

文章编号: 1004-8405(2004)03-0048-07

## 纤维素稀酸水解产物中发酵抑制物的去除方法

薛 珺, 蒲 欢, 孙春宝  
(北京科技大学 环境工程系, 北京 100083)

**摘 要:** 在纤维素稀酸水解发酵制乙醇的过程中, 由于弱酸、呋喃衍生物和苯系化合物对微生物的影响, 乙醇的产量和产率都不高。针对国内对这些抑制物质的去除研究较少的现状, 重点介绍了国外去除纤维素稀酸水解产物中发酵抑制物的各种方法, 这些方法能有效地降低各种抑制物质的影响, 从而能够获得更高的乙醇产量和产率。

**关键词:** 纤维素; 酸水解; 发酵抑制物; 去除

**中图分类号:** Q939.9      **文献标识码:** A

我国是农林大国, 纤维素资源极其丰富。纤维素是通过 $\beta(1-4)$ 糖苷键结合的多糖聚合物, 经过酸或酶水解后再通过微生物, 如 *Saccharomyces cerevisiae* 发酵后就可以得到乙醇, 而乙醇是一种能再生的清洁的生物能源。因此近年来各国科学家对纤维素稀酸水解发酵制乙醇的方法进行了大量的研究, 但是乙醇的产量和产率都不是太理想, 究其原因是因为纤维素在稀酸水解的过程中产生了发酵抑制物质, 如甲酸、乙酸、糠醛、5-HMF (5-羧甲基糠醛) 和苯系化合物<sup>[1]</sup>。经过研究发现这些已知的物质大致可以分成三类: 弱酸、呋喃衍生物和苯系化合物。本文着重对去除这些抑制物的方法作较为详尽的介绍。

### 1 去除方法

早在 20 世纪 40 年代, 科学家就发现了纤维素稀酸水解产物的发酵不如单纯的可发酵糖发酵那么简单, 纤维素水解产物中存在一定的发酵抑制物质, 因此开始研究去除这些物质的方法<sup>[2]</sup>。在过去的近六十年里, 各种生物、物理和化学的方法被用来除去纤维素水解产物中的发酵抑制物质, 从而提高水解产物的可发酵性。本文对各种方法进行分类和介绍。由于不同水解产物的成分不同, 对微生物发酵的抑制程度也就不同, 而且不同的微生物对抑制物质的耐受能力也是不同的, 因此实际上当水解产物和发酵所使用的微生物不同时, 不同的去毒方法是不能严格地进行比较的。实际上, 即使不同种的 *S. cerevisiae* 对抑制物质的耐受能力也是不同的<sup>[3,4]</sup>。

收稿日期: 2004-04-22

作者简介: 薛 珺 (1979~), 男, 硕士研究生, 从事环境工程微生物研究。

## 1.1 生物去毒方法

### 1.1.1 酶处理

由于酶具有专一性,所以酶处理也只能去除特定的抑制物质。经过过氧化物酶和漆酶处理后,通过木腐菌(*Trametes versicolor*)发酵柳树的半纤维素水解产物,乙醇的产率能提高2~3倍<sup>[5]</sup>。由于漆酶处理具有选择性,能够完全去除酚单体(原水解物中含量为2.6 g/L)和石炭酸。在280 nm的吸收表明漆酶处理后仍然存在芳香化合物,而且并没有减少。但是在全波长扫描中却观察到,大分子苯系化合物转换成小分子苯系化合物因而减少。根据这些观察结果,抑制发酵的原因被认为是低分子量的苯系化合物的大量存在。

### 1.1.2 微生物处理

有的研究是把能够吸收苯系化合物的微生物作为发酵的菌种,丝状软腐菌 *Trichoderma reesei* 能够降解蒸汽预处理过的柳树半纤维素水解所产生的抑制物质,能够把乙醇的最大产率提高3倍,最大产量提高4倍<sup>[6]</sup>。与用漆酶处理的相对比,用 *T. reesei* 处理的,在280 nm处的吸收减少了30%,表明所去除的抑制物质是不同的。通过 *T. reesei* 处理,乙酸、糠醛和安息香酸衍生物被从水解产物中除去。

