

土壤中产木糖醇酵母菌株的筛选其发酵条件优化

刘建军^{1,2}, 杨其义¹, 赵祥颖², 韩延雷², 张家祥², 杨丽萍²

(1. 山东轻工业学院食品与生物工程学院, 山东济南 250353)

(2. 山东食品发酵工业研究设计院, 山东济南 250013)

摘要: 本文以木糖为唯一碳源从土壤中筛选得到可以耐受高浓度木糖的菌株, 再经过复筛选出一株高产木糖醇的酵母菌株 Y-9。经高效液相色谱(HPLC)和红外扫描分析, 确定菌株 Y-9 发酵利用木糖转化得到的主要产物为木糖醇。通过单因素实验、正交试验等手段, 对菌株 Y-9 发酵产木糖醇的培养基组分和发酵条件进行了优化, 进一步提高了目的菌株的木糖醇产率和转化率, 确定了菌株 Y-9 摇瓶发酵木糖转化木糖醇的最优培养基和发酵条件。在木糖初始浓度为 200 g/L, 氮源为酵母膏 3.0 g/L, 硫酸铵 2.0 g/L, 玉米浆 10.0 mL/L, 硫酸镁 0.1 g/L, 初始 pH 为 6.0, 转速为 180 r/min, 接种量为 4% 的条件下, 菌株 Y-9 的木糖醇产率为 160 g/L 左右, 木糖醇生成速率为 1.67 g/L·h, 木糖/木糖醇转化率达到 80% 以上, 是一株具有良好工业化研究开发价值的木糖醇生产菌株。

关键字: 木糖; 木糖醇; 发酵; 条件优化

文章编号: 1673-9078(2013)1-1632-1637

Screening of Xylitol-producing Yeast Strains from Soil and Optimization of the Fermentation Conditions

LIU Jian-jun^{1,2}, YANG Qi-yi¹, ZHAO Xiang-ying², HAN Yan-lei², ZHANG Jia-xiang², YANG Li-ping²

(1. College of Food and Biological Engineering, Shandong Polytechnic University, Jinan 250353, China)

(2. Research and Design Institute of Food and Fermentation Industries of Shandong Province, Jinan 250013, China)

Abstract: A yeast strain Y-9 was isolated from soil samples, which could tolerate high concentrations of xylose. HPLC and infrared scanning analysis showed that the main product of the strain Y-9 was xylitol. To improve the xylitol production and conversion rate of strain Y-9, the medium compositions and cultural conditions were optimized by means of single factor experiment and orthogonal test. Under the optimal cultural conditions (initial xylose concentration 200 g/L, yeast extract 3 g/L, ammonium sulfate 2 g/L, corn steep liquor 10 mL/L, magnesium sulphate 0.2 g/L, initial pH 6, rotation speed 180 r/min and inoculum size 4%), The yield and producing rate of xylitol reached 160 g/L and 1.67 g/L·h, respectively. The conversion rate of xylose reached 80%.

Key words: xylose; xylitol; fermentation; condition optimization

木糖醇在自然界中广泛存在于许多水果、蔬菜中, 同时也是人体糖类代谢的一种中间代谢产物, 每天正常的新陈代谢产生 5~15 g 的木糖醇。木糖醇为白色结晶或结晶性粉末, 甜度与蔗糖相当, 易溶于水, 但吸湿性小, 无美拉德反应。口腔内多数的微生物不能利用, 因此木糖醇有防龋齿功效。木糖醇在人体内的吸收代谢不需要胰岛素的参与, 而且能促进胰岛素的分泌, 是糖尿病人理想的食品与治疗良药。木糖醇还具有多元醇的多种特性, 因此木糖醇被广泛应用于食品、医药工业, 另外, 在造纸、卷烟、牙膏、涂料等领域也有较好的应用潜力^[1-2]。目前, 木糖醇的工业化生产

主要通过木糖镍催化加氢还原制造, 成本高, 耗能大, 对环境污染也比较大。随着世界人口和环境压力的增加, 人们对环保和节约能源的意识加强, 以及人们对功能性食品的需求的增长, 微生物生产木糖醇可以作为更加经济实惠的一种替代方式。微生物发酵法生产木糖醇以其条件温和、操作简便、副产物少、环境污染低等优点已经引起人们的广泛关注。根据相关文献报道, 发现可以利用木糖转化为木糖醇的微生物中细菌很少、大部分是霉菌和酵母。其中研究最多的是酵母。细菌、霉菌中转化木糖为木糖醇能力普遍较差。据报道酵母转化木糖醇的能力最强, 前景最好。但是目前, 木糖/木糖醇转化率和木糖醇产率是限制微生物转化生产木糖醇规模化的关键因素。因此, 获得优良菌株、优化发酵工艺控制仍是生物转化木糖醇生产研究的重点。

