

斑茅酶解转化可发酵单糖的液氨预处理及参数优化

刘建军, 彭何欢, 赵相君, 程成, 陈峰, 邵千钧

浙江农林大学工程学院 国家木质资源综合利用工程中心, 浙江 临安 311300

刘建军, 彭何欢, 赵相君, 等. 斑茅酶解转化可发酵单糖的液氨预处理及参数优化. 生物工程学报, 2013, 29(3): 333-341.
Liu JJ, Peng HH, Zhao XJ, et al. Optimization of liquid ammonia treatment (LAT) parameters for enzymatic hydrolysis of *Saccharum arundinaceum* to fermentable sugars. Chin J Biotech, 2013, 29(3): 333-341.

摘要: 斑茅(*Saccharum arundinaceum* Retz.)的生物产量高, 对土壤条件要求低, 可作为纤维素乙醇生产的原料作物在我国南方地区广泛种植。实验以斑茅为原料, 采用液氨预处理法克服其水解顽抗性, 并添加纤维素酶进行酶解, 运用高效液相色谱 (HPLC) 测定了酶解液中的单糖含量。实验结果表明在纤维素酶添加量为 15 FPU/(g 当量葡聚糖)、预处理原料含水率为 80%、预处理温度为 130 °C、预处理驻留时间为 10 min、液氨与生物质的质量比例为 2:1 时, 葡聚糖和木聚糖的总转化率分别为 69.34% 和 82.60%, 相比于未作预处理的原料分别提高了 573% 和 1 056%, 单糖产量提高 8 倍。实验结果表明液氨预处理对斑茅是一种有效的预处理方式, 并优于稀酸或湿爆法预处理, 与酸预处理和氨爆法 (AFEX) 处理效果接近。

关键词: 斑茅, 液氨预处理, 酶解, 生物质, 纤维素乙醇

Optimization of liquid ammonia treatment for enzymatic hydrolysis of *Saccharum arundinaceum* to fermentable sugars

Jianjun Liu, Hehuan Peng, Xiangjun Zhao, Cheng Cheng, Feng Chen, and Qianjun Shao

National Engineering Research Center of Wood-based Resource Utilization, School of Engineering, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China

Abstract: China has abundant available marginal land that can be used for cultivation of lignocellulosic energy plants. *Saccharum arundinaceum* Retz. is a potential energy crop with both high biomass yield and low soil fertility requirements. It can be planted widely as cellulosic ethanol feedstock in southern China. In the present work *Saccharum arundinaceum*

Received: July 22, 2012; **Accepted:** October 25, 2012

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 30871991), Innovative Research Team of Zhejiang Province (No. 2009R50012), Research Foundation of Education Bureau of Zhejiang Province (No. Z201017451).

Corresponding author: Qianjun Shao. Tel: +86-571-63740358; Fax: +86-571-63732723; E-mail: shawqj@gmail.com

国家自然科学基金 (No. 30871991), 浙江省创新团队项目 (No. 2009R50012), 浙江省教育厅重点项目 (No. Z201017451) 资助。

was pretreated by liquid ammonia treatment (LAT) to overcome biomass recalcitrance, followed by enzymatic hydrolysis. The monosaccharide contents (glucose, xylose, and arabinose) of the enzymatic hydrolysate were determined by high performance liquid chromatography. Experimental results show that the optimal LAT pretreatment conditions were 130 °C, 2:1 (W/W) ammonia to biomass ratio, 80% moisture content (dry weight basis) and 5 min residence time. Approximately 69.34% glucan and 82.60% xylan were converted after 72 h enzymatic hydrolysis at 1% glucan loading using 15 FPU/(g of glucan) of cellulase. The yields of glucose and xylose were 573% and 1 056% higher than those of the untreated biomass, and the LAT-pretreated substrates obtained an 8-fold higher of total monosaccharide yield than untreated substrates. LAT pretreatment was an effective to increase the enzymatic digestibility of *Saccharum arundinaceum* compared to acid impregnated steam explosion and similar to that of acid treatment and ammonia fiber expansion treatment.

