

doi:10.3969/j.issn.0253-2417.2016.05.013

亚硫酸盐预处理对蔗渣酶解效率的影响



LIU Zhi-jia

刘志佳, 董益帆, 兰天晴*

(昆明理工大学食品安全研究院, 云南 昆明 650500)

摘要: 为了破坏蔗渣的抗降解性, 获得高的酶解效率, 采用亚硫酸盐法对蔗渣进行预处理, 探讨亚硫酸氢钠用量对蔗渣理化性质、表面磺酸基含量(磺化度)及酶解效率的影响, 并进一步分析了磺化度对酶解效率的影响。结果显示: 不同亚硫酸氢钠用量蔗渣的结晶度(I_{Cr})变化不显著, 但预处理后蔗渣纤维素结晶区相对含量上升, 半纤维素含量减少。50 g 蔗渣, 按固液比 1:8 (g:mL) 加入 1.1% 的稀硫酸, 亚硫酸氢钠加入量(以绝干蔗渣计)为 8%, 在 160 °C 条件下反应 30 min 时制得的蔗渣其表面磺酸基最多, 达 131.73 $\mu\text{mol/g}$ 。在 2% 干蔗渣, 7.5 FPU/g(以干蔗渣计), 50 °C, 72 h 酶解条件下, 对不同磺化度的蔗渣进行酶解, 结果显示酶解效率随底物的磺化度升高而升高, 最高综合纤维素水解效率可达 83.76%。研究表明: 蔗渣的酶解效率与磺酸基的含量呈正相关, 而与蔗渣中纤维素的结晶度关系不明显; 酸性亚硫酸盐法可除去绝大部分半纤维素, 破坏蔗渣抗降解性, 促进酶解效率。

关键词: 蔗渣; 亚硫酸盐预处理; 纤维素酶水解; 磺化度; 结晶度

中图分类号: TQ353

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2016)05-0089-06

引文格式: 刘志佳, 董益帆, 兰天晴. 亚硫酸盐预处理对蔗渣酶解效率的影响[J]. 林产化学与工业, 2016, 36(5): 89-94.

Effect of Sulfite Pretreatment on Hydrolysis Efficiency of Sugarcane Bagasse

LIU Zhi-jia, DONG Yi-fan, LAN Tian-qing

(Food Safety Institute, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: To overcome the anti-degradation of sugarcane bagasse, sulfite pretreatment (SPORL) was used and the effects of sodium bisulfite concentration on the physicochemical characteristics, the sulfonic acid group on the surface (sulfonation degree) and hydrolysis efficiency of sugarcane bagasse were investigated, and the effect of sulfonation degree on hydrolysis efficiency of bagasse was further studied. The results revealed that different sodium bisulfite concentration had no significant influences on the crystallinity index (I_{Cr}) of bagasse and bagasse samples treated by SPORL had more crystalline cellulose and less hemicellulose. Besides, 50 g oven bagasse with 1:8 solid-liquid ratio was treated by adding 8% sodium bisulfite (based on the dry bagasse) at 160 °C for 30 min and 131.73 $\mu\text{mol/g}$ sulfonic group was obtained. The hydrolyses of bagasse with different degree of sulfonation were conducted at 50 °C for 72 h as 7.5 FPU/g dry bagasse (based on 2% dry bagasse). The results demonstrated that the enzymatic efficiency increased with the increase of degree of sulfonation and the highest hydrolysis efficiency of holocellulose was 83.76%. The study indicated that the hydrolysis efficiency of bagasse was positively related to sulfonic group content in bagasse and had no significant relationship with crystallinity degree of bagasse. Low-pH SPORL could remove most hemicellulose in bagasse, and the anti-degradation of bagasse was overcome. Finally, the enzymatic hydrolysis of lignocellulose was enhanced as well.

Key words: sugarcane bagasse; SPORL; enzyme hydrolysis of cellulose; degree of sulfonation; crystallinity degree

随着能源危机和全球变暖等问题的日益严重, 将蔗渣、秸秆、玉米芯等农业废弃物转化为燃料乙醇, 用来替代化石能源并减少环境污染, 具有广阔的发展前景。我国是世界上仅次于巴西和印度的第三大

收稿日期: 2015-12-17

基金项目: 云南省科技计划面上资助项目(2014FB119)

作者简介: 刘志佳(1989—), 女, 云南丽江人, 硕士, 主要从事生物质能源研究工作

* 通讯作者: 兰天晴, 讲师, 博士, 硕士生导师, 研究领域为生物质能源; E-mail: lantianqing_8019@163.com.

