

引用格式:钱睿创,王峥,史旭军,等. 杨树木屑废弃物酶解液发酵制备富硒酵母的研究[J]. 北京化工大学学报(自然科学版), 2020, 47(1): 81–88.

QIAN RuiChuang, WANG Zheng, SHI XuJun, et al. Preparation of selenium-enriched yeast by enzymatic hydrolysis of waste poplar wood chips[J]. Journal of Beijing University of Chemical Technology (Natural Science), 2020, 47(1): 81–88.

# 杨树木屑废弃物酶解液发酵制备富硒酵母的研究

钱睿创<sup>1</sup> 王 峥<sup>2\*</sup> 史旭军<sup>3</sup> 王 瑞<sup>4</sup>

(1. 北京化工大学 化学工程学院, 北京 100029; 2. 北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029;

3. 桂林长发小寨生物科技有限公司, 桂林 541000; 4. 北京佰草国颐堂医学研究院, 北京 100012)

**摘 要:**以杨树木屑为原料,考察了固液比、酶添加量、pH 和酶解时间对其酶解效果的影响。通过优化酶解条件制得葡萄糖质量浓度为 55 g/L 的酶解液,将酶解液作为碳源替代传统培养基中的葡萄糖,其他营养成分不变,发酵制备富硒酵母,重点研究了酵母菌在酶解液中的生长情况和富硒能力。结果表明,酵母在酶解液培养基中长势良好,5 L 发酵罐发酵 36 h 后,每 L 发酵液酵母干重 23.9 g,单位酵母硒含量超过 3 500  $\mu\text{g/g}$ 。

**关键词:**杨树木屑; 酶解; 富硒酵母; 硒含量

**中图分类号:** TQ926.3 **DOI:** 10.13543/j.bhxbzr.2020.01.013

## 引 言

我国人工林规模发展迅速,已经成为世界上人工林保存面积最大的国家<sup>[1]</sup>。在人工速生丰产林工程中,杨树为主要造林树种之一。速生杨规模的快速发展在满足人们对木材的需求的同时,产生了大量的采伐剩余物和加工剩余物,这些剩余物含有丰富的生物活性物质、纤维素以及半纤维素<sup>[2–6]</sup>。郑光耀等<sup>[7]</sup>利用杨树木屑和树皮替代棉籽壳栽培姬菇和金针菇;吴春山<sup>[8]</sup>用木屑制作饲料,其中利用杨树木屑制作的饲料效果最好;李晓鸣等<sup>[9]</sup>利用杨树木屑栽培黑木耳,黑木耳的产量比常规椴木屑增加 7.7%。木质纤维素量大、廉价的特点<sup>[10]</sup>使得其具有替代淀粉类生物质水解为单糖进而发酵生产燃料乙醇、益生菌等的潜能。然而,目前关于木质纤维素水解成单糖的研究主要集中在农作物秸秆上<sup>[11–13]</sup>,对林业剩余物的研究较少。

木质纤维素类生物质在酶解前要进行预处理,脱除半纤维素和木质素,增加原料的孔隙率,暴露出

更多的活性位点,使得纤维素酶与纤维素的接触更加充分,从而提高酶解速率。在酶解过程中,酶与底物充分有效的接触是控制酶解速率的关键因素。Hodge 等<sup>[14]</sup>研究了传质对玉米秸秆酶解速率的影响,结果表明,当底物浓度接近 20% 时传质的限制变得明显;Arantes 等<sup>[15]</sup>指出纤维素酶的高成本仍然是生物乙醇商业化的一大障碍。以上研究表明合适的底物浓度及纤维素酶添加量对于酶解工艺的优化是十分必要的。

富硒酵母主要指以酿酒酵母为载体,将环境中无机硒富集并转化为更容易被生物体利用和吸收的有机硒的一类特种酵母<sup>[16–19]</sup>。富硒酵母是一种重要的食用/饲用生产菌株,具有独特的生理功能,能够增加人体或动物体的硒含量,改善健康状况。富硒酵母在生长过程中对氮源、碳源、磷源的要求较高,因此使用流加发酵策略有利于富硒酵母的高密度培养。Shi 等<sup>[20]</sup>的研究表明在日粮中添加富硒酵母可以改善山羊的精液质量,通过短期膳食补充有机硒,能够以较低的饲养成本提高其繁殖性能;娄兴丹等<sup>[21]</sup>从新疆富硒土壤中筛选出一株红酵母 X-20,以甘油作为碳源,在发酵过程中流加亚硒酸钠,使得菌株 X-20 的硒含量达到 5 009  $\mu\text{g/g}$ ;Wang 等<sup>[19]</sup>研究了富硒酵母的补料发酵策略,结果表明,在酵母对数生长后期添加亚硒酸钠对其生长影响较小,发酵结束时酵母干重 102 g/L,硒含量为 2 020  $\mu\text{g/g}$ 。富

