学院武汉病毒研究所诱变和筛选的耐高温酵母,能够耐受 40 ~ 50 ℃ 高温,致死温度 80 ~ 100 ℃ 5 min,耐酒精度 13%,耐 NaCl 10%;25 ~ 32 m³ 中试,主发酵 38 ~ 42 ℃,48 h,发酵能力优于对照,出酒率提高 1% ~ 2%^[11]。

2.2 分子生物学研究

2.2.1 转入淀粉酶系基因。因为酵母不含淀粉酶系基因,不能直接利用淀粉^[11],利用玉米、小麦、薯类、大米等淀粉质原料生产燃料乙醇时,首先需要加入 α-淀粉酶和糖化酶把淀粉分解为葡萄糖,酵母才能吸收碳源进行正常的生理代谢活动。由此,许多研究者把其他菌种的 α-淀粉酶和糖化酶基因转入酿酒酵母,使其可以直接利用淀粉发酵,省却生产中的液化和糖化过程,降低生产成本。Tunahan Cakir 等把 *Bacillus subtilis* 的 α-淀粉酶基因和 *Aspergillus awamori* 的糖化酶基因克隆到 *Saccharomyces cerevisiae* 中并成功表达,直接发酵淀粉产生乙醇^[4]。这类研究文献较多,但乙醇产率较低,未见工业化生产的报道^[11]。

2.2.2 构建絮凝基因工程菌。酵母絮凝是由絮凝基因编码的絮凝蛋白(Flop,凝集素)与邻近细胞细胞壁甘露糖结合,形成的多细胞聚集现象^[17-18],是可逆的、无性的和需要钙离子的过程^[18-19]。

2.2.2.1 酵母絮凝的遗传因子研究。*Saccharomyces cerevisiae* 的絮凝基因家族中,目前已发现的基因至少有 14 个^[20],*FLO1*、*FLO5*、*FLO9*、*FLO10*、*FLO11* 研究较多,*FLO1*、*FLO5*、*FLO9*、*FLO10* 临近端粒(距端粒约 10 ~ 40 kb),而 *FLO11* 既不临近端粒也不临近着丝粒^[21]。*FLO5*、*FLO9* 与 *FLO1* 极为相似,而这一家族中的另 2 个基因 *FLO2* 和 *FLO4* 与 *FLO1* 是等位基因^[22]。当某个基因家族中一个基因表达时,这一家族中的其他基因保持沉默,这是不同微生物中的一个普遍规则^[21]。在 Σ 1 287 b 菌株中,*FLO11* 是这一家族中唯一表达

的基因^[23]。在所有这些已发现的絮凝基因中,*FLO1* 是迄今为止研究得最为详尽的一个絮凝基因^[21,24]。*FLO1* 为显性,位于染色体 I,ORF 4.6 kb,编码一个富含 Ser/Thr 的 1 537 个氨基酸的蛋白质^[25-26]。Flo1p 结合在细胞壁上,其 N-末端第 196 ~ 240 氨基酸区暴露于培养基中。这一区域的功能类似于外源凝集素的作用,使得 Flo1p 可选择性地与其他细胞细胞壁上的甘露糖结合^[17-18,27]。酵母细胞在发酵结束时发生絮凝尤为重要,是一种高效、环境友好、简单而不需耗费的分离细胞方式。因此,絮凝性能是酿酒酵母的优良性状之一^[28]。反之,如果絮凝基因过早表达,絮凝细胞聚集体就会包裹发酵过程中产生的 CO₂,导致细胞凝聚物浮在醪液中或在液面形成菌膜层,发酵不彻底^[29-30]。Severino Zara 等研究了 *Saccharomyces cerevisiae* 中的 *Sardinian* 菌株,其 *FLO11* 基因编码一种疏水的细胞壁糖蛋白,在发酵过程中产生絮凝,形成液面菌膜层^[30]。为了避免这种现象发生,Verstrepen 等将 HSP30 启动子取代无絮凝性能的野生酿酒酵母菌株 *FLO1* 的启动子,*FLO1* 基因表达并在发酵末期产生较强的絮凝性状^[31]。

