

DOI: 10.13376/j.cbbls/2014028

文章编号: 1004-0374(2014)02-0188-06

褐藻生物乙醇的研究进展

唐丽薇, 尚淑梅, 邵宏博, 申冬玲, 李卫娜, 伊日布斯*

(昆明理工大学生命科学与技术学院生物转化实验室, 昆明 650500)

摘要: 利用大型褐藻转化生产的第三代燃料乙醇已受到研究者的广泛关注。我国拥有丰富的褐藻资源, 具备了褐藻生物乙醇转化的有利条件。为了实现工业化生产, 还需要通过筛选分离和基因工程手段获得高效发酵褐藻的优良菌株及优化预处理、发酵条件等。主要介绍了我国褐藻资源概况、预处理方法和微生物发酵褐藻不同组分生产乙醇的研究进展, 提出了当前褐藻乙醇转化中存在的问题, 展望了褐藻乙醇的发展方向。

关键词: 褐藻; 生物乙醇; 乙醇发酵菌株

中图分类号: S216.2 **文献标志码:** A

Research progress on ethanol production by brown seaweed

TANG Li-Wei, SHANG Shu-Mei, TAI Hong-Bo, SHEN Dong-Ling, LI Wei-Na, CHAGAN Irbis*

(Laboratory of Bioconversion, Faculty of Life Science and Technology,
Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: As the third-generation bioethanol, the biofuels from macroalgae biomass fermentation have received the widespread attention of researchers. There are rich resources of brown seaweeds in China, the favorable conditions of bioconversion of brown algae into ethanol have been possessed. However, in order to realize industrial production, we need to obtain fine strain, which can efficiently ferment brown algae by means of isolation and gene engineering, optimize pretreatment and fermentation conditions. This article focused on research situations of resource profile, the raw material pretreatments, microorganisms fermenting different components of algae into ethanol, it also proposed the current problems and prospects for kelp biomass into ethanol by microbial fermentation.

Key words: brown seaweed; bioethanol; ethanol fermentation strains

随着气候的恶化和化石能源的告急, 生物乙醇、生物柴油、氢气、沼气等生物能源的开发已迫在眉睫。生物乙醇因具有原料来源广, 绿色可再生等优点而受到广泛关注。预计到 2020 年我国生物能源消费量占到整个石油消费量的 20%, 生物乙醇产量达 1 500 万吨^[1]。以玉米、小麦和甘蔗等为原材料的传统乙醇生产工艺成熟^[2], 乙醇转化率高, 但原料价格占整个生产成本的 40%~75%^[3], 还存在耕种面积受限和与人争粮的问题。而利用木质纤维素生产的第二代生物乙醇, 由于原料预处理成本和纤维素酶生产成本过高, 还缺乏戊糖发酵菌株, 导致原料的乙醇转化率低, 至今未能实现商业化生产。

在此背景下, 研究者们将科研重点放在了海洋生物上, 渴望为新能源产业找到新的解决途径。

海洋占地球表面积的 70%^[4], 是地球上尚未充分开发利用的最大生物质资源宝库。我国在大型海藻栽培和养殖方面具备有利的自然条件、人力资源和技术优势, 这些都成为我国发展海洋生物质能的重要基础^[5]。褐藻是种类较多的类群之一, 可达

收稿日期: 2013-06-17; 修回日期: 2013-11-17

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金

*通信作者: E-mail: irbisc@gmail.com; Tel: 0871-65920211

1 500 多种^[6-7], 全球褐藻产量达 1 600 万吨^[8], 海带 (*Laminaria japonica* 或 *Saccharina japonica*) 是我国主要的经济藻类, 年产量约占全球的 95%^[9]。其中碳水化合物含量可达 67%, 是生产乙醇的理想原料^[10-11]。利用藻类生产生物能源具有以下几点优势^[12]: 首先, 不占用耕地、生长周期短、光合效率高及生物量大; 其次, 海藻几乎不含有木质素成分, 经简单的预处理便可以被微生物发酵^[13]; 再次, 吸收 CO₂, 可有效缓解温室效应^[14]; 加之, 海藻培育技术成熟及生长所需的人工、机械和肥料等成本也较陆生植物低。

