

分类号: Q81

单位代码: 10363

密 级: 公开

学 号: 2220520134

油茶果壳组分的分级分离及其高值化利用研究

Fractionation of *Camellia oleifera* shells components for high-value applications

学 生 姓 名: 喻艳玲

校 内 导 师: 张琴 唐松

校 外 导 师: 唐金鹏

专 业: 生物与医药

研 究 方 向: 生物技术与工程

论文答辩日期: 2025 年 05 月 15 日

安徽工程大学学位论文原创性声明

本人郑重声明：我恪守学术道德，崇尚严谨学风。所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已明确注明和引用的内容外，本论文不包含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品及成果的内容。论文为本人亲自撰写，我对所写的内容负责，并完全意识到本声明的法律后果由本人承担。

学位论文作者签名：



日期：2025 年 5 月 18 日

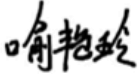
安徽工程大学学位论文版权使用授权书

学位论文作者完全了解学校有关保留、使用学位论文的规定，同意学校保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅或借阅。本人授权安徽工程大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。

保密 ☐，在 _____ 年解密后适用本版权书。

本学位论文属于

不保密 ☒。

学位论文作者签名：		指导教师签名：	
日期：2025 年 5 月 18 日		日期：2025 年 5 月 18 日	

油茶果壳组分的分级分离及其高值化利用研究

摘 要

木本油料作物加工副产物的处理方式普遍为焚烧或填埋，其利用效率低。油茶果壳作为油茶加工成茶油的副产物，具有原料丰富、价格低廉和可再生性等优势。本论文目的是通过分级分离油茶果壳的组分，实现其高值化利用，以达到缓解能源短缺和减少碳排放的目的。本论文以油茶果壳为原料，通过提取油茶果壳多糖和制备多糖水凝胶，将醇提后的油茶果壳进行预处理，促使油茶果壳木质纤维素定向分离，实现纤维素酶高效水解获得可发酵性糖，并用于圆红冬孢酵母发酵生产微生物油脂，为可持续生产生物柴油提供了原料支持。主要研究结果和结论如下：

(1) 本研究提取了油茶果壳的总多糖并制备多糖水凝胶。通过乙醇对油茶果壳中的总多糖进行了提取工艺优化，随后对纯化后油茶果壳总多糖的抗氧化性进行了考察，检测了多糖水凝胶的溶胀率与包载率。结果表明，提取时间 1 h，提取温度 85 °C，乙醇浓度 60%，料液比 1:12 g/mL 时，所得油茶果壳总多糖得率最大为 10.61%。经 ABTS⁺ 和 DPPH 可知，油茶果壳多糖具有抗氧化活性。当多糖浓度添加量为 2 mg/mL，其溶胀率达到最大为 1600%，包载率为 98%。油茶果壳多糖水凝胶具有良好的溶胀性与包载率。

(2) 为实现油茶果壳组分的分级利用，本研究将乙醇提取后的油茶果壳进行预处理。开发了一种水热联合白腐真菌 *Trametes sp.* LS-10C 预处理方法。探究了不同氯化铁 (0-0.08 mol/L)，预处理温度 (130-170 °C) 预处理时间 (0-180 min) 对油茶果壳中木质纤维素组分分离效

果的影响,对水热预处理液进行抑制物检测和水热预处理后的特征官能团及纤维素结晶度的分析。并探究水热以及水热联合生物预处理对纤维素酶水解效率的影响。结果表明,水热联合白腐真菌预处理中,130 °C和 0.02 mol/L 氯化铁预处理 10 min,油茶果壳的纤维素保留率为 52.83%,半纤维素脱出为 58.97%,木质素脱出为 30.56%。与原料相比较,水热预处理的酶解产率提高了 3.12 倍,水热联合生物预处理酶解产率提高了 4.77 倍。从水热预处理后的特征官能团及纤维素结晶度可知,预处理可以提高纤维素含量,有助于提高油茶果壳对纤维素酶的酶水解效率。

(3) 为提高纤维素酶水解产糖量,本研究开发了一种氯化铁联合四氢糠醇的预处理工艺。通过响应面分析法,以纤维素保留率和木质素去除率作为评价参数,对 THFA 浓度(50-90%)、氯化铁浓度(0-0.08 mol/L)、预处理温度(100-170 °C)和预处理时间(0-50 min)预处理条件进行优化。对预处理后固体残留物及预处理液中的木质素分别进行理化特性测定和化学结构进行表征分析。研究了酶载量、基质浓度和添加剂对酶水解效率的影响。最后研究了分批补料对酶水解效率的影响。结果表明:优化预处理条件为 0.037 mol/L FeCl_3 , 62% THFA 浓度和 170 °C保温 0 min,预处理后油茶果壳的纤维素保留率和木质素脱除率为 93%和 85%。通过表征分析,预处理后油茶果壳的木质素含量明显减少,其表面被破坏,热稳定性降低,表面负电荷量减少,比表面积增大。在 2%基质浓度和 10 FPU/g 干基水解 24 h 条件下,预处理油茶果壳的酶解效率比未处理的油茶果壳提高了 6.0 倍。在 15%基质浓度及酶载量 5 FPU/g 干基,在添加 PEG10000 水解 72 h 后的葡萄糖产率显著提高 62%,预处理后的油茶果壳液化时间缩短。分批补料中 12 h 和 24 h 分别补料 5%后,其酶解产率比初始未补料(15%)提

高了 0.7 倍，水解产物中葡萄糖浓度最高可达 95 g/L，可用于后续作为碳源用于微生物油脂发酵。

(4) 本研究以四氢糠醇联合氯化铁预处理后油茶果壳的酶解液为碳源，利用圆红冬孢酵母发酵生产微生物油脂。以纯葡萄糖为碳源对酵母产油脂进行优化。考察了碳源种类、氮源种类对酵母生长的影响，通过单因素实验以及响应面优化了酵母发酵培养基中的组分与其浓度。以优化的酵母发酵培养基，将预处理后油茶果壳的酶解液作为碳源产微生物油脂，并对其油脂成分进行气相联用色谱分析，以大豆油及纯葡萄糖培养基所产油脂作对照。结果表明：响应面最优的工艺条件为葡萄糖 70 g/L、酵母粉 0.75 g/L、硫酸镁为 2 g/L、碳氮比 250:1，其生物量为 11.24 ± 0.59 g/L，油脂产量为 6.27 ± 0.05 g/L，油脂含量为 $64.11 \pm 2.73\%$ 。油茶果壳酶解产物发酵产糖经酵母发酵，其生物量为 8.72 ± 0.14 g/L，油脂产量为 4.29 ± 0.25 g/L，油脂含量为 $48.91 \pm 0.36\%$ ，其油脂脂肪酸成分类似大豆油，可作为生产生物柴油的潜在替代原料。

关键词：油茶果壳，多糖水凝胶，木质纤维素，预处理，微生物油脂

FRACTIONATION OF *CAMELLIA OLEIFERA* SHELLS COMPONENTS FOR HIGH-VALUE APPLICATIONS

ABSTRACT

The processing by-products of woody oil crops are commonly disposed of through incineration or landfill, resulting in low utilization efficiency. As a by-product generated during the processing of *Camellia oleifera* into tea oil, *Camellia oleifera* shells (COS) demonstrates significant advantages such as abundant raw material availability, low cost and renewability. This study aims to achieve high-value utilization of COS through component fractionation, thereby addressing energy shortages and reducing carbon emissions. Using COS as raw materials, this research first extracted polysaccharides and prepared polysaccharide hydrogels. Subsequently, Meanwhile, the ethanol extracted *Camellia oleifera* shells (ECOS) are underwent pretreatment to facilitate directional separation of lignocellulose components. This process enabled efficient enzymatic hydrolysis of cellulose to obtain fermentable sugars, which were then utilized for microbial lipid production through *Rhodospiridium toruloides* fermentation. The resulting microbial lipids provide essential raw material support for sustainable biodiesel production, establishing an integrated pathway for the comprehensive utilization of COS resources :

(1) The total polysaccharide components in ECOS were subjected to ethanol extraction with process optimization. Simultaneously, the antioxidant activity of the purified COS polysaccharides was investigated.

The swelling ratio and encapsulation efficiency of the polysaccharide hydrogels were determined. The results demonstrated that under the optimal extraction conditions of 1 h duration, 85 °C , and a solid-liquid ratio of 1:12 g/mL with 60% ethanol, the maximum yield of total polysaccharides from ECOS reached 10.61%. Moreover, the ECOS polysaccharides exhibited great antioxidant activity, and the polysaccharide-based hydrogel showed excellent swelling capacity and encapsulation efficiency. At a polysaccharide concentration of 2 mg/mL, the hydrogel achieved a maximum swelling rate of 1600% with an encapsulation rate of 98%.

(2) A novel hydrothermal-white rot fungus combined pretreatment method using *Trametes sp.* LS-10C was established. The effects of varying ferric chloride (FeCl_3) concentrations (0–0.08 mol/L), pretreatment temperatures (130–170°C), and durations (0–180 min) on the separation efficiency of lignocellulosic components in ECOS were systematically investigated. The hydrothermal prehydrolysate was analyzed for inhibitor content, while the functional groups and crystallinity of the pretreated biomass were characterized. Additionally, the enzymatic hydrolysis of the pretreated material was evaluated. The results demonstrated that the hydrothermal-white rot fungus combined pretreatment achieved the highest delignification (30.56%) efficiency under conditions of 0.02 mol/L FeCl_3 , 130°C, and 10 min, resulting in 52.83% cellulose retention and 58.97% hemicellulose removal. Hydrothermal pretreatment alone enhanced enzymatic hydrolysis yield by 3.12 fold, while the combined hydrothermal-biological pretreatment increased enzymatic yield by 4.77 fold. The analysis of characteristic functional groups and cellulose crystallinity after hydrothermal pretreatment reveals that this treatment enhances cellulose content, thereby improving the enzymatic hydrolysis efficiency of COS by facilitating cellulose accessibility to cellulase.

(3) A synergistic pretreatment strategy using tetrahydrofurfuryl alcohol (THFA) and ferric chloride (FeCl_3) was developed. The pretreatment conditions were systematically optimized via response surface methodology (RSM), with cellulose retention and lignin removal efficiency as evaluation parameters. The physicochemical properties and chemical structures of lignin in the pretreated solid residues and prehydrolysates were characterized. The effects of enzyme loading, substrate concentration, and additives on enzymatic hydrolysis efficiency were investigated. Furthermore, the effect of fed-batch process on enzymatic hydrolysis efficiency was investigated. The optimized pretreatment conditions (0.037 mol/L FeCl_3 , 62% THFA concentration, and 170°C with holding for 0 min) resulted in 93% cellulose recovery and 85% delignification efficiency. The analysis of materials revealed that the lignin content of pretreated ECOS was significantly reduced, with surface structural disruption, decreased thermal stability, reduced surface negative charge, and increased specific surface area. These variations of pretreated materials contributed to the enhanced enzymatic digestibility. Under conditions of 15% substrate concentration and 5 FPU/g dry substrate enzyme loading, the addition of PEG 10000 during 72-hour hydrolysis increased final glucose yield by 62%. The liquefaction time of pretreated ECOS was shortened, achieving a maximum glucose concentration of 69 g/L in the hydrolysate. The optimal fed-batch strategy improved yield by 0.7-fold compared to the initial batch process, achieving a maximum glucose concentration of 95 g/L in the hydrolysate. The processed material can be subsequently utilized as a carbon source for microbial lipid fermentation.

(4) Microbial lipid production using THFA- FeCl_3 pretreated ECOS hydrolysate was investigated. Microbial lipid production pretreated hydrolysate was achieved by yeast of *Rhodospiridium toruloides* using

enzymatic hydrolysate from THFA-FeCl₃ pretreated ECOS as the carbon source. The fermentation process of the yeast was first optimized with pure glucose. Then single factor experiments and response surface methodology (RSM) were employed to optimize the medium components of the fermentation. The results revealed that 70 g/L glucose, 0.75 g/L yeast extract, 2 g/L magnesium sulfate, and a carbon to nitrogen (C/N) ratio of 250:1 was the optimal conditions. With these conditions, it could finally yield 11.24±0.59 g/L biomass and 6.27±0.05 g/L lipids (64.11±2.73% lipid content). Based on the above optimization, 8.72±0.14 g/L biomass with 4.29±0.25 g/L lipids (48.91±0.36% lipid content) was achieved from the fermentation of ECOS enzymatic hydrolysate. The fatty acid composition of the microbial lipids resembles that of soybean oil. The optimized process demonstrates in this study represented a good example of a novel efficient bioconversion process of lignocelluloses to microbial lipids.

Yu Yanling (Biology and Medicine)

Supervised by Zhang Qin

KEY WORDS: *Camellia oleifera* shells, polysaccharide hydrogel, lignocellulose, pretreatment, microbial lipids

目 录

摘 要	I
ABSTRACT	IV
第 1 章 绪论	1
1.1 油茶果壳简介	2
1.1.1 油茶果壳利用现状	2
1.1.2 油茶果壳生物活性成分组分分析	2
1.2 木质纤维素	5
1.3 木质纤维素的预处理	6
1.3.1 物理预处理	6
1.3.2 酸预处理	7
1.3.3 深共熔溶剂预处理	8
1.3.4 有机溶剂预处理	8
1.3.5 生物预处理	9
1.4 微生物油脂制备	9
1.5 研究内容、意义和创新点	10
1.5.1 研究内容	10
1.5.2 研究意义	12
1.5.3 研究创新点	12
第 2 章 油茶果壳总多糖的提取及水凝胶制备	13
2.1 引言	13
2.2 实验材料	13
2.2.1 实验原料	13
2.2.2 实验试剂及设备	13
2.3 实验方法	13
2.3.1 油茶果壳的预处理	13
2.3.2 油茶果壳总多糖提取工艺的优化	14

2.3.3 油茶果壳总多糖的获得及纯化.....	14
2.3.4 油茶果壳总多糖的理化性质.....	15
2.3.5 油茶果壳总多糖的体外抗氧化.....	17
2.3.6 多糖水凝胶的制备.....	18
2.4 结果与讨论.....	18
2.4.1 单因素实验.....	18
2.4.2 正交实验结果分析.....	20
2.4.3 油茶果壳及油茶果壳多糖的活性成分分析.....	20
2.4.4 油茶果壳总多糖的体外抗氧化测定.....	21
2.4.5 多糖水凝胶性能检测.....	22
2.5 本章小结.....	24
第 3 章 水热联合白腐真菌 <i>Trametes sp.</i>LS-10C 预处理油茶果壳产糖	25
3.1 引言.....	25
3.2 实验材料.....	25
3.2.1 实验菌种.....	25
3.2.2 实验原料.....	26
3.2.3 培养基.....	26
3.2.4 实验试剂及设备.....	26
3.3 实验方法.....	26
3.3.1 水热预处理.....	26
3.3.2 水热预处理后油茶果壳特征官能团和纤维素结晶度.....	26
3.3.3 水热联合白腐真菌 <i>Trametes sp.</i> LS-10C 预处理	27
3.3.4 油茶果壳木质纤维素成分以及抑制物的测定.....	27
3.3.5 水热联合白腐真菌预处理后产的粗酶液酶活的测定.....	28
3.3.6 纤维素酶水解方法.....	29
3.4 结果与讨论.....	30
3.4.1 水热预处理后油茶果壳的组分分析.....	30
3.4.2 水热预处理后油茶果壳的预处理液分析.....	31
3.4.3 水热预处理前后特征官能团及纤维素结晶度分析.....	31
3.4.4 水热联合白腐真菌预处理油茶果壳组分分析.....	33

3.4.5 水热联合白腐真菌预处理后产的粗酶液的酶活分析.....	35
3.4.6 水热及水热联合白腐真菌预处理油茶果壳的酶水解.....	35
3.5 本章小结.....	37
第 4 章 四氢糠醇联合氯化铁预处理油茶果壳产糖	38
4.1 引言.....	38
4.2. 实验材料.....	39
4.2.1 实验原料.....	39
4.2.2 实验试剂及设备.....	39
4.3 实验方法.....	39
4.3.1 氯化铁-四氢糠醇预处理油茶果壳的方法	39
4.3.2 氯化铁-四氢糠醇预处理油茶果壳的优化	39
4.3.3 纤维素酶水解方法.....	40
4.3.4 纤维素酶吸附试验方法.....	41
4.3.5 木质素的提取和纯化方法.....	41
4.3.6 木质纤维素组分的测定方法以及抑制物检测.....	42
4.3.7 氯化铁-四氢糠醇预处理后油茶果壳的表征分析	42
4.3.8 油茶果壳木质素和四氢糠醇木质素的表征分析.....	42
4.4 结果与讨论.....	42
4.4.1 氯化铁-四氢糠醇的预处理条件的优化	42
4.4.2 预处理前后油茶果壳的表征分析.....	48
4.4.3 氯化铁-四氢糠醇的预处理前后的酶水解	51
4.4.4 球磨木质素和四氢糠醇木质素的表征分析.....	54
4.5 本章小结.....	58
第 5 章 油茶果壳酶解产物发酵制备微生物油脂	59
5.1 引言.....	59
5.2 实验材料.....	59
5.2.1 实验菌种.....	59
5.2.2 培养基.....	59
5.2.3 产油酵母培养.....	59
5.2.4 实验试剂及设备.....	60

5.3 实验方法.....	60
5.3.1 纯葡萄糖发酵产油脂培养基的优化.....	60
5.3.2 微生物生物量及油脂的提取.....	61
5.3.3 油茶果壳酶解产物发酵产微生物油脂.....	62
5.3.4 油茶果壳酶解产物发酵产微生物油脂成分分析.....	62
5.4 结果与讨论.....	62
5.4.1 碳源及氮源对圆红冬孢酵母生长的影响.....	62
5.4.2 纯葡萄糖培养基的单因素优化.....	63
5.4.3 纯葡萄糖培养基的响应面优化.....	64
5.4.4 油茶果壳酶解产物发酵制备微生物油脂.....	66
5.4.5 油茶果壳酶解产物发酵产微生物油脂成分分析.....	66
5.5 本章小结.....	67
第 6 章 结论与展望	68
6.1 结论.....	68
6.2 展望.....	69
参考文献	70
附录	82
攻读硕士期间学术论文发表情况	84
致谢	85

第 1 章 绪论

随着全球对能源的需求不断增加,石油、煤炭等不可再生能源因过度采集导致能源紧缺和环境污染。为了解决以上问题,中国提出了“碳达峰”与“碳中和”两个计划,以减少对不可再生资源的过度依赖,为降低温室气体排放提供了一条有效路径^[1]。其中生物质能源在实现“双碳”计划中起着至关重要的作用。生物质能源因具备环保、可持续、低碳等优点,是替代传统化石燃料的绿色能源。其中油茶果壳、玉米秸秆、小麦秸秆、稻草等农林加工废弃物以及城市垃圾、食品加工废料、餐厨垃圾等生物质能源可以通过燃烧、发酵、气化或厌氧消化等方式转化为清洁生物燃料(乙醇、生物柴油)^[2]。

在清洁生物燃料规模化时,生物柴油的即用性兼容现有设施与环保性能均高于生物乙醇、生物甲醇,在替代化石燃料上具有优异性。生物柴油是以动植物油脂(废弃食用油、棕榈油)或微生物油脂为原料,通过酯交换反应制备而成^[3]。植物油、废弃食用油因供应有限,不宜转化为生物柴油,而微藻、酵母和真菌等含油微生物产生的微生物油脂在生物柴油的生产被广泛提及。但是,高昂的发酵成本限制了它们的大规模生产^[4]。研究发现,利用生物质木质纤维素水解物^[5-6]生产微生物油脂不仅降低发酵成本,而且能形成从原料获取到油脂合成再到生物柴油生产的经济循环,有益于推动能源可再生与双碳目标的协同实现。油茶作为我国四大油料植物之一,易种植,含油量高,每年的茶籽产量超过 300 万吨^[7],在制备茶油过程中会产生大量加工废弃物,如油茶籽饼和油茶果壳,每年大约产生近 800 万吨油茶果壳^[8],但这些油茶果壳通常被填埋或焚烧,导致资源浪费和环境污染。因此,高效开发和利用大量茶油加工废料至关重要。油茶果壳中含有丰富的木质纤维素(>70 wt.%)和生物活性组分(多糖、单宁、皂素和黄酮等)^[9,10],其组分的资源化利用具有极大的市场前景。因此,聚焦于油茶果壳组分的分级分离及其高值化利用的技术开发,高效利用生物质资源不仅提升生物质综合利用价值还可持续为生物柴油生产提供原料。

油茶果壳活性组分高效提取以及木质纤维素组分分离及转化过程存在一定难度,例如茶果壳活性组分提取率低,在预处理过程中油茶果壳的木质素含量

高，组分选择性分离效率低、预处理试剂和高浓度酶量导致成本高以及预处理中产生的抑制物影响纤维素酶水解活性等技术经济性挑战^[11-13]。在生物质纤维多糖酶水解后的可发酵糖经发酵产微生物油脂的过程中，发酵条件影响着微生物油脂积累能力^[14]。本章节从油茶果壳组分分析、生物活性成分分离提取、木质纤维素预处理技术，以及微生物油脂制备等几个方面进行综述。

1.1 油茶果壳简介

1.1.1 油茶果壳利用现状

油茶(*Camellia oleifera* Abel.)属于灌木或小乔木，果实为卵圆形蒴果。我国是油茶的主要起源地，已有 2300 多年的种植历史。油茶籽油被称为“东方橄榄油”，其原因为油茶籽油含丰富的活性物质、维生素和油酸、亚油酸等不饱和脂肪酸^[15]，这些脂肪酸构成与橄榄油相近，具有多重生物活性，包括抑制氧化反应、对抗肿瘤生成、减缓机体老化进程以及降低心血管疾病风险等，被归类为功能性保健食品油^[16]。油茶籽油因其较高的营养价值和药用价值在健康油脂方面具有极大的市场前景。截至 2025 年，油茶林总面积达 1700 万亩，其中高产油茶林面积突破 800 万亩，茶油产能达到 44.2 万吨^[17]。

油茶主要由油茶果和油茶果壳两部分组成，油茶果壳在油茶中质量占比超过 50%^[18]。生产茶油的过程中会产生大量的废弃物，其中最主要的是油茶籽饼和油茶果壳，每年大约产生近 200 万吨油茶籽饼与 800 万吨油茶果壳^[8]，油茶果壳中含有丰富的木质纤维素(>70 wt.%)以及生物活性组分（多糖、单宁、皂素和黄酮等）。但是这些废弃的油茶果壳资源尚未被系统化利用，对于油茶果壳的处理采取简单填埋或焚烧产能。这不仅造成木质纤维素、生物活性物质等高价值成分的浪费，还加剧环境污染问题^[19]。因此，如何实现高效、经济地利用油茶果壳的活性成分及木质纤维素成为油茶果壳高值化利用的关键。

1.1.2 油茶果壳生物活性成分组分分析

在茶油加工过程中，油茶果壳是主要副产物，油茶果壳中除了木质纤维素还蕴含着多种生物活性成分，如黄酮、皂素、单宁和多糖等。本研究对油茶果壳高附加值活性成分研究有助于为油茶果壳组分的分级分离及其高值化利用提供技术指导。

1.1.2.1 黄酮

许多中草药的主要活性成分都含有黄酮，根据 DPPH 自由基清除能力的测定

可知,黄酮具有抗氧化活性。目前,油茶果壳中黄酮的提取主要以乙醇溶剂为主,超声波为辅等方法。周琛媛等人^[20]采用 65%浓度的乙醇, 60 °C下超声处理功率为 72 W, 油茶果壳中总黄酮的提取效率达到 6.98%。吴苏喜等人^[21]在不同溶剂对油茶蒲黄酮提取影响中,选择提取剂为 60%乙醇,其得率为 5.24%。研究发现,不同产地的油茶果壳含有的黄酮量是不相同的。谷睿等人^[22]利用 40%乙醇结合超声波提取不同产地的油茶果壳的黄酮,温度 63.5 °C及超声功率 452.4 W 提取 37.2 min,其黄酮提取率博白大果油茶(8.67%)高于普通油茶(4.96%)。刘昕等人^[23]喂小鼠槲子花黄酮,在小鼠负重游泳中发现黄酮具有抗疲劳作用。此外,黄酮可以抑制食用油脂氧化^[24]。

黄酮在油茶果壳中含量不高,常用提取方法得率低,对此,可以通过优化提取方法提高油茶果壳中黄酮的提取率或是提取纯度^[25]。

1.1.2.2 皂素

皂素是从油茶壳中提取的一类五环三萜类化合物,是一个由糖体、配基、糖醛酸和有机酸共同构成的复杂大分子物质。茶皂苷含有疏水和亲水基团,是天然非离子表面活性剂,具有优异的发泡、乳化、分散和润湿性能^[8,26]。近年来,茶皂苷的健康相关益处:抗菌抗炎、抗癌、降低血脂等功能性作用,受到越来越多研究人员的关注。油茶果壳皂素提取方法通常为水提法和有机溶剂法。袁成华等人^[27]采用水酶法提取茶皂素,其收率为 1.4%。有机溶剂提取得到的茶皂素高于水溶剂提取,张文婷等人^[28]通过乙醇提取法提取茶皂素,在单因素的基础上结合响应面法,得到提取茶皂素最优工艺:料液比 1:11.85 g/mL、提取温度 81.69 °C、时间 6.17 h、乙醇体积分数 56.69%,油茶果壳茶皂素提取率为 7.38%。郭永生等人^[29]采用乙醇提取茶皂素,其得率为 10.32%。

目前提取方法得到的粗提液中皂素纯度较低,皂素的纯化需通过大孔树脂吸附、柱层析等手段^[30],但是果壳中的色素与多糖易污染树脂导致纯化效率降低,不具备经济性。

1.1.2.3 单宁

油茶果壳中的单宁是一大类复杂多元酚类化合物,为油茶果壳次级代谢产物,具有独特的化学和生理活性。油茶果壳单宁可以抑制脂多糖诱导细胞的 NO 释放具有抗炎作用,多应用于化妆品中,例如,保湿、抗氧化、美白及延缓衰老等^[31]。杨小敏等人^[32]水提油茶果壳中的单宁,响应面最佳提取得率为 4.28%,其反应时

间为 26 min, 而张余华等人^[33]通过闪式提取法显著缩短了时间, 仅 3 min 的反应时间, 获得的单宁提取含量为 $0.039 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

单宁在栲胶的原料上的应用有利于油茶产业的全面发展。但是从油茶果壳中提取得到的单宁纯度与目前栲胶产品要求单宁纯度($>60\%$)有一定差距。因此, 单宁的利用还需优化油茶单宁的提取工艺, 以提高其纯度^[34]。

1.1.2.4 多糖

多糖是一类天然高分子多聚物, 其由醛糖或酮糖通过糖苷键连接形成。油茶果壳中多糖含量丰富, 是油茶果壳资源中极具开发价值的活性组分, 不同的提取方法得到的多糖含量不同, 朱志东等人^[35]通过对比实验, 分别利用超声-乙醇法和水提醇沉法提取油茶果壳多糖, 结果表明, 利用超声-乙醇提取法在提取效率上明显优于传统的水提醇沉法, 其多糖得率达到 5.4%。相似的, 舒斌斌等人^[36]采用水提醇沉结合柱层析纯化的综合工艺制备油茶蒲多糖, 通过多步骤的纯化处理, 得到多糖产品纯度为 87.40%, 多糖得率仅为 2.3%。吴静等人^[37]探究了甲醇、乙醇、丙酮等不同溶剂对油茶果壳多糖的提取得率, 其中 80% 的乙醇提取效果最佳。油茶果壳中多糖的含量与饼粕中多糖含量相近, 两者均为茶油加工过程中的副产物, 是油茶多糖提取的重要原料来源^[34]。因此, 如何高效制备油茶果壳多糖并高值利用是实现油茶果壳资源化利用的关键。

油茶果壳多糖其抗氧化、抗炎镇痛、抗肿瘤、降血脂、抗凝血等药理作用已成为研究热点^[38]。例如, Chen 等人^[39]发现不同部位的油茶果壳多糖抗氧化性不同, 多糖的抗氧化性主要通过减少活性氧的产生来降低细胞凋亡水平, 在 $600 \mu\text{g/mL}$ 浓度下油茶果壳最高的细胞活力为 61%。

此外, 多糖独特的分子构象使其具有水溶性和成膜性, 可以成为功能性食品以及生物制药包材的理想载体。多糖材料开发和利用的进展前景广阔, 在组织工程领域提供了突出的应用。多糖水凝胶可促进伤口愈合和抗菌活性^[40]。在农产业中用于控制营养物质释放的多糖水凝胶, 可以最大限度地减少营养物质的浸出和径流^[41]。目前天然水凝胶材料, 如壳聚糖、透明质酸和明胶, 多样性有限, 药效较低。而多糖水凝胶因其生物相容性、生物降解性、生物活性和可用性在慢性伤口愈合上有优势。但是多糖水凝胶在营养物质流失方面存在缺陷, 从而限制了它们的潜在应用^[42]。因此, 对如何增强多糖水凝胶结构紧密性和保留其营养物质的研究至关重要。

1.2 木质纤维素

表 1-1 不同果壳类农林加工废弃物中木质纤维素含量

Table 1-1 Lignocellulose content in various shell-type agricultural and forestry processing wastes

固体废弃物	木质纤维素 (wt.%)			文献
	纤维素	半纤维素	木质素	
花生壳	36	16	25	[46]
椰子壳	32	20	40	[47]
棕榈壳	31	31	38	[48]
核桃壳	24	27	45	[49]
油茶果壳	16	18	39	[50]
杏仁壳	35	11	45	[49]

纤维素、半纤维素和木质素三者紧密结合组成三维稳定结构，形成一个整体为木质纤维素^[43]。木质纤维素在地球上属于廉价、可再生和环保的能源的原材料，木材和农作物及其废弃物副产品含量丰富，其平均贡献量占生物能源总量的64%^[44]。其中木材、农作物及加工废弃物（稻草秸秆、花生壳、油茶果壳）、林业及加工废弃物和城市固体废弃物的有机部分都属于木质纤维素生物质范畴^[45]。表 1-1 为不同果壳类农林加工废弃物中木质纤维素含量(wt.%)。其中壳类的纤维素与半纤维素占 50 wt.%以上，木质素占 30-50 wt.%。因此，有效利用壳类中的纤维素、半纤维素以及木质素的去除是实现木质纤维素生物质资源化和高值化的关键。

木质素将纤维素与半纤维素紧密包裹（图 1-1 所示），木质素结构单元由复杂的苯基丙烷构成，这些单元由 C-C 键和 C-O-C 键相互连接^[51]，其化学键水解困难，降低了木质纤维素生物质在生物能源转化过程中的效率与有效性。

纤维素是一种稳定性最强的聚合物^[52]。在生物质中纤维素资源丰富，纤维素占木质纤维素近一半。纤维素具有结晶和非晶结构，大部分纤维素是组装良好的结晶，而其余的是无定形的。结晶纤维素难分解，无定形纤维素更适合降解^[53]，结晶度加剧了降解的难度。半纤维素约占木质纤维素生物质的 20-35%^[54]。与纤维素不同，半纤维素由异质聚合物制成，主要由各种糖类（如戊糖、己糖和糖醛酸）的侧链组成。木质纤维素中最难降解的是木质素，是一种无定形的复杂芳香族聚合物^[55]。酚类单体的交联使木质素成为复杂的大分子，木质素的复杂和坚固的性质是微生物引起的植物细胞壁降解和氧化应激的屏障。木质素通常与半纤维素通过酯键形成木质素-碳水化合物复合物(Lignin Carbohydrate Complexes;

LCCs)^[56]。LCCs 的组成十分复杂，未经处理的木质纤维素难以利用酶及微生物进行水解，预处理对于解构木质素的抗性层至关重要^[8]。因此，油茶果壳木质纤维素定向解构是实现木质纤维素酶水解高效产糖的关键。

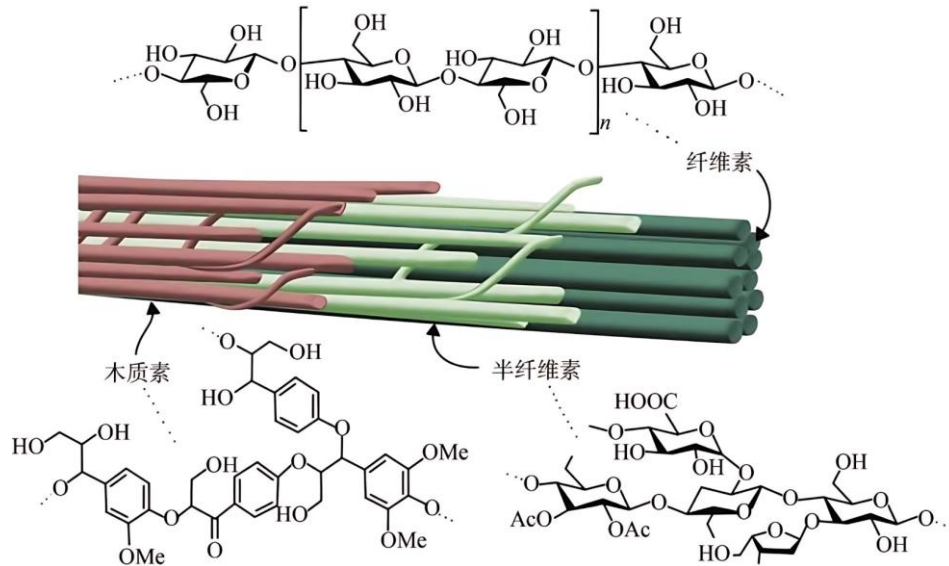


图 1-1 木质纤维素模型图^[51]

Figure 1-1 Lignocellulose model diagram

1.3 木质纤维素的预处理

木质纤维素的预处理可以减少木质纤维素后续转化过程中有效生物质转化的阻力。有效的预处理有益于后续酶水解、减少抑制酶糖化的副产物的产生以及减少污染和资源浪费^[43]。目前，已经有多种去除木质素的预处理方法。传统预处理方法如物理、酸性和有机溶剂预处理，以及绿色新兴技术（微生物、深共熔溶剂、蒸汽爆炸、超临界流体），这些预处理方法已被有效应用于木质素的脱除，以改善生物质糖化效率^[57]。

