

• 研究论文 •

离子液体[BMIM]Cl 预处理对微晶纤维素酶解的影响

李秋瑾 殷友利 苏荣欣 齐 崑* 何志敏

(天津大学化工学院化学工程研究所 天津 300072)

摘要 以微晶纤维素为研究对象, 设计了离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑氯盐(1-butyl-3-methylimidazolium chloride, [BMIM]Cl)预处理微晶纤维素 Avicel 的实验方法以实现纤维素的高效酶解糖化. 在[BMIM]Cl 中 Avicel 完全溶解, 经水洗沉淀得到再生纤维素, 回收后的离子液体可重复利用. 预处理后底物酶解的可溶性糖转化率在 24 h 时高达 94.65%, 较之同样条件下未经预处理底物的酶解糖转化率(48.57%)有飞跃性提升. 进一步考察了离子液体预处理对纤维素结构及形态的影响, 结果表明: [BMIM]Cl 预处理后 Avicel 氢键减弱; 结晶度明显下降, 结晶型态由纤维素 I 型转变为纤维素 II 型; 由规整的平行排布转变为疏松有孔的无序形貌. 正是离子液体预处理引起的纤维素微观与宏观结构性质的显著改变使得再生后纤维素酶解的可溶性糖转化率大幅提高.

关键词 纤维素; 离子液体; 预处理; 酶解

Enzymatic Hydrolysis of Microcrystalline Cellulose with an Ionic Liquid Pretreatment Step

Li, Qiujiun Yin, Youli Su, Rongxin Qi, Wei* He, Zhimin

(Chemical Engineering Research Center, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract Microcrystalline cellulose Avicel was subjected to an ionic liquid (IL) 1-butyl-3-methylimidazolium chloride ([BMIM]Cl) pretreatment step to obtain a high conversion of soluble sugars in the enzymatic hydrolysis of cellulose. Avicel was dissolved completely in [BMIM]Cl, followed by precipitating it into deionized water to obtain the regenerated cellulose. The high performance liquid chromatography (HPLC) analysis results indicated that after 24 h, the sugar released from IL-treated Avicel was 94.65%, much higher than that from the original Avicel (48.57%). Structure, crystallinity and morphology of the IL-treated Avicel were also investigated as follows: the hydrogen bonding, detected by FTIR, decreased; the crystallinity, monitored by XRD, changed significantly from crystalline to amorphous pattern; the morphology, examined by SEM, demonstrated that the orderly structure was destroyed remarkably with some pores and holes appearing in the cellulose substrates. These changes of Avicel pretreated with [BMIM]Cl led to the increase of sugar conversion during cellulose enzymatic hydrolysis.

Keywords cellulose; ionic liquid; pretreatment; enzymatic hydrolysis

随着石油等传统资源快速大量消耗以及整个世界范围内环境污染的日益加重, 资源及能源的可持续发展与利用迫在眉睫. 纤维素类生物质是地球上最丰富的可

再生资源, 通过酶解糖化与发酵制醇等生物炼制过程, 可在一定程度上缓解能源短缺的问题^[1,2]. 因此如何高效绿色地开发利用以纤维素为主的可再生资源已成为

* E-mail: qiwei@tju.edu.cn

Received August 27, 2008; revised October 30, 2008; accepted December 4, 2008.

国家自然科学基金(No. 20576095)、国家科技支撑计划(No. 2007BAD42B02)、国际科技合作计划(No. 2006DA62400)、教育部创新团队(2007IRT0641)、教育部科学技术研究重点项目(No. 108031)基金资助项目.

