

生物转化木质纤维素原料生产乳酸的研究进展

邹水洋^{1,2}, 郭祀远¹, 肖凯军¹

(1. 华南理工大学轻化工研究所, 广东 广州 510640) (2. 东莞理工学院化学生物工程系, 广东 东莞 523808)

摘要: 以木质纤维素生物原料转化生产乳酸对节约粮食、保护环境和促进乳酸产业的发展意义重大。对纤维素生产乳酸的几个技术环节: 原料预处理、酶促水解、乳酸发酵的研究进展作了概要介绍和评述。并强调提高酶解效率和降低生产成本仍是现阶段研究的主要目标, 指出各种新技术的集成与优化是加快其产业化进程的必由之路。

关键词: 木质纤维素; 生物转化; 纤维素酶; 乳酸

中图分类号: TQ92; **文献标识码:** A; **文章篇号:** 1673-9078(2008)04-0394-08

Research Progress in the Bioconversion of Lignocellulosic Biomass for Lactic Acid Production

ZOU Shui-yang^{1,2}, GUO Si-yuan¹, XIAO Kai-jun¹

(1. Light Industry and Chemical Engineering Research Institute, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)(2. Department of Chemistry and Bioengineering, Dongguan Institute of Technology, Dongguan 523808, China)

Abstract: The bioconversion of lignocellulosic biomass for lactic acid production had great meaning to saving foodstuff, protecting environment and developing lactic acid industry. The research progress of lactic acid production from lignocellulose, including the pretreatment of raw materials, the enzymatic hydrolysis and lactic acid fermentation, was reviewed. It was pointed out that the main objectives of the current researches were to improve the efficiency of enzymatic hydrolysis and reduce the production cost. The integration of new technologies was necessary for the acceleration of its industrialization.

Key words: lignocellulose; bioconversion; cellulase; lactic acid

随着世界人口的激增和世界工业规模的不断扩大, 石油煤炭等不可再生资源正在日益枯竭, 人类社会面临能源短缺、粮食危机、环境恶化等一系列严峻挑战。开发利用各种可再生资源是解决这些问题的重要途径, 正受到世界各国的高度重视。地球上每年光合作用的产物(生物质)高达100亿~500亿吨^[1], 其中木质纤维素占50%左右, 是地球上数量最大的可再生有机资源。而目前自然界的木质纤维素资源只有很小一部分得到利用, 绝大多数都被付之一炬, 不仅浪费资源而且还造成环境污染。在能源和资源的供给与需求矛盾日益突出的严峻现实下, 借助生物技术将地球上最丰富、最廉价的可再生有机资源—木质纤维素转化为附加值高的乙醇、乳酸、单细胞蛋白等生物化

收稿日期: 2007-12-21

基金项目: 高等学校博士学科点专项科研基金项目(20050561014)

作者简介: 邹水洋(1970-), 男, 讲师, 在职博士研究生

通讯作者: 郭祀远(1939-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事糖类物质的改性及生物利用研究

工产品^[2-4], 将是新世纪开发利用可再生资源的重要途径之一。

乳酸是一种重要的有机酸, 学名为2-羟基丙酸, 分子中有一个不对称碳原子, 具有旋光性, 因此有L-乳酸(右旋性), 与D-乳酸(左旋性)两种旋光异构体。其中L-乳酸能被人体完全代谢, 且不产生任何毒副作用的代谢产物, D-乳酸的过量摄入则可能引起代谢紊乱甚至导致酸中毒。乳酸在医药、食品、日用化工、石油化工、皮革、卷烟工业等领域有着广泛的应用。特别是近年来开发出的以L-乳酸为单体合成的聚乳酸^[5], 可生产易生物降解的农用地膜及其它塑料制品, 用来代替无法降解的常用塑料, 可望解决全球“白色”污染问题, 引起世界广泛关注, 应用前景非常广阔。因此, 对乳酸的生产、应用研究越来越引起人们的重视。

乳酸的生产分为发酵法和化学合成法两大类, 其中发酵法因其以可再生资源为原料、所得产品无有害物质混入、食用安全可靠而受到国内外学者的普遍重

视。目前,全世界的乳酸年产量约为20~25万吨,其中90%均选育特定的微生物用发酵法生产。但传统乳酸发酵所用的原料主要是淀粉类原料,成本较高。而且大规模工业化生产乳酸作为聚乳酸合成原料会大量消耗粮食,加剧粮食与饲料资源的紧张状况。如果能采用价廉易得的木质纤维素原料来生产,不仅能大大拓展其生产原料的来源、降低原料成本,而且对解决粮食危机和减少环境污染有积极意义,其经济效益和社会效益十分明显。