也有利用驯化后的微生物进行处理的报道,在一次培养<sup>[7]</sup>,续批式培养<sup>[8]</sup>和持续培养<sup>[9]</sup>中对 *S. cerevisiae* 进行驯化以适应糠醛的方法也有报道,细胞的生长和乙醇的体积产率都有所提高。有报道<sup>[10]</sup>说,通过驯化后的微生物发酵能够提高乙醇产量可能是由于合成了能使糠醛减少的酶,或者是产生了有这种作用的联合酶。有报道<sup>[11]</sup>说,当糠醛的初始浓度为2 g/L,ADH(乙醇脱氢酶)在厌氧发酵48 h后的活性提高了78%。

还有通过高接种量来提高乙醇产量的报道<sup>[12]</sup>,可能是因为水解液的这种抑制作用主要存在于发酵的初期,随着发酵的进行,抑制作用逐渐减弱,依靠细胞的繁殖弥补死亡或受到抑制的细胞的数量,从而维持一定的细胞浓度,一旦抑制物质的浓度很小后,抑制作用消除,活性细胞就大量增殖,使发酵恢复正常。

## 1.2 物理去毒方法

### 1.2.1 旋转蒸发

柳树半纤维素水解产物中最易挥发的部分(10%, V/V),通过旋转蒸发去除后,再进行发酵,最后和含葡萄糖和营养物质的参考发酵样比较<sup>[13]</sup>,发现前者的乙醇产率只是稍低于后者。在参比研究中,非挥发性部分被认为更具有抑制作用。

在用 *P. stipitis* 发酵酸水解的白杨的研究中,发现与不含抑制物质的参比样相比,使用旋转蒸发处理时,在几乎蒸干的情况下,再对残余物进行发酵,乙醇的产量从0提高到了13%<sup>[14]</sup>。这里抑制作用降低的原因被认为是,与原液相比,把乙酸、糠醛和香草醛的浓度分别降低了54%(降至2.8 g/L)、100%和29%。

### 1.2.2 萃取

用乙醚在pH为2的环境中,对具有强抑制作用的云杉水解产物进行24 h的连续萃取后,

其乙醇产量据报道能够与含有葡萄糖和营养物质 (0.40 g/g) 的参比发酵样相比<sup>[15]</sup>。乙醚萃取了乙酸、甲酸、菊芋糖酸、糠醛、HMF 和苯系化合物。将萃取物重新分散在发酵介质中后再进行发酵, 与参比发酵样相比, 乙醇的产量和产率分别下降到 33% 和 16%。在使用醋酸盐萃取时与上述报道保持一致, 使用 *P. stipitis* 发酵的水解液中, 乙酸的去除率是 56%, 糠醛、香草醛和 4-羟基安息香酸被全部除去, 乙醇产量从 0 提高到 93%。在使用乙醚萃取时发现, 低分子量的苯系化合物的抑制作用最大。再用水三次洗涤用乙醚萃取过的云杉稀酸水解产物, 又在水相中发现了发酵的抑制物质<sup>[15]</sup>, 说明还有水溶性抑制物质存在。

### 1.2.3 树脂吸附

据文献[16]报道, 通过聚合树脂 XAD-4 的吸附后, 用 HPLC 进行检测, 糠醛的浓度从原来的 1~5 g/L 降到 0.01 g/L。然后再使用基因重组过的 *E. coli* K011 种进行发酵, 这时糠醛在发酵过程中的抑制作用可以忽略。反应的速度和用同浓度的试剂纯度的糖作为发酵物质进行发酵的速度差不多, 而且乙醇产量达到了理论产量的 90%。聚合树脂 XAD-4 使用后再进行解吸, 就能够重复使用。

### 1.2.4 木炭吸附

通过特制的木炭吸附<sup>[17]</sup>也能大量除去发酵抑制物质, 杉木屑在氮气保护下, 高温中加热 1 h, 加热速率是 2 °C/min, 并且加热后要研磨成粉末状, 就制成了这种特制木屑。

