

doi: 10.3969/j.issn.1673-5854.2016.03.011

· 综述评论——生物质能源 ·

# 木质纤维原料同步糖化发酵制取生物乙醇研究进展

高月淑<sup>1</sup>, 许敬亮<sup>2</sup>, 袁振宏<sup>2</sup>, 张宁<sup>1</sup>, 蒋剑春<sup>1\*</sup>

(1. 中国林业科学研究院林产化学工业研究所; 生物质化学利用国家工程实验室; 国家林业局林产化学工程重点开放性实验室; 江苏省生物质能源与材料重点实验室, 江苏南京 210042;  
2. 中国科学院广州能源研究所, 广东广州 510640)

**摘要:** 简单介绍了同步糖化发酵及其优势, 综述了同步糖化发酵工艺近年来在工艺参数、工艺流程及发酵微生物等方面的最新研究进展, 着重介绍了耐高温酵母的选育及其在同步糖化发酵制取生物乙醇中的应用, 这有可能成为解决同步糖化发酵工艺中酶解和发酵温度不协调问题的最重要途径。

**关键词:** 木质纤维原料; 生物乙醇; 同步糖化发酵

中图分类号: TQ35; TK6

文献标识码: A

文章编号: 1673-5854(2016)03-0065-06

## Research Progress in Bioethanol Production through Simultaneous Saccharification and Fermentation with Lignocellulose

GAO Yue-shu<sup>1</sup>, XU Jing-liang<sup>2</sup>, YUAN Zhen-hong<sup>2</sup>, ZHANG Ning<sup>1</sup>, JIANG Jian-chun<sup>1</sup>

(1. Institute of Chemical Industry of Forest Products, CAF; National Engineering Lab. for Biomass Chemical Utilization; Key and Open Lab. of Forest Chemical Engineering, SFA; Key Lab. of Biomass Energy and Material, Jiangsu province, Nanjing 210042, China; 2. Guangzhou Institute of Energy Conversion, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) and its advantage were briefly introduced. The recent progress in the process parameters, process flow and fermentative microbe were reviewed. Intensively, the breeding of thermotolerant yeast and its application in the production of bio-ethanol with SSF process were introduced. This might be the most important method to solve the problem of the incoordination in optimal temperature of cellulose hydrolysis and microorganism fermenting of SSF.

**Key words:** lignocellulose; bio-ethanol; simultaneous saccharification and fermentation

我国的木质纤维原料资源丰富, 仅农作物秸秆每年产量就有 7.04 亿吨, 其中玉米秸 (3.05 亿吨)、小麦秸 (1.49 亿吨) 和稻草 (1.16 亿吨) 是我国主要的 3 大秸秆资源<sup>[1]</sup>。以木质纤维原料生产的生物乙醇, 具有经济、环保等诸多优点, 是近年来生物能源领域研究的热点。生物乙醇是生物质液体能源物质的主要形式, 也是化石燃料最理想的替代品。有研究表明, 其燃烧时排放的温室气体比汽油少 90%, 而且远低于谷物类乙醇燃料<sup>[2]</sup>, 在当前能源日益紧缺的形势下, 积极开发高效的生物乙醇生产工艺具有重要的社会及经济意义。传统的木质纤维原料生产乙醇技术路线主要包括预处理脱除木质素、酶水解转化纤维素为还原糖和微生物发酵生成乙醇 3 步。尤其在糖化发酵耦合工艺开发方面, 已经开发出包括分步糖化发酵 (SHF)、同步糖化发酵 (SSF)、联合生物加工 (CBP) 以及固态发酵等技术工艺, 其中美国国家可再生能源实验室于 1995 年 3 月修建了采用同步糖化发酵工艺的中试工厂, 该工艺是美国现在玉米生物乙醇行业所采用的主要方法, 也是最具发展潜力和优势的方法之一<sup>[3]</sup>。作者综述了同步糖化发酵工艺近年来在增加乙醇浓度、优化工艺流程及提高反应体系温度等方面的最新研究进展, 着重介绍了选育耐高温的酵母, 实现高温下的同步糖化发酵工艺, 为燃料乙醇的工业化生产提供新的思路。

收稿日期: 2015-11-18

基金项目: “十二五” 国家科技支撑计划资助 (2014BAD02B02); 中国科学院可再生能源重点实验室开放基金 (y507k71001)