纤维素、半纤维素等碳水化合物可通过酸或酶水解转化成可发酵性糖,再进一步通过微生物发酵转化成乳酸。酸法水解需要耐酸、耐压、耐热的特殊设备,涉及试剂的回收及环保问题,同时还产生羟甲基糠醛等有毒有害物质影响微生物发酵,工业应用目前还不可行。而酶法水解由于设备简单、反应条件温和以及不污染环境等优点,被认为是纤维素资源开发利用的理想途径。本文重点评述木质纤维素生物转化生产乳酸的主要工艺环节:纤维素原料的预处理、酶促水解、乳酸发酵等方面的研究进展。

1 原料预处理

天然的纤维素生物质一般为木质纤维素,主要由纤维素、半纤维素、木质素以及少量的蜡质、蛋白质等物质构成。纤维素是植物细胞壁的主要成分,由葡萄糖以 β -1,4糖苷键连接而成的没有分支的聚合物,聚合度为500~2500,多以微晶结构存在,是一种相对惰性的物质。半纤维素是由多种五碳糖、六碳糖及葡萄糖醛酸构成的杂多糖,木聚糖是其主要成分。半纤维素分子结构上有较多的分支,枝链聚合度为100~200,比纤维素易溶解和水解。木质素是芳香族化合物通过不同取代基修饰而形成的高度不规则的三维大分子聚合物,与纤维素和半纤维素相比,木质素分子链中没有重复单元,酶解相当困难。木质纤维素这三种主要成分的含量随生物质种类不同而异(表1)^[6]。且纤维素、半纤维素、木质素通过大量的共价键、非共价键相互连接形成一种复杂的三维结构——类似于混凝土,极难降解。

基于木质纤维素的复杂结构和化学惰性特点,纤维素原料直接酶解比较困难。通过各种手段对原料进行预处理,以去除部分木质素、半纤维素或降低纤维素的结晶度、增加原料孔隙率和酶的可及度,都可以不同程度提高酶解效率。已发展的各种预处理方法可以概括为物理方法、物理化学方法、化学方法和生物酶解方法等几大类。

表1 几种常见的木质纤维素原料的组成

Table 1 Composition of various lignocellulosic raw materials

Lignocellulosic materials	质量分数/%			
	Cellulose	Hemicellulose	Liglin	Ash
Corn stover	39.0	19.1	15.1	4.3
Wheat straw	36.6	24.8	14.5	9.6
Rice straw	41.0	21.5	9.9	12.4
Rice hulls	36.1	19.7	19.4	20.1
Bagasse	38.1	26.9	18.4	2.8
Newsprin	64.4	21.7	11.0	0.4
Cotton gin trash	20.0	9.1	17.6	14.8

1.1 物理方法

通过切削、碾磨等机械作用将纤维素原料粉碎,在一定程度上破坏纤维素原料的三维结构、降低纤维素的结晶度、增加原料的表面积,使酶的可及度增加。原料颗粒尺寸越小,酶解效率越高,但相应的预处理能耗也越高^[7]。近年来,用微波、电子辐射、超声波等物理方法预处理的研究也有一些报道^[8,9],但一般都是与其它方法结合使用,虽然有一定协同效应,然而其能耗与设备投资也相应增加,经济成本还需进一步评估。

1.2 物理化学方法

水蒸汽爆破是将初步切割或粉碎的原料在密闭容器中经高温高压饱和水蒸汽加热处理,然后迅速释放压力,使原料经爆破作用破坏其三维结构,同时高温也使半纤维素和木质素发生一定程度的降解和转变。影响水蒸汽爆破效果的主要有处理温度、保温时间、原料尺寸、水分含量等因素^[10],优化的处理工艺随原料不同而异。水蒸汽爆破法的优点是耗能较少,没有试剂的回收或环境污染问题,被认为是一种性价比最好的预处理硬木和农业废弃物的方法^[11]。但该方法也存在一些缺点:如破坏了部分木聚糖(可作为某些微生物发酵生产乙醇或乳酸的原料),木质素和高分子碳水化合物的解构不完全,高温下产生了一些妨碍微生物生长、发酵的抑制物。因此,处理后的纤维素原料还需用水洗去抑制物,水洗过程会导致水溶性半纤维素的损失,损失量可达干料总量的20%~25%^[12]。

为克服水蒸汽爆破的缺陷,现在又发展了氨气爆破法^[12]及CO₂爆破法^[12-13],其处理工艺与水蒸汽爆破法类似,效果却更好。但氨气和CO₂的成本较高,氨气还需回收,其经济上的可行性有待探讨。