收稿日期: 2013-02-28

基金项目: 山东省科技发展项目 (2011GSF11610)

作者简介: 刘建军(1962-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为微生物资源开发利用

本文以木糖为唯一碳源从土壤中筛选得到可以耐受高浓度木糖并且木糖醇转化率较高的酵母菌株 Y-9, 并对其发酵培养基组分和培养条件进行优化以提高木糖醇转化率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要设备

PSH-2C 精密型酸度计, 上海伟业仪器厂; 液相色谱仪, 戴安 U-3000; 722 可见分光光度计, 上海菁华科技仪器公司; TDL-5-A 台式离心机, 上海安亭科学仪器厂; JY2002 电子天平, 上海精密科学仪器有限公司。

1.1.2 培养基

富集培养基: 木糖 300 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L, NaCl 2 g/L; 平板筛选培养基: 木糖 100 g/L, 酵母膏 3 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, NaCl 2 g/L, 琼脂 20 g/L; 复筛培养基: 木糖 100 g/L, 酵母膏 5 g/L, 玉米浆 10 mL/L, $(NH_4)_2SO_4$ 2 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, NaCl 2 g/L, pH 自然;

种子培养基: 木糖 50 g/L, 酵母膏 5 g/L, $MgSO_4$ 1 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, NaCl 2 g/L; 发酵培养基: 同复筛培养基。所有培养基中的木糖均与其它成分分开灭菌。

1.1.3 土样来源

从山东各地树林、农田、草地中共采集土样 40 余份。

1.2 方法

1.2.1 菌种筛选

取土样 5 g, 加入到 50 mL 无菌水中, 振荡 10 min, 静置后取 5 mL 上清液接种到富集培养基中, 180 r/min 摇床培养 7 d。将富集后的培养液进行适当稀释, 涂布在平板筛选培养基上, 30 °C 培养 3~5 d, 挑取酵母状菌落转接到斜面。斜面在 30 °C 培养 2~3 d

斜面菌种培养成熟后, 转接到三角瓶复筛培养基, 于 30 °C, 180 r/min 摇床振荡培养 72 h, 离心。用纸层析检测挑选有木糖醇斑点的菌株并用 HPLC 检测发酵清液中的木糖残余量和木糖醇产量, 筛选木糖利用率高、木糖醇产量高的菌株。

1.2.2 生物量测定

将发酵液稀释 20 倍, 用可见分析光度计在 570 nm 波长下测定吸光度。

1.2.3 pH 值测定

利用 PSH-2C 精密型酸度计进行测定。

1.2.4 产物定性

将发酵液离心取上清液, 稀释 10 倍进行采用纸层析法进行产物的定性。

展开剂: V (正丁醇) : V (吡啶) : V (水) = 2:2:1。

显色剂: 硝酸银-氢氧化钠溶液

1.2.5 木糖、木糖醇定量分析

将发酵液离心取上清液, 稀释适当的倍数, 采用 HPLC 发酵液中的木糖、木糖醇浓度进行定量分析。

分析条件: 色谱柱 HYPERSIL 250 mm×4.6 mm×5 μm NH₂(大连依利特), 检测器 (RID, ShodexRI100), 柱温 60 °C, 检测温度 35 °C, 流动相为乙腈:水=80:20, 流速 0.5 mL/min, 进样量 25 μL。

1.2.6 产物鉴定

发酵结束后离心去菌体, 取上清液经活性炭脱色、浓缩、结晶、重结晶得到目标产物的样品, 然后用 VERTEX-70 傅里叶红外吸收光谱进行分析, 并与标准木糖醇样品图谱做比较。

2 结果与分析

2.1 产木糖醇菌株的筛选

经富集培养、平板初筛, 共挑取耐高浓度木糖的酵母菌株 260 株。经摇瓶发酵、纸层析检测, 共得到 60 株有木糖醇斑点的菌株, 经 HPLC 分析, 其中木糖/木糖醇转化率达 50% 以上的菌株有 24 株。通过多次摇瓶发酵复筛转化率稳定在 60% 左右的有 6 株, 结果见表 1。

