

小麦秸秆预处理对球拟假丝酵母产槐糖脂的影响

王彤¹, 马晓静^{1,2*}, 邵君前¹, 朱慧霞^{1,2}, 王淮^{1,2}, 姚日生^{1,2}

(1. 合肥工业大学 食品与生物工程学院, 安徽 合肥 230009; 2. 合肥工业大学 农产品生物化工教育部工程研究中心, 安徽 合肥 230009)

摘要: 考察了小麦秸秆的预处理方式对球拟假丝酵母 (*Starmerella bombicola*) 利用其糖化液发酵产槐糖脂 (SLs) 的影响, 并对发酵进行了优化。分别选择稀酸预处理 (DAP)、NaOH 预处理 (SHP) 和 SO₃ 微热爆预处理 (STMEP) 对小麦秸秆进行预处理, 使用纤维素酶酶解糖化后将糖化液用于 SLs 的发酵, 考察葡萄糖初始质量浓度和活性炭脱毒对 SLs 产量的影响。结果显示, SHP 最利于小麦秸秆的酶解糖化, 所得糖化液中葡萄糖的初始质量浓度达 61.30 g/L, 其次为 STMEP 和 DAP, 葡萄糖的初始质量浓度分别为 48.30 和 40.00 g/L。STMEP 糖化液中抑制物的总质量浓度最低, 其次为 SHP 和 DAP。球拟假丝酵母可以直接利用上述糖化液发酵产 SLs, 但发酵特性有所不同。SHP 和 STMEP 糖化液更利于酸性槐糖脂 (ASL) 的积累, 相比于化学合成培养基, 其产量分别提高了 74.3% 和 92.3%, 达到 (100.45±0.94) 和 (110.86±0.23) g/L。补加葡萄糖和活性炭脱毒可以进一步提高 SLs 的产量。对于 SHP 糖化液, 补加葡萄糖及其与活性炭脱毒的联合可将 ASL 的产量提高至 (124.49±0.15) g/L; 对于 STMEP 糖化液, 则可将内酯型槐糖脂 (LSL) 的产量提高至 (32.02±0.11) g/L, 与化学合成培养基 [(34.73±0.06) g/L] 的发酵水平相当。

关键词: 小麦秸秆; 预处理; 槐糖脂; 球拟假丝酵母; 发酵优化; 精细化工中间体

中图分类号: TQ920.6 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2022) 12-2585-08

Influence of pretreatment methods of wheat straw on sophorolipids production by *Starmerella bombicola*

WANG Tong¹, MA Xiaojing^{1,2*}, SHAO Junqian¹, ZHU Huixia^{1,2}, WANG Huai^{1,2}, YAO Risheng^{1,2}

(1. School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, Anhui, China; 2. Engineering Research Center of Bio-process, Ministry of Education, Hefei University of Technology, Hefei 230009, Anhui, China)

Abstract: The effects of pretreatment methods of wheat straw on sophorolipids (SLs) fermentation by *Starmerella bombicola* were investigated, and the fermentation process conditions were then optimized. Saccharification liquids were produced by cellulase hydrolysis and saccharification of wheat straw, which were pretreated with dilute acid (DAP), sodium hydroxide (SHP) or sulfur trioxide microthermal explosion (STMEP) respectively, and then used for SLs fermentation along with glucose supplement and activated carbon detoxification. The results showed that SHP was the best wheat straw pretreatment in terms of enzymatic saccharification, with the initial mass concentration of glucose in the saccharification solution obtained 61.30 g/L, followed by STMEP and DAP with the initial mass concentrations of glucose 48.30 and 40.00 g/L, respectively. Meanwhile, it was found that STMEP saccharification liquid had the lowest mass concentration of inhibitors, followed by SHP and DAP. *Starmerella bombicola* could directly use the saccharification solution obtained above to produce SLs, but with different fermentation characteristics. Compared with the control chemical synthesis medium, SHP and STMEP saccharification medium were more conducive to acidic sophorolipid (ASL) accumulation, and the yield increased by 74.3% and 92.3% to

收稿日期: 2022-04-08; 定用日期: 2022-06-20; DOI: 10.13550/j.jxhg.20220328

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项资金 (JZ2021HG TB0114); 企业委托 (W2020JSKF0830, W2021JSKF0443); 安徽省重点研究与开发计划项目 (202004a06020041); 安徽省科技重大专项 (202003a05020060)

作者简介: 王彤 (1996—), 女, 硕士生, E-mail: 1258422965@qq.com。联系人: 马晓静 (1985—), 女, 副教授, E-mail: maxj@hfut.edu.cn。

(100.45±0.94) and (110.86±0.23) g/L. Glucose addition and activated carbon detoxification could further improve SLs production. For SHP saccharification medium, glucose addition combined with activated carbon detoxification further increased ASL production to (124.49±0.15) g/L; For STMEP saccharification medium, lactonicosphorolipid (LSL) production was further increased to (32.02±0.11) g/L, which was equivalent to the fermentation level of chemical synthesis medium [(34.73±0.06) g/L].

Key words: wheat straw; pretreatment; sphorolipids; *Starmerella bombicola*; fermentation optimization; fine chemical intermediates

槐糖脂 (SLs) 是目前产量最高的糖脂类生物表面活性剂^[1], 主要是由酵母利用亲水性碳源和疏水性碳源发酵产生。由于其具有良好的表面活性、生物可降解性和生物相容性, 已被小范围地应用于食品、医药、石油开采、环保等领域^[2-4]。SLs 大范围的应用受到生产成本高的限制, 探寻廉价的发酵底物替代常规使用的亲水性碳源 (葡萄糖)、疏水性碳源 (植物油) 及氮源 (酵母粉) 是降低其生产成本的有效方式^[5]。已有研究者尝试使用乳清、甜水、甘蔗糖蜜等替代葡萄糖; 使用生物柴油、煎炸废油、葵花籽油精炼废料等替代植物油; 使用玉米浆、蛋白胨、尿素等替代酵母粉以降低其原料成本^[6-10]。但上述探索仍存在替代底物来源受限、发酵周期长、SLs 产量偏低等问题, 需进一步寻找可用于 SLs 发酵生产的廉价替代底物。

