不同类型深度共熔溶剂预处理的甘蔗渣酶解效率差异

黄梓健，杨露敏，林凯鹏，冯国坚，张永昊，蒲福龙，古榕榕，侯雪丹

（广东工业大学生物医药学院，广东广州 510006）

摘要：为了探索深度共熔溶剂（DES）预处理生物质的机制，本文分别设计了五种以氯化胆碱为氢键受体（HBA）和以苹果酸为氢键供体（HBD）的 DESs 来预处理甘蔗渣，分析 HBD 和 HBA 对甘蔗渣组分和酶解效率的影响。在氯化胆碱为 HBA 的 DESs 中，乳酸-氯化胆碱（LC）的预处理效果和酶解效率最好，所得甘蔗渣残渣的纤维素含量为 72.92%，纤维素降解度为 60.43%，葡萄糖收率为 56.90%；而在苹果酸为 HBD 的 DESs 中，苹果酸-氯化胆碱的预处理效果最佳，木聚糖和木质素去除率均为最高，纤维素降解度为 43.35%，葡萄糖收率为 38.00%。研究结果证明 DES 的 HBA 和 HBD 的作用皆不可忽略，其分子间氢键作用强度与其对生物质的解构能力负相关。并发现甘蔗渣的木聚糖去除率与氢键受供体的 pKa 值具有一定的相关性；纤维素降解度与木聚糖去除率正相关，而与木质素去除率无关。此外，在一定范围内，DES 分子间的氢键作用强度、DES 与甘蔗渣的氢键缔合作用与预处理温度和时间有相关性。本研究为用于生物质预处理的新型 DES 的设计提供了一定的理论参考。

关键词：深度共熔溶剂；氢键受体；氢键供体；pKa 值；木聚糖去除率；纤维素降解度

文章篇号：1673-9078(2020)06-60-67 DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.6.1234

The Difference for Enzymatic Hydrolysis of Sugarcane Bagasse Pre-treated by Different Deep Eutectic Solvents

HUANG Zi-jian, YANG Lu-min, LIN Kai-peng, FENG Guo-jian, ZHANG Yong-hao, PU Fu-long, GU Rong-rong, HOU Xue-dan

(College of Biomedicine, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In order to evaluate the influence of deep eutectic solvents (DESs) pretreatment on lignocellulosic biomass, five DESs with choline chloride (ChCl) as hydrogen bond acceptor (HBA) and five DESs with malic acid as hydrogen bond donor (HBD) were used to pretreat sugarcane bagasse. The effects of HBDs and HBAs on the components and enzymatic hydrolysis efficiency of biomass were studied. Among ChCl-based DESs, lactic acid-choline chloride (LC) showed the best enzymatic hydrolysis efficiency. The cellulose content in the residue was 72.92%. The glucose yield and cellulose digestibility after saccharification were 56.90% and 60.43%, respectively. Among malic acid-based DESs, malic acid-choline chloride was the best one with the highest xylan and lignin removal, resulting in 43.35% of cellulose digestibility and 38.00% of glucose yield. The results showed that both HBD and HBA played a non-ignorable role in biomass deconstruction, and the strength of intermolecular hydrogen bond in DESs was negatively correlated with their deconstruction ability. Besides, it was found that the xylan removal could be correlated to the pKa value of HBDs or HBAs, while the cellulose digestibility was positively related to xylan removal, instead of delignification. In addition, the intermolecular hydrogen bond strength of DESs and the hydrogen bonding interaction between DES and biomass have been proved to be related to the pretreatment temperature and time in a certain range. Results of this work will provide a theoretical basis for developing novel DESs for biomass pretreatment.

引文格式：

黄梓健,杨露敏,林凯鹏,等.不同类型深度共熔溶剂预处理的甘蔗渣酶解效率差异[J].现代食品科技,2020,36(6):60-67

HUANG Zi-jian, YANG Lu-min, LIN Kai-peng, et al. The difference for enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse pre-treated by different deep eutectic solvents [J]. Modern Food Science and Technology, 2020, 36(6): 60-67

收稿日期：2019-12-15

基金项目：国家自然科学基金资助项目（21406038）

作者简介：黄梓健（1994-），男，硕士研究生，研究方向：生物质能源化工

通讯作者：侯雪丹（1984-），女，博士，副教授，研究方向：生物化工

Key words: deep eutectic solvents; hydrogen bond acceptor; hydrogen bond donor; pKa value; xylan removal; cellulose digestibility

纤维素是由 β-D-葡萄糖通过 β-1,4 糖苷键连接而形成的链状多晶型聚合物[1]，而纤维素结构中的羟基易和分子内或相邻分子间的纤维素的含氧基团结合形成氢键网络结构，从而进一步形成复杂的微原纤维、结晶区和无定形区等纤维素聚合物。半纤维素是由多种糖单元组成的一种化学结构非均一聚合物，包括木糖、阿拉伯糖和半乳糖等，分子量相对较小、多分支、链短，易水解，最具热、化学敏感性。而木质素是由苯丙烷单元以C-C键和C-O-C醚键连接而成的无定型复杂网状杂聚物，它与半纤维素以醚键和酯键等共价连结形成复杂的氢键网络，而且紧密覆盖着纤维素，使其成为木质纤维素生物质酶水解和微生物降解的主要障碍。

