

酶在生物质转化为燃料酒精中的应用

段钢，孙长平

(杰能科国际生物工程有限公司，无锡，214035)

摘要：生物质作为可以再生的能源广泛存在于自然界中。应用酶水解技术处理生物质所制造的燃料酒精可以部分替代石油，生物质还可以被进一步转化成其他的化学产品及生物化学品。预处理过程和纤维素酶成本的降低，纤维素酶效率的提高是生产生物质酒精及其他化学产品的关键。文中介绍了该转化过程的关键技术及其发展进程和最新进展。

1介绍

木质纤维素原料可以用来生产酒精，是一种能替代有限的石油资源的能源。淀粉类粮食作物生产的燃料酒精已经替代部分汽油成为汽车的能源。然而与石油燃料相比较，生产成本相对较高。以玉米淀粉为基础原料来生产酒精，由于受土地限制产量是不可能大幅度增加的。一种低成本酒精生产的潜在的原料，就是利用木质纤维原料，如农作物残渣、草、碎木片、木屑和动物的固体排泄物等。由于生物精炼厂替代了炼油厂，作为再生能源的碳水化合物原料转化成碳氢化合物可以更有利于社会 and 环境保护。以生物质为基础的酒精生产，其转化过程主要有2部分：木质纤维生物质中的纤维素被水解生成还原糖和用还原糖的发酵来生产酒精。当前由木质纤维原料来生产酒精存在的主要问题是水解过程中产量低，生产成本低。目前在这方面的研究已取得一些成果。首选的方法是对生物质原料进行热的化学预处理和用酶水解，经过预处理的原料成为可转化成酒精的发酵糖。预处理的研究是集中在缩短微生物转化的时间，减少纤维素酶的用量和提高酒精的产率等方面。纤维素酶的研究则集中在开发高效、高热稳定性、与其他酶混合所产生的协同增效作用来满足终端用户的需要。对于能将生物质糖转化成酒精和其他生物产品的高活性的发酵微生物也正在被开发利用。相信不久的将来，会出现生物质酒精生产的投资和建工厂(图1)。

木质纤维原料的预处理可以除去木质素和半纤维素，能够明显提高纤维素的水解水平；应用适合的纤维素酶也能够提高水解水平；边糖化边发酵的工艺能有效地减少对于纤维素酶活性有抑制作用的葡萄糖含量，这样就能够提高生产量和纤维素水解的速度。

生物质的酶法水解由于具有低能耗、产品专一并符合政府的环保政策而成为将来发展的主要手段。目前的纤维素酶由于其活性和稳定性水平使得其制造成本过高而阻碍着对生物质的水解应用。开发高效活性并稳定的纤维素酶成为酶制剂研究领域的必然。

