

基于 3,5-二硝基水杨酸法的水稻秸秆酶解工艺*

李彬 高翔 孙倩 陈坤杰

(南京农业大学工学院, 南京 210031)

摘要: 为了提高汽爆水稻秸秆还原糖的转化率,采用纤维素酶对水稻秸秆进行酶解实验。还原糖的含量用 3,5-二硝基水杨酸法进行测定。实验选用加酶量、酶解时长和反应温度作为考察因素,以原始水稻秸秆与蒸汽爆破预处理水稻秸秆作对比。结果表明纤维素酶用量占秸秆干物质质量的 10%,酶解时长 48 h,反应温度 50℃ 是一个较为理想的反应条件;原始水稻秸秆最大酶解还原糖产量约为 9.7%;蒸汽爆破水稻秸秆最大酶解还原糖产量约为 34.3%;蒸汽爆破预处理能够显著提高水稻秸秆的酶解还原糖产量,并缩短酶解反应时间。

关键词: 水稻秸秆 蒸汽爆破 纤维素 酶解 还原糖 3,5-二硝基水杨酸法

中图分类号: S216.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-1298(2013)01-0106-07

Enzymatic Hydrolysis of Rice Straw Based on 3,5-dinitrosalicylic Acid Method

Li Bin Gao Xiang Sun Qian Chen Kunjie

(College of Engineering, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210031, China)

Abstract: For the purpose to improve the conversion rate of reducing sugar of rice straw, the cellulose was used in the enzymatic hydrolysis of rice straw. The content of reducing sugar was detected by 3,5-dinitrosalicylic acid method. The enzyme concentration, hydrolysis time and temperature were selected as inspecting factors. Meantime, comparisons of the enzymatic hydrolysis of rural rice straw with that of steam explosion pretreatment rice straw were made. The results showed when the cellulose weight content taking 10% of the dry rice straw, enzymatic hydrolysis time of 48 h and reaction temperature of 50℃ were ideal reaction conditions. The maximum reducing sugar yield of enzymatic hydrolysis original rice straw was 9.7%. The highest reducing sugar yield of enzymatic hydrolysis steam explosion rice straw was approximately 34.3%. Steam explosion pretreatment can obviously improve the production of reducing sugar of enzymatic hydrolysis rice straw, and at the same time accelerate the reaction rate.

Key words: Rice straw Steam explosion Cellulose Enzymatic hydrolysis Reducing sugar 3,5-dinitrosalicylic acid

引言

与其他农作物秸秆类似,成熟的水稻秸秆干物质主要由植物细胞壁组成,占其秸秆总质量的 70% ~ 80%。其中纤维素占 30% ~ 35%,半纤维素占 25% ~ 35%,木质素占 5% ~ 10%。半纤维素、纤维素和木质素三者都属于高度聚合多糖^[1]。半纤维素可以水解为低木聚糖、木糖、阿拉伯糖和甘露糖等组分。

纤维素可以在纤维素酶的作用下最终转化为葡萄糖。木质素不易分解,难溶于各种酸碱。但此三成分结构错综关联,纤维素和半纤维素之间由强大的氢键连接,木质素是酚的聚合物,内部不仅有氢键连接,外部又与半纤维素连接形成木质素-碳水化合物复合体。秸秆的内部分子结构导致其在酶解和消化吸收等生化反应过程中,在反应的表面形成一个木质素保护层,形成了空间限制,阻止了更深层次的反

收稿日期: 2012-06-18 修回日期: 2012-08-06

* 江苏省科技支撑计划资助项目(BE2010356)和江苏省农机三项工程资助项目(NJ2010-42)

作者简介: 李彬,博士生,主要从事农产品加工及检测技术研究,E-mail: 56996701@qq.com

通讯作者: 陈坤杰,教授,博士生导师,主要从事农产品加工及检测技术研究,E-mail: kunjiechen@njau.edu.cn

应。为了打破各种植物秸秆^[2-4]和木质材料内部的结构关联^[5-6],国内外学者尝试采用微波辐射^[7]、酸化^[8]、碱化^[9]、真菌腐化^[10]等各种物理^[11]、化学^[12]和生物处理方法以及多种联合方法^[13-14]以提高酶解后的还原糖产量。

