

纤维素酶在燃料乙醇工业中的应用研究进展

景春娥,赵旭,常思静,薛林贵

(兰州交通大学化学与生物工程学院,甘肃 兰州 730070)

摘要: 现代社会面临着严重的能源危机,发展燃料乙醇作为化石燃料的替代品已经成为国际上的共识。归纳了燃料乙醇生产原料选择方面的关键问题,总结了微生物直接转化、同步糖化发酵、糖化发酵二段法以及固定化细胞发酵等生物转化方式的主要研究进展,在此基础上对我国利用纤维质原料生产乙醇的研究前景进行了展望,旨在为开展同类工作提供理论依据。

关键词: 燃料乙醇; 纤维素酶; 应用; 研究

中图分类号:Q814;TS262.2;TS261.4

文献标识码:A

文章编号:1001-9286(2009)03-0098-05

Research Progress in the Application of Cellulase in Fuel Ethanol Industry

JING Chun-e, ZHAO Xu, CHANG Si-jing and XUE Lin-gui

(College of Chemical and Biology Engineering, Lanzhoujiaotong University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: We are facing serious energy crisis now and the development of fuel ethanol as a substitute for fossil fuels has become an international consensus. In this paper, the key issues on the selection of raw materials for fuel ethanol production were discussed and the research progress in consolidated bio-processing, simultaneous saccharification and fermentation (SSF), separate hydrolysis and fermentation (SHF) and immobilized cell fermentation was summarized. In addition, the development of using cellulose materials to produce ethanol in China was reviewed, so as to provide theoretical evidence for conducting similar study in the future.

Key words: fuel ethanol; cellulase; application; research

燃料乙醇,指没有添加变性剂的、可以作为燃料使用的无水乙醇,它具有和矿物质相似的燃烧性能。燃料乙醇添加变性剂后,与无铅汽油按一定的比例混配,可以形成一种新型绿色燃料:乙醇汽油,即用90%的普通汽油与10%的燃料乙醇调和而成。与汽油燃料相比,纤维素乙醇燃料可减少86%的温室气体排放,最多可减少96%。因此,目前关于燃料乙醇的开发和研究在国内外都受到了高度重视,各国政府都出台相应措施以实现能源的再生^[1]。目前的研究主要集中在以下几个方面:就乙醇生产原料方面,传统的方式是以玉米等粮食作物为主的生产。但是,在温室气体排放方面,纤维素乙醇燃料比传统的粮食乙醇燃料更环保。目前,坚持利用边际性土地、与生态恢复相结合发展能源作物的原则。大量的种植木质原料可以解决生产燃料乙醇原料的问题,而且能源作物种类筛选及品种改良至关重要。就转化过程而言,预处理方法的优化以及纤维素酶成本的降低和效率的提高是生产生物质乙醇的关键。就发酵方式而言,统合生物工艺即直接用微生物转化是最理想的发酵方式。本文对适合于规模化生产的主要原料,微生物直接转化、同步糖化发酵、糖

化发酵二段法、固定化细胞发酵做了综述。

1 适合规模化生产的原料选择

生产燃料乙醇,一种是采用淀粉质原料,另一种是采用糖质原料。淀粉质原料有薯类和谷类等农副产品,以美国为代表采用的是玉米为原料的生产方式。糖质原料主要有甘蔗和甜高粱等农副产品,以巴西为代表采用的是甘蔗为原料的生产方式。目前,以玉米为原料生产乙醇在世界乙醇发展中占主导地位。但是用玉米生产乙醇对食品和饲料价格的上升有一定影响,引发了诸多争议,并且替代石油的潜力有限,因此,国际各相关科研机构积极开发新的原料资源,使生物燃料更加完善和可行。不仅考虑如下几个方面:①农业废弃物,如麦草、玉米秸秆、玉米芯、大豆渣、甘蔗渣等;②工业废弃物,如制浆和造纸厂的纤维渣、锯末等;③林业废弃物;④城市废弃物,如废纸、包装纸等,而且种植有效生产乙醇的木质原料。

1.1 甜高粱

高粱具有高效、高产、耐干旱和适合边际性土地种植、生长期短、种植投入低等特性而成为潜力巨大的能源

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30870384);甘肃省自然科学基金资助项目(No.3ZS0512-A25-058)。

