

# 经胆碱氨基酸水溶液预处理的水稻秸秆中残余木质素对多糖酶水解抑制作用的研究

叶梅, 黄超梅, 林凯鹏, 冯国坚, 侯雪丹

(广东工业大学轻工化工学院, 广东广州 510006)

**摘要:** 本文通过考察牛血清蛋白(BSA)的添加量和不同纤维素酶用量下其添加与否对水稻秸秆残渣中多糖酶水解效率的影响, 以及比较不同木质素含量的底物对纤维素酶催化行为的影响来探讨[胆碱][氨基酸]处理水稻秸秆残渣后其残留木质素对纤维素酶活性的抑制作用大小。结果发现, 低酶量下, BSA 的添加对纤维素和半纤维素的酶水解降解度有轻微的促进作用, 分别最多提高 5%及 7%; 而高纤维素酶用量时, 其促进作用甚微。且经该类离子液体处理后的不同木质素含量的水稻秸秆基本上对酶蛋白皆无显著吸附和抑制作用。可见, 该类离子液体可去除部分木质素以提高酶分子对多糖底物的可及性, 此为多糖酶水解效率提高的关键因素, 而该法所形成的残余木质素对酶蛋白的非特异吸附或抑制作用相对较弱。

**关键词:** [胆碱][氨基酸]离子液体; 多糖酶水解; 木质素; 抑制作用

文章篇号: 1673-9078(2017)5-71-76

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.5.012

## The Influence of Lignin on Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides from Rice Straw Pretreated with [Ch][AA]-water

YE Mei, HUANG Chao-mei, LIN Kai-peng, FENG Guo-jian, HOU Xue-dan

(College of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The effect of bovine serum albumin (BSA) addition on the enzymatic hydrolysis of rice straw residues containing different lignin content obtained by different [Ch][AA] ILs-water mixture pretreatment were investigated. The results showed that a slight increase in cellulose and xylan digestibility occurred under low enzyme loading after BSA pre-incubation; the maximum digestibility was increased by 5% and 7% BSA, respectively. However, there was no clear enhancement in cellulose and xylan digestibility with high enzyme loading. This study also found that the rice straw lignin content did not affect enzyme adsorption when pretreated with different [Ch][AA] ILs-water mixtures. Overall, the results indicate that it is polysaccharide accessibility to enzymes rather than lignin adsorption and inhibition of enzymes that mainly determines the efficiency of enzymatic degradation of polysaccharides in the rice straw residues obtained by [Ch][AA] ILs-water mixture pretreatment.

**Key words:** cholinium amino acid ionic liquids; polysaccharide enzymatic hydrolysis; lignin; inhibition effect

以来源广泛、廉价、可再生的木质纤维素生物质如农业废弃物为原料生产生物燃料是目前解决能源和环境问题的最具前景的途径之一。由于木质纤维素生物质天然的复杂结构特性, 其具有超强的化学或生物降解抗性, 故通常需要在降解前进行预处理。近年来, 离子液体由于其优异的物理化学性质尤其是其较强的溶解能力, 在生物质预处理领域表现出广阔的应用前

收稿日期: 2016-08-22

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21406038); 广东省大学生创新训练项目(201611845139)

作者简介: 叶梅(1993-), 女, 本科, 研究方向: 生物质能源、生物催化

通讯作者: 侯雪丹(1984-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 生物质能源、生物催化

景。然而, 传统的咪唑、吡啶类离子液体存在合成原料不可再生、合成工艺复杂且环境不友好、毒性大、生物降解性差等缺点。而目前新型、低毒、易生物降解、可再生的[胆碱][氨基酸]离子液体已被成功地应用于木质纤维素预处理, 且研究表明, 大部分该类离子液体能有效萃取木质纤维素的部分木质素组分, 提高纤维素和木质素多糖的可及度, 最终可使多糖酶水解度显著提高, 分别由 20.4%和 6.8%提高至 90%及 60%以上<sup>[1-4]</sup>。然而水稻秸秆中残余的木质素组分对后续多糖的酶水解过程的影响却未有深入研究。关于木质纤维素中木质素组分对纤维素酶的影响, 人们普遍认为: 一方面, 木质素通过阻碍酶与纤维素有效接触而影响纤维素的酶解效率, 木质素的去除导致底物结构和纤维