还原糖是指具有还原性的糖类。在糖类中,分子中含有游离醛基或酮基的单糖和含有游离醛基的二糖都具有还原性。还原性的糖包括葡萄糖、果糖、半乳糖、乳糖、麦芽糖。检测方法有折光法、旋光法、分光法和高效液相色谱法等,其中旋光法和菲林试剂法检测结果精确^[15-16]。前者可以针对特定的糖分进行检测,菲林试剂法是对所有的还原糖进行检测,可当作是某种主要糖分的转化含量,但操作复杂、费时。3,5-二硝基水杨酸法属于分光法,又叫DNS法,是美国应用化学联合会推荐的测定葡萄糖含量的方法^[17]。此方法方便、快捷,结果也较为准确。其原理是3,5-二硝基水杨酸溶液与还原糖溶液共热后被还原成棕红色的氨基化合物,在一定的浓度范围内,还原糖的量和棕红色物质的吸光度呈一定比例关系,利用比色法可测出样品的含糖量^[18]。但这种方法受波长、显色剂等因素的影响。本文采用此方法测定酶解后的还原糖含量,以葡萄糖为转化对象,同时对酶解反应条件进行研究分析,并采用蒸汽爆破预处理试图打破半纤维素、纤维素、木质素之间的机体联络,以提高酶解后的还原糖含量。

1 材料与方法

1.1 实验材料

水稻秸秆(南京农业大学农场);氢氧化钠(天津市北联精细化学品开发有限公司),分析纯;无水亚硫酸钠(南京奥佳化工有限公司),分析纯;酒石酸钾钠、3,5-二硝基水杨酸、无水葡萄糖、苯酚、纤维素酶(国药集团化学试剂有限公司),均为分析纯。

1.2 实验设备

汽爆机(自制,如图1所示)、干燥箱(DHG-101型,上海华连医疗器械有限公司)、粉碎机(JFSO-100型,上海嘉定粮油仪器有限公司)、恒温水浴锅(HH-60型,常州国华电器有限公司)、真空泵(SHZ-D型,巩义市予华仪器有限责任公司)、紫外可见分光光度计(759S型,上海菁华科技仪器有限公司)、筛子(40目,浙江上虞道墟张兴纱筛厂)以及电子天平(0.0001 g)、容量瓶(50 mL)、1 mL移液管等各种常用化学量器。

1.3 实验内容和方法

影响纤维素酶解的因素有酶解对象、加酶量、酶解时间、反应温度以及检测方法上的DNS用量、检

测前的显色时间和检测时的波长选择等。结合其他研究成果,本实验选用检测时的波长、加酶量、酶解时长、反应温度作为研究对象,并将汽爆前后的水稻秸秆的还原糖含量作对比,观测蒸汽爆破预处理作用的效果。

1.3.1 秸秆的蒸汽爆破预处理

将水稻秸秆剪切至长度3~5 cm,按照一定的加工条件在爆缸内进行加压汽爆。蒸汽的水源由水泵输送至蒸汽发生器,经液化石油气加热产生水蒸气,再经阀门输送至爆缸,物料在爆缸内加压到一定的时长后,通过空气压缩机及气泵的控制,使爆缸在0.008 s的时间内实现位移下落,压力蒸汽在短时间释放,达到爆破的目的。汽爆机原理如图1所示。