Keywords: *Saccharum arundinaceum*, liquid ammonia pretreatment, enzymatic hydrolysis, biomass, cellulosic ethanol

能源需求与环境保护是中国经济发展面临的双重压力,我国的碳排放量已居世界第一,石油消费量居世界第二。纤维素乙醇作为第二代燃料乙醇技术,受到各国政府与研究者的的高度重视。纤维素乙醇燃料与汽油相比,能消减温室气体排放 86%^[1]。我国宜耕边际性土地资源丰富,预计生产乙醇的总潜力为 7.4×10^7 t 以上^[2],可替代 1/3 以上的汽油消费量。斑茅 *Saccharum arundinaceum* Ratz, 又名大密,是禾本科甘蔗属多年生、密丛高大草本,最近研究者根据基因表达将其划归为蔗茅属 *Erianthus*。斑茅的秆粗壮,高 2~4 m (最高可达 6 m),茎达 1~2 cm,具有分蘖力强、根系发达、抗旱性强等特性,广泛分布在我国热带、亚热带至暖温带的广大区域,具有生物产量高、较高的光合效率和干物质积累的能力。其灰分与木质素含量低、纤维素含量较高,从化学成分及能值上看斑茅很适合作能源植物^[3]。

木质纤维素原料来源于植物细胞壁,主要成分是半纤维素、纤维素和木质素等,其中纤维素的成分是葡聚糖,经水解后可转化为葡萄糖,半纤维素的主要成分为木聚糖、阿拉伯聚糖、甘露聚糖等,经水解后可转化为木糖、阿拉伯糖、甘

露糖等,单糖经发酵可转化为乙醇(五碳糖发酵需要经基因工程改进后的菌种)。植物具有很强的水解顽抗性,被学者称为生物质顽抗 (Biomass recalcitrance)^[4-5]。木质素将纤维素紧紧包裹,并形成共价键联结网络结构 (Lignin-carbohydrate complexes, LCCs),半纤维素缠绕其中,再加上植物材料本身的致密性和纤维素的高结晶度,使水解酶难以接触到纤维素,导致酶解效率低下。预处理技术可去除部分木质素,瓦解纤维素的晶体结构,部分降解半纤维素,暴露纤维素的核心部分,使其在酶的作用下高效地水解成可发酵的单糖。预处理是纤维素乙醇转化过程中最重要的关键技术^[4],生产成本高达 30 美分/加仑乙醇^[6],占纤维素乙醇生产成本的 1/4~1/3。预处理的主要方法有:酸预处理、碱预处理、热水预处理、蒸汽爆破法和氨纤维爆破法等^[6-8],处理效果各有优劣。

氨是价格低廉的碱性原料,可采用氨的水溶液或纯液氨进行预处理。氨水预处理根据处理温度、氨含量与水分不同,主要有 ARP 法 (Ammonia recycle percolation)^[9-10]、SAA 法 (Soaking in aqueous ammonia)^[11]和 LMAA 法 (Low moisture anhydrous ammonia)^[12]等。以玉米秸秆为原料,

纤维素酶的添加量为每克葡聚糖 15 FPU/(g 当量葡聚糖), 72 h 的葡聚糖转化率 (葡萄糖得率与理论最大值之比): ARP 法为 88.5%^[9]和 90.1%^[10], SAA 法为 92.5% (10 FPU/(g 当量葡聚糖))^[11]; LMAA 法的乙醇得率为理论最高值的 89%^[12]。

纯液氨处理主要采用氨爆法 (Ammonia fiber explosion, AFEX), 玉米秸秆在优化条件下, 葡聚糖的转化率在 95% 以上, 而木聚糖的转化率为 80% 以上^[13]。AFEX 用于草本植物的效果良好, 除玉米秸秆外, 还用于稻草^[14]、甜高粱秸秆^[15]、青贮玉米^[16]、芒^[17]、柳枝稷^[18-19]等。

本文提出的液氨处理法 (Liquid ammonia treatment, LAT) 在 AFEX 的基础上作了改进, 提高了温度处理范围 (AFEX 认为 90 °C 具有最佳的处理效果), 并将氨的快速释放改为缓慢释放, 降低了工艺控制难度与处理成本。LAT 法能移除一部分木质素, 不会使半纤维素分解后的木糖降解, 氨易于回收再利用, 预处理过程中不产生阻碍酶解或发酵的物质, LAT 法预处理的优势与 AFEX 法相似。斑茅转化燃料乙醇的相关研究目前报道还不多, 由于它的生物形态和化学组分与能源草本植物芒的相近, 本文的结果将与芒的预处理研究结果进行比较。

