

杂色云芝生物预处理对硬木和软木酶水解的影响

余洪波, 张晓昱

华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074

摘要: 节能减排的生物预处理技术是促进木质纤维素酶水解转化乙醇的有效途径。本试验首次研究了白腐菌杂色云芝(*Trametes vesicolor*)生物预处理对柳木(*Salix babylonica*, 硬木)和杉木(*Cunninghamia lanceolata*, 软木)纤维素酶水解的影响及作用机制。结果显示生物预处理使硬木和软木的最终转化率分别增加 4.78 倍和 4.02 倍。通过研究酶与基质的相互作用发现, 预处理后木材基质与酶亲和力的增强并不一定导致酶水解初始转化率的提高; 但水解过程中转化速率的下降速度随着解吸附指数增加而降低, 说明生物处理主要通过减少纤维素酶对基质的不可逆吸附, 延缓水解过程中基质转化速率的急剧下降, 从而提高水解效率。不可逆吸附的降低与预处理过程中木质素的部分降解与改性有一定关系。

关键词: 酶水解, 杂色云芝, 吸附, 硬木, 软木

Effect of biological pretreatment with *Trametes vesicolor* on the enzymatic hydrolysis of softwood and hardwood

Hongbo Yu, and Xiaoyu Zhang

College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China

Abstract: We evaluated the effect of biological pretreatment with white rot fungus *Trametes vesicolor* on the enzymatic hydrolysis of two wood species, Chinese willow (*Salix babylonica*, hardwood) and China-fir (*Cunninghamia lanceolata*, softwood). The result indicated that the pretreated woods showed significant increases in the final conversion ratios of enzymatic hydrolysis (4.78-fold for hardwood and 4.02-fold for softwood). In order to understand the role of biological pretreatment we investigated the enzyme-substrate interactions. Biological pretreatment enhanced the substrate accessibility to cellulase but not always correlated with the initial conversion rate. However, the change of the conversion rate decreased dramatically with increased desorption values after biological pretreatment. Thus, the biological pretreatment slowed down the declines in conversion rates during enzymatic hydrolysis by reducing the irreversible adsorption of cellulase and then improved the enzymatic hydrolysis. Moreover, the decreases of the irreversible adsorption may be attributed to the partial lignin degradation and alteration in lignin structure after biological pretreatment.

Keywords: enzymatic hydrolysis, *Trametes vesicolor*, adsorption, hardwood, softwood

木材、秸秆等木质纤维素原料是燃料乙醇生产的最廉价来源^[1, 2]。然而, 木质纤维素分子对纤维素

酶水解的高抗性限制了可发酵糖的转化^[3]。利用预处理技术可以有效降低原料多孔性、结晶度和聚合

Received: March 7, 2009; Accepted: May 21, 2009

Supported by: Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (973 Program)(No. 2007CB210201).

Corresponding author: Xiaoyu Zhang. Tel: +86-27-87792108; Fax: +86-27-87792128; E-mail: hongbo.fish@gmail.com

国家重点基础研究发展规划项目(973 项目) (No. 2007CB210201)资助。

度、木质素和半纤维素含量,从而提高转化率^[4]。目前常用的预处理工艺包括酸预处理、碱预处理、蒸汽爆破预处理等。这些处理工艺通常需要较高的反应温度和压力,耗水耗能,并需要特殊处理设备,处理废液还会带来严重的环境问题^[5]。近年来,节能减排的白腐菌生物预处理技术逐渐受到重视^[4,6]。作为自然界中唯一可以完全矿化木质素的微生物^[7],白腐菌已经在生物制浆中得到广泛应用。但仅有少数研究利用白腐菌预处理提高木质纤维素酶转化效率,研究对象大多限于秸秆、竹杆等非木材原料^[8-10],而利用白腐菌预处理提高木材酶水解效率的研究很少见到报道^[2]。