表 1 木糖醇产生菌株复筛结果

Table 1 The screening results of strains for transforming xylose to xylitol

菌株编号	菌体浓度	木糖残余量/(g/L)	木糖醇产量/(g/L)	转化率/%
Y-9	0.97±0.25	0.20±0.11	63.06±0.76	63.36±0.20
Y-29	0.81±0.11	4.92±0.36	57.83±1.59	60.82±1.44
Y-55	0.93±0.13	2.1±3.40	58.44±0.86	59.85±0.81
Y-126	1.20±0.16	4.12±1.24	57.63±0.81	60.22±0.84
Y-151	0.93±0.12	3.20±1.43	57.87±0.64	60.13±0.93
Y-256	0.90±0.10	5.62±1.07	55.51±1.31	58.82±1.25

比较而言, 菌株 Y-9 的木糖利用率和木糖醇转化率都比较高, 初始木糖浓度为 100 g/L 时, 该菌株在 30 °C、180 r/min 培养 48 h 后, 木糖消耗完全, 木糖醇产率可达 63 g/L, 经过多次复筛实验中发现菌株 Y-9 和一些国内外研究报道的菌株比较, 木糖消耗速度和木糖醇转化率都具有一定的优势, 可以作为生物转化木糖醇的出发菌株, 作为下一步研究的对象。

2.2 菌株 Y-9 产物定性鉴定

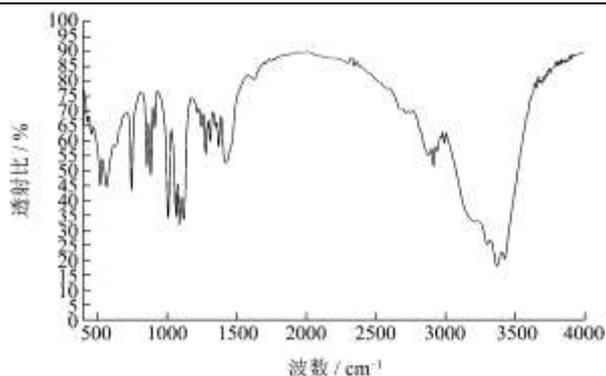


图1 发酵液结晶样品的红外光谱分析

Fig.1 The fermentation liquid crystalline analysed by the infrared scanning

发酵结束后收集菌株 Y-9 发酵液，离心去菌体，上清液经活性炭脱色、减压蒸发浓缩、降温结晶，晶体分离后再经重结晶精制，得到的结晶产物经红外光谱扫描，吸收谱图如图1，与木糖醇标准品红外吸收谱图（图2）比较，样品吸收峰与标准木糖醇吸收峰重叠性非常好，进一步确认了菌株 Y-9 转化木糖的产物为木糖醇。

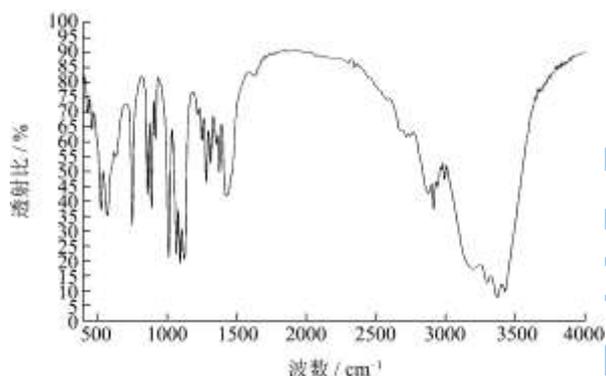


图2 木糖醇标准样的红外光谱分析

Fig.2 Xylitol standard samples analysed by the infrared scanning

2.3 菌株 Y-9 木糖醇发酵条件的优化

2.3.1 木糖初始浓度对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响

木糖醇发酵过程中，培养基中的木糖除用于转化生成木糖醇外，还要为菌体的生长和代谢提供碳源和能源，如果初始木糖浓度偏低，木糖用于细胞的生长比例就相对较高，木糖醇转化率相对较低，但如果初始木糖浓度过高，可能会抑制细胞的生长，从而导致发酵效率下降^[4]。本文考察了培养基中初始木糖浓度对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响，结果见表2。

由实验结果可以看出，初始木糖浓度低，木糖消耗速度快，但转化率偏低，随着木糖浓度的增加，转化率不断增加，但发酵速度也逐步降低，100 g/L 木糖发酵2 d 基本消耗完全，而木糖浓度为200 g/L 时，发

酵5 d 木糖仍有残留，当木糖浓度为250 g/L 时，木糖消耗速度更慢，同时转化率也出现下降的趋势。综合考虑发酵速度和转化率，200 g/L 初始木糖浓度，比较有利于菌株 Y-9 木糖醇发酵。另外，在实验中观察到菌株 Y-9 有利用木糖醇的现象，当培养基木糖耗尽后发酵液中木糖醇含量有降低的现象，所以发酵过程中要控制恰当的发酵周期，以获得最高的转化率。

