

doi:10.6041/j.issn.1000-1298.2017.10.032

低温冻融-酶解预处理对稻秆厌氧发酵产气特性的影响

邓媛方^{1,2} 邱凌^{1,3} 王雅君^{1,3} 戴本林^{2,4} 徐继明^{2,4}

(1. 西北农林科技大学机械与电子工程学院, 陕西杨凌 712100;

2. 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;

3. 西北农林科技大学农业部农村可再生能源开发利用西北科学观测实验站, 陕西杨凌 712100;

4. 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)

摘要: 为利用我国寒冷地区天然冷资源,在实验室模拟低温环境(Z组: -4°C , S组: -20°C),探索低温冻融及纤维素酶液预处理对水稻秸秆中温厌氧发酵产气特性的影响。结果表明,浸泡温度 30°C 、浸泡时间 4 h、液固比 15 mL/g 条件下水稻秸秆持水力最佳。冷冻后解冻液中木糖质量(Z3组: 6.5 g, S2组: 7.2 g)大幅增加,半纤维素转化率(Z3组: 24.1%, S2组: 26.6%)增幅显著($p < 0.05$)。经纤维素酶解后其水解液中葡萄糖质量(Z3组: 13.5 g, S2组: 14.5 g)大幅增加,纤维素转化率(Z3组: 30.9%, S2组: 33.2%)增幅显著($p < 0.05$)。对预处理后的原料进行厌氧发酵,累计产气量最高 543 mL,较 CK 提升 73.5% (S4组),平均甲烷体积分数最高提升 160.4% (S2组),且随着冷冻时间的延长(Z组 48 h 以上, S组 24 h 以上)厌氧发酵周期缩短(共 19 d),产气高峰提早到来且峰值较高。过酸化现象得到有效缓解,能够更快地进入到甲烷化阶段。

关键词: 水稻秸秆; 低温冻融; 酶解; 厌氧发酵; 产气特性

中图分类号: X712 文献标识码: A 文章编号: 1000-1298(2017)10-0260-06

Effect of Freeze-thaw and Enzymatic Pretreatment of Rice Straw on Biogas Production by Anaerobic Digestion

DENG Yuanfang^{1,2} QIU Ling^{1,3} WANG Yajun^{1,3} DAI Benlin^{2,4} XU Jiming^{2,4}

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

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

3. Western Scientific Observing and Experimental Station for Development and Utilization of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China

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

Abstract: In order to use of the outdoor cold climate resources as the low-temperature reaction condition, the objective of this research was to investigate the effect of freeze-thaw treatment (Z groups: -4°C , S groups: -20°C) on the efficiency of hemicellulose degradation and enzymatic hydrolysis pretreatment of rice straw to improve its biodegradability and anaerobic biogas production. A new low temperature freeze-thaw pretreatment development pathway was created for the pre-processing research and development. The results showed that water holding capacity was optimal when soaking temperature was 30°C , time was 4 h, and liquid-solid ratio was 15 mL/g. Under low temperature freeze-thaw condition, the contents of xylose in the liquid hydrolysates were increased (Z3: 6.5 g, S2: 7.2 g), hemicellulose conversion rate reached 24.1% (Z3) and 26.6% (S2), which were improved significantly ($p < 0.05$). Glucose yield were increased (Z3: 13.5 g, S2: 14.5 g) after enzymatic hydrolysis, cellulose conversion rate reached 30.9% (Z3) and 33.2% (S2), which were improved significantly ($p < 0.05$). These treatments conditions resulted in the highest total biogas yield (543 mL, S4), compared with the CK, the total biogas yield from S4 was improved by 73.5%. The highest average methane concentrations level was

收稿日期: 2016-10-24 修回日期: 2016-11-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(51576167)和淮安市重点研发(社会发展)计划项目(HAS201601、HAS201601-3、HAS201601-4)

作者简介: 邓媛方(1985—),女,博士生,淮阴师范学院讲师,主要从事生物质能源方面的研究, E-mail: dengyf@hytc.edu.cn

通信作者: 邱凌(1957—),男,教授,博士生导师,主要从事生物能源与生态环境方面的研究, E-mail: ql2871@126.com

51.3% (S2), compared with CK, it was improved by 160.4% (S2). Extension of time for freeze was apt to shorten the anaerobic fermentation period in the next anaerobic digestion. The digestion time for pretreatment rice straw (Z groups freeze-thaw treatment time was above 48 h, S groups freeze-thaw treatment time was above 24 h) was calculated as 19 d, and the peak values of gas production came earlier than those of other groups. The significant reduction in digestion time indicated that the straw had become more accessible and more readily biodegradable after biological pretreatment. Freeze-thaw and enzymatic pretreatment could be an effective method for improving biodegradability and enhancing the highly efficient biological conversion of rice straw into bioenergy.