当今世界可持续发展战略的重要议题。

纤维素酶解是制备生物质燃料的重要一步, 但纤维素分子排布紧密、高结晶度、不溶于水及大部分有机溶剂的特性, 使其降解和转换效率普遍较低且加工能耗很大^[3], 成为制约糖化制醇的关键因素。因此, 破坏纤维素网状骨架, 降低分子结晶度将是提高酶解效率的有效途径^[4]。自 20 世纪 70 年代以来, 一些溶剂体系如 LiCl/*N,N*-二甲基乙酰胺 (DMAc), *N*-甲基吗啉-*N*-氧 (NMMO), 氢氧化物熔融盐 (LiClO₄·3H₂O or LiSCN·2H₂O) 和金属络合物水溶液被用于纤维素的溶解及再生, 且部分实现了商业化^[5]。然而, 这些溶剂大多存在价格昂贵、易挥发、有毒性、不稳定和难回收等缺点。近期研究发现, 一些新型的离子液体 (Ionic Liquids, ILs) 可理想地溶解纤维素^[6], 而且离子液体不易挥发并具有很好的化学及热稳定性, 与传统有机溶剂相比被称为“绿色”溶剂。目前, 国内外已有一些文献对离子液体处理纤维素进行了报道: Rogers 等^[7]首先提出了离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑氯盐 ([BMIM]Cl) 可以溶解纤维素的观点; 任强^[8]等合成了新型室温离子液体 1-烯丙基-3-甲基咪唑氯盐 ([AMIM]Cl), 考察了其对纤维素的溶解性能, 并从微观角度分析了溶解机理; 郭明^[9]等对咪唑类离子液体溶解微晶纤维素的最适条件进行了研究, 并对溶解机理进行了探讨; Dadi 等^[10]对离子液体 [BMIM]Cl 处理微晶纤维素后糖的酶解释放规律进行了研究。

本文则以微晶纤维素 Avicel 为研究对象, 重点考察离子液体预处理后微晶纤维素的酶解效果, 利用高效液相色谱得到酶解产物糖释放曲线, 并综合运用傅立叶红外分光光度法, X 射线衍射法, 以及扫描电子显微镜等从化学结构、结晶形态以及宏观形貌等方面多尺度研究离子液体对纤维素结构与性质的改变, 从而分析预处理后纤维素酶解产糖率显著提高的原因, 可为纤维素基燃料乙醇的生物炼制过程提供参考。

1 实验部分

1.1 实验材料

微晶纤维素 Avicel PH-101 (~50 μm): Sigma 公司; 纤维素酶 (160 FPU/mL): Genecor 公司, 纤维二糖酶 (926 IU/mL): Sigma 公司; *N*-甲基咪唑 (分析纯): 百灵威公司; 其他试剂均为分析纯, 市售。

1.2 实验仪器

数显磁力搅拌器 (巩义市英裕仪器厂); 恒温振荡水浴 (JULABO 公司); 旋转蒸发器 (上海申生科技有限公

司); 冷冻干燥机 (LABCONCO 公司); 高效液相色谱 (HPLC) 系统: P200 II 高压恒流泵、EChrom98 色谱工作站 (大连依利特分析仪器有限公司); RI-71 示差折光检测器 (SHODEX, 日本); HPX-87H 色谱柱 (Bio-Rad 公司); 傅立叶变换红外分光光谱仪 FT-IR (560E.S.P, Thermo Nicolet); X 射线衍射仪 XRD (X'Pert Pro, PANalytical); 扫描电子显微镜 SEM (S-3500N, Hitachi)。

1.3 离子液体 1-丁基-3-甲基咪唑氯 ([BMIM]Cl) 的合成^[8]

量取 100 mL (1.253 mol) *N*-甲基咪唑和 160 mL (1.504 mol) 1-氯丁烷 (两者物质的量比约为 1 : 1.2) 混合于圆底烧瓶中, 在 85 °C 油浴中回流 (同时施以磁力搅拌)。随时间延长溶液逐渐由无色变为浅黄色, 粘度逐渐增大, 24 h 后基本无液滴回流, 反应停止。用旋转蒸发器蒸除过量 1-氯丁烷, 冷却得白色固体 [BMIM]Cl。

1.4 纤维素的溶解及再生

称取微晶纤维素 Avicel 5 g, [BMIM]Cl 45 g, 放入圆底烧瓶中, 使得溶液浓度为 10%, 于 130 °C 密封, 强烈机械搅拌至样品完全溶解。

