应用与环境生物学报 2008, **14** (6): 877~884
Chin J Appl Environ Biol=ISSN 1006-687X
2008-12-25
DOI: 10.3724/SP.J.1145.2008.00877

木质纤维素生产燃料乙醇的关键技术研究现状*

李 科[1,2] 靳艳玲[1,2] 甘明哲[1,2] 刘晓风[1] 赵 海[1**]
([1]中国科学院成都生物研究所 成都 610041)
([2]中国科学院研究生院 北京 100049)

摘 要 木质纤维素是自然界广泛存在且廉价的可再生资源, 其主要成分纤维素、半纤维素是潜在的燃料乙醇生产原料. 虽然由木质纤维素生产燃料乙醇的技术路线已具可行性, 但存在着具体工艺环节复杂、生产能耗高等局限, 严重阻碍了其规模化生产. 目前纤维素燃料乙醇生产主要围绕预处理、酶解、发酵三大关键步骤进行技术攻关, 其中预处理的能耗和效率、发酵过程的五碳糖利用等问题成为该工艺的重要制约因素. 本文在综述国内外纤维素乙醇生产关键步骤的基础上, 着重分析了各种物理、化学和生物预处理的优缺点以及新兴的预处理思路, 归纳了各类纤维素乙醇生产菌的特点, 包括耐高温和五碳糖的利用, 并介绍了当前主要的发酵方式和优化措施, 以期为木质纤维素生产乙醇提供新的研究思路. 表5 参86

关键词 木质纤维素; 燃料乙醇; 预处理; 离子液; 酶解; 发酵; 戊糖
CLC TK6

Progress in Research of Key Techniques for Ethanol Production from Lignocellulose*

LI Ke[1,2], JIN Yanling[1,2], GAN Mingzhe[1,2], LIU Xiaofeng[1] & ZHAO Hai[1**]
([1]*Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences*, Chengdu 610041, China)
([2]*Graduate University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract Lignocellulose, with cellulose and hemicellulose as its main components, extensively occurs in the world and is a kind of cheap renewable resource for ethanol production. Although the technical route of bioethanol production from lignocellulose is feasible, the industrial application is limited by its practical obstacles. At present, the studies on ethanol production from lignocellulose mainly focus on three critical steps: pretreatment, enzymatic hydrolysis and fermentation. Particularly, the energy cost and the efficiency of the pretreatment, along with the usage of pentose in fermentation become the crucial limitations of this process. Based on reviewing key techniques for bioethanol production from lignocellulose, advantages and disadvantages of various physical, chemical and biological pretreatments, along with the latest methods, were analyzed. Moreover, the characteristics of many kinds of microbes, such as their thermotolerance and ability of pentose' s usage, and the widely-used fermentation modes are also summarized in this review to provide some new ideas for ethanol production from lignocellulose. Tab 5, Ref 86

Keywords lignocellulose; bioethanol; pretreatment; ionic liquids; enzymatic hydrolysis; fermentation; pentose
CLC TK6

随着世界人口的增加以及各国工业化水平的提升, 整个社会对能源的需求量与日聚增. 而乙醇作为一种能替代或部分替代汽油的可再生能源, 可以缓解石油、天然气等不可再生化石能源日渐枯竭带来的能源压力. 考虑到粮食安全问题, 以玉米为代表的燃料乙醇生产已被逐渐停止; 短期来看, 木薯、红薯等薯类作物是取代玉米等原料生产乙醇的理想代替物; 长期来看, 它们也只是中国生产燃料乙醇的过渡性原料, 而秸秆、麸皮、锯木粉这些低成本农业、工业废弃物, 其包含的木质纤维素将是一种有潜力的乙醇发酵原料.

1 木质纤维素(Lignocellulose)的组成

植物中存在的木质纤维素主要由3部分构成: 纤维素(Cellulose)、半纤维素(Hemicellulose)和木质素(Lignin). 纤维素分子是由*n*个葡萄糖苷通过β-1,4糖苷键连接起来的链状聚合体, 纤维素大分子之间通过氢键聚合在一起形成纤维束. 半纤维素是一大类结构不同的多聚糖的统称, 这类聚糖包括葡聚糖、甘露聚糖、半乳聚糖、木聚糖、阿拉伯聚糖以及果胶, 而木聚糖占组分的一半以上. 木质素是由苯基丙烷结构单元通过碳–碳键连接而成的具有三维空间结构的高分子聚合物. 半纤维素位于许多纤维素之间, 就像是一种填充在纤维素框架中的填充料; 而木质素是一种镶嵌物质, 在纤

收稿日期: 2008-02-02 接受日期: 2008-04-22
*国家"863"计划项目(No. 2007AA100702)和国家科技支撑计划(No. 2007BAD78B04)资助 Supported by the National "863" Project of China (No. 2007AA100702) and the National Key Technology R & D Program of China (No. 2007BAD78B04)
**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zhaohai@cib.ac.cn)

表1 常见植物纤维原料的组成

Table 1 Composition of lignocellulose materials of some plants

木质纤维素原料 Lignocellulose material	纤维素 Ccellulose (*w*/%)	半纤维素 Hemicellulose (*w*/%)	木质素 Lignin (*w*/%)
农作物废弃物 Crop wastes			
小麦杆 Wheat straw[1]	35~45	20~30	8~15
玉米杆 Corn stover[2]	40	30	24
玉米纤维 Core fibre[3]	19	29	8
稻壳 Rice hull[4]	36	12	15
甘蔗渣 Sugarcane bagasse[5]	43	31	11
大豆杆 Soybean straw[6]	25	12	18
树木 Wood			
硬木 Hardwood[7]	40~55	24~40	18~25
软木 Softwood[7]	45~50	25~35	25~35
纸张 Paper			
新闻纸 Newspaper[7]	40~55	25~40	18~30
废纸 Waste paper[7]	60~70	10~20	5~10

维素周围形成保护层.

纤维素、半纤维素和木质素在不同原料中所占的比例各不相同, 故利用的难易程度也会有差异. 一些常见的植物纤维各组分比例见表1.

2 木质纤维素乙醇生产的关键技术

由于木质素、半纤维素对纤维素的包裹作用以及纤维素本身的结晶状态, 天然形态的纤维素很难直接被微生物利用转化为乙醇, 一般通过预处理、酶解和发酵3个关键步骤, 木质纤维素原料才能高效转化为乙醇. 预处理可以破坏纤维素的结晶结构, 去除木质素和半纤维素, 扩大纤维素酶在纤维素表面上的接触面积; 酶解过程是在纤维素酶的作用下将纤维素转化为以葡萄糖为代表的可发酵糖; 再利用各种微生物发酵葡萄糖生成乙醇. 下面对各步骤作具体的论述.

