

几种化学物质对稻草秸秆酶解糖化的影响

任天宝^{1,2}, 尹双耀¹, 马孝琴², 张玲玲¹, 苏 尧³, 宋安东^{1*}

(1.河南农业大学生命科学学院, 郑州 450002; 2.河南科技学院, 河南 新乡 453003; 3.鹤壁互邦农业科技有限公司, 河南 鹤壁 458000)

摘 要:在木质纤维素酶解研究领域,高浓度还原糖的获得是实现其能源转化的基础。以稀硫酸预处理后的稻草秸秆为原料,初始酶解物料条件为 20%(重量/体积),木聚糖酶 220 U·g⁻¹(底物),纤维素酶 6 FPU·g⁻¹(底物),果胶酶 50 U·g⁻¹(底物),选取吐温 80 (Tween80)、MgSO₄、FeSO₄、聚乙二醇(PEG)和牛血清白蛋白(BSA)作为酶解体系添加物,分别考察了其添加量对还原糖浓度的影响。试验结果表明:在稻草秸秆酶解体系中,Tween80、MgSO₄、FeSO₄、PEG 和 BSA 5 种化学物质各自最佳添加量分别为 0.05、0.000 5、0.02、0.01 g 和 0.000 5 g·g⁻¹(底物);助催化作用强度依次为 MgSO₄>Tween80>BSA>FeSO₄>PEG。添加 MgSO₄ 0.000 5 g·g⁻¹(底物),48 h 糖化后,还原糖浓度达到 72.45 g·L⁻¹,比对照提高了 7.98%。试验结果表明添加适量化学物质可以有效提高还原糖浓度。

关键词:秸秆;预处理;化学物质;酶解

中图分类号:X712 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2012)01-0206-06

The Effect of Chemical Inducers on Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw

REN Tian-bao^{1,2}, YIN Shuang-yao¹, MA Xiao-qin², ZHANG Ling-ling¹, SU Yao³, SONG An-dong^{1*}

(1.College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China, 2.Henan Institute of Science and Technology, Xinxiang 453003, China; 3.Hebi Hubang Agricultural Technology Co. Ltd, Hebi 458000, China)

Abstract: High-concentration reducing sugars production from lignocellulosic is a important foundation for energy conversion in the research field of enzymatic hydrolysis. In this study, the reducing sugars were produced from pretreated rice stover by enzymatic hydrolysis. After being pretreated by the dilute sulphuric acid, the initial ratio of solid raw material to liquid culture was 20%(W/V) and the initial concentrations of enzymes for xylanase, cellulose and pectinase were 220 U, 6 FPU, and 50 U per gram of substrates, respectively. The impacts of Tween80, MgSO₄, FeSO₄, polyethylene glycol(PEG) and bovine serum albumin(BSA) on the enzymatic hydrolysis of rice stover were investigated. Results showed that the optimal addition of these five chemicals inducers for Tween80, MgSO₄, FeSO₄, PEG and BSA were 0.05 g, 0.000 5 g, 0.02 g, 0.01 g and 0.000 5 g per gram of substrates, respectively; and promoting catalysis intensity of these five chemicals inducers were in order of MgSO₄, Tween80, BSA, FeSO₄, PEG. After 48 hours saccharification, the final concentration of reducing sugar was increased to 72.45 g·L⁻¹ with addition of MgSO₄(0.000 5 g) per gram of substrates, increased 7.98% compared with the control. This study demonstrated that the addition of proper amount chemicals inducers could significantly improve the concentration of reducing sugar.

Keywords: stover; pretreatment; chemical inducers; enzymatic hydrolysis

随着国际化石能源的日益枯竭,节能减排、保护环境的呼声日益高涨,各国纷纷采取有效措施鼓励生物质能产业的发展^[1]。利用纤维素类生物质生产燃料乙醇,因其原料来源广泛、价格低廉、具有再生特点,

成为可替代能源研究的重点之一^[2]。由于木质纤维素原料质地疏松、能量密度小、浸水性差等特点,因此构建木质纤维素高效糖化技术体系是实现生物液体燃料开发的重要途径^[3-4]。

研究表明高浓度糖化液是高浓度乙醇发酵前提,并可有效降低乙醇蒸馏能耗和生产成本,也是实现木质纤维素液体燃料产业化发展的平台^[5]。近年来,虽然纤维素高浓度水解技术取得了一定进展,但仍然存在两个较为突出的问题:一是纤维素酶用量大,酶的添

