

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2015.06.028

# 酶预处理对秸秆类原料厌氧发酵特性的影响<sup>\*</sup>

邓媛方<sup>1</sup> 邱凌<sup>2</sup> 黄辉<sup>1</sup> 戴本林<sup>1,3</sup> 王一线<sup>4</sup> 徐继明<sup>1,3</sup>

(1. 淮阴师范学院江苏省生物质能与酶技术重点实验室, 淮安 223300;

2. 西北农林科技大学机械与电子工程学院, 陕西杨凌 712100;

3. 淮阴师范学院江苏省区域现代农业与环境保护协同创新中心, 淮安 223300; 4. 淮安市农业委员会, 淮安 223001)

**摘要:** 为探索经木霉培养液预处理的秸秆厌氧消化产气特性, 利用实验室自制小型厌氧发酵装置, 在中温 ( $30 \pm 1$ ) °C 条件下, 分别对经预处理的稻秸、麦秆和稻麦秆混合物进行批次厌氧发酵试验。结果表明: 料液质量分数 10%、接种物质量分数 20% 条件下经木霉培养液预处理过的秸秆产气量有明显提升, 稻秸、麦秆、稻麦秆混合物总产气量分别达到 14 555、15 103、17 130 mL; 甲烷含量显著增长, 平均甲烷体积分数分别为 48.2%、45.4% 和 47.8%, 较对照组提高 205.1%、213.1%、214.5%。最高甲烷体积分数分别达 60.5%、66.1% 和 66.8%; 原料利用率较大提高, 化学需氧量 COD 日均降解量分别为 522.23、542.50、668.72 g/d, TS 产气率分别达 172.84、183.12、205.54 mL/g; 其中经预处理后的稻麦秆混合物在产气量增加的前提下, 大大缩短厌氧发酵时间 ( $DT_{90}$ : 17 d)。发酵过程 pH 值、挥发性脂肪酸 (VFA) 变化情况均在正常范围。

**关键词:** 秸秆 酶法预处理 沼气 厌氧发酵

中图分类号: X712 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2015)06-0201-06

## Effects of Enzymatic Pretreatment Straw Wastes on Its Characteristics of Anaerobic Digestion for Biogas Production

Deng Yuanfang<sup>1</sup> Qiu Ling<sup>2</sup> Huang Hui<sup>1</sup> Dai Benlin<sup>1,3</sup> Wang Yixian<sup>4</sup> Xu Jiming<sup>1,3</sup>

(1. Jiangsu Key Laboratory for Biomass-based Energy and Enzyme Technology, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China

2. College of Mechanical and Electronic Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

3. Jiangsu Collaborative Innovation Center of Regional Modern Agriculture & Environmental Protection, Huaiyin Normal University, Huaian 223300, China 4. Commission of Agriculture of Huaian, Huaian 223001, China)

**Abstract:** A biological pretreatment with *Trichoderma reesei* culture was used to pretreat straw wastes (i.e. rice straw, wheat stalk and their mixture) at ambient temperature ( $30 \pm 1$ ) °C to improve their biodegradability and anaerobic biogas production. The initial *Trichoderma reesei* spores dose was 200  $\mu$ L, it had twice expanding training, and the pretreatment time of 72 h was appropriate for biological pretreatment. These treatment conditions resulted in more total biogas yield, methane yield and shorter technical digestion time compared with the untreated sample. The total gas production from pretreated straw wastes reached the maximum of 14 555, 15 103 and 17 130 mL for rice straw, wheat straw and their mixture, respectively. The average methane concentration levels were at 48.2%, 45.4% and 47.8%, respectively. The highest methane concentrations were at 60.5%, 66.1% and 66.8%, respectively. The average methane concentrations were increased by 205.1%, 213.1% and 214.5% compared with the untreated sample. The values of pH, VFA were located in normal range. The average daily degradation values of COD reached 522.23, 542.50 and 668.72 g/d and TS degradative rates were

