

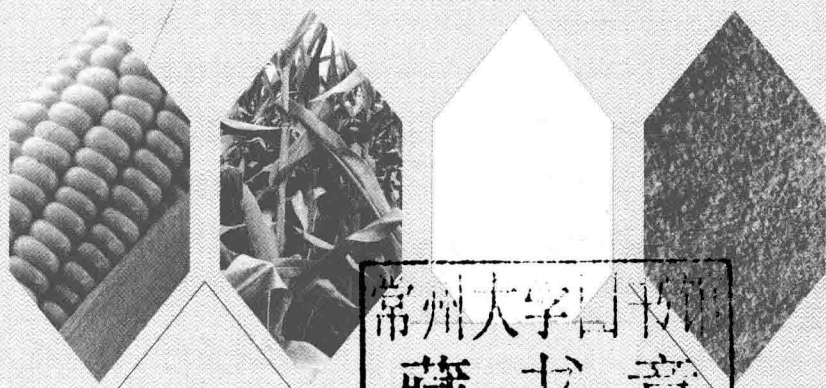
木质纤维素全糖生物 转化生产大宗化学品

凌宏志◎著



木质纤维素全糖生物 转化生产大宗化学品

凌宏志◎著



常州大学图书馆
藏书章

黑龙江大学出版社
HEILONGJIANG UNIVERSITY PRESS

图书在版编目 (CIP) 数据

木质纤维素全糖生物转化生产大宗化学品 / 凌宏志
著. — 哈尔滨: 黑龙江大学出版社, 2016. 7
ISBN 978-7-81129-994-6

I. ①木… II. ①凌… III. ①纤维素—化学加工—生
产工艺 IV. ①TQ352.6

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 066548 号

木质纤维素全糖生物转化生产大宗化学品

MUZHI XIANWEISU QUANTANG SHENGWU ZHUANHUA SHENGCHAN DAZONG HUAXUEPIN

凌宏志 著

责任编辑 肖嘉慧
出版发行 黑龙江大学出版社
地 址 哈尔滨市南岗区学府三道街 36 号
印 刷 哈尔滨市石桥印务有限公司
开 本 720×1000 1/16
印 张 16.25
字 数 211 千
版 次 2016 年 7 月第 1 版
印 次 2016 年 7 月第 1 次印刷
书 号 ISBN 978-7-81129-994-6
定 价 49.00 元

本书如有印装错误请与本社联系更换。

版权所有 侵权必究

目 录

第 1 章 概述	1
1.1 木质纤维素资源概述	2
1.2 燃料乙醇概述	14
1.3 木糖醇概述	24
第 2 章 玉米芯稀硫酸水解动力学模型的构建	30
2.1 实验材料与方法	30
2.2 结果与分析	39
2.3 讨论	57
第 3 章 热带假丝酵母发酵玉米芯半纤维素水解液生产 木糖醇	60
3.1 实验材料与方法	60
3.2 结果与分析	66
3.3 讨论	79
第 4 章 表达 β -葡萄糖苷酶基因酿酒酵母工程菌株的 构建	85
4.1 实验材料与方法	85
4.2 结果与分析	123
4.3 讨论	156

第5章 重组酿酒酵母同步糖化发酵生产乙醇	162
5.1 实验材料与方法	162
5.2 结果与分析	165
5.3 讨论	169
附录	171
附录 1	173
附录 2	176
附录 3	179
附录 4	181
附录 5	182
参考文献	230
后记	251

第1章 概述

随着化石能源的逐渐枯竭,人们越来越重视对新能源的开发和利用。木质纤维素资源是自然界中含量最为丰富的可再生资源,利用木质纤维素资源生产生物乙醇(作为生物燃料)是新能源开发利用的重要组成部分,其不仅能够减少“温室气体”的排放,还可以解决传统的利用粮食作物生产乙醇所带来的“与人争粮”的问题。当前以木质纤维素为原料生产生物乙醇的主要问题是,由于在生产过程中添加了相应的工序和成本较高的生物酶,所以生产成本远高于基于传统原料的乙醇生产过程。另一个问题是利用木质纤维素中的半纤维素部分发酵生产乙醇难度较大。对以木质纤维素原料生产乙醇的全过程进行经济性评价发现,五碳糖的有效利用对提高整个过程的经济性非常重要。因此可将五碳糖转化为其他附加值更高的产品,使以木质纤维素为原料生产生物乙醇更具可行性,而利用生物法将木糖转化为木糖醇就是一个比较可行的方案。

