

半纤维素水解物生物转化生产木糖醇

张厚瑞 何成新 梁小燕 曾健智 唐 峰

(广西植物研究所 桂林 541006)

摘 要 木糖醇在食品、医药及化工行业中有着广泛的用途而深受关注。但是,传统的化学法生产木糖醇需要一系列复杂的分离纯化步骤,过高的生产成本限制了木糖醇的使用范围。发酵工艺生产木糖醇无需木糖的纯化步骤,是取代化学合成法的一条可行工艺路线。本文着重介绍产木糖醇的微生物、酵母对木糖的同化途径,半纤维素水解物的脱毒方法,影响木糖醇发酵的工艺条件等。

关键词 半纤维素,水解,发酵,木糖醇

中图分类号 Q815 文献标识码 C 文章编号 1000-3061(2000)03-0304-04

木糖醇是一种五碳糖醇,其甜度与蔗糖相当^[1],无致龋性,在体内代谢不需胰岛素参与,也不会造成血糖的急剧变化,不仅在防龋齿食品,糖尿病人食品当中具有重要的应用价值,而且是外伤病人及术后病人的良好营养剂^[2]。木糖醇还具备甘油和其它多元醇的优异特性,在医药工业及化工行业中也具有广泛的应用前景而倍受人们关注。

目前,工业化生产木糖醇的方法是:首先水解富含木聚糖(木糖的多聚物)的半纤维素,纯化制得木糖,再经催化氢化,柱层析、重结晶等步骤制得木糖醇。由于整个过程包含了一系列复杂的纯化步骤,从木糖到木糖醇的收率大约只有 50%~60%^[3],生产成本约为蔗糖的 10 倍^[4]。相对较高的价格限制了木糖醇的使用范围。

生物转化工艺生产木糖醇是可能有效降低生产成本的工艺路线,其中发酵法不需纯化木糖,还可以简化木糖醇的分离步骤^[4],酶法合成则有可能实现连续高效生产。本文侧重于木糖醇发酵的研究进展。

1 木糖醇的生物合成途径

1.1 产木糖醇的微生物

根据已有的研究,在自然界的微生物当中只有很少一部分细菌可以生成木糖醇,丝状真菌产木糖醇的效率也不高,而酵母则比较容易将木糖转化生成木糖醇。已经发现,产木糖醇性能优越的酵母菌株主要集中于 *Candida* 属(假丝酵母属),如 *C. guilliermondii*^[5],*C. tropicalis*^[6],*C. mogii*^[7],*C. parasilosis*^[8];部分属于 *Debaromyces* 属(德巴利酵母属),如 *D. hansenii*^[9] 和 *Pachysolen* 属(管囊酵母属),如 *P. tannophilus*^[10]。

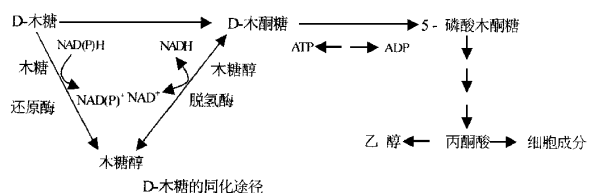
1.2 微生物体内木糖醇合成的调控

一般说来,细菌直接以异构酶(EC5.3.1.5)催化异构

D-木糖成为 *D*-木酮糖,然后在激酶作用下形成 5-磷酸木酮糖^[11]。绝大多数酵母催化 *D*-木糖成为 *D*-木酮糖需经两个步骤,首先是木糖还原酶(XR)(EC1.1.1.21)以 NADPH 或 NADH 为辅酶,将 *D*-木糖还原为木糖醇。木糖醇既可以作为主要产物分泌进入培养基内,也可以被以 NAD⁺ 为辅酶的木糖醇脱氢酶(XDH)(EC1.1.1.19)催化氧化成 *D*-木酮糖,最后进入磷酸木酮糖代谢途径^[11]。

某些酵母的 XR 只能以 NADPH 为辅酶,另一些酵母则既可以 NADPH,也可以 NADH 为辅酶,有的酵母则以 NADH-XR 的活力较高。所有酵母的 XDH 只能以 NAD⁺ 为辅酶^[4]。那些以 NADPH-XR 为主的酵母,在限制供氧的条件下,NAD⁺ 供应失衡,直接抑制了 XDH 的活性而导致积累木糖醇。而以 NADH-XR 为主的酵母,则因辅酶的氧化还原平衡,木糖醇直接被氧化成木酮糖,积累的产物将主要是乙醇而不是木糖醇^[12]。

微生物对 *D*-木糖的同化途径如下图所示:



