

文章编号: 1003-9015(2013)04-0631-06

低浓度的酸碱及双酶解预处理对麦糟发酵乙醇的影响

李夏兰¹, 张 兰¹, 王镇发¹, 方柏山^{1,2}(1. 华侨大学 化工学院生物工程与技术系, 福建 厦门 361021;
2. 厦门大学 化学化工学院 化学工程与生物工程系, 福建 厦门 361005)

摘 要: 研究综合利用木质纤维三大组分的生物转化过程。将麦糟的醇不溶物按料液比 1:8(W/V)加入 0.1 mol·L⁻¹ NaOH, 浸泡 24 h, 264 W 微波处理 20 min 后, 调 pH 5.0、45 °C, 加 50 U·mL⁻¹ 的木聚糖酶粗酶液反应 12 h 后, 再加入 40 mU·mL⁻¹ 的阿魏酸酯酶粗酶液反应 12 h, 将沉淀洗至中性, 烘干, 乙醇抽提, 得到酶降解后麦糟的醇不溶物残渣。此残渣在料液比 1:40(W/V), 纤维素酶量 200 U/g (麦糟的醇不溶物), 反应时间 36 h, 初始 pH 值为 4.5, 50 °C 条件下进行水解, 此残渣的纤维素酶解糖化率为 78.5%。将残渣的水解液进行乙醇发酵, 其乙醇的产量为 0.27 g·g⁻¹ (麦糟的醇不溶物), 对应的转化率为 48.72%, 为理论纤维素的糖转化率的 86.06%。实验结果表明经低浓度的酸碱及双酶解预处理的麦糟, 经纤维素酶酶解, 发酵乙醇是可行的, 此研究为木质纤维的综合利用提供应用研究基础。

关键词: 阿魏酸酯酶; 麦糟; 乙醇; 生物转化

中图分类号: Q814

文献标识码: A

DOI: 10.3969/j.issn.1003-9015.2013.04.014

Fermentation of Brewers' Spent Grain Pretreated by Acid or Alkali with Dilute Concentration and Two-Hydrolases to Produce Alcohol

LI Xia-lan¹, ZHANG Lan¹, WANG Zhen-fa¹, FANG Bai-shan^{1,2}

(1. Department of Bioengineering and Biotechnology, College of Chemical Engineering, HuaQiao University, Xiamen 361021; 2. Department of Chemical and Biochemical Engineering, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract: This paper deals with the biological transformation process of the three main ingredients in lignocellulose. Alcohol-insoluble residue (AIR) of brewers' spent grain (BSG) was put into the 0.1 mol·L⁻¹ NaOH solution at the ratio of 1:8(W/V) and soaked for 24 h. After being treated with 264 W microwave for 20 min, the sample reacts with crude enzyme solution of xylanase (50 U·mL⁻¹) at pH 5.0 and 45 °C for 12 h. Then the crude enzyme solution of feruloyl esterase (40 mU·mL⁻¹) was added and reacts with the sample for another 12 h. The enzyme-treated BSG-AIR was obtained by eluting, drying, and ethanol extracting the precipitate obtained by above-mentioned process. The obtained sample was hydrolyzed with cellulase (200 U per g AIR-BSG) at the ratio of 1:40(W/V), pH 4.5 and 50 °C for 36 h, and its saccharification ratio is 78.5%. The hydrolyzate of AIR-BSG was fermented and the ethanol product of 0.27 g·g⁻¹ AIR-BSG was obtained, the corresponding conversion ratio is 48.72%, which is 86.06% of the theoretical one. Our results show that it is feasible for BSG fermentation to produce alcohol *via* pretreating the BSG with dilute concentration of acid or alkaline and two kinds of enzymatic hydrolyses. It may provide foundation for research on the multipurpose use of the lignocellulose.