本书选用玉米芯作为研究对象,其是我国及世界主要粮食作物玉米的副产物,因此玉米芯是一种典型的木质纤维素原料,也是将来生产生物燃料的主要原料。本书应用数学建模方法、数理统计方法、发酵工程技术、分子克隆技术等系统研究了玉米芯全纤维素转化为可发酵糖的过程;优化了利用微生物发酵五碳糖(主要是半纤维素中的木糖)生产木糖醇的过程;构建了能够通过同步糖化发酵法高效转化玉米芯纤维素生产乙醇的工程菌株,并对工程菌株的分泌机制进行了研

究。其旨在阐明玉米芯全纤维素转化生产木糖醇和乙醇的整个过程中的各关键问题及解决方案,并揭示以木质纤维素为原料生产生物乙醇的又一可行路线,同时,为进一步开发以玉米芯为原料生产有用产品的方法提供基本信息和理论基础。此领域和方向的研究,可促进我国经济的可持续发展,为我国农业及相关产业的结构调整发挥重要作用,具有重要的科学理论意义和生产实际意义。

1.1 木质纤维素资源概述

生物质原料按其含有的主要成分可分为3大类:含蔗糖的原料(例如,甘蔗、甜菜、甜高粱和水果),含淀粉的原料(例如,玉米、高粱、小麦、大米、马铃薯、木薯和大麦)和木质纤维素原料(例如,木材、农业生产废弃物)。当前,生物质转化生产各种产品研究的一个焦点,就是如何利用年生成量远高于粮食作物的木质纤维素原料来进行生物转化生产,特别是利用木质纤维素作为原料生产乙醇更是研究热点。

1.1.1 木质纤维素资源的类型和特点

木质纤维素原料依其资源的类型可分为4类:

- ①木材资源(落叶树、针叶树等);
- ②城市固体废弃物;
- ③废纸;
- ④农作物废弃物(玉米秸秆、玉米芯、稻草等)。

在地球上每年通过生物圈的作用可形成大量的生物质,其中,90%是木质纤维素。木质纤维素原料的形成过程是植物通过光合作用系统将太阳能以化学键的形式储存在植物组织中,同时吸收温室气体(CO_2)将其转化为化合物的形式存储在木质纤维素中。该过程是地球生物圈碳循环的一部分,并且所形成的化合物是能量大量储存的

一种形式。因此,为获取能量直接燃烧植物组织并不会增加大气中 CO_2 的净含量,但化石燃料燃烧所释放的 CO_2 是远古时代(主要指中生代和古生代时期)储存于植物中的,其会使大气中的 CO_2 的净含量增加,从而形成“温室效应”。

1.1.2 木质纤维素的化学组成和理化性质

木质纤维素原料的化学结构是影响生物转化生产的关键因素。不同木质纤维素原料由于受自身遗传特性和种植环境因素的影响,其结构和化学组成有很大的不同。一个典型的木质纤维素原料的化学组成是:碳 48%,氢 6%,氧 45%,无机物占很小的比例。

木质纤维素原料主要由 3 种聚合物构成:纤维素大概占总重的 40%~50%,半纤维素 20%~35%,木质素 15%~25%。木质纤维素中还有一些次要的聚合物,包括淀粉、果胶等。低分子量的抽出物多为苯酚化合物、萜类物质、脂肪和脂肪酸等(Demirbas, 2008)。表 1-1 显示了一些木质纤维素材料的主要成分构成比例。

表 1-1 各种木质纤维素材料主要成分构成比例(%)