葡萄糖的成本很大程度上决定了 SLs 的生产成本, 因此, 对葡萄糖替代物的寻找从未停止过^[11]。木质纤维素是廉价易得的可再生资源, 2014 年, MA 等^[12]以脱木质素木糖渣为亲水性碳源发酵产 SLs, 并获得了 39.10 g/L 的产量, 论证了木质纤维素替代葡萄糖产 SLs 的可行性; 随后, SAMAD 等^[13]以甜高粱渣水解液为亲水性碳源得到了产量为 84.60 g/L 的 SLs; LIU 等^[14]以 SO₃ 微热爆预处理 (STMEP) 的稻草秸秆为亲水性碳源获得了 53.70 g/L 的 SLs 产量。中国约有 2.33×10¹¹ m² 的小麦种植面积, 每年的小麦秸秆产量高达 1.5×10⁸ t^[15]。多年来, 国家相关部门致力于推广建立秸秆收集储运体系。目前, 中国已建立较合理高效的收储运系统^[16]。对小麦秸秆进行合理利用并提高其附加值是现今值得思考和探索的课题。相比于玉米秸秆和稻草秸秆, 小麦秸秆具有更高的棕纤维素含量及更低的灰分含量^[17], 因此, 通过酶解糖化获得小麦秸秆糖化液用于微生物发酵更具优势。但由于秸秆结构致密, 且纤维素结晶结构和木质素的存在会降低酶解效率, 所以对小麦秸秆进行预处理具有必要性^[18]。目前, 稀酸处理 (DAP)^[19]和 NaOH 处理 (SHP)^[20]的化学法是研究较多的预处理方法。而 STMEP 是近年发展起来的木质纤维素材料的预处理技术, 具有条件温和、能耗低、污染小等优点^[21]。因此, 考察并比较哪种

预处理方式更适合小麦秸秆的酶解糖化以及后续的 SLs 发酵生产具有一定的现实意义。

球拟假丝酵母 (*Starmerella bombicola*) 是 SLs 的要产生菌, 发酵过程中大量葡萄糖的添加有助于 SLs 的积累。马晓静^[22]研究发现, 向脱木质素木糖渣糖化液中补加葡萄糖, 使其达到最优葡萄糖质量浓度可将 SLs 的产量提高 29.2%。此外, 糖化液中含有的抑制物会对微生物的生长和代谢产生抑制作用, 脱毒处理可以通过减少抑制物的质量浓度而提高 SLs 的产量^[12]。目前, 常用的脱毒方法有活性炭吸附、离子交换、Ca(OH)₂ 中和等, 其中活性炭吸附法因操作简单、吸附效果好、不存在二次污染、成本低等优点而被广泛用于水解液脱毒^[23]。

基于此, 本文首先考察 DAP、SHP 和 STMEP 对小麦秸秆酶解糖化和抑制物质量浓度的影响; 随后, 比较产 SLs 菌株 *Starmerella bombicola* 利用不同糖化液发酵产 SLs 的能力; 最后, 对 *Starmerella bombicola* 利用小麦秸秆糖化液发酵产 SLs 的发酵进行优化, 以进一步提高 SLs 的产量。本研究有助于在降低 SLs 生产成本的同时实现小麦秸秆的综合利用。

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

小麦秸秆采自合肥市长丰县, 使用前将其切割至 1~2 cm 长; 纤维素酶, 经测定酶活为 320.40 FPU/g, 甘肃赛诺生物科技有限公司; 活性炭 (AV-CP), 20~40 目, 天津市精细化工有限公司; 葡萄糖、油酸、酵母粉、KH₂PO₄、Na₂HPO₄·12H₂O、MgSO₄·7H₂O、NaOH、三水合乙酸钠 (CH₃COONa·3H₂O)、P₂O₅、H₂SO₄、乙酸 (CH₃COOH)、无水乙醇 (CH₃CH₂OH), 分析纯, 国药集团化学试剂有限公司。

MIRA3 型热场发射扫描电子显微镜, 捷克 Tescan 公司; D7000-HSM 型高效液相色谱仪, 日本岛津公司; SBA-40E 型生物传感器, 中国山东省科学院。

1.2 菌株与培养基

SLs 发酵菌株: *Starmerella bombicola* CGMCC

1576, 山东大学微生物技术国家重点实验室宋欣教授实验室提供, 保存于甘油管中 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 存放, 定期转接。

液体种子培养基(均为质量浓度, g/L): 葡萄糖 20、蛋白胨 20、酵母粉 10, 纯水定容至 1 L, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min 待用。将甘油管中菌以种子培养基体积的 4% 进行转接, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 下培养 10~12 h。

化学合成发酵培养基(CFM, 均为质量浓度, g/L): 油酸 60、葡萄糖 60、酵母粉 1.5、 KH_2PO_4 1.0、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 调整至 4.8。

糖化液发酵培养基(SFM, 均为质量浓度, g/L): 油酸 60、糖化液(葡萄糖初始质量浓度未调整)、酵母粉 1.5、 KH_2PO_4 1.0、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 自然。

葡萄糖-糖化液发酵培养基(G-SFM, 均为质量浓度, g/L): 油酸 60、糖化液(调整总葡萄糖质量浓度至 60 g/L)、酵母粉 1.5、 KH_2PO_4 1.0、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 自然。

脱毒-葡萄糖-糖化液发酵培养基(DG-SFM, 均为质量浓度, g/L): 油酸 60、脱毒糖化液(调整总葡萄糖质量浓度至 60 g/L)、酵母粉 1.5、 KH_2PO_4 1.0、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.0、 $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5, pH 自然, 纯水定容至 1 L, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 灭菌 20 min 待用。按体积分数 2% 接种活化后种子培养基, 置于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 下发酵培养 7 d。