Key words: rice straw; low-temperature freeze-thaw; enzymatic hydrolysis; anaerobic digestion; biogas

引言

生物质沼气化利用主要是指农、林有机废弃物在厌氧环境中利用微生物作用将生物质能转换为沼气的过程。生物质主要由纤维素(40%~50%)、半纤维素(20%~30%)及木质素(5%~30%)组成^[1],其化学性质稳定,难以降解,直接作为厌氧发酵原料产气率低且厌氧发酵周期长^[2]。通常情况下,需要对这类原料进行有效的预处理,目的在于打破纤维素的晶体结构,从而提高厌氧发酵的消化效率^[3]。

目前,针对纤维素类秸秆常规的预处理方法包括物理法^[4-5]、化学法^[6-7]、生物法^[8-9]。物理法通过机械外力破坏植物细胞壁和纤维素的晶体结构,使原料更易于微生物的侵入及分解。化学法利用化学试剂的腐蚀性和氧化性,水解纤维素原料,但同时也易造成二次污染及容器的腐蚀。生物法利用好氧微生物,分解纤维木质素,与物理法和化学法相比较具有反应温和、能耗小,设备简单,低污染等诸多优点^[10]。

低温冻融技术最早在细胞物质的提取^[11-12]、食品保鲜^[13-14]及对寒冷地区隧道围岩的冻胀破坏机制方面^[15-16]有较为广泛的应用和研究。依据 GB50176—93《民用建筑热工设计规范》对气候划分,我国东北、华北地区天然冷资源丰富,其中东北地区最冷月平均温度在 -10°C 以下,全年 145 d 日平均温度 5°C 以下^[17]。

本文利用我国寒冷地区丰富的天然冷资源,实验室内模拟室外低温环境,采用低温冻融技术对水稻秸秆进行冻融处理,利用低温使秸秆表面空隙中游离水冻结冰体积膨胀,从而破坏秸秆晶体结构,增加后续酶解时酶的可及度,旨在厌氧发酵产沼气时能够更好地降解底物。

1 材料与方 法

1.1 原料

水稻秸秆取自江苏省淮阴区郊区农田,自然风

干,粉磨机粉碎过筛(筛分粒度 10 目)。接种物取自实验室自行驯化的厌氧发酵污泥,pH 值 7.1。原料理化性质如表 1 所示。

表 1 发酵原料及接种物理化特性

Tab.1 Physicochemical properties of raw material and inoculum

参数	原料	
	水稻秸秆	接种物
碳氮比	42.48 ± 1.05	20.00 ± 0.25
总固体质量分数/%	95.00 ± 0.53	10.00 ± 0.13
纤维素质量分数/%	39.32 ± 0.95	
半纤维素质量分数/%	24.32 ± 0.32	

1.2 低温冻融及酶解处理

低温冻融试验是在实验室内模拟寒冷地区低温环境。为证明低温冻融对水稻秸秆内部结构的破坏作用及对纤维素酶解的影响,选取浸泡温度、浸泡时间、液固比及冷冻温度、冷冻时间作为试验因素,考察浸泡温度(5、30、50、70 $^{\circ}\text{C}$)、浸泡时间(2、4、16 h)、液固比(1、5、15、20 mL/g)、冷冻温度(-4°C 、 -20°C)、冷冻时间(12、24、48、72 h)及酶水解对水稻秸秆纤维素、半纤维素转换率和水解液中还原糖含量的影响。对冻融稻秆进行酶水解处理,纤维素酶液培养依据文献[18]提供的方法进行。里氏木霉孢子(*T. reesei* RUT C30)培养自江苏省生物质能与酶重点实验室,菌体浓度 1×10^6 CFU/mL。按照冷冻温度不同,设置 -4°C 低温冻融组(Z组,Z1~Z4分别表示冷冻时间 12、24、48、72 h)和 -20°C 低温冻融组(S组,S1~S4分别表示冷冻时间 12、24、48、72 h),每组 2 次重复,同时设置对照组 CK(秸秆筛分粒度小于 10 目,不经低温冻融及酶处理)。