收稿日期: 2019-08-04

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFD0601001)

第一作者: 男,1994 年生,硕士生

\* 通信联系人

E-mail: 15822509667@163.com

硒酵母在生长过程中对碳源的需求量很大,从资源循环、废弃物再利用的角度来考虑,以杨树木屑酶解液作为碳源替代传统的葡萄糖发酵制备富硒酵母具有实际应用意义。

本文以杨树木屑为原料,根据文献[22]提供的方法对木屑进行预处理。将预处理后的木屑渣作为研究对象,探究纤维素酶水解的可行性及最佳水解条件,并探讨了利用酶解液作为碳源发酵制备富硒酵母的可行性,以期为人工林剩余物的工业化利用提供理论和技术参考。

## 1 实验部分

### 1.1 实验原料和仪器

#### 1.1.1 实验原料

杨树木屑原料由南京林业大学提供,粒度250~420  $\mu\text{m}$ ,置于105  $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干备用;纤维素复合酶由康地恩生物科技公司提供,酶活70 FPU/mL(filter paper unit,即滤纸酶活,1FPU表示在1 min内产生1  $\mu\text{mol}$ 葡萄糖所用的酶量);酵母粉、蛋白胨,分析纯,北京奥博星生物技术有限公司;葡萄糖、七水硫酸镁,分析纯,北京化工厂;磷酸二氢钾、硫酸铵,分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

种子培养基:酵母粉10 g/L,蛋白胨20 g/L,葡萄糖20 g/L。

葡萄糖发酵培养基:酵母粉10 g/L,葡萄糖25 g/L,硫酸铵10 g/L,七水硫酸镁6 g/L,磷酸二氢钾9 g/L。

杨树木屑酶解液发酵培养基:用酶解液替代发酵培养基中的葡萄糖,其余成分不变。

#### 1.1.2 实验仪器

KHY-2H型高温高压反应釜,北京金仕德科技有限公司;X-620型笔式pH计,上海三信仪表厂;LDZX-75KBS立式高压蒸汽灭菌锅,上海申安医疗器械厂;HZQ-F100全温震荡培养箱,太仓培英实验设备有限公司;Mini-15K微型高速离心机,杭州奥盛仪器有限公司;RE52-99旋转蒸发仪,北京天林恒泰科技有限公司;BIOTECH-5JG发酵罐,上海保兴生物设备工程有限公司;SBA-40D生物传感分析仪,山东省科学院生物研究所;UV-5500PC紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;DM500型显微镜,德国徕卡公司。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 杨树木屑组分分析

采用美国国家可再生能源实验室(NREL)提供

的方法测定杨树木屑组分的含量<sup>[23]</sup>。纤维素的含量以葡萄糖质量与原料质量的比值表示,半纤维素的含量以木糖、阿拉伯糖的质量和与原料质量的比值表示,计算公式如式(1)、(2)所示。

$$w_c = \frac{m_1 \times 0.9}{m} \times 100\% \quad (1)$$

$$w_h = \frac{(m_2 + m_3) \times 0.88}{m} \times 100\% \quad (2)$$

式中, $w_c$ 为纤维素含量(质量分数),%; $m_1$ 为水解液中葡萄糖的质量,g; $m$ 为原料杨树木屑的质量,g; $w_h$ 为半纤维素含量(质量分数),%; $m_2$ 为水解液中木糖的质量,g; $m_3$ 为水解液中阿拉伯糖的质量,g。

#### 1.2.2 杨树木屑预处理及酶解液制备

在固液比1:5、醋酸浓度5%、温度170  $^{\circ}\text{C}$ 条件下保温30 min对杨树木屑进行预处理。保温结束后待反应釜自然降温至80  $^{\circ}\text{C}$ ,取出反应罐,置于冷水中冷却至室温。水洗体积倍数定义为用于对预处理液脱毒的水洗体积与预处理液体积的比值,充分水洗表示水洗液pH呈中性且基本无色,水洗的目的是去除固体剩余物上吸附的糠醛、乙酸等有害物质。水洗后的固体置于105  $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中干燥至恒重,进行酶解条件优化<sup>[24-25]</sup>。葡萄糖含量采用SBA-40D生物传感分析仪测定,纤维素转化率根据式(3)计算

$$\alpha = \frac{m_4 \times 0.9}{m_5} \times 100\% \quad (3)$$

式中, $\alpha$ 为纤维素的转化率,%; $m_4$ 为酶解液中葡萄糖的质量,g; $m_5$ 为固体剩余物中葡聚糖的质量,g。

#### 1.2.3 发酵制备富硒酵母

**菌种活化** 将斜面保存的菌种挑出一环接种于小试管中,在30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min条件下培养24 h。按照1%的接种量将试管中的酵母接种于摇瓶中,30  $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min下培养16 h。

