

离子液体预处理生物质提高糖化产率

罗影龄 薛智权 易炜林 张 飞 马 炯*

(北京大学深圳研究生院环境与能源学院 深圳 518055)

摘 要 采用酶解糖化法检测离子液体 EmimAc 和 AmimCl 对生物质(甘蔗渣和桉木)的预处理效果,考察了温度、时间和固/液质量比对离子液体预处理效果的影响。结果表明,2种离子液体对2种生物质的最佳预处理温度均为 140 ℃,固液质量比均为 1:15,EmimAc 对桉木和甘蔗渣的预处理时间分别是 12 和 4 h,而 AmimCl 所需的时间分别是 14 和 8 h,EmimAc 对桉木和甘蔗渣的预处理效果分别是传统方法的 13.931 和 3.886 倍,而 AmimCl 对这2种生物质分别是传统方法的 4.665 和 2.835 倍。可见 EmimAc 的预处理效果优于 AmimCl。

关键词 离子液体,甘蔗渣,桉木,糖化产率

中图分类号:O621.2

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2014)01-0054-07

DOI:10.3724/SP.J.1095.2014.30101

木质纤维素资源广泛,价格低廉,已经成为生物能源最有前景的原料之一^[1]。木质纤维素直接水解的糖化产率太低。通过预处理增加纤维素的反应面积,以提供更多的酶解反应接位点^[2],从而提高酶水解糖化产率。酸预处理能水解半纤维素,破坏由共价键、氢键、范德华力联接的木质纤维素^[3],因而被广泛应用于工业。但是酸有腐蚀性,对仪器、设备的要求比较高;其次,酸水解会产生抑制发酵的副产物^[4]。

离子液体(ILs)由有机阳离子和无机阴离子组成,大多数 ILs 在室温下是液态,当温度升至 300 ℃ 时性能依然稳定^[5],几乎不产生蒸汽压^[6],并且无毒无害^[7]。目前,ILs 已成为应用于生物质预处理的新型方法之一^[8]。不同种类的 ILs 可以溶解纤维素^[9-11]、木素^[12]甚至生物质^[13-15]。带有咪唑型基团,含有如氯离子、醋酸盐或甲酸盐阴离子的 ILs 比较容易溶解纤维素^[14]。含氯 ILs 的氯阴离子和纤维素的羟基质子之间可形成氢键^[16],使得纤维素分子内的氢键断裂,经过反沉淀剂的作用使离子液和纤维素分离,暴露出更多的羟基,使酶解反应进行得更为充分。离子液体 MMIMeOSO₃^[12]、EmimAc 和 AmimCl^[17]均可溶解木素。二甲亚砜-4-丁基氯化铵和二甲亚砜咪唑盐二元体系可溶解木粉^[2],BmimCl、AmimCl 也可以有效地溶解生物聚合物^[8,19]。

EmimAc 溶解木素的能力较强^[17,20],而 AmimCl 则易于溶解纤维素^[21]。目前有关 ILs 预处理生物质最佳条件的探索以及与传统预处理方法效果的对比研究报道很少。此外,ILs 作用生物质的机理,如 ILs 是如何引起生物质性质的改变,如何破坏木素和纤维素、半纤维素的联接,对后续的酶解糖化的影响等尚不明确。本文探索了这2种 ILs 对桉木和甘蔗渣进行预处理的条件,通过糖化产率检测其预处理效果,并与传统的预处理方法进行了比较,以期 ILs 预处理的实际应用提供实验依据。

1 实验部分

1.1 试剂和仪器

甘蔗渣(广西科学院);桉木(海南洋浦);离子液体:1-乙基-3-甲基咪唑醋酸盐(EmimAc,上海成捷化学有限公司)99%,氯化-1-丙烯基-3-甲基咪唑(AmimCl,上海成捷化学有限公司)99%;浓硫酸(湖南凯信化学试剂厂),氢氧化钠(天津市百世化工有限公司),亚硫酸钠(天津市致远化学试剂有限公司),

2013-02-26 收稿,2013-04-22 修回,2013-05-22 接受

深圳市新兴产业重点项目资助(JC201104210118A)

通讯联系人:马炯,副教授;Tel/Fax:0755-26032184;E-mail:jiiongmg@gmail.com;研究方向:生物能源技术与环境微生物基因组学

