

酵母发酵蔗渣半纤维素水解物生产木糖醇

张厚瑞* 曾健智 何成新 方宏 蔡爱华

(中国科学院广西植物研究所, 桂林 541006)

摘要 采用二次正交旋转组合设计研究了蔗渣半纤维素水解过程中硫酸浓度与液/固比对木糖收率的影响。回归分析表明,这两个因素与木糖的收率之间存在显著的回归关系。通过回归方程优化水解条件,当硫酸浓度 2.4g/L,液/固 = 6.2,在蒸汽压力 2.5×10^4 Pa 的条件下水解 2.5h,100g 蔗渣可水解生成木糖约 24g。大孔树脂吸附层析处理蔗渣半纤维素水解物,能有效地减少其中的酵母生长抑制物含量,显著改善水解物的发酵性能。用大孔树脂在 pH 2 条件下处理过的蔗渣半纤维素水解物作基质,含木糖 200g/L,产木糖醇酵母菌株 *Candida tropicalis* AS2.1776 发酵 110h 耗完基质中的木糖,生成木糖醇 127g/L,产物转化率 0.64(木糖醇 g/木糖 g),产物生成速率 1.15g/L·h。

关键词 蔗渣,半纤维素水解物,木糖醇,发酵

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)06-0724-05

木糖醇是一种五碳糖醇,甜度与蔗糖相当,在人体内代谢无需胰岛素参与,同时有良好的抗龋齿性能,在食品工业中具有特殊的应用价值而倍受人们的关注^[1]。

目前工业化生产木糖醇仍采用化学法还原本糖的生产工艺,但利用微生物发酵生产木糖醇已经引起人们的广泛关注,因为化学工艺首先必需从半纤维素水解物中制取出纯净的木糖,才能用于加氢还原制备木糖醇。发酵工艺则无需纯化木糖的步骤,是一条可能有效降低生产成本的工艺路线^[2]。

但是,半纤维素水解过程伴随产生一系列对微生物有毒的副产物^[3],包括木糖的降解产物糠醛,半纤维素脱乙酰基生成的醋酸,由木质素降解生成的酚类化合物等^[3]。它们能抑制酵母细胞生长,影响半纤维素水解物的木糖醇发酵性能。只有经过脱毒工艺处理过的半纤维素水解物,才能用于发酵生产木糖醇。然而,一条适于工业化应用的半纤维素水解物脱毒工艺,仍然是一个探索中的课题。

蔗渣半纤维素的主要成分——木聚糖约占蔗渣干重的 27%~29%,利用微生物发酵蔗渣半纤维素水解物生产木糖醇,是合理利用蔗渣资源的有效途径^[4]。在本文中,我们优化了蔗渣半纤维素的水解条件,提出了利用大孔树脂吸附水解物中有毒物质

的脱毒方法,并进行了木糖醇发酵试验。

1 材料与方法

1.1 蔗渣预处理

蔗渣取自当地糖厂。干燥蔗渣 100g 加水 1000mL 煮沸 10min,滤出的蔗渣,用清水洗 1 次,晒干,粉碎后过 40 目筛备用。

1.2 水解条件优化

水解条件优化采用二元二次正交旋转组合设计^[5],含 4 个析因点,4 个星号点($\gamma = 1.414$),中心点设计 8 次重复。以硫酸浓度 x_1 (g/L),液/固比 x_2 作自变量,经下述公式分别转换为编码值 A, B。

$$A = (x_1 - 1.750) / 0.884;$$

$$B = (x_2 - 5.50) / 1.768$$

干燥蔗渣与稀硫酸溶液在三角瓶内混匀,室温下放置 5h,然后以蒸汽加热水解。水解结束,压榨出水解液并测定木糖浓度,换算出每 100 克绝干蔗渣水解后的木糖收率。

1.3 水解物脱毒处理

水解液在 70℃ 条件下真空浓缩至可溶性固形物含量约 200g/L,继用石灰乳中和至不同 pH 值,抽滤除去硫酸钙沉淀,然后用大孔树脂或活性炭吸附

收稿日期 2002-06-29,修回日期 2002-08-21。

基金项目 广西自然科学基金资助(No.9811015)。

* 通讯作者。Tel: 86-773-3550075; Fax: 86-773-3550067; Email: zhhr@gl.gx.cninfo.net

脱毒(大孔树脂 HPD500, 中国, 河北沧州化工厂产)装入层析柱内, 样品由柱床上端加入, 收集柱下流出液。处理过的水解物用石灰乳或磷酸调节至 pH 5.5, 80℃保温 2h, 抽滤除去沉淀, 70℃真空浓缩至木糖含量约 220~230 g/L。每 100g 湿树脂吸附处理相当于 500g 干燥蔗渣的水解物。