收稿日期: 2014-10-16 修回日期: 2014-11-31

\* 农业部农村能源科技专项资助项目(2013-30)和国家水电水利规划设计总院科研专项资助项目(KY-J2013-122)

作者简介: 邓媛方, 讲师, 主要从事生物质能源研究, E-mail: dengyf@hytc.edu.cn

通讯作者: 邱凌, 教授, 博士生导师, 主要从事生物能源与循环农业研究, E-mail: ql2871@126.com

172.84, 183.12 and 205.54 mL/g, respectively. The digestion time  $DT_{90}$  for pretreated straw waste which contained a mixture of rice straw and wheat stalk was calculated. The significant reduction of digestion time indicated that the straw had become more accessible and readily biodegradable after biological pretreatment.

**Key words:** Straw Enzyme pretreatment Biogas Anaerobic digestion

## 引言

秸秆作为重要的可再生资源,主要由木质素、纤维素及半纤维素构成。木质素属高分子芳香类聚合物,难以水解,而纤维素被木质素和半纤维素以共价键形式包裹其中,导致其难以降解<sup>[1-2]</sup>。因此将秸秆类原料直接用于厌氧发酵,水解酸化阶段往往是其限速步骤,延长发酵周期,难以应用推广。为提高秸秆类原料的甲烷转化率,需对其进行必要的预处理,目的在于破坏木质素结构。Zhu等<sup>[3]</sup>采用化学预处理手段对玉米、谷壳原料进行氢氧化钠溶液浸泡,有效提高挥发性固体(VS)产气率。孙辰等<sup>[4]</sup>采用NaOH对芦笋秸秆进行碱性化学预处理,大大提高发酵周期,甲烷体积分数最高达70%。闫志英等采用复合菌剂对玉米秸秆进行干式厌氧发酵,其沼气产量及甲烷含量明显高于未加菌剂预处理的秸秆<sup>[5]</sup>。刘荣厚等采用氨-生物联合预处理法探讨菌种添加量对小麦秸秆厌氧发酵产气性能的影响,大大缩短厌氧发酵周期的同时提高了产气量<sup>[6]</sup>。本文采用生物预处理手段,选择产纤维素酶能力最强的微生物里氏木霉(*Trichoderma reesei*)为秸秆预处理菌株,其安全无毒,不会对人和环境产生影响<sup>[7]</sup>,用其产生的富含纤维素酶培养物分别预处理稻秸、麦秆及稻麦混合原料,探索预处理后秸秆产气规律和特性,以期为秸秆沼气工程研究提供理论和实践参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与处理

#### 1.1.1 预处理酶液培养

配置0.5%的玉米浆3 mL装入试管,121℃灭菌20 min,接入里氏木霉孢子(*Trichoderma reesei*)200  $\mu$ L,在30℃恒温条件下摇床培养(200 r/min, 24 h)。将试管种子接入质量分数为0.5%的100 mL玉米浆摇瓶培养液中,30℃恒温条件下摇床培养(200 r/min, 24 h),进行酶液种子扩大培养。

稻秸、麦秆取自淮阴区郊区农田,自然风干,粉碎机粉碎,过筛(8目)。分别称取质量分数3%的稻秸(A)、麦秆(B)及稻麦混合物(质量比1:1,C)

的原料于500 mL锥形瓶中,配置成100 mL培养液,每瓶添加必须营养元素:玉米浆0.2%、硫酸铵0.3%、磷酸二氢钾0.2%、氯化钴20 mg/L、硫酸镁0.3 g/L、硫酸亚铁5 mL/L、硫酸锰1.6 mg/L、硫酸锌1.4 mg/L<sup>[8]</sup>,121℃灭菌20 min。另添加质量分数为0.01%的葡萄糖和0.03%的尿素(115℃灭菌15 min),置于摇床进行纤维素酶扩大培养(30℃, 200 r/min, 120 h),取样测其纤维素滤纸酶活(FPA),见表1。