1.3.1 物理预处理

物理预处理主要是通过机械作用将生物质进行简单的剪切、粉碎、球磨、压缩、微波和超声处理等，在减少或改变木质纤维素生物质的表面积的作用下，增加了纤维素酶的可及性。这些物理预处理方法的综合应用，为后续的生物转化或联合化学处理奠定了良好的物理基础，达到提高木质纤维素生物质的利用效率的目的。然而，物理预处理存在研磨、压榨时能耗高，无化学试剂添加时预处理效果低，且局限于草本生物质等问题。目前，水热、酸或有机溶剂预处理与物理预处理相结合是解构 LCCs 的常用方法^[58]。

近年来,微波、超声波、电子束、脉冲电场、高静水压力和高压均质等新型技术在木质纤维素预处理上被应用^[59]。其中微波、超声波水热预处理利用去除更多半纤维素^[60]。但是这些技术新设备存在投资成本高的问题。木质纤维素生物质预处理中的商业应用中新兴技术的使用需要进一步的可行性研究^[59]。

1.3.2 酸预处理

水热预处理符合生物质精炼的低成本和环保要求,其对木质素脱除效果较弱,主要溶解半纤维素并产生低聚糖、单糖等成分,在生产生物基化学品、燃料和材料具有优势^[61]。随着预处理的严重程度增加,其抑制物成分不断累积抑制后续的纤维素酶水解与发酵。

盐酸、硫酸、硝酸和乙酸属于常用酸预处理催化剂。稀酸在水解过程中释放的氢离子对木质纤维素结构的定向攻击,氢离子通过质子化作用于纤维多糖中的糖苷键,特别是半纤维素,被解聚为木糖等可溶性单糖。然而,对于高木质素结构的生物质来说,通常需要严格的预处理条件才能去除木质素和得到易被纤维素酶水解的纤维素^[62]。预处理中苛刻的条件(高温、高酸浓度、处理时间长)会导致抑制产物副产物的形成,例如,葡萄糖会被降解成5-羟甲基糠醛,半纤维素将会被降解为糠醛、甲酸和乙酸^[13]。还会使原本致密的纤维素微纤丝结构因非结晶区的水解而崩塌,导致纤维素聚合度下降和葡萄糖得率损失,而未充分解构的木质素阻隔了纤维素酶对底物的有效接触。酸预处理另一缺点是反应器成本高,酸具有腐蚀性和毒性,对反应设备的耐酸性有要求^[63],预处理后得到的水解物中的酸难以去除,存在处理成本高的难题^[62]。

研究学者发现添加后路易斯酸,其在显著降低的预处理温度或时间的基础上,还保留了大部分纤维素组分。路易斯酸似乎是传统酸的有前途的替代品^[64]。因为路易斯酸具有腐蚀性更小和更环保等优点,氯化铁、氯化铝、氯化锌均为路易斯酸。Hou 等人^[65]利用水热联合 FeCl_3 分离杨树半纤维素,其分离度从 34%提高了至 77%。路易斯酸在水热预处理过程中,虽然能有效破坏半纤维素的 β -1,4-糖苷键并促进其水解,但木质素在酸性高温环境下易发生二次缩合反应。例如,利用 AlCl_3 处理木材后,木质素的特征峰强度反而增强,表明酸性 AlCl_3 在一定程度上促进木质素的缩合反应,通过 C-C 键形成致密的交联结构,使木质素脱除效率下降^[66]。因此,路易斯酸在预处理半纤维素上存在优势,但在木质素脱除效率较低,还需要结合其他预处理方法以提高木质素脱除效率。

1.3.3 深共熔溶剂预处理

深共熔溶剂(Deep Eutectic Solvent; DES)是特殊类型的离子液体,被定义为两种或多种固体的液体混合物,它们在低于其纯化合物的熔点(即共晶点)的温度下结合形成液体^[67]。与其他离子液体相比,它们更便宜、毒性更小且生物相容性更强^[68]。酸性 DES,如乳酸、苹果酸和草酸基溶剂,对各种生物质原料的木质素脱出率特别有效(>90%)^[69]。Shen 等人^[70]通过用 ChCl-乳酸预处理桉树,实现了高于 80%的木质素脱出率和 94%的葡萄糖产率。Xia 等人^[71]在 ChCl-甘油中引入金属氯化物水合物形成一种三组分 DES 体系。与典型的二元 DES,如 ChCl-甘油相比,用三元 DES 预处理拥有更高的木质素脱除率。DES 预处理在木质素分离上具有明显效果,且不会产生对后续发酵过程不利的抑制剂^[72]。但是,DES 的黏度较高,会降低 DES 接触物料的效率,需依赖超声辅助或机械搅拌,通常伴随更高的能量消耗^[73, 74]。

1.3.4 有机溶剂预处理

有机溶剂预处理在良好的组分选择性、卓越的全纤维素水解性和减少微生物抑制产生方面具有显著优势,通常是由于溶剂易于回收和减少污染排放^[75],其中,多元醇在木质素溶解上具有潜力。

低沸点醇是早期开发的用于木质纤维素生物质制浆的有机溶剂,例如,甲醇和乙醇。Oliva 等人^[76]利用甲醇预处理将榛子皮的生物甲烷潜力提高了 18 倍,但是单比较累积甲烷产生而言,甲醇预处理对废咖啡渣和杏仁壳无效果,甲醇在预处理顽固性的木质素上有一定难度。甲醇在低温下具有极高的易燃易挥发性^[77],而且甲醇的毒性和低沸点使其存在安全问题。Fan 等人^[78]利用乙醇预处理杨木,其固体保留率为 67%,木聚糖去除率为 49%以及 57%的木质素脱除率。在乙醇中添加 10% NaOH,木质素脱除率为 86%,但是木聚糖去除率仅为 23%,杨木中的半纤维素未脱出完全且有固体保留率仅为 60%。乙醇预处理虽然有较高木质素脱除率,但不能有效脱除半纤维素。

高沸点醇对木质纤维素中的木质素有较好的溶解作用,可以有效地将生物质的木质素脱除,实现木质纤维素组分资源化利用,如乙二醇、甘油、四氢糠醇等。Wei 等人^[79]利用盐酸-乙二醇预处理甘蔗渣脱除的半纤维素和木质素为 99%和 67%,其葡萄糖回收率优于甘蔗渣的碱处理。甘油预处理分解过程选择性地解构 LCCs 并改变溶解成分的结构,这有助于保护成分免受过度降解并产生较少的抑

制剂成分^[80]，甘油的无毒性使其低成本用于 LCCs 的预处理^[81]。四氢糠醇作为一种优良的木质素溶解溶剂，Wang 等人^[82]利用对甲苯磺酸辅助 70%四氢糠醇预处理竹子，其组分中 91%的木质素被脱除，半纤维素几乎完全去除，且产生的抑制物较少。同时，高沸点有机溶剂可以在不产生废液和废气的情况下进行回收，实现循环利用。

1.3.5 生物预处理

生物预处理（白腐真菌、褐腐真菌等）所产生的木质素分解酶系（木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶及漆酶）与纤维素酶共同发挥协同效应，可以定向破坏木质纤维原料中复杂的立体网状构型。该方法具有显著的生态优势：不仅毒性低，对环境友好，而且避免了抑制剂对后续工艺的影响^[30, 43]。

白腐真菌因其在木质素降解中的高选择性而成为真菌预处理的首选^[83]，也是目前唯一一类能在纯培养中将木质素彻底降解为二氧化碳和水的微生物。白腐真菌分泌的木素降解酶系主要包括木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶^[84]。Liu 等人^[83]推测菌丝可以直接穿透初级和次级壁进入秸秆腔，从而降解木质素。Wang 等人^[85]利用白腐菌和棕腐菌预处理玉米芯，其纤维素转化率分别提高了 29.9%，但是需要近 30 天的处理时间。为缩短处理时间以及提高酶解效率，将单一的生物预处理和其他预处理工艺相结合^[87]。例如，磷酸和白腐菌联合处理使乙醇产率从 27.9%提高到 62.8%^[88]。Fenton 预处理结合桦褐孔菌处理后的玉米秸秆和油菜秸秆的还原糖产量均有提高了 3 倍，其发酵时间也缩短到 10 天^[89]。

因此，生物和不同预处理方法相结合可能会产生协同效应并优化单独预处理过程的缺陷，达到缩短处理时间并提高纤维素酶的可及性^[86]。

1.4 微生物油脂制备

微生物油脂作为生物柴油生产的重要原料，因其可持续性和高效性受到广泛关注。当微生物合成并储存油脂量超过细胞干重 20%时，可以被认定为产油微生物，其中以酵母和藻类为主要代表。虽然藻类的培养简单且脂质积累能力强，但是其生长过程对光照条件具有特定要求，同时需要较大的培养空间，对于碳源的利用局限于二氧化碳。与之形成对比的是酵母类微生物，其不仅可以实现超过 75%的脂质积累率，还展现出对多种碳源的高效利用特性，培养周期较短，其微生物油脂生产具有可持续性^[90-92]。

圆红冬孢酵母(*Rhodotorula toruloides*)能生产类胡萝卜素和酶，圆红冬孢酵母

可以积累超过 70%干细胞重量的细胞内脂质和细胞脂质结构中的胡萝卜素^[93]。圆红冬孢酵母脂肪积累中氮元素的限制对于促进脂肪积累的作用最为显著^[94]。Leiva-Candia 等人^[95]对产油酵母在农林废弃物转化为生物柴油中的应用前景进行了分析,研究发现这类微生物通过发酵处理农业残余物生成微生物油脂为可持续再生能源产生提供了创新思路。

以油茶果壳、小麦秸秆、米糠和其他植物废弃物等木质纤维素生物质可以作为碳源用于微生物发酵。因圆红冬孢酵母的底物代谢物质广泛,生物质木质纤维素生物质均可用于圆红冬孢酵母生长发酵并生产脂肪酸,而脂肪酸可以转化为各种生物燃料^[96]。Wu 等^[97]通过改造成功获得了一株耐高温的圆红冬孢酵母。其菌株的生物量和油脂含量最高时的温度在 37 °C,提升了亚油酸含量。杨航^[98]研究发现圆红冬孢酵母发酵合成的类可可脂其结构与可可脂其相似,为微生物油脂转化为生物柴油的研究提供了一种研究思路。同属酵母相比,圆红冬孢酵母能够产生胡萝卜素和脂肪酸,且该菌油中独特的脂肪酸组成,使其微生物油脂在工业化生产生物柴油的制备中用于巨大潜力^[96, 99, 100]。

1.5 研究内容、意义和创新点

1.5.1 研究内容

(1) 油茶果壳总多糖的提取及水凝胶制备

对油茶果壳中总多糖进行单因素优化,选择提取时间,提取温度,料液比以及乙醇浓度为优化条件,在单因素的基础上进行正交实验。将提取工艺优化好的醇提的油茶果壳用于后续预处理研究。获取乙醇提取液中的多糖并进行油茶果壳中总多糖的体外抗氧化活性测定(DPPH 及 ABTS⁺自由基清除能力)及多糖水凝胶的制备,并对油茶果壳多糖水凝胶与不同多糖水凝胶进行了溶胀率与包载率的性能检测。

(2) 水热联合白腐真菌 *Trametes sp.* LS-10C 预处理油茶果壳产糖

研究了水热预处理以及水热联合白腐真菌 *Trametes sp.* LS-10C 预处理醇提后油茶果壳的氯化铁浓度、预处理温度和时间变量,探究了不同预处理条件对油茶果壳的纤维素、半纤维素、木质素的选择分离性,以及酶水解效率。通过水热预处理中抑制物以及预处理前后油茶果壳特征官能团以及纤维素结晶度的变化以研究该处理体系对水热联合白腐真菌 *Trametes sp.* LS-10C 预处理醇提后油茶果壳的影响。

(3) 四氢糠醇联合氯化铁预处理油茶果壳产糖

通过单因素优化,选择提取时间、提取温度、四氢糠醇和氯化铁浓度为优化条件,通过响应面方法并确定最佳预处理条件。然后,对醇提后的油茶果壳和预处理液中回收的木质素的化学结构进行表征分析,用电子扫描显微镜、物理吸附仪等仪器对预处理前后的油茶果壳的理化性质进行表征分析,为后续的酶水解提供理论依据。随后,以葡萄糖产率为指标,考察酶载量、基质浓度和添加剂对油茶果壳在低酶载量和高浓度基质条件下酶水解的影响。同时,探究了不同添加剂以及 PEG10000 添加量对酶水解率的影响,最后,探究了分批补料对预处理后油茶果壳高浓度酶水解的影响,将获得的可发酵糖作为碳源用于酵母发酵产微生物油脂。

(4) 油茶果壳酶解产物发酵制备微生物油脂

以四氢糠醇联合氯化铁预处理后油茶果壳的酶解液为碳源,利用圆红冬孢酵母发酵生产微生物油脂。首先,以纯葡萄糖作为酵母产油脂的碳源对进行优化。考察了碳源种类和氮源种类对酵母生长的影响,其次通过单因素实验依次考察酵母发酵培养基中的组分对酵母生长的影响。随后,基于上述优化后的发酵培养基,以油茶果壳酶水解液为碳源用于酵母发酵生产微生物油脂。本论文主要的技术路线如图 1-2 所示。

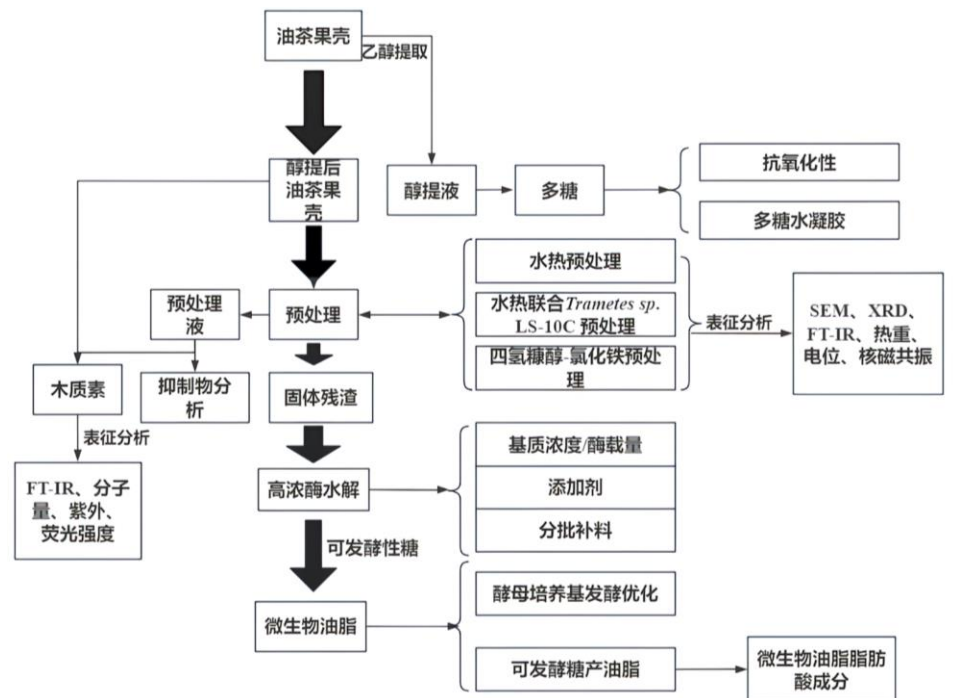


图 1-2 本研究技术路线

Figure 1-2 The technical route of this study

1.5.2 研究意义

油茶是我国重要的粮油经济作物。目前，我国油茶种植面积已经超过 6700 万亩，同时 2022 年中央一号文件提出，支持扩大油茶种植面积并改造提升低产林，使得油茶产业蓬勃兴起，在市场上具有较好的前景^[101]。油茶果壳占油茶比超过 50%^[102]，随着茶油加工业的蓬勃兴起，大量油茶果壳堆积，研究发现油茶果壳含有大量的木质纤维素(>70 wt.%)以及生物活性组分（多糖、单宁、皂素和粗蛋白等），因油茶果壳利用率低（填埋或焚烧），油茶果壳资源被浪费，如何有效利用油茶果壳是亟须解决的问题。本文以油茶果壳为原料，对油茶果壳的组分进行分级分离及其高值化利用进行研究。将油茶果壳中的总多糖进行提取并制备多糖水凝胶，将醇提后的油茶果壳采用水热联合白腐真菌 *Trametes sp.* LS-10C 及四氢糠醇联合氯化铁预处理，探究了木质纤维素的组分分离情况，预处理后的油茶果壳的高浓酶水解以及微生物油脂的发酵生产，为油茶果壳的资源化和高值化利用提供技术支持。

1.5.3 研究创新点

（1）本论文实现了油茶果壳组分的分级分离以及全组分综合利用。

（2）本论文开发了氯化铁联合四氢糠醇预处理方法。例如，果壳通过预处理实现高纤维素保留率与高木质素脱除率，并分析了 FeCl_3 催化木质纤维素的解聚机理，酶解产糖高，且预处理液中回收的木质素具有优异的紫外吸收能力和荧光强度，为果壳类高效预处理提供新思路。

（3）预处理后油茶果壳酶解产物获得的可发酵糖用于酵母发酵产微生物油脂，其油脂脂肪酸成分接近于大豆油，可为生物柴油的生产提供可持续性。

第 2 章 油茶果壳总多糖的提取及水凝胶制备

2.1 引言

随着油茶种植年产量的增加，油茶果壳占油茶重量的 50%，每年都会产生大量的油茶果壳，这些果壳被用于简单填埋或焚烧方式处理。据报道，油茶果壳中含有多种生物活性成分，如多糖、单宁、黄酮、皂素等功能性物质，其中多糖有助于降低血压和胆固醇、对抗癌症和缓解胃肠道疼痛等作用^[103-105]。油茶果壳多糖中半乳糖醛酸、半乳糖、鼠李糖、甘露糖和木糖是其具有抗氧化性的关键^[39]。

目前，在油茶果壳总多糖提取中通常采用水热提取法，水提法操作简便，成本消耗低，但是多糖提取率较低，其原因可能是油茶总多糖中除了中性多糖外还有酸性多糖。油茶果壳细胞壁结构紧密，水提法仅能提出中性多糖，而酸性多糖仍保留在油茶果壳中^[10]。乙醇可以破坏油茶果壳的细胞壁，促使酸性多糖溶解，可用于水提多糖的壳类生物物质，且在乙醇提取法中乙醇可以回收再利用。

本研究目的为分级分离油茶果壳的组分并加以利用。本章节主要在分离油茶果壳中活性成分并将回收多糖成分，比较了不同条件下乙醇提取油茶果壳中总多糖的效果，并优化提取工艺，将提取得到的油茶果壳多糖进行了水凝胶制备，对比添加不同种类多糖对水凝胶的影响，探究多糖水凝胶的溶胀率和包载率性能。

2.2 实验材料

2.2.1 实验原料

油茶果壳由湖南省木本油资源利用国家重点实验室供应。

2.2.2 实验试剂及设备

所用试剂、仪器见附录表 1、2。

2.3 实验方法

2.3.1 油茶果壳的预处理

油茶果壳经水洗后置于 105 °C 下烘干至恒重，然后粉碎机粉碎并筛分过 20-40 目。油茶果壳加入乙醇溶液于磁力水浴锅中加热，提取油茶果壳中的多糖至乙醇溶液中，收集滤渣水洗和烘干备用。油茶果壳总多糖醇提液用于提取总多糖，

乙醇提取后的油茶果壳作为后续预处理研究的原料。

2.3.2 油茶果壳总多糖提取工艺的优化

2.3.2.1 单因素实验设计

以 10 g 粉碎的油茶果壳为基准, 固定其他因素及相应水平: 提取时间 1.5 h, 料液比 1:20 g/mL 和乙醇浓度 80%, 考察不同提取温度 (55, 65, 75, 85 和 95 °C) 对提取液多糖得率的影响, 每组重复 2 次。

以 10 g 粉碎的油茶果壳为基准, 固定其他因素及相应水平: 提取温度 75 °C, 料液比 1:20 g/mL 和乙醇浓度 80%, 考察不同提取时间 (0.5, 1, 1.5, 2 和 2.5 h) 对提取液多糖得率的影响, 每组重复 2 次。

以 10 g 粉碎的油茶果壳为基准, 固定其他因素及相应水平: 提取温度 75 °C, 提取时间 1.5 h 和乙醇浓度 80%, 考察不同提取料液比 (1:6, 1:8, 1:10, 1:12 和 1:15 g/mL) 对提取液多糖得率的影响, 每组重复 2 次。

以 10 g 粉碎的油茶果壳为基准, 固定其他因素及相应水平: 提取温度 75 °C, 提取时间 1.5 h 和料液比 1:20 g/mL, 考察不同乙醇浓度 (55, 65, 75, 85 和 95 %) 对提取液多糖得率的影响, 每组重复 2 次。

2.3.2.2 正交实验设计

根据单因素实验, 采用四因素三水平法对油茶果壳总多糖的提取条件进行正交设计。如表 2-1 所示, 选用正交试验表进行 $L_9(4^3)$ 正交试验, 以多糖得率作为指标, 每种组合重复 2 次。

表 2-1 油茶果壳总多糖的提取的正交实验设计表

Table 2-1 Orthogonal experimental design table for the extraction of total polysaccharides from *Camellia oleifera* shells

水平	A 时间/h	B 温度/°C	C 乙醇浓度/%	D 料液比/g/mL
1	1	65	60	1:8
2	1.5	75	70	1:10
3	2	85	80	1:12

2.3.3 油茶果壳总多糖的获得及纯化

2.3.3.1 油茶果壳总多糖的获得

油茶果壳乙醇提取液在 4 °C 下离心 10 min (8000 r/min) 后, 弃去沉淀部分, 用旋转蒸发器将乙醇提取液浓缩到原体积的 1/10, 浓缩液中加入 4 倍体积的无水乙醇, 在 4 °C 下过夜。乙醇处理后, 收集沉淀物并将其溶解, 溶解液用 Sevag 法

的方法除去蛋白质，最后冷冻干燥得到油茶总多糖^[106]。

2.3.3.2 油茶果壳总多糖的脱色

使用氨水将多糖溶液的酸碱度调节至 pH 值约为 8.0，随后缓慢滴入 10%浓度为 30%的 H_2O_2 ，并在 50 °C 恒定温度下保温 2 h^[107]，用于油茶果壳的抗氧化性测定。

2.3.4 油茶果壳总多糖的理化性质

2.3.4.1 多糖标准曲线的绘制和回归方程的确定

采用苯酚-硫酸法^[108]，准确称取 250 mg 葡萄糖于 250 mL 容量瓶中，用蒸馏水定容，得到 1 mg/mL 的葡萄糖标准液。取 1 mL 不同浓度葡萄糖（0.02, 0.04, 0.06, 0.08 以及 0.1 mg/mL）于玻璃试管中，加入 2 mL 水，摇匀后加入 1 mL 5% 苯酚溶液，混合均匀后，在冰水浴里加入 5 mL 浓 H_2SO_4 ，摇匀后置于沸水中反应 15 min，随后放入冰水浴中冷却至室温，以吸光度为纵坐标，不同浓度的葡萄糖溶液为横坐标，在 490 nm 处测定吸光度。实验数据经处理后，获得标准曲线图（图 2-1a），用于后续多糖含量测定。

样品中多糖含量的测定：为定量分析样品中的多糖组分，取 1 mL 油茶果壳醇提液进行实验，实验操作步骤与前述方法一致。待反应终止后，于 490 nm 波长下进行吸光度检测，利用标准曲线计算反应体系中多糖含量。

2.3.4.2 黄酮标准曲线的绘制和回归方程的确定

准确称取 10 mg 芦丁于 100 mL 容量瓶中，用乙醇定容。取 0.0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 0.9, 1.2, 1.4, 1.6 和 1.8 mL，依次放入 10 个 10 mL 规格的容量瓶中，均加入 1% AlCl_3 溶液 1 mL，用无水乙醇定容^[109]，黄酮标准曲线见图 2-1b。

样品中黄酮含量的测定：为定量分析样品中的黄酮组分，取 1 mL 油茶果壳醇提液，参照前述实验流程进行处理，待显色反应完成后，在 410 nm 下进行吸光度值测定，利用标准曲线计算反应体系中黄酮含量。

2.3.4.3 单宁标准曲线的绘制和回归方程的确定

在 50 mL 容量瓶中加入 5 mg 没食子酸对照品，用蒸馏水溶解并定容，得浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$ 的没食子酸标准液。取 1 mL 不同浓度没食子酸（0.2, 0.4, 0.6, 0.8 以及 1 mg/mL）于容器中，加入 10% 福林酚试剂 5 mL，摇匀静置 5 min，再加入 7.5% 碳酸钠溶液 4 mL，摇匀后置于避光处反应 1 h，吸光度的检测波长为 765 nm^[110]。单宁标准曲线见图 2-1c。

样品中单宁含量的测定：为定量分析样品中的单宁组分，吸取 1 mL 油茶果壳醇提液，后续操作方法同上，反应结束后，在 765 nm 处测定其吸光度。利用标准曲线计算反应体系中单宁含量。

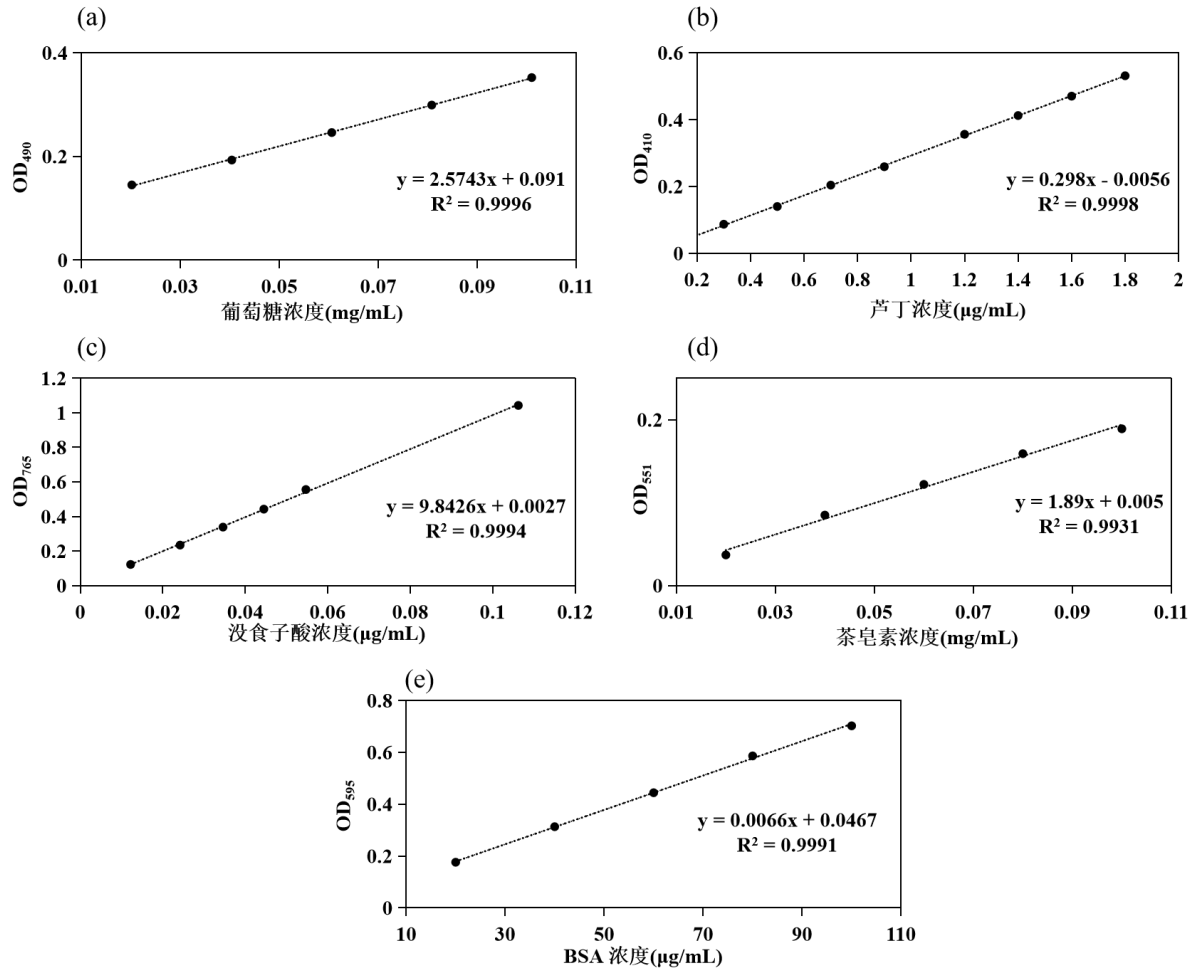


图 2-1 标准曲线(a)葡萄糖, (b)黄酮, (c)单宁, (d)皂素以及(e)BSA

Figure 2-1 Standard curve (a) glucose, (b) flavonoids, (c) tannins, (d) saponins and (e) BSA

2.3.4.4 茶皂素标准曲线的绘制和回归方程的确定

准确称取茶皂素标准品 25 mg，在 25 mL 容量瓶中利用 80%乙醇溶解获得 1 g/L 的茶皂素标准溶液。取 0.5 mL 不同浓度茶皂素（0.2，0.4，0.6，0.8 以及 1 mg/mL）于玻璃试管中，吸取 0.5 mL 的 8%香草醛乙醇溶液，将混合物置于冰水混合物中，加入 4 mL 77%硫酸溶液，摇匀于 60 °C 恒温水浴锅中加热 15 min，然后于冰水浴中冷却 10 min，最后在 551 nm 处测定吸光度^[11]，茶皂素标准曲线见图 2-1d。

样品中茶皂素含量的测定：精确吸取 1 mL 油茶果壳醇提液，后续操作方法同上，利用标准曲线计算反应体系中茶皂素含量。

2.3.4.5 蛋白量的测定方法

蛋白含量根据考马斯亮蓝法进行外标定量测定^[112]，以牛血清白蛋白 (Bovine Serum Albumin; BSA) 标准样品，取 0.5 mL 不同浓度 BSA (20, 40, 60, 80 和 100 $\mu\text{g/mL}$) 于玻璃试管中，加入 2.5 mL 考马斯亮蓝，混合均匀后于波长 595 nm 下测定标准样的吸光度，根据 BSA 的不同浓度及其对应吸光度绘制标准曲线 (图 2-1e)。

样品中蛋白含量的测定：精确吸取 1 mL 油茶果壳醇提液，后续操作方法同上，反应结束后，在 595 nm 处测定其吸光度。利用标准曲线计算反应体系中蛋白质含量。

2.3.5 油茶果壳总多糖的体外抗氧化

2.3.5.1 DPPH 清除能力的测定

根据唐敏^[113]的研究方法，通过 DPPH 自由基清除实验评估多糖的抗氧化活性。首先，配制不同梯度 (0.3, 0.6, 0.8, 1.0 以及 1.5 mg/mL) 的油茶果壳总多糖及抗坏血酸溶液，以 0.40 mmol/L 的 DPPH-乙醇为反应体系。精确吸取 20 μL 待测样品与 0.18 mL DPPH-乙醇溶液混合于 96 孔板中，充分混匀后置于暗处反应 30 min，随后在 517 nm 波长下检测吸光值。以抗坏血酸作为阳性对照，通过以下计算公式确定样品的 DPPH 自由基清除效率：

$$\text{DPPH 清除率}(\%) = [1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0}] \times 100 \quad (2-1)$$

式中 A_0 为蒸馏水与 DPPH 溶液反应后的吸光值； A_1 为多糖液/抗坏血酸与 DPPH 溶液反应后的吸光值； A_2 为油茶果壳总多糖液/抗坏血酸与蒸馏水混合后的吸光值。

2.3.5.2 ABTS⁺清除能力的测定

根据刘丹^[114]的研究方法改进，对油茶总多糖的 ABTS⁺自由基清除能力的测定。首先配制不同梯度 (0.3, 0.6, 0.8, 1.0 以及 1.5 mg/mL) 的总多糖及抗坏血酸溶液，ABTS⁺溶液用无水乙醇稀释至于 734 nm 处吸光值为 0.70 左右。吸取 180 μL 的 ABTS⁺溶液和 20 μL 待测液于 96 孔板中，摇匀后在暗处反应 6 min，734 nm 处测定吸光度。以抗坏血酸作为对照组。按照公式计算 ABTS⁺清除率：

$$\text{ABTS}^+ \text{清除率}(\%) = [1 - \frac{(A_1 - A_2)}{A_0}] \times 100 \quad (2-2)$$

式中 A_0 为蒸馏水与 ABTS⁺溶液反应后的吸光值； A_1 为油茶果壳总多糖液/

抗坏血酸与 ABTS⁺溶液反应后的吸光值；A₂ 为油茶果壳总多糖液/抗坏血酸与蒸馏水混合后的吸光值。

2.3.6 多糖水凝胶的制备

2.3.6.1 制备方法

按 Liu^[115]等人的研究方法，3%壳聚糖乙酸溶液与 3%柠檬酸溶液以 1:1 的体积比混合，并加入等体积且不同浓度（0，1，2，3 以及 4 mg/mL）的油茶果壳多糖溶液，搅拌均匀后置于 -20 °C 低温环境进行过夜冷冻处理。待样品在室温条件下完全解冻后，即为多糖水凝胶。空白水凝胶制备采用上述实验方法进行操作，以等量去离子水替代多糖溶液。选取黄原胶，微晶纤维素，羧甲基纤维素以及果胶多糖制备水凝胶，采用上述相同的实验方法进行操作，多糖浓度为 2 mg/mL，水凝胶在冷冻干燥机(-47 °C)中冻干 48 h。

2.3.6.2 油茶果壳多糖水凝胶的性能检测

(1) 油茶果壳多糖水凝胶的溶胀度性能

根据寇先勇等人^[116]的研究方法，取冷冻干燥的水凝胶样品称重，记为 m_1 ，置于 37 °C 的 PBS 缓冲液(pH 7.4)中 24 h 后，将水凝胶表面的水分擦净，进行称重记为 m_2 。溶胀率的计算公式如下：

$$\text{溶胀率}(\%) = \frac{m_2 - m_1}{m_1} \times 100 \quad (2-3)$$

(2) 油茶果壳多糖水凝胶的包载率性能

将冻干后的油茶果壳多糖水凝胶，浸泡于 10 mL 去离子水中，24 h 后取出，采用苯酚-硫酸法测定浸泡液的多糖含量。油茶果壳多糖水凝胶包载率的计算公式如下：

$$\text{包载率}(\%) = \frac{M_1}{M} \times 100 \quad (2-4)$$

式中 M 为投入的油茶果壳多糖质量； M_1 被水凝胶包载的油茶果壳多糖质量。

2.4 结果与讨论

2.4.1 单因素实验

2.4.1.1 提取时间对总多糖得率的影响

测定不同提取时间对油茶果壳总多糖得率的影响，如图 2-2a 所示。提取时间对总多糖提取率的影响在 4.14-5.06%，随着提取时间的增加，总多糖得率呈现上升趋势，当提取时间从 1 h 到 2 h 之间，总多糖得率上升趋势明显，经过 1.5 h