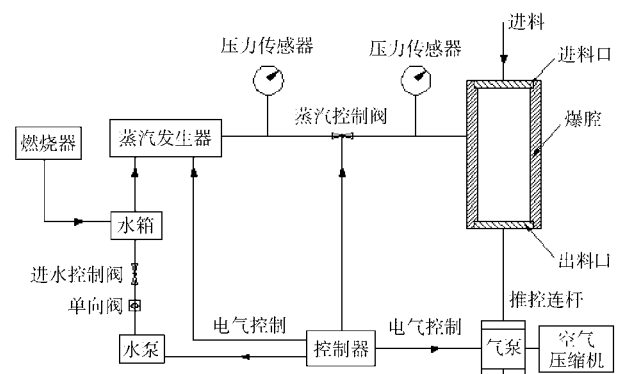


图1 汽爆机工作原理图

Fig.1 Working principle diagram of steam explosion machine

1.3.2 检测前样品的处理

将原始水稻秸秆和汽爆后的水稻秸秆收集,干燥,粉碎,过40目筛,采用四分法取样。

1.3.3 显色剂和溶液的配制^[19]

(1)DNS试剂:称量18.1992 g酒石酸钾钠溶于50 mL蒸馏水中,加热,加入0.6313 g 3,5-二硝基水杨酸(DNS)。

(2)甲液:将6.9 g结晶苯酚溶于15.2 mL 10% NaOH溶液,蒸馏水稀释至69 mL,在此溶液中加入6.9 g亚硫酸氢钠。

(3)乙液:将255 g酒石酸钾钠溶于300 mL 10% NaOH溶液中,再加入880 mL 1%的3,5-二硝基水杨酸溶液。

将甲、乙溶液混合即得黄色试剂,储于棕色瓶中放置7~10 d后使用。

(4)1 mg/mL葡萄糖标准溶液:准确称取100 mg分析纯的葡萄糖(预先在105℃干燥2 h),用少量蒸馏水溶解后稀释至100 mL,冰箱保存备用。

1.3.4 葡萄糖标准曲线绘制

葡萄糖标准溶液(1 mg/mL)0~0.8 mL分别放入试管中,均用蒸馏水稀释至1 mL,加入1 mL DNS

试剂,在沸水浴中加热 5 min,取出以自来水冷却,再加入 8 mL,混匀,在波长 500 ~ 540 nm 下,选取最优的波长,以 1 cm 比色皿测定各管光密度(空白管溶液调零),以葡萄糖质量分数为横坐标,相应各管吸光度为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.5 酶解实验方法

精确称取干燥、过 40 目筛、四分法之后的样品 0.2 g,放入 50 mL 的容量瓶内,加入一定量的纤维素酶,以蒸馏水定容。混匀后置恒温水浴锅中反应相应的时长。

1.3.6 还原糖含量的测定

将上述反应后的实验样品取出冷却至室温,用真空泵进行抽滤(或取上清液),取滤液 1 mL(浓度高的需要进行预稀释),加入 1 mL 的 DNS 试剂,在沸水浴中加热 5 min,取出以自来水冷却,再加入蒸馏水 8 mL,混匀,在相应波长下,用 1 cm 比色皿测定样品的吸光度。对应标准曲线计算出还原糖的含量。样品还原糖质量百分数计算公式为

$$c = \frac{m_1 V}{1\,000 V_1 m} \times 100\%$$

式中 c ——样品还原糖含量, %
 m_1 ——查标准曲线所得待测样品液中还原糖含量, mg
 m ——样品质量, g
 V ——样品总体积, mL
 V_1 ——待测样品液的体积, mL

2 结果与分析

2.1 葡萄糖标准曲线的测定

由上述方法,在 500 ~ 550 nm 波长区间下,以每隔 10 nm 的波长分别测 0 ~ 0.8 mg/mL 等 9 组葡萄糖溶液质量浓度与吸光度间的关系,结果如表 1 所示。线性回归关系如图 2 所示。

表 1 不同波长及葡萄糖标准溶液质量浓度的吸光度
Tab.1 Relation between standard glucose solution and absorbance under different wavelengths

葡萄糖质量 浓度/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	波长/nm					
	500	510	520	530	540	550
0	0	0	0	0	0	0
0.1	0.325	0.221	0.202	0.157	0.123	0.086
0.2	0.508	0.428	0.372	0.328	0.251	0.192
0.3	0.661	0.568	0.508	0.426	0.363	0.298
0.4	0.831	0.719	0.666	0.563	0.503	0.405
0.5	1.016	0.859	0.804	0.715	0.597	0.501
0.6	1.185	0.987	0.947	0.84	0.726	0.615
0.7	1.364	1.141	1.061	0.964	0.842	0.735
0.8	1.504	1.274	1.175	1.07	0.967	0.844