2003 年，Abbott 首次提出了深度共熔溶剂（DES）的概念[2]，它是一类由季铵盐、天然碱等氢键受体和有机酸、酰胺、甘油或碳水复合物等氢键供体组成的共熔化合物。与离子液体相比，DES 的原料是一些廉价、易大量获取的生物基材料，因此可以完全生物降解；其合成步骤简单，且合成收率为 100%，无需纯化。其中 DES 作为酶催化介质及其与酶的生物相容性是一大研究热点，而以氯化胆碱与氢键供体形成的 DES 是现阶段应用研究最为广泛的一类[3]。DES 体系中含有氢键、静电力和范华德力[4]，其中以氢键供体和氢键受体的阴离子之间形成的氢键作用为主[5]，而且 DES 体系和溶质之间的氢键作用与其对溶质的溶解能力有关。然而，人们对 DES 中的分子间氢键强度对生物质解构的机理研究较少。最近 Zhang[6]等人以氯化胆碱为氢键受体，分别考察了以一元羧酸、二元羧酸、多元醇为氢键供体的三类 DES，对玉米芯预处理效果的影响，研究表明，当 DES 中的氢键供体为羧酸时，酸用量以及酸强度的增加，有利用加强 DES 的去木质素作用，而以多元醇作为氢键供体时，可避免采用羧酸为氢键供体时对玉米芯中碳水化合物的降解。

此外，很多学者在研究 DES 对生物质的预处理效果时基本只是关注木质素的去除，较少探索半纤维素的去除与纤维素酶水解效率之间的关系。但在 Xu 等人的研究中[7]，经过氯化胆碱-甲酸预处理之后，葡萄糖产率的提高归功于大部分半纤维素的去除（66.2%）和部分木质素的去除（23.8%），而在 Kumar[3] 和 Procentese[8]的研究中表明是木质素的去除导致酶解效率提高。

目前，DES 对木质纤维素生物质中各组分的作用机理还不够清楚，人们依然在寻找合适的 DES 对木质纤维素进行处理以达到更好的处理效果。本文分别设计了以氯化胆碱为氢键受体和以苹果酸为氢键供体的 5 种 DES，将其用于甘蔗渣的预处理研究，以残渣多糖含量、多糖降解度和单糖收率为评价指标，探究 DES 的粘度、组成成分（氢键供体和受体）和预处理条件如温度、时间对甘蔗渣组分分离和酶解效率的影响。最终，研究 DES 组分的 pKa 值与甘蔗渣的木聚糖去除率、木质素去除率和纤维素降解度之间的关系来探讨 DES 的预处理机制。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甘蔗渣，由广东省生物工程研究所赠送，经过机械粉碎和筛选，收集 250~400 mm 的粉末，然后 60 ℃烘箱过夜，直到恒重，放到干燥器中保存。纤维素、木聚糖和木质素含量分别为 35.83%，25.00%和 22.44%。来源于里氏木霉的纤维素酶，购于美国 Sigma 公司；氯化胆碱、乳酸、苹果酸、草酸、乙醇酸、柠檬酸、柠檬酸钠和各种氨基酸均购于 Aladdin 公司；硫酸、乙醇等试剂均为国产分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 DES 的合成

将各种氢键供体和氢键受体按特定摩尔比例均匀混合（氯化胆碱类 DES，氢键供体与氢键受体摩尔比为 2:1；苹果酸类 DES，氢键供体与氢键受体的摩尔比为 1:1），装入 50 mL 磨口瓶中，置于 80 ℃或者 120 ℃，转速 200 r/min 的油浴锅中（用磁力搅拌器加热），待 DES 呈现均一、澄清透明的状态后停止加热，然后将 DES 装入带螺旋口的小试剂瓶密封保存备用。

1.2.2 甘蔗渣的预处理

将 DES 和不同固液比（5%和 10%）甘蔗渣混合，于一定温度和时间下搅拌（200 r/min）。预处理完毕后，加入适量的无水乙醇，多次清洗离心分离混合物。然后用适量蒸馏水洗涤固体残渣部分，直至洗涤液的 pH 为中性。最后将固体残渣冷冻干燥，用于后续的成分和酶水解分析。

1.2.3 成分分析

水稻秸秆中各组分含量的测定参照 NREL[9]法，未处理或预处理后甘蔗渣样品经 72% H_2SO_4 在 30 ℃下水解 1 h 后，添加去离子水调节酸浓度至 4%，于

121 ℃下水解 1 h。利用高效液相色谱仪测定水解液中葡萄糖及木糖浓度，根据纤维素和木聚糖的转化数，计算出甘蔗渣样品中纤维素及木聚糖含量。测定水解液在 320 nm 下的吸光值，根据摩尔吸光系数 30 L/(g·cm)计算酸溶木质素含量。不溶性残渣先于烘箱 105 ℃干燥 4 h，后放入马弗炉 575 ℃下干燥 3 h，根据 105 ℃和 575 ℃干燥后的质量差，计算酸不溶木质素含量。相关的计算公式如下：