收稿日期:2008-12-24

通讯作者:薛林贵,男,教授,研究生导师,E-mail:xuelg@mail.lzjtu.cn。

作物,尤其是甜高粱,既能生产高粱米用于食品和饲料,又能在茎秆中产生糖用于生产乙醇。因此,甜高粱制取生物乙醇技术研究成为生物燃料行业的焦点。根据我国的实际情况,大规模发展以玉米为原料的燃料乙醇有一定难度。而我国拥有数千万公顷的盐碱地,通过改良用来种植甜高粱^[2]。国内已自主研发了甜高粱茎秆转化燃料乙醇的技术,并在黑龙江、山东、新疆、内蒙等省区进行了甜高粱种植以及燃料乙醇生产试点,但其转化为乙醇的技术需要进一步改进才可进行商业化生产试验^[3]。河北省农林科学院2005年育成的早熟甜高粱新品种——能饲1号、能饲杂1号,示范区内出现了每667 m²产秸秆7000 kg、糖锤度最高达22° Brix的高产典型^[4]。王莹^[5]等介绍了甜高粱原料保藏、发酵制取乙醇的高效菌株选育、酵母细胞固定化、发酵条件优化、产业化开发与副产物综合利用等甜高粱茎秆乙醇发酵技术的研究与应用进展情况。在美国休斯敦召开的高粱生物燃料国际会议上李十中教授的“甜高粱秆先进固体发酵技术”被认为是实现高粱生物燃料商业化和可持续生产生物燃料的关键技术途径之一^[6]。从目前的研究状况可知,甜高粱替代玉米生产乙醇势在必行。

1.2 海藻

海藻是生产生物燃料最有前途的来源之一。与食品类作物或纤维素材料相比,某些海藻可自然地产生和集聚,并可在生长过程中通过吸收利用氮氧化物和二氧化碳而净化废物,有助于碳封存和减缓气候变化。以色列海洋生物技术公司的科学家研发出一种利用海藻制造生物燃料的新方法。他们将发电厂产生的二氧化碳输入海藻池,不仅净化了环境,也为海藻提供了充足的营养。研究显示,每单位面积海藻产生的生物质能,要比传统的生物燃料作物高得多,且不含毒素,可生物降解^[7]。美国国际能源公司于2007年11月初宣布启动“海藻变油”研发计划,将从完全基于海藻的光合产物生产生物质燃料。国际能源公司利用专有的微海藻,自然地使CO₂和水光合成为液态烃类,并且按可再生的当量石油计,油量积聚可高达其生物质的30%^[8]。因此,海藻很可能成为今后最有发展前途的生物质燃料之一。但是,到目前为止大规模使用海藻生产燃料乙醇的试验很少。

1.3 盾叶薯蓣

盾叶薯蓣是薯蓣科,薯蓣属多年生缠绕草本植物,是我国提取甾体激素类药物原料薯蓣皂甙元的主要植物。甾体激素类药物是仅次于抗生素的第二大类药物,随着其不断开发应用,盾叶薯蓣被广泛研究和种植。盾叶薯蓣除含有1.1%~16.15%的薯蓣皂甙元外,还含有45%~50%的淀粉和40%~50%的纤维素及其他有利用价值的成分,以其中的淀粉和纤维素为原料发酵生产乙醇,既有很高的经济效益,又具有很好的环境效应。楚德强^[9]等

研究了盾叶薯蓣发酵生产乙醇的液化、糖化及发酵工艺条件。结果表明,盾叶薯蓣的淀粉利用率为97%,淀粉出酒率为53.5%,最终酒精度为7.8%vol。

1.4 柳枝稷

柳枝稷是禾本科,多年生丛生型禾草,耐旱、耐高温、排水不良的土壤环境。由于能够从柳枝稷中提炼出乙醇,所以其有“能源草”的称谓。美国研究认为,柳枝稷具有很高的生物产量,而且在水土保持和草地改良方面具有优势,是其本土最具前景的能源作物。1992年美国建立了18个大田试验点,种植了8个柳枝稷品种。美国能源部资助了柳枝稷遗传育种研究,培育的第一个品种为Shawnee,其他品种将于近10年陆续审定。中国农业大学程序教授于2005年专程赴美考察能源作物,引进了Shawnee和Trailblazer 2个品种,并在我国北方开始了试种^[10]。中国农业大学资源与环境学院教授胡林等专家完成的一份研究报告显示,如果能把适合种植的361万公顷荒地用于种植生物乙醇能源植物,每年潜在的生物乙醇产量可达1100万t,可替代当今中国汽油消费的23%。研究表明,为了提高发酵性糖类的产量,对柳枝稷的预处理是必需的,预处理后,水解产生的葡萄糖的产量从70%上升至90%,木糖产量从70%上升至100%,发酵后乙醇产量从72%达到了92%的理论最大值^[11]。