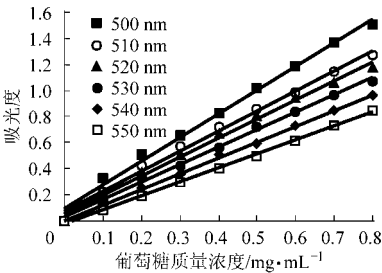


图 2 不同波长下的葡萄糖标准曲线
Fig.2 Standard glucose curves under different wavelengths

线性回归分析显示,500 ~ 550 nm 波长下的相关系数依次为 0.991 7、0.992 4、0.993 9、0.997 1、0.999 5、0.998 9。可见,在 540 nm 下,葡萄糖标准曲线的线性关系最优。

根据波长 540 nm 下葡萄糖质量浓度与吸光度之间的关系,绘制葡萄糖标准曲线。吸光度与葡萄糖质量浓度之间的关系为

$$Y = 1.201\,5X + 0.005\,2$$

相关度 99.95%,显著性 $p = 0.000\,1 < 0.01$,说明此标准曲线线性关系极显著,实验数据准确。

2.2 检测结果的稳定性验证

为了检验 3,5-二硝基水杨酸法检测结果的稳定性,将一定条件下汽爆后的水稻秸秆按照加酶量与秸秆干物质的质量比 10 mg/g,酶解 48 h,反应温度 50℃,后在 540 nm 波长下检测还原糖含量,重复 8 次实验。结果见表 2。

数据分析显示,最大值 32.49%,最小值 31.84%,均值 32.17%,极差 0.65,方差 0.068 7,标准差 0.26,最大相对误差 0.99%。

2.3 酶解工艺研究

2.3.1 加酶量对还原糖含量的影响

分别取汽爆秸秆和原始秸秆进行酶解实验,检测酶解后的还原糖含量。

(1)取原始水稻秸秆,依次粉碎、干燥、过 40 目筛,四分法取样。取 8 组 0.2 g 样品分别加入如表 3 所示含量的纤维素酶,置于 50 mL 容量瓶内 50℃ 恒温反应 24 h 后,用紫外可见分光光度计检测吸光度(3 次取均值),并根据葡萄糖标准曲线计算出秸秆酶解后的还原糖含量。结果如表 3 所示。

由表 3 可见,原始水稻秸秆酶解 24 h,还原糖含量约为秸秆总质量的 5.2%,当加酶量达到 50 mg/g(0.2 g 样品加酶 10 mg)时,糖含量激增。当加酶量大于 100 mg/g(0.2 g 样品加酶 20 mg)时,酶解后的还原糖含量增幅不再显著。

(2)取在一定条件下汽爆后的水稻秸秆,依次粉碎、干燥、过 40 目筛,四分法取样。取 8 组 0.2 g 样品分别加入如表 4 所示含量的纤维素酶,置于 50 mL

表 2 3,5-二硝基水杨酸法对还原糖含量的稳定性检测

参数	组别							
	1	2	3	4	5	6	7	8
吸光度	0. 519	0. 516	0. 512	0. 522	0. 513	0. 512	0. 522	0. 520
含糖量/%	32. 27	32. 13	31. 84	32. 46	31. 93	31. 88	32. 49	32. 35

表 3 原始秸秆加酶量与还原糖含量关系

参数	组别							
	1	2	3	4	5	6	7	8
加酶量/mg	0	1	5	10	15	20	30	40
吸光度	0. 052	0. 069	0. 078	0. 202	0. 222	0. 252	0. 255	0. 257
含糖量/%	0. 9	1. 3	1. 5	4. 1	4. 5	5. 1	5. 2	5. 2