1 材料与方法

1.1 材料

实验采用的生物质原料为一年生斑茅、芒和玉米秸秆, 均采自浙江省临安市浙江农林大学平山实验农场 (北纬 30.23°、东经 119.72°), 斑茅和芒的采收期为 12 月份, 玉米秸秆采收期为 7 月份 (播种至青穗采收约 65 d)。实验采用了地上

部分的整株植物, 将其切割成约 1~2 cm 长条状, 40 °C 烘干至含水率低于 15%, 用 FZ102 微型植物粉碎机粉碎成 50~100 目的粉末。经混合均匀后采用水分分析仪 MA35 (赛多利斯) 测得其含水率, 并用塑料袋密封后置 -20 °C 冰箱中存放备用。

用于高效液相色谱 (HPLC) 分析的葡萄糖、木糖等标准品均采购自 Sigma-Aldrich 公司, 纯度为 99% 以上。

添加的水解酶为纤维素酶 (Novozyme NS50013)、 β -葡萄糖苷酶 (Novozyme NS50010) 及木聚糖酶 (山东泽生生物科技有限公司)。

1.2 方法

实验分析方法参照了美国的国家可再生能源实验室 (National renewable energy laboratory, NREL) 制订的实验规程 (Laboratory analytical procedure, LAP), 部分实验在相关规程上有适当改进 (见下述方法表述)。

1.2.1 组分含量测定

生物质中碳水化合物和酸不溶性木质素 (Klason 木质素) 的含量采用酸水解法测定, 碳水化合物组分由 LAP002 确定, 酸不溶性木质素由 LAP003 测定。LAP002 和 LAP003 均采用酸解法, 可以在一次实验中完成。

酸水解的具体步骤是先准确称量已知含水率并去除抽提物的生物质原料约 0.3 g, 加入 72% 硫酸 3 mL, 在 30 °C 水浴中保持 2 h, 加去离子水 84 mL (稀释至 4% 硫酸), 放入灭菌锅中 121 °C 保持 1 h。经真空过滤后将滤纸上的固形物烘干至恒重, 用 HPLC 法 (色谱分析柱为 Aminex HPX-87H 醇酸柱, 美国 Bio-Rad 生产) 测定各种单糖的浓度, 并计算出葡聚糖(纤维素)、木聚糖、

阿拉伯聚糖等含量,由滤纸上的固形物质量确定不溶性木质素含量。

灰分测定采用 LAP005 规程,称量 1 g 左右已知含水率的原料,将其放入已测定质量的有盖陶瓷坩锅中,置入箱式电阻炉中程序缓慢升温,约 2 h 升后至 575 °C,保持此温度 4 h 以上。冷至室温前将坩锅放入干燥器,称量质量并计算灰分。

1.2.2 LAT 法预处理

LAT 法预处理:根据生物质原料与液氨的比例将确定量的液氨注入称量小钢瓶,将待处理的已知含水率的原料放入反应器(高压反应釜)中,加热小钢瓶至 50 °C~60 °C,然后将氨注入反应器,加热反应器到预定温度(约加热 10~30 min,视加热器的功率与预定温度而定),然后保留一定的时间后控制在预定温度,而后氨被缓慢释放(释放时间约 30 s)。取出处理后的原料置于通风柜中室温干燥 12 h 左右或烘箱中低于 45 °C 干燥。称重并测得含水率,计算预处理后生物质原料得率,将处理后的原料放入 -20 °C 冷藏备用。

液氨预处理优化的工艺参数选择分别为:预处理的温度、含水率、驻留时间以及液氨与生物质的比例等。

1.2.3 酶水解

酶水解参照 LAP009 的相关规程进行,反应量由原来的 10 mL 提高到 15 mL。称取 0.15 g 葡聚糖当量的生物质放入酶解瓶(20 mL 样品瓶),预处理后的原料中葡聚糖含量视同未作预处理原料。依次加入蒸馏水、柠檬酸钠缓冲溶液(平衡后 pH 值为 4.8)、抗生素(四环素和环己酰亚胺),经预混合 1 h 后添加纤维素酶、β-葡萄糖苷