材料	纤维素	半纤维素	木质素	灰分	抽提物
草	25~40	25~50	10~30	—	—
硬木	22~40	20~38	30~55	0.8 ± 0.2	5 ± 3
软木	18~38	15~33	30~60	0.8 ± 0.2	4 ± 2
玉米秸秆	39~47	26~31	3~5	12~16	1~3
稻草	37~41	27~32	12~15	11~14	7 ± 2
报纸	40~55	25~40	18~30	—	—

1.1.2.1 纤维素

纤维素是自然界提供给生物生存最大量、最重要的物质。人们对

纤维素的研究开始于 1838 年 Payen 由植物组织中分离得到纤维素。他通过对纤维素的基本分析得到了组成纤维素的 3 种主要元素的比例:碳 44.4%、氢 6.2% 和氧 49.3%,根据经验这种比例构成相当于分子式 $C_6H_{10}O_5$,而这一分子式恰好又是葡萄糖去掉一分子 H_2O 后的分子式形式。Payen 定义纤维素是基于葡萄糖聚合而成的聚合物,是淀粉的异构体,这一定义与现今我们认同的纤维素构成定义有一些相似之处。这一定义后来又经多次修改,并且纤维素这一术语又被用于更多的难以水解的碳水化合物,有时还在纤维素之前加一些前缀,如 Cross 和 Bevan 纤维素, α -纤维素等。 α -纤维素在高浓度氢氧化钠溶液(17.5%)中不能溶解,而 β -纤维素能够在碱性溶液中溶解并在较低的 pH 值条件下形成沉淀, γ -纤维素被定义为能够在中性溶液中溶解的纤维素。

纤维素是由 β -D-葡萄糖通过 β -D-1,4-糖苷键结合而成的线性同聚多糖,是 2 个葡萄糖分子之间通过 C_1 上的半缩醛羟基和 C_4 的醇羟基脱去一分子的 H_2O 后缩合而成的。纤维素分子完全都是线性的,分子间和分子内氢键的作用使纤维素结构特别牢固。因此纤维素分子都是成束聚集在一起形成微纤维的,而微纤维中纤维束又是由排列十分规律的结晶和排列不规律的无定形区组成的,大约 50 个纤维素单元聚集成直径为 $10 \sim 30 \mu\text{m}$ 的纤维素纤维。纤维素结晶有 4 种不同的晶形,分别称为纤维素 I、纤维素 II、纤维素 III 和纤维素 IV。纤维素 I 是自然界中纤维素的存在形式。纤维素 I 是由 10 000 到 14 000 个葡萄糖苷残基聚合而成的,而且纤维素 I 是不溶于水的。纤维素包含无定形区和结晶区。5 个不同的假设理论被用来解释纤维素的结构,这 5 个理论分别是胶束结构理论、水晶结构理论、二级结构理论、胶束网络结构理论和纤维素微粒理论。

像所有其他的碳水化合物一样,纤维素里的羟基也容易发生化学反应,尤其是 C_2 、 C_3 、 C_6 上的羟基。醚、酯、硫酸盐、硝酸盐、乙酸和磺酸盐都可以形成一些工业上的纤维素衍生物。在造纸工业中纤维素

的水解和氧化是至关重要的,而这一从生物质到糖类的转化称为剥皮反应。在碱性纸浆中的剥皮反应结束时,纤维素上的各羟基位点已经被氧化为羰基或羧基。酸水解、碱水解和酶解是3种当前最经常使用的生物质原料的预处理方法。严格意义上来看,纤维素的单元结构应该是纤维二糖(图1-1),纤维二糖的长度是1.03 nm。早在20世纪20年代,纤维素的这种结构单元和连接形式就已经通过一些实验得到了证明。

