外加电场协同作用下外源添加剂对稻草酶解糖化性能的影响

王永忠[1,2,3], 胥腾飞[1,2], 廖 强[1,2], 朱 恂[1,2], 陈 蓉[1,2]

(1.低品位能源利用技术及系统教育部重点实验室, 重庆 400030; 2.重庆大学工程热物理研究所, 重庆 400030; 3.重庆大学生物工程学院, 重庆 400030)

摘 要:以预处理后的稻草基质为试验原料,研究了两个平行电极板形成的外加电场的电场强度以及外加电场协同作用下 4 种添加剂 Tween-80、PEG 6000、BSA 和[BMIM]Cl 对木质纤维素基质酶解糖化性能的影响,以探讨提高木质纤维素基质酶解糖化效率的新方法。试验结果发现:电场强度为 12 V·m^{-1} 时获得最佳的基质糖化效率,比对照组提高了 26.6%;在 12 V·m^{-1} 的外加电场协同作用下,Tween-80、PEG 6000、BSA 的添加量分别为 200 μL·g^{-1} 基质和 40、20 mg·g^{-1} 基质时获得最高的酶解糖化效率; 试验条件下离子液体[BMIM]Cl 对纤维素酶解糖化产生一定的抑制作用,随着添加量增加,糖化效率逐渐降低。分析表明在外加平行电场协同作用下添加适量的 Tween-80、PEG 6000、BSA 有助于提高纤维素酶解糖化效率,其中 BSA 对纤维素酶解糖化效率的影响最大。

关键词:纤维素;纤维素酶;糖化作用;电场;协同作用

中图分类号:X712 **文献标志码**:A **文章编号**:1672-2043(2014)07-1414-08 doi:10.11654/jaes.2014.07.023

Synergy Effects of Additives on Enzymolysis and Saccharification of Rice Straw Under Exogenous Electric Field

WANG Yong-zhong[1,2,3], XU Teng-fei[1,2], LIAO Qiang[1,2], ZHU Xun[1,2], CHEN Rong[1,2]

(1.Key Laboratory of Low-grade Energy Utilization Technologies and Systems, Ministry of Education, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 2.Institute of Engineering Thermophysics, Chongqing University, Chongqing 400030, China; 3.School of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract: Conversion efficiency of lignocelluloses to ethanol is influenced by many factors. In this work, enzymatic saccharification of pre-treated rice straw was explored in four additives (Tween-80, PEG 6000, BSA and [BMIM]Cl) with and without different electric field strengths from two parallel electrodes. Saccharification efficiency was 26.6% greater at 12 V·m^{-1} of electric field strength than the control. At this electric field strength, applying Tween-80 at 200 μL·g^{-1}, PEG 6000 at 40 mg·g^{-1} and BSA at 20 mg·g^{-1} further enhanced saccharification efficiency. However, ionic liquid [BMIM]Cl had inhibition to enzymatic saccharification of rice straw. The experimental results indicate that proper additives such as Tween-80, PEG 6000 and BSA could effectively improve efficiency of enzymatic saccharification of lignocellulose with parallel electric field, with BSA showing the greatest efficiency of lignocellulosic saccharification.

Keywords: lignocellulose; cellulase; saccharification; electric field; synergy

农业和林业生产中产生了大量的可再生资源——木质纤维素,因此世界各国非常重视以木质纤维素为原料的燃料如乙醇、氢气等新能源的开发和利用[1-3]。在木质纤维素转化为燃料乙醇、氢气的过程中,木质纤维素首先在酶的催化作用下转化为葡萄糖等单糖,再经微生物的发酵作用被转化成乙醇、氢气等能源[4]。然而,木质纤维素的复杂结构导致其糖化效率较低,是整个转化过程的限制性步骤。

为此, 人们采用不同的预处理方法如物理法、化学法、生物法等[5-6]破坏木质纤维素原料结构以提高其糖化效率。已有研究表明,在酶解糖化的强化过程中

收稿日期:2013-12-11

基金项目:国家自然科学基金项目(51376200);国家自然科学基金重点项目(51136007)

作者简介:王永忠(1967—),男,博士,副教授,主要研究方向为微生物能源的转化和利用。E-mail:wangyzh@cqu.edu.cn

添加一定量的表面活性剂可以提高纤维素的转化效率,如吐温(Tween-80、Tween-20)、聚乙二醇(PEG 4000、PEG 6000)等。Yang 等[7]研究 Tween-80 对酶吸附的影响,结果表明 Tween-80 可以阻碍吸附的纤维素酶失活,提高纤维素的转化效率;Zeng 等[8]研究了 Tween-80 和鼠李糖脂对固态酶解中简青霉胞外酶活性的影响;席琳乔等[9]研究了不同分子量的 PEG 表面活性剂对棉秆木质纤维素水解复合酶的影响;任天宝等[10]研究了几种化学物质对稻草秸秆酶解糖化的影响;Liu 等[11]研究了离子液体[BMIM]Cl 作为溶剂对棉花纤维溶解及再生性能的影响。