1.3 化学方法

化学方法是目前研究应用最多的预处理方法,采用稀酸、稀碱、氧化剂、有机溶剂等化学试剂单独或

结合作用于各种木质纤维素原料,能有效去除木质素或破坏纤维素原料的三维结构,有利于后续的酶解过程。

1.3.1 酸处理

尽管浓酸直接水解纤维素尚未实现工业化生产,但稀酸水解已成功应用于木质纤维素原料的预处理。由于预处理的酸浓度较低,必须结合高温、辐射、蒸汽爆破等方法才能达到较好的效果。一般采用0.5%~2.0%稀硫酸在110~220℃浸渍原料一定时间,并经过滤、洗涤、中和等工序制成酶解原料,这种处理能显著提高后续的纤维素酶解效率^[14]。其原理是稀硫酸在高温下使半纤维素水解释出,纤维残渣形成多孔或溶胀型结构,从而减少了物理屏障,促进了酶解效果。稀酸处理法值得注意的问题是,水解液中木糖浓度须达到较高水平才有合理利用的价值,否则只能作为废水处理,造成大量的糖类损失。此外,酸处理比汽爆法成本要高,原料还需调节pH后才可进入后续酶解工艺。除了无机酸之外,一些有机酸也被用作预处理剂^[15],但作用机理有所不同,如甲酸的作用主要是脱除木质素,而不是溶解半纤维素。

1.3.2 碱处理

用低浓度的无机碱如NaOH和氨水处理纤维素原料是较普遍采用的一种化学处理方法^[12,16,17],其处理效果主要与原料的木质素含量相关,对木质素含量较低(10%~18%)的秸秆类原料效果较明显。碱的作用主要是水解木质素与木聚糖等组分之间相连接的酯键(皂化作用),使木质素溶解脱去;此外,碱可以使原料中的纤维素得到润胀,并使纤维素的聚合度、结晶度降低。尽管NaOH水解处理是一种有效的木质纤维素预处理方法,能显著提高后续的酶解效率,但NaOH的用量过大,且会造成部分半纤维素的损失,还不太适用于工业化大生产。氨水与NaOH的作用类似,作用的浓度要高一些,但氨水处理较温和,不会造成多糖类物质的大量损失;更为重要的是氨水通过加热很容易将氨气回收,重复利用使成本大大降低。因此,氨水处理受到人们的重视^[12,17]。

1.3.3 氧化剂处理

过氧化氢、臭氧、次氯酸钠等氧化剂能去除大部分木质素,而对半纤维素破坏较少,纤维素基本不受影响。采用湿氧化、碱联合处理麦草,经170℃、5~10min的处理后,纤维素糖转化率可达到85%^[16]。用臭氧处理麦草,可除去60%的木质素,使水解率提高5倍^[18]。臭氧处理的优点是去木质素效率高,不留下残余有害物质影响下游工艺,反应在常温常压下进行,但

臭氧用量大,生产成本高。

1.4 生物方法

利用微生物来降解木质素可以在温和的环境中进行,需要的能量少,是一种很有吸引力的方法。目前已知能降解木质素的微生物有白腐菌、褐腐菌、软腐菌以及某些瘤胃微生物,其中降解能力最强且研究得最深入的是白腐菌。

用白腐菌 *Ceriporiopsis subvermispora* 和 *Cyathus stercoreus* 预处理百慕大草,6周后其生物降解率可分别提高到29%~32%和63%~77%^[19]。但白腐菌之类的木质素降解真菌还存在生长速度慢、生产周期长、木素降解酶过量表达困难等一系列问题。

白腐菌降解木质素是一个过氧化反应过程,酚过氧化物酶是其关键酶。白腐菌产生的酚过氧化物酶包括木质素过氧化物酶(LiP EC1.11.1.7)、锰过氧化物酶(MnP EC1.11.1.7)和漆酶(Laccase EC1.10.3.2)等几类,它们是白腐菌在限氮或限碳培养过程中的次级代谢产物,因而酶的产量少。因此,提高酶的产量是其实现工业化应用的关键。在液态发酵工艺中,保证白腐菌的供氧和较低的剪切力是一个难题,采用生物膜反应器和气升式生物反应器能有效提高菌丝体的稳定性及供氧的可靠性,比用机械搅拌通气培养产酶量明显提高^[6]。另外,用固态发酵法生产木质素降解酶也是一个值得注意的研究方向。