的乙醇提取后，总多糖得率的上升趋势渐缓。为了在提高多糖得率的基础上缩短提取时间，最佳条件总多糖的提取时间选择 1 h，这一提取时间与林欣颖等人^[117]研究的油茶果壳多糖提取时间相近。

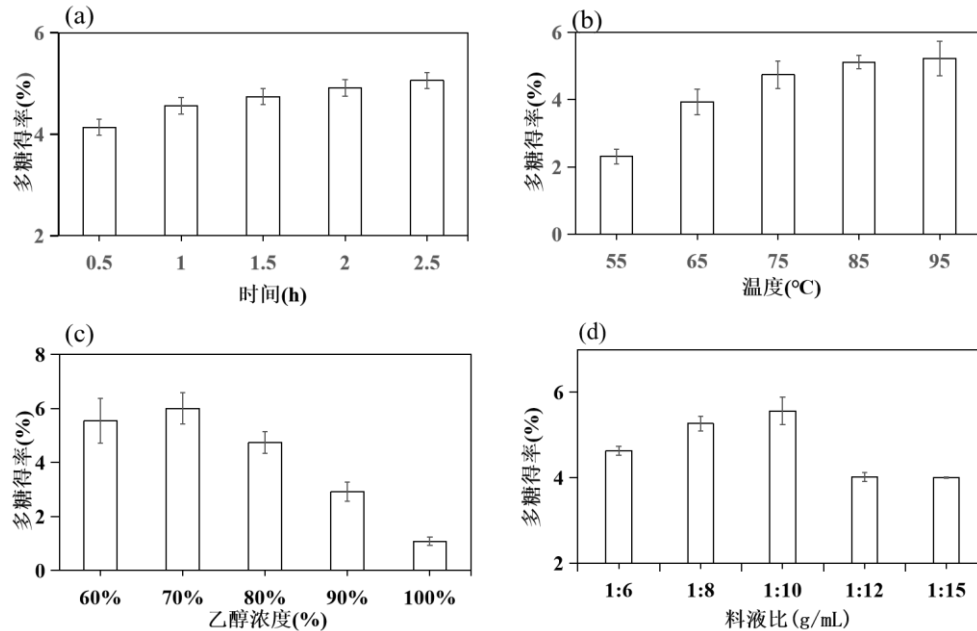


图 2-2 不同提取条件(a)时间，(b)温度，(c)乙醇浓度以及(d)料液比对油茶果壳总多糖得率的影响

Figure 2-2 Effects of different extraction conditions (a) time, (b) temperature, (c) ethanol concentration and (d) solid-liquid ratio on the yield of chitosan polysaccharides in *Camellia oleifera* shells

2.4.1.2 提取温度对总多糖得率的影响

测定不同提取温度对油茶果壳总多糖得率的影响，如图 2-2b 所示。随着提取温度的升高，总多糖得率也在升高。当 95 °C 时，总多糖得率达到最高，其提取得率为 5.23%，于 85 °C 下的总多糖得率相近。而多糖在高温情况下，容易导致多糖链断裂，因此，最佳条件总多糖的提取温度选择 75°C，以 65，75 和 85°C 作为正交实验的水平。

2.4.1.3 乙醇浓度对总多糖得率的影响

测定不同乙醇浓度对油茶果壳总多糖得率的影响，如图 2-2c 所示。总多糖得率随乙醇浓度的增加呈现先升高后降低，70%乙醇浓度时达到最大，为 6.01%，纯乙醇对总多糖得率最低，提取效果不佳。因此，选取 70%乙醇浓度为最佳浓度。

2.4.1.4 料液比对总多糖得率的影响

测定不同料液比对油茶果壳总多糖得率的影响，如图 2-2d 所示，油茶果壳

中总多糖的提取效率受料液比变化影响明显，当料液比从 1:5 g/mL 逐步提升至 1:10 g/mL 时，多糖产量呈现上升趋势，并在 1:10 时达到最大。然而，继续增大料液比至 1:15 g/mL 后，多糖得率降低可能是因为添加了过量的油茶果壳，提取过程中油茶果壳未能与乙醇完全接触，导致总多糖得率低。过高或过低的料液比均不利于油茶果壳总多糖的提取。

2.4.2 正交实验结果分析

表 2-2 油茶果壳总多糖的提取的正交实验设计表

Table 2-2 Orthogonal experimental design table for the extraction of total polysaccharides from *Camellia oleifera* shells

试验号	时间	温度	乙醇浓度	料液比	多糖得率/%
1	1	1	1	1	5.71
2	1	2	2	2	4.25
3	1	3	3	3	7.12
4	2	1	2	3	4.45
5	2	2	3	1	2.50
6	2	3	1	2	5.66
7	3	1	3	2	3.72
8	3	2	1	3	6.22
9	3	3	2	1	5.61
k1	5.70	4.63	5.86	4.61	/
k2	4.20	4.32	4.77	4.54	/
k3	5.18	6.13	4.45	5.93	/
R	0.51	1.81	1.42	1.39	/

根据表 2-2 油茶果壳总多糖的提取的正交实验设计表可知，对茶果壳总多糖的提取各因素影响程度依次是 $B > C > D > A$ ，影响油茶果壳总多糖提取率最大的因素是提取温度，其次是乙醇浓度，之后是料液比，最后是提取时间。根据正交试验结果可得出油茶果壳总多糖提取最佳工艺为 $A_1B_3C_1D_3$ ，即提取时间 1 h、提取温度 85 °C、乙醇浓度 60%以及料液比 1:12 g/mL。

按油茶果壳总多糖提取的最佳工艺进行验证实验，经过三组平行实验得到油茶果壳总多糖的提取率为 $10.61 \pm 0.32\%$ ，其提取率高于其他条件所得提取率。其验证实验结果与正交试验结果相符，证实采用最佳工艺提取油茶果壳总多糖方法的可靠性。

2.4.3 油茶果壳及油茶果壳多糖的活性成分分析

粉碎的油茶果壳经过乙醇预处理，得到醇提后的油茶果壳以及乙醇提取液。乙醇提取物含量为 $16.20 \pm 0.01\%$ ，其中油茶果壳总多糖含量为 $24.35 \pm 0.55\%$ ，单

宁含量为 $2.77 \pm 0.01\%$ ，黄酮含量为 $5.59 \pm 0.78\%$ ，皂苷含量为 $36.31 \pm 0.53\%$ ，蛋白质含量为 $7.89\% \pm 0.04\%$ 。经醇沉纯化后的油茶果壳总多糖中活性占比为多糖含量为 $63.89 \pm 0.12\%$ ，单宁含量为 $1.64 \pm 0.05\%$ ，黄酮含量为 $2.51 \pm 0.16\%$ ，皂苷含量为 $29.86 \pm 0.26\%$ ，蛋白质含量为 $3.26\% \pm 0.25\%$ 。

2.4.4 油茶果壳总多糖的体外抗氧化测定

2.4.4.1 DPPH 清除能力的测定

DPPH (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼) 是一种稳定的氮中心自由基，其甲醇/乙醇溶液呈深紫色，在 517 nm 处有特征吸收峰^[118]。当具有抗氧化性的试剂接触 DPPH 时，会被还原为无色的 DPPH-H，导致溶液褪色，吸光度下降。根据图 2-3a 可知，油茶果壳总多糖与对照抗坏血酸随着质量浓度的增加，其 DPPH 清除能力在不断增加。对照抗坏血酸表现出强抗氧化性，而油茶果壳总多糖的 DPPH 清除能力在 0.3-1.0 mg/mL 质量浓度上升趋势明显，在 1.5 mg/mL 总多糖质量浓度时，其 DPPH 清除率为 76.10%，其原因可能是油茶果壳中浓度过大，加深了溶液的颜色。

2.4.4.2 ABTS⁺清除能力的测定

ABTS⁺是评估天然多糖抗氧化活性的常用指标，其作用机制依赖于抗氧化剂分子中的羟基(-OH)和羧基(-COOH)等活性基团通过电子转移反应，将蓝绿色的 ABTS⁺还原为无色稳定产物，从而定量反映物质的自由基清除能力^[119]。

根据图 2-3b 可知，油茶果壳总多糖与抗坏血酸清除 ABTS⁺的能力与其浓度成正比，随着总多糖质量浓度的增加，ABTS⁺清除能力清除率也在逐步增加。当油茶果壳总多糖的质量浓度为 0.3 mg/mL 时，ABTS⁺清除率可到达 94.26%，其结果与对照组抗坏血酸相似，当油茶果壳总多糖的质量浓度为 1.5 mg/mL 时，其 ABTS⁺清除率结果与对照组抗坏血酸相近。根据 ABTS⁺清除率结果表明，油茶果壳总多糖具有较强的抗氧化性。研究表明，阿拉伯糖、鼠李糖、甘露糖等含量影响着 ABTS⁺清除能力，油茶果壳总多糖表现出较强的抗氧化性，可能与多糖的结构与成分有关^[120, 121]。

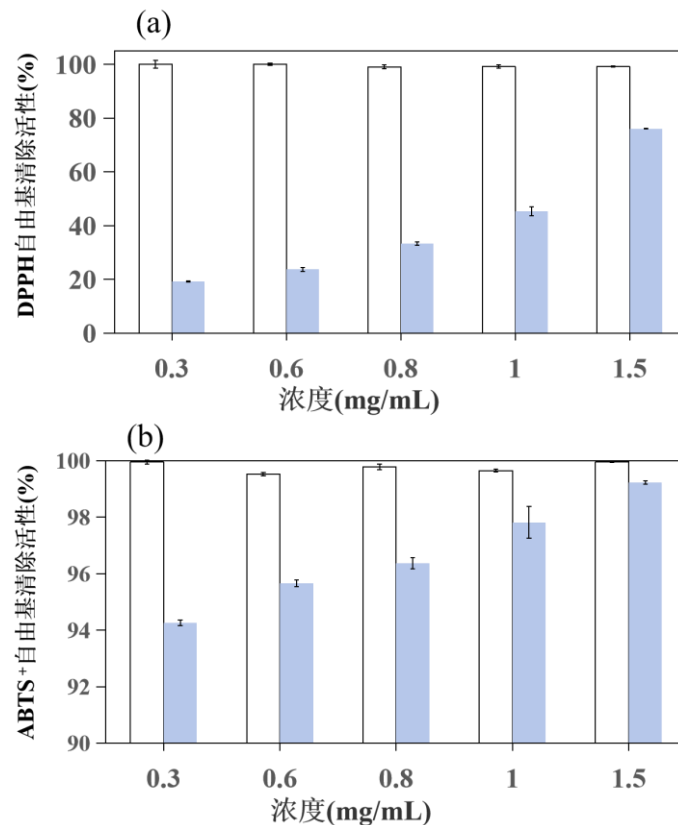


图 2-3 油茶果壳总多糖和抗坏血酸的抗氧化性(a)DPPH 自由基清除能力以及(b)ABTS⁺清除能力

Figure 2-3 Antioxidant properties of total polysaccharides and ascorbic acid in *Camellia oleifera* shells (a) DPPH free radical scavenging capacity and (b) ABTS⁺ scavenging capacity

2.4.5 多糖水凝胶性能检测

2.4.5.1 油茶果壳总多糖浓度对水凝胶的溶胀能力的影响

多糖水凝胶的溶胀能力是评价其保湿功能的核心参数^[122]。溶胀性反映了材料对渗出液的吸收潜力。从图 2-4a 可知，油茶果壳总多糖水凝胶的溶胀随着多糖浓度的增加呈现先升高到达 2 mg/mL 后出现降低趋势。与空白水凝胶对比，油茶果壳多糖水凝胶的溶胀能力更强，油茶果壳多糖的引入可能抑制柠檬酸对壳聚糖分子间交联的促进作用，从而改变水凝胶网络结构的致密性。当多糖浓度添加量为 2 mg/mL 时，其水凝胶具有较好的溶胀性与保水性。Sman^[123]发现糖浓度增加会引起的交联多糖微凝胶溶胀增加，这对应了一定浓度的油茶果壳多糖水凝胶会随着多糖浓度增加，其溶胀率增加，最大为 1600%，比空白水凝胶的溶胀率高了 3 倍。与一支箭、鸡血藤、鱼腥草、红景天粗等植物多糖水凝胶相比，油茶果壳多糖水凝胶的溶胀性能略高^[116]。

从图 2-4b 可知, 当水凝胶添加 2 mg/mL 的黄原胶, 微晶纤维素, 羧甲基纤维素, 果胶以及油茶果壳多糖时, 油茶果壳的溶胀度最高。其原因可能是黄原胶、羧甲基纤维素以及果胶主要用于增稠剂、粘合剂和稳定剂^[124], 可能更适用在提高水凝胶的机械强度上。

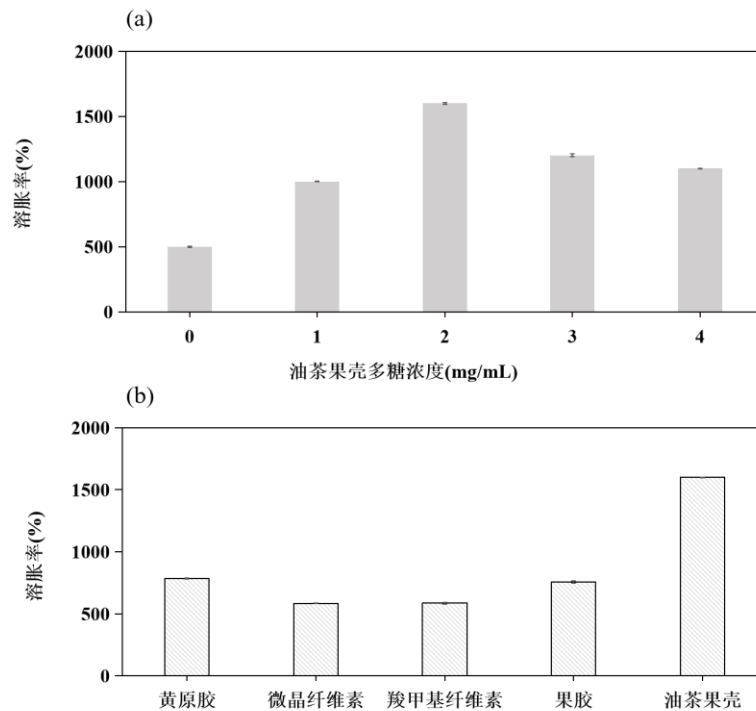


图 2-4 (a)不同油茶多糖浓度以及(b)不同多糖的水凝胶溶胀度

Figure 2-4 (a) Hydrogel swelling of different *Camellia oleifera* polysaccharide concentrations and (b) different polysaccharides

2.4.5.2 多糖浓度对水凝胶的包载能力的影响

多糖水凝胶的包载率是反应水凝胶载药后的释放性能, 包载率越高, 水凝胶中所含的多糖越多, 表明多糖水凝胶可利用性高^[116]。由图 2-5a 可知, 当油茶果壳多糖添加浓度为 1 g/mL 时, 其包载率为 100%, 这可能是因为含糖量低, 壳聚糖分子与油茶多糖之间产生静电吸引, 限制了油茶多糖在水凝胶中的充分释放。随着多糖浓度升高, 多糖水凝胶包载率呈下降趋势, 多糖浓度为 2 g/mL 时, 其包载率为 98%, 多糖浓度为 4 g/mL 是 90%。

由图 2-5b 可知, 当水凝胶添加 2 mg/mL 的, 微晶纤维素, 羧甲基纤维素, 果胶以及油茶果壳多糖时, 油茶果壳的包载率最高, 其次是微晶纤维素, 羧甲基纤维素, 果胶以及黄原胶。多糖溶液具有抗氧化性, 而多糖水凝胶在载药后具有良好的释放性能, 将这两者结合, 可以使其成为创面敷料与缓释给药过程的理想

候选材料^[125]。在缓释给药过程中,用于药物载体实现靶向释放^[126]。也可以用于环境治理中的重金属吸附,且吸附法是一种高效、低成本、易于实施的脱除重金属离子的方法,不会产生二次污染,可在水处理中得到了广泛的应用^[127]。对于油茶果壳水凝胶较低的机械强度而言,可以通过离子交联改性,可进一步拓展其在组织工程支架中的应用场景^[128]。

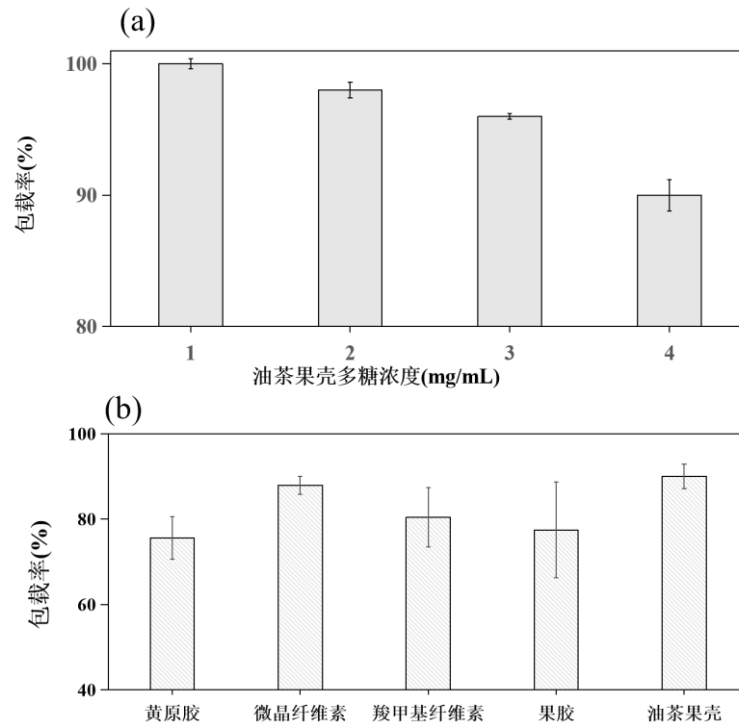


图 2-5 (a)不同油茶多糖浓度以及(b)不同多糖的水凝胶包载率

Figure 2-5 (a) Concentrations of polysaccharides in *Camellia oleifera* and (b) hydrogel encapsulation rates of different polysaccharides

2.5 本章小结

本章以油茶果壳为原料,对油茶果壳的组分进行总多糖的提取,并制备多糖水凝胶。首先,对油茶果壳醇提工艺进行单因素实验后进行正交优化实验,对纯化后油茶果壳总多糖的抗氧化性进行了考察。随后进行了总多糖水凝胶的溶胀率与包载率的性能检测。其主要研究结果和结论如下:

- (1) 油茶果壳总多糖的最佳提取工艺为,提取时间 1 h,提取温度 85 °C,乙醇浓度 60%,料液比 1:12 g/mL 时,所得油茶果壳总多糖得率最大为 10.61%。
- (2) 通过 DPPH 和 ABTS⁺测定结果表明,油茶果壳总多糖具有抗氧化活性。
- (3) 通过测定多糖水凝胶性能,油茶果壳多糖浓度为 2 mg/mL,其溶胀率达到 1600%,包载率为 98%。表明多糖水凝胶具有良好的溶胀性与包载率。

第3章 水热联合白腐真菌 *Trametes sp.*LS-10C 预处理油茶果壳产糖

3.1 引言

物理预处理能耗高，化学预处理过程中会产生有毒的副产物^[7, 59]，这些副产物会抑制酶水解，而预处理后的化学难度大，排放而造成环境污染。其中生物预处理不仅毒性低、环境友好，而且不会产生抑制物^[30]。该方法利用自然界中存在的酶来脱除木质素。研究发现，甘蔗渣经过生物预处理 56 d 后，木质素脱除率为 49%，甘蔗渣的体外消化率提升了 1.39 倍^[129]。采用真菌预处理和其他预处理结合，有助于有效改善生物质的酶糖化^[86]。Wang 等人^[85]利用白腐菌和桦褐孔菌联合预处理玉米芯，其最高葡萄糖产量为 83%，预处理时间长达 32 d。将单一的生物预处理和其他预处理工艺相结合发现，有助于缩短处理时间以及提高酶解效率^[130]。陈肖肖^[89]采用 Fenton 预处理与桦褐孔菌联合预处理麦秆，其还原糖产率提高了 1 倍多，预处理时间仅为 10 d。*Trametes sp.*LS-10C 属于白腐真菌且具有较强产漆酶能力。据文献可知，*Trametes sp.*LS-10C 可以利用许多碳源，如蔗糖、葡萄糖、木糖等^[131]。而水热预处理溶解的大量半纤维素会转化为木糖。因此，本章节形成了一种水热预处理“一锅法”进行真菌发酵降解生物质的新思路。

本章将第二章油茶果壳醇提后的固体成分进行纤维素、半纤维素及木质素的定向分离，随后经纤维素酶水解以获得可发酵糖。首先，根据水热预处理与水热联合白腐真菌预处理后油茶果壳的纤维素、半纤维素及木质素组分变化，探究其对酶水解效率的影响。通过水热预处理液的抑制物测定以及预处理后油茶果壳特征官能团以及纤维素结晶度的变化，探讨水热联合白腐真菌 *Trametes sp.*LS-10C 预处理对醇提后油茶果壳组分以酶解率的影响。

3.2 实验材料

3.2.1 实验菌种

*Trametes sp.*LS-10C 菌株为本课题组筛选并保藏于中国典型培养物保藏中心（保藏编号: CCTCC NO: M2015191）。

3.2.2 实验原料

本实验所用原料为章节 2.2.2 乙醇提取后的油茶果壳。Celllic®CTec2 纤维素酶(SAE0020-50 mL)采购于上海西格玛奥德里奇贸易有限公司, 其滤纸的酶活为 150 FPU/mL。

3.2.3 培养基

马铃薯葡萄糖与种子培养基: 葡萄糖 20 g/L, 土豆 200 g/L, 自然 pH。

发酵培养基: 25 g 粉碎后的油茶果壳和 150 mL 水溶液添加适量氯化铁水热预处理得到的液体与固体部分收集并调节 pH 至 4, 补充氮源(尿素)并用旋转蒸发仪将预处理物的含水量控制在 80%, 置于 500 mL 锥形瓶中灭菌作为白腐真菌发酵培养基。

以上培养基在 121 °C 条件下灭菌 20 min, 固体培养基则在液体培养基中加入 18 g/L 的琼脂。

3.2.4 实验试剂及设备

所用试剂、仪器见附录表 1、2。

3.3 实验方法

3.3.1 水热预处理

在石英内衬中装入 25 g 粉碎过筛后的油茶果壳、150 mL 水溶液和(0, 0.02, 0.04, 0.06 以及 0.08 mol/L)的氯化铁, 将石英内衬置于不锈钢反应釜体(1000 mL), 盖上釜盖, 将反应釜体密封后, 放入反应釜, 全程通过搅拌浆搅拌, 以 500 rpm 搅拌, 保证物料与溶液混合均匀。通过釜盖上方热电偶监测温度, 从 20 °C 以每分钟 3 °C 升温至(130, 150 以及 170 °C), 保温(0, 10, 30, 50, 90, 120, 150 以及 180 min)后, 取出釜体置于冰水浴处理 5 min, 冷却后取出石英内衬, 收集液体部分用于检测抑制物成分, 固体部分用去离子水洗涤固体成分至中性, 冷冻干燥机(-47 °C)中干燥 48 h, 用于后续称重与组分测定及纤维素酶水解。取部分固体残渣于 105 °C 烘干, 用于探究预处理对油茶果壳特征官能团以及纤维素结晶度变化。

3.3.2 水热预处理后油茶果壳特征官能团和纤维素结晶度

傅里叶红外光谱仪检测样品中化合物的特征官能团, 其扫描范围从 400-4000 cm^{-1} , 扫描 32 次。利用 X-衍射仪测定检测样品的结晶度, 衍射角范围为 5°-55°, 扫描速度为 2°/min^[13]。

3.3.3 水热联合白腐真菌 *Trametes sp.*LS-10C 预处理

将章节 3.3.1 水热预处理中得到的液体与固体部分采用“一锅法”^[132], 将所有预处理物收集并控制含水量为 80%, 灭菌后作为白腐真菌发酵培养基。以一组水热预处理后不接菌和一组未经水热预处理(醇提油茶果壳)接菌作对照。发酵培养基冷却后按 20%接菌量接入白腐真菌, 摇床温度 28 °C, 摇床转速为 180 rpm, 发酵时间 8 d, 发酵结束后用研钵将发酵培养基中的物质碾碎均匀后加入醋酸-醋酸钠缓冲液(0.1mol/L, pH4.0) 100 mL 置于恒温摇床 30 °C, 150 rpm 中振荡 2 h, 浸出液离心取上清液为粗酶液^[131], 用于漆酶及纤维素酶活的检测。随后将固体部分用去离子水洗涤固体成分至中性, 冷冻干燥机中(- 47 °C)干燥 48 h, 用于后续称重, 木质纤维素组分测定及酶水解。

3.3.4 油茶果壳木质纤维素成分以及抑制物的测定

油茶果壳木质纤维素成分采用美国国家可再生能源实验室(NREL)研发的关于生物质中碳水化合物及木质素的组分分析方法^[133], 通过两步酸水解测定油茶果壳及预处理后固体残渣中纤维素、半纤维素和木质素含量, 每组实验 2 个平行。

称取 0.3 g 经粉碎的固体样品, 记录实际称取样品的质量, 放入 30 mL 的小酒杯中, 然后加 3.0 mL 72 wt.%浓硫酸, 于 30 °C水浴锅内用玻璃棒持续搅拌 60 min, 随后, 将小酒杯内混合物和玻璃棒上残留物用 84 mL 去离子水冲洗入西林瓶内, 并用橡胶塞和铝盖封口。将西林瓶置于灭菌锅 121 °C下水解反应 60 min。反应完成后, 取 15 mL 上清液于 50 mL 离心管中, 缓慢加入碳酸钙中和, 期间不断搅拌直到 pH 试纸检测为中性。取上清液 12000 rpm 离心 2 min, 经 0.005 mol/L H₂SO₄ 稀释 2 倍, 过 0.22 μm 有机系滤膜后, 进样高效液相色谱仪(High performance liquid chromatography; HPLC)检测其中糖组分含量(葡萄糖, 木糖和阿拉伯糖)^[13]。样品中纤维素、半纤维素含量(wt.%)计算公式如下:

$$\text{样品中纤维素含量(wt.\%)} = 100 \times (\text{上清液中葡萄糖浓度} \times 87 \text{ mL} \times 0.9) / (k_1 \times \text{样品质量}) \quad (3-1)$$

$$\begin{aligned} \text{样品中半纤维素含量(wt.\%)} = & 100 \times [(\text{上清液中木糖浓度} \times 87 \text{ mL} \times 0.9) / (k_2 \times \text{样品质量}) + \\ & (\text{上清液中阿拉伯糖浓度} \times 87 \text{ mL} \times 0.9) / (k_3 \times \text{样品质量})] \end{aligned} \quad (3-2)$$

式中 k_1 、 k_2 、 k_3 为葡萄糖, 木糖和阿拉伯糖酸水解反应中的损失校正系数,

分别为 0.97, 0.84 和 0.88。

因酸溶性木素极易脱除, 本研究重点在油茶果壳中酸不溶木素的分离。样品中酸不溶性木质素测定: 将西林瓶剩余部分使用过滤坩埚(80-120 μm)抽滤, 残留的固体用 200 mL 去离子水洗涤至滤液为中性后置于烘箱 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘干 8 h 后, 将坩埚拿至干燥器中冷却至室温并称重, 记为 M_1 (坩埚+残渣), 然后将坩埚放入马弗炉中, 梯度升温至 575 $^{\circ}\text{C}$, 保温 3 h 后自然冷却至 105 $^{\circ}\text{C}$, 放至干燥器中冷却至室温称重, 记为 M_2 (坩埚)。样品中酸不溶性木质素(wt.%)计算公式如下:

$$\text{样品中酸不溶性木质素(wt.\%)} = 100 \times (M_1 - M_2) / (\text{样品质量}) \quad (3-3)$$

纤维素(半纤维素)保留率定义为未经预处理的醇提油茶果壳中基于原纤维素(半纤维素)的固体残渣中保留的纤维素(半纤维素)的重量百分比。以未经处理的醇提油茶果壳中的原木质素为基础, 木质素脱除率等于百分百减去固体残渣中回收木质素的质量百分比。

回收的预处理液用于抑制物的检测, 利用高效液相色谱测定预处理液中的低聚糖和衍生物(乙酸、甲酸、糠醛和 5-羟甲基糠醛), 采用 Aminex HPX-87 H 型离子交换色谱柱(300 mm $\times$ 7.8 mm, Bio-Rad), 配备示差折光检测器(RID)和紫外检测器(UV, 210 nm), 45 $^{\circ}\text{C}$ 柱温, 流速为 0.6 mL/min, 流动相为 0.005 mol/L H_2SO_4 。

3.3.5 水热联合白腐真菌预处理后产的粗酶液酶活的测定

3.3.5.1 漆酶酶活的测定

漆酶酶活的测定以愈创木酚为底物, 使用等体积的 0.8 mmol/L 愈创木酚溶液和适当稀释的粗酶液在 40 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后冰浴终止反应并立即在 465 nm 处测定吸光值。其中, 所有底物或酶液均使用醋酸/醋酸钠缓冲液(0.1mol/L, pH 4.0)配置或稀释并以煮沸灭活的酶液作为对照。试验重复 3 次, 取平均值^[131]。

漆酶酶活公式计算如下:

$$\text{漆酶酶活} = \frac{\Delta\text{OD} \times V_t}{\varepsilon \times \Delta t \times V_e \times 10^{-6}} \times n \quad (3-4)$$

式中 $\varepsilon = 1.2 \times 10^4$ L/mol $\cdot$ cm, 为 465 nm 处愈创木酚的摩尔消光系数; ΔOD : 30 min 内吸光度的变化值; Δt : 10 min; V_t : 酶反应液的总体积; V_e : 酶反应液中酶液体积; n : 酶液稀释的倍数。

3.3.5.2 纤维素酶酶活的测定

根据 NREL 提出的关于纤维素酶的滤纸酶活力分析方法^[133], 测定水热联合

白腐真菌预处理结束后粗酶液中纤维素酶活。本实验采用 DNS 法测定纤维素酶酶活，每组设置两个平行样本并取均值作为最终结果^[13]。具体操作如下：精确称取 50.0 mg Waterman 纤维滤纸片，折叠后置于 10 mL 试管中，加入 0.5 mL 稀释的酶液和 1 mL pH 4.0 醋酸-醋酸钠缓冲液，确保滤纸充分浸没。将混合液置于 50 °C 恒温水浴中反应 60 min，随后立即加入 1.5 mL DNS 试剂终止反应，充分混匀并密封管口，转移至沸水浴中反应 5 min 后，立即用冰水浴冷却。经 10000 rpm 离心 2 min，取 0.4 mL 上清液与 2.6 mL 去离子水混合，于紫外分光光度计 540 nm 波长处测定吸光度，通过还原糖标准曲线计算酶解产生的葡萄糖当量浓度，以此表征纤维素酶对滤纸底物的降解活性。一分钟内产生 1 μmol 葡萄糖的酶用量为一个酶活单位。

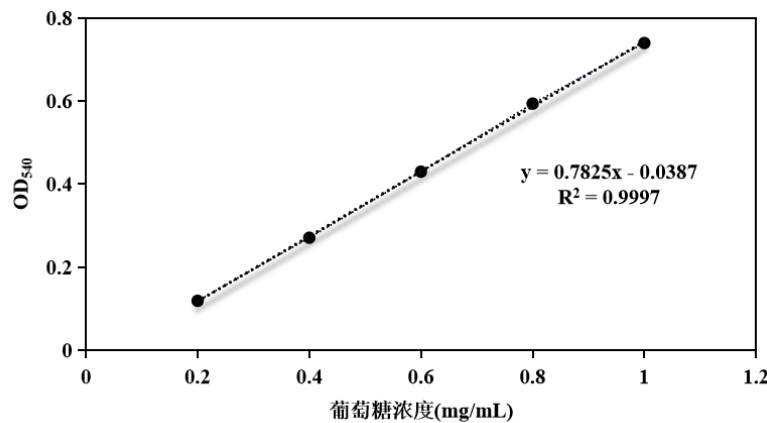


图 3-1 DNS 标准曲线

Figure 3-1 DNS standard curve

3.3.6 纤维素酶水解方法

准确称取未预处理的油茶果壳以及预处理后的干燥油茶果壳的 0.4 g 和 20 mL 柠檬酸缓冲液(50 mmol/L, pH 4.8)混合在 150 mL 的蓝盖瓶中，摇床 50 °C 和 150 rpm 下进行酶解，添加纤维素酶的酶载量为 20 FPU/g 干基。定期取 0.5 mL 酶水解样用于糖浓度测定，于 -20 °C 保存。水热预处理及水热联合白腐真菌预处理后的油茶果壳固体残渣基于上述实验操作进行酶水解。将定期取得的样品离心 (12000 rpm, 2 min)，并用流动相(0.005 mol/L H₂SO₄)稀释，取上清液过 0.22 μm 有机系滤膜，进样 HPLC 以检测水解液中糖浓度，以葡萄糖产率评估酶水解效率。

$$\text{葡萄糖产率}(\%) = 100 \times \frac{\text{水解液中葡萄糖浓度} \times 20 \text{ mL} \times 0.9}{\text{基质中纤维素含量}} \quad (3-5)$$

3.4 结果与讨论

3.4.1 水热预处理后油茶果壳的组分分析

表 3-1 不同水热条件预处理对油茶果壳的组分变化的影响

Table 3-1 Effect of pretreatment with different hydrothermal conditions on the component changes of *Camellia oleifera* shells