纤维素可及性发生变化,如使纤维素暴露、并有利于纤维素溶胀,促进酶与纤维素接触并发生反应<sup>[5]</sup>。另一方面,木质素可通过非特异性地吸附纤维素酶,降低酶的活性,从而影响多糖酶水解效率<sup>[6]</sup>。而木质素对纤维素酶的吸附和抑制程度与木质纤维素中木质素的结构性质有关,而后者则主要取决于木质纤维素原料的预处理方法。总之,木质素一方面阻碍酶与多糖接触,另一方面可通过酚羟基或疏水性作用抑制纤维素酶活性,那么对于[胆碱][氨基酸]离子液体预处理后的水稻秸秆残渣中的木质素对多糖的酶水解效率的影响主要通过哪一种形式实现?针对该问题,本文探讨了水稻秸秆经其预处理后残留木质素对纤维素酶的非特异性吸附和活性抑制作用,阐明该类离子液体预处理方法提高多糖酶水解效率的主要机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

离子液体胆碱赖氨酸([Ch][Lys])、胆碱天冬氨酸([Ch][Asp])由实验室自行合成并进行结构鉴定<sup>[7]</sup>。经20%[Ch][Lys]、50%[Ch][Asp]水溶液预处理的水稻秸秆样品参考之前所报道的方法制备<sup>[4]</sup>。来源于*Trichoderma reesei*的纤维素酶(6 U/mg)、牛血清蛋白(BSA)购于美国Sigma-Aldrich公司;其它试剂皆为市售分析纯标准试剂。水稻秸秆收集于当地农田,晒干后经机械粉碎(粒径100~200 μm),以密封袋密封,于-20℃下储存备用。

### 1.2 主要仪器设备

高效液相色谱仪:Waters 515泵,配备waters2410示差检测器,美国Waters公司;色谱柱:300×7.8 mm Aminex HPX-87H分析型色谱柱,美国Bio-Rad公司。磁力搅拌器:型号IKA RCT basic,德国IKA公司。恒温气浴振荡器:型号ZHWY-200D,上海智城分析仪器制造有限公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 水稻秸秆样品中木质素对酶蛋白的吸附作用研究

将一定量的牛血清蛋白(BSA)添加于含10 mg水稻秸秆底物的3.5 mL柠檬酸缓冲液(50 mM, pH 4.8)中,然后于50℃摇床中封闭结合1 h。然后加入一定量的纤维素酶以启动底物的水解反应,于50℃下进行反应,摇床转速为200 r/min。反应72 h后,定时取样200 μL,于沸水灭活5 min后终止反应,将流动

相(5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液)稀释2倍,经0.22 μm孔径的微孔滤膜过滤后离心(15000 r/min)10 min,随后取上清液以供液相色谱分析。所有试验重复三次。

#### 1.3.2 酶水解分析

加20 mg经[胆碱][氨基酸]预处理过或未处理的水稻秸秆样品、一定量的纤维素酶于50 mL具塞三角瓶中和经事先50℃下预热的7 mL柠檬酸缓冲液(50 mM, pH 4.8),混合均匀,立即置于恒温振荡器内(50℃, 200 r/min)振荡,计时。定时取样200 μL,于沸水灭活5 min后终止反应,将流动相(5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液)稀释2倍,经0.22 μm孔径的微孔滤膜过滤后离心(15000 r/min)10 min,随后取上清液以供液相色谱分析。所有试验重复三次。

#### 1.3.3 高效液相色谱分析

仪器:Waters 515 高效液相色谱仪;配备Waters 2410 示差检测器;检测温度为50℃;色谱柱:Aminex HPX-87H(7.8×300 mm)。流速:0.5 mL/min;进样量:20 μL;柱温:65℃。流动相:5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液。葡萄糖和木糖的保留时间分别为11.9 min和12.9 min。

