

枯草芽孢杆菌发酵甘草渣产2,3-丁二醇和乙偶姻

肖志伟¹, 周克蒙¹, 安雨萌¹, 戴建英^{1*}, 修志龙¹, 党艳艳², 权春善³

(1. 大连理工大学 生物工程学院, 辽宁 大连 116024; 2. 石河子大学 化学化工学院, 新疆 石河子 832003; 3. 大连民族大学 生物技术与资源利用教育部重点实验室, 辽宁 大连 116600)

摘要: 以2种稀碱(Na_2CO_3 水溶液和NaOH水溶液,下同)及稀碱和醋酸乙醇胺离子液体混合液为溶剂对甘草渣进行预处理,考察不同碱浓度和预处理温度对甘草渣组成及酶解效果的影响。结果表明,质量分数为2%的NaOH水溶液在固液比(g:mL,下同)为1:10、100℃条件下预处理甘草渣1.5h,木质素去除率达54.1%、纤维素回收率为77.2%;样品酶解24h,葡萄糖得率可达53.5%,较预处理前甘草渣(10.6%)提高了4.0倍。并对预处理后的甘草渣进行高固酶解,在固液比3:10、纤维素酶用量45 FPU/g_{甘草渣}条件下酶解72h,葡萄糖产量达到86.2 g/L、木糖产量为18.9 g/L。以此酶解液为碳源进行发酵,64h后发酵液中2,3-丁二醇和乙偶姻产量为43.9 g/L,还原糖转化率为0.42 g/g;与对照组相比,酶解液更有利于菌体生长,生产强度提高,但转化率略低。

关键词: 甘草渣; 预处理; 碱溶液; 高固酶解发酵; 2,3-丁二醇; 生物工程

中图分类号: TQ452.1; X705 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5214(2023)12-2682-07

Fermentation of 2,3-butanediol and acetoin from liquorice residue using *Bacillus subtilis*

XIAO Zhiwei¹, ZHOU Kemeng¹, AN Yumeng¹, DAI Jianying^{1*},
XIU Zhilong¹, DANG Yanyan², QUAN Chunshan³

(1. School of Bioengineering, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China; 2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shihezi University, Shihezi 832003, Xinjiang, China; 3. Key Laboratory of Biotechnology and Resource Utilization of Ministry of Education, Dalian Minzu University, Dalian 116600, Liaoning, China)

Abstract: Liquorice residue was pretreated with two dilute basic solutions (Na_2CO_3 aqueous solution and NaOH aqueous solution) and the mixtures of the above dilute basic solution and ethanolamine acetate, respectively. The effects of different base concentrations and pretreatment temperature on the composition and enzymatic hydrolysis of liquorice residue were studied. The results showed that the removal rate of lignin and cellulose recovery rate reached 54.1% and 77.2%, respectively, under the conditions of 2% (mass fraction) NaOH aqueous solution as solvent, solid-liquid ratio (g : mL, the same below) 1 : 10, time 1.5 h and temperature 100 °C. The glucose yield was 53.5% after 24 h enzymatic digestion, which was 4.0 times higher than that without pretreatment (10.6%). When the pretreated liquorice residue was subjected to high solid enzymatic digestion at a solid-liquid ratio of 3 : 10 with an enzyme dosage of 45 FPU/g_{liquorice residue} for 72 h, the yield of glucose and xylose reached 86.2 and 18.9 g/L, respectively. This hydrolysate was used as carbon source for fermentation, the production of 2,3-butanediol and acetoin was 43.9 g/L after 64 h, and the conversion rate of reducing sugar was 0.42 g/g. Compared with control group, the hydrolysate was more favorable to the growth of bacteria, while the productivity of 2,3-butanediol and acetoin was increased and the conversion rate was slightly lower.

Key words: liquorice residue; pretreatment; alkali solution; high-solid enzymatic hydrolysis and fermentation;

收稿日期: 2023-03-10; 定用日期: 2023-05-29; DOI: 10.13550/j.jxhg.20230194

基金项目: 新疆兵团科技攻关计划项目(S2019AB1568); 生物技术与资源利用教育部重点实验室开放课题(KF2022010)

作者简介: 肖志伟(1999—),男,硕士生, E-mail: 1169210116@qq.com. 联系人: 戴建英(1972—),女,副教授, E-mail: jydai@dlut.edu.cn.

2,3-butanediol; bioengineering

利用木质纤维素发酵生产生物基化学品已成为生物质资源利用的有效途径之一^[1]。然而, 木质纤维素的复杂致密结构, 导致其有效成分难以被酶和微生物直接利用^[2-3], 因此, 木质纤维素预处理成为其高值化利用的关键^[4]。

甘草渣是甘草提取活性成分后的剩余物, 富含木质纤维素^[5-6], 其中纤维素成分可通过糖化发酵转化为生物基化学品^[7]。研究发现, Na_2CO_3 溶液和 NaOH 溶液可有效去除甘草渣中的木质素。ERABI 等^[8]利用 0.5 mol/L Na_2CO_3 溶液在 120 °C、固液比〔即每克甘草渣预处理所加入溶剂体积 (mL), 下同〕1:20 条件下预处理甘草渣 3 h, 可去除 70% 的木质素; KOORAVAND 等^[9]在 28 °C、固液比 1:20 条件下, 利用质量分数 4% 的 NaOH 溶液预处理甘草渣 24 h, 木质素去除率达到 68%; 在固液比 1:20、纤维素酶用量 20 FPU/g_{生物质} 条件下, 经 96 h 酶解葡萄糖得率达 93.7%。但该法碱溶液浓度高、固体负载量低、预处理时间长, 而且后续酶解糖化过程中酶量较大、酶解时间长、固体负载低, 导致酶解液葡萄糖浓度偏低。因此, 可通过降低碱溶液浓度、缩短预处理时间、提高固体负载量等措施进一步优化甘草渣的预处理条件, 提高预处理效率。

