

木薯生料发酵生产高浓度燃料乙醇工艺研究*

Very High Gravity Fuel Ethanol Production with the Fermentation of Uncooked Cassava

申乃坤^{1,2}, 曹薇^{1,2}, 王青艳^{1,2}, 秦艳^{1,2}, 朱婧¹, 朱绮霞¹, 米慧芝¹, 黄日波^{1,2**}
SHEN Nai-kun^{1,2}, CAO Wei^{1,2}, WANG Qing-yan^{1,2}, QIN Yan^{1,2}, ZHU Jing¹, ZHU Qi-xia¹, MI Hui-zhi¹, HUANG Ri-bo^{1,2}

(1. 广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007; 2. 广西大学生命科学与技术学院, 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 广西南宁 530005)

(1. Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China; 2. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-resource Conservation and Utilization, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China)

摘要:【目的】对木薯生料发酵生产高浓度燃料乙醇的工艺进行研究,为其工业化生产奠定基础。【方法】首先通过单因素试验确定发酵中主要影响因素的最佳水平,然后利用响应面法对主要因素的相互作用进行研究,最后对发酵温度进行梯度降温控制,以提高乙醇的产量。【结果】单因素试验确定主要影响因素的最佳水平:颗粒淀粉水解酶用量为 0.8 GAU/g 木薯粉,底物浓度为 36%(W/V),初始 pH 值为 4.2。响应面法优化的结果:颗粒淀粉水解酶用量为 0.82 GAU/g 木薯粉,底物浓度为 37%(W/V),初始 pH 值为 4.3。对发酵温度进行梯度降温控制,则可降低醪液残糖,提高原料转化率。在技术集成基础上,对木薯生粉发酵 96 h,醪液乙醇产量可达 16.24%(V/V),残还原糖含量为 0.29%(W/V),残总糖含量为 1.81%(W/V)。与初始条件相比,乙醇产量提高 25%。【结论】木薯生料发酵生产高浓度燃料乙醇,在技术集成基础上可降低能耗,节约生产成本,具有较好的工业化应用前景。

关键词:生料发酵 响应面法 燃料乙醇 木薯 温度梯度控制

中图分类号:TQ223.12 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2015)01-0037-07

Abstract:【Objective】Very high gravity fuel ethanol production was studied with the fermentation of uncooked cassava flour. 【Methods】First, the important parameters were screened by single factor tests. Second, the optimum values of the parameters were obtained by response surface methodology. And finally, a gradient temperature control strategy was used with the optimized conditions, all of which were used to improve the ethanol concentration. 【Results】The conditions optimized by single factor tests were starch hydrolyzing enzyme dosage 0.8 GAU/g cassava flour, substrate concentration 36% (W/V), and initial pH value 4.2. The optimal concentrations were determined by response surface

methodology. And finally, a gradient temperature control strategy was used with the optimized conditions, all of which were used to improve the ethanol concentration. 【Results】The conditions optimized by single factor tests were starch hydrolyzing enzyme dosage 0.8 GAU/g cassava flour, substrate concentration 36% (W/V), and initial pH value 4.2. The optimal concentrations were determined by response surface

收稿日期:2014-05-20

修回日期:2014-05-29

作者简介:申乃坤(1980-)男,助理研究员,博士研究生,主要从事生物质能源及酶工程方面的研究。

* 国家自然科学基金项目(31160023),国家星火计划项目(2012GA790001),广西自然科学基金项目(2013GXNSFBA019102)和八桂学者建设工程专项经费资助。

** 通讯作者:黄日波(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事分子酶工程研究,E-mail:rbhuang@gxas.ac.cn。

methodology as follows: Starch hydrolyzing enzyme dosage 0.82 GAU/g cassava flour, substrate concentration 37%, and initial pH value 4.3. A gradient temperature control strategy could reduce the reducing sugar and improve the fermentation efficiency. Under such optimum conditions, the ethanol concentration could reach up to 16.24% (V/V), while the reducing sugar and total sugar were 0.29% (W/V) and 1.81% (W/V) correspondingly, after 96 h fermentation. The ethanol content of fermentation mashing increased 25% compared with the original condition. **【Conclusion】**On the basis of integration technology, very high gravity fuel ethanol production and low production cost with the fermentation of uncooked cassava flour may facilitate industrial scale application in future.

