

假丝酵母发酵玉米芯半纤维素水解液生产木糖醇

方祥年 黄炜 夏黎明*

(浙江大学生物工程研究所 杭州 310027)

摘 要 采用一株驯化过的假丝酵母(*Candida* sp.)直接发酵经过简单脱毒处理的玉米芯半纤维素水解液生产木糖醇。确定了水解液的最适浓缩倍数在 3.0~3.72 的范围内。利用正交实验,确定了摇瓶批批发酵工艺条件的最适组合为:摇床转速 180r/min,起始 C/N 为 50,起始 pH 5.5,接种量 5%(体积比)。在此基础上,重点研究了在发酵罐中通气量对酵母发酵玉米芯水解液生产木糖醇的影响。结果表明采用先高后低的分段通气发酵在木糖醇得率方面明显优于恒定通气发酵,其中,在 0~24h 3.75 L/min,24~108h,1.25 L/min 的分段通气条件下(装液量为 2.5L),木糖醇得率(木糖醇/木糖, g/g)达到 0.75 g/g。该结果将有助于建立一种高效的、大规模的利用玉米芯半纤维素水解液发酵生产木糖醇的工艺。

关键词 木糖,木糖醇,玉米芯,半纤维素水解液,通气量,发酵

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)02-0295-04

木糖醇是一种无致龋性的甜味剂,已广泛应用于食品、医药等领域,在体内代谢不需胰岛素参与,因此也适合于糖尿病患者。目前工业上采用加氢催化还原来自于半纤维素水解液的高度纯化的木糖溶液生产木糖醇。该方法产率低,成本高,镍催化剂会污染环境^[1]。而利用微生物直接发酵经过脱毒处理的半纤维素水解液生产木糖醇,具有工艺条件温和、能耗低、无需繁琐的纯化木糖浆,环境污染程度低、产品质量更加安全可靠等优势^[2]。

发酵半纤维素水解液生产木糖醇的影响因素主要包括:通气量、碳氮比、水解液的浓缩倍数、pH、温度、种子龄及接种量、水解液中的其它单糖等^[3]。其中,溶氧水平可以影响木糖代谢中的生化途径。过量供氧利于生长大量菌体,厌氧条件下,木糖不能被利用,只有在微好氧条件下才能大量积累木糖醇^[4]。因此,为了优化木糖醇发酵过程,本研究采用正交实验和单因素实验相结合,考察了摇床转速、碳氮比、pH、接种量及水解液的浓缩倍数对水解液在摇瓶中发酵的影响,在此基础上,重点考察了通气量对水解液在发酵罐中发酵的影响。

1 材料与方 法

1.1 玉米芯半纤维素水解液的制备

将玉米芯(产自河北唐山)粉碎至粒径 30 目左右,按固液比 1:1(质量:体积)加入 1.0%的 H₂SO₄,在 110℃下水解 3 h。抽滤除去玉米芯残渣后,水解液在 50℃下真空浓缩至具

体实验要求的倍数。浓缩水解液用石灰乳过中和至 pH 10.0,抽滤去 CaSO₄沉淀后用浓 H₃PO₄回调 pH 至 6.0,抽滤去 Ca₃(PO₄)₂沉淀,所得水解液于 4℃冷藏备用。经 HPLC 测定,玉米芯半纤维素水解液中总糖浓度为 39.44g/L,主要糖类成分含木糖、葡萄糖、阿拉伯糖、果糖,占总还原糖的比例分别为 81.9%、7.7%、6.5%和 3.9%。

1.2 菌种和培养基

1.2.1 菌种 假丝酵母(*Candida* sp.)由美国普渡大学可再生资源工程实验室赠送,并经本实验室驯化后得到的一株木糖醇高产菌株^[5]。在菌种保藏培养基上 4℃下保存。