1.3 厌氧发酵试验

采用批式单相厌氧发酵工艺对预处理 Z 组、S 组及 CK 进行厌氧发酵产沼气试验,发酵罐为 2 L 密闭容器,恒温水浴保温(30 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,每组发酵原料 100 g,接种物质量分数 20%,料液质量分数 12%,初始 pH 值 7.0~7.2。采用排水法收集产生气体,隔天取样测量发酵液 pH 值及挥发性脂肪酸(VFA)含量。

1.4 检测方法

纤维素、半纤维素测量依据 SOEST^[19] 的粗纤维测定法;还原性糖测定依据 DNS 法^[20];气体成分测定利用 Geotech 沼气气体分析仪 (Biogas 5000 型);总固体测定方法为 (105 ± 1) °C 的干燥箱中干燥至质量恒定;pH 值测定利用 pH 计 (PHS-3C 型,上海精密科学仪器有限公司);挥发性脂肪酸 (VFA) 测定利用气相色谱仪 (GC-2014 型,日本岛津)^[21]。总碳 (TOC) 测定利用总有机碳分析仪 (日本岛津);总氮 (TN) 测定依据凯氏定氮法;产气量测定方法为排水法收集气体,量筒测定其体积。

1.5 计算公式

试验中水稻秸秆持水力及纤维素、半纤维素转化率计算公式为^[22-23]

$$H = \frac{m_w - m_d}{m_d} \times 100\% \quad (1)$$

$$T_{cel\ conv.} = \frac{0.9m_{glu}}{m_{cel}} \times 100\% \quad (2)$$

式中 H ——持水力, %

m_w ——吸饱水稻秆质量, g

m_d ——初始稻秆质量, g

$T_{cel\ conv.}$ ——纤维素转化率, %

m_{glu} ——葡萄糖质量, g

m_{cel} ——纤维素质量, g

$$T_{hcel\ conv.} = \frac{0.9m_{xyl}}{m_{hcel}} \times 100\% \quad (3)$$

式中 $T_{hcel\ conv.}$ ——半纤维素转化率, %

m_{xyl} ——木糖质量, g

m_{hcel} ——半纤维素质量, g

2 结果与讨论

2.1 浸泡试验

由浸泡温度和浸泡时间对水稻秸秆持水能力的影响可知,在一定范围内随着浸泡温度的升高和浸泡时间的延长,水稻秸秆持水力有增大趋势,但增势明显减缓。浸泡温度分别为 50 °C 和 70 °C 条件下,持水力仅由 430% 增至 433%。浸泡时间由 4 h 延长至

16 h,持水力仅由 423% 增至 428%。本试验使用的水稻秸秆含水率低,总固体质量分数为 95%。采用低温冻融的方式对水稻秸秆进行处理的实质是利用水分结冰膨胀从而破坏木质纤维晶体结构。秸秆作为木质纤维素原料,其纤维素的游离羟基与水分子的结合仅发生在无定形区^[24],通过延长浸泡时间和适当增加浸泡温度的方式可使纤维素分子与水分子间以氢键方式结合,溶液吸入生物质内部,从而提高纤维素原料本身的吸水及持水能力^[25]。

浸泡温度、浸泡时间、液固比对稻秆原料纤维素转化率和浸泡液中还原糖含量的影响如图 1 所示。可知,通过提高浸泡温度、延长浸泡时间等外部条件的改变,可以增加纤维素无定形区游离羟基对水溶液的吸附,提升秸秆原料本身吸水及持水能力,同时秸秆内部因内聚力减少而容积增大,纤维素结晶区内发生润胀,破坏其晶体结构。由图 1 可知,随着浸泡温度及浸泡时间的增加,浸泡液中葡萄糖和木糖质量都有所增加,半纤维素转化率 (3.0% ~ 6.3%) 明显高于纤维素转化率 (0.2% ~ 1.4%)。当液固比为 15 mL/g 时,半纤维素转化率最高 5.6%,纤维素转化率最高 0.9%。半纤维素具有亲水性能,适当地增加浸泡时间及温度,有利于造成细胞壁的润胀及纤维素和半纤维素的水解。综合考虑能耗及效率产出选取浸泡时间 4 h、浸泡温度 30 °C、液固比 15 mL/g 作为水稻秸秆低温冻融前的浸泡条件。