Key words: fermentation of uncooked materials, response surface methodology, fuel ethanol, cassava, temperature staging strategy

0 引言

【研究意义】燃料乙醇是目前世界上生产规模最大的生物质能源,联合国工业发展组织曾在维也纳乙醇专题讨论会上指出:“乙醇应该被当做燃料和化工原料永久的和可供选择的来源”^[1]。但以粮食为原料发展燃料乙醇存在“与人争粮,与粮争地”的问题,严重影响我国粮食安全^[2],我国《可再生能源中长期发展规划》明确提出:“不再增加以粮食为原料的燃料乙醇生产能力,合理利用非粮生物质原料生产燃料乙醇”,并提出2020年实现生物燃料乙醇年利用量1000万t的目标。目前,我国非粮燃料乙醇的生产中,只有木薯燃料乙醇达到规模化生产的程度,全国产量约60万t,其中广西约为40万t。但近几年木薯价格的涨幅较大,而乙醇价格的涨幅较小,形成较强的“剪刀效应”^[3],使得企业面临巨大的成本压力,为此许多企业纷纷停产。目前在木薯原料价格很难降低的情况下,降低乙醇生产成本是唯一出路。传统的木薯乙醇生产需要对原料进行蒸煮,尤其是其高压蒸煮工段的能耗、气耗占整个生产工序能量投入的30%~40%^[4],并且由此产生的冷却用水量猛增也使乙醇的生产成本增加。生料发酵则不需要高温蒸煮,不仅大幅度降低蒸汽和水的消耗,减少因蒸煮造成的可发酵糖糖分的损失,而且还可以进一步简化工艺,减少设备的使用,使工作强度大幅下降,降低生产成本。此外,生料发酵还可以避免料浆粘稠问题,发酵醪中的糖浓度保持在低水平,适合酵母的生长,发酵副产物生成量少,淀粉出酒率高,更适合于浓醪发酵。浓醪发酵在乙醇生产企业提高效益、节约能源、保护环境等方面都有非常积极的促进作用,是乙醇行业的发展方向之一。因此,生料浓醪发酵乙醇越来越受到重视,近期的研究逐渐增多。**【前人研究进展】**王丽红等^[5]利用响应面法对小麦生料发酵乙醇的条件进行研究,经过72h发酵乙醇产量可达12.6%(V/V)。陶磊等^[6]对玉米原料生料发酵乙醇的条件进行摸索,

优化酶的用量、底物浓度及液化时间等因素。王年忠等^[7]对陈化小米生料发酵进行中试研究,比较分析发酵过程中酒度、酸度和糖的变化,所得的数据显示新粮与陈化小麦的淀粉出酒率均达到50%以上,生料发酵技术适用于陈化小麦乙醇生产。**【本研究切入点】**有关乙醇的生料发酵主要集中在玉米、小麦等粮食作物,也有木薯^[8]、甘薯^[9,10]等非粮原料的研究报道,但乙醇产量均不高。本研究以木薯生料为原料,在技术集成基础上生产高浓度燃料乙醇。**【拟解决的关键问题】**通过单因素试验对木薯生料发酵高浓度燃料乙醇过程中的关键影响因素进行优化,考虑到各因素的相互作用,利用响应面法确定各影响因素的最佳组合水平,最后通过对木薯生料发酵过程中培养温度的梯度控制,进行一步降低残糖,提高乙醇产量,为木薯生料乙醇发酵的工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种:酿酒酵母GXASY-49^[11]为本实验室选育得到的耐高温高产菌株;木薯粉:本地木薯干片,实验室粉碎后过40目筛,淀粉含量67.56%(W/W)。

斜面培养基(YPED, W/V):葡萄糖2%,酵母粉1%,蛋白胨2%,琼脂2%;种子培养基(YPD, W/V):葡萄糖2%,酵母粉1%,蛋白胨2%;木薯生淀粉发酵培养基:木薯粉以一定比例与自来水混合,添加0.25%(W/V)尿素,0.04%(W/V)硫酸镁。

颗粒淀粉水解酶^[12]:GC004,酶活力为443 GAU/g,1 GAU是由水解生淀粉的酶活力和水解可溶性糊精的糖化酶的活力在规定条件下计算得到。由杰能科段刚博士馈赠。

1.2 菌种发酵^[13]

木薯粉与自来水以一定比例调浆,用6 mol/L HCl调节pH值,装入250 mL三角瓶,装液量为100 mL,并加入颗粒淀粉酶、尿素及硫酸镁,32℃水解4h后接种发酵(接种量10%, V/V)。摇床转速为100

r/min, 发酵时间为 96 h, 测定醪液的残还原糖、残总糖及乙醇含量。每个条件设置 3 个平行, 结果取平均值。根据乙醇产量的增加以及生产成本的降低来确定各因素的最佳的用量。