作者简介: 高月淑 (1986—), 女, 山东临沂人, 助理研究员, 博士, 主要从事生物质化学品研究工作

\* 通讯作者: 蒋剑春, 研究员, 博士, 博士生导师, 主要从事林产化学加工和生物质能源开发技术研究; E-mail: bio-energy@163.com。

## 1 同步糖化发酵及其优势

同步糖化发酵(SSF)的概念在1976年由Gauss等<sup>[4]</sup>提出,以纤维素原料作为底物,加入纤维素酶复合物和酵母,使酶水解糖化和微生物发酵两个过程在一个反应器中同时进行。纤维素水解产生的葡萄糖通过酵母的代谢作用迅速发酵为乙醇,不会有糖的大量累积,使得酶促反应尤其是纤维二糖转化为葡萄糖的过程得以顺利进行。与传统的分步糖化发酵(SHF)工艺相比,SSF可以有效降低纤维素酶的用量,尤其是 $\beta$ -葡萄糖苷酶的添加量,同时减少了反应器个数,节约20%的设备投资成本<sup>[5]</sup>。另外,体系中较低的葡萄糖浓度可减少被杂菌污染的机会<sup>[6]</sup>。表1列举了部分SSF和SHF工艺的发酵参数,通过对比可以看出,大多数的SSF工艺能够用较短的时间,获得更高的乙醇产量,显示出同步糖化发酵工艺在缩短反应时间,提高乙醇产量方面的优势。

表1 几组SSF和SHF工艺的发酵参数比较

Wingren等<sup>[7]</sup>以经过二氧化硫高压蒸汽预处理处理的杉木为原料,分别通过SHF和SSF两种方法生产乙醇,并从技术性和经济性角度对两种工艺进行了分析和对比,核算结果显示SHF的生产成本为0.63美元/升,而SSF的生产成本为0.57美元/升,通过提高工艺体系中的底物浓度以及循环使用60%的蒸馏蒸汽,可以将SSF成本进一步降低到0.37美元/升,显示出良好的工业应用前景。

Table 1 Parametric comparison of several SHF and SSF processes

底物 substrate	工艺 type of process	温度/℃ temp.	时间/h time	乙醇产量 ethanol yield
蒸汽爆破麦秆 <sup>[8]</sup> steam-exploded wheat straw	SHF	37	120	5%
	SSF	37	72	10%
蒸汽爆破麦秆 <sup>[9]</sup> steam-exploded wheat straw	SHF	37~45	96	81%
	SSF	37	30	68%
蒸汽爆破云杉 <sup>[10]</sup> steam-exploded spruce	SHF	37	72	40%
	SSF	37	72	60%
再生纸污泥 <sup>[11]</sup> recycled paper sludge	SHF	30~35	59~120	19.6 g/L
	SSF	30	48	18.6 g/L

## 2 同步糖化发酵工艺优化

影响SSF的工艺因素主要包括温度、酶负载量、酵母浓度、pH值、底物浓度以及酵母菌株类型等<sup>[12-13]</sup>。一方面,研究者们选取部分因素作为变量进行优化研究,另一方面,研究者们采用改进工艺流程的方式对SSF工艺进行整合,以提高整个进程的效率。

### 2.1 底物浓度

有研究表明,当乙醇质量浓度低于40 g/L,后期蒸馏提纯的成本会大幅度增加<sup>[7]</sup>。为了降低成本、提高燃料乙醇生产的经济性,必须提高体系中乙醇的体积分数,增加底物浓度是最直接的办法。然而,随着底物浓度的增加,会造成有害物质的积累、体系黏度增大、传质和传热受阻同时伴随着乙醇转化率下降等一系列问题<sup>[14]</sup>。通过分批加料的方式逐渐增加底物浓度,可以使反应体系中不溶性固体的含量维持在相对较低水平,同时在发酵过程中部分抑制物可以被微生物转化,从而降低有害物质对整个反应的抑制作用<sup>[15-16]</sup>。很多研究者都采用分批加料的方式进行发酵产乙醇的研究。Liu等<sup>[17]</sup>以经酸碱预处理的玉米芯作为底物,比较了一次性补料和分批补料方式对同步糖化发酵生产乙醇的影响,发现分批补料方式可以大大提高乙醇的生产效率,在底物质量分数为15%时,经141.5 h发酵最终乙醇质量浓度为57.2 g/L。Zhang等<sup>[18]</sup>通过酸碱综合预处理去除玉米芯中非纤维素的部分,在底物质量分数为15%时经SSF过程120 h,乙醇质量浓度为69.2 g/L,采用分批补料方式提高体系中底物质量分数至25%,最终乙醇质量浓度为84.7 g/L,是迄今为止国内外报道的最高的乙醇浓度。因此,将分批补料与同步糖化发酵相结合是解决乙醇发酵浓度较低问题的有效途径。