自然同化木糖的酵母会通过 *D*-木酮糖途径消耗一部分已经生成的木糖醇,木糖醇转化率一般只能达到理论转化率(0.912 g 木糖醇/g 木糖)^[4]的 65%~85%^[3]。*Saccharomyces cerevisiae*(酿酒酵母)因缺乏 XR 和 XDH 而不能利用木糖和木糖醇。将酵母 *Pichia stipitis* 的木糖还原酶基因(XYL1)导入 *S. cerevisiae* 后,用某些已糖或乙醇作辅助基质培养,这种表达 XYL1 基因的 *S. cerevisiae* 代谢工程菌株可

以将 95% 以上的木糖转化为木糖醇^[13]。但是,目前此类代谢工程菌株只能在消耗完己糖之后才吸收和转化木糖,其木糖醇转化率虽然很高,而生成速率却很低^[14]。

1.3 木糖醇的酶法合成

Nidetzky 等人^[15]将 NADH-XR 催化的木糖还原反应与葡萄糖脱氢酶催化的葡萄糖或木糖氧化反应在酶膜反应器中偶联,用以再生 NADH。在分批反应中,0.1mmol/L 辅酶就能使 300g·L⁻¹的木糖/葡萄糖基质转化 96%~98%,连续反应木糖醇生成速率达 80g/(L·d),千单位木糖还原酶连续使用时间超过 150h 而只需一次投入少量 NADH。Hasumi 等人^[16]用氢气作还原剂,由氢化酶催化再生 NADH。此反应与木酮糖还原酶偶联,可催化 98% 以上的木酮糖转化为木糖醇而无副产物产生。

2 半纤维素水解与水解物脱毒

玉米芯、棉籽壳、甘蔗渣等,都是制备富含木糖单糖的水解物的极好原料,稀的硫酸、盐酸是最常用的催化剂。植物纤维材料在高温与强酸条件下水解,会产生或释放出大量对酵母有毒的物质。很稀的酸(0.7%)虽然可以降低毒物含量,但水解物中往往含有大量不可发酵的低聚糖^[17]。

半纤维素水解物中对酵母有毒的物质主要包括糠醛(降解副产物)、醋酸(由乙酰化木聚糖释放)、某些木质素衍生物(如酚类化合物)、重金属离子等^[18]。不同酵母对这些毒物的敏感性有很大差异,总体说来,糠醛的毒性要大于醋酸^[18]。木质素降解物,主要是苯环上连接 COOH、 ρ -OH、CHO 及 CH=CH 基团的一类化合物,其毒性大于糠醛。一般而言,芳香酸的毒性要低于相应的醛^[18]。

除去半纤维素水解物中对微生物有毒物质的纯化过程称脱毒。真空蒸发在提高水解物中木糖浓度的同时,可以除去大部分糠醛、醋酸及某些挥发性有毒成分^[19]。活性炭吸附在除去某些酸溶性木质素衍生物的同时,也可以除去大部分醋酸^[18]。钙能除去由活性炭才能除去的某一重要抑制物^[20],用过量的石灰(pH10)在除去中和法所能除去的有毒物质的同时,也能有效除去酚性物^[21]。溶剂抽提^[21]、离子交换树脂^[22]、蒸汽处理^[23]等均可除去某些有毒成分。

由于毒物成分复杂,需要结合使用多种处理方法才能达到比较好的脱毒效果。过量石灰处理可显著改善细胞生长^[22],但只有经乙醚抽提后才可显著提高木糖醇转化率^[21]。若与离子交换树脂结合使用,则活性炭的效果要优于过量石灰法^[20]。

木材在酸水解之前用碱(NaOH)处理可除去大部分醋酸,但会增加水解物中木质素类衍生物浓度而降低发酵性能^[24]。玉米芯、木材原料在室温下经氨水处理,其水解物只需中和浓缩,便具有良好的木糖醇发酵性能^[25]。

3 木糖醇发酵工艺过程的影响因素

3.1 通气量

氧是木糖同化当中必不可少的因子^[3,4],但是,过量的

通气会导致 NADH 氧化成 NAD⁺,激活 XDH,降低 XR/XDH 活性比,不利于木糖醇积累。一般地讲,细胞生物量的增长与通气量呈正相关,而木糖醇转化率则与通气量呈负相关。微量的通气条件有利于木糖醇生成。

Vandeska 等人^[12]研究了通气量对 *C. boidinii* 酶活性的影响时发现,氧传质速率(OTR)由 10mmol·L⁻¹·h⁻¹ 提高至 30mmol·L⁻¹·h⁻¹,细胞生物量增加 6 倍,XR/XDH 则由 2.8 降至 0.98,木糖醇转化率由 0.38g·g⁻¹ 降至 0.23g·g⁻¹。

