

# Progress of Fermentation Technology for Bioethanol Production

Wenjie Yuan<sup>1,2\*</sup>, Lijie Chen<sup>1</sup>, Nannan Li<sup>1</sup>, Fengwu Bai<sup>1</sup>, Shuying Li<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian

<sup>2</sup>Postdoctoral Research Center, Dalian SEM BIO-Engineering Technology Ltd. Co., Dalian

Email: \*ywj@dlut.edu.cn

Received: May 9th, 2012; revised: May 23rd, 2012; accepted: May 29th, 2012

**Abstract:** Bioethanol is the most mature biomass energy, which can solve energy shortage and pollution problems, occupying the important position in the human new energy layout. But bioethanol industry had many problems such as high production costs and raw material shortages. In this paper, the new technologies including energy-saving fermentation technology, pathway engineering to construct engineered strains and alternative materials were summarized. The developing direction for further investigation was discussed.

**Keywords:** Bioethanol; Energy-Saving Fermentation Technology; Pathway Engineering; Alternative Materials

## 燃料乙醇生产研究进展

袁文杰<sup>1,2\*</sup>, 陈丽杰<sup>1</sup>, 李楠楠<sup>1</sup>, 白凤武<sup>1</sup>, 李淑英<sup>2</sup>

<sup>1</sup>大连理工大学生命科学与技术学院, 大连

<sup>2</sup>大连赛姆生物工程技术有限公司博士后科研流动站, 大连

Email: \*ywj@dlut.edu.cn

收稿日期: 2012年5月9日; 修回日期: 2012年5月23日; 录用日期: 2012年5月29日

**摘要:** 燃料乙醇是发展最为成熟的生物质能源, 能够解决能源短缺及环境污染等问题, 在人类的新能源布局中占据重要地位。但燃料乙醇产业仍存在生产成本低、原料短缺等问题。本文对燃料乙醇发酵节能技术、途径工程改造生产菌种及非粮原料利用方面的研究进展进行了综述, 分析了燃料乙醇发酵技术中存在的问题, 并对今后进一步研究提出了建议。

**关键词:** 燃料乙醇; 节能技术; 途径工程; 替代原料

### 1. 引言

乙醇作为可替代石油基液体燃料的可再生清洁能源, 在石油资源供需矛盾日益突出, 国际石油市场持续高价位的背景下, 得到了世界各国的高度重视。利用生物质生产燃料乙醇的主要过程是利用液化酶/糖化酶将生物质转化成可发酵性糖, 然后采用间歇或连续操作的模式, 利用微生物(常用菌株为酿酒酵母)将可发酵性糖发酵生成乙醇和 CO<sub>2</sub>。综观世界各国燃

料乙醇发展, 燃料乙醇的经济性始终是突出问题, 生产成本分析表明, 能耗和原料成本占燃料乙醇总生产成本的比例高达 90%以上<sup>[1]</sup>, 因此降低燃料乙醇生产综合能耗, 提高乙醇发酵收率以降低原料消耗, 开发资源丰富价格低廉的生产原料, 始终是这一领域基础研究和技术开发的主要方向。

### 2. 乙醇发酵节能技术

#### 2.1. 生料发酵技术

传统的淀粉质原料发酵工艺中, 都经高温蒸煮或

\*通讯作者。

喷射液化, 导致能耗较大。近年来兴起的生料发酵技术或无蒸煮工艺, 将液化、糖化和发酵三个工序合而为一, 不仅大大降低了能耗, 而且不经蒸煮的淀粉质发酵醪液粘度小, 在粗馏塔内流动效果好, 可以进行浓醪发酵, 提高发酵罐的生产能力<sup>[2]</sup>。

我国在生料发酵研究方面起步晚, 但是应用早, 发展快。进入 20 世纪 80 年代, 我国对生料酿酒的研究达到了高潮, 并且随着酶工程的发展, 再加上耐高温酿酒活性干酵母的问世, 使生料发酵技术有了新的进步, 取得了实质性进展。汪江波和覃红梅等<sup>[3,4]</sup>分别研究了在生料乙醇发酵中添加各种酶制剂, 考察其对发酵的影响, 结果发现糖化酶的最佳添加量为 225 U/g 左右, 而果胶酶、酸性蛋白酶、纤维素酶的添加对乙醇发酵并没有明显的效果。段刚<sup>[5]</sup>等人利用新型酶制剂 STARGENTM 颗粒淀粉水解酶生料制取乙醇, 在实验过程中避免或减少了淀粉的损失, 提高了淀粉的利用率和出酒率, 并且降低了能耗, 简化了操作过程。