同时,已有研究表明纤维素水解酶结合了一些带电荷的基团[12]。Jørgensen 等[13]采用电泳的方法成功分离了纤维素酶与半纤维素酶,并评估了纤维素酶的吸附情况。因此,可以认为在外加电场作用下纤维素水解酶能发生定向移动,这种定向移动能提高木质纤维素水解过程中酶与基质接触的几率,从而提高木质纤维素的水解效率。

本文创新性地设计了一种基于外加电场作用下的木质纤维素酶解糖化装置,并以稻草粉末作为原料,分别比较研究了在有无外加电场作用下不同外源性添加剂对纤维素酶解糖化性能的影响,以探索提高纤维素基质酶解糖化效率的新方法,促进纤维素基质酶解糖化技术的发展及应用。本课题的研究内容还未见相关文献报道。

1　材料和方法

1.1　基质预处理

稻草秸秆取自重庆郊区,稻草首先剪切成 1~2 cm 小段,洗净并于 80 ℃烘干至恒重;用粉碎机将稻草秸秆粉碎,并用自动振动筛过 60 目,得到 60 目稻草秸秆粉末;再将其用 1%的氢氧化钠溶液按固液比为 1:10 的比例混合,预处理 24 h,然后用清水清洗稻草粉末基质直至清洗液 pH 为中性,最后烘干至恒重备用。

1.2　试验装置

外加电场作用下的纤维素基质酶解糖化试验装置由纤维素基质酶解糖化反应器、外加电源及电极、恒温培养箱等组成(图 1)。其中反应器主体(直径 30 mm、轴向长度 50 mm)体积为 35 cm^3,反应器两端采用厚度为 0.5 mm 的铜片作为电极,并用导线连接外加电源,以便在反应器中形成平行电场,而没有外加电场作用的反应器则不需布置电极。在反应器中部设置一个取样口以检测基质酶解后还原糖的含量。反应器置于恒温培养箱中以维持反应器内纤维素基质酶解糖化作用的恒定温度。

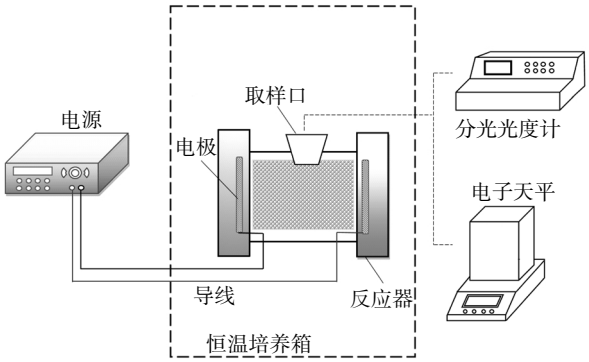

图 1　试验装置示意图

Figure 1　Schematic diagram of experimental system

1.3　操作步骤

在试验启动前,反应器系统用甲醛溶液消毒 30 min,并用灭菌冷却后的蒸馏水清洗干净。称取 2.0 g 已灭菌并经预处理后的稻草粉末,加入 53.36 mg 纤维素酶(115 U·mg^{-1} DW,Worthington,美国),用无菌的移液枪取 100 μL β-葡萄糖苷酶(≥250 U·g^{-1},Novozyme 188,Sigma,美国),再加入 10 mL 无菌蒸馏水及相应量的添加剂(Tween-80、PEG 6000、BAS 或[BMIM]Cl),调节 pH 为 4.5(Buffer 溶液采用 0.1 mol·L^{-1} CH_3COONa 与 0.1 mol·L^{-1} CH_3COOH 调配),在 100 mL 干净并灭菌的烧杯中混合均匀,然后填装于反应器中,并密封。将反应器置于 48 ℃恒温培养箱中酶解糖化,接通电源,维持 0.6 V 的电压,保证反应器内电场强度为 12 V·m^{-1},每 12 h 切换电极的正负极。对照组则无外加电压。酶解 96 h 后从反应器中取出基质,加入定量蒸馏水稀释后离心(6000 r·min^{-1})10 min。取离心后的上清液,用 3,5-二硝基水杨酸法测还原糖浓度。残余基质经烘干后称重。每个参数影响均进行 2 次重复试验。

1.4　分析方法及仪器设备

水解液中还原糖总糖浓度采用 3,5-二硝基水杨酸法测量,以蒸馏水为对照,分别在波长 540 nm 下测量 OD 值,水解液还原糖总糖浓度通过 $OD_{540\,nm}$ 值标准曲线计算得到[14]。还原糖浓度与 $OD_{540\,nm}$ 值之间的关系为:

$$y=470.61x+34.581 \qquad R^2=0.990\,5$$

式中:x 为水解液中还原糖在 540 nm 下测量吸光度值;y 为还原糖的浓度,mg·L^{-1}。

反应后的基质用烘箱于 105 °C 烘干至恒重,采

用精密分析电子天平称量基质的消减量。

糖化效率定义为酶解后还原糖总产量与酶解前基质的质量之比[15]:

$$糖化效率=\frac{酶解后还原糖总产量(g)\times 0.9}{酶解前基质的质量(g)}\times 100\%$$

在试验过程中,基质称量采用精密分析电子天平(Sartorius BP114,德国);电源为可编程直流电源(Array 3645A,台湾);反应器温度维持采用恒温培养箱(SHH-250 L 型,重庆);还原糖浓度测量采用分光光度法(722N 型,上海);基质烘干采用烘箱(CS101-3E 型,重庆);以冷冻离心机(GL-21M 型,湖南)提取和分离还原糖水解液。

