

汽爆秸秆漆酶协同作用提取木质素

李冠华, 陈洪章

中国科学院过程工程研究所 生物质炼制工程北京市重点实验室, 北京 100190

李冠华, 陈洪章. 汽爆秸秆漆酶协同作用提取木质素. 生物工程学报, 2014, 30(6): 911-919.

Li GH, Chen HZ. Synergistic mechanism of steam explosion combined with laccase treatment for the delignification of straw. Chin J Biotech, 2014, 30(6): 911-919.

摘要: 组分分离是秸秆炼制的关键技术。本文建立了汽爆耦合漆酶协同作用工艺, 研究其对秸秆物理形态、化学组成以及木质素碱提取过程的影响。研究结果表明汽爆破坏秸秆表面致密结构, 提高比表面积, 促进漆酶对秸秆木质素的氧化作用; 红外分析表明, 漆酶破坏了汽爆秸秆中半纤维素酯键, 且愈创木基吸收峰减弱, 漆酶削弱了木质素与纤维素间相互作用; 汽爆漆酶协同作用后的秸秆木质素提取率提高约 20% (70 °C, 120 min)。Nuclei Growth 模型分析温和条件下秸秆木质素提取过程, 动力学结果表明, 汽爆漆酶协同预处理增加了汽爆秸秆木质素碱提过程中反应起始作用位点, 并提高了该过程对温度的敏感性。汽爆-漆酶协同预处理是一种有效的分离木质素的方法, 将在木质纤维素原料的生物炼制中发挥重要作用。

关键词: 炼制, 汽爆, 漆酶, 秸秆, 木质素

Synergistic mechanism of steam explosion combined with laccase treatment for straw delignification

Guanhua Li, and Hongzhang Chen

Beijing Key Laboratory of Biomass Refining Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China

Abstract: Components separation is the key technology in biorefinery. Combination of steam explosion and laccase was

Received: January 26, 2014; **Accepted:** March 31, 2014

Supported by: Special Funds of the Science and Technology Innovation Base for Beijing Key Laboratory of Biomass Refining Engineering (No. Z13111000280000), National Natural Science Foundation of China (No. 21206176), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CB707401).

Corresponding author: Hongzhang Chen. Tel/Fax: +86-10-82627071; E-mail: hzchen@home.ipe.ac.cn

生物质炼制工程北京市重点实验室 2013 年度科技创新基地培育与发展工程专项项目 (No. Z13111000280000), 国家自然科学基金 (No. 21206176), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CB707401) 资助。

网络出版时间: 2014-04-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140060.html>

used, and synergistic effect of the combined pretreatment was evaluated in terms of physical structure, chemical components and extraction of lignin. The results showed that steam explosion can destroy the rigid structure and increase the specific surface area of straw, which facilitated the laccase pretreatment. The laccase pretreatment can modify the lignin structure based on the Fourier transform infrared test, as a result the delignification of straw was enhanced. Nuclei Growth model with a time dependent rate constant can describe the delignification, and the kinetics parameters indicated that the combined pretreatment improved the reaction sites and made the delignification reaction more sensitive to temperature. The combined pretreatment enhanced delignification, and can be a promising technology as an alternative to the existing pretreatment.

Keywords: biorefinery, steam explosion, laccase, straw, lignin

秸秆是世界上丰富的可再生资源, 以中国为例, 年产秸秆近 7 亿 t。秸秆炼制转化为生物基燃料、生物基材料、饲料和肥料等是解决能源、环境问题的重要途径^[1-2]。秸秆由纤维素、木质素和半纤维素三大组分组成。其中, 木质素是复杂的、非晶性、三维网状化合物, 被认为是工业上唯一能从可再生资源中获取的芳香族化合物^[3]。木质素有很好的分散性、阻燃性、热稳定性, 在工业、农业、医药方面具有广泛的应用前景^[4]。