#### 1.3.4 纤维素酶解初速度V<sub>0</sub>的计算

根据反应初始阶段单位时间内酶解产物(葡萄糖或木糖)的增加量来计算初始反应速度:

$$\text{反应初速度 } V_0 = (C_t - C_0) / t$$

其中:t为反应时间(h)、C<sub>0</sub>和C<sub>t</sub>分别表示反应前后葡萄糖或木糖的浓度(g/L)。

#### 1.3.5 纤维素或木聚糖的降解度的计算

根据所得酶解产物葡萄糖或木糖的量换算出水解的纤维素或木聚糖的量,其与反应前底物纤维素或木聚糖的总量之比值即为降解度:

$$\text{纤维素降解度}(\%) = (P_0 - C_t \times V / 0.9) / P_0 \times 100\%$$

$$\text{木聚糖降解度}(\%) = (P_0 - C_t \times V / 0.88) / P_0 \times 100\%$$

其中:P<sub>0</sub>和C<sub>t</sub>分别表示反应前水稻秸秆底物中纤维素或木聚糖的总量和酶解后溶液葡萄糖或木糖的浓度(mM);V为酶解液的体积。

#### 1.3.6 数据统计分析

本文所有试验至少要重复三次,所得试验数据通过统计软件SPSS 11.5 (SPSS Inc., USA)进行统计分析,文中所有图中数据以平均值±标准偏差(SD)呈现。

## 2 结果与讨论

### 2.1 牛血清蛋白的预孵育及用量对[Ch][Lys]

水溶液预处理的水稻秸秆残渣酶水解效率的影

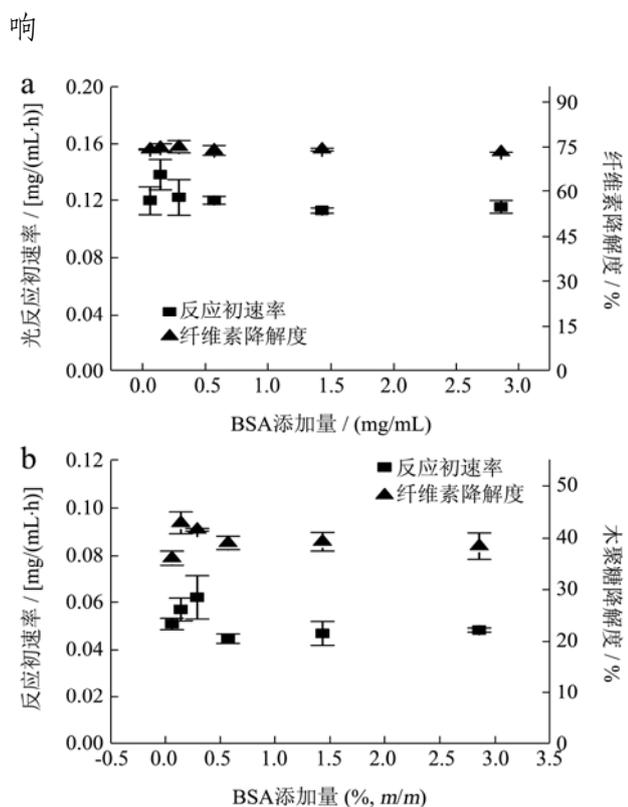


图1 牛血清蛋白预孵育及用量对[Ch][Lys]水溶液预处理过的水稻秸秆残渣底物酶解效率的影响

Fig.1 Effect of BSA loadings on the enzymatic hydrolysis of rice straw residues obtained by [Ch][Lys]-water mixture pretreatment: (a) cellulose and (b) xylan

注: a, 纤维素; b, 木聚糖。

木质素在木质纤维素原料中对酶法糖化步骤的不利作用主要包括: 作为物理障碍阻止酶分子与多糖底物接触和作为吸附剂或抑制剂对酶分子进行非生产性吸附而抑制其活性。纤维素酶对纤维素底物的水解作用一般为多个酶的协同作用, 所以反应速率较慢, 而且往往需要较多的酶量才能达到可观的酶解速率和单糖得率。纤维素酶比较昂贵, 它构成了生物质转化产生生物燃料过程的主要成本来源之一。多数研究者认为低纤维素酶量水解具有相当可及表面积木质纤维素底物(经预处理)的糖得率较低的原因在于由残留木质素对纤维素酶组分尤其是β-葡萄糖苷酶的非生产性不可逆吸附作用造成的<sup>[6,8,9]</sup>。如 Del Rio 等<sup>[8]</sup>比较了经有机溶剂预处理了的 *Lodgepole pine* 底物在经磺化和球磨法后的酶解效率, 结果发现后者虽降低了纤维素结晶度和粒径、促进了溶胀作用, 但水解单糖得率提高的并不多, 而前者则可经较低的酶量水解得到较高的糖得率, 并且当所用的酶量越少时, 酶解程度提高越明显。该作者认为主要原因是因为底物经磺化可降低组分中木质素对纤维素酶的非特异性吸附作用。进