2 结果与分析

2.1 电场强度对纤维素酶解糖化性能的影响

试验首先研究了电场强度对纤维素酶解性能的影响。试验过程中,电场强度分别设定为 0、8、12、16、20 $V\cdot m^{-1}$。试验结果如图 2 所示。

试验结果表明,随着电场强度的增加,还原糖的产量、基质消减量、糖化效率均呈先增加后减少的趋势,电场强度为 12 $V\cdot m^{-1}$ 时达到最大,分别为 420.95 mg、0.435 g 和 18.9%,此时比对照组(电场强度为 0 $V\cdot m^{-1}$)分别提高了 26.6%、29.8%和 26.6%。因此,一定强度的外加电场能强化纤维素酶和 β-葡萄糖苷酶的催化作用,促使纤维素水解,产生还原糖等[16]小分子物质。

本组试验数据显著性检验 $P<0.01$,表明外加电场强度对木质纤维素基质酶解糖化性能影响具有极显著性。

2.2 Tween-80 对纤维素酶解糖化性能的影响

试验主要研究不同 Tween-80 添加量分别在有无电场(电场强度为 12 $V\cdot m^{-1}$)协同作用下对纤维素酶解糖化性能的影响。Tween-80 添加量分别为 50、100、150、200、250 $\mu L\cdot g^{-1}$ 基质。

试验结果如图 3 所示。在有无外加电场协同作用条件下,随着 Tween-80 添加量的增加,还原糖总产量、基质消减量以及糖化效率皆呈逐渐上升趋势,在 Tween-80 添加量为 200 $\mu L\cdot g^{-1}$ 基质时,在电场协同作用下还原糖总产量、基质消减量、糖化效率分别为 587.6 mg、0.580 g 和26.4%,而无电场作用时分别为 475.1 mg、0.531 g 和 21.4%。在本试验条件下,随着 Tween-80 添加量继续增加至 250 $\mu L\cdot g^{-1}$(基质)时,还原糖总产量、基质消减量以及糖化效率则呈下降趋势,

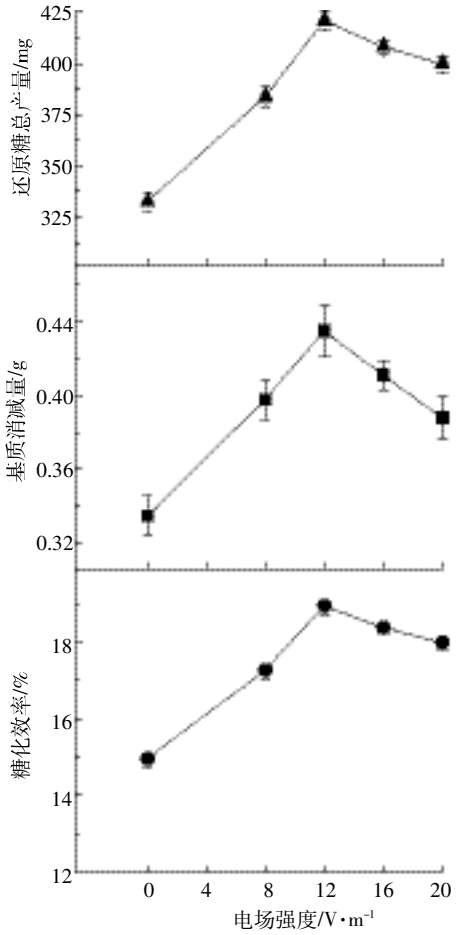

图 2 电场强度对纤维素酶解糖化性能的影响

Figure 2 Effect of electric field strengths on performance of enzymatic saccharification of rice straw

其原因是随着 Tween-80 的进一步增加,多余的表面活性剂易发生自聚而形成微胶束[17],微胶束可阻止纤维素酶与纤维素底物的接触,抑制纤维素酶解糖化,从而表现出糖化效率的下降。由图 3 还发现,当 Tween-80 添加量为 200 $\mu L\cdot g^{-1}$ 基质时,电场协同作用下还原糖产量、基质消减量以及糖化效率比未施加电场分别提高了 23.7%、9.2%和 23.4%。试验结果表明,在外加电场的协同作用下,Tween-80 对纤维素酶的酶解糖化有一定的促进作用。

本组试验数据显著性检验 $P<0.05$,表明 Tween-80 对木质纤维素基质的酶解糖化性能影响显著。

2.3 PEG 6000 对纤维素酶解糖化性能的影响

试验分别研究了在有无电场协同作用条件下,PEG 6000 不同添加量对纤维素酶解糖化性能的影响。试验中,PEG 6000 添加量分别为 10、20、30、40、50 $mg\cdot g^{-1}$ 基质,电场强度为 12 $V\cdot m^{-1}$。