表2 木糖初始浓度对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响

Table 2 Effect of the initial xylose concentration on the production of xylitol

木糖/(g/L)	发酵时间/d	木糖残余量/(g/L)	木糖醇产量/(g/L)	菌体浓度	转化率/%
50	1	10.73±2.08	21.05±2.42	0.98±0.19	53.64±5.77
	2	0	19.81±0.97	1.11±0.10	39.63±1.94
100	1	37.41±2.64	29.14±1.52	1.00±0.19	46.57±1.45
	2	2.39±2.64	59.40±1.66	0.98±0.12	60.85±0.15
	3	0	49.98±0.60	1.00±0.13	49.98±0.60
200	3	85.57±6.36	78.80±5.10	0.99±0.19	68.84±6.32
	4	34.40±3.10	110.63±1.51	0.93±0.10	66.81±0.55
	5	4.33±2.90	136.89±1.96	0.86±0.16	69.92±0.25
	6	0	131.47±3.56	0.87±0.12	65.73±1.78
250	3	140.34±5.18	68.63±4.39	0.65±0.13	62.55±1.37
	4	91.98±7.08	82.57±7.12	0.60±0.10	52.20±2.49
	5	75.64±4.92	94.99±3.28	0.61±0.09	54.49±1.71
	6	56.61±7.40	102.81±4.54	0.60±0.07	53.17±1.86

2.3.2 氮源对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响

文献报道，氮源种类和浓度是影响酵母木糖醇发酵的关键因素^[5]。常用氮源有硫酸铵、脲、酵母浸出物、蛋白胨等，但不同的菌株差异较大。本文在菌株筛选阶段采用的培养基氮源为酵母膏、玉米浆和硫酸铵的复合氮源，现选用几种常用的有机和无机氮源，考察他们单独或复合使用时对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响。单一氮源对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响见表3。

表3 氮源种类对木糖醇发酵的影响

Table 3 Effect of the nitrogen source on the production of xylitol

氮源	木糖/(g/L)	木糖醇/(g/L)	菌体浓度	转化率/%
酵母膏	90.08±3.76	46.28±6.36	1.24±0.13	42.00±4.33
蛋白胨	144.71±7.86	0	1.28±0.26	0
玉米浆	154.09±5.41	0	1.09±0.10	0
尿素	162.23±7.29	0	0.99±0.17	0
硫酸铵	109.69±10.07	39.08±3.51	0.88±0.12	43.35±1.17
酵母膏+玉米浆+硫酸铵	8.23±2.48	133.74±4.37	0.98±0.15	69.73±1.59

实验结果表明,氮源种类对菌株 Y-9 影响非常显著,单独使用酵母膏或硫酸铵为氮源时,菌株 Y-9 可以转化木糖生产木糖醇,以酵母膏为氮源,菌体生长优于硫酸铵,发酵速度相对较快,但与对照组相差比较大。而单独使用蛋白胨、脲、玉米浆为氮源时,菌体生长良好,但没有木糖醇产生。进一步研究发现如果玉米浆、蛋白胨与硫酸铵复合使用,菌株则能够转化木糖生成木糖醇(表4),酵母膏复合硫酸铵后,发酵速度明显变快,转化率也相应增加,说明菌株 Y-9 转化木糖生成木糖醇,硫酸铵的添加是必须的,这种现象其他菌株未见报道。另外,实验发现使用玉米浆代替部分酵母膏,对菌株 Y-9 发酵速度和木糖醇产率没有影响。

表4 复合氮源对木糖醇发酵的影响

Table 4 Effect of the Complex nitrogen source on the production of xylitol

氮源	木糖残余 (g/L)	木糖醇 (g/L)	菌体 浓度	转化率 /%
酵母膏+硫酸铵	11.18±2.68	136.84±3.34	1.03±0.14	72.47±0.88
玉米浆+硫酸铵	55.39±5.02	100.60±5.11	1.01±0.12	69.58±2.99
蛋白胨+硫酸铵	83.17±4.81	51.48±2.31	1.14±0.11	44.07±1.14
硫酸铵	86.08±3.62	53.28±2.27	0.96±0.16	44.84±3.44

2.3.3 金属离子对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响

金属离子是细胞生长和代谢不可或缺的营养因子,实验考查了在发酵培养基中添加不同的金属离子对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响,以不额外添加金属离子为对照,实验室结果见表5。