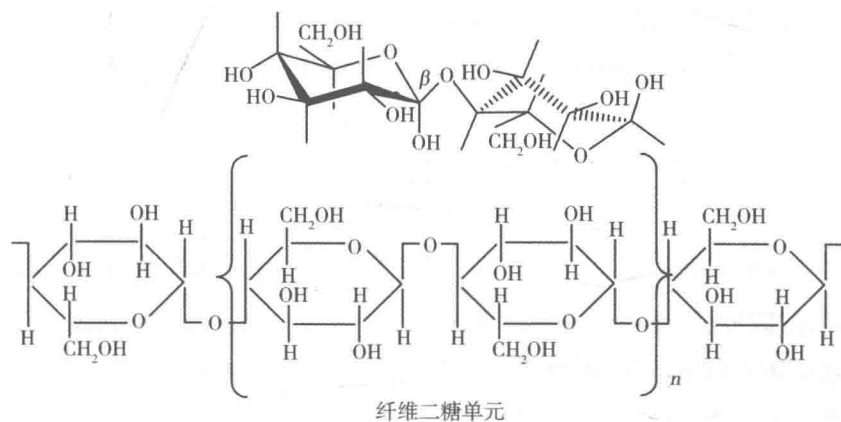


图1-1 组成纤维素葡聚糖的重复单元

1.1.2.2 半纤维素

1891年Schulze将用碱从植物中抽提出来的多糖称为半纤维素。半纤维素在植物细胞壁中连接木质素和纤维素,草本生物质中半纤维素的含量要高于木本生物质。半纤维素(或称之为聚糖)由各种单糖单元所构成,例如葡萄糖、甘露糖、半乳糖、木糖和阿拉伯糖。乙酰基团和4-O-甲基-葡萄糖醛酸也是半纤维素主要结构的组成部分。木糖和甘露糖是植物半纤维素中最重要的组成糖,而且它们经常以木聚糖和甘露聚糖的形式存在。半纤维素以吡喃木糖为链上的基本单

元通过 1,4-糖苷键连接,聚合程度为 50~200。同纤维素相比,半纤维素的分子链较短,而且更加成束、更不规则,其耐受微生物酶解的能力远低于纤维素。

1.1.2.3 木质素

木质素是一个三维空间无定形的分子,是以苯酚-丙烷为亚单位构建成的芳香族聚合物。木质素的各单元连接方式为醚键连接、芳环间的碳碳键连接。相对于纤维素和半纤维素,木质素是一种不可溶物质,通过温和的化学处理过程不能使其分解为小分子物质。在木质纤维素中,半纤维素加上木质素为纤维素微纤维提供了一个保护屏障。

1.1.3 木质纤维素资源的预处理

利用木质纤维素材料通过生物转化的方法生产各种相应产品,需将木质纤维素原料中的纤维素和半纤维素成分转化为可利用的发酵糖后再利用微生物进行发酵。木质纤维素难以被降解为可发酵糖是利用其作为生物转化生产原料的主要障碍之一。去除这一障碍就要通过相应的技术方法对木质纤维素进行预处理,使其中纤维素和半纤维素降解为各种发酵糖。Tahezadeh 总结了理想的木质纤维素预处理方法应具备的优点:

- ①处理之后的纤维素纤维适合利用酶解法产生葡萄糖;
- ②尽量减少对纤维素的破坏;
- ③避免生成对下一步酶解和微生物发酵过程有抑制作用的物质;
- ④减少粉碎材料的能量需求;
- ⑤降低材料预处理反应器的花费;
- ⑥产生最少量的废渣;
- ⑦少消耗或者不消耗化学品。

预处理方法对于完全利用木质纤维素中的聚合糖类是至关重要

的。通常没有经过预处理的木质纤维素水解后发酵糖得率低于 20%，而经过预处理的木质纤维素水解后发酵糖得率超过 90%。

目前主要有 4 类预处理方法：化学预处理法（酸预处理法、碱预处理法、氧化剂预处理法和有机溶剂预处理法），物理预处理法（机械粉碎预处理法、高温分解预处理法和液态热水法），物理化学预处理法（蒸汽爆破预处理法、氨纤维爆破预处理法和 CO_2 爆破预处理法）和生物预处理法，它们已经被广泛应用于木质纤维素材料的预处理。然而这些方法还没有发展到在技术的可行性和经济性上都能满足工业化生产的要求。每一种木质纤维素材料的预处理方法利与弊在表 1-2 中进行了总结。