2 纤维素糖化发酵方式

植物纤维原料生产乙醇主要工序为:预处理、水解糖化和发酵。而又以预处理和水解糖化最重要,它直接影响乙醇的产率。预处理的目的是除去木质素和半纤维素,降低纤维素的结晶度以及提高基质的孔隙率。预处理方法主要有物理法、化学法(湿氧化法、稀酸法等)和生物法。常见的水解糖化方法主要是酸水解。酸水解可以直接将纤维素水解产生单糖,也可以作为酶水解的预处理方法。从现有的技术水平看,采用温和的酶水解技术更具前景。酶水解法转化纤维类物质成为乙醇的过程通常包括4步生物催化的反应:纤维素酶生产、纤维素水解、己糖发酵和戊糖发酵。根据这些生物反应被组合的程度,工艺过程变化很大。

2.1 统合生物工艺(CBP)

统合生物工艺(CBP)以前被称为直接微生物转化(DMC)工艺^[13],可将纤维素酶生产、水解和发酵组合在一步里完成。自然界中的某些微生物如*Clostridium*、*Monilia*、*Fusarium*、*Neurospora*等都具有直接把生物质转化为乙醇的能力。研究最多的是用热纤梭菌,它是嗜热产芽孢的严格厌氧菌,能分解纤维素,并能使纤维二糖、葡萄糖等发酵。目前看来,它是将纤维素直接转化为乙醇的最有效菌种。

2.1.1 CBP所需菌株的选育

可以通过代谢工程途径进行:①使用能降解纤维素的微生物,如热纤梭菌作为出发菌株,进行末端产物(乙醇)代谢途径的代谢工程选育;②使用发酵产物的得率和耐性都已经过考验的成熟菌株。Ingram 等将欧文氏菌(*Erwinia*)的2种内切葡聚糖酶的基因克隆到能生产乙醇的克雷伯氏菌(*Klebsiella*)中,使该菌配合真菌纤维素酶发酵纤维素生产乙醇,产率增加了22%。但微生物直接产生乙醇也存在以下问题:碳水化合物发酵不完全,乙酸、乳酸、氢的形成导致乙醇产率低;纤维素发酵速度慢,容积生产力低;终产物乙醇和有机酸对细胞有相当大的毒性^[12~13]。

2.1.2 高效纤维素降解菌的筛选及纤维素酶的应用

目前,人工接种纤维素降解菌,已从接种单一菌种向接种混合菌种发展。纤维素的混合菌发酵是自然界纤维素分解转化的人工模拟。混合菌直接发酵,能解决酒精产率不高和有机酸等副产物的存在问题。已研究过的能在共培养体系中增加乙醇产量的微生物有嗜热厌氧杆菌、嗜热硫化氢梭菌、嗜热解糖梭菌等。Hogsett 等利用嗜热解糖梭菌和热纤梭菌直接转化纤维质为乙醇方面作了研究,能提高乙醇产量^[14]。