$$\varphi = (1 - \frac{\omega_1 \times c}{\omega}) \times 100\% \quad (1)$$

其中：φ-纤维素损失率，%; ω_1-固体残渣的纤维素含量，%; c-残渣回收率，%; ω-原料甘蔗渣的纤维素含量。

$$x = (1 - \frac{\omega_2 \times c}{\omega m}) \times 100\% \quad (2)$$

其中：x-木聚糖或木质素去除率，%; ω_2-固体残渣的木聚糖或木质素含量，%; c-残渣回收率，%; ωm-原料甘蔗渣的木聚糖或木质素含量。

1.2.4 酶水解分析

在 15 mL 具塞三角瓶中加入 10 mg 未处理或预处理后的甘蔗渣样品、2 mg 纤维素酶（8 U/mg）和经预热（50 ℃）的 3.5 mL 柠檬酸缓冲液（pH 4.8），混合均匀，置于恒温培养振荡器（50 ℃，200 r/min）反应。定时（0.5、24 和 48 h）取样 300 μL，于沸水中灭活 5 min 终止反应，以流动相稀释 2 倍，经 0.22 μm 孔径的微孔滤膜过滤后，离心 10000 r/min，5 min，随后取上清液，用于后续的 HPLC 分析，获得葡萄糖和木糖的浓度。使用配备有 Aminex 的 HPX-87H 柱和（Waters 2410）示差检测器的高效液相色谱来葡萄糖和木糖的浓度。流动相为 5 mmol/L 硫酸水溶液，流速为 0.5 mL/min，柱温、检测器温度分别为 65 ℃和 50 ℃。相关的计算公式如下：

$$D = \frac{m_1}{m_2} \times 100\% \quad (3)$$

其中：D-多糖降解度，%; m_1-酶解液中所含单糖质量，g; m_2-理论上固体残渣酶解后所含的单糖质量，g。

$$y = \frac{m_1}{m_3} \times 100\% \quad (4)$$

其中：y-单糖产率，%; m_1-酶解液中所含单糖质量，g; m_3-理论上原料甘蔗渣所含的单糖质量，g。

1.2.5 数据处理

所有试验均重复 3 次，所有实验数据以平均数±标准偏差（X±SD）表示，数据用 Excel 和 SPSS 21.0 统计软件整理和分析，p<0.05，差异具有统计学意义，采用 Origin 9.0 进行线性回归分析。

2 结果与讨论

2.1 氢键供体对 DES 预处理效率的影响

本文首先选择了五种典型的以氯化胆碱为 HBA 的 DES，探究 DES 的氢键供体对其预处理甘蔗渣效率的影响。五种典型的 DES 的性质如表 1 所示。其中 DES 的黏度是影响预处理效果的重要因素，因为 DES 的黏度越大，流动性就越低，生物质和 DES 之间的传质传热效果也越差[10]。而粘度也受氢 HBD 的粘度、分子间作用、温度和水含量等因素的影响。根据刘书燕[11]等人的研究，氯化胆碱的氯原子和羧基氢原子之间能够形成氢键，且该氢键比氯化胆碱自身氢键强，这是能够形成 DES 的原因，而且随着脂肪二酸中两个羧基之间的碳原子的增加，酸和氯化胆碱之间的氢键作用减弱，所以草酸-氯化胆碱（OC）的粘度比苹果酸-氯化胆碱（MC）大。事实上，本文所用的氢键供体酸性强弱顺序如下：草酸>苹果酸>乳酸>乙醇酸>乙二醇。随着氢键供体的酸性减弱，HBDs 与氯化胆碱之间的氢键作用也随之减弱，形成的 DES 的粘度也会降低。经过这些 DESs 预处理之后，甘蔗渣的结构组成发生了较大变化（p<0.05）。如图 1 所示，纤维素含量由未预处理原料中的 35.83%增至 47.11%~72.92%；木聚糖含量则由 25.00%降至 3.14%~11.63%，值得一提的是，经过 EGC 预处理之后提高至 28.26%；而木质素的含量变化则不具有明显的规律性。

表 1 以氯化胆碱为氢键受体的 DES 的基本性质

Table 1 The properties of DESs with choline chloride as HBAs

DES 种类	颜色	状态	氢键供体的 pKa 值
苹果酸-氯化胆碱(MC)	无色	常温下为液态	3.46
草酸-氯化胆碱(OC)	无色	常温下为固态	1.25
乳酸-氯化胆碱(LC)	无色	常温下为液态	3.86
乙醇酸-氯化胆碱(GC)	无色	常温下为液态	3.83
乙二醇-氯化胆碱(EGC)	淡黄色	常温下为液态	14.2

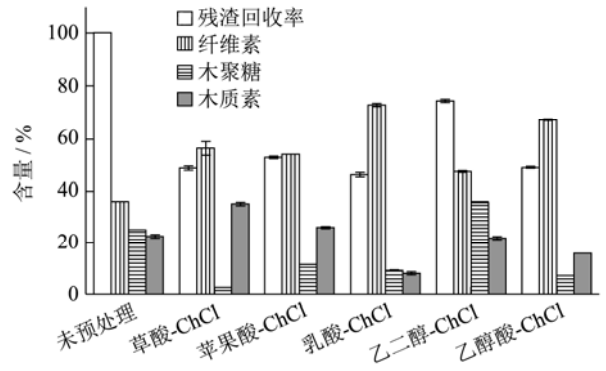


图 1 不同氢键供体的 DES 预处理对甘蔗渣组成的影响

Fig.1 Effect of HBDs on the composition of DESs-pretreated sugarcane bagasse

从图 2 可知，纤维素降解度由未处理的 25.55%增加到 36.50%~73.52%（乙二醇-氯化胆碱（EGC）降为 10.67%），木聚糖降解度由 2.43%增加至 9.25%~66.28%，这些数据说明经过酸性 DES 预处理，甘蔗渣的大部分木聚糖被去除（高达 80%以上），导致酶和纤维素的可及性增加，从而提高了纤维素的酶解效率。令人惊讶的是，经过 EGC 预处理之后，葡萄糖收率反而下降至 10.41%，而其他 DES 的葡萄糖收率也增长不明显，最大的仅为 56.90%，说明以氯化胆碱为 HBA、多元醇为 HBD 的 DESs 在目前的预处理条件下预处理效率较低，与本课题组之前的结论相符合[12]。