1.2.2 菌种保藏培养基 酵母粉 1.5 g,胰蛋白胨 2.5 g,琼脂粉 20 g,玉米芯水解液(含木糖 30g/L) 1.0L。

1.2.3 液体种子培养基(g/L):D-木糖 10,葡萄糖 10,酵母粉 1.5,胰蛋白胨 2.5,麦芽汁 3.0, pH 5.5。

1.2.4 发酵培养基:每 40mL 适当浓缩的玉米芯水解液中(含木糖约 125g/L),补加 5mL 含 30g/L 酵母粉、50g/L 胰蛋白胨的氮源溶液(保持在接种后,C/N 为 50),起始 pH 调至 5.5;于 110℃,灭菌 15min。

1.3 菌种培养与玉米芯水解液发酵条件

1.3.1 液体种子培养 斜面菌种一环,接入液体种子培养基中,500 mL 三角瓶装液量 100 mL,于 30℃、摇床转速 210 r/min 下培养 24h。最终细胞浓度约为 6.5g/L(dry weight)。

1.3.2 摇瓶发酵 250mL 摇瓶中加入 45mL 发酵培养基(含不同浓缩倍数的水解液以及保持 C/N 为 50 的氮源),接入

5mL 液体种子,在 180r/min,30℃ 下发酵,以考察水解液的浓缩倍数对发酵的影响。

1.3.3 发酵罐发酵:在 3.7L 的发酵罐(Benchtop Fermenter KLF2000, Bioengineering AG, Wald, Switzerland)中加入 2.25L 发酵培养基,并接入 250mL 液体种子,加 0.5% 的消泡剂,在 30℃、搅拌转速 500 r/min 下发酵,通气条件分别按以下 4 种策略进行 (A) 0~24h 6.25 L/min 24~66h 2.5 L/min (B) 0~24h 5.0 L/min 24~90h 1.25 L/min (C) 0~24h 3.75 L/min 24~108h 1.25 L/min (D) 0~66h, 5.0 L/min。

1.4 分析方法

1.4.1 葡萄糖、木糖、木糖醇的测定:发酵液离心后经 0.45 μm 滤膜过滤,采用 HPLC (Beckman Coulter) 进行分析,条件为: Dikma Nucleosil 5 μm NH₂ 10nm (250 mm \times 4.6mm) 新柱,流动相为乙腈/水 = 85/15 (V/V),流速 1.0 mL/min,柱温 25℃,示差折光检测器 (JASCO Intelligent RI-1530) 检测。

1.4.2 菌体量的测定:先测定菌液在 600nm 处的吸光值,再通过该吸光值与细胞干重之间经过校正的标准曲线计算出菌体干重。

2 结果与讨论

2.1 玉米芯水解液的浓缩倍数对发酵的影响

Nolleau 等人^[6]研究表明,在微好氧菌 (*C. parapsilosis*) 的木糖代谢过程中,当木糖浓度高于 100g/L 时,会对与辅酶 NADPH 相关的木糖还原酶 (XR) 的活力产生抑制作用。Alves

等人^[7]报道了甘蔗渣半纤维素水解液的浓缩倍数可以显著影响 *C. guilliermondii* 细胞内的 XR 和木糖醇脱氢酶 (XDH) 的比活力。在玉米芯半纤维素水解液中,除木糖之外,还含有葡萄糖、阿拉伯糖等单糖,以及乙酸、糠醛、酚类物质等发酵抑制物。水解液经过不同程度的真空浓缩,这些组分的含量会发生不同程度的变化。如果浓缩倍数过高,造成发酵抑制物浓度过高,毒性超过酵母的耐受能力,将会严重影响其生长与生理代谢,最终使得木糖醇发酵受抑制而无法进行。