收稿日期:2011-05-24

基金项目:国家自然科学基金资助项目(70741032);国家农业科技成果转化资金资助项目(2006G B2D000173)

作者简介:任天宝(1981—),男,河南尉氏人,博士,主要从事农业废弃物资源化利用研究。E-mail:tianbao1016@126.com

* 通讯作者:宋安东 E-mail:song1666@126.com

加量通常为 $20\sim 45 \text{ FPA} \cdot \text{g}^{-1}$ (原料);二是还原糖浓度较低,且糖化时间较长,这些不利因素制约了纤维乙醇产业化发展进程^[6]。天然纤维素复杂的结构特性是影响构建高效酶解体系关键因素,降低了酶与底物的有效接触,增加了酶解的难度。目前,基于木质纤维素酶水解机理模型,围绕木质纤维素高浓度水解液的技术体系优化,降低或消除水解过程中产物反馈抑制与激活效应已经成为研究的重点之一^[7]。酶促反应机理分析表明,在纤维素酶与底物作用过程中,存在催化功能域和碳水化合物结合功能域。Dadi 等^[8-9]在研究过程中发现一些理化因子对酶促反应具有一定的激活作用,如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Co^{2+} 和中性盐类等^[10]。Nguyen 等和颜涌捷等曾研究了用 Fe^{2+} 催化水解纤维素,能够明显提高纤维素水解糖的得率^[11-12]。Alkasrawi 等^[13]研究发现在同步糖化发酵过程中添加非离子型表面活性剂能阻止木素对纤维素酶的无效吸附,提高同步糖化发酵转化乙醇的反应速度和得率,减少昂贵的纤维素酶的用量。

本研究以稻草秸秆为原料,分别选取 Tween80、 MgSO_4 、 FeSO_4 、PEG 和 BSA 5 种理化因子作为酶解体系添加物,考察其对还原糖总糖浓度的影响,探讨和优化经稀酸预处理的稻草秸秆酶解工艺。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 原料

稻草秸秆取自河南农业大学北郊科教试验园区,粉碎 120~160 目,水分含量 12%,经测定其主要成分含量(干基)如下:

纤维素 39.8%、半纤维素 21.6%、木质素 17.3%、灰分 2.2%、其他 19.1%。

1.1.2 所用酶类

纤维素酶:购自无锡杰能科生物工程有限公司,滤纸酶活 $180 \text{ FPU} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

木聚糖酶:购自无锡杰能科生物工程有限公司,CMC 酶活 $4.5 \times 10^4 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

果胶酶:购自宁夏和氏璧生物技术有限公司,酶活 $5.0 \times 10^5 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

1.2 稀酸预处理及糖化

每次准确称取稻草秸秆原料 10 g 放于 300 mL 三角瓶中,平行 3 次,用 1% 稀硫酸溶液浸润,初始固形物含量为 20%, 121°C 处理 60 min 后,冷却至室温,在 pH5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液进行酶解。每克原料

酶添加量为:木聚糖酶 $220 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,纤维素酶 $6 \text{ FPU} \cdot \text{g}^{-1}$,果胶酶 $50 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$,温度 45°C ,转速为 $120 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$,经 48 h 后测定还原糖浓度。

1.3 分析方法

纤维素酶酶活依据 QB 2583—2003 测定。

木聚糖酶酶活依据 GB/T 23874—2009 测定。

果胶酶酶活依据 QB 1502—1992 测定。

总还原糖浓度依据 DNS 法测定。

1.4 数据分析

利用 SAS 8.0 对数据进行统计分析。对每组数据进行方差齐次性检验,应用单变量方差分析确定化学物质添加量对酶解影响。利用最小显著差数法(LSD 法)对各处理组间的均值进行差异显著性检验。

