

# 胆碱脂肪酸盐离子液体预处理水稻秸秆提高多糖酶解反应的研究

徐杰<sup>1, 2</sup>, 任欢<sup>2</sup>, 李宁<sup>1, 2</sup>, 宗敏华<sup>2</sup>

(1. 中国科学院可再生能源与天然气水合物重点实验室, 广东广州 510640)

(2. 华南理工大学轻工与食品学院制浆造纸工程国家重点实验室, 广东广州 510640)

**摘要:** 木质纤维素预处理是生物精炼制备生物能源的关键步骤之一。近年来, 离子液体预处理木质纤维素逐渐受到人们的关注。本研究通过中和反应合成了7种胆碱脂肪酸盐离子液体, 并用于水稻秸秆预处理。在25℃下, 这些离子液体的粘度介于74~488 cP。结果表明, 经这些生物离子液体预处理后, 水稻秸秆中的多糖酶解效率得到了显著提高。并且, 离子液体的预处理效果依赖于阴离子链长。其中, [胆碱][丁酸盐]为最适水稻秸秆预处理溶剂。在90℃下经[胆碱][丁酸盐]离子液体预处理6h后的水稻秸秆酶解后, 葡萄糖和木糖收率分别达70.62%和41.47%。这类离子液体能选择性从水稻秸秆中除去大量木质素和部分木聚糖, 而不会改变纤维素的晶体结构, 从而显著提高后续酶解效率。

**关键词:** 离子液体; 预处理; 木质纤维素; 酶解反应

文章编号: 1673-9078(2014)11-145-150

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2014.11.026

## Improvement of Enzymatic Hydrolysis of Polysaccharides in Rice Straw by Cholinium Alkanoate Ionic Liquid Pretreatment

XU Jie<sup>1, 2</sup>, REN Huan<sup>2</sup>, LI Ning<sup>1, 2</sup>, ZONG Min-hua<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Renewable Energy and Gas Hydrate, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China)

(2. State Key Laboratory of Pulp and Paper Engineering, College of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Pretreatment of lignocellulosic biomass is a key step in the production of biofuels by biorefinement. Recently, ionic liquid (IL) pretreatment of lignocellulosic biomass has attracted increasing interest. In this study, seven cholinium alkanoate ([Ch][Alk]) ILs were synthesized via a neutralization reaction, and were used for the pretreatment of rice straw. At 25 °C, the viscosities of these ILs ranged from 74 to 488 cP. After the pretreatment of rice straw by these ILs, the efficiency of the enzymatic hydrolysis of polysaccharides in rice straw was improved significantly. In addition, the pretreatment performance of ILs depended on the chain length of the anion. Among the tested ILs, cholinium butyrate ([Ch][But]) proved to be the optimal solvent for the pretreatment of rice straw. Following the enzymatic hydrolysis of rice straw pretreated by [Ch][But] at 90 °C for 6 h, the yields of glucose and xylose reached 70.62% and 41.47%, respectively. This type of IL could selectively remove lignin and xylan from rice straw, while retaining the cellulose crystalline structure, which significantly improved the efficiency of the subsequent enzymatic hydrolysis.

**Key words:** ionic liquids; pretreatment; lignocellulose; enzymatic hydrolysis

随着全球变暖的加剧和化石资源的日益匮乏, 近年来, 生物质等可再生资源的开发和利用逐渐受到学术界和工业界的关注。相对于煤和石油等不可再生资

收稿日期: 2014-04-28

基金项目: 中国科学院可再生能源与天然气水合物重点实验室资助项目(y207k31001); 珠江科技新星专项基金(2012J2200011); 中央高校基本科研业务费项目(2014ZG0045)

作者简介: 徐杰(1986-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 生物质预处理

通讯作者: 李宁, 男, 博士, 副教授, 研究方向: 生物质预处理及生物催化

源, 生物质具有储量大、可再生、绿色环保等优点, 具有广阔的开发和应用前景。木质纤维素是地球上储量最大的可再生生物质资源。由于木质纤维素结构复杂, 纤维素不仅被半纤维素和木质素包裹, 且其分子内及分子间存在大量氢键, 致使其结构高度结晶化, 很难直接利用化学或生物法将其高效转化为还原糖, 进而发酵获得生物能源。故在木质纤维素转化为生物能源过程中, 首先需要木质纤维素进行预处理, 以破坏其三维结构, 削弱木质素及半纤维素对纤维素的