酶、及木糖酶(有的实验组未添加)。纤维素酶的添加量为 15 FPU/(g 当量葡聚糖)、β-葡萄糖苷酶 64 pNPGU/g。酶解条件是温度设定为 50 °C,摇床转速为 150 r/min。酶解取样时间分别为 24 h、72 h 和 144 h。

酶解取样 1 mL 放入离心管,放置加热器(设置温度 99 °C)中加热 20 min,使酶蛋白变性失效,放入 -20 °C 冰箱冷却 5 min,放入离心机(艾本德 5424,设置转速 14 500 r/min)离心 5 min,经 0.22 μm 一次性针头过滤器过滤(聚醚砜膜)后转入 HPLC 分析瓶,放入 5 °C 或 -20 °C 冷藏待分析。

1.2.4 单糖的测定

酶解液或酸解液中的单糖定量分析采用 HPLC 法,色谱仪为 Agilent Technologies 1200 Series(安捷伦公司,带自动进样器 G1329A),采用示差折光检测器检测。检测酸解液和发酵液采用 BioRad 公司的 HPX-87H 色谱柱,流动相为 0.005 mol/L 稀硫酸,流速为 0.60 mL/min,柱温为 50 °C。

1.2.5 酶解率计算

酶解率为实际获得单糖含量与原料中同类单糖含量之比(或同类聚糖之比),以葡聚糖的酶解率为例,其计算公式是:

$$d = \frac{g \times 15 / 1\,000 \times 162 / 180}{0.375 \times c / 100} \times 100$$

酶解率 d 为百分数,式中分子为酶解所获得葡萄糖含量折算成葡聚糖的量,其中 g 为酶解液中葡萄糖的含量(单位为 g/L);分母为理论上加入的葡聚糖量, c 为原料成分分析(酸解法)葡聚糖含量百分数,0.375 为加入酶解瓶中的干基生物质原料质量。

2 结果与分析

2.1 原料组分分析

表 1 给出了斑茅和五节芒的组分比较 (原料经 95%乙醇索氏抽提 24 h)。斑茅中的葡聚糖 (纤维素) 含量为 42.88%、木聚糖含量为 22.83%，两者合计 65.71%；五节芒中的葡聚糖 (纤维素) 含量为 43.70%、木聚糖含量为 22.22%，两者合计 65.92%。上述分析可知斑茅与五节芒的组分非常接近。

2.2 预处理温度对酶解单糖得率的影响

预处理温度对酶解率的影响如图 1 所示，横坐标为预处理温度 (untreated 表示未经预处理)，即预处理加热到此温度下并保留一定时间的温度 (实验过程中温度波动范围为 ± 5 °C)；纵坐标为葡聚糖/木聚糖的转化率。其他预处理条件为含水率 80%、预处理驻留时间为 10 min、液氨与原材料比例为 2:1。结果表明，在 70 °C~170 °C 范围内，葡聚糖的酶解转化率随着预处理温度升高而增加，至 130 °C 时达到最大值，而后随温度升高略有下降，130 °C 时 72 h 取样的酶解率为 65.80%，与未经预处理的 10.31% 相比提高了 5.38 倍。木聚糖的酶解转化率随温度变化趋势与葡聚糖相似，也在温度为 130 °C 时达到最高值。未经处理原料的木聚糖转化率为 7.01%，温度为

130 °C 时的木聚糖转化为 81.07%，提高了 10.56 倍。酶解 144 h 时葡聚糖和木聚糖转化率分别为 74.40% 和 85.44% (图中未表示)。随着预处理温度的继续提高，葡聚糖和木聚糖转化率均无明显变化。Murnen 等^[15]采用 AFEX 预处理芒 (奇冈) 的实验结果中 72 h 葡聚糖转化率未超过 70%，此实验结果的转化率略高。国外学者以玉米秸秆为原料，采用 ARP 法预处理，纤维素酶的添加量为每克葡聚糖 15 FPU/(g 当量葡聚糖)，72 h 的葡聚糖转化率为 88.5%^[9]。经对 LAT 法预处理后的木质素含量分析，130 °C 实验条件下预处理后原料的酸不溶性木质素比未经预处理的原料下降 13.75%，这是酶解效果提高的一个原因。Rollin 等研究认为提高纤维素的可及性比移除木质素更为重要^[20]，表面结构与纤维素结晶度改变情况有待进一步研究。