以秸秆为原料进行燃料酒精的生产,在目前许多关键科学问题尚未完全解决,其中如何针对秸秆组成特点,实现秸秆纤维素高效糖化以及消除在后续工艺中原料和产物间的相互抑制是两个极为重要的关键问题。冯玉杰等^[15]筛选出了1株产酶稳定的纤维素分解菌。采用纤维素分解菌和酵母菌混合菌种发酵工艺,进行秸秆燃料酒精试验研究,有效消除了纤维素分解菌的产物反馈抑制及高糖分对酵母发酵的抑制作用,发酵后酒精产量为16g酒精/100g秸秆。赵小蓉等^[16]试验研究,发现6株菌中产黄纤维单胞菌和康氏木霉分解纤维素类物质的能力比较强,真菌与细菌一起接种时,分解纤维素类物质的速度明显高于其中任何一个单一菌株,说明纤维素类物质的分解需要多种微生物的联合作用。高建民等^[17]从含有大量纤维素物质的堆肥里分离到一株土曲霉 *A. terreus* M11,其最适生长温度为45℃,最适生长酸碱度为pH 2.0,在最适条件下培养该菌的最高CMCase活性可达3.680 IU/mL,并且此酶具有较高的热稳定性和pH稳定性。因具有嗜热嗜酸和高产纤维素酶的特性,在城市垃圾尤其是酸性环境下的垃圾处理中具有很大的应用价值。刘长莉等^[18]对一组具有分解纤维素和农药林丹双重功能的复合菌系NSC-7的培养特性和稳定性进行了探讨,研究结果发现,NSC-7在5d和14d分别分解稻秆的44.7%和73.6%重量,且具有相当高的热稳定性,对温度的适应范围很广,因此,该菌株可以用于同步糖化发酵的工艺过程中,可以克服糖化和发酵温度不一致的缺点。杨声莲等^[19]从富集纤维素分解菌的材料中筛选出分

解纤维素能力强的中温和高温型菌株51株,经拮抗作用试验,选择相互不拮抗的菌株混合后接种。最终筛选出了一批分解纤维素能力强的菌种和7个混合菌组合,可供纤维素降解研究和垃圾、秸秆、畜禽便处理等参考。夏子芳等^[20]已实现在*E.coli*中表达的重组质粒pEtac-PA为基础,构建了pHY-PA、pBBR-PA系列质粒。在此基础上构建乳杆菌重组菌,探索重组乳杆菌的乙醇合成能力。

用酶糖化生物质原料生产乙醇,其主要的制约因素是纤维素酶的成本。可通过多种途径来降低纤维素酶的生产成本以及提高其利用效率,包括:使用廉价的木质素发酵底物,使用有效的发酵方式。柴梅等^[21]对固定化酶一些理化性质的研究表明,固定化纤维素酶的pH溶解范围与纤维素酶水解反应的最适pH值相符,其低pH值稳定性和热稳定性较好。因此,为提高纤维素酶的利用率、降低生产成本提供了一种很好的方法。我国在燃料乙醇生物转化过程的研究也取得了好的成果。中国科学院过程工程研究所陈洪章研究员项目组的专利实现了乙醇制备过程的纤维素酶解糖化-发酵-液体乙醇分离三重耦合技术,便于协调糖化发酵的最佳作用温度,调节反应器内的乙醇浓度、避免高浓度乙醇对酵母菌的抑制,同时可以保持较低的葡萄糖浓度,降低产物中糖对纤维素酶的反馈抑制作用,可制得体积分数为40%~60%的乙醇。河南农业大学利用秸秆类原料生产燃料乙醇的发酵方法专利,采用纤维素酶和木聚糖酶在45℃、pH4.5、150 r/min、液固比为15的条件下对秸秆进行双酶糖化,燃料乙醇产率达到16.7%。2006年8月山东泽生生物公司利用中国科学院过程工程研究所的专利技术,建设了国内首条年产3000t秸秆酶解发酵燃料乙醇示范工程,在利用秸秆生产乙醇的同时,还生产高附加值的低聚木糖,既克服了木糖转化为乙醇的难题,又提高了经济效益。这些技术具有我国独立的自主知识产权,取得了完整的技术工艺参数,为秸秆酶发酵万吨级乙醇工业化生产积累了经验^[22]。纤维素乙醇领域的十几个中国专利的内容都集中在糖化发酵环节的开发,没有预处理、酶和发酵菌等的专利,在实现纤维素乙醇产业化生产时,需要引进由国外专利控制的酶和发酵菌等技术,因此,我们需要开发具有我国自主知识产权的酶和发酵菌株,从而增强了燃料乙醇的市场竞争力。

2.2 糖化发酵二段法(SHF)与同步糖化发酵法(SSF)