Horitsu 等人^[26]指出,如欲高效生产木糖醇,培养初期应维持较高水平的溶解氧,此后应降低溶氧水平以抑制微生物呼吸。这种两段法通气,对于提高木糖醇的生成速率是十分有效的。在后一阶段溶氧水平低的情况下,培养基的氧化还原电位是监测溶氧水平的灵敏指标,Kim 等人^[27]培养 *C. tropicalis* 时,在第二阶段减少通气,使培养基的氧化还原电位降至最适值 140mV,经 66h 发酵,300g·L⁻¹ 木糖生成 250g·L⁻¹ 木糖醇,生成速率达 3.79g·L⁻¹·h⁻¹。

3.2 氮源

木糖醇的积累受氮源的显著影响,适宜的氮源及浓度在不同培养基、不同 pH 条件及酵母菌株之间存在很大差异。有机氮源可降低 *C. Shehatate* XDH 水平^[3]。酵母膏是最好的有机氮源^[26]。用稻草半纤维素水解物培养 *C. guilliermondii* 在 pH4.5 时用尿素作氮源比硫酸铵好,木糖醇转化率提高 25%,而在 pH5.3、pH6.0 的条件下,则这两种氮源无明显差异^[19]。一些学者混合使用有机氮与无机氮源,取得很好的效果。

3.3 木糖浓度

提高初始木糖浓度,既有利于提高木糖醇的浓度也有利于提高木糖醇的转化率与生成速率。但是,不同菌株之间的耐糖性存在显著差别。

将木糖浓度由 50g·L⁻¹ 提高至于 100g·L⁻¹,*C. parasilosis*^[28],*C. guilliermondii*^[28] 及 *C. tropicalis*^[6] 的菌体最大生长比速(μ_{max})并无显著变化,而 *C. mogii*^[7] 的 μ_{max} 值几乎下降了一半。Nelleau 等人^[28]发现,*C. guilliermondii* 及 *C. parasilosis* 这 2 种酵母的 XR 活性显著受木糖浓度的影响,获得最大产物生成速率及最大产物转化率的木糖浓度基本上位于 XR 活性达最大值的糖度附近。摇瓶培养 *C. tropicalis* KFCC-10960,木糖浓度由 50g·L⁻¹ 提高至此 250g·L⁻¹,木糖醇转化率由 0.76g·g⁻¹ 增至 0.90g·g⁻¹,但木糖醇生成速率在 150g·L⁻¹ 木糖时达最大值(2.91g·L⁻¹·h⁻¹)之后便急剧下降,当木糖浓度为 250g·L⁻¹ 时,产物生成速率只有 1.44g·L⁻¹·h⁻¹^[6]。

根据现有的资料,几种比较耐糖的酵母用发酵罐培养已经达到的木糖醇生成速率与浓度是:*C. guilliermondii*^[5], 1.04g·L⁻¹·h⁻¹, 221g·L⁻¹; *C. parapsilosis*^[8], 3.18g·L⁻¹·h⁻¹, 210g·L⁻¹; *C. tropicalis*^[6], 4.56g·L⁻¹·h⁻¹, 251g·L⁻¹; *D. hansenii*^[9], 4.67g·L⁻¹·h⁻¹, 221g·L⁻¹。它们的木糖醇转化率一般在 70%~82% 之间,只有 *C. tropicalis* 在葡萄糖木糖培养基上的转化率超过 90%^[6]。

若以半纤维素水解物作发酵基质,允许使用的木糖浓度与选用的原材料,水解方法,脱毒程度有密切关系^[22,24,25,28]。因为浓缩提高木糖浓度的同时,也提高了其中毒物的浓度。当毒物浓度超过一定值之后,酵母就无法生长。

酵母菌株对不同原材料水解物中毒物耐受性有很大差异。除非经过特别精制,否则 *Candida sp.* 11-2 几乎很难利用蔗渣半纤维素水解物中的木糖,但这一菌株发酵经氨水处理后的玉米芯水解物,其中木糖浓度高达 $130\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,木糖醇生成速率达 $1.94\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ ^[25]。同一菌株发酵经氨水处理过的木材水解物,木糖醇生成速率达 $5.38\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,转化率 $0.74\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[29]。