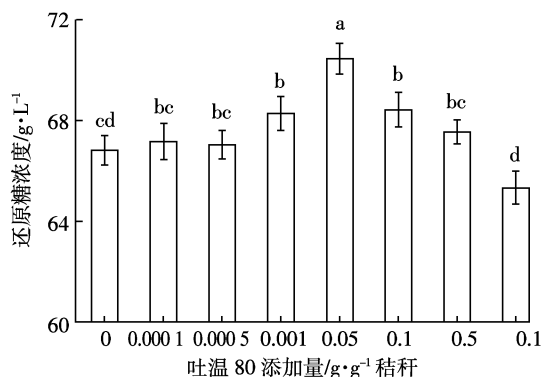
2 结果与分析

2.1 Tween80 对还原糖浓度的影响

由图 1 可以看出,随着 Tween80 添加量递增,还原总糖浓度均在一定程度上产生动态响应,总体变化趋势先增加然后递减。在添加量 $0.0001\sim 0.05 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (底物),还原总糖浓度明显上升,达到 $70.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,与对照相比增加了 $3.36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随着 Tween80 添加量递增,在大于 $0.05 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (底物)后,还原糖浓度呈下降趋势,说明 Tween80 对液体理化特性有一定的影响,并不是添加越多越好,在某范围内可以提高底物的酶解效果。从总的变化趋势看,添加 Tween80 对糖化作用具有显著影响($P<0.05$)。当添加量为 $0.05 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ (底物)时,比对照增加 5.03%。

2.2 MgSO_4 对还原糖浓度的影响

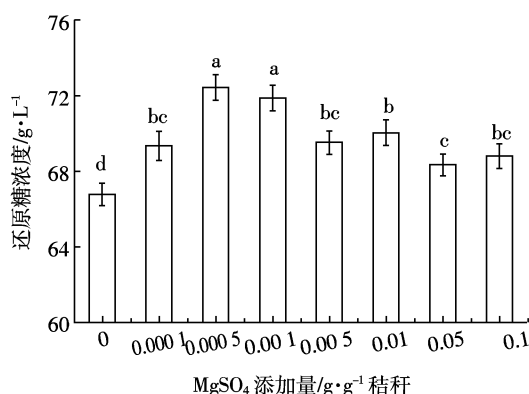
由图 2 可以看出,随着 MgSO_4 添加,还原总糖浓度均在一定程度上产生明显变化动态响应,先呈明显



Error bars: $\pm$ SE, 字母不同表示差异显著($P<0.05$),下同

图 1 Tween80 对还原糖浓度的影响

Figure 1 Effect of Tween80 on the concentration of reducing sugar

图2 MgSO₄对还原糖浓度的影响Figure 2 Effect of MgSO₄ on the concentration of reducing sugar

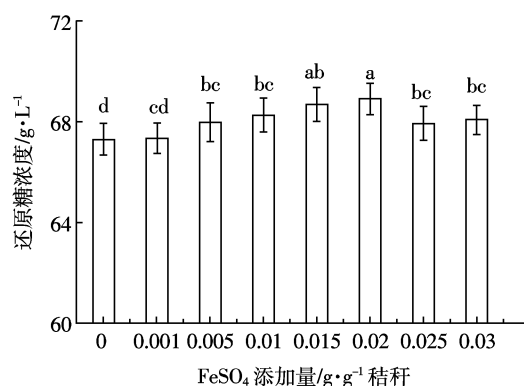
增加,然后增量趋于减少。在添加量 0.000 1~0.000 5 g·g⁻¹(底物)时,还原总糖浓度明显上升,达到 72.44 g·L⁻¹,与对照相比增加了 5.35 g·L⁻¹。还原总糖浓度提高了 7.98%,与对照差异极为显著。总体而言,添加对糖化作用具有显著影响,还原总糖浓度都高于对照值。结果表明酶解糖化体系内添加适量的 Mg²⁺离子,有助于促进酶水解糖化,可以显著地提高还原糖得率。

2.3 FeSO₄对还原糖浓度的影响

由图 3 可以看出,添加少量的 FeSO₄,还原糖浓度略有上升,但增幅相对较小。当糖化液中 FeSO₄ 浓度达 0.02 g·g⁻¹(底物)时,还原糖浓度达到最大值 68.87 g·L⁻¹,与对照相比增加了 2.15 g·L⁻¹,与对照相比提高了 3.08%。当添加量大于 0.02 g·g⁻¹(底物)时,还原糖浓度趋于减小。当添加量为 0.05 g·g⁻¹ 秸秆时,还原总糖浓度比对照增加 5.03%。从总的变化趋势看,添加对糖化作用具有显著影响。结果表明 FeSO₄ 对底物糖化酶解有一定的促进作用。