表 4 汽爆秸秆加酶量与还原糖含量关系

参数	组别							
	1	2	3	4	5	6	7	8
加酶量/mg	0	1	5	10	15	20	30	40
吸光度	0. 157	0. 178	0. 262	0. 321	0. 338	0. 469	0. 515	0. 521
含糖量/%	9. 5	10. 8	16. 0	19. 7	20. 8	29. 0	31. 8	32. 2

容量瓶内 50℃ 恒温反应 24 h 后,取 1 mL 反应后的溶液,稀释 3 倍,按照实验方法用紫外可见分光光度计检测吸光度,并根据葡萄糖标准曲线计算出秸秆酶解后的还原糖含量。

由表 4 可以看出,汽爆后水稻秸秆酶解 24 h,还原糖含量约占秸秆总质量的 32.2%,当加酶量大于 100 mg/g 时,酶解含糖量增幅不再显著。

随加酶量的变化,原始水稻秸秆与汽爆后的水稻秸秆酶解还原糖含量对比见图 3。

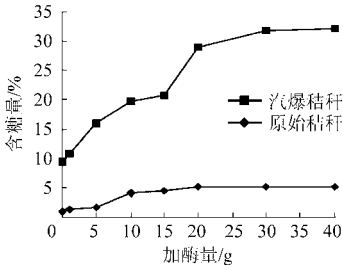


图 3 汽爆前后加酶量与还原糖含量关系对比

Fig. 3 Relationship between reducing sugar content and enzyme content (before and after steam explosion)

对比可见,在相同加酶量的情况下,汽爆作用可以显著提高水稻酶解的还原糖产量。为了准确检测秸秆酶解的含糖量。在后面的实验中,加酶量选定在 100 mg/g。

2.3.2 酶解时长对还原糖含量的影响

(1)取原始水稻秸秆,依次粉碎、干燥、过 40 目筛,四分法取样。取 9 组 0.2 g 样品加入 20 mg 的纤维素酶,置于 50 mL 容量瓶内,50℃ 恒温反应。分别在表 5 所示的时间段,用紫外可见分光光度计检测溶液的吸光度,并根据葡萄糖标准曲线计算出反应不同时间时秸秆酶解后的还原糖含量。

由表可见,原始水稻秸秆的酶解含糖量最终稳定在 9.7%。可见,原始水稻秸秆酶解反应的速度均匀,充分酶解需 60 h 以上的反应时间。

(2)取同上在一定条件下汽爆后的水稻秸秆,依次粉碎、干燥、过 40 目筛,四分法取样。取 9 组 0.2 g 样品加入 20 mg 的纤维素酶,置于 50 mL 容量瓶内 50℃ 恒温反应。分别在表 6 所示的时间段,取

表 5 原始秸秆酶解时长与还原糖含量关系

参数	组别								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
酶解时长/h	4	8	12	16	20	24	48	60	96
吸光度	0. 035	0. 106	0. 136	0. 177	0. 199	0. 252	0. 368	0. 459	0. 471
含糖量/%	0. 6	2. 1	2. 7	3. 6	4. 0	5. 1	7. 5	9. 4	9. 7

表 6 汽爆秸秆酶解时长与还原糖含量关系

Tab.6 Reducing sugar content vs reaction time (steam explosion rice straw)

参数	组别								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
酶解时长/h	4	8	12	16	20	24	48	60	96
吸光度	0.291	0.429	0.443	0.451	0.456	0.469	0.521	0.545	0.554
含糖量/%	17.8	26.4	27.3	27.8	28.1	29.0	32.2	33.7	34.3

1 mL 反应后的溶液,稀释 3 倍,按照实验方法用紫外可见分光光度计检测吸光度,并根据葡萄糖标准曲线计算出不同反应时间时秸秆酶解的还原糖含量。

由表 6 可见,汽爆后的水稻秸秆酶解还原糖含量最终稳定在 34.3%。

随酶解时长变化,原始水稻秸秆与汽爆后的水稻秸秆酶解还原糖含量对比见图 4。

由图可见,汽爆秸秆在酶解反应 8 h 内有一个

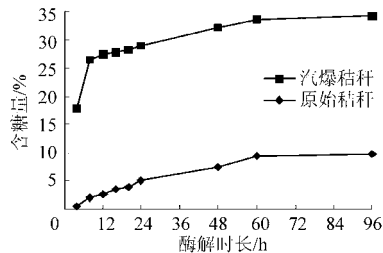


图 4 汽爆前后酶解时长与还原糖含量关系对比

Fig.4 Reducing sugar content vs reaction time(before and after steam explosion)