将所得纤维素溶液用 5 倍于其体积的去离子水反复冲洗沉降, 得到再生纤维素, 并减压旋蒸回收离子液体。过滤后将产物冻干 48 h。

1.5 处理前后 Avicel 的酶解

向离子液体处理前后的 Avicel 中加入 0.05 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 4.8), 固液比为 1/20 (w/V), 置于温度 50 °C、转速 150 r/min 水浴摇床中反应。每个样品中加入 40 FPU/g 底物的纤维素酶及 60 IU/g 底物的纤维二糖酶, 反应不同时间间隔后置于沸水中加热 10 min 充分灭酶。将灭酶后的溶液过滤取清液定容, 经 HPLC 分析得到酶解反应糖释放曲线。

1.6 高效液相色谱 (HPLC) 分析

可溶性糖液组成利用高效液相色谱测定, 样品定容后, 过膜 (0.45 μm), 脱气, 进样, 进样量为 20 μL。操作条件为: HPX-87H 色谱柱; RI-71 示差折光检测器; 流动相: 0.005 mol/L H₂SO₄; 流速: 0.6 mL/min; 柱温: 65 °C; 检测时间 20 min。

1.7 纤维素底物结构形貌分析

将 [BMIM]Cl 预处理前后的微晶纤维素 Avicel 进行傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 测试, X 射线衍射 (XRD) 分析及扫描电子显微镜 (SEM) 观测, 从分子结构、结晶形态及总体形貌等方面对离子液体预处理前后 Avicel 进行多角度表征。

2 结果与讨论

2.1 离子液体处理前后纤维素材料的酶解速率

图1是离子液体处理前后 Avicel 酶解过程中可溶性糖的液相色谱检测图. 保留时间为 6.81 min 及 8.39 min 的组分分别对应纤维二糖和葡萄糖. 由图可见, 随时间增加纤维二糖含量逐渐下降, 而葡萄糖含量逐渐上升. 这是由于纤维二糖酶 β -glucosidase 的存在, 可不断消耗酶解反应产生的纤维二糖, 降低了产物抑制现象, 提高了糖的转化率, 而使葡萄糖含量不断升高. 同时发现, 预处理后反应初始阶段(0.5~3 h)葡萄糖含量的增加大于反应后期(3~24 h).

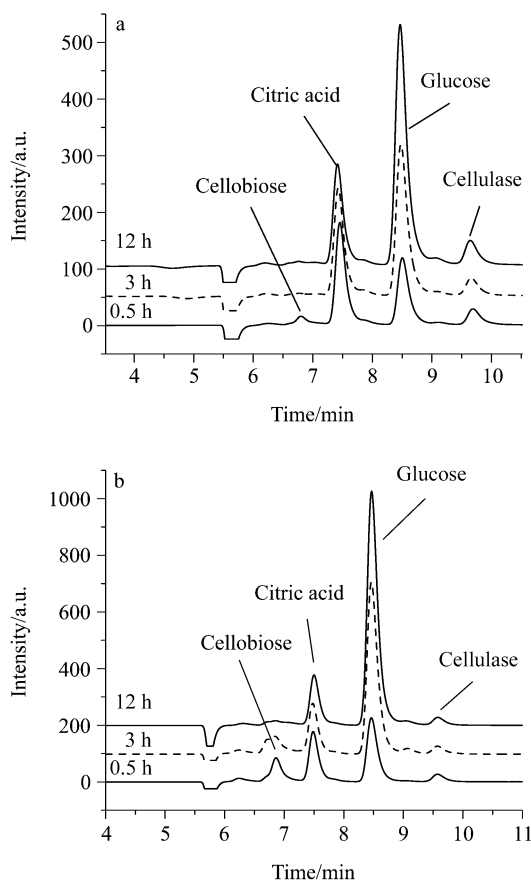


图1 离子液体[BMIM]Cl 预处理前后 Avicel 酶解过程 HPLC 谱图: (a)未预处理底物; (b)预处理底物

Figure 1 HPLC spectra of soluble reducing sugars obtained from (a) original and (b) [BIMIM]Cl-treated Avicel

