

综述

新型工业酶制剂的进步对生物化学品工业生产过程的 影响

段钢

杰能科(中国)生物工程有限公司 杰能科·丹尼斯克, 无锡 214028

摘要: 工业酶制剂对化工和生物化工产品生产的影响有两方面, 一是直接催化生产, 另一方面是辅助发酵菌进行生产。以下简单回顾了酶制剂在工业领域的应用现状, 注重讨论酶制剂在淀粉糖等方面的直接催化应用和在酒精发酵生产等方面的辅助作用, 分析新型酶制剂对生产过程的影响及带来的益处, 促进行业的可持续发展。

关键词: 工业酶制剂, 生物催化, 发酵, 可持续发展

Impact of the industrial enzyme progress on the production of chemicals

Gang Duan

Genencor (China) Bioproduct Co. Ltd., A Danisco Division, Wuxi 214028, China

Abstract: Industrial enzymes play dual roles for the production of chemicals and biochemicals, one is to act as direct catalyst for the reaction, the other is to participate in the fermentation process to convert substrates to fermentable sugars or to make it more efficient. The review briefs the applications of industrial enzymes for chemical productions, with emphasis on direct conversion of starch and their roles in bioethanol production process, also analyzes the benefits by using new enzymes and prospects for future development.

Keywords: industrial enzymes, biocatalysis, fermentation, sustainability

中国发酵产品的生产量已经在世界范围内名列前茅, 有些产品如: 味精(184/200 万吨)、柠檬酸、赖氨酸、麦芽糖和葡萄糖, 甚至是遥遥领先, 但是, 如果看看生产这些产品的消耗和付出的环境代价, 那些数字实在是不太值得骄傲。以酒精的生产为例: 表 1 对比了中美生产的消耗^[1], 其中原料的消耗可能与玉米的淀粉含量有关系而有差异, 但其他指标也无一不远远高于美国, 特别值得提出的是水的消耗惊人的高! 除了众所周知中国是世界上缺水的国

家的事实外, 消耗的水很大程度成了工业废水, 造成环保问题。因此, 节能减排的呼声很高。大家公认的观点是: 工业生物技术的进步是解决生化产品生产中高能耗、高消耗和高污染等问题, 走可持续发展之路的关键^[2]。

工业生物技术的核心范围很广泛, 生物催化只是其中的一部分。与发酵不同, 生物催化是指使用分离的、单一/复合的酶制剂催化生产目标产物, 但不涉及到生理反应。发酵菌种有关的问题不在本

Received: October 9, 2009; **Accepted:** November 10, 2009

Corresponding author: Gang Duan. E-mail: gang.duan@danisco.com

表 1 中美酒精生产消耗对比

Table1 Comparison of key consumption indices of ethanol production from China and USA

| Countries | Feedstock (t/t ethanol) | Heat (MJ/kg ethanol) | Coal (kg/kg ethanol) | Steam (kg/kg ethanol) | Water (t/t ethanol) | Electricity (kW·h/t ethanol) |
|-----------|----------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------|------------------------|---------------------------------|
| China | 3.2 | 33.4 | 1.45 | 8.0 | 12 | 500 |
| USA | 2.8 | 16.8 | 0.73 | 4.0 | 1.8 | 350 |

Adapted from "White book of China Industrial Biotechnology 2007" (Hao, 2008); t: ton.

次讨论之内。生物催化的核心则是生物催化剂,即工业酶制剂。除了从自然选择外,随着分子生物学、蛋白质工程、基因工程和计算技术等相关学科的迅速发展,高通量筛选技术和装置的发展与成熟,使得直接进化和合理设计生物酶催化剂的效率大大提高,可能在更短的时间内创造出越来越多新的高效而经济的工业酶制剂。

引起酶制剂进步的原因可归纳为:由于技术的进步表达水平的提高,进而降低了发酵成本;产生的新酶具有改善的特性:活力、稳定性、专一性和极限操作环境下的耐受性。在酶制剂的发展过程中,通常是两种变化的结合。不论是哪种进步,都可引起生产过程的革新,使从前的不可能变得可能,从前的不经济变得有竞争力。

工业酶制剂在大宗工业生化品的生产中所发挥的作用有两个方面,一种类型是直接催化反应而得到产品;另一种类型是酶制剂在反应过程中起辅助作用。由于生产生化品反应的复杂性和现在工业酶制剂的水平,只有极少数过程可以直接用全部酶转化,属于第一种类型;大部分过程仍需要发酵菌株的作用来完成。在第二种过程中,除了发酵菌株的效率很重要外,酶制剂的功能对过程的影响也很大。这些影响包括:产生/增加高质量的可发酵糖(淀粉酶、糖化酶和纤维素酶等)、改善体系的营养供应(蛋白酶)和改善体系的传质并产生更多的发酵糖(非淀粉类多聚糖水解酶水解非淀粉类多糖而降低黏度,且可能产生一定量的可发酵糖)。

以下先就这两种类型反应进行概述,然后各举一两例来讨论酶制剂对生产过程的影响,减少能耗和对环境的不良影响,同时展望未来的发展方向。

1 工业酶直接催化的反应

1.1 概况

直接用酶成功生产化学品的产值虽然与化学法

相比只占很少部分(OECD, 2009),但在大宗化学品、精细化工品、食品和医药中间体等领域都不乏成功的例子。这里简单回顾一下主要的成功例子有:染料靛蓝(市场超过 2 亿美元)、嗜热菌蛋白酶用于阿斯巴田 Aspartame 甜味剂(市场超过 10 亿美元)的合成,青霉素酰化酶在 6APA 生产上的应用,腈水合酶和腈水解酶在从丙烯腈生产丙烯酰胺等^[3-4]。

非水相酶催化的发展也使酶制剂的使用领域大大拓宽,特别是水解酶,如脂肪酶和蛋白酶等在合成上的应用,在手性化合物的生产和拆分上也有很成功的例子^[3]。

1.2 淀粉糖的生产

最初的淀粉糖葡萄糖是由酸法来生产的,近年来已基本由酶法替代,而且生产淀粉糖的酶也不断进步。选择淀粉糖为例子的一个原因是淀粉糖行业所使用工业酶制剂在过去的十几年里,是酶制剂技术进步最快的领域之一;另一个重要的原因是中国的淀粉糖生产总量在世界上已名列前茅,仅次于美国,2008 年达到 554 万吨(干基),其中葡萄糖和麦芽糖已超过美国。

