

技术进展

加压或超临界溶剂对乙醇发酵和 在线萃取分离的影响

张团伟¹ 刘秀凤¹ 朱慧铭¹ 张宝泉¹ 林跃生^{1,2}

(1. 天津大学化工学院, 天津 300072;

2. Department of Chemical Engineering, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio 45221, USA)

摘要: 压缩或超临界流体作为良好的萃取溶剂, 在食品加工与保藏、制药和生物材料加工等领域有广阔的应用前景。在简要论述了压缩或超临界流体对微生物存活与催化活性影响的基础上, 详细综述了近年来采用超临界溶剂进行乙醇发酵与在线萃取分离过程取得的新进展, 特别是装置结构设计和过程优化方面的新成果。最后探讨了实现过程规模化需要深入开展的关键性问题。

关键词: 超临界流体; 发酵; 萃取; 分离; 乙醇

中图分类号: TQ028.8

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)03-0011-05

Effects of compressed or supercritical solvents on ethanol fermentation and/or in-situ extraction

ZHANG Tuan-wei¹, LIU Xiu-feng¹, ZHU Hui-ming¹, ZHANG Bao-quan¹, LIN Yue-sheng^{1,2}

(1. School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Department of Chemical Engineering, University of Cincinnati, Cincinnati, Ohio 45221, USA)

Abstract: Compressed or supercritical fluids are excellent extraction solvents. They have got wide applications in food processing and storage, medicine making, as well as biomaterials processing. The effects of compressed or supercritical fluids, especially carbon dioxide, on the viability and catalytic activity of microorganisms were discussed briefly. The progress in the fermentation of ethanol under pressure and/or in-situ supercritical extraction was thus reviewed. The discussion was concentrated on the novel design of equipment structure as well as process optimization for the purpose of the reduction of the negative effect of high-pressure environment on microorganisms. Finally, some key topics were addressed, which would be crucial to the large-scale application of this integrated process.

Key words: supercritical fluid; fermentation; extraction; separation; ethanol

利用生物质发酵生产乙醇是通过可再生资源生产能源替代品的一条重要途径。发酵法生产乙醇的经济性主要取决于高能耗的乙醇分离过程。Wilson^[1]的研究结果显示, 尽管超临界萃取过程的设备投资比传统精馏过程的高 40%, 但其运行费用仅是精馏过程的 1/7。Serra 等^[2]通过对比双柱精馏、以戊烷作为夹带剂的共沸精馏以及超临界二氧化碳萃取等 3 种方式, 发现后者的能耗最低。Kuk 和 Montagna^[3]的研究结果也清楚显示, 采用超临界二氧化碳萃取的方法分离乙醇-水混合液在经济和技术上

均可行。

使用微生物(酵母菌、细菌等)发酵生产乙醇, 存在乙醇的非竞争性抑制作用^[4]。很多研究者试图采取多种途径实现乙醇在线分离以减轻这种抑制作用, 其中包括: ①真空发酵^[5]; ②萃取发酵^[6]; ③以循环方式将发酵液连续通过疏水性分子筛^[7]; ④使用超临界萃取塔^[8]; ⑤使用膜生物反应器^[9-10]; ⑥采用中空纤维膜萃取器^[11]。以下将重点讨论近年来采用加压或超临界流体进行乙醇发酵过程与在线萃取分离方面的研究进展, 并提出近期研究工作展望。

收稿日期: 2003-12-29; 修回日期: 2004-01-08

基金项目: 国家自然科学基金(20076033)和国家杰出青年基金(50228203)资助项目

作者简介: 张团伟(1980-), 男, 硕士生; 张宝泉(1962-), 男, 博士, 教授, 从事超临界化学反应与生物转化过程、无机膜技术研究, 通讯联系人, 022-27405165, bqzhang@tju.edu.cn; 林跃生(1960-), 男, 博士, 教授, 天津大学长江学者讲座教授, 从事膜技术、多相传递过程、多相催化反应研究。