活性炭(粉末状, 化学纯, 广州化学试剂厂产)吸附。总可溶性固形物含量 200g/L 的浓缩水解液, 直接用石灰乳调节至 pH 5.5, 80℃保温 2h, 抽滤除去沉淀物, 然后加入活性炭 20g/L, 80℃保温 0.5h, 抽滤除去活性炭, 真空浓缩至木糖含量约 220g/L。脱毒处理后的糖液 4℃冷藏, 使用时按要求稀释。

1.4 发酵

1.4.1 微生物菌株:所用酵母为热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)菌株 AS2.1776, 购自中国普通微生物菌种保藏中心, 接种并保存于普通麦芽汁培养基上。

1.4.2 培养基:种子培养基, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2g/L; KH_2PO_4 5g/L 酵母膏 10g/L; 葡萄糖 10 g/L; 木糖 10 g/L。木糖醇发酵培养基, 以商品木糖(中国, 河北, 保定化工二厂)或蔗渣半纤维素水解物取代种子培养基中的木糖, 葡萄糖, 其余成分同种子培养基。

1.4.3 培养条件:250mL 三角瓶装量 25mL 培养基, 30℃, 200r/min 摇床培养。种子培养:取试管斜面菌体一环, 接一瓶种子培养基, 摇床培养 24h。木糖醇发酵:每瓶培养基接入种子液 0.5mL, 接种量约相当于每升 0.45g 干细胞, 其余培养条件同种子培养。

1.5 分析方法

可溶性固形物含量用手持式糖量计测定。木糖、木糖醇标准样品购自 Sigma, 检测分析用 HPLC 法: Waters 510 泵、410 示差折光检测器; 色谱柱, 大连依利特公司 Hypersil NH_2 。流动相: V(乙腈):V(水)=80:20。离心收集发酵液菌体, 蒸馏水洗涤 2 次, 620nm 处测定吸光度, 经标准曲线换算出细胞干重。统计分析用 SAS 统计分析软件完成。

2 结果与讨论

2.1 蔗渣水解条件优化

蔗渣半纤维素水解的木糖收率, 主要与蒸汽压力、酸浓度、液/固比、水解时间等因素有关。根据预备实验结果, 本研究选定水解蒸汽压力为 2.5×10^4 Pa, 水解时间为 2.5h, 在此条件下考察硫酸浓度、液/固比变化对产物木糖收率的影响。实验结果见表 1。

表 1 蔗渣半纤维素水解的试验设计与试验结果

Table 1 Experimental design and results for Sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysis

Experiment number	Coded value		Xylose yield(g/100g)	
	A	B	Observed	Predicted
1	1	1	24.86	22.60
2	1	-1	19.36	19.24
3	-1	1	15.18	12.93
4	-1	-1	8.25	8.13
5	1.414	0	20.63	21.82
6	-1.414	0	5.94	7.13
7	0	1.414	17.16	19.86
8	0	-1.414	14.14	14.09
9	0	0	22.66	21.90
10	0	0	21.78	21.90
11	0	0	22.00	21.90
12	0	0	20.90	21.90
13	0	0	21.34	21.90
14	0	0	22.11	21.90
15	0	0	24.31	21.90
16	0	0	20.13	21.90

回归关系的方差分析显著性检验证明(表 2), 总回归达到极显著水平, 即硫酸浓度、液/固比与木糖收率之间存在极显著的回归关系, 其中 A, B, A^2 , B^2 项均达极显著水平, 但互作项 AB 不显著。