2 纤维素的酶解

纤维素的酶解是纤维素生物转化生产乳酸的关键技术,目前尚未解决的问题主要是酶解效率低,用酶量大,导致生产成本过高。为提高酶解效率,许多学者从酶与底物的性质及相互作用、酶解条件等多方面做了大量研究。

2.1 纤维素酶

纤维素酶是协同作用将纤维素催化水解最终产生葡萄糖的一组酶的总称,包括内切纤维素酶(EG, EC3.2.1.4)、外切纤维素酶(CBH, EC3.2.1.91)和β-葡萄糖苷酶(BGL, EC3.2.1.21)。EG以随机形式作用于较长的纤维素链中某一糖苷键,主要产物是纤维糊精;CBH能从纤维素链的非还原端或者还原端依次切下纤维二糖单位;BGL能水解纤维二糖和纤维寡糖生成葡萄糖^[6]。这三种组分的协同作用对彻底水解纤维素非常重要。产纤维素酶的微生物很多,细菌、放线菌和真菌的许多属都有产酶能力。但目前工业用酶的来源主要是好氧丝状真菌产生的纤维素酶,如木霉(*Trichoderma*)、青霉(*Penicillium*)、曲霉(*Aspergillus*)

等。其中以里氏木霉、康宁木霉产生的纤维素酶应用最为广泛,其优点是酶产量大、活性高,以胞外酶的形式分泌到培养基中,易于提取和使用。但木霉属的纤维素酶系组成不理想, β -葡萄糖苷酶比较缺乏^[21]。这种情况会导致纤维素酶解液中纤维二糖的积累,而纤维二糖对EG和CBH强烈的产物反馈抑制作用,是酶解过程效率低下的重要原因。通过添加外源的 β -葡萄糖苷酶或多菌混合培养产酶可改善酶系的组成,如文献报道^[20,21],里氏木霉(*T. reesei*)与黑曲霉(*A. niger*)、海枣曲霉(*A. phoenicis*)混合培养能提高 β -葡萄糖苷酶产量,从而有利于提高纤维素的酶解效率。由于木质纤维素组成成份的复杂性,使用包括纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶等多种水解酶类的混合物,对纤维素的转化有明显的促进作用^[22]。

近些年来,厌氧微生物产生的纤维素酶表现出的新奇特点吸引了人们的注意。如瘤胃微生物区系、热纤梭菌等厌氧细菌和厌氧真菌产生的纤维素酶是一些与细胞连接的表面酶,酶系的各组分以多酶复合体(cellulosome)的形式结合在一起,其酶学性质和作用特点迥异于好氧真菌产生的纤维素酶。多酶复合体能减少酶组分及中间产物的流失,使水解反应速度大大提高,因而具有很高的酶活性^[23]。但厌氧微生物生长与产酶的速度很慢,提取也较困难,目前在工业上的应用还较少。

2.2 纤维素的酶解条件

酶的催化作用是酶与底物、产物相互作用的过程,纤维素酶解糖化的速度和转化率与酶的活力、底物的性质以及产物的浓度等多个因素密切相关。

温度对酶作用过程的影响非常显著,是酶解过程要考虑的重要参数。工业纤维素酶作用的最适宜温度一般在40℃~50℃,随酶的来源不同而异。但酶的最适温度不是酶的特征常数,对具体工艺中特定的酶来说,选择最佳温度需要实验确定。如50℃常作为木霉纤维素酶的最适作用温度,比在40℃时催化效率要高很多^[17],然而受热失活的程度也严重得多,如果考虑酶的回收利用,45℃作为酶解温度可能较为合适。另外,采用同时糖化发酵法(SSF)时还须兼顾微生物的耐热性,必须选择一个折中的温度。

另一个重要的参数是pH,酸性纤维素酶的最适pH在4.8左右,中性纤维素酶在6.8左右,在乳酸研究中一般选用酸性纤维素酶,pH在4.0~6.0都可保持相对稳定^[24]。

提高酶载量会使糖化率有所提高,但不成正比,各类文献报道的酶载量大多为7~33 FPU/g 纤维素,10

FPU/g 纤维素是较多实验研究采用的剂量。

2.3 底物及酶解助剂

纤维素原料的理化性质,如纤维素的聚合度、结晶度、可及度等对酶解过程影响很大。结晶的纤维素对酶作用有很强的抗性,半纤维素、木质素、蜡质等成分构成的物理屏障也是影响酶解效率的重要因素。对原料进行各种预处理的实质就是改善其理化性质,使易于酶解。木质纤维素不溶于水,酶解反应是一个多相反应,底物较难达到饱和状态。然而,原料载量过高反而会降低酶解效率,其原因是原料中的木质素等杂质与纤维素酶的无效吸附,有部分酶会转变成不可逆吸附导致酶的失活,这是酶钝化的原因之一^[25]。