2.2.2.2 酵母絮凝的环境因素影响。酵母絮凝是一个极复杂的现象,不仅受遗传因子的控制,而且受环境、生理等多方面因素的影响^[32]。**①钙离子的影响。**过去人们认为,酵母细胞之间的絮凝是通过“钙桥”,即钙离子和细胞壁上的负电荷结合而产生凝集作用,这一理论已基本被否定。钙离子的促凝作用是作为一种辅助因子稳定凝集素的活力构象^[33]。**②pH 值的影响。**pH 值为 1.5 ~ 9.0 时,絮凝都可以发生,但最适 pH 值为 3.5 ~ 5.8,即偏酸基质利于絮凝^[29]。**③温度的影响。**温度对酵母絮凝的影响还未形成定论,许多研究结果相差较大。一般认为,15 ~ 32 ℃ 时,温度变化对絮凝的影响不明显,低于 5 ℃、高于 60 ℃ 条件下,絮凝迅速下降^[29,34]。**④碳或氮源的影响。**普遍认为,啤酒酵母的絮凝是由营养物质饥饿、胁迫条件诱导表达的^[29]。碳、氮饥饿时启动絮凝表达,而向培养基中加入这些营养物质则会延迟絮凝产生。这就有可能通过改变碳、氮浓度来控制絮凝的形成时间^[29,35]。**⑤乙醇浓度的影响。**乙醇对酵母絮凝的影响因菌株而异,有的研究表明乙醇诱导或加强絮凝,而有的研究则恰恰相反,表明乙醇抑制絮凝。乙醇对絮凝的影响机制还不清楚。**⑥Ca²⁺ 的影响。**原来以为,酵母的絮凝是邻近细胞细胞壁上的阴离子和 Ca²⁺ 结合,通过此“钙桥”而达到凝集作用的。这一理论已基本被否定。现在认为,酵母的絮凝通过稳定凝集素即 Flop 的活力构象,而达到促凝作用^[36]。除了遗传因素和环境因素的影响外,酵母的絮凝还受絮凝蛋白活性和细胞间相互作用的物理因子影响。

2.2.3 利用纤维素或半纤维素发酵生产乙醇。农业和森林废弃物是可用于燃料乙醇生产的主要木质纤维素类原料。但微生物不能直接利用纤维素类物质发酵产生乙醇,必须把纤维素类物质用酸、碱或酶水解为微生物可以利用的单糖,或者运用基因操作技术构建可以利用纤维素或半纤维素类物质及其水解产物的基因重组菌。目前,以纤维素和半纤维素为原料生产燃料乙醇的成本过高,无法实现工业化生产。

2.3 发酵工艺学研究

2.3.1 高浓度(VHG)发酵。高浓度发酵是指每升发酵液中可溶性固形物为300 g或更高^[37]。目前,已成功实现小麦、燕麦、大麦、黑麦和黑小麦等的高浓度发酵,提高了乙醇产量,降低了生产成本^[38]。影响乙醇高浓度的因素主要是温度和营养元素含量,在此过程中,添加麦角固醇和 Tween 80 会提高乙醇产率^[39]。Wang 等用高浓度发酵等技术使酒精度从9.5%~10.0%(V/V)提高到12.9%~15.1%(V/V)^[38]。

2.3.2 补料发酵。虽然高浓度酒精发酵是科研人员和生产企业一直追求的目标,但过高的糖浓度会导致发酵醪高渗透压和低水活性,抑制菌体细胞的生长和代谢,最终使得乙醇产率降低。所以采取较低初始底物浓度和补料发酵工艺可以解除高浓度底物对菌体细胞的抑制作用,并且更有利于代谢产物的积累。