表 1-2 各种预处理方法处理木质纤维素材料的利与弊

预处理方法	优点	限制性因素或缺点
机械粉碎	降低纤维素的结晶程度	能量消耗大
蒸汽爆破	可使半纤维素降解和去除木质素；费用较低	破坏了一部分木聚糖；对木质素和聚糖之间连接破坏得不完全；生成一些对微生物生长有抑制作用的物质
氨纤维爆破	增加了纤维素暴露的表面积；在一定程度上去除了木质素和半纤维素；没有产生对下游过程有抑制作用的物质	对木质素含量较高的生物质处理效率较低
CO_2 爆破	增加了纤维素暴露的表面积；费用低；无抑制物质的形成	对木质素和半纤维素没有处理效果
臭氧分解	减少木质素的含量；不产生有毒残渣	臭氧需求量大，费用高
酸水解	能水解半纤维素得到木糖和另一些糖；改变木质素结构	费用高；对设备有腐蚀；形成有毒物质
碱水解	能够去除木质素和半纤维素；增加酶解作用面积	处理时间长；有不溶性的盐类形成并附着在木质纤维素里

续表

预处理方法	优点	限制性因素或缺点
有机溶剂溶解	能够去除木质素和半纤维素	需要特殊的反应器;费用高
高温分解	生成气体和液体产物	需高温;产生大量灰尘
脉冲电场处理	处理环境要求低;破坏植物细胞	技术还不成熟
生物降解	设备简单;能够降解木质素和半纤维素;能量消耗低	处理效率低

1.1.3.1 木质纤维素资源的化学预处理法

(1) 酸预处理法

酸预处理法是最早被研究也是研究最深入的木质纤维素预处理方法。酸预处理法的主要目的是在木质纤维素材料水解后获取糖的高产率。硫酸是应用最广泛的预处理用酸,此外磷酸、硝酸和盐酸也被用于水解木质纤维素中的半纤维素部分,使纤维素部分更有利于下一步的酶解。酸预处理法可以在较高的温度和较低酸浓度下处理木质纤维素(通常称为稀酸预处理法),或者是在较低的温度和较高的酸浓度下反应(通常称为浓酸预处理法)。稀酸预处理法最为适合农业生产废弃物的水解,像玉米芯、玉米秸秆和稻草。稀酸水解木质纤维素能够显著提高纤维素酶的酶解效率,但稀酸水解的成本相对较高。稀酸预处理法有2种基本的处理过程:

① 较低的固体加载量, 5% ~ 10% (w/w)^①, 较高的温度 ($T > 300\text{ }^{\circ}\text{C}$), 连续处理;

② 较高的固体加载量, 10% ~ 40% (w/w), 较低的温度 ($T < 300\text{ }^{\circ}\text{C}$), 分批处理(Silverstein, 2004)。

一般而言,较高的预处理温度就会在一个较短的预处理时间内获得较高的溶解木糖产率和较高的纤维素酶解率(Tucker 等, 2003)。

^① 本书中 w/w 表示质量比。

通过不同的稀酸预处理条件对不同的木质纤维素底物进行处理,其中80%~95%的半纤维素都能被还原溶解在稀酸溶液中。

近些年来,木质纤维素材料中半纤维素水解和纤维素酶水解纤维素之前的预处理大都采用的是稀酸预处理法。而在稀酸预处理法的研究中,硫酸用量低于4%的方法是研究最广泛的。稀硫酸预处理法(0.2%~2.0%硫酸)处理木质纤维素在转化过程中有3个主要的功能:

- ①水解木质纤维素中的半纤维素成分,获得单糖溶液;
- ②通过半纤维素的去除,使纤维素充分暴露出来,利于纤维素的酶解;
- ③去除在材料中可能存在的可溶性重金属成分。