表1 稻秸/麦秆对木霉孢子产酶效果影响

Tab.1 Effect of rice/wheat straw on cellulase production

处理	滤纸酶活 FPA/( $u \cdot mL^{-1}$ )	
	摇瓶试验	预处理后
空白对照 A	—	2.796 4
空白对照 B	—	2.135 6
空白对照 C	—	2.937 1
A	6.374 3	10.531 6
B	5.938 3	10.356 2
C	7.618 3	11.791 6

#### 1.1.2 秸秆预处理

秸秆预处理阶段在非密闭恒温环境中进行。将上述培养酶液100 mL分别倒入装有发酵原料A、B、C的敞口烧杯中,覆盖一层纱布,置于生化培养箱恒温培养(30℃, 72 h),同时设置空白对照,以清水替代酶液。预处理完毕,取样测定其FPA,见表1。由表1可知,经过72 h预处理,试验组A、B、C滤纸酶活有较大提高,木质纤维素降解为小分子糖是一个十分复杂的过程,需要几十种酶协同参与,首先通过机械粉碎作用帮助破坏秸秆木质纤维素结构,进而降解木质素、纤维素和半纤维素<sup>[9]</sup>。*Trichoderma reesei*已被证实能够分泌大量高效纤维素酶<sup>[10]</sup>,可有效分解经机械粉碎后的秸秆类原料,通过外切葡聚糖苷酶、内切葡聚糖苷酶及 $\beta$ -葡聚糖苷酶的协同作用将纤维素转换成葡萄糖<sup>[11]</sup>,可大大提高秸秆厌氧发酵水解酸化速率。同时也体现*Trichoderma reesei*容易培养和控制,生长环境条件粗狂,适应性强,易于控制管理的特点。分别对经预处理及厌氧发酵后试验组秸秆原料中主要成分进行分析,其变化结果见表2。

表2 秸秆主要物质组分成分变化(质量分数)

Tab.2 Changes of components of rice/wheat straw after pretreatments and anaerobic digestion %

处理	纤维素	半纤维素	木质素	
预处理后	A	37.51	17.62	9.67
	B	37.04	17.22	9.40
	C	37.31	17.51	9.39
厌氧发酵后	A	28.78	8.20	9.22
	B	28.41	7.72	8.93
	C	28.40	8.18	9.00

### 1.1.3 厌氧发酵

厌氧发酵阶段在密闭发酵罐中进行。料液质量分数10%、接种物质量分数20%,接种物取自实验室自行驯化的厌氧发酵污泥,pH值7.2,秸秆粉碎过筛(2目),粒径小于8mm,原料物料组成及接种物理化特性见表3。

表3 发酵原料及接种物理化特性

Tab.3 Physical and chemical characteristics of raw material and inoculum

项目	A	B	C	接种物
碳氮质量比	42.48	62.94	50.65	20
干物质质量分数/%	95	97	96	10
挥发性固体质量分数/%	89.78	88.37	89.11	84.95
纤维素质量分数/%	37.92	37.43	37.72	—
半纤维素质量分数/%	21.32	20.92	21.21	—
木质素质量分数/%	9.82	9.53	9.60	—

### 1.2 试验装置

水压式厌氧发酵装置<sup>[12]</sup>,由发酵瓶(2000mL密封罐)、集气瓶(2000mL)、集水瓶、电热恒温水箱等组成。采用排水法收集气体,为防止CO<sub>2</sub>溶解,集气瓶中用水pH值小于3。

### 1.3 试验设计

为探索秸秆酶法预处理厌氧发酵产气特性,在不影响产气效率前提下尽可能减少厌氧发酵外界辅助能耗,选择在(30±1)℃条件下进行厌氧发酵产气试验,试验方案见表4。同时设置对照组(清水替代酶液),每组试验重复3次,一次进料,7d内无气体产生则试验终止。