一些研究认为白腐菌预处理后转化效率的提升可能与基质去木质化和多孔性增加有关,但具体作用机制并不清楚^[10,11]。不同于一般酶解反应,木质纤维素的酶水解是一个复杂的固液多相反应过程,其主要特征表现为在水解初始阶段纤维素快速转化,但转化尚未完全时速率就急剧下降^[12-14]。研究表明水解的初始转化速率常和酶与基质的亲和力有关,而水解过程中纤维素酶对基质吸附和解吸附的复杂作用规律是导致转化速率下降的原因之一^[15,16],因此,生物处理很可能通过改变木材基质与酶蛋白的相互作用提高转化率,然而这方面的研究尚未见报道。由于木材种类差异会对白腐菌处理效果产生一定影响,通常软木较硬木对白腐菌处理具有更高抗性^[17]。因此,为评价白腐菌预处理在木材酶水解中的应用潜力,本研究以柳木(*Salix babylonica*, 硬木)和杉木(*Cunninghamia lanceolata*, 软木)为原料评价白腐菌杂色云芝(*Trametes vesicolor*)预处理对酶水解的影响,同时研究了预处理后纤维素酶吸附特征的变化规律,进一步揭示白腐菌生物预处理的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

白腐菌杂色云芝(*T. vesicolor*)从神农架自然保护区分离得到,保存在华中科技大学生命科学与技术学院环境资源微生物研究所。

1.1.2 木材原料

柳木(*Salix babylonica*, 硬木)和杉木(*Cunninghamia*

lanceolata, 软木)采自湖北武汉,其中柳木树龄7年,杉木树龄7年。将新鲜木材自然干燥后粉碎,过20~40目筛,得到平均直径为0.3 mm的木质纤维素粉末,置于60°C烘箱内72 h干燥。

1.1.3 培养基

种子培养基:85%的玉米秸秆、2%蔗糖、10%麸皮、3%棉籽壳及300%的蒸馏水,混合均匀后加入直径为90 mm的平皿中,每平皿5 g。

1.2 实验方法

1.2.1 白腐菌预处理

三角瓶中加入5 g已烘干木粉和适量蒸馏水,柳木和杉木的加水量分别为1:2.5、1:3,塑料膜封口,121°C高压灭菌20 min。白腐菌杂色云芝接种在种子培养基上,25°C培养10 d后,每个三角瓶加入直径为1 cm的杂色云芝接种块,置于25°C分别预处理30、60、90、120 d,菌丝长满后三角瓶倒置防止水分流失。预处理完成后,小心地剥离表面的残留接种块,置于60°C烘箱恒重72 h,测量重量损失。每个试验重复3次,没有接种的三角瓶作为空白对照。

1.2.2 木材成分测定

处理后的木材和对照粉碎至40~60目。利用美国分析化学家学会标准方法(AOAC, 1984)测定纤维素及木质素含量^[18]。

1.2.3 木材的酶解糖化

木材的酶水解体系包含50 mmol/L的pH 4.8的醋酸纳缓冲溶液、2.5%的木材基质和20 FPU/g基质的纤维素酶。纤维素酶来源于里氏木霉,购自Sigma公司。水解体系置于50°C水浴锅内分别反应1、3、6、12、24、48、72、96、120 h,10 000 r/min离心5 min,利用DNS法测定上清液中的还原糖浓度^[19],酶水解转化率定义为:

$$\text{转化率(Conversion ratio, \%)} = \frac{\text{还原糖产量} \times 0.9 \times 100}{\text{基质中纤维素含量}}$$

1.2.4 纤维素酶的吸附

利用Bradford法测定上清液中纤维素酶蛋白浓度。被吸附的纤维素酶量为溶液中初始纤维素酶蛋白含量和反应后蛋白含量之差。纤维素酶对基质的吸附率定义为:

$$\text{纤维素酶吸附率(Adsorption ratio, \%)} =$$

$$\frac{\text{吸附的纤维素酶量} \times 100}{\text{加入的纤维素酶量}}$$

解吸附指数(Desorption value)作为评价纤维素酶不可逆吸附的指标。解吸附指数越高则在水解末期释放到反应液中的酶越多,说明酶的不可逆吸附越低。解吸附指数定义为:

$$\text{解吸附指数 (Desorption value)} = \frac{\text{酶蛋白的最大吸附量} - \text{水解完成时酶蛋白的吸附量}}{\text{初始纤维素酶蛋白量}}$$