而 *Lodgepole pine* 的乙醇和蒸汽爆破预处理底物及其相应的纤维素酶解分离木质素对纤维素酶的吸附作用研究表明两种预处理底物的纤维素酶解分离木质素对纤维素酶蛋白的吸附作用较预处理底物强, 热力学分析表明该分离木质素对酶蛋白的吸附作用为自发进行, 且吸附过程符合 Langmuir 吸附等温线。然而, 众多研究表明可以通过添加表面活性剂(如吐温 80)或 BSA 来降低木质素对纤维素酶蛋白的吸附作用<sup>[6,9]</sup>。如 Yang 和 Wyman<sup>[6]</sup>在其研究中探讨了稀酸预处理玉米秆底物对纤维素酶蛋白的吸附作用, 发现该底物可吸附大量的酶蛋白, 而在酶添加前先将底物用 1% 的 BSA 预处理, 溶液纤维素酶滤纸活性提高了 2 倍, 而 β-葡萄糖苷酶活性提高了 14 倍。作者认为其结果表明底物经 BSA 处理减少了木质素组分对纤维素酶(尤其是 β-葡萄糖苷酶)的吸附, BSA 对木质素有非特异竞争性、不可逆的吸附作用。

酶解条件: 10 mg 底物(20% [Ch][Lys]水溶液于 90 °C 下处理 1 h 所得水稻秸秆残渣), 0.86 U/mL 来源于 *Trichoderma reesei* 的纤维素酶; 3.5 mL 柠檬酸缓冲液(50 mM, pH 4.8), 50 °C, 200 r/min, 牛血清蛋白(BSA)预孵育时间 1 h; 酶反应时间 72 h。

不同的预处理方法所得底物可能具有不同的酶蛋白吸附性, 相同木质素含量的底物可能也会因底物木质素物化性质不同表现出不同的抑制特性。因而本文探讨了 20% [Ch][Lys]水溶液 90 °C 下处理 1 h 所得水稻秸秆残渣底物酶解过程中对酶蛋白吸附和抑制作用(图 1)。首先, 通过考察低酶量水解该底物时 BSA 用量对底物酶解效率的影响。研究发现在较低的纤维素酶用量的条件下(0.86 U/mL), BSA 的添加对预处理底物后续酶解纤维素糖化速率和降解度影响甚微(由 70%增至 73%~75%, 图 1a), 即使增大 BSA 的添加量也基本上对纤维素降解度无影响。虽然糖化速率在低 BSA 添加量时比未经 BSA 添加和处理时稍有提高, 但继续增大 BSA 用量则对糖化速率有微弱的反作用。可能是因为 BSA 浓度过高时会对酶分子与纤维素接触造成一定的非特异性空间阻碍作用。然而, 对木聚糖的酶水解而言, BSA 的作用效果似乎较纤维素酶解的情况稍加明显(图 2b), 由未添加 BSA 时的 36% 增至 38%~43%。可能是因为低酶量中木聚糖酶含量更低, 则水稻秸秆底物对纤维素酶组分中混有的少量木聚糖水解酶吸附作用就会显得更大。