间接法即糖化、发酵二段发酵法(SHF),它是用纤维素酶水解纤维素,收集酶解后的糖液作为酵母发酵的碳源,也是目前研究最多的一种方法。为了克服乙醇产物的抑制,必须不断地将其从发酵罐中移出,采取的方法有:减压发酵法、快速发酵法和阿尔法-拉伐公司的Bio-stile法。对细胞进行循环利用,可以克服细胞浓度低的问题。筛选在高糖浓度下存活并能利用高糖的微生物突变株,

以及使菌体分阶段逐步适应高基质浓度,可以克服基质抑制。

为了克服反馈抑制作用,Gauss等提出了在同一个反应罐中进行纤维素糖化和乙醇发酵的同步糖化发酵法。其特点是纤维素酶对纤维素的水解和酵母发酵生成乙醇在同一容器内连续进行,这样纤维素酶水解的产物——葡萄糖由于酵母的发酵不断地被利用,消除了葡萄糖浓度过高对纤维素酶的反馈抑制,这是目前最有前途的方法。在工业生产上,该法简化了设备,降低了能源的消耗,节约了总生产时间,提高了生产效率,但存在一些如糖化和发酵温度不协调等抑制因素。在纤维素酶的糖化过程中,纤维素酶的最适温度为 50°C 左右,而酵母发酵的控制温度是 $37\sim 40^{\circ}\text{C}$,解决这2个过程温度不协调的方法有:采用耐热酵母(如假丝酵母、克劳森氏酵母);进一步选育耐热酵母;耐热酵母与普通酵母混合发酵等。Wu Zhangwen采取了非等温同时糖化发酵法,很好地解决了纤维素酶这一矛盾。

在同步糖化发酵中,尽管高浓度的水不溶性固体使酶和酵母受到抑制,以及预处理材料粘度造成大量运输问题。然而,在同步糖化发酵中,水不溶性固体浓度越高,在随后的蒸馏和蒸发过程中所需要的能量越少。M. Linde等^[23]为了降低成本,采用蒸汽爆破和浓硫酸预处理后的大麦秸秆进行同步糖化发酵,目的是提高水不溶性固体浓度降低酶的使用量和酵母浓度。E. Tomás-Pejó等^[24]探讨了商业纤维素酶(Celluclast 1.5 LFG)对 *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875 生长的影响,以及在SSF过程中对乙醇产量的影响。Guido Zacchi等^[25]以预处理后的玉米秸秆水解物作为底物,对SSF和SHF生成乙醇产量作了比较。结果显示,SSF产生的量将高于SHF13%(理论上SSF为72.4%,SHF为59.1%)。预处理后的匀浆中抑制物对SHF和SSF的抑制程度不同。S. Marques等^[26]使用回收的废纸污泥转化生产乙醇,以酶转化污泥后的主要成分(纤维素和木聚糖)作为底物,采用SSF和SHF2种方式生产乙醇。使用的水解酶是由Novozym 188提供的,糖化效率达到了100%。SHF转化率略高于SSF,对应的乙醇产量为 19.6 g/L 。

2.3 固定化细胞发酵

固定化细胞发酵具有能使发酵罐内细胞浓度提高,细胞可连续使用,使最终发酵液酒精浓度得以提高等特点,常用的载体有海藻酸钠、卡拉胶、多孔玻璃等,目前,固定化细胞的新动向之一是混合固定细胞发酵。Isabella De Bari等^[27]用海藻酸钠共固定化酿酒酵母和树干毕赤酵母细胞,在实验室规模的FBR中进行混合糖的连续发酵试验,乙醇产率达到 0.396 g乙醇/g糖 。Mahesh等^[28]研究了固定化重组运动发酵单胞菌CP4(Pzb5)的玉米秸秆水解液的批式和连续乙醇发酵特性。批式固定化细