2.3.3 细胞固定化。据报道,向培养基中直接加入乙醇的酿酒酵母细胞的毒性和细胞死亡率,低于其自身细胞产生乙醇的毒性和细胞死亡率。这就说明,发酵醪中还有其他代谢副产物,并对菌体产生抑制作用^[40]。与连续发酵相比,使用细胞固定化技术发酵生产乙醇,可以减少代谢副产物的抑制作用,提高发酵产率,并且可以重复利用细胞,降低生产成本。但是还没有见到运用固定化技术进行燃料乙醇工业化生产的报道^[11]。

3 小结

燃料乙醇等生物质能源的研究和生产,已是21世纪人类面临的亟需解决的重大问题。其中传统的菌种选育、分子育种、发酵工艺以及乙醇提取工艺都同等重要,而且已取得了丰硕成果。虽然酒精发酵是最古老的发酵技术之一,但结合其他方面的研究成果,这一传统项目还有许多可以提高和发展的空间;虽然酿酒酵母是研究真核细胞的模式菌株,但分子生物学方面的大量基础研究工作还需要科研人员继续进行,以便为进一步应用研究做准备。

参考文献

- [1] 谭天伟,王芳,邓利. 能源生物技术[J]. 生物加工过程,2003,1(1):32-36.
- [2] CHUN,L H,OVEREND R P. Biomass and renewable fuels[J]. Fuel bioprocess,2001,17:187-195.
- [3] TUNAHAN CAKIR, YALCIN ARGA K, METE ALTINTAS M, et al. Flux analysis of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* YPB-G utilizing starch for optimal ethanol production[J]. Process Biochemistry,2004,39:2097-2108.
- [4] WORLEY J W, VAUGHAN, D H CUNDIFF, J S. Energy analysis of ethanol production from sweet sorghum[J]. Biores Technol,1992,40:263-273.
- [5] JAMES C OGBONNA, HIROAKI MASHIMA, HIDEO TANAKA. Scale up of fuel ethanol production from sugar beet juice using loofa sponge immobilized bioreactor[J]. Bioresource Technology,2001,76:1-8.
- [6] 黄治玲. 燃料乙醇的生产与利用[J]. 化工科技,2003,11(4):44-47.
- [7] 崔凯. 2007年燃料乙醇行业报告. 北大纵横管理咨询有限公司.
- [8] 佚名. 中国成为世界第三大燃料乙醇生产国[EB/OL]. (2007-09-18)[2008-05-01]http://www.hewenergy.com.cn.
- [9] 路明. 巴西甘蔗作物的燃料酒精转化和对我国发展燃料酒精的启示[J]. 作物杂志,2004,5:1-4.
- [10] JOSE GOLDEMBERG, SUANI TEIXEIRA COELHO, PLINIO MARIO NASTARI, et al. Ethanol learning curve-the Brazilian experience[J]. Biomass and Bioenergy,2004(26):301-304.
- [11] 贾树彪,李盛贤,吴国峰. 新编酒精工艺学[M]. 北京:化学工业出版社,2004.
- [12] 高露,杨大鹏. 九省汽车试用“燃料乙醇”[N]. 经济参考报,2004-02-