离子液体是一种绿色溶剂^[10], 在溶解木质纤维素各组分方面具有高选择性^[11]。本课题组前期对羟胺型离子液体的理化性质、预处理效率、对微生物的生长代谢影响等进行了研究, 发现醋酸乙醇胺离子液体 (EOAA) 预处理效果最佳, 且有好的耐水性, 不过成本及预处理温度较高^[12-13]。这类耐水性好的离子液体可与稀碱组成混合溶剂, 降低离子液体黏度, 而且预处理木质纤维素时可提高溶解生物质的能力^[14-15]。

目前, 利用甘草渣为原料生产生物基化学品的研究较少^[7-9]。利用甘草渣水解液进行大肠杆菌产琥珀酸^[7]和酵母产乙醇^[8-9]的研究表明, 甘草渣水解液可被微生物利用, 但未进一步考察甘草渣水解液中其他成分对微生物生长和代谢的影响。基于此, 本文以 C4 平台化合物 2,3-丁二醇和乙偶姻^[16-17]为目标产品, 以稀碱 (Na_2CO_3 水溶液或 NaOH 水溶液) 和 EOAA-稀碱混合溶液为溶剂, 在较低温度、较短时间内对甘草渣进行预处理, 考察预处理对甘草渣组成和酶解糖化的影响, 并以酶解液为碳源, 利用枯草芽孢杆菌发酵生产 2,3-丁二醇和乙偶姻, 通过与模拟液发酵比较, 考察甘草渣酶解液其余成分对菌体生长和产物组成生成的影响。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

纤维素酶 Cellic[®] CTec2 (157 FPU/mL), 上海西格玛奥德里奇贸易有限公司; 乙醇胺、冰醋酸, AR, 国药集团化学试剂有限公司; 柠檬酸、木糖、葡萄糖, AR, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; NaOH 、 Na_2CO_3 、 KH_2PO_4 、 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、柠檬酸三钠, AR, 天津市大茂化学试剂厂; 酵母浸粉、玉米浆干粉, BR, 北京奥博星生物技术有限公司。EOAA 按照文献^[18]通过酸碱中和法制备。

甘草渣由新疆隆惠源药业有限公司提供, 将甘草渣原料洗涤、烘干 (105 °C)、粉碎并过 40 目筛, 备用, 经检测其主要成分 (均为质量分数) 为纤维素 33.9%、半纤维素 11.3%、木质素 37.5%、灰分 1.7%, 还包括少量的多糖、黄酮、氨基酸等其他成分^[5]。菌种与培养基: 甘草渣酶解液发酵使用的菌株是枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (CGMCC No. 23179)^[12]。

实验组 (发酵) 培养基: 15 mL 甘草渣酶解液、质量浓度 3.5 g/L 酵母浸粉、质量浓度 6 g/L 玉米浆干粉、质量浓度 3 g/L KH_2PO_4 、质量浓度 0.065 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH=6.5。

对照组培养基: 糖液 15 mL〔用 0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH=4.8) 配制, 葡萄糖和木糖的质量浓度与甘草渣酶解液中糖浓度相同〕、质量浓度 3.5 g/L 酵母浸粉、质量浓度 6 g/L 玉米浆干粉、质量浓度 3 g/L KH_2PO_4 、质量浓度 0.065 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH=6.5。

HZQ-F160 振荡培养箱, 中国科学院武汉仪器厂; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技公司; GC 2010 气相色谱仪, 日本岛津公司; 722 紫外-可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; DF-101S 集热式恒温加热磁力搅拌器, 上海力辰邦西仪器科技有限公司; SHB-III A 循环水式多用真空泵, 上海沪析实业有限公司; SS-325 高温灭菌锅, 日本 TOMY 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 甘草渣预处理

将 5.0 g EOAA 与不同种类及浓度的稀碱溶液 (A_1 : 浓度为 0.5 mol/L 的 Na_2CO_3 水溶液; B_1 : 浓度为 1 mol/L 的 Na_2CO_3 水溶液; C_1 : 质量分数为 1% 的 NaOH 水溶液; D_1 : 质量分数为 2% 的 NaOH 水溶液) 按质量比 1:1 混合, 配成 EOAA-稀碱溶液 (A_2 : EOAA-0.5 mol/L Na_2CO_3 水溶液; B_2 : EOAA-1 mol/L Na_2CO_3 水溶液; C_2 : EOAA-质量分数 1% 的 NaOH 水溶液; D_2 : EOAA-质量分数 2% 的 NaOH 水溶液)。

室温下, 将 1.0 g 甘草渣按固液比 1:10 (g:

mL)置于装有不同稀碱及 EOAA-稀碱溶液的 50 mL 具塞三角烧瓶中,混合均匀,并在恒温磁力搅拌油浴锅中升温至 80 或 100 °C,在 200 r/min 搅拌下反应 1.5 h。预处理结束后,冷却,用 3 倍预处理溶液体积的蒸馏水将混合物转移至布氏漏斗中,用与预处理溶液等体积的蒸馏水洗涤混合物,减压抽滤进行固液分离,重复多次洗涤、抽滤操作,当滤液呈无色透明状且 pH 接近中性,确认洗涤完全。将滤渣转移至玻璃器皿中,置于 105 °C 真空干燥箱中烘干至恒重,得到预处理后甘草渣残渣,用于后续实验。

