

# 聚氨酯固定化热带假丝酵母发酵木糖醇

王乐 袁其朋\* 常铮 范晓光

(北京化工大学 化工资源有效利用国家重点实验室 北京 100029)

**摘要:** 固定多孔聚氨酯载体中的热带假丝酵母(*Candida tropicalis*), 可有效地利用玉米芯半纤维素水解液生产木糖醇。在摇瓶条件下, 采用分批发酵方式, 确立了适宜的发醇工艺参数为: 接种量 7%, 聚氨酯加入量 1.0 g/100 mL, 温度 30°C, 初始 pH 值 6.0, 分段改变摇床转速进行溶氧调节, 其中 0~24 h 为 200 r/min; 24 h~46 h 为 140 r/min。聚氨酯固定化提高了菌体对发醇抑制物的耐受力, 固定化细胞密度高, 发醇性能稳定, 发醇产率和体积生产速率都有所提高。水解液未经脱色与离子交换便可转化成木糖醇, 大幅降低了成本, 显示了良好的应用前景。固定化细胞连续重复进行 12 批次 21 d 的发醇, 木糖醇得率平均为 67.6%, 体积生产速率平均为 1.92 g/(L·h)。

**关键词:** 木糖醇, 半纤维素水解液, 聚氨酯, 固定化

## Polyurethane Foam Immobilization of *Candida tropicalis* for Xylitol Production

WANG Le YUAN Qi-Peng\* CHANG Zheng FAN Xiao-Guang

(State Key Laboratory of Chemical Resource Engineering, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Immobilization conditions of *Candida tropicalis* to be absorbed in polyurethane foam carrier materials were studied on the xylitol production from corn hemicellulosic hydrolysate. Optimum batch-fermentation conditions were as follows: inoculum amount, 7% (volume ratio); polyurethane foam quantity, 1.0 g/100 mL; 30°C; initial pH, 6.0. Shaking speed was divided into two-phase to accommodate the dissolved oxygen, with 200 r/min at 0~24 h and 150 r/min at 24 h~46 h. The immobilized cells on polyurethane foam carrier have high density and good resistance to inhibitors in the hydrolysates. Average xylitol yield and volumetric productivity of polyurethane foam immobilized fermentation were much higher than the fermentation without immobilization. Corn cob hydrolysates can be directly biotransformed to xylitol without decoloration or ion-exchange treatment. This process can effectively reduce production costs, and it shows broad prospects of applications. Average xylitol yield was 67.6% and xylitol volumetric productivity was 1.92 g/(L·h).

**Keywords:** Xylitol, Hemicellulosic hydrolysate, Polyurethane foam, Immobilization

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。它在体内代谢不需胰岛素参与, 因此也适合于糖尿病患者。半纤维素是廉价的

可再生资源, 利用玉米芯等富含半纤维素物质制成水解液发醇生产木糖醇, 与传统加氢催化工艺相比, 具有工艺条件温和、能耗低、环境友好、无需繁琐

的纯化木糖浆、工艺安全简单、产品质量更加安全可靠等优势。目前,张厚瑞等<sup>[1]</sup>已分离出一株能将底物木糖晶体转化为木糖醇接近理论极限值的菌株。直接以半纤维素水解液为底物发酵生产木糖醇的产率相对于传统加氢工艺较低,同时单批次发酵成本相对较高。因此微生物发酵生产木糖醇在实际应用过程中受到了限制,如何降低成本,提高产率仍然是其难点。

细胞固定化技术无疑是解决该难点的较好手段。细胞固定化技术是现代生物工程领域中的一项新兴技术,固定化方法主要分为吸附法、包埋法、结合法、交联法等<sup>[2]</sup>。固定化生长细胞具有密度高、反应快、抗污染能力强、可连续使用、产物分离方便等特点<sup>[3]</sup>。因此将固定化酵母细胞用于木糖醇生产具有重要的研究价值和经济意义。如陈红英等<sup>[4]</sup>通过ACA微囊化包埋固定化酵母细胞能较为高效地转化木糖醇。目前发酵生产木糖醇采用的细胞固定化技术主要有:海藻酸钠包埋法、沸石吸附法与聚乙烯醇(PVA)膜状载体固定化法。海藻酸钠包埋法传质扩散阻碍明显、机械强度差,不利于连续化发酵;沸石吸附法因内部空隙率低,不利于菌体的吸附和生长,载体机械强度高导致通气过程的相互摩擦,使菌体容易脱落破裂;聚乙烯醇膜状载体固定化工艺较为复杂,而且固定化的细胞无法有效抵抗水解液中抑制物毒害。基于克服上述缺点,本文首先提出了以聚氨酯泡沫为载体,固定热带假丝酵母细胞发酵玉米芯半纤维素水解液生产木糖醇的工艺,并对其进行了确立和优化,取得了较好的结果。旨在为提高连续转化半纤维素水解液发酵生产木糖醇的产率和效率,简化发酵生产工序,降低生产成本。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:**热带假丝酵母(*Candida tropicalis* As 2.1776)购于中科院微生物研究所。经诱变和驯化,筛选出一株优良的木糖醇生产菌株,命名为 *C. tropicalis* JY309。