2.2 低温冻融试验

对浸泡后的水稻秸秆进行低温冻融试验,在实验室内模拟寒冷地区低温环境,分别选取 -4 °C 和 -20 °C 作为冷冻温度,室温 (20 °C) 下自然解冻。考察不同冷冻时间对稻秆原料纤维素、半纤维素转化率及解冻液中还原性糖含量的影响,如图 2 所示。由图 2 可知,通过降低冷冻温度可缩短冷冻时间。经低温冻融后,100 g 秸秆原料解冻液中葡萄糖质量 (0.8 ~ 1.9 g) 和木糖质量 (2.5 ~ 7.4 g) 均明显增加,半纤维素转化率 (9.3% ~ 27.4%) 高于纤维素转化率 (1.8% ~ 4.3%)。由图 2 可知, -4 °C 冻融条件下,稻秆原料半纤维素转化率随冷冻时间的延

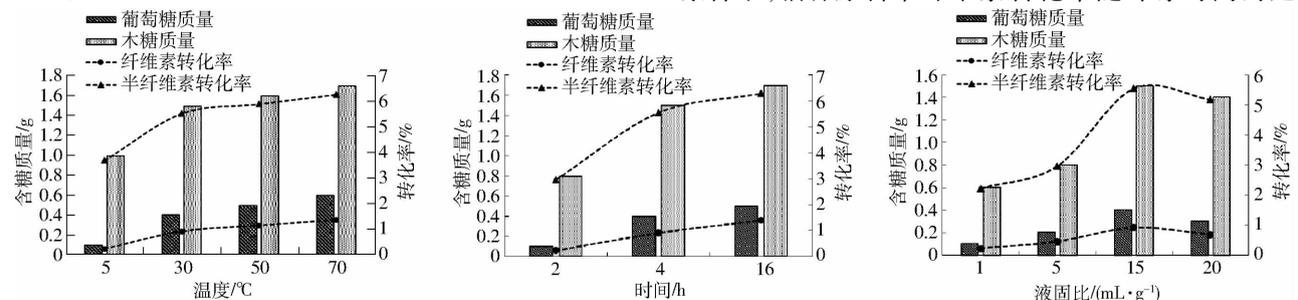


图 1 浸泡条件对纤维素、半纤维素降解的影响

Fig. 1 Effect of soaking temperature, time and solid-liquid ratio on degradation of cellulose and hemicellulose

长呈递增趋势,Z3 组解冻液中木糖质量达 6.5 g,半纤维素转化率为 24.1%,距上一水平梯度(Z2 组)环比增长 103.1%,增幅显著($p < 0.05$)。由图 2 可知,-20℃冻融条件下,S2 组解冻液中木糖质量达 7.2 g,半纤维素转化率 26.6%,环比增长 105.7%,增幅显著($p < 0.05$)。随着冷冻温度的降低,更有利于短时间内半纤维素的水解。通过有效的浸泡增加了木质纤维素的微孔结构中含水率,低温结冰体积膨胀,膨胀一方面破坏了纤维素的晶体结构,另一方面破坏了纤维素、半纤维素及木质素之间的氢键连接,使结构变得松散,有利于下一步对木质纤维素进行降解。