## 2.2 不同酶量下牛血清蛋白的预孵育对 [Ch][Lys]水溶液预处理过的水稻秸秆残渣底物

酶解效率的影响

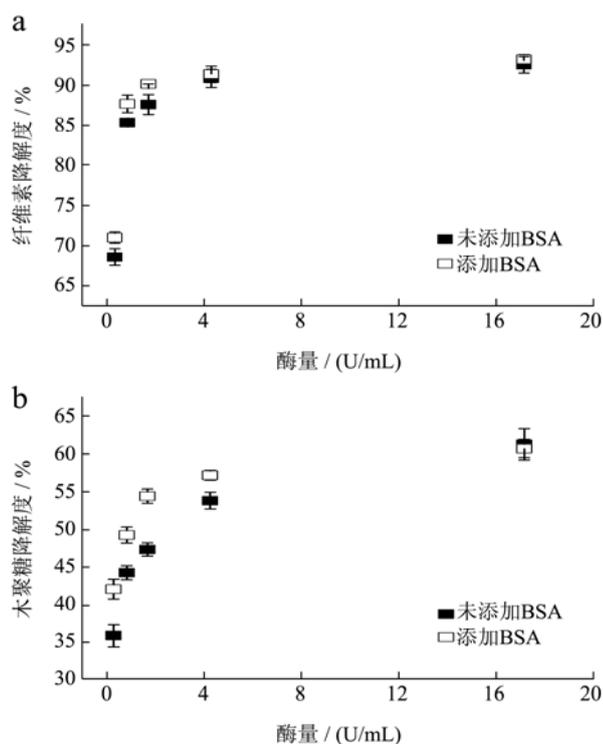


图2 不同酶量下牛血清蛋白的预孵育对[Ch][Lys]水溶液预处理过的水稻秸秆残渣底物酶解效率的影响

Fig.2 Effect of BSA loading on the enzymatic hydrolysis of rice straw residues obtained by [Ch][Lys]-water mixture pretreatment at different cellulase concentrations: (a) cellulose and (b) xylan

注: a, 纤维素; b, 木聚糖。

酶解条件: 10 mg 底物 (20% [Ch][Lys]水溶液于 90 °C 下处理 1 h 所得水稻秸秆残渣), 不同浓度的来源于 *Trichoderma reesei* 的纤维素酶; 3.5 mL 柠檬酸缓冲液 (50 mM; pH 4.8), 50 °C, 200 r/min, 牛血清蛋白 (5 mg) 预孵育时间 1 h; 酶反应时间 72 h。

随后, 以不同酶量水解[Ch][Lys]水溶液预处理过的水稻秸秆残渣底物, BSA 的预孵育与否对酶解效率的影响见图2。在酶浓度低于 4.29 U/mL 时, 纤维素和木聚糖降解度提高稍多, 可分别提高3%和7%左右。再增加 BSA 的量, 两者的降解度基本上没明显提高。可能由于该离子液体处理所得底物中的木质素对纤维素酶吸附作用能力并不强, 在酶用量较低时, 木质素吸附少量的酶蛋白, 有效酶蛋白量减少, 酶解效率因而稍有下降; 当以 BSA 处理底物后, 木质素先吸附了 BSA, 则不会再吸附后添加的酶蛋白, 因此有效酶蛋白量未减少、多糖降解度提高。而在酶使用量提高后, 木质素吸附的酶蛋白量占整体酶量较少, 剩余的酶量足以与底物多糖接触并作用, BSA 的添加与否则不会

产生影响。

2.3 牛血清蛋白的预孵育对经不同[胆碱][氨基酸]离子液体预处理的水稻秸秆底物酶水解的影响

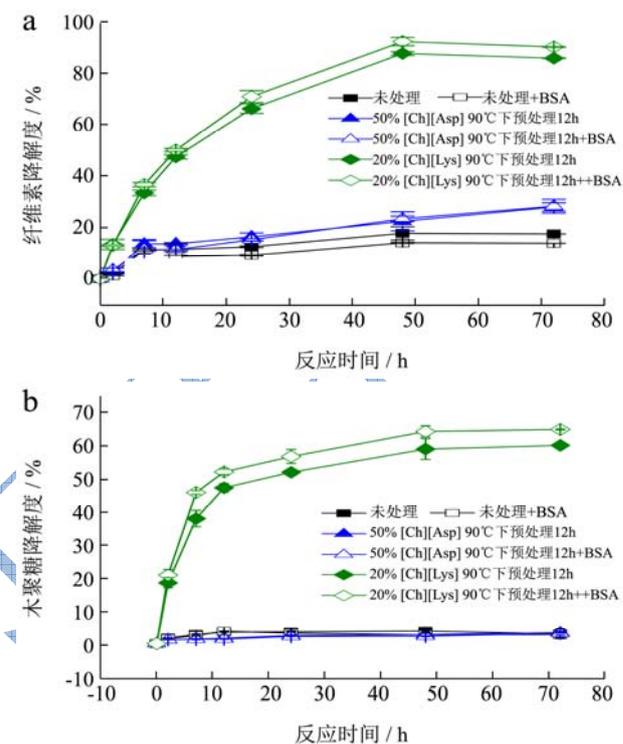


图3 牛血清蛋白的预孵育对不同底物酶水解过程的影响

Fig.3 Effect of BSA loading on the enzymatic hydrolysis of different rice straw residues obtained by different [Ch][AA] ILs-water mixture pretreatment: (a) cellulose and (b) xylan