表 7 原始秸秆反应温度与还原糖含量关系

Tab.7 Reducing sugar content vs reaction temperature (rural rice straw)

参数	组别								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
反应温度/℃	20	25	30	35	40	45	50	55	60
吸光度	0.034	0.072	0.101	0.120	0.212	0.255	0.366	0.249	0.178
含糖量/%	0.6	1.4	2.5	3.0	4.3	5.2	7.5	5.1	3.6

表 8 汽爆秸秆反应温度与还原糖含量关系

Tab.8 Reducing sugar content vs reaction temperature (steam explosion rice straw)

参数	组别								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
反应温度/℃	20	25	30	35	40	45	50	55	60
吸光度	0.079	0.101	0.154	0.223	0.276	0.455	0.518	0.381	0.236
含糖量/%	4.8	6.2	9.5	13.8	17.1	28.3	32.2	23.7	14.6

随反应温度变化,原始水稻秸秆与汽爆后的水稻秸秆酶解还原糖含量对比见图 5。

由图 5 可见,当反应温度低于 50℃ 时,还原糖含量逐渐增高,反应温度高于 50℃ 后,还原糖量开始下降。50℃ 左右最有利于纤维素酶发生酶解作用。由斜率可见,在 40 ~ 45℃ 温度范围内,汽爆后的水稻秸秆受温度的影响更强烈。

由上述分析可知,加酶量占水稻秸秆干物质质

较快的上升速率,之后的反应速率较为平稳。8 h 酶解还原糖量约占总还原糖含量的 77%。48 h 酶解还原糖量约占总还原糖含量的 93.9%。

2.3.3 反应温度对还原糖含量的影响

(1)取原始水稻秸秆,依次粉碎、干燥、过 40 目筛,四分法取样。取 9 组 0.2 g 样品加入 20 mg 的纤维素酶,置于 50 mL 容量瓶内,分别在表 7 所示的温度下恒温反应 48 h。用紫外可见分光光度计检测溶液的吸光度,并根据葡萄糖标准曲线计算出不同反应温度的秸秆酶解后的还原糖含量。

(2)取在一定条件下汽爆后的水稻秸秆,依次粉碎、干燥、过 40 目筛,四分法取样。取 9 组 0.2 g 样品加入 20 mg 的纤维素酶,置于 50 mL 容量瓶内,分别在表 8 所示的温度下恒温反应 48 h。取 1 mL 反应后的溶液,稀释 3 倍,按照实验方法用紫外可见分光光度计检测吸光度,并根据葡萄糖标准曲线计算出不同反应温度的秸秆酶解后的还原糖含量。

量的 10%,酶解 48 h,反应温度控制在 50℃ 是汽爆后水稻秸秆较为理想的酶解反应条件。

3 结论

(1)3,5-二硝基水杨酸法检测还原糖含量误差不大于 1%,可以用于工厂和实验室的粗测定。当检测波长选择在 540 nm 时,检测结果较为精确。

(2)在水稻秸秆纤维素酶解工艺中,酶含量占

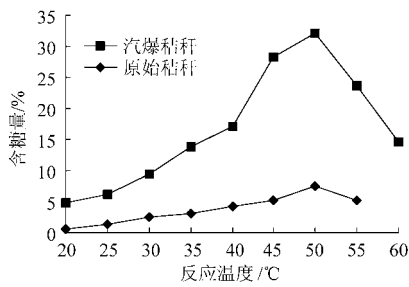


图 5 汽爆前后反应温度与还原糖含量关系对比
Fig.5 Reducing sugar content vs reaction temperature
(before and after steam explosion)