1.3 小麦秸秆的预处理

将小麦秸秆烘干粉碎过 60 目筛密封保存待用, 记为 RWS 组。按照文献[24]方法, 将 20 g 小麦秸秆加入到 200 mL 体积分数为 2% 的 H_2SO_4 溶液中, $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 120 min, 流水洗至中性, 烘干粉碎过 60 目筛密封保存待用, 记为 DAP 组。按照文献[25]方法, 将 20 g 小麦秸秆加入到 200 mL 质量分数为 7% 的 NaOH 溶液中, 浸润 60 min 后在 $150\text{ }^{\circ}\text{C}$ 油浴下 5 min, 流水洗至中性, 烘干粉碎过 60 目筛密封保存待用, 记为 SHP 组。按照文献[26]方法, 将 20 g 小麦秸秆、0.45 g P_2O_5 、1.13 g 质量分数为 98% 的 H_2SO_4 共同投入反应罐中, $110\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 60 min, 随后加入质量分数为 2% 的 NaOH 溶液 300 mL, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反应 180 min, 流水洗至中性, 烘干粉碎过 60 目筛密封保存待用, 记为 STMEP 组。

1.4 小麦秸秆的组成测定及表面微观结构表征

采用美国能源部 NREL 法(NREL 2008)测定预处理前后小麦秸秆样品中木质素、半纤维素、纤维素、灰分的含量。使用热场发射扫描电子显微镜, 在加速电压为 20 kV、放大倍数为 6000 倍下观察不同小麦秸秆样品的表面微观结构的差异。

1.5 小麦秸秆的酶解糖化与脱毒处理

在 0.2 mol/L pH 4.8 乙酸-乙酸钠缓冲液中加入质量分数为 10% 的小麦秸秆样品, 进行酶解糖化。灭菌后加入纤维素酶 30 FPU/g_{小麦秸秆}, $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 水解 72 h。酶解结束后, 将体系升温至 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 20 min, 使纤维素酶失活, 离心收集上清液得糖化液^[21]。将活性炭与不同糖化液以固液比(g:mL, 下同)1:100 混合, $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下搅拌处理 30 min, 过滤去除活性炭后得脱毒糖化液^[21]。

1.6 小麦秸秆中发酵抑制物质量浓度的测定

根据陈佳丽^[27]所述检测条件, 采用高效液相色谱仪对糖化液中甲酸、乙酸、5-羟甲基糠醛和糠醛进行定量分析。色谱柱采用 Venusil MP C18 (4.6 mm \times 250 mm \times 5 μm), 通过面积归一化法计算上述物质质量浓度。采用福林-酚法^[28]对糖化液中总酚类物质质量浓度进行测定。

1.7 SLs 相关发酵参数的测定

参照文献[22]方法, 使用生物传感器测定葡萄糖产量; 使用干重法测定 *Starmerella bombicola* 的生物量; 使用蒽酮-硫酸法测定内酯型槐糖脂(LSL)和总槐糖脂(TSL)的产量, 差减法计算获得酸型槐糖脂(ASL)的产量。

1.8 数据处理及统计学分析

所有实验均重复 3 次, 结果以“平均值 \pm 标准偏差”表示。采用 SPSS20.0 软件进行方差分析, Origin2020 进行绘图。

2 结果与讨论

2.1 预处理前后小麦秸秆化学组成的变化

预处理前后小麦秸秆化学组成变化见图 1。

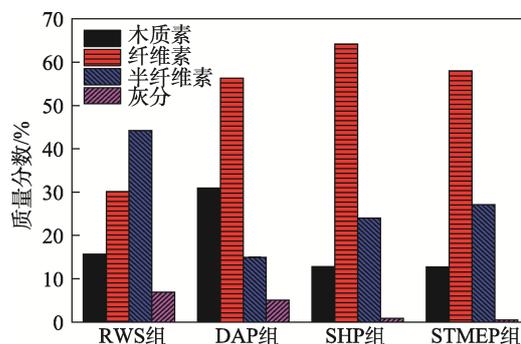


图 1 预处理前后小麦秸秆化学组成分析

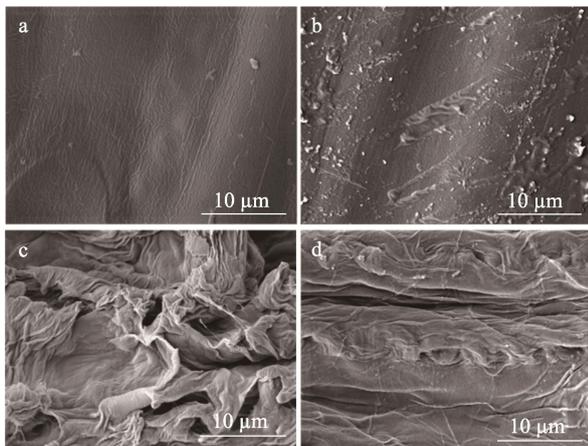
Fig. 1 Chemical composition analysis of wheat straw before and after pretreatment

葡萄糖是纤维素的主要酶解产物, 秸秆中纤维素的占比与糖化液中葡萄糖产量息息相关。如图 1 所示, 整体来看, SHP 组纤维素质量分数最高, STMEP 组半纤维素质量分数最高。其中, DAP、SHP

和 STMEP 组中纤维素质量分数分别为 56.3%、64.2%和 58.0%，分别比 RWS 组 (30.1%) 提高了 87.0%，113.3%和 92.7%。此外，SHP 和 STMEP 组还可使小麦秸秆的木质素质量分数由原始的 15.7% 降至 12.8%和 12.7%。DAP 不能断裂木质素大分子中的氢键，且其处理过程中产生的糠醛及其衍生物易聚合形成类似木质素结构，从而导致 DAP 组中木质素质量分数不降反升^[29]。小麦秸秆样品中木质素、灰分质量分数的减少以及纤维素质量分数的增加都将有助于酶解糖化过程中产生更多的葡萄糖。