1.2.1 单因素试验

1.2.1.1 最佳颗粒淀粉酶添加量的确定

将木薯粉浓度调整为 32% (W/V), pH 值调整为 4.5, 颗粒淀粉水解酶 GC004 添加量分别为 0.6 GAU/g 木薯粉、0.8 GAU/g 木薯粉、1.0 GAU/g 木薯粉、1.2 GAU/g 木薯粉, 进行发酵实验, 确定最佳颗粒淀粉酶的添加量。

1.2.1.2 最佳底物浓度的确定

将木薯粉浓度 (W/V) 分别调整为 32%, 34%, 36%, 38%, 40%, 颗粒淀粉水解酶 GC004 用量为 0.8 GAU/g 木薯粉, 进行发酵实验, 确定最佳底物浓度。

1.2.1.3 最适发酵 pH 值确定

将木薯粉浓度为调整为 36% (W/V), 调节 pH 值分别为 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 颗粒淀粉水解酶 GC004 用量为 0.8 GAU/g 木薯粉, 进行发酵实验, 确定最佳发酵 pH 值。

1.2.2 响应面法优化木薯粉生料高浓度乙醇发酵

在单因素试验的基础上, 运用 Box-Behnken 的中心组合设计原理, 对确定的 3 个显著性影响因子各取 3 水平。本项实验安排响应面试验各个因素水平如表 1 所示。

表 1 响应面分析实验参数水平

Table 1 Factors and levers of response surface central composite design

Code	Variables Factors	Level		
		Low(-1)	Center(0)	High(+1)
X ₁	Substrate concentration % (W/V)	34.00	36.00	38.00
X ₂	SHE* dosage (GAU/g substrate)	0.6	0.8	1.0
X ₃	pH Value	4.0	4.2	4.4

* SHE: starch hydrolyzing enzyme

1.2.3 发酵过程梯度降温控制

为了进一步降低生料发酵残糖含量设置了一下梯度降温试验。降温方式如表 2 所示。

1.3 测定方法

还原糖浓度的测定: 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 比色法^[14]。

总糖浓度的测定: 酸水解法^[15], 水解后用 DNS 比色法测定还原糖的含量。

乙醇浓度的测定: 气相色谱法^[16]。

表 2 不同梯度降温方式控制发酵温度

Table 2 Different fermentation temperature staging ways

Fermentation time(h)	Temperature(°C)				
	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4	Model 5
0~24	32	32	32	32	25
24~48	32	30	32	32	25
48~72	32	30	25	32	25
72~96	32	30	25	25	25

2 结果与分析

2.1 颗粒淀粉水解酶添加量的影响

木薯生料发酵时, 淀粉中糖的释放完全依靠酶的作用。酶用量太低, 木薯水解速率低, 水解效果差, 会影响原料转化率及乙醇产量; 而酶用量太高会增加生产成本。由图 1 可以看出: 颗粒淀粉水解酶用量对乙醇产量影响显著, 当酶用量低于 0.8 GAU/g 木薯粉时, 乙醇产量随酶量增加而升高, 而残总糖量随酶量增加而降低; 当酶用量大于 0.8 GAU/g 木薯粉时, 酶量的增加对乙醇产量的影响不大, 但会增加乙醇生产成本。因此, 确定颗粒淀粉水解酶的合适用量为 0.8 GAU/g 木薯粉。

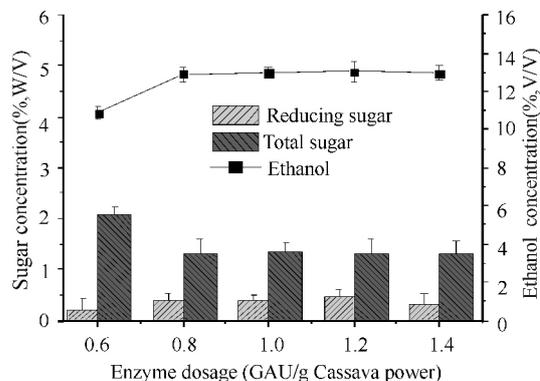


图 1 颗粒淀粉水解酶用量对乙醇发酵的影响

Fig. 1 Effect of the dosage of starch hydrolyzing enzyme on ethanol fermentation

2.2 底物浓度影响

从图 2 可以看出: 木薯粉浓度直接决定着发酵醪液的总糖浓度, 当木薯粉浓度超过 36% (W/V), 发酵醪液的残总糖含量很高, 原料转化率较低。这是因为当乙醇浓度高于 5% 时, 酵母出芽和生长受到抑制; 当乙醇浓度高于 15% (V/V) 时, 酵母代谢受到抑制^[12]。而本试验后期醪液乙醇浓度在 15% (V/V) 左右, 酵母生长和代谢受到抑制, 从而会使发酵时间延长, 残糖含量升高, 发酵效率降低, 影响原料和发酵设备的利用率。当木薯粉浓度低于 36% (W/V) 时, 发酵醪液的总糖浓度过低, 发酵结束后醪液乙醇含量低, 增加蒸馏时的能耗和废水的排放量, 从而增加乙