保护作用或(和)降低纤维素的结晶度,增加反应位点,从而提高后续多糖酶解效率<sup>[1]</sup>。

离子液体由于其优异的特性如可设计性、不易挥发、稳定性高,尤其是对多糖等各种生物大分子具有较强的溶解能力,近年来在木质纤维素预处理领域受到广泛关注<sup>[2]</sup>。目前,绝大部分基于离子液体的木质纤维素预处理研究都是利用咪唑类离子液体,尤其是1-乙基-3-甲基咪唑乙酸盐([EMIm][Ace])作为预处理溶剂<sup>[3]</sup>。然而,大量研究已表明咪唑类离子液体并不绿色,其毒性较强、生物可降解性差,是一类环境不友好介质<sup>[4]</sup>;此外,合成这类离子液体的原料源于化石资源,不具可再生性,这可能将极大地限制这类离子液体在木质纤维素预处理中的大规模应用。

最近,本课题组报道了一类源于全生物材料的[胆碱][氨基酸]离子液体,这类离子液体能够选择性萃取木质纤维素材料中的木质素,从而极大地提高后续多糖酶解效率<sup>[5-7]</sup>。更重要的是,这些生物离子液体远比传统的咪唑类离子液体环境友好,具有更低的毒性和更优异的生物可降解性<sup>[8]</sup>。本文报道了另一类胆碱离子液体—胆碱脂肪酸盐(Choliniumalkanoate, [Ch][Alk])离子液体用于水稻秸秆的预处理,研究离子液体结构、预处理时间及预处理温度对预处理过程及后续多糖酶解反应的影响。据报道,胆碱脂肪酸盐同样具有较低的生物毒性和高的生物可降解性<sup>[9]</sup>,故可望对生态系统有较低的负面影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 原料

甲酸、乙酸、丁酸、特戊酸、己酸、辛酸及异辛酸均为市售分析纯。46%胆碱氢氧化物溶液及源于*Trichoderma reesei*的纤维素酶(1 U定义为在pH5.0, 37 °C下,1 h内从SigmaCell纤维素Type 20中水解1 μmol葡萄糖所需的酶量)购自美国Sigma-Aldrich公司。水稻秸秆收集于当地农田,晒干后经机械粉碎,过100目筛后(粒径约150 μm),装入密封袋中,于-20 °C下储存备用。

### 1.2 主要仪器设备

DV II-PRO型粘度计,美国Brookfield公司;787型卡氏水分测定仪,瑞士Metrohm公司;D8 ADVANCE型X-射线衍射分析仪,德国Bruker公司;Waters 515高效液相色谱仪,Waters 2410示差检测器,美国Waters公司。

### 1.3 试验方法

#### 1.3.1 离子液体的合成与表征

在25 °C、搅拌下,将等摩尔的胆碱氢氧化物水溶液逐滴加至脂肪酸溶液,在N<sub>2</sub>保护下反应48 h后,于55 °C、减压下旋蒸除去水分,随后于70 °C下真空干燥48 h,置于干燥器内备用。分别对离子液体的结构、水含量和粘度进行表征。

#### 1.3.2 离子液体预处理水稻秸秆

将300 mg水稻秸秆粉末加入6 g离子液体中,在N<sub>2</sub>保护、一定温度下搅拌预处理一定时间。随后加入等体积的去离子水稀释、混匀,过滤,并利用去离子水多次洗涤滤渣,真空冷冻干燥后,于-20 °C下储存备用。结果为两次实验的平均值,误差范围低于3%。