开发海藻类生产燃料乙醇的关键主要包括适合的藻类品种、高效的预处理方法和优良的发酵菌种^[15]。目前, 关于甘露醇及海藻酸发酵菌株的改造、海藻酸裂解酶的分离纯化和海藻酸代谢途径等研究已有报道, 但海藻中甘露醇、海带淀粉等成分的利用及预处理方法的研究还较少。本文将着重介绍微生物发酵褐藻生物质产乙醇过程中, 褐藻不同成分生产乙醇的研究进展、预处理方法及未来发展方向。

1 褐藻分布及其化学成分

褐藻中较常见的有海带 (*Laminaria*)、马尾藻 (*Sargasso*) 和裙带菜 (*Undaria*) 等。我国境内的褐藻除马尾藻生长在南方外, 其他的主要都生长在北方沿海地区。自然生长的海带和裙带菜仅分布在辽东半岛和山东半岛海域, 而人工养殖的海带已遍及长江以南, 浙江、福建和广东等地。

褐藻的化学成分如表 1 所示, 主要包括: 甘露醇、海藻酸、蛋白质、无机盐、粗纤维和海带淀粉等^[16-17], 其中可发酵的碳水化合物占生物质干重的 30%~67%。

2 褐藻生产燃料乙醇的研究进展

2.1 褐藻预处理

藻类含有多种结构复杂的多糖, 为了提高微生物对碳水化合物的利用率, 有必要对原材料进行预处理。目前常见的预处理方法有: 粉碎、研磨、气爆、热酸水解和酶解^[19]。其中褐藻的预处理方法包括: 高温高压稀酸法, 提取其中的可溶性单糖和甘露醇成分; 酶解法, 经纤维素酶或海藻多糖酶酶解海藻粗纤维和海藻多糖; 也可采用超高压酸解-酶解的复合水解工艺^[20]。关于褐藻中海带的预处理和乙醇发酵研究较多, 而裙带菜、昆布等褐藻因生物量小、碳水化合物含量低^[21], 国内外相关的乙醇转化研究报道较少。Lee 等^[19]用稀酸水解和酶水解预处理裙带菜, 但糖化得率较低, 仅有 0.013 g 葡萄糖/g 裙带菜。海带水解液成分复杂, 目前没有一种菌株能够利用其中的多种单糖和多糖成分, 都需多种菌株混合协同发酵提高乙醇产量。

2.2 发酵褐藻不同成分生产乙醇的研究

2.2.1 海带淀粉

海带淀粉 (Laminaran 或 Laminarin) 也称褐藻淀粉或昆布多糖, 由 1,3-β-D 吡喃型葡萄糖组成的葡聚糖, 支链由 1,6-β 糖苷键连接, 部分糖链末端含有甘露醇残基, 存在于细胞质中; 褐藻中海带淀粉的含量高时可达 28.6%, 而低时几乎没有。海洋中真菌和细菌等多种微生物都能分泌 1,3-β 葡聚糖酶, 可将海带淀粉酶解成葡萄糖单体。

较早研究褐藻发酵产乙醇的学者是 Hom 等, 他们发现马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) 和嗜鞣管囊酵母 (*Pachysolen tannophilus*) 能分泌海带淀粉酶, 将海带淀粉酶解成葡萄糖并发酵产乙醇, 但乙醇转化率都较低, 分别为 0.31 g/g 和 0.29 g/g

表1 常见褐藻类的主要成分^[18]