同时测定纤维素酶对木材基质的初始吸附率。初始吸附率的测定体系包含 50 mmol/L pH 4.8 的醋酸纳缓冲溶液、2.5% 的木材基质和 20 FPU/g 基质的纤维素酶。测定体系置于 4°C 反应 90 min 达到平衡后,在 50°C 反应 10 min 活化,于 10 000 r/min 离心 5 min 测定上清液中蛋白质浓度。纤维素酶对基质的初始吸附率定义为:

$$\text{纤维素酶初始吸附率(Initial adsorption ratio, \%)} = \frac{\text{吸附的纤维素酶量} \times 100}{\text{加入的纤维素酶量}}$$

1.2.5 数据处理

利用 Ohmine 的经验模型定量描述水解的初始转化率和转化速率的变化特征^[20],酶水解转化率可以表示为:

$$X = \frac{1}{k} * \ln(1 + V_0 * k * t) \quad (1)$$

其中 X 为转化率(%), t 是水解时间(h)。这个模型有 2 个动力学参数,其中 V_0 为初始转化速率(%/h), k 是水解减速常数,表示转化速率的下降速度。利用公式(1)拟合生物预处理后木材在纤维素酶作用下的转化率-时间曲线,计算酶水解动力学参数。

2 结果与讨论

2.1 生物预处理对木材酶水解的影响

图 1 显示了杂色云芝预处理对酶水解的影响。酶解效率随生物预处理时间增加逐渐提高,预处理 120 d 后,硬木和软木的最终转化率分别增加 4.78 倍和 4.02 倍。软木对纤维素酶水解具有较高抗性,转化率总低于硬木,预处理 120 d 后的软木转化率仅和预处理 30 d 后的硬木相似。随着水解时间增加酶转化速率以一种非线性方式急剧下降。但与未处理木材相比,预处理后木材转化速率的变化规律有所不同。

利用 Ohmine 的经验模型对转化率-时间数据拟合,计算酶水解的初始转化率和水解减速常数(表 1),回归曲线显示在图 1。结果显示,硬木的初始转化速

率 V_0 随着处理时间的增加显著提升。然而,软木初始转化速率的变化却没有明显规律,在预处理 30 d 后转化速率突然下降,而预处理 60 d 后又显著增加,处理 90 d 和 120 d 后转化速率又一次下降和上升。初始转化速率和酶解效率变化趋势并不一致,因此,预处理后酶解效率的提升与初始转化速率的变化没有显著的联系。

然而,2 种基质的水解减速常数 k 均随着处理时间增加而显著降低,和酶解效率的变化呈现出一致趋势。这表明生物处理延缓了酶水解过程中转化速率下降的速度,从而增加了最终酶水解转化率。所以,尽管软木在处理 30 d 后初始转化速率下降,但由于 k 值降低,转化速率的下降趋势延缓,仍导致最终转化率的提升。因此,酶水解效率的提高主要归因于生物处理延缓了水解过程中转化速率的急剧下降。