2.1 预处理(Pretreatment)

木质纤维素对酶抵触性的根本原因是(微)晶态纤维素与纤维素酶的低接触性, 以及木质素与半纤维素在纤维素表面的存在[8]. 通过预处理降低纤维素的结晶状态并去除木质素与半纤维素, 能够充分减轻原料对酶解的抗性[9]. 主要的预处理方法可分为物理处理、化学处理和微生物处理.

2.1.1 **物理预处理** 研磨是一种常用的物理方法, 它能增加纤维素与酶的接触面积, 提高酶解率. 高能辐射能使纤维素的聚合度和结晶性降低, 原料可溶性增强. 蒸汽爆破(Steam explosion)是将已破碎的生物质置于高压饱和蒸汽中(通常是160~260 ℃, 0.69~4.83 MPa)处理数秒, 再迅速降至常压的物理预处理方法. 在这个爆破性的过程中, 原料的木质纤维素结晶度和半纤维素含量可以部分降低[10]. Cristobal cara报道蒸汽爆破橄榄木, 酶解72 h最大能得到52 g L^{-1}的葡萄糖[11]. 但Carlos Martin观察到经蒸汽爆破处理过的水解产物对乙醇发酵有强烈的抑制作用[5]. 微波处理能明显地改进纤维素的酶解效果. 微波预处理稻草和麦秆方面的研究表明, 微波协助的碱处理能提高水解初期的速率[12], 降低发酵期间的纤维素酶使用量、缩短反应时间, 提高乙醇转化率[13]. 热水也能溶解半纤维素, 当大多数的生物质原料在220 ℃热水下处理2 min, 可以去除1/2到2/3的木质素. 流动预处理(Flowthrough pretreatment)的方法是在预处理过程中连续或间断地通入热水, 能达到75%的木质素去除率[14]; 流动预处理酶解后的总糖产量高于批次处理[15, 16].

2.1.2 **化学预处理** 化学预处理主要包括以下3种: ⑴ **稀酸**预处理. 稀酸预处理是目前广泛使用的预处理方法, 它能够释放大多数的戊糖, 并能提高纤维素的水解效果[23, 24]. 表2比较了近年来不同浓度稀酸对玉米原料的预处理情况, 该方法可达96%的木糖产量. 若采用不同的温度, 分两步稀酸预处理木渣可获得97%的木糖产量[25]. 与一步稀酸预处理(215 ℃, 5 min)相比, 两步预处理(190 ℃, 2 min; 210 ℃, 5 min)后的软木原料具有更高的乙醇产量(300 L ton^{-1}, 227 L ton^{-1})[26, 27]. 虽然稀酸处理的单糖产量很高, 但也存在一些缺点. 稀酸批次处理对木质素的去除率较低, 在20%以内[16]; 反应通常是在高温高压下进行, 半纤维素分解成木糖后, 木糖继续降解易形成发酵抑制物糠醛[28], 在发酵之前需要对水解液进行额外的脱毒处理; 稀酸处理需要耐腐蚀性的容器. ⑵ **碱性预处理**. 与酸及其它氧化剂相比, 在不降解半纤维素聚合体的情况下, 碱预处理在打破木质素、半纤维素和纤维素之间的酯键上更具优势, 但NaOH、KOH等较高的成本限制了该方法的大规模使用. 近年来与氨水相关的预处理方法受到了越来越多的关注. 氨水的优点在于它与木质素有较高的反应选择性, 且高挥发性使其易于回收和再利用. Z. Xue等报道, 与未处理的原料相比, 用10%氨水预处理24 h后大豆秆的半纤维素和木质素分别降低约40%和30% [6]. 氨水与其他物理和化学相结合的预处理方法也能达到较好的效果. 用自动热水水解和氨循环渗滤工艺(Ammonia recycled percolation process, ARP)相结合的方法处理白杨木, 有62%的半纤维素去除量(180 ℃, 30 min), 酶解能力达到95% [29]. N.J. Cao同时采用氨水和盐酸的预处理方法处理玉米芯, 在26 ℃下24 h去除了80%~90%的木质素及醋酸盐类, 整个预处理酶解后得到92%的葡萄糖产量[30]. 氨纤维爆裂(Ammonia fiber expansion process, AFEX)结合了氨水和蒸汽爆破的优势, 在温和温度(70~100 ℃)及高压(200~500 Pa)下使氨水结合在纤维素上, 然后迅速降压, 达到降低纤维素的结晶度, 扩大酶解接触面的目的. AFEX不仅能降低木质素和半纤维素含量[31], 还能在低

表2 近年来各种酸浓度对玉米秆预处理的报道
Table 2 The latest reports about dilute acid pretreatments of corn stover

底物 Substrate	酸浓度 Acid concentration	θ/℃	t/min	木糖产量 Xylose yield, (w/%)	葡萄糖产量 Glucose yield (w/%)	报道者及时间 Reporters & time
玉米秆 Corn stover	w/%=1.06	190	1.5	96	N/A	Tucker *et al.* (2003)[17]
	w/%=1.17	191	0.75~1.25	77	N/A	Schell *et* al. (2003)[18]
	w/%=1	180	10	90	N /A	Yongming Zhu (2004)[19] a
	w/%=1	170	4.4	73	6.3	Yongming Zhu (2005)[20]
	φ/%=0.98	160	5	90	1.6	Lloyd *et al.* (2005)[21]
	φ/%=2	120	43	77	8.4	Lu XB *et al.* (2007)[22]
	φ/%=2.4	100	100	78	11.3	Lu XB *et al.* (2007)[22]

a. 采用流动处理的方法, 酸流动率为10 mL/min　a. Use acid flow pretreatment, flow rate=10 mL/min

酶量加入条件下高效地将纤维素转化为葡萄糖[32]. Farzaneh优化了AFEX预处理玉米秆的最佳条件, 得到了80%的木糖产量和近乎100%的葡萄糖产量[33]. 石灰(Lime)预处理是一种低成本除去木质素的方法. 在25~130 ℃的温度范围内反应都能够进行, 相对应的反应时间在数周到数小时之间[34~36]. 对于低木质素含量的草本植物, 石灰处理所达到的效果可以供给生物原料进行酶解[37, 38]; 但对于高木质素含量的木本植物, 还需要额外的预处理方法相结合才能有效的进行酶解[39]. (3) 氧化预处理. 湿氧化(Wet oxidation, WO)预处理是在高温水蒸汽和高压氧气共同存在下氧化木质纤维素原料, 使部分木质素和大多数半纤维素溶解, 从而提高酶解效果. A.S. Schmidt用碱性WO处理麦秆, 在最佳条件下(185 ℃, 12bar O_2, 15 min), 有55%的木质素和80%的半纤维素溶解[40]. C. Martin用碱性WO处理(195 ℃, 12 bar O_2, 15 min)甘蔗渣, 酶解48 h后获得792 g kg^{-1}的葡萄糖产量[5]. 双氧水与其它化学、物理方法相结合也能去除木质素和得到较高的单糖转化率. Badal C. Saha用碱性H_2O_2预处理小麦秆(35 ℃, 24 h), 酶解后获得最大单糖产量672 mg g^{-1} (最大理论值的96.7%)[41]. C. Cara结合蒸汽爆破和双氧水的方法预处理橄榄木, 去除了80%的木质素[42]. 虽然有较好的预处理效果, 但氧化预处理作为一种需要高能投入并依靠其他物化方法协作进行的较为复杂的预处理手段, 离大规模的使用还有一定的距离.