表5 金属离子对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响

Table 5 Effect of the metal ions on the production of xylitol

金属离子	菌体 浓度	木糖残余 (g/L)	木糖醇 (g/L)	转化率 /%
Cu ²⁺	0.75±0.07	116.38±3.83	30.66±2.37	36.63±1.31
Zn ²⁺	0.99±0.11	5.87±2.51	154.76±2.80	79.72±0.42
Mn ²⁺	0.81±0.12	8.03±1.36	151.04±2.86	78.67±0.95
Fe ²⁺	0.87±0.09	11.21±1.95	143.13±2.61	75.81±0.69
Ca ²⁺	0.83±0.10	5.57±2.02	143.32±2.77	73.71±0.68
Mg ²⁺	0.99±0.09	0.55±0.53	158.99±0.93	79.72±0.18
Na ⁺	0.81±0.10	0.67±0.58	126.61±3.45	63.52±1.75
对照	0.86±0.11	13.29±2.71	127.79±2.45	68.45±0.92

实验结果表明,培养基中添加 Cu²⁺对菌体的生长和木糖的消耗都有一定的抑制作用,添加钠盐对菌株木糖醇的发酵基本没有影响,实验用其他金属离子对菌株 Y-9 木糖醇的转化都有一定的促进作用,其中 Zn²⁺、Mn²⁺、Mg²⁺促进比较明显,综合价格和来源等因素考虑,选用镁盐比较合适。

2.3.4 培养基初始 pH 对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响

不同的 pH 对酵母生长代谢和产物形成有很大的影响。pH 过高或过低会影响酵母代谢过程中有关酶的活性。不同酵母转化木糖醇最适 pH 值不同,文献报道的酵母转化木糖产木糖醇最适 pH 范围约为 4.0~6.0^[6]。本文研究了发酵培养基不同初始 pH 值对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响,结果如图3。

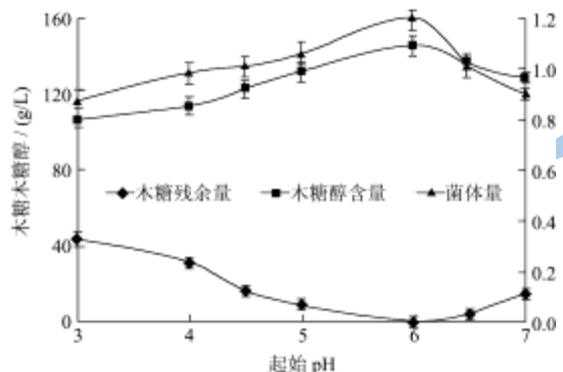


图3 培养基初始 pH 值对木糖醇发酵的影响

Fig.3 Effect of the initial pH on the production of xylitol

由图3可以看出,该菌株在 pH 值 3.0~7.0 范围内,都能够转化木糖生成木糖醇, pH 值 6.0 时结果最佳。从实验结果可以看出,发酵液中木糖的消耗和木糖醇的生成与菌体浓度呈正相关性,说明初始 pH 值主要通过影响菌体的生长从而影响了菌株木糖的转化。

2.3.5 接种量对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响

利用木糖转化生成木糖醇为一步酶反应,文献报道,适宜的接种量,一方面可以缩短菌体生长时间,另一方面可以减少发酵过程用于菌体生长的木糖消耗,提高木糖的转化率^[7]。本文考察了接种量对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响,结果如图4。

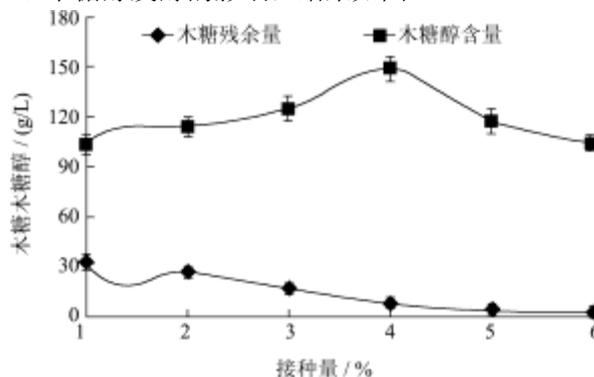


图4 接种量对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响

Fig.4 Effect of the inoculum size on the production of xylitol

研究发现接种量由 1% 增加到 4% 时,菌株 Y-9 木糖醇产率随着接种量的增加而增加,当接种量高于 4% 时,木糖醇产率开始降低,可能原因是接种量偏高,成熟菌体对木糖醇消耗的量也相应增加造成。