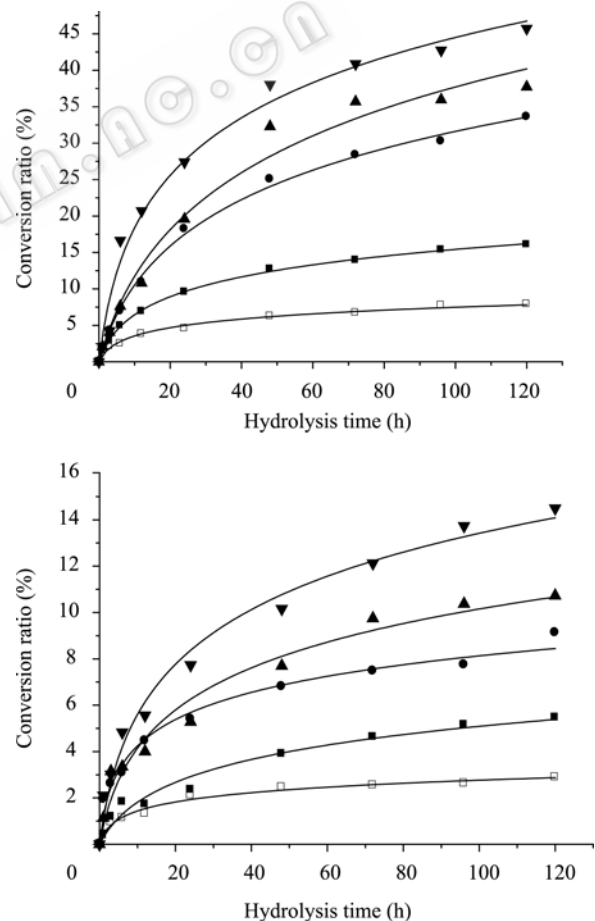


图 1 杂色云芝预处理对酶水解的影响

Fig. 1 Effect of biological pretreatment with *T. vesicolor* on the enzymatic hydrolysis. Control (\square); pretreated for 30 d (\blacksquare); pretreated for 60 d (\bullet); pretreated for 90 d (\blacktriangle); pretreated for 120 d (\blacktriangledown).

2.2 生物预处理对酶与木材亲和力的影响

表 2 显示了生物预处理后纤维素酶对木材基质初始吸附率的变化。纤维素酶的初始吸附率反映了酶与基质的亲和力^[16]。结果表明, 预处理前后软木的初始吸附率总高于硬木。初始吸附率随着预处理时间增加明显提高, 处理 90 d 后, 硬木和软木分别增加 1.72 倍和 1.60 倍, 表明生物预处理提高了木材对纤维素酶的亲和力。但亲和力的增强并不一定导致初始转化率的提高, 如初始转化速率增加并不显著的软木, 其初始吸附率的增加却与硬木相似。

表 1 硬木和软木酶水解的动力学模型参数

Table 1 Kinetics parameters of enzymatic hydrolysis of hardwood and softwood

Pretreatment time (d)	V_0 (%/h)	k	R^2
Hardwood (Chinese willow)			
0	1.11	0.55	0.99
30	1.49	0.23	0.99
60	1.74	0.09	0.99
90	1.81	0.07	0.98
120	4.16	0.08	0.98
Softwood (China-fir)			
0	0.60	1.67	0.99
30	0.33	0.59	0.97
60	1.80	0.57	0.98
90	0.92	0.34	0.97
120	1.29	0.27	0.99

表 2 杂色云芝预处理对纤维素酶初始吸附率的影响

Table 2 Effect of biological pretreatment with *T. vesicolor* on the initial adsorption ratio

Pretreatment time (d)	Initial adsorption ratio (%)	
	Hardwood (Chinese willow)	Softwood (China-fir)
0	5.8±1.5	6.2±1.6
30	10.5±0.8	14.7±0.8
60	13.7±3.2	13.4±0.4
90	15.8±0.1	16.1±3.0

众所周知, 白腐菌处理可以增加木材多孔性, 使更多纤维素从木质纤维素网络中暴露出来, 为水解提供了更多酶结合位点, 从而增加酶与基质的亲和力^[10,21], 因此生物处理后初始转化速率通常有所提高。然而, 纤维素酶也可以通过疏水作用吸附在木质素上, 多孔性的增加同时使更多木质素暴露, 因此与木质素结合的纤维素酶也有所增加^[16]。所以酶与基质亲和力的增强是木质素和纤维素与酶结合

能力共同增强的结果。但纤维素酶对木质素的吸附是无效吸附, 不能催化纤维素的转化, 无效吸附的提高不能带来转化率的提升, 所以亲和力的增强与初始转化率的增加没有必然联系。

目前木材基质初始转化速率的影响因素并不完全清楚。已有研究表明, 初始转化速率与基质中纤维素的结晶度、聚合度等因素也有一定关系^[4,12]。通常, 纤维素无定形区较结晶区更容易水解, 结晶度低的基质初始转化率更高^[4]。由于生物处理有可能会对木材结晶度产生一定影响, 因此预处理后杉木初始转化速率的不规律变化可能是酶亲和力、基质结晶度及其他因素共同改变的结果, 但对此仍需要进行更加深入的研究。