由不同酶解时间色谱图, 经进一步计算可得纤维素酶解的糖转化率曲线, 如图2所示. 图2显示, 经离子液体预处理后 Avicel 酶解反应速率在 0~5 h 阶段快速大幅提升, 而在 5~24 h 阶段仅有小幅提升, 最终转化率为 94.65%; 未经离子液体处理的 Avicel 酶解过程糖转化率曲线与离子液体预处理后 Avicel 糖转化率曲线变

化趋势一致, 所不同的是未经预处理的 Avicel 酶解反应速率初始阶段提升幅度较小, 酶解 24 h 后最终糖释放率为 48.57%, 而酶解进行到 72 h 时糖转化率仅为 58.51%, 远远小于预处理后 Avicel 24 h 酶解反应的糖转化率.

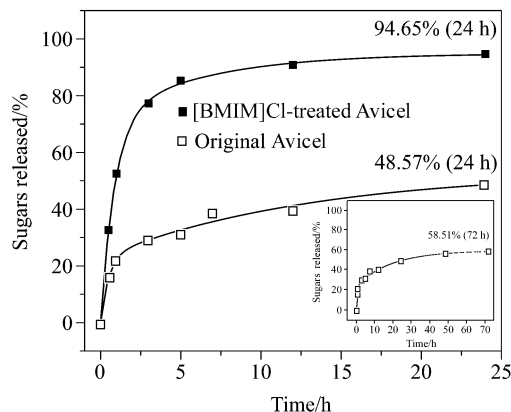


图2 离子液体[BMIM]Cl 预处理前后 Avicel 酶解过程糖转化率对比, 插图为未经预处理 Avicel 酶解 72 h 糖释放曲线

Figure 2 Sugar conversion of original vs. [BIMIM]Cl-treated Avicel during the hydrolysis time of 24 h. Inset is sugar conversion of original substrate during the hydrolysis time of 72 h

2.2 再生纤维素结构与形貌分析

离子液体具有较强的溶解性能, 对于氯离子取代的离子液体, 相对较高的氯离子浓度及活性在纤维素溶解中起着至关重要的作用^[8]. [BMIM]Cl 中的氯离子与纤维素分子链上的羟基形成氢键使纤维素分子间和分子内的氢键作用减弱, 从而使纤维素易于溶解. 该溶解过程可使纤维素分子结构及形貌发生改变, 继而导致预处理后纤维素酶解效率的大幅提高, 以下将从微观结构到宏观形貌对离子液体处理后纤维素发生的变化进行多尺度描述与分析.

2.2.1 FTIR 分析

图3为微晶纤维素 Avicel 再生前后的 FTIR 谱图. 可以看出预处理前的 Avicel (图 3a)位于 3417, 2900, 1637, 1431 和 1164 cm^{-1} 处的谱峰与预处理后的 Avicel 红外信号峰位置基本相同(图 3b), 说明离子液体与 Avicel 之间未发生衍生化反应, 故离子液体对纤维素的溶解为物理作用. 在原始 Avicel 的 FTIR 图中, 位于 3417 cm^{-1} 的宽峰为 O—H 伸缩振动峰, 2900 cm^{-1} 为 C—H 伸缩振动峰, 1637 cm^{-1} 为纤维素分子吸附水分子而出现的吸收峰, 1431 cm^{-1} 为 O—H 弯曲振动峰, 1164 cm^{-1} 是 C—O 不对称伸缩振动峰^[11]. Avicel 在 1431 cm^{-1} 处的 O—H 弯曲振动, 经离子液体预处理后消失, 再生后的材料在 1421 cm^{-1} 处出现 CH_2 的变形振动峰, 说明处理过程中氢键被破坏; 经[BMIM]Cl 溶解再生的 Avicel 于指纹区内的 897 cm^{-1} 处出现一个小的吸收峰,