**发酵培养** 按照5%的接种量将摇瓶中的菌种转接到发酵罐中,发酵罐装液2 L,调节初始转速为200 r/min,每隔1 h增加50 r至转速为500 r/min,之后维持恒定转速,pH=5.3 $\pm$ 0.1,通气量3 L/min。接种后每4 h取样测定葡萄糖浓度和酵母生物量,用显微镜观察菌种生长状态,同时留样用来测定硒含量。

**发酵培养基优化** 以酵母生长必须依赖的碳源、氮源、磷源等为自变量,即硫酸铵、磷酸二氢钾和硫酸镁浓度为因素,设计三因素四水平正交试

验<sup>[26]</sup>,见表 1,不考虑成分的交互作用,以酵母生物量作为指标判断最适的培养基浓度。

表 1  $L_9(4^3)$  正交试验的因素和水平

Table 1 Factors and levels of  $L_9(4^3)$  orthogonal experiments

水平	因素(质量浓度/(g·L <sup>-1</sup> ))		
	硫酸铵(A)	磷酸盐(B)	硫酸镁(C)
1	0	0	0
2	10	3	3
3	15	6	6
4	20	9	9

1.2.4 酵母硒含量测定及分析

原始培养基中葡萄糖消耗完毕后,开始流加含有亚硒酸钠的高浓度葡萄糖,每隔 4 h 取样,用去离子水重悬 3 次,离心,冻干。称取 0.1 g 左右干酵母,加入浓硝酸 5 mL,160 ℃ 下高温高压消解 2~3 h 至液体澄清透明,采用催化-分光光度法测定酵母硒含量<sup>[19,27]</sup>。

2 结果与讨论

2.1 预处理前后的杨树木屑组分

如表 2 所示,与原料相比,预处理后经充分水洗的固体剩余物中纤维素的含量提高了 49.4%,半纤维素的含量下降了 85.1%,表明预处理的效果十分明显,能够溶解大部分的半纤维素。由于稀酸对木质素的降解作用有限,故大部分木质素得以保留。

表 2 预处理前后杨木组分含量

Table 2 Poplar component content before and after pretreatment

材料	组分含量/%		
	纤维素	半纤维素	木质素和灰分
原料	34.23	17.2	21.21
固体剩余物	51.13	2.5	35.59

2.2 酶解条件优化

2.2.1 水洗体积

稀酸预处理能够有效提高纤维素酶的酶解效果,其原理是半纤维素在稀酸溶液中降解为单糖或寡糖,造成纤维素膨胀、比表面积增大,有利于纤维素酶对纤维素的分解,从而提高了纤维素转化率。在预处理过程中,糖类的降解产物如糠醛、羟甲基糠

醛、甲酸、乙酸等能够显著抑制纤维素酶的活性,故需要对预处理后的木质纤维材料进行脱毒。最简单有效的脱毒方法是水洗法,即用大量水将木屑渣中的糠醛、乙酸等有害物质除去,之后加入纤维素酶酶解。表 3 为不同水洗体积下固体剩余物的酶解情况,考虑到未经充分水洗的木屑渣上可能吸附有因预处理而降解生成的葡萄糖,因此计算纤维素转化率时需要扣除此部分葡萄糖的浓度。分别取 0、5、10 倍体积水洗的固体木屑渣各 10 g,加入缓冲液 60 mL,充分摇匀,上清液中的葡萄糖浓度分别为 0.23~0.27、0、0 g/L。扣除了背景浓度后,木屑渣在不同水洗体积下的纤维素转化率分别为 26%、41%、47% 和 56%,充分水洗的木屑渣纤维素转化率是未经脱毒的 2.1 倍。从经济性上分析,充分水洗的方式虽然提高了纤维素转化率,但是需要消耗大量的水资源,所以综合纤维素转化率和经济性双重考虑,决定选择 10 倍水洗体积的固体剩余物进行酶解最适条件的探究。

表 3 水洗体积对酶解的影响

Table 3 Effect of washing volume on enzymatic hydrolysis

水洗体积倍数	葡萄糖浓度/(g·L <sup>-1</sup> )	纤维素转化率/%
0	25.93	26.38
5	40.6	41.32
10	46.32	47.14
充分水洗	55	55.97

2.2.2 固液比

固液比表示为烘干的木屑质量与缓冲液体积的比值(g/mL),固液比决定酶解液中还原糖浓度的上限,当底物充足且传热传质良好时,酶解效果佳。在纤维素酶添加量 20 FPU/g、pH = 4.8、50 ℃ 条件下,水解 48 h,考察不同固液比下纤维素的转化率,结果如图 1 所示。在考察的固液比范围内,葡萄糖浓度随着固液比的增大而增大,纤维素转化率则是先增大后减小,当固液比为 1:5 时葡萄糖浓度达到最大值,固液比 1:6 时纤维素转化率最高达到 56%。葡萄糖浓度和纤维素转化率的非同步性表明随着固液比的增大,水解条件发生了变化。分析其原因,固液比过高阻碍了纤维素酶与纤维素的有效碰撞,使得局部底物不能充分与酶接触;同时,水解产物葡萄糖、纤维二糖等由于体系流动性下降造成局部浓度过高,对纤维素酶形成产物抑制。因此,确定固液比 1:6 作为底物添加量。