2.3 生物预处理对纤维素酶吸附和解吸附的影响

由于纤维素在水解过程中的不断转化, 基质特性也发生着变化, 因此纤维素酶对基质的吸附呈现动态的变化^[13,22]。然而初始吸附率仅代表水解初始酶与基质的天然亲和力, 并不能完全反映水解过程中酶与基质的相互作用。因此, 本试验研究了酶水解过程中纤维素酶吸附率的变化(图 2)。如图所示, 水解初期纤维素酶快速吸附到基质上, 并在 12 h 或 24 h 后酶蛋白的吸附达到峰值, 其后酶蛋白极其缓慢地释放到水解液中。由于生物处理后纤维素酶和基质亲和力增强, 经过处理的木材最大吸附率明显高于未处理木材。

木质纤维素的酶水解包括酶的吸附、水解、解吸附 3 个步骤, 但随着水解进行, 有一部分酶蛋白不能从基质上解吸附, 被称为不可逆吸附^[22]。从图 2 可以看出, 在水解末期大部分酶蛋白仍吸附在木材基质上, 但吸附在经过生物预处理基质上的纤维素酶似乎较未处理基质更容易释放到水解液中。本研究用解吸附指数(Desorption value)作为衡量不可逆吸附的定量指标(表 3)。解吸附指数越高表示不可逆吸附的酶也就越少。结果显示, 解吸附指数随着预处理时间延长而显著增加。预处理 90 d 后, 硬木和软木的解吸附指数分别是未经处理基质的 2.71 倍和 10.23 倍。这表明生物预处理减少了纤维素酶对基质的不可逆吸附。比较表 1 和表 3 发现, 预处理后水解减速常数 k 随着解吸附指数增加而降低。一些研究表明, 纤维素酶的不可逆吸附使水解体系中酶的比活力随水解时间增加而降低, 结果导致转化速率

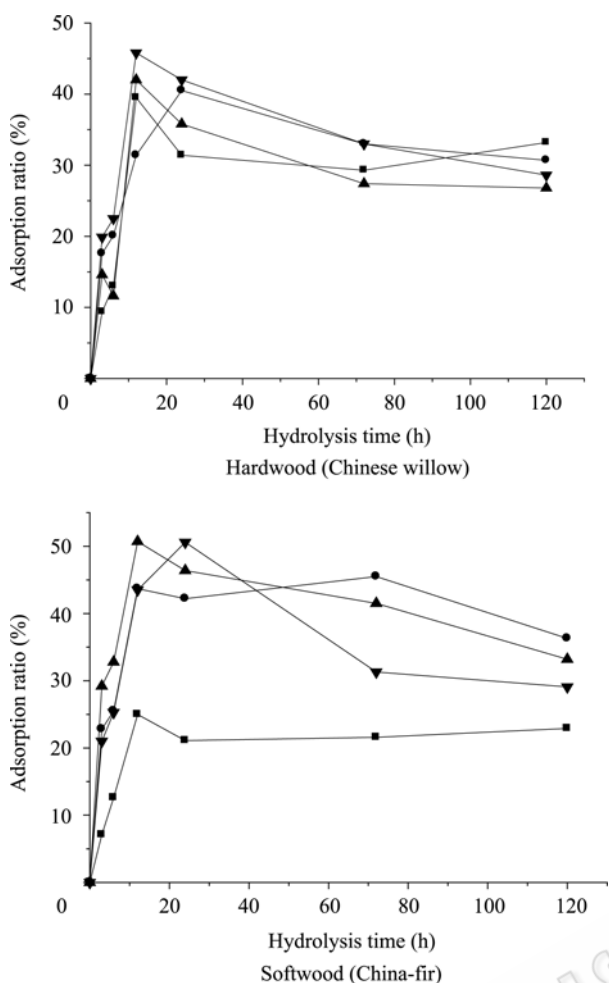


图2 杂色云芝预处理对纤维素酶吸附的影响
Fig. 2 Effect of biological pretreatment with *T. vesicolor* on cellulase adsorption. Control (■); pretreated for 30 d (●); pretreated for 60 d (▲); pretreated for 90 d (▼).