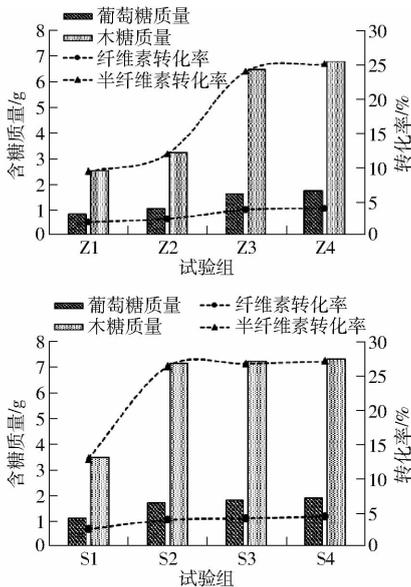


图 2 冷冻时间对纤维素、半纤维素降解的影响

Fig. 2 Effect of freezing time on degradation of cellulose and hemicellulose

2.3 纤维素酶解试验

对解冻后的秸秆原料进行纤维素酶液处理。酶解后的秸秆原料中纤维素、半纤维素转化率及还原糖含量变化如图 3 所示。由图 3 可知,酶解后的原料水解液中葡萄糖质量(7.2 ~ 14.5 g)大幅度提升,纤维素转化率(16.5% ~ 33.2%)高于半纤维素转化率(1.5% ~ 2.6%)。其中 Z3 组酶解液中葡萄糖质量达 13.5 g,纤维素转化率为 30.9%,距上一水平梯度(Z2 组)环比增长 58.8%;S2 组酶解液中葡萄糖质量达 14.5 g,纤维素转化率达 33.2%,环比增长 70.6%。通过低温冻融处理改变秸秆结构形态,增加了秸秆原料的孔隙体积和纤维素内部可及面的区域,将酶解过程与低温冻融处理相结合,促进了酶与生物质的接触,经过低温冻融处理后酶解的作用空间进一步加大,从而提高了纤维素的转化率^[26-27]。

2.4 厌氧发酵试验

预处理的目的是将水稻秸秆中纤维素和半纤维

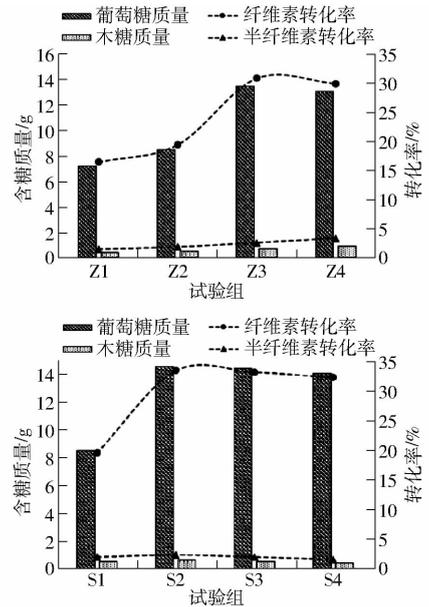


图 3 纤维素酶水解对纤维素、半纤维素降解的影响

Fig. 3 Effect of enzymatic hydrolysis on degradation of cellulose and hemicellulose

素分解为含六碳糖和五碳糖的混合溶液。当这些溶解性糖类作为主要基质进行厌氧发酵反应时,因糖类有机物代谢速度快,产酸过程迅速,从而使得产甲烷阶段成为厌氧发酵反应的限速步骤。

2.4.1 水稻秸秆厌氧发酵产气特性

对完成预处理的水稻秸秆原料进行厌氧发酵产沼气试验,沼气产量和甲烷体积分数是衡量其生物质转化效率的主要指标,其产气特性如图 4 所示。由图 4 可知,经低温冻融与酶解相结合处理后的秸秆原料,其产气能力较对照(CK)组明显提升,最高累计产气量 543 mL(S4 组)较 CK 组增加 73.5%,且产气高峰期明显提前,Z3、Z4、S2、S3、S4 组沼气产量在第 5 天达到峰值(峰值范围 100 ~ 118 mL/d),发酵周期共 19 d,Z1、Z2、S1 组产气高峰出现在第 7 天(峰值范围 80 ~ 93 mL/d),发酵周期共 23 d。随着冷冻时间的延长(Z 组 48 h 以上,S 组 24 h 以上)厌氧发酵周期缩短 17.4%,产气高峰提前 2 d,且峰值范围高于其他组 20.0% ~ 21.2%。

由图 4 可知,除 CK 组外,其余组甲烷体积分数快速增加,5 d 后均稳定在 40% 以上,进入正常产甲烷阶段。该阶段各试验组甲烷体积分数与预处理阶段水解液中葡萄糖质量呈正相关,葡萄糖易被厌氧微生物分解利用,发酵液中葡萄糖质量的增加,可满足厌氧发酵初期厌氧微生物快速繁殖对易分解有机物的需要,提高厌氧微生物活性,短时间内使系统内厌氧微生物种群数量达到较高水平,从而促进秸秆的分解转化。试验结束时,平均甲烷体积分数 Z1 ~ Z4 组(42.7% ~ 49.2%),S1 ~ S4 组(44.1% ~

