

李栋梁,舒月力,韩琳洁,等. 表面活性剂对汽爆小麦秸秆高固体含量酶解的影响[J]. 江苏农业科学,2020,48(3):266-272.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.03.048

表面活性剂对汽爆小麦秸秆高固体含量酶解的影响

李栋梁,舒月力,韩琳洁,田亚东,刘正,贾士儒,钟成
(天津科技大学生物工程学院/工业发酵微生物教育部重点实验室,天津 300457)

摘要:以蒸汽爆破预处理(2.2 MPa,6 min)的小麦秸秆(SEPW)作为原料,对其进行高固体含量酶解。经过一系列的单因素试验及双因素正交试验,发现添加表面活性剂聚乙二醇 6000(PEG6000)使 SEPW 的酶解效率在低纤维素酶添加量下有明显提高。在反应体系为 30 g、葡聚糖添加量为 10%、纤维素酶添加量为 10 FPU/g 葡聚糖时,SEPW 的葡聚糖及木聚糖转化率分别达到 54.43%、52.63%,相比于对照组的 45.79%、22.75%,分别提高 18.87%、131.34%。

关键词:小麦秸秆;蒸汽爆破预处理;酶解;表面活性剂;高固体含量

中图分类号: S188+.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)03-0266-07

小麦秸秆产量丰富,但是利用效率极低,现阶段主要通过粉碎还田、喂养牲畜及堆肥发酵进行处理^[1-14]。随着科技进步,新型的物理、化学及生物预处理技术给高效利用这种高产量的生物质能源提供了便利。如微波粉碎预处理、热水预处理、蒸汽爆破(汽爆)预处理、碱处理、酸处理、生物预处理及综合预处理等^[2]。蒸汽爆破预处理被广泛应用于生物质预处理,其具有不产生废弃物、无需额外添加化学试剂、预处理成本低、环境友好等特点。

经过汽爆预处理后小麦秸秆的表面结构被破坏,极大提高了纤维素酶与纤维素的结合效率^[4]。研究如何减少纤维素酶用量及提高纤维素酶利用率,从而降低酶解过程的成本,一直以来受到极大关注^[5]。

目前大多数研究表明,表面活性剂主要通过降低木质素对纤维素酶的无效吸附,提高纤维素酶的酶解效果^[6]。本试验通过研究表面活性剂聚乙二醇 6000(PEG6000)对汽爆小麦秸秆酶解的影响^[13-16],并通过一系列的单因素试验及正交试验优化摇瓶酶解的条件^[17-21],从而提高高固体含量汽爆小麦秸秆的酶解效率^[15],以为高固体含量下生物质糖化发酵成本的降低做出贡献^[7-9]。

收稿日期:2018-12-28

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(编号:201503135-15)。

作者简介:李栋梁(1994—),男,河南漯河人,硕士研究生,主要从事木质纤维素预处理及糖化发酵研究。E-mail: lidongliangA@163.com。

通信作者:钟成,博士,教授,博士生导师,主要从事纤维素的生物合成代谢与降解机理研究。E-mail: czhong@tust.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 试验材料、主要仪器及试剂

小麦秸秆采自河北省沧州市沧县。纤维素酶

[2]项学敏,宋晨,周集体,等. 人工湿地水处理技术研究进展存在问题与改进[J]. 环境科学与技术,2006,29(10):101-102,114.

[3]陈进树. 国内生态浮床研究进展[J]. 安徽农学通报,2017,23(1):21-23.

[4]王俭,吴阳,王晶彤,等. 生态浮床技术研究进展[J]. 辽宁大学学报(自然科学版),2016,43(1):50-55.

[5]王国芳,汪祥静,吴磊,等. 组合型生态浮床中各生物单元对污染物去除的贡献及净化机理[J]. 土木建筑与环境工程,2012,34(4):136-141.

[6]李伟,李先宁,曹大伟,等. 组合生态浮床技术对富营养化水源水质的改善效果[J]. 中国给水排水,2008,24(3):34-38.

[7]曹文平,王冰冰. 生态浮床的应用及进展[J]. 工业水处理,2013,33(2):5-9.

[8]汪银梅,殷红桂,唐子夏,等. 不同基质的浮床对浮床植物及废水脱氮效果的影响[J]. 工业安全与环保,2017,43(3):88-91,98.

[9]梁冬. 椰棕丝中纤维素及木质素含量的测定方法[J]. 轻纺工业与技术,2014,169(4):127-128.

[10]李宏钧,孔亚平,张岩,等. 植物纤维毯对道路边坡微生境的影响[J]. 公路交通科技,2016,33(6):146-151.