经过木炭吸附处理后的水解产物和未经处理的水解产物中各种糖含量是几乎一样的。在未经处理的水解产物中葡萄糖浓度、乳糖和阿拉伯糖的总浓度、木糖浓度、半乳糖浓度分别是 6.2, 17.5, 9.4 和 3.7 g/L, 在经过 400 °C 和 1000 °C 下生产的木炭处理后, 浓度分别为 6.1, 17.3, 9.3, 3.6 g/L 和 6.2, 17.4, 9.4, 3.7 g/L。进一步的实验表明, 用经过高温 (600 °C 或 1000 °C) 处理过的木炭处理水解产物, 其开始发酵的时间要早于较低温度 (400 °C) 的木炭处理过的水解产物。实验表明, 在用经过高温 (600 °C 或 1000 °C) 处理过的木炭处理的水解产物中几乎没有检测到呋喃和苯系化合物, 这可能就是上述现象的原因。

### 1.2.5 其他物理方法

除了上述方法外, 还有沸石处理<sup>[18]</sup>、活性炭吸附<sup>[19]</sup>和阴离子交换<sup>[20]</sup>等方法, 但是这些方法在去除抑制物质的同时还会除去大量的可发酵糖, 导致乙醇的产量大幅度降低, 在此不作介绍。

## 1.3 化学去毒方法

### 1.3.1 过量碱法

通过碱处理纤维素水解产物来除去其中的抑制物质, 例如, 用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调 pH 至 9~10 (过量碱法 overliming), 再用  $\text{H}_2\text{SO}_4$  调回 5.5, 这种方法在 1945 年已经被 Leonard 和 Hajny 报道。由于通过  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节 pH 值的水解产物比用 NaOH 调节 pH 值的水解产物具有更好的发酵性, 因而被多次报道, 这可能是由于前者对抑制物质有沉淀作用<sup>[21]</sup>。与此相符的是, 用乙醚萃取过的云杉稀酸水解产物, 再用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调 pH 值至 5.5 与用 NaOH 调 pH 值至 5.5

相比,经发酵后,能得到更高的乙醇产量和产率<sup>[4]</sup>。与只用 NaOH 调 pH 值到 5.5 时比较,各种物质对杉木的稀酸水解产物发酵的抑制作用明显减弱,从而乙醇产量提高了 2 倍<sup>[4]</sup>。但是这种方法的缺点是费用太高。

在过量碱化后 (pH 值到 10),大量沉淀形成,乙醇的产量因此得到进一步提高。过量碱化能如此有效除去抑制物的原因在于其对有毒物质的沉淀作用和一些抑制物质在高 pH 值时的不稳定。

### 1.3.2 亚硫酸盐和过量碱法联用

在 20 世纪 40 年代,使用诸如亚硫酸盐的还原剂和增大酵母接种量等方法来避免所遇到的纤维素水解过程中潜在的减产问题<sup>[22]</sup>。在最近的一些研究中,Larsson 等人<sup>[23]</sup>使用了亚硫酸钠来处理杉木的稀酸水解产物,有效地降低糠醛和 HMF 的浓度。联合使用过碱化和加亚硫酸盐的方法经实验证实,对于除去要使用大肠杆菌 *Escherichia coli* 发酵的柳树半纤维素的水解产物中的发酵抑制物是最有效的方法<sup>[24]</sup>。在未经处理的水解产物中,经过 40 h 的发酵,只消耗了 24% 的木糖,然而在过碱化处理过的水解产物中则全部消耗。当在水解产物中再加入 0.1% 的亚硫酸盐并在 90 °C 加热 30 min,和只经过过碱化处理的比较,发酵时间减少了 30%。类似地,用 KOH 调 pH 值至 10,再在室温下用 HCl 和 0.1% 的亚硫酸钠的混合液调 pH 值至 6.5,这种方法被认为是用 *P. stipitis* 发酵甘蔗渣水解后的半纤维素产物的最好方法<sup>[21]</sup>。这种联合处理的方法会取得如此效果的原因可能是在于降低了 Hibbert 酮和乙醛的浓度,在加热时又将可挥发性物质除去,从而大大减少了抑制物质的浓度。