在酸性 DES 中，残渣回收率的排序是 MC>OC>LC（52.44%>48.55%>46.16%），木质素去除率的排序是 LC>MC>OC（83.59%>39.49%>24.23%），木聚糖去除率的排序则是 OC>LC>MC（93.90%>82.82%>75.57%），与 Zhang[6]和 Hou[12]等人的结论相符。根据 Francisco 等人的理论[13]，酸性 DES 的预处理效果与 DES 组分的共轭酸的 pKa 值正相关，而溶剂的预处理能力可以由木质素和半纤维素的去除率反映出来，但本文并非如此。本文所采用的预处理条件对于二元羧酸类 DES 来说相对激烈，两个羧基易被激活，释放出二氧化碳[6]，因此这两者的葡萄糖收率和木糖收率均不如 LC。在二元羧酸类 DES 中，过强的酸性可能会带来较低的葡萄糖和木糖产率，主要为激烈的预处理强度导致敏感的半纤维素组分过度降解而损失[14]，且容易导致假木质素产生。这一点在 MC 上得到充分反映，其葡萄糖产率仅为 28.79%，甚至比未预处理甘蔗渣还低，木糖产率是 6.69%，纤维素降解度也仅为 36.50%。

值得一提的是 MC 的木质素去除率比 OC 高，这是因为苹果酸有更长的烷基链[15]，在提取木质素上比草酸更具优势；但 MC 木聚糖去除率又是最低的，一个合理的解释是三碳以上的二元羧酸分子间会形成广泛的二聚体链，限制了体系的流动性[16]，传质相对困难。另外一个原因可能是苹果酸额外的羟基会使得 DESs 更加稳定，粘度增大，因此需要更多能量打开两者之间的网络结构来使得 DES 可以和生物质组分发生作用[17]。LC 预处理残渣成分中纤维素含量为 72.92%，为五组中最高值；木聚糖含量为 9.29%；木质素含量为 7.98%，为 5 组中最低值，木质素去除率也是最高的，因为 LC 对木质素的选择性溶解能力最强，与 Hou[12]、Zhang[6]和 Kumar[3]等人的结论一致。与草酸和苹果酸相比，乳酸属于中强酸，因此 LC 具有最高的木质素去除率、葡萄糖（56.90%）和木糖产率（8.69%）。

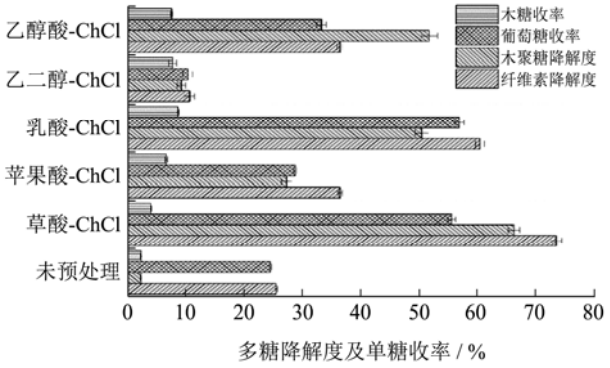


图 2 不同氢键供体的 DES 预处理对甘蔗渣酶解效率的影响

Fig.2 Effect of HBDs on the enzymatic hydrolysis efficiency of DESs pretreated sugarcane bagasse

2.2 氢键受体对 DES 预处理效率的影响

苹果酸是一种酸性较强的二元羧酸，本文进而以其为 HBD，以丙氨酸、甘氨酸、甜菜碱、氯化胆碱、脯氨酸为 HBA，得到五种基于苹果酸的 DES，来探究 DES 的氢键受体对甘蔗渣组成成分和酶水解效率的影响。在 120 ℃下，经 DES 预处理甘蔗渣 6 h 后，残渣的组成与未处理原料产生显著差异（p<0.05），具有统计学意义。纤维素含量由未处理原料中的 35.83%升至 49.26%~52.98%，木聚糖和木质素含量变化不明显，由未处理原料中的 25.00%降至 21.35%~23.38%，木质素含量降至 18.27%~19.73%。最大的纤维素降解度和葡萄糖收率也仅为 43.35%和 38.00%，木聚糖降解度和木糖收率则变化较大，分别为 22.14%~28.27%和 14.86%~15.65%，各组的差异性均显著（p<0.05）。

在三种以氨基酸为 HBA 的 DES 中，苹果酸-甘氨酸预处理获得最低的残渣回收率（61.62%），最高的木质素（45.30%）和木聚糖去除率（47.48%），与 Hou[18]等人的结论一致。这是因为丙氨酸的 α-C 的甲基是一个供电子基，使得氮原子的电负性下降。同理，脯氨

酸的 α-C 环烷烃也是一个供电子基，吸引质子的能力就大大增强，导致丙氨酸和脯氨酸在 DES 体系内形成分子间氢键的强度增大，需要更多的能量来打开两者之间的相互作用来与生物质接触，因此苹果酸-甘氨酸多糖降解度和单糖收率最高。