秸秆炼制的前提是实现各组分的提取分离。木质素的提取包括化学提取和有机溶剂提取两种方法。化学提取法是利用强酸、强碱将秸秆中综纤维素或者木质素溶解, 使二者得以分离^[5]。其中酸法提取木质素过程中, 木质素以固体残渣的形式得以分离; 碱法提取是将木质素以溶解于碱溶液的形式而得以分离^[6]。化学法是广泛应用的提取木质素方法, 但该过程较高的酸、碱用量和较剧烈的反应条件造成的高污染和高能耗是化学法所需要解决的问题。因此对秸秆进行预处理, 实现温和条件下提取木质素是当前重要研究方向^[7-8]。

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶, 具有较高氧化还原电势, 作用底物广泛, 可以氧化降解酚型木质素结构单元。漆酶作为主要的木质纤

维素氧化酶, 在木质素氧化降解、改性等方面同样发挥着重要作用^[9]。秸秆的物理结构和半纤维素同木质素间的相互作用阻碍了漆酶对秸秆木质素的氧化。因此需破坏秸秆致密结构和半纤维素对木质素的包裹作用, 以提高汽爆秸秆木质素提取率。低压无污染蒸汽爆破是集物理撕裂、化学催化于一体的, 有效的、低成本的预处理技术。经过汽爆预处理后, 秸秆半纤维素转化为木糖、低聚木糖, 存在于水洗液中而与木质素分离。汽爆过程中, 木质素被抽提之后沉积于纤维素表面而暴露^[10]。汽爆可以降解秸秆中半纤维素, 暴露出木质素组分, 在此基础上利用漆酶氧化汽爆秸秆中的木质素, 促进秸秆木质素提取^[11]。但是上述研究并没有对汽爆与漆酶提取木质素过程中的协同作用进行讨论, 因此本研究在建立汽爆漆酶协同提取木质素的基础上, 重点分析二者间的协同作用。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究所用秸秆为稻草, 收集于四川成都, 置于室外储存。漆酶由白腐真菌硬毛粗毛盖孔菌 *Funalia troglia* 固态发酵所得, 平均酶活值为 100 U/mL。本研究所用试剂均为分析纯, 购自于北京试剂公司。

1.2 汽爆处理方法

风干秸秆剪成 15 cm 的小段,以 1:1 的比例加入自来水,浸润过夜。秸秆预浸后放入汽爆罐中,通入饱和热蒸汽,分别升压到 0.7 MPa、1.1 MPa 和 1.5 MPa,维压时间为 3 min,快速泄压即得到汽爆秸秆^[12]。以 1:15 的固液比向汽爆秸秆中加入 70 °C 自来水,除去汽爆秸秆表面可溶物,水洗后汽爆秸秆室温自然风干,并用粉碎机粉碎,过 40 目筛待用。汽爆罐为本实验室自行设计开发,工作体积为 4.5 L。

1.3 漆酶处理方法

汽爆秸秆漆酶处理在 2 L 带搅拌和自动控温的反应釜中进行。漆酶催化条件如下:缩苹果酸-缩苹果酸钠溶液为缓冲液,pH=4,固液比 1:20,漆酶用量 10 U/g,5 mmol/L ABTS 为催化介体,反应温度 50 °C,反应过程中通入高压空气提高氧分压到 0.4 MPa,反应进行 180 min。

1.4 提取秸秆木质素

木质素提取的条件如下:NaOH 溶液浓度为 0.25 mol/L,固液比为 1:15,反应温度分别为 30 °C、50 °C、70 °C,反应时间 15 min 到 120 min。反应结束后,将样品迅速放入冰浴中降温,过滤收集残渣,残渣用蒸馏水冲洗,至洗脱液 pH 值呈现中性。

$$X_t = \frac{m_t}{m_0} \times L_t$$

X_t 为反应进行 t 分钟时基质中木质素含量, m_t 为碱提反应进行 t 分钟时基质质量, m_0 为碱提反应前基质质量, L_t 为反应进行 t 分钟时基质中木质素相对含量 (%)。

$$P = (1 - \frac{X_t}{X_0}) \times 100$$

P 表示木质素损失率, X_0 为木质素初始含量。

1.5 木质素提取动力学

使用 Nuclei Growth 模型预测温和条件下木质素脱除动力学^[13-14]。

$$-\frac{dX}{dt} = a \times [C]^b \times t^{n-1} \times \exp(\frac{-E}{RT})^n \times X \quad (1)$$