2.2 预处理前后小麦秸秆微观结构的变化

使用 SEM 观察了预处理前后小麦秸秆表面微观形态的变化，结果如图 2 所示。



a 为 RWS 组；b、c、d 分别为 DAP、SHP 和 STMEP 组

图 2 预处理前后小麦秸秆的 SEM 图

Fig. 2 SEM images of wheat straw before and after pretreatment

由图 2 可知，RWS 组 (图 2a) 样品表面光滑，形态完整，有明显的蜡质层涂膜存在。由于半纤维素的部分水解以及假木质素的生成^[19]，DAP 组样品表面有明显的裂缝和颗粒吸附，但仍保留着整体的完整性 (图 2b)。SHP 组样品表面结构已经被完全破坏，整体褶皱凸起明显 (图 2c)。该现象与 NaOH 的作用方式有关，在高温条件下，NaOH 能够破坏木质素和半纤维素的结构，造成木质素的剥离和半纤维素的水解，而失去木质素和半纤维素支撑的秸秆会发生塌陷和褶皱^[30]。由于 SO₃ 在秸秆表面发生爆破并造成了内部结构的塌陷，因此 STMEP 组样品表面出现明显的孔洞和褶皱凸起，能明显观察到纤维素链的存在 (图 2d)^[21]。

2.3 不同预处理方式对小麦秸秆酶解糖化的影响

预处理方式对小麦秸秆酶解糖化产葡萄糖的影响如图 3 所示。由图 3 可以发现，与 RWS 组相比，不同预处理方式均可显著提高所得糖化液中葡萄糖的产量。其中，SHP 组葡萄糖质量浓度最高，达到

了 61.30 g/L，其次为 STMEP 和 DAP 组，葡萄糖质量浓度分别为 48.30 和 40.00 g/L。该结果与 2.1 节中测试的结果一致。此外，DAP 组在 0~6 h 时葡萄糖产量增速最快，可能的原因是 DAP 中的高温导致了半纤维素的部分溶解，从而破坏了纤维素的结晶结构，提高了纤维素酶的可及性；6~72 h 时增速减慢，则是由于暴露的棕纤维素已反应完全，而 DAP 的低木质素剥离率阻碍了内部棕纤维素的进一步反应^[31]。对于 SHP 组，由于 SHP 可以同时去除木质素和部分半纤维素，因此，其可在提高纤维素内部孔隙率的同时降低纤维素的结晶度，最终使该组水解液中葡萄糖产量最高。而同样有着较高棕纤维素产量的 STMEP 组，由于主要依靠 SO₃ 爆破产生塌陷破坏小麦秸秆的结构，但对秸秆整体结构破坏得不够彻底。因此，其糖化液中葡萄糖的产量低于 SHP 组。

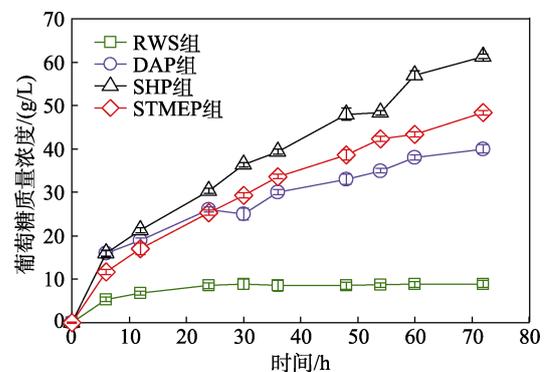


图 3 预处理方式对小麦秸秆酶解糖化产葡萄糖的影响
Fig. 3 Effects of pretreatment models on glucose production from enzymatic saccharification of wheat straw

2.4 脱毒前后不同糖化液中发酵抑制物质量浓度的变化

秸秆糖化液中一般含有糠醛、酚类、有机酸等对酶解和发酵有抑制作用的抑制物，对 3 种预处理后小麦秸秆糖化液脱毒前后的抑制物的种类和质量浓度进行了测定和分析，结果如表 1 所示。由表 1 可以发现，在所有组别中，未经预处理的 RWS 组中的 5-羟甲基糠醛质量浓度最高，达到 (7.71±0.35) mg/L；DAP 组抑制物总质量浓度最高，其不仅含有最高质量浓度的糠醛 [(4.30±0.12) mg/L]、乙酸 [(3.72±0.14) mg/L]、甲酸 [(0.36±0.24) mg/L]，还含有较高质量浓度的 5-羟甲基糠醛 [(3.10±0.21) mg/L]，原因是在酸性和高温条件下，木糖脱水变成了糠醛，葡萄糖降解成了 5-羟甲基糠醛，而秸秆中含有的大量乙酰基团经过酸水解后，从大的分子断裂变成乙酸^[32]；SHP 组中的 5-羟甲基糠醛和糠醛质量浓度均为最低，分别为 (0.33±0.19) 和 (0.03±0.10) mg/L，且不含乙酸，但其总酚类物质质量浓度最高，达到 (43.87±2.29) mg/L，这一结果与

丁驰等^[33]研究结果一致; 而 STMEP 组各抑制物的质量浓度均较低, 且不含甲酸。上述结果进一步说明, 与 DAP 和 SHP 相比, STMEP 是一种作用方式更加温和、更少产生抑制物的秸秆预处理方法^[21], 所得糖化液具备可直接用于发酵的潜力。

由表 1 可见, 活性炭脱毒处理可以不同程度地

降低上述抑制物的质量浓度, 其中对酚类物质的作用最为明显, 处理后所有组别中的酚类抑制物均被完全脱除。活性炭吸附处理对 SHP 组的效果最好, 脱毒后所有抑制物的质量浓度均最低, 提示脱毒后的 SHP 组糖化液对微生物的生长和代谢产生的影响最小。

表 1 脱毒前后不同糖化液中发酵抑制物质量浓度的比较

Table 1 Mass fraction of inhibitors in different saccharification liquids before and after detoxification

抑制物种类	质量浓度/(mg/L)							
	SFM				DG-SFM			
	RWS 组	DAP 组	SHP 组	STMEP 组	RWS 组	DAP 组	SHP 组	STMEP 组
5-羟甲基糠醛	7.71±0.35	3.10±0.21	0.33±0.19	0.98±0.25	4.72±0.32	1.30±0.20	0.23±0.03	0.39±0.04
糠醛	4.05±0.21	4.30±0.12	0.03±0.10	0.42±0.14	0.55±0.17	1.48±0.14	0.02±0.01	0.03±0.01
甲酸	0.34±0.02	0.36±0.24	0.04±0.01	—	0.26±0.12	0.32±0.02	0.01±0.01	—
乙酸	1.80±0.12	3.72±0.14	—	3.30±0.11	1.27±0.22	2.56±0.11	—	2.22±0.02
总酚	23.49±1.32	26.67±2.10	43.87±2.29	8.61±0.76	—	—	—	—