2.1.3 **生物预处理**　生物预处理主要是在纤维质原料中加入能分解木质素和半纤维素的微生物, 利用微生物自身代谢活动来降解木质纤维素中的成分. 近年来对白腐菌生物预处理木质纤维素的报道较多. T.K. Hakala等人研究了86株白腐菌对云杉木中木质素的降解情况, *Ceriporiopsis subvermispora*和*Physisporinus rivulosus* T241i在10 wk内有最高的木质素降解能力, 分别为44%和39%[43]. 用*Pleurotus ostreatus*预处理稻草60 d后, Klason木质素和半纤维素分别减少了41%和48%[44]. 低的能量需求和温和的环境条件是生物处理的优势, 但是较长的分解周期使这种方法存在局限性.

2.1.4 **主流预处理的比较**　2005年, 由美国农业部未来农业与食品体系(US Department of Agriculture Initiative for Future Agriculture and Food Systems, IFAFS)资助, Auburn University、Dartmouth College等美国6所大学或科研单位组成研究小组, 使用同样的原料(Corn stover)、分析方法和数据表达方法, 对不同的主流预处理方法的效果做出了对比研究. 各种主流预处理方法的技术参数和反应条件见表3.

该研究结果(表4)可以得出: (1) 稀酸和AFEX处理可以得到90%左右的总单糖产量, 而其他处理方法虽然得到的总糖产量也很高, 但是其总单糖所占比例相对较低. (2) 各种预处理的葡萄糖几乎都以单糖的形式释放, 而木糖的释放形式各种处理之间有很大的差别. (3) **达到各种预处理最佳产量的**条件, 除AFEX和石灰处理是在相对较低的温度下(90 ℃, 55 ℃), 其他处理反应温度都比较剧烈(160~200 ℃).

2.1.5 **新兴的预处理方法**　以上所介绍的各种预处理方法, 简言之, 是利用酸碱在高温高压下或利用微生物半选择性地降解木质纤维素中的木质素和半纤维素. 虽然其中某些方法能够达到较好的预处理效果, 但都存在一定的局限性, 例如操作危险性、环境污染、能耗高、反应时间长、反应装置的耐腐蚀要求等. 近年来, 一种新的去除木质素和半纤维素得到纤维素的预处理思路有了发展. 该思路用特定的溶剂[如浓酸、离子液(Ionic liquids)等]溶解纤维质原料, 破坏木质纤维素中的氢键, 将木质素、半纤维素和纤维素分离开来, 再分别回收. 该方法能得到较高的无定形纤维素含量和酶解后葡萄

表3 几种主要预处理技术方法及其反应条件[9]
Table 3 Main pretreament technologies and their reaction conditions for biomass preparation [9]

预处理技术 Pretreatment technology	化学试剂 Chemicals used	温度 Temp. (θ/℃)	压力 Pressure (p/atm absolute)	反应时间 Reaction time	固体浓度 (w/%) Solid concentration
稀酸 Dilute acid	φ/%=0.5~3.0 (H_2SO_4)	130~200	3~15	2~30 min	10~40
流动预处理 Flowthrough	φ/%=0.0~0.1 (H_2SO_4)	190~200	20~24	12~24 min	2~4
控pH处理 pH controlled	水 Water	160~190	6~14	10~30 min	5~30
氨纤维爆裂 AFEX	100% (1 : 1) ammonia	70~90	15~20	<5 min	60~90
氨循环渗滤工艺 ARP	w/%=10~15 (ammonia)	150~170	9~17	10~20 min	15~30
石灰处理 Lime	0.05~0.15 g $Ca(OH)_2$/g (material)	70~130	1~6	1~6 h	5~20
空气中石灰处理 Lime+air	0.05~0.15 g $Ca(OH)_2$/g (material)	25~60	1	2 wk~2 mo	10~20

表4 几种主流预处理方法最佳条件下预处理后和酶解后的木糖和葡萄糖产量(加入15FPU纤维素酶/g初始玉米杆)[45]
Table 4 Yields of xylose and glucose from each pretreatment system studied followed by enzymatic hydrolysis with a loading of 15FPU/g glucan in the original corn stover [45]

预处理系统 Pretreatment system	木糖产量 Xylose yield			葡萄糖产量 Glucose yield			总糖 Total sugar		
	第1步 Stage 1	第2步 Stage 2	总木糖 Total xylose	第1步 Stage 1	第2步 Stage 2	总葡萄糖 Total glucose	第1步 Stage 1	第2步 Stage 2	总量 Total
稀酸 Dilute acid	32.1/31.2	3.2	35.3/34.4	3.9	53.2	57.1	36.0/35.1	56.4	92.4/91.5
流动处理 Flowthrough	36.3/1.7	0.6/0.5	36.9/2.2	4.5/4.4	55.2	59.7/59.6	40.8/6.1	55.8/55.7	96.6/61.8
部分流动处理 Partial flow pretreatment	31.5/2.8	2.6/2.4	34.1/5.2	4.3/4.2	51.2	55.5/55.4	35.8/7.0	53.8/53.6	89.6/60.6
控制pH处理 Controlled pH	21.8/0.9	9.0	30.8/9.9	3.5/0.2	52.9	56.4/53.1	25.3/1.1	61.9	87.2/63.0
氨水爆破 AFEX		34.6/29.3	34.6/29.3		59.8	59.8		94.4/89.1	94.4/89.1
氨循环渗滤工艺 ARP	17.8/0	15.5	33.3/15.5	0	56.1	56.1	17.8/0	71.6	89.4/71.6
石灰 Lime	9.2/0.3	19.6	28.8/19.9	1.0/0.3	57.0	58.0/57.3	10.2/0.6	76.6	86.8/77.2

Stag 1为预处理过程，stage 2为预处理过程中产生固体物质的酶法消解. “/” 前的值为溶液中释放的总糖，“/” 后的值为释放的单糖. 只有一个值说明只释放了单糖. 产量定义为以玉米秆中每100 g干固形物中最大潜在的64.4 g可释放的糖为基础， 包括37.7%最大潜在木糖和62.3%最大潜在葡萄糖
Stage 1 refers to pretreatment and stage 2 refers to enzymatic digestion of the solids produced in pretreatment. The first value reported in each column is for total sugars released into solution and the second is just for the monomers released. A single value indicates the release of only monomers. Yields are defined based on the maximum potential sugars released from the corn stover used of 64.4 g per 100 g of dry solids with the maximum potential xylose of 37.7% and the maximum potential yield of glucose of 62.3% on this basis

糖产率，同时也能回避发酵抑制物的产生.