Key words: feruloyl esterase; brewers' spent grain; ethanol; bioconversion

收稿日期: 2011-12-16; 修订日期: 2012-04-16。

基金项目: 福建省科技重点项目(2011N0020); 华侨大学人才启动基金(11BS221); 华侨大学校基金(09X0289)。

作者简介: 李夏兰(1965-), 女, 福建省邵武市人, 华侨大学教授, 博士。通讯联系人: 方柏山, E-mail: fbs@xmu.edu.cn

1 前言

国内外对植物纤维质原料的生物转化研究已经取得了可喜的进展,但对植物纤维质的三大主要组分没有全面综合的利用,常以生产单一产品为目的,经济效益低下。如目前利用植物纤维质产燃料乙醇、木糖、木糖醇、糠醛等,都只利用其中一种组分,而忽视了其他组分的利用。由于这些单一产品自身价值有限,造成生物基产品无法与石油基产品竞争。目前的预处理方法,其目的更多的是考虑利用木质纤维原料中的纤维素,没有考虑半纤维素、木质素综合利用,因此预处理技术应充分考虑在利用纤维素的同时,回收半纤维素、木质素等其他高附加值成分,从综合利用的角度相对降低木质纤维原料生产乙醇的成本,同时可避免造成二次污染。开发出节能、低耗化学试剂或不添加化学试剂的新型技术,以同时利用木质纤维中的三大组分,是当务之急。

全面利用木质纤维素中的三大主要成分有很多报道^[1-3]。如,Kadam等提出了二步法稀酸水解,首先原材料用 $0.5\sim 2.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的稀硫酸处理,约有 50%的半纤维素转化为可溶性的低聚木糖(xylooligosaccharide,简称XOS)或单糖,然后在 62.5%~87.5%的液体乙醇中,用 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ H}_2\text{SO}_4$ 处理,脱除木素,纤维素糖化率 $>60\%$ ^[4]。Roberto等^[5]采用稀酸催化水解半纤维素回收木糖,以制作木糖醇等产品,而纤维素发酵成酒精。

课题组提出以低浓度的酸或碱(小于 0.5%)辅助物理方法对木质纤维进行处理,初步降解其三维空间结构,再经实验室发酵的阿魏酸酯酶协同木聚糖酶,降解半纤维素产阿魏酸(Ferulic acid,简称FA)和低聚木糖,随后用乙醇抽提木质素,再以纤维素酶酶解木质纤维中的纤维素产葡萄糖,利用降解的葡萄糖发酵产乙醇。此生物转化过程中有望得到了阿魏酸和低聚木糖及乙醇三种医药化工产品。

本文报道以麦糟(brewers' spent grain,简称BSG)为木质纤维代表,经低浓度的酸碱辅助物理方法及阿魏酸酯酶和木聚糖酶协同酶解预处理后,麦糟中的纤维素发酵乙醇的实验结果。

2 实验

2.1 实验器材与材料

反式阿魏酸标准品、木聚糖,美国Sigma公司;木二糖及低聚木糖标准品,日本和光纯药工业株式会社;阿拉伯木聚糖酶XG180,广州博士奥生化公司;其他常规试剂均为国产或进口分析纯。麦糟,福建泉州雪花啤酒厂提供。

Agilent 1100 高效液相色谱仪,美国Agilent公司;SP-2000型光度计,上海光谱仪器有限公司;6890N 安捷伦气相色谱仪,美国Agilent公司。

橘青霉,本实验室从土壤中筛选得到,已鉴定为桔青霉^[6]。

2.2 实验方法

2.2.1 阿魏酸含量的测定

阿魏酸含量及释放率按文献[7]测定。

2.2.2 总还原糖及主要单糖的测定

总还原糖采用苯酚-硫酸法测定^[8]。单糖采用本实验室建立的HPLC法测定^[9]。总还原糖及主要单糖的释放率见文献[9]。

2.2.3 低聚木糖总量的测定

采用文献[10]的HPLC法。

2.2.4 纤维素、半纤维素和木质素的测定

按文献[11]分析。

2.2.5 酶活力的测定方法

阿魏酸酯酶的活力按文献[7]测定。木聚糖酶活力的按文献[12]测定。

2.2.6 阿魏酸酯酶粗酶液的制备

阿魏酸酯酶的发酵工艺见文献[7]。将所得阿魏酸酯酶发酵液, $10000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 离心 5 min,得阿