但在生料发酵技术中仍存在两个突出的问题。一方面, 未经蒸煮液化的淀粉分子糖化酶作用速率极慢, 糖化酶消耗量大导致成本增加, 因此构建同时表达液化酶和糖化酶的酿酒酵母, 是主要研究方向之一<sup>[6]</sup>; 另一方面, 淀粉质原料的蒸煮液化在淀粉酶将淀粉水解为易于糖化的糊精分子的同时, 还对发酵原料具有灭菌作用, 可有效防止发酵过程杂菌污染导致的糖份损耗, 而生料发酵没有蒸煮环节, 虽然节省了能耗, 但也同时失去了对发酵原料进行灭菌处理的过程, 增加了发酵过程杂菌污染的机会。控制糖化发酵速率避免过程中还原糖的积累是未来发展生料发酵技术的另一重要方向。

## 2.2. 高浓度乙醇发酵技术

使用总糖浓度超过 25% (w/v) 的底物, 使发酵终点乙醇浓度达到 15% (v/v) 以上的超高浓度 (Very High Gravity, VHG) 发酵是乙醇发酵技术的另一个主要发展方向。VHG 发酵技术, 不仅可以节省发酵醪精馏的能耗, 而且可以减少废糟液总量, 节省后续采用 DDGS (Distillers Dried Grains with Soluble) 技术处理废糟液的能耗, 同时降低了生产过程物料流总量, 节省了液化和糖化过程加热和冷却的能量。Bayrock 等人<sup>[7]</sup>首次采用多级串联式发酵罐进行高浓度乙醇连续发酵, 葡萄糖浓度在 150~320 g/L 范围, 末级出口处残糖低于

0.3%, 使终点乙醇浓度达到 16.7% (v/v)。Thomas 等人<sup>[8]</sup>在实验室条件下, 使用 38% 底物, 乙醇浓度达到 23.8%。但 VHG 发酵系统初期的高底物浓度和发酵进行过程中不断提高的乙醇浓度对酵母细胞的强抑制作用, 是这一技术发展的最大屏障, 改善酵母营养环境以提高其对高浓度底物和乙醇的耐受性<sup>[9,10]</sup>, 以及从生物反应工程角度来分析和改进发酵系统工艺流程和设备来减轻乙醇抑制, 是 VHG 乙醇发酵技术的主要研究内容, 并取得了良好研究进展<sup>[11]</sup>。

## 2.3. 高温发酵技术

高温酵母的选育是燃料乙醇生产的关键环节, 因为在较高温度下发酵生产乙醇存在下列优点: 一是在热带地区使用耐高温酵母进行乙醇发酵, 可大大降低冷却水的用量, 降低乙醇生产成本; 二是在高温下, 糖化和发酵速率加快, 可缩短发酵时间; 三是可通过抽真空, 在线移走乙醇, 减小产物抑制; 四是可以减少杂菌污染。因此引起了国内外学者的广泛关注<sup>[12]</sup>。长期以来, 高温发酵菌株的选育主要集中于高温驯化<sup>[13]</sup>和自然界筛选<sup>[14]</sup>, 其中马克斯克鲁维酵母属 *Kluyveromyces marxianus* 因为其良好的耐热性, 已应用于高温下的乙醇生产<sup>[15]</sup>。*K. marxianus* 能在超过 40 °C 的条件下产生乙醇, 甚至在 47 °C<sup>[16]</sup>、49 °C<sup>[17]</sup> 和 52 °C<sup>[18]</sup> 条件下发酵生产乙醇。然而温度升高对乙醇发酵也有负面影响, 会降低细胞的活性<sup>[19]</sup>, 并且与 *S. cerevisiae* 相比, *K. marxianus* 的乙醇耐性较差。通过现代生物学手段提高其乙醇耐性是未来重点发展的方向。

## 3. 途径工程技术改造乙醇生产菌株

途径工程中可以通过引入外源基因扩展、延伸原来的代谢途径, 产生新的末端代谢产物, 提高产率; 或者利用新的底物作为生物合成的原料。近年来应用途径工程技术对酿酒酵母进行遗传改造, 扩展底物利用, 阻断或削弱副产物合成, 改进细胞特性, 缩短发酵周期等方面已取得很大的进步。

### 3.1. 扩展底物谱

酿酒酵母缺乏合成  $\alpha$ -淀粉酶(切断  $\alpha$ -1,4 糖苷键)、 $\beta$ -淀粉酶(从淀粉的非还原端切出麦芽糖)、支链淀粉酶或异淀粉酶( $\alpha$ -1,6 糖苷键)和葡萄糖淀粉酶(从淀粉

的非还原端水解出单个的葡萄糖单位)的能力,不能直接转化淀粉生产乙醇。因此,要想利用淀粉,就必须在发酵前添加降解淀粉所需的各种酶或利用可产生这些酶的重组菌株。生淀粉的乙醇发酵就是构建同时分泌 $\alpha$ -淀粉酶和糖化酶基因的工程菌,直接发酵粗淀粉,提高淀粉的出酒率,降低生产成本,已引起国内外学者的广泛关注。Hisayori等<sup>[20]</sup>在 $\alpha$ -凝集素的C端连接淀粉酶构建的酿酒酵母基因工程菌能够直接发酵生淀粉,在72h内产生61.8g/L的乙醇,糖醇转化率可达理论值的86.5%。