木质纤维性物质含有纤维素(38%~50%)，半纤维素(23%~32%)，多酚性木质素(15%~25%)以及其他的可以提取的成分。

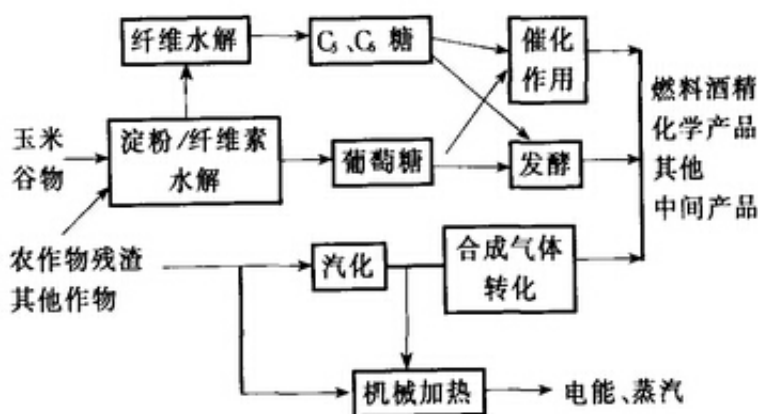


图1 生物质精制流程示意图

2木质纤维原料生产酒精的工艺技术

虽然有大量的原料可以利用，但是在工业上将生物质转化的最大挑战是降低操作成本。主要是预处理过程和酶制剂的成本，以及新的更有效的酵母。

2.1 木质纤维原料的预处理

预处理的目的是去除木质素和半纤维素，减少纤维素的结晶度和增加原料的多孔性。成功的预处理必须满足以下需要：

产生大量可被酶分解的多糖(如：打开纤维素的结构，使酶可以进行作用)；

低固定资产投入(压力，建筑材料)；

低能量消耗；

从纤维素分解的C6糖的含量高；

从半纤维素分解的C5糖的含量高；

木质素分解反应程度低(对用于能量及化学原料，越完整越好)；

所使用的化学品：费用低/或者可回收；

工艺放大容易纳入整个系统。

大多数的预处理并不能完全水解木质纤维原料生物质中的所有纤维素。预处理能通过去除纤维素微纤维结构周围的半纤维素并连同木质素的改变使纤维素的酶水解更加有效。物理法、物理2化学法、化学法和生物法等工艺已经被用于木质纤维原料的预处理。普通的预处理过程由于生物质的不同结构而比较困难。所处理木质纤维原料的成分取决于生物质的来源和所处理的类型，但是，在通常情况下，使用纤维素酶和相关的酶对于天然生物质的水解更有效。下面将简单介绍几种预处理工艺。

(1)物理预处理：包括机械粉碎、高温、冷冻/解冻循环和辐射，其目的是降低生物质颗粒的大小和机械晶格。这些方法操作费用一般昂贵。

(2)生物预处理：能够使生物质中的纤维素和木质素发生降解，但不是很有效，而且需要比较长的处理时间。

(3)化学法预处理：使用稀酸(最初利用硫酸)和蒸汽或者加压的热水可以水解出生物质中大量的半纤维素，从中得到的可溶性糖就能够达到比较高的产量。热洗涤过程，使用不同的稀酸进行预处理，包括所处理生物质固体的高温洗涤和分离，可以防止在预处理条件下所溶解的木质素和木聚糖的再析出。木质素的再析出会引起后续处理固体的酶水解的负反应。最近已经研究出在不严格的条件下的稀酸水解，并可以使含量较高的木聚糖转化成为木糖，这一转化过程必须要经济有效，因为在许多木质纤维原料中的木聚糖含量占全部的碳水化合物1/3以上。另一方面，一些碱也能被用来预处理木质纤维原料，处理效果取决于原料中木质素的含量。碱预处理通常对于在可溶性多聚体中去除大量的半纤维素的同时，溶解大量的木质素更加有效。碱水解的机理被认为是由于分子间的酯键皂化交联形成木聚糖，由于交联键的断裂，木质纤维原料多孔性的增加，经过稀碱NaOH处理后会引原料的膨胀，从而导致内表面积的增加，聚合度和结晶度的降低，木质素和碳水化合物之间结构键分开，木质素结构被破坏。氨冷冻喷爆(AFEX)分解纤维素并能减少纤维素酶的用量，同时还能去除半纤维素和木质素。采用CO₂汽爆对纤维素进行预处理的效果也很好。

(4)氧化去除木质素木质素能被过氧化物酶和过氧化氢酶所氧化而降解。用H₂O₂预处理会大大提高酶水解的灵敏性。在30℃，2% H₂O₂

下处理8h，大约有50%的木质素和大部分的半纤维素被溶解，并且在随后的糖化中，在45℃，24h之内，被纤维素酶作用的纤维素可以产生95%的葡萄糖。

(5)有机溶解过程：在有机溶解处理过程中，一种有机或水合有机溶剂混合物与无机酸(硫酸或盐酸)催化剂一起被用来分解原料内部的木质素和半纤维素的连接键。有机溶剂包括甲醇、乙醇、丙酮、乙二醇、丙二醇以及四水合糠醛乙醇。有机酸如草酸、乙酰基水杨酸和水杨酸也能被用做有机溶解过程中的催化剂。高温时(温度超过185℃)，对于正常的去除木质素作用的过程中不必加入催化剂，加入酸能够得到较高的木糖产量。为了降低生产成本和保护环境，必须将在预处理过程中所使用的溶剂加以回收利用，另外将溶剂从生产系统中去除也是必需的，因为有机溶剂可能会抑制微生物的生长繁殖，影响酶水解和发酵。