**1.1.2 玉米芯半纤维素水解液的制备:**将产自于北京市郊区,半纤维素质量分数为37%的玉米芯粉碎至粒度为10~20目。玉米芯颗粒以1:10(W/V)的固液比与质量浓度1.2%硫酸混合,100°C~102°C下水解3h,

抽滤除去残渣得到玉米芯半纤维素水解液。水解液在50°C下真空浓缩6.0倍稀释至实验所需。浓缩水解液用石灰乳中和至pH 6.0,75°C保温0.5h后,过滤除去CaSO<sub>4</sub>沉淀后的滤液用于实验。经HPLC测定,过滤后的水解液中木糖含量为150.0 g/L,葡萄糖16.14 g/L,阿拉伯糖14.02 g/L,乙酸9.68 g/L,糠醛0.53 g/L。实验所用的发酵底物均为该方法处理后的水解液,由于此水解液未经过活性炭和离子交换树脂的处理,后简称未离交水解液。

**1.1.3 多孔聚氨酯泡沫:**购于北京恒跃兴泡沫厂。平均密度为0.02 g/cm<sup>3</sup>,空隙率为90%~95%,平均孔径为0.04 mm,尺寸为边长0.4 cm~0.5 cm的正方体聚氨酯泡沫小块,用蒸馏水洗净,浸泡24 h后与发酵培养基一同灭菌,备用。

**1.1.4 培养基:**菌种保藏固体培养基组成:未离交水解液150 mL/L,酵母膏15 g/L,琼脂粉20 g/L。液体种子培养基组成:未离交水解液80 mL/L,葡萄糖10 g/L,酵母膏15 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5 g/L。初始pH自然。发酵培养基组成:未离交水解液800 mL/L,酵母膏12 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.6 g/L, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4 g/L。初始pH为6.0。1 × 10<sup>5</sup> Pa灭菌30 min。

### 1.2 方法

**1.2.1 菌体量的测定:**以未接种的发酵培养液作为空白,测定菌液在550 nm处的吸光值,再通过该吸光值与细胞湿重之间经过校正的标准曲线计算出菌体湿重。

**1.2.2 聚氨酯固定化批次发酵操作方法:**将培养好的一定量的种子液加入到含有1 g聚氨酯泡沫的100 mL发酵培养基中进行第1批次的发酵,在一定的发酵条件下,将结束了的第1批次发酵液移去,保留其所有的聚氨酯泡沫的固定化部分(其中包含发酵液中40%左右的菌体,以及10%左右的发酵液),同时加入所需的新鲜发酵培养基进行第2批次的发酵。随后的批次发酵操作方法与之一致。

**1.2.3 半纤维素水解液及发酵液成分分析:**木糖醇、木糖、葡萄糖、阿拉伯糖的测定方法:发酵液离心后经0.45 μm滤膜过滤,采用HPLC分析,条件为Water Sugar Pak1 (300 mm×6.0 mm)新柱,以超纯水为流动相,流速0.55 mL/min,柱温80°C,

HITACHI公司L-7490 示差折光检测器。糠醛和四氢呋喃的测定方法: 水解液离心后经 0.45  $\mu\text{m}$ 滤膜过滤, 采用HPLC分析, 条件为: Dikma Inertsil  $\text{NH}_2$  10 nm (250 mm $\times$ 4.6 mm) 新柱, 吸收波长 280 nm, 流动相为乙腈:水=85:15(V/V), 流速 1.0 mL/min, 柱温 25 $^\circ\text{C}$ , HITACHI公司L-7300 紫外检测器。乙酸的测定方法: 同糠醛和四氢呋喃的HPLC分析条件, HITACHI公司L-7490 示差折光检测器。