2.4 PEG 对还原糖浓度的影响

试验选择了两种不同聚合度的 PEG4000 和

图3 FeSO₄对还原糖浓度的影响Figure 3 Effect of FeSO₄ on the concentration of reducing sugar

PEG6000,考察其对底物酶解的影响。由图 4 可以看出,二者对酶水解影响差异明显。当 PEG4000 添加量为 0.01 g·g⁻¹(底物)时,还原糖浓度达到最大值 68.54 g·L⁻¹,比对照增加了 1.82 g·L⁻¹。随着 PEG4000 浓度增加,还原糖浓度基本低于对照水平。PEG6000 对酶水解影响虽呈上升趋势,但酶促作用并不明显。从总的变化趋势看,PEG4000 和 PEG6000 对底物酶解效果都不明显。

2.5 BSA 对还原总糖浓度的影响

由图 5 可以看出,添加 BSA 使还原糖浓度略有变化。当添加量为 0.000 5 g·g⁻¹(底物)时达到最大值 69.34 g·L⁻¹,与对照相比,还原糖浓度仅提高 0.75 g·L⁻¹。随着 BSA 浓度继续增加,还原糖浓度基本维持不变。

2.6 最佳添加量对还原总糖浓度的影响

图 6 比较了 5 种化学物质最佳添加量时对稻草秸秆酶解还原糖浓度的影响。可以看出,Tween80、MgSO₄、FeSO₄、PEG、BSA 5 种化学物质都对稻草秸秆酶水解有助催化作用,还原总糖浓度均在一定程度上产生动态响应,且不同程度地提高了纤维素的还原糖

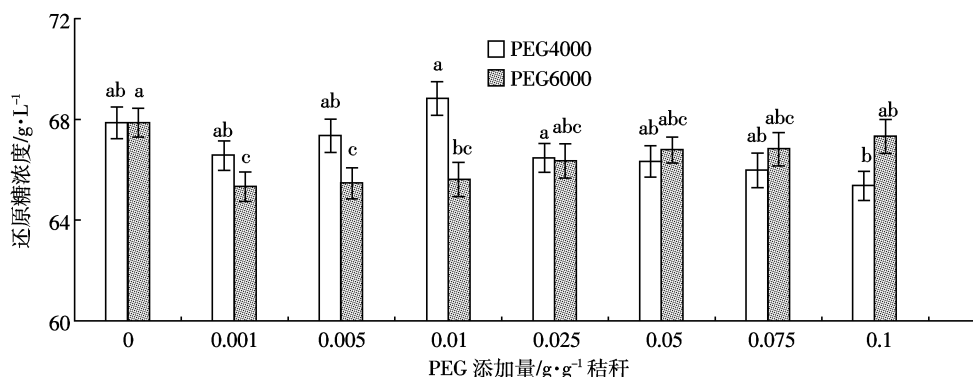
不同字母表示同一种 PEG 不同添加量之间差异显著($P<0.05$)

图4 PEG对还原糖浓度的影响

Figure 4 Effect of PEG on the concentration of reducing sugar

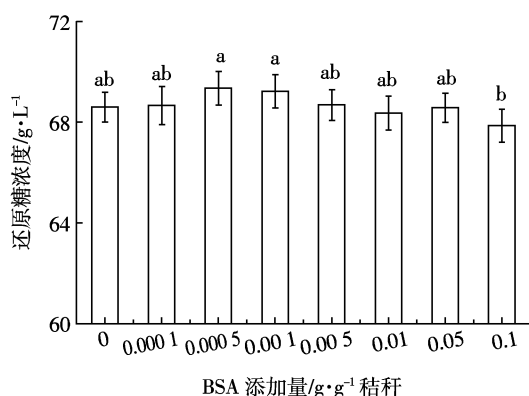


图5 BSA对还原糖浓度的影响

Figure 5 Effect of BSA on the concentration of reducing sugar

浓度。在最佳添加量条件下,助催化强度依次为 $\text{MgSO}_4 > \text{Tween80} > \text{BSA} > \text{FeSO}_4 > \text{PEG}$, 其中以 Mg^{2+} 的效果最佳,最高还原糖浓度达到 $72.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 比对照提高了 7.98%, 影响最为显著。