#### 1.3.3 水稻秸秆成分分析

水稻秸秆中各组分含量的测定参考Hou等的方法<sup>[6]</sup>。水稻秸秆样品先后经72%和4% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水解后,过滤。部分滤液用碳酸钙调节滤液pH至5.0~6.0,利用HPLC测定水解液中葡萄糖及木糖浓度,据此计算样品中纤维素及木聚糖含量。另一部分滤液在320 nm下测定吸光值,根据吸光系数为30 L/(g·cm)计算酸溶木质素的含量。酸不溶性滤渣经去离子水洗涤多次,在干燥箱内于105 °C烘干至恒重并称量,随后置于马弗炉内于575 °C下烘至恒重、称量,计算酸不溶木质素的含量。结果为两次实验的平均值,误差范围低于3%。木质素萃取率计算:

$$\text{木质素萃取率}/\% = \left(1 - \frac{\text{残渣回收率} \times \text{残渣中木质素含量}}{\text{原始样品中木质素含量}}\right) \times 100$$

#### 1.3.4 水稻秸秆样品的酶解及HPLC分析

10 mg水稻秸秆样品加入含50 U纤维素酶的3.5 mL柠檬酸缓冲液(50 mM, pH4.8),混合均匀,置于恒温振荡器内(50 °C, 200 r/min)反应,计时。定时取样100 μL,于100 °C下灭活5 min终止反应,用流动相(5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液)稀释2倍,经0.22 μm孔径的微孔滤膜过滤后,离心(18000×g)10 min后取上清液,供液相色谱分析。结果为两次实验的平均值,误差范围低于3%。

葡萄糖及木糖浓度通过Waters高效液相色谱仪[Aminex HPX-87H (7.8×300 mm)]分析。柱温:65 °C;检测温度:50 °C;流动相:5 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液;流速:0.5 mL/min。纤维二糖、葡萄糖、木糖的保留时间分别为9.8、12.0和13.0 min。

#### 1.3.5 水稻秸秆的纤维素结晶度测定

水稻秸秆样品经X-射线衍射分析仪测定其衍射

图谱,扫描角度为5~60°,步长0.04°,电压40 kV,电流40 mA。水稻秸秆样品的纤维素结晶度(CrI)计算:

$$\text{CrI} = \frac{I_{002} - I_{am}}{I_{002}} \times 100$$

注:其中 $I_{002}$ 为纤维素样品中结晶部分002面(2 $\theta$ ≈22.5°)的结晶峰强度, $I_{am}$ 为非结晶部分(2 $\theta$ ≈18.2°)的峰强度。

## 2 结果与讨论

### 2.1 胆碱脂肪酸盐离子液体的水含量及粘度

表1 25 °C下胆碱脂肪酸盐离子液体粘度

Table 1 Viscosity of [Ch][Alk] ILs at 25 °C

| 离子液体   | 简写         | 粘度/cP          |
|--------|------------|----------------|
| 胆碱甲酸盐  | [Ch][For]  | 74.25          |
| 胆碱乙酸盐  | [Ch][Ace]  | 91.07          |
| 胆碱丁酸盐  | [Ch][But]  | 124.03         |
| 胆碱特戊酸盐 | [Ch][Piv]  | 488.36         |
| 胆碱己酸盐  | [Ch][Hex]  | 288.00         |
| 胆碱辛酸盐  | [Ch][Oct]  | - <sup>a</sup> |
| 胆碱异辛酸盐 | [Ch][iOct] | 427.51         |

注:<sup>a</sup>在25 °C下是固体。

所有离子液体在70 °C下真空干燥48 h后,水含量均低于0.1%。各离子液体的NMR氢谱与以前的报道相同<sup>[9]</sup>,故可以确定为胆碱脂肪酸盐(表S1)。尽管离子液体具有诸多优异的溶剂性质,但这类离子型的溶剂也有许多缺点,例如大多数离子液体的粘度远高于分子型溶剂,从而影响其应用。故近年来,诸多课题组致力于开发粘度低的离子液体<sup>[10]</sup>。本文首先测定了这些胆碱脂肪酸盐离子液体的粘度(表1)。