2.3.6 氧对菌株 Y-9 木糖醇发酵影响

文献报道溶氧是影响木糖/木糖醇转化率的关键因素^[8]。根据木糖醇产生的代谢途径分析,木糖是在木糖还原酶(XR)的催化下以 NADPH 为辅酶转化成木糖醇,不需要氧的参与,而生成的木糖醇会在木糖醇脱氢酶(XDH)的催化下继续氧化生成木酮糖,这一步是需氧反应,相关文献普遍认为微耗氧环境比较利于木糖醇的积累,同时,因为菌体的生长需氧量比较高,所以大家通常采用两段供氧发酵的方法来提高菌株木糖醇的产率:第一阶段提供充足的氧以满足菌体生长,第二阶段减少供氧量,在满足木糖转化的同时降低木糖醇的消耗。本文通过改变摇床转速考察了氧对菌株 Y-9 木糖醇发酵影响,结果见表 6。

表 6 转速对木糖醇发酵的影响

Table 6 Effect of shaker speed on the production of xylitol

转速 (r/min)	时间 /h	菌体 浓度	木糖残余 /(g/L)	木糖醇 /(g/L)	转化率 /%
100	24	0.10±0.03	189.20±2.86	4.98±1.53	45.81±2.08
	48	0.36±0.09	171.30±3.81	15.52±1.96	54.55±8.17
	72	0.66±0.11	126.52±3.74	39.97±1.46	54.42±0.79
	96	0.86±0.08	100.68±3.52	64.03±3.16	64.45±0.91
	120	0.98±0.13	58.77±1.51	107.28±2.91	75.95±1.25
140	24	0.16±0.02	181.58±3.60	6.90±1.57	37.33±3.45
	48	0.58±0.11	160.27±4.30	23.90±3.50	59.99±2.48
	72	0.86±0.14	110.06±3.57	54.46±3.54	60.52±1.89
	96	0.91±0.11	90.16±3.69	65.09±3.44	59.24±1.36
	120	0.92±0.14	41.45±3.80	124.90±3.03	78.78±0.03
180	24	0.26±0.05	171.44±3.60	13.04±2.64	45.34±4.11
	48	0.67±0.11	140.75±5.40	35.21±6.56	59.08±5.73
	72	0.95±0.08	84.98±4.07	86.01±1.10	74.82±1.82
	96	0.97±0.11	39.70±4.80	129.28±2.25	80.67±1.04
	120	0.98±0.12	1.30±0.88	159.65±1.33	80.34±0.51
200	24	0.29±0.04	168.08±2.15	18.66±1.53	58.43±1.51
	48	0.86±0.12	122.99±2.52	56.44±3.34	73.24±2.03
	72	0.98±0.14	62.30±2.70	110.63±2.20	80.36±2.13
	96	0.99±0.09	15.76±1.41	137.00±1.04	74.36±0.05
	120	1.13±0.14	0	132.41±1.19	66.20±0.59

从实验结果可以看出,随着摇床转速增加,菌体生长速度和木糖消耗速度都相应加快,木糖/木糖醇转化率呈现先增加后下降的趋势,转速 200 r/min 与 180 r/min 相比,木糖消耗速度进一步增加,但最终转化率和木糖醇产率下降明显,说明菌株 Y-9 在供氧增加条件下,菌株自身消耗木糖醇的量确实有所增加。另外,实验也考察两段供氧发酵对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响。初始转速设定为 200 r/min,然后不同培养阶

段调整转速到 140 r/min,结果见表 7。

表 7 转速切换对菌株 Y-9 木糖醇发酵的影响

Table 7 Effect of Switching shaker speed on the production of xylitol

转速切 换时间/h	菌体 浓度	木糖残余 /(g/L)	木糖醇 /(g/L)	转化率 /%
24	0.95±0.12	27.02±1.78	135.67±0.91	78.43±0.74
48	0.93±0.09	13.33±0.90	146.32±0.51	78.38±0.53
72	0.97±0.04	2.55±1.09	157.30±0.28	79.66±0.31
96	0.98±0.10	0	151.36±2.07	75.68±1.03
转速不变	0.99±0.09	0	136.88±1.00	68.44±0.50

实验结果表明,高转速培养时间越长发酵速度越快,高转速培养 72 h 时切换成低转速发酵结果最好。高转速培养时间短,木糖消耗速度变慢,但木糖/木糖醇转化率并没有增加,高转速培养时间再延长,木糖消耗速度继续增加,但最终产率和转化率都相应下降。结合表 6 的实验结果分析,菌株 Y-9 采用两段发酵其木糖醇产率和转化率与固定 180 r/min 的发酵结果相当,并没有明显提高。因此,有关两段供氧对菌株 Y-9 木糖醇的发酵的影响需要通过配有溶氧电极的发酵罐进行进一步研究探讨。