Y.H.P. Zhang在温和的条件下(50 ℃，常压)采用浓磷酸处理玉米秆等粗原料，再用丙酮和水分馏，酶解24 h后得到97%的葡萄糖产率[8]. Alabama大学的Rogers建立了一种用离子液体溶解和处理纤维素的平台策略，获得2005年美国总统绿色化学挑战奖学术奖，并证明基于$[C_4mim]^+Cl^-$的离子液体能够部分溶解未经预处理的木质原料，纤维素在离子液中辅助微波加热能达到最大w=25%的溶解性[46, 47]. Thomas Heinze等在$[C_4mim]^+Cl^-$、$[C_4mpy]^+Cl^-$、BDTAC三种离子液体中分别研究了各种纤维素的溶解性，在$[C_4mpy]^+Cl^-$中纤维素聚合体发生较大的解聚作用[48]. 用酸做催化剂以离子液$[C_4mim]^+Cl^-$为反应载体，常压下纤维素Sigmacell能在3 min内获得36%的葡萄糖产量和59%的还原糖产量[49]. 由于离子液在木质纤维素溶解上表现出的高效性和较低的环境污染性，这一领域逐渐成为近年来研究的热点.

2.2 酶解(Enzymatic hydrolysis)

酶解过程主要是利用纤维素酶将预处理后的纤维素转化为可发酵性糖，若不通过酶解直接由预处理后的产物发酵，需要较长的时间且只能获得相对较低的乙醇浓度. 例如Raj Boopathy将甘蔗收获后的剩余物进行碱(2% H_2O_2)或酸(0.8 mol/L H_2SO_4)预处理后直接发酵，前者10 d发酵后仅获得最大乙醇浓度130.5 mg L^{-1}，后者12 d获得335.67 mg L^{-1} (乙醇)[50].

纤维素酶是多种酶的混合物，主要有三大种类起作用：(1) 内切型β-葡聚糖酶endoglucanase (EG, endo-1,4-*D*-glucanohydrolase, EC 3.2.1.4)，它以随机的形式对纤维素聚合物内部的非结晶区进行切割，对末端键的敏感性比间键小. 其主要产物是纤维糊精、纤维二糖和纤维三糖. (2) 外切型β-葡聚糖酶exoglucanase 或 cellobiohydrolase (CBH, 1,4-β-*D*-glucan cellobiohydrolase, EC3.2.1.91)，它能从纤维素链的非还原性末端切割，生成可溶性的纤维糊精和纤维二糖. (3) β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase, EC 3.2.1.21)，能水解纤维二糖和短链的纤维寡糖生成葡萄糖. 天然纤维素的降解需要依靠这些酶的协同作用才能完成.

丝状真菌被较多的用作纤维素酶生产菌，例如木霉属(*Trichoderma* sp.)、曲霉属(*Aspergillus* sp.)和青霉属(*Penicillium* sp.)中一些菌株，其中里氏木霉(*Trichoderma reesei*) Rut C30较为典型，被认为是目前较好的纤维素酶产生菌[51, 52]. 目前国外采用的商品化的纤维素酶主要有诺维信公司生产的Cellulast 1.5L和Novozym188. 前者主要提供纤维素酶的活性，而后者主要提供β-葡萄糖苷酶活性[53]. 也有不添加商用纤维素酶，在预处理过的纤维质原料上直接接入产纤维素酶的菌种而进行酶解的报道. B.S. Dien在热水预处理过的玉米纤维上接入*Trichoderma reesei* RutC30和*Aspergillus niger* NRRL 2001，得到74%的阿拉伯糖和54%的木糖产量[54].

2.3 发酵(Fermentation)

2.3.1 菌 种 自然界有多种能利用糖类产乙醇的微生物，其底物的利用范围和产乙醇的能力各有不同(表5). 纤维素原料经预处理后有很大一部分半纤维素降解成木糖，虽然酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)以其高效的产乙醇能力和较强的乙醇耐受性成为目前广泛使用的乙醇生产菌， 但由于它们都不能利用木糖，故用作木质纤维素乙醇生产菌的优势并不明显.

获得能利用木糖的微生物是提高纤维素乙醇转化率的一个途径. 假丝酵母(*Candida*)同酿酒酵母相比具有耐高温的特点，且某些菌株也能利用木糖. K.L. Kadam报道用*C. acidothermophilum*发酵稀硫酸预处理的白杨木，40 ℃时有80%的乙醇产率，而酿酒酵母只有73%的产率[56]. 具柄毕赤氏酵母(*Pichia stipitis*)也是一种能利用木糖的微生物. Frank K. Agbogbo研究了*Pichia stipitis*在不同比例的葡萄糖

和木糖混合液中的发酵情况, 当有25%葡萄糖和75%木糖或者100%木糖时, 都可达较高的乙醇浓度和产率(120 h, 约为24.4 g L^{-1}和0.45 g g^{-1})[57]. Gunnar Liden报道, 用*Pichia stipitis*、*Candida shehatae*和*Pachysolen tannophilus*发酵稀酸预处理过的玻利维亚草(Bolivian straw), *Pichia stipitis*的乙醇产率最高[58]. 一些丝状真菌(如毛霉)也用作发酵纤维素水解产物, 其优点在于: (1) 能利用木糖. (2) 能产生一些高附加值的产物, 例如壳聚糖[59]. (3) 能够37 ℃下获得较高的乙醇产量和发酵强度. M.J. Taherzadeh对*Mucor indicus*、*Rhizopus oryzae*和*Saccharomyces cerevisiae*的纤维素乙醇生产能力做了对比研究, 在15 FPU g^{-1}酶量下, 2~3 d乙醇的浓度和产率分别为11.35 g L^{-1} 67.62%、12.35 g L^{-1} 73.58%、10.2 g L^{-1} 60.77%[60]; 该研究团队还用*Mucor indicus*进行了补料发酵, 乙醇浓度达19.6 g L^{-1} [61].

