

由莫格假丝酵母发酵法生产木糖醇的研究^{*}

陈宏文^① 方柏山^① 胡宗定^②

(① 华侨大学化工与生化工程系, 泉州 362011; ② 天津大学化工学院, 天津 300072)

摘要 考察由木糖生产木糖醇的分批发酵过程。实验结果表明, 初始木糖浓度、通气量及 pH 值对木糖醇发酵有较大影响。当 pH 值为 5 时, $56.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的木糖可得到 $31.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 木糖醇, 达到理论转化率的 61.6%。运用广义对数方程模拟发酵过程, 模拟值与实验值吻合较好; 同时, 利用动力学研究结果和木糖醇发酵机理, 对发酵影响因素进行分析。

关键词 木糖, 木糖醇, 过程模拟, 广义对数方程

分类号 TQ 923

木糖醇是一种五碳糖醇, 广泛用于国防、医药、化工、日化、涂料及食品等行业。目前, 国内外工业规模普遍采用化学法生产木糖醇^[1], 国外实验室规模发酵法生产木糖醇的研究已取得很大进展, 但国内报道还不多。发酵法生产木糖醇优点在于, 可简化木糖提纯工艺和对高温高压设备的要求, 节约能源、降低成本、提高木糖转化率等。本文研究木糖醇发酵的一些影响因素, 并用数学模型模拟发酵过程, 最后从木糖醇发酵动力学及其代谢机理的角度解释这些因素的影响结果。

1 材料和方法

1.1 菌种及试剂

莫格假丝酵母(*Candida Mogii* ATCC 18364, 美国; 4 条件下, 保存于马铃薯-琼脂斜面上); D-木糖(福建漳州糖厂); 木糖醇(美国 SOGMA 产品); 其它药品均为试剂级。

1.2 培养基

(1) 斜面培养基为马铃薯-琼脂培养基。(2) 种子培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 木糖 40, 葡萄糖 20, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 4, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, KH_2PO_4 4, MgSO_4 1, 酵母浸膏 6, 蛋白胨 6.5, pH 值为 5。(3) 发酵培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 5, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5, KH_2PO_4 10, MgSO_4 0.5, 酵母浸膏 10, 蛋白胨 4, CaCl_2 0.1 及含量不等的木糖。木糖与其它营养成分分开灭菌。

1.3 培养方法

(1) 种子培养。挑取保存在斜面上的菌种三环, 接到盛有 170 mL 种子培养基的三角瓶中, 于 30℃ 下摇床培养 48 h, 摇床转速为 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。所得菌体离心洗涤两次, 悬浮于 5 mL 无菌生理盐水中备用。

(2) 发酵. 将上述种子悬浮液接入装有一定量发酵培养基的三角瓶中, 于 30 ℃ 下摇床培养 122~168 h, 摇床转速为 200 r · min⁻¹.

1.4 分析方法

- 1.4.1 细胞含量的测定 采用干重法测定, 即隔时取 5 mL 发酵样品, 离心洗涤, 于 104 ℃ 烘干 24 h 至恒重. 上清液用于分析木糖、木糖醇含量.
- 1.4.2 木糖含量的测定 采用文献 [2] 的方法测定.
- 1.4.3 木糖醇含量的测定 采用文献 [6] 的方法测定.

2 结果与讨论

2.1 通气量对木糖醇发酵的影响

将不同体积的发酵培养基分别装入三角瓶中, 初始木糖浓度($C_{\text{木糖}}$)为 56.6 g · L⁻¹, pH 为 6, 结果见表 1. 由表 1 可知, 随着培养基体积(V)增加, 通气量减小, 木糖醇产量($C_{\text{木糖醇}}$)提高, 说明通气量对木糖醇发酵有影响. 这是由于木糖醇的积累取决于两步关键反应(图 1): 其一是借助 NADPH, 木糖还原酶将木糖还原为木糖醇; 其二是在 NAD⁺ 存在下, 木糖醇脱氢酶把木糖醇氧化为木酮糖. 半厌氧条件下, 胞内 NADPH, NADH 含量增加, 有利于木糖还原, 阻碍木糖醇氧化, 从而提高木糖醇产量.