乳糖在牛奶中的含量非常丰富,是干酪乳清的主要成分,也是乳酪生产中的主要副产物。利用乳糖生产乙醇不仅可以避免乳酪生产中资源的浪费,还有利于解决干酪乳清排放造成的环境问题。由于酿酒酵母不具备乳糖通透酶体系,乳糖不能穿透酿酒酵母的细胞膜进入细胞内,同时,酿酒酵母自身也不编码切割 $\beta$ -1,4糖苷键分解乳糖产生葡萄糖和半乳糖的半乳糖苷酶。为了使酿酒酵母能发酵乳糖生产乙醇,Jeong等<sup>[21]</sup>将来源于*Kluyveromyces lactis*的乳糖透性酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶引入酿酒酵母,Farahnak等<sup>[22]</sup>进行了*Kluyveromyces lactis*和*Saccharomyces cerevisiae*之间的原生质体融合,但这些尝试的结果是细胞生长缓慢、基因不稳定、乙醇产率较低等。Dominques等人<sup>[23]</sup>构建了含有*Kluyveromyces marxianus*乳糖通透酶和半乳糖苷酶基因的絮凝酿酒酵母,该重组酵母菌株的絮凝性和外源基因的稳定性都有所提高,并且发酵时能完全利用乳糖,乙醇产量达到了理论值的80%。Beccerra等<sup>[24]</sup>构建了只分泌表达克鲁维酵母属半乳糖苷酶的重组酵母,具有很高的乳糖利用率,在干酪乳清培养基中其生长速率可达0.23h<sup>-1</sup>,与所报道过的共表达 $\beta$ -半乳糖苷酶和乳糖透性酶基因的重组酿酒酵母的最高生长速率接近。

糖蜜是甘蔗或甜菜糖厂的副产品,含糖量较高,只须添加酵母便可直接发酵生产酒精,是大规模工业生产制造酒精的良好原料。糖蜜中除含有葡萄糖、果糖、蔗糖外,还含有一定量的棉子糖。由SUC2基因编码的转化酶可将棉子糖转化为葡萄糖和蜜二糖。蜜二糖是由 $\alpha$ -1,6糖苷键连接的葡萄糖和半乳糖,只能被少数酵母利用。通过构建表达MEL1基因的*Saccharomyces cerevisiae*<sup>[25]</sup>,可以提高糖蜜的生物量及乙醇产量,并显著降低工业污水的BOD。

木糖是自然界中除D-葡萄糖之外第二大糖源,它作为半纤维素聚合体的一部分广泛存在于植物组织中,是木质纤维素的主要成分之一。为了降低木质纤维素生产乙醇的成本,必须使半纤维素的木糖转化为乙醇。酿酒酵母具有木酮糖代谢途径的完整酶系,木酮糖经过木酮糖激酶(Xylulokinase, XK)磷酸化生成5-磷酸木酮糖进入磷酸戊糖途径(PPP),然后以中间产物6-磷酸葡萄糖和3-磷酸甘油醛的形式进入酵解途径(EMP),最终在厌氧条件下生成乙醇。但酿酒酵母因缺乏将木糖转化为木酮糖的酶系而不能直接利用木糖。

为了达到*Saccharomyces cerevisiae*快速转化木糖为乙醇的目标,必须完成两项任务:1)将木糖转化为木酮糖;2)提高木酮糖的利用速率。自然界中木糖转化为木酮糖的代谢途径有2条。其一,在某些真菌中<sup>[26]</sup>,木糖在木糖还原酶(Xyloereductase, XR)的作用下还原为木糖醇,然后在木糖醇脱氢酶(Xylitol dehydrogenase, XDH)的作用下还原为木酮糖,XR和XDH分别需要NADPH和NAD<sup>+</sup>作为辅酶;其二,在某些细菌中,木糖在木糖异构酶(Xyloseisomerase, XI)的作用下直接转化为木酮糖<sup>[27]</sup>。

单纯地将来源于*P. stipitis*的为XR及XDH编码的XYL1和XYL2基因转移到*S. cerevisiae*中,并没有提高木糖生产乙醇的能力<sup>[28]</sup>。在有氧的情况下,木糖主要转化为生物量和小部分的木糖醇,而在限氧情况下,生长速率变慢,乙醇产量更低,但木糖醇的产量有所提高。这主要是因为木糖还原酶在厌氧条件下消耗NADPH将木糖转化为木糖醇,导致NADH无法充分氧化为NAD<sup>+</sup>,致使XDH活性受限,从而引起木糖醇的积累。因此,要提高木糖利用率除了引入木糖还原酶和木糖醇脱氢酶以外,还必须使木糖还原酶和木糖醇脱氢酶所催化的还原及氧化反应在热力学上达到平衡。Walfridsson等<sup>[29]</sup>通过改变表达XR/XDH比例,提高XDH的活性,实现了减少木糖醇含量和提高乙醇产量的目的,但效果仍不理想,推测可能是木糖到乙醇整个代谢途径上的其他环节有障碍。转酮酶(Transketolase, TKL)和转醛酶(Transketolase, TAL)是PPP途径上的关键酶,酿酒酵母菌含有这两种酶,但酶活较低。鲍晓明等<sup>[30]</sup>在XYL1和XYL2基因的酿酒酵母转化子中,又引入转酮酶TKL1基因及转醛酶TAL1基因,使酿酒酵母转化子在原有基础上超表达