试验结果如图 4 所示。随着 PEG 6000 添加量的

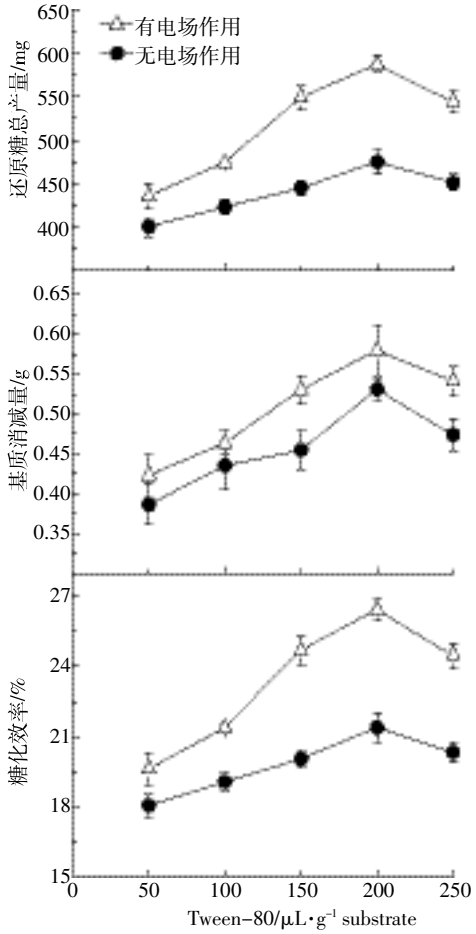

图 3 Tween-80 对纤维素酶解糖化性能的影响

Figure 3 Effect of Tween-80 additions on performance of enzymatic saccharification of rice straw with and without electric field

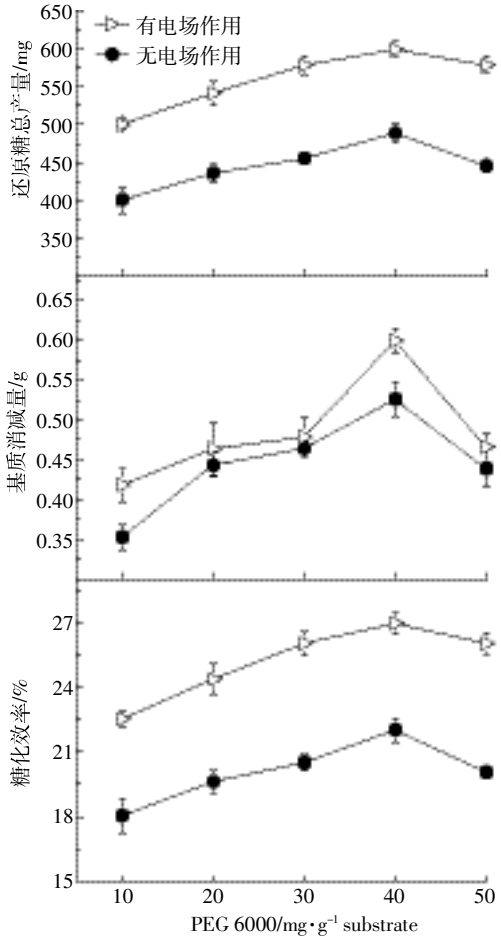

图 4 PEG 6000 对纤维素酶解糖化性能的影响

Figure 4 Effect of PEG 6000 additions on performance of enzymatic saccharification of rice straw with and without electric field

增加,还原糖总产量、基质消减量和糖化效率呈逐渐上升的趋势,在 PEG 6000 添加量为 40 mg·g^{-1} 基质时,还原糖总产量、基质消减量和糖化效率分别达到最大,无外加电场作用时分别为 489.2 mg、0.525 g 和 22.0%,有外加电场协同作用下则分别为 598.8 mg、0.599 g 和 26.9%,分别比前者提高了 22.4%、14.1%和 22.3%。但随着 PEG 6000 添加量继续增加,还原糖总产量、基质消减量以及糖化效率呈下降趋势,本试验条件下当其添加量为 50 mg·g^{-1} 基质时,还原糖总产量、基质消减量以及糖化效率在电场协同作用下分别降至 578.1 mg、0.466 g 和 26.0%,无电场作用时则分别降至 445.9 mg、0.439 g 和 20.1%。主要原因是当 PEG 6000 的含量达到一定后,使 PEG 6000 占据了纤维素酶与纤维素基质结合的位点,降低纤维素酶的非生产性吸附,产生排阻效应[18],从而导致还原糖的产量、基质消减量、糖化效率下降。

本组试验数据显著性检验 $P<0.01$,表明 PEG 6000 对木质纤维素基质酶解糖化性能的影响具有极显著性。

2.4 牛血清白蛋白(BSA)对纤维素酶解糖化性能的影响

试验主要研究了在有无电场协同作用条件下 BSA 添加量对纤维素酶解糖化性能的影响。BSA 添加量分别为 10、20、30、40、50 mg·g^{-1} 基质,外加平行电场强度为 12 V·m^{-1}。

BSA 对纤维素酶解糖化性能的影响如图 5 所示。随着 BSA 添加量的增加,还原糖总产量、基质消减量和糖化效率呈逐渐上升的趋势,在 BSA 添加量为 20 mg·g^{-1} 基质时,还原糖总产量、基质消减量和糖化效率均达到最大,无外加电场作用时分别为 493.9 mg、0.523 g 和 22.2%,在外加电场协同作用下则分别为 607.3 mg、0.615 g 和 27.3%,分别比前者提高了 23.0%、17.6%、22.9%。但随着 BSA 添加量继续增加,还原糖总产量、基质消减量以及糖化效率呈下降趋势,本试验条件下当 BSA 添加量为 50 mg·g^{-1} 基质