温度 (°C)	条件		预处理量 (%)	预处理固体的成分(%)			预处理后油茶果壳中组分回收率(%)		
	时间 (min)	FeCl ₃ 浓度 (mol/L)		纤维素	半纤维素	木质素	纤维素保 留率	半纤维素 保留率	木质素脱 除率
130	10	0	83.88	18.09±0.24	37.22±0.71	31.02±1.41	93.85±1.22	85.99±1.64	10.29±4.07
130	10	0.02	83.71	18.37±0.43	37.89±0.04	31.15±0.57	95.08±2.24	87.38±0.09	10.07±1.66
130	10	0.04	73.58	20.95±0.15	36.09±0.33	35.38±0.02	95.36±0.66	73.16±0.68	10.22±0.06
130	10	0.06	63.64	23.43±0.56	26.24±0.21	40.89±0.22	92.20±2.21	46.01±0.38	10.26±0.49
130	10	0.08	49.94	30.93±0.24	13.62±0.15	52.08±0.40	95.54±0.73	18.74±0.22	10.31±0.69
130	0	0.02	85.90	17.03±0.37	36.77±0.45	30.44±0.24	90.48±1.97	87.02±1.07	9.83±0.72
130	30	0.02	79.65	20.87±0.24	34.01±0.59	32.89±0.35	~100 ^a	74.63±1.29	9.65±0.97
130	50	0.02	71.17	21.78±0.41	32.92±0.51	36.64±0.01	95.86±1.82	64.54±1.00	10.07±0.04
130	90	0.02	49.66	27.94±0.39	14.37±0.04	50.98±0.58	85.81±1.19	19.30±0.06	12.69±1.39
130	120	0.02	51.14	28.30±0.14	18.26±0.13	53.07±1.21	89.50±0.44	25.53±0.19	6.42±3.27
130	150	0.02	50.03	23.95±3.89	13.77±0.14	52.40±3.22	74.11±2.15	17.84±0.20	9.60±5.51
130	180	0.02	48.67	27.68±0.15	14.20±0.06	52.30±0.42	83.33±0.44	19.18±0.08	12.23±0.71
150	90	0.02	46.54	29.01±0.07	8.19±0.03	57.18±1.31	83.50±0.19	10.49±0.04	8.23±2.12
170	90	0.02	50.40	27.47±0.53	3.93±0.32	61.78±0.12	85.61±1.64	5.34±0.450	/

^a 部分数据超过 100%，误差无意义。

通过探究了不同氯化铁(0-0.08 mol/L)、温度(130-170 °C)预处理时间(0-180 min)对油茶果壳中木质纤维素组分分离效果的影响,以确定实现高纤维素保留率以及木质素脱除率。醇提后油茶果壳中纤维素,半纤维素和酸不溶木质素含量为 16.17±0.39%, 36.30±1.30%, 和 30.23±0.18%。

根据表 3-1 可知,油茶果壳在预处理(130 °C和 FeCl₃ 0.02 mol/L)中,半纤维素含量随着水热预处理时间的增加而减少,这与水热预处理在半纤维素脱除上有优势相对应^[61],但是纤维素的保留在缓慢下降,其损失在 40%以内。表明预处理时间增加主要影响半纤维素,对纤维素的影响较小^[135]。在同一温度下(130 °C),随着氯化铁浓度的增加,油茶果壳中半纤维素的含量显著降低,这可能是与路易斯酸作用有关^[65]。随着预处理温度的升高,油茶果壳经高温蒸煮后,其固体保留率在减低。水热条件预处理下木质素效果不理想,最高为 12.69% (130 °C, 预处理时间 90 min 和 FeCl₃ 0.02 mol/L)。这可能是水热预处理下主要溶解半纤维素,而油茶果壳属于高木质化生物质,其木质素脱除难度高,使得水热预处理对油茶

果壳木质素的脱除能力有所欠缺。

3.4.2 水热预处理后油茶果壳的预处理液分析

当预处理条件剧烈时（长时、高温，高浓酸），水热预处理会产生过量抑制剂（甲酸，乙酸，5-羟甲基糠醛和糠醛），这些抑制物的存在对于微生物发酵是有毒的^[134]，根据表 3-2 可知，5-羟甲基糠醛和糠醛含量较少或者未检测出，大部分未甲酸和乙酸。其原因可能是，在水热预处理过程中，脱除的半纤维素转化为甲酸、乙酸^[61]。

在预处理中（130 °C和 FeCl₃ 0.02 mol/L），随着预处理时间的增加，水热预处理过程中的抑制物甲酸含量在不断增加，当预处理时间为 90 min 时，甲酸含量为 6.12 g/L，乙酸含量为 2.21 g/L。经过 90 min 后，甲酸增加渐缓，而乙酸含量开始缓慢增加，其最高为预处理 150 min 时，乙酸为 8.52 g/L。抑制物的量可能会影响后续白腐真菌的生长情况。

表 3-2 不同水热条件油茶果壳预处理液的抑制物

Table 3-2 Inhibitors of different hydrothermal conditions of *Camellia oleifera* shells pretreatment solution

条件			预处理液体抑制物成分(g/L)		
温度(°C)	时间(min)	FeCl ₃ 浓度(mol/L)	甲酸	乙酸	糠醛
130	10	0	0.72±0.14	/	/
130	10	0.02	1.46±0.22	/	/
130	10	0.04	1.34±0.17	2.38±0.05	/
130	10	0.06	4.48±0.16	5.07±0.47	/
130	10	0.08	1.82±0.24	7.35±0.70	/
130	0	0.02	0.09±0.01	/	/
130	30	0.02	2.35±0.24	2.14±0.14	/
130	50	0.02	5.72±0.66	2.11±0.36	/
130	90	0.02	6.12±1.52	2.21±1.32	/
130	120	0.02	21.22±0.14	7.24±0.32	/
130	150	0.02	20.01±0.71	8.52±0.98	/
130	180	0.02	20.73±0.06	4.23±1.28	/
150	90	0.02	21.01±0.10	2.31±0.97	/
170	90	0.02	16.49±2.35	/	2.62±0.18

3.4.3 水热预处理前后特征官能团及纤维素结晶度分析

3.4.3.1 水热预处理前后对油茶果壳特征官能团的分析

通过对预处理前后的油茶果壳进行傅里叶红外光谱分析，得到的吸收光谱图如图 3-2 所示。预处理效果会影响油茶果壳的官能团变动，在 3071 cm⁻¹（纤维素中羟基骨架的伸缩振动）处的吸收峰变化是纤维素和半纤维素的-OH 键振动引起

的^[135]。随着氯化铁浓度的增加， 3071 cm^{-1} 和 2846 cm^{-1} 处的变动，可能表现为预处理过程中纤维素晶型结构被破坏，这与水热预处理后油茶果壳的纤维素结晶度相对应。 1018 cm^{-1} 处是纤维素中的 β -1,4-糖苷键，其信号增强，油茶果壳的纤维素的含量可能增加^[13]。如 1600 cm^{-1} 主要为苯环骨架特征峰，其结构与木质素结构相关^[136]，这与组分测定中木质素被脱除相对应。

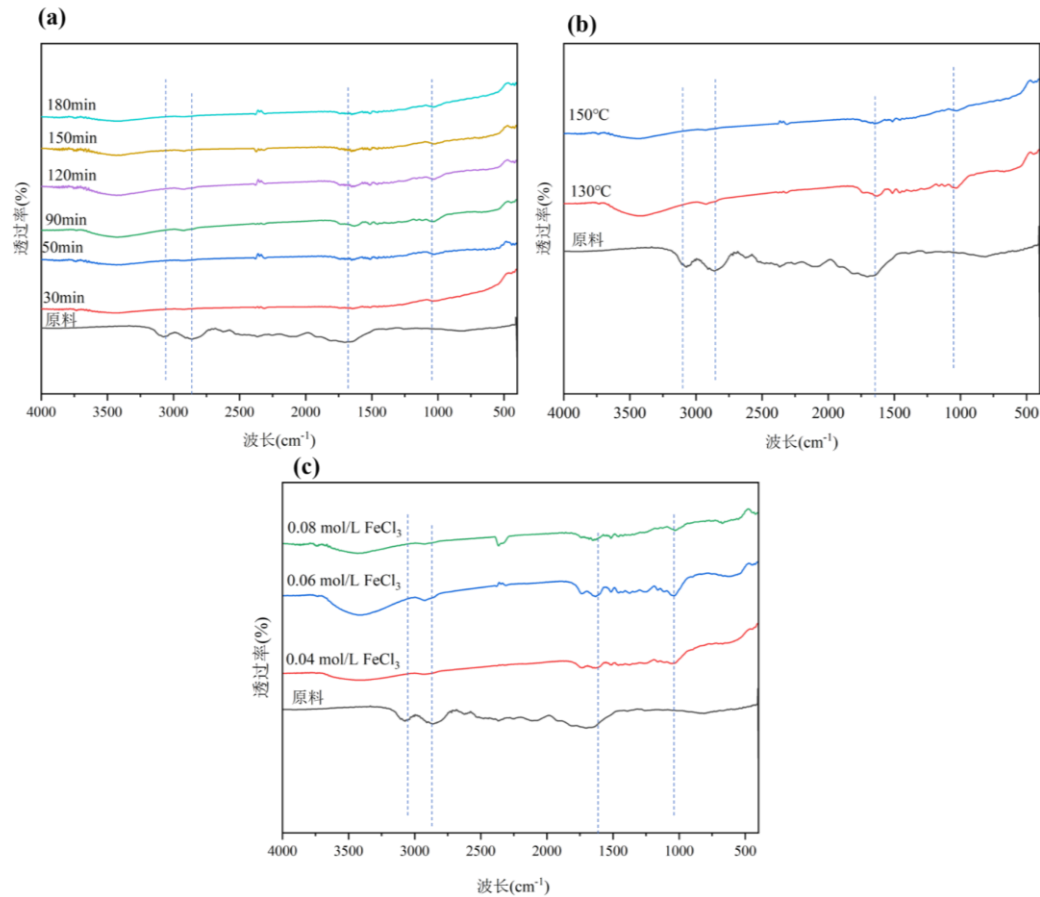


图 3-2 不同(a)预处理时间, (b)温度以及(c)氯化铁浓度预处理后油茶果壳的 FT-IR 曲线

Figure 3-2 FT-IR curves of *Camellia oleifera* shells after pretreatment with different (a) pretreatment time, (b) temperature and (c) ferric chloride concentration

3.4.3.2 水热预处理前后对油茶果壳纤维素结晶度的分析

纤维素的结晶度变化通过在纤维素 I 晶型 $2\theta \approx 21.7^\circ (I_{002})$ 和非晶区 $2\theta \approx 18.7^\circ (I_{am})$ 进行计算^[13]。不同水热预处理条件测得的结晶度与经醇提后的油茶果壳原料对比，其纤维素结晶度有所提高，醇提的油茶果壳原料其结晶度为 15.54%。由图 3-3a 可知，随着预处理时间的增加，其纤维素结晶度呈现先增加后降低的总趋势，最高为预处理 90 min，其纤维素结晶度为 22.58%，油茶果壳纤维素结晶度提高了 7.04%。在预处理过程中（130 °C 和 10 min），FeCl₃ 从 0.04

增加至 0.08 mol/L，油茶果壳结晶度为 12.05~23.61%，这可能是预处理过程中氢键破坏了糖苷键，导致纤维素长链断裂^[137]。纤维素的结晶度变化表明预处理过程中，非晶区被破坏导致结晶区增大，可能促进纤维素酶的可及性。

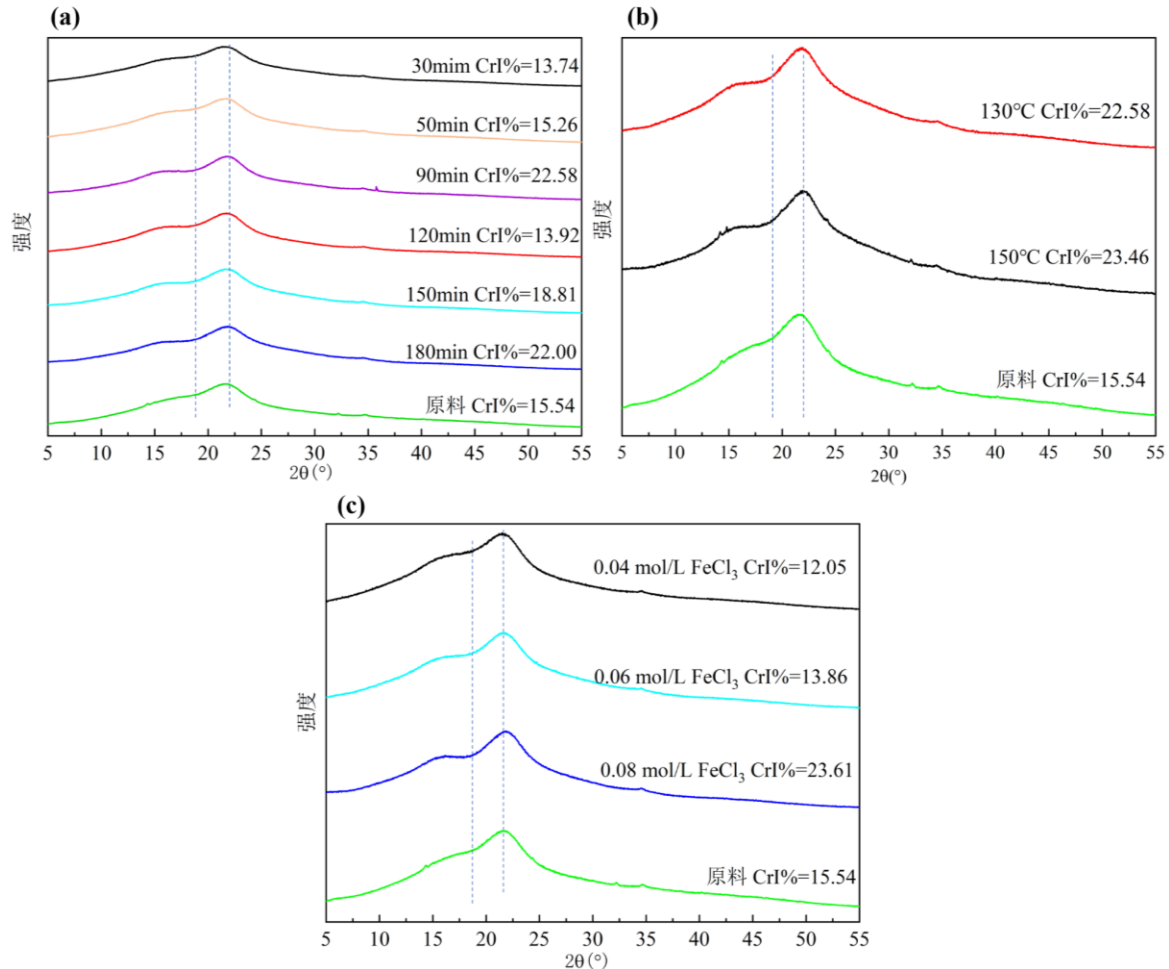


图 3-3 不同(a)预处理时间, (b)温度以及(c)氯化铁浓度
预处理后油茶果壳的 XRD 曲线

Figure 3-3 Different (a) pretreatment time, (b) temperature and (c) ferric chloride concentration, and XRD curves of *Camellia oleifera* shells after pretreatment

3.4.4 水热联合白腐真菌预处理油茶果壳组分分析

由表 3-3 水热联合白腐真菌预处理后油茶果壳的组分变化可知，经过白腐真菌预处理后的油茶果壳木质素脱除率有所提高。水热联合真菌预处理和经醇提后的油茶果壳未经预处理后接菌，未经预处理的油茶果壳的纤维素含量及保留率降低了。其原因可能是，水热预处理油茶果壳水热预处理过程中产生的单糖及木聚糖被白腐真菌所利用，减少了白腐真菌对纤维素的侵蚀。在预处理过程中（130 °C 和 10 min），FeCl₃ 从 0 增加至 0.08 mol/L，其木质素脱除率为先上升后下降，最

高时为 30.56%，其纤维素保留率为 52.83%，半纤维素脱出为 58.97%。预处理组别 10-14 与预处理组别 16 的木质素相近，其可能是水热预处理中产生的抑制物过多抑制白腐真菌在油茶果壳发酵培养基上生长。

表 3-3 水热联合真菌预处理油茶果壳的组分变化

Table 3-3 Changes in the composition of *Camellia oleifera* shells pretreated by hydrothermal combined fungal treatment

组别	条件			预处理量 (%)	预处理固体的成分(%)		
	温度 (°C)	时间 (min)	FeCl ₃ 浓度 (mol/L)		纤维素	半纤维素	木质素
1	130	10	0	67.17	14.03±0.52	35.52±1.04	33.20±0.17
2	130	10	0.02	61.87	13.81±0.13	34.61±0.10	32.55±0.14
3	130	10	0.04	70.27	16.81±0.76	31.99±0.56	33.98±1.12
4	130	10	0.06	58.67	20.23±0.96	18.85±0.03	41.40±0.53
5	130	10	0.08	55.19	21.89±0.51	14.68±0.28	43.75±0.64
6	130	0	0.02	64.95	14.59±0.52	39.55±0.18	30.22±0.66
7	130	30	0.02	62.97	14.24±0.32	33.25±0.06	33.49±0.24
8	130	50	0.02	60.78	15.37±0.12	32.26±0.43	33.58±0.47
9	130	90	0.02	55.91	18.24±1.70	25.37±1.57	40.24±1.81
10	130	120	0.02	59.71	21.56±0.05	21.41±0.02	39.63±1.26
11	130	150	0.02	66.64	21.81±0.70	20.01±0.27	38.57±0.12
12	130	180	0.02	57.98	23.49±1.64	17.91±0.39	40.22±0.55
13	150	90	0.02	46.54	25.45±0.25	2.37±0.24	54.71±0.16
14	170	90	0.02	55.01	26.60±0.47	2.32±0.07	63.93±0.04
15	水热未接菌 ^a			77.15	17.13±0.19	32.86±0.39	32.21±0.54
16	原料无水热接菌 ^b			70.15	13.13±0.33	37.66±0.27	31.58±0.29

续表 3-3 水热联合真菌预处理油茶果壳的组分变化

组别	条件			预处理量 (%)	预处理后油茶果壳中组分回收率(%)		
	温度 (°C)	时间 (min)	FeCl ₃ 浓度 (mol/L)		纤维素保留率	半纤维素保留率	木质素脱除率
1	130	10	0	67.17	58.29±2.14	64.62±0.35	23.10±0.4
2	130	10	0.02	61.87	52.83±0.50	58.97±0.17	30.56±0.31
3	130	10	0.04	70.27	73.06±3.28	62.60±1.09	17.67±2.71
4	130	10	0.06	58.67	73.38±3.47	30.17±0.05	16.26±1.08
5	130	10	0.08	55.19	74.72±1.74	22.43±0.43	16.74±1.22
6	130	0	0.02	64.95	58.60±2.08	70.97±0.32	12.33±1.48
7	130	30	0.02	62.97	55.46±1.25	58.63±0.1	27.28±0.52
8	130	50	0.02	60.78	57.76±0.47	53.70±0.72	29.62±0.98
9	130	90	0.02	55.91	63.07±5.88	40.18±1.11	13.13±1.12
10	130	120	0.02	59.71	79.62±0.19	35.25±0.08	18.40±2.59
11	130	150	0.02	66.64	89.89±2.90	36.35±0.49	8.61±0.01
12	130	180	0.02	57.98	84.22±5.86	28.88±0.62	7.92±1.10
13	150	90	0.02	46.54	73.25±0.72	3.07±0.31	5.49±0.36
14	170	90	0.02	55.01	90.51±1.61	3.66±0.11	/
15	水热未接菌 ^a			77.15	81.73±0.89	69.84±0.83	14.32±1.44
16	原料无水热接菌 ^b			70.15	56.88±1.31	71.97±0.53	23.74±1.10

^a 醇提后的油茶果壳经 130 °C，FeCl₃ 添加 0.02mol/L 水热预处理时间 10 min 后经处理灭菌后未接入白腐真菌 *Trametes* sp.LS-10C，摇床培养 8 d；

^b 醇提后的油茶果壳未经水热预处理，补充氮源和水分后灭菌接入白腐真菌 *Trametes* sp.LS-10C，摇床培养 8 d。

3.4.5 水热联合白腐真菌预处理后产的粗酶液的酶活分析

表 3-4 预处理条件对粗酶液酶活的影响

Table 3-4 Effect of pretreatment conditions on the enzyme activity of crude enzyme solution.

组别	条件			漆酶酶活 (U/mL)	纤维素酶活 (U/mL)
	温度(°C)	时间(min)	FeCl ₃ 浓度 (mol/L)		
1	130	10	0	1.958±0.030	0.350±0.004
2	130	10	0.02	0.733±0.022	0.036±0.008
3	130	10	0.04	3.220±0.069	0.479±0.007
4	130	10	0.06	0.011±0.001	0.330±0.007
5	130	10	0.08	0.011±0.001	0.493±0.019
6	130	0	0.02	1.207±0.044	0.393±0.004
7	130	30	0.02	0.606±0.016	0.426±0.007
8	130	50	0.02	1.271±0.044	0.367±0.015
9	130	90	0.02	0.430±0.017	1.053±0.012
10	130	120	0.02	0.058±0.001	0.794±0.001
11	130	150	0.02	0.001±0.001	0.818±0.023
12	130	180	0.02	0.003±0.001	0.647±0.028
13	150	90	0.02	0.001±0.001	0.465±0.012
14	170	90	0.02	0.002±0.001	0.455±0.004
15	水热未接菌 ^a			0.008±0.001	0.426±0.012
16	原料无水热接菌 ^b			1.793±0.066	0.391±0.014

^a 醇提后的油茶果壳经 130 °C，FeCl₃ 添加 0.02mol/L 水热预处理时间 10 min 后经处理灭菌后未接入白腐真菌，摇床培养 8 d;

^b 醇提后的油茶果壳未经水热预处理，补充氮源和水分后灭菌接入白腐真菌，摇床培养 8 d。

水热联合白腐真菌预处理后产的粗酶液的酶活如表 3-4 所示，氯化铁的浓度对水热联合生物预处理的影响较大，水热预处理 130 °C，FeCl₃ 0.04 mol/L 以及预处理 10 min，其漆酶酶活最高为 3.22 U/mL，而纤维素酶活为 0.48 U/mL。当氯化铁的浓度过高时(0.06-0.08 mol/L)，未见白腐真菌生长在发酵培养基中，其可能是氯化铁浓度过高和水热预处理产生较多抑制物导致白腐真菌无法生存^[132]。根据纤维素酶活测定方法测得粗酶液的纤维素酶活均低于 2 U/mL，可能白腐真菌在预处理过程其酶生产偏向于降解木质素的漆酶，导致纤维素酶在白腐真菌培养过程中分泌少。

3.4.6 水热及水热联合白腐真菌预处理油茶果壳的酶水解

以固体基质为 2%的未预处理的油茶果壳以及预处理后的干燥油茶果壳，添加纤维素酶的酶载量为 20 FPU/g 干基，结果如表 3-5 所示。油茶果壳原料酶解 12 h 葡萄糖产率为 6.39±0.03%，酶解 24 h 葡萄糖产率为 12.07±0.71%。随着氯化铁浓度的增加，水热预处理的葡萄糖产率也增加，随着时间的增加，水热预处理的葡萄糖产率随着预处理时间的增加而增加。水热联合真菌预处理的酶解效率与

水热相比,均有所提高,结果表明,酶水解的增加可能是进一步脱出木质素所致。130 °C预处理 30 min 并添加 0.02 mol/L FeCl₃ 条件时,酶水解 24 h 后,水热预处理后酶解产率提高了 3.12 倍,水热联合白腐真菌 *Trametes sp.*LS-10C 预处理酶解产率提高了 4.77 倍。水热联合真菌预处理酶解得到的产率低,其结果可能是添加的基质浓度较少或者酶处理量低。

Wang 等^[85]采白腐菌和桦褐孔菌联合预处理玉米芯,其最高葡萄糖产量为 83.0%,但是其预处理时间长于本章节水热联合白腐真菌预处理,发酵时间为 8 d,远远短于白腐菌和桦褐孔菌联合预处理。陈肖肖^[89]采用 Fenton 预处理与桦褐孔菌联合预处理麦秆,其还原糖产率提高了 1 倍多,且预处理时间为 10 d。本章节水热联合白腐真菌 *Trametes sp.*LS-10C 预处理酶解产率较原料相比提高了 1.5 倍。

表 3-5 水热及水热联合真菌预处理油茶果壳的酶水解

Table 3-5 Enzymatic hydrolysis of *Camellia oleifera* shells by hydrothermal and hydrothermal combined fungal pretreatment

条件			葡萄糖产率(%)			
			水热预处理		水热联合真菌预处理	
温度 (°C)	时间 (min)	FeCl ₃ 浓度 (mol/L)	12/(h)	24/(h)	12/(h)	24/(h)
130	10	0	46.10±0.02	46.23±0.01	49.81±0.50	56.39±0.41
130	10	0.02	39.83±0.30	39.09±0.42	49.77±0.35	57.18±0.79
130	10	0.04	38.71±0.94	40.06±0.17	50.10±2.03	50.97±2.81
130	10	0.06	36.18±0.53	38.02±0.06	48.10±0.45	47.45±2.31
130	10	0.08	40.13±0.38	45.44±0.21	50.90±0.63	52.31±2.40
130	0	0.02	43.94±0.23	46.26±1.26	41.86±0.32	45.25±0.41
130	30	0.02	36.97±0.89	37.40±0.01	50.15±0.28	57.23±0.18
130	50	0.02	39.22±0.34	40.31±0.30	49.73±0.19	49.99±0.38
130	90	0.02	45.46±0.04	48.99±0.15	44.80±0.01	50.80±0.64
130	120	0.02	38.02±0.26	42.12±0.03	39.10±0.07	45.30±0.71
130	150	0.02	50.22±0.24	56.53±0.28	52.83±0.44	58.02±0.03
130	180	0.02	42.25±0.23	47.97±0.21	45.75±0.75	54.88±0.66
150	90	0.02	63.68±1.44	70.06±0.80	90.43±0.46	95.18±1.63
170	90	0.02	67.26±0.05	76.36±0.19	80.68±0.07	86.83±0.74
水热未接菌 ^a					42.75±0.04	45.05±0.34
原料无水热接菌 ^b					7.59±0.28	57.94±0.97

^a 醇提后的油茶果壳经 130 °C, FeCl₃ 添加 0.02mol/L 水热预处理时间 10 min 后经处理灭菌后未接入白腐真菌,摇床培养 8 d;

^b 醇提后的油茶果壳未经水热预处理,补充氮源和水分后灭菌接入白腐真菌,摇床培养 8 d。

3.5 本章小结

本研究建立了水热联合白腐真菌 *Trametes sp.* LS-10C 预处理方法。本研究旨在将生物预处理的时间缩短并提高酶水解产率，实现 *Trametes sp.* LS-10C 选择性分离油茶果壳中的半纤维素以及木质素，提高纤维素的保留率。探究了不同氯化铁(0-0.08 mol/L)、温度(130-170 °C)预处理时间(0-180 min)对油茶果壳中木质纤维素组分分离效果的影响，对水热预处理液进行抑制物检测，对水热预处理后的特征官能团及纤维素结晶度分析，同时对预处理后纤维素酶水解进行了考察。主要结果和结论如下：

(1) 水热预处理后的油茶果壳的特征官能团以及纤维素结晶度表明油茶果壳内部结构发生改变，纤维素结构可能被破坏。

(2) 水热联合白腐真菌预处理其木质素脱除率最高为 30.56%，为 130 °C 下油茶果壳添加量为 0.02 mol/L 预处理 10 min，其纤维素保留率为 52.83%，半纤维素脱出为 58.97%。水热联合白腐真菌 *Trametes sp.* LS-10C 预处理在一定程度上分离了木质素。

(3) 预处理后油茶果壳组分结构变松散，与纤维素酶吸附效率相对应。水热预处理方法其酶解产率提高了 3.12 倍，水热联合白腐真菌 *Trametes sp.* LS-10C 预处理酶解产率提高了 4.77 倍。

第 4 章 四氢糠醇联合氯化铁预处理油茶果壳产糖

4.1 引言

虽然生物预处理的环保特性和无抑制物的优势格外突出,但是第三章水热联合白腐真菌预处理后的油茶果壳酶水解效率低,其糖含量不利于用于后续微生物发酵,其可能是油茶果壳固有的高度木质化结构所导致。因此,需要寻找新的温和且高效的预处理方法来提高油茶果壳,实现木质纤维素选择性分离。在预处理过程中,通过有机溶剂预处理得到的木质素化学变化小、分子量均一、活性基团保留较多,易于被进一步改性加工成其他高附加值产品^[138]。低沸点有机溶剂因高挥发性及易燃,导致低沸点有机溶剂预处理过程中易存在安全隐患,限制了其运用价值^[139]。而四氢糠醇(Tetrahydrofurfuryl Alcohol; THFA)是一种高沸点溶剂且具有高效的木质素溶解性,是一种优异的预处理溶剂^[140]。Wang 等人^[82]利用对甲苯磺酸辅助 70% THFA 预处理竹子实现了 91%的木质素被有效脱除,半纤维素几乎完全被脱除,且产生的抑制物较少。在 THFA 有机溶剂预处理中 THFA 可以在不产生废液和废气的情况下进行回收,实现循环利用。

本章节采用氯化铁与四氢糠醇溶剂联合预处理醇提后的油茶果壳,通过单因素条件优化(提取时间、提取温度、四氢糠醇和氯化铁浓度),随后,采用响应面方法中心复合设计来确定油茶果壳的最佳预处理条件。进行了预处理对木质纤维素组成结构的影响的研究,用电子扫描显微镜、物理吸附仪、粒度仪和热重分析仪对预处理前后的油茶果壳的表观形貌、比表面积等理化性质进行表征分析,为后续的酶水解提供理论依据。对球磨的油茶果壳以及预处理液中的木质素进行分离纯化,进行傅里叶红外测定、荧光分光光度计、核磁共振以及 GPC 等表征分析。随后,以葡萄糖产率为指标,考察酶载量、基质浓度和添加剂(木聚糖酶、吐温 60、吐温 80、PEG10000 和 PEG20000)对油茶果壳在低酶载量和高浓度基质酶水解的影响。探究了 PEG10000 添加量对酶水解效率的影响,最后,为了进一步提高油茶果壳酶水解产率,探究了分批补料对预处理后油茶果壳高浓水解的影响,将获得的可发酵糖作为碳源用于圆红冬孢酵母发酵产微生物油脂。

4.2. 实验材料

4.2.1 实验原料

醇提油茶果壳预处理见章节 2.2.1。

4.2.2 实验试剂及设备

所用试剂、仪器见附录表 1、2。

4.3 实验方法

4.3.1 氯化铁-四氢糠醇预处理油茶果壳的方法

将 15.0 g 油茶果壳和 300 mL THFA/水溶液（50，70，80，90 以及 100%）与 FeCl_3 （0，0.02，0.04，0.06 以及 0.08 mol/L）催化剂放入石英内衬中混合后置于反应釜(1000 mL)中。通过釜盖上方热电偶监测温度，将混合物以 3 °C/min 的速率加热至不同的预处理温度（100，120，130，150 以及 170 °C），预处理过程中反应釜的搅拌桨以 600 rpm 进行机械搅拌，等反应釜温度达到预处理温度时开始计时，预处理时间为（0，20，30，40 以及 50 min）。反应结束后，立即将反应釜浸入冰水中快速冷却，直至反应釜温度降到室温为止。利用 80-120 μm 孔径的砂芯漏斗进行真空过滤，分离并收集预处理液和固体残渣。预处理液部分用于抑制物检测以及木质素的回收。预处理后的固体残渣用水洗涤至中性，冷冻干燥机 (-47 °C)冻干 48 h 后储存于自封袋中用于后续称重，纤维素，半纤维素和木质素的组分分析以及纤维素酶水解。部分固体残渣在烘箱 105 °C 下烘干 8 h，用于后续表征分析。

4.3.2 氯化铁-四氢糠醇预处理油茶果壳的优化

使用 Design Expert 13.0 软件设计中心组合实验(Central composite design; CCD)优化四氢糠醇联合氯化铁预处理条件，主要考察因素包括温度(130-170 °C)、时间(0-30 min)、 AlCl_3 浓度(0-0.04 mol/L)和 THFA 浓度(50%-90%)，然后通过软件分析各因素对木质素脱除率和纤维素保留率的影响，寻找最佳氯化铁和四氢糠醇预处理工艺。

CCD 实验是基于 4 因子和 3 水平，共设计 28 组实验，每组进行重复实验。通过使用 Design Expert 软件对实验结果进行分析，建立了结果响应数据的多元回归模型，并验证了回归模型的可靠性。CCD 实验设计表及对应响应值如表 4-1 所示。

表 4-1 CCD 实验设计表及对应响应值

Table 4-1 CCD experimental design table and corresponding response values

Run	X_1 THFA(%)	X_2 预处理 时间 (min)	X_3 FeCl ₃ 浓 度(mol/L)	X_4 预处理 温度 (°C)	Y_1 纤维素保留 率(%)	Y_2 木质素脱除 率(%)	预处理 量(%)
1	50	0	0	130	88.50±0.35	25.23±0.66	90.20
2	90	0	0	130	91.91±6.65	18.18±1.60	98.33
3	50	30	0	130	97.91±1.23	36.49±0.19	78.39
4	90	30	0	130	98.94±0.65	22.07±1.37	91.34
5	50	0	0.04	130	87.20±1.56	34.06±0.31	71.56
6	90	0	0.04	130	87.30±1.30	24.94±1.74	90.33
7	50	30	0.04	130	90.10±0.59	76.23±0.39	28.66
8	90	30	0.04	130	91.80±0.44	58.54±0.40	49.18
9	50	0	0	170	93.12±0.17	33.56±1.38	78.74
10	90	0	0	170	98.90±2.00	20.79±1.50	88.56
11	50	30	0	170	89.33±0.27	68.28±2.00	34.34
12	90	30	0	170	92.70±1.48	30.03±0.70	73.37
13	50	0	0.04	170	96.70±1.17	79.04±0.95	23.63
14	90	0	0.04	170	91.67±1.26	77.41±0.33	32.14
15	50	30	0.04	170	67.25±0.72	85.02±0.06	16.20
16	90	30	0.04	170	64.51±0.73	85.55±0.34	17.14
17	30	15	0.02	150	91.02±2.26	58.61±0.49	31.11
18	100	15	0.02	150	94.81±0.96	27.18±2.97	79.76
19	70	0	0.02	150	84.70±0.67	33.30±0.46	66.26
20	70	45	0.02	150	82.25±0.34	82.24±0.17	23.93
21	70	15	0	150	92.80±0.56	25.90±0.63	85.55
22	70	15	0.06	150	83.67±0.40	81.14±0.89	21.56
23	70	15	0.02	110	92.70±2.65	15.30±2.43	87.94
24	70	15	0.02	190	81.44±1.63	87.94±0.07	19.65
25	70	15	0.02	150	95.15±1.19	73.85±0.51	30.79
26	70	15	0.02	150	99.86±0.12	73.11±1.53	27.88
27	70	15	0.02	150	97.47±0.11	76.87±0.28	31.61
28	70	15	0.02	150	96.35±0.82	79.25±0.41	29.15