转酮酶及转醛酶活性。同时具有 XYL1 和 XYL2 以及超表达基因 TAL1、TKL1 的酿酒酵母转化子可以在木糖为唯一碳源的平板上生长。摇瓶发酵实验结果表明当 XR/XDH 比值为 0.06 时,产物中检测不到木糖醇,其他的副产物如甘油、乙酸盐等也有所下降,而乙醇得率却有所提高。此外,鲍晓明等<sup>[31]</sup>首次成功地在酿酒酵母中得到木糖异构酶的活性表达,并且为了使木糖代谢流向乙醇形成的方向,在酵母转化子中又引入磷酸戊糖途径中的转酮酶基因 TKL 及转醛酶基因 TAL1,同时表达 xylA 和超表达 TAL1 基因、TKL1 基因的酿酒酵母工程菌株可以在木糖为唯一碳源的平板上生长;摇瓶发酵实验结果表明,该工程菌株可以发酵木糖形成 1.3 g/L 乙醇,在酿酒酵母菌中建立了一条新的木糖代谢途径。

### 3.2. 降低副产物的生成率, 提高乙醇产量

在酵母发酵产生乙醇的过程中最主要的副产物就是甘油,甘油的生成会消耗总碳源的 4%~10%<sup>[32]</sup>。产生甘油的主要原因是在厌氧条件下,呼吸链不起作用,这样使 NADH 还原成 NAD<sup>+</sup>的唯一途径就是通过甘油的形成,从而维持细胞内氧化还原电势的平衡。甘油的生物合成途径包括磷酸二羟丙酮在 3-磷酸甘油脱氢酶(GPDH)的催化下还原为 3-磷酸甘油,后者在 3-磷酸甘油酯酶的作用下脱磷形成甘油,其中由 GPD1 和 GPD2 两个基因编码的 3-磷酸甘油脱氢酶是限制性因素,且 GPD2 是最重要的部分。研究者通过改变甘油合成途径的关键酶,改变碳流方向与碳流量,从而提高乙醇发酵的产率。Bjorkqvist 等<sup>[33]</sup>研究了缺失 GPD1 或 GPD2 基因与 2 种基因双缺失的酿酒酵母在有氧条件下的生理学反应。研究结果表明,在有氧培养条件下,缺失 GPD1 或 GPD2 的菌株与亲本比较,生长速率略低,甘油产量较亲本分别减少了 69% 和 54%,乙醇产率由 0.38 变为 0.37 g/g;而双基因缺失突变体在有氧条件下的生长速率只有亲本的 50% 左右,未检测到甘油,乙醇产率为 0.36 g/g。Valadi 等<sup>[34]</sup>在前人基础上研究了 GPD2 缺失型突变菌株在厌氧条件下生长,乙醇产量提高了 8%,甘油形成量降低了 40%,但是与野生型菌株 W3O3-IA 相比,该菌株的生长速率降低了 45%;同时敲除 GPD1 和 GPD2 的菌株表现为在厌氧条件下不能生长。Nissen<sup>[35]</sup>等报

道了通过减少 NADH 的生成,消耗生物合成过程中的 ATP 的方法降低甘油的产量,方法是通过在氨基酸合成过程中改变辅助因子的需求。构建了一株敲除 GDH1,但过量表达 GDH2 或者是 GLT1 和 GLN1 的菌株 TN19,结果乙醇的产率提高了 10%,甘油的产率降低了 38%。Kong 等<sup>[36]</sup>也采用同样的原理进行了提高乙醇产量的研究。通过敲除 FPS1,(编码甘油运输的通道蛋白),过量表达 GLT1,乙醇的产率提高 14%,而甘油的产量降低 30%。

### 3.3. 提高乙醇耐受性

乙醇对酵母细胞生长和乙醇发酵具有强烈的抑制作用,提高酵母菌株的乙醇耐性,是提高发酵终点乙醇浓度的先决条件。在酿酒酵母中增加不饱和脂肪酸的量可在乙醇存在时加强细胞膜的流动性,从而提高乙醇耐性<sup>[37]</sup>。Kajiwara 等<sup>[38]</sup>通过在酿酒酵母中表达拟南芥  $\Delta$ -脂肪酸去饱和酶基因,并超表达酿酒酵母自身的  $\Delta$ -脂肪酸脱饱和酶基因,增加了细胞膜脂质不饱和脂肪酸的比例,使菌体在高的乙醇浓度中仍具有产乙醇的能力,显现出很高的乙醇耐受性。