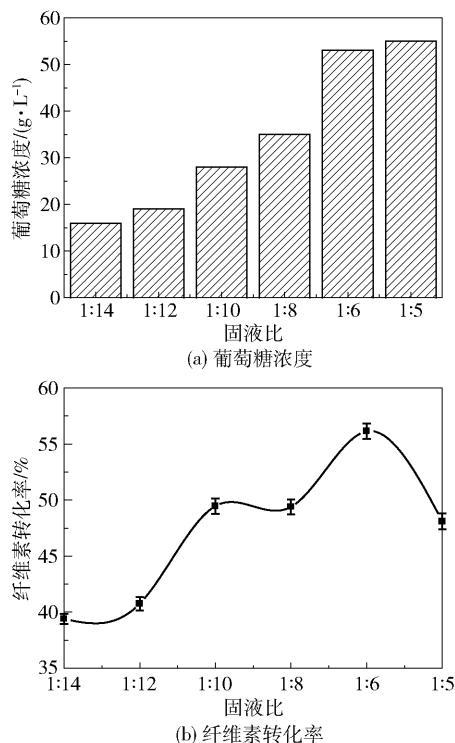


图1 固液比对酶解的影响

Fig. 1 Effect of substrate concentration on enzymatic hydrolysis

### 2.2.3 纤维素酶添加量

纤维素酶不菲的价格要求在酶添加量和酶解率之间寻找一个平衡点。在固液比 1:6、 $\text{pH} = 4.8$ 、 $50^\circ\text{C}$  下酶解 48 h, 以纤维素酶添加量为自变量探究其对酶解的影响。由图 2 可知, 当纤维素酶量由 7.5 FPU/g 提高至 22.5 FPU/g 时, 水解液中葡萄糖浓度由 39 g/L 上升至 55 g/L, 纤维素转化率提高 41%, 在此基础上继续增加酶量, 转化率基本保持不变。这是因为纤维素的结合位点有限, 多余的酶不能有效攻击这些位点, 因此最佳酶用量为 22.5 FPU/g。

### 2.2.4 pH

纤维素酶是由多种水解酶组成的复杂蛋白类酶系, 其活性与 pH 密切相关。在固液比 1:6, 酶添加量 22.5 FPU/g,  $50^\circ\text{C}$  酶解 48 h 的条件下, 分别考察了杨树木屑在不同 pH 体系中的酶解情况。由图 3 可知, 随着 pH 上升, 葡萄糖浓度和纤维素转化率同步先增大后减小, 当 pH 为 4.8 时, 葡萄糖浓度最大, 酶解效果最好, 因此酶解的最适 pH 为 4.8。