由表1可知,在25 °C下,除[Ch][Oct]为固态外,其他离子液体均为液体,粘度介于74~488 cP之间。而且,离子液体的粘度随着阴离子碳链的增长显著增大,这可能是由于范德华力增加所致<sup>[11]</sup>。其中,[Ch][For]的粘度最小,仅为74.25 cP,与1-烯丙基-3-甲基咪唑甲酸盐的粘度(66 cP)相当<sup>[12]</sup>。粘度最大的离子液体是[Ch][Piv],达488.36 cP。但这6种离子液体粘度均小于500 cP,可望能用于水稻秸秆预处理,提高后续多糖酶解效率。

### 2.2 胆碱脂肪酸盐离子液体预处理对水稻秸秆组成和酶解效率的影响

表2 胆碱脂肪酸盐离子液体预处理水稻秸秆

Table 2 Pretreatment of rice straw by various [Ch][Alk] ILs

| 离子液体       | 残渣中各组分含量/% |       |        |       | 残渣中各组分回收率/% |        |        |
|------------|------------|-------|--------|-------|-------------|--------|--------|
|            | 纤维素        | 木聚糖   | 酸不溶木质素 | 酸溶木质素 | 纤维素         | 木聚糖    | 酸不溶木质素 |
| 未经预处理      | 37.82      | 19.60 | 16.41  | 2.02  | 100.00      | 100.00 | 100.00 |
| [Ch][For]  | 46.64      | 18.71 | 10.22  | 1.63  | 85.46       | 66.15  | 43.16  |
| [Ch][Ace]  | 48.23      | 20.63 | 9.82   | 1.54  | 87.74       | 72.42  | 41.17  |
| [Ch][But]  | 51.58      | 20.58 | 8.71   | 2.01  | 88.79       | 68.36  | 34.55  |
| [Ch][Piv]  | 54.04      | 17.60 | 8.13   | 1.28  | 91.16       | 57.29  | 31.61  |
| [Ch][Hex]  | 48.42      | 21.81 | 13.44  | 1.56  | 85.91       | 74.67  | 54.96  |
| [Ch][Oct]  | 51.12      | 18.23 | 8.79   | 2.10  | 90.56       | 62.32  | 35.89  |
| [Ch][iOct] | 50.17      | 21.08 | 13.36  | 1.27  | 87.82       | 71.20  | 53.90  |

注:预处理条件:在N<sub>2</sub>保护情况下,300 mg水稻秸秆在6 g离子液体中于90 °C下搅拌6 h。

随后,对比研究了这7种胆碱脂肪酸盐离子液体预处理水稻秸秆前后组分的变化(表2)。由表2可知,预处理前,水稻秸秆中纤维素、木聚糖、酸不溶木质素和酸溶木质素含量分别为37.82%、19.60%、16.41%和2.02%。经离子液体预处理后,其纤维素含量增至46.64~54.04%,木聚糖含量几乎保持不变,但酸不溶木质素含量降至8.13~13.44%。根据预处理后,水稻秸秆残渣的回收率及各组分含量的变化,可以计算得到残渣中各组分的回收率。从表2可知,纤维素的回收率较高,达85.46~91.16%;木聚糖回收率次之,介

于57.29~74.67%之间;而木质素回收率最低,为31.61~54.96%。这表明这类离子液体与[胆碱][氨基酸]离子液体具有类似的性质<sup>[6]</sup>,能够从水稻秸秆中选择性提取大部分木质素,破坏木质纤维素的三维结构,但又不会导致多糖显著降解而降低还原糖收率,故可望成为一类优异的木质纤维素预处理溶剂。Ninomiya等最近也研究发现竹粉经[Ch][Ace]预处理后,纤维素消解率得到显著提高,达80%<sup>[13]</sup>。在上述7种离子液体中,[Ch][But]和[Ch][Piv]对木质素的提取能力相对较强。