### 3.4. 其他代谢工程手段

另外,还可以通过构建代谢旁路和改变能量代谢途径等代谢工程手段提高乙醇产率,如 Chen 等<sup>[39]</sup>成功地通过导入血红蛋白基因,提高酿酒酵母的乙醇产量;漆酶过量表达赋予了克隆菌对木质纤维素水解物中酚抑制剂的高耐受性,从而改善了酿酒酵母由可再生原材料生产乙醇的产量<sup>[40]</sup>。脯氨酸是类似于海藻糖和甘油的渗透压保护剂,能够提高酿酒酵母对冷冻或干燥条件下的耐受性。通过破坏 PUT1 基因(编码脯氨酸氧化酶),使得脯氨酸在细胞内积累,从而提高细胞对外界环境的耐受性<sup>[41]</sup>。

## 4. 非粮原料燃料乙醇生产

我国当前的燃料酒精生产是以糖质和淀粉质原料为主,一方面成本居高不下,无法与汽油和柴油等成品油竞争;另一方面存在“与人争粮、与粮争地”的问题。燃料酒精在我国的产业发展受到严重制约。积极开发非粮替代资源及相应的乙醇生产技术是解决问题的根本。

#### 4.1. 以纤维素为原料的乙醇生产

纤维素是地球上最丰富的可再生生物质资源，它占地球生物总量的 60%~80%。陆生植物每年约生产 1500 亿吨纤维素、半纤维素以及木质素。因此，利用秸秆、蔗渣、废纸、垃圾纤维等木质纤维素类物质作为粮食替代资源生产燃料乙醇有着光明的前景被称为“第二代燃料乙醇”。但与葡萄糖单元以糖苷键聚合而成的淀粉质原料不同，纤维素不仅被半纤维素和木质素所包裹，且其本身也存在着复杂的结晶结构，必须将其晶体结构破坏后，才有利于纤维素酶的降解作用，进而获得可发酵的糖。以木质纤维素类物质为原料生产燃料乙醇有两个完全不同的平台技术：即热化学转化(Thermochemical Platform)和生物化学转化(Biochemical Platform)。现阶段热化学转化的技术经济指标略好，但与生物化学转化技术相比相差不大。鉴于热化学转化技术能耗高，进一步提高其技术经济指标的空间有限，而生物化学转化技术则可以依托现代生物技术进展不断提高其技术经济指标，因而被公认为是纤维素乙醇技术发展的主要方向，但目前在预处理技术、纤维素酶技术、混合糖发酵技术发酵方面仍然面临很多技术难点和挑战。

纤维素生物转化过程集成化技术将反应或分离步骤中的不同方法集成在一个反应器或一个工艺步骤中，简化工艺流程、提高生产效率<sup>[42]</sup>。在“纤维素酶解制乙醇”的过程中，纤维素酶存在显著的产物抑制效应。通过同步糖化发酵，可以较好地解决乙醇产物抑制问题。然而，目前比较流行的纤维素液体同步糖化发酵分离的方法存在糖浓度低、乙醇浓度低、纤维素酶用量大、发酵剩余物含水量大和综合利用困难等问题。陈洪章等<sup>[43]</sup>纤维素固相酶解-液体发酵相耦合的技术可以有效地提高纤维素酶解效率和乙醇发酵效率，降低纤维素酶解发酵乙醇的成本。

#### 4.2. 以菊芋为原料的乙醇生产

菊芋，别名鬼子姜、洋姜等，为菊科向日葵属一年生草本植物，耐旱、耐寒、耐盐碱，能够在不适宜于粮食和经济作物生长的边际土地上种植，且生物质产量高<sup>[44]</sup>。菊芋的主要成分菊粉是带有一个葡萄糖末端的低聚果糖，与目前国内外普遍关注的以农作物秸秆为代表的木质纤维素类生物质相比，菊芋原料水解

既不需要技术难度大，糖份损耗高的预处理技术，也不需要成本昂贵的酶制剂。由于菊粉的聚合度低，菊芋原料的水解比淀粉质原料还容易，不需要高温液化，一步菊粉酶水解就可以获得可发酵性糖，工艺流程简单，能耗低。因此，菊芋是替代粮食类淀粉质原料生产燃料乙醇和其它生物基化学品可供选择的原料之一。

