

# 生物脱毒改善蔗渣水解物木糖醇发酵性能的研究\*

覃香香, 周玉恒, 陈海珊\*\*, 蔡爱华, 王磊, 张厚瑞

(广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西木质纤维素生物炼制技术工程研究中心, 广西植物功能物质研究与利用重点实验室, 广西桂林 541006)

**摘要:**为提高热带假丝酵母 *Candida tropicalis* 1-18 代谢产物木糖醇的产量, 本研究以蔗渣半纤维素稀酸水解物作为研究材料, 以生物脱毒菌株东方伊萨酵母 *Issatchenkia orientalis* S-7 细胞干重、水解物在 280 nm 处紫外吸收物含量、木糖醇产量作为评价指标, 考察尿素、pH 值、脱毒时间、预浓缩比例和细胞循环利用等 5 个因素对蔗渣半纤维素稀酸水解物木糖醇发酵性能的影响。结果表明, 蔗渣半纤维素稀酸水解物采用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节 pH 值为 5, 预浓缩至 1/2 体积, 添加  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  尿素, 东方伊萨酵母 S-7 生物脱毒 40 h, 脱毒后水解物预浓缩至木糖浓度为  $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 热带假丝酵母 1-18 发酵的木糖醇产量最高, 达  $134.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 比对照组高出  $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 循环利用细胞进行生物脱毒, 脱毒时间缩短 13 h; 循环利用热带假丝酵母 1-18 对生物脱毒水解物进行产醇发酵, 木糖醇产量达  $163.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 生成速率为  $5.85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , 比第一代发酵 ( $1.95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) 提高 2 倍。生物脱毒是改善木质纤维稀酸水解物木糖醇发酵性能的有效手段。

**关键词:** 东方伊萨酵母 蔗渣 半纤维素水解物 生物脱毒 木糖醇发酵

中图分类号: Q939.9 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2020)03-0344-08

DOI: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20201027.014

## 0 引言

甘蔗渣由纤维素、半纤维素和木质素组成, 所占比例依次约为 45%, 26% 和 23%。目前蔗渣这一丰富资源主要用于造纸, 现有的蔗渣制浆造纸技术仅能利用其中的纤维素, 因此需要预处理去除蔗渣中的半纤维素和木质素。而蔗渣预处理过程会产生大量难处理的黑液废水, 对环境造成重大污染, 制约着企业

的发展。蔗渣是广西资源丰富且集中的生物炼制原料, 如能实现蔗渣资源的价值最大化, 则有助于制糖企业的有效升级。

木糖醇是一种五碳糖醇, 在食品、医药和化工等领域具有广泛应用。酵母发酵半纤维素水解物生产功能性甜味剂木糖醇<sup>[1,2]</sup>, 是有效利用半纤维素资源生产高附加值产品的重要途径。20 世纪 70 年代工业上即开始使用生物合成法生产木糖醇, 该方法具有

\* 广西植物功能物质研究与利用重点实验室主任基金项目(ZRJJ2016-18), 广西植物研究所基本业务费项目(桂植业 18012), 广西自然科学基金项目(2018GXNSFAA050093)和广西科技重大专项(桂科 AA18118044)资助。

### 【作者简介】

覃香香(1980—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事木质纤维功能多糖的制备及生理活性研究, E-mail: qinx2008@163.com。

### 【\*\*通信作者】

陈海珊(1970—), 男, 副研究员, 主要从事木质纤维生物炼制制备功能糖的开发研究, E-mail: 376839158@qq.com。

### 【引用本文】

覃香香, 周玉恒, 陈海珊, 等. 生物脱毒改善蔗渣水解物木糖醇发酵性能的研究[J]. 广西科学院学报, 2020, 36(3): 344-351.

QIN X X, ZHOU Y H, CHEN H S, et al. Study on Biodetoxification to Improve the Fermentation Performance of Bagasse Hydrolysate Xylitol [J]. Journal of Guangxi Academy of Sciences, 2020, 36(3): 344-351.