- 25.
- [13] 章克昌,吴佩琮. 酒精工业手册[M]. 北京:轻工业出版社,1998:140.
- [14] JEFFRIES T W, SHI N Q. Genetic engineering for improved xylose fermentation by yeasts[J]. Adv Biochem Eng Biotechnol,1999,65:117-161.
- [15] 刘建军,姜鲁燕,赵祥颖,等. 高产酒精酵母菌种的选育[J]. 酿酒,2003,30(1):57-59.
- [16] 刘建军,赵祥颖,姜鲁燕,等. 高产酒精絮凝酵母 SY-130 菌株的选育[J]. 酿酒科技,2003(3):34-36.
- [17] BIDARD F, BONY M, BLONDIN B, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* FLO1 flocculation gene encodes a cell surface protein[J]. Yeast,1995,11:809-822.
- [18] BONY M, THINES-SEMPOUX D, BARRE P, et al. Localisation and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p[J]. J Bacteriol,1997,179:4929-4936.
- [19] STRAFORD M. Yeast flocculation: Calcium specificity[J]. Yeast,1989,5:487-496.
- [20] 郑怀礼. 生物絮凝剂与絮凝技术[M]. 北京:化学工业出版社,2003.
- [21] ADRIAN HALME, STACIE BUMGARNER, CORA STYLES, et al. Genetic and epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface var in yeast[J]. Cell,2004,116:405-415.
- [22] SIEIRO C, REBOREDO N M, VILLA T G. Cloning of a new FLO gene from the flocculating *Saccharomyces cerevisiae* IMI-8b strain[J]. FEMS Microbiol Lett,1997,146:109-115.
- [23] GUO B, STYLES C A, FENG Q, et al. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2000,97:12158-12163.
- [24] 刘小琳,贺鹏,卢大军,等. 絮凝选择载体的构建及 β -葡萄糖苷酶基因在酿酒酵母中的表达[J]. 生物工程学报,2005,21(1):167-170.
- [25] STRAFORD M, ASSINDER, S. Yeast flocculation: Flo1 and New Flo phenotypes and receptor structure[J]. Yeast,1991,7:559-574.
- [26] TEUNISSEN A, HOLUB E, VAN DER HUUCHT, J, et al. Sequence of the open reading frame of the FLO1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Yeast,1993,9:423-427.
- [27] KOBAYASHI O, HAYASHI N, KUROKI R, et al. Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition[J]. Bacteriol,1998,180:6503-6510.
- [28] VERSTREPEN K J, DERDELINCKX G, VERACHTERT H, et al. Yeast flocculation: what brewers should know[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2003,61:197-205.
- [29] STRAFORD M. Yeast flocculation: A new perspective[J]. Adv Microbiol Physiol,1992,33:2-71.
- [30] SEVERINO ZARA, ALAN T BAKALINSKY, GIACOMO ZARA, et al. FLO11-Based Model for Air-Liquid Interfacial Biofilm Formation by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied and Environmental Microbiology,2005,17(6):2934-2939.
- [31] VERSTREPEN K J, DERDELINCKX G, DELVAUX F R, et al. Late fermentation expression of FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Am Soc Brew Chem,2001,59(2):6976.
- [32] 张博润,陈蔚,铁翠娟,等. 酵母菌絮凝的分型及其生理生化特性的研究[J]. 微生物学报,1999,39(6):527-532.
- [33] 姚汝华,路福平. 啤酒酵母菌种及其应用[J]. 广州食品工业科技,1994(3):13-22.
- [34] GONZALES M G, FERNANDEZ S, SIERRA J A. Effect of temperature in the evaluation of yeast flocculation ability by the Helm's method[J]. J Am Soc Brew Chem,1996,54:29-31.
- [35] STRAVER M H, AAR P C, VAN DER SMIT G, et al. Determinants of flocculence of brewer's yeast during fermentation in wort[J]. Yeast,1993,9:527-532.
- [36] FONTANA A., BIDENNE C, GHOMMIDH C, et al. Study of the flocculation of *Saccharomyces diastaticus*[J]. J Inst Brew,1992(98):401-407.
- [37] THOMAS K C, HYNES S H, JONES A M, et al. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology: effect sugar concentration and fermentation temperature[J]. Appl Biochem Biotechnol,1993,43:211-226.
- [38] WANG S, THOMAS K C, SOSULSKI K, et al. Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale[J]. Process Biochem,1999,34:421-428.
- [39] GIULIANO DRAGONE, DANIEL P SILVA, JOAO B DE ALMEIDA E SILVA. Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing[J]. Lebensm-Wissu Technol,2004(37):797-802.
- [40] GHASEM NAJAFPOUR, HABIBOLLAH YOUNESI, KU SYAHIDAH KU ISMAIL. Ethanol production in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioresource Technol,2004,92:251-260.