1.2.2 酶解糖化实验

采用纤维素酶 Cellic® CTec2 进行酶解实验,酶载量为 15 FPU/g_{甘草渣} (即 1 g 甘草渣添加 0.1 g 纤维素酶)。具体步骤为:称 0.1 g 甘草渣于 10 mL 离心管中,加入 1 mL 0.05 mol/L 柠檬酸钠缓冲液 (pH 4.8) (固液比 1:10),混匀,加入纤维素酶,然后在恒温振荡培养箱于 50 °C、200 r/min 条件下酶解 24 h。通过高效液相色谱仪测定甘草渣酶解液中各还原糖 (葡萄糖、木糖) 质量浓度。以葡萄糖、木糖的得率来评价预处理及酶解糖化实验的效果,计算公式如下:

葡萄糖得率/% = [酶解液中葡萄糖质量 (g) / 酶解前甘草渣中葡萄糖质量 (g)] × 100 (1)

木糖得率/% = [酶解液中木糖质量 (g) / 酶解前甘草渣中木糖质量 (g)] × 100 (2)

1.2.3 高固酶解与发酵实验

采用固液比 3:10 进行酶解实验 (即高固酶解),具体步骤为:在 50 mL 锥形瓶中加入 6 g 预处理后甘草渣残渣和 20 mL 柠檬酸盐缓冲液 (pH=4.8, 0.05 mol/L),添加 45 FPU/g_{甘草渣} 的纤维素酶,在恒温振荡培养箱中 (50 °C、200 r/min) 酶解 72 h。设置 3 组平行实验。酶解过程中,酶和底物均采用 4 次分批加料,先加酶和甘草渣总质量的 1/3,然后每 12 h 分批补加酶和甘草渣总质量的 1/6 (4 次补料),总计酶解 72 h。通过高效液相色谱仪测定酶解液中还原糖的质量浓度,将剩余的酶解液充当培养基成分。

以接种量 2% (体积分数) 接种于分别装有 15 mL 甘草渣酶解液的发酵培养基和对照组培养基中,在 37 °C、200 r/min 的恒温振荡培养箱中培养 96 h,定点取样,测定发酵液中菌体的生长情况。将样品在 12000 r/min 条件下离心 10 min,得到的清液通过高效液相色谱仪测定发酵液中还原糖质量浓度以及副产物 (柠檬酸、乙酸、乳酸) 的质量浓度,利用气相色谱仪测定主产物 2,3-丁二醇和乙偶姻的质量浓度,发酵过程中的还原糖转化率 (g/g) 以及生产强度 [g/(L·h)] 按下式计算:

还原糖转化率 = 主产物 (2,3-丁二醇+乙偶姻) 质量

(g) / 还原糖 (葡萄糖+木糖) 质量 (g) (3)

生产强度 = 主产物 (2,3-丁二醇+乙偶姻) 质量浓度 (g/L) / 发酵时间 (h) (4)

1.3 分析与测试方法

1.3.1 甘草渣组分分析

采用美国可再生能源实验室 (NREL) 标准分析方法^[19]测定甘草渣预处理前后化学组分变化。以葡萄糖脱水系数 (0.90) 计算纤维素含量;以木糖脱水系数 (0.88) 计算半纤维素含量;以 NREL 测定不溶物质量,计算酸不溶木质素含量。

固体、纤维素和半纤维素的回收率以及木质素 (酸溶木质素和酸不溶木质素之和) 的去除率按下式计算^[12]:

固体回收率/% = [预处理后甘草渣质量 (g) / 预处理前甘草渣质量 (g)] × 100 (5)

纤维素回收率/% = [预处理后甘草渣中纤维素质量 (g) / 预处理前甘草渣中纤维素质量 (g)] × 100 (6)

半纤维素回收率/% = [预处理后甘草渣中半纤维素质量 (g) / 预处理前甘草渣中半纤维素质量 (g)] × 100 (7)

木质素去除率/% = [1 - 预处理后甘草渣中木质素质量 (g) / 预处理前甘草渣中木质素质量 (g)] × 100 (8)

1.3.2 分析方法

采用液相色谱检测时,通过外标法测定酶解液及发酵液中的还原糖 (葡萄糖、木糖) 和发酵副产物 (柠檬酸、乙酸、乳酸) 的质量浓度。HPLC 检测条件:检测器为 Waters 2414 示差检测器,色谱柱为 Aminex HPX-87H,流动相为 0.05 mol/L 硫酸,流速 0.6 mL/min,柱温 55 °C^[12]。

采用气相色谱检测发酵液中 2,3-丁二醇和乙偶姻的质量浓度。GC 检测条件:色谱柱为 Column BGB-174,氢火焰离子化检测器 (FID) 温度为 200 °C,分流检测温度 (SPLI) 温度为 200 °C, N₂ 为载气 (分流比 1:5)^[18]。

采用紫外-可见分光光度计测定发酵液在 600 nm 处光密度值 (OD₆₀₀, 发酵液菌体密度);测定 320 nm 光密度值 (酸溶木质素含量),均以去离子水为空白。

2 结果与讨论

2.1 甘草渣预处理条件的优化

2.1.1 稀碱对甘草渣化学组分的影响

在固液比 1:10、反应温度 80 °C、反应时间 1.5 h 的条件下,考察了不同种类和浓度的稀碱溶液及离子液体碱溶液对甘草渣化学组分的影响,结果如表 1 所示。