藻类名称	占海藻干重百分比 (w/w)					
	甘露醇 (mannitol)	海藻酸 (alginate)	粗纤维 (crude fiber)	灰分 (ash)	蛋白质 (protein)	海带淀粉 (laminaran)
海带(<i>L.japonica</i>)	23.37	17.05	6.11	28.98	10.23	0.59
匍枝马尾藻(<i>S.polycystum</i>)	1.78	14.00	7.79	23.73	15.48	-
裙带菜(<i>U.pinnatifida</i>)	5.43	27.06	10.42	25.29	18.02	1.65
昆布(<i>E.kurome</i>)	23.00	16.00	4.63	23.84	-	-
铁钉菜(<i>I.okamurae</i>)	4.42	18.24	42.92	17.31	11.94	5.45
海蒿子(<i>S.pallidum</i>)	21.06	22.28	13.00	19.60	4.27	0.57
海黍子(<i>S.kjellmaninum</i>)	5.53	15.75	15.19	24.01	11.98	0.97
鼠尾藻(<i>S.rhumborgir</i>)	7.78	14.30	38.95	31.12	8.16	1.00

海带淀粉^[22]。虽然乙醇产量不高,但改变了以粮食作物为主要原料的局面,为生物乙醇的生产提供了新的原材料。2012年, Lee 和 Lee^[10]发现粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)可以发酵海带淀粉生产乙醇,产量可达 5.74 g/L。Yanagisawa 等^[23]利用酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) IAM 4178 发酵窄叶赤藻(*Alaria crassifolia* Kjellman)的海带淀粉水解的葡萄糖,乙醇产量大于 3%。未经海带淀粉酶酶解处理,野生菌株直接发酵的乙醇产量均不高。2009年, Adams 等^[24]用红酵母(*Rhodotorula*)发酵经海带淀粉酶酶解处理的糖海带(*Saccharina latissima*),乙醇产率是 0.45% (V/V)。2012年, Jang 等^[25]用 40 mmol/L H₂SO₄ 121 °C 预处理糖海带 60 min,再加入海带淀粉酶酶解海带淀粉成分,接入红橡胶树毕赤酵母(*Pichia angophorae*)发酵,乙醇浓度达到 7.7 g/L。从上述的研究报道可以看出,野生型菌株发酵海带淀粉的乙醇产量较低,主要原因是菌株分泌的酶活性不高,不能完全酶解海带淀粉成分,海带淀粉经酶解、稀酸、加热等预处理,可有效提高乙醇产量^[26]。

2.2.2 甘露醇

甘露醇(D-mannitol),又称 D-甘露糖醇,分子式为 C₆H₁₄O₆,广泛存在于植物的叶、茎和根中,褐藻中甘露醇含量最高可达 30%^[27]。微生物通过分泌甘露醇脱氢酶(dehydrogenase),将甘露醇转化成果糖,进一步生成果糖-6-磷酸,进入糖酵解途径(EMP)。1 mol 甘露醇进入糖酵解途径产生 3 mol NADH (1 mol 葡萄糖只产生 2 mol NADH),细胞为了维持 NADH/ NAD⁺ 比例平衡,需要再生 NAD⁺,但 NAD⁺的再生需要转氢酶(transhydrogenase)或氧气参与^[28]。而工业菌株 *S. cerevisiae* 和运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)因缺少转氢酶,在严格厌氧条件下不能在以甘露醇为碳源的培养基中生长,为了满足菌株生长需求,必须提供氧气,但在有氧条件下,菌株不能将甘露醇转化成乙醇。目前,研究者主要从自然界中筛选能发酵甘露醇生产乙醇的菌株。

不同菌株的底物利用能力不同,适宜的发酵菌株可以明显地提高乙醇产量。筛选分离的细菌主要有棕榈发酵杆菌(*Zymobacter palmae*), 2000年, Horn 等^[29]用 Okamoto 等^[30]分离的 *Z. palmae* T109 在微氧条件下发酵极北海带(*Laminaria hyperborea*)的甘露醇生产乙醇。乙醇得率是 0.38 g/g 极北海带,但该菌不能分泌 1,3-β 葡聚糖酶,以至不能利用海