五氧化二磷(天津市化学试剂六厂),苯(天津市富宇精细化工有限公司),苯酚(天津市福晨化学试剂厂),冰乙酸(天津市致远化学试剂有限公司),葡萄糖(天津市福晨化学试剂厂),3,5-二硝基水杨酸(天津市光复精细化工研究所),酒石酸钾钠(天津市致远化学试剂有限公司),柠檬酸(天津市广成化学试剂有限公司),柠檬酸三钠(天津市福晨化学试剂厂),以上试剂均为分析纯;纤维素酶(诺维信公司),最适温度 65 ℃,最适 pH = 5,标称活力:700 EGU/g。

AL104/01 型电子天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司);DF-101S 型集热式恒温加热磁力搅拌器(上海一凯仪器设备有限公司);FW-100 型高速万能粉碎机(北京市永光明医疗仪器厂);DHG-9140A 型电热鼓风干燥箱(上海一恒科技有限公司);DZF-6050 型真空干燥箱(上海一恒科技有限公司);FTIR-8400S 型傅里叶变换红外光谱仪(日本岛津);LIV-3200 型紫外分光光度计(上海美谱达仪器有限公司);THZ-100 型恒温培养摇床(上海一恒科技有限公司);SU-70 型扫描电子显微镜(日本日立);Centrifuge5810R 型离心机(eppendorf);SHB-III 型循环水式多用真空泵(河南省予华仪器有限公司);反应釜(郑州博科仪器设备有限公司);HYC-326A 型冰箱(青岛海尔特种电器有限公司)。

1.2 ILs 预处理

将甘蔗渣和桉木 45 ℃ 真空干燥 24 h,放在干燥器中备用。称取一定量的 EmimAc 或 AmimCl 和生物质于 50 mL 烧瓶内,用集热式恒温加热磁力搅拌器搅拌一定时间。在这个过程中,ILs 不能完全溶解生物质,只能形成固液悬浮液。到达反应终点,加水沉淀出 ILs 溶解的物质,然后用 G2 坩埚滤器过滤再生生物质,用大量的去离子水洗去 ILs,将再生生物质于 45 ℃ 真空干燥 24 h,用纤维素酶水解测定其还原糖含量。取 3 次实验平均值。

1.3 传统预处理

甘蔗渣的传统预处理^[22]:将甘蔗渣加入 4% H₂SO₄,以固液质量比 1:20 混合,常压煮沸回流 3 h。
桉木的传统预处理^[23]:用碱(NaOH + Na₂SO₃),其中 *w*(NaOH)为 3%(以绝干桉木粉质量为基准),*w*(Na₂SO₃)为 12%,将二者配成混合碱液,固液质量比为 1:3,在反应釜内 170 ℃ 保温 2 h 完成碱预处理。取 3 次实验的重复值。

1.4 酶解糖化

在 25 mL 试管中加入一定量的再生生物质,0.1 mol/L 柠檬酸缓冲溶液(pH = 5),加入一定量的纤维素酶,使其底物浓度为 10 g/L。置于 50 ℃、转速为 180 r/min 的恒温培养摇床中,水解 24 h。释放的还原糖用 DNS^[24]测定在 540 nm 的吸光度。

2 结果与讨论

2.1 温度对 ILs 预处理效果的影响

图 1 为温度对 ILs 预处理效果的影响。从图 1 可以看出,糖化产率随温度升高而升高。因为温度的

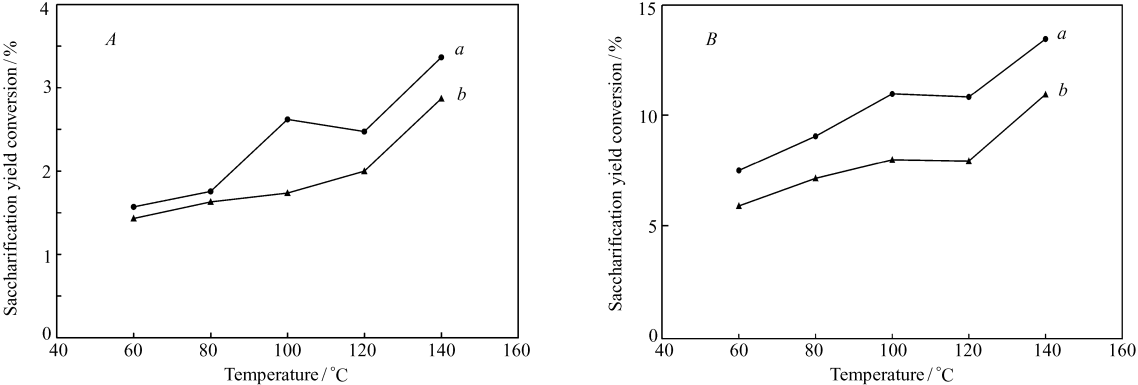


图 1 温度对离子液体 EmimAc(a) 和 AmimCl(b) 预处理桉木(A) 和甘蔗渣(B) 效果的影响

Fig. 1 Saccharification yields of eucalyptus(A) and bagasse(B) pretreated with ILs EmimAc(a) and AmimCl(b) under different temperatures