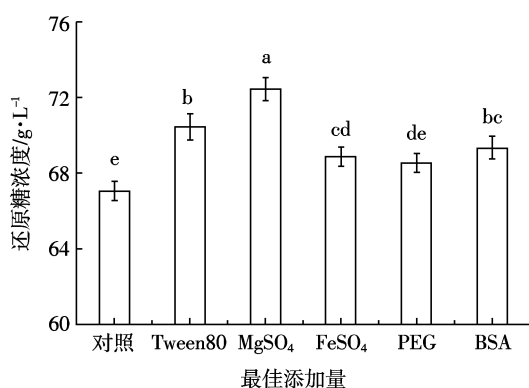


图6 最佳添加量对还原糖浓度影响的比较

Figure 6 Effect of the optimal addition on the concentration of reducing sugar

3 讨论

在纤维乙醇研究领域中,纤维素原料高浓度还原糖水解液的获得有利于提高后期乙醇高浓度发酵并降低乙醇蒸馏的能耗和经济成本^[6]。因此,开展木质纤维素高效糖化技术研究是实现木质纤维素原料高值化利用的重要途径。

围绕纤维素原料高浓度酶解体系的建立,选取有代表性的 Tween80、 MgSO_4 、 FeSO_4 、聚乙二醇(PEG)和牛血清白蛋白(BSA) 5种理化因子作为酶解体系添加物,分别研究其对底物酶解糖化作用的影响。

有研究报道显示,Tween80 是一种非离子表面活性剂,水溶性较好,有利于酶与底物的吸附,在一定浓度下可以扩大酶和原料的接触面积而促进糖化和发

酵^[14]。由图1中添加 Tween80 对还原糖浓度的变化趋势可以看出对糖化作用具有显著影响。这与其他研究结果相一致。张明令等^[15]研究表明,当水中加入少量表面活性剂 Tween80 时,液体表面张力急剧下降,降低界面的自由能,从而有利于增强吸附效应,随着表面活性剂浓度的增加,当达到临界胶束浓度时,液体表面张力会发生突变现象,可能影响物质的吸附。王健等^[16]研究了 Tween80 对烃降解菌 HB29 产糖脂的影响,当溶液中 Tween80 添加量小于 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,有利于产物的生成,当大于 $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,糖脂量与生物量都出现下降。赖智乐等^[17]研究了 Tween80 对蒸汽爆破预处理玉米秸秆酶解糖化与发酵的影响,添加 0.15% (质量分数) 的 Tween80 有助于提高产物浓度。罗鹏等^[18]在对表面活性剂对麦草同步糖化发酵转化乙醇的影响中发现,添加 $0.03 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ 的 Tween80, 反应 72 h, 乙醇浓度比未添加表面活性剂的体系提高了 15.8%。综上所述,值得注意的是,该试验结果进一步印证了 Tween80 对液体影响理化的特性,且添加量较少。通过对液体表面张力的微观改变,进而影响到酶的吸附与解析过程,在一定程度上可以提高底物的酶解效果,从而有利于提高还原糖浓度。

Mg^{2+} 离子是一类重要的酶活性中心激活剂,通过与配位共价键的结合,有利于底物与催化功能域或碳水化合物功能域的结合,增强纤维素酶类的酶切效应^[19]。由图2可见,添加 Mg^{2+} 离子对糖化作用具有显著影响,还原总糖浓度提高 7.98%。其他研究者对 Mg^{2+} 离子在酶促反应过程中作用机制研究也表明,添加适量的 Mg^{2+} 离子,有助于促进酶水解糖化。李卫芬等^[20]进行了金属离子对糖化酶活影响的研究,结果表明 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Mg^{2+} 离子对糖化酶有一定的激活作用,提高糖化酶的作用效果。试验结果表明酶解糖化体系内添加适量的 Mg^{2+} 离子,有助于促进酶水解糖化,可以显著地提高还原糖得率。

研究显示, Fe^{2+} 离子是酶类的重要的激活剂与抑制剂。图3中, FeSO_4 含量从 0% 按照一定的梯度提高到 0.02% 时,还原糖浓度持续增大,而当 FeSO_4 含量提高为 0.025% 时,还原糖浓度开始出现下降,主要是糖化液中 Fe^{2+} 离子达到一定的浓度会对酶促反应产生抑制作用。这与 Target 等^[21]的研究结论相一致,他们认为,在间歇反应器中,由于水解糖的继续降解,纤维素稀酸水解糖的得率一般只能达到 55%~60%。在水解反应中加入适量的 Fe^{2+} 离子后,硬木水解还原糖得率提高 5%,说明 Fe^{2+} 离子对小麦秸秆水解制备还