2.3 预处理含水率控制对酶解单糖得率的影响

预处理前原料的含水率对预处理效果有一定的影响，实验通过添加水来控制原料预处理时的含水率。将温度控制在优化温度 130 °C，原料含水率对酶解率的影响如图 2 所示，实验中的含水率为水分与干基物料比值。结果表明，随着含水率升高，转化率上升，当含水率为 80%~100% 时，葡聚糖的酶解转化率较高，72 h 取样的酶解

表 1 生物质的组分分析 (干基)

Table 1 Compositional analysis (dry basis) of biomass

Components	<i>Saccharum arundinaceum</i>	<i>Miscanthus floridulus</i>	Corn stover
Glucan (Cellulose)	42.88 \pm 1.58	43.70 \pm 0.23	34.42 \pm 2.01
Xylan	22.83 \pm 0.14	22.22 \pm 0.04	21.79 \pm 1.11
Klason lignin	24.50 \pm 0.42	22.97 \pm 0.15	17.78 \pm 0.30
Ash	5.19 \pm 0.10	6.67 \pm 0.08	9.23 \pm 0.21

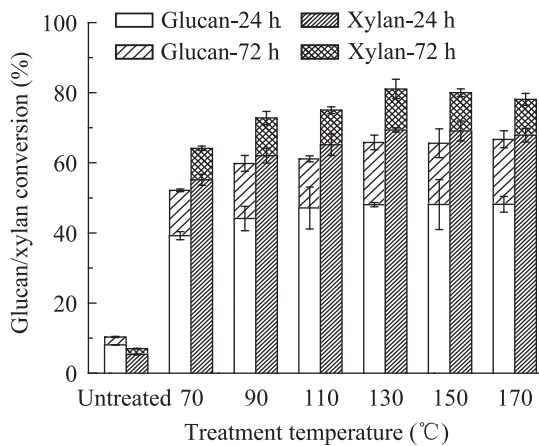


图1 不同温度下斑茅中葡聚糖/木聚糖的酶解转化率
Fig. 1 Effects of temperature on glucan and xylan conversion of LAT treated *Saccharum arundinaceum*. The treatment condition (fixed) was at 80% moisture content (dwb), 2:1 ammonia loading and 10 min residence time. The cellulase loading was 15 FPU/(g of glucan), and the enzymatic hydrolysis time was 24 h and 72 h.

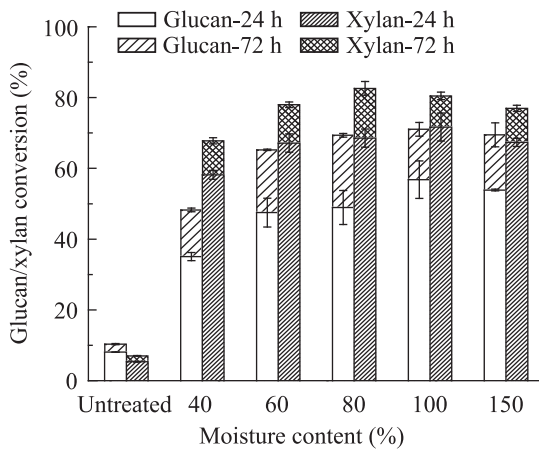


图2 不同含水率下斑茅中葡聚糖/木聚糖的酶解转化率

Fig. 2 Effects of moisture content on glucan and xylan conversion of LAT treated *Saccharum arundinaceum*. The treated condition (fixed) was at 130 °C, 2:1 ammonia loading and 10 min residence time. The Cellulase loading was 15 FPU/(g of glucan), and the enzymatic hydrolysis time was 24 h and 72 h.