环境污染小、反应条件温和、反应底物糖浆不需纯品等优点。蔗渣中的木糖含量约为 24%, 将含多缩戊糖的蔗渣经稀酸水解后获得木糖水解物, 利用微生物可将水解物中的木糖直接转化为木糖醇<sup>[3]</sup>。

稀酸目前仍然是制备半纤维素水解物最重要的催化剂, 但在稀酸水解过程会生成一系列的微生物代谢抑制物<sup>[4,5]</sup>, 这些抑制物不但会抑制细胞生长, 而且还是产醇效率限速因子。要使木糖醇发酵工艺具备商业竞争力, 必须去除半纤维素水解物中的抑制物, 改善发酵性能。半纤维素水解物中的酵母代谢抑制物主要包括小分子酸(如甲酸、乙酸、阿魏酸等)、呋喃衍生物(如糠醛、5-羟甲基糠醛等)、酚类(如香草醛、愈创木酚等)<sup>[4-13]</sup>。理化脱毒是改善水解物木糖醇发酵性能的方法之一。张厚瑞等<sup>[3]</sup>在 pH 值为 2 的条件下, 使用大孔树脂对蔗渣稀硫酸水解物进行处理, 处理后的水解物木糖浓度为  $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 酵母菌株 *Candida tropicalis* AS2.1776 发酵 110 h 后耗完基质中的木糖, 生成木糖醇  $127 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 产物转化率为 0.64(木糖醇 g/木糖 g), 产物生成速率为  $1.15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。虽然通过理化方法可去除这些有毒物质, 但是理化方法普遍存在产生新的污染物的缺点, 如吸附抑制物的大孔树脂需要使用酸或碱再生, 会产生酸碱废水等。另外, 单一的理化方法并不能有效去除化学性质不同的抑制物, 而同时结合多种理化方法进行水解物脱毒又会产生过高的成本, 降低木糖醇发酵工艺的优势。蔗渣半纤维素稀酸水解物生物脱毒, 是利用特定活性的微生物选择性降解去除蔗渣半纤维素稀酸水解物中的抑制物, 保留其中主要木糖类物质的脱毒方法, 因简捷、环保, 该方法已经引起学者的普遍关注。笔者<sup>[13]</sup>曾报道筛选出木质纤维水解物生物脱毒活性微生物东方伊萨酵母 *Issatchenkia orientalis* S-7, 对三大代表性毒物——醋酸、糠醛及酚类化合物均具有降解活性, 该菌株对含有三大代表性毒物的木糖糖液进行脱毒后, 与对照组比较, 其木糖醇发酵性能显著改善。

蔗渣半纤维素稀酸水解物中单一代谢抑制物组分毒性并不高, 但组合于水解物中可显著抑制生物脱毒微生物和木糖醇发酵微生物的生长。糠醛、羟甲基糠醛及酚类抑制物的最大吸收波长均位于 280 nm 附近<sup>[12]</sup>, 对比测定东方伊萨酵母 S-7 生物脱毒前后的水解物在 280 nm 处的吸光值, 以及脱毒水解物的木糖醇发酵性能, 根据这些指标的变化即可评价生物脱毒过程这些抑制物的降解情况。因此, 本文以细胞

干重、紫外吸收光谱特征和木糖醇的产量为指标, 系统研究不同条件下利用东方伊萨酵母 S-7 脱毒后蔗渣半纤维素稀酸水解物的产醇性能变化规律, 为蔗渣资源生物定向高值化利用和制糖企业产业升级提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与试剂

所用菌株均为本实验室筛选, 并保藏于中国典型培养物保藏中心, 包括用于生物脱毒的东方伊萨酵母 S-7 (*Issatchenkia orientalis*, CCTCC NO: M 206098) 以及用于木糖醇发酵的热带假丝酵母 1-18 (*Candida tropicalis*, CCTCC NO: M 205067)。实验菌株用普通麦芽汁培养基斜面 4℃ 保存。

实验所用试剂、糖类购自中国上海国药化学试剂公司, 分析纯; L-550 型离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司生产; T6 型紫外可见分光光度计, 北京普析通用仪器有限责任公司生产。

### 1.2 蔗渣半纤维素稀酸水解物的制备

参照文献<sup>[3]</sup>的方法对甘蔗渣进行水解。稀硫酸(浓度为  $2.4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ): 甘蔗渣 = 6.2, 两者混合浸泡 12 h, 在蒸汽压力  $2.5 \times 10^4 \text{ Pa}$  的条件下水解 2.5 h, 离心过滤去除残渣。液体部分用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  溶液中, 调整 pH 值为 3.0, 然后于 85℃ 水浴保温 30 min, 离心过滤去除  $\text{CaSO}_4$  沉淀, 澄清液即为蔗渣半纤维素水解物。

### 1.3 培养方法

#### 1.3.1 种子培养

种子培养基: 葡萄糖  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 酵母膏  $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 自然 pH 值, 121℃ 灭菌 20 min。250 mL 三角瓶装入种子培养基 50 mL, 接入一环菌种, 30℃、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  条件下培养 15 h。