国外自上世纪 80 年代开始进行发酵菊芋生产乙醇的研究，研究重点在菊粉酶生产菌株及乙醇发酵菌株的选育，并以菊粉为原料，对分步糖化发酵和同步糖化发酵工艺进行研究。近年来，国内的学者也进行了类似的研究，以菊芋粉为底物，利用 *Aspergillus niger* SL-09 和 *Saccharomyces cerevisiae* Z-06 采用同步糖化与发酵法利用菊芋生产乙醇<sup>[45]</sup>。本课题组开展了以盐碱地种植收获的菊芋块茎为原料生产燃料乙醇的研究工作，选育了具有菊粉酶生产能力且乙醇发酵性能良好的克鲁维酵母(*Kluyveromyces sp.*)，开发了集产酶、菊粉糖化及乙醇发酵为一体的创新技术(统合加工技术 CBP, consolidated bioprocessing)，将产酶、糖化和乙醇发酵三个环节耦合，是技术经济指标最具有竞争能力的技术路线<sup>[46]</sup>，其主要优点在于：

1) 乙醇发酵对菌株产酶能力要求不高，产生的菊粉酶水解菊粉的速率与乙醇发酵能够匹配即可，与使用商品菊粉酶或单独生产菊粉酶相比，经济上最合理；

2) 以菊芋为原料生产燃料乙醇，没有高温液化环节，虽然节省了能耗，但也增加了杂菌污染的可能性，将产酶、糖化和乙醇发酵三个环节耦合起来(乙醇发酵速率略高于菊粉酶解速率)，水解下来的可发酵性糖被及时发酵为乙醇，在过程中不积累，可以有效防止杂菌污染，提高乙醇收率。

因此，集产酶、糖化及乙醇发酵于一体的创新技术，是菊芋为原料燃料乙醇生产的最佳技术路线和技术发展趋势。

#### 4.3. 以木薯为原料的乙醇生产

木薯，热带和亚热带广泛种植的粮食和经济作物，适应性强，耐水、耐瘠、耐旱，产量高，淀粉含量高，已被世界公认为具有发展潜力的生产乙醇的可再生资源。我国非粮燃料生物乙醇试点项目广西北海

年产 20 万吨木薯燃料乙醇项目于 2007 年 12 月已投产,是我国迄今为止唯一投入生产的非粮燃料乙醇项目。这个项目的建成,意味着生物质能源的发展路线真正走向非粮化发展。

以木薯为原料生产乙醇虽然有很多成本上的优势,但也同时存在很多制约瓶颈。目前存在的主要问题有:一是人们还没有认识到木薯的经济价值,种植的比较少,产量也比较低,一般都是处于自然生长状态,并且缺乏专门用于生产燃料乙醇的专用品种,大部分的木薯淀粉含量比较低,不适合燃料乙醇的生产;二是木薯乙醇企业的“三废”处理技术比较低,从而导致了严重的环境污染,制约着木薯乙醇的进一步发展。因此,寻找适合燃料乙醇生产的专用品种并增加种植面积、提高产量以及采用清洁的燃料乙醇生产技术是亟需解决的难题<sup>[47]</sup>。

#### 4.4. 以甜高粱为原料的乙醇生产

甜高粱又叫甜秆、糖高粱、芦粟等,属禾本科高粱属,普通粒用高粱的一个变种。甜高粱具有抗逆性强、含糖量高、生物产量高、光合效率高和粮、饲、能兼用等优良特性,备受世界各国的关注。目前,在众多生物质能源作物中,甜高粱以其高的乙醇转化率和抗逆性成为符合我国国情既产能源又产粮食的理想作物。尤其在能源环境危机日趋加剧的今天,它的开发利用为生产燃料乙醇原料的多元化发展开辟了一条新路,对减少我国石油消费对国际市场的依赖、保证国家能源安全和粮食安全具有重大的意义。

由于甜高粱属于 C4 植物,具有极强的光合速率,鲜茎秆产量达 75~300 t/hm<sup>2</sup>。甜高粱大约 16 t 茎秆能加工成 1 t 的精乙醇,每年可生产 95% (v/v)的乙醇 6000~7500 kg/hm<sup>2</sup>,超过木薯、玉米、小麦等近 1 倍以上。因此,以甜高粱茎秆汁液为原料生产燃料乙醇,无论是从经济性还是从能源安全的角度讲,都具有广阔的发展前景<sup>[48]</sup>。

#### 4.5. 以甘蔗为原料的乙醇生产

新世纪以来,甘蔗燃料乙醇在世界生物质燃料乙醇生产中一直占据半壁江山。在我国,甘蔗的种植分布在热带及亚热带地区,主要是在广西。利用甘蔗生产燃料乙醇与其他原料相比具有以下几点优势:一是甘蔗对自然资源的利用率非常高,包括光合效率

高、占用的土地少等;二是甘蔗的生物产量高、可发酵性糖类的含量高;三是利用甘蔗生产乙醇的产量高、成本低。因此利用甘蔗为原料甘蔗生产燃料乙醇具有广阔的发展前景。但我国甘蔗种植地区的环境平均温度较高,这就对酿酒酵母的耐高温要求较高,否则就会增加乙醇的生产成本。因此,高浓度发酵技术、使用耐高温、耐高浓度乙醇酵母是我国甘蔗燃料乙醇的关键。