加入一些表面活性剂可降低溶液的表面张力,改变纤维素的表面特性,使无效吸附的酶容易洗脱下来,增加有效吸附的机率,减少不可逆吸附引起的失活。文献报道的主要是一些非离子型表面活性剂^[26,27],如Tween80、Tween20等能缩短酶解时间和增加产糖量。

2.4 产物反馈抑制与去除措施

随着水解液中小分子糖类如葡萄糖、纤维二糖的增加,产物抑制效应越来越强烈,酶解过程也越来越困难。

减轻产物反馈抑制的常用方法有改善酶系组成和去除抑制物。在里氏木霉纤维素酶中添加外源 β -葡萄糖苷酶^[28]可有效转化纤维二糖,提高糖化效率,但对葡萄糖引起的反馈抑制还需其它方法才能解决。采用超滤可同时去掉葡萄糖、纤维二糖,但工艺变得复杂,同时增加了设备投资及运行费用。在酶解糖化时加入特定微生物将葡萄糖、纤维二糖等转化成乳酸,即同时糖化发酵法,是目前流行的方法,但也面临糖化与发酵的温度、pH不一致的问题。还有研究表明,乳酸在较高浓度下对酶及微生物也有较强反馈抑制效应,只是在较低浓度下比葡萄糖、纤维二糖的抑制效应要小得多,这是同时糖化发酵法得以成立的原因^[29]。

3 乳酸发酵

乳酸发酵的方法可依据发酵与糖化工序之间的关系分为:分别糖化发酵法(SHF)和同时糖化发酵法(SSF)两类。其原理都是将纤维素原料酶解产生葡萄糖等可发酵性糖,再经微生物转化成乳酸。SHF法中酶解糖化和乳酸发酵分别进行,两个工序可分别采用相应的优化条件,但不能克服产物抑制问题。而SSF法由于酶解和发酵在同一生物反应器中进行,能及时除去产物对酶的阻抑,转化效率得到提高,再加上可

减少生产周期和运行费用等优点,成为当前普遍采用的方法。乳酸发酵使用的菌种主要有两类:乳酸菌和根霉菌,其发酵的特点及工艺条件有很大差别。

3.1 乳酸菌发酵

乳酸菌种类很多,一般为耐氧菌,其生长过程不需氧气,最适生长温度在30℃~50℃。在纤维素生产乳酸的研究中,较多采用德氏乳杆菌(*Lactobacillus delbrueckii*)^[28-31]进行发酵,也有采用*L. bulgaricus*^[3],*L. rhamnosus*^[32]等其它乳酸菌的。发酵温度一般在37℃~45℃,能达到较高的乳酸生产速度和乳酸转化率。但目前用于工业生产的乳酸菌一般都不能利用半纤维素的水解产物——木糖,从而增加了生产成本;另外乳酸菌的生长与发酵需要丰富的营养,培养成本较高;乳酸菌的发酵产物有时含有L-乳酸和D-乳酸两种产物,增加了分离纯化的困难。尽管如此,采用乳酸菌发酵还是比较普遍,所用纤维素原料也很广泛。Schmidt等^[30]用废纸为原料,以德氏乳杆菌产酸,对影响SSF工艺的多个因素进行了详细探讨,在原料浓度5%,酶载量25FPU/g纤维素,糖化发酵温度45℃,pH5.0的优化条件下,乳酸产量可达理论值的84%。Venkatesh^[3]用纯纤维素为原料,用里氏木霉纤维素酶进行糖化,以*L. bulgaricus*发酵产酸,结果表明SSF法的酶解效率明显高于简单糖化(SS)法。玉米芯在202℃高温自动水解预处理后作为原料,用纤维素酶和*L. rhamnosus*通过SSF法生产乳酸,动力学研究表明生产进行25小时后,酶水解成为整个工艺的限速步骤^[32]。为充分利用木糖和协调酶解与发酵温度,有人从自然界中筛选了一株耐热的杆菌*Bacillus sp.*,可在pH5.0、55℃同时糖化共发酵纤维素和半纤维素水解产物,使乳酸生产速率和生物质的综合利用率都得到提高^[33]。混合发酵比单菌发酵产酸具有明显的优势,有研究表明清酒乳杆菌、干酪乳杆菌及两菌混合发酵大豆秸杆菌酶解液所得L-乳酸的转化率分别为48.27%、56.42%和71.05%^[34]。固定化细胞或酶发酵技术在纤维素生产乳酸研究中也有重要的应用,如将固定化乳酸菌与纤维素酶解反应器(可附加β-葡萄糖苷酶固定化柱)串联,以玉米芯等为原料,通过料液的循环可实现酶解糖化与乳酸发酵的同步进行;固定化的乳酸菌可多次重复使用,降低了生产成本;通过添加β-葡萄糖苷酶和采用分批加料的措施可进一步提高乳酸产率和浓度^[28,35]。