### 2.2 发酵温度

同步糖化发酵工艺虽然有诸多优点,但也存在一些缺陷。尤其是纤维素酶最适的酶解温度是在45~50℃之间,而酵母的最适宜发酵温度一般在30~37℃之间,两者最适温度范围存在明显的差别。目前,SSF工艺通常的做法是采用折中的37℃<sup>[19]</sup>。但是这样使得两个过程都不能得到最合适的温度,在

一定程度上降低了水解和发酵的速率。实际上,通过蛋白质工程很难降低纤维素酶的最适反应温度,因此,提高乙醇发酵酵母的最适发酵温度就成为解决这一问题的关键<sup>[20]</sup>。选择耐高温的高产发酵菌株进行高温同步糖化发酵,正受到越来越多的关注和研究,它可使发酵反应体系中的温度更加接近酶解最适温度,同时又不影响酵母的发酵能力,不但能够发挥SSF工艺的优势,又可以提高酶解效果,使两步反应温度更加协调,提高整个SSF过程的效率。同时,采用高温同步糖化发酵的方式可以降低控温和蒸馏成本、减少醪液污染的几率,尤其适合热带地区的乙醇生产<sup>[21]</sup>。

Lin等<sup>[22]</sup>以NaOH处理的甘蔗渣为原料,考察37、42和45℃条件下克鲁维氏酵母(*Kluveromyces marxianus* var. *marxianus*)对SSF生产乙醇的影响。结果发现,在42℃下乙醇产量最高,达到理论值的92.2%,这主要是因为37℃下纤维素酶活性较低,酶水解产生的可发酵性糖较少,导致最终转化得到的乙醇产量较低,而45℃时温度过高又严重阻碍了酵母自身生长代谢机能,使得可发酵性糖到乙醇的转化过程受阻。因此,在微生物可耐受的温度范围内,适当提高反应温度对最终乙醇产量的提高十分有利。

### 2.3 发酵微生物

为了解决SSF工艺中酶解和发酵温度不协调的问题,人们将目光投到高温酵母的选育上,并挑选性状优良的菌株进行同步糖化发酵试验。长期以来,高温酵母菌株的选育主要集中在高温驯化和自然界筛选。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)作为乙醇生产中发酵性能优良的传统微生物吸引了许多研究者的关注,Edgardo等<sup>[23]</sup>对酿酒酵母属的11株菌株在35~45℃下的生长和发酵利用葡萄糖的情况进行了研究,经过高温驯化和富集培养获得一株耐温和发酵性能良好的IR2-9a酵母,以有机溶剂预处理后的松木片作为底物,40℃下获得的乙醇质量浓度为22g/L,比原始菌株提高了5倍。也有一些学者从热带地区分离筛选耐高温的酿酒酵母,用于燃料乙醇的生产<sup>[24-25]</sup>。研究发现,*K. marxianus*具有更强的耐高温能力,同时发酵产乙醇的能力也很强,利用其进行SSF生产乙醇的整体性能明显优于*S. cerevisiae*<sup>[26-28]</sup>。Szczo drak等<sup>[29]</sup>从12个属中挑选58株菌,测试它们在40℃以上的生长和发酵性能,发现豆孢酵母属(*Fabospora*)和克鲁维氏酵母属(*Kluveromyces*)中的一些酵母能在46℃的高温下生长,其中*F. fragilis* CCY51-1-1在43℃能将140g/L的葡萄糖转化获得56g/L乙醇,发酵性能优良。Ballesteros等<sup>[30]</sup>通过研究来自假丝酵母属(*Candida*)、酿酒酵母属(*Saccharomyces*)和克鲁维氏酵母属(*Kluveromyces*)的27株酵母菌在32~45℃下的生长和发酵情况,发现*K. marxianus*和*K. fragilis*在高温条件下有更好的乙醇生产性能,在SSF试验中,以10%亚硫酸盐纸浆作为底物,纤维素酶添加量为15FPU/g,42℃下发酵78h最高能够产生38g/L的乙醇。Castro等<sup>[31]</sup>对比了在45℃下5株克鲁维氏酵母的发酵能力,发现NRRL Y-6860的乙醇生产性能最优,将其用于SSF试验中并以8%稀酸预处理的稻秆作为底物,最高乙醇产量为0.24g/g。