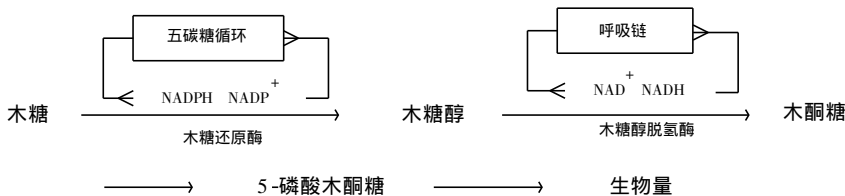


图1 木糖醇发酵机理

2.2 初始 pH 值对木糖醇发酵的影响

分别用 HCl 和 NaOH 调节发酵培养基的 pH 值, 初始木糖浓度($C_{\text{木糖}}$)为 56.6 g · L⁻¹, 培养基体积(V)均为 220 mL. 从表 2 可知, 初始 pH 值为 5 时, 木糖醇产量最高, 这是因为酸性条件有助于 NADPH, NADH 的积累, 从而提高木糖醇产量.

表 1 培养基体积对木糖醇发酵的影响

V/mL	30	60	100	150	220
$C_{\text{木糖醇}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	9.97	13.60	14.81	26.08	26.89

表 2 初始 pH 值对木糖醇发酵的影响

pH	4	5	6	7	8
$C_{\text{木糖醇}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	30.27	31.82	26.65	24.47	12.39

2.3 初始木糖浓度对木糖醇发酵的影响

在培养基体积(V)为 220 mL、初始 pH 值为 5 的条件下, 考察了不同初始木糖浓度的木糖醇发酵过程, 结果如图 2 所示. 从图 2 可知, 随着初始木糖浓度提高, 木糖醇产量也增加, 达到最大木糖醇浓度所需时间(t)也随初始木糖浓度增加而延长. 对于初始木糖浓度为 100.7 g · L⁻¹时(发酵终止), 剩余木糖浓度仍较高. 图 2(a), (b) 中, 当木糖快消耗完时, 木糖醇含量开始下降, 说明所积累的木糖醇可能继续被用于细胞生长和代谢. 图 2(c) 显示当木糖醇浓度开始下降时, 残余木糖浓度较高, 图中细胞含量表征为 $C_{\text{细}}$. 在高浓度初糖条件下, 发酵后期可能存在莫格假丝酵母竞争性利用木糖醇的情况, 这有待进一步探讨.

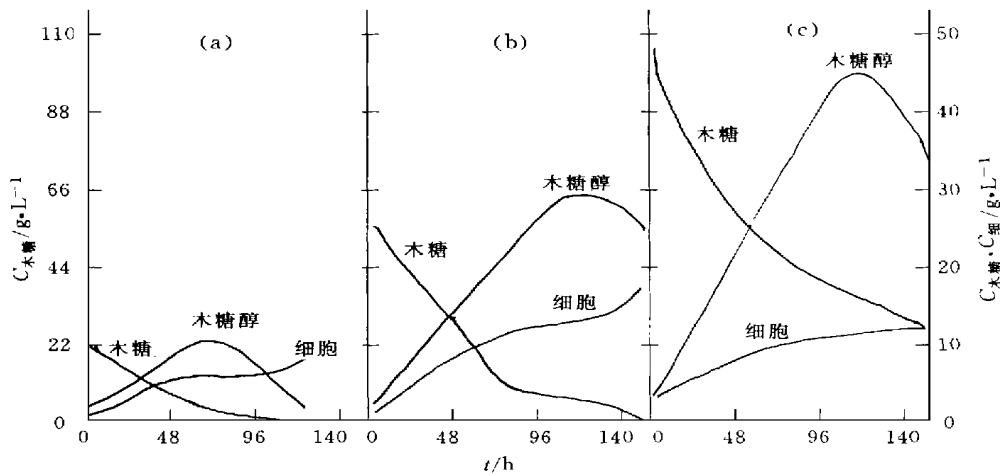


图 2 初糖浓度对木糖醇发酵的影响

我们运用 Edwards 提出的用于描述培养动力学数据的广义对数方程^[6,41], 即

$$y = \frac{K}{1 + \exp[F(t)]}, \tag{1}$$

$$F(t) = \sum_{n=0}^{\infty} a_n t^n, \tag{2}$$

式中 y 为时间变量, a_n 和 K 为参数, 对不同初糖浓度下的分批发酵数据用 FORTRAN 语言编程, 进行上机模拟. 所得结果如图 2 中的曲线所示, 表明计算值与实验值吻合较好. 由方程 (1), (2), 我们可进一步得到各变量的速率 dy/dt 和宏观得率, 即