注: a, 纤维素; b, 木聚糖。

酶解条件: 10 mg 不同预处理底物; 0.86 U/mL *Trichoderma reesei* 的纤维素酶; 3.5 mL 柠檬酸缓冲液 (50 mM; pH 4.8), 50 °C, 200 r/min, 牛血清蛋白 (5 mg) 预孵育时间 1 h; 酶反应时间 72 h。

比较经不同[胆碱][氨基酸]预处理所得不同木质素含量的底物对 BSA 的吸附作用 (图3), 包括未处理水稻秸秆、50%[Ch][Asp]水溶液 90 °C 下预处理 12 h 所得的水稻秸秆残渣、20% [Ch][Lys]水溶液 90 °C 下预处理 24 h 所得的水稻秸秆残渣, 其木质素含量分别为 18.2%、17.4%和 15.3%。未处理原料酶水解时 BSA 的预孵育反而起了负作用, 可能是因为大量的 BSA 非但不能进入相对完整的底物内部与木质素结合, 反而成了浓度本来就低的酶分子的运动障碍。而 50%[Ch][Asp]水溶液 90 °C 下预处理 12 h 所得的水稻秸秆底物酶解时, BSA 的预孵育仅使纤维酶解程度提

高了约 2%，而 BSA 的预孵育使 20% [Ch][Lys]水溶液预处理底物纤维素降解度也仅提高了 5%左右。木聚糖酶解的情况与此类似。说明木质素的吸附作用并不明显，无论底物木质素含量高低，其对酶蛋白的吸附量都比较小。提示该预处理方法所得底物中的木质素性质不与其他多种方法相似<sup>[6,9,10]</sup>，并且足以说明木质素吸附并非多糖有效降解的主要限速步骤，而酶分子对底物多糖的可及度才是关键因素。

### 3 结论

木质素的含量和结构与性质对木质纤维素生物质多糖酶解效率影响较大。木质素的含量直接决定了多糖组分对酶分子的可及性，而残留木质素的物理化学性质则决定了其对纤维素酶的非特异性吸附和抑制作用强弱。连接木质素亚单位的化学键为  $\beta$ -O-4 芳香醚键，在预处理过程中  $\beta$ -O-4 芳香醚键通常会发生断裂，形成更多的自由酚羟基。例如， $\text{SO}_2$ -催化的蒸汽预处理会降低  $\beta$ -5 和  $\beta$ -O-4 芳香醚键的数量，且因  $\text{SO}_2$  的酸催化缩合作用致使 C6 芳香取代数目的增加，高强度的蒸汽预处理会大大降低  $\beta$ -O-4 芳香醚键数量、导致更多木质素的解聚、形成大量的自由酚羟基。与蒸汽预处理相比，有机溶剂预处理硬木会导致更多的  $\beta$ -O-4 芳香醚键断裂，形成更多的自由酚羟基<sup>[11]</sup>。Sewalt 等<sup>[12]</sup>发现经有机溶剂预处理的底物中含有大量酚羟基，它会抑制纤维素酶活性，当酚基被保护后，木质素的抑制作用消失。Berlin 等<sup>[13]</sup>提出了另外一种观点，他们认为蒸汽和有机溶剂预处理后的木质纤维素原料对酶的抑制作用的不同源于后者的羧基和脂肪族羟基含量较低，导致底物中木质素的疏水性较强，因而易于与纤维素酶产生疏水性相互作用，从而降低酶解活性。众多研究已表明通过添加表面活性剂、BSA 和聚乙二醇等疏水性物质，可竞争性地与疏水性木质素吸附位点相结合，减少纤维素酶与木质素的非特异性吸附，提高酶的水解效率<sup>[8,9,14]</sup>。本文则是通过添加 BSA 的方法，间接探讨[胆碱][氨基酸]离子液体水溶液预处理水稻秸秆残渣中的残余木质素对酶蛋白的吸附和抑制作用。低酶量下，BSA 的预孵育与否，多糖降解度变化不大，尤其是在高酶浓度时 BSA 处理基本无影响。且不同木质素含量的该类离子液体预处理底物基本上都对酶蛋白皆无显著吸附作用，BSA 的添加使多糖酶降解度最多提高 5%或 7%。说明木质素吸附并非多糖有效降解的主要限速步骤，而酶分子对底物多糖的可及度才是关键因素。总之，该类离子液体可去除部分木质素，提高酶分子对多糖底物的可及性，此为酶解效率提高的关键因素，而该法所形成的残留