随着科学技术的发展,一些新兴的技术包括诱变、离子束注入、基因工程等应用于高温酵母选育也逐渐表现出喜人的前景。Cha等<sup>[28]</sup>利用溴化乙锭诱变*S. cerevisiae*获得一株呼吸缺陷型菌株mbc 2,利用NaOH预处理的芒草进行SSF试验,在42℃、葡聚糖底物质量分数为3%条件下发酵48h,可以获得15.3g/L乙醇,对应的乙醇产率为理论值的90.1%。Watanabe等<sup>[32]</sup>获得了一株*Candida glabrata*突变体,不仅具有很高的乙醇发酵效率,对醪液中的酸性物质以及温度也具有很强的耐受能力。以50g/L的结晶纤维素为底物,在42℃下此株呼吸缺陷性菌株经发酵可以获得质量浓度高达17g/L的乙醇,表现出良好的耐温高产特性。Ishchuk等<sup>[33]</sup>通过分子生物学手段构建出能够过量表达热休克蛋白Hsp16p和Hsp104p的汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*),其耐高温能力提高了12倍,在50℃下转化木糖生成乙醇的能力提高了5.8倍。An等<sup>[34]</sup>通过对6-磷酸海藻糖合酶的基因TPS1的过量表达,发现在乙醇生产中6-磷酸海藻糖合酶的活性显著,同时能够累积更多海藻糖。*S. cerevisiae*的极限生长温度从36℃提高到42℃,38℃下乙醇的产量提高近70%。Shi等<sup>[35]</sup>以工业菌株SM-3为研究对象,通过原生质体紫外诱变和基因组重排的方式,获得1株性能优良的F34,该菌株可以在45~48℃下利用200g/L的葡萄糖,产生78.7g/L的乙醇,同时可以耐受体积分数25%的乙醇,极大提高了原始菌株的耐温、耐乙醇以及乙

醇产率等方面的性能。

总体来说,通过自然界筛选和新兴技术手段的组合运用,酵母对温度的耐受性得到很大提高,研究者们已经获得了一些具有优良性能的耐温菌株,有的菌株甚至可以在 45 °C 条件下生长,但目前实际用于 SSF 发酵试验中的高温菌株主要集中在 42 °C。因为随着温度的进一步提高,酵母细胞受到高温的胁迫作用,逐渐造成其生理生化性能的改变,代谢糖类产乙醇的能力会逐渐下降,表现出发酵性能的显著降低<sup>[28]</sup>。在众多微生物中, *K. marxianus* 有较好的耐温性能,是用于高温同步糖化发酵最受关注的酵母之一,将糖基水解酶、木糖代谢等基因插入其中,通过细胞代谢工程和表面展示表达技术,构建一个工程化的超级菌,以实现多糖水解酶的生产、水解糖化、戊糖和己糖发酵全部融于一个反应体系中进行,可能会成为未来 SSF 工艺乃至整个生物燃料乙醇的发展方向。