胞混合糖发酵24h后的乙醇浓度为 44.3 g/L ,乙醇产率为 0.46 g/g糖 。连续发酵过程中木糖的最大转化率为91.5%。宋向阳等^[29]以树干毕赤酵母为发酵菌株,利用海藻酸钙凝胶代替海藻酸钠,固定化酵母使用寿命明显增加。海藻酸钙凝胶耐磷酸盐能力是海藻酸钠凝胶的3倍,总糖利用率为95.8%,乙醇得率为理论得率的92.3%,发酵稳定时间明显长于海藻酸钠固定化酵母细胞乙醇发酵的稳定时间。季更生等^[30]采用以 15.0 g/L 木糖和 30.0 g/L 葡萄糖混合物模拟植物纤维原料水解液作为发酵底物进行发酵,结果表明,当底物流加速度约为 60 mL/h 时,二级连续发酵液中酒精平均质量浓度为 13.79 g/L ,还原糖利用率为83.09%;当底物流加速度约为 45 mL/h 时,发酵液酒精质量浓度平均值为 15.41 g/L ,还原糖利用率为90.38%;当采用固定化技术和低pH值处理技术后,该系统在连续发酵35d的运行中从未发现“染菌”现象,发酵操作相当稳定。Yuya Yamashita等^[31]使用 *Zymomonas mobilis* NBRC13756对纸污泥生物转化为乙醇的效率做了研究。研究结果表明,*Z. mobilis*海藻酸钙固定化细胞,在分批发酵的作用方式下,从造纸废渣中生产乙醇取得了良好的效果。总之,虽然固定化细胞发酵在生产燃料乙醇方面的应用技术还不够成熟,但是,其潜在的应用价值将为生产生物乙醇过程“节能减材”。

3 结语

随着世界人口及经济的增长,能源危机在不断加剧。国际能源署(IEA)的最新数据表明,中国和印度未来十年的基本石油需求将随着人口及经济的增长翻一番。欧美各国也在加快生物燃料技术开发的步伐。纤维素乙醇发酵领域的十几个中国专利的内容都集中在糖化发酵环节的开发方面,没有预处理、酶和发酵菌种等方面的专利,因此在实现纤维素乙醇产业化生产时,需要引进由国外专利控制的酶和发酵菌等技术。因此,应该开发具有我国独立的自主知识产权的技术,从而促进我国燃料乙醇工业的快速发展。虽然我国在基于以上两个方面的研究仍落后于世界,但是,我国在纤维素酶产生菌的菌种选育及纤维素发酵生产乙醇的生产工艺方面的研究取得了可喜的成果,这将为进一步发展我国乙醇能源提供科学支撑。

参考文献:

- [1] 尤蓉.燃料乙醇的代谢工程研究进展[J].微生物学通报,2005,32(3):113-116.
- [2] 徐铨明.甜高粱制燃料乙醇前景广阔[J].产业观察,2006,(12):51-52.
- [3] 刘峰,等.积极推进我国新能源的开发和利用[J].石油规划设计,2008,19(1):8-10.
- [4] 张凤荣,李联习,王俊先.河北省发展甜高粱产业前景广阔[J].中国农业信息,2007,(5):6-7.
- [5] 王莹,张峰龙,贾茹珍.甜高粱茎汁酒精发酵研究与应用进展[J].