尽管稀硫酸预处理法有这些优点,但这种方法也有一些显著的缺点:

- ①对处理过程中所涉及的设备有腐蚀性;
- ②酸化的处理液pH值必须要调整到中性才能用于微生物发酵;
- ③利用廉价的 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 来调节水解液的pH值会产生大量不溶性的沉淀;
- ④会形成一些对微生物发酵过程有抑制作用的物质;
- ⑤必须要去除中和过程中形成的中性盐;
- ⑥水解过程中需要较小的木质纤维素颗粒,这就先要将木质纤维素打碎。

(2) 碱预处理法

碱预处理法是指利用碱性溶液去除木质素和半纤维素上的糖醛酸类物质,这两类物质都会影响酶对半纤维素和纤维素的作用。这种处理过程相对于其他处理技术通常采用较低的温度和压力。碱处理过程通常采用常温常压的处理条件,但处理时间相对于其他方法较长。 NaOH 、 KOH 、 $\text{Ca}(\text{OH})_2$ 和 NH_4OH 是最适合被用于碱预处理法中的,而在这4种材料中 NaOH 是研究最广泛的。稀 NaOH 溶液处理木质纤维素能够使其通过膨胀增加内表面积,从而降低木质纤维素的结

晶程度,使其中的木质素和碳水化合物分离。Millet 等(1976)利用稀 NaOH 溶液处理硬木使消化率由 14% 增加到 55%,而其中的木质素含量由 24% ~ 55% 降低到 20%。但稀 NaOH 溶液处理软木类木质纤维素就没能将木质素含量降低到 26% 以下。Silverstein 等(2008)报道使用 2% NaOH 溶液,在 394 K/15 psi^① 条件下处理棉秆 90 min,棉秆中 65% 的木质素会被去除。Akhtar 等(2001)发现对不同木质纤维素采用 2% 的 NaOH 溶液进行处理还可增加这些材料的酶解糖化效率。因此,可通过碱性过氧化物处理木质纤维素的方法去除木质纤维素材料中的木质素成分,以达到增加纤维素酶解效率的目的。

(3) 氧化剂预处理法

氧化预处理法就是利用过氧化氢、过氧乙酸、臭氧或氧气在碱性条件下使木质素分解并将半纤维素溶解。臭氧分解法是利用臭氧气体破坏木质素和半纤维素的结构,以达到增加纤维素生物降解效率的目的。臭氧分解法通常在室温下进行,并且没有有毒的副产物产生。臭氧化作用已被应用在农业和森林废弃物中木质纤维素成分的去除中。臭氧分解法能够有效去除玉米秸秆中 49% 的木质素和 55% ~ 59% 的半纤维素。在一个研究中发现,用臭氧分解法处理小麦和黑麦秸秆后能够增加之后的纤维素酶解效率。但是这种方法的最大缺点就是处理的费用昂贵,这主要是因为处理过程需要大量的臭氧气体,而制造这种气体的费用是比较昂贵的。

(4) 有机溶剂预处理法

可以用有机溶剂(甲醇、乙醇、丙酮、乙烯基乙二醇、三甘醇及四氢化糠基乙醇等)对木质纤维素原料进行预处理。有机溶剂常与无机酸催化剂混合使用。通常添加酸可以提高木糖的得率,但在高温高压条件下对木质素的脱除没有明显的效果。有机溶剂预处理成本较低,但同时也存在有腐蚀性和毒性等问题,容易造成环境污染。

^① 1 psi = 6.89 kPa。

1.1.3.2 木质纤维素资源的物理预处理法

(1) 机械粉碎预处理法

木质纤维素资源能通过机械加工变为颗粒或粉末从而降低纤维素的结晶程度。机械加工所需要的能量主要取决于木质纤维素原料的特性和颗粒的最终大小,质粒越小需要的能量越高。如将硬木材料制成直径为 1.6 mm 大小的颗粒,其对能量的需求为 $130 \text{ kW} \cdot \text{h/t}$;而将玉米秸秆制成同样大小的颗粒,其能耗仅为 $14 \text{ kW} \cdot \text{h/t}$ 。研究表明大豆秸秆粉碎细度由 40 目增加到 140 目时,经酶解后所获还原糖量逐渐增加,但细度增加到 140 目以后酶解所获还原糖量增幅减小,所以木质纤维素颗粒细到一定程度后,继续粉碎只能有限地提高酶解效率。机械粉碎预处理法能耗大、成本高,但可以考虑与其他预处理方法联合使用。