苹果酸-氯化胆碱预处理后的甘蔗渣酶水解所得纤维素降解度和葡萄糖收率最高，分别为 43.35%、38.00%，与 Kumar[3]的结论一致。根据其观点，木质素在含有氯化胆碱的 DES 体系中的溶解度极高，且木质素为碱溶性大分子，而氯化胆碱为季铵盐，pKa 大于 12；此外，氯化胆碱的羟基与甘蔗渣的纤维素可形成氢键网络，起到保护作用，纤维素和半纤维素是较难溶解的，因此苹果酸-氯化胆碱能够相对有效分离甘蔗渣的各组份。苹果酸-甜菜碱的预处理效率最低，纤维素降解度仅为 32.63%。可能是因为甜菜碱内部的羧基和氮原子形成了分子内氢键，导致 DES 内部更稳定，需要更多的能量打开此键合结构，使得甜菜碱与生物质组分接触并作用，而且本研究所用的 DES 摩尔比仅为 1:1，DES 体系酸度不足，这也是苹果酸-甜菜碱预处理效果较差的重要原因。

表 2 氢键供体对 DES 预处理效率的影响

Table 2 Effect of HBAs on the pretreatment efficiency of DES

DES 种类	纤维素含量/%	木聚糖含量/%	木质素含量/%	纤维素降解度/%	木聚糖降解度/%	葡萄糖收率/%	木糖收率/%
未预处理	35.83±0.16	25.00±0.07	22.44±0.56	25.55±0.26	2.43±0.15	24.52±0.22	2.43±0.14
苹果酸-丙氨酸	49.26±0.82$^{*\#}$	21.35±0.22*	23.16±0.61$^{*\#}$	31.84±0.80$^{*\#}$	25.53±0.93$^{*\#}$	29.67±0.63$^{*\#}$	14.93±0.19*
苹果酸-甘氨酸	50.87±0.20*	22.28±0.34*	19.18±0.46*	42.58±0.47*	28.27±1.12*	37.13±0.35*	15.65±0.23*
苹果酸-甜菜碱	48.68±0.79$^{*\delta}$	23.38±0.25$^{*\delta}$	19.73±0.78$^{*\delta}$	32.63±0.65$^{*\delta}$	22.14±0.87$^{*\delta}$	32.00±0.83$^{*\delta}$	15.12±0.24*
苹果酸-氯化胆碱	52.98±0.31*	22.62±0.54*	18.27±0.85*	43.35±0.90*	27.38±0.72*	38.00±0.84*	15.13±0.56*
苹果酸-脯氨酸	50.14±0.33$^{*\delta}$	21.97±0.47*	18.92±0.72$^{*\delta}$	36.16±0.45$^{*\delta}$	25.42±1.10*	33.25±0.81$^{*\delta}$	14.86±0.30*

注：*表示与未预处理相比，p<0.05 有显著差异；#表示与苹果酸-甘氨酸相比，p<0.05 有显著差异；δ 表示与苹果酸-氯化胆碱相比，p<0.05 有显著差异。

2.3 预处理温度对甘蔗渣组成和酶解效率的影响

根据上述分析，选择摩尔比为 2:1 的 LC 作为预处理甘蔗渣的 DES，温度设定为 130 ℃、140 ℃和 150 ℃，探究预处理温度对甘蔗渣组成和酶解效率的影响（表 3、图 3）。如表 3 所示，随着温度的升高，甘蔗渣残渣回收率不断减少，纤维素含量则随之上升，由 62.70%上升至 84.15%，木聚糖含量下降至 6.21%，木质素含量从 14.34%降至 6.12%，而且各组的差异性均显著（p<0.05）。这是由于氯化胆碱在 DES 处理生物质过程中起相催化转移的作用，提高温度将增强氯化胆碱的相催化转移能力，加快木质素的溶解。同时，多糖降解度和葡萄糖收率不断提高，木糖收率反而有所下降，与 Nagoor[19]、Zhang[6]、Hou[12]等人的结论一致。在 150 ℃时，纤维素降解度达到最大（72.26%），葡萄糖和木糖收率分别为 68.97%，8.55%。根据 D'Agostino 的理论[16]，随着预处理温度的升高，氯化胆碱阳离子和乳酸阴离子的分子间氢键强度会随之减弱，更多自由的吸电子基（羧基）会攻击木质纤维素组分之间形成氢键网络结构，同时也会破坏木质素和半纤维素之间的酯键和醚键，从而导致大量木质素和木聚糖被去除，最终提高酶水解效率。当温度从 140 ℃提高到 150 ℃，甘蔗渣的回收率和纤维素含量变化不大，多糖降解度和单糖收率增长不明显。说明了多糖的损失和酶解效率的提高达到了一个平衡点，当预处理时间为 1 h，150 ℃是一个较为合适的预处理温度。总的来说，在一定温度范围内，升高温度可获得更好的预处理效果，提高葡萄糖收率，但过高的温度会造成较大的木聚糖损失，降低木糖收率（图 3）。

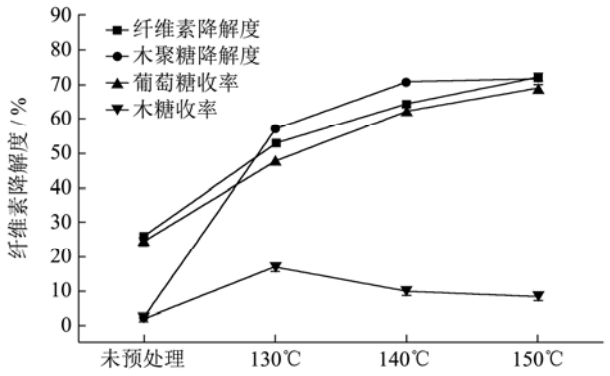


图 3 不同预处理温度对甘蔗渣酶解效率的影响

Fig.3 Effect of pretreatment temperature on the enzymatic hydrolysis efficiency of pretreated sugarcane bagasse