2.3.7 设计正交试验确定最佳发酵条件

表 8 正交试验直观分析表

Table 8 The intuitive analysis of the orthogonal experiment

试验号	A	B	C	D	E	木糖醇/(g/L)
1	180	1	8	1	0.1	128.10
2	180	2	10	2	0.2	137.39
3	180	3	12	3	0.3	136.46
4	180	4	14	4	0.4	133.52
5	200	1	10	3	0.4	158.12
6	200	2	8	4	0.3	153.60
7	200	3	14	1	0.2	150.39
8	200	4	12	2	0.1	158.90
9	220	1	12	4	0.2	153.19
10	220	2	14	3	0.1	150.20
11	220	3	8	2	0.4	151.61
12	220	4	10	1	0.3	148.32
13	240	1	14	2	0.3	104.19
14	240	2	12	1	0.4	100.00
15	240	3	10	4	0.1	107.91
16	240	4	8	3	0.2	103.89
K ₁	133.87	135.90	134.30	131.70	136.28	
K ₂	155.25	135.30	137.94	138.02	136.22	
K ₃	150.83	136.59	137.14	137.17	135.64	
K ₄	104.00	136.16	134.58	137.06	135.81	
极差 R	51.25	1.30	3.64	6.32	0.64	
主次次序			A>D>C>B>E			
优水平	A ₂	B ₃	C ₂	D ₂	E ₁	
最优组合			A ₂ B ₃ C ₂ D ₂ E ₁			

注: A-木糖/(g/L); B-酵母膏/(g/L); C-玉米浆/(mL/L); D-硫酸铵/(g/L); E-硫酸镁/(g/L)。

在单因素实验基础上,对培养基组分影响较大的因素(木糖初始浓度、酵母膏、玉米浆、硫酸铵、硫酸镁)进行通过正交试验 $L_{16}(4^5)$ 优化。结果与分析见表 8。

由表 8 中 R 值可以看出,对菌株木糖发酵基影响的大小依次为木糖浓度>硫酸铵>玉米浆>酵母膏>硫酸镁。木糖初始浓度对发酵最大,菌株转化木糖醇条件的最优组合是 $A_2B_3C_2D_2E_2$,即木糖浓度 200 g/L、硫酸铵 2 g/L 玉米浆 10 mL,酵母膏 3 g/L,硫酸镁 0.1 g/L,与单因素实验的影响基本相同。

2.3.8 菌株 Y-9 木糖醇发酵进程

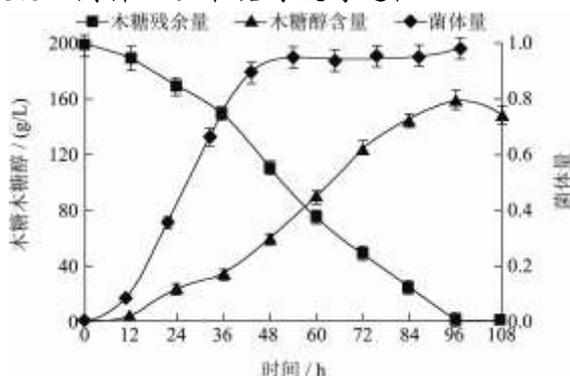


图 5 菌株 Y-9 木糖醇发酵进程

Fig.5 The fermentation process of Strain Y-9 on the production of xylitol

图 5 为条件优化后的菌株 Y-9 木糖醇发酵进程。通过条件优化,菌体 Y-9 木糖醇发酵木糖初始浓度由 100 g/L 提高到 200 g/L,木糖/木糖醇转化率由 60% 提高至 80% 以上,木糖醇产率达到最高值 160 g/L 以上。

3 结论

本文从天然样品中筛选得到一株可以耐受高浓度木糖的酵母菌株 Y-9,经 HPLC 和红外扫描分析,菌株 Y-9 转化木糖的主要产物为木糖醇。然后对菌株 Y-9 的木糖醇发酵培养基和培养条件又进行了优化。研究表明,菌株的木糖/木糖醇转化率会随着培养基中初始木糖浓度的提高而增加,但初始木糖浓度过高会抑制菌体的生长,从而降低其发酵速率;氮源研究表明,硫酸铵对菌株木糖醇转化至关重要,有机氮源中辅助硫酸铵可以显著提高木糖的转化速率;培养基中添加少量的 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 等金属离子,可以提高菌株 Y-9 木糖醇的转化效率;发酵培养基初始 pH 主要通过影响菌体的生长而影响其木糖醇的转化;适当的接种量有助于获得较高的木糖醇转化率;氧的供给对菌株生长和木糖醇转化影响明显,低氧供给,菌体生长受