带淀粉。陈姗姗^[31]利用 *Z. palmae* 发酵马尾藻生产乙醇,乙醇得率达 0.429 g/g 海藻,达到理论值的 84%。筛选分离的酵母菌间差距就很明显,2011年, Lee 和 Lee^[32]从酒曲中分离出一株葡萄牙假丝酵母(*Candida lusitanae*) Nuruk4,该菌株可以发酵来源于海带的甘露醇生产乙醇,产量为 2.59 g/L。2012年, Lee 和 Lee^[10]测试了 8 种酵母菌发酵褐藻成分产乙醇的能力,结果表明 *S. cerevisiae* 能利用甘露醇,乙醇产量达 2.59 g/L,而德巴利酵母(*Debaryomyces occidentalis*)发酵 100.0 g/L 海带时,乙醇产量达 10.86 g/L,但在只含有甘露醇的培养基上,乙醇产量仅有 1.54 g/L。Horn 等^[29]发现分离自澳大利亚赤桉树的 *P. angophorae* 可以同时利用极北海带中的甘露醇和海带淀粉生产乙醇,并且优先利用甘露醇,在 pH 4.5, 通氧量为 5.8 mmol O₂ L⁻¹h⁻¹ 的条件下,乙醇得率达 0.43 g/g 甘露醇。综上所述, *P. angophorae* 是兼性厌氧菌,不仅利用海带淀粉,也利用甘露醇,是一种更适合发酵褐藻产乙醇的微生物。

与此同时,研究者也通过基因工程手段构建重组菌株。2011年, Kim 等^[33]将 *Z. mobilis* 代谢乙醇的丙酮酸甲裂解酶基因 *pf1B* 导入大肠杆菌(*Escherichia coli*) B 中,构建重组菌 *E. coli* KO11,利用重组菌发酵经酸热预处理海带中的甘露醇,乙醇转化得率是 0.41 g/g 甘露醇,这比 *Z. palmate* 野生型菌株发酵甘露醇的乙醇产量高出 7.89%,用重组菌与 *S. cerevisiae* 混合发酵海带时,乙醇产量提高到 29.0 g/L,其原因是 *S. cerevisiae* 利用了预处理液中的葡萄糖成分。

2.2.3 海藻酸

海藻酸(alginate)也称褐藻胶、褐藻酸,是褐藻的主要成分,约占干海藻重量的 20%~30%^[34]。由 β-D-甘露糖醛酸(β-D-mannuronic acid)和 α-L-古洛糖醛酸(α-L-guluronic acid)单体通过 1-4 糖苷键连接的直链多糖,主要存于褐藻细胞壁中^[35]。来源于海洋细菌、海洋软体动物和海藻类的海藻酸裂解酶通过 β 消去机制作用于单体间的 β-1,4-糖苷键,将海藻酸裂解成单糖或寡糖^[36-38]。但 *S. cerevisiae* 等传统乙醇发酵菌自身不具备代谢海藻酸及降解物的途径,有些细菌虽然能够分泌海藻酸裂解酶酶解海藻酸,但不能生产乙醇;因此,对海藻酸裂解酶的降解机理及降解产物的微生物代谢研究就显的尤为重要。

可以利用多种菌株混合协同发酵,将海藻酸降解成单糖或寡糖后产乙醇。2012年, Jang 等^[25]利

用从海洋分离的一株高温芽孢杆菌 (*Bacillus* sp.) JS-1 和 *P. angophorae* 混合协同发酵稀硫酸预处理的糖海带, 乙醇产量是 7.7 g/L, 转化率达到 33.3%。该过程中 *Bacillus* sp. JS-1 分泌外切型海藻酸裂解酶, 将海藻酸酶解为单体, 再经 *P. angophorae* 代谢单体生产乙醇。