### 2.2.5 酶解时间

考察杨树木屑在 0 ~ 72 h 的纤维素酶解情况, 见图 4。分析不同时间段的葡萄糖浓度和平均酶解

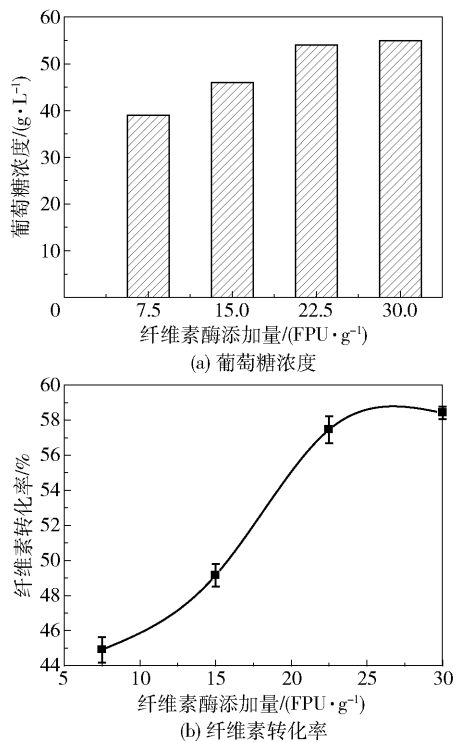


图2 酶添加量对酶解的影响

Fig. 2 Effect of enzyme loading on enzymatic hydrolysis

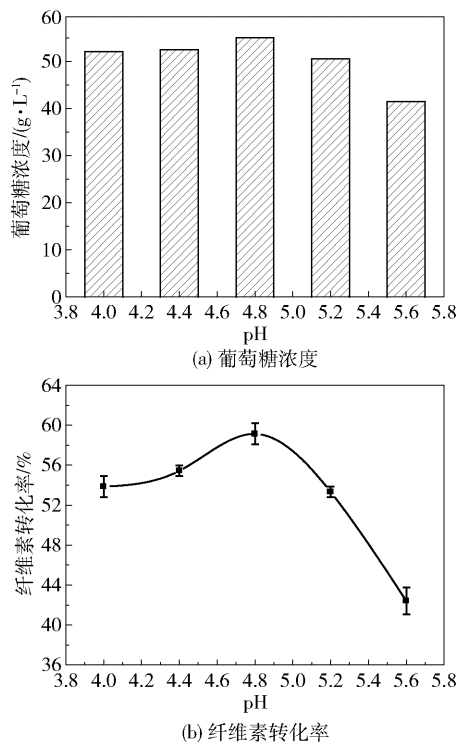


图3 pH对酶解的影响

Fig. 3 Effect of pH on enzymatic hydrolysis

速度, 平均酶解速度定义为在 0 ~  $t$  时间内每 L 酶解液中产生葡萄糖的量 (单位为  $\text{g}/(\text{L} \cdot \text{h})$ )。当

酶解时间超过 48 h, 葡萄糖浓度基本不再增加, 同时平均酶解速度下降趋势变得极为缓慢, 故最适酶解时间为 48 h。

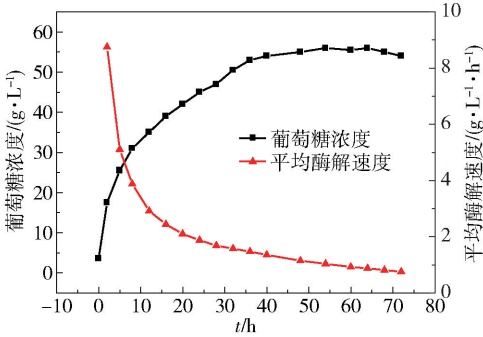


图 4 酶解时间对酶解的影响

Fig. 4 Effect of reaction time on enzymatic hydrolysis

2.3 发酵培养基优化

利用 SPSS 软件对培养基中的硫酸铵、磷酸二氢钾和硫酸镁浓度进行正交优化, 见表 4。从表 5 菌体密度表示值  $OD_{600}$  的结果来看, 因素 B 为最主要影响因素, 其次为因素 A, 影响程度次序为  $B > A > C$ 。

表 4 正交试验设计及描述统计

Table 4 Orthogonal experimental design and description statistics

编号	因素			菌密度 ( $OD_{600}$ ) $X_i$	$X_i^2$
	A	B	C		
1	1	1	1	0.082	0.007
2	1	2	2	0.176	0.031
3	1	3	3	0.27	0.073
4	1	4	4	0.24	0.058
5	2	1	2	0.015	0.00022
6	2	2	1	2.866	8.214
7	2	3	4	2.26	5.11
8	2	4	3	2.14	4.58
9	3	1	3	0.004	0.000016
10	3	2	4	1.408	1.98
11	3	3	1	1.638	2.683
12	3	4	2	1.976	3.90
13	4	1	4	0	0
14	4	2	3	1.74	3.027
15	4	3	2	2.012	4.05
16	4	4	1	1.916	3.67
$K_1$	1.755	20.973	14.519		
$K_2$	15.884	0.171	18.861	$\sum X_i = 18.743$	$\sum X_i^2 = 179$
$K_3$	14.722	14.884	20.086		
$K_4$	18.756	17.152	17.205		
$\sum K_i^2$	823.9	955.6	1265.99		

从表 6 的多重比较结果来看,  $A_4$ 、 $A_3$ 、 $A_2$  和  $A_1$  之间差异显著,  $A_2$  最好; 同样, 从菌密度表示值  $OD_{600}$  角度分析因素 B 和 C,  $B_4$  和  $C_3$  最好。因此培养基最佳组合为  $A_2B_4C_3$ , 即最佳培养基配方为硫酸铵 10 g/L, 磷酸二氢钾 9 g/L, 硫酸镁 6 g/L。

表 5  $OD_{600}$  方差分析  
Table 5 Variance analysis of  $OD_{600}$

源	Ⅲ类平方和	自由度	均方	F	显著性
修正模型	3 939.228	9	436.581	6.146	0.019
截距	6 181.498	1	6 181.498	87.022	0.000
硫酸铵	1 637.143	3	545.714	7.682	0.018
磷酸二氢钾	1 973.133	3	657.711	9.259	0.011
硫酸镁	318.952	3	106.317	1.497	0.308
误差	426.203	6	71.034		
总计	10 536.928	16			
修正后总计	4 355.431	15			