魏酸酯酶粗酶液。

2.2.7 木聚糖酶粗酶液制备

取阿拉伯木聚糖酶 XG180(简称 XG180) 0.25 g, 加入 20 mL 蒸馏水、玻璃棒捣研、40 ℃ 浸提 1 h, 过滤, 稀释 10 倍, 得木聚糖酶粗酶液。

2.2.8 BSG 的乙醇不溶物酶解前的低浓度酸碱处理

按文献[13]制备 BSG 的乙醇不溶物(Alcohol insoluble residue of brewers' spent grain, BSG-AIR)^[13]。

称取 BSG-AIR, 按料液比 1:8(W/V)加入 0.05 mol·L⁻¹ H₂SO₄ 溶液或 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 溶液, 浸泡 24 h 后, 或再用 264 W 微波处理 20 min, 4000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液。分析各单糖、阿魏酸及低聚木糖的释放量。

2.2.9 低浓度酸或碱处理后 BSG-AIR 的双酶酶解

将经 2.2.8 节处理后的 BSG-AIR 溶液, 调 pH 5.0、45 ℃, 加 50 U·mL⁻¹ 的木聚糖酶粗酶液反应 12 h 后, 再加入 40 mU·mL⁻¹ 的阿魏酸酯酶粗酶液反应 12 h, 将酶解液倾出, 8000 r·min⁻¹、4 ℃ 冷冻离心 20 min, 取上清液, 分析各单糖、阿魏酸及低聚木糖的释放量。并将沉淀洗至中性, 烘干, 得到预处理后 BSG-AIR 残渣。

2.2.10 乙醇抽提预处理后的 BSG-AIR

将 2.2.9 节所得的 BSG-AIR 残渣, 用 95%乙醇室温振荡 2 h 去木质素, 4000 r·min⁻¹、离心 20 min, 取固形物, 待用^[14]。

2.2.11 经预处理的 BSG-AIR 的纤维素酶酶解

经预处理的 BSG-AIR 残渣, 加入纤维素酶 200 U/g (BSG-AIR), pH 4.5 的 Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液, 料液比 1:40(W/V), 50 ℃ 水浴振荡 36 h, 得 BSG-AIR 的纤维素酶酶解液, 8000 r·min⁻¹、离心 20 min, 取上清液测定还原糖含量, 计算纤维素糖化率。

$$\text{纤维素糖化率} = \frac{\text{酶解得到的还原糖量} \times 0.9}{\text{纤维素量}} \times 100\%$$

2.2.12 发酵产乙醇的菌种及培养基成分

(1) 菌种

酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* 2.535), 购自中国微生物菌种保藏中心。

(2) 培养基成分及培养条件

斜面培养基: 麦芽汁 150 mL, pH 6.4, 琼脂 3 g。

种子培养基: 麦芽汁 90 mL, pH 4.0。

发酵培养基(%): 酵母粉 0.15, NH₄Cl 0.25, 柠檬酸 0.3, K₂HPO₄ 0.55, MgSO₄·7H₂O 0.0025, 氯化钠 0.1, 氯化钙 0.001, pH 5.5, 含 2.5%还原糖的纤维素酶酶解液。

2.2.13 发酵 BSG-AIR 残渣酶解液

酿酒酵母菌种接入固体培养基, 30 ℃ 培养 24 h 后转接到种子培养基中, 30 ℃、150 r·min⁻¹ 培养 24 h。种子培养液再转接到发酵培养基, 接种量 10%, 120 r·min⁻¹, 28 ℃、厌氧培养 72 h。