4.3.3 纤维素酶水解方法

准确称取 0.2 g 干燥的预处理后的油茶果壳和 20 mL 柠檬酸缓冲液(50 mmol/L, pH 4.8)混合在 150 mL 的蓝盖瓶中, 添加 10 FPU/g 纤维素酶干基, 在摇箱 50 °C 和 150 rpm 下进行酶解。同时, 以醇提后的油茶果壳作为对照进行上述操作。此外, 在不同纤维素酶用量(1, 3, 5, 7 和 10 FPU/g 干基)和基质浓度(2, 5, 7, 10, 12 和 15% w/v)下, 对预处理油茶果壳的酶水解能力进行了评估。为了从预处理后的油茶果壳中获得更多的葡萄糖, 将木聚糖酶、吐温 60、吐温 80、PEG10000 和 PEG20000 等添加剂以 40 mg/g 的干基添加量进行高浓度酶

解^[141]，并进一步确定添加剂的最佳用量。此外，本研究采用分批补料实验设计，在不同纤维素酶素酶水解阶段（12，24，36 以及 48 h）补加不同干基质量（3，5 以及 6% w/v），进而使得水解体系中的最终基质浓度达到 15% w/v。定期取 0.5 mL 的酶水解样，置于冰箱-20℃保存。将所取得的样品在 12000 rpm 离心 2 min，收集上清液稀释过 0.22 μm 有机系滤膜后，进样高效液相色谱仪。样品的酶水解效率计算公式见章节 3.3.6。

4.3.4 纤维素酶吸附试验方法

分别取未预处理的油茶果壳（即醇提后的油茶果壳）和预处理后的油茶果壳 0.4 g 和 20 mL 柠檬酸缓冲液(50 mmol/L, pH 4.8)混合在 150 mL 的蓝盖瓶中，加入初始纤维素酶，在 4℃ 条件下 150 rpm 摇床反应 2 h^[13]。反应结束后 8000 rpm 离心 10 min，取上清液测蛋白量，吸附的纤维素酶蛋白的质量计算为吸附实验前后液相中游离纤维素酶蛋白的质量之差，用吸附的纤维素酶蛋白质量除以初始纤维素酶的质量计算纤维素酶吸附率，每个实验重复进行。

4.3.5 木质素的提取和纯化方法

4.3.5.1 油茶果壳木质素的提取及纯化

油茶果壳中木质素的提取以及纯化方法参考^[13]。首先将球磨处理后的油茶果壳装入索氏提取器，以 1, 4-二氧六环为溶剂进行连续抽提，所得提取液经旋转蒸发浓缩后，向浓缩液中缓慢滴加 95%乙醇使半纤维素沉淀出来，离心并去除沉淀物，保留上清液并进行二次浓缩。将浓缩液与 10 倍体积的去离子水混合，用 HCl 调节 pH 至 1.5-2.0，10000 rpm 离心 2 min 后取沉淀部分，用去离子水洗涤及冷冻干燥(-47℃)下 48 h。进一步纯化时，将粗木质素溶解于 90%乙酸溶液，加入 10 倍体积的去离子水后再次用 HCl 调节 pH 至 1.5-2.0，重复离心、洗涤与冷冻干燥步骤，实验流程与上述一致，得到纯木质素，再重复一次纯化步骤得到高纯度木质素。由于该木质素来源于球磨预处理的油茶果壳，故在本研究中命名为 MWL。

4.3.5.2 氯化铁-四氢糠醇预处理液中木质素的提取和纯化

根据 Ma 等人^[142]报道的方法提取和纯化溶解在 THFA 溶液中的木质素，其方法为用 HCl 调节回收的预处理液 pH 至 1.5-2.0，经 10000 rpm 离心 2 min 后收集固体沉淀。沉淀物经去离子水反复洗涤至中性，随后在真空冷冻干燥机中-47℃冻干 48 h。其操作与油茶果壳中木质素的提取以及纯化方法上述相同。因

为该木质素从四氢糠醇预处理液中提取得到,在本文中被命名为 THFA-木质素。

4.3.6 木质纤维素组分的测定方法以及抑制物检测

具体测定方法同章节 3.3.3。

4.3.7 氯化铁-四氢糠醇预处理后油茶果壳的表征分析

氯化铁-四氢糠醇预处理后的油茶果壳 ($0.037 \text{ mol/L FeCl}_3$ 在 170°C 下保持 0 min) 和未预处理的油茶果壳 (醇提后的油茶果壳) 进行表征分析。FT-IR 测定方法具体见章节 3.3.2。称取约 5.0 mg 的样品在热重分析仪研究失重率。采用扫描电子显微镜观察样品表面特征结构。采用粒度仪检测样品的表面电荷量,将样品分散到去离子水中,置于粒度仪上进行 Zeta 电位检测。采用核磁共振仪波谱在分子水平上表征样品的化学结构组成,取 60 mg 固体样品溶于 0.5 mL 氘化二甲基亚砜,然后置于核磁共振波谱仪中测定样品的 2D HSQC NMR 图谱。

4.3.8 油茶果壳木质素和四氢糠醇木质素的表征分析

球磨后的油茶果壳木质素和四氢糠醇木质素为表征分析的样品。FT-IR 测定方法具体见章节 3.3.2。取样品称重 8.0 mg ,溶解于 100 mL 乙醇中,用荧光分光光度计测定其 3D 荧光强度。紫外分光光度计在 $200\text{-}800 \text{ nm}$ 扫描范围内,液层厚度为 1 cm ,分析紫外吸收系数。木质素分子量采用凝胶渗透色谱法配备折射率检测器(RID-10A),在 50°C 的色谱柱[PLgel $10 \mu\text{m MIXED-B}$ ($300 \text{ mm} \times 7.5 \text{ mm}$)]温度下,以 1.0 mL/min 流速,流动相为四氢呋喃。

4.4 结果与讨论

4.4.1 氯化铁-四氢糠醇的预处理条件的优化

4.4.1.1 单因素优化

通过了研究氯化铁-四氢糠醇的预处理过程中 THFA 浓度、氯化铁浓度、预处理温度和预处理时间对油茶果壳组分分析效果的影响,确定单因素的最佳条件。如图 4-1b 所示,随着 THFA 浓度的增加,油茶果壳纤维素保留率相差不大,均在 93% ,当 THFA 浓度为 90% 时其纤维素保留率在 98% ,THFA 浓度为 $70\text{-}90\%$ 的木质素脱出率在 80% 左右,考虑到成本问题,氯化铁-四氢糠醇的预处理油茶果壳采用 70% THFA 浓度为最佳量。考察氯化铁浓度时 (图 4-1c), 0.02 mol/L 为最佳使用量;随着预处理时间的增加 (图 4-1a),纤维素及木质素先增加,到 20 min 达到最大,纤维素保留率为 98% ,木质素脱出率为 81% ,随后随着时间的增加,纤维素保留率和木质素脱出率开始下降。

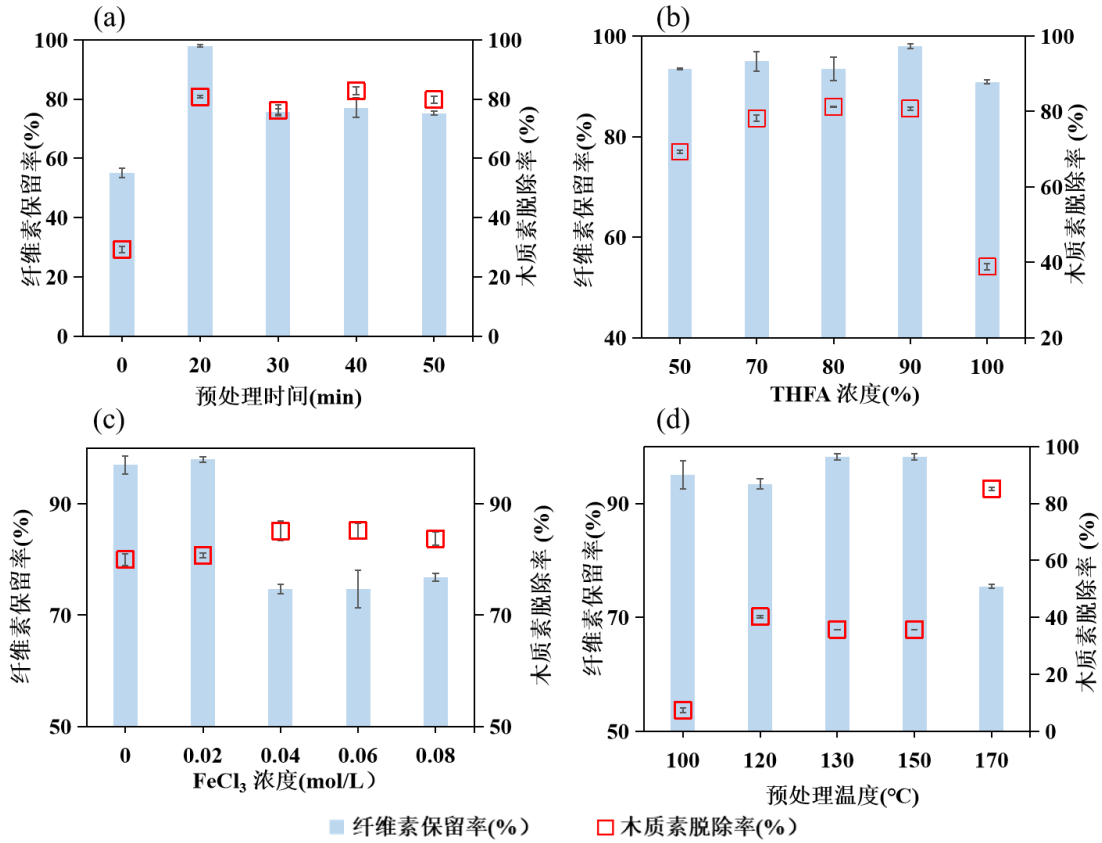


图 4-1 不同预处理(a)预处理时间, (b)THFA 浓度, (c)氯化铁浓度以及(d)预处理温度对油茶果壳组分的影响

Figure 4-1 Effects of different pretreatment (a) pretreatment time, (b) THFA concentration, (c) ferric chloride concentration and (d) pretreatment temperature on the husk components of *Camellia oleifera* shells

4.4.1.2 响应面优化

多元回归模型将自变量 (THFA 浓度, FeCl₃ 浓度, 预处理温度和预处理时间) 与响应值 (纤维素保留率和木质素脱除率) 之间的关系通过以下二次方程 (Eq.1)和(Eq.2)表示为设计编码因子:

$$Y_1 = 97.23 + 0.4058 \times X_1 - 0.1525 \times X_2 - 1.35 \times X_3 - 1.02 \times X_4 + 0.0163 \times X_1 \times X_2 - 1.25 \times X_1 \times X_3 - 0.3312 \times X_1 \times X_4 - 3.44 \times X_2 \times X_3 - 5.62 \times X_2 \times X_4 - 2.14 \times X_3 \times X_4 - 0.7110 \times X_1^2 - 3.35 \times X_2^2 - 1.93 \times X_3^2 - 1.79 \times X_4^2 - 1.01 \times X_1 \times X_3 \times X_4 - 2.24 \times X_2 \times X_3 \times X_4 - 2.69 \times X_1^2 \times X_2 - 3.09 \times X_1^2 \times X_3 - 1.50 \times X_1^2 \times X_4 \quad (4-1)$$

$$Y_2 = 75.77 - 7.29 \times X_1 + 9.80 \times X_2 + 15.40 \times X_3 + 16.60 \times X_4 - 3.18 \times X_1 \times X_2 + 1.99 \times X_1 \times X_3 - 0.9687 \times X_1 \times X_4 + 1.13 \times X_2 \times X_3 - 2.78 \times X_2 \times X_4 + 4.37 \times X_3 \times X_4 - 8.76 \times X_1^2 - 5.06 \times X_2^2 - 5.76 \times X_3^2 - 7.36 \times X_4^2 + 2.68 \times X_1 \times X_3 \times X_4 - 6.43 \times X_2 \times X_3 \times X_4 - 5.83 \times X_1^2 \times X_4 \quad (4-2)$$

式中 Y_1 、 Y_2 分别代表纤维素保留率和木质素脱除率, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 分别代

表 THFA 浓度、预处理时间、FeCl₃ 浓度、预处理温度。根据表 4-2 中描述的方差分析(ANOVA), 纤维素保留率和木质素脱除率模型的 p 值小于 0.0001, 但由于缺乏拟合, p 值大于 0.1, 这表明两个回归模型都具有统计学意义。两种回归模型的变异系数值均低于 10%, 说明实验数据具有良好的精度和可靠性。

表 4-2 纤维素保留和木质素脱除率的多元回归模型的方差分析结果

Table 4-2 ANOVA results of the multiple regression model for cellulose recovery and delignification

方差来源	纤维素保留率(%)			木质素脱除率(%)		
	Ratio	F-value	P-value	Ratio	F-value	P-value
模型	1787.50	36.22	<0.0001	17548.70	47.48	<0.0001
Intercept	97.25	/	/	75.78	/	/
X ₁ -THFA 浓度(%)	0.40	3.92	1.51	-7.29	58.63	< 0.0001
X ₂ -预处理时间(min)	-0.15	0.18	0.07	9.80	105.94	< 0.0001
X ₃ -FeCl ₃ 浓度(mol/L)	-1.35	14.58	5.61	15.40	261.68	< 0.0001
X ₄ -预处理温度(°C)	-1.03	8.40	3.24	16.60	101.41	< 0.0001
X ₁ X ₂	0.02	0.01	0.01	-3.18	7.45	0.0212
X ₁ X ₃	-1.26	25.25	9.72	1.99	2.93	0.1180
X ₁ X ₄	-0.33	1.76	0.68	-0.97	0.70	0.4253
X ₂ X ₃	-3.44	189.75	73.04	1.13	0.95	0.3547
X ₂ X ₄	-5.62	505.13	194.44	-2.78	5.69	0.0382
X ₃ X ₄	-2.14	73.53	28.31	4.37	14.05	0.0038
X ₁ ²	-0.72	12.43	4.79	-8.77	84.87	< 0.0001
X ₂ ²	-3.36	270.51	104.13	-5.06	28.21	0.0003
X ₃ ²	-1.93	89.61	34.49	-5.76	36.57	0.0001
X ₄ ²	-1.79	77.31	29.76	-7.37	59.93	< 0.0001
X ₁ X ₃ X ₄	-1.01	16.20	6.24	2.68	5.29	0.0442
X ₂ X ₃ X ₄	-2.24	80.55	31.01	-6.43	30.44	0.0003
X ₁ ² X ₂	-2.69	38.70	14.90	/	/	/
X ₁ ² X ₃	-3.09	51.05	19.65	/	/	/
X ₁ ² X ₄	-1.49	11.90	4.58	-5.83	8.34	0.0162
失拟项	/	0.44	0.80	/	3.34	0.1752
变异系数(%)		1.78			8.85	
信噪比		25.86			19.99	
测定 R ²		0.99			0.99	
调整 R ²		0.96			0.97	
预测 R ²		0.78			0.82	

根据表 4-2 可知, 纤维素保留率的信噪比 25.86 和木质素脱除率的信噪比 19.99 的精度值在大于 4, 表明该模型可用于准确预测。对于决定系数(R²), 两个回归模型均大于 0.9, 调整后的决定系数也大于 0.9, 表明模型与实验数据的拟合良好。与其他自变量相比, 预处理时间对纤维素保留率($p=0.07$)和木质素脱除率($p<0.0001$)均有显著影响, 而预处理时间与 THFA 浓度对纤维素保留率 ($p=0.01$)

和木质素脱除率数($p=0.0212$)的交互作用显著。预处理温度与预处理时间木质素脱除率($X_2X_4=0.0382$)的 p 以及预处理温度与 FeCl_3 浓度木质素脱除率($X_3X_4=0.0038$)的 p 值有显著的交互作用。

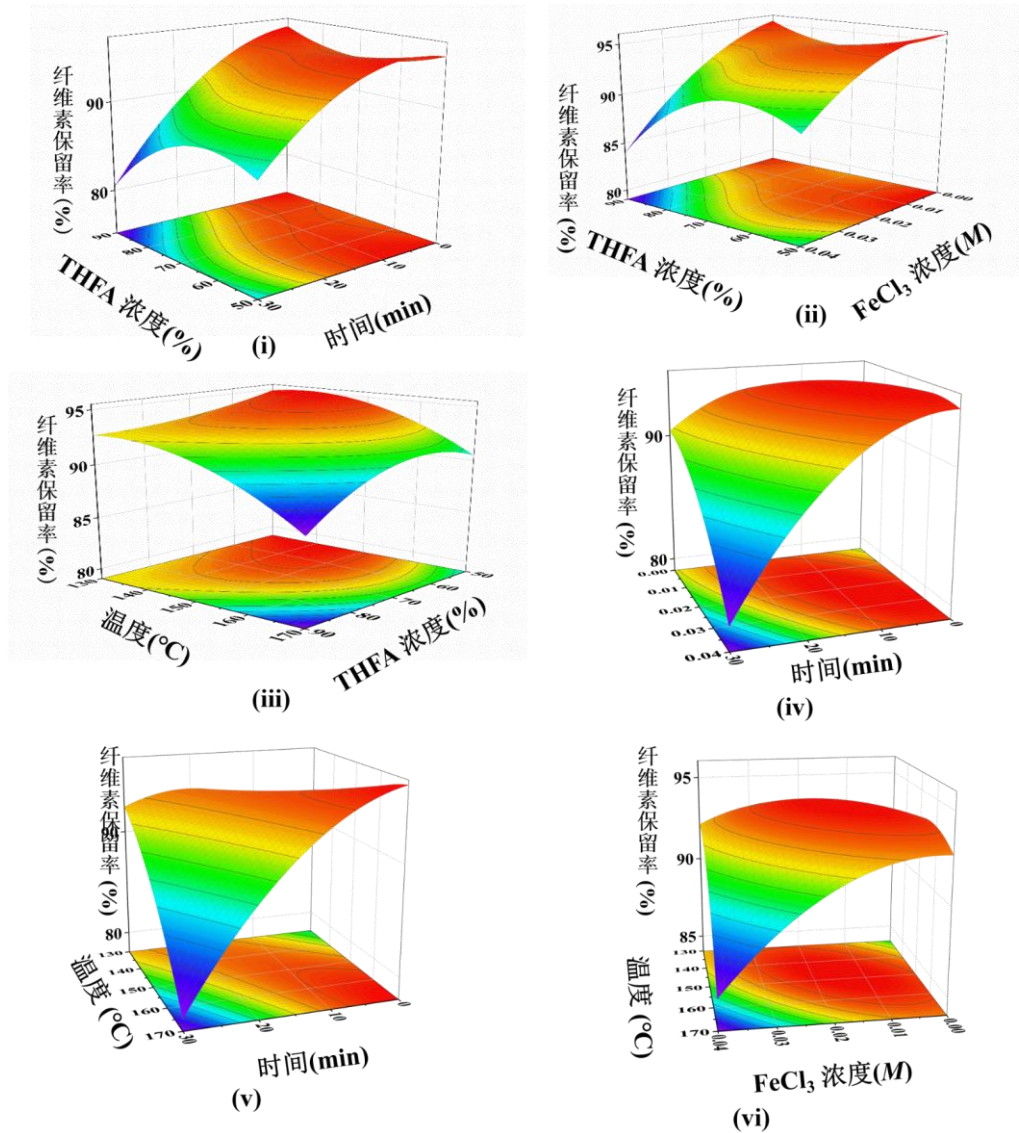


图 4-2 纤维素保留率的 3D/2D 响应面 (i)THFA 浓度与时间, (ii)THFA 浓度与氯化铁浓度, (iii)THFA 浓度与温度, (iv)温度与 THFA 浓度, (v)温度与时间, (vi)温度与氯化铁浓度
Figure 4-2 3D/2D response surface plot of cellulose retention rate (i) THFA concentration and time, (ii) THFA concentration and ferric chloride concentration, (iii) THFA concentration and temperature, (iv) temperature and THFA concentration, (v) temperature and time and (vi) temperature and ferric chloride concentration.

三维响应面和二维等高线图, 显示了变量与响应值之间的响应关系。例如, 在保持预处理条件 FeCl_3 浓度(0.02 mol/L)以及预处理温度(150°C)不变的情况下, THFA 浓度和预处理时间对纤维素保留率和木质素脱除率的影响为在较低的

THFA 浓度(50-63%)范围内,随着预处理时间从 0~30 min 的增加,观察到木质素脱除率适度下降。THFA 浓度在 64~90%时较高,但随时间延长呈现急剧上升后逐渐下降的趋势。观察结果表明,在预处理后油茶果壳的纤维素的保留率和木质素脱除率中,THFA 浓度和预处理时间之间存在显著的相互作用,这意味着通过适当降低 THFA 浓度,可以在很短的预处理时间内实现木质纤维素的有效解构。

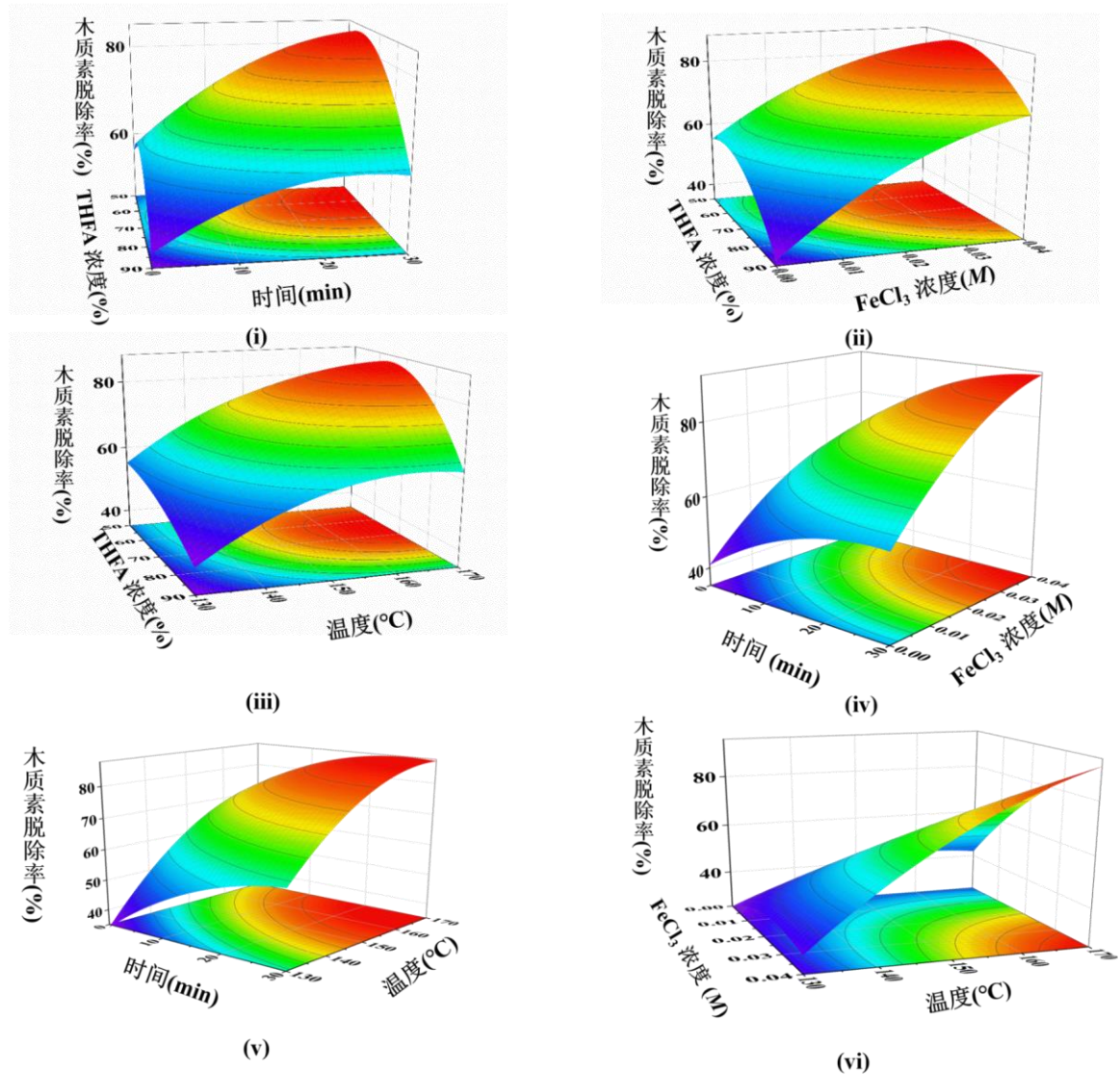


图 4-3 木质素脱除率的 3D/2D 响应面 (i)THFA 浓度与时间, (ii)THFA 浓度与氯化铁浓度, (iii)THFA 浓度与温度, (iv)温度与 THFA 浓度, (v)温度与时间, (vi)温度与氯化铁浓度
Figure 4-3 3D/2D response surface diagram of delignification (i) THFA concentration and time, (ii) THFA concentration and ferric chloride concentration, (iii) THFA concentration and temperature, (iv) temperature and THFA concentration, (v) temperature and time and (vi) temperature and ferric chloride concentration.

利用 Design Expert 软件优化得到最佳条件为 0.037 mol/L FeCl_3 浓度和 62%

THFA 浓度在 170 °C 保温 0 min, 预测最大纤维素保留率和木质素脱除率分别达到 97.69% 和 88.17%。在此优化条件下, 油茶果壳预处理后的纤维素保留率和木质素脱除率分别为 $92.82 \pm 0.11\%$ 和 $85.32 \pm 0.62\%$, 纤维素保留率和木质素脱除率 p 值均大于 0.05, 实验数据与预测数据无显著差异。半纤维素去除率为 $92.20 \pm 0.07\%$, 预处理后固体残渣回收率为 $22.33 \pm 1.03\%$ 。预处理后的油茶果壳中纤维素含量比原料提高了 3.2 倍, 达到 $66.61 \pm 0.09\%$, 半纤维素和木质素分别为 $12.64 \pm 0.35\%$ 和 $20.79 \pm 0.41\%$ 。

氯化铁-四氢糠醇预处理后的预处理液中糠醛含量为 1.23 ± 0.13 g/L, 乙酸含量为 4.21 ± 0.05 g/L, 葡萄糖含量为 1.93 ± 0.62 g/L, 木糖含量为 8.58 ± 0.34 g/L, 低聚糖含量为 4.01 ± 0.07 g/L。结果表明, 预处理液中脱除的木聚糖主要以木糖的形式存在。这些结果与 Tang 等人^[143]报道的结果不同, 他们用 THFA 水溶液在 150 °C 下预处理 30 min, 结果表明去除的木聚糖难以直接降解为木糖。研究为利用 THFA 和 FeCl₃ 从油茶果壳中高效生产木糖提供了可能性。

通过采用不同的预处理方法 (表 4-3) 分离油茶果壳以及农林废弃物的木质纤维素表明, 实现最佳木质素脱除率同时纤维素损失量最小是具有挑战性的。Qiu 等人^[144]用 0.21 mol/L 的丙酮酸在 130 °C 下预处理油茶果壳 30 min 后, 仅达到 8% 的木质素脱除率, 随着预处理时间延长至 70 min 时, 油茶果壳的木质素脱除率增加到 17%, 但是, 油茶果壳的纤维素回收率从 73% 下降到 65%。在加入有机溶剂 (γ -戊内酯、乙醇、醋酸、甘油等)^[145-147]或 FeCl₃ 催化剂^[148-152]提高了木质纤维素的木质素去除率 (大于 70%), 但各组分的纤维素保留率中可以发现, 木质纤维素中大量的纤维素在预处理过程中被溶解, 存在较高的纤维素损失量。相比之下, 本研究在较温和的预处理条件下 (170 °C 保持 0 min, 62% THFA, 0.037 mol/L 和 FeCl₃) 成功地从醇提后的油茶果壳中去除了 85% 的木质素, 同时保留了 93% 的纤维素。

氯化铁-四氢糠醇预处理既安全又可控, 其预处理在密封的不锈钢反应器中进行, 该反应器内衬特氟龙, 使得预处理温度控制在 170 °C (低于 THFA 的沸点), 防止了 THFA 溶剂和氯化铁泄漏或挥发, 从而避免损坏钢制反应器, 另一方面, 廉价的氯化铁催化剂^[148]可以通过膜分离技术从废预处理液中轻松回收。因此, 氯化铁联合四氢糠醇的木质纤维素预处理方法在工业规模操作中展现出极大的可行性和前景。

表 4-3 木质纤维素生物质分离中不同预处理方法的比较

Table 4-3 Comparison of different preprocessing methods on the separation of lignocellulosic biomass

原料	预处理条件				预处理后油茶果壳组分回收率(%)			参考文献
	溶剂	催化剂	温度(°C)	时间(min)	纤维素保留率	半纤维素保留率	木质素脱除率	
油茶果壳	甘油	/	180	180	82	33	39	[146]
	甘油	3% H ₂ SO ₄	160	150	38	100	78	[147]
	醋酸	0.6% H ₂ SO ₄	125	100	88	86	68	[153]
	水	0.5% ZnCl ₂	170	30	80	91	5	[154]
	水	2 mol/L 苹果酸	120	30	66	85	27	[155]
	γ -戊内酯	/	200	120	71	93	89	[145]
	乙醇	/	200	120	76	74	72	[145]
	水	0.21 mol/L 丙酮酸	130	30	73	72	8	[144]
	水	0.21 mol/L 丙酮酸	130	70	65	81	17	[144]
	THFA	0.037 mol/L FeCl ₃	170	0 ^a	93	92	85	本章节
水稻秸秆	THFA	0.06 mol/L AlCl ₃	150	30	98	93	90	[143]
甘蔗渣	乙二醇	0.05 mol/L FeCl ₃	130	90	86	99	65	[149]
水稻秸秆	甘油	0.06 mol/L FeCl ₃	150	20	96	86	72	[156]
油菜籽秸秆	水	0.25 mol/L FeCl ₃	138	20	71	93	12	[150]
甘蔗渣	水	0.1 mol/L FeCl ₃	160	30	70	100	0	[151]
甘蔗渣	乙醇	0.025 mol/L FeCl ₃	170	60	94	96	53	[152]
桉树	水	0.1 mol/L FeCl ₃	170	30	85	84	0	[148]

^a 当反应温度从室温升高到 170°C，即在 170°C 下保持 0 min 时，立即将反应器容器浸入冰水中冷却。

4.4.2 预处理前后油茶果壳的表征分析

4.4.2.1 红外分析

经过 THFA-FeCl₃ 预处理(62% THFA, 0.037 mol/L FeCl₃, 170 °C 保持 0 min)的油茶果壳与未处理的油茶果壳相比较，油茶果壳中 1250cm⁻¹ 处的红外峰（与木质素中 C-O-C 拉伸振动对称相关）几乎消失（图 4-4），表明木质素分数下降，其对应于预处理后木质素含量从 30%下降到 21%。此外，1725cm⁻¹ 处的吸收谱带（与烷基芳基酯中的 C=O 振动有关）减弱。这可能是因为来自半纤维素侧链中乙酰基被溶解，从而进一步促进了乙酸的形成^[157]。Wen 等人^[158]证明木质素和乙

酰基的去除可以增强木质纤维素的水解。

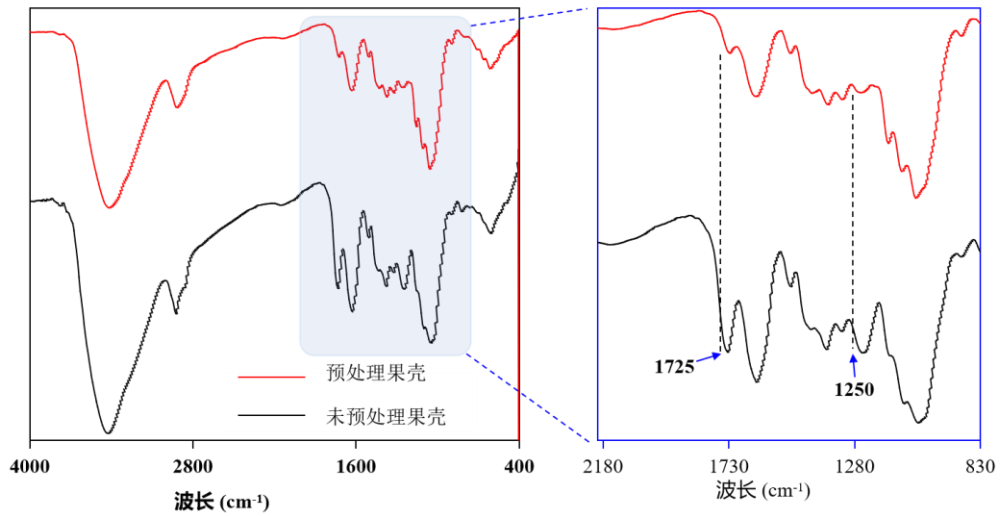


图 4-4 未处理和预处理后的油茶果壳 FT-IR 曲线

Figure 4-4 FT-IR curves of untreated and pretreated *Camellia oleifera* shells

4.4.2.2 热重分析

当热解温度从室温提高到 400 °C 时，预处理前后油茶果壳的失重率如图 4-5 所示，当温度为 400 °C 时预处理前后油茶果壳的降解率分别为 64% 和 82%。同时，经预处理的油茶果壳的最大导数峰从 295 °C 升高到 345 °C。结果表明，经预处理的油茶果壳的热稳定性得到了明显的提高。这可能是因为油茶果壳经预处理后，部分热不稳定物质（如木质素）从油茶果壳中脱除，而预处理后的固体残渣中大量积累了热稳定物质，如纤维素，这与上述情况相对应^[106]。