表 2 回归的方差分析

Table 2 Variance analysis for regression

Source	DF	Sum of Squares	Mean of Squares	F Stat	Prob > F
A	1	215.9541	215.9541	68.9087	0.0001
B	1	33.2917	33.2917	10.6230	0.0086
A * A	1	110.3881	110.3881	35.2237	0.0001
A * B	1	0.5112	0.5112	0.1631	0.6948
B * B	1	48.5917	48.5917	15.5051	0.0028
Model	5	408.7588	81.7518	26.0862	0.0001
Error	10	31.3391	3.1339		
C Total	15	440.0980			

将 AB 项剔除, 木糖收率依硫酸浓度(A)及液/固比(B)的回归方程用编码值计算可表示为:

$$P = 21.9036 + 5.1960A + 2.0401B - 3.7115A^2 - 2.4651B^2$$

P 是木糖的收率(g 木糖:100g 绝干蔗渣)。

根据回归方程计算, 并将编码值转换为因素水平的实际取值后得出:最佳硫酸浓度 2.37g/L, 液/固 = 6.2(蒸汽压力 2.5×10^4 Pa, 水解时间 2.5h), 产物

最高收率约为 24g 木糖/100g 蔗渣。验证实验的平均收率为 23.5g/100g 蔗渣。预测值与实验值颇为接近,说明本回归模型有较好的预测精度。

2.2 大孔树脂的脱毒效果

半纤维素水解物的紫外吸收物含量,是评价有毒成分含量的一个重要指标^[6]。将活性炭处理的水解物及在 pH 2、pH 5 条件下用大孔树脂处理过的水解物配制成 0.025% 的水溶液,进行 200~500nm 范围紫外扫描。紫外光谱分析表明,3 个样品在 288nm 处均有明显的糠醛吸收特征峰,因此 3 个样品都含有糠醛,但大孔树脂处理后样品的糠醛含量明显低于活性炭处理,并且大孔树脂除去糠醛的效果, pH 2 条件下处理显著优于 pH 5。此外,样品在 290~320 nm 处均有较宽的吸收带,不同处理方法对于除去这一吸收带化合物的效果,与除去糠醛的规律是一致的。

比较吸收值曲线可以看出,活性炭吸附蔗渣半纤维素水解物中紫外吸收物的效果不及大孔树脂,而大孔树脂处理则有随水解物 pH 上升,吸附紫外吸收物效果下降的趋势(图 1)。

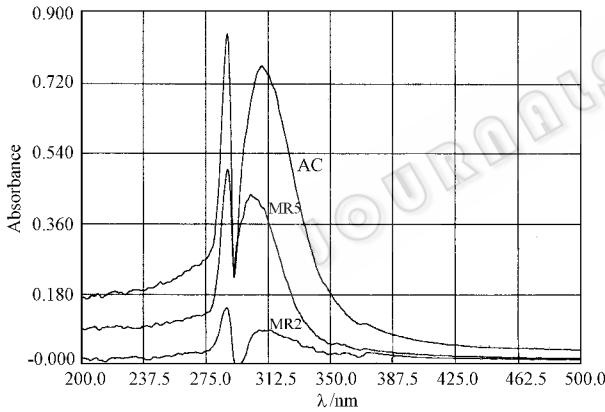


图 1 在 pH 2 (MR2) 或 pH 5 (MR5) 条件下经大孔树脂吸附, pH 5.5 条件下经活性炭吸附处理 (AC) 后的蔗渣半纤维素水解物光谱

Fig.1 Spectra of sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysates treated with macroporous resin adsorption at pH 2 (MR2) or pH 5 (MR5), and with activated charcoal adsorption at pH 5.5 (AC)

将 pH 2、pH 5 条件下经大孔树脂处理过的蔗渣半纤维素水解物调节至 pH 5.5,配制成不同木糖浓度,接种 *Candida tropicalis* AS 2.1776,摇瓶培养 48h 后测定细胞密度,并与活性炭处理作比较。图 2 表明,用大孔树脂处理的水解物,酵母细胞密度明显高于活性炭处理。木糖浓度约 105g/L 时,前者的细胞密度是后者的 1 倍以上。将木糖浓度提高到 210

g/L,活性碳处理的基质中酵母细胞已经基本停止生长,而大孔树脂处理的基质中,酵母细胞密度比活性炭处理木糖浓度 105g/L 时还要高。显然,大孔树脂除去蔗渣半纤维素水解物中酵母细胞毒物要比活性炭有效。