## 2 结果与讨论

### 2.1 聚氨酯固定化发酵时接种量的考察

取斜面菌种一环, 接入液体种子培养基, 250 mL 摇瓶装液量为 40 mL, 于 30 $^\circ\text{C}$ 、摇床转速 200 r/min 下培养 22 h。最终细胞浓度约为 22 g/L(湿重), 用于发酵时接种所需。由图 1 可知, 当接种量大于 10% 时, 木糖醇产率随接种量的增大逐渐降低。原因是接种浓度过高, 菌体消耗将过多的底物和其它营养成分; 同时接种量过大, 发酵培养基被种子液稀释过多, 也会增加发酵成本。当接种量小于 7% 时, 木糖醇产率随接种量的减少急剧降低。原因是未离交水解液毒性较大, 对初始浓度较低的细胞有较大抑制作用, 导致细胞的生长和代谢存在较长的适应期和延滞期。此时随着接种量增加, 细胞重量及木糖醇产率迅速上升, 至接种量为 7% 时达到最高木

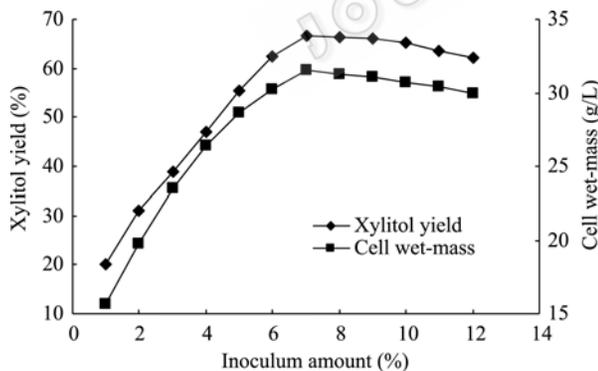


图 1 接种量对聚氨酯固定化发酵的影响

Fig. 1 Effect of inoculum amount on polyurethane foam immobilized fermentation

注: 图中所有细胞湿重的考察是未包括聚氨酯固定化的细胞重量, 在聚氨酯较优加入量及较优的发酵参数下, 发酵液所有细胞重量约增大至 1.6 倍。

Note: The data of cell wet-mass in all the figures were the lack of polyurethane foam additive's fermentation data. While performing optimal ferment parameters and quantity of polyurethane foam additive, the whole cell wet-mass increased to about 1.6-fold of the figures' data.

糖醇产率, 此时的细胞湿重为 33 g/L。

### 2.2 聚氨酯的添加量对固定化细胞发酵产木糖醇的影响

将优化得到较适物理条件的聚氨酯作为固定化载体, 按一定添加量加入到发酵培养基。由图 2 可知, 添加量为 1 g/100 mL 发酵液时, 木糖醇产率达到最高值。当聚氨酯加入量小于 0.8 g/100 mL 时, 无法对细胞起较好的固定化效果, 产率无法较好提高。当加入量大于 1.2 g/100 mL 时, 木糖醇的产率随聚氨酯量的增加下降明显。原因可能是聚氨酯占据的空间过大, 较多的聚氨酯堆积导致装液体积大幅上升, 由于空间阻碍作用, 各方面的传质及流通变缓, 发酵液中的溶氧水平和营养供应能力有所降低, 造成细胞的正常生长和生产木糖醇的能力受到了抑制。