升高促使生物质分子间的氢键更易打开,从而暴露更多的羟基,有利于酶解反应的进行。反应终点定为 140 ℃,超过此温度,生物质的结构会产生变化,此时,2 种 ILs 对甘蔗渣或是桉木的预处理效果最好。

2.2 液/固比对 ILs 预处理效果的影响

图 2 为液/固比对 ILs 预处理效果的影响。从图 2 可以看出,EmimAc 和 AmimCl 对 2 种生物质的最佳固液比均为 1:15。此时,ILs 能充分地 与生物质反应,有效地促使纤维素分子内氢键断裂,同时 ILs 溶解的生物质已经达到饱和,继续增加 ILs 量也不能溶解更多的生物质,反而抑制 ILs 与纤维素的作用,导致糖化产率下降。从图中可以看出,改变比例对预处理效果的影响 AmimCl 不如 EmimAc 明显。综合考虑节约成本和预处理效果,确定 AmimCl 预处理生物质的最佳固/液比为 1:15。用 ILs 预处理生物质的温度通常为 110 ℃^[25],120 ℃^[26-27],固液比为 1:20^[27-28]。本文中的处理温度虽高些(140 ℃),但是固液比为 1:15,所需的 ILs 较小,可以节约成本。

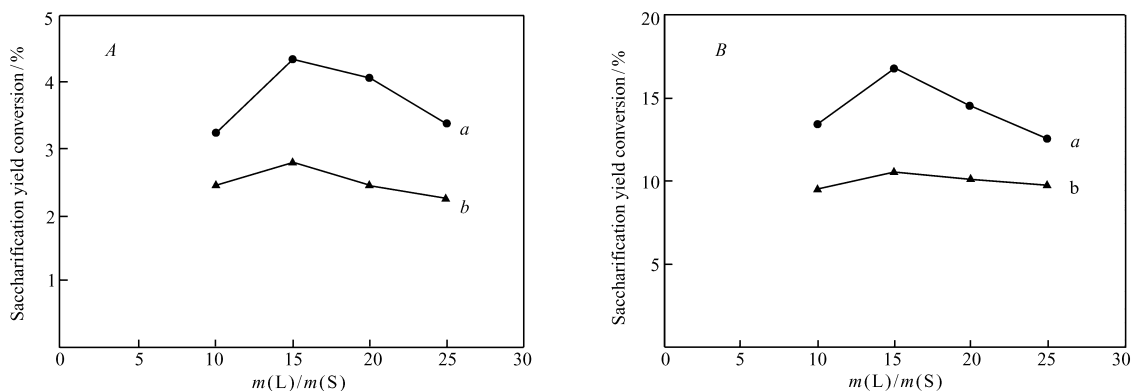


图 2 液/固比对离子液体 EmimAc(a) 和 AmimCl(b) 预处理桉木(A)和甘蔗渣(B)效果的影响

Fig.2 Saccharification yields of eucalyptus(A) and bagasse(B) pretreated with ILs EmimAc(a) and AmimCl(b) with different liquid-solid ratios

2.3 时间对 ILs 预处理效果的影响

图 3 为时间对 ILs 预处理效果的影响。从图 3 可以看出,EmimAc 对桉木和甘蔗渣的预处理时间分别是 12 和 4 h,而 AmimCl 的处理时间分别是 14 和 8 h。不同种类的 ILs、生物质和检测指标,最佳处理时间不尽相同,跨度也比较大,用[Bmpy][Cl]预处理桉木和甘蔗渣,用糖化产率作为指标,10 min 的预处理效果好于 60 min^[28];用 EmimAc 预处理麦秸,以溶出的酸不溶木素量作为指标,探索 0.5~24 h 溶解出的木素量,以 90 min 为最佳^[20]。