表 3 预处理温度对甘蔗渣的组分含量

Table 3 The composition of sugarcane bagasse obtained at different pretreatment temperatures

预处理条件	回收率/%	纤维素含量/%	木聚糖含量/%	木质素含量/%
130 ℃ 5% 1 h	51.10±0.45	62.70±1.42	12.05±1.19	14.34±0.31
140 ℃ 5% 1 h	41.13±0.54*	83.46±0.99*	7.04±0.30*	13.35±0.50*
150 ℃ 5% 1 h	40.34±0.75*	84.15±0.57*	6.21±0.15*	6.12±0.49*#

注：*表示与 130 ℃ 5% 1 h 相比，p<0.05 有显著差异；#表示与 140 ℃ 5% 1 h 相比，p<0.05 有显著差异。

2.4 预处理时间对甘蔗渣组成和酶解效率的影响

同样选择摩尔比为 2:1 的 LC 预处理甘蔗渣，探究预处理温度为 130 ℃时预处理不同时间对甘蔗渣组成和多糖酶水解效果的影响。如表 4 所示，随着预处理时间的延长，甘蔗渣残渣的木质素含量不断下降，纤维素含量随之增加至 76.26%，多糖降解度也显著提高（p<0.05）。这是因为乳酸-氯化胆碱与甘蔗渣得到更加充分的接触，生物质组分与 DES 发生氢键缔合的频率更高[6]。但当预处理时间为 3 h 时，此多糖降解度最高，分别为 76.70%和 80.60%，同时葡萄糖和木糖收率分别可达 72.63%和 18.12%。因此当预处理温度为 130 ℃，固液比为 5%时，预处理 3 h 是一个恰当的时间。值得注意的是，当预处理时间为 5 h 时，其木聚糖和木质素去除率比 3 h 的高，但多糖酶水解效率却有所降低。可能是因为木质素降解产生大量酚羟基或者假木质素形成，会抑制纤维素酶活性[20]。

表 4 预处理时间对甘蔗渣组分和酶解效率的影响

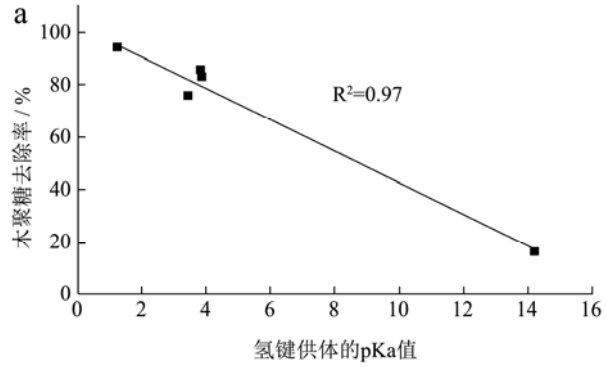
Table 4 Effect of pretreatment time on the components and enzymatic hydrolysis efficiency of bagasse

预处理条件	回收率/%	纤维素含量/%	木聚糖含量/%	木质素含量/%	纤维素降解度/%	木聚糖降解度/%	葡萄糖收率/%	木糖收率/%
130 ℃ 5% 1 h	51.10±0.45	62.70±1.42	12.05±1.19	14.34±0.31	52.89±0.53	57.11±0.41	47.53±0.53	16.67±0.24
130 ℃ 5% 3 h	45.96±0.57*	73.34±0.45*	10.30±0.15*	5.50±0.25*	76.70±0.86*	80.60±0.62*	72.63±0.69*	18.12±0.33*
130 ℃ 5% 5 h	45.74±0.68*	76.26±1.15*#	10.55±0.30*	4.72±0.25*#	63.90±0.78*#	65.87±0.83*#	62.69±0.85*#	15.12±0.29*#

注：*表示与 130 ℃ 5% 1 h 相比，p<0.05 有显著差异；#表示与 140℃ 5% 1 h 相比，p<0.05 有显著差异。

2.5 DES 的 pKa、木聚糖去除率和纤维素降解度之间的关系

以往的研究表明，胆碱单羧酸类和双羧酸类的离子液体的去木质素能力与其阴离子的共轭酸的pKa值线性正相关[15]。现在被广泛接受的理论是 DES 组分的 pKa 值与解离原子位置的电子相关，与质子溶剂化的自由能有关，即溶剂的 pKa 值代表给出质子的能力大小和 DES 体系内部的氢键强度[13]，Gilli 等人也用这个理论来预测溶剂体系的氢键强度[21]。



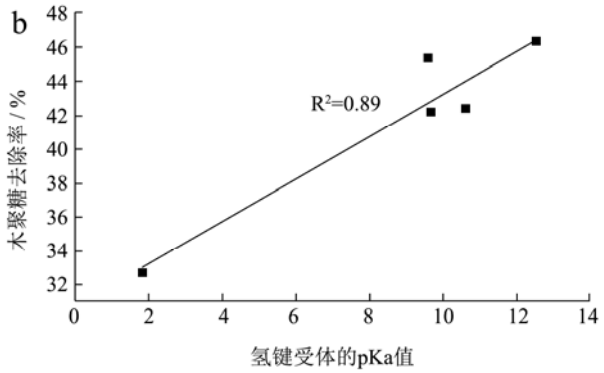


图 4 木聚糖去除率与基于 ChCl 的 DES 的氢键供体 pKa 值（a）、与基于苹果酸的 DES 的氢键受体 pKa 值（b）之间的关系

Fig.4 The relationship between xylan removal and the pKa value of HBDs in ChCl based DESs (a), between xylan removal and the pKa value of HBAs in the malic acid based DESs (b)