表4 试验方案

Tab.4 Experimental plan

处理	质量/g		预处理阶段		厌氧发酵阶段	
	稻秸	麦秆	酶液/mL	时间/h	H <sub>2</sub> O/mL	接种物/mL
A	84.21	—	100	72	615	200
B	—	82.47	100	72	617	200
C	42.10	41.23	100	72	616	200
对照A	84.21	—	—	72	715	200
对照B	—	82.47	—	72	717	200
对照C	42.10	41.23	—	72	716	200

### 1.4 检测方法

纤维素酶活测定采用QB 2583—2003中的方法;气体成分检测采用Geotech沼气气体分析仪(Biogas5000),排水法收集;TS测定:在(105±1)℃的干燥箱中干燥至质量恒定;VS测定:550℃灼烧至质量恒定;pH值测定:PHS-3C型pH计(上海精密科学仪器有限公司);纤维素、半纤维素和木质素:Van Soest中性、酸性纤维洗涤<sup>[13]</sup>;挥发性脂肪酸(VFA)采用紫外分光光度计比色法测定<sup>[14]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 木酶预处理对秸秆厌氧发酵产气量的影响

图1为厌氧发酵过程中分别对各组日产气量进行监测的情况。由图1可知,试验组A(稻秸)及试验组B(麦秆)作为单一原料厌氧发酵产气趋势整体一致,产气主要时间段位于中后期:试验组A首个产气高峰出现在启动后第2天,日产气率6.9mL/g,甲烷体积分数21.9%(图2)。之后产气率下降,直至第10天开始稳步回升。同时伴随甲烷含量的显著增长,进入产气产甲烷的稳定期;试验组B启动第1天即迎来第一个产气高峰,日产气率7.0mL/g,该气体组分中甲烷仅占14.3%(图2),半数以上气体成分经检测为CO<sub>2</sub>。试验组A、B厌氧发酵产气周期均为35d,至试验结束TS产气率分别达到172.84、183.12mL/g。

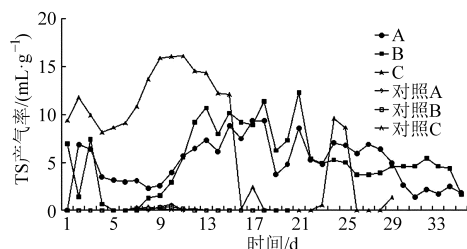


图1 秸秆厌氧发酵TS日产气率变化

Fig.1 Daily biogas TS production rate of straw wastes

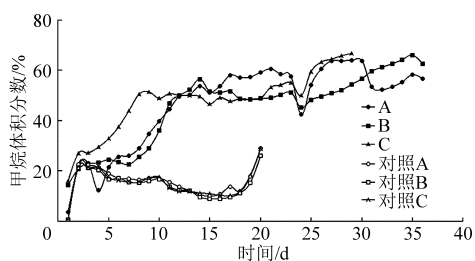


图2 秸秆厌氧发酵甲烷含量变化

Fig.2 Methane volume content of straw wastes during anaerobic digestion

试验组C(稻麦混合秸秆)集中产气出现在厌氧发酵中前期,并迅速进入产气产甲烷阶段,首个产气高峰出现在启动后第2天,日产气率11.8mL/g

(图1),甲烷体积分数26.9%(图2),最高日产气率达16.1 mL/g(第11天),前17 d累计产气15 443 mL,占总产气量的90.15%。稻麦混合预处理秸秆厌氧发酵有效产气时间 $DT_{90}$ 为17 d, $DT_{90}$ 表征厌氧发酵过程中产气潜力达到总产气量90%的时间<sup>[15]</sup>,可认为本次厌氧发酵基本完成<sup>[16]</sup>。之后其产气量迅速下降,至反应结束TS产气率达205.54 mL/g。与同期试验相比<sup>[5-6]</sup>,达到了预期的处理效果。经预处理的稻麦混合发酵原料,在产气量显著提升的同时有效缩短了厌氧发酵周期,提高了秸秆类原料厌氧发酵入池周转效率,经生物预处理,纤维素及半纤维素被大量分解,沼气微生物营养