醇的生产和后处理成本。综合考虑到原料的利用率和乙醇后处理的成本,木薯生料发酵的最适木薯粉浓度为 36%(W/V)。

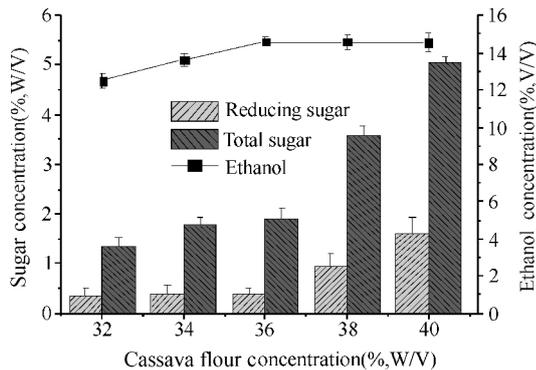


图 2 木薯粉浓度对乙醇发酵的影响

Fig. 2 Effect of the cassava flour concentration on ethanol fermentation

2.3 发酵初始 pH 值的影响

发酵 pH 值对乙醇生料发酵具有重要的影响:第一,pH 对酵母菌的生命活动有显著影响,菌体的生长、产酶能力、所产酶的活力高低以及营养物质进入细胞的速度与醪液的 pH 值有关;第二,pH 影响颗粒淀粉水解酶的酶活,从而影响木薯粉水解效果,进一步影响发酵结果;第三,pH 与杂菌生长有密切关系,生料发酵过程不经过高温蒸煮工序,且发酵时间较长,容易染菌,较低 pH 能抑制乳酸菌、乙酸菌等杂菌生长。

由图 3 可以看出:pH 值在 4.0~4.4 时,发酵醪的乙醇含量相对较高。pH 值低于 4.0 时,发酵残糖含量偏高,这与颗粒淀粉水解酶活性(最适 pH 值为 4.3)和菌体的生理状态受到抑制有关;而 pH 值高于 4.4 时,环境有利于杂菌生长,会产生较多的挥发酸,导致乙醇产量降低,影响发酵效率。因此,木薯生料发酵最优的初始 pH 值为 4.2。

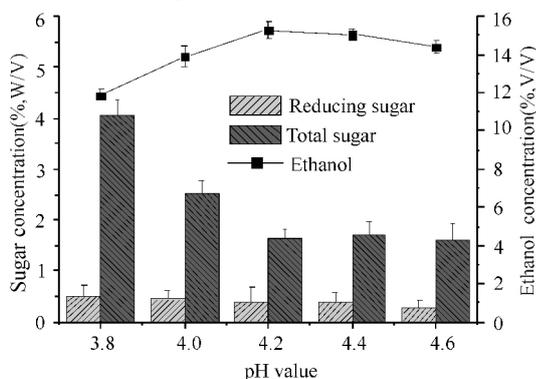


图 3 初始 pH 值对乙醇发酵的影响

Fig. 3 Effect of the initial pH value on ethanol fermentation

2.4 响应面法优化木薯生料高浓度乙醇发酵

根据响应面分析试验软件设计了 3 因素 3 水平

共 15 个实验点进行响应面分析,试验安排及结果见表 3。15 个试验点分为两类,一类是析因点,共 12 个;一类是零点(试验点 3,11,13)为区域的中心点。零点重复 3 次,用于估计试验的误差。

表 3 Box-Bohnkon 试验设计和结果

Table 3 Experimental design of Box-Bohnkon and corresponding results

Run	X_1	X_2	X_3	Y % (V/W)
1	0	1	-1	14.11
2	-1	0	1	14.30
3	0	0	0	15.66
4	-1	-1	0	14.03
5	1	0	-1	14.31
6	1	1	0	14.47
7	0	-1	-1	13.82
8	-1	0	-1	14.21
9	1	0	1	15.76
10	0	1	1	14.96
11	0	0	0	15.63
12	-1	1	0	13.70
13	0	0	0	15.65
14	0	-1	1	14.33
15	1	-1	0	14.51