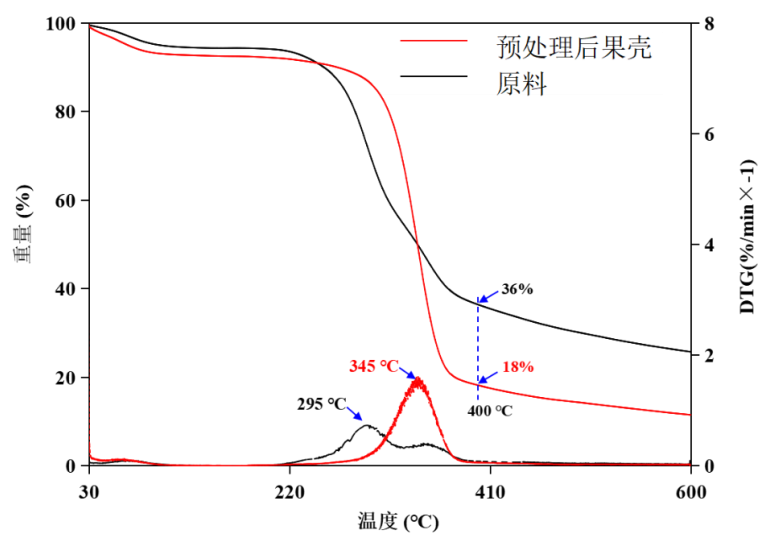


图 4-5 未处理和预处理油茶果壳的 TG 曲线

Figure 4-5 TG curves of untreated and pretreated *Camellia oleifera* shells

4.4.2.3 电镜分析

油茶果壳经 0.037 mol/L FeCl_3 在 170 °C 下保持 0 min 预处理后，由 SEM 图像显示（图 4-6），预处理前后的油茶果壳发生了明显的形态学变化，从最初光滑致密的表面变得粗糙松散，完整的外壳经预处理破碎成更小的切片和纤维，从而暴露了内部结构。在 SEM 图像还观察到预处理后的固体残渣表面出现了较大的空腔，这意味着内部微孔结构也可能发生了变化。

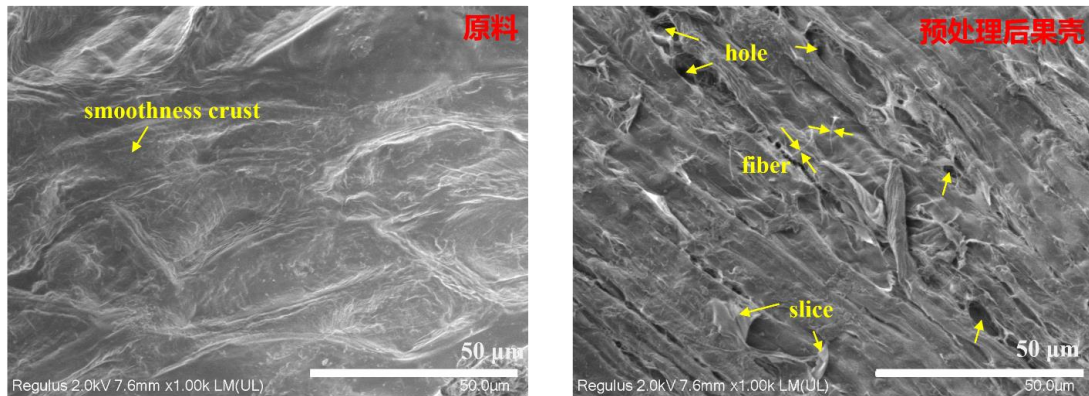


图 4-6 未处理和预处理油茶果壳的 SEM 图像

Figure 4-6 SEM images of untreated and pretreated *Camellia oleifera* shells

4.4.2.4 比表面积、孔体积和孔径分析

未经处理的油茶果壳的比表面积、孔体积和孔径分别为 $0.24 \text{ m}^2/\text{g}$ 、 $1.04 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$ 和 3.36 nm 。其比表面积、孔体积和孔径远低于农林生物质（如稻草和桉树）^[159, 160]。预处理后的油茶果壳比表面积和孔隙体积分别增加了 24.6 倍和 34.3 倍，分别达到 $6.15 \text{ m}^2/\text{g}$ 和 $36.75 \times 10^{-3} \text{ cm}^3/\text{g}$ ，表明预处理后的油茶果壳结构变得松散，使油茶果壳的可接触面积增大，有助于在酶水解中更好的吸附纤维素酶，以提高酶水解效率。

4.4.2.5 电荷分析

经过预处理的油茶果壳的电位值从 -35.1 mv 增加到 -29.9 mv，预处理降低了油茶果壳表面的负电荷，这可能是由于去除了木质素和乙酰基等带负电荷的物质。这种还原可能会削弱纤维素酶与油茶果壳之间的吸附阻力^[160]。

4.4.2.6 纤维素酶吸附分析

预处理后的油茶果壳对纤维素酶的吸附效率达到 56.3%，是未处理的 6.9 倍。这表明预处理后的油茶果壳经预处理后，其纤维素酶吸附能力有明显提升，氯化铁联合四氢糠醇的预处理可能在酶水解上具有促进作用。

4.4.3 氯化铁-四氢糠醇的预处理前后的酶水解

当基质浓度固定在 5% 时, 纤维素酶载量增加到 10 FPU/g 干基时 (图 4-7), 预处理油茶果壳酶水解 48 h 后葡萄糖产率为 71%, 高于先前报道的^[161]。他们以 15 FPU/g 干基水解乙酸预处理的油茶果壳, 酶效率仅为 50%。但是, 这一结果仍略低于水稻秸秆、桉树、玉米秸秆等的葡萄糖产率(90%)^[157, 162, 163], 这可能是由于果壳固有的高度木质化结构所致。

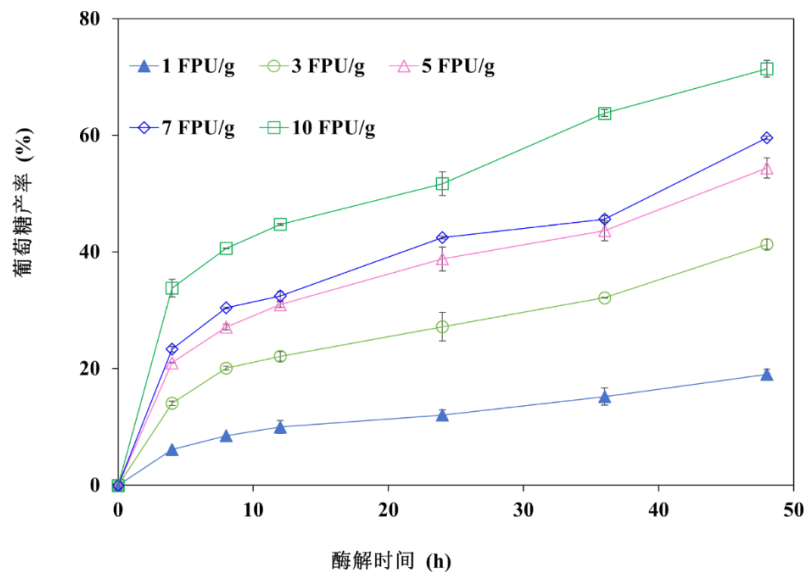


图 4-7 5% 基质浓度的纤维素酶载量(FPU/g)

Figure 4-7 Cellulase loading with 5% solids content (FPU/g)

以 2% 基质浓度和 10 FPU/g 干基水解 24 h 的预处理油茶果壳的葡萄糖产率为 $69.36 \pm 0.40\%$, 比未处理的油茶果壳($11.53 \pm 0.90\%$)提高了 6.0 倍 (图 4-8), THFA-FeCl₃ 预处理后油茶果壳酶水解效率明显增强。这可能是由于纤维素酶对预处理油茶果壳的可及性增加所致。

然而, 在 5 FPU/g 干基条件下, 当基质浓度从 2% 增加到 15% 时, 葡萄糖产率急剧下降, 特别是预处理后的油茶果壳在水解 24 h 后未能完全液化。基质浓度 10%, 12%, 15% 时, 预处理油茶果壳表现出难液化现象。在 15% 基质浓度下酶水解 84 h 后, 仅获得 50% 的葡萄糖产率。这可能归因于高浓度基质在酶水解过程中的传质阻力以及木质素纤维素酶^[153]的非生产性吸附。

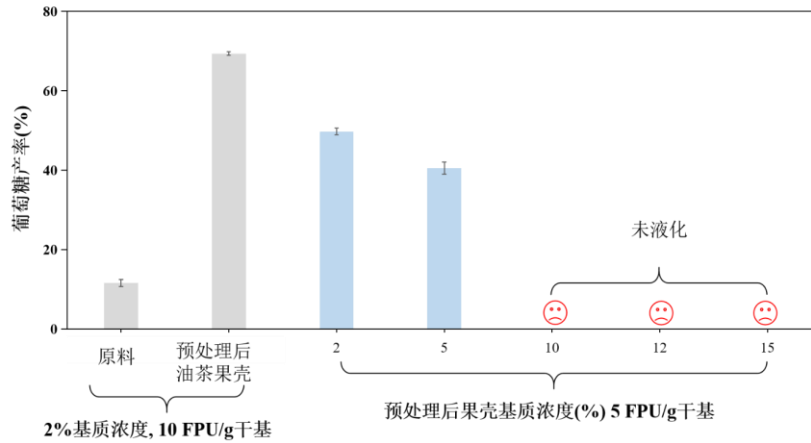


图 4-8 5 FPU/g 干基的基质浓度对水解 24 h 葡萄糖产量的影响

Figure 4-8 Effect of solid loading of 5 FPU/g dry substrate on glucose yield from hydrolysis for 24 h

为提高预处理油茶果壳的高浓度水解效率，在基质浓度为 15% 时，使用 5 FPU/g 干基进行酶解时，添加各种添加剂可能可以提高酶水解效率^[141]。根据图 4-9 可知，吐温 80，吐温 60，PEG10000 以及 PEG20000 的葡萄糖产率比未添加的高，都对酶水解有促进作用（图 4-9）。与其他添加剂相比，PEG10000 的加入使水解 72 h 后的葡萄糖产率显著提高 62%。预处理后的油茶果壳的酶水解液化时间明显缩短，水解产物中葡萄糖浓度最高可达 69 g/L。

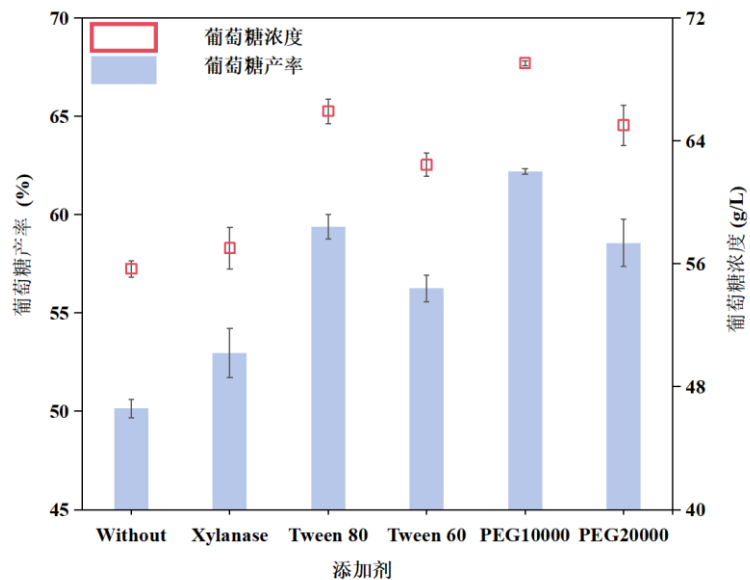


图 4-9 不同添加剂对酶水解的影响

Figure 4-9 Effect of different additives on enzymatic hydrolysis

在 5 FPU/g 干基和 15% 基质浓度条件下，PEG10000 添加量同样影响着葡萄糖产率。由图 4-10 可知，随着添加量的增加，葡萄糖产率呈现先升高后降低的

趋势，40mg/g 干基添加量为最佳，并在后续的分批补料实验中采用，以进一步提高预处理后油茶果壳的高浓度水解。

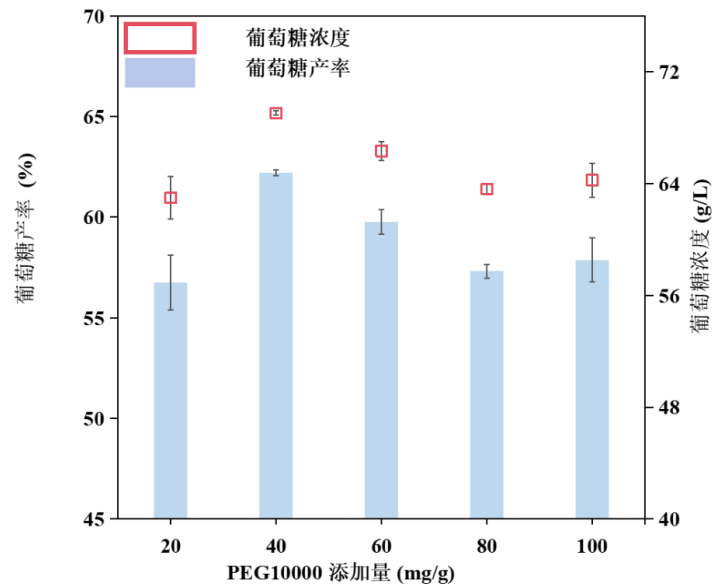


图 4-10 PEG10000 添加量对酶水解的影响

Figure 4-10 Effect of PEG10000 addition on enzymatic hydrolysis

根据文献^[141, 143]，在 5 FPU/g 干基条件下，初始基质浓度为 3%、5%和 6%的情况下，按表 4-3 在初始基质浓度选择 PEG10000 的添加以及在 12, 24, 36 和 48 h 时添加预处理后的油茶果壳，使最终基质浓度达到 15%。

表 4-4 预处理后油茶果壳分批补料的酶水解

Table 4-4 Enzymatic hydrolysis of *Camellia oleifera* shells with batch supplementation after pretreatment

序号	初始水解体系		补充预处理的油茶果壳 (%, w/v)				84 h 糖产率 (%)	84 h 糖浓度 (g/L)
	基质浓度 (%, w/v)	PEG10000 (mg)	12 h	24 h	36 h	48 h		
1	15	0	0	0	0	0	50.14±0.47	55.67±0.53
2	6	0	6	3	0	0	51.17±0.02	56.81±0.05
3	6	120	6	3	0	0	69.59±0.49	76.87±0.54
4	5	0	5	5	0	0	67.66±1.97	75.11±2.19
5	5	120	5	5	0	0	85.25±1.06	95.47±1.18
6	3	0	3	3	3	3	55.43±0.01	61.54±0.18
7	3	120	3	3	3	3	66.50±0.68	73.29±0.75

根据表 4-4 可知，2 号中 51%的葡萄糖产率与 1 号中 50%的葡萄糖产率相似，而明显低于 4 号的 68%，这表明初始基质浓度的减少有助于水解的改善。然而，当初始基质浓度为 3%时，6 号的葡萄糖产率仅为 55%，6 号在 12, 24, 36 和 48h 均进行了预处理后的油茶果壳的添加。由此得出结论，在分批补料中投料

频率对葡萄糖产量有关键影响，这与之前报道的^[141]一致。在 PEG10000 的作用下，葡萄糖产量显著提高，从 2 号与 3 号的糖产率可以看出，在添加 PEG10000 120 mg 后，其糖产率提高了 19%；4 号与 5 号之间糖产率提高了 17%；6 号与 7 号之间糖产率提高了 11%。当初始基质浓度为 5%，PEG10000 为 120 mg，在 12 h 和 24 h 分别添加了 5% 的预处理油茶果壳的 5 号是最好的分批补料策略，葡萄糖浓度为 95 g/L，比初始基质浓度即为 15% 的 1 号糖浓度提高了 0.7 倍。

4.4.4 球磨木质素和四氢糠醇木质素的表征分析

4.4.4.1 红外分析

图 4-11 描述了 MWL 与 THFA-木质素的官能团差异，导致 THFA-木质素在 1723 cm^{-1} （与烷基芳基酯的 C=O 振动有关）和 1374 cm^{-1} （与乙酰基的 C=O 振动有关）处的吸收带与 MWL 相比消失。这进一步证明了预处理过程中木质素-碳水化合物复合物中乙酰基的降解。

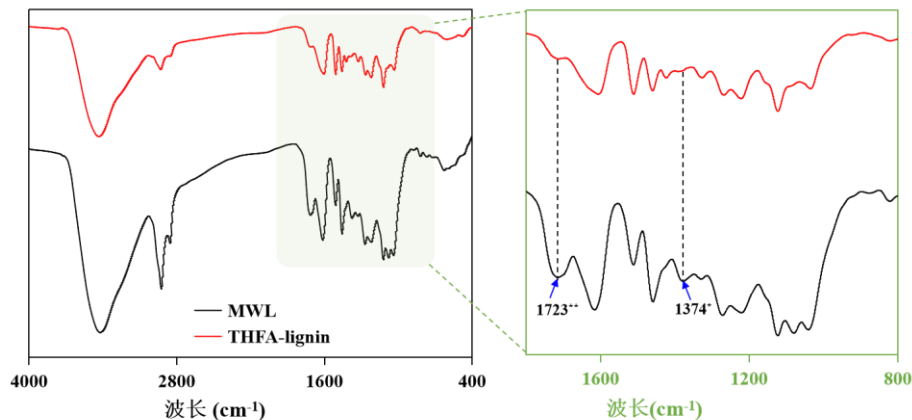


图 4-11 木质素样品的 FT-IR 曲线

Figure 4-11 FT-IR curves of lignin samples

4.4.4.2 核磁共振分析

在脂肪族区域（图 4-12），常见的单位间键（即 β -O-4（A 和 A'）、 β -5（C）、 α -O-4（C）、 β - β （B）和 -OCH₃）在 MWL 中被表征。然而，在 THFA-FeCl₃ 预处理后（图 4-12），在 THFA-木质素中没有观察到 63.0/4.36 ppm 的信号（指在 A' 中具有 γ -酰化 β -O-4 的烷基-芳香醚），这可能表明木质素与碳水化合物（如木聚糖）连接的侧链区域中 γ 位置的乙酰基被脱除。THFA-木质素中 71.2/3.82 ppm（B_γ）、80.8/4.52 ppm [A'_β（G，愈创木酰基）] 和 70.3/3.4-3.8 ppm（C₂-C₃）峰的消失也表明木质素由于 β -O-4、 α -O-4 和 β - β 的断裂而被分解。

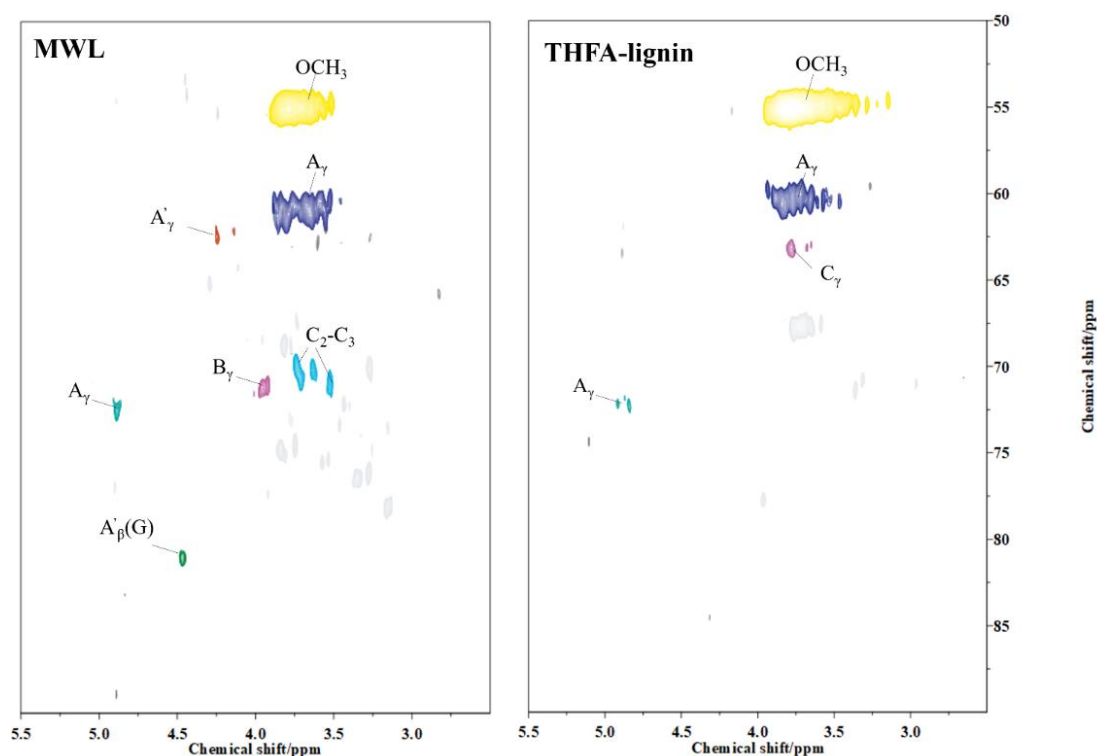


图 4-12 木质素样品的 2D HSQC NMR 光谱表征-脂肪族区域

Figure 4-12 2D HSQC NMR spectral characterization of lignin samples - aliphatic regions

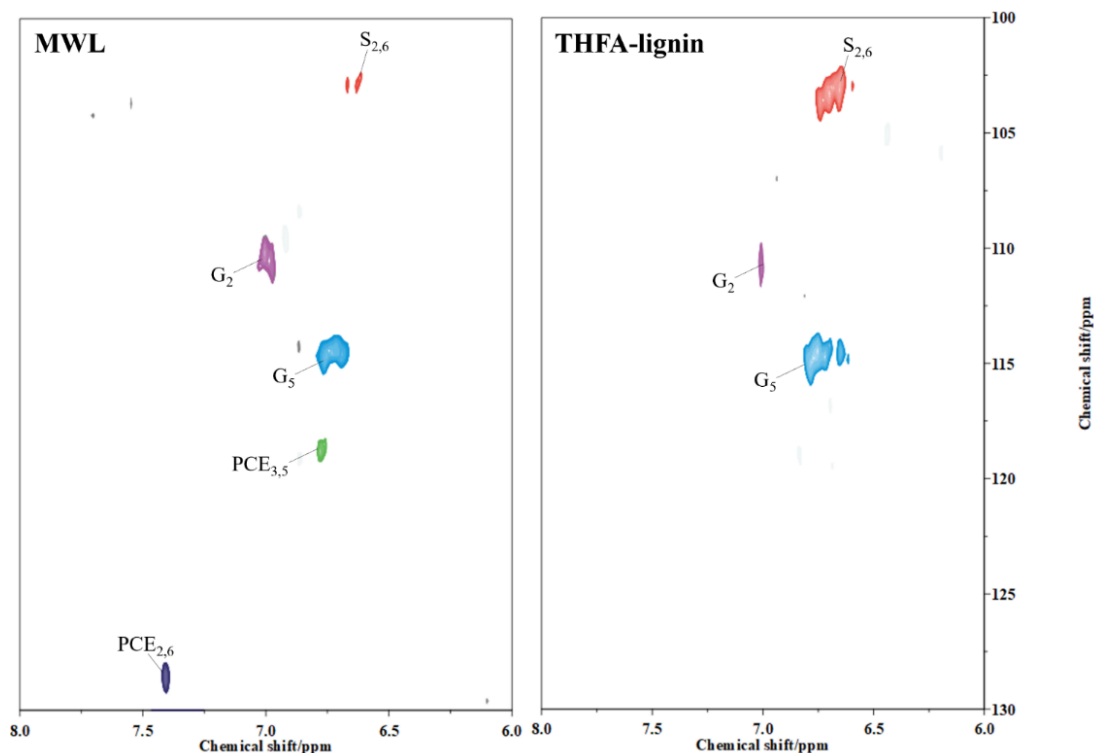


图 4-13 木质素样品的 2D HSQC NMR 光谱表征-芳香族区域

Figure 4-13 2D HSQC NMR spectral characterization of lignin samples - aromatic regions

此外，在 MWL 的芳香区（图 4-13），结构单元 S，对香马酸酯(*p*CE)和 G 分别在 103.9/6.7 ppm ($S_{2,6}$), 110.8/7.0 ppm (G_2)和 114.5/6.7 (G_5)处被识别出来，但

H（对羟基苯基）单元没有信号。这意味着天然油茶果壳木质素中只存在微量 H 单元，这与 Liu 等人^[145]的发现很好地一致。与 MWL 比较，THFA-木质素在 115.6/6.8 ppm ($pCE_{3,5}$)和 129.2/7.4 ppm ($pCE_{2,6}$)处未检测到峰，说明对香豆酸单元发生了解离。

4.4.4.3 分子量分析

与 THFA-木质素相比，MWL 的质量-平均分子量为 5266 g/mol，数量-平均分子量为 4543 g/mol，两者变化不大。碎片化木质素在 THFA/ $FeCl_3$ 体系中表现出缩聚行为^[143, 164]，较高分子量的木质素可能有助于形成更小的纳米颗粒^[165, 166]。

4.4.4.4 紫外分析

THFA-木质素与 MWL 在紫外线区(200 - 400 nm)下，结果如图 4-14 所示，THFA-木质素的紫外吸收率明显高于 MWL，特别是在 280 nm，THFA-木质素的紫外吸收率为 12 L/(g×cm)，MWL 的紫外吸收率为 9 L/(g×cm)。THFA-木质素呈现出优异的抗紫外线性能。结合二维 HSQC 核磁共振分析，THFA-木质素在 320 nm 处的新峰可能与 PCE 单元^[158]降解形成的对香豆酸有关。

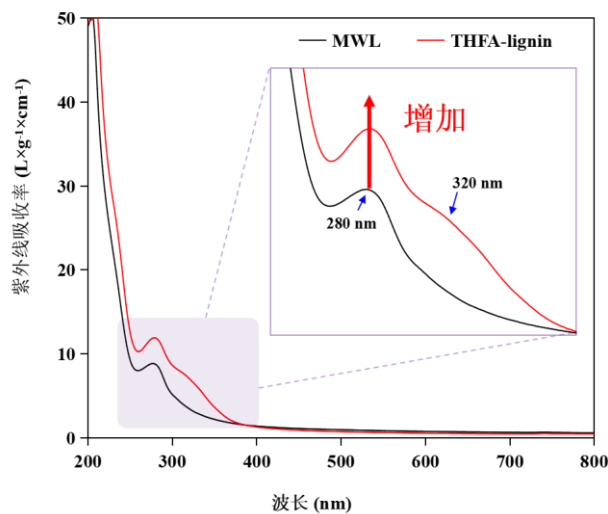


图 4-14 木质素样品的紫外曲线

Figure 4-14 Ultraviolet curves of lignin samples

4.4.4.5 荧光强度分析

THFA-木质素与 MWL 的荧光强度如图 4-15 所示，在激发波长为 360 nm，发射波长为 398 nm 时检测到 THFA-木质素的荧光强度，得到 2011 a.u.，是 MWL（激发波长为 310 nm，发射波长为 370 nm 时检测到 791 a.u.）的 2.5 倍，尤其比商用碱木质素^[146]强得多，在荧光方面显示出巨大的应用潜力。

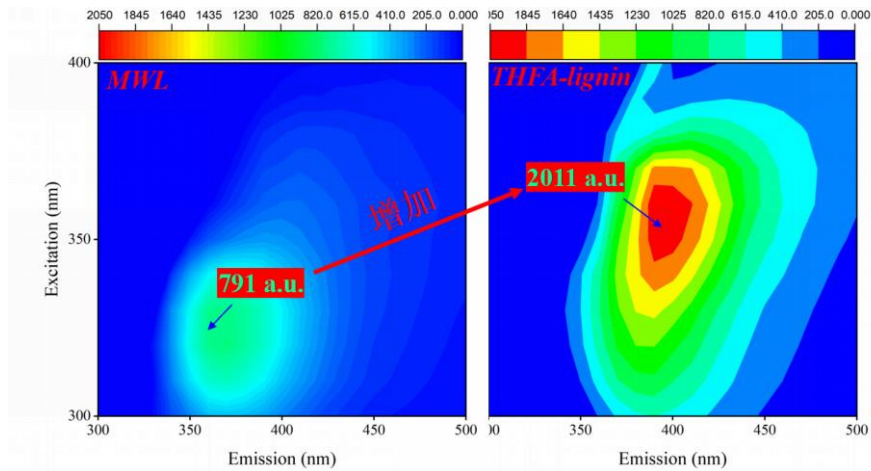


图 4-15 木质素样品的荧光等温曲线

Figure 4-15 Fluorescence isothermal curve of lignin sample

在 THFA-FeCl₃ 体系中，THFA 用于溶解木质素并维持温度。天然的 LCCs 结构在初始阶段通过酯键断裂而被破坏，导致木质素和碳水化合物（主要是木聚糖）释放到 THFA 溶液中（图 4-16）。由于[Fe(OH)(aq)]ⁿ⁺催化的作用，溶解的木质素逐渐发生碎片化，这是由于 β -O-4、 α -O-4 和 β - β 键的断裂所致。随后，通过脱氢、双键迁移或水解，这些木质素片段中的一部分可能进一步降解为具有反应性化学基团（如醛基和羧基）的不稳定酚类化合物^[167]。研究表明，这些不稳定的酚类化合物可以与乙二醇发生醛化反应形成稳定的五元杂环化合物，或者通过亲核反应与二甘醇反应生成芳香烯醇醚^[159, 162]，从而减少木质素的无序自缩合。

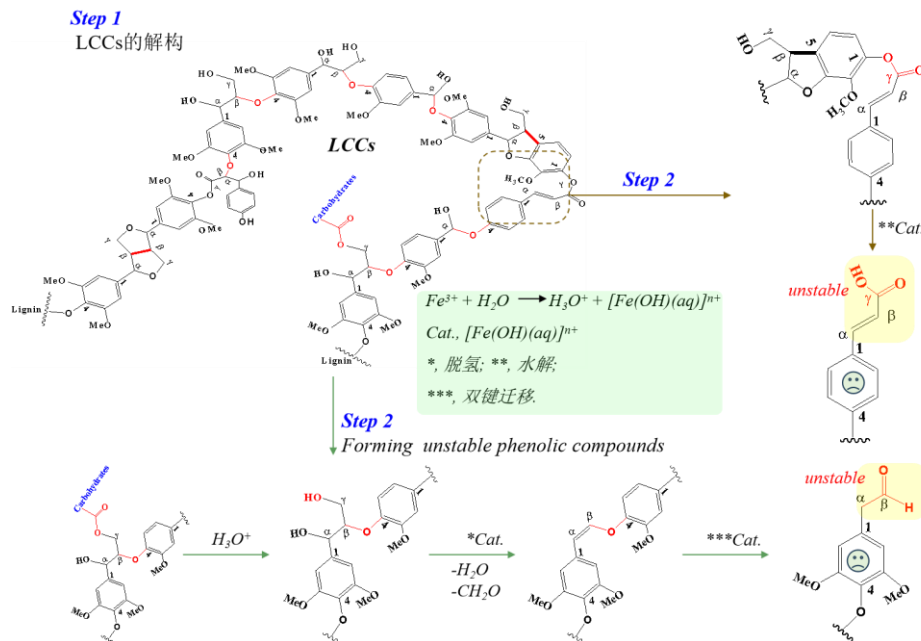


图 4-16 FeCl₃ 催化木质纤维素的解聚过程

Figure 4-16 Depolymerization processing of lignocellulose catalyzed by FeCl₃

4.5 本章小结

本章节以醇提后的油茶果壳为原料,开发了一种基于四氢糠醇与氯化铁联合的预处理工艺。该预处理方法在纤维素保留率为 93%时,脱除了油茶果壳中的大量木质素和半纤维素,并提高了油茶果壳在低酶载量条件下高浓度基质的酶水解效率。最后研究了分批补料对酶水解效率的影响。主要结果和结论如下:

(1) 优化预处理条件为 0.037 mol/L FeCl_3 浓度和 62% THFA 浓度在 170 °C 保温 0 min, 预处理后的纤维素保留率和木质素脱除率分别为 93%和 85%。

(2) 通过表征分析,油茶果壳木质素含量有明显减少,其表面被破坏,热稳定性降低,表面负电荷量减少,比表面积增大,显著增强了预处理后油茶果壳的酶解能力。

(3) 15%基质浓度及酶载量 5 FPU/g 干基,在添加 PEG10000 水解 72 h 后的葡萄糖产率显著提高 62%。预处理后的油茶果壳液化时间缩短,水解产物中葡萄糖浓度最高可达 69 g/L。

(4) 分批补料中,初始基质浓度为 5%,PEG10000 为 120 mg,在 12 h 和 24 h 分别补料 5%底物 2 次,葡萄糖浓度为 95 g/L,比初始基质浓度量的 1 号(56 g/L)提高了 0.7 倍。

(5) THFA-木质素具有优异的抗紫外线性能以及荧光强度。

第5章 油茶果壳酶解产物发酵制备微生物油脂

5.1 引言

圆红冬孢酵母(*Rhodotorula toruloides*)是一种极好的微生物脂质生产者,由于其出色的产脂能力而受到高度关注,且在生产类胡萝卜素和酶存在潜能。其底物代谢物质广泛,圆红冬孢酵母可以并生产脂肪酸,而脂肪酸可以转化为各种生物燃料^[96]。在某些条件下,圆红冬孢酵母可以积累超过70%干细胞重量的细胞内脂质和细胞脂质结构中的大量各种类胡萝卜素^[94]。

将第四章四氢糠醇量氯化铁预处理后油茶果壳中获得的高浓度酶水解糖液作为碳源,用于圆红冬孢酵母发酵生产微生物油脂。首先,以纯葡萄糖为碳源对圆红冬孢酵母产油脂能力进行优化。考察了碳源种类和氮源种类对酵母生长的影响,其次根据单因素实验依次考察酵母发酵培养基中的组分(硫酸镁、磷酸二氢钾、氮源浓度以及碳源浓度)对酵母生长的影响,对发酵培养基中的组分进行响应面优化。随后,基于上述优化后的酵母发酵培养基,以油茶果壳酶解液为碳源发酵生产微生物油脂。利用气质联用色谱分析了酵母产的微生物油脂和大豆油的脂肪酸组成组分,为微生物油脂制备生物柴油的可持续性提供动力。

5.2 实验材料

5.2.1 实验菌种

圆红冬孢酵母菌(*Rhodospiridium toruloides* 32489),购于中国普通微生物菌种保藏管理中心。

5.2.2 培养基

YPD培养基:酵母粉 10 g/L,葡萄糖 20 g/L,蛋白胨 10 g/L 和自然 pH。固体培养基中需要添加 18 g/L 的琼脂,在 115 °C 灭菌 20 min。

产油脂发酵培养基:葡萄糖 70 g/L,酵母提取物 0.75 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g/L, KH_2PO_4 0.4 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L,在 115 °C 下灭菌 20 min。