1.2.1 果糖的生产

果糖浆的工业产品分为两类,果糖含量为 42% 和 55%,也称 F42 和 F55 果糖。F55 的果糖因甜度与蔗糖相同,被广泛应用在 Cola 品牌上。现在工业上的异构化反应只能生产 F42 的果糖,因为在操作温度 50°C~60°C 范围内,即使达到热力学平衡,果糖的含量也低于 49%。F55 的果糖是通过模拟移动床吸附分离得到的 90% 以上的果糖与 F42 混配得到的^[5]。

果糖的生产是固定化酶制剂在工业上进行大规模生产最成功的例子之一,全球每年的果葡糖浆的生产量超过千万吨。与其他淀粉糖相比,果糖生产的单元操作多,首先要生产高质量的葡萄糖,然后进行浓缩、纯化、异构化和再纯化等,流程较长,且

过程参数需严格控制, 见图 1。由于固定化酶制剂相对昂贵, 因此要尽量延长酶的半衰期, 这就要求底物中的杂质, 如金属离子、有颜色物质及非葡萄糖, 特别是糖化过程中的长链糖等应尽量减少。体系中任何添加调 pH 的酸碱或添加的酶激活剂都会加重离子交换系统的负担, 精炼过程的化学品费用占整个生产成本近 20%。由于液化过程要耗费大量蒸汽, 要尽量提高配料浓度, 这样也会减少异构化前蒸发浓缩的负担。应用高效的液化 SPEZYME FRED 和糖化酶 OPTIMAX PTT 可使淀粉在更高浓度下转化, 得到高质量的葡萄糖浆, 其中含有超过 96% 的葡萄糖, 尽量少的长链糖, 并减少蒸发的能耗和离交系统的负担, 缩短过程时间。

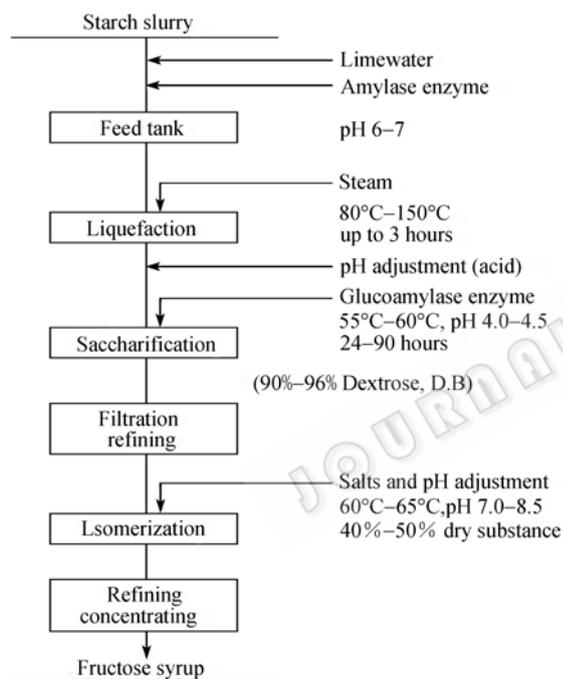


图 1 果糖生产流程图

Fig.1 Flowchart of fructose production.

图 1 中显示传统的液化过程, 由于配料时湿磨淀粉浆的 pH 值为 5.5 左右, 使用传统的淀粉酶需要把 pH 值调高至 6 以上, 同时加入少量钙离子以增加淀粉酶在高温中的稳定性。然而在下面的糖化过程中, 为了配合糖化酶的性能, 又要把 pH 值降低至 4.2 左右; 在糖化以后, 又要将 pH 值调高至 7.0~7.5 以适应葡萄糖异构化酶的反应。图 2 中显示了在过程中 pH 值随单元操作的变化而上下变化, 从过程

整体来看变化很不合理。体系中的 pH 变化是通过加酸和加碱来实现的, 这不但增加化学品的消耗, 而且使操作变得复杂。更糟糕的是, 所有加入体系中的化学品/离子, 在反应结束后又基本要出去, 这又大大地增加了离子交换单元的成本。此外, 葡萄糖异构化酶对钙离子非常敏感, 钙离子的浓度若超过 5 ppm, 就会大大影响异构化酶的效率, 因此液化前加入的钙离子要在异构化前出去。这些精炼的费用远远大于酶制剂的成本。

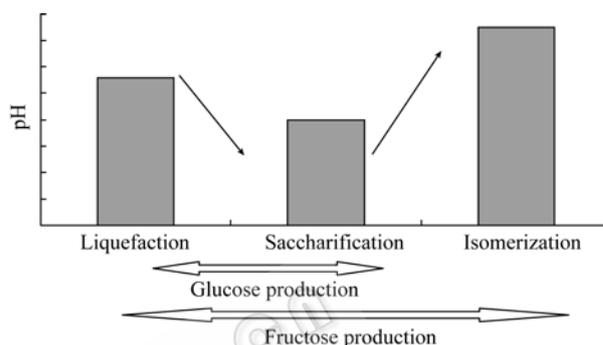


图 2 果糖生产过程中 pH 值的变化

Fig. 2 Changes of pH during fructose production process.

归纳起来, 传统过程的问题涉及: 由于酶的活性和稳定性的限制, 要进行单元操作中 pH 反复的调节(酸碱); 金属离子的引入和除去。

从图中可看出: 若采用耐酸的淀粉酶, 如 SPEZYME FRED, 液化的 pH 不需调节, 同时也不需要另外添加钙来增强酶的稳定性; 关于葡萄糖生产, 为了避免 pH 的变化, 糖化可以在相对高的 pH, 即与液化的 pH, 大约 5.5 相同的条件下进行, 现在工业上使用的黑曲糖化酶(*A. niger*)的最适 pH 不在此范围, 其他的糖化酶如 *Trichoderma reesi*、*Humicola grisea* 等在较高的或较宽的 pH 值范围内性能较优。虽然 *Humicola* 糖化酶还没有大规模商业化, 但 *Trichoderma* 糖化酶已有商业化。这样精炼过程的负担已大大减少。

未来的发展方向在于异构酶, 若能降低异构化反应的 pH 值, 则整个过程可能实现 UNI-pH, 即无 pH 调节, 那么精炼费用会明显降低。

前面提到, 现在的异构化反应是在 60°C 左右进行, 由于受热力学限制, 得到的果糖浓度低于 49%, 有人提出, 若提高异构化酶的热稳定性, 可在 90°C

进行异构化, 则可直接得到 55% 的果糖。作者不认为这是未来酶发展的方向, 原因如下: 一是在高温下, 果糖本身的化学反应会造成颜色问题, 另外在如此高温下, 固定化酶的技术将是极大的挑战。