原糖具有助催化作用。颜涌捷等^[12]进行了纤维素连续催化研究,观察到了类似的现象,添加2%的 Fe^{2+} 离子,木屑中可水解部分的71%以上能被转化为还原糖,并发现 Fe^{2+} 离子的催化效果强于 Fe^{3+} 离子。从本试验结果与其他研究结果比较可见,虽然酶解的底物不同,但这一规律与前者具有一致性。

研究表明,添加适量的表面活性剂可降低溶液的界面张力,提高溶液的通透性,增加底物在水中溶解性与酶的吸附强度,促进底物的降解^[13]。不同种类的非离子型表面活性剂对糖化影响研究也鲜见报道,由于其不同原料化学组成和结构存在显著差异,影响表面活性剂的强化效果。PEG具有良好的水溶性,并与许多有机物组分有良好的相溶性,常作为非离子表面活性剂。添加PEG的试验结果(图4)表明,还原糖浓度在一定程度上产生了动态响应,还原糖浓度最高比对照增加2.7%。汤金婷等^[22]在对木质纤维素酶解糖化研究中,向酶液中添加0.14%的PEG4000,发现对酶有激活作用,可以显著提高酶活力。因此,在某种程度上印证了以上研究结果。

BSA也是一种常用的表面活性剂。添加BSA的试验结果(图5)表明,加入BSA后,还原糖浓度变化幅度较小,它可能起到“载体”或“保护”作用,有助于酶的稳定性。罗鹏等^[18]在对麦草同步糖化发酵转化乙醇试验过程中,添加 $0.01\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ 的BSA,乙醇浓度提高7.28%。这与本试验的结果相比,BSA对酶解作用都有激活作用,但作用强度差异较大,可能前者采用的同步糖化(SSF)工艺。

4 结论

本研究以稀硫酸预处理后的稻草秸秆为原料,分别考察了5种化学物质最佳添加量对其酶解还原糖浓度的影响。试验结果表明:

(1)每克稻草秸秆酶解体系中,Tween80、 MgSO_4 、 FeSO_4 、PEG、BSA最佳添加量分别为:0.05、0.0005、0.02、0.01 g和0.0005 g。

(2)5种化学物质都对稻草秸秆酶水解有助催化作用,在最佳添加量条件下,助催化强度依次为 $\text{MgSO}_4 > \text{Tween80} > \text{BSA} > \text{FeSO}_4 > \text{PEG}$,其中以 MgSO_4 的效果最佳,还原糖最高浓度达到 $72.45\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,与对照相比提高7.98%。

参考文献:

[1] Yan Lin, Shuzo Tanaka. Ethanol fermentation from biomass resources:

Current state and prospects[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006(69): 627–642.

[2] 江滔,路鹏,李国学. 稻草秸秆稀酸水解糖化法影响因子的研究[J]. 农业工程学报, 2008, 24(7): 185–189.

JIANG Tao, LU Peng, LI Guo-xue. Formation cause and influencing factors of furfurals during the dilute acid hydrolysis of corn stalks[J]. *Transactions of the CSAE*, 2009, 24(7): 185–189.

[3] 张百良,王吉庆,徐桂转,等. 中国生物能源利用的思考[J]. 农业工程学报, 2009, 25(9): 226–231.

ZHANG Bai-liang, WANG Ji-qing, XU Gui-zhuan, et al. Thinking about bio-energy utilization in China[J]. *Transactions of the CSAE*, 2009, 25(9): 226–231.

[4] 吴创之,周肇秋,阴秀丽,等. 我国生物质能源发展现状与思考[J]. 农业机械学报, 2009, 40(1): 91–100.

WU Chuang-zhi, ZHOU Zhao-qiu, YIN Xiu-li, et al. Current status of biomass energy development in China[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2009, 40(1): 91–100.

[5] Barry D Solomon, Justin R Barnes, Kathleen E Halvorsen. Grain and cellulosic ethanol: History, economics, and energy policy[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2007, 6(31): 416–425.

[6] 宋安东,任天宝,张玲玲,等. 稻草秸秆分批补料获得高还原糖浓度酶解液的条件优化[J]. 生物工程学报, 2011, 27(3): 393–397.

SONG An-dong, REN Tian-bao, ZHANG Ling-ling, et al. Optimization of corn stover hydrolysis by fed-batch process [J]. *Chin J Biotech*, 2011, 27(3): 393–397.