根据表 3 的试验结果,以乙醇产率 Y 值为响应值,对数据进行回归分析,试验因子对响应值的影响可得到如下方程: $Y = 15.65 + 0.35X_1 + 0.07X_2 + 0.36X_3 + 0.07X_1X_2 + 0.34X_1X_3 + 0.08X_2X_3 - 0.56X_{12} - 0.90X_{22} - 0.44X_{32}$ 。

决定系数 $R^2 = 0.9861$,说明方程的拟合度很好,可以用该回归方程代替真实试验点结果进行分析。回归方程的方差分析还表明,一次项和二次项对响应值的影响是十分显著的,交互项的影响不明显,试验因子与响应值之间不是线性关系。

对响应面实验进行方差分析(表 4),结果表明:“Model Prob> F”等于 0.003 远小于 0.05,说明模型是重要的。一般认为,相关系数 R^2 大于 0.9,表明预测值与试验值具有高度相关性^[17]。在这个试验中, $R^2 = 0.9861$,表明仅有不到 2%的乙醇产量变异不能由该模型解释。

图形能够提供一种形象的观测响应值和试验参数水平关系的方法。通过上面多元回归方程做响应曲面,结果见图 4。

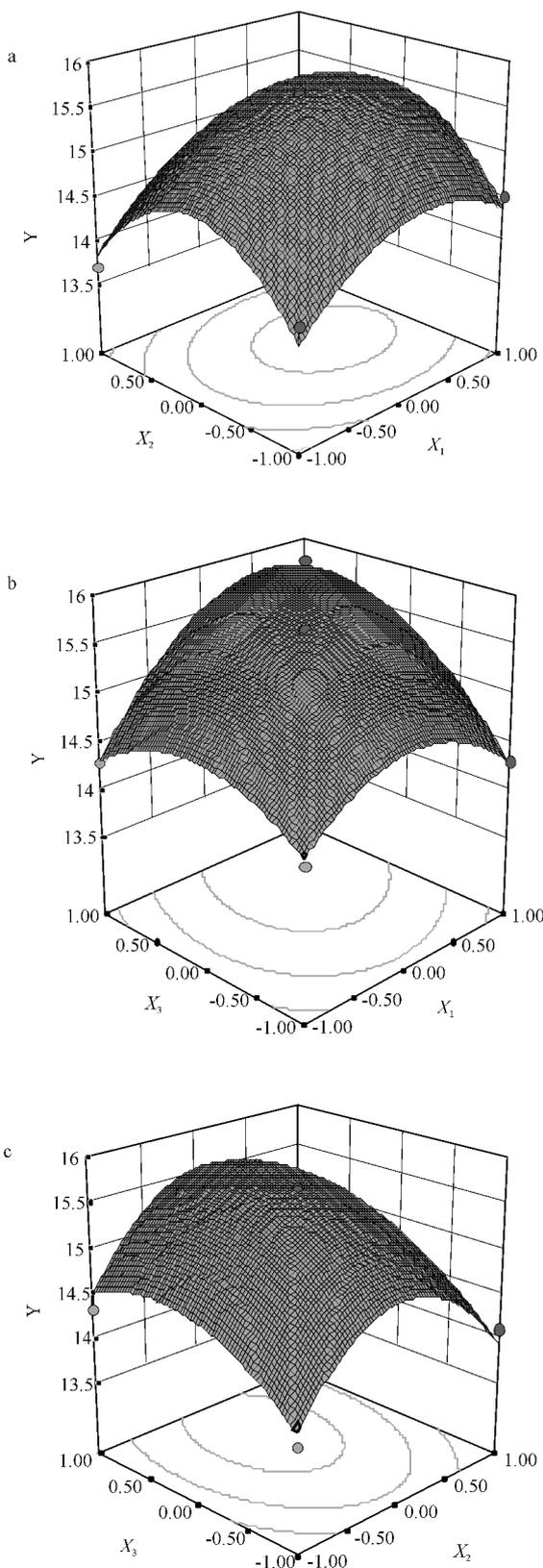


图 4 各因素交互作用对乙醇影响的响应面

Fig. 4 Response surface plot showing the interactional effects of various factors on ethanol content

a: 底物浓度与颗粒淀粉水解酶用量; b: 底物浓度与初始 pH 值; c: 颗粒淀粉水解酶用量与初始 pH 值

a: Substrate concentration and starch hydrolyzing enzyme; b: Substrate concentration and pH value; c: Starch hydrolyzing enzyme and pH value