X 为碱提反应一定时间后基质中剩余木质素含量, C 为碱浓度,本实验中碱提取过程中 NaOH 浓度一致,因此 C 可看作常数。 E 为反应活化能 (kJ/mol), R 为摩尔气体常数 (8.314 J/(mol·K)), t 为碱提取反应时间 (min), T 为反应温度 (°C), n 、 a 、 b 是常数,依赖于基质本征特性和碱提取反应过程。

因此公式 (1) 可以变成如下形式

$$-\frac{dX}{dt} = a \times t^{n-1} \times \exp(\frac{-E}{RT})^n \times X \quad (2)$$

公式 (2) 经过线性整合转化可以变为如下形式

$$\ln(-\ln(\frac{X_t}{X_0})) = n \ln t + \ln a - \frac{nE}{RT} \quad (3)$$

实验结果经多元线性回归计算 a 、 n 、 E 。

1.6 秸秆化学组分分析方法

参照美国可再生能源实验室标准测定不同处理的秸秆化学组成^[15]。基本过程如下:样品经 72% H_2SO_4 ,30 °C 水浴条件下反应 60 min,加入蒸馏水调节酸浓度达到 4%,121 °C 反应 45 min,分离滤液和残渣,所得残渣 105 °C 烘干至恒重。烘干后的残渣 550 °C 灰化 180 min 测定灰分含量。酸不溶木质素含量为残渣质量与灰分质量的差值,滤液中主要单糖含量 (葡萄糖、木糖、阿拉伯糖) 由高效液相测定 (HPLC,Agilent 1200,American)。检测条件为:HPX-87H 色谱柱,流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 ,流速 0.6 mL/min,柱温 65 °C。酸溶木质素含量由紫外分光光度计测定。

1.7 秸秆比表面积测定

不同处理后的秸秆粉碎后过 40 目筛,比表面积测定使用贝世德全自动氮比表面吸附仪完成。

1.8 秸秆红外光谱测定

不同处理的秸秆红外吸收光谱分析,由 Pekin-Elmer 2000 红外光谱仪测定。扫描范围: $4\ 000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$, 分辨率 4 cm^{-1} , 扫描 32 次进行光谱累加,以纯 KBr 的红外光谱图作为背景,环境气氛为空气^[16]。

2 结果与分析

2.1 汽爆破坏秸秆致密结构

2.1.1 不同汽爆处理秸秆宏观形态变化

由图 1 可知原秸秆呈浅黄色,质地较硬。

经过汽爆处理秸秆形态发生了显著变化,物料粒度减小(呈细丝状),表面致密结构受到破坏,并缠绕在一起,外表呈褐色或深褐色。随着汽爆压力的增加,秸秆体积逐渐减小,外表颜色逐渐加深。这是由于汽爆过程中,高温蒸煮作用使少量木质素会发生溶出,残留在秸秆表面,因而秸秆呈现深褐色^[17]。

2.1.2 不同汽爆处理秸秆比表面积变化

汽爆处理可以显著提高秸秆比表面积(图 2)。随着汽爆压力的增加秸秆比表面积逐渐增大,当汽爆压力为 1.5 MPa 时,秸秆比表面积可达 $0.40\text{ m}^2/\text{g}$ 。这是因为汽爆过程中随着压力增加,瞬间泄压时蒸汽对物料的撕裂作用逐渐增强;另一方面,较高温度下半纤维素更易降解^[18]。



图 1 不同汽爆条件秸秆宏观形态

Fig. 1 Physical morphologies of the raw straw and steam exploded straw. (A) Raw straw. (B) Steam exploded straw (0.7 MPa, 3 min). (C) Steam exploded straw (1.1 MPa, 3 min). D: Steam exploded straw (1.5 MPa, 3 min).