(2) 高温分解预处理法

高温分解($300 \text{ }^\circ\text{C}$ 以上)预处理法是一种快速($2 \sim 15 \text{ min}$)的木质纤维素原料的预处理方法,并且可将纤维素和半纤维素以较高的转化率转化为可发酵的糖。当木质纤维素原料以高于 $300 \text{ }^\circ\text{C}$ 的温度处理时,纤维素被快速地分解为气体和焦化物残渣。Leustean(2009)用高温分解预处理法处理了 3 种纤维质废弃物(办公废纸、报纸和纸板),发现用高温分解预处理法处理后的原料在纤维素酶解的过程中能够获得较高的葡萄糖产率。

(3) 液态热水预处理法

用液态热水煮木质纤维素原料也是处理木质纤维素的方法之一,这种方法在造纸工业中已经应用了几十年。这一过程会提高五碳糖的还原比例,但也会生成一些抑制物质。这个预处理过程通常处理的温度是 $200 \sim 230 \text{ }^\circ\text{C}$,处理时间为 15 min 。木质纤维素干重的 $4\% \sim 60\%$ 会在这一过程中溶解,其中纤维素的 $4\% \sim 22\%$ 、木质素的 $35\% \sim 60\%$ 和所有的半纤维素被去除。如果在这一过程中体系的 pH 值保持在 $4 \sim 7$ 之间,则单糖的降解能达到最小程度。

1.1.1.3.3 木质纤维素资源的物理化学预处理法

(1) 蒸汽爆破预处理法(简称为汽爆法)

这种方法是通过高压饱和蒸汽在几十秒至几分钟的瞬间处理之后,立即降低压力至常压,使木质纤维素原料被爆破成渣,预处理时间和温度是影响蒸汽爆破的主要因素。相对于其他的木质纤维素预处理方法,汽爆法具有投资少、环境友好、能量利用效率高、没有有害的化学物质产生和发酵糖转化完全等特性。Prasad 等(2007)认为这种方法对木质纤维素原料中的硬木类和农业废弃物残渣处理效果最好,而对软木类木质纤维素处理效果最差。

木质纤维素原料汽爆处理的主要效果是:

- ①汽爆法可以通过增大纤维素中无定形区的结晶度来提高木质纤维素中纤维素的结晶程度;
- ②木质纤维素原料中的半纤维素成分可以容易地水解为木糖等发酵糖;
- ③能够提高木质素的去除效率。

目前又将汽爆法分为添加催化剂和不添加催化剂两种。不添加催化剂是指在不添加任何化学物质的条件下,通过高压蒸汽快速处理木质纤维素原料。Negro 等(2003)研究了不添加催化剂汽爆处理白杨,最好的汽爆处理条件是 210 °C 处理 4 min,纤维素的回收率可达到 95%,获得的纤维素经酶解得率为 60%,41% 的木糖在液相中。在汽爆过程中添加 H_2SO_4 (或 SO_2) 或 CO_2 作为催化剂会显著降低汽爆的处理温度和缩短时间,有效地提高水解效率,降低有抑制作用化合物的产生,能够完全地去除半纤维素。 H_2SO_4 是半纤维素水解最有效的催化剂,但是也容易产生抑制性物质。Ballesteros 等(2006)采用酸催化汽爆小麦秸秆进行生物乙醇的生产,其纤维素残渣用于生物乙醇生产的转化率可达理论转化率的 80%。这种方法可以间歇操作也可以连续操作,并且无环保或回收费用,但一次性投资较高。