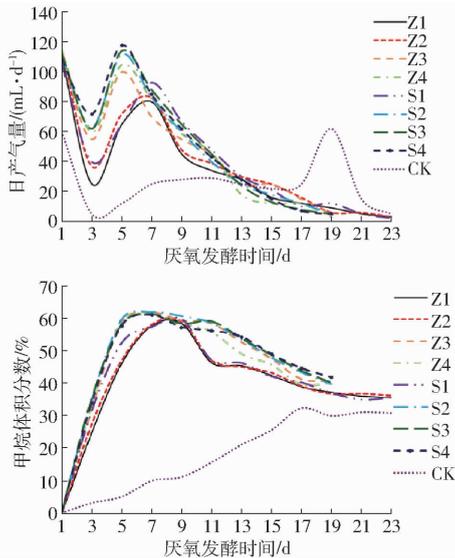


图4 预处理水稻秸秆厌氧发酵产气特性

Fig. 4 Biogas volumes and methane contents in percentage during anaerobic digestion of pretreatment rice straw

51.3%), 较 CK 组 (19.7%) 最高增加 160.4% (S2 组)。研究表明低温冻融及酶解相结合的预处理方法对水稻秸秆厌氧发酵沼液中甲烷体积分数的提高有显著的促进作用。

2.4.2 水稻秸秆厌氧发酵料液特性

目前,以富含纤维素的秸秆作为制取沼气的原料已成为农村地区获取能源的热点,其中纤维素原料水解缓慢造成厌氧发酵周期过长,原料周转率低。通过低温冻融和酶解相结合的预处理方式,使得秸秆原料水解酸化速率加快,能够快速进入产甲烷阶段,甲烷菌能否适应环境大量繁殖,充分利用水解酸化产物产甲烷成为厌氧反应的限速步骤。厌氧发酵过程中发酵液中总挥发性脂肪酸(VFA)及 pH 值变化情况如图 5 所示。由图 5(柱状图,总挥发性脂肪酸质量浓度;曲线图,pH 值变化趋势)可知,经预处理后的料液其水解酸化进程较 CK 组明显加快,第 3 天 pH 值即降至最低(6.2~6.6),VFA 积累达到峰值(5 320~7 400 mg/L),发酵液中以丁酸、乙酸代谢为主。随后的几天,在产氢、产乙酸菌作用下丁酸被转变为有利于甲烷菌生长代谢的乙酸,此阶段甲烷菌快速繁殖,大量有机酸被分解利用,VFA 含量逐渐下降,直至产气结束,pH 值恢复中性水平。说明厌氧发酵启动后不久,产甲烷菌活性即开始逐渐增强,生长繁殖及代谢能力加快,进入产甲烷阶段,沼

气产量及甲烷体积分数开始增加,VFA 变化趋势与图 4 描述产沼特性相一致。而 CK 启动后第 7 天才进入酸化阶段,第 11 天 pH 值一度降至 5.5,期间 VFA 不断积累但消耗很慢,酸化严重,说明甲烷菌一直处于生长受抑制状态,直至厌氧发酵结束料液 pH 值仍处于 6.7 左右。经低温冻融及酶解相结合预处理后的水稻秸秆厌氧发酵能够快速进入产甲烷阶段,且保持 pH 值有较小的波动,使水解酸化阶段快速顺利进行。

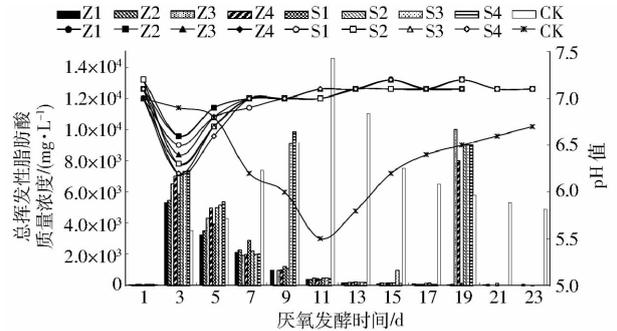


图5 预处理水稻秸秆厌氧发酵料液特性

Fig. 5 Properties of pretreatment rice straw obtained during anaerobic digestion

3 结论

(1) 水稻秸秆在 30℃ 水温下浸泡 4 h,液固比 15 mL/g 条件下具有较高持水力。冷冻温度越低,获得一定浓度解冻液中的木糖所需时间越短。-4℃、48 h (Z3 组)和 -20℃、24 h (S2 组),解冻液中木糖质量大幅增加(Z3 组:6.5 g,S2 组:7.2 g),半纤维素转化率为 24.1% (Z3 组)、26.6% (S2 组),环比增长 103.1% (Z3 组)、105.7% (S2 组)。