3.2 根霉发酵

根霉属的一些菌种能将淀粉和小分子糖类发酵产生乳酸,其中米根霉作为生产乳酸的菌种近十多年来被

广泛研究应用。米根霉是好氧菌,其发酵类型属混合酸发酵,由EMP途径生成丙酮酸,然后进入三羧酸循环,副产物是丙酮酸、延胡索酸或其他一些有机酸^[36],生长发酵的适宜温度在28~35℃。其优点是培养过程对营养要求很低,粗生快长,不易污染;所产L-乳酸纯度高;能产生高活性的淀粉酶、果胶酶至少少量纤维素酶。由于米根霉是中温性微生物,在SSF法中采用的温度一般不能超过35℃,与纤维素酶的最适作用温度45℃~50℃相距较大,以致酶解糖化效率较低。

近些年来,也有不少研究者对米根霉在木质纤维素生产乳酸中的应用进行了一些探索。如用米根霉和纤维素酶将办公废纸通过SHF法生产乳酸,乳酸的转化率和生产速度分别为59%和16.3l/d,并发现木糖能抑制产酸速度,而较低的乳酸转化率则与纸浆中的某种未知化学物质有关^[37]。用聚氨酯泡沫吸附固定米根霉菌丝,在三相流化床中对葡萄糖、木糖以及木糖渣的纤维素酶解液等不同碳源进行L-乳酸发酵,结果表明,固定化菌丝发酵乳酸至少可以重复12批,乳酸的平均转化率可保持在70%以上^[38]。Miura等用嗜热头孢菌(纤维素酶生产者)与根霉MK-96-1196(乳酸生产者)混合培养,直接转化玉米芯生产乳酸,在未添加任何纤维素酶制剂的情况下,从100g/l未经处理的粗原料生产了24g/l L-乳酸^[39]。笔者认为,利用一些纤维素酶生产菌与乳酸生产菌混合培养,直接转化纤维素生产乳酸是一个新的发展方向,值得进一步研究。

3.3 糖化与发酵动力学

在纤维素生物转化生产乳酸的过程中,酶促反应及微生物发酵动力学的研究是掌握其生产过程有关规律的重要方法,建立恰当的数学模型对高效生物反应器及工艺流程的设计有重要的指导作用。不少学者对纤维素的酶解以及乳酸发酵的动力学做过较深入的研究。

Philippidis等^[40]从纤维素酶解反应的机理及葡萄糖、纤维二糖的竞争性抑制作用出发,详细探讨简单糖化过程的动力学,建立了由一系列微分方程组成的数学模型,能较好地模拟实验过程,但该模型在本质上还是非机理性的启发式模型^[40]。Venkatesh^[3]在此基础上结合乳酸生长的结构模型发展了SSF法的动力学模型^[3],其主要特点是:酶促反应模型符合Michaelis-Menten方程,而乳酸发酵模型呈现Leadeking-Priret方程($q_p = \alpha\mu + \beta$)的特征。Leadeking-Priret方程在乳酸发酵模型研究中经常被采用并不断改进,这类模型共同的特点是能较准确模拟发酵产酸过程,但计算非常复杂。由于纤维素的酶解涉及多种

酶的协同作用及酶的吸附与解吸、失活与抑制、中间产物的形成与转化等复杂情况,对糖化与发酵过程进行全面的机理性研究极为困难。因此,在具体实验中一些经验模型的推广具有现实意义,如 Moldes 等^[15]采用 Caminal 提出的糖化经验模型:

$$-\frac{dc_i}{dt} = \frac{r_m \cdot c_i}{k_m \left(\frac{1+c_b}{k_i} \right) + c_i} \dots\dots\dots (1)$$