表 3 未预处理的和经离子液体预处理的水稻秸秆酶解反应

Table 3 Enzymatic hydrolysis of the untreated and IL-pretreated rice straw

| 离子液体       | 纤维素结晶度/% | 糖化初速度/[mg/(mL·h)] |      | 多糖消解率/% |       | 糖收率/% |       |
|------------|----------|-------------------|------|---------|-------|-------|-------|
|            |          | 葡萄糖               | 木糖   | 葡萄糖     | 木糖    | 葡萄糖   | 木糖    |
| 未经预处理      | 59.60    | 0.15              | 0.05 | 20.93   | 8.74  | 20.93 | 8.74  |
| [Ch][For]  | 66.42    | 0.68              | 0.14 | 64.82   | 33.60 | 57.52 | 25.57 |
| [Ch][Ace]  | 72.33    | 0.91              | 0.27 | 70.51   | 42.29 | 63.53 | 34.76 |
| [Ch][But]  | 76.61    | 1.07              | 0.38 | 77.40   | 56.71 | 70.58 | 42.86 |
| [Ch][Piv]  | 80.04    | 0.98              | 0.33 | 75.71   | 55.95 | 70.75 | 35.09 |
| [Ch][Hex]  | 72.59    | 0.84              | 0.27 | 70.43   | 47.99 | 62.04 | 39.04 |
| [Ch][Oct]  | 79.53    | 0.76              | 0.26 | 74.06   | 61.80 | 68.71 | 41.84 |
| [Ch][iOct] | 69.32    | 0.92              | 0.30 | 68.74   | 56.16 | 62.02 | 43.51 |

注：条件：10 mg 水稻秸秆残渣, 3.5 mL 柠檬酸盐缓冲液(50 mM, pH 4.8), 14.3 U/mL 来源于 *Trichoderma reesei* 纤维素酶, 50 °C, 200 r/min. 反应 24 h。

由表 3 可知, 水稻秸秆经离子液体预处理后, 葡萄糖释放初速度是预处理前的 4.5~7.1 倍, 而木糖释放初速度为预处理前的 2.8~7.6 倍。并且, 预处理后, 水稻秸秆中多糖消解率也得到了显著提高。例如, 经 [Ch][But] 预处理的水稻秸秆中纤维素的消解率达 77.40%, 远高于未经预处理的水稻秸秆原料的纤维素降解度 (20.93%); 类似地, 经该离子液体预处理后的原料中木聚糖的消解率是未经处理原料木聚糖消解率的 6.5 倍 (56.71% vs 8.74%)。关于离子液体预处理提高木质纤维素原料多糖酶解效率的原因, 多数研究提出是预处理过程导致纤维素结晶度的降低和/或木质素的去除所致<sup>[14]</sup>。为了初步阐明这类离子液体预处理提高水稻秸秆多糖酶解效率的原因, 我们测定了预处理前后水稻秸秆中纤维素晶体结构的变化 (图 1)。结果表明, 纤维素晶体结构未发生显著变化。由表 3 可知, 预处理后, 水稻秸秆的纤维素结晶度显著增大 (66.42~80.04% vs 59.60%), 这与传统离子液体预处理后纤维素结晶度变化的结果完全相反<sup>[14]</sup>。这可能是由于胆碱脂肪酸盐离子液体与传统离子液体对纤维素溶解性能不同导致的。由于胆碱脂肪酸盐离子液体对纤维素几乎不能溶解, 故对纤维素晶体结构影响较小, 但是在预处理过程中能选择性除去大量无定型的组分如木质素和半纤维素, 从而导致水稻秸秆中纤维素结晶度净增加。这与 [胆碱][氨基酸] 离子液体预处理水稻秸秆中的纤维素结晶度变化结果类似<sup>[6]</sup>。因此, 胆碱脂肪酸盐离子液体在预处理过程中能够除去大量木质素和部分半纤维素导致水稻秸秆三维结构变化, 从而显著提高后续酶解效率。由表 3 可知, 经 [Ch][But] 及 [Ch][Piv] 预处理的水稻秸秆酶解后, 葡萄糖和木糖收率均相对较高, 但是由于 [Ch][But] 的粘度远低于 [Ch][Piv] 的粘度, 故选择 [Ch][But] 用于后续预处理过