#### 1.3.2 细胞干重曲线

种子液转入木糖醇发酵培养基或蔗渣半纤维素脱毒培养基, 待发酵或脱毒结束。取 100 mL 发酵液,  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 去上清液。沉淀用无菌去离子水洗 3 次后, 添加 20 mL 无菌去离子水, 混匀, 依次取 1, 2, 3, 4, 5 mL 加水定容至 11 mL; 然后分别取 1 mL 稀释 100 倍, 利用比浊法, 使用紫外可见分光光度计于 600 nm 处测定吸光值  $OD_{600}$ 。剩余的 10 mL 菌液于  $4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 10 min, 弃上清液, 沉淀菌体于 100℃ 烘箱中干燥至恒重。以菌

体干重为横坐标,吸光值  $OD_{600}$  为纵坐标,绘出细胞干重标准曲线。其中,热带假丝酵母 1-18 细胞干重标准曲线为  $Y=X/0.017$ ,东方伊萨酵母 S-7 细胞干重标准曲线为  $Y=X/0.013$ ,发酵样品则根据测定的  $OD_{600}$  代入标准曲线计算细胞干重。

### 1.3.3 木糖醇发酵

木糖醇发酵培养基:经生物脱毒的蔗渣半纤维素稀酸水解物,在  $70^{\circ}\text{C}$  减压条件下真空浓缩至木糖  $170\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  (或者  $220\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),离心除去浓缩过程生成的沉淀。使用前经  $80^{\circ}\text{C}$  灭菌 30 min,加入已灭菌的尿素  $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,酵母膏  $5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,补充适量水将培养基木糖稀释至要求浓度。

培养条件:500 mL 三角瓶装脱毒水解物 100 mL,接入热带假丝酵母 1-18 种子液 10 mL,  $30^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  摇床发酵 60 h。如果重复利用细胞发酵,则在木糖醇发酵结束后离心分离出热带假丝酵母细胞,并投入到下一批新鲜的浓缩水解物脱毒液中,继续下一轮木糖醇发酵。

### 1.3.4 蔗渣半纤维素稀酸水解物生物脱毒条件优化

#### 1.3.4.1 尿素用量对生物脱毒微生物细胞生长的影响

按照 1.2 节方法制备蔗渣半纤维素稀酸水解物,用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  调节至 pH 值为 6.0,  $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下离心 10 min,保留上清液。取上清液 100 mL,  $80^{\circ}\text{C}$  灭菌 30 min,添加  $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  尿素溶液 ( $121^{\circ}\text{C}$  灭菌 15 min) 至发酵液中,使其尿素含量分别为 0.0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,补充灭菌的去离子水至 110 mL,接入东方伊萨酵母 S-7 种子液 10 mL,  $30^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  脱毒发酵 24 h,使用分光光度比浊法测定细胞密度,根据 1.3.2 节的细胞干重标准曲线计算细胞干重。

#### 1.3.4.2 初始 pH 对生物脱毒水解物产醇性能的影响

按照 1.2 节方法制备蔗渣半纤维素稀酸水解物,用  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  分别调节初始 pH 值为 4, 5, 6, 7, 于  $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  条件下离心 10 min,留上清液备用。取上清液 100 mL,  $80^{\circ}\text{C}$  灭菌 30 min,添加尿素(按照 1.3.4.1 节最优用量),接入东方伊萨酵母 S-7 种子液 10 mL,  $30^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  脱毒发酵 60 h。脱毒结束,  $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,取上清液,将上清液浓缩至木糖浓度  $150\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,然后进行木糖醇发酵,发酵过程按照 1.3.3 节操作步骤进行。根据发酵效果,以筛选获得的最优 pH 条件进行后续试验。

#### 1.3.4.3 浓缩比例对东方伊萨酵母 S-7 细胞生长的影响

在 1.3.4.2 节优化 pH 条件下,将蔗渣半纤维素稀酸水解物真空浓缩不同比例之后,分别接种东方伊萨酵母 S-7,进行生物脱毒发酵,发酵 60 h,取 1 mL 发酵液用去离子水定容至 100 mL 混匀后于 600 nm 处测定吸光值,按照 1.3.2 节的细胞干重标准曲线计算细胞干重。

#### 1.3.4.4 生物脱毒时间对蔗渣半纤维素稀酸水解物产醇性能的影响

在 1.3.4.3 节优化浓缩比例条件下进行蔗渣半纤维素稀酸水解物生物脱毒,500 mL 三角瓶装量蔗渣水解物 100 mL,接入东方伊萨酵母 S-7 种子液 10 mL,共 13 份,  $30^{\circ}\text{C}$ 、 $200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  摇床脱毒发酵,每 5 h 取出 1 份样本,于  $4000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min,移取 1 mL 上清液于 280 nm 测定吸光值  $A_{280}^{[12]}$ ,用  $K$  表示蔗渣半纤维素稀酸水解物总的紫外吸收物的去除比例,其计算公式如下:

$$K(\%) = \left(1 - \frac{A_{280}(\text{生物脱毒后的样本})}{A_{280}(\text{生物脱毒前的样本})}\right) \times 100\%$$