和Mercier提出乳酸发酵经验模型:

$$\frac{dP}{dt} = P_0' \cdot P \cdot (1 - P/P_m) \dots\dots\dots (2)$$

通过实验数据的回归求得有关参数,应用于实践也能较好重现 SHF 过程^[15]。在研究 SSF 动力学特征时也可采用简单的经验模型:

$$X = \frac{X_\infty \times t}{t + \tau} \dots\dots\dots (3)$$

$$C_t = \frac{C_{\max} \times t}{t + \tau} \dots\dots\dots (4)$$

(3) 式中: X —实验条件下 t 时刻纤维素的转化量, X_∞ —反应时间无限长时纤维素的理论转化量, τ —50%的纤维素转化时所需的反应时间; (4) 式中: C_t —实验条件下 t 时刻的乳酸浓度, C_{\max} —纤维素全部转化时的乳酸浓度, τ —50%的纤维素转化时所需的反应时间。 X_∞ 和 C_{\max} 可由初始实验条件通过理论计算获得, τ 值在特定实验条件下为常数,可通过实验数据的回归分析得出。这个经验模型形式上和 Michaelis-Menten 方程一致,对实验过程进行预测时,可获得偏差小于 10%的效果。

4 结语

尽管国内外众多研究者对纤维素原料的生物转化生产乳酸这一课题做了大量研究,并取得多方面进展,但离工业化还有一定距离。其根本问题是纤维素酶效率低、用量大,导致生产成本过高。因此,提高酶解效率和降低生产成本仍是现阶段研究的主要目标。

目前国内外许多研究存在一个误区——即为了提高纤维素的酶解糖化率不惜大量使用纤维素酶制剂。事实上,纤维素原料的酶解糖化率与酶载量并不成正比,如酶载量从 7 FPU/g 纤维素增加到 25 FPU/g 纤维素,乳酸的转化率从 56.9%增加到 72%,似乎 25 FPU/g 纤维素才是最适宜酶载量^[30],但仔细分析会发现,酶载量增加了 2.6 倍,而乳酸产量仅增加 15.1%,这在经济上是很不合算的。因为木质纤维素原料成本很低廉,而纤维素酶制剂却很昂贵,有人估算酶制剂成本约占乳酸生产总成本的 60%~70%^[39],这已经超过了纤维素原料节约的成本。因此,笔者建议在计算

糖化率和乳酸的转化率时,不应以原料为基础,而应以纤维素酶活力单位为基础,即每单位酶活产生多少克糖或乳酸,这才能真正反映生产效率的高低。但这样可能产生另外一个问题:酶载量过低,导致发酵液乳酸最终浓度过低,又会增加产品分离提纯的费用。因此,如何选择适当的酶载量需要综合多方面的因素来评估。

总之,提高酶解效率和降低酶解成本是实现纤维素生产乳酸工业化的关键,需要从纤维素酶的生产、木质纤维素原料的预处理、酶解糖化与乳酸发酵技术等多方面开展系统研究,才可能达到目标。本领域出现的一些新的研究成果,如纤维素酶高产菌的成功选育以及耐高温的乳酸菌、固定化酶及固定化细胞技术、混合培养和新型生物反应器等不断发展,让我们看到光明的前景。但纤维素生产乳酸是由多个环节组成的系统工程,而各种技术创新相对来说是零散的,要加快其产业化进程,必须对各种新技术加以集成与优化,并将优化工艺路线放大到一定试验规模上评价其经济可行性,如此得出的结论才更切合于实际生产。

参考文献

- [1] 刘娜,石淑兰.木质纤维素转化为燃料乙醇的研究进展[J].现代化工,2005,25(3):19-24
- [2] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review[J]. Bioresour Technol, 2002, 83: 1-11
- [3] Venkatesh K V. Simultaneous saccharification and fermentation of cellulose to lactic acid [J]. Bioresour Technol, 1997, 62: 91-98
- [4] Yang S L, Wu M, Ning S, et al. Studies on co-fermentation waste of agriculture industry with microorganisms to produce protein[J]. 中山大学学报(自然科学版),2003,42 (suppl): 115-117
- [5] Tuominen J, Kylma J, Kapanen A, et al. Biodegradation of lactic acid based polymers under controlled composting conditions and evaluation of ecotoxicological impact [J]. Biomacromolecules, 2002, 3: 445-455
- [6] Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol[J]. Journal of Biotechnology, 1997, 56:1-24
- [7] Cadoche L, López G D. Assesment of size reduction as a Preliminary step in the production of ethanol from lignocellulosic wastes[J]. Biol. Wastes,1989,30:153-157
- [8] Zhu S, Wu Y, Yu Z, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of microwave/alkali pre-treated rice straw to