## 2 结 语

由于弱酸、呋喃衍生物和苯系化合物都会抑制纤维素水解产物的发酵,各种物质的相互负作用会使已存在的抑制作用增强<sup>[25]</sup>,抑制物质会增加发酵微生物的环境压力。微生物在可以耐受的抑制物的浓度限度内是可以继续存活的,但是一旦超过微生物耐受的极限,微生物就会死亡。前面所讨论的几种降低弱酸、呋喃衍生物和苯系化合物浓度的方法,其实质就是降低微生物环境总的压力水平。

实际上,抑制作用在通过用漆酶处理除去苯系化合物后明显减弱<sup>[5]</sup>,这表明苯系化合物在纤维素水解产物发酵的过程中是主要的抑制物质。支持这一观点的还有这样一个实验,杉木稀酸水解产物比包含弱酸、呋喃和 HMF,但没有苯系化合物的模拟发酵样具有更大的抑制作用<sup>[1]</sup>。除了酶处理外的其他方法都是通过非特定性的处理降低所有抑制物质的总浓度,或者说是压力水平,可以得到与通过特定处理方法(如用漆酶处理)去除低分子量苯系化合物取得同样的降低抑制作用的效果。最近,通过在使用同样的稀酸和杉木的水解产物,并且都用 *S. cerevisiae* 发酵的情况下,对不同的去毒方法进行了比较<sup>[23]</sup>。在这些被研究的方法中发现,在 pH 为 10 的情况下只有进行阴离子交换和过碱化处理,比用漆酶处理更能提高乙醇产量,漆酶处理和阴离子交换能去除超过苯系化合物总量的 80%,而且阴离子交换还能

去除所有甲酸、乙酸和菊芋糖酸, 70%的糠醛和 HMF。但是阴离子交换也导致了相当数量的可发酵糖的损耗, 因此阴离子交换并不是一个切实可行的方法。过碱化处理的效果在这个研究中也涉及到, 但是, 不太容易理解的是, 弱酸并没有受到影响, 总的苯系化合物的浓度也只减少了 20%, 抑制物质的浓度和用 NaOH 调 pH 值至 10 的样品中的浓度几乎没有区别, 但是过碱化就把乙醇的产量提高了几乎 3 倍。因此看来, 纤维素水解过程中还产生了尚未发现的抑制物质。

#### 参考文献:

- [1] Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, *et al.* The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood[J]. *Enz Microb Technol*, 1998, 24: 151-159.
- [2] Leonard R H, Hajny G J. Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol[J]. *Ind Eng Chem*, 1945, 37: 390-395.
- [3] Lindén T, Peetre J, Hahn-Hägerdal B. Isolation and characterisation of acetic acid tolerant galactose-fermenting strains of *Saccharomyces cerevisiae* from a spent sulfite liquor plant[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1992, 58: 1661-1669.
- [4] Palmqvist E, Galbe, M Hahn-Hägerdal B. Evaluation of cell recycling in continuous fermentation of enzymatic hydrolysates of spruce with *Saccharomyces cerevisiae* and on-line monitoring of glucose and ethanol[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1998, 50: 545-551.
- [5] Jönsson L J, Palmqvist E, Nilvebrant N O, *et al.* Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49: 691-697.
- [6] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Szegyel Z, *et al.* Simultaneous detoxification and enzyme production of hemicellulose hydrolysates obtained after steam pretreatment[J]. *Enz Microb Technol*, 1997, 20: 286-293.
- [7] Banerjee N, Bhatnagar R, Viswanathan L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1981, 11: 226-228.
- [8] Villa G P. Microbial transformation of furfural to furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Acta Biotechnol*, 1992, 12: 509-512.
- [9] Chung I S, Lee Y Y. Ethanol fermentation of crude acid hydrolyzate of cellulose using high-level yeast inocula[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1984, 27: 308-315.
- [10] Boyer L J, Vega K, Klasson K T, *et al.* The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Biomass Bioeng*, 1992, 3(1): 41-48.
- [11] Banerjee N, Bhatnagar R, Viswanathan L. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol*, 1981b, 11: 226-228.