程优化。

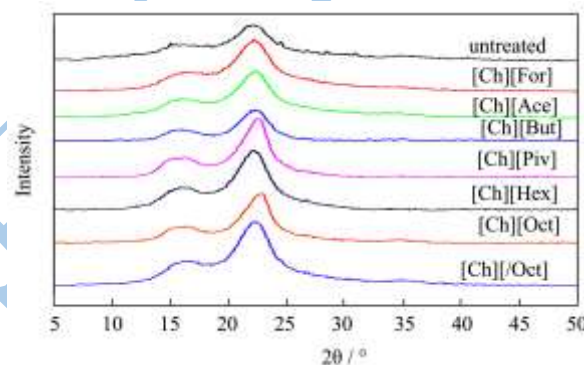


图 1 未预处理的和经离子液体预处理的水稻秸秆的 X-射线衍射图

Fig.1 X-ray diffraction spectra of the untreated and IL-pretreated rice straw

### 2.3 预处理温度对 [Ch][But] 预处理过程及后续多糖酶解反应的影响

研究表明预处理温度对预处理过程和后续酶解反应有显著的影响<sup>[6]</sup>。因此, 在 90~130 °C 范围内, 研究了预处理温度对木质素萃取率、残渣组成及后续酶解反应的影响 (表 4)。表 4 显示木质素萃取率随预处理温度的提高略有增加。例如, 在 90 °C 下预处理 6 h 后, 木质素萃取率为 66.23%, 而当预处理温度为 130 °C 时, 木质素萃取率达到 74.12%。相应地, 在较高温度下预处理后的残渣中木质素含量也相对较低。并且, 当预处理温度由 90 °C 上升至 110 °C 时, 后续酶解反应中还原糖释放初速度逐渐增大, 但预处理温度继续上升对还原糖释放初速度影响甚微。在所研究的预处理温度范围内, 尽管多糖降解度随预处理温度的升高略有提高 (图 S1), 但还原糖收率几乎相当 (葡

葡萄糖收率 70.34~74.18%；木糖收率 38.22~44.31%），其原因是随着预处理温度的升高水稻秸秆中多糖损失增大。例如，在 90 °C 下预处理水稻秸秆，纤维素和木聚糖损失率分别为 9%和 33%，而在 130 °C 下，其

损失率分别增至 17%和 44%。当温度超过 110 °C 时，预处理导致的多糖损失超过了其降解度的增大，因而还原糖收率降低。

表 4 预处理温度对[Ch][But]预处理水稻秸秆及后续多糖酶解反应的影响

Table 4 Effect of pretreatment temperature on [Ch][But] pretreatment of rice straw and subsequent enzymatic hydrolysis of polysaccharides

| 预处理 <sup>a</sup> |           |          | 残渣中各组分含量/% |       |         |        | 残渣酶解 <sup>b</sup> |      |       |       |
|------------------|-----------|----------|------------|-------|---------|--------|-------------------|------|-------|-------|
| 温度 /°C           | 木质素萃 取率/% | 残渣回 收率/% | 纤维素        | 木聚糖   | 酸不溶 木质素 | 酸溶木 质素 | 糖化初速度/[mg/(mL·h)] |      | 糖收率/% |       |
|                  |           |          |            |       |         |        | 葡萄糖               | 木糖   | 葡萄糖   | 木糖    |
| 90               | 66.23     | 63.71    | 52.91      | 20.61 | 8.74    | 1.71   | 1.07              | 0.40 | 70.61 | 42.03 |
| 100              | 67.14     | 62.72    | 53.63      | 22.93 | 8.62    | 1.72   | 1.12              | 0.45 | 70.72 | 44.31 |
| 110              | 71.69     | 58.78    | 56.94      | 17.14 | 7.92    | 1.44   | 1.44              | 0.54 | 74.18 | 38.22 |
| 120              | 73.54     | 57.93    | 55.65      | 19.68 | 7.53    | 1.19   | 1.43              | 0.50 | 70.34 | 39.04 |
| 130              | 74.12     | 57.37    | 54.28      | 18.87 | 7.42    | 1.23   | 1.47              | 0.57 | 71.24 | 41.91 |