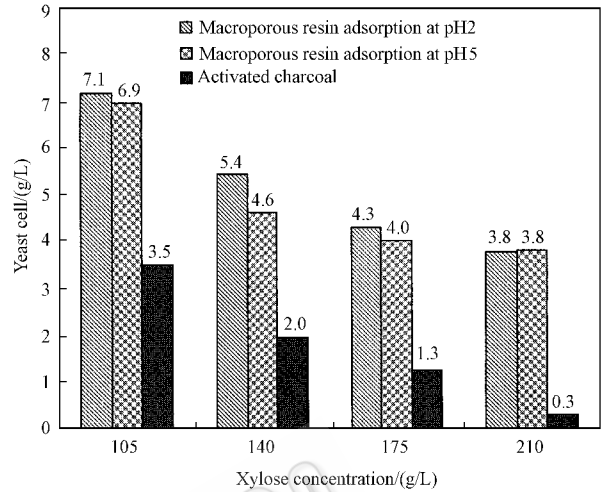


图 2 蔗渣半纤维素水解物在不同 pH 条件下经大孔树脂吸附处理及活性炭吸附处理后,酵母细胞的生长情况。发酵时间 48h

Fig.2 The yeast cell growth on sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysates treated with macroporous resin under different values of pH and treated with activated charcoal. Fermentation time 48h

图 1 显示,蔗渣半纤维素水解物在 pH 2 条件下经大孔树脂处理后,紫外吸收物含量明显低于 pH 5 条件下处理的水解物。但图 2 表明,较高木糖浓度条件下,这两种基质之间的细胞密度差异并不明显。这种现象可以这样理解:在 pH 2 或 pH 5 条件下,经大孔树脂吸附处理过的水解物,具有紫外吸收特性的残余毒物浓度,在本试验条件下已经低于可以明显影响酵母细胞生长的范围。当然,也可能是大孔树脂除去的某一重要有毒物质,并没有紫外吸收的特性。

2.3 木糖醇发酵

将 pH 2 条件下经大孔树脂吸附处理过的蔗渣半纤维素水解物,配制成初始木糖浓度 200g/L 培养液,接入酵母菌株 AS 2.1776,用同等浓度的商品木糖培养基作对照。发酵结果表明,用蔗渣半纤维素水解物作培养基,虽然产物生成速率只有商品木糖的 1/2 左右,但两者的产物转化率却是接近的(表 3)。

表 3 酵母 *Candida tropicalis* AS2.1776 利用蔗渣半纤维素水解物及纯净木糖生成木糖醇的性能Table 3 xylitol production from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate and pure xylose by *Candida tropicalis* AS2.1776

Substrates	Xylose/(g/L)	Xylitol/(g/L)	Q_p /(g/L·h)	$Y_{p/s}$ /(g/g)	Fermentation time/h
Hydrolysate	200	127	1.15	0.64	110
Pure xylose	200	136	2.23	0.68	61

3 与同类研究的比较

利用半纤维素水解物发酵生产木糖醇,评价水解物脱毒效果最直接的指标是发酵所用的初始木糖浓度(S_0 ,g/L)与木糖醇生成速率[Q_p ,g(L·h)]。只有使用毒物含量较低的水解物,酵母细胞才可能耐受较高的初始木糖浓度;只有酵母细胞处于良好的生长与发酵活性状态,才可能获得较高的木糖醇生成速率,因为木糖醇生成速率实际上就是体系中细胞密度与木糖醇比生成速率的乘积。表 4 列出玉米芯与甘蔗渣的半纤维素水解物,当前在改善其发酵性能方面取得效果最好的几种脱毒方法。

Dominguez 等人^[6]用 10% 氨水溶液预处理玉米芯,然后再水解,所制备的水解物用酵母菌株 *Can-*

didia sp. 11-2 发酵,初始木糖浓度 130g/L,生成木糖醇 70g/L,产物生成速率 1.94g/L·h,这几项发酵参数的指标,都是迄今为止利用半纤维素水解物发酵生产木糖醇研究当中所达到的最高值。本研究的初始木糖浓度,产物木糖醇浓度这两项指标分别是 Dominguez 研究的 1.5、1.8 倍(表 4)。对于产物生成速率而言,Dominguez 等人是通过离心收集菌体,以相当于 4g 干细胞/L 的大接种量,才获得 1.94g/L·h 的产物生成速率,它实际上忽略了专门培养大量酵母细胞所耗费的时间。本研究的接种量约 0.45g 干细胞/L,木糖醇生成速率 1.15g/L·h,则已经包含了相应的酵母细胞增殖时间在内。与用大量的氨水预处理原料相比,大孔树脂吸附脱毒的方法不仅操作便利,成本较低,而且更容易实现良好的生产环境。