时，还原糖总产量、基质消减量以及糖化效率在电场协同作用下分别降至 494.8 mg、0.499 g 和 22.3%，无电场作用时则分别为 407.8 mg、0.438 g 和 18.3%。

以上结果表明，当 BSA 加入后，BSA 能与纤维素基质中部分抑制或破坏酶活性的物质相结合，对酶起到一定保护作用，使酶的活性大幅度提高，这样在外加电场协同作用下，驱使更多的纤维素水解酶迁移并吸附至基质表面，促进木质纤维素的酶解糖化[19]。但随着 BSA 添加量的继续增加，导致部分 BSA 覆盖在酶的表面，使酶的活性不能充分体现，从而造成糖化效率降低。

本组试验数据显著性检验 $P<0.05$，表明 BSA 对木质纤维素酶解糖化性能的影响显著。

2.5 [BMIM]Cl 对纤维素酶解糖化性能的影响

试验中，[BMIM]Cl 的添加量分别为 10、20、30、40、50、100、150、200、250 mg·g^{-1} 基质，外加平行电场强度为 12 V·m^{-1}。

试验结果如图 6 所示。随着离子液体[BMIM]Cl 添加量的增加，还原糖总产量、基质消减量及糖化效率呈逐渐下降的趋势。在本试验条件下，添加量为 10~40 mg·g^{-1} 基质时，下降趋势比较平缓，在外加电场协同作用下还原糖总产量、基质消减量及糖化效率分别从 487.8 mg、0.428 g、21.9% 下降到 406.8 mg、0.284 g、18.3%，而无电场作用时则分别从 457.2 mg、0.369 g、20.6%下降到 392.7 mg、0.262 g、17.7%。当添加量达到50 mg·g^{-1} 基质时，下降趋势更显著，在外加电场协同作用下还原糖总产量、基质消减量及糖化效率分别降至 282.1 mg、0.224 g、12.7%，无电场作用时分别为217.6 mg、0.182 g、9.8%。随着 [BMIM]Cl 添加量进一步增加，纤维素基质的酶解糖化效率继续呈下降趋势，当添加量达到 200 mg·g^{-1} 基质时，还原糖总产量在外加电场协同作用下为 99.5 mg，而无电场作

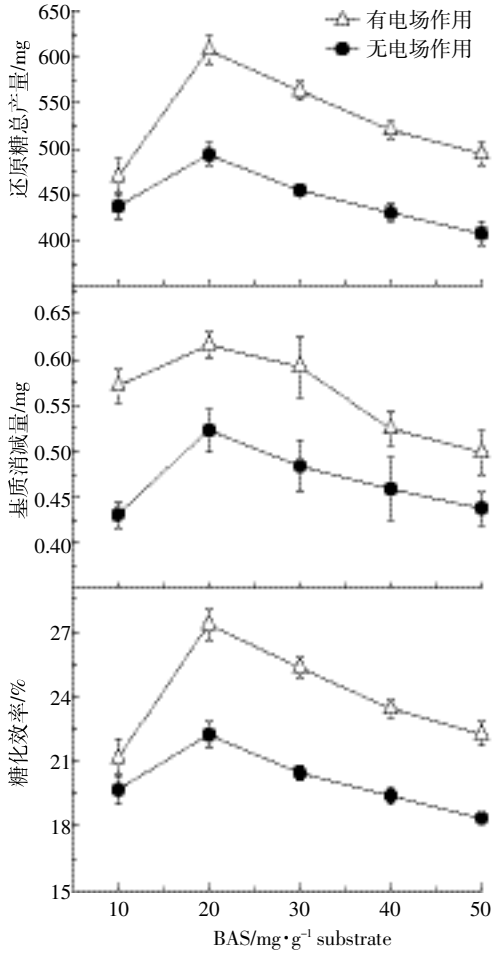

图 5 BSA 对纤维素酶解糖化性能的影响

Figure 5 Effect of BSA additions on performance of enzymatic saccharification of rice straw with and without electric field