3.4 其它糖类与辅助基质

C. guilliermondii 及 *C. tropicalis* 吸收利用葡萄糖、甘露糖、半乳糖的速率分别是木糖的 2.2、2.0 及 1.8 倍^[5],这些己糖主要用于酵母细胞生长,一般不会积累相应的多元醇,大部分的阿拉伯糖被酵母消耗后也只是生成少量的阿拉伯糖醇^[5]。

若添加比木糖更易于利用的糖类作碳源,抑制木糖消耗于细胞生长及 NADPH 再生,则木糖醇的实际转化率就有可能达到或超过理论转化率。Oh 等人^[6]在葡萄糖/木糖比为 10%~20% 条件下培养 *C. tropicalis* KFCC-10960,木糖醇转化超过 $0.9\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,当葡萄糖比例超过 20%,会大量生成乙醇,严重降低木糖醇生成速率和转化率。

3.5 接种量

离心收集菌体提高接种量,可以有效缩短培养时间,提高木糖醇生成速率。微量通气培养 *D. hansenii*^[9], $140\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 木糖发酵 72h,接种量为 $0.3\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞(相当干细胞),生成木糖醇 $60\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,接种量提高至 $3.0\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞,则可生成木糖醇 $105.8\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

高密度细胞接种显然可以减轻半纤维素水解物中的毒物抑制效应,改善发酵性能。用含有 $58\sim 78\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 木糖的木材水解物培养 *D. hansenii*^[30],接种量为 $16\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞(鲜细胞),发酵几乎无法进行,若接种量提高至 $50\sim 80\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 细胞,则可生成木糖醇 $39\sim 41\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.6 pH 值与温度

大多数酵母在 pH4.5~5.5 的范围内表现出较高的木糖醇转化率与生成速率。很少有人研究过木糖醇积累与温

度之间的关系,一般所用的温度都是 $30\text{C}^{\text{[3]}}$ 。*D. hansenii* 在 $28\sim 37\text{C}$ 范围内都是适宜温度^[9]。

4 发酵技术

已有许多学者研究应用固定化技术截留酵母细胞生产木糖醇。Silva 等人^[31]用多孔玻璃固定 *C. tropicalis* 并在流化床反应器上培养, $155\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 木糖生成木糖醇 $90\sim 95\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,生成速率 $1.35\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 。Yahashi Y 等人^[32]经比较后认为,无纺纤维固定 *C. tropicalis* 的效果最好。

木糖浓度超过一定限度之后会影响酵母细胞生长,其结果是延长发酵时间,大大降低产物的生成速率。Oh 等人^[6]报道,木糖浓度超过 $150\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 后, *C. tropicalis* KFCC-10960 的细胞生长会出现明显停滞期。他们把初始木糖浓度控制在 $150\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,待细胞密度增殖至 $15\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时开始恒速补加高浓度的葡萄糖/木糖,总加入的木糖为 $270\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,经 55h 发酵,木糖醇浓度达 $251\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,产物生成速率达 $4.56\text{g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$,转化率达 $0.93\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

5 讨论

利用酶法合成木糖醇虽然是一条精巧而有前景的工艺路线,但就目前的水平而言,它还不具备与发酵工艺的竞争力。

按照目前的资料, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *D. hansenii* 这 4 个种,是木糖醇发酵最有潜力的微生物,因为它们能在高浓度的木糖中表现出高的产物生成速率或高的产物转化率^[5,6,8,9]。表达 XYLI 基因的 *S. cerevisiae* 菌株,必须导入木糖透性酶系统,使之在利用己糖的同时转化木糖,才可能有效提高木糖醇生成速率^[14]。

分批恒速补料培养是消除高浓度木糖抑制效应,提高产物生成速率的有效方法。这种补料培养技术可能也是减轻半纤维素水解物中毒物效应的一条可行途径。

补加葡萄糖可有效提高木糖醇的转化率,培养基中葡萄糖过量会生成较高浓度的乙醇^[6],严重影响木糖醇的生成速率。这种效应提示,纤维材料水解物中不应含有过高比例的葡萄糖或其它己糖。半纤维素水解物中包含了许多对微生物代谢有毒的成分,可能还存在某些抑制细胞分泌木糖醇的物质^[22]。研究更加经济而有效的脱毒技术,是大规模利用半纤维素水解物进行木糖醇发酵工艺中一项十分紧迫的课题。

参 考 文 献

- [1] Emodi A. *Food Technol*, 1978, **32**: 28~32
- [2] Mettala P J, Knuutila M L E, Svanberg M J. *Mettabol*, 1998, **47**(5): 578~579
- [3] Nigam P, Singh D. *Process Biochem*, 1995, **30**(2): 117~124
- [4] Parajó J C, Dominguez H, Dominguez J M. *Biore Technol*, 1998, **65**: 191~201
- [5] Meyrial V, Delgenes J P, Moletta R et al. *Biotechnol Lett*, 1991, **13**(4): 281~286
- [6] Oh D-K, Kim S Y. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **50**: 419~425
- [7] 陈宏文, 方柏山, 胡宗定. 华侨大学学报(自然科学版), 1998, **4**: 416