甘蔗种植国,蔗渣产量丰富^[1]。然而,由于木质纤维原料特殊的天然屏障抗降解性^[2],蔗渣的利用率仍较低。为了提高蔗渣的利用率,必须对蔗渣进行预处理。目前常见的预处理方法有氨气爆破法、离子预处理法和酸预处理法等^[3]。由美国农业部林产品实验室开发出一种新的生物质预处理方法——亚硫酸盐预处理法(SPORL)^[4],不仅可以有效去除木质纤维原料中的半纤维素,而且消耗能量较少,具有工业化应用的潜力^[5]。前期研究发现^[6-8],SPORL法可使底物中的木质素磺化生成木质素磺酸盐,增加木质素亲水性,从而减少木质素与纤维素酶的无效吸附,增加纤维素酶的有效利用,促进底物中纤维素的酶解效率。因此,亚硫酸盐浓度是亚硫酸盐法预处理过程中的一个关键研究点。本研究以蔗渣为底物,探讨2%~8%亚硫酸氢钠预处理对蔗渣理化性质及酶水解效率的影响,旨在为SPORL预处理法的推广提供理论依据,并对提高蔗渣利用率、降低纤维素乙醇的生产成本具有重要意义。

1 实验

1.1 材料与仪器

蔗渣,广西贵糖(集团)股份有限公司,长度约1~2 cm。纤维素酶CTec2由Novozymes提供,酶活力为147 FPU/mL。葡萄糖、木糖、纤维二糖等购自Sigma公司。其他所用试剂如NaHSO₃、CaCO₃、NaOH、NaCl等均为分析纯。

ZQS1-15型旋转蒸煮锅,咸阳通达机械制造有限公司;Agilent 1260高效液相色谱,配备Agilent G1362AX型示差折光检测器,美国Agilent公司;所用色谱分析柱为Sepax Carbomix Pb-NP(7.8 mm×300 mm),美国赛分公司;DDSJ-308A型电导率仪,上海雷磁仪器厂;TENSOR27型红外光谱仪,德国Bruker公司;D/max-2200型X射线衍射仪,日本理学公司。

1.2 实验方法

1.2.1 亚硫酸盐预处理 预处理在1 L的不锈钢高温反应罐中进行。每罐填装干蔗渣50 g,亚硫酸氢钠的添加量分别为蔗渣绝干质量的2%、4%、6%和8%,按固液比1:8(g:mL)加入1.1%的稀硫酸,密封后放入旋转蒸煮锅,通电升温至160℃,保持30 min,转速为1 r/min。完成反应后,冷却至室温,用纱布分离蔗渣和预处理液,储存于4℃冰箱备用。此预处理后按NaHSO₃添加量的不同得到不同磺化度的蔗渣,分别为S-2%、S-4%、S-6%和S-8%。

1.2.2 预处理蔗渣的酶解 精确称取预处理后的绝干蔗渣1 g放入100 mL带塞锥形瓶,用50 mL,0.05 mol/L的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液调节水解体系pH值为5.3。酶用量为7.5 FPU/g(以绝干蔗渣质量计)。将上述锥形瓶放入摇床,酶解条件:50℃,180 r/min培养72 h,取上清液,DNS法测水解液中还原糖。蔗渣水解效率(y_1)和综纤维素水解效率(y_2)计算公式如下:

$$y_1 = m_1 \times 0.9 / m_2 \times 100\% \quad (1)$$

$$y_2 = m_1 \times 0.9 / m_3 \times 100\% \quad (2)$$

式中: m_1 —水解液中的还原糖质量,g; m_2 —蔗渣干质量,g; m_3 —原料中综纤维素质量,g;0.9—纤维素与葡萄糖的转换系数。

1.3 分析与表征

1.3.1 蔗渣化学成分分析 蔗渣中纤维素、半纤维素、木质素的含量测定参考美国可再生能源实验室提供的方法^[9]。糖分由高效液相色谱分析仪分析,流动相为纯净水;色谱条件:流速0.45 mL/min,柱温75℃,检测器温度30℃。用CaCO₃调节预处理液pH值为5,并用0.22 μm水系滤膜过滤,分析其单糖组分。