注: “—” 表示未检测出。

2.5 *Starmerella bombicola* 利用不同糖化液发酵产 SLs 的能力比较

Starmerella bombicola 在不同糖化液发酵培养基中生长和发酵产 SLs 的能力见表 2。由表 2 可以发现, *Starmerella bombicola* 可以利用不同 SFM 中的葡萄糖生长和积累 SLs。干重法测得的生物量结

果显示, 与 CFM 组〔(5.39±0.19) g/L〕相比, 酵母在 RWS 组〔(6.43±0.35) g/L〕、DAP 组〔(6.20±1.64) g/L〕、SHP 组〔(6.24±0.15) g/L〕、STMEP 组〔(7.38±0.25) g/L〕中的生长情况均更优, 这是由于糖化液中失活的纤维素酶被酵母用作了额外的氮源, 该结果与 MA 等^[12]的研究结果一致。

表 2 *Starmerella bombicola* 在不同 SFM 中生长和发酵产 SLs 的能力比较

Table 2 Comparison of cell growth and SLs fermentation by *Starmerella bombicola* in different SFM

	葡萄糖质量浓度/(g/L)	生物量/(g/L)	残余葡萄糖质量浓度/(g/L)	pH	LSL/(g/L)	ASL/(g/L)	TSL/(g/L)
CFM 组	60	5.39±0.19	1.02±0.19	2.75±0.04	34.73±0.06	57.64±0.12	92.37±2.62
RWS 组 ^①	8.89	6.43±0.35	0.23±0.02	4.55±0.01	11.35±0.79	26.77±0.32	38.12±0.15
DAP 组 ^①	40.00	6.20±1.64	0.27±0.16	4.06±0.26	6.85±0.06	70.25±0.03	77.10±0.09
SHP 组 ^①	61.30	6.24±0.15	1.97±0.05	4.08±0.01	31.71±0.53	100.45±0.94	132.16±1.49
STMEP 组 ^①	48.30	7.38±0.25	2.93±0.03	4.00±0.02	23.51±0.11	110.86±0.23	134.37±0.33

① SFM。

在 SLs 的发酵生产方面, 由于 RWS 组中葡萄糖初始质量浓度较低, 仅为 8.89 g/L, 因此该组的 TSL 产量最低, 仅有(38.12±0.15) g/L。对小麦秸秆进行预处理可以显著提高 *Starmerella bombicola* 利用糖化液中葡萄糖产 ASL 的能力。与 CFM 组相比, DAP、SHP 和 STMEP 组的 ASL 产量增至(70.25±0.03)、(100.45±0.94)、和(110.86±0.23) g/L, 分别提高了 21.9%、74.3%和 92.3%。而 RWS、DAP、SHP 和 STMEP 组的 LSL 产量并没有达到 CFM 组水平, 推测原因为木糖的存在更有利于促进 ASL 的积累^[22]。因此, 直接使用不同 SFM 生产不同结构的 SLs, 进而用于不同的应用领域具有一定的可行性。其中,

STMEP 来源的 SFM 更有利于 ASL 的积累, 其产量达到了(110.86±0.23) g/L, 可以直接用作乳化剂和助溶剂; SHP 来源的 SFM 更有利于 LSL 的积累, 其产量达到(31.71±0.53) g/L, 基本与 CFM 组持平, 经分离纯化后可以用作抑菌/杀菌活性物质^[11]。

2.6 葡萄糖初始质量浓度调整对 *Starmerella bombicola* 利用不同糖化液发酵产 SLs 的影响

发酵培养基中葡萄糖的初始质量浓度显著影响 SLs 的产量, 在 SLs 的合成过程中, 葡萄糖不仅作为 *Starmerella bombicola* 初级代谢的能量来源, 也是次级代谢产物 SLs 合成的底物来源, 一部分葡萄糖分子通过“直接合成”的方式被用于了 SLs 的合

成^[6]。马晓静^[22]比较了脱木质素木糖渣糖化液中初始葡萄糖质量浓度对 SLs 产量的影响,发现当葡萄糖的总质量浓度为 60 g/L 时,LSL 和 TSL 的产量均达到最高。因此,考察了调整葡萄糖至相同最优初始质量浓度对 *Starmerella bombicola* 利用小麦秸秆不同 G-SFM (即 G-RWS 组、G-DAP 组、G-SHP 组和 G-STMEP 组) 发酵产 SLs 的影响,结果如表 3 所示。

由表 3 可知,相比于 SFM 组的 DAP 和 STMEP 组,G-SFM 组的 DAP 和 STMEP 组将其 LSL 产量在(6.85±0.06)和(23.51±0.11) g/L 的基础上分别提高了 123.8%和 12.0%,达到了(15.33±0.12)和(26.33±0.16) g/L,上述现象与文献^[22]报道一致。但两组中 TSL 的产量却由(77.10±0.09)和(134.37±0.33) g/L 下降至(67.85±0.09)和(131.87±0.81) g/L,降幅分别为

12.0%和 1.9%,与文献^[6]报道不符。此外,还发现,调整葡萄糖质量浓度使 G-DAP 和 G-STMEP 组比未调整葡萄糖质量浓度的 DAP 组和 STMEP 组均出现了 LSL 产量上升,ASL 产量下降的现象。可能原因是 *Starmerella bombicola* 发酵过程中优先利用葡萄糖,其次是木糖等五碳糖,且五碳糖有助于促进 ASL 向 LSL 的转化^[14]。而对于 G-RWS 和 G-SHP 组,其结果刚好与 G-DAP 和 G-STMEP 组相反。G-RWS 组和 G-SHP 组的 LSL 产量分别降低了 9.3%和 26.1%,但 TSL 产量分别提高了 5.4%和 5.5%,具体原因仍在探索中。总体而言,葡萄糖初始质量浓度的调整有利于 DAP 组和 STMEP 组 LSL 的生成,有利于 RWS 组和 SHP 组 ASL 的生成。因此,在工业化生产过程中,应根据目标产物的不同,对不同来源的糖化液的初始葡萄糖初始质量浓度进行优化和相应调整。