然而，在以氯化胆碱为 HBA 的 DESs 中，脱木质素的能力与其氢键供体的pKa值并没有明显的线性关系，而木聚糖去除能力却似乎与 DES 相应组分的 pKa 值相关（图 4）。由图 4(a)可知，随着共轭酸的 pKa 值增大，DES 体系酸度不断下降，HBDs 给出质子的能力越来越弱，其攻击半纤维素和木质素的氢键网络能

力也下降，导致木聚糖去除能力不断下降，与 Hou[12] 等人的结论一致。这就是羧酸类 DESs 去除木聚糖能力较强的原因。图 4(b)的结果则显示木聚糖去除率与 DES 的 HBA 的 pKa 值正相关。随着 HBA 的 pKa 值增大，其接受质子的能力不断增强，DES 体系内部的氢键强度也逐渐下降，需要更少的能量来打开键合结构。与此同时，半纤维素和木质素的氢键网络的质子也更容易与 DES 的 HBAs 相互作用。为了更加深入了解 DES 对甘蔗渣的预处理机制，本文把所有 DES 预处理甘蔗渣的木聚糖和木质素去除率与后续的纤维素降解度进行关联。与胆碱型离子液体不同的是，纤维素降解度与木质素去除率没有明显的相关性，反而与木聚糖去除率线性正相关（图 5），与 Hou[12]等人的结论一致。随着木聚糖去除率的增加，纤维素的可及性就不断增大，使得纤维素的酶水解效率不断提高[22]。

总而言之，DESs 的酸度与预处理能力具有很高的相关性[23]。DESs 预处理甘蔗渣的机理就是解离于氢键供体的质子能够催化木质素和半纤维素之间的酯键和醚键的断裂，导致木质素和半纤维素的去除。这两者的去除程度取决于 DES 解离质子的能力，而这又和 HBA 和 HBD 的分子间氢键强度相关[12]。虽然这种预处理机制与酸预处理机制相似，但实际上 DESs 氢键受体与氢键供体在预处理过程中的具体作用需要进一步深入研究。

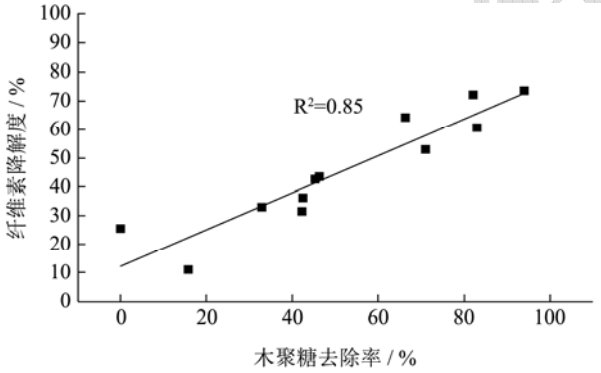


图 5 甘蔗渣残渣的纤维素降解度与木聚糖去除率之间的关系

Fig.5 The relationship between the cellulose digestibility of the sugarcane bagasse residues and xylan removal

3 结论

本文以纤维素含量、葡萄糖收率和纤维素降解度来评价 DES 性质对甘蔗渣组分和酶解效率的影响，其中 LC 和 MC 的预处理效果最佳。研究结果证实了 HBA 和 HBD 对 DES 的预处理效率均不可忽略，两者之间的氢键强度决定了其对生物质的解构能力，而强度大小又与 HBA 和 HBD 的 pKa 值、预处理温度和时间相关。在以氯化胆碱为 HBA 的 DESs 中，木聚糖去除率与氢键供体的 pKa 值负相关；在以 HBD 为氢键供体的 DESs 中，则是正相关。在一定范围内加大 DES 体系的酸度有利于去除更多的木聚糖，导致纤维素降解度的提高。总的来说，本文研究有助于理解 DES 的预处理机制及用于生物质解构的 DESs 的设计。

参考文献

[1] 安艳霞.基于胆碱离子液体的木质纤维素预处理、酶解及其机制的研究[D].广州:华南理工大学,2016
AN Yan-xia. Study on pretreatment, enzymatic hydrolysis and mechanism of lignocellulose based on choline ionic liquid [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2016

[2] Abbott A P, Boothby D, Capper G, et al. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids [J]. Journal of the American Chemical Society, 2004, 126(29): 9142-9147

[3] Kumar A K, Parikh B S, Pravakar M. Natural deep eutectic solvent mediated pretreatment of rice straw: bioanalytical characterization of lignin extract and enzymatic hydrolysis of pretreated biomass residue [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23(10): 9265-9275

[4] Zhang Q, De Oliveira Vigier K, Royer S, et al. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications [J]. Chemical Society Reviews, 41(21): 7108-7146

[5] Perkins S L, Painter P, Colina C M. Experimental and computational studies of choline chloride-based deep eutectic solvents [J]. Journal of Chemical & Engineering Data, 2014, 59(11): 3652-3662

[6] Zhang C W, Xia S Q, Ma P S. Facile pretreatment of lignocellulosic biomass using deep eutectic solvents [J]. Bioresource Technology, 2016, 219: 1-5

[7] Xu G C, Ding J-C, Han R-Z, et al. Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation [J]. Bioresource Technology, 2016, 203: 364-369