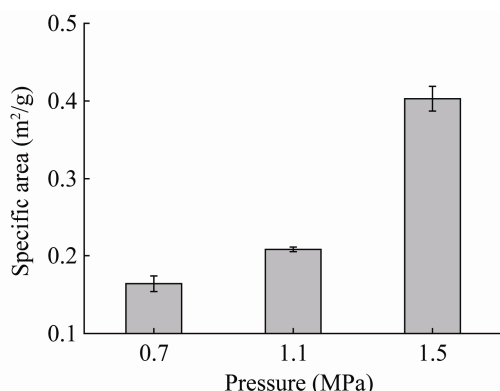


图2 不同汽爆处理秸秆比表面积变化

Fig. 2 Variations of specific surface area of straw pretreated by steam explosion.

比表面积是总容积与固体总表面积之比,是表征秸秆物性的重要参数,直接影响着碱提反应过程中秸秆与NaOH间的相互作用。高比表面积可增加秸秆可及性,更利于碱提取木质素。

2.2 汽爆漆酶处理对秸秆化学结构的影响

2.2.1 不同汽爆处理秸秆化学组分变化

为了比较汽爆处理前后秸秆中主要成分相对含量变化,参照美国可再生能源实验室标准测定不同汽爆条件下秸秆化学组成。从图3可知汽爆可以使秸秆各组分相对含量发生显著变化。汽爆秸秆中半纤维素含量降低,纤维素含量显著增加。随着汽爆强度的增加,半纤维素含量从24.35%减小到6.33%,而纤维素含量则从39.72%增加到51.26%。这是因为汽爆处理过程中半纤维素的乙酰基的连接非常容易断裂,在较低温度下即可解离完全,伴随半纤维素的降解,以及乙酰基的水解形成乙酸,弱酸环境可以进一步强化汽爆效果,进而使得纤维素结晶区氢键受到破坏,木质素结构发生变化^[19]。相比于原秸秆,汽爆秸秆中酸溶木质素含量略有减少,这是因为少量酸溶木质素溶解于高温汽相水中^[20]。

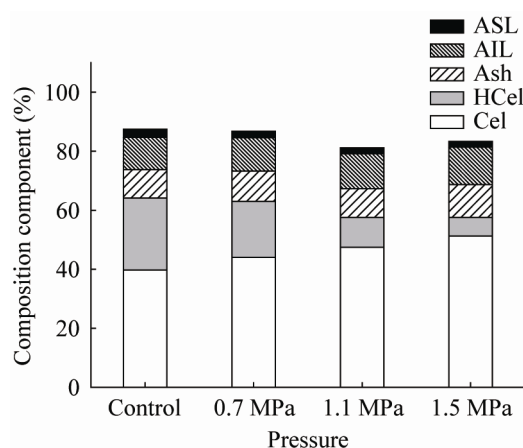


图3 不同汽爆处理秸秆化学组分的变化

Fig. 3 Variations of chemical composition of straw pretreated by steam explosion. Cel: cellulose; HCel: hemicellulose; ASL: acid-soluble lignin; AIL: acid-insoluble lignin.

酸不溶木质素含量则在汽爆后略有增加,主要原因是半纤维素组分的降解,使得全部碳水化合物含量降低,木质素的相对含量有所增加;另一方面较高的蒸汽温度使木质素和糖以及糖的降解产物(糠醛)之间发生缩聚反应形成“假木质素”^[21]。