表 6 因素 A 各水平均值多重比较  
Table 6 Multiple comparisons of A

因素 A	$X_i$	95% 置信区间
$A_4$	23.963	[13.651, 34.274]
$A_3$	21.263	[10.951, 31.574]
$A_2$	30.313	[20.001, 40.624]
$A_1$	3.085	[-7.226, 13.396]

2.4 杨树木屑酶解液发酵制备富硒酵母

2.4.1 酵母利用酶解液作为碳源的可行性探究

将酵母分别接种于酶解液及葡萄糖发酵培养基中, 探究酵母菌利用酶解液的可行性。图 5 是酵母菌在两种培养基中的生长曲线, 可以看出, 酵母在酶解液中的长势良好, 适应力较强, 能够快速进入对数生长期, 但是在对数生长中后期, 即发酵 16 h 以后, 酵母在葡萄糖培养基中的长势趋于缓慢, 这可能是由于酶解液中存在少量抑制物, 酵母生长过程中受到的环境胁迫增强, 使得发酵周期延长。发酵时长 36 h, 酵母菌在葡萄糖培养基中的生物量为 5.47 g/L, 在酶解液中的生物量为 5.2 g/L, 表明酵母菌完全能够利用杨树木屑酶解液作为碳源。

2.4.2 酵母在 5 L 发酵罐中的生物量及富硒效果分析

从图 5 看出, 摇瓶中发酵 16 h 的酵母菌处于对数生长中期, 活力最高, 因此选择 16 h 的酵母菌作为种子液接种于 5 L 发酵罐中。利用旋转蒸发仪浓

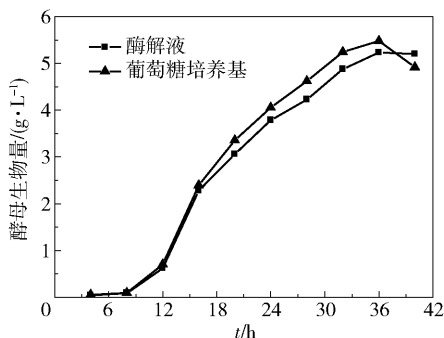


图5 酵母菌在两种培养基中的发酵情况

Fig. 5 Fermentation process curves for yeast in two different media

缩初始糖浓度 50 g/L 左右的杨木酶解液至葡萄糖浓度 500 g/L,同时添加一定量的亚硒酸钠作为补料培养基。

初始培养基中的葡萄糖被消耗殆尽后,开始流加浓缩的杨木酶解液,这样既补充了酵母生长所需的碳源,又最大限度地降低了亚硒酸钠对酵母的毒害作用,提高了无机硒转化为有机硒的效率。由图 6 可知,酵母菌在发酵罐中的生长情况与摇瓶中酵母的长势高度吻合,在 8 h 左右进入对数生长期,36 h 发酵基本结束,酵母菌在酶解液培养基与葡萄糖培养基中的生物量分别为 23.9 g/L 和 29.5 g/L。在对数生长中期以前,酵母菌在两种培养基中的长势相当,以对数生长中期为节点,酵母菌在酶解液中的生长速度变缓,这是由于高浓度酶解液被作为碳源补充到发酵罐内,使得罐内的抑制物不断积累,造成酵母长势低于其对照组葡萄糖培养基。

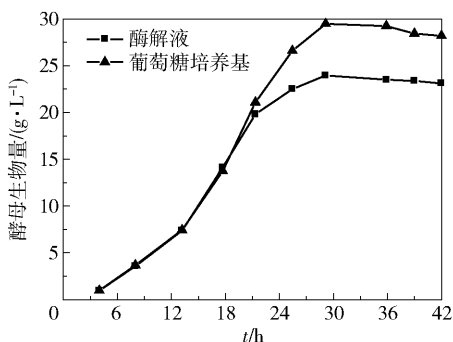


图6 5 L 发酵罐中酵母生物量的发酵曲线

Fig. 6 Fermentation curve of yeast biomass in a 5 L fermenter

图 7 是单位酵母硒含量随发酵时间的变化曲线。发酵 8 h 开始流加含有亚硒酸钠的酶解浓缩液,单位酵母硒含量随发酵时长呈逐步增加的趋势,在 40 h 达到最大值。但是发酵时长 17.7 h 的单位

酵母硒含量要比发酵 13.2 h 的下降 24.4%,这是因为单位酵母硒含量是由酵母生物量和硒添加量共同决定的,由于酵母生长速度和无机硒添加量的非同步性,造成在这段时间内单位酵母硒含量的下降,而硒浓度的下降在某种程度上降低了对酵母的毒性,使得酵母菌快速进入生长对数期。发酵 30 h 左右,酵母生长进入稳定期,发酵 36 h 左右,发酵停止,每 L 发酵液中酵母干重达 23.9 g,单位酵母硒含量超过 3 500  $\mu\text{g/g}$ 。