1.3.2 蔗渣表面磷酸基测定 蔗渣表面的磷酸基由电导率滴定法测得^[10]。

1.3.3 FT-IR和XRD分析 预处理前后蔗渣表面官能团的变化用傅里叶红外光谱仪测得,扫描波数为400~4000 cm⁻¹,扫描次数10次,光谱分辨率4 cm⁻¹。并用X射线衍射仪测定了预处理前后蔗渣的结晶度变化。实验仪器采用Cu靶,衍射角2θ为5~40°,蔗渣结晶度 $I_{Cr} = (I_{002} - I_{am}) / I_{002} \times 100\%$,其中 I_{002} 为002面衍射峰的极大强度, I_{am} 为非结晶背景的散射强度^[11]。蔗渣在进行FT-IR和XRD测试前均放置在45℃烘箱烘至质量恒定,然后再过孔径为0.6 mm筛子。

2 结果与讨论

2.1 亚硫酸盐预处理对蔗渣组成的影响

2.1.1 预处理前后成分变化 半纤维素是形成生物质抗降解屏障的一个重要因素,主要分为3类,即聚木糖类、聚葡萄糖甘露糖类和聚半乳糖葡萄糖甘露糖类^[12]。木质素除了对纤维素具有保护作用外,还会与纤维素酶发生无效吸附^[12]。因此,蔗渣成分对其酶解效率有着重要作用。预处理前后蔗渣化学成分变化如表1所示。由表1可知,经过亚硫酸盐预处理,蔗渣半纤维含量下降,纤维素含量上升。由表1可知,随着亚硫酸氢钠用量的上升(2%~8%),蔗渣酸溶性木质素的含量上升,而酸不溶木质素的含量下降,但均高于原蔗渣。由此可见,亚硫酸氢钠预处理法不仅可以破坏蔗渣中的半纤维素,还可以作用于木质素。

表1 蔗渣化学成分

样品 ¹⁾ samples	纤维素 cellulose	半纤维素 hemicellulose	酸不溶木质素 Klason lignin	酸溶木质素 acid soluble lignin
S	36.70 ± 1.75	36.44 ± 0.56	19.32 ± 0.37	2.31 ± 0.14
S-2%	57.77 ± 1.80	8.90 ± 0.19	27.09 ± 0.29	3.78 ± 0.11
S-4%	57.35 ± 2.64	7.82 ± 0.92	25.12 ± 1.76	4.26 ± 0.03
S-6%	57.26 ± 0.80	7.02 ± 0.87	23.47 ± 1.04	5.73 ± 0.87
S-8%	56.87 ± 0.67	6.01 ± 0.42	22.90 ± 0.50	6.02 ± 0.12

1) S表示原蔗渣;S-x%表示经x%亚硫酸氢钠预处理的蔗渣,下同 S indicates raw bagasse; S-x% indicate bagasse samples treated with x% NaHSO₃, same as in following

通常纤维素的降解产物为纤维二糖和葡萄糖,半纤维素降解的产物为木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖^[5]。表2所示为预处理液中糖组分。

表2 预处理液中糖组分

样品 samples	纤维二糖 cellobiose	葡萄糖 glucose	木糖 xylose	半乳糖 galactose	阿拉伯糖 arabinose
S-2%	0.27	0.92	17.83	0.92	2.49
S-4%	0.56	0.58	17.59	1.56	2.51
S-6%	1.32	0.46	16.16	2.41	2.41
S-8%	1.54	0.35	15.77	2.47	2.66

从表2可知,预处理液中的糖主要为纤维二糖、葡萄糖、木糖、半乳糖和阿拉伯糖。随着处理过程中亚硫酸氢钠用量上升,葡萄糖、木糖逐渐下降,纤维二糖、半乳糖含量有上升趋势。预处理液5种糖组分中,木糖最高,这说明SPORL法可以有效去除半纤维素,这与SPORL预处理蔗渣成分中半纤维素含量较低的结果是一致的。