2.2.2 汽爆漆酶协同作用秸秆主要化学基团变化

红外光谱可以定性表示秸秆中各化学基团的变化,由图4可知,经过汽爆处理和汽爆-漆酶协同处理后秸秆的红外谱图发生变化。 $1\ 515\text{ cm}^{-1}$ 处的吸收峰代表木质素中苯环特征吸收峰,通常认为汽爆处理不会显著改变苯环结构,因此将该处的透过值作为定值,用其他特征峰的透过值与其相比以分析处理前后秸秆各基团变化(表1)。 $3\ 404\text{ cm}^{-1}$ 代表着纤维素中的氢键、甲基和亚甲基吸收峰,经过汽爆漆酶协同处理后 I_{3404}/I_{1515} 降低,表明纤维素含量增多。 $1\ 736\text{ cm}^{-1}$ 和 $1\ 720\text{ cm}^{-1}$ 代表着半纤维素间的酯键链接,

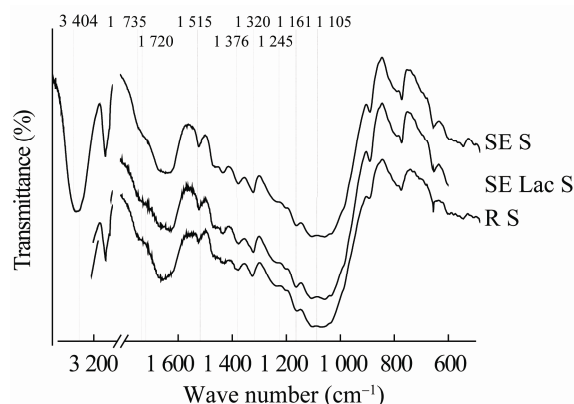


图4 不同预处理的秸秆红外光谱图

Fig. 4 Infrared spectrum of untreated/pretreated straw. R S: raw straw; SE S: steam exploded straw; SE Lac S: steam explosion combined with laccase pretreated straw.

表1 不同预处理的秸秆红外光谱结果

Table 1 Assignment of the infrared spectra of untreated/pretreated straw

	I3404/ I1515	I1735/ I1515	I1720/ I1515	I1376/ I1515	I1161/ I1515	I1105/ I1515
R S	0.52	1.05	1.02	0.78	0.45	0.32
SE S	0.40	1.20	1.12	0.66	0.27	0.17
SE Lac S	0.33	1.12	1.07	0.70	0.31	0.21

经过预处理后I1735/I1515和I1720/I1515增大,表明半纤维素间的脂键受到破坏。1376 cm⁻¹处的吸收峰是C-H弯曲振动(纤维素和木质素)特征吸收峰,经过汽爆预处理后I1376/I1515值减小,表明汽爆预处理使纤维素和木质素相互作用增强;而进一步漆酶预处理后I1376/I1515的值增大,表明漆酶氧化作用可以破坏木质素与纤维素间相互作用。1245 cm⁻¹的吸收峰为愈创木基的特征吸收峰,经过汽爆、漆酶处理后该处的吸收峰几乎消失,表明愈创木基受到显著破坏。1161 cm⁻¹和1105 cm⁻¹代表着纤维素和

半纤维素的骨架结构,经过汽爆处理后,I1161/I1515和I1105/I1515的值经过预处理后降低,纤维素含量增多^[22-23],上述结果表明汽爆、汽爆-漆酶处理后秸秆中半纤维素与纤维素及木质素间链接的酯键受到破坏,纤维素含量显著升高,木质素基团发生改变。

2.3 汽爆漆酶协同作用秸秆木质素提取过程

2.3.1 汽爆漆酶协同作用秸秆木质素提取率的变化

以0.25 mol/L NaOH溶液为碱提取液,低温(30~70℃)条件下,比较研究了原秸秆、汽爆秸秆、汽爆-漆酶秸秆的木质素提取率。由图5可知,秸秆木质素提取率随着反应时间和反应温度的增加而提高。反应前20 min是木质素提取初始阶段,初始阶段木质素提取速率高于后反应阶段,随着处理条件和碱提反应温度的不同,初始阶段木质素提取率在24.34%到58.05%之间变化。汽爆处理可以提高秸秆木质素提取率,汽爆秸秆经过漆酶作用后,木质素提取率进一步提高。原秸秆木质素提取率变化为24.34%(30℃,20 min)到62.59%(70℃,120 min),汽爆秸秆木质素提取率变化为31.3%(30℃,20 min)到72.36%(70℃,120 min),汽爆漆酶秸秆木质素提取率变化为32.5%(30℃,20 min)到75.63%(70℃,120 min)。经过汽爆漆酶协同作用后秸秆木质素提取率可提高约13%(30℃,120 min)到20%(70℃,120 min)。漆酶被认为是绿色化学中的蓝色酶^[24],在木质素修饰改性中发挥着重要作用,此前研究认为,漆酶作用后的木质素木质素的分子量都趋于高分子区域,分子量分散性能降低,更有利于木质素的利用^[25-26]。综上所述,漆酶不仅有利于促进木质素的提取,而且所得木质素具有更高的利用价值。