充足代谢快速,日产气量增加,随着底物不断消耗,产气量逐渐降低,直至产气停止<sup>[17]</sup>。

对试验组及对照组产气量及产气率情况进行统计,见表5。对表5数据进行单因素方差分析,由Bonferroni统计检验结果表明:预处理组A、B、C总产气量、日均产气量、池容产气率及TS产气率均显著高于对照组( $p < 0.05$ )。秸秆先经机械粉碎破坏木质素结构有利水解进行,再经酶液预处理,其纤维素、半纤维素等大分子有机聚合物被进一步水解成糖、醇、酸,最终转变成甲烷菌可直接利用的底物发酵产气,显著提高了秸秆产气效率。

表5 试验组及对照组产气情况比较

Tab.5 Biogas production comparison between different groups

参数	试验组			对照组		
	A	B	C	A	B	C
总产气量/mL	14 555	15 103	17 130	106	93	82
日平均产气量/(mL·d <sup>-1</sup> )	428.1	472.0	552.6	5.3	4.7	4.1
池容产气率/(m <sup>3</sup> ·m <sup>-3</sup> ·d <sup>-1</sup> )	0.214 0	0.236 0	0.276 0	0.002 7	0.002 3	0.002 1
TS产气率/(mL·g <sup>-1</sup> )	172.84	183.12	205.54	1.26	1.13	0.98

## 2.2 木酶预处理对秸秆厌氧发酵甲烷含量的影响

对每天所产气体组分进行监测可知,启动初期,CO<sub>2</sub>浓度整体偏高。图2为预处理原料厌氧发酵甲烷含量变化趋势,由图2可知,试验组A、B、C甲烷浓度分别从第10、9和6天开始迅速攀升,最高体积分数分别达60.5%、66.1%、66.8%。对照组甲烷含量未见显著升高,甲烷含量的显著变化原因在于:发酵初始阶段,产酸菌活性逐渐增大,pH值显著下降,影响甲烷菌生长繁殖,甲烷浓度低,随着甲烷细菌数量增加,甲烷体积分数开始提高并趋于稳定<sup>[18]</sup>。

图3为厌氧发酵平均甲烷体积分数对比图,由图3可知,直至厌氧发酵结束,试验组A、B、C平均甲烷体积分数分别为48.2%、45.4%和47.8%,相对于对照试验组分别提高205.1%、213.1%、214.5%。对图3数据进行整理,采用Stata 9.0数据处理软件进行数据分析,数据方差齐性且服从正态分布,采用成组 $t$ 检验, $p < 0.000 1$ 。可知,采用酶

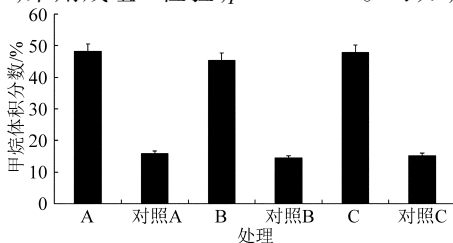


图3 秸秆厌氧发酵平均甲烷体积分数

Fig.3 Average volume fraction of methane

法预处理的秸秆原料平均甲烷浓度明显高于对照组平均甲烷浓度,并且差异具有统计学意义。

## 2.3 木酶预处理对秸秆厌氧发酵pH值的影响

图4为不同试验组秸秆厌氧发酵pH值的变化曲线。沼气发酵正常进行所需pH值范围在4.0~8.5之间,以pH值7.0最宜<sup>[19]</sup>。在厌氧发酵过程中,不同组分发酵液pH值变化趋势大致相同,先下降后回升。其中试验组A、B在试验初期pH值下降较快,最低时为5.4左右,尚处于水解酸化阶段<sup>[20]</sup>,后稳步调整回升,试验停止后A、B、C组均维持在pH值7.0左右。pH值的震荡回升说明甲烷菌活性增强并开始利用发酵底物进行代谢。