(6)微生物预处理:在微生物的预处理过程中,一些微生物例如褐色、白色和温和的腐败真菌可以被用来降解废物原料中的木质素和半纤维素。白色腐败真菌对于木质纤维原料的微生物预处理效果最好,许多白色腐败真菌产生的细胞外酶能够降解木材细胞壁。其他的酶包括多酚氧化酶、漆酶、过氧化氢生成酶和苯醌还原酶也能降解木质素。微生物预处理的优点有低能耗和温和的作用条件。然而,大多数的微生物预处理过程中的水解速度很慢。

所有的预处理工艺都会受到密集投资的制约。例如,对于水解过程所需要的昂贵的反应器材料以及由于在预处理过程中所使用的催化剂而生产的废物的处理和回收的成本。一些预处理工艺,像AFEX,由于废物产生得较少,优势比较明显,这样,在预处理中可以实现比较高的纤维素的消化利用,高的半纤维素糖的回收,较低的资金投入和低的木质素分解以及降低生产过程中化学品的回收利用成本。

2.2酶水解

纤维素的酶水解是由具有高效性的纤维素酶来完成的。水解产物通常是包含葡萄糖在内的还原糖。同酸或者碱相比较,酶水解的成本是比较低的,因为酶通常是在比较温和的条件下(pH值4.8,温度45~50℃)完成,而且不会有腐蚀问题。细菌和真菌能产生使木质纤维原料水解的纤维素酶。微生物可以是需氧或厌氧的、嗜热或嗜温的。纤维素酶通常是几种酶的混合物,在水解过程中包括至少3种主要的纤维素酶:

(1)内 β -葡聚糖酶(EG内切21, 42D2葡聚糖苷水解酶,或EC3.3.1.4),主要用在纤维素中低结晶度的区域,随机产生短链分子;

(2)外 β -葡聚糖酶或纤维二糖酶(CBH1, 42 β 2D2葡聚糖,纤维二糖水解脱,或EC3.2.1.91),进一步从随机的短碳链中降解分子以去除纤维二糖。

(3) β -葡萄糖苷酶(EC3.2.1.21)可水解纤维二糖成葡萄糖。

除了这3种主要的纤维素酶以外,还有很多的辅酶能够作用于半纤维素。如葡糖苷酸酶、乙酰酶、木聚糖酶、 β 2木聚糖酶、半乳甘露聚糖酶和葡甘露聚糖酶等。在酶水解期间,纤维素被纤维素酶降解成为能被酵母或细菌发酵成酒精的还原糖。

用纤维素酶水解生物质中的纤维素生产酒精有着巨大的潜力。虽然对于纤维素酶的开发已经过了数十年,但这些酶的成本还是很高。目前需要降低生产纤维素酶的成本才能使木质纤维生物质生产酒精的工艺更具有竞争性。纤维素酶是作用相对缓慢的酶,实质上是由于它们所作用底物的复杂的,不可溶解的,和半晶体的结构。除此以外,还需要纤维素酶有比较高的活力以及相关的内 β -葡聚糖酶,外 β -葡聚糖酶和 β 2葡萄糖苷酶的协同作用才能将纤维素完全转化成葡萄糖。