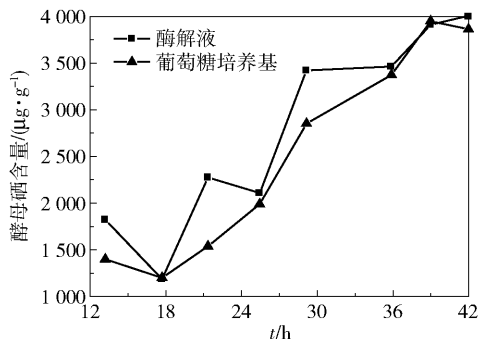


图7 5 L 发酵罐中单位酵母硒含量的发酵曲线

Fig. 7 Fermentation curve of unit yeast selenium content in a 5 L fermenter

### 3 结论

(1) 酶解杨树木屑的最优条件为:固液比 1:6 (g/mL),纤维素酶添加量 22.5 FPU/g, pH = 4.8,酶解时间 48 h。最优条件下酶解液中葡萄糖浓度达 55 g/L,纤维素转化率 56%。稀醋酸预处理后木屑渣中仍然保存大部分的木质素,阻碍了纤维素与纤维素酶的有效接触,故除去木质素后纤维素转化率有望进一步提高。

(2) 酶解液作为碳源发酵制备酵母的可行性探究结果表明,酵母完全能够利用酶解液中的葡萄糖。

(3) 在 5 L 发酵罐中进行富硒酵母发酵实验,发酵时间 36 h,每 L 发酵液中酵母干重 23.9 g,酵母硒含量超过 3 500  $\mu\text{g/g}$ 。

### 参考文献:

- [1] CARLE J, VUORINEN P, LUNGO A D. Status and trends in global forest plantation development[J]. Forest Products Journal, 2002, 52(7/8): 12-23.
- [2] XUE Y, CHEN H Y, ZHAO W N, et al. A review on the operating conditions of producing bio-oil from hydro-thermal liquefaction of biomass[J]. International Journal of Energy Research, 2016, 40: 865-877.

- [3] OUELLET M, DATTA S, DIBBLE D C, et al. Impact of ionic liquid pretreated plant biomass on *Saccharomyces cerevisiae* growth and biofuel production [J]. *Green Chemistry*, 2011, 13: 2743–2749.
- [4] ZHENG Y, ZHAO J, XU F Q, et al. Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production[J]. *Progress in Energy and Combustion Science*, 2014, 42: 35–53.
- [5] SANNIGRAHI P, RAGAUSKAS A J, TUSKAN G A. Poplar as a feedstock for biofuels: a review of compositional characteristics[J]. *Biofuels Bioproducts and Biorefining*, 2010, 4(2): 209–226.
- [6] DEVAPPA R K, RAKSHIT S K, DEKKER R F H. Forest biorefinery: potential of poplar phytochemicals as value-added co-products [J]. *Biotechnology Advances*, 2015, 33(6): 681–716.
- [7] 郑光耀, 谢春芹, 薄采颖, 等. 杨树木屑、树皮替代棉籽壳栽培姬菇和金针菇的研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2013, 40(1): 47–50.
- ZHENG G Y, XIE C Q, BO C Y, et al. Experimental cultivation of *Pleurotus corticipiae* and *Flammulina velutipes* by partially using poplar sawdust or poplar bark as a substitute for cottonseed hull[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2013, 40(1): 47–50. (in Chinese)
- [8] 吴春山. 用木屑制作饲料[J]. *饲料工业*, 1993, 14(11): 33–34.
- WU C S. Making feed from sawdust[J]. *Feed Industry*, 1993, 14(11): 33–34. (in Chinese)
- [9] 李晓鸣, 刘颖, 王英, 等. 利用杨树木屑种植黑木耳高产技术研究[J]. *中国食用菌*, 1997, 17(4): 18–19.
- LI X M, LIU Y, WANG Y, et al. Study on high-yield cultivated techniques of using scraps of willow to grow *auricularia auricula*[J]. *Edible Fungi of China*, 1997, 17(4): 18–19. (in Chinese)
- [10] CARVALHO A F A, OLIVA NETO P D, DA SILVA D F, et al. Xylo-oligosaccharides from lignocellulosic materials: chemical structure, health benefits and production by chemical and enzymatic hydrolysis[J]. *Food Research International*, 2013, 51(1): 75–85.
- [11] JIANG H, HAN B B, GE J H. Enhancement in the enzymatic digestibility of hybrid poplar with poor residual hemicelluloses after  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  pretreatment [J]. *Bioresource Technology*, 2015, 180: 338–344.
- [12] KIM K H, DUTTA T, RALPH J, et al. Impact of lignin polymer backbone esters on ionic liquid pretreatment of poplar[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10(1): 101–110.
- [13] ZHANG L M, YOU T T, ZHANG L, et al. Enhanced fermentability of poplar by combination of alkaline peroxide pretreatment and semi-simultaneous saccharification and fermentation [J]. *Bioresource Technology*, 2014, 164: 292–298.
- [14] HODGE D B, KARIM M N, SCHELL D J, et al. Soluble and insoluble solids contributions to high-solids enzymatic hydrolysis of lignocellulose[J]. *Bioresource Technology*, 2008, 99(18): 8940–8948.
- [15] ARANTES V, SADDLER J N. Access to cellulose limits the efficiency of enzymatic hydrolysis: the role of amorphogenesis[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3(1): 4–14.
- [16] MAHAN D C, CLINE T R, RICHERT B. Effects of dietary levels of selenium-enriched yeast and sodium selenite as selenium sources fed to growing-finishing pigs on performance, tissue selenium, serum glutathione peroxidase activity, carcass characteristics, and loin quality [J]. *Journal of Animal Science*, 1999, 77(8): 2172–2179.
- [17] BIRD S M, UDEN P C, TYSON J F, et al. Speciation of selenoamino acids and organoselenium compounds in selenium-enriched yeast using high-performance liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry [J]. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 1997, 12(7): 785–788.
- [18] CHASSAIGNE H, CHÉRY C C, BORDIN G, et al. Development of new analytical methods for selenium speciation in selenium-enriched yeast material[J]. *Journal of Chromatography A*, 2002, 976(1/2): 409–422.
- [19] WANG Z, ZHANG L Y, TAN T W. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* GS2 for selenium-enriched yeast production [J]. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 2010, 27(6): 1836–1840.
- [20] SHI L, ZHANG C X, YUE W B, et al. Short-term effect of dietary selenium-enriched yeast on semen parameters, antioxidant status and Se concentration in goat seminal plasma[J]. *Animal Feed Science and Technology*, 2010, 157(1): 104–108.
- [21] 娄兴丹, 张根林, 叶邦策. 高富硒酵母的筛选及富硒强化研究[J]. *生物技术通报*, 2017, 33(12): 132–137.
- LOU X D, ZHANG G L, YE B C. Screening of high selenium-enriched yeast and enhancement of its selenium-enriched capacity[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2017, 33(12): 132–137. (in Chinese)
- [22] WEN P Y, ZHANG T, WANG J Y, et al. Production of