表5 能大量生产乙醇的酵母和细菌以及被它们用作底物的主要碳水化合物[55]

Table 5 The yeast and bacteria which can produce large quantity of ethanol and the main carbohydrate they can use[55]

微生物 Microbe	底物 Substrate
酵母 Yeast	
酵母属 *Saccharomyces*	
酿酒酵母 *S. cerevisiae*	葡萄糖, 果糖, 半乳糖, 麦芽糖, 麦芽三糖, 木酮糖 Glucose, fructose, galactose, maltose, maltotriose and xylulose
卡尔斯伯酵母 *S. carlsbergensis*	葡萄糖, 果糖, 半乳糖, 麦芽糖, 麦芽三糖, 木酮糖 Glucose, fructose, galactose, maltose, maltotriose and xylulose
鲁氏酵母 *S. rouxii*	葡萄糖, 果糖, 麦芽糖, 蔗糖 Glucose, fructose, maltose, sucrose
克鲁维酵母属 *Kluyveromyces*	
脆壁克鲁维酵母 *K. fragilis*	葡萄糖, 半乳糖, 乳糖 Glucose, galactose, lactose
乳酸克鲁维酵母 *K. lactis*	葡萄糖, 半乳糖, 乳糖 Glucose, galactose, lactose
假丝酵母属 *Candida*	
假热带假丝酵母 *C. pseudotropicalis*	葡萄糖, 半乳糖, 乳糖 Glucose, galactose, lactose
热带假丝酵母 *C. tropicalis*	葡萄糖, 木糖, 木酮糖 Glucose, xylose, xylulose
细菌 Bacteria	
运动发酵单胞菌 *Zymomonas mobilis*	葡萄糖, 果糖, 蔗糖 Glucose, fructose, sucrose
布氏热厌氧菌 *Thermoanaerobium brockii*	葡萄糖, 蔗糖, 纤维二糖 Glucose, sucrose, cellubiose
乙酰乙基热厌氧杆菌 *Thermobacteroides acetoethylicus*	葡萄糖, 蔗糖, 纤维二糖 Glucose, sucrose, cellubiose
梭菌属 *Clostridium*	
热纤梭菌 *C. thermocellum*	葡萄糖, 纤维二糖, 纤维素 Glucose, cellubiose, cellulose
热硫化氢梭菌 *C. thermohydrosulfuricum*	葡萄糖, 木糖, 蔗糖, 纤维二糖, 淀粉 Glucose, xylose, sucrose, cellubiose, starch

为获得优良的纤维素发酵菌株, 国内外学者采用现代生物技术手段对野生菌株进行了改造. 方震祺等用原生质体融合技术将*Saccharomyces cerevisiae* 396和*Candida* sp. C6进行了属间融合, 文铁桥等将酿酒酵母*Saccharomyces cerevisiae* A001和克鲁维酵母*Kluyveromyces* sp. Y034进行了原生质体属间融合, 分别都获得了耐高温且高糖利用率的融合子[62, 63]. 在利用基因工程手段扩大发酵菌株所利用的底物这方面, 主要有两种思路: 一是将携带木糖外源基因的质粒转化到酿酒酵母当中, 从而获得一种可以以混合糖为原料产乙醇的基因工程菌. 刘继开等采用RT-PCR的方法克隆得到*Candida shehatae*木糖还原酶基因xyll和*Pichia stipitis*的木糖醇脱氢酶基因xyl2, 以期整合到酿酒酵母的基因组当中, 获得同时代谢木糖和葡萄糖的重组菌株[64]. 二是将能产生乙醇的基因整合到能利用多种底物的细菌中, 用新构建的微生物进行发酵. Ingram实验室构建了具有*Zymomonas mobilis*丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶基因的*E.coli* KO11和*Klebsiella oxytoca* P2. KO11能同时利用戊糖和己糖产生乙醇, 在含有58.5 g L^{-1}戊糖和37 g L^{-1}己糖的稻壳水解液中, 摇瓶发酵72 h产乙醇46 g L^{-1} [65], 在200 L的发酵罐中48 h产乙醇40 g L^{-1} [66]. P2能迅速和高效地发酵葡萄糖和纤维二糖. N.B. Pamment等将P2和其他野生型纤维二糖利用菌的发酵情况做了对比研究, 发现P2能在70 h左右达到乙醇浓度30 g L^{-1}, 而其他野生型纤维二糖利用菌需要120~133 h [67].

2.3.2 **发酵方式**　主要的发酵方式包括补料发酵和批次发酵. 通过补料添加纤维素底物和酶, 乙醇浓度200 h能达20 g L^{-1}; 将菌固定后, 相同的发酵方式乙醇浓度能提高到28 g L^{-1} [68]. 批次发酵主要有先糖化后发酵(Separate hydrolysis and fermentation, SHF)和边糖化边发酵(Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)两种方式. SHF在糖化过程中易形成高浓度的葡萄糖和纤维二糖, 从而抑制纤维素酶的活性; SSF技术可消除高浓度糖对纤维素酶的抑制作用, 但缺陷在于发酵菌株的最适温度(例如酿酒酵母, <37 ℃)通常低于纤维素酶的最适温度(>45 ℃), 从而影响纤维素酶的糖化效率[69]. 筛选耐高温菌株可在一定程度上解决SSF中纤维素酶最适温度和发酵温度不协调的矛盾, 降低生产成本. 英国Ulster大学对耐高温的*K. marxianus* IMB3做了较为系统的研究[68~73], 该酵母能在45 ℃的条件下正常生长, 且SSF发酵NaOH预处理过的大麦秆, 能达乙醇浓度12 g L^{-1} [71]. 钱名宇等以木质纤维素的稀酸水解液为底物, 对批式发酵、补料批式发酵和间隔补料批式发酵3种发酵方式进行了比较, 结果表明, 间隔补料批式发酵可以有效地减弱水解液中抑制因子对菌种的影响, 乙醇产量高于其他两种发酵方式[74].

由于纤维素酶生产菌和纤维素乙醇发酵菌通常是两种微生物, 故无论补料发酵还是批次发酵, 达到酶解和发酵的目的都会涉及两种微生物. 为减少整个过程的繁琐性, 提高效率, 构建同时具有分解纤维素和产乙醇功能的基因工程菌进行一步发酵也是近年来纤维素乙醇发酵的一个研究方向. Yasuya Fujita将里斯木霉内切葡聚糖酶II (EndoglucanaseII)、纤维二糖酶II (CellobiohydrolaseII)及曲霉的β-葡萄糖苷酶基因整合到酿酒酵母基因里, 用所构建的基因工程菌发酵纤维素, 40 h后乙醇浓度达2.9 g L^{-1}, 效率为0.45 gg $^{-1}$ [75]. L.O. Ingram整合了来自*Zymomonas mobilis*的(pdc, adhB)和*Erwinia chrysanthemi*的内切葡聚糖基因(celY, celZ), 构建成Klebsiella oxytoca SZ21, 在不添加外源纤维素酶的条件下发酵无定形

纤维素, 72 h乙醇浓度7.84 g L^{-1}, 产量70% [76]. Willem H. van Zyl构建了能同时表达内切葡聚糖苷酶和β-葡萄糖苷酶活性酿酒酵母, 在纯纤维素上发酵192 h, 乙醇浓度1 g L^{-1} [77]. 目前以这种思路构建的菌种直接发酵纤维素原料所得的乙醇浓度都很低, 发酵时间都很长, 还需进一步的研究.