1 加压或超临界流体对微生物的影响

如前所述,使用超临界流体在线萃取分离抑制性发酵产物可同时提高目的产物的转化率和分离效率,是过程强化的一种有效手段。在线萃取过程中,超临界流体对微生物的存活和代谢行为有明显影响。已有的研究表明,各种微生物细胞对超临

界流体的抵抗能力不同,并且随实验条件的改变差异颇大。以在线萃取发酵产物为目的,探讨加压或超临界环境对微生物存活与催化活性影响的研究工作始于 20 世纪 80 年代末,目前相关的研究工作仍非常活跃,详细情况如表 1 所示^[12-22]。在各种超临界流体中,由于二氧化碳本身具有价廉、不易燃以及环境友好等优点,是研究最多的在线萃取溶剂。

表 1 加压或超临界流体对微生物存活与催化活性的影响

微生物	压力/MPa	温度/K	气体	对微生物的影响	来源
<i>Saccharomyce cerevisiae</i>	0.1 ~ 7.0	303	CO ₂ , N ₂	加压二氧化碳对微生物有明显的抑制作用,但抑制作用可逆, [12] 没有观察到细胞破裂或死亡;而在加压氮气环境中,抑制作用明显减弱	
<i>Baker's yeast, Saccharomyce cerevisiae, Saccharomyce rouxii</i>	7.0	303	CO ₂	3 种酵母对加压二氧化碳的抵抗能力无明显差别;利用抑制 [13] 作用的可逆性,可以通过加压—减压—加压的操作方式消除加压环境对微生物的负面影响	
<i>Pseudomobas fluorescens</i>	0.1 ~ 0.8	303	CO ₂ , O ₂	提高氧分压抑制微生物的生长,1.15 × 10 ⁵ Pa 纯氧下细胞生长 [14] 受到完全抑制	
<i>Candida utilis, Kluyvermyces fragilis</i>	0 ~ 10.0	281 ~ 316	CO ₂	细胞存活率与温度和二氧化碳溶解量有关,随着二氧化碳压 [15] 力的升高,微生物的存活率下降,变化规律符合 S 型曲线	
<i>Saccharomyce cerevisiae, Clostridium thermocellum</i>	6.9	333	CO ₂ , C ₂ H ₆ , N ₂	高压氮气环境下压力对乙醇发酵过程几乎没影响。6.9 MPa [16] 的 CO ₂ 环境几乎完全抑制细胞代谢,而同样压力的 C ₂ H ₆ 则几乎没有抑制作用	
<i>Kluyvermyces marxianus</i>	14.0	308	CO ₂	暴露时间是影响细胞存活的关键因素,当细胞在超临界二氧 [17] 化碳中暴露 37 min 后,存活率只有 0.01%	
<i>Clostridium thermocellum</i>	7.0	333	C ₂ H ₆ , C ₃ H ₈ , N ₂ 等	加压或超临界流体种类、溶剂特性等明显影响发酵过程的产 [18] 物分布	
<i>Clostridium thermocellum</i>	1.5 ~ 7.0	298, 333	C ₂ H ₆ , C ₃ H ₈ , N ₂ 等	与高压 N ₂ 比较,加压或超临界 C ₂ H ₆ 和 C ₃ H ₈ 对细胞催化活性 [19] 有较大抑制作用,生物适应性溶剂的选择非常关键	
<i>Geotrichum candidum</i>	10.0	308	CO ₂	细胞保持很高的存活率,且细胞中的酶仍具有很高的催化活 [20] 性和选择性	
<i>Saccharomyce cerevisiae, Absidia coerulea</i>	0 ~ 8.0	301 ~ 312	CO ₂ , N ₂	压力、温度和初始 pH 值对细胞的抑制作用明显;温度对微生 [21] 物催化活性的影响在溶剂临界点附近有突变	
<i>Saccharomyce cerevisiae, Absidia coerulea</i>	0 ~ 8.0	301 ~ 312	CO ₂ , C ₂ H ₄ , N ₂	与二氧化碳相比,超临界乙烯对细胞催化活性的影响非常微 [22] 弱;超临界二氧化碳作用下, <i>A. coerulea</i> 菌丝量明显减少	