5.2.3 产油酵母培养

种子液培养:挑取圆红冬孢酵母菌单菌落于 YPD 液体培养基中,摇床 30 °C,

200 rpm 培养 24 h。

发酵培养基培养：将种子液以 10%接种量接入发酵培养基，摇床 30 °C，200 rpm 培养 7 d。

5.2.4 实验试剂及设备

所用试剂、仪器见附录表 1、2。

5.3 实验方法

5.3.1 纯葡萄糖发酵产油脂培养基的优化

5.3.1.1 碳源种类及氮源种类对圆红冬孢酵母菌产油效果的影响

以产油脂发酵培养基（酵母提取物 0.75 g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1 g/L， KH_2PO_4 0.4 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L）为基准，添加 70 g/L 不同种类碳源（葡萄糖，木糖，甘油，蔗糖和乳糖）对圆红冬孢酵母菌产油效果的影响，以酵母生长量为指标。

以产油脂发酵培养基（葡萄糖 70 g/L，酵母提取物 0.75 g/L， KH_2PO_4 0.4 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L）为基准，添加 0.1 g/L 不同种类氮源（酸铵，氯化铵，硝酸钾，硝酸钠和尿素）对圆红冬孢酵母菌产油效果的影响，以酵母生长量为指标。

5.3.1.2 酵母培养基单因素优化

以产油脂发酵培养基（酵母提取物 0.75 g/L， KH_2PO_4 0.4 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L，硝酸钠 0.1 g/L）为基准，添加不同浓度（30，50，70，90，110，130 和 150 g/L）的葡萄糖对圆红冬孢酵母菌产油效果的影响，以酵母生长量为指标。

以产油脂发酵培养基（葡萄糖 70 g/L、酵母提取物 0.75 g/L， KH_2PO_4 0.4 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L）为基准，添加不同浓度（0，0.1，0.5，0.7，0.9，1.1，1.5 和 2 g/L）的硝酸钠对圆红冬孢酵母菌产油效果的影响，以酵母生长量为指标。

以产油脂发酵培养基（葡萄糖 70 g/L、酵母提取物 0.75 g/L， KH_2PO_4 0.4 g/L，硝酸钠 0.1 g/L）为基准，添加不同浓度（0，0.5，1，1.5，2 和 2.5 g/L）的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 对圆红冬孢酵母菌产油效果的影响，以酵母生长量为指标。

以产油脂发酵培养基（葡萄糖 70 g/L、酵母提取物 0.75 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g/L，硝酸钠 0.1 g/L）为基准，添加不同浓度（0，0.4，0.8，1.2，1.6，2 g/L）的 KH_2PO_4 对圆红冬孢酵母菌产油效果的影响，以酵母生长量为指标。

5.3.1.3 酵母培养基响应面优化

根据单因素实验结果确定各因素影响油脂产量的浓度范围，利用 Design Expert 13.0 响应面软件设计 CCD 优化纯葡萄糖发酵产油脂培养基，以油脂产量

为指标。酵母培养基 CCD 实验设计表及对应响应值如表 5-1 所示。

表 5-1 CCD 实验设计表及对应响应值

Table 5-1 CCD experimental design table and corresponding response values

Runs	X_1	X_2	X_3	Y_3
	硫酸镁(g/L)	碳氮比 ^a	磷酸二氢钾(g/L)	油脂产量(g/L)
1	1	250	0	5.90±0.15
2	2	250	0	6.07±0.05
3	1	1700	0	4.39±0.19
4	2	1700	0	5.05±0.58
5	1	250	0.8	2.38±0.04
6	2	250	0.8	3.10±0.29
7	1	1700	0.8	3.44±0.33
8	2	1700	0.8	5.11±0.53
9	0.66	975	0.4	3.84±0.80
10	2.34	975	0.4	5.07±0.73
11	1.5	0	0.4	3.61±0.22
12	1.5	2194.3	0.4	3.71±0.22
13	1.5	975	0	4.42±0.02
14	1.5	975	1.07	5.41±0.06
15	1.5	975	0.4	5.21±0.22
16	1.5	975	0.4	4.96±0.53
17	1.5	975	0.4	5.05±0.07
18	1.5	975	0.4	5.12±0.92
19	1.5	975	0.4	5.13±0.34

^a 碳氮比是培养基中添加的碳元素与氮元素质量比，其中以碳源为固定量。本研究中选用的酵母提取物中氮源浓度仅为 9%，故不参与碳氮比计算中。

5.3.2 微生物生物量及油脂的提取

发酵结束后，将所得的发酵液经离心(8000, 10min)后，菌体用去离子水洗涤 2 次离心后于真空冷冻干燥机-47℃冻干 24 h，取出测干细胞重量。

取冷冻干燥后酵母细胞放入 50 mL 具塞离心管，粉碎后加入 6 mL 盐酸溶液(4 mol/L)，盖塞封闭后在 30℃条件下超声处理 30 min 后沸水煮 3-5 min，完成后立即冰水降温，加入 10 mL 二氯甲烷/甲醇(1/1, v/v)和 10 mL 氯化钠(0.1 wt.%)溶液逐次加入上述离心管中，并混合均匀，经离心(10000, 2min)后，取下层为水、油脂、二氯甲烷和甲醇混合物，加入氯化钠溶液洗涤离心，取出将下层的混合物，并放入通风橱内，室温过夜挥发除去其中二氯甲烷，95℃下烘干 8 h，称重。

$$\text{生物量(g/L)} = \frac{\text{干细胞重量}}{\text{发酵培养基体积}} \quad (5-1)$$

$$\text{油脂产量(g/L)} = \frac{\text{提取油脂重量}}{\text{发酵培养基体积}} \quad (5-2)$$

$$\text{胞内油脂含量(wt.\%)}=100\times\frac{\text{提取油脂重量}}{\text{干细胞重量}} \quad (5-3)$$

5.3.3 油茶果壳酶解产物发酵产微生物油脂

基于上述以纯葡萄糖为碳源优化的培养条件和发酵培养基,将分离得到的四氢糠醇-氯化铁预处理后油茶果壳酶解液(可发酵糖)作为碳源加入发酵培养基中,为酵母生产油脂提供葡萄糖,同时酵母发酵培养的其他组分及其浓度以纯葡萄糖糖最优工艺制备,接入酵母种子液后,置于恒温摇床,在最佳培养条件下进行发酵产微生物油脂。

5.3.4 油茶果壳酶解产物发酵产微生物油脂成分分析

油茶果壳酶解产物发酵产微生物油脂成分分析参照邓茜^[168]的方法,主要步骤如下:将提取的微生物油脂溶于 1 mL 5%硫酸甲醇溶液,随后,90 °C 水浴 2 h,放冷后,加入 2 mL 正己烷充分摇匀,离心后收集上清液,并添加适量无水硫酸钠后静置 5 min,取上清液过 0.22 μm 有机系滤膜,最后添加 2 μL 内标(0.1 mol/L C17:0)用于上样。气相色谱柱为:HP-5(30 m×0.32 mm×0.5 μL)。

5.4 结果与讨论

5.4.1 碳源及氮源对圆红冬孢酵母生长的影响

5.4.1.1 碳源对圆红冬孢酵母生长的影响

油脂合成过程中,碳源不仅影响产油酵母的生长、油脂积累量以及脂肪酸组成,还对油脂的功能特性及应用范围有影响。微生物利用的常见的碳源包括葡萄糖、麦芽、甘油、蔗糖和淀粉水解液等。本研究分析了木糖、甘油、蔗糖、乳糖对圆红冬孢酵母的影响,结果见图 5-1a。以葡萄糖为唯一碳源时,圆红冬孢酵母的生物量、油脂含量和油脂产量高于气体碳源,尤其是油脂产量,明显优于乳糖、木糖。其可能的原因为葡萄糖属于单糖,无需经历复杂的水解或异构化过程,可以被直接利用,且葡萄糖有助于长链脂肪酸的合成与积累^[169]。

5.4.1.2 氮源对圆红冬孢酵母生长的影响

氮源作为关键营养因子,在调控圆红冬孢酵母细胞增殖与脂质代谢过程中具有双重调控功能。不同的氮源对圆红冬孢酵母的生长和脂质合成影响不同,因酵母提取物有助于菌种生长量的增加以及油脂的产生^[98],因此选用氮源为复合氮源,并添加酵母提取物浓度为 0.75 g/L。其结果如图 5-1b 所示,硝酸钠为氮源时,圆红冬孢酵母生长量、油脂含量和油脂产量具有优势,硫酸铵与氯化铵的效果也

明显，促进了圆红冬孢酵母生长与产油能力。在后续实验中，选择使圆红冬孢酵母产量大的硝酸钠作为氮源。

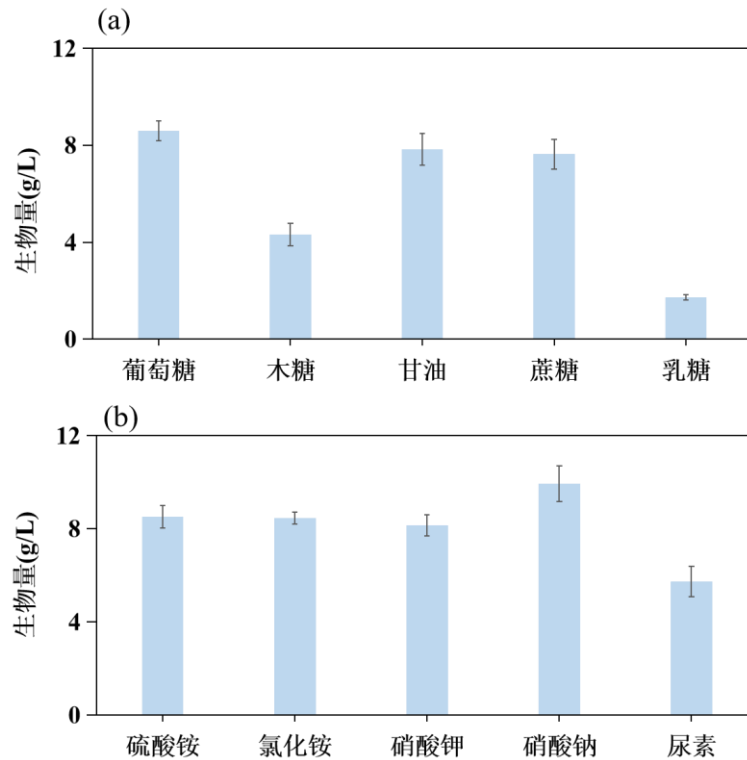


图 5-1 不同(a)碳源和(b)氮源下圆红冬孢酵母生长的影响

Figure 5-1 Effects of different (a) carbon and (b) nitrogen sources on the growth of *Rhodotorula toruloides*

5.4.2 纯葡萄糖培养基的单因素优化

5.4.2.1 葡萄糖浓度对圆红冬孢酵母生长的影响

由图 5-2a 可知，随着葡萄糖浓度的增加，圆红冬孢酵母的含量在逐步增加，在葡萄糖浓度达到 110 g/L 时，其结果达到最高，为 2.67 g/L，随后出现下降趋势。而碳源浓度对酵母油脂含量的影响不大，呈现平滑趋势。当碳源浓度在 70-110 g/L，油脂产量在上升，但是其油脂产量相差在 0.5 g/L 以内。后续实验中选择 70 g/L，过多的糖不符合经济性。过高的葡萄糖浓度会限制酵母的代谢碳源的酶，会降低酶活性^[170]。

5.4.2.2 硫酸镁浓度对圆红冬孢酵母生长的影响

在微生物代谢工程中，硫酸镁作为关键的无机盐组分，通过镁离子和硫酸根的双重功能调控圆红冬孢酵母的生理活动，从而提高油脂产量和改善产品品质。由图 5-2b 可知，在一定浓度范围内，镁离子有利于菌体油脂的合成。对于添加

硫酸镁与未添加硫酸镁的酵母相比较,添加硫酸镁可以有效增加酵母的油脂产量。随着硫酸镁浓度的增加,油脂含量总体呈现增加趋势,在 2 g/L 时达到最大为 60%。

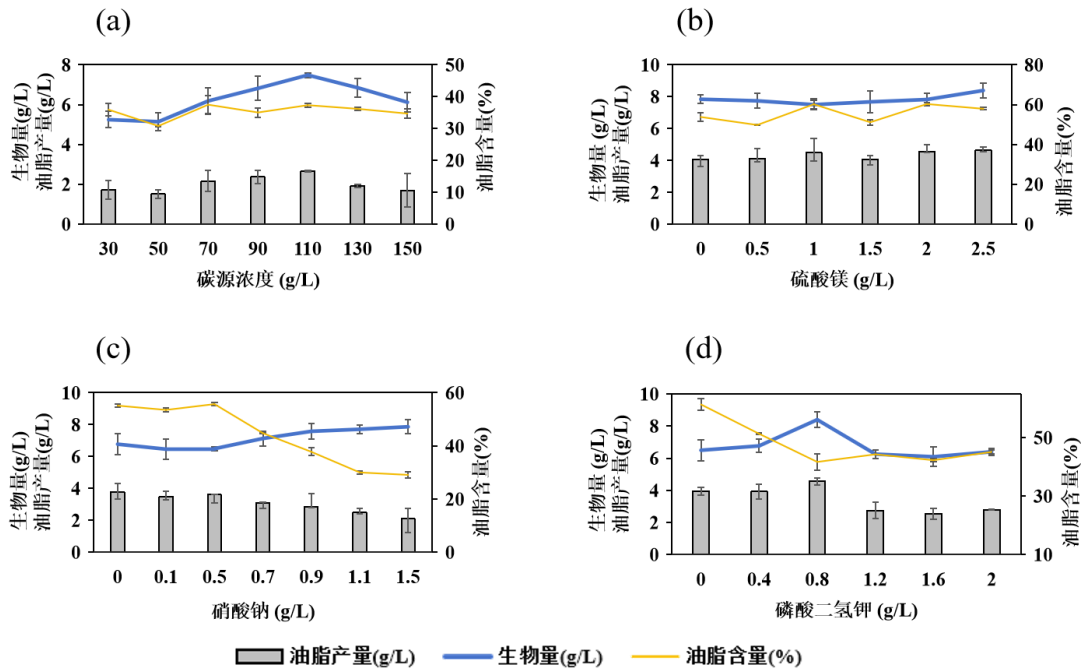


图 5-2 不同(a)葡萄糖, (b)硫酸镁, (c)硝酸钠以及(d)磷酸二氢钾浓度对圆红冬孢酵母生长的影响

Figure 5-2 Effects of different concentrations of (a) glucose, (b) magnesium sulfate, (c) sodium nitrate and (d) potassium dihydrogen phosphate on the growth of *Rhodotorula toruloides*

5.4.2.3 硝酸钠浓度对圆红冬孢酵母生长的影响

由图 5-2c 可知,氮源浓度过高或过低都影响酵母的生长与产油能力,在一定范围内添加硝酸钠,有助于提高酵母生长量,但是随着硝酸钠的浓度增加,其酵母所含的油脂含量呈现先上升后下降,过高的氮源浓度会影响酵母生长^[171]。

5.4.2.4 磷酸二氢钾浓度对圆红冬孢酵母生长的影响

由图 5-2d 可知,随着磷酸二氢钾浓度的增加,菌体的生物量先增加,到磷酸二氢钾浓度为 0.8 g/L 时,生物量最大,油脂产量较多。对于圆红冬孢酵母的生长而言,适量添加磷酸二氢钾有助于提高酵母生长;对于积累圆红冬孢酵母的油脂含量而言,低磷更有益于提高油脂的含量,这与限制磷有益于油脂的积累相对应^[172]。

5.4.3 纯葡萄糖培养基的响应面优化

多元回归模型将自变量(碳源浓度、氮源浓度、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KH_2PO_4)与响应值(油脂产量)之间的关系通过以下二次方程表示:

$$Y_3=5.09+0.3872\times X_1+0.0519\times X_2+0.2943\times X_3+0.1800\times X_1\times X_2+0.1950\times X_1\times X_3+0.7000\times X_2\times X_3-0.1977\times X_1^2-0.4788\times X_2^2-0.0351\times X_3^2-1.22\times X_1^2\times X_3 \quad (5-1)$$

式中 Y_3 代表酵母油脂产量, X_1 、 X_2 、 X_3 分别表示硫酸镁、碳氮比、磷酸二氢钾。

表 5-2 CCD 实验的方差分析结果

Table 5-2 ANOVA results of multiple regression model for microbial liquid and fats

方差来源	油脂产量(g/L)		
	Ratio	F-value	P-value
模型	14.08	108.91	<0.0001
Intercept	5.09	/	/
X_1 -硫酸镁(g/L)	+0.3872	129.23	< 0.0001
X_2 -碳氮比(g/g)	+0.0519	2.32	0.1665
X_3 -磷酸氢二钾(g/L)	+0.2943	30.92	0.0005
X_1X_2	+0.1800	16.36	0.0037
X_1X_3	+0.1950	19.19	0.0023
X_2X_3	+0.7000	247.35	<0.0001
X_1^2	-0.1977	33.68	0.0004
X_2^2	-0.4788	197.46	<0.0001
X_3^2	-0.0351	1.06	0.3331
$X_1^2X_3$	-1.22	309.59	<0.0001
失拟项	/	2.59	0.1896
变异系数(%)		2.75	
信噪比		38.20	
测定 R^2		0.99	
调整 R^2		0.98	
预测 R^2		0.88	

根据表 5-2 微生物油脂的多元回归模型的方差分析结果可知, 这个模型 ($P<0.0001$) 具有显著性, 圆红冬孢酵母发酵产生的微生物油脂产量其精度值在大于 4, 表明该模型可用于准确预测。对于决定系数(R^2), 回归模型大于 0.9, 调整后的决定系数也大于 0.9, 表明模型与实验数据的拟合好。碳氮比是菌体生物量及细胞内油脂合成中的重要影响因素^[173]。根据单因素中葡萄糖浓度以及硝酸钠浓度对圆红冬孢酵母产油脂效率的影响, 设定葡萄糖浓度为 70 g/L (即碳源浓度固定), 加入不同硝酸钠以调节碳氮比。碳氮比与磷酸氢二钾之间存在交互作用, 这意味着通过适当降低磷酸氢二钾浓度, 可以提高微生物油脂的产量^[172]。

Design Expert 响应面软件对最优的油脂产量预测值为 6.07 g/L, 根据最优的工艺条件得到的实际值与实际值相接近。纯葡萄糖发酵产微生物油脂最优的工艺条件为葡萄糖 70 g/L、酵母粉 0.75 g/L、硫酸镁为 2 g/L、碳氮比 250:1, 其生物量为 11.24 ± 0.59 g/L, 油脂产量为 6.27 ± 0.05 g/L, 油脂含量为 $64.11\pm2.73\%$ 。

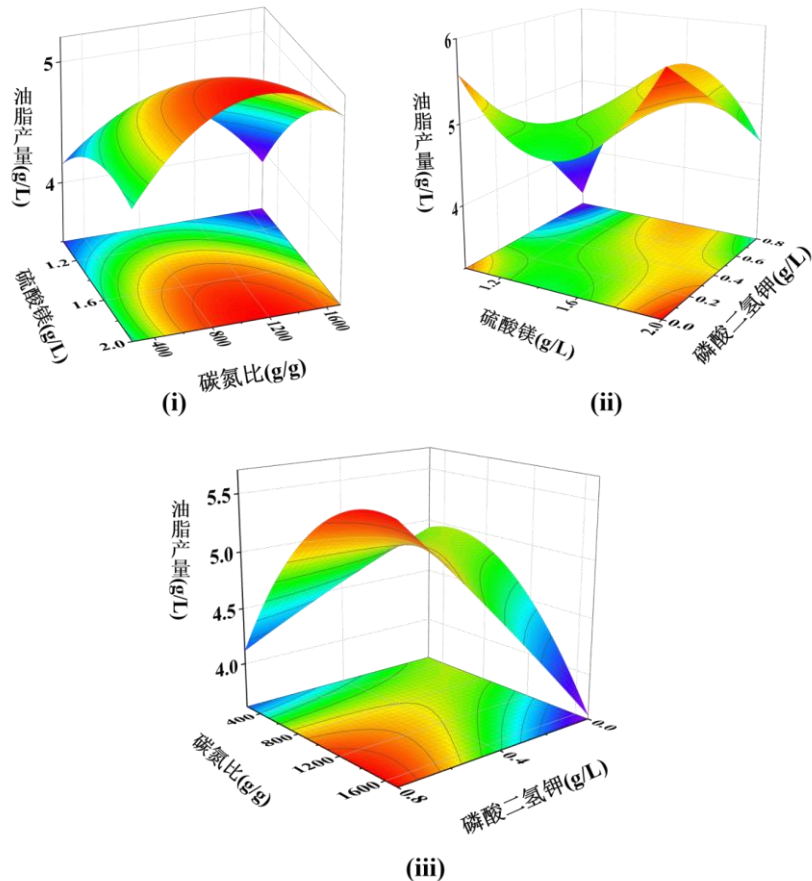


图 5-3 油脂产量的 3D/2D 响应面 (i)碳氮比和硫酸镁的影响, (ii)磷酸二氢钾和硫酸镁的影响以及(iii)磷酸二氢钾和碳氮比的影响

Figure 5-3 3D/2D response surface plot of oil yield (i) influence of carbon-nitrogen ratio and magnesium sulfate, (ii) of potassium dihydrogen phosphate and magnesium sulfate and (iii) of potassium dihydrogen phosphate and carbon-nitrogen ratio

5.4.4 油茶果壳酶解产物发酵制备微生物油脂

根据第四章得到的预处理后的油茶果壳酶解产物选用优化好的酵母培养基条件进行发酵, 其生物量为 8.72 ± 0.14 g/L, 油脂产量为 4.29 ± 0.25 g/L, 油脂含量为 $48 \pm 0.36\%$, 低于纯葡萄糖培养所得的油脂产量, 但其油脂产量较高于相关文献^[98]。进一步验证了圆红冬孢酵母可以通过发酵处理农业残余物生成微生物油脂, 这为可持续再生能源的产生提供了创新思路。

5.4.5 油茶果壳酶解产物发酵产微生物油脂成分分析

大豆油、藻油、酵母发酵油茶果壳酶解液以及葡萄糖发酵所产油脂的脂肪酸组成如表 5-3 所示, 脂肪酸组成组分以 GC-MS 检测出的对应化合物的峰面积与总峰面积的百分比进行定量分析。脂肪酸组成组分主要以为(C16:0)棕榈酸和油酸(C18:1)为主。大豆油和酵母发酵油茶果壳酶解液所产油脂中主要脂肪酸成分

相似。此外，采用油茶果壳酶液发酵产的油脂的棕榈酸含量高于葡萄糖组和大豆油^[174]，且亚油酸低于前两者，更适用于作为原料生产生物柴油。

表 5-3 不同油脂的脂肪酸组分分析

Table 5-3. Analysis of Fatty Acid Composition in Different Oils

油脂	油脂脂肪酸含量 ^a (%)						
油脂种类	棕榈酸 C16:0	棕榈油酸 C16:1	硬脂酸 C18:0	油酸 C18:1	亚油酸 C18:2	亚麻酸 C18:3	其他 ^b
大豆油	7.99	2.74	0.69	50.81	19.81	3.78	17.96
藻油	30.85	17.75	1.04	8.93	0.82	1.74	40.61
油茶果壳酶液发 酵产的油脂 ^c	22.19	3.15	0.29	60.09	2.91	0.56	11.37
葡萄糖发酵产的 油脂 ^d	0.75	7.74	0.41	59.99	5.46	0.94	25.65

^a 组分含量为气相检测出的对应化合物的峰面积与总峰面积的百分比;

^b 其他为除表头内以外的脂肪酸含量;

^c 发酵条件为油茶果壳酶解液 70 g/L、酵母粉 0.75 g/L、硫酸镁为 2 g/L、碳氮比 250:1, 30 °C 下 200 rpm 培养 7 d;

^d 发酵条件为葡萄糖 70 g/L、酵母粉 0.75 g/L、硫酸镁为 2 g/L、碳氮比 250:1, 30 °C 下 200 rpm 培养 7 d。

5.5 本章小结

本章节以四氢糠醇-氯化铁预处理后油茶果壳的酶解液为碳源用于圆红冬孢酵母发酵生产微生物油脂。以纯葡萄糖为碳源对酵母产油脂进行优化。优化了酵母发酵培养基中的组分与浓度。酵母以酶解液为碳源发酵生产微生物油脂。主要结果和结论如下：

(1) 响应面最优的工艺条件为葡萄糖 70 g/L、酵母粉 0.75 g/L、硫酸镁为 2 g/L、碳氮比 250:1，其生物量为 11.24 ± 0.59 g/L，油脂产量为 6.27 ± 0.05 g/L，油脂含量为 $64.11 \pm 2.73\%$ 。

(2) 油茶果壳酶解产物发酵产糖经酵母发酵，其生物量为 8.72 ± 0.14 g/L，油脂产量为 4.29 ± 0.25 g/L，油脂含量为 $48.91 \pm 0.36\%$ 。

(3) 油茶果壳酶解产物发酵产微生物油脂经气相测定的脂肪酸组成组分主要以为(C16:0)棕榈酸和油酸(C18:1)为主，与大豆油主要脂肪酸成分相似，可最为原料生产生物柴油。

第6章 结论与展望

6.1 结论

油茶果壳资源丰富，且其含有较多的木质素、半纤维素、纤维素以及一定量的茶皂素、黄酮、多糖、单宁等成分。通过对木质纤维素的转化，可以得到可发酵性糖，而发酵性糖可以通过微生物发酵产油脂，因此，油茶果壳成为生物柴油原料的一个潜力巨大的资源。本实验建立了一种短时高效预处理油茶果壳的方法（氯化铁-四氢糠醇预处理），同时探究了圆红冬孢酵母产微生物油脂的方法，为生物精炼最大化处理提供新思路。本研究的主要结论如下：

（1）本研究优化了对油茶果壳中的总多糖组的乙醇提取工艺并制备了多糖水凝胶。结果表明，油茶果壳总多糖的最佳提取工艺为：提取时间 1 h，提取温度 85 °C，乙醇浓度 60%，料液比 1:12 g/mL 时，油茶果壳总多糖得率最大为 10.61%。通过 DPPH 和 ABTS⁺测定结果表明，油茶果壳总多糖具有抗氧化活性，所制备的多糖水凝胶具有良好的溶胀性与包载率，多糖浓度添加量为 2 mg/mL，其溶胀率达到最大为 1600%，包载率为 98%，表明了多糖水凝胶在抗氧化活性与载药特性方面具有良好应用潜力。

（2）本研究开发了一种水热联合 *Trametes sp.* LS-10C 真菌预处理方法。系统考察了不同氯化铁(0-0.08 mol/L)、预处理温度(130-170 °C)和预处理时间(0-180 min)对油茶果壳中木质纤维素组分分离效果及酶解效率的影响，通过对水热预处理后的特征官能团以及纤维素的结晶度的变化进行分析。结果表明：油茶果壳内部结构发生改变，经过预处理后，油茶果壳纤维素的结晶度提高了，可能是纤维素结构被破坏。水热联合白腐真菌 *Trametes sp.* LS-10C 预处理在一定程度上分离了木质素，水热联合 *Trametes sp.* LS-10C 真菌使纤维素酶吸附效率增加 4.77 倍。

（3）本研究开发了一种基于四氢糠醇与氯化铁协同作用的预处理工艺。结果表明：优化预处理条件为 0.037 mol/L FeCl₃ 浓度和 62% THFA 浓度在 170 °C 保温 0 min，预处理后的纤维素保留率和木质素脱除率率分别为 93%和 85%。通过表征分析，油茶果壳木质素含量有明显减少，其表面被破坏，热稳定性降低，表面负电荷量减少，比表面积增大，显著增强了预处理后油茶果壳的酶解能力。15%

基质浓度及酶载量 5 FPU/g 干基, 在添加 PEG10000 水解 72 h 后的葡萄糖产率显著提高 62%。预处理后的油茶果壳液化时间缩短, 水解产物中葡萄糖浓度最高可达 69 g/L。经过分批补料, 其葡萄糖浓度最高可为 95 g/L。预处理液中提取分离得到的木质素具有优异的抗紫外线性能以及荧光强度。

(4) 以四氢糠醇-氯化铁预处理后油茶果壳的酶解液为碳源, 利用圆红冬孢酵母发酵生产微生物油脂。以纯葡萄糖为碳源对酵母产油脂进行优化。考察了碳源种类、氮源种类对酵母生长的影响, 单因素实验以及响应面优化了酵母发酵培养基中的组分与浓度。酵母以酶解液为碳源发酵生产微生物油脂。结果表明: 葡萄糖及硝酸钠具有产油优势, 当葡萄糖 70 g/L、酵母粉 0.75 g/L、硫酸镁为 2 g/L、碳氮比 250:1, 响应面最优的生物量为 11.24 ± 0.59 g/L, 油脂产量为 6.27 ± 0.05 g/L, 油脂含量为 $64.11 \pm 2.73\%$ 。利用油茶果壳酶水解产物中的可发酵糖经酵母发酵产油, 其生物量为 8.72 ± 0.14 g/L, 油脂产量为 4.29 ± 0.25 g/L, 油脂含量为 $48.91 \pm 0.36\%$ 。其脂肪酸成分与大豆相似, 可作为生产生物柴油的潜在替代原料。

6.2 展望

本研究提出了一种氯化铁联合四氢糠醇的新颖壳类预处理方法, 实现高木质素脱除率与纤维素保留率, 其酶水解产糖可达 95 g/L, 将其用于酵母发酵产微生物油脂, 经气相检测微生物油脂的脂肪酸成分类似于大豆油, 是可持续性的生产生物柴油的潜在替代原料。未来仍可继续从以下方面进行深入探究:

在实现高浓度生物质基质的基础上, 氯化铁联合四氢糠醇预处理方法在经济可行性与规模化生产上, 还需要进行全生命周期评价。

参考文献

- [1] Yu L, Sun J, Liu W, et al. Policy analysis of biomass recycling supply chain considering carbon and pollution emission reduction—taking China’s straw subsidy policy for example [J]. *Systems*, 2023, 11(7): 343.
- [2] Sharma R, Choudhary P, Thakur G, et al. Sustainable management of biowaste to bioenergy: A critical review on biogas production and techno-economic challenges [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2025, 196: 107734.
- [3] Sanli H. Characterizing three generation biodiesel feedstocks: A statistical approach and empirical modeling of fuel properties [J]. *Waste Management*, 2025, 200: 114755.
- [4] Yousuf A, Khan M R, Islam M A, et al. Technical difficulties and solutions of direct transesterification process of microbial oil for biodiesel synthesis [J]. *Biotechnology letters*, 2017, 39: 13-23.
- [5] Qin L, Qian H, He Y. Microbial lipid production from enzymatic hydrolysate of pecan nutshell pretreated by combined pretreatment [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2017, 183: 1336-1350.
- [6] 汤韵涵, 章晓宇, 崔心江, 等. 圆红冬孢酵母利用废糖蜜合成微生物油脂及类胡萝卜素 [J]. *生物加工过程*, 2024, 22(03): 289-296.
- [7] Fu L H, Liu A H. China statistical yearbook-2021 [J]. *Output of Major Forestry Products*, National Bureau of Statistics of China, Beijing, 2021: 403.
- [8] Feng S, Zhang J, Luo X, et al. Green extraction of polysaccharides from *Camellia oleifera* fruit shell using tailor-made deep eutectic solvents [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253: 127286.
- [9] 张胜. 普通油茶饼粕与果壳中多糖的提取,活性及应用研究 [D]. 中南林业科技大学, 2013.
- [10] 李桂珍, 谷瑶, 杨漓 等. 不同油茶品种果壳及饼粕中活性成分的测定 [J]. *广西林业科学*, 2019; 48(03): 348-352.
- [11] Chandel A K, Garlapati V K, Singh A K, et al. The path forward for lignocellulose biorefineries: bottlenecks, solutions, and perspective on commercialization [J]. *Bioresource technology*, 2018, 264: 370-381.
- [12] Rahmati S, Doherty W, Dubal D, et al. Pretreatment and fermentation of lignocellulosic biomass: reaction mechanisms and process engineering [J]. *Reaction Chemistry & Engineering*, 2020, 5(11): 2017-2047.
- [13] 唐松. 多元醇和氯化物预处理水稻秸秆发酵产微生物油脂的研究 [D]. 南京农业大学, 2020.
- [14] Zhang L, Lee J T E, Ok Y S, et al. Enhancing microbial lipids yield for biodiesel production by oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* fermentation: a review [J]. *Bioresource technology*,

-
- 2022, 344: 126294.
- [15] Tang N, Tan X, Cai Y, et al. Characterizations and application potentials of the hemicelluloses in waste oil-tea camellia fruit shells from Southern China [J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 178: 114551.
- [16] 刘海, 胡堇, 郭少海, 等. 不同成熟度的威宁短柱油茶果实主要经济性状和营养成分分析及评价 [J]. *中国油脂*, 2025: 1-13.
- [17] 赖海荣. 我省油茶面积产能产值稳居全国第二 [N]. *南昌日报*, 2025: 2.
- [18] 沈建福, 姜天甲. 山茶油的营养价值与保健功能 [J]. *粮食与食品工业*, 2006, (06): 6-8+21.
- [19] Istrate I R, Galvez-Martos J L, Dufour J. The impact of incineration phase-out on municipal solid waste landfilling and life cycle environmental performance: Case study of Madrid, Spain [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 755: 142537.
- [20] 周琛媛, 董柳青. 响应面法优化油茶蒽醌提取工艺的研究 [J]. *现代食品*, 2021, (13): 121-123+126.
- [21] 吴苏喜, 吴美芳, 谢妍祎, 等. 油茶蒽不同溶剂粗提液的总蒽醌提取率与抗氧化活性比较 [J]. *中国油脂*, 2019, 44(06): 116-119+123.
- [22] 谷睿, 邹蓉, 唐健民, 等. 普通油茶总蒽醌提取工艺优化及抗氧化活性比较 [J]. *江苏农业科学*, 2022, 50(04): 163-169.
- [23] 刘昕. 栀子花蒽醌纯化工艺及其抗氧化与抗运动疲劳作用研究 [J]. *中国食品添加剂*, 2023, 34(02): 27-34.
- [24] 彭玲. 油茶壳总蒽醌对食用油脂抗氧化性研究 [J]. *食品研究与开发*, 2012, 33(12): 201-204.
- [25] 刘艳新. 油茶果壳生物质组分的分离、表征及其综合利用研究 [D]. 中南林业科技大学, 2019.
- [26] Yu X, Zhao Z, Yan X, et al. Extraction optimization of tea saponins from *Camellia oleifera* seed meal with deep eutectic solvents: Composition identification and properties evaluation [J]. *Food Chemistry*, 2023, 427: 136681.
- [27] 袁成华, 杨琼玲, 邓爱华, 等. 油茶果壳中茶皂素提取工艺研究 [J]. *广东化工*, 2021, 48(17): 19-21+24.
- [28] 张文婷, 王后玮, 潘金鹏, 等. 响应面法优化油茶壳中茶皂素提取工艺及 HPLC 验证 [J]. *食品工业*, 2019, 40(10): 75-79.
- [29] 郭永生, 吴静, 顾震, 等. 响应面法优化提取油茶果壳中茶皂素 [J]. *食品工业*, 2023, 44(11): 46-50.
- [30] Zhao Y, Su R, Zhang W, et al. Antibacterial activity of tea saponin from *Camellia oleifera* shell by novel extraction method [J]. *Industrial crops and products*, 2020, 153: 112604.
- [31] 贺义昌, 蔡鹤群, 吴韬, 等. 油茶果壳单宁抗炎活性及其作用机制 [J]. *林业科技通讯*,