2.2.14 发酵液中乙醇含量的测定

采用气相色谱法^[15]。

$$\text{纤维素对乙醇的转化率}(\%) = \frac{\text{生成乙醇量} \times 100 \times 1.76}{\text{底物中纤维中纤维}}$$

$$\text{生成乙醇量} = \text{测定的乙醇体积分数} \times \text{乙醇密度} \times \text{总体积}$$

$$\text{乙醇产率}(\text{g} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{\text{生成乙醇量}}{\text{纤维素的量}}$$

$$\text{纤维素对乙醇的理论转化率}(\%) = 100 \times 1.11 \times 0.51 = 56.61\%$$

3 结果与讨论

3.1 预处理对阿魏酸释放率的影响

因阿魏酸释放率与BSG的降解呈正相关,因此研究BSG-AIR经不同方法预处理后的上清液中阿魏酸释放率,结果如表1。

表1 不同预处理方法对BSG-AIR释放阿魏酸的影响

Different pretreatments	Release percent of FA / %
Enzymatic hydrolysis	34.1
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ +Enzymatic hydrolysis	55.8
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ /Microwave+Enzymatic hydrolysis	62.7
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH+Enzymatic hydrolysis	62.3
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH/Microwave+Enzymatic hydrolysis	88.1

由表1可知,经过低浓度酸或碱处理(或加上微波辅助),再经双酶酶解的BSG-AIR的阿魏酸释放率在55.8%~88.1%。微波辅助0.1 mol·L⁻¹ NaOH处理,再经双酶酶解的BSG-AIR,阿魏酸的释放率最高,为88.1%。这几种预处理方法都可以断裂三大素之间的糖苷键或酯键,降解了部分半纤维素和木质素,使得植物纤维孔径增大,对BSG-AIR的结构造成一定程度的“松动”,使阿魏酸酯酶到达作用位点,酶解变得容易进行^[16]。

3.2 预处理对还原糖、低聚木糖和单糖释放量的影响

BSG-AIR经不同方法预处理后的上清液中低聚木糖含量和还原糖、单糖等的释放率,结果如表2。

由表2可知,微波辅助H₂SO₄处理再双酶酶解,其还原糖、阿拉伯糖、木糖的释放率最高,分别为56.6%、68.2%、62.4%。影响半纤维降解的因素主要有木聚糖的含量、组成成分、阿魏酸与木聚糖的连接位置、多糖链的长度等,且阿拉伯糖对木聚糖侧链的取代程度与该细胞壁物质酶解的难易程度之间存在着一定的正相关^[17]。因BSG中的阿拉伯木聚糖含量较高,且木聚糖在其侧链上被阿拉伯糖取代的程度较大,因此,形成了较大的空间位阻,影响酶与底物的结合,造成了酶解的困难^[17]。低浓度H₂SO₄处理、微波辅助H₂SO₄处理,在预处理过程中断裂部分侧链上的糖苷键,释放出少量的单糖,有利于酶解过程中木聚糖酶解,促进低聚木糖的释放。但由于处理条件温和,仅对BSG结构造成一定的“松动”,低聚木糖和单糖的释放量还是很低。从表2可知,NaOH处理与H₂SO₄相比,其低聚木糖和单糖的释放量相对较小。NaOH预处理过程中去除了乙醛酸较多,微波辅助NaOH处理再双酶酶解,其乙醛酸释放率最高,分别为79.2%。从表2可知,葡萄糖的释放率都非常的小,说明预处理过程对BSG中的纤维素几乎没有降解。

表2 不同预处理方法对BSG-AIR释放糖的影响

Table 2 Effect of different pretreatments of BSG-AIR on the release of sugar

Different pretreatments	XOS / mg·mL ⁻¹	Release percent of sugar / %				
		Reducing sugar	Arabinose	Xylose	Glucose	Acetic acid
Enzymatic hydrolysis	8.38	21.2	31.2	32.2	2.78	25.2
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ + Enzymatic hydrolysis	9.79	36.8	41.6	42.6	4.37	39.3
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ /Microwave+Enzymatic hydrolysis	10.80	56.6	68.2	62.4	2.80	47.7
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH+Enzymatic hydrolysis	8.86	29.4	47.3	42.6	2.75	68.5
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH/Microwave+Enzymatic hydrolysis	9.15	30.9	56.3	53.2	2.30	79.2