率分别为 69.34% 和 71.04% (因预处理批量与酶解批量不同, 相同预处理条件下, 酶解率略有差异), 与未经预处理的 10.31% 相比分别提高了 573% 和 1 056%。未经处理的木聚糖转化率为 7.01%, 经 LAT 预处理后木聚糖转化率显著提高, 在含水率控制为 80% 时为 82.60%, 木聚糖转化率比未经预处理的提高了 10.78 倍。实验显示预处理的含水率控制为 80%, 酶解 144 h 时, 葡聚糖和木聚糖的酶解率分别为 73.98% 和 83.39%。

2.4 驻留时间对酶解单糖得率的影响

将温度控制在 130 °C、含水率为 80%、液氨与原料比例为 2 : 1 时, 以驻留时间分别为 5 min、10 min、15 min 对照试验, 对酶解率的影响如图 3 所示。在 10 min 内, 酶解率随着预处理驻留时间增加而提升, 而预处理时间继续增加时, 酶解

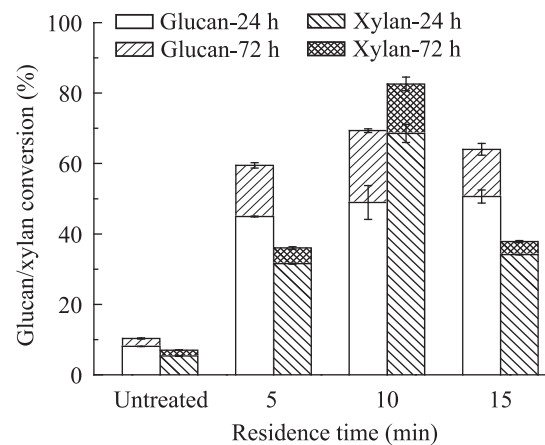


图3 不同驻留时间下斑茅中葡聚糖/木聚糖的酶解转化率

Fig. 3 Effects of residence time on glucan and xylan conversion of LAT treated *Saccharum arundinaceum*. The treated condition (fixed) was at 130 °C, 80% moisture content and 2:1 ammonia loading. The cellulase loading was 15 FPU/(g of glucan), and the enzymatic hydrolysis time was 24 h and 72 h.

率下降。10 min 左右对葡聚糖和木聚糖均有较好的酶解转化率, 分别为 69.34% 和 82.60%。随着预处理时间加长, 可能是聚糖或单糖分解导致酶解率下降, 葡萄糖得率下降较缓慢, 而木糖得率快速下降。

2.5 液氨和生物质比例对酶解单糖得率的影响

将优化后的因素 (130 °C、80% 含水率、10 min) 液氨与生物质比例 (干基) 按照质量比 0.5 : 1、1 : 1、2 : 1、3 : 1 进行对照实验, 结果如图 4 所示。当液氨比例升高时, 葡聚糖转化率上升, 2 : 1 以上增加趋缓; 木聚糖的酶解转化率在 2 : 1 时达到最高值, 随着氨用量提高, 木糖得率下降明显。文献指出农作物秸秆类原料最佳氨用量比例为 1 : 1^[11-14], 斑茅与之不同, 结果显示优化条件与生物质种类有显著的相关性。

2.6 质量平衡与预处理效果比较

预处理与酶解的质量平衡流程如图 5 所示。在前述预处理优化条件 (预处理温度 130 °C、含水率 80%、驻留时间为 10 min、液氨与生物质比例为 2 : 1), 纤维素酶添加量为 15 FPU/(g 当量

葡聚糖), 100 g 干基斑茅经 72 h 酶解后可获得单糖 54.47 g, 而未作预处理的单糖获得量为 6.73 g, 转化率提高了 8.09 倍。Vanderghem 等采用甲酸/乙酸混合液对芒草在 107 °C 处理 3 h, 其最高酶

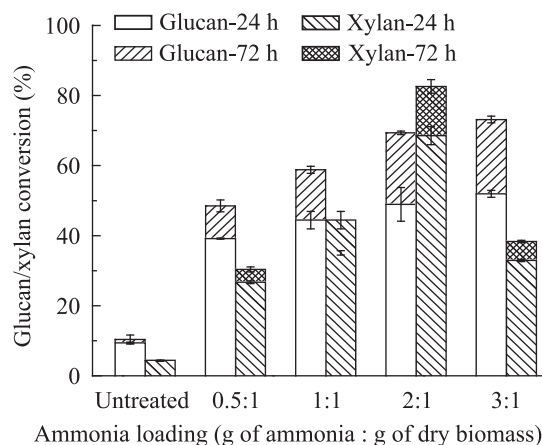


图 4 液氨与生物质不同比例下斑茅中葡聚糖/木聚糖的酶解转化率

Fig. 4 Effects of ammonia loading on glucan and xylan conversion of LAT treated *Saccharum arundinaceum*. The treated condition (fixed) was at 130 °C, 80% moisture content and 10 min residence time. The cellulase loading was 15 FPU/(g of glucan), and the enzymatic hydrolysis time was 24 h and 72 h.