## 2.4 工艺流程改进

经典的 SSF 发酵工艺是直接将合适比例的纤维素酶、木质纤维原料底物和酵母放入同一个反应器中。为了更好地发挥 SSF 的优势,研究者们通过改变工艺流程的方式对其进行了优化,如尝试采用循环温度同步糖化发酵(CTSSF)、变温同步糖化发酵(TS-SSF)以及同步水解分离发酵(SSFF),与传统 SSF 的等温相比,这些改进使得纤维素酶的水解效果明显增强。CTSSF 法由 Chen 等<sup>[8]</sup>提出,即先在 42 °C 下酶水解 15 min,然后调节温度至 37 °C 进行同步糖化发酵 10 h,重复此过程,然后发酵 72 h,与相应的 37 °C SSF 相比,乙醇产量提高 50%。Kang 等<sup>[36]</sup>采用 TS-SSF 的方法,利用耐高温的 *K. marxianus* 在 45 °C、底物质量分数为 16% 条件下同步糖化发酵 24 h,再将温度降低至 35 °C 继续发酵 48 h,乙醇质量浓度可以达到 40.2 g/L,与 45 °C SSF 相比乙醇产量提高了 54.5%。SSFF 是 Ishola 等<sup>[37]</sup>最近提出的,首先在 50 °C 下水解罐中糖化 24 h,经过错流方式进行膜过滤后,含糖的水解液流到发酵罐中 30 °C 发酵,然后再重新泵回到水解罐中,其中膜和酵母都可以实现多次循环。Shafiei 等<sup>[38]</sup>先用纤维素酶和  $\beta$ -葡萄糖苷酶在 45 °C 下酶解云木和硬橡木 24 h,然后在 37 °C 下进行同步糖化发酵 3 天,乙醇产量显著提高,分别达到理论值的 85.4% 和 89.0%。

另外,为了充分利用底物、提高乙醇产率,可将纤维素和半纤维素产生的糖都进行发酵,己糖戊糖共发酵工艺(SSCF)正得到越来越多的关注和研究。木质纤维原料前处理完成后,半纤维素水解产生的戊糖不与纤维素分离,而是与纤维素产生的糖在同一反应体系中进行发酵生产乙醇<sup>[39]</sup>。SSCF 不仅减少了水解过程的产物反馈抑制,而且去除了单独发酵戊糖这一步,将其融入己糖的发酵,提高底物利用率和乙醇产率的同时,还有助于生产成本的降低。目前应用于工业乙醇生产最常用的酿酒酵母(*S. cerevisiae*),本身不能够代谢木糖,但通过基因工程的手段插入木糖还原酶(XR)和木糖醇脱氢酶(XDH)或者插入能够编码木糖异构酶(XI)的基因可以实现木糖的利用<sup>[40]</sup>。Olofsson 等<sup>[41]</sup>利用甘蔗渣进行 SSCF 过程研究发现,温度是影响 SSCF 工艺的重要因素之一, *S. cerevisiae* TMB3400 在 32 °C 的条件下比在 37 °C 的条件下能代谢利用更多的木糖,这可能是由于较低的温度减缓了葡萄糖的释放速率,从而有利于木糖的吸收。Zhu 等<sup>[42]</sup>利用玉米秸秆进行 SSCF 过程也发现, *S. cerevisiae* SyBE005 在 34 °C 条件下发酵得到的乙醇浓度比在 38 °C 条件下提高 10.2%。另外,通过分批补料的方式可以维持体系中的葡萄糖保持在较低的浓度,同时加大菌种的接种量对木糖的发酵及乙醇浓度的提高也是非常有利的。Hahn-Hägerdal 等<sup>[43]</sup>针对一些戊糖发酵菌株的发酵性能进行了研究,发现 *S. cerevisiae* TMB3400 可以有效利用戊糖发酵产乙醇,乙醇质量浓度达到 40 g/L,木糖和葡萄糖的转化率高达理论值的 80%。Erdei 等<sup>[44]</sup>以蒸汽预处理过的稻秆作为原料也对 TMB3400 的 SSCF 情况进行了考察,结果显示,在底物质量分数为 7.5% 下乙醇产率达到 70%,质量浓度达 43.7 g/L,当体系不溶性固体含量进一步提高到 10%,乙醇质量浓度可以达到 53 g/L,大大提高了发酵醪液的乙醇浓度,对后期蒸馏成本的降低起到了重要作用。然而,目前仍然未能获得可满足 SSCF 工业化生产要求的木糖乙醇发酵菌株。