目前, 构建利用海藻酸的乙醇工程菌有两个策略。一是在海藻酸分解菌中构建高效的乙醇代谢途径。2012 年, Wargacki 等^[39] 构建了能将海藻酸裂解酶分泌到细胞外的海藻酸裂解酶分泌系统, 并从灿烂弧菌 (*Vibrio splendidus*) 12B01 的基因文库中筛选了参与海藻酸代谢的相关基因, 将它们同时导入到乙醇代谢工程菌株 *E. coli* 中, 并发酵海藻, 乙醇得率是 0.28 g/g 干海藻, 达到理论转化率的 80%。二是将海藻酸裂解酶基因和海藻酸代谢的关键酶基因导入到乙醇工程菌中, 2011 年, Takeda 等^[40] 将 *Z. mobilis* 中的丙酮酸脱羧酶基因 *pdh* 和乙醇脱氢酶基因 *adhB* 在鞘氨醇单胞菌 (*Sphingomonas* sp.) A1 中过表达, 同时敲除 A1 菌株的乳酸脱氢酶基因 *ldh*, 获得重组菌株以海藻酸为唯一碳源发酵, 乙醇产量达 13.0 g/L。与现有的产乙醇微生物不同, 重组菌株 A1 自身能降解大分子海藻酸并将其转化成乙醇。无论是基因工程菌株, 还是混合野生型菌株发酵, 这些都为转化海藻酸生产生物乙醇开辟了新途径。

2.2.4 海藻粗纤维

海藻中的粗纤维 (crude fiber) 是以纤维二糖为单位的重复结构, 是海藻细胞壁的主要成分。目前, 从海带中提取海藻酸、甘露醇和碘等, 剩余的水不溶性纤维残渣则被视为废弃物直接丢弃到自然界中, 不但造成生物质资源的浪费, 也导致环境污染^[41]。粗纤维约占海带残渣干重的 50%, 将海带残

渣转化为生物能源, 可使海带的工业利用率提高 15%^[42]。不仅可使海带加工废弃物变废为宝, 还可为制备生物能源提供廉价充足的原材料, 从而促进海藻产业和海洋生物质的开发利用。

2011 年, Ge 等^[43] 利用稀酸水解和酶水解海带残渣的纤维素组分, 水解产物接入 *S. cerevisiae* 发酵, 乙醇得率达 0.11 g/g 海带残渣。缪锦来等^[44] 用从南极冰中分离的假交替单胞菌 (*Pseudoalteromonas* sp.) NJ62 生产的低温纤维素酶酶解海带残渣, 再接种 *S. cerevisiae*, 30℃ 发酵, 乙醇得率达 0.14 g/g 海带残渣。陆生木质纤维素中, 木质素与半纤维素以共价键的形式结合, 纤维素分子被包埋其中, 同时受纤维素分子内和分子间氢键作用, 这些都增大了预处理的难度; 而海藻粗纤维中木质素的含量几乎可以忽略, 所以使用化学或生物方法预处理海带粗纤维, 比处理陆生木质纤维素方法和技术简单, 使得乙醇得率增高。

综上所述, 将不同海藻的各组分发酵产乙醇的研究结果列于表 2。

3 褐藻转化燃料乙醇的研究方向

尽管海洋生物质在解决未来能源问题上拥有诸多优势, 但海藻发酵生产生物乙醇在菌种和技术上还有待突破, 未来的研究将主要集中在以下几个方面:

(1) 筛选菌种。已有的菌株还不能完全利用褐藻的主要成分, 利用褐藻发酵产乙醇菌株的最适温度约 30℃, 增加了发酵过程中冷却降温 and 蒸馏回收的成本, 应继续从海洋动植物、海藻堆肥及废弃物中筛选底物利用范围广、乙醇产率高、耐抑制物能力强、发酵温度高的菌种。