1.2.2 麦芽糖的生产

麦芽糖在食品和糖果的生产中有着广泛的应用, 我国的麦芽糖生产超过 300 万吨。麦芽糖生产中通常使用真菌淀粉酶或 β -淀粉酶, 操作温度 $55^{\circ}\text{C}\sim 60^{\circ}\text{C}$, pH 5.5 左右。在这样的操作条件下, 工业上遇到很头疼的问题就是染菌, 因为乳酸菌很容易生长。两种办法可以解决这个问题, 一是提高反应的温度至 68°C ; 二是反应在更低的 pH 值下进行。新的真菌淀粉酶 TrAA(*Trichoderma*) 可在这种条件下进行麦芽糖的生产^[6-7]。

酶法代替发酵法生产生化品的另一个很成功的例子是葡萄糖酸/盐的生产。

1.3 葡萄糖酸/盐的生产

1.3.1 葡萄糖酸钙

葡萄糖酸/盐由于其特殊性质而在食品、医药和建筑等领域广泛应用, 我国已成为世界上最大的生产国, 年产超过 10 万吨。传统的葡萄糖酸钙的生产方法很多, 归纳起来有电解氧化法、溴化法、金属催化合成法、发酵法等。在工业化大生产中, 主要采用发酵法。

发酵法历史悠久、工艺稳定、成本较低, 被多数厂家所采用。发酵法是以黑曲霉为生产菌种, 经菌种逐级扩大培养, 发酵代谢的酶将葡萄糖氧化成葡萄糖酸, 再经碳酸钙中和精制而成, 底物可以是葡萄糖或淀粉经“双酶法”转化的葡萄糖浆。发酵法受到菌种质量、扩培、染菌、工艺变化以及气候条件等多种因素的影响, 生产波动性大, 步骤多, 限制了其产量、收率、品质的提高。

酶法工艺就是利用酶制剂, 葡萄糖氧化酶直接将葡萄糖转化成葡萄糖酸, 再经过碱的中和作用, 将其转化成葡萄糖酸盐系列产品; 由于反应过程产生过氧化氢, 因此反应体系中需要脱氢酶来配合分解过氧化氢成为对体系无毒的水和氧气。与发酵法相比, 酶法不需要种子培养, 免去了微生物和培养基等原辅材料对反应体系的干扰, 提高了反应产物

的纯度, 给提取和精制带来方便。没有了种子培养, 反应更加容易控制, 生产也会变得更加平稳。对生产者而言, 酶法工艺简便、设备简单、操作方便, 没有染菌的危险, 而且产物单一, 纯度高, 易于分离和精制, 产品质量和收率显著提高, 产品等级完全达到食品级和注射级标准。这些下游过程的简化大大节省了时间、能源和操作成本。废水废渣也大量减少。此外, 对于新建厂, 可以省去种子罐和一部分提取设备, 降低了设备投资。

在过去的几年里, 我国主要的葡萄糖酸钙的生产绝大部分已从发酵法转向酶法^[8]。

1.3.2 葡萄糖酸锌

葡萄糖酸锌传统的生产方法是利用葡萄糖酸钙作为原料, 经过多步反应而成, 可称为“多步法”工艺; 而酶法是采用葡萄糖作为原料, 经过酶制剂催化一步直接生产出成品, 可称为“一步酶法”工艺。一步法工艺简单易行, 产品纯度高、收率高, 是葡萄糖酸锌生产的理想途径^[9]。

2 酶在发酵过程的辅助作用

2.1 概况

很多化学品的生物生产是由发酵过程或全细胞催化完成的。这些过程中都涉及到很多酶反应, 但菌种和全细胞本身有丰富的酶系。外加的酶制剂起辅助作用, 与菌种配合, 目的是使发酵过程的效率提高、提高原料的利用率、减少能量和水的消耗、减少废水废渣。虽然酶制剂起辅助作用, 但酶制剂的进步可能会很大程度改变生产过程, 使操作简化并容易控制。下面以淀粉质原料生产酒精的生料过程为例, 显示酶制剂如何和酵母配合是酒精生产过程产生巨大的变化, 对生产带来各种益处。除了淀粉质原料酒精的生产外, 还讨论了纤维素酒精生产的酶制剂的发展, 虽然从生物质生产化学品还有很大的挑战, 但却是未来生物经济发展的方向。

2.2 生物酒精的生产

2.2.1 淀粉质酒精的生产

新的酶制剂的出现使生料发酵和传统酒精生产过程都有所进步, 下面分别进行讨论。

1) 生料过程: 生物酒精的生产由于石油危机而造成的国家能源安全、农民收入和环境等问题而日益受到重视, 近几年发展较快, 中国已成为世界上第三大生物酒精生产国。现在工业上的生物酒精皆由淀粉质原料来生产。众所周知, 生物酒精的生产消耗相当多的能量和水来蒸煮淀粉类原料。由于黏度问题, 配料浓度很高的情况下, 会造成液化不彻底, 并且浓醪的换热和输送非常困难, 同时也影响发酵体系的传质, 而使过程效率降低^[10-11]。生料发酵可在很大程度上解决上述问题。新型高效生料复合水解酶的出现使得生料发酵从传统饮料酒生产的低效率长周期变得可进行高强度发酵在短时间生产工业用的生物酒精, 大大提高碳源的转化率、节能、过程简化, 并且整个加工过程不产生黏度问题^[12-15]。

从图 3 中可看出: 生料过程基本上不存在黏度问题。在传统过程中配料浓度若达到 35%(DS 干物), 蒸煮、机械输送、换热和发酵都会因高黏度而出现严重问题, 然而对于生料系统就不会出现这样的问题, 发酵可顺利进行, 酒度可达 20%(V/V)以上^[16]。

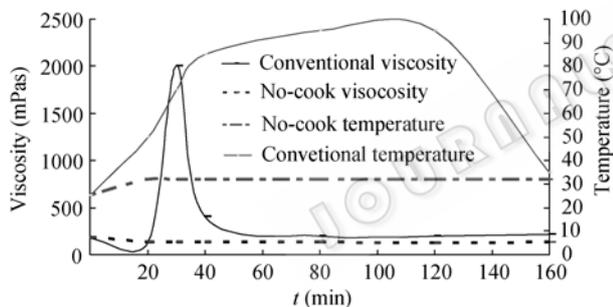


图 3 生料过程和传统过程中温度和黏度对比曲线
Fig. 3 Comparison of the temperature and viscosity changes during no-cook and conventional processes.