### 5. 展望

资源、能源和环境是制约国民经济和社会可持续发展的重大瓶颈问题,积极探索并创立新技术,建立资源和能源可持续利用的环境友好型社会是“十二五”期间科技创新的重要内容之一。我国燃料乙醇技术研究开发起步晚,缺乏引导和协调,低水平重复现象严重。燃料乙醇生产成本远高于发达国家水平。积极开发代粮原料及优化工艺提高发酵水平至关重要,另一方面需要通过基因工程和代谢工程等近代分子生物学技术来培育和构建新的生产菌株以提高工艺水平、最大程度降低生产成本。

### 6. 致谢

感谢国家自然科学基金(21106016),教育部高校基本业务费专项项目(DUTSM13),辽宁企业博士后基金资助。

### 参考文献 (References)

- [1] 梁倩. 生物质能源的成本分析[D]. 南京林业大学, 2008.
- [2] 阮彩彪, 何建, 李文华等. 生料发酵技术应用概述[J]. 中国酿造, 2010, 214(1): 4-8.
- [3] 汪江波, 薛海燕, 邹玉玲等. 酶制剂的添加对早籼稻谷生料发酵生产酒精的影响[J]. 中国酿造, 2005, 145(4): 15-17.
- [4] 覃红梅, 韦仕岩, 张家伟. 酶制剂在玉米生料发酵酒精生产中的应用研究[J]. 酿酒科技, 2002, 113(5): 46-47.
- [5] 段钢, 许宏贤. 大米生料发酵酒精生产的研究[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(1): 95-102.
- [6] H. Shigechi, J.J. Koh, Y. Fujita, et al. Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and  $\alpha$ -amylase. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 5037-5040.
- [7] D. P. Bayrock, W. M. Ingledew. Application of multistage continuous fermentation for production of fuel alcohol by very-high-gravity fermentation technology. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 2001, 27(2): 87-93.
- [8] K. C. Thomas, S. H. Hynes, A. M. Jones, et al. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology-effect of sugar concentration and fermentation temperature. *Applied Biochem-*