注：<sup>a</sup> 条件：在 N<sub>2</sub> 保护情况下，300 mg 水稻秸秆在 6 g 离子液体中于特定温度下搅拌 6 h；<sup>b</sup> 条件：10 mg 水稻秸秆残渣，3.5 mL 柠檬酸盐缓冲液(50 mM, pH 4.8)，14.3 U/mL 来源于 *Trichoderma reesei* 纤维素酶，50 °C，200 r/min。反应 24 h。

## 2.4 预处理时间对[Ch][But]预处理过程及后续多糖酶解反应的影响

表 5 预处理时间对[Ch][But]预处理水稻秸秆及后续多糖酶解反应的影响

Table 5 Effect of pretreatment time on [Ch][But] pretreatment of rice straw and subsequent enzymatic hydrolysis of polysaccharides

| 预处理 <sup>a</sup> |           |          | 残渣中各组分含量/% |       |         |        | 残渣酶解 <sup>b</sup> |      |       |       |
|------------------|-----------|----------|------------|-------|---------|--------|-------------------|------|-------|-------|
| 时间/h             | 木质素萃 取率/% | 残渣回 收率/% | 纤维素        | 木聚糖   | 酸不溶 木质素 | 酸溶木 质素 | 糖化初速度/[mg/(mL·h)] |      | 糖收率/% |       |
|                  |           |          |            |       |         |        | 葡萄糖               | 木糖   | 葡萄糖   | 木糖    |
| 1                | 40.38     | 68.9     | 48.72      | 21.43 | 14.23   | 1.41   | 0.53              | 0.11 | 41.13 | 19.23 |
| 3                | 48.74     | 67.3     | 50.43      | 21.72 | 12.54   | 1.53   | 0.75              | 0.20 | 49.93 | 31.34 |
| 6                | 66.23     | 63.7     | 52.94      | 20.57 | 8.68    | 1.67   | 1.07              | 0.40 | 70.62 | 41.47 |
| 9                | 74.29     | 58.6     | 56.42      | 20.72 | 7.22    | 1.42   | 1.16              | 0.47 | 70.61 | 41.92 |
| 12               | 75.51     | 56.6     | 58.24      | 20.54 | 7.14    | 1.33   | 1.28              | 0.51 | 69.94 | 40.13 |
| 24               | 76.71     | 55.4     | 58.72      | 20.32 | 6.91    | 1.24   | 1.43              | 0.59 | 68.63 | 40.62 |
| 34               | 78.04     | 54.6     | 59.03      | 19.93 | 6.61    | 1.12   | 1.33              | 0.56 | 67.82 | 39.44 |

注：<sup>a</sup> 条件：在 N<sub>2</sub> 保护情况下，300 mg 水稻秸秆在 6 g 离子液体中于 90 °C 下搅拌一定时间；<sup>b</sup> 条件：10 mg 水稻秸秆残渣，3.5 mL 柠檬酸盐缓冲液(50 mM, pH 4.8)，14.3 U/mL 来源于 *Trichoderma reesei* 纤维素酶，50 °C，200 r/min。反应 24 h。

表 5 展示了预处理时间对[Ch][But]预处理过程及后续多糖酶解反应的影响。结果表明，当预处理时间低于 9 h 时，木质素萃取率随预处理时间的延长显著增加；相应地，后续残渣的酶解效率也得到显著提高。例如，预处理 1 h 的水稻秸秆进行酶解时，葡萄糖和木糖释放初速度分别为 0.53 和 0.11 mg/(mL·h)；反应 24 h 后，纤维素和木聚糖消解率分别为 43.00% 和 22.96%（图 S2）。而预处理 6 h 的水稻秸秆酶解时，葡萄糖和木糖释放初速度分别上升至 1.16 和 0.47 mg/(mL·h)；反应 24 h，纤维素和木聚糖消解率分别达

75.55%和 57.09%。但在 9~34 h 预处理时间范围内，木质素萃取率变化较小；尽管还原糖释放初速度随预处理时间的延长略有上升，但多糖消解率变化较小（图 S2，纤维素消解率 75.97~77.03%，木聚糖消解率 62.51~66.91%），并且多糖损失相当（纤维素损失 13~15%，木聚糖损失 38~45%），从而导致还原糖收率相当（葡萄糖收率 67.82~70.61%，木糖收率 39.44~41.92%）。综合考虑还原糖收率及能耗，6 h 为最优预处理时间。在 90 °C 下经[Ch][But]离子液体预处理 6 h 后的水稻秸秆进行酶解时，反应 24 h 后，葡萄