2.3.3 **优化策略** 研究表明, 在纤维素酶解过程中加入表面活性剂能增加纤维素的葡萄糖转化率[78]. 关于表面活性剂能增强纤维素转化的机理, 目前有研究认为是表面活性剂降低了纤维素酶在木质素上的无效结合——表面活性剂与木质素在木质纤维素表面的相互作用, 使非专一性结合在木质素表面的的纤维素酶得到了释放[79]. Guido Zacchi研究了用蒸汽预处理过的云杉做底物, 在SSF过程中添加吐温20对发酵的影响. 当添加量在2.5 g L^{-1}时, 乙醇产率提高了8% (达92%, 48 h)的同时缩短了发酵时间; 相同产量下添加吐温20后酶的加入量减少了一半[80]. 在木质纤维素的酶解过程中加入聚乙二醇(PEG), 能使纤维素转化率提高到70%以上[81, 82]. 同表面活性剂机理类似, 牛血清蛋白(BSA)也能提高酶解率. 在预处理后的玉米秆里添加BSA, 酶解72h后葡萄糖产率由82%增加到92% [83].

在大多数SSF过程的后期, 酶解程度成为发酵的限制因素之一, 而纤维素与酶的低接触性是酶解速率降低的关键原因[84]. 为提高纤维素与酶的接触性, 改善SSF的发酵效率, 科研人员在发酵过程中进行了一些物理优化. 利用带磁粒的反应器在酶解过程中进行强烈的搅拌能提高纤维素的水解效率[85]; 在SSF过程中采用间歇超声, 可提高乙醇产量20% [86].

3 展望

木质纤维素是地球上最丰富的可再生资源, 我国可利用的木质纤维素每年在7×10^8 t左右, 这些来自农林业、工业和城市的废弃物是燃料乙醇生产的丰富来源. 尽管木质纤维素原料本身非常廉价, 但是将其转化成乙醇的工艺过程非常复杂, 往往需要大量的能耗. 综合以上对整个生产流程的分析, 可考虑在以下环节做进一步的研究来提高预处理的转化率和水解产物的利用率: (1) 研究不同纤维素溶剂对纤维素的溶解性, 结合物理和化学手段使溶解性能最优; 采用分馏等方法对木质纤维素中的纤维素、半纤维素、木质素进行高效、绿色的分离. (2) 分离、筛选能够利用木糖和葡萄糖产乙醇的菌株; 建立和优化能分别高效利用葡萄糖和木糖的微生物共培养体系.

Reference

1 Saha BC, Cotta MA. Ethanol production from alkaline peroxide pretreated enzymatically saccharified wheat straw. *Biotechnol Progr*, 2006, **22** (2): 449~453

2 Varga E, Klinke HB, Reczey K, Thomsen AB. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol. *Biotechnol & Bioengin*, 2004, **88** (5): 567~574

3 Gáspár M, Juhász T, Szengyel Z, Réczey K. Fractionation and utilisation of corn fibre carbohydrates. *Proc Biochem*, 2005, **40** (3~4): 1183~1188

4 Saha BC, Cotta MA. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. *Enzyme & Microbial Technol*, 2007, **41** (4): 528~532

5 Martin C, Gonzalez Y, Fernandez T, Thomsen AB. Investigation of cellulose convertibility and ethanol fermentation of sugarcane bagasse pretreated by wet oxidation and steam explosion. *J Chem Technol Biotechnol*, 2006, **81** (10): 1669~1667

6 Xu Z, Wang QH, Jiang ZH, Yang XX, Ji YZ. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw. *Biomass & Bioenergy*, 2007, **31** (2~3): 162~167

7 章克昌. 酒精与蒸馏酒工艺学. 北京: 中国轻工业出版社, 1995. 22

8 Zhang YHP, Ding SY, Mielenz JR, Cui JB, Elander RT, Laser M, Himmel ME, McMillan JR, Lynd LR. Fractionating recalcitrant lignocellulose at modest reaction conditions. *Biotechnol & Bioengin*, 2007, **97** (2): 214~223

9 Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresour Technol*, 2005, **96**: 1959~1966

10 Yong Q (勇强), Xu Y (徐勇), Song XY (宋向阳), Yu SY (余世袁). The pilot system of bioethanol production from corn stalks. *J Cellulose Sci Technol* (纤维素科学与技术), 2006, **14** (3): 37~70

11 Cara C, Moya M, Ballesteros I, Negro MJ, Gonzalez A, Ruiz E. Influence of solid loading on enzymatic hydrolysis of steam exploded or liquid hot water pretreated olive tree biomass. *Proc Biochem*, 2007, **42** (6): 1003~1009

12 Zhu SD, Wu YX, Yu ZN, Zhang X, Li H, Gao M. The effect of microwave irradiation on enzymatic hydrolysis of rice straw. *Bioresour Technol*, 2006, **97** (15): 1964~1968

13 Zhu SD, Wu YX, Yu ZN, Zhang X, Wang CW, Yu FQ, Jin SW. Production of ethanol from microwave-assisted alkali pretreated wheat straw. *Proc Biochem*, 2006, **41** (4): 869~873

14 Liu CG, Wyman CE. The effect of flow Rate of compressed hot water on xylan, lignin, and total mass removal from corn stover. *Ind Eng Chem Res*, 2003, **42** (21): 5409~5416

15 Liu CG, Wyman CE. Partial flow of compressed~hot water through corn stover to enhance hemicellulose sugar recovery and enzymatic digestibility of cellulose. *Bioresour Technol*, 2005, **96** (18): 1978~1985

16 Yang B, Wyman CE. Effect of xylan and lignin removal by batch and flowthrough pretreatment on the enzymatic digestibility of corn stover cellulose. *Biotechnol & Bioengin*, 2004, **86** (1): 89~95

17 Tucker MP, Kim KH, Newman MM, Nguyen QA. Effects of temperature and moisture on dilute-acid steam explosion pretreatment of corn stover and cellulase enzyme digestibility. *Appl Biochem Biotechnol*, 2003, **105**: 165~178

18 Schell DJ, Farmer J, Newman M, McMillan JD. Dilute-sulfuric acid pretreatment of corn stover in pilot-scale reactor-investigation of yields, kinetics, and enzymatic digestibilities of solids. *Appl Biochem Biotechnol*, 2003, **105**: 69~85

19 Zhu YM, Lee YY, Elander RT. Dilute-acid pretreatment of corn stover using a high-solids percolation reactor. *Appl Biochem Biotechnol*, 2004, **117** (2): 103~114

20 Zhu YM, Lee YY, Elander RT. Optimization of dilute-acid pretreatment of corn stover using a high-solids percolation reactor. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, **121**: 1045~1054