表 1 给出了发酵不同浓缩倍数的玉米芯半纤维素水解液的结果。在一定的范围内,当起始木糖浓度逐渐增加,木糖醇达到峰值所需的发酵时间 (t) 随之增加,木糖醇的生产速率 (Q_p) 及得率 ($Y_{p/s}$) 也同时随之增长,水解液的浓缩倍数在 3.0~3.72 的范围内,木糖醇得率较高,并且残糖浓度 (S) 相对较低,有利于产物的后续纯化。然而,当浓缩倍数提高到 4.48 或更高时,由于高浓度抑制物的有害作用及较高浓度木糖造成的渗透压胁迫共同导致木糖利用受到强烈抑制,木糖醇产量急剧下降,即使延长发酵时间到 120 h 或更长,也不见明显改善 (数据未列出)。以纯木糖为碳源及保持 C/N 的对照实验表明,只有在木糖浓度大于 200 g/L 时,因为木糖浓度过高而产生的代谢抑制以及高渗透压胁迫作用才会逐渐显示出来。因此,在本研究中,高浓度抑制物应是主要影响因素。综合考虑发酵过程的生产能力与效率,采用浓缩倍数在 3.0~3.72 范围内的水解液较为适宜。

表 1 水解液的浓缩倍数对假丝酵母发酵玉米芯水解液生产木糖醇的影响

Table 1 Effects of concentration factor of corn cob hydrolysate on xylitol production by *Candida* sp.

Concentration factor (fold)	Initial xylose conc S_0 (g/L)	Fermentation time t (h)	Residual xylose conc S (g/L)	Xylitol conc P (g/L)	Cell mass (dry wt) X (g/L)	Volumetric productivity Q_p [(g/L·h)]	Xylitol yield $Y_{p/s}$ (g/g)
1.00	32.30	18	0.50	11.13	10.48	0.62	0.35
1.54	49.60	36	0.57	23.76	13.37	0.66	0.48
2.26	73.06	54	6.80	47.11	15.88	0.87	0.71
3.00	96.92	72	9.53	70.79	17.48	0.98	0.81
3.72	120.23	96	15.59	81.62	15.50	0.85	0.78
4.48	144.64	72	130.41	2.65	7.92	0.04	0.19
5.65	182.56	72	169.35	0.62	6.74	0.01	0.05
6.95	224.51	72	214.51	0.00	5.26	0.00	0.00

Results represent the average of two independent experiments conducted with two replicates for each condition. Standard deviations were below 2.0% of the mean.

2.2 摇瓶中发酵条件的优化

在酵母发酵玉米芯半纤维素水解液生产木糖醇的过程中,除了水解液的浓缩倍数之外,影响发酵效率较大的因素还包括摇床转速、氮源含量 (C/N)、起始 pH 及接种量等^[3]。因此,在保持发酵时水解液的起始木糖浓度为 100g/L 的条件下,设计正交试验 $L_9(3^4)$,以木糖醇浓度为指标来优化发酵条件。250mL 摇瓶中总装液量 50mL,于 30℃ 发酵 72h。连续 3 次发酵的平均结果表明,以上四因素对木糖醇产量的影响大小顺序为:起始 pH > 摇床转速 > 接种量 > 氮源含量,较优工艺条件为:摇床转速 180r/min,氮源含量 3.0 g/L 酵母粉、5.0g/L 胰蛋白胨 (木糖 $C_5H_{10}O_5$ 的含碳量按 40% 计算,酵母粉、胰蛋白胨的含氮量为 10%,换算成 C/N 为 50),起始 pH

2.3 接种量 2.5mL (5% 体积比)

其中,起始 pH 的影响较大的原因主要是因为,在较低的 pH (< 4.0) 条件下,玉米芯水解液中较高浓度的乙酸 (6.6g/L) 主要以未解离的分子形式存在,后者会强烈抑制酵母生长及阻遏木糖还原酶的诱导合成与比活力^[3]。同时,以纯木糖为碳源的对照实验表明,在 pH2.5~pH8.0 的范围内,发酵效率无明显差异。这就证明了乙酸的影响。由于在木糖醇发酵过程中,控制 pH 要比控制通气或溶氧要容易得多,因而,有必要重点考察通气量对发酵的影响。