[11]陈敏娇. 畜禽养殖污水植物净化与资源化利用研究[D]. 杭州:浙江大学,2007.

[12]丁冬梅. 利用泥鳅对重金属富集的现象来指示河流污染变化程度的研究[J]. 江苏环境科技,2007,20(2):31-32.

[13]范子红,刘超翔,于鑫,等. 溶氧状况对美人蕉根系特征和畜禽废水处理效果的影响[J]. 土木建筑与环境工程,2011,33(1):124-128.

(19.89 FPU/mL)由湖南尤特尔生化有限公司友情提供。

主要仪器:台式连续投料粉碎机(DF-15),购自温岭市林大机械有限公司;电子天平(FA2004)、分析天平(JH1102)、pH计(PHSJ-4A)等,均购自上海精密科学仪器有限公司;水分仪(MJ33),购自梅特勒-托利多;蒸汽爆破设备(QBS-200B),购自鹤壁市正道生物能源有限公司;摇床(ZWYR-D2401),购自上海智城分析仪器制造有限公司;真空泵[SHZ-D(Ⅲ)],购自巩义市予华仪器有限责任公司;红外激光成像系统(Odyssey),购自美国LI-COR公司;电热鼓风干燥箱(DH-101)、电热恒温干燥箱(DH-204),均购自天津市中环实验电炉有限公司;高速冷冻离心机(CR22G),购自日本日立公司;台式高速离心机(TGL-16G),购自上海医用分析仪器厂;恒温水浴锅(HH-2),购自常州市凯航仪器有限公司;扫描电镜(JSM-6360),购自日本电子株式会社(JEOL)。

主要试剂:氢氧化钠,购自天津市化学试剂一厂;酒石酸钾钠、盐酸,均购自天津市北方天医化学试剂厂;浓硫酸,购自国药集团化学试剂有限公司;十二烷基磺酸钠,购自生工生物工程(上海)股份有限公司;柠檬酸、柠檬酸钠、木糖,均购自上海阿拉

丁生化科技股份有限公司;叠氮化钠,购自北京索莱宝科技有限公司;葡萄糖、木聚糖酶,均购自Sigma公司;阿拉伯糖,购自VETEC公司;微晶纤维素、蛋白测定试剂盒,均购自天津鼎国生物技术有限责任公司。

1.2 试验方法

1.2.1 小麦秸秆预处理 小麦秸秆剪切至2~3 cm长的小段,备用。蒸汽爆破设备为5 L的反应釜,每次加入秸秆200 g,设定处理时间为6 min,处理压力为2.2 MPa。蒸汽爆破后收集物料用去离子水清洗至中性,晾干粉碎过40目筛,4℃保存。

1.2.2 纤维素酶活性测定 纤维素酶活性采用二硝基水杨酸(DNS)法^[8]进行测定。

1.2.3 酶解 将经预处理的小麦秸秆粉末加入到100 mL的三角瓶中,加入pH值为4.8的柠檬酸钠缓冲液,反应条件为50℃、220 r/min振荡培养(本研究中除非特定说明,反应体系、葡聚糖添加量、纤维素酶添加量分别为20 g、10%、10 FPU/g葡聚糖)。酶解反应120 h,反应结束后,4℃、12 000 r/min离心10 min。取上清,通过高效液相色谱法测定葡萄糖、木糖的含量^[11]。正交试验因素水平见表1。

表1 预处理的小麦秸秆酶解正交试验因素水平

因素	水平				
	1	2	3	4	5
A:纤维素酶添加量(FPU/g 葡聚糖)	10	15	20	25	30
B:反应体系(g)	20	25	30	35	40
C:PEG6000 添加量(Ws/W)	0	0.01%	0.05%	0.10%	0.50%

注:Ws为表面活性剂质量,g;W为总反应体系质量,g。

1.2.4 成分分析 纤维素原料的化学成分分析采用美国国家能源部可再生能源实验室(NREL)的试验方法。

1.2.5 扫描电镜分析 扫描电镜观察预处理前后及酶解过程中纤维素底物的表面结构。样品观察前先喷金处理,电压为5 kV。

1.2.6 X射线衍射仪分析 用X射线衍射方法分析预处理前后及酶解过程中纤维素底物的纤维素结晶度的变化规律,在 $2\theta = 10^\circ \sim 40^\circ$ 范围内扫描,变化速率为 $2^\circ/\text{min}$ 。结晶度计算公式如下:

$$\text{结晶度} = \frac{I_{002} - I_{\text{am}}}{I_{002}} \times 100\%$$

式中: I_{002} 为002衍射晶面 $2\theta = 22.8^\circ$ 的强度; I_{am} 为

$2\theta = 18.0^\circ$ 散射峰的强度。

1.3 数据分析

数据作图均采用Origin 9.0制图软件。

2 结果与分析

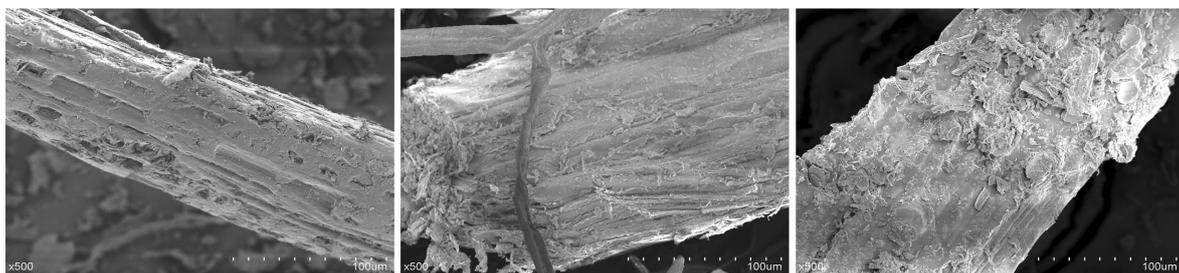
2.1 预处理前后小麦秸秆主要成分变化

多次称量可知,固体平均回收率为39.47%,根据表2计算得出,葡聚糖回收率为76.21%,木聚糖回收率为19.70%,木质素回收率为53.37%,说明汽爆预处理小麦秸秆(SEPW)能够去除大量半纤维素及木质素,并对纤维素有一定的破坏作用。从表2可以看出,经汽爆预处理后,小麦秸秆的葡聚糖及木质素含量升高,但木聚糖含量降低,原因在于木

聚糖及其他物质如水溶性物质及小分子物质等在汽爆过程中被去除,因此导致葡聚糖及木质素的含量有所上升。大量研究表明,木质素及半纤维素的存在会对纤维素的酶解产生负面影响^[9]。

表2 蒸汽爆破处理前后小麦秸秆成分变化

处理	葡聚糖含量 (%)	木聚糖含量 (%)	木质素含量 (%)
未处理小麦秸秆(UW)	24.33	10.80	29.08
汽爆预处理小麦秸秆(SEPW)	46.98	5.39	39.32



a. 未处理的小麦秸秆(UW)

b. 蒸汽爆破预处理的小麦秸秆(SEPW)

c. 酶解后汽爆小麦秸秆(ESEPW)

图1 蒸汽爆破预处理前后小麦秸秆电镜图像

2.3 预处理及酶解前后小麦秸秆结晶度变化

如图2所示,通常天然纤维素(纤维素I)的结晶区具有4个特征峰,分别为101、10 $\bar{1}$ 、002、004,其中101峰和10 $\bar{1}$ 峰的布拉格角分别为14.3°、16.8°,002峰的布拉格角为22.3°,004峰的布拉格角为34.7°,无定型纤维素特征峰的布拉格角为18.7°。从图2中可以看出,蒸汽爆破预处理的小麦秸秆(SEPW)和酶解后汽爆小麦秸秆(ESEPW)的101结晶峰的形状变得尖锐,002结晶峰的形状变得平缓,通过计算得知蒸汽爆破预处理的小麦秸秆(SEPW)和酶解后汽爆小麦秸秆(ESEPW)纤维素结晶度分别为47.80%、46.54%,而未处理的小麦秸秆的结晶度为36.47%(表3)。这说明与未处理的样品相比,蒸汽爆破预处理的小麦秸秆(SEPW)的纤维素结晶度增大了,这可能是由于预处理过程对小麦秸秆中其余组分如木聚糖、水提物的去除造成的。

2.4 补料时间对汽爆小麦秸秆(SEPW)酶解的影响

补料策略如下:初始加入底物小麦秸秆总量的40%,随后2次补料分别添加底物总量的30%,共4种补料策略,分别为(6,12)、(6,18)、(6,24)、(12,24)h,括号中为补料时间。从图3中可以看出,(6,12)h的补料策略下,SEPW的酶解效率略高于其他的补料策略,这可能是由于补料间隔较长时,酶解产物葡萄糖会对酶解产生较强抑制。所以选取

2.2 预处理及酶解前后小麦秸秆表观形态变化

如图1所示,未处理的小麦秸秆表面平整光滑,纤维排列规则有序,物理结构致密(图1-a)。在蒸汽爆破预处理后,小麦秸秆的微观结构有了较大的变化,致密的物理结构消失,结构变得疏松,纤维呈无规则排列,细胞内部纤维外露(图1-b),说明蒸汽爆破破坏了纤维素链之间的氢键网络,使纤维素链呈散乱排列。