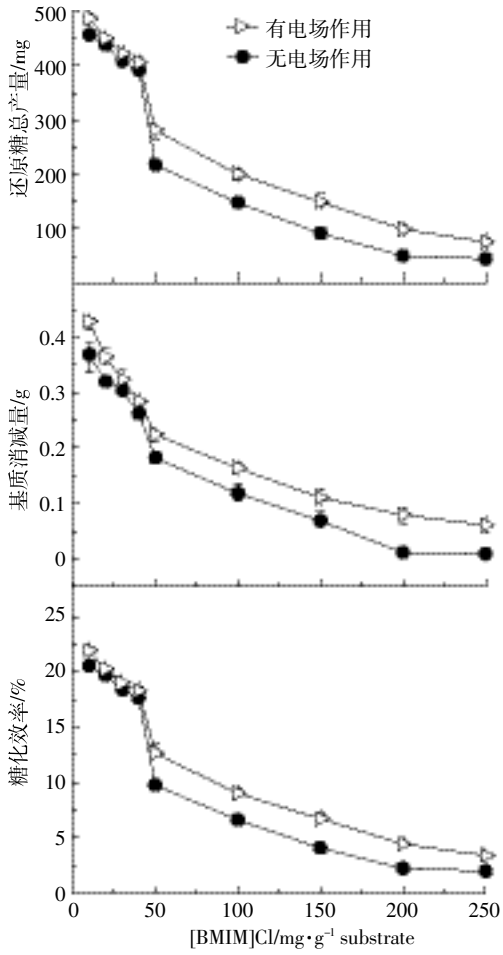

图 6 [BMIM]Cl 对纤维素酶解糖化性能的影响

Figure 6 Effect of [BMIM]Cl additions on performance of enzymatic saccharification of rice straw with and without electric field

用时仅为 50.1 mg。

以上试验结果表明,[BMIM]Cl 对纤维素基质酶解糖化过程起着一定程度的抑制作用,随着 [BMIM]Cl 添加量的增加,这种抑制作用加强。主要原因是随着[BMIM]Cl 添加量的增加,更多的带电基团特异性作用于酶的某些基团,甚至使酶失活,从而影响了纤维素的酶解糖化,具体的抑制机制尚需进一步深入研究。

本组试验数据显著性检验 $P>0.05$,表明在其他条件相同的情况下,在木质纤维素酶解糖化中添加[BMIM]Cl 对还原糖产量的影响不存在显著性差异。

3 讨论

3.1 外加电场强度对纤维素酶解糖化性能的影响

众所周知,水解纤维素的酶蛋白分子是由氨基酸分子通过肽键联结构成,氨基酸分子中含有游离带正电荷的氨基基团或带负电荷的羧基基团,导致酶蛋白质分子带有一定量的电荷,在一定外加电场强度作用下纤维素酶蛋白将发生迁移和运动。根据这个原理可以在纤维素基质酶解糖化过程中施加一定强度的外加电场,以促使水解纤维素的酶分子迁移和运动,促进其在纤维素基质表面作用位点的吸附,提高酶解糖化效率。施加不同外加电压可以获得不同的电场强度,从而产生不同的电场作用力,获得不同的酶解糖化效率;但是过高的电场强度也不利于纤维素的酶解糖化,原因是过高的电场力导致酶的迁移速率过快,甚至引起酶在基质表面的吸附不稳定,相应地,纤维素基质的酶解糖化效率下降。因此,适当的外加电场强度可以促进纤维素基质的酶解糖化。

3.2 外加电场协同作用下外源添加剂对纤维素酶解糖化效率的影响

Tween-80、PEG 6000 和 BSA 均属于非离子表面活性剂,在溶于水时不发生解离,其亲水基团主要是由具有一定数量的含氧基团(如羟基和聚氧乙烯链)构成。非离子表面活性剂在溶液中不是以离子状态存在,所以它的稳定性高,不易受强电解质存在的影响,也不易受酸、碱的影响,在各种溶剂中均有良好的溶解性,在固体表面上不发生强烈吸附。

Tween-80 的亲水基团对酶蛋白产生一种空间排斥作用,使酶蛋白难与木质素的疏水基团相互作用,因此可抑制纤维素酶活性下降、增加酶的活性、促进木质纤维素基质与纤维素酶的吸附作用[20-21]。但在纤维素基质的酶解糖化过程中,过多的 Tween-80 易发生自聚而形成微胶束,引起糖化效率的下降。在外加电场协同作用下,Tween-80 对纤维素基质酶解糖化的强化主要是通过对纤维素酶的保护作用实现的。

PEG 6000 作为一种非离子型的水溶性聚合物,在液相介质中,其分子表面的醚键带有微弱的负电荷,它能与许多极性较高的物质和蛋白质、硝基纤维素等物质配伍,因此在外加电场的协同作用下适量的 PEG 6000 能与纤维素酶结合,有利于酶的迁移;同时,PEG 6000 能有效阻止纤维素酶与木质素的无效吸附,促进底物与酶的吸附作用[22-23]。但过多的 PEG 6000 使纤维素酶被覆盖而降低酶的水解糖化效率。本试验得到与 Ouyang 等[24]一致的研究结果。

BSA 是一种常用的载体蛋白,由 581 个氨基酸残基组成,可与多种阳离子、阴离子和其他小分子物质结合,防止酶的分解和非特异性吸附;同时,BSA 还能减轻酶的变性,特别是减轻一些不利环境因素如加热、表面张力及化学因素所引起的酶的变性[25]。至于其具体作用机理目前还不是很清楚,可能是与 BSA 结构中有 17 个二硫键和一个巯基有关。因此,BSA 可显著提高纤维素水解酶的活性,促进木质纤维素的水解糖化效率。Yang 等[26]和罗鹏等[27]得出了类似的结论。外加电场的协同作用则可强化 BSA 与纤维素酶的吸附及其酶的迁移,从而更显著地提高木质纤维素基质的酶解糖化效率。但 BSA 添加量的过量增加,则导致 BSA 覆盖在酶的表面,使酶的活性不能充分体现,从而造成糖化效率降低。