21 Lloyd TA, Wyman CE. Combined sugar yields for dilute sulfuric acid pretreatment of corn stover followed by enzymatic hydrolysis of the remaining solids. *Bioresour Technol* , 2005, **96** (18): 1967~1977

22 Lu XB, Zhang YM, Yang J, Liang Y. Enzymatic hydrolysis of corn stover after pretreatment with dilute sulfuric acid. *Chem Engin & Technol*, 2007, **30** (7): 938~944

23 Palmarola-Adrados B, Choteborska P, Galbe M, Zacchi G. Ethanol production from non-starch carbohydrates of wheat bran. *Bioresour Technol*, 2005, **96** (7): 843~850

24 Varga E, Reczey K, Zacchi G. Optimization of steam pretreatment of corn stover to enhance enzymatic digestibility. *Appl Biochem Biotechnol*, 2004, **113**: 509~523

25 Torget R, Hatzis C, Hayward TK, Hsu TA, Philippidis GP. Optimization of reverse-flow, two-temperature, dilute-acid pretreatment to enhance biomass conversion to ethanol. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **57** (8): 85~101

26 Soderstrom J, Pilcher L, Galbe M, Zacchi G. Two~step steam pretreatment of softwood by dilute H_2SO_4 impregnation for ethanol production. *Biomass & Bioenergy*, 2003, **24** (6): 475~486

27 Soderstrom J, Galbe M, Zacchi G. Effect of washing on yield in one- and two-step steam pretreatment of soft wood for production of ethanol. *Biotechnol Progr*, 2004, **20** (3): 744~749

28 Ingram LO, Aldrich HC, Borges ACC, Causey TB, Martinez A, Morales F, Saleh A, Underwood SA, Yomano LP, York SW, Zaldivar J, Zhou SD. Enteric bacterial catalysts for fuel ethanol production. *Biotechnol Prog*, 1999, **15** (5): 855~866

29 Yoon HH. Pretreatment of lignocellulosic biomass by autohydrolysis and aqueous ammonia percolation. *Korean J Chem Eng*, 1998, **15 (**6): 631~636

30 Cao NJ, Krishnan MS, Du JX, Gong CS, Ho NWY, Chen ZD, Tsao GT. Ethanol production from corn cob pretreated by the ammonia steeping process using genetically engineered yeast. *Biotechnol Lett*, 1996, **18** (9): 1013~1018

31 Mosier N, Wyman CE, Dale B, Elander R, Lee YY, Holtzapple M, Ladisch M. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 2005, **96** (6): 673~686

32 Dale BE, Leong CK, Pham TK, Esquivel VM, Rios I, Latimer VM. Hydrolysis of lignocellulosics at low enzyme levels: Application of the AFEX process. *Bioresour Technol*, 1996, **56** (1): 111~116

33 Teymouri F, Laureano-Perez L, Alizadeh H, Dale BE. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour Technol*, 2005, **96** (18): 2014~2018

34 Kaar WE, Holtzapple MT. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass & Bioenergy*, 2000, **18** (3): 189~199

35 Kim S, Holtzapple MT. Lime pretreatment and enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour Technol*, 2005, **96** (18): 1994~2006

36 Kim S, Holtzapple MT. Effect of structural features on enzyme digestibility of corn stover. *Bioresour Technol*, 2006, **97** (4): 583~591

37 Gandia J, Holtzapple MT, Ferrerb A, Byersc FM, Turnerc ND, Nagwania M, Chang S. Lime treatment of agricultural residues to improve rumen digestibility. *Anim Feed Sci & Technol*, 1997, **68** (3~4): 195~211

38 Kaar WE, Holtzapple MT. Using lime pretreatment to facilitate the enzymic hydrolysis of corn stover. *Biomass & Bioenergy*, 2000, **18** (3): 189~199

39 Chang VS, Kaar WE, Burr B, Holtzapple MT. Simultaneous saccharification and fermentation of lime-treated biomass. *Biotechnol Lett*, 2001, **23** (16): 1327~1333

40 Schmidt AS, Thomsen AB. Optimization of wet oxidation pretreatment of wheat straw. *Bioresour Technol*, 1998, **64** (2): 139~151

41 Gaspar M, Kalman G, Reczey K. Corn fiber as a raw material for hemicellulose and ethanol production. *Proc Biochem*, 2007, **42** (7): 1135–1139

42 Cara C, Ruiz E, Ballesterosb I, Negro MJ, Castro C. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. *Proc Biochem*, 2006, **41** (2): 423~429

43 Hakala TK, Maijala P, Konn J, Hatakka A. Evaluation of novel wood-rotting polypores and corticioid fungi for the decay and biopulping of Norway spruce (*Picea abies*) wood. *Enzyme & Microb Technol*, 2004, **34** (3~4): 255~263

44 Taniguchi M, Suzuki H, Watanabe D, Sakai K, Hoshino K, Tanaka T. Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *J Biosci & Bioengin*, 2005, **100** (6): 637~643

45 Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. Comparative sugar recovery data from laboratory scale application of leading pretreatment technologies to corn stover. *Bioresour Technol*, 2005, **96** (18): 2026~2032

46 Fort DA, Remsing RC, Swatloski RP, Moyna P, Moyna G, Rogers RD. Can ionic liquids dissolve wood? Processing and analysis of lignocellulosic materials with 1-*n*-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Green Chem*, 2007, **9** (1): 63~69

47 Swatloski RP, Spear SK, Holbrey JD, Rogers RD. Dissolution of cellose with ionic liquids. *J Am Chem Soc*, 2002, **124** (18): 4974~4975

48 Heinze T, Schwikal K, Barthel S. Ionic liquids as reaction medium in cellulose functionalization. *Macromo Biosci*, 2005, **5** (6): 520–525

49 Li CZ, Zhao ZKB. Efficient acid-catalyzed hydrolysis of cellulose in ionic liquid. *Adv Synth Catal,* 2007, **349**: 1847~1850

50 Dawson L, Boopathy R. Use of post-harvest sugarcane residue for ethanol production. *Bioresour Technol*, 2007, **98** (9): 1695~1699

51 Persson I, Tjerneld F, Hahn-Hagerdal B. Fungal cellulolytic enzyme production: A review. *Proc Biochem*, 1991, **26** (2): 65~74

52 Yu XB (余晓斌), Koo Y (具润漠). The cellulase production by *Trichoderma reesei* in submerged fermentation. *Food & Fermentation Ind* (食品与发酵工业), 1997, **24** (1): 20~25

53 Thygesen A, Thomsen AB, Schmidt AS, Jorgensen H, Ahring BK, Olsson L. Production of cellulose and hemicellulose-degrading enzymes by filamentous fungi cultivated on wet-oxidised wheat straw. *Enzyme & Microb Technol*, 2003, **32** (5): 606~615