表 4 Box-Bohnkon 试验方差分析结果

Table 4 Analysis of Variance of Box-Bohnkon experiment

Term	SS	DF	MS	F	Pr>F
model	6.93	9	0.770	16.87	0.0031
X_1	0.99	1	0.99	21.66	0.0056
X_2	0.039	1	0.039	0.83	0.4029
X_3	1.050	1	1.050	23.04	0.0049
$X_1 * X_1$	1.180	1	1.180	25.76	0.0038
$X_1 * X_2$	0.022	1	0.022	0.47	0.5220
$X_1 * X_3$	0.460	1	0.460	10.16	0.0243
$X_2 * X_2$	3.01	1	3.010	65.87	0.0005
$X_2 * X_3$	0.029	1	0.029	0.64	0.4586
$X_3 * X_3$	0.71	1	0.710	15.62	0.0108
Lack of fit	0.23	3	0.076	338.82	0.0029

由响应面的规范分析可知,回归模型存在最大稳定点。Y 的最大估计值为 15.85,最佳点为 $X_1 = 0.5$ 、 $X_2 = 0.09$ 、 $X_3 = 0.62$,即底物浓度为 37% (W/V),颗粒淀粉水解酶添加量为 0.82 GAU/g 木薯粉,最适初始 pH 值为 4.3,此点醪液的乙醇浓度为 15.85% (V/V)。对最佳点进行 3 次 250 mL 三角瓶验证试验,测定发酵过程残还原糖和乙醇浓度的变化,取平均值,其结果见图 5。乙醇产量平均值为 15.78% (V/V),残总糖含量为 1.68% (W/V),表明预测值与验证试验很接近,说明回归方程能够比较真实地反映各筛选因素对乙醇发酵的影响。

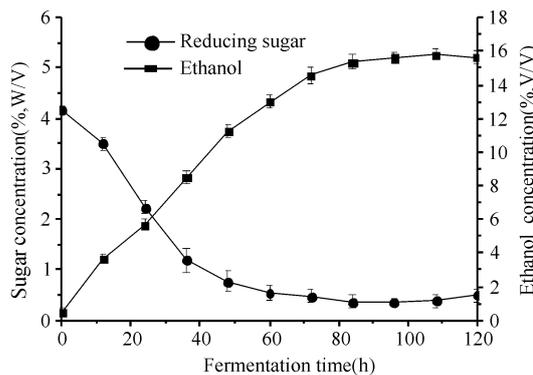


图 5 250 mL 三角瓶发酵试验结果

Fig. 5 Fermentation result of 250 mL erlemeyer flask

2.5 发酵过程梯度降温控制的影响

从发酵结果看,发酵结束后醪液残还原糖含量和残总糖含量偏高,影响木薯生料高浓度乙醇发酵的产业化前景。许宏贤等^[12]采用降温控制可实现乙醇产量增加,残糖浓度降低的目的。为了进一步降低生料发酵残糖含量,我们进行梯度降温试验,发酵结果如表 5。

从梯度降温试验结果可以看出:发酵温度与醪液的残还原糖、残总糖浓度密切相关,残总糖含量随发酵温度的降温而增加,残还原糖含量与梯度降温的时间有关。与方式 1 相比,方式 5 的培养温度一直为较

低的温度(25℃),颗粒淀粉酶的酶活较差,导致木薯粉被水解的效果较差,残总糖含量较高,乙醇产量较低;方式2的发酵结果也不尽如人意,可能与发酵24 h后开始降温,降温时间太早,影响颗粒淀粉酶的活性,使木薯粉水解过程延长,从而使发酵时间增加;方式4采用72 h降温,此时醪液乙醇浓度较高,酵母出现乙醇中毒症状,生理代谢缓慢,再降低温度对发酵结果影响不是很大;方式3采用发酵48 h后降温,可大幅度降低残还原糖含量,原因可能是采取适当的温度梯度控制策略,使酵母细胞的活力得以长久维持,增强了酵母生产乙醇的能力和对乙醇的耐受性^[18]。由此可见,生料发酵过程中,培养温度越高前期木薯粉水解速率较高,乙醇的生产速率也越高,但酵母衰老也越早,乙醇抑制作用表现得也越明显;低温发酵虽然非常有利于发酵后期酒精的生产,但前期产酒速度较慢,发酵周期偏长。有关温度梯度控制的最优方式及机理还有待进一步研究。

表5 温度变化对发酵结果的影响

Table 5 Effect of the temperature on ethanol fermentation

Model	Concentration(%)			Fermentation efficiency(%)
	Ethanol (V/V)	Reducing sugars(W/V)	Total sugars (W/V)	
1	15.82	0.44	1.70	88.72
2	15.64	0.20	2.15	87.72
3	16.24	0.29	1.81	91.08
4	16.01	0.40	1.77	89.79
5	14.33	0.14	3.88	80.37