在加压或超临界环境中,微生物的存活率和催化活性随压力、温度的提高而降低,暴露时间的延长对微生物细胞死亡和催化活性降低也至关重要。此外,初始 pH 值和加、减压速度等也是影响细胞存活和催化活性的重要因素。需要强调的是,使用加压或超临界流体对微生物进行灭菌、消毒方面的研究报道颇多,国内外均有比较详细的综述^[23-24]。以下讨论的重点是如何降低加压或超临界流体对微生物和乙醇发酵过程的负面影响,即如何提高微生物在加压流体或超临界相态中的存活率和催化活性,

实现在线萃取分离发酵产物乙醇。从已有的文献报道可知,加压流体,特别是加压二氧化碳对微生物细胞失活机理的研究比较深入^[23-26],而加压或超临界流体对发酵过程抑制作用的机理仍处于初步探索阶段。通常认为,压力越高二氧化碳在酵母液及细胞中的溶解度就越大,溶解的二氧化碳抑制了合成乙醇的酶促反应过程。高压二氧化碳导致酵母液 pH 值降低,也是原因之一。此外,高压条件下生成的乙醇在酵母细胞内大量积存,细胞内外乙醇的联合作用进一步强化了原有的抑制作用^[12-13,16]。

2 加压或超临界流体对乙醇发酵过程的影响

Thibault 等^[12]最先尝试用超临界二氧化碳在线萃取发酵产物乙醇,考察了加压或超临界流体对乙醇发酵过程的影响。研究结果显示,高压环境对乙醇发酵过程的影响十分明显,降低了乙醇的生成速度与最终浓度。当使用高压二氧化碳时,这种抑制作用更为严重。与二氧化碳相比,高压氮气对乙醇转化的抑制作用要小得多。例如:其他条件相同的情况下,以高压氮气作为顶气时生成的乙醇浓度比常压下低 40% ~ 50%;但对于加压或超临界二氧化碳,乙醇浓度则随二氧化碳压力的增加而迅速下降,在 8.4 MPa 时,乙醇浓度只有常规条件下的 25%。他们的研究还表明,加压或超临界流体对乙醇发酵过程的影响通常是可逆的,即当系统恢复到常压条件后乙醇发酵又恢复到原来的水平。当酵母细胞暴露于近临界二氧化碳的时间较短时(3 ~ 6 h),在恢复到常压条件后细胞立即恢复正常活力;如果暴露时间过长,则需要经过一段停滞期(通常为 36 h)才能恢复正常活力。

L'Italian 等^[13]为了消除高压环境对乙醇发酵过程的不利影响,实现在线萃取分离,从菌种筛选、操作条件优化和加大接种量等几个方面进行了研究。通过比较耐压酵母(*Saccharomyce rouxii*)、酿酒酵母(*Saccharomyce cerevisiae*)、商业面包酵母等在近临界二氧化碳(30℃、7 MPa)下的乙醇发酵过程,表明以上 3 种酵母并无明显差异,即使用耐压酵母替代商业面包酵母并无优势。特别值得指出的是,研究者利用加压—减压—加压多次循环的操作方式,交替进行正常发酵过程和伴有在线萃取的非正常发酵过程,既实现了抑制性发酵产物的在线萃取,又避免了加压或超临界流体对发酵过程的抑制。此外,增加接种量也有利于提高加压或超临界环境中乙醇的最终浓度。