这是原始 Avicel(纤维素 I 型)所没有的, 此峰由 CH_2 和 $\text{C}-\text{O}-\text{H}$ 的变形振动产生, 且这一变化暗示着离子液体预处理可能造成纤维素结晶类型的改变. 此外, 再生 Avicel 的 $\text{O}-\text{H}$ 伸缩振动峰出现在 3439 cm^{-1} , 较之预处理前发生了蓝移, 且伴随峰强度的减弱, 这可能是由于离子液体预处理造成纤维素分子中氢键作用减弱或是与水缔合作用引起.

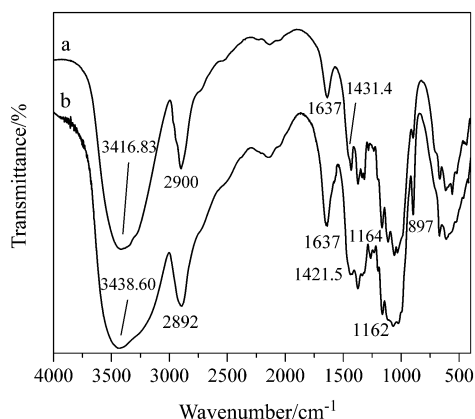


图3 离子液体[BMIM]Cl 预处理前后 Avicel 的 FTIR 谱图: (a) 预处理前底物; (b) 预处理后底物

Figure 3 FTIR spectra of (a) original and (b) [BMIM]Cl-treated Avicel

2.2.2 XRD 分析

XRD 曲线可以很好地描述纤维素的结晶状况. 图 4 为离子液体预处理前后 Avicel 的 X 射线衍射图. 由图 4a 可知, 预处理前 Avicel 的 XRD 图中, 位于 $2\theta=16.9^\circ\sim 19.4^\circ$ 的衍射峰对应纤维素晶体中的晶面 101, $2\theta=26.1^\circ$ 的衍射峰对应晶面 002, $2\theta=40.15^\circ$ 的衍射峰对应晶面 040. 这种结晶类型属纤维素 I 型. 而预处理后 Avicel 结晶程度大大降低, 在 $2\theta=14.5^\circ, 23.7^\circ\sim 25.1^\circ$ 处

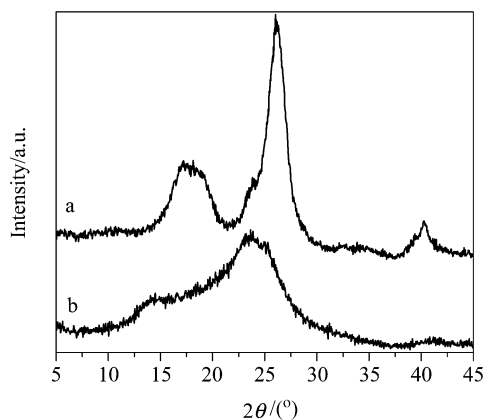


图4 [BMIM]Cl 预处理前后 Avicel 的 XRD 谱图: (a) 预处理前底物; (b) 预处理后底物

Figure 4 XRD patterns of (a) original and (b) [BMIM]Cl-treated Avicel

出现一组强度很低分布很宽的衍射峰, 峰形不再尖锐明显, 这与纤维素 II 型相符, 说明纤维素在离子液体中的溶解再生将造成晶型由 I 型到 II 型的转变^[12,13], 破坏了纤维素的原有晶型, 使结晶度大大降低, 为纤维素酶组分中剪切作用最快、效果最明显的内切酶提供更多更好的作用位点, 因此加快了酶解速率, 提高了还原糖转化率.