- [8] Kim S Y ,Kim J H ,Oh D K. *J Ferment Bioeng* ,1997 **83** :260~270
- [9] Dominguez J M ,Gong C S ,Tsao G T. *Appl Biochem Biotechnol* ,1997 **63/65** :117~127
- [10] Darajó J C ,Dominguez H ,Dominguez J M. *Biore Technol* ,1998 **65** :203~212
- [11] Amore R ,Kötter P ,Köster C *et al.* *Gene* ,1991 **109** :89~97
- [12] Verduyn C ,Van Kleef R ,Frank J *et al.* *Biochem J* ,1985 **226** :669~677
- [13] Hallborn J ,Walfridsson M ,Airaksinen U *et al.* *Bio/Technology* ,1991 **9** :1090~1095
- [14] Meinander N Q ,Hahn-Hagerdal B. *Appl Environ Microbiol* ,1997 **63** (5) :1959~1964
- [15] Nidetzky B ,Neuhauser W ,Haltrich D *et al.* *Biotechnol Bioeng* ,1996 **52** :387~396
- [16] Hasumi F ,Teshima C. *Chem Lett* ,1996 **10** :597~598
- [17] Hespell R B O ,Bryan P J ,Moniruzzaman M *et al.* *Appl Biochem Biotechnol* ,1997 **62** :87~97
- [18] Tran A V ,Chambers R P. *Biotechnol Lett* ,1985 **7** (11) :841~846
- [19] Poberto I C C ,Silva S S ,Feliõe M G A. *Appl Biochem Biotechnol* ,1996 **57/58** :339~344
- [20] Roberto I C ,Lacis L S ,Barbosa M F S *et al.* *Process Biochem* ,1991 **26** :15~21
- [21] Parajo J C ,Dominguez H ,Dominguez J M. *Process Biochem* ,1997 **32** (7) :599~604
- [22] Dominguez J M ,Gong C S ,Tsao G T. *Appl Biochem Biotechnol* ,1996 **57/58** :49~56
- [23] Puls J ,Poutanen K ,Korner H U *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol* ,1985 **22** :416~423
- [24] Parajó J C ,Dominguez H ,Dominguez J M. *Food Chem* ,1996 **57** (4) :531~535
- [25] Dominguez J M ,Cao N J ,Gong C S *et al.* *Biore Technol* ,1997 **61** :85~90
- [26] Hovitsu H ,Yahashi Y ,Takamizawa K *et al.* *Biotechnol Bioeng* ,1992 **40** :1085~1091
- [27] Kim S Y ,Kim J H ,Oh D K. *Food Biotechnol* ,1998 **7** (4) :282~285
- [28] Nollet V ,Preziosi-Belloy L ,Delgenes J P *et al.* *Current Microbiol* ,1993 **27** :191~197
- [29] Dominguez J M ,Cao N J ,Gong C S *et al.* *Biotechnol Techn* ,1997 **11** :339~341
- [30] Parajó J C ,Dominguez H ,Dominguez J M. *Biotechnol lett* ,1996 **18** (5) :593~598
- [31] Silva S S ,Afsvhar A S. *Biopro Engineer* ,1994 **11** :129~134
- [32] Yahashi Y ,Hatsu M ,Horitsu H *et al.* *Biotechnol lett* ,1996 **18** (12) :1395~1400

Bioconversion of Hemicellulose Hydrolysates for Xylitol Production

ZHANG Hou-Rui HE Cheng-Xin LIANG Xiao-Yan ZENG Jian-Zhi Tang Feng

(Guangxi Institute of Botany , Guilin 541006)

Abstract Xylitol has attracted much attention because of its many applications in the food ,medicine and chemical industries. However the use has been limited by its high price. This cost is a result of the extensive purification steps needed for the preparation of a pure xylose solution which is essential for the chemical process. The fermentative process of xylitol is an interesting alternative to conventional chemical process since it does not require initial xylose purification. The present review describes the advantage of xylitol production by fermentation ,xylitol-producing microorganisms ,metabolic pathway of xylose in yeasts ,detoxification of hemicellulose hydrolysates and fermentative conditions affecting xylitol production.

Key words Hemicellulose , hydrolysis , fermentation , xylitol