54 Dien BS, Li XL, Iten LB, Jordan DB, Nichols NN, O'Bryan PJ, Cotta MA. Enzymatic saccharification of hot-water pretreated corn fiber for production of monosaccharides. *Enzyme & Microb Technol*, 2006, **39** (5): 1137~1144

55 Glazer AN, Nikaido H. Microbial Biotechnology-Fundamentals of Applied Microbiology. Chen SW (陈守文), Yu ZN (喻子牛) Translated. New York: W.H. Freeman and Company, 1995

56 Kadam KL, Schmidt SL. Evaluation of Candida acidothermophilum in ethanol production from lignocellulosic biomass. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48** (6): 709~713

57 Agbogbo FK, Coward-Kelly G, Torry-Smith M, Wenger KS. Fermentation of glucose/xylose mixtures using Pichia stipitis. *Proc Biochem*, 2006, **41** (11): 2333~2336

58 Sanchez G, Pilcher L, Roslander C, Modig T, Galbe M, Liden G. Dilute-acid hydrolysis for fermentation of the Bolivian straw material Paja Brava. *Bioresour Technol*, 2004, **93** (3): 249~256

59 Chatterjee S, Adhya M, Guha AK, Chatterjee BP. Chitosan from *Mucor rouxii*: Production and physico-chemical characterization. *Proc Biochem*, 2005, **40** (1): 395~400

60 Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Engzyme & Microbial Technol*, 2006, **40** (1): 138~144

61 Karimi K, Brandberg T, Edebo L, Taherzadeh MJ. Fed-batch cultivation of Mucor indicus in dilute-acid lignocellulosic hydrolyzate for ethanol production. *Biotechnol Lett*, 2005, **27** (18): 1395~1400

62 Fang AQ (方蔼祺), Li SL (李绍兰), Chen YW (陈有为), Li P (李萍). Study on protoplast fusion between a thermotolerant yeast and *Saccharomyces cerevisiae*. *Chin J Biotechnol* (生物工程学报), 1990, **6** (3): 224~229

63 Wen TQ (文铁桥), Zhao XH (赵学慧). Construction of thermotolerant ethanol-producing yeast by protoplast fusion. *Acta Microbiol Sin* (微生物学报), 1999, **39**, (2): 141~147

64 Liu JK (刘继开), Tian S (田沈), Zhang YZ (张亚珍), Zhang JX (张金鑫), Yang XS (杨秀山). Construction of recombinant yeast metabolizing xylose and glucose. *Renewable Energy Resourc* (可再生能源), 2007, **25** (1): 13~16

65 Moniruzzaman M, Ingram LO. Ethanol production from dilute acid hydrolysate of rice hulls using genetically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett*, 1998, **20** (10): 943–947

66 Ingram LO, Gomez PF, Lai X, Moniruzzaman M, Wood BE, Yomano LP, York SW. Metabolic engineering of bacteria for ethanol production. *Biotechnol & Bioengin*, 1998, **58** (2~3): 204~214

67 Golias H, Dumsday GJ, Stanley GA, Pamment NB. Evaluation of a recombinant Klebsiella oxytoca strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: Comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis*. *J Biotechnol*, 2002, **96** (2): 155~168

68 Barron N, Marchant R, McHale L, McHale AP. Ethanol production from cellulose at 45 ℃ using a batch-fed system containing alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *World J Microbiol & Biotechnol*, 2006, **12** (1): 103~104

69 Alfani F, Gallifuoco A, Saporosi A, Spera A, Cantarella M. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw. *J Ind Microbiol & Biotechnol*, 2000, **25** (4): 184~192

70 Hack CJ, Marchant R. Ethanol adaptation in a thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. *J Ind Microbiol & Biotechnol*, 1998, **20** (3~4): 227~231

71 Boyle M, Barron N, McHale AP. Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* Imb3. *Biotechnol Lett*, 1997, **19** (1): 49~51

72 Kourkoutas Y, Dimitropoulou S, Kanellaki M, Marchant R, Nigam P, Banat IM, Koutinas AA. High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. *Bioresour Technol*, 2002, **82** (2): 177~181

73 Limtong S, Sringiew C, Yongmanitchai W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresour Technol*, 2007, **98**: 3367~3374

74 Qian MY (钱名宇), Zhang J (张晶), Liu JK (刘继开), Yang XS (杨秀山). Ethanol production from dilute-acid lignocellulose hydrolysates by free cells. *Acta Energiae Solaris Sin* (太阳能学报), 2006, **27** (4): 618~622

75 Fujita Y, Ito J, Ueda M, Fukuda H, Kondo A. Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme. *Appl & Environ Microbiol*, 2004, **70** (2): 1207~1212

76 Zhou SD, Ingram LO. Simultaneous saccharification and fermentation of amorphous cellulose to ethanol by recombinant *Klebsiella oxytoca* SZ21 without supplemental cellulose. *Biotechnol Lett*, 2001, **23** (18): 1455~1462

77 Den Haan R, Rose SH, Lynd LR, van Zyl WH. Hydrolysis and fermentation of amorphous cellulose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engin*, 2007, **9** (1): 87~94

78 Helle SS, Duff SJB, Cooper DG . Effect of surfactants on cellulose hydrolysis. *Biotechnol & Bioengin*, **42** (5): 611~617

79 Eriksson T, Borjesson J, Tjerneld F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme & Microb Technol*, 2002, **31** (3): 353~364

80 Alkasrawi M, Eriksson T, Borjesson J, Wingren A, Galbe M, Tjerneld F, Zacchi G. The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. *Enzyme & Microb Technol*, 2003, **33** (1): 71~78

81 Borjesson J, Peterson R, Tjerneld F. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly (ethylene glycol) addition. *Enzyme & Microb Technol*, 2007, **40** (4): 754~762

82 Kristensen JB, Borjesson J, Bruun MH, Tjerneld F, Jorgensen H. Use of surface active additives in enzymatic hydrolysis of wheat straw lignocellulose. *Enzyme & Microb Technol*, 2007, **40** (4): 888~895

83 Yang B, Wyman CE. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates. *Biotechnol & Bioengin*, 2006, **94** (4): 611~617

84 Philippidis GP, Smith TK. Limiting factors in the simultaneous saccharification and fermentation process for conversion of cellulosic biomass to fuel ethanol. *Appl Biochem Biotechnol*, **51 (**2): 117~124

85 Gusakov AV, Sinitsyn AP, Davydkin IY, Davydkin VY, Protas OV . Enhancement of enzymatic cellulose hydrolysis using a novel type of bioreactor with intensive stirring induced by electromagnetic field. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **56** (2): 141~153

86 Wood BE, Aldrich HC, Ingram LO. Ultrasound stimulates ethanol production during the simultaneous saccharification and fermentation of mixed waste office paper. *Biotechnol Progr*, 1997, **13 (**3) : 232~237