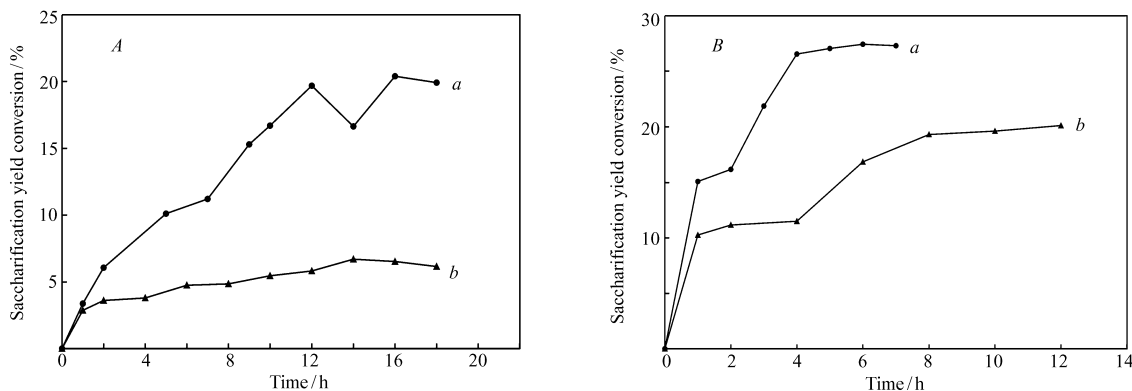


图 3 时间对离子液体 EmimAc(a) 和 AmimCl(b) 预处理桉木(A)和甘蔗渣(B)效果的影响

Fig.3 Saccharification yields of eucalyptus(A) and bagasse(B) pretreated with ILs EmimAc(a) and AmimCl(b) under different reaction time

2.4 新型和传统预处理糖化产率的比较

以糖化产率作为比较的指标。用碱、EmimAc 和 AmimCl 预处理过的再生桉木的糖化产率提高的倍

数分别是 3.39、13.93 和 4.66。用酸、EmimAc 和 AmimCl 预处理过的再生甘蔗渣的糖化产率提高的倍数分别是 1.35、3.89 和 2.84。可见,不论是桉木或是甘蔗渣,ILs 的预处理效果均优于传统用酸、碱的预处理效果,且 EmimAc 的预处理效果优于 AmimCl。因为 EmimAc 的粘度比 AmimCl 的小,更容易渗入生物质内进行反应。此外,EmimAc 溶解木质素能力较强。木质素被溶解后,生物质失去保护结构从而变得不稳定,且孔隙率增加,酶与生物质反应的位点增加,提高了糖化产率。而 AmimCl 较易溶解纤维素,对甘蔗渣或是桉木的预处理效果均弱于 EmimAc。

2.5 生物质和再生生物质的红外光谱分析

图 4 和图 5 分别为原生桉木、再生桉木和原生甘蔗渣、再生甘蔗渣的红外谱图。从图中可以看出,经过预处理后,3000 ~ 3600 cm^{-1} 范围内的分子内氢键振动吸收峰变宽变弱,表明分子内的氢键受到破坏,有利于后续的酶解糖化。

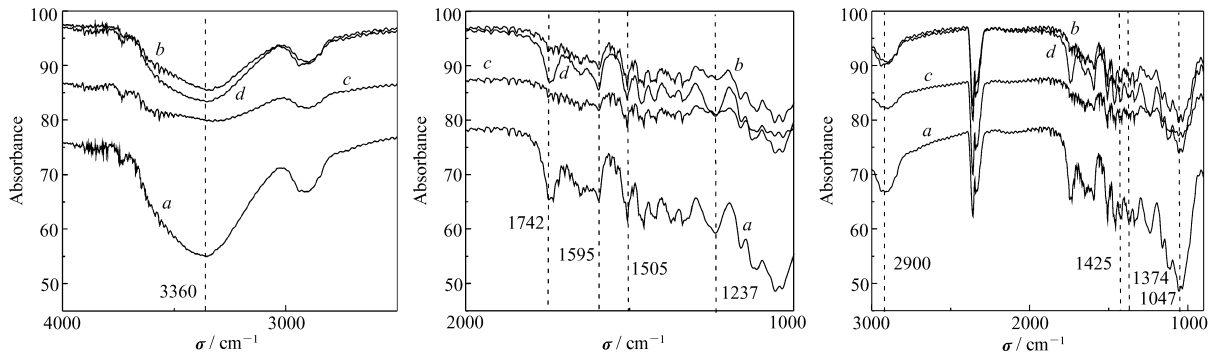


图 4 原生桉木(a)和再生桉木(b~d)的红外谱图

Fig. 4 FT-IR spectra of untreated eucalyptus(a) and regenerated eucalyptus pretreated with alkali(b), EmimAc(c) and AmimCl(d)