水稻秸秆干物质的 10%，酶解 48 h，反应温度 50℃，是较优且又符合实际生产的工艺条件。

(3)原始水稻秸秆最终酶解还原糖含量和 48 h 酶解还原糖含量分别占干物质的 9.7% 和 7.5%。

蒸汽爆破后的水稻秸秆最终酶解还原糖含量和 48 h 酶解还原糖含量分别占干物质质量的 34.3% 和 32.2%。

(4)充分酶解原始水稻秸秆需要 60 h 以上的反应时间。汽爆后的水稻秸秆 8 h 的酶解还原糖含量约占总还原糖含量的 77%，48 h 酶解还原糖含量约占总还原糖的 93.9%。蒸汽爆破预处理作用不仅能够显著提高水稻秸秆酶解的还原糖产量,还能大幅提高酶解的反应速率。

(5)对比文献[20]酶解汽爆酸化后的稻秸仅得到 14% 的还原糖,表明不同的蒸汽爆破加工条件会显著影响还原糖的最终产量,因此有必要对汽爆加工的工艺条件做进一步的研究。

参 考 文 献

1 Sen Yang, Ding Wenyong, Chen Hongzhang. Enzymatic hydrolysis of rice straw in a tubular reactor coupled with UF membrane [J]. Process Biochemistry, 2006, 41(3): 721 ~ 725.

2 Xu Zhong, Wang Qunhui, Jiang Zhaohua, et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated soybean straw [J]. Biomass and Bioenergy, 2007, 31(2/3): 162 ~ 167.

3 Sun Fubao, Chen Hongzhang. Enhanced enzymatic hydrolysis of wheat straw by aqueous glycerol pretreatment [J]. Bioresource Technology, 2008, 99(14): 6 156 ~ 6 161.

4 Ming Chen, Jing Zhao, Li Mingxia. Enzymatic hydrolysis of maize straw polysaccharides for the production of reducing sugars [J]. Carbohydrate Polymers, 2008, 71(3): 411 ~ 415.

5 Linoj K, Richard C, Pablo C A, et al. Can the same steam pretreatment conditions be used for most softwoods to achieve good, enzymatic hydrolysis and sugar yields [J]. Bioresource Technology, 2010, 101(20): 827 ~ 833.

6 Ankiö V, Matti S A, Liisa V. Restriction of the enzymatic hydrolysis of steam-pretreated spruce by lignin and hemicellulose [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2010, 46(3 ~ 4): 185 ~ 193.

7 Zhu Shengdong, Wu Yuanxin. Pretreatment by microwave/alkali of rice straw and its enzymic hydrolysis [J]. Process Biochemistry, 2005, 40(9): 3 082 ~ 3 086.

8 Baboukani B S, Vossoughi M, Alemzadeh I. Optimisation of dilute-acid pretreatment conditions for enhancement sugar recovery and enzymatic hydrolysis of wheat straw [J]. Biosystems Engineering, 2012, 111(2): 166 ~ 174.

9 刘海臣. 稻草秸秆同步糖化发酵制备纤维素乙醇的研究 [D]. 北京:中国矿业大学,2010.

Liu Haichen. Investigation on the production of cellulose ethanol from rice straw by simultaneous saccharification and fermentation [D]. Beijing: China University of Mining and Technology, 2010. (in Chinese)

10 Yu Hongbo, Zhang Xiaoyu, Song Lili, et al. Evaluation of white-rot fungi-assisted alkaline/oxidative pretreatment of corn straw undergoing enzymatic hydrolysis by cellulase [J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2010, 110(6): 660 ~ 664.

11 Heon K K, Juan H. Supercritical CO₂ pretreatment of lignocellulose enhances enzymatic cellulose hydrolysis [J]. Bioresource Technology, 2001, 77(2): 139 ~ 144.

12 杨培周,姜绍通,郑志,等. 碱性氧化物预处理玉米秸秆维管柱、皮层和表皮研究 [J]. 农业机械学报,2010,41(增刊): 137 ~ 140.