$$\frac{dy}{dt} = y \left(\frac{y}{k} - 1 \right) \frac{dF(t)}{dt}, \tag{3}$$

$$\frac{dy_1}{dy_2} = \frac{y_1 \left(\frac{y_1}{k_1} - 1 \right) dF_1(t)}{y_2 \left(\frac{y_2}{k_2} - 1 \right) dF_2(t)}, \tag{4}$$

据此及上述所得的动力学模型, 我们可进一步得到最大微生物比生长速率 $\mu = dx/xdt$, 限制性底物比消耗速率 $q_s = ds/xdt$, 产物比生成速率 $q_p = dp/xdt$ 和微生物对底物的宏观得率 $Y_{x/s} = dx/ds$, $Y_{p/s} = -dp/ds$, 如表 3 所示.

表 3 不同木糖浓度对木糖醇发酵的影响

$C_{\text{木糖}}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	μ/h^{-1}	$Y_{x/s}/\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$Y_{p/s}/\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	$Y_s/\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	$Y_p/\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
24.4	0.068	0.497	0.653	0.167	0.047
56.6	0.055	0.267	0.707	0.205	0.082
100.7	0.026	0.233	0.633	0.274	0.066

由表 3 可知, 初始木糖浓度越高, 对细胞生长越可能产生抑制作用, 细胞生长对初始木糖浓度的改变较敏感, 这与文献 [6] 的发酵结果是一致的.

初始木糖浓度较低时, 木糖大部分用于菌体生长, $Y_{p/s}$, q_p 值较低; 在高浓度初糖条件下, 可能由于底物浓度抑制作用, $Y_{p/s}$, q_p 值也较低. 这说明在初始木糖浓度为 $56.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的附近, $Y_{p/s}$, q_p 可能存在一个最优值.

3 结束语

通过以上实验可得到优化培养条件, 即初始 pH 值为 5, 培养基体积为 220 mL, 可从 $56.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的木糖得到 $31.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的木糖醇, 达到理论转化率的 61.6%^[6]。研究结果同时表明, 广义对数方程可以较好地描述利用莫格假丝酵母进行的木糖醇分批发酵过程, 并方便地计算出 μ , $Y_{x/s}$, $Y_{p/s}$, q_p 等动力学参数值。

参 考 文 献

- 1 徐文玉. 木质纤维素酶解的方法. 华侨大学学报(自然科学版), 1991, 12(3): 269~274
- 2 Lise D, Ernest K C Y. A simple pentose assay for biomass nonversion studies. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1986, 24: 379~385
- 3 Song H B, Arnold L D. An improved colorimetric assay for polyols. Analytical Biochemistry, 1977, 81: 18~20
- 4 方柏山. 补料分批培养过程模拟. 生物工程学报, 1994, 10(3): 227~233
- 5 Chen L F, Gong C S. Fermentation of sugar cane bagasse hydrolysate-acclimatized yeast. J. Food Sci., 1985, 50: 226~228
- 6 Maria F S B, Maria B de M, Ismael M de M, et al. Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. J. Industrial Microbiology, 1988, 3: 241~251

Study on Xylitol Fermentation in *Candida Mogii*

Chen Hongwen^① Fang Baishan^① Hu Zongding^②

(^① Dept. of Chem. & Biochem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou;

^② Inst. of Chem. Eng., Tianjin Univ., 300072, Tianjin)

Abstract An investigation is made on bath fermentation of xylitol from xylose. As shown by experimental results, xylitol fermentation is influenced to a fairly great extent by initial xylose concentration, dissolved oxygen and pH value. Under the condition of pH 5 and proper dissolved oxygen, $31.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ xylitol can be obtained from $56.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ xylose and thus a theoretical conversion rate of 61.6% is obtained. The application of generalized logarithmic equation to process simulation of fermentation leads to a simulation value well coinciding to experimental value. The factors influencing fermentation are analysed by applying results from dynamic study and mechanism of xylitol fermentation.

Keywords xylose, xylitol, process simulation, generalized logarithmic equation