(2) 构建工程菌株。海藻酸、甘露醇和海带淀

表2 不同种类褐藻发酵产乙醇

藻类	发酵菌株	发酵底物	发酵工艺	乙醇得率 g/g	参考文献
<i>L. japonica</i>	<i>Pseudoalteromonas</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	纤维素、半纤维素	混合发酵	0.14	44
<i>L. japonica</i>	<i>Candida lusitanae</i>	甘露醇	分批发酵	0.13	32
<i>L. japonica</i>	<i>Debaryomyces occidentalis</i>	海带淀粉、甘露醇	分批发酵	0.11	10
<i>L. japonica</i>	<i>E. coli</i> (基因工程菌)	甘露醇	SSF	0.41	33
<i>L. hyperborea</i>	<i>Pichia angophorae</i>	甘露醇	分批发酵	0.40	22
<i>L. hyperborea</i>	<i>Pichia angophorae</i>	甘露醇	连续发酵	0.27	22
<i>L. hyperborea</i>	<i>Zymobacter palmae</i>	甘露醇	分批发酵	0.38	29
<i>S. japonica</i>	<i>E. coli</i> (基因工程菌)	海藻酸	连续发酵	0.28	39
<i>S. japonica</i>	<i>Pichia angophorae</i>	海带淀粉	SSF	0.08	25
<i>S. polycystum</i>	<i>Zymobacter palmae</i>	海带淀粉	分批发酵	0.43	31

粉等都可以代谢生成中间产物丙酮酸,因此,可以参照早期构建的代谢木质纤维素类微生物的改造方法,对褐藻发酵菌种的遗传性状进行改良,使工程菌株优良性状得以稳定高效表达。传统乙醇发酵菌株具有乙醇产量高、遗传背景清晰、可利用现有的发酵设备等优点,但不能直接利用褐藻的主要成分海藻酸。为了提高褐藻的乙醇转化率,还需要在现有的乙醇工业菌株中导入海藻酸降解途径的关键酶基因,使其能够自行降解和利用海藻酸生产乙醇。此外,还可以对筛选分离的海藻酸降解菌进行遗传背景分析,将乙醇生成途径关键酶基因导入海藻酸降解菌株中,从而实现海藻酸的乙醇转化。

(3) 优化预处理方法。传统的稀酸预处理方法腐蚀设备、污染环境,菌株最适 pH 大多为中性,发酵需进行中和处理,增大了底物盐浓度。可在固定床反应器上安装非均相催化剂,此方法中的均相催化剂可以重复利用,减少发酵中和与污水处理的步骤。优化海藻酸裂解酶和海带淀粉酶等产酶菌株的产酶条件,提高酶活、酶量,降低成本。在酸热预处理藻类时,预处理液中含有酚类和砷、铅等重金属离子毒害微生物发酵,需要进行脱毒处理。

(4) 改进发酵技术。现有的发酵工艺主要是同步糖化发酵 (SSF)、分步糖化发酵 (SHF)、同步糖化共发酵 (SSCF) 和联合生物加工 (CBP) 等,而研究大都处于实验室阶段,应加强生产设备的研发,为其实现工业化生产做准备。可进一步综合利用副产物(如丙三醇等)及预处理海藻后的残渣,如通过厌氧消化作用发酵产生沼气,为海带发酵产乙醇提供电能和热能。

相信随着研究的深入和技术的不断成熟,利用褐藻类的主要成分高效发酵生产生物燃料必能实现产业化,在推动我国经济和社会发展方面具有更广阔的发展前景。

[参 考 文 献]