(6,12)h作为最佳的补料时间。

2.5 反应体系总质量对SEPW酶解的影响

从图4中可以看出,随着反应体系总质量的增大,葡聚糖转化率先升高后降低,在反应体系总质量为30g时达到最高,为49.46%,相比反应体系总质量为20g的46.41%,增长6.57%。笔者认为,在高固体含量的木质纤维素酶解中,反应体系总质量为30g时,能量损失最低,混合效率最高。

2.6 纤维素酶添加量对SEPW酶解的影响

从图5可以看出,随着纤维素酶添加量的增加,葡聚糖及木聚糖的转化率均在增加,在30FPU/g葡聚糖的酶添加量后,基本趋于平缓。在纤维素酶添加量增加到50FPU/g葡聚糖时,转化率并没有明显增长(60.11%),这与何珣等的研究结果^[15]相似。从图6可以看出,纤维酶添加量的变化过程中,葡聚糖与木聚糖的转化率具有很强的相关性。因此不考虑成本,纤维素酶添加量为50FPU/g葡聚糖时,葡聚糖转化率最高。

2.7 葡聚糖添加量对SEPW酶解的影响

当纤维素酶添加量为10FPU/g葡聚糖时,从图7可以看出,随着葡聚糖添加量的增加,葡聚糖转化率呈先上升后下降的趋势,当葡聚糖的添加量为5%时达到最大。为满足精馏分离的经济性要求,乙醇发酵液的浓度须>4%(质量体积比)。为满足该乙醇浓度的要求,糖的总浓度需要高于8%(质量体