3.3 预处理对BSG-AIR中纤维素、半纤维素和木质素含量的影响

BSG-AIR经过不同方法预处理后的残渣中半纤维素、纤维素和木质素的含量,结果如表3。

由表3可知,BSG含纤维素25.5%,半纤维素21.8%,木质素20.2%,与文献^[18]基本一致。

表3 不同预处理方法的BSG-AIR残渣三大素含量变化

Table 3 Effect of different pretreatments of BSG-AIR residue on the content of cellulose, hemicellulose and lignin

Different pretreatments	Content / %			Degradation percentage / %		
	Hemicellulose	Cellulose	Lignin	Hemicellulose	Cellulose	Lignin
Raw BSG	21.8	25.50	20.2			
Enzymatic hydrolysis	17.61	25.50	19.98	8.07	0	1.05
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ + Enzymatic hydrolysis	11.02	24.01	18.08	49.5	5.81	6.93
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ /Microwave+ Enzymatic hydrolysis	10.28	23.04	17.91	52.8	9.64	11.28
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH+ Enzymatic hydrolysis	17.72	23.28	12.73	18.7	8.71	37.0
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH/Microwave+ Enzymatic hydrolysis	19.07	23.02	8.84	12.5	8.92	56.2

从表3可知,微波辅助H₂SO₄降解,再双酶酶解,其半纤维素的降解率最高,为52.8%,但仍有47.2%的半纤维素没有降解。这是因为半纤维素是由两部分,一部分是易水解片段,另一部分是难水解片段,

易水解部分在 55%~100%^[19], 本实验方案的预处理方法是温和的, 对难水解的片段还无法降解。同时温和的预处理方法只能降解半纤维素或木质素, 对木质纤维中的纤维素几乎无法水解, 纤维素的降解率都小于 10%。不同的预处理方法中, 双酶预处理方法的木质素的去除率最低, 为 1.05%, 微波辅助 NaOH 处理, 再双酶酶解的木质素去除率最高, 为 56.2%。木质素的去除有利于纤维素的降解。

3.4 不同预处理对纤维素糖化率的影响结果

对预处理后的 BSG-AIR 残渣进行纤维素酶酶解或预处理后的 BSG-AIR 残渣经乙醇抽提再纤维素酶酶解, 实验结果见表 4, 从表 4 可知, 经预处理的 BSG-AIR 残渣与未经任何处理的 BSG-AIR 相比, 纤维素酶解糖化率显著提高。

若预处理的 BSG-AIR 残渣继续用乙醇抽提去木质素, 则纤维素酶解得率继续提高, 微波辅助 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 处理, 再酶解, 继续用乙醇抽提, 其糖化率最高为 78.5%。

3.5 BSG-AIR 残渣酶解液发酵产乙醇的结果

利用处理后的 BSG-AIR 残渣的纤维素酶酶解液中的葡萄糖, 进行酿酒酵母厌氧发酵乙醇, 实验结果见表 5。

由表 5 可知, 乙醇产率的变化趋势与纤维素酶酶解糖化率相似, 经预处理的乙醇产率远高于未经任何处理的 BSG-AIR 的乙醇转化率, 从 2.23% 上升到 48.72%。纤维

素酶酶解液中还原糖浓度升高, 则乙醇产率提高。从表 4 及 5 可知, 微波辅助 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 处理, 再酶解, 继续用乙醇抽提, 木质纤维中纤维素的糖化率最高, 为 78.5%, 对应的转化率为 48.72%, 为理论纤维素的糖转化率的 86.06%。

Xiros 等^[20-22]研究了用不同的菌种, 以 BSG 和麸皮或玉米芯做碳源, 在优化的条件下液体发酵, 得培养液, 培养液中含有丰富的木质纤维降解酶, 包括阿魏酸酯酶和木聚糖酶, 将此培养液加入到有稀碱预处理的 BSG 中, 通过一步发酵法固体或液体发酵产乙醇。实验结果与已报道的研究结果相比较, 见表 6。

表 6 表明, 本实验研究结果, 采用微波辅助 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 处理, 再酶解, 继续用乙醇抽提, 采用二步法发酵乙醇, 其乙醇的产量为 0.27 g·g⁻¹ (BSG-AIR), 是 Xiros 等研究结果的 1.47~4.10 倍。因此本实验设计方案是可行的, 可继续深入研究。