表 3 葡萄糖初始质量浓度调整对 *Starmerella bombicola* 利用不同 SFM 产 SLs 的影响

Table 3 Effects of initial glucose mass concentration of adjustment on SLs production by *Starmerella bombicola* in different SFM

CFM/G-SFM	葡萄糖初始质量浓度/(g/L)	生物量/(g/L)	残余葡萄糖/(g/L)	pH	LSL/(g/L)	ASL/(g/L)	TSL/(g/L)
CFM 组	60	5.39±0.19	1.02±0.19	2.75±0.04	34.73±0.06	57.64±0.12	92.37±2.62
G-RWS 组	60	7.56±0.37	0.26±0.01	4.30±0.01	10.29±1.17	29.90±0.35	40.19±0.28
G-DAP 组	60	5.80±1.00	0.20±0.06	3.86±0.02	15.33±0.12	52.32±0.12	67.85±0.09
G-SHP 组	60	6.62±0.96	7.25±0.33	3.85±0.01	23.42±0.11	116.03±0.83	139.45±0.94
G-STMEP 组	60	6.60±0.70	6.48±2.60	3.96±0.08	26.33±0.16	105.54±0.75	131.87±0.81

2.7 脱毒处理对 *Starmerella bombicola* 利用不同糖化液发酵产 SLs 的影响

小麦秸秆预处理过程中产生的抑制物会影响微生物的生长和代谢,脱毒处理有助于抑制物的脱除。

因此,本文进一步考察了脱毒处理对 *Starmerella bombicola* 利用小麦秸秆不同 DG-SFM(即 DG-RWS 组、DG-DAP 组、DG-SHP 组和 DG-STMEP 组)发酵产 SLs 的影响,结果见表 4。

表 4 脱毒处理对 *Starmerella bombicola* 利用不同 SFM 产 SLs 的影响

Table 4 Effects of detoxification on SLs production by *Starmerella bombicola* in different SFM

CFM/DG-SFM	葡萄糖初始质量浓度/(g/L)	生物量/(g/L)	残余葡萄糖质量浓度/(g/L)	pH	LSL/(g/L)	ASL/(g/L)	TSL/(g/L)
CFM 组	60	5.39±0.19	1.02±0.19	2.75±0.04	34.73±0.06	57.64±0.12	92.37±2.62
DG-RWS 组	60	8.30±0.23	0.44±0.36	4.18±0.16	27.56±0.22	36.32±0.27	63.88±0.34
DG-DAP 组	60	5.30±0.11	0.61±0.21	3.76±0.03	15.62±0.06	61.82±0.10	77.44±0.16
DG-SHP 组	60	7.12±0.16	4.22±1.15	3.60±0.08	25.03±0.11	124.49±0.15	149.52±0.16
DG-STMEP 组	60	6.66±0.28	5.87±0.46	4.12±0.02	32.02±0.11	102.32±0.03	134.34±0.16

如表 4 所示,与 G-SFM 相比, *Starmerella bombicola* 在 4 种 DG-SFM 中积累 SLs 的能力均有不同程度的提高,其中 DG-RWS 组的提高效果最显著。DG-STMEP 组 LSL 的产量提高了 21.6%,达到了(32.02±0.11) g/L,与 CFM 组 [(34.73±0.06) g/L] 相当。与 G-SHP 组相比,DG-SHP 组的 LSL、ASL 和 TSL 产量又分别提高了 6.9%、7.3%和 7.2%,达

到(25.03±0.11)、(124.49±0.15)和(149.52±0.16) g/L。而 DG-STMEP 组 TSL 产量相对于 G-STMEP 仅有较小幅度的上升,ASL 产量甚至出现了少许的下降,这说明与 SHP 组相比,脱毒对 STMEP 组的 ASL 和 TSL 产量影响不大。结合上文 G-SFM 组的发酵数据以及抑制物的质量浓度数据可以推测,葡萄糖质量浓度的不同和高浓度酚类物质的存在是导致 SFM

组中 SHP 的 ASL 和 TSL 低于 STMEP 的主要原因。刘晓英^[16]的研究也发现, 高温和 NaOH 预处理可引起大量酚类物质的产生, 进而影响微生物的生长和发酵进程。STMEP 虽然也有碱洗步骤, 但其作用方式较为温和, 因此, 其糖化液中酚类物质的质量浓度在所有组别中最低^[21]。

综上, 葡萄糖初始质量浓度的调整以及糖化液的脱毒处理均有助于 SLs 产量的提高, 其中, DG-SFM 组中 STMEP 是生产 LSL 的最适发酵培养基, SHP 组是生产 ASL 和 TSL 的最佳发酵培养基, 以上结果与 2.4 节中所述一致。

3 结论

(1) 通过测定不同预处理后小麦秸秆的结构组成和观察表观形貌变化发现, STMEP 组半纤维素质量分数最高, 木质素质量分数最低。SHP 组纤维素质量分数最高, 小麦秸秆完整结构被破坏最彻底。

(2) 不同预处理后小麦秸秆的酶解糖化和抑制物质量浓度测定结果显示, SHP 组糖化液中葡萄糖产量最高, 这与其较高的纤维素质量分数、秸秆结构破坏得更彻底以及较低的抑制物质量浓度有关; STMEP 组葡萄糖产量次之, 但抑制物质量浓度最低; 而由于 DAP 对秸秆结构的破坏程度较轻且过程产生了大量的抑制物, 因此, 该组所得糖化液中葡萄糖产量最低。活性炭脱毒处理可以显著降低糠醛、酚类、有机酸等抑制物的质量浓度, 其中对酚类物质的脱除作用最为明显。