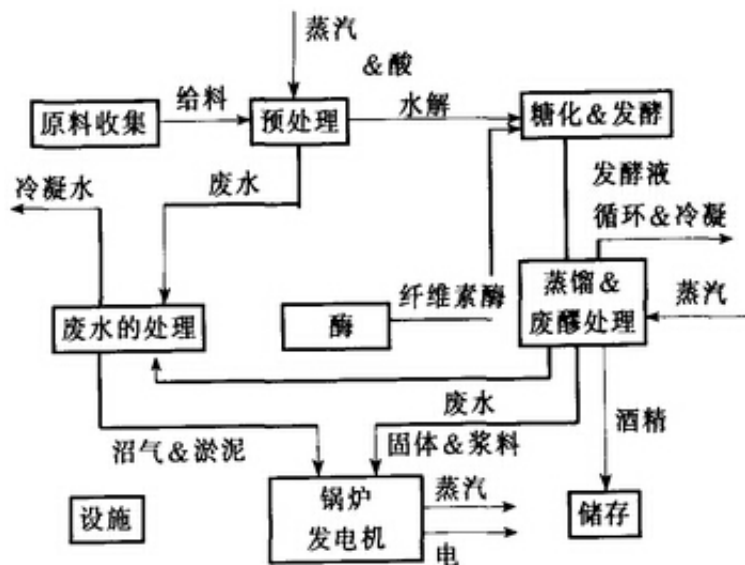
用纤维素酶生产生物酒精,在酶的开发方面,不仅要提高酶的稳定性,而且还要在预处理工艺的苛刻的条件下提高酶的有效活性。其次,不同的生物质,其预处理工艺都是不一样的,结果也会使产物含有不同的成分。因此,纤维素酶能够分解的是预处理后的适合于酶作用的组分。例如,由于底物表面的 β -1,4糖苷键的高通透性可以提高内、外 β -葡聚糖酶作用的效率,同时外 β -葡聚糖酶与内 β -葡聚糖酶的比率较高适合于作用具有较低聚合度的底物分子。高含量的木质素阻碍酶的渗透,吸附酶使之不能作用,引起最终产物的抑制并降低纤维素的转化率。除了纤维素的晶格和聚合度的范围以外,半纤维素的脱乙酰作用和水解也影响酶的需求。

高含量的木质素能够阻碍酶的渗透,吸附酶使之不能作用,引起最终产物的抑制并降低纤维素的转化率。除了木质素以外,纤维二糖和葡萄糖也是比较强的纤维素酶抑制剂,纤维素酶的活性能够被它们所抑制,现在已经研究出几种方法来降低抑制作用,包括使用高浓度的酶制剂;在水解期间 β -葡萄糖苷酶的补加;用超滤技术去除葡萄糖或者同时进行糖化和发酵(SSF)等方式。

SSF工艺已经被广泛地应用于规模生产。为了减小水解最终产物的抑制作用,在这个工艺过程中,纤维素在糖化水解中产生的还原糖被立即发酵成酒精,这样可以大大降低水解产物葡萄糖的抑制作用。

与两段式间歇的水解和发酵工艺相比较,SSF具有以下优点:由于对纤维素酶活性有抑制作用的葡萄糖被转化,从而可以提高水解的效率;比较少量的酶需求;比较高的产品产量;由于葡萄糖可以被立即去除并有乙醇产生,因此对于操作条件的要求比较低;比较短的生产时间;由于水解和发酵可以在一个反应器内同时进行,因此可以有比较小的反应器体积。但是,在SSF工艺中产生的乙醇也能抑制纤维素酶的活性。曾经有实验证明,在SSF工艺的反应期间,在38℃下,当乙醇的浓度分别达到9、35和60g/L时,纤维素酶的活力会损失到它的初始酶活力的9%、36%和64%。SSF工

艺的缺点有：水解和发酵温度的矛盾；微生物对于乙醇浓度的耐受性；纤维素酶的活性被乙醇所抑制。



稀酸处理与纤维素酶结合 & SSF

图 2 纤维素生产酒精流程

3纤维素酶的最新进展

目前对于发展酒精生产用纤维素酶的研究主要集中在以下几方面：

发现和克隆从自然界来源的酶；

通过分子演化和设计来提高酶的功能性；

通过强化的低成本发酵来生产酶制剂。

运用科学的研究方法，例如从已知的不同种类的纤维素酶的基因进行表达和纯化；发现新酶的活性，通过基因工程和蛋白质工程识别新的纤维素酶蛋白质；在先进的工艺条件下通过蛋白质工程和直接的转化来提高纤维素酶的性能，使酶获得改进；并寻找使最大量的生物质混合物降解的最优化方案。这些研究成果最终导致发现了几种新型的糖基水解酶。而且，以前很多的未知的里氏木霉(*T.reesei*)蛋白质的基因密码也被发现，例如：葡聚糖酶，壳多糖酶，蛋白酶等等。