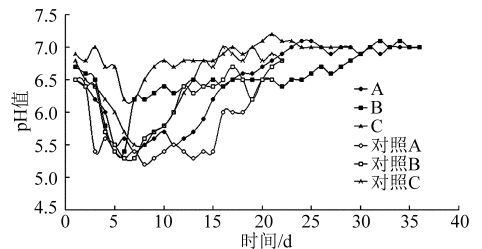


图4 秸秆厌氧发酵pH值的变化

Fig.4 pH value variation of straw wastes during anaerobic digestion

## 2.4 木酶预处理对秸秆厌氧发酵VFA浓度的影响

挥发性脂肪酸(VFA)是厌氧发酵产甲烷过程中的重要中间产物,图5为厌氧发酵过程中VFA变化情况,各试验组VFA浓度均呈现先快速增长后平缓回落趋势。试验组A、B、C在发酵初始阶段VFA

质量浓度分别达到 15 875、16 180、12 570 mg/L,随着反应进行 VFA 质量浓度分别在第 5、5 和 7 天达到峰值 42 725、40 845、34 025 mg/L。反应初期发酵罐中 VFA 质量浓度呈快速攀升状态,加之罐内尚有氧气余存,整体呈现对甲烷菌生长的抑制状态,厌氧发酵处于水解酸化阶段,发酵细菌将不溶性大分子有机物分解为小分子水溶性的低脂肪酸物料,其中一类能被甲烷菌直接利用(如乙酸、甲酸等),产氢、产乙酸菌将另一类不能被甲烷菌直接利用的有机物(如丙酸、丁酸等)进一步转化为氢气和乙酸。待厌氧环境基本形成,甲烷菌开始成为优势菌群,进入甲烷化阶段,产甲烷菌将乙酸转化为  $\text{CH}_4$  和  $\text{CO}_2$ ,利用  $\text{H}_2$  还原  $\text{CO}_2$  生成  $\text{CH}_4$ ,或利用其他细菌产生甲酸形成  $\text{CH}_4$ ,此阶段大量有机酸被分解利用,VFA 浓度

开始降低<sup>[21]</sup>。直至反应结束,试验组 A、B、C 质量浓度分别降为 6 420、8 115、6 625 mg/L。

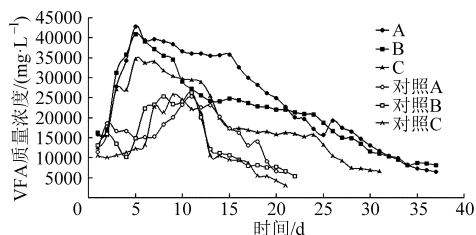


图5 秸秆厌氧发酵过程 VFA 变化

Fig. 5 VFA value variation of straw wastes during anaerobic digestion

## 2.5 木酶预处理秸秆厌氧发酵前后物料成分变化

分别对试验组及对照组厌氧发酵前后的 pH 值、VFA 及 COD 日均降解量进行测定对比分析,结果见表 6。

表 6 秸秆厌氧发酵前后料液成分变化情况

Tab. 6 Composition change of fermentative fluid before and after anaerobic digestion

参数	A		B		C		对照组 A		对照组 B		对照组 C	
	前	后	前	后	前	后	前	后	前	后	前	后
pH 值	6.6	7.0	6.7	7.0	6.9	7.0	7.0	5.4	7.0	5.2	7.0	6.2
挥发性脂肪酸质量浓度/( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	15 875	6 420	16 180	8 115	12 570	6 625	11 390	6 543	13 035	5325	10 532	3 029
COD 日均降解量/( $\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ )	522.27		542.50		668.72		2.12		1.73		1.57	