Knutson 等^[16]使用耐温菌(*Clostridium thermocellum*)研究了加压或超临界流体(氮气、二氧化碳、乙烷)对碳水化合物转化和乙醇生成速率的影响。他们的研究表明,在常压条件下和 6.9 MPa 氮气环境中乙醇的生成速度与产率是相近的,只是氮气没有萃取能力。由此可以看出:压力本身对乙醇合成的影响并不明显,关键在于溶剂的种类。例如:当采用乙烷时,在 6.9 MPa 条件下乙醇产率仅降低 20%;但如果使用相同压力下的二氧化碳,乙醇产率将降低 80% 以上。类似地,由 RS-醋酸酯(Reich-

sterin's substance acetate)通过 C11 β 羟基化生物合成氢化可的松(β -hydrocortisone)过程中,蓝色梨头霉(*Absidia coerulea*)在超临界乙烯中的催化活性比在超临界二氧化碳中高 2 倍。由于超临界乙烯、乙烷具有很好的萃取能力,特别适合于抑制性发酵产物的在线萃取。

与上述结果不同,Matsuda 等^[20]用休眠的真菌细胞 *Geotrichum candidum* (IFO 5767)进行酮类的非对称还原反应,发现在 35℃、10 MPa 超临界二氧化碳环境中细胞的乙醇脱氢酶有很高的活性和构相选择性。这一结果也为超临界二氧化碳同时作为反应介质和在线萃取分离溶剂的可行性提供了依据,意义深远。

除存活率和催化活性之外,微生物在加压或超临界溶剂中的选择性也是需要考察的一个重要目标参量。Berberich 和 Knutson 等^[18]通过考察压缩氮气、乙烷、丙烷等对微生物 *C. thermocellum* 发酵生产乙醇过程选择性的影响,发现通过调节加压或超临界溶剂性能可以改变发酵产物的分布,提高乙醇生成量。而加压或超临界流体的溶剂特性可以通过调节温度、压力等非常方便地实现。

根据目前的文献报道,对于大部分微生物而言加压或超临界环境对发酵过程造成不利影响,影响程度与微生物种类、压力、温度、pH 值,乃至暴露时间等因素紧密相关。尽管这方面的研究工作还很充分,有些研究结果还相互矛盾,但过程的可行性和应用前景毋庸置疑。加压或超临界流体对微生物的抑制作用可以通过装置结构设计^[11]、过程优化^[13]等加以缓解,而对于不存在抑制作用的微生物反应,可以使用超临界流体作为反应和在线萃取溶剂^[20]。但无论如何,生物适应性溶剂的选择非常关键^[19]。

3 乙醇发酵液的在线超临界萃取分离

根据文献报道,已有很多研究者使用超临界溶剂萃取分离乙醇^[3,27-31],其中大部分以超临界二氧化碳为溶剂。到目前为止,大部分研究针对合成法制得的乙醇溶液,其乙醇浓度比发酵法获得的乙醇溶液高得多。最近几年,从发酵液中萃取分离乙醇,特别是乙醇发酵在线萃取分离的研究开始获得普遍关注。

Güvenç 等^[30]用超临界二氧化碳从发酵液中连续萃取分离乙醇。当二氧化碳体积流率为 7.5 mL/min 时,经过 10 h 可获得 88% 的乙醇收率,而且萃取收率随超临界二氧化碳-水两相界面的增

大而上升。Güvenç 等^[31]还进一步考察了采用超临界二氧化碳短时间多次间歇萃取对总分离收率的影响。在 12 MPa、313 K 条件下从含 7% (体积分数) 乙醇的发酵液中连续萃取乙醇,即在乙醇发酵液中通入超临界二氧化碳萃取 1 h 后卸压,然后立即充入新鲜的二氧化碳再萃取 0.5 h 后卸压,并重复第二次萃取过程一次。这样乙醇的分离收率从第一次的 5.8% 上升到最终的 19.2%。