表 1 不同浓度碱溶液及 EOAA-稀碱溶液预处理甘草渣
Table 1 Pretreatment of licorice residue by alkali or EOAA-alkali solutions with various concentrations

预处理条件	固体回收率/%	纤维素回收率/%	半纤维素回收率/%	木质素去除率/%
A ₁	82.1±1.0	93.4±1.2	82.3±1.6	27.4±2.7
A ₂	85.3±0.5	96.4±2.0	83.8±1.7	23.4±1.3
B ₁	76.6±0.7	90.4±0.9	77.3±0.8	36.1±2.0
B ₂	82.7±1.9	96.8±0.7	81.7±1.0	27.1±2.7
C ₁	70.7±0.6	93.6±2.1	72.6±0.0	40.8±2.5
C ₂	80.2±0.8	97.7±0.3	84.3±0.5	31.4±3.1
D ₁	61.6±0.3	90.8±2.8	57.5±1.9	44.4±2.7
D ₂	78.1±2.1	93.6±0.7	80.4±2.1	32.1±1.5

由表 1 可看出, 在稀碱预处理过程中, 随着碱溶液浓度 (或质量分数) 的增大, 木质素去除效果提高。用质量分数 2% 的 NaOH 水溶液预处理后, 残渣中木质素去除率最高, 达 44.4%±2.7%。相较于预处理前的甘草渣, 甘草渣中大部分纤维素得到了很好的保留, 纤维素回收率为 90.4%~97.7%; 但随着碱溶液浓度的增大, 甘草渣中半纤维素回收率降低, 可能是碱浓度的提高导致破坏半纤维素与木质素结合键的作用增强, 在去除木质素的同时也有部分半纤维素被去除。而用 EOAA-稀碱溶液预处理时, 随着碱浓度的增大预处理效果提高; 相较于对应的稀碱溶液, 纤维素和半纤维素的回收率更高, 但木质素去除能力较弱。

2.1.2 预处理温度对甘草渣化学组分的影响

温度是影响预处理效果的关键因素, 本研究综合比较了稀碱及 EOAA-稀碱溶液在不同反应温度 (80、100 °C) 下对甘草渣化学组分的影响 (图 1)。

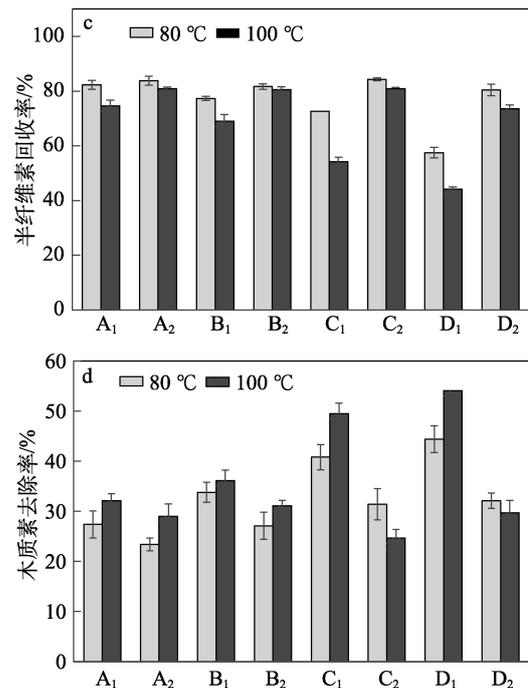
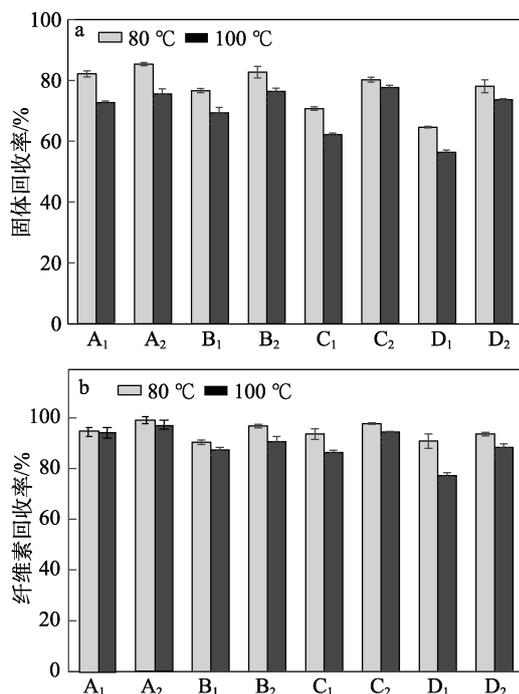


图 1 不同稀碱及 EOAA-稀碱溶液在不同温度下对固体回收率 (a)、纤维素回收率 (b)、半纤维素回收率 (c)、木质素去除率 (d) 的影响

Fig. 1 Effects of different dilute alkali and EOAA-dilute alkali solutions at different temperature on solid recovery (a), cellulose recovery (b), hemicellulose recovery (c), lignin removal rate (d)