(3) 通过比较 *Starmerella bombicola* 在不同糖化液中的生长和发酵产 SLs 的能力发现, 与 CFM 相比, SFM 均能够显著提高 ASL 的产量。其中, STMEP 组效果最好, ASL 的产量提高了 92.3%, 达到了 (110.86±0.23) g/L。葡萄糖初始质量浓度的调整有利于 DAP 组和 STMEP 组 LSL 的生成, 有利于 RWS 组和 SHP 组 ASL 的生成。糖化液的脱毒处理可以进一步提高 SLs 的产量, 脱毒处理后的 STMEP 组的 LSL 产量已基本与 CFM 组持平, 而 DG-SHP 组的 ASL 产量更是高达 (124.49±0.15) g/L, 居所有组别之首。因此, 小麦秸秆具备发酵产 SLs 的潜力, 且不同预处理方式及发酵方式可用于获得不同类型的 SLs。

本研究工作证实了小麦秸秆糖化液用于 SLs 发酵的可行性和可实施性, 为降低 SLs 的成本以及小麦秸秆的综合利用提供了数据基础。

参考文献:

[1] YU X X, LI X L, JIN T W, *et al.* Integrated biorefinery process for production of sophorolipids from corn straw[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2020, 167: 107908.
[2] HUANG C, HU C Y, SUN G, *et al.* Antimicrobial finish of cotton

fabrics treated by sophorolipids combined with 1,2,3,4-butanetetracarboxylic acid[J]. *Cellulose*, 2020, 27(5): 2859-2872.
[3] BANAT I M, CARBOUE Q, SAUCEDO-CASTANEDA G, *et al.* Biosurfactants: The green generation of speciality chemicals and potential production using solid-state fermentation (SSF) technology[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 320: 124222.
[4] DAVEREY A, DUTTA K, JOSHI S, *et al.* Sophorolipid: A glycolipid biosurfactant as a potential therapeutic agent against COVID-19[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 9550-9560.
[5] LIU J M (刘佳铭), LI J F (李俊峰), LIANG S K (梁生康), *et al.* Utilization of waste fried oil for production of sophorolipid biosurfactants by fermentation[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2018, 35(6): 949-955.
[6] VAN BOGAERT I N A, ZHANG J X, SOETAERT W. Microbial synthesis of sophorolipids[J]. *Process Biochemistry*, 2011, 46(4): 821-833.
[7] WADEKAR S D, KALE S B, LALI A M, *et al.* Utilization of sweetwater as a cost-effective carbon source for sophorolipids production by *Starmerellabombicola* (ATCC 22214)[J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 42(2): 125-142.
[8] HIRATA Y, IGARWSHI K, UEDA A, *et al.* Enhanced sophorolipid production and effective conversion of waste frying oil using dual lipophilic substrates[J]. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2021, 85(7): 1763-1771.
[9] JADHAV J V, PRATAP A P, KALE S B. Evaluation of sunflower oilrefinery waste as feedstock for production of sophorolipid[J]. *Process Biochemistry*, 2019, 78: 15-24.
[10] KIM J H, OH Y R, HWANG J, *et al.* Value-added conversion of biodiesel into the versatile biosurfactant sophorolipid using *Starmerella bombicola*[J]. *Cleaner Engineering and Technology*, 2020, 1: 100027.
[11] WONGSIRICHOT P, INGHAM B, WINTERBURN J. A review of sophorolipid production from alternative feedstocks for the development of a localized selection strategy[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 319: 128727.
[12] MA X J, LI H, WANG D X, *et al.* Sophorolipid production from delignined corncob residue by *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576 and *Cryptococcus curvatus* ATCC 96219[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(1): 475-483.
[13] SAMAD A, ZHANG J, CHEN D, *et al.* Sophorolipid production from biomass hydrolysates[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 175(4): 2246-2257.
[14] LIU X G, MA X J, YAO R S, *et al.* Sophorolipids production from rice straw via SO₃ micro-thermal explosion by *Wickerhamiella domercqiae* var. *sophorolipid* CGMCC 1576[J]. *AMB Express*, 2016, 6(1): 1-11.
[15] LYU Y B (吕亚兵). Simulation study on optimization of wheat straw collection, storage and transportation system[D]. Zhengzhou: Henan Agricultural University (河南农业大学), 2019.
[16] LIU X Y (刘晓英). Study on pretreatment technology and integrated energy utilization of wheat straw[D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology (北京化工大学), 2015.
[17] ZHAO W X (赵文霞), YANG Z X (杨朝旭), LIU S (刘帅), *et al.* Composition and combustion dynamics analysis of typical crop straws[J]. *Journal of Agro-Environment Science (农业环境科学学报)*, 2019, 38(4): 921-927.
[18] JIN X C (金显春), SONG A D (宋安东), SU T F (苏同福), *et al.* Impact of detoxification of steam exploded corn straw on enzymatic hydrolysis and ethanol fermentation by different organic solvents[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2012, 29(2): 126-129, 181.
[19] CAO L K (曹龙奎), KOU F (寇芳), LI W J (李文杰), *et al.* The structure of corn straw degraded by sulfuric acid and the composition of reducing sugar in the hydrolysate[J]. *China Food Additives (中国食品添加剂)*, 2017, (8): 176-181.
[20] LI H Y (李辉勇), JIN M (金密), WEI Q Q (魏琴琴), *et al.* Effects of mild alkaline peroxide pretreatment on enzymatic saccharification of rice straw[J]. *Biomass Chemical Engineering (生物质化学工程)*,