Yang Peizhou, Jiang Shaotong, Zheng Zhi, et al. Pretreatment of micro-column, cortex and epidermis of corn stover by alkali oxide. [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(Supp.): 137 ~ 140. (in Chinese)

13 杨培周,姜绍通,潘丽军,等. 玉米芯糖化微波与酸/碱联合预处理效果实验分析 [J]. 农业机械学报,2010,41(7):101 ~ 104.

Yang Peizhou, Jiang Shaotong, Pan Lijun, et al. Experiment analysis on pretreatment of corn cob saccharification by acid and alkali coordination with microwave [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2010, 41(7): 101 ~ 104. (in Chinese)

14 Gong Guifen, Liu Danyu, Huang Yudong. Microwave-assisted organic acid pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice straw [J]. Biosystems Engineering, 2010, 107(2): 67 ~ 73.

15 周礼玲,张新芹. 高效液相色谱-示差折光检测法同时测定替硝唑葡萄糖注射液 中替硝唑与葡萄糖的含量 [J]. 数理医药学杂志,2011,24(6):745 ~ 747.

Zhou Liling, Zhang Xinqin. Simultaneous assay of tinidazole and glucose in tinidazole and glucose injection by HPLC with rid

[J]. Journal of Mathematical Medicine, 2011, 24(6): 745 ~ 747. (in Chinese)

16 张莉萍,周明玉. 旋光法、阿贝折射仪、碘量法测定工业用葡萄糖含量比较[J]. 苏州医学院学报,1998,18(12):1 270 ~ 1 271.
Zhang Liping, Zhou Mingyu. Polarimetry, Abbe refractometer, iodometric method for the determination of glucose content for industrial using[J]. ACTA Academiae Medicinae Suzhou, 1998, 18(12): 1 270 ~ 1 271. (in Chinese)

17 Toma R B, Leung H K. Determination of reducing sugars in French fried potatoes by 3,5-dinitrosalicylic acid[J]. Food Chemistry, 1987, 23(1): 29 ~ 33.

18 Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. Analytical Chemistry, 1959, 31(3): 426 ~ 428.

19 黄晓钰,刘邻渭. 食品化学与分析综合实验[M]. 2 版. 北京:中国农业大学出版社,2009:138 ~ 139.

20 Vlasenko Y E, Ding H, Labavitch M J, et al. Enzymatic hydrolysis of pretreated rice straw[J]. Bioresource Technology, 1997, 59(2 ~ 3): 109 ~ 119.

21 宋孝周,吴清林,傅峰,等. 农作物与其剩余物制备纳米纤维素研究进展[J]. 农业机械学报,2011,42(11):106 ~ 112.
Song Xiaozhou, Wu Qinglin, Fu Feng, et al. Research progress of nanocrystalline cellulose prepared from crops and agricultural residues[J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2011,42(11):106 ~ 112. (in Chinese)

~~~~~

(上接第 118 页)

10 刘常昱,冯芒,戴晓军,等. 基于云 x 信息的逆向云新算法[J]. 系统仿真学报, 2004, 16(11): 2 417 ~ 2 420.  
Liu Changyu, Feng Mang, Dai Xiaojun, et al. A new algorithm of backward cloud[J]. Journal of System Simulation, 2004, 16(11): 2 417 ~ 2 420. (in Chinese)

11 陈昊,李兵. 基于逆向云和概念提升的定性评价方法[J]. 武汉大学学报:理学版, 2010, 56(6): 683 ~ 688.  
Chen Hao, Li Bing. Qualitative evaluation method based on backward cloud and concept generalizing[J]. Journal of Wuhan University: Natural Science Edition, 2010, 56(6): 683 ~ 688. (in Chinese)

12 张水华,孙君社,薛毅. 食品感官鉴评[M]. 广州:华南理工大学出版社, 1999: 36 ~ 38.

13 刘常昱,李德毅,杜鹂,等. 正态云模型的统计分析[J]. 信息与控制, 2005, 34(2): 236 ~ 239.  
Liu Changyu, Li Deyi, Du Yi, et al. Some statistical analysis of the normal cloud model[J]. Information and Control, 2005, 34(2): 236 ~ 239. (in Chinese)