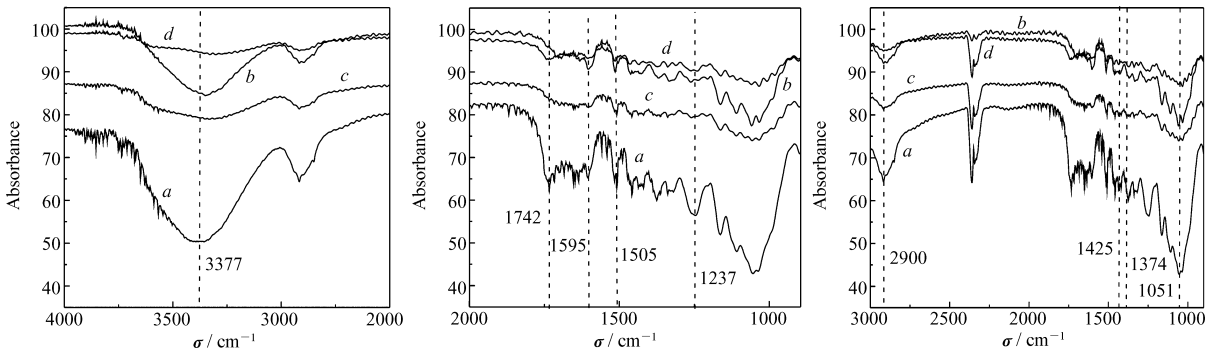


图 5 原生甘蔗渣(a)和再生甘蔗渣(b~d)的红外谱图

Fig. 5 FT-IR spectra of untreated bagasse(a) and regenerated bagasse pretreated with H_2SO_4 (b), EmimAc(c) and AmimCl(d)

半纤维素木聚糖的红外特征吸收峰为 1742、1595 cm^{-1} ,而 1505 cm^{-1} 则为木素的特征峰。半纤维素和木素在 1237 cm^{-1} 处均有吸收。纤维素的特征峰为 2900、1425 和 1374 cm^{-1} 。从图 4 可以看出,EmimAc(c)对桉木中半纤维素和木素的破坏作用比用碱(b)和 AmimCl(d)处理要更大,但是三者对其纤维素的降解程度较为一致。从图 5 可知,AmimCl(d)预处理对甘蔗渣中纤维素的破坏程度要比 EmimAc(c)和酸(b)造成的破坏程度要大,对木素的破坏程度略强于后二者,但是三者对甘蔗渣中半纤维素的破坏程度相近。1047 cm^{-1} 的吸收峰代表结晶纤维素,可见在预处理之后,纤维素的结晶度下降,有利于酶进入纤维素内部,从而可提高糖化产率。

综上分析可知,用 EmimAc 预处理桉木的效果优于 AmimCl;用 AmimCl、EmimAc 和酸预处理甘蔗渣,对木素和半纤维素的降解程度均相差不多,但是 AmimCl 处理后的再生甘蔗渣的纤维素降解程度较

严重,故 EmimAc 预处理甘蔗渣效果依然优于 AmimCl。

2.6 生物质和再生生物质的 SEM 观察

图 6 和图 7 为原料生物质和再生生物质的扫描电子显微镜照片。从图中可以看到,原生甘蔗渣/桉木有完整的纤维结构,经过酸液/碱液预处理的纤维(D)没有太大的改变,而经过 ILs 预处理后(B,C)改变了纤维结构,表面出现空隙,可使酶解更为充分。