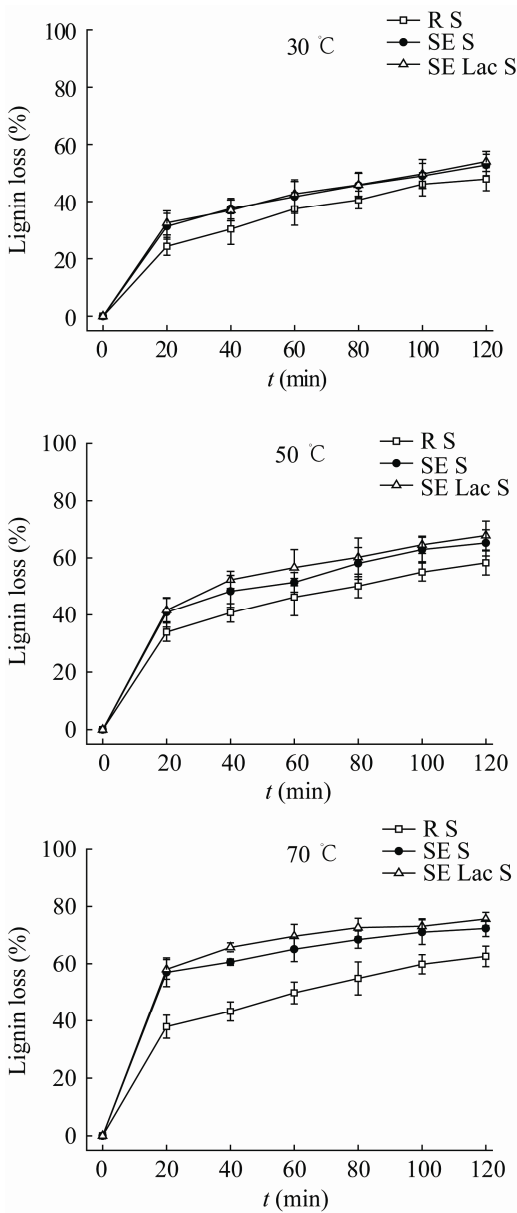


图5 不同预处理的秸秆木质素提取率
Fig. 5 Delignification of untreated/pretreated straw. R S: raw straw; SE S: steam exploded straw; SE Lac S: steam explosion combined with laccase pretreated straw.

2.3.2 木质素提取动力学

表2给出了Nuclei Growth脱木质素动力学模型的相关参数, 相关系数 R^2 大于90%, 表明实验结果和预测模型结果十分符合 (图6)。Nuclei

Growth模型结果显示提取木质素反应速率常数 $at^{n-1}\exp(-E/RT)$ 随着碱提取时间和碱提取温度不同而异, a 表示起始反应位点, 经过汽爆处理和漆酶协同作用后秸秆起始反应位点 a 显著增大, 表明汽爆过程中破坏了半纤维素对木质素包裹作用, 使得木质素外露, 增加了碱提取过程中木质素作用位点^[13]。 n 表示时间依赖性的反应速率常数, 秸秆经过汽爆和漆酶处理后 n 显著降低。 E 表示反应活化能, Nguyen研究认为反应活化能 E 是一个依赖于反应速率常数 n 的连续函数, 由公式4可知, 反应活化能 E 代表着反应速率对温度的灵敏度, 经过汽爆和漆酶处理后的 E 值升高, 表明经过汽爆处理后秸秆木质素提取对反应温度的变化更加敏感。上述结果表明汽爆处理和汽爆-漆酶处理后改变了秸秆物理和化学性质使其利于木质素的提取。