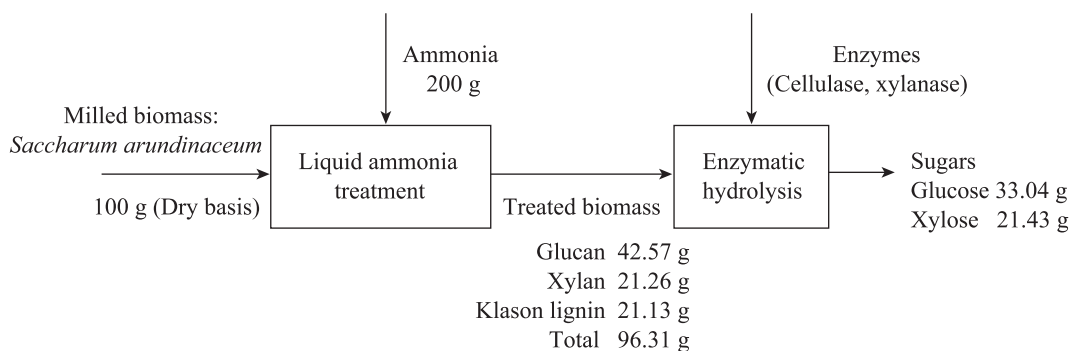


图 5 斑茅液氨预处理与酶解过程质量平衡流程图

Fig. 5 Flow chart of mass balance during pretreatment and hydrolysis process for *Saccharum arundinaceum*. The LAT pretreatment condition was at 130 °C, 80% moisture content, 2:1 ammonia loading and 10 min residence time. The cellulase loading was 15 FPU/(g of glucan), and the enzymatic hydrolysis time was 24 h and 72 h.

解转化率达 75.3%^[21], 酶解效果与 LAT 法相近。Sorensen 等采用稀酸预浸/湿爆法对芒草进行预处理^[22], 预处理后的芒草酶解的葡萄糖、木聚糖的最高得率分别为 63.7% 和 82.4%。本试验的 LAT 法预处理斑茅的酶解得率为 69.34% 和 82.65%, 说明 LAT 法预处理对斑茅的酶解促进效果更好。

3 结论

通过对斑茅的 LAT 法预处理、酶解过程的试验研究, 得到如下结论。斑茅与芒在化学组分上比较接近, 其预处理效果与芒有较大的可比性。液氨预处理能显著提高斑茅原料的单糖转化率, 通过优化预处理条件比未经预处理的原料的单糖获得量提高到 8 倍。预处理效果优于稀酸预浸/湿爆法, 与酸预处理、氨爆法 (AFEX) 处理效果接近。

斑茅采用 LAT 法预处理的优化条件是: 温度为 130 °C、含水率 80%、驻留时间为 10 min、液氨与生物质比例为 2 : 1 时, 在纤维素酶添加量为 15 FPU/(g 当量葡聚糖) 时, 葡萄糖和木糖的 72 h 酶解转化率分别为 69.34% 和 82.65%, 相比于未作预处理的原料分别提高了 573% 和 1 056%, 预处理显著地提升了酶解效率。