德国 Henkel 和 Degussa 公司^[8]的专利中提出,从发酵罐中连续引出一部分发酵清液(不含有酵母细胞与其他固体),经压缩后流过超临界萃取塔,萃取后的发酵清液经过减压、冷却重新返回发酵罐。富含乙醇的超临界二氧化碳通过活性炭床层,乙醇被吸附下来,当吸附床达到饱和后,再生活性炭床层并收集乙醇。这一过程的优点主要有:能耗比采用传统精馏方法减少 50% 以上;消除了乙醇的抑制作用;由于二氧化碳是发酵副产物,无须考虑溶剂损失问题。

如前所述,L'Italien 等^[13]采取常压发酵—高压萃取分离—常压发酵的循环交替方式在线萃取发酵产出的乙醇。在萃取分离阶段,将 6~8 MPa、350 K 的二氧化碳通入发酵罐,超临界二氧化碳直接选择性地从水相中吸收乙醇,然后富含乙醇的二氧化碳通过减压阀流出发酵罐,并回收析出的乙醇。这一过程通过降低乙醇浓度减少其对微生物代谢过程的抑制作用,反应转化率和乙醇收率均得到提高。特别是该方法在避免加压或超临界二氧化碳与微生物细胞的直接接触方面非常成功。与上面的在线萃取过程比较,Hagen 和 Hartwig 使用了 1 个发酵罐和 2 个高压萃取塔(1 个用于萃取,1 个用于吸附),而 Thibault 等所用的只有 1 个高压发酵罐,发酵与萃取过程均在其中进行。

特别值得指出的是,Bouthun 等从分离装置设计的角度入手,也可以消除加压或超临界溶剂对微生物的抑制。他们采用中空纤维膜萃取器萃取分离乙醇水溶液,避免了加压或超临界萃取剂与微生物的直接接触,其实验流程如图 1 所示^[11]。含发酵产品的水溶液在中心管内流动,而加压或超临界流体则在环隙内流动。高压溶剂与乙醇水溶液之间由中空纤维膜隔开,一方面阻止了高压流体进入发酵液中,另一方面发酵产品透过膜孔转移到高压溶剂中,通过卸压实现溶剂与发酵产物乙醇的分离。由于微生物不会穿过膜孔进入高压溶剂一侧,该装置完全可以和发酵罐结合在一起,在消除了高压流体对微生物

活性抑制的前提下,实现乙醇发酵和在线萃取分离过程的结合。

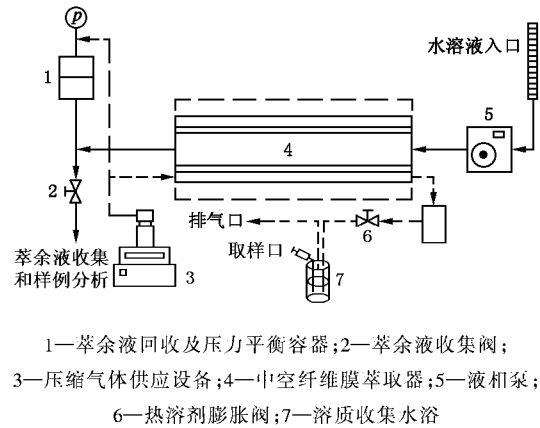


图 1 中空纤维膜萃取器及萃取分离流程

Fabre 等^[17]考虑到超临界流体对微生物的不利影响,用超滤的办法将发酵液中的微生物截流,然后对透过的发酵液进行超临界萃取以分离发酵产品香料,可以实现发酵与产物在线分离的一体化操作。与前面提出的各种在线萃取过程类似,核心问题是如何避免加压或超临界流体与微生物的直接接触,在保持原有微生物发酵活性的基础上实现抑制性产物的在线分离。