图 4 的数据显示过程中的糖浓度一直很低, 酵母压力小, 染菌机会小。产酒业胜出传统过程。

关于生料过程, 另一个很有趣的现象是: 体系中的酵母数量低于传统过程, 体系中用于酵母生长的碳源减少, 更多的转化成酒精。

以前的观点, 在谈到生料过程主要是着重减少蒸煮的能耗, 其实蒸煮过程的能耗只占酒精生产能耗的一小部分, 而蒸馏和干燥才是主要耗能的单元操作, 而生料过程使得高浓发酵成为可能。除此之外, 如上面提到的较少的碳源用于生长酵母, 再加

上过程没有经过高温蒸煮因而原料中的游离糖的损失减少, 所以生料过程更重要的是提高过程的产酒效率^[17]。

其他酶制剂的进步也使生料过程的效率和竞争性进一步提高, 如新型酸性蛋白酶的出现, 使得生料的浓醪发酵/大颗粒发酵更容易, 同时也可以增加清液回配比例, 达 60%, 大大减少废水处理的压力, 结果如图 6^[16,18]。

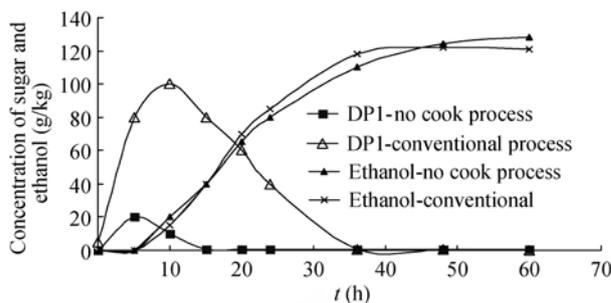


图 4 传统过程和生料过程中究竟和葡萄糖浓度随时间的变化
Fig. 4 Comparison of the ethanol and glucose concentration changes with time in conventional and no-cook processes.

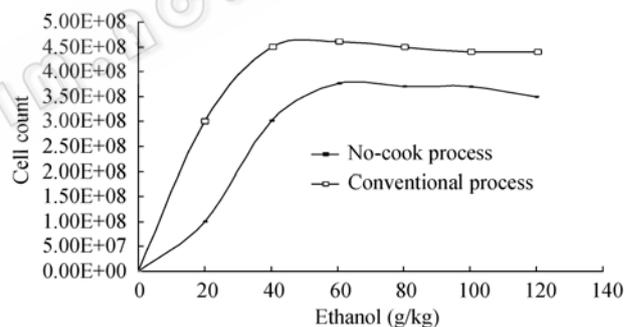
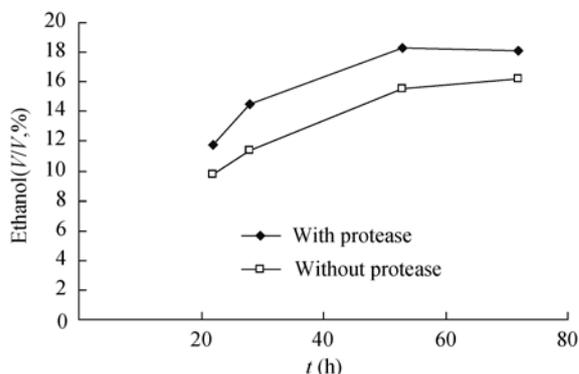


图 5 发酵过程中的酵母数量变化
Fig. 5 Comparison of yeast count changes in two fermentation processes.



Residual starch: 3.71%(without) and 1.39%(with protease)
图 6 蛋白酶的添加对生料发酵中 60%清液回配的影响
Fig. 6 Effect of protease on no-cook fermentation process at the 60% recycle of thin stillage.

2) 传统过程: 木薯是非粮生物酒精生产的一个主要原料, 近期的应用研究不少^[19-21]。应用于传统酒精生产过程的酶制剂, 新型高效液化酶(低 pH)和新型糖化酶(里氏木霉 *Trichoderma reesei*, 简称 TrGA)的结合可使从液化到发酵的整个过程不需要调节 pH 值, 不但减少了酸碱的使用、节约了成本, 而且使操作和控制变得更容易, 更重要的是由于减少了化学品的添加, 因而减少了体系中酵母的压力, 因此酵母的效率得到提高, 从而提高了出酒率(图 7)。

TrGA(DISTILLASE ASP)的另一个好处是在预糖化上, 当今的酒精生产的一个发展趋势是进行边糖化边发酵 SSF, 这样做的一个重要原因是避免糖化过程的染菌。TrGA 的热稳定性高使得预糖化可在较高的温度如 68°C 进行, 这样可很大程度避免染菌的危险^[21]。

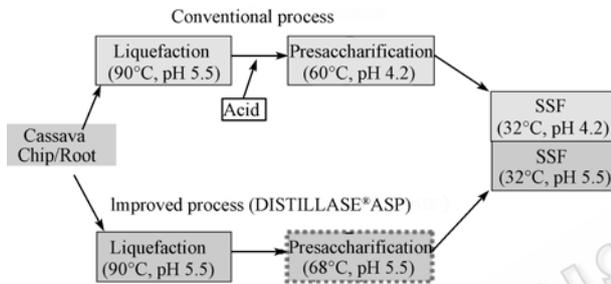


图 7 UNI-pH 过程在木薯究竟生产中的示意图
Fig. 7 Process for ethanol production using UNI-pH process from cassava.