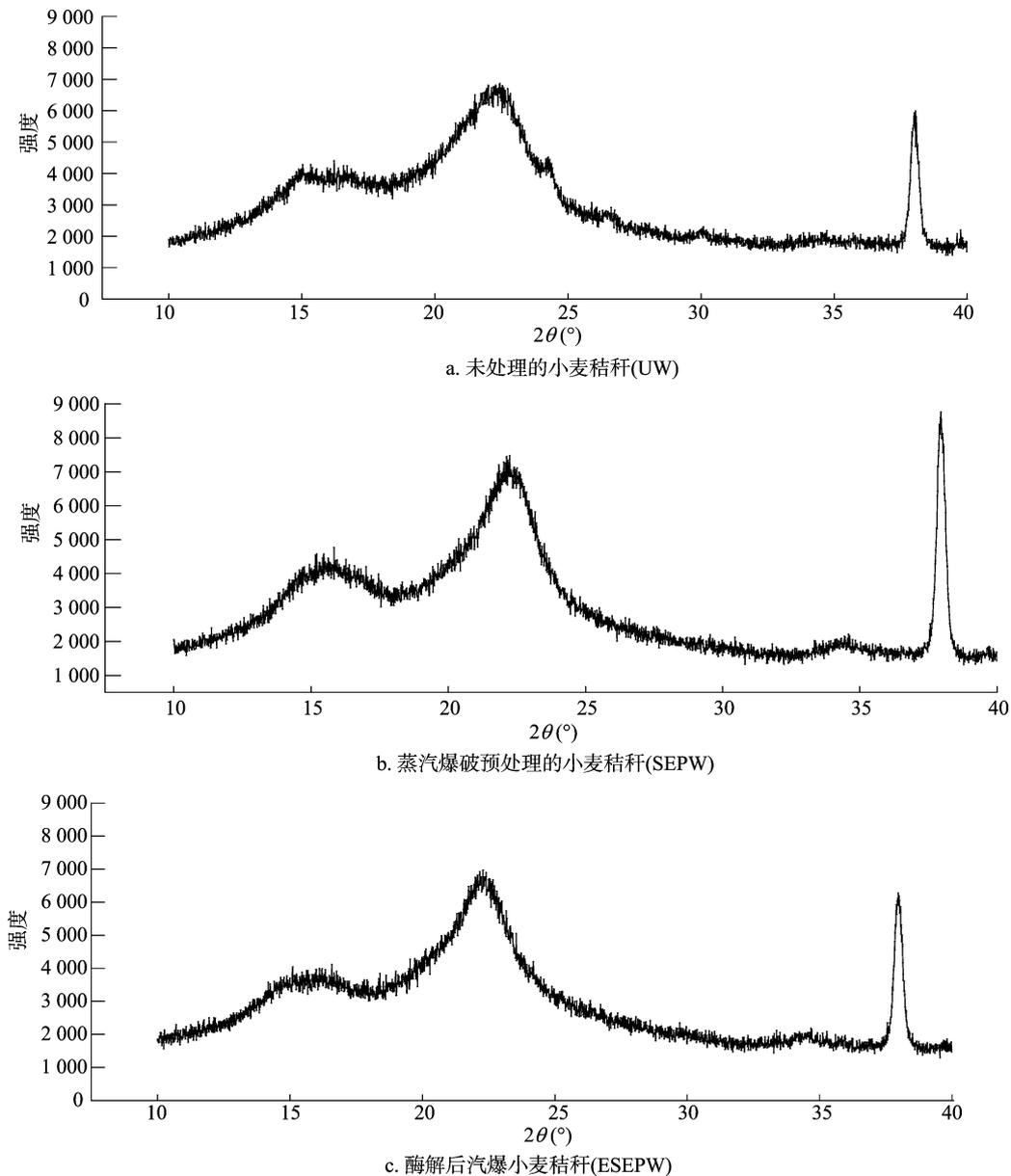


图2 蒸汽爆破预处理前后小麦秸秆 X 射线衍射图

表 3 纤维素结晶度

样品	纤维素结晶度(%)
未处理小麦秸秆	36.47 ± 1.32
蒸汽爆破预处理小麦秸秆	47.80 ± 2.81
酶解后汽爆小麦秸秆	46.54 ± 2.42

注:数值为均值 ± 相对标准偏差。

积比)^[22]。但高固体含量酶解时反应体系会存在无法液化的严重问题,这种问题会使酶与底物无法混合均匀,进而严重影响酶解效率。本研究发现,当葡聚糖添加量为 11% 时,液化时间延迟的现象出现。因此,本研究选取葡聚糖添加量为 10% 作为底物添加量。