2.1.2 预处理后蔗渣表面磺酸基的变化 图1为不同用量亚硫酸氢钠预处理蔗渣表面磺酸基含量的变化。

由图1可知,亚硫酸氢钠用量为2%~8%时,预处理蔗渣表面含磺酸基分别为54.00、91.06、110.20和131.73 μmol/g(以干蔗渣质量计)。这可能是亚硫酸盐预处理磺化了蔗渣中的木质素,生成了木质素磺酸盐。木质素磺酸盐是一种表面活性剂,在Lan和Lou等研究中,木质素磺酸盐可增加木质素的亲水性,从而减少纤维素酶与木质素的无效吸附,提高了纤维素酶的有效利用^[6,8]。

2.2 蔗渣预处理前后的结构分析

2.2.1 FT-IR分析 图2为预处理前后蔗渣的FT-IR图。波数

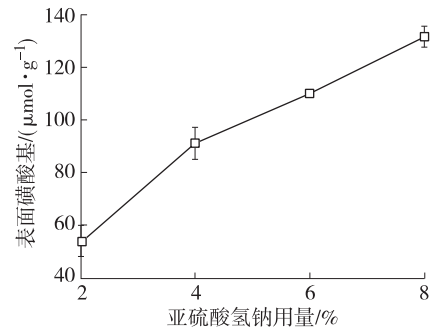


图1 不同用量亚硫酸氢钠预处理蔗渣表面磺酸基含量

Fig. 1 Sulfonic acid group contents of treated bagasse with different dosage of NaHSO₃

3415 cm^{-1} 左右的峰代表的是蔗渣内部氢键的伸缩,1737 cm^{-1} 附近的吸收峰是半纤维素中 $\text{C}=\text{O}$ 的振动强度^[13],650 cm^{-1} 为磺酸基的特征吸收峰^[14]。

从图2中峰强度的变化可以发现,亚硫酸盐预处理的蔗渣在3415 cm^{-1} 处的振动强度增加,表明预处理破坏了蔗渣中木质素和半纤维素以及纤维素的非定型区,使得预处理后蔗渣中纤维素的结晶区相对含量上升,从而导致蔗渣中的氢键伸缩强度上升。Sindhu等^[15]酸法预处理(甲酸和硫酸)后的蔗渣在3415 cm^{-1} 附近的振动强度比预处理前明显增强,同时结晶度也明显增加,本研究结果与之相似。由图2也可知,蔗渣在1737 cm^{-1} 处的振动强度减弱,表明蔗渣中半纤维素含量减少,这与表1结果一致。650 cm^{-1} 处代表磺酸基的特征吸收峰,预处理后的蔗渣在此处附近的吸收峰增强,由此推断亚硫酸氢钠与木质素发生反应生成了木质素磺酸盐,这与2.1.2节磺酸基含量测定结果一致。

2.2.2 XRD 分析 蔗渣预处理前后的XRD图见图3。原蔗渣的 I_{Cr} 为(51.35 ± 1.99)%,经预处理后,S-2%、S-4%、S-6%和S-8%的 I_{Cr} 分别为(56.63 ± 1.57)%、(57.07 ± 1.24)%、(56.16 ± 1.29)%和(56.48 ± 1.76)%。由数据可知,经过预处理后蔗渣结晶度都有所上升,这是因为纤维素中的无定形区不稳定,预处理更容易破坏纤维素的无定形区,预处理后蔗渣中的结晶区含量增加,因此底物的结晶度上升。Gao等^[16]研究发现,预处理前蔗渣中存在大量的无定形区包括半纤维素和木质素,结晶度较低,而预处理后的蔗渣结晶度显著升高,本研究结果与之一致。