脱毒水解物按照 1.3.3 节方法进行木糖醇发酵,其中木糖发酵起点浓度为  $150\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

#### 1.3.4.5 循环利用细胞对东方伊萨酵母 S-7 脱毒发酵的影响

在 1.3.4.4 节优化生物脱毒时间条件下进行蔗渣半纤维素稀酸水解物生物脱毒,连续 6 次循环利用细胞进行脱毒发酵,检测发酵耗时和细胞干重的变化情况。

## 1.4 热带假丝酵母 1-18 连续发酵生产木糖醇

按照 1.3.4.4 节优化的条件用东方伊萨酵母 S-7 将蔗渣半纤维素水解物脱毒 40 h,然后适当浓缩脱毒水解物后,调节至水解物木糖的发酵起点浓度为  $150\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  或  $200\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,按照 1.3.3 节培养条件进行木糖醇发酵,循环利用热带假丝酵母 1-18 连续发酵 4 代。

## 1.5 检测方法

参照文献[14]方法制备高效液相检测样本。

木糖和木糖醇检测方法。仪器:Waters 510 高效液相色谱仪和示差折光检测器,色谱柱:BC-100 碳水化合物  $\text{Ca}^{2+}$  柱,流动相:超纯水,流速:  $1\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ ,色谱柱保温温度:  $85^{\circ}\text{C}$ ,进样量:  $20\text{ }\mu\text{L}$ 。

紫外吸收物检测:蔗渣半纤维素稀酸水解物的紫



外吸收物含量,是评价有毒成分含量的一个重要指标<sup>[15]</sup>。糠醛<sup>[16]</sup>、芳香醛和酚类<sup>[17]</sup>在 280 nm 处有最大吸收值,因而在 280 nm 处测定吸光值。甘蔗渣半纤维素稀酸水解物生物脱毒结束,脱毒水解物离心并经滤纸过滤去除菌体,上清液用分光光度计于 280 nm 处测定吸光值。

## 2 结果与分析

### 2.1 尿素用量对东方伊萨酵母 S-7 生长的影响

将蔗糖半纤维素稀酸水解物进行预处理脱毒发酵,结果表明当尿素用量达到  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  后,东方伊萨酵母 S-7 的细胞干重达到最大值,再增加尿素用量,细胞干重基本不再增加(图 1)。因而后续试验选择  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  作为水解物脱毒时的尿素添加量。

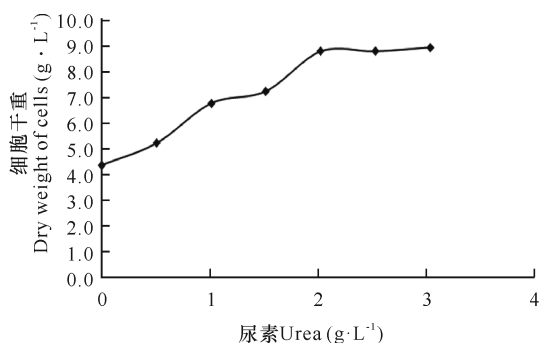


图 1 尿素添加量对东方伊萨酵母 S-7 细胞生长的影响

Fig. 1 Effect of urea add amount on the growth of *I. orientalis* S-7 cells

### 2.2 初始 pH 值对生物脱毒水解物产醇性能的影响

在不同初始 pH 条件下脱毒 60 h 后,对脱毒的蔗渣半纤维素稀酸水解物进行木糖醇试验,结果如表 1 所示。在 pH 值为 5.0 条件下,生物脱毒处理的蔗渣半纤维素稀酸水解物产醇性能最佳,热带假丝酵母 1-18 发酵木糖醇产量最高达  $129.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,比 pH 值为 3.0 条件下生物脱毒的水解物木糖醇产量增加  $24.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 2.3 浓缩比例对东方伊萨酵母 S-7 细胞生长的影响

随着浓缩比例增加,东方伊萨酵母 S-7 细胞生长生物量先增加后降低,可知真空浓缩过程能逐步去除挥发性毒物组分。当水解物浓缩至原体积 50% 时,脱毒细胞生长最旺盛,细胞干重最大,细胞繁殖速度增加 1 倍;后续继续浓缩,东方伊萨酵母 S-7 细胞数量减少,可知不挥发毒物浓度增加,限制脱毒菌的生长(图 2)。