2.2.2 木质纤维素和酒精的生产

从木质纤维素来生产酒精或其他化学品是当今最热的话题之一。无论从科学上、技术方面还是工程的角度, 全世界都面临着巨大的挑战。

木质纤维素主要由纤维素(33%~51%)、半纤维素(19%~34%)、木质素(21%~32%)、少量灰分(0%~2%)和其他(1%~5%)等组成。由木质纤维素类原料生产酒精的方法很多, 基本上可归纳成两条路线: 生物化学、热化学^[22]。热化学的方法可分成两类, 化学催化和生物发酵。两种方法的最初步骤都是首先要通过气化装置把纤维素类生物质转化成 CO、CO₂ 和 H₂ 等中间气体。化学法是采用化学催化剂来合成酒精; 而生物发酵法则需要(或不需)这些气体在经过化学反应进行整合, 生成合成气, 整合后的合成气进入发酵设备通过细菌的作用转化成乙醇。以

下将重点讨论利用酶制剂来水解的生物化学法。

1) 预处理过程: 生物化学的方法就是大家较熟悉的纤维素水解发酵工艺。这种方法主要分为 4 个步骤: 粉碎和预处理、酶解、发酵和蒸馏脱水。首先要对原料采取不同的方法进行预处理, 预处理的目的是使酶或酸可以有效地进行水解纤维素, 如果木质纤维素类原料不经过预处理, 酶水解的转化率一般都低于 20%。处理后, 在酵母或其他菌的作用下发酵成乙醇。

因为不同的预处理方法对下面的酶水解会有相当大的影响, 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。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-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。预处理的目的是为了提高酶水解的效率, 不同的预处理的过程对纤维素、半纤维素和木质素的改变不同。从酒精生产的角度来讲, 浓酸法、湿法氧化法和有机溶剂法虽然很有效, 但是可以说操作费用太高^[23]; 微生物法从现在的研究结果来看, 速度太慢。有希望的是稀酸法、热水法、AFEX、氨循环渗透法和碱法。具体哪种方法更合适, 很大程度上决定于原材料的组成和操作条件, 如何配合酶水解及下游的发酵系统。详细的讨论可参考有关文献^[24-25]。

2) 酶水解和糖化发酵过程: 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。与酸或者碱相比较, 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°C~50°C)完成, 而且不会有腐蚀问题。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内切β-葡聚糖酶(EC3,2,1,4, endoglucanases), 简称 EG I-IV, 属于内切酶, 作用于纤维素大分子的内部, 随机切割β-1,4-葡萄糖苷键, 随机产生短链分子, 产生的小分子可以被下面介绍的 CBH 所作用。②外切β-葡聚糖酶(EC3,2,1,91, cellobiohydrolases), 也叫微晶纤维素分解酶, 简称 CBH 酶, 又分为两大类: 一

是 β -1,4-葡聚糖葡萄糖水解酶 CBH I, 作用于纤维素分子链的非还原性末端, 切割 β -1,4 键, 产物是葡萄糖。二是 β -1,4-葡聚糖纤维二糖水解酶 CBH II, 同样作用于纤维素分子链的非还原性末端, 但产物是纤维二糖。③ β -1,4 葡萄糖苷酶(EC.3,2,1,21)又称 BGL 酶, 可水解纤维二糖和短链寡糖成葡萄糖。这几种纤维素酶的作用方式见图 8。

在最常用的里氏木霉(*Trichoderma reesei*)中 CBH I 约占 60%, CBH II 约占 20%, 而 EG I-IV 占约 15%, 水解纤维二糖的 BGL 则少于 5%。因为 BGL 的含量很低, 因此会造成水解过程中纤维二糖的积累, 而纤维二糖又对其他酶的水解有抑制作用, 因此, 要改变这种情况就要想办法提高 BGL 的活力。

除了上述提到这 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 -木聚糖酶、半乳糖甘露聚糖酶和葡甘露聚糖酶等。此外, 除了上述提到的纤维素和半纤维素酶外, 最新的研究^[26]表明: 添加果胶酶和阿魏酯酶(Feruloyl esterase)会增加半纤维素和纤维素的转化。各酶的作用位置见图 9。

3) 糖化过程/发酵工艺:

① 分步水解发酵 (Separate hydrolysis and fermentation, SHF)。该工艺是水解和发酵在不同的反

应器中进行。早期的工艺多采取这种方法, 因为其流程比较简单。过程的主要问题是若采用酶法水解, 反应最初产生的葡萄糖和木糖对酶的抑制作用很大, 因此水解的速度逐渐下降, 最终水解的程度低。

② 同步糖化发酵工艺 (SSF)。此过程是在同一容器中同时加入纤维素酶和发酵菌, 使纤维素酶半纤维素酶水解生成的葡萄糖、纤维二糖和木糖发酵成乙醇。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和纤维二糖对酶的抑制作用。

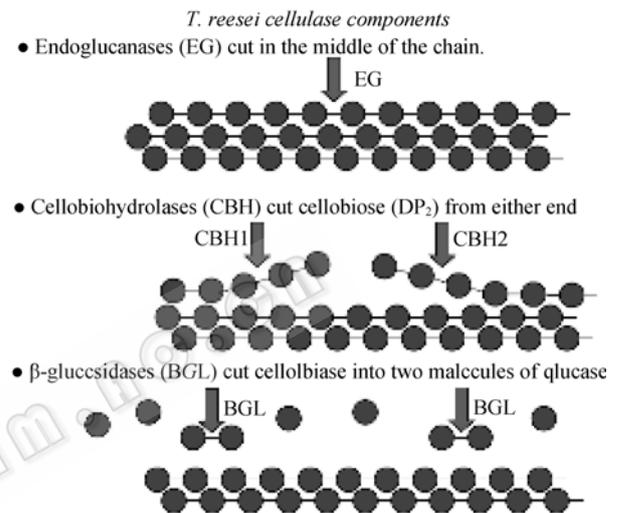


图 8 不同纤维素酶的作用特点
Fig. 8 Working patterns of different cellulases.