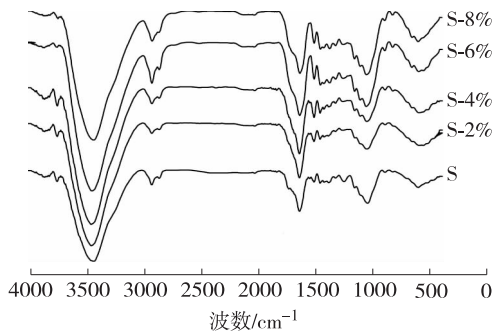


图2 预处理前后蔗渣的FT-IR图

Fig. 2 FT-IR spectra of virgin and pretreated bagasse

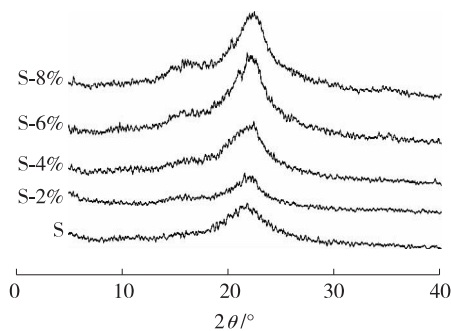


图3 预处理前后蔗渣的XRD图谱

Fig. 3 XRD spectra of virgin and pretreated bagasse

由图3可知,经亚硫酸盐预处理的蔗渣其结晶区的吸收峰($2\theta = 22^\circ$)逐渐增强,特别是6%和8%亚硫酸氢钠预处理的蔗渣变化较大,但是其结晶度的变化却不大,说明预处理过程中亚硫酸氢钠用量对蔗渣结晶度没有显著的影响。此外文献^[17]也显示,不同方法预处理后的底物水解效率差别较大,但是结晶度变化甚微,说明底物结晶度与其酶水解效率之间没有必然的联系。本研究结果与之相似,即不同用量亚硫酸盐预处理后的蔗渣的结晶度无明显变化,但对应的蔗渣的酶水解效率差别较大,说明底物结晶度与其水解效率并无明显关系。

2.3 预处理蔗渣的酶水解效率

由图1可知,S-2%、S-4%、S-6%和S-8%的磺酸基含量(磺化度)分别为54.00、91.06、11.20和131.73 $\mu\text{mol/g}$ 。图4为预处理蔗渣磺化度对酶水解效率及综纤维素水解效率的影响。在生物质酶解转换过程中,主要是三大类纤维素酶共同作用于纤维素产生葡萄糖^[3]。从图4可知,未处理的蔗渣水解效率为12.37%,综纤维素水解效率为15.21%。随着蔗渣磺化度的提高,蔗渣水解效率不断升高,S-2%水解效率为32.80%,综纤维素水解效率为49.20%,S-4%的水解效率和综纤维素水解效率分别为44.10%和67.67%,而S-6%和S-8%水解效率分别上升至51.66%和52.67%,综纤维素的水解率为80.36%和83.76%。说明亚硫酸氢钠用量为2%~8%时,SPORL法预处理均能破坏蔗渣的抗降解屏障,促进蔗渣酶水解。而且随着亚硫酸氢钠用量的增加,预处理蔗渣的磺化度提高随之酶解效率也会提高,直至上升趋势变得平缓。

本研究采用酸性 SPORL 预处理法,在 8% 亚硫酸氢钠,1.1% 硫酸,固液比 1:8,160 °C,30 min 条件下,能达到较高的水解效率,此时综纤维素水解效率为 83.76%,可得还原糖 0.53 g/g(以蔗渣质量计)。与其他预处理法相比,如 Fuentes 等^[18]用石灰预处理蔗渣得到最高还原糖为 0.366 g/g;Qiu 等^[19]用离子液体预处理法处理蔗渣,在酶载量为 15 FPU/g 的条件下进行酶水解,得到纤维素水解效率为 68.9%;Rezende 等^[20]采用 H₂SO₄ 和 NaOH 两次预处理蔗渣,在酶载量为 25 FPU/g 的条件下能使纤维素水解效率几乎达到 100%。本研究所用预处理法具有时间短、耗能少、所得底物在较低酶载量(7.5 FPU/g)条件下能获得较高的水解效率等优点。

关于亚硫酸盐法预处理的其他研究,陈理恒等^[21]所用的蔗渣预处理条件强烈(亚硫酸氢镁用量 20%,反应温度 160 °C,处理时间 60 min,高 pH 值),酶载量为 13.6 U/g,总糖水解效率(即综纤维素水解效率)为 82.22%。吴连栋等^[22]采用亚硫酸盐蔗渣浆作为底物,在酶载量为 16 U/g(绝干浆)的条件下,水解效率最高可达 74.89%。因此,本研究采用的预处理法,添加少量硫酸,条件相对温和,且酶水解时所用酶载量较低,是一种具有工业化生产潜力的预处理方法。本研究结果显示,酸性亚硫酸盐法(低 pH 值)对蔗渣这类草本植物纤维的酶水解有较好的效果。与高 pH 值亚硫酸盐法预处理的蔗渣(28.6% 半纤维素^[21]和 18.88% 戊聚糖^[22])相比,本研究所采用的酸性亚硫酸盐法(低 pH 值)预处理过的蔗渣所含半纤维素含量明显较低,仅为 6.01%~8.90%,这与文献报导的半纤维素对纤维素的降解具有强的拮抗性,去除半纤维素可以有效促进木质纤维原料的酶解效率的结果是一致的^[23]。本研究可为酸性亚硫酸盐预处理法的工业化应用提供理论参考。