[7] Badal C Saha, Loren B Iten, Michael A Cotta, et al. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification, and fermentation of rice hulls to ethanol[J]. *Biotechnology Progress*, 2005, 21(3): 816–822.

[8] Dadi A P, Schall C A, Varanasi S. Mitigation of cellulose recalcitrance to enzymatic hydrolysis by ionic liquid pretreatment [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2007, 136–140(7): 407–421.

[9] Chenlin Li, Bernhard Knierim, Chithra Manisseri, et al. Comparison of dilute acid and ionic liquid pretreatment of switchgrass: Biomass recalcitrance, delignification and enzymatic saccharification [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(13): 4900–4906.

[10] Sims R E H, Mabey W, Saddler J N, et al. An overview of second generation biofuel technologies[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(6): 1570–1580.

[11] Nguyen Quang A, Tucker Melvin P. Dilute acid/metal salt hydrolysis of lignocellulosics[P]. US6423145, 2002.

[12] 颜涌捷,任铮伟. 纤维素连续催化水解研究 [J]. 太阳能学报, 1999, 20(1): 55–58.

YAN Yong-jie, REN Zheng-wei. Continuous catalytic hydrolysis of cellulose[J]. *Acta Energetica Solaris Sinica*, 1999, 20(1): 55–58.

[13] Alkasrawi M, Eriksson T, Börjesson J, et al. The effect of tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 33(2): 71–78.

[14] Hendriks A T W M, Zeeman G. Pretreatments to enhance the digestibility of lignocellulosic biomass[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(1): 10–18.

[15] 张明令,张海燕,丛英,等. 吐温-80在水溶液中的表面活性研究

- [J]. 中成药, 2010, 32(1):55-59.
- ZHANG Ming-ling, ZHANG Hai-yan, CONG Ying, et al. Influence of tween80 on the surface activity in water[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*, 2010, 32(1):55-59.
- [16] 王 健, 侯百友, 孙玉梅, 等. 吐温-80、乙醚、NaCl 对烃降解菌 HB29 产糖脂的影响[J]. 中国酿造. 2010, 218(5):113-116.
- WANG Jian, HOU Bai-you, SUN Yu-mei, et al. Influence of addition of tween80, ether and sodium chloride on the glycolipid production by hydrocarbon degrading bacteria HB29[J]. *China Brewing*, 2010, 218(5):113-116.
- [17] 赖智乐, 常 春, 马晓建, 等. 汽爆玉米秸秆同步糖化发酵产乙醇的工艺优化[J]. 农业工程学报, 2010, 26(7):250-254.
- LAI Zhi-le, CHANG Chun, MA Xiao-jian, et al. Process optimization of ethanol production from steam exploded corn stalk by simultaneous saccharification and fermentation[J]. *Transactions of the CSAE*, 2010, 26(7):250-254.
- [18] 罗 鹏, 刘 忠. 表面活性剂对麦草同步糖化发酵转化乙醇的影响[J]. 过程工程学报, 2009, 9(2):355-360.
- LUO Peng, LIU Zhong. Effects of surfactants on simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2009, 9(2):355-360.
- [19] Rudolf A, Alkasrawi M, Zacchi G, et al. A comparison between batch and fed-batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2005, 37(2): 195-204.
- [20] 李卫芬, 许梓荣, 孙建义, 等. 金属离子对糖化酶活性的影响 [J]. 浙江农业大学学报, 1999, 25(3):296-298.
- LI Wei-fen, XU Zi-rong, SUN Jian-yi, et al. Influence of metallic ions on glucoamylase activity[J]. *Journal of Zhengjiang Agricultural University*, 1999, 25(3):296-298.
- [21] Target R W, Kim J S, Lee Y Y. Fundamental aspects of dilute acid hydrolysis/fraction kinetics of hardwood carbohydrates cellulose hydrolysis[J]. *Ind Eng Chem Res*, 2000, 39(8):2817-2825.
- [22] 汤金婷, 董玲玲, 李志军, 等. 木质纤维素酶解糖化发酵研究 [J]. 酿酒科技, 1999, 177(3):125-129.
- TANG Jin-ting, DONG Ling-ling, LI Zhi-jun, et al. Study on the saccharification and the fermentation of lignocellulose[J]. *Liquor-Making Science & Technology*, 1999, 177(3):125-129.