到抑制,木糖消耗速度偏低,高氧供给,菌体生长、木糖消耗速度加快,但同时木糖醇的再消耗也增加,致使最终木糖醇产率降低。通过条件优化,菌株 Y-9 木糖醇发酵初始木糖浓度可提高至 200 g/L,其木糖/木糖醇转化率提升至 80%,发酵周期 96 h 左右,与文献报道相比,菌株 Y-9 的木糖消耗速度、木糖醇产率和转化率都达到先进水平,是一株具有工业化开发价值的木糖醇生产菌株。

参考文献

- [1] 方祥年,黄炜,夏黎明.半纤维素水解液中抑制物对发酵生产木糖醇的影响[J].浙江大学学报,2005,4:547-551
Fang Xiang nian, Huang Wei, Xia Li ming. Effects of inhibitors in hemicellulosic hydrolysate on xylitol production [J]. Journal of Zhejiang University (Engineering Science), 2005, 4: 547-551
- [2] 靳冠娴,梁广川,王娜,等.从低木糖醇含量母液中提取晶体木糖醇的实验研究[J].食品科技,2008,6:113-114
Jin Guan xian, Liang Guang chuan, Wang Na, et al. Study on xylitol crystallizing from low purity xylitol mother liquid [J]. Food science and Technology, 2008, 6:113-114
- [3] 董丽辉,周晓云,张朝晖.生物转化生产木糖醇研究进展[J].科技通报,2004,20(1):37-41
Dong Li hui, Zhou Xiao yun, Zhang Zhao hui. Research Progress on Bioconversion of Xylitol [J]. Bulletin of Science and Technology, 2004, 20(1): 37-41
- [4] 徐俊,郑建仙,葛亚中.木糖醇生发酵法生产[J].中国食品添加剂,2003,5:44-49
Xu Jun, Zhen Jian xian, Ge Ya zhong. Fermentative Production of Xylitol [J]. China Food Additives, 2003, 5: 44-49 (in chinese)
- [5] Jose M. Dominguez Cheng S. Production of Xylitol from D-Xylose by *Debaryomyces hansenii* [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 1997: 117-127
- [6] Wallther T, THensirisak D, Agblevor A. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by *Candida tropicalis* [J], bioresour. Technol, 2001, 76: 213-220
- [7] 赵寿经,侯琨,梁彦龙,等.产木糖醇菌株的筛选及发酵条件优化[J].吉林大学学报(工学版),2005,5:868-872
Zhao Shou jing, Hou Kun, Liang Yan long, et al. Screening of Xylitol Producing Strain and Optimization of its Fermentation Conditions [J]. Journal of Jilin University (Engineering and Technology Edition), 2005(5): 868-872
- [8] Walther T, Hensirisak P, Agbevor FA. The influence of aeration and hemicellulosic sugars on xylitol production by

- Candida tropicalis* [J]. Bioresource Technology, 2001, 76: 213-220
- [9] R S Prakasham, R Sreenivas Rao, P J Hobbs. Current trends in biotechnology production of xylitol and future prospects [J]. Curr. Trends Biotechnol. Pharm., 2009, 3: 8-36
- [10] 刘森,杨涛,崔薇薇.尖孢镰刀菌发酵生产木糖醇的工艺研究[J].现代食品科技,2008,24(4):247-248
Liu Sen, Yang Tao, Cui wei wei. Study on the Xylitol Production via [J]. Fermentation by *Fusarium Xysporum*[J] Modern Food Science and Technology, 2008, 24(4): 247-248
- [11] R F Branco, J C Santos, L Y Murakami, et al. Xylitol production in a bubble column bioreactor: influence of the aeration and immobilized system concentration [J]. Proc. Biochem., 2007, 42: 258-262
- [12] 张凌燕,张梁,王正祥等.一株高效利用木糖的酵母菌的分离及鉴定[J].生物加工过程,2008,6(4):56-60
Zhang Ling yan, Zhang Liang, Wang Zheng xiang, et al. Isolation and identification of one yeast strain with high xylose-utilizing efficiency[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2008, 6(4): 56-60
- [13] Izumori K, Tuzaki K. Production of xylitol from D-xylulose by *Mycobacterium smegmatis* [J]. J Ferment Technol, 1988, 66(1): 33-36
- [14] Nakano K, Katsu R, Tada K, et al. Production of highly concentrated xylitol by *Candida magnoliae* under a microaerobic condition maintained by simple fuzzy control[J]. J Biosci Bioengin, 2000, 89(4): 372-376