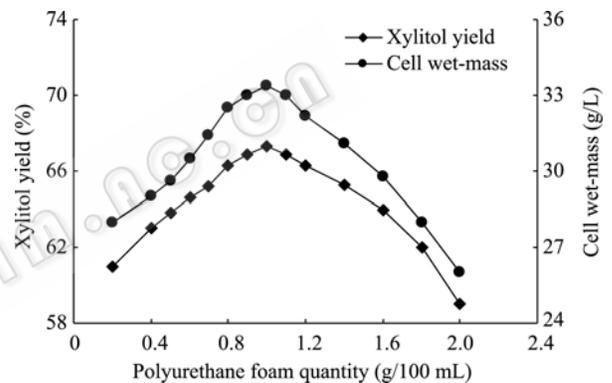


图 2 聚氨酯泡沫添加量对发酵的影响

Fig. 2 Effect of polyurethane foam quantity on immobilized fermentation

### 2.3 通气量对聚氨酯固定化发酵产木糖醇的影响

生物法制木糖醇是一个比较特殊的过程, 溶氧对酵母的生长代谢十分重要<sup>[5]</sup>。加入 7% 接种量的发酵培养基, 第 1 批次的发酵过程分为 2 个阶段。第 1 阶段的较高通气量, 使细胞快速生长并大量聚集固定于聚氨酯载体中, 有利于葡萄糖的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; 同时也利于乙酸等抑制物的消耗, 从而缩短发酵过程的延滞期。第 2 阶段的较低通气量, NADH 大量积累, 抑制了 XDH 的活性, 从而促进木糖醇积累<sup>[6,7]</sup>。由图 3 可知, 聚氨酯固定化发酵第一批次的装液量为 60 mL~70 mL/250 mL 较宜。转速和时间的调控为: 第 1 阶段(增殖期): 0~24 h, 转速为 180 r/min~200 r/min; 第 2 阶段(转醇期): 24 h~46 h, 转速为 120 r/min~140 r/min。

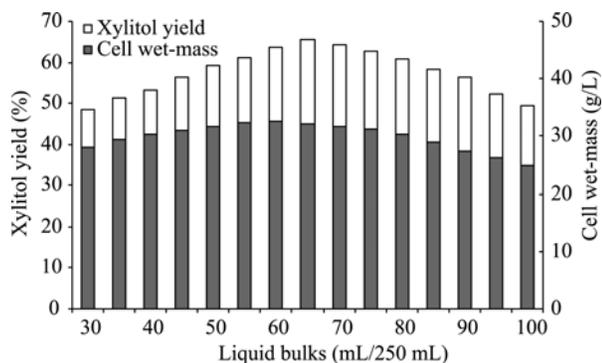


图3 聚氨酯固定化批次发酵第1批次装液体积的影响  
Fig. 3 Effects of liquid bulks of the first batch on batch-fermentation of polyurethane foam immobilized

由于固定化细胞在第1批次发酵过程中已得到增殖,在第2批次及以后的批次发酵中,细胞的浓度已满足发酵所需,无需在较高溶氧下消耗大量底物作为碳源用作细胞增殖,可直接进入微氧环境转化底物生成木糖醇,进一步提高产率<sup>[8]</sup>。由图4可知,聚氨酯固定化发酵第2批次及以后批次发酵的装液体积为80 mL/250 mL较宜,控制转速100 r/min~140 r/min,每批发酵42 h,细胞湿重维持在32 g/L左右,残糖在3 g/L以下,木糖醇产率较高。

#### 2.4 不同温度对聚氨酯固定化发酵产木糖醇的影响

温度是*C. tropicalis*的营养生长和木糖醇产物合成的重要条件<sup>[9]</sup>。由图5可知,28°C~32°C是聚氨酯固定化生产木糖醇较适宜的温度范围。30°C时,聚氨酯固定化发酵生产木糖醇的产率最高且残糖量

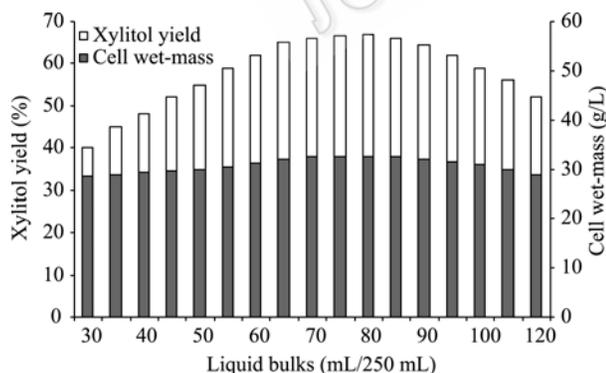


图4 聚氨酯固定化批次发酵第2批次及以后装液体积的影响  
Fig. 4 Effect of liquid bulks of the second and sith batches on batch-fermentation of polyurethane foam immobilized

注:图3,4所示的装液体积是在未加入聚氨酯载体时的装液量,加入上述优化的聚氨酯载体的添加量后,装液体积约增大至1.3倍。  
Note: The data of liquid bulks in Fig. 3 and Fig. 4 were the lack of polyurethane foam additive's fermentation data. While performing optimal quantity of polyurethane foam additive, the whole liquid bulk increased to about 1.3-fold of the Fig. 3 and Fig. 4's data.