糖和木糖收率分别为 70.62% 和 41.47%。

### 3 结论

完全由生物材料组成的胆碱脂肪酸盐离子液体是一类优秀的木质纤维素预处理溶剂,能够高效、高选择性从水稻秸秆中萃取木质素,破坏其三维结构,提高多糖可及性和反应活性,从而显著增强后续多糖酶解效率。并且,该类离子液体的预处理过程完全不同于传统离子液体的,因为利用前者不能显著改变纤维素的晶体结构。离子液体阴离子的链长不仅影响其粘度,而且对离子液体的预处理效果也有显著的影响。其中, [Ch][But]为最优预处理溶剂。在所研究的范围内,预处理温度对预处理后残渣组成及后续多糖酶解效率影响不显著,但预处理时间对上述两参数影响显著。这类绿色、可再生离子液体的应用将促进木质纤维素预处理向更绿色、简易、经济、高效的方向发展。

### 参考文献

- [1] Mora-Pale M, Meli L, Doherty TV, et al. Room temperature ionic liquids as emerging solvents for the pretreatment of lignocellulosic biomass [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2011, 108: 1229-1245
- [2] Domínguez de María P. Recent trends in (ligno) cellulose dissolution using neoteric solvents: switchable, distillable and bio-based ionic liquids [J]. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2014, 89: 11-18
- [3] Brandt A, Gräsvik J, Hallett JP, et al. Deconstruction of lignocellulosic biomass with ionic liquids [J]. *Green Chem.*, 2013, 15: 550-583
- [4] Cvjetko Bubalo M, Radosevic K, Radojic Redovnikovic I, et al. A brief overview of the potential environmental hazards of ionic liquids [J]. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 2014, 99: 1-12
- [5] Liu QP, Hou XD, Li N, et al. Ionic liquids from renewable biomaterials: synthesis, characterization and application in the pretreatment of biomass [J]. *Green Chem.*, 2012, 14: 304-307
- [6] Hou XD, Smith TJ, Li N, et al. Novel renewable ionic liquids as highly effective solvents for pretreatment of rice straw biomass by selective removal of lignin [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, 109: 2484-2493
- [7] Hou XD, Li N, Zong MH. Facile and simple pretreatment of sugar cane bagasse without size reduction using renewable ionic liquids-water mixtures [J]. *ACS Sustainable Chem. Eng.*, 2013, 1: 519-526
- [8] Hou XD, Liu QP, Smith TJ, et al. Evaluation of toxicity and biodegradability of cholinium amino acids ionic liquids [J]. *PLoS One*, 2013, 8: e59145
- [9] Petkovic M, Ferguson JL, Gunaratne HQN, et al. Novel biocompatible cholinium-based ionic liquids-toxicity and biodegradability [J]. *Green Chem.*, 2010, 12: 643-649
- [10] Peppel T, Kockerling M, Geppert-Rybczynska M, et al. Low-viscosity paramagnetic ionic liquids with doubly charged [Co(NCS)<sub>4</sub>]<sup>2-</sup> ions [J]. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49: 7116-7119
- [11] Yu YH, Lu XM, Zhou Q, et al. Biodegradable naphthenic acid ionic liquids: synthesis, characterization, and quantitative structure-biodegradation relationship [J]. *Chem-Eur. J.*, 2008, 14: 11174-11182
- [12] 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: 3295-3297
- [13] Ninomiya K, Soda H, Ogino C, et al. Effect of ionic liquid weight ratio on pretreatment of bamboo powder prior to enzymatic saccharification [J]. *Bioresour. Technol.*, 2012, 128: 188-192
- [14] Lee SH, Doherty TV, Linhardt RJ, et al. Ionic liquid-mediated selective extraction of lignin from wood leading to enhanced enzymatic cellulose hydrolysis [J]. *Biotechnol. Bioeng.*, 2009, 102: 1368-1376