3 结论

3.1 经过 2%~8% 亚硫酸盐预处理,蔗渣中半纤维素含量降低,纤维素含量上升,结晶度上升,但不同亚硫酸盐用量蔗渣的结晶度变化不明显,且蔗渣表面生成的磺酸基含量(磺化度)随亚硫酸氢钠添加量上升而升高。

3.2 在 2% 干蔗渣,7.5 FPU/g(以干蔗渣计),50 °C,72 h 酶解实验条件下,酶解效率随磺化度升高而升高,磺化度为 131.73 μmol/g 的蔗渣(预处理条件为:固液比 1:8,加入 1.1% 硫酸,亚硫酸氢钠添加量为绝干蔗渣质量的 8%,160 °C,30 min),综纤维素水解效率最高为 83.76%。

3.3 与已报导的高 pH 值亚硫酸盐预处理法相比,酸性亚硫酸盐法预处理可去除蔗渣中大部分半纤维素,有效降低了底物的拮抗性。随着亚硫酸氢钠用量的提高,蔗渣中磺酸基团含量和蔗渣水解效率都呈上升趋势。这可能是由于蔗渣中的木质素被磺化,亲水性增强,木质素与纤维素酶的无效吸附减少,从而提高了纤维素酶的有效利用,促进底物酶水解。

参考文献:

- [1] 赵风云,杨鑫,黄淑君,等.以蔗渣和棉籽壳为基质的灵芝酶活性及其营养对比研究[J].现代食品科技,2015,31(1):84-89.
ZHAO Feng-yun, YANG Xin, HUANG Shu-jun, et al. Comparison of enzyme activity and nutrients of ganoderma lucidum cultivated on bagasse and cottonseed hull substrates[J]. Modern Food Science and Technology, 2015, 31(1): 84-89.
- [2] 马斌,储秋露,朱均均,等.4种木质纤维素预处理方法的比较[J].林产化学与工业,2013,33(2):25-30.
MA Bin, CHU Qiu-lu, ZHU Jun-jun, et al. Four kinds of pretreatment methods for lignocellulosics[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2013, 33(2): 25-30.
- [3] MARGEOT A, HAHN-HAGERDAL B, EDLUND M, et al. New improvements for lignocellulosic ethanol[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(3): 372-380.

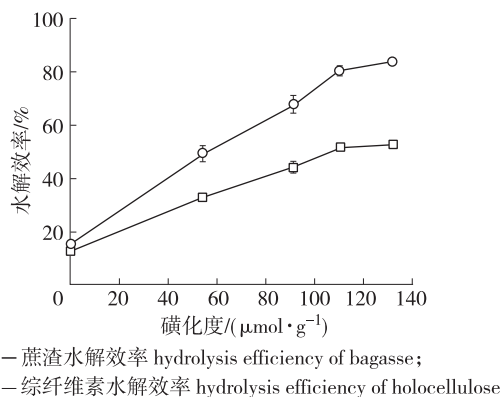


图4 不同磺化度蔗渣的酶水解效率
Fig. 4 Hydrolysis efficiencies of bagasse samples with different sulfonation degree