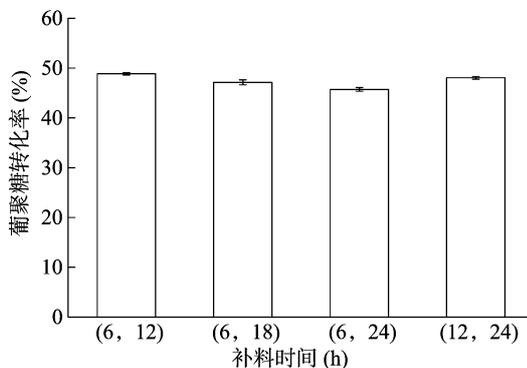


图3 补料时间对汽爆小麦秸秆葡聚糖转化率的影响

从图 8 可以看出,在不同的葡聚糖添加量时,葡

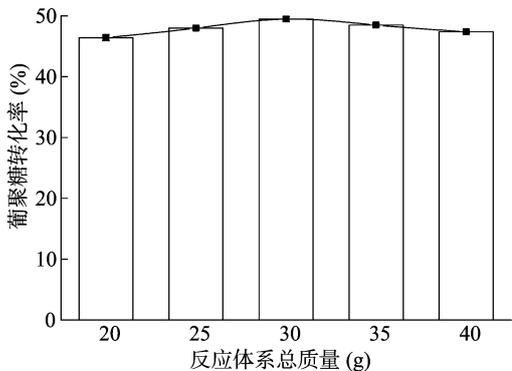


图4 反应体系总质量对 SEPW 葡聚糖转化率的影响

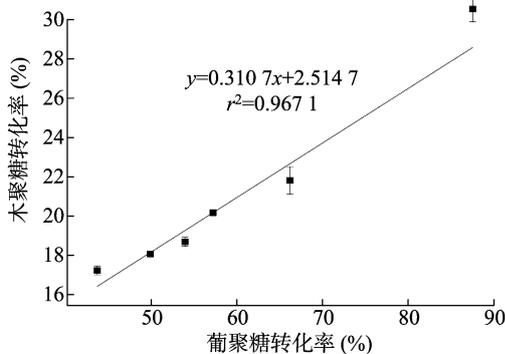


图8 葡聚糖转化率与木聚糖转化率的相关性

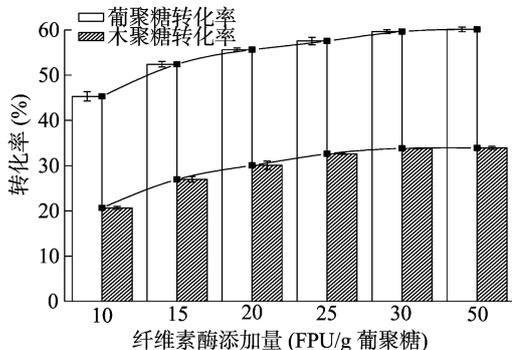


图5 纤维素酶添加量对 SEPW 聚糖转化率的影响

2.8 表面活性剂种类对 SEPW 酶解的影响

从图9可以看出,PEG6000对汽爆小麦秸秆葡聚糖转化率有较明显的影响,相对于不添加表面活性剂的对照组,葡聚糖转化率增加8.62%。有研究指出,表面活性剂会通过提高酶的活性进而提高降解效率^[23]。但在本研究中,当底物是微晶纤维素时,表面活性剂的加入并没有改变酶解效率(图10)。另一种观点认为在木质纤维素的酶解过程中,表面活性剂的加入能降低木质素与纤维素酶的无效吸附,从而增加纤维素与纤维素酶的接触概率,进而提高酶解效率^[24-25],本研究结果符合后者的观点。

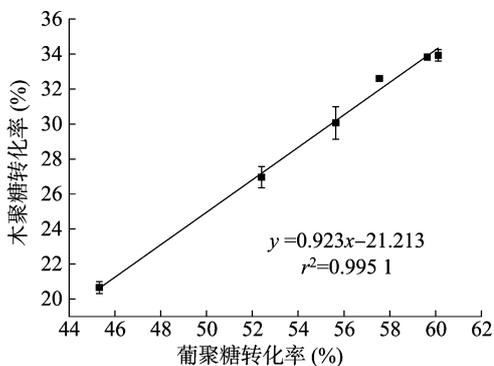


图6 葡聚糖转化率与木聚糖转化率的相关性

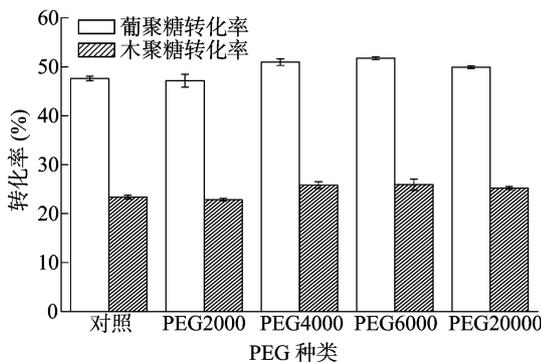


图9 表面活性剂对 SEPW 葡聚糖转化率的影响

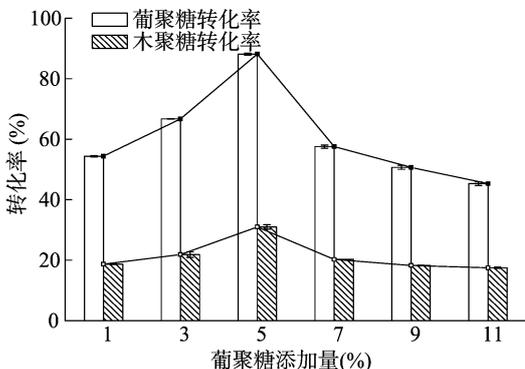


图7 葡聚糖添加量对 SEPW 酶解的影响

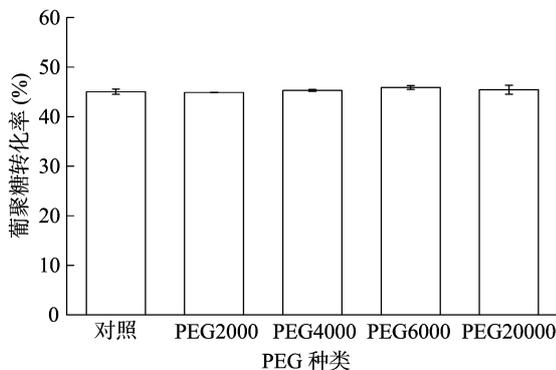


图10 表面活性剂对微晶纤维素葡聚糖转化率的影响

聚糖转化率与木聚糖转化率之间有较强的相关性。后续研究仅参考葡聚糖转化率作为确定最佳条件的依据。

2.9 PEG6000 添加量对 SEPW 酶解的影响

从图 11 可以看出,PEG6000 添加量为 0.10% 时,SEPW 的酶解效果最佳;在 PEG6000 的添加量低于 0.10% 时,酶解效率随 PEG6000 添加量的增加而提高;继续增加 PEG6000 的添加量,酶解效率反而下降。从图 12 可以看出,PEG6000 对微晶纤维素的酶解没有明显的作用。所以本研究最佳的 PEG6000 添加量为 0.10%,此时葡聚糖的转化率为 54.43%。