木质素对酶蛋白的非特异不可逆吸附作用相对较弱。

### 参考文献

- [1] HOU Xue-dan, Smith Tomth John, LI Ning, et al, Novel renewable ionic liquids as highly effective solvents for pretreatment of rice straw biomass by selective removal of lignin [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109(10): 2484-2493
- [2] HOU Xue-dan, XU Jie, LI Ning, et al. Effect of anion structures on cholinium ionic liquids pretreatment of rice straw and the subsequent enzymatic hydrolysis [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2015, 112(1): 65-73
- [3] HOU Xue-dan, LI Ning, ZONG Min-hua. Renewable bio ionic liquids-water mixtures-mediated selective removal of lignin from rice straw: Visualization of changes in composition and cell wall structure [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2013, 110(7): 1895-1902
- [4] HOU Xue-dan, LI Ning, ZONG Min-hua. Significantly enhancing enzymatic hydrolysis of rice straw after pretreatment using renewable ionic liquid-water mixtures [J]. *Bioresour. Technol.*, 2013, 136(12): 469-474
- [5] Cantarella Maria, Cantarella Laura, Gallifuoco Alberto, et al, Comparison of different detoxification methods for steam-exploded poplar wood as a substrate for the bioproduction of ethanol in SHF and SSF [J]. *Process Biochem.*, 2004, 39(11): 1533-1542
- [6] Yang Bin, Wyman Charles E. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2006, 94(4): 611-617
- [7] LIU Qiu-ping, HOU Xue-dan, LI Ning, et al. Ionic liquids from renewable biomaterials: synthesis, characterization and application in the pretreatment of biomass [J]. *Green Chem.*, 2012, 14(2): 304-307
- [8] Del Rio Luis F, Chanadra Richard P, Saddler John N. The effects of increasing swelling and anionic charges on the enzymatic hydrolysis of organosolv-pretreated softwoods at low enzyme loadings [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, 108(7): 1549-1558
- [9] Tu Mao-Bing, Pan Xue-Jun, Saddler Jack N. Adsorption of cellulase on cellulolytic enzyme lignin from lodgepole pine [J]. *J. Agri. Food Chem.*, 2009, 57(17): 7771-7778
- [10] Rollin Joseph A, Zhu Zhi-Guang, Sathisuksanoh Noppadon, et al. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: A comparison of cellulose solvent - based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, 108(1): 22-30

- [11] Söderström Johanna, Pilcher Linda, Galbe Mats, et al. Two-step steam pretreatment of softwood with SO<sub>2</sub> impregnation for ethanol production [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2002, 98-100(1): 5-21
- [12] Sewalt Vincent J H, Ni Wei-ting, Blount Jack W, et al. Reduced lignin content and altered lignin composition in transgenic tobacco down-regulated in expression of L-phenylalanine ammonia-lyase or cinnamate 4-hydroxylase [J]. Plant Physiol., 1997, 115(1): 41-50
- [13] Kurabi Arwa, Berlin Alex, Gilkes Neil, et al. Enzymatic hydrolysis of steam-exploded and ethanol organosolv-pretreated Douglas Fir by novel and commercial fungal-cellulases [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 2005, 121(1-3): 219-230
- [14] Kumar Linoj, Arantes Valdeir, Chanadra Richard, et al. The lignin present in steam pretreated softwood binds enzymes and limits cellulose accessibility [J]. Bioresour. Technol., 2012, 103(1): 201-208

现代食品科技