- istry and Biotechnology, 1993, 43(3): 211-226.
- [9] B. G. Patil, D. V. Gokhale, K. B. Bastawde, et al. The use of tamarind waste to improve ethanol production from cane molasses. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 1998, 21(6): 307-310.
- [10] F. W. Bai, L. J. Chen, W. A. Anderson, et al. Parameter oscillations in very high gravity medium continuous ethanol fermentation and their attenuation on multi-stage packed column bioreactor system. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 88(5): 558-566.
- [11] F. W. Bai, L. J. Chen, Z. Zhang, et al. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability under very high gravity medium conditions. *Journal of Biotechnology*, 2004, 110: 287-293.
- [12] I. M. Banat, P. Nigam, D. Singh, et al. Ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations I: Yeasts in general. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1998, 14(6): 809-821.
- [13] 庞会利, 李景原, 秦广雍. 耐高温乙醇酵母的研究现状及进展[J]. *酿酒科技*, 2008, 164(2): 99-102.
- [14] D. A. Tony, C. Guy and R. Inge. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. *Enzyme and Microbial Technology*, 1989, 11(7): 411-416.
- [15] Y. Kourkoutas, S. Dimitropoulou, M. Kanellaki, et al. High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. *Bioresource Technology*, 2002, 82(2): 177-181.
- [16] I. Ballesteros, M. Ballesteros, A. Cabanas, et al. Selection of thermotolerant yeasts for simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of cellulose to ethanol. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1991, 28(1): 307-315.
- [17] D. B. Hughes, N. J. Tudrosaan and C. J. Moye. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. *Biotechnology Letters*, 1984, 6(1): 1-6.
- [18] I. M. Banat, P. Nigam and R. Marchant. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1992, 8(3): 259-263.
- [19] P. J. Anderson, K. McNeil and K. Watson. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus* isolated from sugar mills. *Applied Environmental Microbiology*, 1986, 51(6): 1314-1320.
- [20] S. C. Hisayori, K. Jun, F. Yasuya, et al. Direct production of ethanol from raw corn starch via fermentation by use of a novel surface-engineered yeast strain codisplaying glucoamylase and  $\alpha$ -amylase. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70(8): 5037-5040.
- [21] Y. S. Jeong, W. R. Vieth. Fermentation of lactose to ethanol with recombinant yeast in an immobilized yeast membrane bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 1991, 37(6): 587-590.
- [22] F. Farahnak, T. Seki, D. Y. Ryu, et al. Construction of lactose-assimilating and high ethanol producing yeasts by protoplast fusion. *Applied Environmental Microbiology*, 1986, 51(2): 362-367.
- [23] L. Dominiques, M. M. Dantas, N. Lima, et al. Continuous ethanol fermentation of lactose by a recombinant flocculating *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Biotechnology and Bioengineering*, 1999, 64(6): 692-697.
- [24] M. Beccerra, S. DiazPrado, E. Rodriguez-Belmonte, et al. Metabolic engineering for direct lactose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2002, 24(17): 1391-1396.
- [25] B. Ronnow, L. Olsson, J. Nielsen, et al. Derepression of galactose metabolism in melibiase producing bakers' and distillers' yeast. *Journal of Biotechnology*, 1999, 72(3): 213-228.
- [26] P. Y. Wang, C. Shopsis and H. Schneider. Fermentation of a pentose by yeasts. *Bioresource Technology*, 1980, 94(1): 248-254.
- [27] C. J. Moes, I. S. Pretorius and W. H. Zyl. Cloning and expression of the *Clostridium thermosulfurogenes* D-xylose isomerase gene (*xylA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 1996, 18(3): 269-274.
- [28] P. Kotter, M. Ciriacy. Xylose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1993, 38(6): 776-783.
- [29] M. Walfridsson, M. Anderlund, X. Bao, et al. Expression of different levels of enzymes from the *Pichia stipitis* XYL1 and XYL2 genes in *Saccharomyces cerevisiae* and its effects on product formation during xylose utilization. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1997, 48(2): 218-224.
- [30] 鲍晓明, 高东, 曲音波等. 木糖代谢基因表达水平对酿酒酵母重组菌株产物形成的影响[J]. *生物工程学报*, 1997, 13(4): 355-361.
- [31] 鲍晓明, 高东, 王祖农. 嗜热细菌木糖异构酶基因 *xylA* 在酿酒酵母中的高效表达[J]. *微生物学报*, 1999, 39(1): 49-54.
- [32] L. Andre, A. Hemming and L. Adler. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae* studies on the osmotic induction of glycerol production and glycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>). *FEBS Letters*, 1991, 292(2): 13-17.
- [33] S. Bjorkqvist, R. Ansell, L. Adler, et al. Physiological response to anaerobicity of glycerol 3-phosphate dehydrogenase mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Environmental Microbiology*, 1997, 63(1): 128-132.
- [34] H. Valadi, C. Larsson and L. Gustafsson. Improved ethanol production by glycerol-3-phosphate dehydrogenase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1998, 50(4): 434-439.
- [35] T. L. Nissen, M. C. Kielland-Brandt, J. Nielsen, et al. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. *Metabolic Engineering*, 2000, 2(1): 69-77.
- [36] Q. X. Kong, J. G. Gu, L. M. Cao, et al. Improved production of ethanol by deleting FPS1 and over-expressing GLT1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 2006, 28(24): 2033-2038.
- [37] H. Alexandre, I. Rousseaux and C. Charpentier. Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasma membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters*, 1994, 124(1): 17-22.
- [38] S. Kajiwara, K. Suga, H. Sone, et al. Improved ethanol tolerance and fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* by alteration of fatty acid content in membrane lipids via metabolic engineering. *Biotechnology Letters*, 2000, 22(23): 1839-1843.
- [39] W. Chen, D. E. Hughes and J. E. Bailey. Intracellular expression of *Vitreoscilla* hemoglobin alters the aerobic metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Progress*, 1994, 10(3): 308-313.
- [40] S. Larsson, P. Cassland and L. J. Jonsson. Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by heterologous expression of laccase. *Applied Environmental Microbiology*, 2001, 67(3): 1163-1170.
- [41] H. Takagi, K. Sakai, K. Morida, et al. Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 184(1): 103-108.
- [42] 陈洪章, 邱卫华. 秸秆发酵燃料乙醇关键问题及其进展[J]. *化学进展*, 2007, 19(7-8): 1116-1121.
- [43] 陈洪章, 王岚. 生物质能源转化技术与应用[J]. *生物质化学工程*, 2008, 42(4): 67-72.
- [44] W. J. Yuan, X. Q. Zhao, X. M. Ge, et al. Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in salina and irrigated with a mixture of seawater and freshwater. *Journal of Applied Microbiology*, 2008, 105(6): 2076-2083.
- [45] X. Y. Ge, W. G. Zhang. A shortcut to the production of high ethanol concentration from Jerusalem artichoke tubers. *Food Technology and Biotechnology*, 2005, 43(3): 241-246.
- [46] 袁文杰, 任剑刚, 赵心清等. 一步法发酵菊芋生产乙醇[J].

- 生物工程学报, 2008, 24(11): 1-6.
- [47] 黎贞崇, 黄志民, 杨登峰等. 影响木薯燃料乙醇产业发展的不利因素及对策[J]. 可再生能源, 2008, 26(3): 106-110.
- [48] E. Gnansounou, A. Daurint and C. E. Wyman. Refining sweet sorghum to ethanol and sugar: Economic tradeoffs in the context of North China. *Bioresource Technology*, 2005, 96(9): 985-1002.