4 结论与展望

综上所述,尽管加压或超临界流体对绝大部分微生物的存活和催化活性有不同程度的负面作用,但已有的研究结果清楚表明,在保持较高乙醇收率的前提下,可以通过装置结构设计、过程优化等避免或减缓加压环境对微生物代谢的抑制作用,实现乙醇发酵与在线萃取分离过程一体化完全可能。这些成果在制药和食品加工等领域中也具有应用潜力。然而已有的研究工作仍处于实验室开发阶段,在很多方面还不成熟。实现规模化的发酵过程与抑制性产物在线萃取分离需要对一些关键性的问题进行深入探讨,笔者认为解决好以下 3 方面的问题是实现过程规模化的关键。

(1) 发酵液改性

由于初始 pH 值对微生物的存活和催化活性有显著影响^[21-22],因此,任何能维持发酵液 pH 值稳定的方法对微生物的存活都应是有益的。显然,开发合适的缓冲溶液可以用来维持发酵液的 pH 值在比较适宜的范围波动。通过加入各种细胞保护试剂也是比较好的方法,例如,Jin 等^[32]提出的通过蛋白质-磷脂复合体作为酵母细胞的保护剂,消除了乙

醇对细胞的抑制作用; Lin 等^[33]在检查加压二氧化碳对 *Listeria monocytogenes* 灭菌影响时, 发现油脂能减轻微生物的失活速率。很明显, 无论使用缓冲溶液或加入保护性试剂, 均可以提高发酵液中微生物的存活和催化活性, 这将是今后研究的一个重要方向。

(2) 嗜压和耐压微生物的利用

嗜压、耐压微生物在高压环境中表现出良好的生理特性和催化活性, 是加压或超临界系统所用微生物的理想选择。通过诱导现有微生物可能获得比较理想的嗜压或耐压微生物, 以用于各种产品的代谢。随着深海微生物探测不断向纵深发展, 寻找用于工业生产的嗜压微生物将成为可能^[34]。

(3) 操作条件优化和新型装置开发

诸多操作因素的合理配置也是减缓加压或超临界流体对微生物存活与催化活性负面影响的一种有效手段。L'Italian 等^[13]曾提出利用常压发酵和加压二氧化碳在线萃取的发酵与分离耦合过程, 实现抑制性发酵产物的在线分离, 而且发酵速率没有明显的下降。然而, 重复压缩二氧化碳在经济上无法承受。近年来出现的利用膜分离手段回收加压或超临界溶剂的方法, 可减少循环压缩过程能耗的 75%^[35]。这方面的深入研究可以提高过程的经济性, 对实际工业应用非常有益。除此之外, 开发新型的发酵-分离一体化设备, 避免加压或超临界流体对微生物的影响也是实现抑制性产物在线萃取的一条有效途径。利用中空纤维膜萃取器分离发酵产物的在线分离就是一个很好的例子^[11]。目前这方面的工作非常缺乏, 有待加强。