表 1 生物脱毒初始 pH 值对热带假丝酵母 1-18 木糖醇发酵性能的影响

Table 1 Effects of the yield of xylitol fermentation by *C. tropicalis* 1-18 in initial pH in bio-detoxification bagasse hydrolyzate

生物脱毒初始 pH 值 Initial pH in bio-detoxification	木糖利用率 Xylose utilization (%)	木糖醇产量 Xylitol yield ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	细胞干重 Dry weight of cells ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
3	78.3	105.2	12.70
4	82.3	117.0	20.57
5	90.2	129.8	21.17
6	87.3	120.5	21.17
7	83.2	112.5	21.18

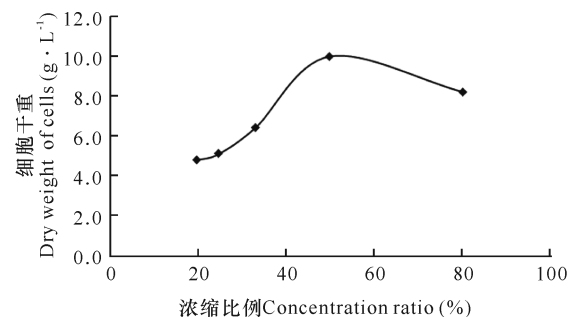


图 2 浓缩比例对东方伊萨酵母 S-7 细胞生长的影响

Fig. 2 Effects of concentration ratio on the growth of *I. orientalis* S-7 cells

### 2.4 生物脱毒时间对蔗渣半纤维素稀酸水解物产醇性能的影响

在东方伊萨酵母 S-7 脱毒发酵过程中,连续检测水解物 280 nm 处的吸光值(用  $A_{280}$  表示),结果显示初期的  $A_{280}$  随脱毒时间延长而不断下降(图 3);当脱毒发酵至 40 h,蔗渣半纤维素水解物  $A_{280}$  由初始的 3.121 降至 1.616。此后继续延长发酵时间,  $A_{280}$  不再明显下降。

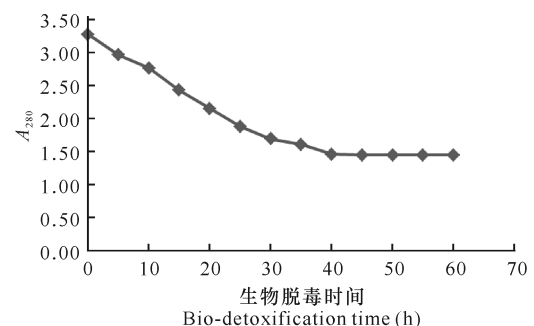


图 3 不同脱毒时间下东方伊萨酵母 S-7 降解蔗渣水解物中的 280 nm 紫外吸收物的变化趋势

Fig. 3 Variation trend of 280 nm ultraviolet absorber in bagasse hydrolyzate degraded by *I. orientalis* S-7 under different detoxification time

结合图3水解物的280 nm处紫外吸收值,可知当东方伊萨酵母对蔗渣半纤维素稀酸水解物脱毒40 h时,280 nm紫外吸收值降至最低,此时的紫外吸收物去除比例最大,用 $K_{max}$ 表示。根据1.3.4.4节公式计算 $K_{max} \approx 55.4\%$ ,即280 nm处的紫外吸收物总量的55.4%可以被东方伊萨酵母S-7降解,剩余45.6%是东方伊萨酵母S-7不能降解或不易降解的。经过40 h的脱毒发酵,蔗渣半纤维素稀酸水解物的K值已经达到 $K_{max}$ (55.4%),继续延长脱毒发酵时间并测定其 $A_{280}$ 已不必要。

收集经东方伊萨酵母S-7不同脱毒时间处理的蔗渣半纤维素稀酸水解物,用热带假丝酵母1-18进行木糖醇发酵。结果表明,蔗渣半纤维素稀酸水解物的木糖醇发酵性能随生物脱毒时间的延长而提高(表2),当脱毒发酵超过40 h,其K值达到 $K_{max}$ 后,热带假丝酵母木糖醇发酵产量最高达 $134.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,继续延长脱毒发酵时间并不能增加热带假丝酵母1-18的木糖醇发酵产量。

表2 生物脱毒时间对热带假丝酵母1-18木糖醇发酵性能的影响

Table 2 Effect of biological detoxification time on the performance of xylitol fermentation by *C. tropicalis* 1-18