REFERENCES

- [1] Wang M, Wu M, Huo H. Life-cycle energy and greenhouse gas emission impacts of different corn ethanol plant types. *Environ Res Lett*, 2007, 2(2): 9–22.
- [2] Yan LZ, Zhang L, Wang SQ, et al. Potential yields of bio-ethanol from energy crops and their regional distribution in China. *Trans Chin Soc Agric Engin*, 2008, 24(5): 213–216 (in Chinese).
- [3] Liang XZ. Genetic diversity and evaluation of biomass energy of *Erianthus arundinaceum* (Retz.) JeSWiet[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University, 2011 (in Chinese).
梁绪振. 斑茅种质资源遗传多样性及生物质能潜力评估[D]. 雅安: 四川农业大学, 2011.
- [4] Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, et al. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 2007, 315(5813): 804–807.
- [5] Gross AS, Chu JW. On the molecular origins of biomass recalcitrance: the interaction network and solvation structures of cellulose microfibrils. *J Phys Chem B*, 2010, 114 (42): 13333–13341
- [6] Mosier N, Wyman C, Dale B, et al. Features of promising technologies for pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresour Technol*, 2005, 96(6): 673–686.
- [7] Geddes CC, Nieves IU, Ingram LO. Advances in ethanol production. *Curr Opin Biotech*, 2011, 22(3): 312–319.
- [8] Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, et al. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res*, 2009, 48 (8): 3713–3729
- [9] Kim TH, Lee YY. Pretreatment and fractionation of corn stover by ammonia recycle percolation process. *Bioresour Technol*, 2005, 96(18): 2007–2013.
- [10] Kim TH, Lee YY, Sunwoo C, et al. Pretreatment of corn stover by low-liquid ammonia recycle percolation process. *Appl Biochem Biotechnol*, 2006, 133(1): 41–57.
- [11] Kim TH, Lee YY. Pretreatment of corn stover by soaking in aqueous ammonia. *Appl Biochem Biotechnol*, 2005, 121–124: 1119–1131.
- [12] Yoo CG, Nghiem NP, Hicks KB, et al. Pretreatment of corn stover using low-moisture anhydrous ammonia (LMAA) process. *Bioresour*

- Technol, 2011, 102(21): 10028–10034.
- [13] Teymouri F, Laureano-Perez L, Alizadeh H, et al. Optimization of the ammonia fiber explosion (AFEX) treatment parameters for enzymatic hydrolysis of corn stover. *Bioresour Technol*, 2005, 96(18): 2014–2018.
- [14] Zhong C, Lau MW, Balan V, et al. Optimization of enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation from AFEX-treated rice straw. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(4): 667–676.
- [15] Li BZ, Balan V, Yuan YJ, et al. Process optimization to convert forage and sweet sorghum bagasse to ethanol based on ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment. *Bioresour Technol*, 2010, 101(4): 1285–1292.
- [16] Shao QJ, Chundawat SP, Krishnan C, et al. Enzymatic digestibility and ethanol fermentability of AFEX-treated starch-rich lignocellulosics such as corn silage and whole corn plant. *Biotechnol Biofuels*, 2010, 3(1): 12.
- [17] Murnen HK, Balan V, Chundawat SP, et al. Optimization of ammonia fiber expansion (AFEX) pretreatment and enzymatic hydrolysis of *Miscanthus × giganteus* to fermentable sugars. *Biotechnol Prog*, 2007, 23(4): 846–850.
- [18] Alizadeh H, Teymouri F, Gilbert TI, et al. Pretreatment of switchgrass by ammonia fiber explosion (AFEX). *Appl Biochem Biotech*, 2005, 124(1): 1133–1141.
- [19] Garlocka RJ, Balana V, Dale BE, et al. Comparative material balances around pretreatment technologies for the conversion of switchgrass to soluble sugars. *Bioresour Tech*, 2011, 102(24): 11063–11071.
- [20] Rollin JA, Zhu ZG, Sathitsuksanoh N, et al. Increasing cellulose accessibility is more important than removing lignin: a comparison of cellulose solvent-based lignocellulose fractionation and soaking in aqueous ammonia. *Biotech Bioengin*, 2011, 108(1): 22–30.
- [21] Vanderghem C, Brostaux Y, Jacquet N, et al. Optimization of formic/acetic acid delignification of *Miscanthus × giganteus* for enzymatic hydrolysis using response surface methodology. *Ind Crop Prod*, 2012, 35(1): 280–286.
- [22] Sørensen A, Teller PJ, Hilstrom T, et al. Hydrolysis of *Miscanthus* for bioethanol production using dilute acid presoaking combined with wet explosion pre-treatment and enzymatic treatment. *Bioresour Technol*, 2008, 99(14): 6602–6607.

(本文责编 陈宏宇)