2.2.3 SEM 分析

进一步利用 SEM 技术从宏观角度对[BMIM]Cl 预处理前后的 Avicel 进行形貌表征与分析, 如图 5 所示. 由图可知, 未预处理的 Avicel 分子表面结构平滑紧密, 呈长条形颗粒状, 长度约为 $50\sim 80\ \mu\text{m}$ (A); 经 [BMIM]Cl 预处理后纤维素分子表面呈绒毛状, 结构蓬松柔软且不规则(B); 高倍率电镜照片显示, 预处理前 Avicel 分子表面十分平滑, 结构相当规整, 可见分子的平行排布形式(C, E); [BMIM]Cl 处理后 Avicel 表面凹凸不平, 有点状突起并夹杂有小孔洞, 规整致密的结构被破坏(D, F). 运用 SEM 分析, 更直观地显示了离子液体 [BMIM]Cl 预处理前后纤维素结构的变化, 同时从另一角度佐证了 FTIR 与 XRD 的分析结果, 即纤维素规整结构的破坏是离子液体预处理后纤维素酶解速率及糖转化率提高的关键原因.

3 结论

本文合成了离子液体[BMIM]Cl, 并利用其对微晶纤维素 Avicel 进行了溶解预处理及再生. 考察了预处理前后 Avicel 酶解过程中糖转化率的变化, 并对预处理前后底物 Avicel 进行了 FTIR, XRD 及 SEM 表征. 结果表明离子液体[BMIM]Cl 是纤维素的非衍生化溶剂, 且在溶解过程中造成了 Avicel 氢键的破坏及结晶型态的转变, 从而导致酶解速率及还原糖产量的大幅提高.

(1) HPLC 分析结果可知: [BMIM]Cl 预处理可使 Avicel 酶解速率及所得可溶性糖转化率均显著提高, 酶解反应进行 24 h 后糖转化率可由预处理前的 48.57% 提高到预处理后的 94% 以上.

(2) FIIR 分析表明: [BMIM]Cl 预处理破坏了 Avicel 原有的大量高强度氢键, 为提高酶解效率提供了重要的前提条件.

(3) XRD 分析表明: [BMIM]Cl 预处理使 Avicel 的结晶度大大降低, 并且造成了纤维素 I 型到纤维素 II 型的转变, Avicel 由结晶态变为无定型态, 这是预处理后纤维素酶解速率显著提高的又一重要因素.