## 3 结语与展望

能源安全、粮食问题以及环境保护是当前人类面临的三大挑战,寻找开发有效的替代能源生产方法

也是人类面临的重大抉择。鉴于木质纤维原料来源的广泛性,以及燃料乙醇应用的普适性,开发有效的纤维素乙醇转化技术就显得颇为迫切。同步糖化发酵作为新型实用的纤维乙醇转化技术工艺,在节约设备投资和反应时间、降低纤维素酶用量及提高乙醇生产效率方面具有明显优势,受到研究者的重视。现阶段需要重点研究的问题是获得能够在接近纤维素酶最适温度和 pH 值条件下高效代谢糖类的微生物,实现木质纤维原料酶水解程度和乙醇产量的双重提高,另外有关酶水解系统的性能、混合酶的组成以及戊糖发酵等方面的研究还需继续深入开展。

#### 参考文献:

- [1] 石元春. 中国生物质原料资源[J]. 中国工程科学, 2011, 13(2): 16-23.
- [2] 武冬梅, 李冀新, 孙新纪. 纤维素类物质发酵生产燃料乙醇的研究进展[J]. 酿酒科技, 2007(4): 116-220.
- [3] BOTHAST R J, SCHLICHER M A. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 67(1): 19-25.
- [4] GAUSS W F, SUZUKI S, TAKAGI M. Manufacture of alcohol from cellulosic materials using plural ferments; USA, 3990944[P]. 1976-11-09.
- [5] WYMAN C E. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities [J]. Bioresource Technology, 1994, 50(1): 3-15.
- [6] OLOFSSON K, BERTILSSON M, LIDÉN G. A short review on SSF-an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks[J]. Biotechnology for Biofuels, 2008, 1(1): 7.
- [7] WINGREN A, GALBE M, ZACCHI G. Techno-economic evaluation of producing ethanol from softwood: Comparison of SSF and SHF and identification of bottlenecks[J]. Biotechnology Progress, 2003, 19(4): 1109-1117.
- [8] CHEN H Z, XU J, LI Z H. Temperature cycling to improve the ethanol production with solid state simultaneous saccharification and fermentation [J]. Applied Biochemistry and Microbiology, 2007, 43(1): 57-60.
- [9] ALFANI F, GALLIFUOCO A, SAPOROSI A, et al. Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw [J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2000, 25(4): 184-192.
- [10] STENBERG K, BOLLÓ M, RÉCZEY K, et al. Effect of substrate and cellulase concentration on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated softwood for ethanol production[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 68(2): 204-210.
- [11] MARQUES S, ALVES L, ROSEIRO J, et al. Conversion of recycled paper sludge to ethanol by SHF and SSF using *Pichia stipitis*[J]. Biomass and Bioenergy, 2008, 32(5): 400-406.
- [12] ABDEL-BANAT B M A, HOSHIDA H, ANO A, et al. High-temperature fermentation: How can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2010, 85(4): 861-877.
- [13] ZHANG Wei, LIN Yan, ZHANG Qi, et al. Optimisation of simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw for ethanol production [J]. Fuel, 2013, 112: 331-337.
- [14] ROSGAARD L, ANDRIC P, DAM-JOHANSEN K, et al. Effects of substrate loading on enzymatic hydrolysis and viscosity of pretreated barley straw[J]. Applied Biochemical and Biotechnology, 2007, 143(1): 27-40.
- [15] SANSSNER P, GALBE M, ZACCHI G. Bioethanol production based on simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated *Salix* at high dry-matter content[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(4): 756-762.
- [16] VARGA E, KLINKE HB, RÉCZEY K, et al. High solid simultaneous saccharification and fermentation of wet oxidized corn stover to ethanol [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 88(5): 567-574.
- [17] LIU Kai, LIN Xiao-hui, YUE Jue, et al. High concentration ethanol production from corncob residues by fed-batch strategy[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(13): 4952-4958.
- [18] ZHANG Ming-jia, WANG Fang, SU Rong-xin, et al. Ethanol production from high dry matter corncob using fed-batch simultaneous saccharification and fermentation after combined pretreatment[J]. Bioresource Technology, 2010, 101(13): 4959-4964.
- [19] EKLUND R, ZACCHI G. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated willow[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1995, 17(3): 255-259.
- [20] 庞会利, 李景原, 秦广雍. 耐高温乙醇酵母的研究现状及进展[J]. 酿酒科技, 2008(2): 99-102.
- [21] HASUNUMA T, KONDO A. Consolidated bioprocessing and simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulose to ethanol with thermotolerant yeast strains[J]. Process Biochemistry, 2012, 47(9): 1287-1294.
- [22] LIN Yu-sheng, LEE W C, DUAN K J, et al. Ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation in rotary drum reactor using thermotolerant *Kluveromyces marxianus*[J]. Applied Energy, 2013, 105: 389-394.