-
- 2025, (01): 1-6.
- [32] 杨小敏, 刘建平, 李倩倩, 等. 响应面法优化超声辅助提取油茶壳中单宁的工艺 [J]. 食品工业科技, 2012, 33(09): 215-217+221
- [33] 张余华, 吴艳, 黄建军, 等. 闪式提取法提取油茶果壳中单宁的工艺研究 [J]. 南方林业科学, 2022, 50(06): 66-70.
- [34] 李桂珍, 谷瑶, 杨漓, 等. 不同油茶品种果壳及饼粕中活性成分的测定 [J]. 广西林业科学, 2019, 48(03): 348-352.
- [35] 朱志东, 蔡延渠, 吕莉, 等. 不同提取方法对油茶果壳多糖含量的影响 [J]. 广州中医药大学学报, 2019, 36(03): 410-413.
- [36] 舒斌斌, 吴苏喜, 谢妍祎, 等. 油茶蒲纯化多糖的制备与组分、结构分析 [J]. 中国油脂, 2023, 48(04): 119-123+139.
- [37] 吴静, 顾震, 谢传奇, 等. 油茶果壳多糖纯化工艺及其抗氧化活性研究 [J]. 食品工业, 2023, 44(11): 72-76.
- [38] Zhou L, Luo S, Li J, et al. Optimization of the extraction of polysaccharides from the shells of *Camellia oleifera* and evaluation on the antioxidant potential in vitro and in vivo [J]. Journal of Functional Foods, 2021, 86: 104678.
- [39] Chen T, Tang M, Zhao X R, et al. Antioxidant potential evaluation of polysaccharides from *Camellia oleifera* Abel in vitro and in vivo [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 248: 125726.
- [40] Liu M, Jin J, Zhong X, et al. Polysaccharide hydrogels for skin wound healing [J]. Heliyon, 2024, 10(15).
- [41] Fu J, Yap J X, Leo C P, et al. Polysaccharide hydrogels for controlling the Nutrient Release [J]. Separation & Purification Reviews, 2024, 53(3): 276-288.
- [42] Yan R, Wang Y, Li W, et al. Promotion of chronic wound healing by plant-derived active ingredients and research progress and potential of plant polysaccharide hydrogels [J]. Chinese Herbal Medicines, 2025, 17(01): 70-83.
- [43] Wu Z, Peng K, Zhang Y, et al. Lignocellulose dissociation with biological pretreatment towards the biochemical platform: A review [J]. Materials Today Bio, 2022, 16: 100445.
- [44] Kumar S, Paritosh K, Pareek N, et al. De-construction of major Indian cereal crop residues through chemical pretreatment for improved biogas production: an overview [J]. Renewable and Sustainable Energy Reviews, 2018, 90: 160-170.
- [45] M, Paritosh K, Vivekanand V. Lignocellulose to bio-hydrogen: an overview on recent developments [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2020, 45(36): 18195-18210.
- [46] Ji Q, Su L, Li Z, et al. Preparation of peanut shell lignin nanocellulose by aluminum trichloride acid deep eutectic solvent pretreatment [J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2025: 1-22.
- [47] Wijaya C, Sangadji N L, Muharja M, et al. An integrated green fractionation of coconut husk:

-
- Hydrothermal and deep eutectic solvent pretreatment for enhanced sugar and lignin production [J]. *Bioresource Technology Reports*, 2025, 29: 102078.
- [48] Abd A N, Shakor Z M, Al-Zuhairi F K, et al. Enhancing cellulose extraction from palm fronds using acidic and alkaline pretreatment: a kinetic study [J]. *Reaction Kinetics, Mechanisms and Catalysis*, 2025: 1-22.
- [49] Halysh V, Romero-García J M, Vidal A M, et al. Apricot seed shells and walnut shells as unconventional sugars and lignin sources [J]. *Molecules*, 2023, 28(3): 1455.
- [50] Wan Q, Lu Y, Cheng L, et al. Optimizing energy use in the integrated utilization of woody biomass: Process development and simulation [J]. *Industrial Crops and Products*, 2025, 225: 120426.
- [51] 赵烁, 李莹, 王震, 等. 木质纤维素预处理方法的研究进展 [J]. *中国造纸*, 2024, 43(08): 29-38.
- [52] Li X, Jiang G, Wang G, et al. Promising cellulose-based functional gels for advanced biomedical applications: a review [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 260: 129600.
- [53] Yadav M, Paritosh K, Pareek N, et al. Coupled treatment of lignocellulosic agricultural residues for augmented biomethanation [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2019, 213: 75-88.
- [54] Manyatshe A, Sibali L L. A review on the recovery of cellulose, lignin, and hemicellulose biopolymers from the same source of lignocellulosic biomass—Methodology, characterization and applications [J]. *Journal of Water Process Engineering*, 2025, 70: 107037.
- [55] Lobato-Peralta D R, Duque-Brito E, Villafan-Vidales H I, et al. A review on trends in lignin extraction and valorization of lignocellulosic biomass for energy applications [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2021, 293: 126123.
- [56] Padmanathan A M D, Beck S, Ansari K B, et al. Impact of lignin-carbohydrate complex (LCC) linkages on cellulose pyrolysis chemistry [J]. *Energy Advances*, 2024, 3(2): 515-528.
- [57] Yoo C G, Meng X, Pu Y, et al. The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review [J]. *Bioresource technology*, 2020, 301: 122784.
- [58] Zhao Y, Shakeel U, Rehman M S U, et al. Lignin-carbohydrate complexes (LCCs) and its role in biorefinery [J]. *Journal of Cleaner Production*, 2020, 253: 120076.
- [59] Hassan S S, Williams G A, Jaiswal A K. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass [J]. *Bioresource technology*, 2018, 262: 310-318.
- [60] Dai L, He C, Wang Y, et al. Comparative study on microwave and conventional hydrothermal pretreatment of bamboo sawdust: Hydrochar properties and its pyrolysis behaviors [J]. *Energy conversion and management*, 2017, 146: 1-7.
- [61] Yue P, Hu Y, Tian R, et al. Hydrothermal pretreatment for the production of oligosaccharides:

-
- A review [J]. *Bioresource technology*, 2022, 343: 126075.
- [62] Jamaldeen S B, Kurade M B, Basak B, et al. A review on physico-chemical delignification as a pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion [J]. *Bioresource technology*, 2022, 346: 126591.
- [63] Jönsson L J, Martín C. Pretreatment of lignocellulose: formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects [J]. *Bioresource technology*, 2016, 199: 103-112.
- [64] Chen X, Jiang J, Zhu J, et al. Deep eutectic solvent with Lewis acid for highly efficient biohydrogen production from corn straw [J]. *Bioresource Technology*, 2022, 362: 127788.
- [65] Hou Y, Wang S, Deng B, et al. Selective separation of hemicellulose from poplar by hydrothermal pretreatment with ferric chloride and pH buffer [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 251: 126374.
- [66] 王旭洁, 姚三川, 雒翠梅, 等. 路易斯酸预处理对木材热降解特性的影响 [J]. *北京林业大学学报*, 2024, 46(11): 133-140.
- [67] Pereira E, Pereira D T V, Rabelo S C, et al. Green solvent pretreatments for lignocellulosic biorefineries: A review [J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2025: 115303.
- [68] Bhagwat P, Amobonye A, Singh S, et al. Deep eutectic solvents in the pretreatment of feedstock for efficient fractionation of polysaccharides: current status and future prospects [J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2022, 12(Suppl 1): 171-195.
- [69] Yoo C G, Meng X, Pu Y, et al. The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review [J]. *Bioresource technology*, 2020, 301: 122784.
- [70] Shen X J, Wen J L, Mei Q Q, et al. Facile fractionation of lignocelluloses by biomass-derived deep eutectic solvent (DES) pretreatment for cellulose enzymatic hydrolysis and lignin valorization [J]. *Green chemistry*, 2019, 21(2): 275-283.
- [71] Xia Q, Liu Y, Meng J, et al. Multiple hydrogen bond coordination in three-constituent deep eutectic solvents enhances lignin fractionation from biomass [J]. *Green chemistry*, 2018, 20(12): 2711-2721.
- [72] Xu G C, Ding J C, Han R Z, et al. Enhancing cellulose accessibility of corn stover by deep eutectic solvent pretreatment for butanol fermentation [J]. *Bioresource technology*, 2016, 203: 364-369.
- [73] Wang W, Lee D J. Lignocellulosic biomass pretreatment by deep eutectic solvents on lignin extraction and saccharification enhancement: A review [J]. *Bioresource technology*, 2021, 339: 125587.
- [74] Cai J, Xue J, Li Y, et al. Research progress on high-value-added application of lignocellulosic biomass based on deep eutectic solvent pretreatment [J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2024, 14(24): 30913-30928.
- [75] Sun C, Song G, Pan Z, et al. Advances in organosolv modified components occurring during the organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass [J]. *Bioresource Technology*, 2023,

-
- 368: 128356.
- [76] Oliva A, Tan L C, Papirio S, et al. Effect of methanol-organosolv pretreatment on anaerobic digestion of lignocellulosic materials [J]. *Renewable Energy*, 2021, 169: 1000-1012.
- [77] Nair L G, Agrawal K, Verma P. Organosolv pretreatment: an in-depth purview of mechanics of the system [J]. *Bioresources and Bioprocessing*, 2023, 10(1): 50.
- [78] Fan M, Lei M, Liu Z, et al. Unveiling the role of lignin feature on bio-ethanol and xylose derived from poplar during combined alkali/ethanol synergistic pretreatment [J]. *Industrial Crops and Products*, 2024, 213: 118408.
- [79] Wei W, Wang B, Wang X, et al. Comparison of acid and alkali catalyzed ethylene glycol organosolv pretreatment for sugar production from bagasse [J]. *Bioresource technology*, 2021, 320: 124293.
- [80] Sun C, Ren H, Sun F, et al. Glycerol organosolv pretreatment can unlock lignocellulosic biomass for production of fermentable sugars: present situation and challenges [J]. *Bioresource technology*, 2022, 344: 126264.
- [81] Joy S P, Krishnan C. Modified organosolv pretreatment for improved cellulosic ethanol production from sorghum biomass [J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 177: 114409.
- [82] Wang S, Li M F. Efficient extraction of light-colored lignin from bamboo by *p*-toluenesulfonic acid assisted tetrahydrofurfuryl alcohol aqueous solution [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 282: 136723.
- [83] Liu L, Qian C, Jiang L, et al. Direct three-dimensional characterization and multiscale visualization of wheat straw deconstruction by white rot fungus [J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(16): 9819-9825.
- [84] 郭良昊, 陈海秀, 李松, 等. *Trametes sp.* LS-10C 固态发酵产漆酶培养基优化及其对双酚 A 的降解 [J]. *菌物学报*, 2020, 39(10): 1948-1959.
- [85] Wang R, You T, Yang G, et al. Efficient short time white rot–brown rot fungal pretreatments for the enhancement of enzymatic saccharification of corn cobs [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2017, 5(11): 10849-10857.
- [86] Li F, Liu Y, Jia J, et al. Combination of biological pretreatment with deep eutectic solvent pretreatment for enhanced enzymatic saccharification of *Pinus massoniana* [J]. *Bioresource Technology*, 2023, 380: 129110.
- [87] Yoo C G, Meng X, Pu Y, et al. The critical role of lignin in lignocellulosic biomass conversion and recent pretreatment strategies: A comprehensive review [J]. *Bioresource technology*, 2020, 301: 122784.
- [88] Ishola M M, Taherzadeh M J. Effect of fungal and phosphoric acid pretreatment on ethanol production from oil palm empty fruit bunches (OPEFB) [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 165: 9-12.
- [89] 陈肖肖. 结合 Fenton 预处理的白腐真菌诱导发酵降解木质纤维素及产糖效果研究 [D]. 浙江理工大学, 2022.

-
- [90] Rocha-Martín J, Martínez-Bernal C, Zamorano S L, et al. Inhibition of enzymatic hydrolysis of pretreated corn stover and sugar cane straw by laccases [J]. *Process Biochemistry*, 2018, 67: 88-91.
- [91] Keita V M, Lee Y Q, Lakshmanan M, et al. Evaluating oleaginous yeasts for enhanced microbial lipid production using sweetwater as a sustainable feedstock [J]. *Microbial Cell Factories*, 2024, 23(1): 63.
- [92] Zhao M, Wang Y, Zhou W, et al. Co-valorization of crude glycerol and low-cost substrates via oleaginous yeasts to micro-biodiesel: status and outlook [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2023, 180: 113303.
- [93] Xie Z T, Mi B Q, Lu Y J, et al. Research progress on carotenoid production by *Rhodospiridium toruloides* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, 108(1): 11-14.
- [94] Liu M, Wang H, Yan X, et al. Multi-omics analysis reveals the mechanism of torularhodin accumulation in the mutant *Rhodospiridium toruloides* A1-15 under nitrogen-limited conditions [J]. *Food & Function*, 2023, 14(14): 6363-6375.
- [95] Leiva-Candia DE, Pinzi S, Redel-Macías MD, Koutinas A, Webb C, Dorado MP. The potential for agro-industrial waste utilization using oleaginous yeast for the production of biodiesel [J]. *Fuel*. 2014; 123: 33-42.
- [96] . Sunder S, Gupta A, Kataria R, et al. Potential of *Rhodospiridium toruloides* for fatty acids production using lignocellulose biomass [J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2024, 196(5): 2881-2900.
- [97] Wu C C, Tsai Y Y, Ohashi T, et al. Isolation of a thermotolerant *Rhodospiridium toruloides* DMKU3-TK16 mutant and its fatty acid profile at high temperature [J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2018, 365(21): 1-35.
- [98] 杨航. 圆红冬孢酵母产油规律及合成类可可脂的研究 [D]. 河南工业大学, 2024.
- [99] Xie Z T, Mi B Q, Lu Y J, et al. Research progress on carotenoid production by *Rhodospiridium toruloides* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2024, 108(1): 7.
- [100] De Almeida S G C, Souza J P, Fogarin H M, et al. Assessment of lipid synthesis from sugarcane biomass by adaptive strains of *Rhodospiridium toruloides* [J]. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 2024: 1-20.
- [101] 张良, 吴坤龙, 金中亮, 等. 油茶副产物综合利用综述 [J]. *食品工业*, 2022, 43(07): 192-196.
- [102] Liu S, He Z, Yin H, et al. ABA and MeJA Induced Catechin and Epicatechin Biosynthesis and Accumulation in *Camellia oleifera* Fruit Shells [J]. *Plants*, 2024, 13(16): 2211.
- [103] 段丽萍, 苗丽坤, 孙炜炜, 等. 油茶多糖的提取及生物活性研究进展 [J]. *粮食与油脂*, 2020, 33(11): 26-28.
- [104] Wei M, Hu Y, Zou W, et al. Physicochemical property and antioxidant activity of polysaccharide from the seed cakes of *Camellia oleifera* Abel [J]. *Food Science & Nutrition*,

-
- 2022, 10(5): 1667-1682.
- [105] Zhang F, Zhu F, Chen B, et al. Composition, bioactive substances, extraction technologies and the influences on characteristics of *Camellia oleifera* oil: A review [J]. Food Research International, 2022, 156: 111159.
- [106] Song H, Zhang Y, Huang Q, et al. Extraction optimization, purification, characterization, and hypolipidemic activities of polysaccharide from pumpkin [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025: 141907.
- [107] Tao L, Zhang J, Lan W, et al. Polysaccharide decolorization: Methods, principles of action, structural and functional characterization, and limitations of current research [J]. Trends in Food Science & Technology, 2023, 138: 284-296.
- [108] 卯明娟, 陆源添, 洪鹏, 等. 超声波-半仿生法提取瓦尼桑黄子实体多糖的工艺优化 [J]. 中国瓜菜, 2025: 1-14.
- [109] 樊贝贝, 尚建平, 白欣宇, 等. 益母草总黄酮的提取工艺优化及其抗氧化活性研究 [J]. 中国饲料, 2025: 1-8.
- [110] 梁杏. 核桃饼粕多酚提取纯化及其抗氧化和降脂活性初步研究 [D]. 云南中医学院, 2016.
- [111] 杜晓静, 梁浩. 响应面分析法优化油茶饼粕中茶皂素的提取工艺 [J]. 饲料研究, 2024, 47(21): 98-103.
- [112] Segal L, Creely J J, Martin Jr A E, et al. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer [J]. Textile research journal, 1959, 29(10): 786-794.
- [113] 唐敏. 油茶多糖的提取优化、理化特性及其抗氧化活性研究 [D]. 四川农业大学, 2023.
- [114] 刘丹, 任洪飞, 逢梦玉, 等. 灵芝多糖的分离纯化、结构表征和抗氧化活性研究 [J]. 粮食与油脂, 2025, 38(03): 81-86+101.
- [115] Liu K, Wu X, Dai H. Citric acid cross-linked chitosan for inhibiting oxidative stress after nerve injury [J]. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 2022, 110(10): 2231-2240.
- [116] 寇先勇, 吴燕, 王晓姿, 等. 5 种中药粗多糖水凝胶的制备及其促伤口愈合能力研究 [J]. 轻工学报, 2024, 39(02): 43-53.
- [117] 林欣颖, 谢传奇. 油茶果壳多糖的提取工艺及免疫活性研究 [J]. 生物化工, 2022, 8(05): 24-28+59.
- [118] Rumpf J, Burger R, Schulze M. Statistical evaluation of DPPH, ABTS, FRAP, and Folin-Ciocalteu assays to assess the antioxidant capacity of lignins [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2023, 233: 123470.
- [119] Yang T, Zhang H, Bian Y, et al. Ultrasonic-assisted plasma-activated water extraction of polysaccharide from *Hemerocallis citrina* Baroni: Structural characterization and antioxidant mechanism in vitro [J]. Food Chemistry, 2025, 465: 142049.

-
- [120] Yang M, Gong H, Jiang C, et al. Effects of different extraction methods on the structure and function of blackberry seed polysaccharides [J]. International Journal of Food Science and Technology, 2024, 59(7): 4866-4879.
 - [121] Zhang S, Li X. Hypoglycemic activity in vitro of polysaccharides from *Camellia oleifera* Abel. seed cake [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 115: 811-819.
 - [122] Xing Z. Exploring the ionic mechanochemical coupling effects in the swelling behavior of hydrogels based on the interaction parameter [J]. Journal of Applied Polymer Science, 2025: e56974.
 - [123] Van Der Sman R G M. Theoretical investigation of the swelling of polysaccharide microgels in sugar solutions [J]. Food & function, 2018, 9(5): 2716-2724.
 - [124] Kunjalukkal Padmanabhan S, Lamanna L, Friuli M, et al. Carboxymethylcellulose-based hydrogel obtained from bacterial cellulose [J]. Molecules, 2023, 28(2): 829.
 - [125] Goh M C, Du M, Peng W R, et al. Advancing burn wound treatment: exploring hydrogel as a transdermal drug delivery system [J]. Drug delivery, 2024, 31(1): 2300945.
 - [126] Schilling A L, Cannon E, Fullerton-Shirey S K, et al. A ready-to-use, thermoresponsive, and extended-release delivery system for the paranasal sinuses [J]. Drug Delivery and Translational Research, 2022: 1-12.
 - [127] Liu S, Cai Y, Du M, et al. Research on Adsorption of Heavy Metal Ions by Polysaccharide Hydrogels [J]. ChemistrySelect, 2024, 9(41): 1-19.
 - [128] Zheng H, Wang J, Huang S, et al. Mechanically robust calcium alginate/polyacrylamide/tannic acid hydrogel with super toughness, adhesiveness and antimicrobial activity for pork freshness monitoring [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2025, 302: 140539.
 - [129] Khan N A, Khan M, Sufyan A, et al. Biotechnological processing of sugarcane bagasse through solid-state fermentation with white rot fungi into nutritionally rich and digestible ruminant feed [J]. Fermentation, 2024, 10(4): 181.
 - [130] Hu M, Cai Z, Zhang J, et al. Ammonia fiber expansion (AFEX) combined with white-rot fungi pretreatment to improve enzymatic hydrolysis of lignocellulose [J]. Biomass Conversion and Biorefinery, 2024, 14(9): 10085-10099.
 - [131] 刘宇. *Trametes sp.* LS-10C 产漆酶发酵条件优化 [D]. 安徽工程大学, 2016.
 - [132] Gómez Millán G, Sixta H. Towards the green synthesis of furfuryl alcohol in a one-pot system from xylose: A review [J]. Catalysts, 2020, 10(10): 1101.
 - [133] Sluiter A, Hames B, Ruiz R O, et al. Determination of structural carbohydrates and lignin in [971biomass [R]. NREL/TP-510-42618, Laboratory Analytical Procedure (LAP) National Renewable Energy Laboratory (NREL), Golden CO, 2008.
 - [134] Jönsson L J, Alriksson B, Nilvebrant N O. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification [J]. Biotechnology for biofuels, 2013, 6: 1-10.

-
- [135] 张佐宇. 芒草水热预处理及副产物糠醛的分离回收研究 [D]. 中南林业科技大学, 2024.
- [136] 王标. 预处理核桃壳水热液化高效制备生物油及酚醛泡沫的制备研究 [D]. 安徽工业大学, 2022.
- [137] 王启尧. 水热预处理笋壳联产葡萄糖和低聚木糖 [D]. 南京林业大学, 2023.
- [138] Tang C, Shan J, Chen Y, et al. Organic amine catalytic organosolv pretreatment of corn stover for enzymatic saccharification and high-quality lignin [J]. *Bioresource technology*, 2017, 232: 222-228.
- [139] 邓杨臻, 谭雪松, 王闻, 等. 四氢糠醇-稀酸体系预处理杂交狼尾草的试验研究 [J]. *太阳能学报*, 2020, 41(03): 339-344.
- [140] Wu H, Wang B, Geng F, et al. Alkaline tetrahydrofurfuryl alcohol pretreatment technology to achieve value-added co-liquefaction of biomass [J]. *Renewable Energy*, 2025, 239: 122097.
- [141] Mukasekuru M R, Hu J, Zhao X, et al. Enhanced high-solids fed-batch enzymatic hydrolysis of sugar cane bagasse with accessory enzymes and additives at low cellulase loading [J]. *Acs Sustainable Chemistry & Engineering*, 2018, 6(10): 12787-12796.
- [142] Ma C Y, Luo X T, Xu L H, et al. Structural elucidation and targeted valorization of untractable lignin from pre-hydrolysis liquor of xylose production via a simple and robust separation approach [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2023, 253: 127029.
- [143] Tang S, Yu Y, Tan X, et al. Impact of surfactants on the pretreatment of rice straw with tetrahydro-2-furanmethanol and aluminum chloride to enhance enzymatic saccharification [J]. *Industrial Crops and Products*, 2024, 210: 118139.
- [144] Qiu Y, Zhang L, Zhang F, et al. Efficient production of xylooligosaccharides from *Camellia oleifera* shells pretreated by pyruvic acid at lower temperature [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 259: 129262.
- [145] Liu X, Xie M, Hu Y, et al. Facile preparation of lignin nanoparticles from waste *Camellia oleifera* shell: The solvent effect on the structural characteristic of lignin nanoparticles [J]. *Industrial Crops and Products*, 2022, 183: 114943.
- [146] Sun F F, Tang S, Liu R, et al. Biorefining fractionation of the *Camellia oleifera* Abel. hull into diverse bioproducts with a two-stage organosolv extraction [J]. *Industrial Crops and Products*, 2016, 94: 790-799.
- [147] Zhang J, Du M, Hu L. Factors influencing polyol liquefaction of nut shells of different camellia species [J]. *BioResources*, 2016, 11: 9956-9969.
- [148] Chen L, Chen R, Fu S. FeCl₃ pretreatment of three lignocellulosic biomass for ethanol production [J]. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 2015, 3(8): 1794-1800.
- [149] Wei W, Chen Z, Wang H, et al. Co-production of fermentable glucose, xylose equivalents, and HBS-lignin from sugarcane bagasse through a FeCl₃-catalyzed EG/H₂O pretreatment

-
- [J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 165: 113440.
- [150] Romero I, López-Linares J C, Moya M, et al. Optimization of sugar recovery from rapeseed straw pretreated with FeCl_3 [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 268: 204-211.
- [151] Zhang H, Ye G, Wei Y, et al. Enhanced enzymatic hydrolysis of sugarcane bagasse with ferric chloride pretreatment and surfactant [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 229: 96-103.
- [152] Zhang H, Zhang S, Yuan H, et al. FeCl_3 -catalyzed ethanol pretreatment of sugarcane bagasse boosts sugar yields with low enzyme loadings and short hydrolysis time [J]. *Bioresource technology*, 2018, 249: 395-401.
- [153] Tang S, Liu R, Sun F F, et al. Bioprocessing of tea oil fruit hull with acetic acid organosolv pretreatment in combination with alkaline H_2O_2 [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 1-12.
- [154] You Y, Zhang X, Li P, et al. Co-production of xylooligosaccharides and activated carbons from *Camellia oleifera* shell treated by the catalysis and activation of zinc chloride [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 306: 123131.
- [155] Zhang L, Zhang W, Zhang F, et al. Xylo-oligosaccharides and lignin production from *Camellia oleifera* shell by malic acid hydrolysis at mild conditions [J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125897.
- [156] ang S, Dong Q, Fang Z, et al. Microbial lipid production from rice straw hydrolysates and recycled pretreated glycerol [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 312: 123580.
- [157] Zhang B, Zhan B, Bao J. Reframing biorefinery processing chain of corn fiber for cellulosic ethanol production [J]. *Industrial Crops and Products*, 2021, 170: 113791.
- [158] Wen P, Chen Z, Lian Z, et al. Efficient production of high concentration monosaccharides and ethanol from poplar wood after delignification and deacetylation [J]. *Bioresource Technology*, 2023, 385: 129459.
- [159] Tang S, Yuan S, Sheng Y, et al. Co-production of fermentable sugars and highly active lignin from eucalyptus via a mild preprocessing with diethylene glycol and chromic chloride [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 273: 133161.
- [160] Zhang Y, Li H, Xin Q, et al. The role of glycosylation in non-productive adsorption of cellulase to lignin isolated from pretreated corn stover [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 266: 130836.
- [161] Zhong D, Zeng K, Li J, et al. Characteristics and evolution of heavy components in bio-oil from the pyrolysis of cellulose, hemicellulose and lignin [J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2022, 157: 111989.
- [162] Tang S, Yu Y, Liu R, et al. Enhancing ethylene glycol and ferric chloride pretreatment of rice straw by low-pressure carbon dioxide to improve enzymatic saccharification [J]. *Bioresource Technology*, 2023, 369: 128391.
- [163] Zhang Y, Li H, Xin Q, et al. The role of glycosylation in non-productive adsorption of cellulase to lignin isolated from pretreated corn stover [J]. *International Journal of Biological*

-
- Macromolecules, 2024, 266: 130836.
- [164] Zhang J, Du M, Hu L. Factors influencing polyol liquefaction of nut shells of different camellia species [J]. BioResources, 2016, 11: 9956-9969.
- [165] Liu X, Xie M, Hu Y, et al. Facile preparation of lignin nanoparticles from waste *Camellia oleifera* shell: The solvent effect on the structural characteristic of lignin nanoparticles [J]. Industrial Crops and Products, 2022, 183: 114943.
- [166] Pylypchuk I V, Riazanova A, Lindström M E, et al. Structural and molecular-weight-dependency in the formation of lignin nanoparticles from fractionated soft-and hardwood lignins [J]. Green Chemistry, 2021, 23(8): 3061-3072.
- [167] Deuss P J, Lancefield C S, Narani A, et al. Phenolic acetals from lignins of varying compositions via iron (iii) triflate catalysed depolymerisation [J]. Green Chemistry, 2017, 19(12): 2774-2782.
- [168] 邓茜. 硫酸酯酶半理性设计及其在大肠杆菌合成中链脂肪酸中的应用 [D]. 上海交通大学 2020.
- [169] 龚佳, 黄其田, 史荣超, 等. 碳源、温度和 pH 对产油酵母脂肪酸组成的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2022, 48 (07): 29-35.
- [170] Adnan A, Nair G R, Lay M C, et al. Influences of saccharides types and initial glucose concentration on microbial cellulose production by *G. xylinus* [J]. Journal of Fundamental and Applied Sciences, 2017, 9(2S): 174-181.
- [171] Xu J, Du W, Zhao X, et al. Renewable microbial lipid production from oleaginous yeast: some surfactants greatly improved lipid production of *Rhodospiridium toruloides* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 32: 1-9.
- [172] 王雅南, 沈宏伟, 杨晓兵, 等. 不同营养元素限制对圆红冬孢酵母油脂生产的影响 [J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(11): 16-22.
- [173] 高振, 马晓宇, 高明, 等. 圆红冬孢酵母利用生物柴油副产物粗甘油产油脂的影响因素分析 [J]. 环境工程, 2020, 38 (08): 52-57.
- [174] 方玉美, 赫玲玲, 程顺利, 等. 圆红冬孢酵母的高密度油脂发酵过程研究 [J]. 中国油脂, 2024, 1-10.

附录

表 1 实验试剂表

试剂名称	规格	生产厂家
葡萄糖	AR	生工
没食子酸	AR	沪试
氯化铵	AR	沪试
芦丁	AR	生工
福林酚	AR	生工
碳酸钠	AR	生工
氯化钙	AR	沪试
茶皂素	AR	生工
七水硫酸亚铁	AR	沪试
香草醛	AR	麦克林
聚乙烯醇 10000	AR	沪试
五水硫酸铜	AR	沪试
愈创木酚	AR	麦克林
蛋白胨	AR	麦克林
氯化钠	AR	生工
磷酸二氢钾	AR	生工
硫酸镁	AR	沪试
无水乙醇	AR	生工
酵母提取物	AR	麦克林
吐温 20	AR	麦克林
吐温 80	AR	麦克林
抗坏血酸	AR	麦克林
琼脂粉	AR	生工
硝酸钠	AR	生工
盐酸	AR	沪试
硫酸	AR	沪试
乙酸	AR	麦克林
氢氧化钠	AR	麦克林
氯仿	AR	沪试

表 2 实验仪器设备表

实验设备	生产厂家
立式高压蒸汽灭菌锅	上海申安医疗器械厂
超净工作台	浙江孚夏医疗科技有限公司
电热鼓风干燥箱	上海力辰科技有限公司
恒温培养箱	上海力辰科技有限公司
马弗炉	安徽科幂仪器有限公司
多功能粉碎机	九阳股份有限公司
紫外可见分光光度计	上海美普达仪器有限公司
机械搅拌反应釜	安徽科幂仪器有限公司
恒温培养摇床	知楚生物科技有限公司
冷冻干燥机	南京金实有限公司
电磁炉	九阳股份有限公司
电子天平	上海力辰科技有限公司
冰箱	海尔集团公司
高速离心机	湖南湘仪实验仪器开发有限公司
紫外可见吸收光谱仪	日本岛津有限公司
高效液相色谱	日本岛津有限公司
荧光分光光度计	日立有限公司
气相色谱仪	美国安捷伦有限公司

攻读硕士期间学术论文发表情况

- [1] Tang S, **Yu Y**, Liu R, et al. Enhancing ethylene glycol and ferric chloride pretreatment of rice straw by low-pressure carbon dioxide to improve enzymatic saccharification [J]. Bioresource Technology, 2023, 369: 128391.
- [2] Tang S, **Yu Y**, Tan X, et al. Impact of surfactants on the pretreatment of rice straw with tetrahydro-2-furanmethanol and aluminum chloride to enhance enzymatic saccharification [J]. Industrial Crops and Products, 2024, 210: 118139.
- [3] 唐松, **喻艳玲**, 孟娜, 李艳宾, 秦梦茹, 张慧云. 一种利用二氧化碳耦合有机溶剂高效解构木质纤维素原料的方法 [P]. 中国专利: 115928479A, 2025-01-24.

致谢

光阴流转，恍若春水煎茶。当神山公园的郁金香盛典再次浪漫启幕，我驻足回望这段交织着困惑与顿悟、汗水与欢欣的科研岁月。其间每一帧光影都镌刻着生命的印记，而最璀璨的星芒莫过于唐松老师的谆谆教诲。犹记初入实验室时的惶惑，是您以渊博学识为灯塔，在纤维素组分的数据迷宫中为我指引方向。没有唐老师孜孜不倦的教诲，我也不会拥有现在的成果。同时，我也要感谢张琴老师，三载春秋，您以春风化雨的智慧将实验设计、学术批判的密钥交予我手。在这里，我由衷地感谢唐老师和张老师这三年来的悉心指导与帮助，愿唐老师和张老师学术长青、桃李满天下。

在这三年的旅程中，很幸运与“309 生物化工课题组”的益友的温暖同行，在这里感谢我的师兄师姐师弟师妹们，祝愿他们工作、科研一切皆顺。我要感谢校外导师，唐金鹏老师，感谢他在我的实验遇到困难时提出的宝贵意见，我还要感谢 309 课题组所有的老师们，衷心感谢他们在我实验受阻时给予的专业指导，以及在科研道路和人生成长中的方向指引，值此之际，更祝愿诸位事业顺遂、身体健康。

最后，我还要感谢我的父母，是他们用故乡的云霞为我的科学探索之旅披上斗篷，用朴素叮嘱构筑起最坚实的后盾，激励着我始终向前。

此去经年，我将奔赴属于我的星辰大海。愿恩师学术之树常青，愿同窗各自灿烂，愿每一个努力的灵魂，都能收获属于自己的星辰大海——这既是致谢的终点，亦是探索未来的开端。

2025 年 5 月 15 日