的急剧下降^[15,22]。因此,生物预处理后纤维素酶不可逆吸附的减少是导致水解过程中转化速率下降趋缓的主要因素之一。

一些研究发现酶蛋白对木质素的吸附通常是不可逆的^[13]。正如表3所示,具有高木质素含量的软木,其解吸附指数要低于硬木。生物预处理使木材基质中木质素含量降低,解吸附指数也随之增加。因此,预处理后纤维素酶不可逆吸附的降低可能是基质中木质素含量降低的结果。然而,生物处理后的软木木质素含量仍显著高于硬木,但解吸附指数却相似,说明木质素含量变化并不是影响不可逆吸附的唯一原因。木质素结构变化也会影响纤维素酶对木质素的不可逆吸附。Mooney等报道含有磺化木质素的基质吸附能力较强^[21]; Eriksson等发现木质素的疏水表面被带有亲水性基团的表面活性剂修饰后,纤维素酶对木质素的吸附降低^[23]。生物预处理过程中,在白腐菌所分泌的木质素降解酶系作用下,部分木质素降解的同时,木质素大分子的结构也会发生改变,如木质素中亲水性的酚羟基含量增加等^[24-26]。木质素结构的生物改性也可能影响了纤维素酶对木质素的吸附。因此,预处理后木质素结构的变化可能是导致不可逆吸附降低的另一个因素。

3 结论

首次利用白腐菌 *T. vesicolor* 生物预处理柳

表3 杂色云芝预处理对纤维素酶不可逆吸附和木质素含量的影响

Table 3 Effect of biological pretreatment with *T. vesicolor* on desorption value and lignin content

Pretreatment time (d)	Maximum of adsorbed protein during hydrolysis (%) / time (h)	Amount of adsorbed protein at the end of hydrolysis (%) / time (h)	Desorption value	Lignin content (%)
Hardwood (Chinese willow)				
0	39.5 / 12	33.2 / 120	6.3	15.9±0.1
30	40.5 / 24	30.7 / 120	9.8	14.4±0.8
60	42.0 / 12	26.8 / 120	15.2	13.6±0.3
90	45.8 / 12	28.7 / 120	17.1	13.4±1.1
Softwood (China-fir)				
0	25.0 / 12	22.9 / 120	2.1	32.8±1.0
30	45.5 / 72	36.3 / 120	9.2	30.2±0.4
60	50.7 / 12	33.2 / 120	17.5	29.8±0.5
90	50.6 / 24	29.1 / 120	21.5	28.6±1.4

木(*Salix babylonica*, 硬木)和杉木(*Cunninghamia lanceolata*, 软木), 生物预处理后硬木和软木的最终转化率分别增加 4.78 倍和 4.02 倍。模型分析显示水解减速常数 k 随着处理时间增加而显著降低, 说明生物预处理延缓了木材基质酶水解过程中转化速率的急剧下降。

生物预处理增强了木材基质与酶的亲和力, 但并不一定导致初始转化速率的提高; 预处理后解吸附指数显著增加, 表明生物处理减少了纤维素酶的不可逆吸附, 水解过程中转化速率的下降速度随着解吸附指数增加而降低。因此, 生物处理主要通过减少纤维素酶对基质的不可逆吸附, 延缓水解过程中基质转化速率的急剧下降, 从而提高水解效率。