4 结 论

采用微波辅助 0.1 mol·L⁻¹ NaOH 处理 BSG, 再双酶酶解, 残渣用乙醇继续抽提, 利用 BSG-AIR 残

表 4 不同预处理对纤维素糖化率的影响

Different pretreatments	Saccharification ratio / %
Raw BSG	1.73
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ +Enzymatic hydrolysis	29.1
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ /Microwave+ Enzymatic hydrolysis	35.7
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ /Microwave+ Enzymatic hydrolysis+ Eethanol	57.2
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH+ Enzymatic hydrolysis	55.2
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH/Microwave+Enzymatic hydrolysis	60.3
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH/Microwave+ Enzymatic hydrolysis+ Eethanol	78.5

表 5 不同预处理的 BSG-AIR 的乙醇产率

Different pretreatments	Ethanol conversion percent / %	Ethanol yield / g·g ⁻¹ BSG
Raw BSG	2.23	0.0071
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ + Enzymatic hydrolysis	16.65	0.091
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ /Microwave+ Enzymatic hydrolysis	28.61	0.16
0.05 mol·L ⁻¹ H ₂ SO ₄ /Microwave+ Enzymatic hydrolysis + Eethanol	35.60	0.20
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH+ Enzymatic hydrolysis	21.97	0.13
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH/Microwave+ Enzymatic hydrolysis	34.62	0.21
0.1 mol·L ⁻¹ NaOH/Microwave+Enzymatic hydrolysis + Eethanol	48.72	0.27

表 6 BSG 产乙醇的不同技术方案比较

Growth stage	Microorganism	Ethanol yield / g·g ⁻¹ BSG	Reference
Submerged culture	<i>Fusarium oxysporum</i>	0.109	[20]
Solid state culture	<i>Fusarium oxysporum</i>	0.065	[21]
Solid state culture	<i>Neurospora crassa</i>	0.074	[22]
Submerged culture	<i>Penicillium citrinum</i>	0.270	Present study

渣的纤维素酶解液中的葡萄糖,进行酿酒酵母发酵产乙醇,其乙醇的产量最高,为 $0.27\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ (BSG-AIR),对应的转化率为48.7%,为理论纤维素的糖转化率的86.1%。

本实验麦糟预处理过程所用的低浓度酸碱(小于0.5%)不用回收,且采用阿魏酸酯酶为关键酶降解BSG的复杂结构,整个生物转化过程可得到阿魏酸、低聚木糖及乙醇。有关麦糟中半纤维素的生物转化释放阿魏酸、低聚木糖的研究及分离纯化将另文报导。

参考文献:

- [1] Sun Y, Cheng J. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review [J]. *Bioresour Technol*, 2002, 83(1): 1-11.
- [2] Saha B. Hemicellulose bioconversion [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, 30(5): 279-291.
- [3] Sánchez C. Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27(2): 185-194.
- [4] Kadam K, Wooley R, Aden A, *et al.* Softwood forest thinnings as a biomass source for ethanol production: A feasibility study for California [J]. *Biotechnol Progr*, 2000, 16(6): 947-957.
- [5] Roberto I, Mussatto S, Rodrigues R. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor [J]. *Ind Crop Prod*, 2003, 17(3): 171-176.
- [6] LI Xia-lan (李夏兰), HU Xue-song (胡雪松), FAN Yun-min (范韵敏), *et al.* Isolation, identification and growth characteristics of a penicillium strain producing feruloyl esterases (一株产阿魏酸酯酶青霉菌株的筛选、鉴定及生长特征) [J]. *Microbiology China* (微生物学通报), 2010, 37(11): 1588-1593.
- [7] LI Xia-lan (李夏兰), FAN Yun-min (范韵敏), FANG Bai-shan (方柏山). Purification and characterization of ferulic acid esterase from *Penicillium citrinu* (来自桔青霉的阿魏酸酯酶的分离纯化、理化性质) [J]. *Acta Microbiology Sinica* (微生物学报), 2010, 50(8): 1058-1064.
- [8] ZHANG Wei-jie (张惟杰). *Biochemical Research Technology of Complex Carbohydrates* (糖复合物生化研究技术) [M]. Hangzhou (杭州): Zhejiang University Press (浙江大学出版社), 1994: 196.
- [9] ZHANG Lan (张兰), CHENG Shan-ying (程珊影), LI Xia-lan (李夏兰), *et al.* Analysis of monosaccharides and organic acids in the liquors of acid hydrolysis on brewery's spent grain by HPLC (高效液相色谱测定麦糟水解液中单糖和有机酸) [J]. *Journal of Huaqiao University* (华侨大学学报), 2010, 31(2): 14-21.
- [10] ZHANG Xiao-ping (张晓萍). The Creation Calibration Equation of Each DP Xylooligosaccharides and Their Application. (低聚木糖各组分高效液相分析方程的建立及应用) [D]. Nanjing (南京): Nanjing Forestry University (南京林业大学), 2006.
- [11] ZHU Shun-guo (朱顺国), XING Zhuang (邢壮), ZHANG Wei (张微), *et al.* Study on changing law of contents of NDF and ADF in corn straw (玉米秸秆 NDF 与 ADF 含量变化规律的研究) [J]. *China Dairy Cattle* (中国奶牛), 2001, 1: 24-26.
- [12] Bartolome B, Gomes-sordoves C, Sancho AI, *et al.* Growth and release of hydroxycinnamic acids from brewer's spent grain by *Streptomyces avermitilis* CECT 3339 [J]. *Enzyme Microb Tech*, 2003, 32(1): 140-144.
- [13] Waldron K, Selvendran R. Composition of the cell walls of different asparagus (*Asparagus officinalis*) tissues [J]. *Physiol Plantarum*, 1990, 80(4): 568-575.
- [14] CHEN Hong-zhang (陈洪章), LI Zuo-hu (李佐虎). Lignocellulose fractionation (木质纤维原料组分分离的研究) [J]. *Journal of Cellulose Science and Technology* (纤维素科学与技术), 2003, 11(4): 31-40.
- [15] HU Chun-keng (胡纯铿). A Study on the Ethanol Tolerance of a Self-flocculating Fusant of *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* (自絮凝颗粒酵母耐酒精机制研究) [D]. Dalian (大连): Dalian University of Technology (大连理工大学), 2003.
- [16] LIAO Lü (廖律), ZHOU Ming-da (周明达), XIAO jin (肖劲). Determination of ferulic acid extracted from rice bran by HPLC (米糠中阿魏酸的提取及高效液相色谱法测定) [J]. *Science and Technology of Food Industry* (食品工业科技), 2007, 28(2): 217-219.
- [17] Bartolome B, Faulds CB, Williamson G. Enzymic release of ferulic acid from barley spent grain [J]. *J Cereal Sci*, 1997, 25(3): 285-288.
- [18] Carvalho F, Esteves M, J C P, *et al.* Production of oligosaccharides by autohydrolysis of brewery's spent grain [J]. *Bioresour Technol*, 2004, 91(1): 93-100.
- [19] Kim S, Yum D, Park S. Step-change variation of acid concentration in a percolation reactor for hydrolysis of hardwood hemicelluloses [J]. *Bioresour Technol*, 2000, 72(3): 289-294.
- [20] Xiros C, Christakopoulos P. Enhanced ethanol production from brewer's spent grain by a *Fusarium oxysporum* consolidated system [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2009, 2:4.
- [21] Xiros C, Topakas E, Katapodis P, *et al.* Evaluation of *Fusarium oxysporum* as an enzyme factory for the hydrolysis of brewer's spent grain with improved biodegradability for ethanol production [J]. *Ind Crop Prod*, 2008, 28(2): 213-224.
- [22] Xiros C, Topakas E, Katapodis P, *et al.* Hydrolysis and fermentation of brewer's spent grain by *Neurospora crassa* [J]. *Bioresour Technol*, 2008, 99(13): 5427-5435.