最低。低于28°C或高于34°C时,木糖醇产率迅速降低,细胞湿重减少,残糖迅速升高。

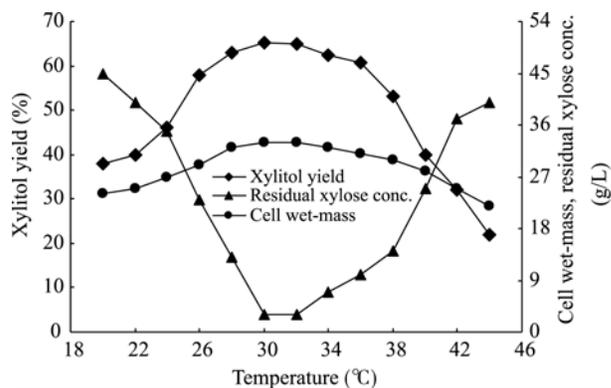


图5 聚氨酯固定化发酵培养中温度的影响  
Fig. 5 Effect of temperatures on polyurethane foam immobilized fermentation

2.5 不同初始pH对聚氨酯固定化发酵产木糖醇的影响

由图6可知,当初始pH值低于5.0,此时乙酸以未解离的状态存在<sup>[10]</sup>,明显抑制了酵母细胞的生长以及对木糖的利用和积累木糖醇的能力。提高发酵液的初始pH值至5.0~6.0,木糖醇得率和浓度随着pH值的上升而迅速提高,木糖醇得率在初始pH值为6.0达到最大。但继续升高pH值又不利于菌体的生长和木糖的转化,当初始pH值超过7.0时,出现明显的木糖醇产率降低,残糖量升高,细胞重量下降的现象。

2.6 聚氨酯固定化发酵玉米芯水解液产木糖醇的重复分批实验

在摇瓶批次发酵条件下,用聚氨酯固定化细胞转化玉米芯半纤维素水解液(未离交水解液初始木糖浓度的平均值为141.7 g/L),重复12批共21 d,每

最低。低于28°C或高于34°C时,木糖醇产率迅速降低,细胞湿重减少,残糖迅速升高。

在摇瓶批次发酵条件下,用聚氨酯固定化细胞转化玉米芯半纤维素水解液(未离交水解液初始木糖浓度的平均值为141.7 g/L),重复12批共21 d,每

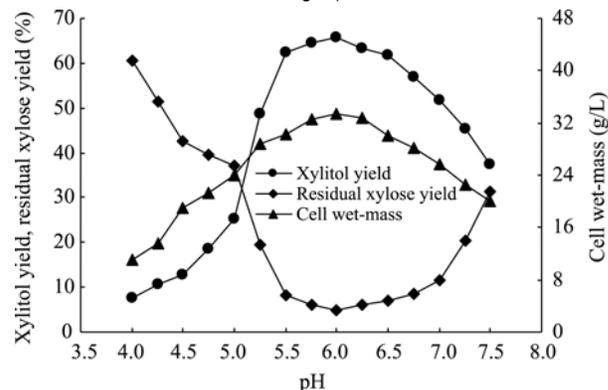


图6 聚氨酯固定化发酵培养中初始pH值的影响  
Fig. 6 Effect of initial pH value on polyurethane foam immobilized fermentation

表 1 固定化细胞重复批发酵玉米芯半纤维素水解液产木糖醇结果  
Table 1 Results of repeated batch-fermentation using polyurethane foam immobilized *C. tropicalis* cells

批次 Batches	初始木糖浓度(g/L) Initial xylose conc.	残留木糖浓度(g/L) Residual xylose conc.	木糖醇浓度(g/L) Xylitol conc.	体积生产速率(g/L·h) Volumetric productivity	木糖醇得率(%) Xylitol yield
1	132	3.6	91.0	2.05	68.6
2	135	4.1	92.8	2.07	68.8
3	140	3.2	96.5	2.04	68.9
4	143	3.1	97.8	1.98	68.3
5	145	3.6	98.7	1.95	68.1
6	142	3.2	95.9	1.89	68.4
7	146	3.5	98.3	1.86	67.5
8	142	3.0	96.1	1.85	67.7
9	144	3.8	96.6	1.86	67.1
10	140	3.6	94.9	1.84	66.4
11	143	4.8	92.8	1.78	65.8
12	142	5.2	94.0	1.79	65.5