REFERENCES

- [1] Zhao Y, Wang Y, Zhu JY, *et al.* Enhanced enzymatic hydrolysis of spruce by alkaline pretreatment at low temperature. *Biotechnol Bioeng*, 2008, **99**(6): 1320–1328.
- [2] Pu Y, Zhang D, Singh PM, *et al.* The new forestry biofuels sector. *Biofuels Bioprod Bioref*, 2008, **2**(1): 58–73.
- [3] Yang B, Wyman CE. Pretreatment: The key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. *Biofuels Bioprod Bioref*, 2008, **2**(1): 26–40.
- [4] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. *Bioresour Technol*, 2002, **83**(1): 1–11.
- [5] Eggeman T, Elander RT. Process and economic analysis of pretreatment technologies. *Bioresour Technol*, 2005, **96**(18): 2019–2025.
- [6] Amirta R, Tanabe T, Watanabe T, *et al.* Methane fermentation of Japanese cedar wood pretreated with a white rot fungus, *Ceriporiopsis subvermispota*. *J Biotechnol*, 2006, **123**(1): 71–77.
- [7] Hakala TK, Lundell T, Galkin S, *et al.* Manganese peroxidases, laccases and oxalic acid from the selective white-rot fungus *Physisporinus rivulosus* grown on spruce wood chips. *Enzyme Microb Tech*, 2005, **36**(4): 461–468.
- [8] Nguyen D, Zhang X, Jiang ZH, *et al.* Bleaching of kraft pulp by a commercial lipase: Accessory enzymes degrade hexenuronic acids. *Enzyme Microb Tech*, 2008, **43**(2): 130–136.
- [9] Mendonca R, Guerra A, Ferraz A. Delignification of Pinus taeda wood chips treated with *Ceriporiopsis subvermispota* for preparing high-yield kraft pulps. *J Chem Technol Biotechnol*, 2002, **77**: 411–418.
- [10] Taniguchi M, Suzuki H, Watanabe D, *et al.* Evaluation of pretreatment with *Pleurotus ostreatus* for enzymatic hydrolysis of rice straw. *J Biosci Bioeng*, 2005, **100**(6): 637–643.
- [11] Zhang X, Yu H, Huang H, *et al.* Evaluation of biological pretreatment with white rot fungi for the enzymatic hydrolysis of bamboo culms. *Int Biodeter Biodegr*, 2007, **60**(3): 159–164.
- [12] Gan Q, Allen SJ, Taylor G. Analysis of process integration and intensification of enzymatic cellulose hydrolysis in a membrane bioreactor. *J Chem Technol Biotechnol*, 2005, **80**(6): 688–698.
- [13] Gan Q, Allen SJ, Taylor G. Kinetic dynamics in heterogeneous enzymatic hydrolysis of cellulose: An overview, an experimental. *Process Biochem*, 2003, **38**(7): 1003–1018.
- [14] Movagarnejad K, Sohrabi M, Kaghazchi T, *et al.* A model for the rate of enzymatic hydrolysis of cellulose in heterogeneous solid-liquid systems. *Biochem Eng J*, 2000, **4**(3): 197–206.
- [15] Boussaid A, Saddler JN. Adsorption and activity profiles of cellulases during the hydrolysis of two Douglas fir pulps. *Enzyme Microb Tech*, 1999, **24**(3–4): 138–143.
- [16] Desai SG, Converse AO. Substrate reactivity as a function of the extent of reaction in the enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Biotechnol Bioeng*, 1997, **56**(6): 650–655.
- [17] Blanchette RA. Delignification by wood-decay fungi. *Annu Rev Phytopathol*, 1991, **29**: 381–403.
- [18] Horwitz W. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Washington: Association of Official Analytical Chemists, 1980: 1–1018.
- [19] Behera BK, Arora M, Sharma DK. Scanning electron microscopic (SEM) studies on structural architecture of lignocellulosic materials of *Calotropis procera* during its processing for saccharification. *Bioresour Technol*, 1996, **58**(3): 241–245.
- [20] Ohmine K, Ooshima H, Harano Y. Kinetic study on enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase from *Trichoderma viride*. *Biotechnol Bioeng*, 1983, **25**: 2041–2053.
- [21] Mooney CA, Mansfield SD, Touhy MG, *et al.* The effect of initial pore volume and lignin content on the enzymatic hydrolysis of softwoods. *Bioresour Technol*, 1998, **64**(2): 113–119.
- [22] Gregg DJ, Saddler JN. Factors affecting cellulose hydrolysis and the potential of enzyme recycle to enhance the efficiency of an integrated wood to ethanol process. *Biotechnol Bioeng*, 1996, **51**(4): 375–383.
- [23] Eriksson T, Börjesson J, Tjerneld F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose. *Enzyme Microb Tech*, 2002, **31**(3): 353–364.
- [24] Garzillo AMV, Colao MC, Caruso C, *et al.* Laccase from the white-rot fungus *Trametes trogii*. *Appl Microbiol Biot*, 1998, **49**(5): 545–551.
- [25] Akin DE, Rigsby LL, Sethuraman A, *et al.* Alterations in structure, chemistry, and biodegradability of grass lignocellulose treated with the white rot fungi *Ceriporiopsis subvermispota* and *Cyathus stercoreus*. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**(4): 1591–1598.
- [26] Widsten P, Kandelbauer A. Adhesion improvement of lignocellulosic products by enzymatic pre-treatment. *Biotechnol Adv*, 2008, **26**(4): 379–386.