如图 1 所示, 稀碱预处理过程中, 温度升高加剧了对木质素的去除。可以看出, 当用质量分数 2% 的 NaOH 水溶液于 100 °C 预处理后, 木质素去除率达 54.1%, 纤维素回收率为 77.2%; 同时温度升高使甘草渣中纤维素及半纤维素的损失也增大, 且碱浓度越高损失程度越明显。EOAA-稀碱溶液体系在升高反应温度后, 对甘草渣的预处理因碱溶液种类的不同, 效果也不一致。Na₂CO₃ 溶液与 EOAA 组成的复合体系, 随着温度的升高, 木质素去除率提高, 最高达到 31.1%, 且纤维素和半纤维素的回收率并没有随着温度的升高而发生明显变化。NaOH 溶液与 EOAA 组成的复合体系, 随着预处理温度的升高, 甘草渣成分变化并不明显, 同时对木质素的去除甚至不如反应温度 80 °C。可能的原因是, 温度的升高加剧了水的气化, 造成离子液体碱溶液体系中的 EOAA 含量升高, 溶液的黏度增大, 影响了预处理效果。之前的研究结果也显示, EOAA 在较低温度 (80~120 °C) 下进行预处理, 效果并不明显^[12]。

2.2 预处理对甘草渣酶解糖化的影响

为进一步考察预处理效果, 对不同稀碱及 EOAA-稀碱溶液预处理所得底物及预处理前的原料进行了 24 h 酶解糖化实验 (图 2)。

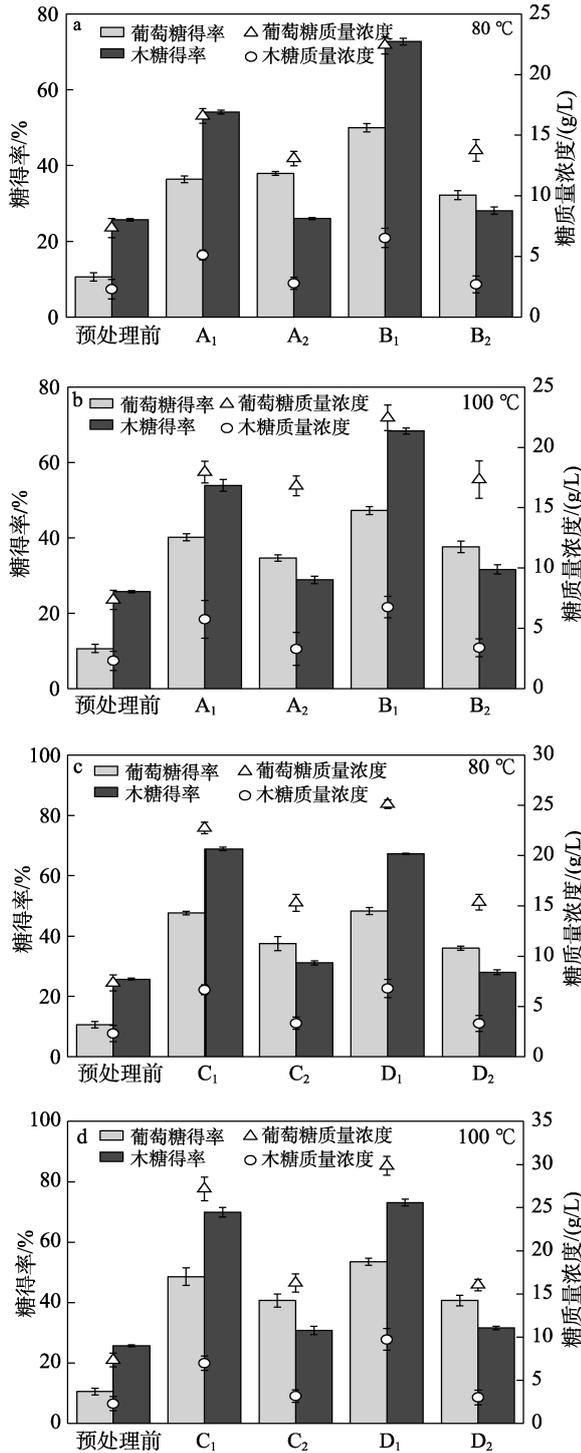


图 2 稀碱及 EOAA-稀碱溶液预处理甘草渣后 24 h 酶解效果

Fig. 2 Enzymolysis effect of liquorice residue pretreated by alkali or EOAA-alkali solutions for 24 h

如图 2 所示, 随着碱溶液浓度的增大, 底物酶解液中的葡萄糖、木糖质量浓度及葡萄糖、木糖得率均呈现增加趋势。可能的原因是随碱浓度的增加, 木质素去除率提高, 酶的可及面积增大, 导致酶解效率增加。在 80 °C 时, 质量分数为 2% 的 NaOH 溶液预处理体系呈现出最佳的酶解效果, 葡萄糖、木

糖质量浓度及葡萄糖、木糖得率均为最高值, 分别为 25.1、6.8 g/L 和 48.3%、67.3%。随着预处理温度升高至 100 °C, 底物的酶解效率与预处理程度成正比, 木质素去除率增加, 底物酶解效率也增加。在 100 °C 时, 质量分数 2% 的 NaOH 溶液预处理后, 葡萄糖、木糖质量浓度和葡萄糖、木糖得率达到最高值, 分别为 29.8、9.8 g/L 和 53.5%、73.1%, 较预处理前甘草渣酶解的葡萄糖 (10.6%) 和木糖 (25.7%) 得率分别提高了 4.0 和 1.8 倍。