3 结论

本研究对木薯生料高浓度乙醇发酵的条件进行了优化,先用单因素试验确定主要影响因素的最优水平:颗粒淀粉酶用量为0.8 GAU/g木薯粉,底物浓度为36%(W/V),初始pH值为4.2。再用响应面法对各主要因素的相互作用进行进一步优化,优化结果:颗粒淀粉水解酶用量为0.82 GAU/g木薯粉,底物浓度为37%(W/V),初始pH值为4.3。为进一步降低醪液残糖含量,提高发酵效率,我们对发酵温度采用梯度降温控制。在技术集成基础上,对木薯生粉发酵96 h,醪液乙醇含量可达16.24%(V/V),残还原糖含量为0.29%(W/V),残总糖含量为1.81%(W/V)。与初始条件相比,乙醇产量提高了25%。因此,木薯生料发酵生产高浓度燃料乙醇,可降低生产成本,具有较好的工业化应用前景。

参考文献:

[1] 雷国光. 用纤维质原料生产燃料乙醇是我国再生能源发展的方向[J]. 四川食品与发酵, 2007, 43(135):39-42.

Lei G G. Cellulose fuel ethanol will be the way of renewable energy in China[J]. Sichuan Food and Fermentation, 2007, 43(135):39-42.

[2] 潘诗翰, 陈姗姗, 黄庶冰, 等. *Zymobacter palmae* 菌株发酵甘露醇生产乙醇的条件优化[J]. 广西科学, 2012, 19(2):165-168.
Pan S H, Chen S S, Huang S B, et al. Condition optimization of ethanol fermentation of mannitol by *Zymobacter palmae* strain [J]. Guangxi Sciences, 2012, 19(2):165-168.

[3] 韦昌联, 卢柳忠, 黎贞崇. 我国木薯生物质能源产业发展现状与科技需求[J]. 酿酒科技, 2012, 7:108-111.
Wei C L, Lu L Z, Li Z C. Scientific and technical demand and current situations of cassava biomass energy industry in China [J]. Liquor-making Science & Technology, 2012, 7:108-111.

[4] 卢晓霆, 张太日, 闫俊, 等. 玉米生料发酵生产燃料乙醇工艺研究[J]. 中国酿造, 2009, 7: 128-132.
Lu X T, Zhang T R, Yan J, et al. Fuel alcohol production technology with the fermentation of uncooked corn flour[J]. China Brewing, 2009, 7:128-132.

[5] 王丽红, 姜晓燕. 响应面法优化小麦淀粉生料酒精发酵工艺条件[J]. 中国酿造, 2012, 31(4): 68-71.
Wang L H, Jiang X Y. Optimization of ethanol fermentation from uncooked wheat starch by response surface methodology [J]. China Brewing, 2012, 31(4):68-71.

[6] 陶磊, 王芳, 张伟民, 等. 玉米生料发酵生产乙醇的工艺研究[J]. 酿酒科技, 2013, 11:59-62.
Tao L, Wang F, Zhang W M, et al. Fuel alcohol production technology with the fermentation of uncooked corn flour [J]. Liquor-making Science & Technology, 2013, 11:59-62.

[7] 王年忠, 赵二永, 王芳, 等. 陈化小麦生料酒酒精发酵的中试[J]. 食品与发酵工业, 2013, 8:81-86.
Wang N Z, Zhao E Y, Wang F, et al. The pilot scale study on aged wheat ethanol production by no-cook technology[J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 8:81-86.

[8] 沈晖, 常亮, 封杏子, 等. 木薯生料发酵制备燃料乙醇的工艺条件研究[J]. 食品工业, 2012, 33(4):76-79.
Shen H, Chang L, Feng X Z, et al. The study on the processing of fuel ethanol from uncooked cassava[J]. The Food Industry, 2012, 33(4):76-79.

[9] 黄加军, 张倩勉, 崔师泰, 等. 高效生料淀粉酶在木薯生料发酵酒精中的应用[J]. 轻工科技, 2013, 6:25-28.
Huang J J, Zhang Q M, Cui S T, et al. Application high performance starch ucooked hydrolyzing enzyme summarize of fermentation with uncooked materials in ethanol fermentation of cassava flour[J]. Light Industry Science & Technology, 2013, 6:25-28.

ence and Technology, 2013, 6: 25-28.