表2 秸秆木质素提取动力学参数

Table 2 Kinetics parameters of delignification of straw

	n	E (kJ/mol)	a	R^2
R S	0.19	36.11	3.36	0.98
SE S	0.15	75.61	22.11	0.98
SE Lac S	0.15	73.2	21.48	0.93

R S: raw straw; SE S: steam exploded straw; SE Lac S: steam explosion combined with laccase pretreated straw.

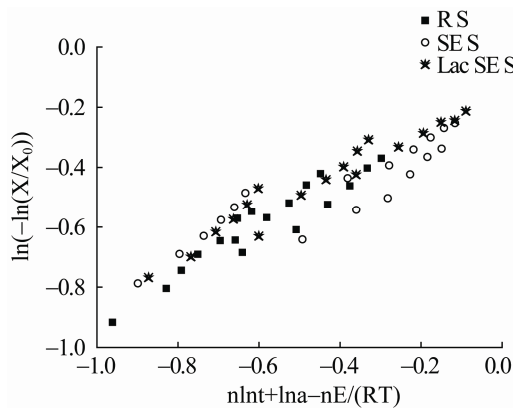


图6 Nuclei Growth model 模型验证回归

Fig. 6 Validation of Nuclei Growth model.

3 结论

汽爆改变秸秆物理结构和化学组成, 促进漆酶对秸秆木质素的氧化作用; 汽爆漆酶协同作用可以显著提高秸秆木质素提取率。Nuclei Growth 模型较好表征了温和条件下秸秆木质素提取动力学, 经过汽爆-漆酶协同作用后秸秆木质素作用位点增加, 木质素提取过程中木质素提取率对温度变化敏感性增强。汽爆耦合漆酶处理一种有效的预处理方法, 将在生物质高质化利用过程中发挥重要作用。

REFERENCES

- [1] Chen HZ. Process Engineering in Plant-based Products. New York: Nova Science Publishers Inc., 2009: 2–20.
- [2] Chen HZ, Li GH. An industrial level system with nonisothermal simultaneous solid state saccharification, fermentation and separation for ethanol production. *Biochem Eng J*, 2013, 74(15): 121–126.
- [3] Xiao ZG, Li YH, Wu XR, et al. Utilization of sorghum lignin to improve adhesion strength of soy protein adhesives on wood veneer. *Ind Crop Prod*, 2013, 50: 501–509.
- [4] Calvo-Flores FC, Dobado JA. Lignin as renewable raw material. *Chemsuschem*, 2010, 3(11): 1227–1235.
- [5] Fanny MR, Phuong M, Ye M, et al. Isolation and characterization of herbaceous lignins for applications in biomaterials. *Ind Crop Prod*, 2013, 41: 356–364.
- [6] Simon M, Brostaux Y, Vanderghem C, et al. Optimization of a formic/acetic acid delignification treatment on beech wood and its influence on the structural characteristics of the extracted lignins. *J Chem Technol Biot*, 2014, 89(1): 128–136.
- [7] Tan SSY, MacFarlane DR, Upfal J, et al. Extraction of lignin from lignocellulose at atmospheric pressure using alkylbenzenesulfonate ionic liquid. *Green Chem*, 2009, 11(3): 339–345.
- [8] Cui XF, Li WY, Wei TT, et al. Process optimization for microwave-assisted extraction of lignin from *Camellia oleifera* shell. *Chin J Food Sci*, 2011, 32(8): 98–102 (in Chinese).
崔晓芳, 李伟阳, 魏婷婷, 等. 微波辅助提取油茶果壳木质素工艺优化. *食品科学*, 2011, 32(8): 98–102.
- [9] Kudanga T, Nyanhongo GS, Guebitz GM, et al. Potential applications of laccase-mediated coupling and grafting reactions: a review. *Enzyme Microb Technol*, 2011, 48(3): 195–208.
- [10] Chen HZ. Gas Explosion Technology and Biomass Refinery. Beijing: Chemical Industry Press, 2013: 129–130 (in Chinese).
陈洪章. 气相爆破技术与生物质炼制. 北京: 化学工业出版社, 2013: 129–130.
- [11] Chen HZ, Qiu WH. Steam explosion combined with laccase treatment for the delignification of straw: CN, 102234948. 2011-11-09 (in Chinese).
陈洪章, 邱卫华. 秸秆漆酶组合预处理脱木质素的方法: CN, 102234948. 2011-11-09.
- [12] Chen HZ, Liu LY. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction. *Bioresour Technol*, 2007, 98(3): 666–676.
- [13] Yu HB, Du WQ, Zhang J, et al. Fungal treatment of cornstalks enhances the delignification and xylan loss during mild alkaline pretreatment and enzymatic digestibility of glucan. *Bioresour Technol*, 2010, 101(17): 6728–6734.
- [14] Dang V, Nguyen KL. Characterisation of the heterogeneous alkaline pulping kinetics of hemp woody core. *Bioresour Technol*, 2006, 97(12): 1353–1359.
- [15] Sluiter A, Hames B, Ruiz R, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Golden, Colorado: National Renewable Energy Laboratory, 2010.
- [16] Kumar R, Mago G, Balan V, et al. Physical and chemical characterizations of corn stover and poplar solids resulting from leading pretreatment technologies. *Bioresour Technol*, 2009, 100(17): 1353–1359.