- [23] EDGARDO A, CAROLINA P, MANUEL R, et al. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 43(2):120–123.
- [24] BENJAPHOKEE S, HASEGAWA D, YOKOTA D, et al. Highly efficient bioethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol[J]. *New Biotechnology*, 2012, 29(3):379–386.
- [25] SREE N K, SRIDHAR M, SURESH K, et al. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 72(1):43–46.
- [26] KÁDÁR Z, SZENGYEL Z, RÉCZEY K. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol[J]. *Industrial Crops and Products*, 2004, 20(1):103–110.
- [27] HARI K S, JANARDHAN R T, CHOWDARY G. Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 77(2):193–196.
- [28] CHA Y L, AN G H, YANG Y J, et al. Bioethanol production from *Miscanthus* using thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* mbc 2 isolated from the respiration-deficient mutants[J]. *Renewable Energy*, 2015, 80:259–265.
- [29] SZCZODRAK J, TARGOŃSKI Z. Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1988, 31(4):300–303.
- [30] BALLESTEROS M, OLIVA J, NEGRO M, et al. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875[J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(12):1843–1848.
- [31] CASTRO R C A, ROBERT I C. Selection of a thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* strain with potential application for cellulosic ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2014, 172(3):1553–1564.
- [32] WATANABE I, NAKAMURA T, SHIMA J. Strategy for simultaneous saccharification and fermentation using a respiratory-deficient mutant of *Candida glabrata* for bioethanol production[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 110(2):176–179.
- [33] ISHCHUK O P, VORONOVSKY A Y, ABBAS C A, et al. Construction of *Hansenula polymorpha* strains with improved thermotolerance[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2009, 104(5):911–919.
- [34] AN Ming-zhe, TANG Yue-qin, MITSUMASU K, et al. Enhanced thermotolerance for ethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* strain by overexpression of the gene coding for trehalose-6-phosphate synthase[J]. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(7):1367–1374.
- [35] SHI Dong-jian, WANG Chang-lu, WANG Kui-ming. Genome shuffling to improve thermotolerance, ethanol tolerance and ethanol productivity of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2009, 36(1):139–147.
- [36] KANG H W, KIM Y, KIM S W, et al. Cellulosic ethanol production on temperature-shift simultaneous saccharification and fermentation using the thermostable yeast *Kluyveromyces marxianus* CHY1612[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2012, 35(1):115–122.
- [37] ISHOLA M M, JAHANDIDEH A, HAIDARIAN B, et al. Simultaneous saccharification, filtration and fermentation (SSFF): A novel method for bioethanol production from lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 133:67–73.
- [38] SHAFIEI M, KARIMI K, TAHERZADEH M J, et al. Pretreatment of spruce and oak by N-methylmorpholine-N-oxide (NMMO) for efficient conversion of their cellulose to ethanol[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13):4914–4918.
- [39] KOPPRAM R, NIELSEN F, ALBERS E, et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production using corncobs at lab, PDU and demo scales[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6:2–10.
- [40] OLOFSSON K, WIMAN M, LIDÉN G. Controlled feeding of cellulases improves conversion of xylose in simultaneous saccharification and co-fermentation for bioethanol production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2010, 145(2):168–175.
- [41] OLOFSSON K, RUDOLF A, LIDÉN G. Designing simultaneous saccharification and fermentation for improved xylose conversion by a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 134(1/2):112–120.
- [42] ZHU Jia-qing, QIN Lei, LI Wen-chao, et al. Simultaneous saccharification and co-fermentation of dry diluted acid pretreated corn stover at high dry matter loading; Overcoming the inhibitors by non-tolerant yeast[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 198:39–46.
- [43] HAHN-HÄGERDAL B, KARHUMAA K, FONSECA C, et al. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(5):937–953.
- [44] ERDEI B, GALBE M, ZACCHI G. Simultaneous saccharification and co-fermentation of whole wheat in integrated ethanol production[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2013, 56:506–514.