生物脱毒时间 Bio-deto- xification time (h)	木糖利用率 Xylose utilization (%)	木糖醇产量 Xylitol yield ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	细胞干重 Dry weight of cells ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )
0(对照 Contrast)	68.1	64.5	12.70
5	75.0	73.5	14.30
10	82.3	89.7	17.80
15	93.3	107.0	20.57
20	94.2	109.8	21.17
25	94.8	110.5	21.17
30	95.0	112.5	21.18
35	95.1	112.5	21.77
40	95.3	134.5	22.98
45	95.3	125.7	22.30
50	95.4	125.5	22.34
55	97.2	123.2	22.20
60	97.5	123.0	22.20

表3 热带假丝酵母1-18连续发酵脱毒水解物生产木糖醇

Table 3 Continuous fermentation of *C. tropicalis* detoxified hydrolysate to produce xylitol

发酵代数 Fermentation algebra	木糖浓度 Xylose concentration ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	木糖利用率 Xylose utilization (%)	木糖醇产量 Xylitol yield ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	木糖醇 生成速率 Xylitol production rate ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )	细胞干重 Dry weight of cells ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )	发酵耗时 Fermentation time (h)
第1代 1st Generation	150	92.1	128.7	1.95	20.1	66
第2代 2st Generation	150	93.3	134.4	2.40	24.2	56
第3代 3st Generation	200	94.2	153.4	3.56	29.0	43
第4代 4st Generation	200	94.8	163.8	5.85	30.2	28

## 2.5 循环利用细胞对脱毒发酵的影响

如图4所示,随着循环利用细胞的次数增加,细胞密度增加,所需要的脱毒时间缩短。因此,只要所用的酵母细胞没有丧失降解毒物的活性,循环利用细胞不仅节约了细胞增殖时间,而且高的初始细胞密度也降低了单位细胞接触毒物的量。这种效应的累加大幅度缩短脱毒所需要的时间。

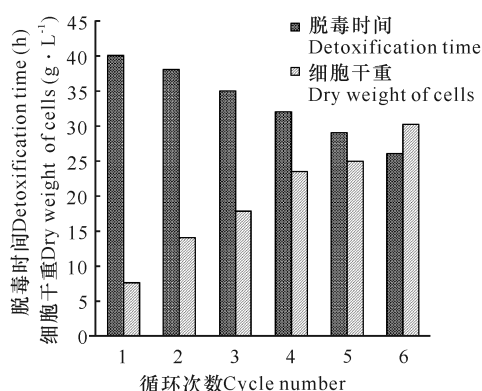


图4 循环利用细胞对东方伊萨酵母S-7脱毒耗时和细胞干重的影响

Fig. 4 Effect of recycling cells on bio-detoxification time and cell dry weight of *I. orientalis* S-7

## 2.6 热带假丝酵母1-18连续发酵生物脱毒水解物生产木糖醇

如表3所示,低密度接种热带假丝酵母1-18,起点木糖浓度 $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,耗时66 h,木糖醇生成速率达到 $1.95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ;循环利用细胞,从第3代起木糖浓度增加至 $200 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ,木糖醇生成速率提高2倍,到第4代时木糖醇产量达 $163.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

### 3 讨论

木质纤维稀酸水解物中存在复杂的代谢毒物。卫力等<sup>[4]</sup>证明半纤维素水解物中的微生物代谢毒物(甲酸、乙酸、糠醛、苯甲醛、香草醛、愈创木酚、对羟基苯甲酸等)对木糖醇发酵菌热带假丝酵母 1-18 存在毒害作用,使得木糖醇产量显著降低,水解物毒物含量越高,木糖醇产量越低。Bruno 等<sup>[18]</sup>研究证实西伊萨酵母可降解蔗渣水解物中的毒物,脱毒 24 h 后,毒物降低的浓度分别为丁香醛 66.67%、阿魏酸 73.33%、糠醛 62% 以及 5-羟甲基糠醛 85%。笔者<sup>[13]</sup>前期研究证实东方伊萨酵母 S-7 能同时降解半纤维素水解物中的乙酸、糠醛、香草醛、酚性物(没食子酸,苯酚),抑制物降解后的木糖醇发酵性能显著改善。邹韞智<sup>[19]</sup>研究发现季氏毕赤酵母 *Pichia guil-liermondii* 对抑制物有较好的耐受性,并能迅速降解水解液中的糠醛、羟甲基糠醛。酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、构巢曲霉菌 *Aspergillus nidulans*、煤油霉菌 *Amorphotheca resiniae*、木生锥毛壳菌 *Coniochaeta ligniaria* 等微生物均具备降解木质纤维水解物中的甲酸、糠醛、羟甲基糠醛的性能,并改善水解物乙醇或木糖醇发酵性能<sup>[20-27]</sup>。可见利用微生物进行生物脱毒是可行的,不会产生二次污染,可提高木质纤维水解物中糖分利用率。