- ethanol[J]. *Biosystems Engineering*, 2005, 92: 229-235
- [9] 李松晔,刘晓非,庄旭品,等.棉浆粕纤维素的超声波处理[J].*应用化学*,2003,20(11):1030-1034
- [10] Duff S J B, Murray W D. Bioconversion of forest products industry waste cellulose to fuel ethanol: a review[J]. *Bioresour Technol*, 1996, 55:1-33
- [11] Clark T A, Mackie K L. Steam explosion of the soft-wood *Pinus radiata* with sulphur dioxide addition. I. Process optimization [J]. *J Wood Chem Technol*,1987,7: 373-403
- [12] Mes-Hartree M, Dale B E, Craig, W K. Comparison of steam and ammonia pretreatment for enzymatic hydrolysis of cellulose[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988,29: 462-468
- [13] Zheng Y Z, Lin H M, Tsao G T. Pretreatment for cellulose hydrolysis by carbon dioxide explosion [J]. *Biotechnol Prog*, 1998, 14: 890-896
- [14] Soderstrom J, Pilcher L, Galbe M, et al. Two-step steam Pretreatment of softwood by dilute H₂SO₄ impregnation for ethanol production[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2003, 24: 475-486
- [15] Moldes A B, Alonso J L, Parajó J C. Cogeneration of cellobiose and glucose from pretreated wood and bioconversion to lactic acid: a kinetic study [J]. *J Biosci Bioeng*, 1999, 87: 787-792
- [16] Bjerre A B, Olesen A B, Fernquist T. Pretreatment of wheat straw using combined wet oxidation and alkaline hydrolysis resulting in convertible cellulose and hemicellulose[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 49: 568-577
- [17] Xu Z, Wang Q, Jiang Z, et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2007,31:162-167
- [18] Vidal P E, Molinier J. Ozonolysis of lignin improvement of in vitro digestibility of polar sawdust[J]. *Biomass*,1998, 16(1):1-17
- [19] Akin D E, Rigsby L L, Sethuraman A, et al. Alteration in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispora* and *Cyathus stercoreus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, 61:1591-1598
- [20] Gutierrez-Correa M, Portal L, Moreno P, et al. Mixed culture solid substrate fermentation of *Trichoderma reesei* with *Aspergillus niger* on sugar cane bagasse [J]. *Bioresour Technol*, 1999, 68: 173-178
- [21] Wen Z, Liao W, Chen S. Production of cellulose/β-glucosidase by the mixed fungi culture *Trichoderma reesei* and *Aspergillus phoenicis* on dairy manure[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40: 3087-3094
- [22] Beldman G, Rombouts F M, Voragen A G J, Pilnik W. Application of cellulose and pectinase from fungal origin for the liquefaction and saccharification of biomass[J]. *Enzyme Microb Technol*, 1984, 6: 503-507
- [23] Bayer E A, Chanzyt H, Lamed R, et al. Cellulose, cellulases and cellulosomes [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 1998, 8:548-557
- [24] 郑亚平,余晓斌.碳源对绿色木霉 ZC 产纤维素酶的影响[J].*无锡轻工大学学报*,2003,22(2):30-33
- [25] Converse A O, Matsuno R, Tanaka M, Taniguchi M. A model for enzyme adsorption and hydrolysis of microcrystalline cellulose with slow deactivation of the adsorbed enzyme[J]. *Biotechnol Bioeng*, 1988, 32: 38-45
- [26] Alkasrawi M, Eriksson T, Börjesson J, et al. The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 33: 71-78
- [27] Wu J, Ju L K. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition [J]. *Biotechnol Prog*, 1998, 14: 649-652
- [28] Shen X, Xia L. Lactic acid production from cellulosic waste by immobilized cells of *Lactobacillus delbrueckii* [J]. *World J Microbiol Biotechnol* 2006, 22:1109-1114
- [29] Iyer P V, Lee Y Y. Production inhibition in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose into lactic acid [J]. *Biotechnology Letters*, 1999, 21: 371-373
- [30] Schmidt S, Padukone N. Production of lactic acid from wastepaper as a cellulosic feedstock[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1997, 18:10-14
- [31] Tanaka T, Hoshina M, Tanabe S, et al. Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation [J]. *Bioresour Technol*. 2006, 97: 211-217
- [32] Rivas B, Moldes A B, Dominguez J M, et al. Lactic acid production from corn cobs by simultaneous saccharification and fermentation: a mathematical interpretation [J]. *Enzyme and Microbial Technology*,2004, 34: 627-634
- [33] Patel M A, Ou M S, Ingram L O, et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of crystalline cellulose and sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate to lactate by a thermotolerant *Acidophilic Bacillus* sp. *Biotechnol. Prog.* 2005; 21:1453-1460