批木糖醇产量平均值为 95.7 g/L, 木糖醇得率平均值为 67.6%, 木糖醇平均体积生产速率为 1.92 g/(L·h) (表 1)。与 Dominguez 等<sup>[11]</sup>结果相比, 这几项指标在目前同类研究中已达到较高水平。与此同时, 本研究所用的聚氨酯固定化细胞发酵玉米芯水解液生产木糖醇工艺使用的原料水解液不需脱色和离子交换处理, 即可高效生产木糖醇, 聚氨酯固定化生产木糖醇的发酵批次可达 12 批次, 木糖醇转化率保持在 65.5% 以上。原因是聚氨酯载体表面积大, 吸附性能好, 载体柔软可减少相互的机械摩擦<sup>[12]</sup>。而且聚氨酯载体能为细胞提供较好屏蔽外界毒素的发酵微环境, 使固定化细胞能较好的生长和代谢。因此采用聚氨酯细胞固定化发酵生产木糖醇工艺可大幅提高菌体对发酵抑制物的耐受力, 简化繁琐的水解液前处理工序, 并且发酵产酶的持续稳定性、细胞活力以及木糖醇发酵产率和效率都有所提高, 大幅降低了发酵成本。

### 3 结论

1) 聚氨酯固定化细胞发酵生产木糖醇提高了菌体对发酵抑制物的耐受力, 固定化细胞密度高, 发酵性能稳定, 发酵产率和体积生产速率都有所提高。水解液未经脱色与离子交换便可转化制木糖醇, 大幅降低了成本, 具有良好的应用前景。

2) 在摇瓶条件下采用分批发酵方式, 得到适宜的发酵工艺参数: 边长为 0.4 cm~0.5 cm 的正方体小

块, 平均密度为 0.02 g/cm<sup>3</sup>, 空隙率为 90%~95%, 平均孔径为 0.04 mm 的聚氨酯泡沫为载体。在其添加量为 1.0 g/100 mL, 接种量为 7%, 30°C, 初始 pH 6.0, 酵母膏 15 g/L 的条件下, 分段改变通气量, 对未经脱色与离子交换的水解液底物, 进行连续重复进行 12 批次, 21 d 的木糖醇发酵生产, 批次发酵中细胞的平均湿重为 33 g/L 左右, 木糖醇平均得率为 67.6%, 木糖醇平均体积生产速率为 1.92 g/(L·h)。

### 参 考 文 献

- [1] 张厚瑞, 赵肃清, 蔡爱华, 等. 一株热带假丝酵母木糖醇高产新菌株的筛选. 食品科学, 2007, 6: 193-197.
- [2] 曹亚莉, 田 沈, 赵 军, 等. 固定化微生物细胞技术在废水处理中的应用. 微生物学通报, 2003, 30(3): 77-81.
- [3] Carvalho W, Silva SS, Conerti A, *et al.* Use of immobilized *Candida* yeast cells for xylitol production from sugarcane bagasse hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, 982100: 489-496.
- [4] 陈红英, 王 铮, 潘帅路, 等. ACA 微囊化酵母细胞利用酒精水解液发酵木糖醇的初步研究. 食品与发酵工业, 2006, 3: 40-43.
- [5] Nolleau VL, Preziosi-Belloy JM, Navano. The reduction of xylose to xylitol by *Candida guilliermondii* and *Candida parapsilosis* incidence of oxygen and pH. *Biotechnol Lett*, 1995, 17: 417-422.
- [6] Poonam N, Dalel S. Production of xylitol-a sugar substi-

- tute. *Process Biochem*, 1995, **30**: 117–124.
- [7] 方祥年, 黄 炜, 夏黎明, 等. 假丝酵母发酵玉米芯半纤维素水解液生产木糖醇. *生物工程学报*, 2004, **20**(2): 295–298.
- [8] Roseiro JC, Peito MA, Girio FMT. The effects of the oxygen transfer coefficient and substrate concentration on the xylose fermentation by *Debaromyces hansenii*. *Arch Microbiol*, 1991, **156**: 484–490.
- [9] Converti A, Perego P, Dominguez J, et al. Effect of temperature on the microaerophilic metabolism of *Pachysolen tannophilus*. *Enzyme Micro Technol*, 2001, **28**: 339–345.
- [10] Morita TA, Silva SS, Felipe MGA. Effects of initial pH on biological synthesis of xylitol using xylose-rich hydrolysate. *Appl Biochem Biotechnol*, 2000, **84-86**: 751–759.
- [11] Dominguezj M, Cao NJ, Gong CS. Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast. *Biore Technol*, 1997, **61**: 85–90.
- [12] 朱俊晨, 翟迪升, 邓维恭, 等. 多孔聚氨酯固定化黑曲霉产 -葡萄糖苷酶条件的研究. *微生物学杂志*, 2004, **24**(3): 32–35.

## 稿件书写规范

### 专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。