生物脱毒改善水解物发酵性能尽管取得不错效果,但现有的单一或组合微生物,不能将水解物中的抑制物组分彻底降解或转化为无毒物质,而且生物脱毒过程耗时长,水解物中的有效糖分含量低。因此生物脱毒技术有待进一步优化,建议从以下 3 个方面展开研究:(1)继续筛选耐更高浓度毒物、降解毒物效率更高的活性微生物,以减少生物脱毒过程的发酵能耗;(2)筛选耐高浓度非挥发性抑制物的脱毒微生物或乙醇、木糖醇发酵菌种,减少脱毒的发酵体积,同时减少乙醇或木糖醇发酵的体积,提高产物浓度,降低能耗;(3)利用现有的乙醇或木糖醇发酵菌与脱毒微生物基因进行重新组装,构建同时具备脱毒和产乙醇或木糖醇的基因工程菌,减少发酵步骤,降低能耗。

### 4 结论

本研究进一步证实东方伊萨酵母 S-7 可有效降解蔗渣半纤维素稀酸水解物中的抑制物。将蔗渣半纤维素稀酸水解物初始 pH 值调节至 5.0,添加 2 g · L<sup>-1</sup> 尿素,脱毒 40 h,水解物木糖醇(134.5 g ·

L<sup>-1</sup>)发酵性能显著改善(空白对照组 64.5 g · L<sup>-1</sup>)。循环利用细胞进行生物脱毒,起到驯化细胞的目的,脱毒细胞浓度增加,脱毒时间由原来的 40 h 减至 27 h。热带假丝酵母 1-18 连续发酵脱毒水解物生产木糖醇的速率提高 2 倍。

### 参考文献

- [1] 石志海. 甘蔗渣生产木糖醇工艺的探讨[J]. 轻工科技, 2012(3):12-13.
- [2] DE ALBUQUERQUE T L, DA SILVA I J, DE MACEDO G R, et al. Biotechnological production of xylitol from lignocellulosic wastes: A review [J]. Process Biochemistry, 2014, 49(11):1779-1789.
- [3] 张厚瑞, 曾健智, 何成新, 等. 酵母发酵蔗渣半纤维素水解物生产木糖醇[J]. 生物工程学报, 2006, 18(6):723-728.
- [4] 卫力, 经艳, 林卫军, 等. 7 种抑制物对热带假丝酵母木糖醇发酵性能的影响[J]. 广西科学, 2008, 15(4): 424-430.
- [5] 经艳, 周玉恒, 覃香香, 等. 甘蔗叶汽爆液中挥发性微生物生长抑制物的鉴定[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(11):29-32.
- [6] LUO C, BRINK D L, BLANCH H W. Identification of potential fermentation inhibitors in conversion of hybrid poplar hydrolyzate to ethanol [J]. Biomass and Bioenergy, 2001, 22(2):125-138.
- [7] 庄军平, 林鹿, 庞春生, 等. 木质纤维素稀水解液脱毒研究进展[J]. 现代化工, 2009, 29(2):19-23.
- [8] TAHERZADEH M J, NIKLASSON C, LIDÉN G. Acetic acid - friend or foe in anaerobic batch conversion of glucose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* ? [J]. Chemical Engineering Science, 1997, 52(15):2653-2659.
- [9] TAHERZADEH M J, NIKLASSON C, LIDÉN G. On-line control of fed-batch fermentation of dilute-acid hydrolyzates [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2000, 69(3):330-338.
- [10] LARSSON S, PALMQVIST E, HAHN-HÄGERDAL B, et al. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood [J]. Enzyme and Microbial Technology, 1999, 24(3/4):151-159.
- [11] ZHUNG J P, LIU Y, WU Z, et al. Hydrolysis of wheat straw hemicellulose and detoxification of hydrolyzate for xylitol production [J]. BioResources, 2009, 4(2):674-686.
- [12] CANILHA L, ALMEIDA E SILVA J B, SOLENZAL A I N, et al. Eucalyptus hydrolyzate detoxification with activated charcoal adsorption or ion-exchange resins for