参考文献

- [1] Wilson R C. Upstream and Downstream Processing[M]. New York: Wiley and Sons, 1986.
- [2] Serra A, Pock M, Sola C. [J]. Process Biochemistry, 1987, 22(5): 154 - 158.
- [3] Kuk M S, Montagna J C. Solubility of oxygenated hydrocarbons in supercritical carbon dioxide[A]. In: Paulaitis M E, Penninger J M L, Gray R D, et al. Chemical Engineering at Supercritical Fluids Conditions[M]. Ann Arbor, Michigan: Ann Arbor Science, 1983.
- [4] Luong J H. [J]. Biotech Bioeng, 1985, 27(3): 280 - 285.
- [5] Maiorella B, Wilke C R, Blanch H W. [J]. Adv Biochem Eng, 1981, 20(1): 43 - 92.
- [6] Cartón A, Benito G G, Rey J A, et al. [J]. Bioresource Technol, 1998, 66(1): 75 - 78.
- [7] Pitt W W Jr, Haag G L, Lee D D. [J]. Biotech Bioeng, 1983, 25(1): 123 - 131.
- [8] Henkel Kommanditgesellschaft auf Aktien, Degussa Aktiengesellschaft. Process for manufacture of quaternary ammonium compounds[P]. US 4492802, 1985 - 01 - 08.
- [9] Kargupta K, Datta S, Sangal S K. [J]. Biochem Eng J, 1998, 1(1): 31 - 37.
- [10] Nomura M, Bin T, Nakao S. [J]. Separation Purification Technology, 2002, 27(1): 59 - 66.
- [11] Bothun G D, Knutson B L, Strobel H J, et al. [J]. J Supercrit Fluids, 2003, 25(2): 119 - 134.
- [12] Thibault J, LeDuy A, Cote F. [J]. Biotech Bioeng, 1987, 30(1): 74 - 80.
- [13] L'Italian Y, Thibault J, LeDuy A. [J]. Biotech Bioeng, 1989, 33(4): 471 - 476.
- [14] Onken U. [J]. Biotech Bioeng, 1990, 35(10): 983 - 989.
- [15] Isenschmid A, Marison I W, von Stockar U. [J]. J Biotechnol, 1995, 33(3): 229 - 237.
- [16] Knutson B L, Strobel H J, Nokes S E, et al. [J]. J Supercrit Fluids, 1999, 16(2): 149 - 156.
- [17] Fabre C E, Condoret J-S, Marty A. [J]. Biotech Bioeng, 1999, 64(4): 392 - 400.
- [18] Berberich J A, Knutson B L, Strobel H J, et al. [J]. Ind Eng Chem Res, 2000, 39(12): 4500 - 4505.
- [19] Berberich J A, Knutson B L, Strobel H J, et al. [J]. Biotech Bioeng, 2000, 70(5): 491 - 497.
- [20] Matsuda T, Harada T, Nakamura K. [J]. Chem Commun, 2000, (15): 1367 - 1368.
- [21] Zhang B Q, Liu X F, Gan Y R, et al. [J]. 化工学报, 2003, 54(5): 713 - 715.
- [22] 刘秀凤. 超临界二氧化碳中微生物的存活率和生理活性的研究[D]. 天津: 天津大学, 2002.
- [23] Dixon N M, Kell D B. [J]. J Appl Bacteriol, 1989, 67(2): 109 - 136.
- [24] Spilimbergo S, Bertuccio A. [J]. Biotech Bioeng, 2003, 84(6): 627 - 638.
- [25] Spilimbergo S, Elvassore N, Bertuccio A. [J]. J Supercrit Fluids, 2002, 22(1): 55 - 63.
- [26] Shimoda M, Kago H, Kojima N. [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(8): 4162 - 4167.
- [27] Gilbert M L, Paulaitis M E. [J]. J Chem Eng Data, 1986, 31(3): 296 - 298.
- [28] Yao S, Guan Y, Zhu Z. [J]. Fluid Phase Equilibria, 1994, 99(15): 249 - 259.
- [29] Gros H P, Diaz S, Brignole E A. [J]. J Supercrit Fluids, 1998, 12(1): 69 - 84.
- [30] Güvenç A, Mehmetoglu Ü, Çalimili A. [J]. J Supercrit Fluids, 1998, 13(1 - 3): 325 - 329.
- [31] Güvenç A, Mehmetoglu Ü, Çalimili A. [J]. Turkish Journal of Chemistry, 1999, 23(3): 285 - 291.
- [32] Jin C K, Chiang H L, Wang S S. [J]. Enz Microbiol Technol, 1981, 3(3): 249 - 257.
- [33] Lin H M, Cao N J, Chen L F. [J]. J Food Sci, 1994, 59(3): 657 - 659.
- [34] Abe F, Horikoshi K. [J]. Trends in Biotechnology, 2001, 19(3): 102 - 108.
- [35] 张宝泉, 刘丽丽, 林跃生. [J]. 现代化工, 2003, 23(5): 9 - 12. ■