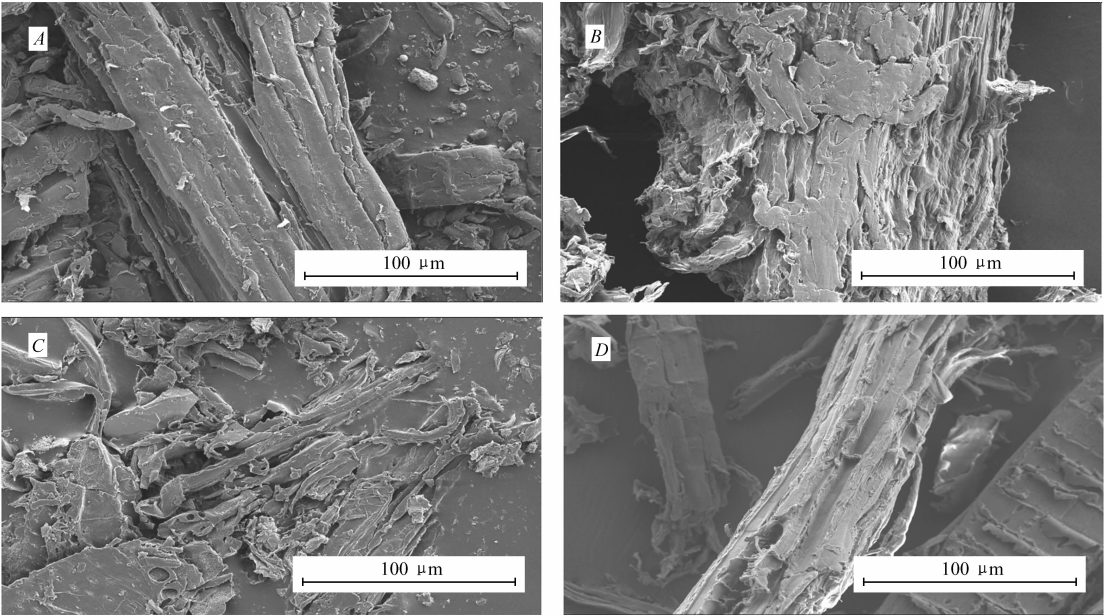


图 6 原生桉木(A)和再生桉木(B~D)的 SEM 照片

Fig.6 SEM micrographs of untreated eucalyptus (A) and regenerated eucalyptus pretreated with EmimAc (B), AmimCl (C) and alkali (D)

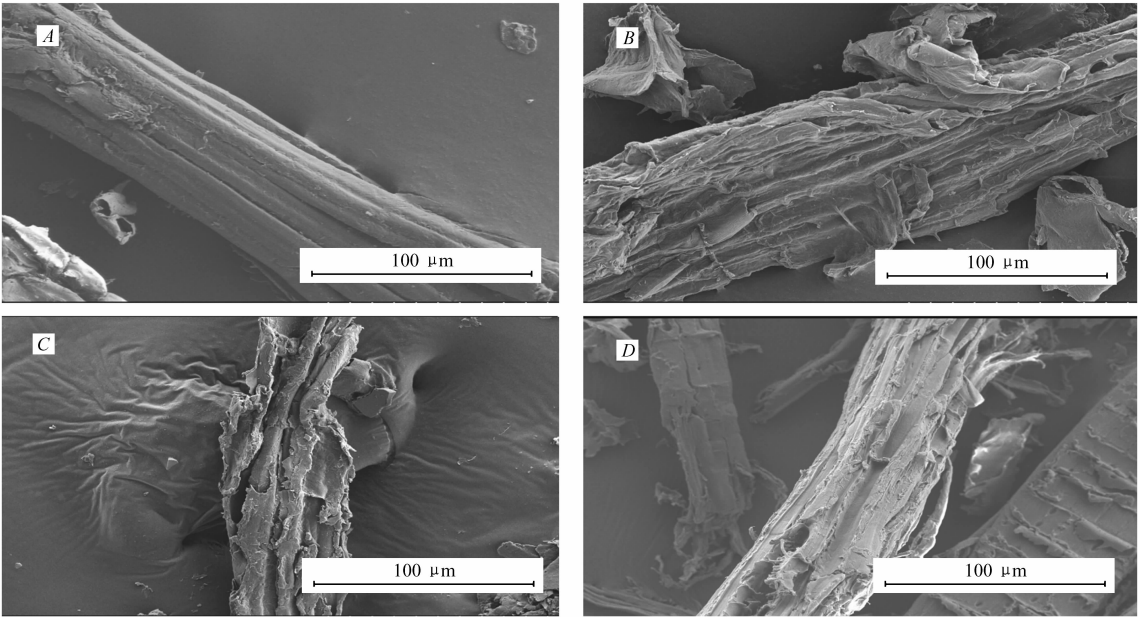


图 7 原生甘蔗渣(A)和再生甘蔗渣(B~D)的 SEM 照片

Fig.7 SEM micrographs of untreated bagasse (A) and regenerated bagasse pretreated with EmimAc (B), AmimCl (C) and acid (D)

3 结 论

2 种 ILs 对 2 种生物质分别预处理的温度均为 140 ℃,固液质量比均为 1:15, EmimAc 对桉木和甘蔗渣的预处理时间分别是 12 和 4 h,而 AmimCl 所需的时间分别是 14 和 8 h。