2.3 通气量对酵母在发酵罐中发酵玉米芯水解液的影响

酵母在木糖代谢中,在好氧条件下,NADH 大量被氧化为 NAD,从而激活 XDH,不利于积累木糖醇,而在微好氧条

件下,NADH大量积累,抑制了XDH的活性,从而促进木糖醇的积累^[1]。

在发酵的早期,积累足够量的菌体对于高效生产木糖醇是必要的,这可以通过提高培养基中的溶氧来实现^[8]。但是木糖醇是在严格限制供氧条件下才能形成^[4],如果一直保持高水平溶氧,不仅会导致刚产生的木糖醇脱氢形成木酮糖,而且会使更大比例的木糖用于过量的菌体生长和呼吸作用而不是木糖醇的积累。因此,可采取在发酵的早期提供较高水平供氧,在后期适当降低供氧的分段供气策略^[9]。第一阶段的高通气量,还有利于葡萄糖快速消耗用于菌体生长,并产生尽可能少的对木糖醇合成有抑制作用的乙醇,也利于乙酸等抑制物的消耗,从而缩短发酵过程的延滞期^[10]。第二阶段的较低通气量,则有利于形成合适的限氧环境,促进木糖醇的产生。

假丝酵母于四种供气条件下,在发酵罐中发酵玉米芯半

纤维素水解液的时间进程曲线如图1A~D所示。在通气策略A、B、D的条件下,水解液中的葡萄糖只需12h就可消耗完毕,而在C的条件下,需16h左右。在发酵的第一阶段,在C的条件下,菌体生长(X)相对较差,24h后只有8.89g/L,且仅有27.3%的木糖被消耗,同样,积累的木糖醇也较少,约16g/L。将通气速率提高到5.0L/min(B、D)时,可以显著提高菌体量、木糖消耗百分比及木糖醇浓度。继续提高通气速率到6.25L/min(A)时,这三种数据变得更高,分别为15.08g/L、67.6%和48.68g/L。然而,在第二阶段,在C的条件下,木糖醇产量为54.9g/L,而在A、B和D的条件下,分别只产生10.36g/L、44.83g/L和37.85g/L的木糖醇。这是由于在C的条件下,第二阶段相对较低的通气速率(1.25L/min)有利于形成合适的限氧环境,再加上第一阶段留下的较大比例的木糖可以用来高效地转化成木糖醇。