- [10] 阮振华, 许宏贤, 段钢. 甘薯生料酒酒精发酵[J]. 食品与发酵工业, 2009, 35(9): 6-9.
Run Z H, Xu H X, Du G. No-cook process for sweet potato ethanol production [J]. Food and Fermentation Industries, 2009, 35(9): 6-9.
- [11] 秦艳, 申乃坤, 莫勇生, 等. 黄浆水与木薯粉混合发酵高浓度乙醇的发酵研究[J]. 广西科学, 2012, 19(2): 249-252.
Qin Y, Shen N K, Mo Y S, et al. Thechniques for fermentating high - concentration ethanol from mixing yellow serofluid and cassava [J]. Guangxi Sciences, 2012, 19(2): 249-252.
- [12] 许宏贤, 段钢. 温度对超高浓度酒精生料发酵体系的影响[J]. 生物工程学报, 2010, 26(3): 330-334.
Xu H X, Duan G. Effect of temperature on the no cook, very high gravity ethanol fermentation process [J]. China Journal of Biotechnology, 2010, 26(3): 330-334.
- [13] 申乃坤, 王青艳, 黄日波, 等. 响应面法优化耐高温酵母生产高浓度乙醇[J]. 生物工程学报, 2010, 26(1): 42-47.
Shen N K, Wang Q Y, Huang R B, et al. Enhancing ethanol production by using thermophilic yeast by response surface methodology [J]. China Journal of Biotechnology, 2010, 26(1): 42-47.
- [14] Rasmus D, Sven P, Lisbeth O. Characterization of very

high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2005, 68: 622-629.

- [15] Wang L S, Ge X Y, Zhang W G. Improvement of ethanol yield from raw corn flour by *Rhizopus* sp. [J]. World Journal Microbiology Biotechnology, 2007, 23: 461-465.
- [16] Tao F, Miao J Y, Shi G Y, et al. Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 183-187.
- [17] Azma M, Mohamed M S, Mohamed R, et al. Improvement of medium composition for heterotrophic cultivation of green microalgae, *Tetraselmis suecica*, using response surface methodology [J]. Biochemical Engineering Journal, 2011, 53: 187-195.
- [18] 申乃坤, 王青艳, 秦艳, 等. 木薯粉与甘蔗汁混合发酵生产高浓度乙醇[J]. 生物工程学报, 2010, 26(9): 1-7.
Shen N K, Wang Q Y, Qin Y, et al. Enhancing ethanol production by using thermophilic yeast by response surface methodology [J]. China Journal of Biotechnology, 2010, 26(9): 1-7.

(责任编辑: 米慧芝)

(上接第 36 页 Continue on page 36)

- [9] Ohtaki A, Iguchi A, Mizuno M, et al. Mutual conversion of substrate specificities of *Thermoactinomyces vulgaris* R-47 alpha-amylases TVA I and TVA II by site-directed mutagenesis [J]. Carbohydr Res, 2003, 338(15): 1553-1558.
- [10] Lee H S, Kim M S, Cho H S, et al. Cyclomaltodextrinase, neopullulanase, and maltogenic amylase are nearly indistinguishable from each other [J]. J Biol Chem, 2002, 277(24): 21891-21897.
- [11] Choi J H, Lee H, Kim Y W, et al. Characterization of a novel debranching enzyme from *Nostoc punctiforme* possessing a high specificity for long branched chains [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 378(2): 224-229.
- [12] Song H N, Jung T Y, Park J T, et al. Structural rationale for the short branched substrate specificity of the glycogen debranching enzyme GlgX [J]. Proteins, 2010, 78(8): 1847-1855.
- [13] Oh S W, Jang M U, Jeong C K, et al. Modulation of hydrolysis and transglycosylation activity of *Thermus maltogenic* amylase by combinatorial saturation muta-

genesis [J]. J Microbiol Biotechnol, 2008, 18(8): 1401-1407.

- [14] 杜丽琴, 庞浩, 胡媛媛, 等. 蔗糖富集环境土壤微生物宏基因组分析及蔗糖水解相关酶基因克隆 [J]. 应用与环境生物学报, 2010, 16(3): 403-407.
Du L Q, Pang H, Hu Y Y, et al. Metagenomic analysis of microbes from sucrose-enriched environment and cloning of sucrose hydrolase genes [J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2010, 16(3): 403-407.
- [15] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar [J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426-428.
- [16] 闭海, 莫莉, 郭媛, 等. 环糊精水解酶底物运输通道的动态结构分析 [J]. 广西科学, 2014, 21(1): 12-16.
Bi H, Mo L, Guo Y, et al. Dynamic structural study on substrate transport channels of cyclodextrin hydrolase [J]. Guangxi Sciences, 2014, 21(1): 12-16.

(责任编辑: 陆雁)