与文献[9]报道的用质量分数 4% 的 NaOH 水溶液于 28 °C 处理甘草渣 24 h 后木质素去除率 (68%) 相比, 本研究在质量分数 2% 的 NaOH 水溶液中于 100 °C 预处理甘草渣 1.5 h 后木质素去除率 (54.1%) 略低。但本研究中所用碱溶液质量分数低, 预处理时间更短。酶解实验结果显示, 与文献[9]相比, 当酶解 24 h 时, 本研究葡萄糖得率高 (53.5% vs 19.5%)、酶用量更低 (15 FPU/g vs. 20 FPU/g)、固体负载量更高 (文献固液比为 1 : 20)。因此, 本研究预处理方法更有利于后续的酶解糖化。

2.3 甘草渣高固酶解及其水解液发酵

结合上述分析, 用质量分数为 2% 的 NaOH 水溶液在 100 °C 预处理甘草渣具有最佳酶解效果, 所以选择此条件预处理后残渣进行酶解与发酵实验。

为了提高酶解液中的糖浓度, 采用高固酶解法进行水解反应。通过分批添加酶和底物的方式, 酶解 72 h 后最终得到含 86.2 g/L 葡萄糖和 18.9 g/L 木糖的酶解液 (葡萄糖得率 59.6%、木糖得率 34.3%)。甘草渣的酶解并不彻底, 是由于固体负载量过高影响了酶的传质所致。为了考察甘草渣水解液的可发酵性, 以此酶解液为碳源, 利用 *B. subtilis* 进行了发酵生产 2,3-丁二醇和乙偶姻的探索。为探究酶解液中其他成分对菌种生长和 2,3-丁二醇发酵的影响, 以相同浓度柠檬酸盐缓冲液配制的与酶解液同等质量浓度的糖液为实验对照组, 其他条件均相同, 为了观察发酵过程中各项参数的变化, 共监测 96 h, 结果如图 3 所示。

从图 3a、c 可以看到, 经过 96 h 的发酵, 实验组 c 的 OD 远高于对照组 a。对照组在发酵时长 16 h 时 OD₆₀₀ 达到 8.6 并逐渐平稳, 而实验组在 16 h 时 OD₆₀₀ 达到 11.7, 且继续保持增长趋势, 在 46 h 达到 15.7 并逐渐趋于平缓。同时可以发现, 在发酵前期, 实验组的菌体密度 (OD₆₀₀) 增长速度显著高于对照组, 实验组的菌株生长情况相较于对照组更好, 推测酶解过程中产生了可溶性物质促进了菌株的生长。

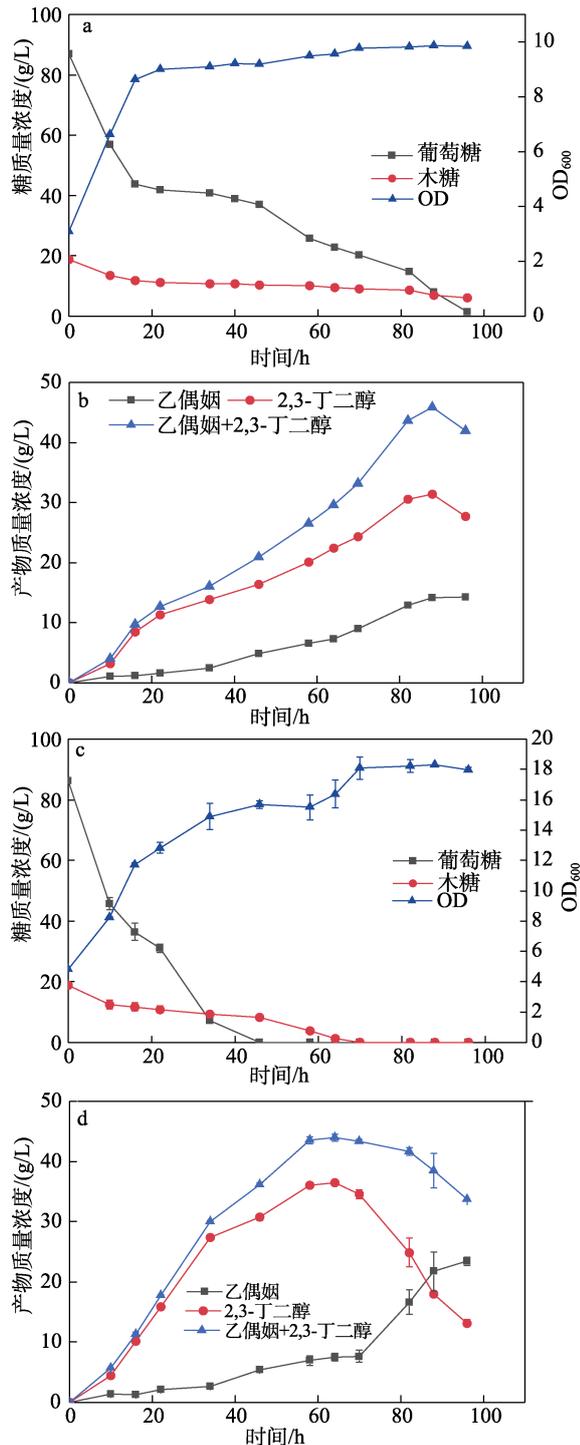


图 3 枯草芽孢杆菌在对照组糖液 (a、b) 及甘草渣酶解液 (c、d) 中的生长代谢情况

Fig. 3 Growth and metabolism of *Bacillus subtilis* in the control (a, b) and glycyrrhiza residue hydrolysate (c, d)