(2) 对解冻后的水稻秸秆原料进行纤维素酶液处理,水解液中葡萄糖质量大幅增加(Z3 组:13.5 g,S2 组:14.5 g),纤维素转化率 30.9% (Z3 组)、33.2% (S2 组),环比增长 58.8% (Z3 组)、70.6% (S2 组)。

(3) 随着冷冻时间的延长(Z 组 48 h 以上,S 组 24 h 以上),厌氧发酵周期缩短 17.4%,产气高峰提前 2 d,且峰值范围高于其他组 20.0%~21.2%。

(4) 预处理后的发酵料液水解酸化进程加快,过酸化现象得到有效缓解,能够更快地进入到甲烷化阶段,产沼能力最高提升 73.5% (S4 组),平均甲烷体积分最高提升 160.4% (S2 组)。

参 考 文 献

- PEREZ J, MUNOZ-DORADO T D L, RUBIA J, et al. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview[J]. *International Microbiology*, 2002, 5(2): 53-63.
- 邓媛方, 邱凌, 孙权平, 等. 蘑菇废弃菌棒及其与猪粪混合发酵对沼气产量及质量的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2012, 31(3): 613-619.

- DENG Y F, QIU L, SUN Q P, et al. Influence of anaerobic co-digestion of mushroom cultivation wastes and pig manure on the biogas production and its quality [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(3): 613 - 619. (in Chinese)
- 3 MICHALSKA K, BIZUKOJC M, LEDAKOWICZ S. Pretreatment of energy crops with sodium hydroxide and cellulolytic enzymes to increase biogas production[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2015, 80: 213 - 221.
- 4 SAPCI Z. The effect of microwave pretreatment on biogas production from agricultural straws [J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 487 - 494.
- 5 BERNAT K, ZIELINSKA M, CYDZIK-KWIATKOWSKA A, et al. Biogas production from different size fractions separated from solid waste and the accompanying changes in the community structure of *Methanogenic archaea* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2015, 100: 30 - 40.
- 6 ZHU J Y, WAN C X, LI Y B. Enhanced solid-state anaerobic digestion of corn stover by alkaline pretreatment[J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(19): 7523 - 7528.
- 7 孙辰, 刘荣厚, 覃国栋. 芦笋秸秆预处理与厌氧发酵制取沼气的试验[J]. *农业机械学报*, 2010, 41(8): 94 - 99.
- SUN C, LIU R H, QIN G D. 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)
- 8 ZHONG W Z, ZHANG Z Z, LUO Y J, et al. Effect of biological pretreatments in enhancing corn straw biogas production[J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(24): 11177 - 11182.
- 9 LALAK J, KASPRZYCKA A, MARTYNIK D, et al. Effect of biological pretreatment of *agropyron elongatum* 'BAMAR' on biogas production by anaerobic digestion[J]. *Bioresource Technology*, 2016, 200: 194 - 200.
- 10 焦翔翔, 勒红燕, 王明明. 我国秸秆沼气预处理技术的研究及应用进展[J]. *中国沼气*, 2011, 29(1): 29 - 33.
- JIAO X X, LE H Y, WANG M M. Research progress of straw pretreatment for anaerobic fermentation producing [J]. *China Biogas*, 2011, 29(1): 29 - 33. (in Chinese)
- 11 李敏康, 钱冬明. 冻融法提取猪血纤维蛋白原[J]. *分析实验室*, 2007, 26(4): 65 - 68.
- LI M K, QIAN D M. Extraction of fibrinogen from pig blood by freeze-thawing [J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory*, 2007, 26(4): 65 - 68. (in Chinese)
- 12 赵颖, 刘静, 戴梦, 等. 丝状真菌产黄青霉 DNA 提取方法的改进[J]. *河北大学学报:自然科学版*, 2010, 30(4): 419 - 423.
- ZHAO Y, LIU J, DAI M, et al. An improved method of extracting genomic DNA from filamentous fungus *Penicillium chrysogenum*[J]. *Journal of Hebei University: Natural Science Edition*, 2010, 30(4): 419 - 423. (in Chinese)