[8] Procentese A, Johnson E, Orr V, et al. Deep eutectic solvent pretreatment and subsequent saccharification of corncob [J]. Bioresource Technology, 2015, 192: 31-36

[9] Sluiter J B, Ruiz R O, Scarlata C J, et al. Compositional analysis of lignocellulosic feedstocks. 1. Review and description of methods [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(16): 9043-9053

[10] 何志强,鄢浩,王骑虎.温度对氯化胆碱/多元醇型低共熔溶剂物性的影响[J].上海大学学报(自然科学版),2015,21(3):

384-392
HE Zhi-qiang, YAN Hao, WANG Qi-hu. Effects of temperature on the physical properties of choline chloride/polyol type eutectic solvents [J]. Journal of Shanghai University (Natural Science Edition), 2015, 21(3): 384-392

[11] 刘书燕.胆碱类低共熔溶剂组分间的氢键作用研究[D].新乡:河南师范大学,2017
LIU Shu-yan. Hydrogen bonding among components of choline low eutectic solvents [D]. Xinxiang: Henan Normal University, 2017

[12] Hou X D, Li A L, Lin K P, et al. Insight into the structure-function relationships of deep eutectic solvents during rice straw pretreatment [J]. Bioresource Technology, 2017, 249: 261-267

[13] Francisco M, Van Den Bruinhorst A, Kroon M C. Low-transition-temperature mixtures (LTTMs): A new generation of designer solvents [J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2013, 52(11): 3074-3085

[14] Hou X-D, Lin K-P, Li A-L, et al. Effect of constituents molar ratios of deep eutectic solvents on rice straw fractionation efficiency and the micro-mechanism investigation [J]. Industrial Crops and Products, 2018, 120: 322-329

[15] Hou X D, Xu J, Li N, et al. Effect of anion structures on cholinium ionic liquids pretreatment of rice straw and the subsequent enzymatic hydrolysis [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2014, 112(1): 65-73

[16] D'agostino C, Harris R, Abbott A, et al. Molecular motion and ion diffusion in choline chloride based deep eutectic solvents studied by ^{1}H pulsed field gradient NMR spectroscopy [J]. Physical Chemistry Chemical Physics, 2011, 13(48): 21383-21391

[17] Dai Y, Van Spronsen J, Witkamp G J, et al. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology [J]. Analytica Chimica Acta, 2013, 766: 61-68

[18] Hou X D, Smith T J, Li N, et al. Novel renewable ionic liquids as highly effective solvents for pretreatment of rice straw biomass by selective removal of lignin [J]. Biotechnology & Bioengineering, 2012, 109(10): 2484-2493

[19] Nagoor Gunny A A, Arbain D, Mohamed Daud M Z, et al. Synergistic action of deep eutectic solvents and cellulases for lignocellulosic biomass hydrolysis [J]. Materials Research Innovations, 2014, 18(S6): S6-65-S6-67

[20] Mansfield S D, Mooney C, Saddler J N. Substrate and enzyme characteristics that limit cellulose hydrolysis [J]. Biotechnology Progress, 2013, 15(5): 804-816

[21] Gilli P, Pretto L, Bertolasi V, et al. Predicting hydrogen-bond strengths from acid-base molecular properties. The pK(a) slide rule: toward the solution of a long-lasting problem [J]. Accounts of Chemical Research, 2009, 42(1): 33-44

[22] Leu S Y, Zhu J Y. Substrate-related factors affecting enzymatic saccharification of lignocelluloses: Our recent understanding [J]. Bioenergy Research, 2013, 6(2): 405-415

[23] An Y X, Li N, Wu H, et al. Changes in the structure and the thermal properties of kraft lignin during its dissolution in cholinium ionic liquids [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2015, 3(11): 2951-2958

（上接第 255 页）

[25] Liu Y, Chen H, Chen W. Beneficial effects of tomato juice fermented by *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus casei*: antioxidation, antimicrobial effect, and volatile profiles [J]. Molecules, 2018, 23(9): 2366

[26] 许世闯,万嗣宝,李聪,等.乳酸菌发酵复合果蔬汁的菌种筛选及发酵工艺优化研究[J].食品科技,2017,42(9):2-7
XU Shi-chuang, WAN Si-bao, LI Cong, et al. Strain selection and fermentation process optimization of lactic acid bacteria fermentation compound fruit and vegetable juice [J]. Food Science and Technology, 2017, 42(9): 2-7

[27] 张玉慧.乳酸菌发酵蓝莓果汁的工艺研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2016,6:19-28
ZHANG Yu-hui. Research on the technology of lactic acid bacteria fermentation of blueberry juice [D]. Shenyang : Shenyang Agricultural University, 2016, 6: 19-28

[28] 王茹,方海田,刘慧燕,等.复合乳酸菌发酵枸杞汁的工艺优化[J].食品工业科技,2019,40(8):177-183
WANG Ru, FANG Hai-tian, LIU Hui-yan, et al. Technology optimization of compound lactic acid bacteria fermentation of lycium barbarum juice [J]. Food Industry Science and Technology, 2019, 40(8): 177-183

[29] 靳玉红.红枣乳酸发酵饮料工艺优化、品质分析及乳酸菌鉴定[D].西安:西北农林科技大学,2014,25-30
JIN Yu-hong. Technological optimization, quality analysis and lactic acid bacteria identification of red date lactic acid fermentation beverage [D]. Xi'an: Northwest University of Agriculture and Forestry Science and Technology, 2014, 25-30