因实验组中菌株生长更快, 导致对葡萄糖及木糖的消耗速度显著高于对照组。经过 46 h 的发酵, 实验组中葡萄糖全部消耗完, 而对照组中剩余葡萄糖质量浓度为 37.2 g/L, 实验组葡萄糖消耗速率相较于对照组提高了 76%, 此趋势与实验组菌体密度高于对照组相一致。实验组和对照组均出现了菌株

同时利用葡萄糖和木糖的现象, 但利用程度存在差异, 实验组对木糖的消耗量和消耗速率均高于对照组。实验组中的木糖在 70 h 全部消耗殆尽, 平均消耗速率为 0.27 g/(L·h), 而且木糖消耗速率也因为葡萄糖效应在葡萄糖消耗殆尽前后存在差异。当培养基中存在葡萄糖时, 木糖消耗量为 10.6 g/L, 消耗速率为 0.23 g/(L·h); 当培养基中葡萄糖全部消耗完, 木糖消耗速率提升至 0.34 g/(L·h)。相比之下, 发酵结束后, 前 96 h 对照组木糖总消耗量为 12.7 g/L, 平均消耗速率为 0.13 g/(L·h), 这表明菌株在实验组中木糖消耗速率大于对照组, 且在实验组中受葡萄糖效应的影响较对照组更小, 对木糖的利用程度更佳。

由图 3b、d 可见, 以酶解液充当发酵碳源时 (图 3d), 菌种的发酵主产物 2,3-丁二醇和乙偶姻的产量和分布相较于对照组 (图 3b) 也发生了变化。实验组中 2,3-丁二醇产量相比于对照组有明显提高, 在发酵 64 h 时, 2,3-丁二醇产量最高, 达 36.5 g/L。2,3-丁二醇产量在前 40 h 增长速率较快, 到 40 h 后 2,3-丁二醇的增长速率降低, 推测原因是培养基中的葡萄糖消耗殆尽, 影响了产物的增长速率, 而乙偶姻的产量在实验组和对照组均呈现较为缓慢的增长。有趣的是, 发酵 70 h 时培养基中葡萄糖、木糖均消耗完全, 实验组中 2,3-丁二醇产量呈下降趋势, 而乙偶姻产量呈显著上升趋势, 且在发酵 88 h 后乙偶姻的产量高于 2,3-丁二醇, 说明葡萄糖消耗完有利于 2,3-丁二醇向乙偶姻转化。发酵 64 h 时, 实验组中主产物 (2,3-丁二醇+乙偶姻) 产量最高, 达 43.9 g/L, 此时还原糖转化率 (即还原糖转化为主产物) 为 0.42 g/g, 生产强度为 0.69 g/(L·h); 对照组中目标产物产量为 45.9 g/L, 此时还原糖转化率为 0.44 g/g, 生产强度为 0.52 g/(L·h)。实验组总目标产物产量及还原糖转化率略低于对照组, 其原因是菌体生长过于旺盛导致碳代谢流向生物量偏移。对代谢副产物的分析表明, 实验组和对照组的副产物 (乙酸、乳酸、柠檬酸) 均一致, 且产量不存在显著差异, 最高产量均 < 1 g/L。

3 结论

本文考察了稀碱溶液以及 EOAA-稀碱对甘草渣的预处理效果及酶解糖化的影响, 发现在较低温度下稀碱更有利于去除甘草渣中的木质素。通过比较稀碱溶液种类、浓度和反应温度对甘草渣中木质纤维组分变化及酶解效果的影响, 发现在温度 100 °C 处理 1.5 h 条件下, 质量分数 2% 的 NaOH 水溶液预处理效果最佳, 木质素去除率达 54.1%、纤维素回收率为 77.2%, 24 h 酶解后, 葡萄糖得率达

到 53.5%，较预处理前甘草渣（10.6%）提高了 4.0 倍。对预处理后的甘草渣进行了高固酶解发酵，发现酶解液中菌体生长明显优于对照组，且耗糖速率更快，发酵 64 h 最终获得 2,3-丁二醇和乙偶姻产量为 43.9 g/L，还原糖转化率 0.42 g/g。与对照组相比，酶解液中菌体生长更旺盛，生产强度提高。本文通过研究甘草渣的预处理、高固酶解和糖化发酵，展示了甘草渣转化为生物化学品的可行性，所得结果可为废弃药渣的生物转化提供参考。