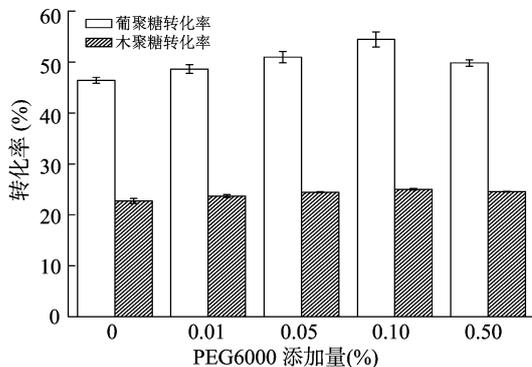


图11 不同 PEG6000 添加量对 SEPW 葡聚糖转化率的影响

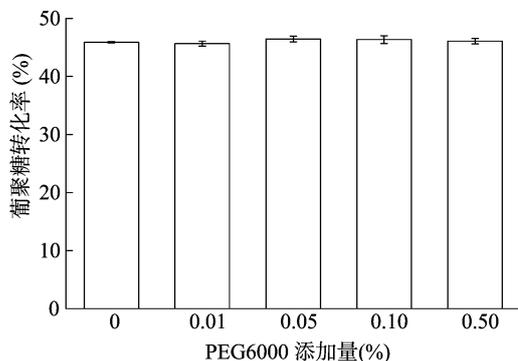


图12 不同 PEG6000 添加量对微晶纤维素葡聚糖转化率的影响

2.10 SEPW 酶解双因素正交试验结果

从表 4 可以得知,纤维素酶添加量为 30 FPU/g 葡聚糖、反应体系为 30 g、PEG6000 添加量为 0.10% 时,SEPW 的酶解效率最高。经计算得知,在 30 g 的反应体系中,添加 0.10% PEG6000 后,在纤维素酶添加量分别为 10、15、20、25、30 FPU/g 葡聚糖时,酶解效率分别提高 14.19%、7.37%、4.36%、4.28%、2.95%。可以发现,随着纤维素酶添加量的增加,表面活性剂的作用越来越不明显。笔者认为,随着纤维素酶添加量的增加,对于整个反应体系,纤维素酶是过量的。在较高的纤维素酶添加量时,木质素对酶的无效吸附在酶解中的影响变低。

3 讨论与结论

笔者发现,小麦秸秆经过蒸汽爆破预处理后,

表 4 SEPW 酶解双因素正交试验结果

试验号	A	B	C	酶解效率(%)
1	1	1	1	45.79
2	1	1	4	50.21
3	1	2	4	52.32
4	1	3	4	53.43
5	1	4	4	53.25
6	1	5	4	52.54
7	2	1	1	51.72
8	2	1	4	53.65
9	2	2	4	54.35
10	2	3	4	55.53
11	2	4	4	55.03
12	2	5	4	53.75
13	3	1	1	55.02
14	3	1	4	56.66
15	3	2	4	57.32
16	3	3	4	57.43
17	3	4	4	57.21
18	3	5	4	56.66
19	4	1	1	57.42
20	4	1	4	57.67
21	4	2	4	58.34
22	4	3	4	59.88
23	4	4	4	58.44
24	4	5	4	57.87
25	5	1	1	60.36
26	5	1	4	60.95
27	5	2	4	61.86
28	5	3	4	62.14
29	5	4	4	62.05
30	5	5	4	61.20
k_1	51.26	54.95		$k = 56.34$
k_2	54.01	56.84		
k_3	56.72	57.68		
k_4	58.27	57.20		
k_5	61.45	56.40		
平方和(S^2)	23.44	118.22		
极差	10.74	3.22		

注: k 代表所有试验结果的平均值。

化学成分发生变化,纤维素及木质素的含量升高,半纤维素的含量降低。小麦秸秆致密的物理结构消失,结构疏松,纤维呈无规则排列,细胞内部纤维外露。

小麦秸秆经过汽爆预处理后,增加纤维素酶添加量以及表面活性剂的添加量,能够有效降低木质素对酶解的影响,特别是表面活性剂,能够有效地在低纤维素酶添加量下,提高纤维素酶与纤维素的结合率,进而提高酶解效率。

在最佳反应体系下,纤维素酶添加量分别为 10、15、20、25、30 FPU/g 葡聚糖时,添加 0.10% 的

PEG6000后,酶解效率分别提高14.19%、7.37%、4.36%、4.28%、2.95%。其中,纤维素酶添加量为10 FPU/g葡聚糖时,PEG6000对酶解效率的提高最明显,SEPW的葡聚糖及木聚糖转化率分别为54.43%、52.63%,相比于对照组的45.79%、22.75%,分别提高14.19%、131.34%。

在汽爆小麦秸秆高固体含量的酶解过程中,仍然存在许多问题,如汽爆过小麦秸秆中抑制物的去除,木质素的分离成本,酶解过程中过量的二糖和三糖不能被完全降解,汽爆后小麦秸秆结晶度的提高等,都是需要解决的问题。

参考文献:

[1]董宇,马晶,张涛,等. 秸秆利用途径的分析比较[J]. 中国农学通报,2010,26(19):327-332.