表 4 酵母发酵经不同方法处理的蔗渣、玉米芯水解物生成木糖醇能力的比较

Table 4 Comparison of xylitol productivities from sugar cane bagasse, core cob hydrolysate treated with different methods by yeasts

Yeast	Raw material	Hydrolysate processing	S_0 /(g/L)	P /(g/L)	Q_p /(g/L·h)	$Y_{p/s}$ /(g/g)	Reference
<i>Candida</i> sp. 11-2	Corn cob	Ammonia pretreatment	130	70	1.94 ^①	0.57	[6]
<i>C. parapsilosis</i> KFCC 10875	Corn cob	Ion exchange	50	36	0.64	0.72	[13]
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	Sugar cane bagasse	CaO + aluminum sulphate	60	44	0.62	0.78 ^②	[8]
<i>C. guilliermondii</i> FTI 20037	Sugar cane bagasse	CaO + Activated charcoal	45	26.6	0.56	0.79 ^③	
<i>C. tropicalis</i> AS2.1776	Sugar cane bagasse	Macroporous resin adsorption.	200	127	1.15	0.64	This study

① The yeast cells from growth medium were collected by centrifugation and transferred into fermentation medium at a density of 4g dry cell/L. ②、③ The xylose consumptions were 94%, 75%, respectively.

大多数研究都是将木质纤维材料水解之后再进行处理,因为相对于处理体积庞大的原料而言,处理水解物显然方便得多。已经证明,采用过量石灰沉淀^[7],硫酸铝沉淀^[8],有机溶剂萃取^[9,10],离子交换树脂处理^[11],活性炭吸附^[11,12]等方法,都能够有效改善水解物的发酵性能。在这些脱毒方法中,可以是单一方法处理,也可以是多种方法联合使用。

从表 4 看出,如果是原料在水解之后再进行处理,且不采用离心收集菌体进行高密度细胞接种的话,不同学者当前所用的初始木糖浓度 ≤ 60 g/L

产物木糖醇浓度 ≤ 44 g/L,木糖醇生成速率 ≤ 0.64 g/L·h。而本研究采用大孔树脂对蔗渣半纤维素水解物脱毒处理,这 3 个发酵参数已经达到的指标值,分别是已有研究最高值的 2.1 倍、2.8 倍、1.8 倍。因此,已经使用过的水解物脱毒方法当中,也没有一种方法能够达到大孔树脂吸附处理的脱毒效果。

4 结 论

蔗渣半纤维素很容易通过稀酸水解生成富含木糖的水解物。用 2.4 g/L 的稀硫酸,按液/固 = 6.2 与

蔗渣混合,在蒸汽压力 2.5×10^4 Pa 的条件下水解 2.5h,水解生成的木糖可占蔗渣重量的 24%。蔗渣半纤维素水解物所含的对酵母细胞生长有毒物质,能通过大孔树脂吸附层析处理有效除去。本研究采用这一方法制备的蔗渣半纤维素水解物培养基用于木糖醇发酵,所用的初始木糖浓度(200g/L),所获得的产物浓度(木糖醇 127g/L),产物生成速率(木糖醇 $1.15\text{g/L}\cdot\text{h}$),都是迄今为止同类研究的最高水平。