参考文献：

- [1] WANG H L (王洪亮), YANG J Y (杨景雅), LIANG M Z (梁明珠). Research progress on the conversion of agricultural biomass to lactic acid and its esters[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2021, 38(12): 2438-2449.
- [2] MA X, GAO M, LI C, *et al.* Effects of different lignocellulosic wastes on alleviating acidification of L-lactic acid production from food waste fermentation[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 342: 126043.
- [3] LIU Y J, LI B, FENG Y, *et al.* Consolidated bio-saccharification: Leading lignocellulose bioconversion into the real world[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 40: 107535.
- [4] JIA L P (贾丽萍), YAO X Q (姚秀清), YANG L (杨磊), *et al.* Advances in pretreatment technology of lignocellulose[J]. *Journal of Cellulose Science and Technology (纤维素科学与技术)*, 2022, 30(2): 72-80.
- [5] LUO Y Y (罗燕燕), LIU X S (刘效栓), LI X X (李喜香), *et al.* Research progress on comprehensive utilization and chemical compositions of licorice residue[J]. *Western Journal of Traditional Chinese Medicine (西部中医药)*, 2017, 30(3): 138-141.
- [6] MA C M (马彩梅). Research progress on comprehensive utilization of licorice and licorice residue[J]. *Modern Agricultural Science and Technology (现代农业科技)*, 2015, (1): 121-122.
- [7] WANG C, SU X, SUN W, *et al.* Efficient production of succinic acid from herbal extraction residue hydrolysate[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 265: 443-449.
- [8] ERABI M, GOSHADROU A. Bioconversion of *Glycyrrhiza glabra* residue to ethanol by sodium carbonate pretreatment and separate hydrolysis and fermentation using *Mucor hiemalis*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2020, 152: 112537.
- [9] KOORAVAND S, GOSHADROU A, HATAMIPOUR M S. Enhanced ethanol production from *Glycyrrhiza glabra* residue by fungus *Mucor hiemalis*[J]. *Industrial Crops and Products*, 2017, 108: 767-774.
- [10] SINGH S K, SAVOY A W. Ionic liquids synthesis and applications: An overview[J]. *Journal of Molecular Liquids*, 2020, 297: 112038.
- [11] HUANG D T (黄冬婷), HUANG J S (黄俊生), TANG J J (汤静洁), *et al.* Ultrasonic-assisted ionic liquid extraction of ginseng polysaccharide and its antioxidant activity[J]. *Fine Chemicals (精细化工)*, 2022, 39(9): 1851-1857, 1871.
- [12] AN Y M, ZHUANG J, LI Y, *et al.* Pretreatment of *Jerusalem artichoke* stalk using hydroxylammonium ionic liquids and their influences on 2,3-butanediol fermentation by *Bacillus subtilis*[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 354: 127219.
- [13] SUN J, KONDA N M, PARTHASARATHI R, *et al.* One-pot integrated biofuel production using low-cost biocompatible protic ionic liquids[J]. *Green Chemistry*, 2017, 19(13): 3152-3163.
- [14] ROCHA E G A, PIN T C, RABELO S C, *et al.* Evaluation of the use of protic ionic liquids on biomass fractionation[J]. *Fuel*, 2017, 206: 145-154.
- [15] LIU Z (刘振), LIU C (刘程), LI L F (李龙飞), *et al.* Removal of lignin from corn straw by ionic liquid alkali solution[J]. *Chemical Industry and Engineering Progress (化工进展)*, 2018, 37(5): 1789-1794.
- [16] CUI Z, WANG Z, ZHENG M, *et al.* Advances in biological production of acetoin: A comprehensive overview[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2022, 42(8): 1135-1156.
- [17] XIE S, LI Z, ZHU G, *et al.* Cleaner production and downstream processing of bio-based 2,3-butanediol: A review[J]. *Journal of Cleaner Production*, 2022, 343: 131033.
- [18] LI Y, DAI J Y, XIU Z L. Salting-out extraction of acetoin from fermentation broths using hydroxylammonium ionic liquids as extractants[J]. *Separation and Purification Technology*, 2020, 240: 116584.
- [19] ZHANG H M (张红漫), ZHENG R P (郑荣平), CHEN J W (陈敬文), *et al.* Investigation on the determination of lignocellulosics components by NREL method[J]. *Chinese Journal of Analysis Laboratory (分析实验室)*, 2010, 29(11): 15-18.
- [38] LIU Z J, REN L, JING J, *et al.* Fabrication of robust superhydrophobic organic-inorganic hybrid coating through a novel two-step phase separation method[J]. *Progress in Organic Coatings*, 2021, 157: 106320.
- [39] GHASEMLOU M, DAVER F, IVANOVA E P, *et al.* Bio-inspired sustainable and durable superhydrophobic materials: From nature to market[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2019, 7(28): 16643-16670.
- [40] LEE E J, DEKA B J, GUO J X, *et al.* Engineering the re-entrant hierarchy and surface energy of PDMS-PVDF membrane for membrane distillation using a facile and benign microsphere coating[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(17): 10117-10126.
- [41] LI J, LI Y S, LU Y Y, *et al.* PDMS/PVDF electrospinning membranes for water-in-oil emulsion separation and UV protection[J]. *Biomimetics*, 2022, 7(4): 217.
- [42] AN A K, GUO J, LEE E J, *et al.* PDMS/PVDF hybrid electrospun membrane with superhydrophobic property and drop impact dynamics for dyeing wastewater treatment using membrane distillation[J]. *Journal of Membrane Science*, 2017, 525: 57-67.
- [43] GE M Z, CAO C Y, LIANG F H, *et al.* A "PDMS-in-water" emulsion enables mechanochemically robust superhydrophobic surfaces with self-healing nature[J]. *Nanoscale Horizons*, 2020, 5(1): 65-73.
- [44] GUO X J, XUE C H, SATHASIVAM S, *et al.* Fabrication of robust superhydrophobic surfaces via aerosol-assisted CVD and thermo-triggered healing of superhydrophobicity by recovery of roughness structures[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2019, 7(29): 17604-17612.
- [45] LIU Z J, WANG H Y, ZHANG X G, *et al.* Durable and self-healing superhydrophobic polyvinylidene fluoride (PVDF) composite coating with *in-situ* gas compensation function[J]. *Surface and Coatings Technology*, 2017, 327: 18-24.
- [46] GUPTA R K, DUNDERDALE G J, ENGLAND M W, *et al.* Oil/water separation techniques: A review of recent progresses and future directions[J]. *Journal of Materials Chemistry A*, 2017, 5(31): 16025-16058.
- [47] PAN Y L, LIU L M, ZHANG Z J, *et al.* Surfaces with controllable super-wettability and applications for smart oil-water separation[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2019, 378: 122178.

(上接第 2675 页)