- 13 HONG H, LUO Y, ZHOU Z, et al. Effects of different freezing treatments on the biogenic amine and quality changes of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) heads during ice storage[J]. *Food Chemistry*, 2013, 138(2): 1476 - 1482.
- 14 TUANKRIANGKRAI S, BENJAKUL S. Effect of modified tapioca starch on the stability of fish mince gels subjected to multiple freeze-thawing [J]. *Journal of Muscle Foods*, 2010, 21(3): 399 - 416.
- 15 MATSUOKA N. Mechanisms of rock breakdown by frost action: an experimental approach [J]. *Cold Regions Science and Technology*, 1990, 17(3): 253 - 270.
- 16 YAMABE T, NEAUPANE K M. Determination of some thermo-mechanical properties of Sirahama sandstone under subzero temperature conditions [J]. *International Journal of Rock Mechanics and Mining Sciences*, 2001, 38(7): 1029 - 1034.
- 17 任国玉, 初子莹, 周雅清, 等. 中国气温变化研究最新进展[J]. *气候与环境研究*, 2005, 10(4): 701 - 714.
- REN G Y, CHU Z Y, ZHOU Y Q, et al. Recent progresses in studies of regional temperature changes in China[J]. *Climatic and Environmental Research*, 2005, 10(4): 701 - 714. (in Chinese)
- 18 邓媛方, 邱凌, 黄辉, 等. 酶预处理对秸秆类原料厌氧发酵特性的影响[J/OL]. *农业机械学报*, 2015, 46(6): 201 - 206. http://www.j-csam.org/jcsam/ch/reader/view_abstract.aspx?file_no=20150628&flag=1. DOI:10.6041/j.issn.1000-1298.2015.06.028.
- DENG Y F, QIU L, HUANG H, et al. Effects of enzymatic pretreatment straw wastes on its characteristics of anaerobic digestion for biogas production [J/OL]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2015, 46(6): 201 - 206. (in Chinese)
- 19 SOEST P J V. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin [J]. *Journal of Association of Official Agricultural Chemists*, 1963, 49: 546 - 551.
- 20 赵凯, 徐鹏举, 谷广焯. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究[J]. *食品科学*, 2008, 29(8): 534 - 536.
- ZHAO K, XU P J, GU G Y. Study on determination of reducing sugar content using 3, 5-dinitrosalicylic acid method[J]. *Food Science*, 2008, 29(8): 534 - 536. (in Chinese)
- 21 GILROYED B H, REUTER T, CHU A, et al. Anaerobic digestion of specified risk materials with cattle manure for biogas production [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(15): 5780 - 5785.
- 22 于猛. 冻融-酶法相结合的生物质预处理研究[D]. 西安:陕西科技大学, 2013: 14.
- YU M. The study on combination of freeze-thaw and enzymatic method for biomass pretreatment [D]. Xi'an: Shaanxi University of Science & Technology, 2013: 14. (in Chinese)
- 23 董晓宇, 段仰凯, 周桂雄, 等. 稀酸和氨相结合预处理柳枝稷[J]. *太阳能学报*, 2009, 30(8): 1150 - 1153.
- DONG X Y, DUAN Y K, ZHOU G X, et al. Study on switchgrass by the combination of dilute acid and ammonia [J]. *Acta Energiae Solaris Sinica*, 2009, 30(8): 1150 - 1153. (in Chinese)
- 24 陈洪章. 纤维素生物技术[M]. 北京:化学工业出版社, 2011:73.
- 25 GOULD J M, JASBERG B K, COTE G L. Structure-function relationships of alkaline peroxide-treated lignocellulose from wheat straw[J]. *Cereal Chemistry*, 1989, 66(3): 213 - 217.
- 26 OUJAI S, SHANKS R A. Solvent and enzyme induced recrystallization of mechanically degraded hemp cellulose [J]. *Cellulose*, 2006, 13(1): 31 - 44.
- 27 YE S, CHENG J Y. Hydrosis of lignocelulosic materials for ethanol production areview[J]. *Bioresource Technology*, 2002, 83(1): 1 - 11.