- 3948–3962.
- [17] Kim S, Kim CH. Bioethanol production using the sequential acid/alkali-pretreated empty palm fruit bunch fiber. *Renew Energ*, 2012, 54: 150–155.
- [18] Chen HZ, Li GH, Li HQ. Novel pretreatment of steam explosion associated with ammonium chloride preimpregnation. *Bioresour Technol*, 2014, 153: 154–159.
- [19] Liu ZH, Qin L, Pang F, et al. Effects of biomass particle size on steam explosion pretreatment performance for improving the enzyme digestibility of corn stover. *Ind Crop Prod*, 2013, 44: 176–184.
- [20] Liu ZH, Qin L, Jin MJ, et al. Evaluation of storage methods for the conversion of corn stover biomass to sugars based on steam explosion pretreatment. *Bioresour Technol*, 2013, 132: 5–15.
- [21] Sannigrahi P, Kim DH, Jung S, et al. Pseudo-lignin and pretreatment chemistry. *Energ Environ Sci*, 2011, 4(4): 1306–1310.
- [22] Hu J, Xiao R, Shen D, et al. Structural analysis of lignin residue from black liquor and its thermal performance in thermogravimetric-Fourier transform infrared spectroscopy. *Bioresour Technol*, 2013, 128: 633–639.
- [23] Boeriu CG, Bravo D, Gosselink RJA, et al. Characterisation of structure-dependent functional properties of lignin with infrared spectroscopy. *Ind Crop Prod*, 2004, 20(2): 205–218.
- [24] Mayer AM, Staples RC, et al. Laccase: new functions for an old enzyme. *Phytochemistry*, 2002, 60(6): 551–565.
- [25] Qiu WH, Chen HZ. An alkali-stable enzyme with laccase activity from entophytic fungus and the enzymatic modification of alkali lignin. *Bioresour Technol*, 2008, 99(13): 5480–5484.
- [26] Qiu WH, Chen HZ. FTIR spectra analysis of the reactive activity of lignin when modified by laccase. *Spectroscopy Spectral Anal*, 2008, 28(7): 1501–1505 (in Chinese).
- 邱卫华, 陈洪章. 红外光谱分析木质素在漆酶酶法改性中的反应性. *光谱学与光谱分析*, 2008, 28(7): 1501–1505.

(本文责编 郝丽芳)