与传统的酸碱预处理方法相比,EmimAc 对桉木和甘蔗渣的预处理效果分别是其的 13.931 和 3.886 倍,而 AmimCl 对这 2 种生物质预处理效果分别是传统方法的 4.665 和 2.835 倍。可以看出,ILs 的预处理效果优于传统方法,且 EmimAc 的预处理效果优于 AmimCl。

参 考 文 献

- [1] Gomez L D, Steele-King C G, McQueen-Mason S J. Sustainable Liquid Biofuels from Biomass: The Writing's on the Walls [J]. *New Phytol*, 2008, **178**(3): 473-485.
- [2] Yang B, Wyman C E. Pretreatment: the Key to Unlocking Low-cost Cellulosic Ethanol [J]. *Biofuels Bioprod Biorefin*, 2008, **2**(1): 26-40.
- [3] Li C, Knierim B, Manisseri C, et al. Comparison of Dilute Acid and Ionic Liquid Pretreatment of Switchgrass: Biomass Recalcitrance, Delignification and Enzymatic Saccharification [J]. *Bioresour Technol*, 2010, **101**(13): 4900-4906.
- [4] Sant'Ana da Silva A, Lee S-H, Endo T, et al. Major Improvement in the Rate and Yield of Enzymatic Saccharification of Sugarcane Bagasse via Pretreatment with the Ionic Liquid 1-Ethyl-3-methylimidazolium Acetate ([Emim][Ac]) [J]. *Bioresour Technol*, 2011, **102**(22): 10505-10509.
- [5] Dadi A P, Varanasi S, Schall C A. Enhancement of Cellulose Saccharification Kinetics Using an Ionic Liquid Pretreatment Step [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **95**(5): 904-910.
- [6] Brennecke J F, Maginn E J. Ionic Liquids: Innovative Fluids for Chemical Processing [J]. *AIChE*, 2001, **47**(11): 2384-2389.
- [7] Anderson J L, Ding J, Welton T, et al. Characterizing Ionic Liquids on the Basis of Multiple [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(47): 14247-14254.
- [8] Swatoski R P, Spear S K, Holbrey J D, et al. Dissolution of Cellose with Ionic Liquids [J]. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(18): 4974-4975.
- [9] Zhang H, Wu J, Zhang J, et al. 1-Allyl-3-methylimidazolium Chloride Room Temperature Ionic Liquid a New and Powerful Nonderivatizing Solvent for Cellulose [J]. *Macromolecules*, 2005, **38**(20): 8272-8277.
- [10] Lateef H, Grimes S, Kewcharoenwong P, et al. Separation and Recovery of Cellulose and Lignin Using Ionic Liquids: A Process for Recovery from Paper-based Waste [J]. *J Chem Technol Biotechnol*, 2009, **84**(12): 1818-1827.
- [11] Fukaya Y, Sugimoto A, Ohno H. Superior Solubility of Polysaccharides in Low Viscosity, Polar, and Halogen-Free 1,3-Dialkylimidazolium Formates [J]. *Biomacromolecules*, 2006, **7**(12): 3295-3297.
- [12] Pu Y Q, Jiang N, Ragauskas A J. Ionic Liquid as a Green Solvent for Lignin [J]. *J Wood Chem Technol*, 2007, **27**(1): 23-33.
- [13] Li Q, He Y C, Xian M, et al. Improving Enzymatic Hydrolysis of Wheat Straw Using Ionic Liquid 1-Ethyl-3-methylimidazolium Diethyl Phosphate Pretreatment [J]. *Bioresour Technol*, 2009, **100**(14): 3570-3575.
- [14] Mäki-Arvela P, Anugwom I, Virtanen P, et al. Dissolution of Lignocellulosic Materials and Its Constituents Using Ionic Liquids: A Review [J]. *Ind Crops Prod*, 2010, **32**(3): 175-201.
- [15] Nguyen T-AD, Kim K-R, Han S J, et al. Pretreatment of Rice Straw with Ammonia and Ionic Liquid for Lignocellulose Conversion to Fermentable Sugars [J]. *Bioresour Technol*, 2010, **101**(19): 7432-7438.
- [16] Remsing R C, Swatoski R P, Rogers R D, et al. Mechanism of Cellulose Dissolution in the Ionic Liquid 1-*n*-Butyl-3-Methylimidazolium Chloride A ¹³C and ^{35/37}Cl NMR Relaxation Study on Model Systems [J]. *Royal Soc Chem*, 2006: 1271-1273.
- [17] Lee S H, Doherty T V, Linhardt R J, et al. Ionic Liquid-mediated Selective Extraction of Lignin from Wood Leading to Enhanced Enzymatic Cellulose Hydrolysis [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2009, **102**(5): 1368-1376.
- [18] Lu F C, Ralph J. Non-degradative Dissolution and Acetylation of Ball-milled Plant Cell Walls: High-resolution Solution-state NMR [J]. *Plant J*, 2003, **35**(4): 5939-5947.
- [19] Wu J, Zhang J, Zhang H, et al. Homogeneous Acetylation of Cellulose in a New Ionic Liquid [J]. *Biomacromolecules*, 2004, **5**(2): 266-268.
- [20] Fu D, Mazza G, Tamaki Y. Lignin Extraction from Straw by Ionic Liquids and Enzymatic Hydrolysis of the Cellulosic Residues [J]. *J Agric Food Chem*, 2010, **58**(5): 2915-2922.
- [21] Wang X J, Li H Q, Cao Y, et al. Cellulose Extraction from Wood Chip in an Ionic Liquid 1-Allyl-3-methylimidazolium