- [1] 吴信, 王志朋, 付晓婷, 等. 利用海带渣制备乙醇的可行性分析及高效水解技术的研究. 农产品加工, 2013, 4: 4-11
- [2] Bothast RJ, Schlicher MA. Biotechnological processes for conversion of corn into ethanol. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 67(1): 19-25
- [3] Lu XB, Zhang YM, Angelidaki I. Optimization of H₂SO₄-catalyzed hydrothermal pretreatment of rapeseed straw for bioconversion to ethanol: focusing on pretreatment at high solids content. Bioresour Technol, 2009, 100(12): 3048-53
- [4] Goh CS, Lee KT. A visionary and conceptual macroalgae-based third-generation bioethanol (TGB) biorefinery in Sabah, Malaysia as an underlay for renewable and sustainable development. Renew Sust Enery Rev, 2010, 14(2): 842-8
- [5] Zhang QT, Ma J, Qiu GY, et al. Potential energy production from algae on marginal land in China. Bioresour Technol, 2012, 109: 252-60
- [6] Mestechkina NM, Shcherbukhin VD. Sulfated polysaccharides and their anticoagulant activity: a review. Appl Biochem Microbiol, 2010, 46(3): 267-73
- [7] Thomas AD, Volesky B, Mucci A. A review of the biochemistry of heavy metal biosorption by brown algae. Water Res, 2003, 37(18): 4311-30
- [8] Figueira MM, Volesky B, Ciminelli VST, et al. Biosorption of metals in brown seaweeds biomass. Water Res, 2000, 34(1): 196-204
- [9] 张志奇, 翁焕新. 海带发酵生产乙醇及其影响因素的控制研究. 能源工程, 2009, 6: 9-15
- [10] Lee SM, Lee JH. Ethanol fermentation for main sugar components of brown-algae using various yeasts. J Ind Eng Chem, 2012, 18(1): 16-8
- [11] Gordon R, Seckbach J. The science of algal fuels[M]. Germany: Springer, 2012, 25: 215-30
- [12] 任小波, 吴园涛, 向文洲, 等. 海洋生物质能研究进展及其发展战略思考. 地球科学进展, 2009, 24(4): 403-10
- [13] Wi SG, Kim HJ, Mahadevan SA, et al. The potential value of the seaweed Ceylon moss (*Gelidium amansii*) as an alternative bioenergy resource. Bioresour Technol, 2009, 100(24): 6658-60
- [14] Yokoyama S, Jonouchi K, Imou K. Energy production from marine biomass: fuel cell power generation driven by methane produced from seaweed. Int J Appl Sci Eng Technol, 2008, 4: 168-75
- [15] 庞通, 刘建国, 林伟, 等. 藻类生物燃料乙醇制备的研究进展. 渔业现代化, 2012, 39(5): 63-71
- [16] Percival E. The polysaccharides of green, red and brown seaweeds: their basic structure, biosynthesis and function. Br Phycol J, 1979, 14: 103-17
- [17] Jung KW, Kim DH, Shin HS. Fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* and optimization of thermal pretreatment conditions. Bioresour Technol, 2011, 102(3): 2745-50
- [18] 纪侯明. 海藻化学[M]. 北京: 科学出版社, 1997: 208-353
- [19] Lee S, Oh Y, Kim D, et al. Converting carbohydrates extracted from marine algae into ethanol using various ethanolic *Escherichia coli* strains. Appl Biochem Biotechnol, 2011, 164(6): 878-88
- [20] 陈姗姗, 潘诗翰, 董蓉, 等. 褐藻燃料乙醇研究进展及其应用前景. 中国酿造, 2011, 4: 11-5
- [21] Yoon M, Choi J, Lee JW, et al. Improvement of saccharification process for bioethanol production from *Undaria* sp. by γ irradiation. Radiat Phys Chem, 2012, 81(8): 999-1002
- [22] Horn SJ. Bioenergy from brown seaweeds[D]. Norwegian University of Science and Technology NTNU, 2000: 10-65
- [23] Yanagisawa M, Nakamura K, Ariga O, et al. Production of