- 可再生能源,2007,25(1):51-55.
- [6] 夏爽.聚焦国际追捧的中国甜高粱[N].科学时报,2008-09-08(B02).
- [7] 汪元欣(责编).以色列高效利用海藻[J].农村实用技术,2008,(01):28.
- [8] 丰洋.美国国际能源公司启动“海藻变油”研发计划[J].石油炼制与化工,2008,(03):57.
- [9] 楚德强,马晓建,陈俊英.盾叶薯蓣发酵生产酒精的研究[J].酿酒科技,2007,(2):25-28.
- [10] 谢光辉,郭兴强,王鑫,等.能源作物资源现状与发展前景[J].资源科学,2007,29(5):74-80.
- [11] Deepak .R. Keshwani,Jay J.Cheng Switchgrass for bioethanol and other value-added applications: A review[J].Bioresource Technology 2009,100 ,1515-1523.
- [12] 曲音波.纤维素乙醇产业化[J].化学进展,2007 ,19 (7/8): 1098-1108.
- [13] 王凡强,许平.产乙醇工程菌研究进展[J].微生物学报,2006,46(4):673-675.
- [14] 马晓建,赵银峰,祝春进.纤维素类物质为原料发酵生产燃料乙醇的研究进展[J].食品与发酵工业,2004,30(11):77-81.
- [15] 冯玉杰,李冬梅.纤维素分解菌的筛选及用于秸秆燃料酒精发酵的试验研究[A].中国生物质能技术与可持续发展研讨会论文集 [C].2004.
- [16] 赵小蓉,林启美,孙焱鑫.纤维素分解菌对不同纤维素类物质的分解作用[J].微生物学杂志 2000 ,20 (3):12-14.
- [17] 高建民,翁海波,席宇.一株嗜热嗜酸纤维素酶高产霉菌分离鉴定及其酶学性质研究[J].微生物学通报,2007,34,(4):715-718.
- [18] 刘长莉,王小芬,牛俊玲.一组多功能细菌复合系 NSC-7 的培养特性及稳定性[J].微生物学通报,2008,35(5):725-730.
- [19] 杨声莲,李登煜,郑林用,等.混合菌在纤维素降解中的作用研究[A].第九届中国青年土壤科学工作者学术讨论会暨第四届中国青年植物营养与肥料科学工作者学术讨论会论文集 [C]. 2004.
- [20] 夏子芳,王正祥.成乙醇重组乳杆菌的研究[J].微生物学通报,2007,34(5):934-938.
- [21] 段黎萍.纤维素乙醇的专利综述与分析[J].现代化工,2008,(5):11-15.
- [22] 柴梅,袁振宏,颜涌捷.肠溶衣聚合物固定化纤维素酶性质的研究[J].微生物学通报 2007,34(3).
- [23] M.Linde, M.Galbe, G.Zacchi .Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2007, 40,100-1107.
- [24] E.Tomás-Pejoj et al, Effect of different cellulase dosages on cell viability and ethanol production by *Kluyveromyces marxianus* in SSF processes[J]. Bioresource Technology , 2008,100 ,90-895.
- [25] Guido Zacchi et al, A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover[J]. Process Biochemistry , 2007,42 ,834 -839.
- [26] S.Marques et al,Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*[J].Biomass and Bioenergy,2008,32,400-406.
- [27] Isabella D B,Daniela C,Francesco N,et al. Ethanol production in immobilized-cell bioreactors from mixed sugar syrups and enzymatic hydrolysates of steam-exploded biomass[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology,2004,113-116,539-557.
- [28] Mahesh S K,Maria B,Christopher K S,et al. Ethanol production from glucose and xylose by immobilized *Zymomonas mobilis* CP4(pzb5) [J].Applied Biochemistry and Biotechnology, 2000,84-86,525-541.
- [29] 宋向阳,徐勇,杨富国,等.海藻酸锰固定化细胞的乙醇发酵[J].南京林业大学学报(自然科学版),2003,27(4):1-4.
- [30] 季更生,勇强,余世袁.固定化酵母戊糖己糖混合连续发酵制取酒精[J].林产化学与工业,2007,27(4):71-74.
- [31] Yuya Yamashita, Akihiro Kurosumi,Chizuru Sasaki,Yoshitoshi Nakamura.Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*[J].Biochemical Engineering Journal, 2008,42 ,314-319.

(上接第97页)

- optimal process for gelatinisation and hydrolysis of highly concentrated starch- water mixtures with alpha- amylase from *B. licheniformis*[J]. Journal of Cereal Science, 2008, 47 :214-225.
- [2] Wong DWS, Robertson GH, Lee CC, Wagschal K. Synergistic action of recombinant α -amylase and glucoamylase on the hydrolysis of starch granules[J]. The Protein Journal, 2007, 26(2):159-164.
- [3] Pronpong S, Saovane D, Sittiwat L. Effect of glycation on stability and kinetic parameters of thermostable glucoamylase from *aspergillus niger*[J]. Process Biochemistry, 2005, 40 :2821-2826.
- [4] Crabb WD, Mitchinson C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars[J]. Trends Biotechnol, 1997, 15:349-352.
- [5] 郭勇,郑穗平.酶在食品工业中的应用[M].北京:中国轻工业出版社,1996.53-54.
- [6] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72 :248-254.
- [7] 张剑,张开诚,田辉,等.混合酶水解水溶性淀粉的研究[J].中国酿造,2007,167(2):23-26.
- [8] Feller G, Payan F, Theys F, et al. Stability and structural analysis of α -amylase from the Antarctic psychrophile *alteromonas haloplanctis* A23[J]. Eur. J. Biochem. 1994, 222 :441-447.
- [9] 姜锡瑞,段刚.新编酶制剂实用技术手册[M].北京:中国轻工业出版社,2002.109-113.