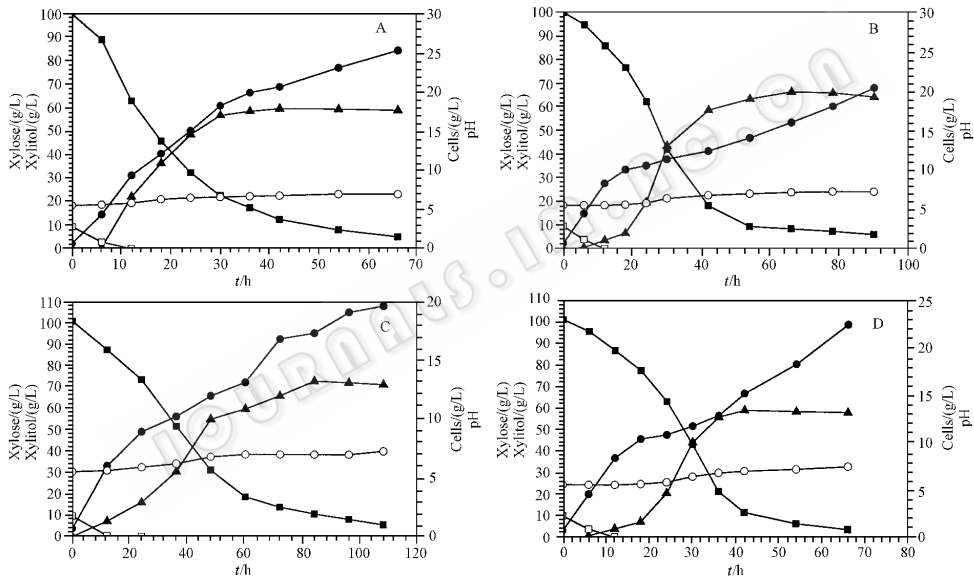


图1 假丝酵母在不同的通气条件下发酵玉米芯半纤维素水解液生产木糖醇的时间进程曲线

Fig. 1 Time courses of xylool production from corn cob hemicellulosic hydrolysate by *Candida* sp. under different aeration strategies

The four letters A, B, C and D representing four different aeration strategies A, B, C and D, respectively.

(■) xylose {▲} xylool {□} glucose {●} cell concentration {○} pH

如图1所示,发酵终点的选取必须同时考虑到获得终浓度尽可能高的木糖醇和终浓度尽可能低的残留木糖,这样有利于产物的后续纯化。由图1A~D中的数据经计算可知:最高的木糖醇生产速率和得率分别在通气策略A和C的条件下得到,二者分别为0.89g/(L·h)和0.75g/g。由此可见,适当的通气量对于高效发酵玉米芯水解液生产木糖醇是非常必要的。采用分段通气发酵工艺,它既能在发酵早期快速消耗抑制物、缩短发酵时间,又能在第二阶段提供适宜的限氧环境,提高了木糖醇得率。

3 结论

在摇瓶中发酵玉米芯水解液生产木糖醇的过程中,起始

pH对木糖醇产量的影响最大,其次是摇床转速,接种量与氮源含量的影响相对较小,水解液的浓缩倍数也有较大的影响。较优发酵条件为:摇床转速180r/min,起始C/N为50,起始pH5.5,接种量5%(体积比),水解液的浓缩倍数在3.0~3.72的范围内。在发酵罐中采用先高后低的分段通气发酵,在木糖醇得率方面明显优于恒定通气发酵,其中,在0~24h,3.75L/min,24~108h,1.25L/min的分段通气条件下,得到最高木糖醇得率0.75g/g。

综上所述,采用驯化过的假丝酵母,在优化后的发酵条件下直接发酵只经过石灰乳过中和等简单处理的玉米芯半纤维素水解液,得到了较高产率的木糖醇。该方法可以大大减少预处理成本,研究结果显示良好的工业化前景。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Poonam N , Dalel S . Production of xylitol – a sugar substitute . *Process Biochem* , 1995 **30** :117 – 124
- [2] Faria LFF , Gimenes MAP , Nobrega R *et al.* Influence of oxygen availability on cell growth and xylitol production by *Candida guilliermondii* . *Appl Biochem Biotechnol* , 2002 **98/100** : 449 – 458
- [3] Parajó JC , Domínguez H , Domínguez JM . Biotechnological production of xylitol . Part3 : Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates . *Bioresource Technology* , 1998 **66** : 25 – 40
- [4] Kim S-Y , Kim J-H , Oh D-K . Improvement of xylitol production by controlling oxygen supply in *Candida parapsilosis* . *J Ferment Bioeng* , 1997 , **83** : 267 – 270
- [5] Sun KS (孙昆山) , Xia LM (夏黎明) . Studies on xylitol fermentation of corn cobs hydrolysate by *Candida* sp . *Chemistry and Industry of Forest Products* (林产化学与工业) , 2002 **22** (2) : 26 – 30
- [6] Nollet V , Preziosi-Belloy L , Delgenes JP *et al.* Xylitol production from xylose by two yeast strains : sugar tolerance . *Curr Microbiol* , 1993 , **27** : 191 – 197
- [7] Alves LA , Vitolo M , Felipe MGA *et al.* Xylose reductase and xylitol dehydrogenase activities of *Candida guilliermondii* as a function of different treatments of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate employing experimental design . *Appl Biochem Biotechnol* , 2002 **98/100** : 403 – 413
- [8] Horitsu H , Yahashi Y , Takamizawa K *et al.* Production of xylitol from D-xylose by *Candida tropicalis* : optimization of production rate . *Biotechnol Bioeng* , 1992 **40** : 1085 – 1091
- [9] Gimenes MAP , Carlos LCS , Faria LFF *et al.* Oxygen uptake rate in production of xylitol by *Candida guilliermondii* with different aeration rates and initial xylose concentrations . *Appl Biochem Biotechnol* , 2002 **98/100** : 1049 – 1058
- [10] Martinez EA , Silva SS , Felipe MGA . Effect of the oxygen transfer coefficient on xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate by continuous stirred-tank reactor fermentation . *Appl Biochem Biotechnol* , 2000 , **84/86** : 633 – 641