- xylooligosaccharides and monosaccharides from poplar by a two-step acetic acid and peroxide/acetic acid pretreatment[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12(1): 87–99.
- [23] BULE M V, GAO A H, HISCOX B, et al. Structural modification of lignin and characterization of pretreated wheat straw by ozonation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61: 3916–3925.
- [24] KIM J S, LEE Y Y, TORGET R W. Cellulose hydrolysis under extremely low sulfuric acid and high-temperature conditions[J]. *Applied Biochemicals and Biotechnology*, 2001, 91–93: 331–340.
- [25] ZHU J Y, CHANDRA M S, GU F, et al. Using sulfite chemistry for robust bioconversion of Douglas-fir forest residue to bioethanol at high titer and lignosulfonate: a pilot-scale evaluation[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 179: 390–397.
- [26] TANG S Q, XU Y F, ZHU G Y, et al. Orthogonal experiment optimum design in the power of the rotor on straight-bladed VAWT[J]. *Energy Procedia*, 2011, 12: 856–861.
- [27] CHAND V, PRASAD S. Trace determination and chemical speciation of selenium in environmental water samples using catalytic kinetic spectrophotometric method[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 165(1): 780–788.

## Preparation of selenium-enriched yeast by enzymatic hydrolysis of waste poplar wood chips

QIAN RuiChuang<sup>1</sup> WANG Zheng<sup>2\*</sup> SHI XuJun<sup>3</sup> WANG Rui<sup>4</sup>

(1. College of Chemical Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

2. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029;

3. Guilin Changfaxiaozhai Biotechnology Co., Ltd., Guilin 541000;

4. Medical Institute of Beijing Baicaoquoyitang, Beijing 100012, China)

**Abstract:** The effects of varying the solid-liquid ratio, enzyme loading, pH and reaction time on the enzymatic hydrolysis of poplar wood were investigated. By optimizing the enzymatic hydrolysis conditions, an enzymatic hydrolysate with a glucose concentration of 55 g/L was obtained. This enzymatic hydrolysate was used as a carbon source to replace glucose in a traditional medium, with the other nutrients unchanged. Selenium-enriched yeast was prepared by fermentation, and the growth of the yeast in the enzymatic hydrolysate and its selenium-enriching ability were studied. The results showed that selenium-enriched yeast grew well in the enzymatic hydrolysate medium. After 36 h of fermentation in a 5 L fermenter, the dry weight of yeast was 24 g/L and the content of yeast selenium exceeded 3 500 µg/g.

**Key words:** poplar; enzymatic hydrolysis; selenium-rich yeast; selenium content

(责任编辑:吴万玲)