结果显示,对照组 A、B、C 在启动条件相同的条件下直至试验结束料液仍呈酸性状态。试验组 A、B、C 虽然在厌氧发酵过程中 pH 值波动较大,但同时显示出较强的酸碱调节能力,试验结束,料液 pH 值呈中性;试验组 A、B、C 厌氧发酵前后料液中 VFA 质量浓度变化明显,先积累攀升后出现减量趋势,但产气量仍维持在较高水平(图 1),造成这一现象的原因可从产甲烷相的两种途径解释:①甲烷菌直接利用有机酸经生物质转换成沼气。②甲烷菌自身代谢产生二氧化碳和氢气<sup>[5]</sup>。通过甲烷体积分数维持在较高水平(图 2),判断本试验产生现象的原因属于前者,但仍需进一步研究探明机理;COD 被普遍用来表示原料中有机质的量,可利用 Buswell 公式推算出理论产气率,即每去除 1 g COD,可生成 0.25 g 甲烷<sup>[22]</sup>。COD 日均降解量从侧面反映了甲烷菌利用原料中有机物的能力,由表 6 可知,通过酶法预处理的秸秆,进行厌氧发酵其 COD 日均降解量较对照组显著提高,原料利用率有效提高,甲烷菌生物降解能力增强。

采用 Stata 9.0 数据分析软件对表 6 中 COD 日均降解量预处理前后变化水平进行分析。 $\alpha =$

0.05,由正态性检验可知  $p = 0.2481 > \alpha$ ,故可认为数据资料近似服从正态分布,采用配对  $t$  检验。由配对  $t$  检验可知, $p = 0.0063 < \alpha$ ,所以,采用酶法预处理后的秸秆类原料其 COD 平均降解量有较大提高且具有统计学意义。

## 3 结论

(1) 经过木霉培养液预处理后的秸秆厌氧发酵产气情况较对照组有较大提高,试验组 A、B、C 总产气量分别达到 14 555、15 103、17 130 mL。

(2) 经预处理秸秆厌氧发酵,甲烷浓度大大提高,试验组 A、B、C 平均甲烷体积分数分别为 48.2%、45.4% 和 47.8%,较对照组分别提高 205.1%、213.1%、214.5%,最高甲烷体积分数分别达到 60.5%、66.1% 和 66.8%。

(3) 将经预处理后的稻麦秆混合物用于厌氧发酵产沼气,能够明显缩短水解酸化时间,有效提高沼气原料利用率,DT<sub>90</sub> 为 17 d,大大缩短厌氧发酵周期,提高原料周转率。试验组 A、B、C, COD 日均降解量分别为 522.23、542.50、668.72 g/d,TS 产气率分别达到 172.84、183.12、205.54 mL/g。