- xylitol production [J]. *Process Biochemistry*, 2004, 39(12):1909-1912.
- [13] 覃香香,张厚瑞,蔡爱华,等. 东方伊萨酵母降解木糖醇发酵抑制物的研究[J]. *广西科学*, 2010, 17(4): 358-362.
- [14] 苗露,周玉恒,张厚瑞,等. 蔗渣木聚糖含量检测方法的比较[J]. *食品科学*, 2016, 37(16):162-168.
- [15] DOMINGUEZ J M, CAO N J, GONG C S, et al. Dilute acid hemicellulose hydrolysates from corn cobs for xylitol production by yeast [J]. *Bioresource Technology*, 1997, 61(1): 85-90.
- [16] CARVALHEIRO F, DUARTE L C, LOPES S, et al. Evaluation of the detoxification of brewery's spent grain hydrolysates for xylitol production by *Debaryomyces hansenii* CCM1941 [J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(3/4):1215-1233.
- [17] CARVALHO G B M, MUSSATTO S I, CÂNDIDO E J, et al. Comparison of different procedures for the detoxification of eucalyptus hemicellulosic hydrolysate for use in fermentative processes [J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2006, 81(2): 152-157.
- [18] BRUNO G F, RONDINELE DE O M, FLAVIO DE O F, et al. Biological detoxification of different hemicellulosic hydrolysates using *Issatchenkia occidentalis* CCTCC M 206097 yeast [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011, 38:199-207.
- [19] 邹韞智. 木质纤维素水解液抑制物耐受菌发酵生产木糖醇的研究及产乙醇基因工程探索[D]. 上海: 上海交通大学, 2009.
- [20] 李丰田, 田沈, 于泳, 等. 酵母菌复合培养物对木质纤维素稀酸水解液原位脱毒乙醇发酵[J]. *太阳能学报*, 2009, 30(11):1582-1586.
- [21] KEATING J D, PANGANIBAN C, MANSFIELD S D. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2006, 93(6):1196-206.
- [22] YU Y L, FENG Y J, XU C, et al. Onsite bio-detoxification of steam-exploded corn stover for cellulosic ethanol production [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(8):5123-5128.
- [23] 张建, 楚德强, 于占春, 等. 低水用量约束条件下的高固体含量纤维乙醇生物加工技术策略[J]. *生物工程学报*, 2010, 26(7):950-959.
- [24] 朱智楠. 木质纤维素来源发酵抑制物的生物降解以及光合发酵制氢[D]. 上海: 华东理工大学, 2010.
- [25] ZHANG J, ZHU Z N, WANG X F, et al. Biodetoxification of toxins generated from lignocellulose pretreatment using a newly isolated fungus, *Amorphotheca resinae* ZN1 and the consequent ethanol fermentation [J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2010, 3:1-26.
- [26] LÓPEZ M J, NICHOLS N N, DIEN B S, et al. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2004, 64(1):125-131.
- [27] NICHOLS N N, SHARMA L N, MOWERY R A, et al. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 42(7):624-630.

## Study on Biodetoxification to Improve the Fermentation Performance of Bagasse Hydrolysate Xylitol

QIN Xiangxiang, ZHOU Yuheng, CHEN Haishan, CAI Aihua, WANG Lei, ZHANG Hourui  
(Guangxi Lignocellulose Biorefinery Research Center of Engineering Technology, Guangxi Key Laboratory of Functional and Phytochemicals Research and Utilization, Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China)

**Abstract:** To increase the production of xylitol metabolites of *Candida tropicalis* 1-18, this study used bagasse hemicellulose dilute acid hydrolysate as the research material. And the growth of the biological detoxification strain *Issatchenkia orientalis* S-7 cells, the 280 nm ultraviolet absorber of the hydrolysate and the yield of xylitol were used as evaluation indicators to investigate the effects of five factors such as urea, pH

value, detoxification time, pre-concentration ratio and cell recycling on the fermentation performance of bagasse dilute acid hemicellulose hydrolysate xylose. The results show that the bagasse hemicellulose dilute acid hydrolysate is adjusted to  $\text{pH}=5$  with calcium hydroxide, pre-concentrated to 1/2 volume, and  $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  urea is added, and *I. orientalis* S-7 is biologically detoxified for 40 h. When the detoxified hydrolysate is pre-concentrated to the xylose concentration of  $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , the xylitol yield of fermentation metabolites in *C. tropicalis* 1-18 is up to  $134.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , which is  $70 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  more than the control group. Recycling cells for biological detoxification shortens the detoxification time by 13 h. Recycling *C. tropicalis* 1-18 for xylitol production and fermentation of biological detoxification hydrolysates, the xylitol output reaches  $163.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ , and the generation rate is  $5.85 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ , which is 2 times higher than the first generation ( $1.95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Biological detoxification is an effective method to improve the xylitol fermentation performance of lignocellulose dilute acid hydrolysate.

**Key words:** *Issatchenkia orientalis*, bagasse, hemicellulose hydrolysate, bio-detoxification, xylitol fermentation

责任编辑:米慧芝



微信公众号投稿更便捷

联系电话:0771-2503923

邮箱:gxkxyxb@gxas.cn

投稿系统网址:<http://gxkx.ijournal.cn/gxkxyxb/ch>