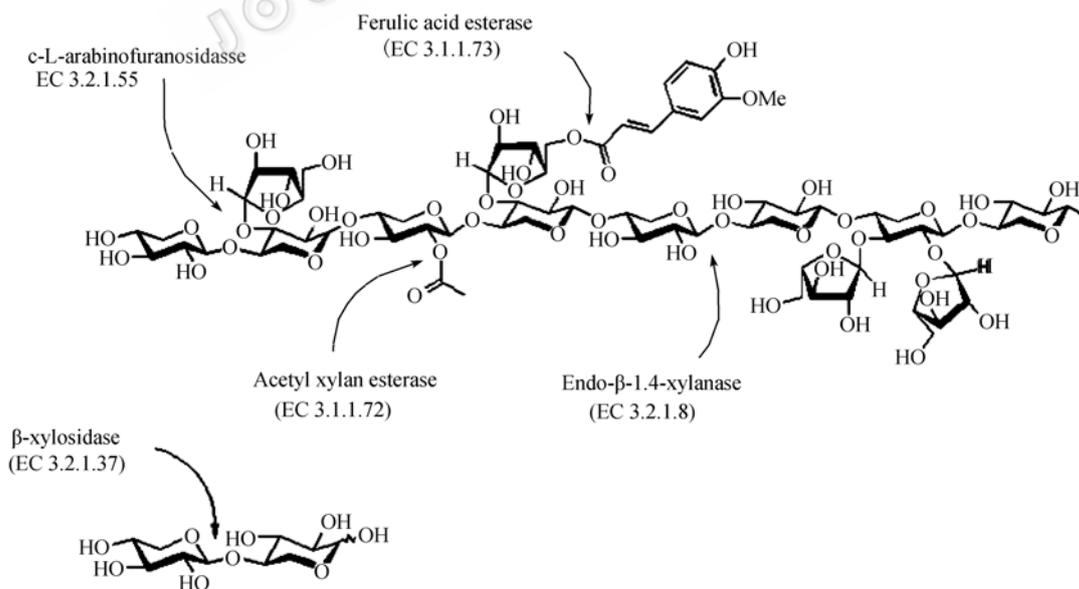


图 9 各种半纤维素酶分解半纤维素的作用位置
Fig. 9 Working patterns of different hemicellulases and esterases.

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; 酶的用量比较少; 产品的产量比较高; 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; 生产时间比较短; 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。SSF 工艺的缺点有: 纤维素酶解和发酵温度的矛盾, 纤维素的酶水解最适温度为 45°C, 而发酵菌则适合在 30°C~40°C 温度范围内工作; 受微生物对于乙醇浓度的耐受性限制; 纤维素酶的活性被乙醇所抑制。解决这个问题一个方法就是进行非等温发酵。

另外, 现在的发酵菌基本上还不能做到既利用五碳糖又利用六碳糖, 或至少还没有商业化的来源。因此, SSF 法仍然存在木糖的抑制。因此一种衍生的 SSF 就是同步糖化共发酵法 (Simultaneous saccharification and co-fermentation, SSCF), 即加入可以利用木糖的菌株进行混合发酵。

③复合水解发酵工艺 (Multiple hydrolysis and fermentation, MHF)。复合水解工艺试图避免前面提到的 SHF 和 SSF 的缺点, 产品抑制和低温下酶活低的问题。先在较高的温度下糖化一段时间, 待系统经过快速反应, 产生一定量的葡萄糖, 冷却后发酵。这种做法被广泛接受。

此外, 众所周知现有的工业上使用的酒精酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 基本上不能利用半纤维素水解生成的五碳糖。通常, 微生物代谢木糖有两种途径: 细菌一般采用由木糖异构酶 (Xylose isomerase, XI) 催化的一步途径; 而酵母菌中发现的通常是涉及木糖还原酶 (Xylose reductase, XR) 和木糖醇脱氢酶 (Xylitol dehydrogenase, XDH) 的两步反应。木糖被转化成木酮糖后, 再被木酮糖激酶 (Xylulokinase, XK) 催化磷酸化为木糖-5-磷酸, 并进而通过磷酸戊糖途径和糖酵解 (Embden-meyerhof, EMP) 途径, 或在运动发酵单胞菌 *Z. mobilis* 中为 ED (Entner-doudoroff) 途径, 进一步降解。利用木糖和其他非发酵糖的发酵菌株构建的代谢工程研究很多, 可参考关于这方

面的综述^[27-28]。

值得一提和思考的是: 虽然很多的努力用来研究发展不同的微生物来发酵酒精, 但相对来说, 发酵的速度比水解的速度快, 因此是纤维素酶水解成为整个过程的限速步骤, 而并不是发酵。

如表 2 所示, 与由淀粉质原料生产酒精的用酶量相比, 纤维酒精生产中纤维素酶的用量要多出 50~200 倍, 再加上纤维素酶/半纤维素酶是相对比较贵的酶 (与淀粉酶相比)。从表中可看出明显的添加量的差别, 这就是纤维酒精过程与谷物酒精的生产相比, 其中酶制剂成本如此昂贵的主要原因。

表 2 玉米和秸秆生产酒精的产率和酶制剂用量的比较
Table 2 Comparison of enzyme dosages for ethanol production using corn and corn stover as feedstocks

| Feedstock | Ethanol productivity (Gallon/t DS) | Enzyme dosage, (g/gallon) |
|-------------|------------------------------------|---------------------------|
| Corn | 114 | 1 |
| Corn stover | 72 | ~200 |

4) 纤维素酶研究进展: 世界范围内有很多研究者在努力降低纤维素酶的成本。以集传统筛选和现代分子生物学的高通量筛选等手段选育高产纤维素酶、木质素酶菌种; 利用工业蛋白质工程来改造酶的性质。酶制剂以后的具体研究方向有: 增加酶的热稳定性; 增加酶的专一性; 水解速度更快; 改善纤维素酶和半纤维素酶与其他酶活力之间协同作用, 以期发挥各种酶的最大活力, 从而降低成本; 减少酶的产品抑制; 增加酶对酒精的耐受力; 减少和低物非有效的结合/作用。

要通过酶工程来提高酶的性质最重要的是要找到一个有效的、可预测的酶分析或筛选的方法, 使得酶的性质向希望的方向改变。然而, 这对纤维素酶来讲是特别困难的, 因为底物的非均相性, 如细胞壁的存在。这对于涉及大量筛选的直接进化 (Direct evolution) 和合理设计 (Rational design) 技术, 甚至重新构建新的纤维素酶来讲, 使用可溶性的底物筛选并不是很成功。有效的筛选和选择必须使用物理和化学上都与工业上相关的底物, 然而这一点目前显然很难做到。因为不溶性底物又使大量筛选变得非常困难。不溶的纤维素的非均相性、不溶性

底物之间的动态作用、纤维素酶不同部分之间的竞争/协同作用限制了这些根据活力来筛选的方法。这也是现阶段纤维素酶研究速度受到限制的主要原因。Zhang 等建议使用不溶性纤维素底物,采用连续培养的方法,作为一种有效的工具来从细胞表面中表现出大量不同的纤维素酶活力来富集有用菌株^[29]。

正因为挑战难度之大,美国能源部才投资支持杰能科国际公司、大学和研究所的科学家,研制开发从木质纤维原料中转化酒精的生物技术。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。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,酶的成本降低了20倍,而且还超过了此前的目标,因此酶制剂的成本问题已经不再是工业化的主要阻碍^[30]。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。