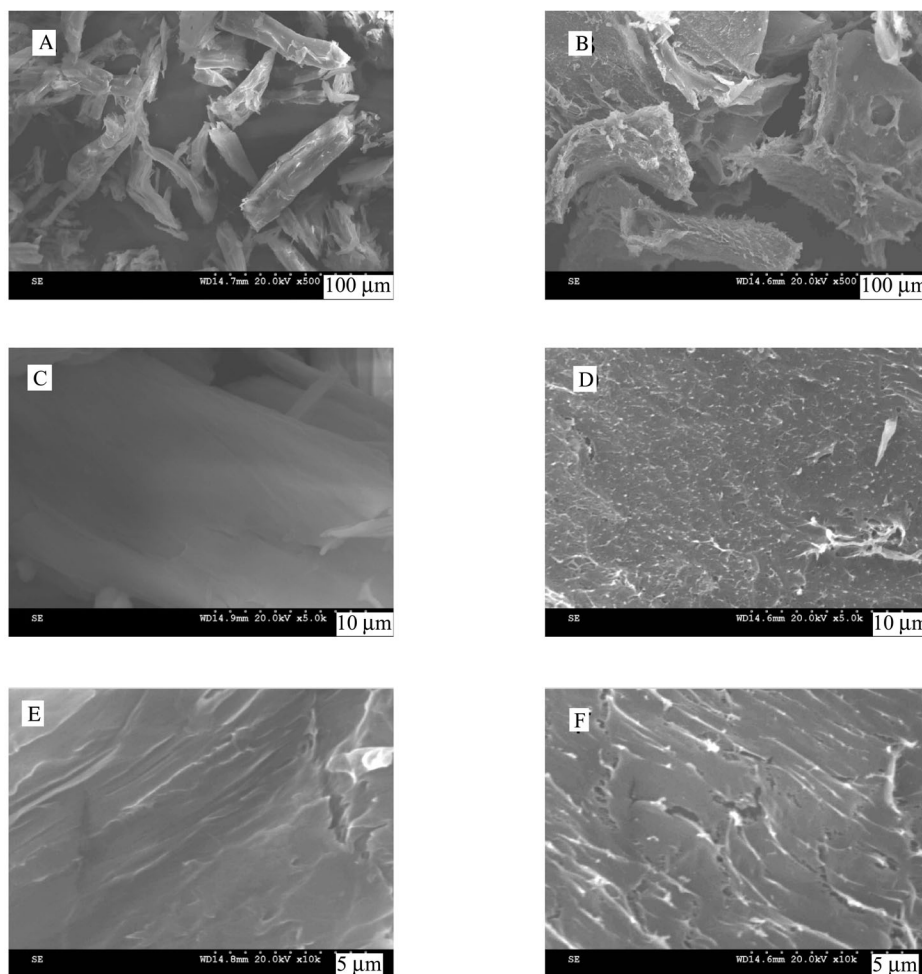


图5 [BMIM]Cl 预处理前后 Avicel 的 SEM 照片. A, C, E 分别为预处理前底物放大 500, 5 k, 10 k 倍数的 SEM 图; B, D, F 分别为预处理后底物放大 500, 5 k, 10 k 倍数的 SEM 图

Figure 5 SEM images of original and [BMIM]Cl-treated Avicel in different magnifications. A, C, E Original Avicel at magnification of 500, 5 k and 10 k; B, D, F [BMIM]Cl-treated Avicel at magnification of 500, 5 k and 10 k

(4) 由 SEM 图可知: 预处理后 Avicel 的表面变得粗糙, 并夹杂小孔, 原本致密的规整结构不复存在, 这些形貌上的变化增加了酶与底物的接触位点, 是酶解加速、反应趋向彻底的另一原因。

References

- 1 Imai, M.; Ikari, K.; Suzuki, I. *Biochem. Eng. J.* **2003**, *17*, 79.
- 2 Lynd, L. R.; Cushman, J. H.; Nichols, R. J.; Wyman, C. E. *Science* **1991**, *251*, 1318.
- 3 Anantharam, P. D.; Constance, A. S.; Sasidhar, V. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, *137*, 407.
- 4 Wood, T. M.; McCrae, S. I. *Biochem. J.* **1977**, *171*, 61.
- 5 Zhang, H.; Wu, J.; Zhang, J.; He, J. *Macromolecules* **2005**, *38*, 8272.
- 6 Zhang, Y. H. P.; Lynd, L. R. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *88*, 797.
- 7 Swatloski, R. P.; Spear, S. K.; Holbrey, J. D.; Rogers, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 4974.
- 8 Ren, Q.; Wu, J.; Zhang, J.; He, J.-S.; Guo, M.-L. *Acta Polymerica Sinica* **2003**, (3), 448 (in Chinese). (任强, 武进, 张军, 何嘉松, 过梅丽, 高分子学报, **2003**, (3), 448.)
- 9 Guo, M.; Yu, Z.-L.; Li, M.-H.; Wang, C.-P.; Chu, F.-X. *Biomass Chem. Eng.* **2006**, *40*, 9 (in Chinese). (郭明, 虞哲良, 李铭慧, 王春鹏, 储富祥, 生物质化学工程, **2006**, *40*, 9.)
- 10 Dadi, A. P.; Vanarasi, S.; Schall, C. A. *Biotechnol. Bioeng.* **2006**, *95*, 904.
- 11 Liu, C. F.; Sun, R. C.; Zhang, A. P.; Qin, M. H.; Ren, J. L.; Wang, X. A. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 2399.
- 12 Isogai, A.; Usuda, M.; Kato, T.; Uryu, T.; Atalla, R. H. *Macromolecules* **1989**, *22*, 3168.
- 13 Zeronian, S. H.; Ryu, H. S. *J. Appl. Polym. Sci.* **1987**, *33*, 2587.