- [12] 潘进权, 刘耘. 酸解纤维素酒精发酵的毒性问题[J]. 生物技术, 2002, 12(1): 45-47.
- [13] Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Galbe M, *et al.* The effect of water-soluble inhibitors from steam-pretreated willow on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation[J]. *Enz Microb Technol*, 1996b, 19: 470-476.
- [14] Wilson J J, Deschatelets L, Nishikawa N K. Comparative fermentability of enzymatic and acid hydrolysates of steam-pretreated aspenwood hemicellulose by *Pichia stipitis* CBS 5776[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, 31: 592-596.
- [15] Clark T, Mackie K L. Fermentation inhibitors in wood hydrolysates derived from the softwood *Pinus radiata*[J]. *J Chem Biotechnol*, 1984, B34: 101-110.
- [16] Weil Joseph R, Dien Bruce, Bothast Rodney, *et al.* Removal of fermentation inhibitors formed during pretreatment of biomass by polymeric adsorbents[J]. *Ind Eng Chem Res*, 2002, 41(24): 6132-6138.
- [17] Hisashi Miyafuji, Herbert Danner, Markus Neureiter, *et al.* Detoxification of wood hydrolysates with wood charcoal for increasing the fermentability of hydrolysates[J]. *Enz Microb Technol*, 2003, 32: 396-400.
- [18] Eken-Saraçođlu N, Arslan Y. Comparison of different pretreatments in ethanol fermentation using corn cob hemicellulosic hydrolysate with *Pichia stipitis* and *Candida shehatae*[J]. *Biotechnol Lett*, 2000, 22: 855-858.
- [19] Gong C S, Chen C S, Chen L F. Pretreatment of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate for ethanol production by yeast[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1993, 39-40: 83-88.
- [20] Nilvebrant N-O, Reinmann A, Larsson S, *et al.* Detoxification of lignocellulose hydrolysates with ion-exchange resin[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2001, 91-93: 35-49.
- [21] van Zyl C, Prior B A, du Preez, J C. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1988, 17: 357-369.
- [22] Leonard R H, Hajny G J. Fermentation of wood sugars to ethyl alcohol[J]. *Ind Eng Chem*, 1945, 37: 390-395.
- [23] Larsson S, Reimann A, Jönsson, L. Comparison of different methods for the detoxification of lignocellulosic hydrolysates of spruce[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 77-79: 91-103.
- [24] Olsson L, Hahn-Hägerdal B, Zacchi G. Kinetics of ethanol production by recombinant *Escherichia coli* KO11[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 45: 356-365.
- [25] Palmqvist E, Q Meinander N, Grage H, *et al.* Main and interaction effects of acetic acid, furfural and phydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeasts[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1999b, 63: 46-55.

(下转第 60 页)

---

## Advance in Rheological Properties and Application of Cellulose Solutions

LIN Hai-yan, LUO Xue-gang

( Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, China )

**Abstract:** The recent advancement in the research of rheological properties and application of cellulose and its derivatives is generalized. Finally the practical utilization and the prospect of cellulose are discussed.

**Key words:** cellulose; rheological properties; application

---

( 上接第 53 页 )

## Methods of the Elimination of the Inhibitors in the Lignocellulosic Hydrolysates

XUE Jun, PU Huan, SUN Chun-bao

(Department of Environmental Engineering, University of Science and Technology Beijing,  
Beijing 100083, China)

**Abstract:** In hydrolysis of lignocellulosic materials, a lot of compounds which are inhibitory to microorganisms can be formed such as: weak acids, furan derivatives, and phenolic compounds. These compounds inhibit the microorganisms growing on the hydrolysates to get more ethanol production by fermentation. So, here introduce a few advanced methods to get rid of them and optimize the fermentation strategy to get better fermentation yield and productivity.

**Key words:** lignocellulose; hydrolysis; fermentation inhibitors; elimination