[BMIM]Cl 作为一种离子型表面活性剂,与水互溶,电导率高,其对纤维素预处理的影响研究较多,但[BMIM]Cl 对纤维素酶解糖化的相关研究报道甚少。Vancov 等[28]研究认为离子液体能显著提高木质纤维素的水解效率。在[BMIM]Cl 对酶活性影响方面,开展了部分研究工作,一般认为随[BMIM]Cl 添加量的增加,更多的带电基团特异性作用于酶的某些基团,甚至使酶失活,从而影响了纤维素的酶解糖化,具体的抑制机制尚需进一步深入研究。Stock 等[29]研究发现一定量的离子液体对纯净的酶产生一定程度的抑制作用,得到与本试验一致的结论。

在本试验条件下,Tween-80、PEG 6000 和 BSA 三种非离子型表面活性添加剂在外加电场协同作用下对稻草酶解糖化性能影响显著,在最佳添加量条件下,获得酶解糖化效果最好的添加剂是 BSA,而离子型表面活性剂[BMIM]Cl 对稻草的纤维素酶的酶解糖化产生明显的抑制作用。

总之,外源添加剂对木质纤维素酶解糖化性能的

影响机制还不很清楚,不同添加剂间及其与外加电场的协同作用机制还有待开展进一步研究,以获得提高木质纤维素酶解糖化效率的实用新技术。

4 结论

本试验研究了不同电场强度以及在外加电场协同作用下 4 种添加剂 Tween-80、PEG 6000、BSA 和[BMIM]Cl 对木质纤维素酶解糖化性能的影响。试验结果表明:

(1)外加电场能明显提高稻草基质的糖化效率,最佳的电场强度为 12 $V\cdot m^{-1}$。同时在 12 $V\cdot m^{-1}$ 的外加电场协同作用下,随着 Tween-80、PEG 6000、BSA 的添加量增加,基质酶解糖化效率逐渐升高,但继续提高其添加量,基质酶解效率反而下降。

(2)本试验条件下,Tween-80 添加量为 200 $\mu L\cdot g^{-1}$ 基质时,还原糖总产量、基质消减量和糖化效率达到最大,分别为 587.6 mg、0.580 g、26.4%;PEG 6000 添加量为 40 $mg\cdot g^{-1}$ 基质时,还原糖总产量、基质消减量和糖化效率最高,分别为 598.8 mg、0.599 g 和 26.9%;BSA 添加量为 20 $mg\cdot g^{-1}$ 基质时,还原糖总产量、基质消减量和糖化效率最高,分别为 607.3 mg、0.615 g 和 27.3%。然而本试验条件下离子液体[BMIM]Cl 对纤维素酶解糖化产生一定的抑制作用,随着添加量增加,糖化效率逐渐降低。

(3)在本试验的外加电场条件下,BSA 对酶解糖化的效率影响最大,其后依次为 PEG 6000 和 Tween-80,而[BMIM]Cl 对酶解糖化表现为负作用。

(4)外加电场及其协同作用下外源添加剂对木质纤维素基质酶解糖化的作用机理还有待于进一步深入研究,以获得提高木质纤维素基质酶解糖化效率的实用新技术。

参考文献:

[1] Lee J. Biological conversion of lignocellulosic biomass to ethanol[J]. *Journal of Biotechnology*, 1997, 56(1):1-24.

[2] Ren N Q, Guo W Q, Wang X J, et al. Effects of different pretreatment methods on fermentation types and dominant bacteria for hydrogen production[J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2008, 33(16): 4318-4324.

[3] Percival Zhang Y H, Himmel M E, Mielenz J R. Outlook for cellulase improvement:Screening and selection strategies[J]. *Biotechnology Advances*, 2006, 24(5):452-481.

[4] 王久臣, 戴 林, 田宜水, 等. 中国生物质能产业发展现状及趋势分析[J]. 农业工程学报, 2007, 23(9):276-282.
WANG Jiu-chen, DAI Lin, TIAN Yi-shui, et al. Analysis of the development status and trends of biomass energy industry in China[J]. *Transactions of the CSAE*, 2007, 23(9):276-282.

[5] 康广博, 袁兴中, 曾光明, 等. 酸-超声波预处理及糖化水解稻草研究[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(2):375-379.
KANG Guang-bo, YUAN Xing-zhong, ZENG Guang-ming, et al. Study on ultrasound-assisted acid pretreatment of rice straw and its enzymatic hydrolysis[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(2):375-379.

[6] 杨懂艳, 李秀金, 庞云芝, 等. 氨化预处理参数对麦秸厌氧消化产气性能的影响[J]. 农业环境科学学报, 2013, 32(1):185-190.
YANG Dong-yan, LI Xiu-jin, PANG Yun-zhi, et al. Research of ammonia pretreatment parameters on biogasification efficiency of wheat straw[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2013, 32(1):185-190.

[7] Yang M, Zhang A, Liu B, et al. Improvement of cellulose conversion caused by the protection of Tween-80 on the adsorbed cellulase[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 56(3):125-129.