Xylitol Production from Corn Cob Hemicellulosic Hydrolysate by *Candida* sp.

FANG Xiang-Nian HUANG Wei XIA Li-Ming*

(Institute of Bioengineering , Zhejiang University , Hangzhou , 310027 , China)

Abstract Xylitol , a five-carbon sugar alcohol , has many interesting applications in the food , pharmaceutical , and odontological industries , owing to its high sweetening power , its anticariogenic properties , and its insulin-independent metabolism. The bioconversion of detoxified hemicellulosic hydrolysate to xylitol by microorganisms could be a cheaper alternative to the current chemical process , since it is a simple process , with great specificity and low energy requirements. However , the success of fermentations for xylitol production depends on the productivity of the strain and its tolerance to different toxic or inhibitory compounds existing in the hydrolysates. In addition , a number of culture process parameters proved to have significant effects on xylitol production in hemicellulosic hydrolysate media. One of the most important control variables in this bioconversion is the aeration level , which affects the biochemical pathways in the xylose metabolism. The production of biomass is favored by aerobic conditions , while under anaerobic conditions xylose cannot be assimilated by yeast , whereas xylitol is formed in oxygen-limited incubation conditions. An adapted *Candida* sp . with enhanced resistance to the inhibitors in the hydrolysate can directly ferment the simply detoxified corn cob hemicellulosic hydrolysate to xylitol. In the present study , the combined effects of shaking speed , C/N ratio , initial pH , and inoculum level on the fermentation of corn cob hemicellulosic hydrolysate to xylitol by an adapted *Candida* sp . were investigated using an orthogonal experimental design in flask. As a result , the optimum fermentation conditions were as follows : 180 r/min , a C/N ratio of 50 , initial pH 5.5 , and an inoculum level of 5% (volume ratio). Moreover , the optimum concentration factor of hydrolysate varied between 3.0 and 3.72 was obtained. Based on these results , in order to evaluate the effect of aeration rate on the fermentation of corn cob hemicellulosic hydrolysate to xylitol in fermentor , batch fermentations were carried out in a 3.7 L stirred fermentor using four different aeration strategies , including three kind of two-stage aeration strategies , which provided relatively high aeration rate in the early stage but reduced it in the later stage , and including a one-stage aeration strategy provided a constant aeration rate. With respect to xylitol yield , the results indicated that two-stage aeration strategy was significantly superior to one-stage aeration strategy. The highest xylitol yield (0.75 g/g) was obtained with oxygen supply strategy C (3.75 L/min for first 24 h , then lowered it to 1.25 L/min , 2.5 L fermentation medium was employed). In this process , without extensive detoxification of hydrolysate , an adapted *Candida* sp . can efficiently ferment the simply treated corn cob hemicellulosic hydrolysate to xylitol under the optimized fermentation conditions. This work should help the development of an efficient process for producing xylitol from corn cob hemicellulosic hydrolysate on a larger scale by bioconversion.

Key words xylose , xylitol , corn cob , hemicellulosic hydrolysate , aeration rate , fermentation