2008年,美国能源部DOE再次资助杰能科等4个公司3380万美元进一步发展纤维素转化有关的酶。这次的目标是发展商业上切实可行的酶制剂来生产纤维乙醇。这个资助也要求参加的公司至少要拿出与赞助额同样的资金来加强项目的研究,因此项目的总体投资至少会达到6800万美元。

在完成了美国能源部任务不久,杰能科又推出了ACCELARASE复合纤维素酶。该酶是第一个商业化的纤维酒精专用酶,是一种包含许多酶活力的复合酶,专为木质纤维水解而制作;除了含有内切和外切 β -葡聚糖酶、半纤维素酶外,还有活性较高的 β -葡萄糖苷酶,快速水解纤维二糖,产生更多的葡萄糖;未经纯化的产品;提高了热稳定性,因而在较高的温度下糖化;简单的配方,减少了糖化过程中因为酶的配方而可能对碳水化合物或发酵过程分析的干扰。

ACCELARASE作为第一个商业化的复合纤维素酶,对未来纤维酒精的发展和工程设计有着很重

要的意义。

国内河南天冠与浙江大学、山东大学(斜卧青霉的抗阻突变株)等合作在固态和液态发酵生产纤维素酶、纤维二糖酶、木聚糖酶等方面取得了相当的进展,吨乙醇的酶制剂成本降低到了1500元/吨左右。中国科学院过程工程研究所设计了可实现纯种培养100 m³纤维素酶的固态发酵反应器及其配套技术和设备。使用该反应器,以汽爆玉米秸秆为发酵的主要原料生产纤维素酶,缩短了发酵时间且提高了纤维二糖酶的活性^[30-31]。

5) 纤维素酒精工业化的挑战:从前面的谈论来看,要从木质纤维类原料生产酒精,虽然有一定的技术和小规模的中试厂结果,但迄今为止,还没有一个商业化的运营厂。除了酶制剂的成本和效率外,还有其他几个原因,归纳如下:固定资产投资太高,特别是预处理的反应器;技术都没有在大规模上验证过,工程设计有问题;酒精是大宗产品,价值不高;需在瓶颈问题上有重大技术突破,比如预处理和发酵菌;同时这些过程的集成也非常重要;投资回报不确定;原料的季节性和分散性的难题。

另外,值得指出的一点:木质纤维素的加工,不只能着眼于酒精,要把这个过程变成一个生物精炼厂(Biorefinery),这样才会有竞争力,且减少对环境的不良影响,达到真正的可持续发展^[32]。

总之,未来新型酶制剂的发展方向应是:有好的pH稳定性而减少过程中pH的变化、提高热的稳定性而使反应加快,使得催化/发酵过程的效率提高、减少副产物、减少化学品的消耗、降低能耗、简化操作过程和环境友好等。随着市场的扩大和需要,工业酶制剂的种类也会越来越多越专业化以适应不同类型的反应。此外,除了商业化的酶制剂外,全细胞催化随着代谢工程等技术的发展,从生物质发酵生产化学品成功的例子,如杰能科生产的1,3丙二醇和生物异戊二烯等。

最后,引用世界经合组织OECD2009年报告中的一个关于未来化学品生产的预测和生物过程所占的比例及增长供大家思考,见表3^[2]。

表 3 世界生产化学品的价值预测: 2005、2010、2025 年(10 亿美元)

Table 3 Projected value of world chemical production: 2005, 2010, 2025 (USD billions)

| Chemical sector | 2005 | | 2010 | | 2025 | |
|-----------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|-------------|--------------------|
| | Total value | Biobased share (%) | Total value | Biobased share (%) | Total value | Biobased share (%) |
| Commodity | 475 | 0.2 | 550 | 0.9–2.0 | 857 | 5.8–10.0 |
| Specialty | 375 | 1.3 | 435 | 20–25.3 | 679 | 44.2–50.1 |
| Fine | 100 | 15.0 | 125 | 20–25.6 | 195 | 45.1–50.3 |
| Polymer | 250 | 0.1 | 290 | 5.2–10.3 | 452 | 10.0–19.9 |
| All chemicals | 1200 | 1.8 | 1400 | 9.4–13.1 | 2183 | 22.1–28.1 |

Pharmaceutical excluded (Adapted from OECD 2009).