[8] Zeng G M, Shi J G, Yuan X Z, et al. Effects of Tween-80 and rhamnolipid on the extracellular enzymes of *Penicillium simplicissimum* isolated from compost[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 39(7): 1451-1456.

[9] 席琳乔, 吴书奇, 马春晖. 非离子表面活性剂 PEG 对棉秆木质纤维素酶解的影响[J]. 农业工程学报, 2012, 28(23):176-183.
XI Lin-qiao, WU Shu-qi, MA Chun-hui. Effect of nonionic surfactant PEG on lignocellulose enzymatic hydrolysis of cotton stalk[J]. *Transactions of the CSAE*, 2012, 28(23):176-183.

[10] 任天宝, 尹双耀, 马孝琴, 等. 几种化学物质对稻草秸秆酶解糖化的影响[J]. 农业环境科学学报, 2012, 31(1):206-211.
REN Tian-bao, YIN Shuang-yao, MA Xiao-qin, et al. The effect of chemical inducers on enzymatic hydrolysis of rice straw[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2012, 31(1):206-211.

[11] Liu Z, Wang H, Li Z, et al. Characterization of the regenerated cellulose films in ionic liquids and rheological properties of the solutions[J]. *Materials Chemistry and Physics*, 2011, 128(1):220-227.

[12] Krawczak M, Bockel B. A genetic factor model for the statistical analysis of multilocus DNA fingerprints[J]. *Electrophoresis*, 1992, 13(1): 10-17.

[13] Jørgensen H, Mørkeberg A, Krogh K B R, et al. Production of cellulases and hemicellulases by three Penicillium species:Effect of substrate and evaluation of cellulase adsorption by capillary electrophoresis[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(1):42-48.

[14] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar[J]. *Analytical Chemistry*, 1959, 31(3):426-428.

[15] Kobayashi F, Sawada T, Nakamura Y, et al. Saccharification and alcohol fermentation in starch solution of steam exploded potato[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1998, 69(3):177-189.

[16] Himmel M E, Baker J O, Overend R P. Enzymatic conversion of biomass for fuels production[M]. Washington, DC:American Chemical Society, 1994:292-324.

[17] 姚日生, 邓胜松, 齐本坤, 等. Tween80 对稻草水解及同步糖化与发酵产乳酸的影响[J]. 精细化工, 2008, 25(2):155-158.
YAO Ri-sheng, DENG Sheng-song, QI Ben-kun, et al. The effect of

surfactants on the enzymatic hydrolysis of rice straw and lactic acid production from rice straw by simultaneous saccharification and fermentation[J]. *Fine Chemicals*, 2008, 25(2):155-158.

[18] Börjesson J, Peterson R, Tjerneld F. Enhanced enzymatic conversion of softwood lignocellulose by poly(ethylene glycol) addition[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(4):754-762.

[19] Hou H, Xie Y, Yang Q, et al. Preparation and characterization of γ-AlOOH nanotubes and nanorods[J]. *Nanotechnology*, 2005, 16(6):741-745.

[20] Wu J, Ju L K. Enhancing enzymatic saccharification of waste newsprint by surfactant addition[J]. *Biotechnology Progress*, 1998, 14(4):649-652.

[21] Eriksson T, Börjesson J, Tjerneld F. Mechanism of surfactant effect in enzymatic hydrolysis of lignocellulose[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 31(3):353-364.

[22] Fang F, Satulovsky J, Szleifer I. Kinetics of protein adsorption and desorption on surfaces with grafted polymers[J]. *Biophysical Journal*, 2005, 89(3):1516-1533.

[23] Alkasrawi M, Eriksson T, Börjesson J, et al. The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 33(1):71-78.

[24] Ouyang J, Dong Z, Song X, et al. Improved enzymatic hydrolysis of microcrystalline cellulose(Avicel PH101) by polyethylene glycol addition [J]. *Bioresource Technology*, 2010, 101(17):6685-6691.

[25] 李 鑫, 欧阳嘉, 陈 牧, 等. 非离子型表面活性剂辅助酶水解玉米秸秆蒸爆渣[J]. 离子交换与吸附, 2009, 25(5):395-401.
LI Xin, OUYANG Jia, CHEN Mu, et al. Enzymatic hydrolysis of steam-pretreated corn stover assisted with non-ionic surfactant [J]. *Ion Exchange and Adsorption*, 2009, 25(5):395-401.

[26] Yang B, Wyman C E. BSA treatment to enhance enzymatic hydrolysis of cellulose in lignin containing substrates[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 94(4):611-617.

[27] 罗 鹏, 刘 忠. 表面活性剂对麦草同步糖化发酵转化乙醇的影响[J]. 过程工程学报, 2009, 9(2):355-360.
LUO Ping, LIU Zhong. Effects of surfactants on simultaneous saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol[J]. *The Chinese Journal of Process Engineering*, 2009, 9(2):355-360.

[28] Vancov T, Alston A S, Brown T, et al. Use of ionic liquids in converting lignocellulosic material to biofuels[J]. *Renewable Energy*, 2012, 45:1-5.

[29] Stock F, Hoffmann J, Ranke J, et al. Effects of ionic liquids on the acetylcholinesterase:A structure-activity relationship consideration[J]. *Green Chemistry*, 2004, 6(6):286-290.