## 参 考 文 献

- 1 Ahring B K, Licht D, Schmidt A S, et al. Production of ethanol from wet oxidised wheat straw by *Thermoanaerobacter mathranii* [J]. *Bioresource Technology*, 1999, 68(1): 3-9.
- 2 Liu H W, Walter H K, Vogt G M, et al. Steam pressure disruption of municipal solid waste enhances anaerobic digestion kinetics and biogas yield[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, 77(2): 121-130.
- 3 Zhu Jiying, Wan Caixia, Li Yebo. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(19): 7523-7528.
- 4 孙辰, 刘荣厚, 覃国栋. 芦笋秸秆预处理与厌氧发酵制取沼气试验[J]. *农业机械学报*, 2010, 41(8): 94-99.  
Sun Chen, Liu Ronghou, Qin Guodong. Experiments on pretreatment and anaerobic digestion of asparagus stalk for biogas production [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2010, 41(8): 94-99. (in Chinese)
- 5 闫志英, 袁月祥, 刘晓风, 等. 复合菌剂预处理秸秆产沼气[J]. *四川农业大学学报*, 2009, 27(2): 176-179.  
Yan Zhiying, Yuan Yuexiang, Liu Xiaofeng, et al. A study on biogas fermentation with straws[J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2009, 27(2): 176-179. (in Chinese)
- 6 刘荣厚, 吴晋锴, 武丽娟. 菌种添加量对生物预处理小麦秸秆厌氧发酵的影响[J]. *农业机械学报*, 2012, 43(11): 147-151.  
Liu Ronghou, Wu Jinkai, Wu Lijuan. Effects of supplement dose of microorganism in biological pretreatment of wheat straw on its characteristics of anaerobic digestion for biogas production [J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2012, 43(11): 147-151. (in Chinese)
- 7 Reczey K, Szengyel Z S, Eklund R, et al. Cellulase production by *T. reesei* [J]. *Bioresource Technology*, 1996, 57(1): 25-30.
- 8 Haggstrom L, Ljunggren J, Ohman L. Metabolic engineering of animal cells [J]. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1996, 782(1): 40-52.
- 9 田朝光, 马延和. 真菌降解木质纤维素的功能基因组学研究进展[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(10): 1333-1339.  
Tian Chaoguang, Ma Yanhe. Progress in lignocellulose deconstruction by fungi [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2010, 26(10): 1333-1339. (in Chinese)
- 10 Zaldivar M, Velasquez J C, Contreras L, et al. *Trichoderma aureoviride* 7-121, a mutant with enhanced production of lytic enzymes: its potential use in waste cellulose degradation and/or biocontrol [J]. *Environmental Biotechnology*, 2001, 4(3): 1-7.
- 11 Muthuvelayudham R, Viruthagiri T. Fermentative production and kinetics of cellulose protein on *Trichoderma reesei* using sugarcane bagasse and rice straw [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(20): 1873-1881.
- 12 邓媛方. 蘑菇废弃菌棒和猪粪混合厌氧发酵特性研究 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.  
Deng Yuanfang. Research on anaerobic co-digestion of mushroom cultivation wastes and pig manure [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2012. (in Chinese)
- 13 Van Soest P J. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds [J]. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*, 1963, 46: 825.
- 14 魏复盛, 齐文起, 孙宗光, 等. 水和废水检测分析方法 [M]. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002: 200-284.
- 15 Zhong Weizhang, Zhang Zhongzhi, Luo Yijing, et al. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(24): 11177-11182.
- 16 Young Chaesong. Mesophilic and thermophilic temperature co-phase anaerobic digestion compared with single-stage mesophilic and thermophilic digestion of sewage sludge [J]. *Water Research*, 2004, 38(7): 1653-1662.
- 17 Jin Seop Bak, Myoung Dong Kim, In-Geol Choi, et al. Biological pretreatment of rice straw by fermenting with *Dichomitus squalens* [J]. *New Biotechnology*, 2010, 27(4): 424-434.
- 18 Feijoo G, Mendez R, Lema J M. Sodium inhibition in the anaerobic digestion process: antagonism and adaptation phenomena [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1995, 17(2): 180-188.
- 19 Herbert H P Fang, Hong Liu. Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture [J]. *Bioresource Technology*, 2002, 82(1): 87-93.
- 20 Lee D H, Behera S K, Kim J, et al. Methane production potential of leachate generated from Korean food waste recycling facilities: a lab scale study [J]. *Waste Management*, 2009, 29(2): 876-882.
- 21 Komemoto K, Lim Y G, Nagao N. Effect of temperature on VFA's and biogas production in anaerobic solubilization of food waste [J]. *Waste Management*, 2009, 29(2): 2950-2955.
- 22 Buswell A M, Muller H F. Mechanics of methane fermentation [J]. *Journal of Industrial Engineering Chemistry*, 1955, 44(3): 550-559.