REFERENCES

- [1] Hao XM, Wu GQ. Bioethanol from non-grain substrates// Chinese Society of Biotechnology. Progress Report of Biotechnology in China. Beijing: Chemical Press, 2008: 166–187.
郝小明, 武国庆. 非粮生物乙醇. 中国生物工程学会, 中国生物技术产业发展报告, 2007, 北京: 化学工业出版社, 2008: 166–187.
- [2] OECD. The Bioeconomy to 2030. OECD, Paris, 2009.
- [3] Bommarius AS, Riebel BR. Biocatalysis. Weinheim: Wiley-VCH, 2004.
- [4] Saha BC, Jordan DB, Bothast RJ. Enzymes, Industrial in Encyclopaedia of Microbiology. 3rd ed. Elsevier, 2009.
- [5] Duan G, Liu ZD, Shetty J. Effect of glucose isomerase on fructose production. *J Henan Ind Univ*, 2005, 26(5): 85–88
段钢, 刘钟栋, Shetty J. 葡萄糖异构化酶对果糖生产的影响. 河南工业大学学报(自然科学版), 2005, 26(5): 85–88.
- [6] Qian Y, Duan G. A new acid-stable fungal alpha amylase for maltose production. *Food Ferm Ind*, 2008, 34(2): 87–89.
钱莹, 段钢. 新型耐酸真菌淀粉酶在麦芽糖生产上的应用. 食品与发酵工业, 2008, 34(2): 87–89.
- [7] Duan G, Zhou HW, Jiang XR. Improving the quality of brewers' syrup using enzymes. *Food Ind Sci Tech*, 2005, 26(3): 86–88.
段钢, 周红伟, 姜锡瑞. 利用酶制剂提高啤酒糖浆质量. 食品工业科技, 2005, 26(3): 86–88.
- [8] Zhou, HW, Jiang XR, Duan G. Novel enzymic method for calcium gluconate production. *Food Ferm Ind*, 2007, 33(7): 99–101.
周红伟, 姜锡瑞, 段钢. 酶法生产葡萄糖酸钙的新工艺. 食品与发酵工业, 2007, 33(7): 99–101.
- [9] Zhou HW, Er YL, Jiang XR, et al. Single step for zinc gluconate production. *Food Ferm Ind*, 2009, 35(10): 77–81.
周红伟, 耳延龄, 姜锡瑞, 等. 一步酶法直接生产葡萄糖酸锌. 食品与发酵工业, 2009, 35(10): 77–81.
- [10] Jia SB, Li SX, Wu GF. New Technologies for Alcohol Production. Beijing: Chemical Industrial Press, 2004.
贾树彪, 李盛贤, 吴国峰. 新编酒精工艺学. 北京: 化学工业出版社, 2004.
- [11] Huang P, Cao JJ, Zhang XK, et al. Improvement of high gravity fermentation in fermentation alcohol industry. *Liquor Making*, 2005, (5): 108–113, 131.
黄平, 曹健君, 张肖克, 等. 应用浓醪发酵技术推动酒精行业科学发展. 酿酒科技, 2005, (5): 108–113, 131.
- [12] Duan G, Xu HX, Sun CP, et al. Technological progress on ethanol production—breakthrough brought by a new enzyme technology. *Food Ferm Ind*, 2006, 32(7): 65–70.
段钢, 许宏贤, 孙长平, 等. 乙醇生产的技术进步——新型酶技术给乙醇生料发酵生产带来的突破. 食品与发酵工业, 2006, 32(7): 65–70.
- [13] Xu HX, Duan G. Dry slide staging for fermentation ethanol. *Chin J Biotech*, 2009, 25(2): 200–206.
许宏贤, 段钢. 固态间歇补料乙醇生料发酵新工艺. 生物工程学报, 2009, 25(2): 200–206.
- [14] Duan G, Xu HX. No-cook process for ethanol using broken rice feedstock. *J Food Biotechnol*, 2008, 27(1): 95–102.
段钢, 许宏贤. 大米生料发酵酒精生产的研究. 食品与生物技术学报, 2008, 27(1): 95–102.
- [15] Kajiwara Y. Production of acid-stable α -amylase by *Aspergillus kawachi* during barley shochu-koji production. *J Ferm Bioeng*, 1997, 84(3): 224–227.
- [16] Duan G, Dunn-Coleman N, Lantero O, et al. Acid fungal protease in fermentation of insoluble starch substrates: USP 7,563,607, 2009 / EP1831386, 2008.
- [17] Duan G. No cook process for ethanol production and the engineering challenges. *Biotechnol Business*, 2009, A4: 19–24.
段钢. 生料发酵生产酒精和其中的工程问题. 生物技术产业, 2009, A4: 19–24.
- [18] Xu HX, Duan G. Comparison of the effect of acid-protease and addition of inorganic nitrogen on alcohol fermentation. *Liquor Making*, 2006, 33: 35–38.
许宏贤, 段钢. 酸性蛋白酶与无机氮源对酒精发酵和 DDGS 影响的比较. 酿酒, 2006, 33: 35–38.
- [19] Shetty JK, Chotani G, Duan G, et al. Cassava as an

alternative feedstock in the production of renewable transportation fuel. *Int Sugar J*, 2007, **109**: 1307.

[20] Duan G, Xu, HX, Ruan ZH, *et al.* Direct conversion of fresh cassava root to ethanol. *J Food Biotechnol*, 2009, **28**(3): 413-417.
段钢, 许宏贤, 阮振华, 等. 新鲜木薯直接转化生产酒精. *食品与生物技术学报*, 2009, **28**(3): 413-417.

[21] Duan G, Shetty J. Novel enzymatic processes for ethanol production from cassava feedstock. Presentation at The 5th Intl Conf. on Starch Technology, Bangkok, September 24, 2009.

[22] Kamm B, Schneider BW, Hüttl RF, *et al.* Lignocellulosic feedstock biorefinery combination of technologies of agroforestry and a biobased substance and energy economy. *Forum der Forschung*, 2006, **19**: 53-62.

[23] Mosier N, Wyman C, Dale B, *et al.* Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 2005, **96**: 673-686.

[24] Galbe M, Zacchi G. Pretreatment of lignocellulosic materials for efficient bioethanol production. *Adv Biochem Engin Biotechnol*, 2007, **108**: 41-65.

[25] Wyman CE, Dale BE, Elander RT, *et al.* Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol*, 2005, **96**: 1959-1966.

[26] Lin Y, Tanaka S. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **69**: 627-642.

[27] Dien BS, Ximenes EA, O'Bryan PJ, *et al.* Enzyme characterization for hydrolysis of AFEX and liquid hot water pretreated distillers' grains and their conversion to ethanol. *Bioresour Technol*, 2008, **99**: 5216-5225.

[28] Bao XM, Shen Y. Strain screening for ethanol fermentation from biomass. *Biotechnol Business*, 2008, (5): 49-57.
鲍晓明, 沈煜. 植物纤维原料全糖乙醇发酵菌株选育. *生物产业技术*, 2008, (5): 49-57.

[29] Zhang YHP, Himmel ME, Mielenz JR. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. *Biotechnol Adv*, 2008, **24**(5): 452-481.

[30] Ibsen K. Technology advance in producing biobased fuels and chemicals. Presentation at Pacific Ethanol and Biodiesel Conference, Bangkok, December 2, 2004.

[31] Chen HZ. *Biotechnology of Celluloses*. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
陈洪章. *纤维素生物技术*. 北京: 化学工业出版社, 2005.

[32] Qu YB. Industrialization of lignocellulosic ethanol. *Chem Progress*, 2007, **19**(7/8): 1098-1108.
曲音波. 纤维素乙醇产业化. *化学进展*, 2007, **19**(7/8): 1098-1108.

[33] United States Department of Agriculture. *US Biobased Products: Market Potentials and Projections through 2025*. <http://www.usda.gov/oce/reports/energy/BiobasedReport2008>.



本 期 广 告 索 引

| 企业 | 版位 | 企业 | 版位 |
|-----------------|----|----------------|----|
| 东曹达 (上海) 贸易有限公司 | 封底 | 生物谷网站 | 内页 |
| 杰能科生物工程有限公司 | 封二 | 上海国强生化工程装备有限公司 | 内页 |
| 赛默飞世尔科技有限公司 | 封三 | 镇江东方生物工程公司 | 内页 |
| 美国 Promega 公司 | 内页 | 泰州贝今生物技术有限公司 | 内页 |