- [4] ZHU Jun-yong, PAN Xue-jun, WANG Gao-sheng, et al. Sulfite pretreatment (SPORL) for robust enzymatic saccharification of spruce and red pine[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(8): 2411–2418.
- [5] LI Shuai, YANG Quan-he, ZHU Jun-yong, et al. Comparative study of SPORL and dilute-acid pretreatments of spruce for cellulosic ethanol production[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(9): 3106–3114.
- [6] LAN Tian-qing, LOU Hong-ming, ZHU Jun-yong. Enzymatic saccharification of lignocelluloses should be conducted at elevated pH 5.2–6.2[J]. *Bioenergy Research*, 2013, 6(2): 476–485.
- [7] WANG Zhao-jiang, LAN Tian-qing, ZHU Jun-yong. Lignosulfonate and elevated pH can enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6(1): 9–19.
- [8] LOU Hong-ming, ZHU Jun-yong, LAN Tian-qing, et al. pH-Induced lignin surface modification to reduce nonspecific cellulase binding and enhance enzymatic saccharification of lignocelluloses[J]. *Chemsuschem*, 2013, 6(5): 919–927.
- [9] SLUITER A, HAMES B, RUIZ R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass[S]. United States; National Renewable Laboratory Golden, 2005.
- [10] 李坤. 香蕉茎和甘蔗渣预处理及其纤维素酶解糖化的基础研究[D]. 广州: 华南理工大学硕士学位论文, 2010.
LI Kun. Study on pretreatment and cellulase saccharification for both banana pseudo-stem and bagasse[D]. Guangzhou; Master Degree Thesis of South China University of Technology, 2010.
- [11] 武书彬, 徐绍华. 蔗渣乙醇预处理及其对酶解的影响[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2014, 42(7): 124–131.
WU Shu-bin, XU Shao-hua. Ethanol pretreatment of sugarcane bagasse and its effect on enzymatic hydrolysis[J]. *Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition*, 2014, 42(7): 124–131.
- [12] 张超. SPORL法与稀酸法对木质生物质预处理效果的研究[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2013.
ZHANG Chao. Study on SPORL and dilute-acid pretreatment for woody biomass[D]. Tianjin; Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2013.
- [13] LIAO Da-zheng, HUANG Zu-qiang, HU Hua-yu, et al. Microscopic structure and properties changes of cassava stillage residue pretreated by mechanical activation[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(17): 7953–7958.
- [14] 李计彪, 武书彬, 徐绍华. 木质素磺酸盐的化学结构与热解特性[J]. 林产化学与工业, 2014, 34(2): 23–28.
LI Ji-biao, WU Shu-bin, XU Shao-hua. Chemical structure and thermochemical property of lignin sulfonate[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2014, 34(2): 23–28.
- [15] SINDHU R, BINOD P, SATYANAGALAKSHMI K, et al. Formic acid as a potential pretreatment agent for the conversion of sugarcane bagasse to bioethanol[J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2010, 162(8): 2313–2323.
- [16] GAO Yue-shu, XU Jing-liang, ZHANG Yu, et al. Effects of different pretreatment methods on chemical composition of sugarcane bagasse and enzymatic hydrolysis[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 144(5): 396–400.
- [17] ZHANG Jing-zhi, MA Xing-xing, YU Jian-liang, et al. The effects of four different pretreatments on enzymatic hydrolysis of sweet sorghum bagasse[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(6): 4585–4589.
- [18] FUENTES L L G, RABELO S C, FILHO R M, et al. Kinetics of lime pretreatment of sugarcane bagasse to enhance enzymatic hydrolysis[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 163(5): 612–625.
- [19] QIU Zeng-hui, AITA G M, WALKER M S. Effect of ionic liquid pretreatment on the chemical composition, structure and enzymatic hydrolysis of energy cane bagasse[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 117(4): 251–256.
- [20] REZENDE C A, LIMA M A D, MAZIERO P, et al. Chemical and morphological characterization of sugarcane bagasse submitted to delignification process for enhanced enzymatic digestibility[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2011, 4: 54–72.
- [21] 陈理恒, 付时雨, 钟林新, 等. 亚硫酸盐制浆方法用于蔗渣生物酶解的预处理研究[J]. 中华纸业, 2011, 32(14): 32–36.
CHEN Li-heng, FU Shi-yu, ZHONG Xin-lin, et al. Pretreatment study on bagasse for enzymatic hydrolysis with sulfite pulping method[J]. *China Pulp & Paper Industry*, 2011, 32(14): 32–36.
- [22] 吴连贞, 张俊华, 林鹿, 等. 亚硫酸盐蔗渣浆的纤维素酶水解及其机理研究[J]. 林产化学与工业, 2010, 30(1): 33–38.
WU Lian-zhen, ZHANG Jun-hua, LIN Lu, et al. Study on hydrolysis and hydrolysis mechanism of bagasse sulfite pulp by cellulase[J]. *Chemistry and Industry of Forest Products*, 2010, 30(1): 33–38.
- [23] ZHU Jun-yong, PAN Xue-jun, ZALESNY R S. Pretreatment of woody biomass for biofuel production; Energy efficiency, technologies, and recalcitrance[J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2010, 87(3): 847–857.