- high concentrations of bioethanol from seaweeds that contain easily hydrolyzable polysaccharides. *Process Biochem*, 2011, 46(11): 2111-6
- [24] Adams JM, Gallagher JA, Donnison IS. Fermentation study on *Saccharina latissima* for bioethanol production considering variable pretreatments. *J Appl Phycol*, 2009, 21(5): 569-74
- [25] Jang JS, Cho YK, Jeong GT, et al. Optimization of saccharification and ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) from seaweed, *Saccharina japonica*. *Bioproc Biosyst Eng*, 2012, 35(1-2): 11-8
- [26] Wang GJ, Wang ZS, Zhang YW, et al. Cloning and expression of *amyE* gene from *Bacillus subtilis* in *Zymomonas mobilis* and direct production of ethanol from soluble starch. *Biotechnol Bioproc E*, 2012, 17(4): 780-6
- [27] Brennan L, Owende P. Biofuels from microalgae-A review of technologies for production, processing, and extractions of biofuels and co-products. *Renew Sust Energ Rev*, 2010, 14(2): 555-7
- [28] Horn SJ, Aasen IM, Østgaard K. Ethanol production from seaweed extract. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2000, 25(5): 249-54
- [29] Horn SJ, Aasen IM, Østgaard K. Production of ethanol from mannitol by *Zymobacter palmae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2000, 24(1): 51-7
- [30] Okamoto T, Taguchi H, Nakamura K, et al. *Zymobacter palmae* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-fermenting peritrichous bacterium isolated from palm sap. *Arch Microbiol*, 1993, 160(5): 333-7
- [31] 陈姗姗. 马尾藻发酵生产燃料乙醇的研究[D]. 广西师范大学, 2012: 31-3
- [32] Lee SM, Lee JH. The isolation and characterization of simultaneous saccharification and fermentation microorganisms for *Laminaria japonica* utilization. *Bioresour Technol*, 2011, 102(10): 5962-7
- [33] Kim NJ, Li H, Jung K, et al. Ethanol production from marine algal hydrolysates using *Escherichia coli* KO11. *Bioresour Technol*, 2011, 102(16): 7466-9
- [34] Burton T, Lyons H, Lerat Y, et al. A review of the potential of marine algae as a source of biofuel in Ireland[R]. Dublin: Sustainable Energy Ireland-SEI, 2009: 22-3
- [35] Panikkar R, Donald JB. Composition and block structure of alginates from New Zealand brown seaweeds. *Carbohydr Res*, 1996, 293(1): 119-32
- [36] Sawabe T, Sugimura I, Ohtsuka M, et al. *Vibrio halioticoli* sp. nov., a non-motile alginolytic marine bacterium isolated from the gut of the abalone *Haliotis discus hannai*. *Int J Syst Bacteriol*, 1998, 48(2): 573-80
- [37] Boyen C, Kloareg B, Polne-Fuller M, et al. Preparation of alginate lyases from marine molluscs for protoplast isolation in brown algae. *Phycologia*, 1990, 29(2): 173-81
- [38] Lin TY, Hass WZ. Pathway of alginic acid synthesis in the marine brown alga, *Fucus gardneri* Silva. *J Biol Chem*, 1966, 241: 5284-97
- [39] Wargacki AJ, Leonard E, Win MN, et al. An engineered microbial platform for direct biofuel production from brown macroalgae. *Science*, 2012, 335(6066): 308-13
- [40] Takeda H, Yoneyama F, Kawai S, et al. Bioethanol production from marine biomass alginate by metabolically engineered bacteria. *Energy Environ Sci*, 2011, 7: 2575-81
- [41] 潘春梅, 李卓, 樊耀亭, 等. 海藻类生物质废弃物的发酵生物制氢研究. *环境科学与技术*, 2009, 32(2): 1-4
- [42] 葛蕾蕾. 海藻加工废弃物的复合降解及乙醇转化[D]. 中国海洋大学, 2010: 63-5
- [43] Ge LL, Wang P, Mou HJ. Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. *Renew Energ*, 2011, 36(1): 84-9
- [44] 缪锦来, 郑洲, 梁强, 等. 海带纤维低温酶解和制备生物乙醇的研究. *现代农业科技*, 2010, 17: 18-20