- 2011, 45(5): 11-16.
- [21] WANG H, PAN C Y, XU F, *et al.* Enhanced saccharification for wheat straw with micro-thermal explosion technology of *in situ* SO₃ reaction[J]. Chemical Engineering Journal, 2016, 286: 394-399.
- [22] MA X J (马晓静). Nitrogen metabolic regulation of sophorolipids synthesis, characteristics of sophorolipids and sophorolipids production from low-cost substrate[D]. Jinan: Shandong University (山东大学), 2012.
- [23] CHEN G (陈光), LI X L (李晓丽), SUN Y (孙旸). Research progress in preparation of sophorolipids from lignocellulosic materials[J]. Journal of Jilin Agricultural University (吉林农业大学学报), 2020, 42(1): 1-7.
- [24] DHABHAI R, JAIN A, CHAURWSIA S P. Production of fermentable sugars by dilute acid pretreatment and enzymatic saccharification of three different lignocellulosic materials[J]. International Journal of Chemtech Research, 2012, 4(4): 1497-1502.
- [25] AHN D J, KIM S K, YUN H S. Optimization of pretreatment and saccharification for the production of bioethanol from water hyacinth by *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2012, 35(1): 35-41.
- [26] YAO R S, HU H J, DENG S S, *et al.* Structure and saccharification of rice straw pretreated with sulfur trioxide micro-thermal explosion collaborative dilutes alkali[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(10): 6340-6343.
- [27] CHEN J L (陈佳丽). Straw as an alternative carbon source for cephalosporin C fermentation[D]. Hefei: Hefei University of Technology (合肥工业大学), 2020.
- [28] YOU J M (游见明), CAO X Z (曹新志). Analysis on the distribution of tea polyphenol in tea tree by folin-ciocalteaut method[J]. Hubei Agricultural Sciences (湖北农业科学), 2013, 52(10): 2417-2419.
- [29] WAN G C (万广聪). The influence of pseudo-lignin formation and the changes of LCC during dilute acid pretreatment on the enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse[D]. Nanning: Guangxi University (广西大学), 2019.
- [30] CHEN M, ZHAO J, XIA L M. Comparison of four different chemical pretreatments of corn stover for enhancing enzymatic digestibility[J]. Biomass and Bioenergy, 2009, 33(10): 1381-1385.
- [31] SHENG Y Q, XU Y. Nuclear magnetic resonance analysis of ascorbic acid assisted lignocellulose decomposition in dilute acid pretreatment and its stimulation on enzymatic hydrolysis[J]. Bioresource Technology, 2022, 343: 126147.
- [32] SUN D Z (孙多志), HUANG Q F (黄清发), WANG F (王复), *et al.* Study on inhibitors in dilute acid hydrolysate of straw[J]. Journal of Analytical Science (分析科学学报), 2008, 24(5): 553-556.
- [33] DING C (丁驰), HUANG H Q (黄慧琴), ZHANG S D (张树栋), *et al.* Effects of different concentrations of NaOH pretreatment on inhibitor components in rice straw hydrolysate[J]. Food and Fermentation Industries (食品与发酵工业), 2015, 41(9): 51-56.

(上接第 2560 页)

- [45] QIAN J Z (钱九州), HAN Y (韩懿), XIA L (夏良), *et al.* Effects of C/N ratio on partial-denitrification and extracellular polymeric substance[J]. Journal of Tianjin Cheng Jian University (天津城建大学学报), 2020, 6(6): 420-425.
- [46] GUO J B, WANG S H, LIAN J, *et al.* Rapid start-up of the anammox process: Effects of five different sludge extracellular polymeric substances on the activity of anammox bacteria[J]. Bioresource Technology, 2016, 220: 641-646.
- [47] CHEN L L (陈丽丽), XIAO Q T (肖启涛), YU X Q (俞晓琴), *et al.* Optical composition and potential driving factors of chromophoric dissolve dorganic matter in large lakes and reservoirs in the eastern region of China[J]. Environmental Science (环境科学), 2022, 43(4): 1930-1940.
- [48] SHIH C, MUSETH A K, ABRAHAMSSON M, *et al.* Tryptophan-accelerated electron flow through proteins[J]. Science, 2008, 320(5884): 1760-1762.
- [49] LI S S, XU Q Y, MA B R, *et al.* Performance evaluation and microbial community of a sequencing batch reactor under divalent cadmium Cd(II) stress[J]. Chemical Engineer Journal, 2018, 336: 325-333.
- [50] GOPALAKRISHNAN K, RAMESH C, RAGUNATHAN V, *et al.* Antibacterial activity of Cu₂O nanoparticles on *E. coli* synthesized from tridax procumbens leaf extract and surface coating with polyaniline[J]. Digest Journal of Nanomaterials & Biostructures, 2012, 7: 833-839.
- [51] DING A Q, ZHAO D, DING F, *et al.* Effect of inocula on performance of bio-cathode denitrification and its microbial mechanism[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 343: 399-407.
- [52] LIU Y F (刘远峰), ZHANG X L (张秀玲), ZHANG Q C (张其春), *et al.* Research progress of anode electrogenic microorganisms in microbial fuel cells[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2020, 37(9): 1729-1737.
- [53] ISHII S I, SUZUKI S, NORDENKRICHMAR T M, *et al.* A novel metatranscriptomic approach to identify gene expression dynamics during extracellular electron transfer[J]. Nature Communications, 2013, 4: 1601.

(上接 2568 页)

- [20] LI X R, LIANG Y Z, ZHOU T, *et al.* Comparative analysis of volatile constituents between recipe jingfangsan and its single herbs by GC-MS combined with alternative moving window factor analysis method[J]. Journal of Separation Science, 2009, 32(2): 258-266.
- [21] HU J (胡静), XIAO Z B (肖作兵), ZHOU R J (周如隼), *et al.* Properties of aroma sustained-release cotton fabric with rose fragrance nanocapsule[J]. Chinese Journal of Chemical Engineering (中国化学工程学报), 2011, 19(3): 523-528.
- [22] OU X H (欧秀花), CUI Y J (崔玉娟), ZHANG R X (张睿祥). Feasibility study on strengthening ancient book paper with ethyl cellulose and nano SiO₂ compound solution[J]. China Cultural Heritage Scientific Research (中国文物科学研究), 2021, 61(1): 61-66.
- [23] ZHANG Y M (张艳梅), LI Z B (李泽兵), AN K (安凯), *et al.* Degradation characteristics and influencing factors of DMF degrading communities[J]. Chemical Industry and Engineering Progress (化工进展), 2019, 38(3): 1517-1523.
- [24] LIU L Y (刘丽英), ZHANG W Y (张渭源). Effect of surface modification on heat and moisture transfer properties of fabrics[J]. Journal of Donghua University (Natural Science) (东华大学学报: 自然科学版), 2002, 28(1): 87-90.
- [25] CHEN K, XU C, ZHOU J, *et al.* Multifunctional fabric coatings with slow-releasing fragrance and UV resistant properties from ethyl cellulose/silica hybrid microcapsules[J]. Carbohydrate Polymers, 2019, 232: 115821.