- Chloride(AmimCl)[J]. *Bioresour Technol*,2011,**102**(17):7959-7965.
- [22] LIU Jiajian,LU Yi. The Research on the Effects of Cellulose Enzyme Degradation with Pretreatment[J]. *Forest Ind Chem*, 1995,**15**(3):67-70(in Chinese).
刘家健,陆怡. 预处理对纤维素酶降解影响的研究[J]. *林产化学与工业*,1995,**15**(3):67-70.
- [23] WU Shubin,WEI Weiqi,LIU Ligu. The Influence of Eucalyptus Pretreated with Alkaline Sulfite on the Enzymatic Saccharification[J]. *J South China Univ Technol*,2011,**39**(11):1-5(in Chinese).
武书彬,尉慰奇,刘立国. 桉木碱性亚硫酸盐预处理对酶解糖化效果的影响[J]. *华南理工大学学报*,2011,**39**(11):1-5.
- [24] Miller G L. Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar[J]. *Anal Chem*,1959,**31**(3):426-428.
- [25] Zhao H,Jones C L,Baker G A,*et al.* Regenerating Cellulose from Ionic Liquids for an Accelerated Enzymatic Hydrolysis [J]. *J Biotechnol*,2009,**139**(1):47-54.
- [26] Kilpelainen I,Xie H B,King A,*et al.* Dissolution of Wood in Ionic Liquids[J]. *J Agric Food Chem*,2007,**55**(22):9142-9148.
- [27] Vancov T,Alston A S,Brown T,*et al.* Use of Ionic Liquids in Converting Lignocellulosic Material to Biofuels[J]. *Renew Energy*,2012,**45**:1-6.
- [28] Uju,Shoda Y,Nakamoto A,*et al.* Short Time Ionic Liquids Pretreatment on Lignocellulosic Biomass to Enhance Enzymatic Saccharification[J]. *Bioresour Technol*,2012,**103**(1):446-452.

Pretreatment of Biomass with Ionic Liquid to Improve Saccharification Yield

LUO Yingling, XUE Zhiqian, YI Weilin, ZHANG Fei, MA Jiong*

(School of Environment and Energy,Peking University Shenzhen Graduate School,Shenzhen 518055,China)

Abstract The effect of pretreating biomass (bagasse/eucalyptus) with ionic liquids (ILs) EmimAc and AmimCl has been explored by assessing the saccharification yield. Factors including temperature, time and solid-to-liquid ratio have been investigated. The results indicate that two ILs produce the best results for the two kinds of biomass at 140 °C when the solid-to-liquid ratio is 1:15. For EmimAc, the optimum pretreatment time is 12 h for eucalyptus, and 4 h for bagasse, respectively. For AmimCl, the optimum pretreatment time is 14 h for eucalyptus, and 8 h for bagasse, respectively. The saccharification yields of EminAc pretreated eucalyptus and bagasse are 13.931 and 3.886 times those of traditional methods, respectively. For AmimCl, the saccharification yields are improved to 4.665 and 2.835 times, respectively. The results show that EmimAc exhibits a better pretreatment effect than AmimCl.

Keywords ionic liquid,bagasse,eucalyptus,saccharification yield