[2]丁梁斌. 秸秆预处理方法的研究进展[J]. 安徽化工,2017,43(6):22-25,28.

[3]刘睿,万楚筠,黄茜,等. 秸秆预处理技术存在的问题与发展前景[J]. 环境科学与技术,2009,32(5):88-91.

[4]康鹏,郑宗明,董长青,等. 木质纤维素蒸汽爆破预处理技术的研究进展[J]. 可再生能源,2010,28(3):112-116.

[5]Du J, Cao Y, Liu G D, et al. Identifying and overcoming the effect of mass transfer limitation on decreased yield in enzymatic hydrolysis of lignocellulose at high solid concentrations [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 229: 88-95.

[6]Zhou Y, Chen H M, Qi F, et al. Non-ionic surfactants do not consistently improve the enzymatic hydrolysis of pure cellulose[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 182: 136-143.

[7]Zhou Y, Zhao X B, Liu D H. Effects of non-ionic surfactant on the enzymatic hydrolysis of lignocellulose and corresponding mechanism [J]. *Progress in Chemistry*, 2015, 27(11): 1555-1565.

[8]Modenbach A A, Nokes S E. Enzymatic hydrolysis of biomass at high-solids loadings: a review[J]. *Biomass & Bioenergy*, 2015, 56: 526-544.

[9]张瑞萍. 纤维素酶活力测定方法[J]. 印染, 2002, 28(8): 38-39, 54.

[10]王玉,周俊,雍晓雨,等. 汽爆预处理对水稻秸秆纤维结构

的影响[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(11): 319-324.

[11]刘云云,张宇,冯胜,等. 甜高粱渣分批补料酶水解生产高浓度糖[J]. *太阳能学报*, 2015, 36(3): 671-676.

[12]崔兴凯,陈可,赵雪冰,等. 甘蔗渣木质素的结构及其对纤维素酶解的影响[J]. *过程工程学报*, 2017, 17(5): 1002-1010.

[13]计红果,庞浩,刘伟,等. 聚乙二醇增强纤维素酶水解玉米秸秆[J]. *华中科技大学学报(自然科学版)*, 2009, 37(10): 121-123.

[14]刘娜,石淑兰. 木质纤维素转化为燃料乙醇的研究进展[J]. *现代化工*, 2005, 25(3): 19-22, 24.

[15]何珣,缪冶炼,陈介余,等. 纤维素酶用量和底物浓度对玉米秸秆酶解的影响[J]. *食品科技*, 2010, 35(2): 47-51, 55.

[16]刘佳. 表面活性剂在废木质纤维素制酒精中的应用基础研究[D]. 长沙:湖南大学, 2008.

[17]席琳乔,吴书奇,马春晖. 非离子表面活性剂PEG对棉秆木质纤维素酶解的影响[J]. *农业工程学报*, 2012, 28(23): 176-183.

[18]周妍,赵雪冰,刘德华. 非离子型表面活性剂对木质纤维素酶催化水解的影响及机理[J]. *化学进展*, 2015, 27(11): 1555-1565.

[19]Rocha-Martín J, Martínez-Bernal C, Pérez-Cobas Y, et al. Additives enhancing enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 244(Pt 1): 48-56.

[20]王钱钱,詹怀宇,孙建中,等. 纤维素酶在木质纤维素底物上的吸附、脱附以及循环利用[J]. *造纸科学与技术*, 2014, 33(3): 9-14.

[21]方志锋,刘昆仑,陈复生,等. 非离子表面活性剂在生物质发酵生产乙醇中的应用及影响[J]. *酿酒科技*, 2013(4): 53-56.

[22]郭红. 高固体系纤维素酶水解与回收强化研究[D]. 天津:天津大学, 2015.

[23]Okino S, Ikeo M, Ueno Y, et al. Effects of Tween 80 on cellulase stability under agitated conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 535-539.

[24]Eriksson T, Börjesson J, Tjerneld F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31(3): 353-364.

[25]Donohoe B S, Decker S R, Tucker M P, et al. Visualizing lignin coalescence and migration through maize cell walls following thermochemical pretreatment [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101(5): 913-925.