虽然本研究的产物生成速率,产物转化率水平仍然偏低,尚不具备直接的商业应用价值,但它已经表明,大规模利用蔗渣半纤维素水解物作为发酵基质生产木糖醇是可行的,因为无需复杂的精制过程,酵母就能利用其中高浓度的木糖,并生成高浓度的木糖醇。此外,本研究采用的大孔树脂吸附脱毒法,对利用半纤维素水解物作为发酵基质的相关研究,也有重要的启示作用。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Emodi A. Xylitol, its properties and food applications. *Food Technol*, 1978, **32**: 28 ~ 32
- [2] Parajó J C, Dominguez H, Dominguez J M. Biotechnological production of xylitol, Part 1. Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Biore Technol*, 1998, **65**: 191 ~ 201
- [3] Parajó J C, Dominguez H, Dominguez J M. Biotechnological production of xylitol, Part 3. Operation in culture media made from ligno-cellulose hydrolysates. *Biore Technol*, 1998, **66**: 25 ~ 40
- [4] Nigam P, Singh D. Processes for fermentative production of xylitol-a sugar substitute. *Process Biochem*, 1995, **30**: 117 ~ 124
- [5] BAI H Y (白厚义), XIAO J Z (肖俊璋). Experimental Research and Statistic Analysis. Xi'an: World book publishing company (世界图书出版公司), 1998, pp. 212 ~ 228
- [6] Dominguez J M, Cao N J, Gong C S *et al.* Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. *Biore Technol*, 1997, **61**: 85 ~ 90
- [7] Roberto I C, Felipe M G A, Lácis L S *et al.* Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. *Biore Technol*, 1991, **36**: 271 ~ 275
- [8] Rodrigue D C G A, Silva S S, Felipe M G A. Fed-batch culture of *Candida guilliermondii* FTI 20037 for xylitol production from sugar cane bagasse hydrolysate. *Letter in Applied Microbiology*, 1999, **29**: 259 ~ 363
- [9] Parajo J C, Dominguez H, Dominguez J M. Xylitol production from *Eucalyptus* wood hydrolysates extracted with organic solvents. *Process Biochem*, 1997, **32**: 599 ~ 604
- [10] Cruz J M, Dominguez H, Parajo J C. Solvent extraction of hemicellulosic wood hydrolysates: a procedure useful for obtaining both detoxified fermentation media and polyphenols with antioxidant activity. *Food Chemistry*, 1999, **67**: 147 ~ 153
- [11] Roberto I C, Silva S S, Felipe M G A. Bioconversion of rice straw hemicellulose hydrolysate for xylitol production. *Appl Biochem Biotechnol*, 1996, **57/58**: 339 ~ 344
- [12] Morita T A, Silva S S, Felipe M G A. Effects of initial pH on biological synthesis of xylitol using xylose-rich hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol*, 2000, **84 ~ 86**: 751 ~ 759
- [13] Kim S Y, Oh D K, Kim J H. Evaluation of xylitol production from corn cob hemicellulose hydrolysate by *Candida parapsilosis*. *Biotech Letter*, 1999, **21**: 891 ~ 895

Utilization of Sugar Cane Bagasse Hydrolysates for Xylitol Production by Yeast

ZHANG Hou-Rui* ZENG Jian-Zhi HE Cheng-Xin FANG Hong CAI Ai-Hua
(Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract The effects of the concentration of sulfuric acid and the ratio of liquid to solid on xylose yield from sugar cane bagasse in its hemicellulose hydrolysis process were studied with the Quadratic Rotary Combination Design. Regression analysis showed that there was a marked regression relationship between the two factors and xylose yield. As the result of optimizing the hydrolysis conditions by regression equation, xylose yield of 24g/100g sugar cane bagasse was obtained when sulfuric acid concentration was 2.4g/L and liquid to solid ratio was 6.2 under the conditions of steam pressure of 2.5×10^4 Pa and hydrolysis time of 2.5 h. The macroporous resin adsorption was proved to be a good method to reduce the concentration of yeast cell growth inhibitor in sugar cane bagasse hemicellulose hydrolysate and to enhance the hydrolysate fermentability. The hydrolysate treated with macroporous resin adsorption under pH2 was used as the substrate for xylitol production by a xylitol-producing yeast, *Candida tropicalis* AS2.1776. At an initial xylose concentration of 200g/L, all xylose was consumed within 110 h with a xylitol production rate of 1.15g/L·h, and a xylitol yield of 0.64g/g xylose.

Key words sugar cane bagasse, hemicellulose hydrolysate, xylitol, fermentation

Received: 06-29-2002

This work was supported by grant from Guangxi Natural Science Fund (No. 9811015).

* Corresponding author. Tel: 86-773-3550075; Fax: 86-773-3550067; E-mail: zhhr@gl.gx.cninfo.net