杰能科国际生物公司与美国能源部开展合作，研制开发从木质纤维原料中转化酒精的生物技术，已经取得了突破性的成就。从2000年起，杰能科国际生物公司与美国能源部下属的美国国家再生能源实验室(NREL)合作，双方共投资2000万美元，开发低成本的纤维素酶和其他的酶，用来转化生物质生产酒精和其他产品。在NREL模式下，3年内的目标是将纤维素酶的成本降低1/10倍。这一目标已在在以下2个方面取得了重大的进步：纤维素酶生产的经济性(每克酶减少的成本)和纤维素酶的性能(所需纤维素酶减少的克数)。2003年，由于研究开发了一套生产强效的纤维素复合酶系统的工艺，酶的成本降低20倍的目标，而且还超过了此目标。最近，酶的成本又进一步降低至原来的30倍，因此酶制剂的成本问题已经不再是工业化的主要阻碍。当然值得指出的是，这个酶成本的降低是以美国能源部所提供的预处理底物为基准的，对其他底物的处理效果可能会不同。

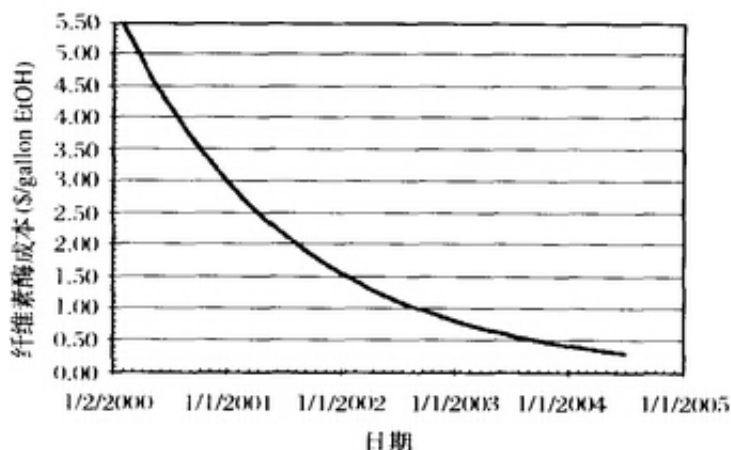


图3 纤维素酶成本随时间变化曲线

4 生物质生产酒精前景展望

利用木质纤维生物质生产燃料酒精可以改善能源保障，实现能源供应的可持续发展，同时拉动农业及其他相关行业的经济发展。尽管生物质酒精的生产通过技术改进已经有了很大的发展，但仍面临着许多挑战：

- 开发性价比更好的纤维素酶；
- 在商业范畴内，开发基因工程酵母；
- 研究更高效的预处理技术；
- 摸索整个乙醇生产系统中最优的经济成分配置。

除了前面提到的酶制剂成本及有效性外，工业化面临的另一个难题是，在预处理过程中产生的5C糖并不能被目前在工业上广泛应用的Saccharomyces酵母所利用。美国能源部与杜邦化学、美国玉米种植协会合作以期找到可有效利用木糖、戊糖和阿拉伯糖的菌种，该计划预计在2007年之前完成。



图4 纤维素和半纤维素的发酵

更有效和环保的预处理过程和过程的优化对工业化业有非常大的影响。当然，如前面提到的，系统过程的放大，工程的设计优化还需要时间。然而随着科学技术的飞速发展，能源危机的加重，相信在不远的将来，以酶解技术处理生物质将被应用于工业化酒精和其他生物产品的生产上。

原文地址：<http://www.china-nengyuan.com/tech/89002.html>