

从蔗渣半纤维素水解物发酵液中 分离纯化木糖醇

蔡爱华, 张厚瑞*, 何成新, 曾健智, 金 科
(中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

摘 要: 蔗渣半纤维素水解物发酵液必须经过超滤处理, 后续的离子交换柱层析过程才能顺利进行。超滤透过液经离子交换柱层析脱盐之后, 再经活性炭脱色, 这种木糖醇液浓缩至可溶性固形物含量为 80%, 即可结晶得到含量 $\geq 98.5\%$ 的木糖醇产品。结晶母液经连续浓缩之后得到的第二次结晶和第三次结晶, 则必须经重结晶后才能获得含量 $\geq 98.5\%$ 的木糖醇产品。从发酵液中的木糖醇到含量 $\geq 98.5\%$ 结晶木糖醇, 产品总收率约为 70.6%。本工艺适宜超滤膜的截留分子量为 5000kD, 阴、阳离子树脂的适宜比例约 1.5:1(V/V), 活性炭用量为木糖醇溶液可溶性固形物含量的 2.5%。当结晶母液中的阿拉伯糖浓度超过木糖醇浓度的 45.0%, 木糖浓度超过木糖醇浓度的 12.6% 时, 它们都容易与木糖醇一起结晶析出。存在于这种母液中的木糖醇将难于通过结晶的方法而继续得到有效的纯化。
关键词: 蔗渣; 半纤维素水解物; 发酵; 木糖醇; 纯化柱层析

Xylitol Purification from the Fermentative Broth of Sugar Cane Bagasse Hemicellulose Hydrolysate

CAI Ai-hua, ZHANG Hou-rui*, HE Cheng-xin, ZENG Jian-zhi, JIN Ke
(Guangxi Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China)

Abstract: Ultrafiltration is a necessary process to ensure an efficient operation of the ion-exchange column chromatography of xylitol fermentation broth of the hemicellulose hydrolysate of sugar cane bagasse. After desalination by ion-exchange column process, followed by decoloration with active carbon, the purified xylitol syrup was concentrated up to soluble solids 80%. Then, the xylitol product could be crystallized out with purity up to 98.5%. The xylitol preparation of the second and third crystallization of the mother liquor could not gain a purity of 98.5% unless it has been recrystallized. In this process, the ultimate yield of xylitol product with a purity of 98.5% could reach about 70.6%. Under this technics, the suitable cut-molecular weight of ultrafiltration membrane is 5000kD and the proper value ratio of anion resin to cation resin is about 1.5:1, while the reasonable dosage of active carbon equals to 2.5 percent of the amount of soluble solids in syrup. In the crystallized mother liquor, if the concentration of arabinose is 45.0% higher than that of xylitol, or the concentration of xylose is 12.6% higher than that of xylitol, this two will crystallize out at same time as the xylitol crystallizes. It is difficult to efficiently purify the xylitol from such mother liquor only by the crystallization process alone.

Key words: sugar cane bagasse; hemicellulose hydrolysate; fermentation; xylitol; purifying column chromatography
中图分类号: TQ928.3 文献标识码: A 文章编号: 1002-6630(2006)07-0136-04

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木糖的工艺, 但发酵工艺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]。近几年来, 随着木糖醇发酵工艺研究的不断深入^[3,4], 从发酵液中分离纯化木糖醇的研究工作将逐步受

收稿日期: 2005-08-29

*通讯作者

基金项目: 广西科技攻关项目(0235005-4)

作者简介: 蔡爱华(1978-), 女, 研究实习员, 研究方向为微生物发酵与酶工程。

到重视。因为从发酵液中有效地分离纯化出符合商品要求的木糖醇,同样是降低木糖醇发酵工艺生产成本的重要环节。本文在国内外关于从发酵液纯化木糖醇若干报道^[5~9]的基础上,系统研究了蔗渣半纤维素水解物的发酵液制备结晶木糖醇的工艺条件。

1 材料与方法

1.1 木糖醇发酵液制备

参照文献[4]的方法制备出可用于木糖醇发酵的蔗渣半纤维素水解物。这种水解物按10g/L加入酵母膏以补充氮源,此外不再另加入其它成分。水解物加入B. Bruan.U.30型发酵罐中,接种热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) CCTCC:M205067菌种,发酵36~48h后得蔗渣水解物的木糖醇发酵液。此发酵液中木糖醇浓度为165g/L,阿拉伯糖14.5g/L,木糖3.9g/L,共120L。其中100L用于木糖醇的批量制备。

1.2 木糖醇分离纯化

1.2.1 超滤

发酵液经离心除去酵母菌体,收集上清液,在U201型超滤机(无锡星达膜科技发展有限公司产)上进行超滤纯化。本机可根据试验要求,通过更换不同截留分子量的卷式超滤膜芯,比较不同截留分子量的超滤膜对发酵液除去杂质效果及对后续纯化过程的影响。

1.2.2 离子交换层析

超滤透过液先通过732强酸型阳离子交换树脂柱,然后通过717强碱型阴离子交换树脂柱,进行层析脱盐、脱色。层析柱直径为4cm,柱床高度为42cm,木糖醇液流速控制为1.5ml/cm²·min。

1.2.3 活性炭吸附

经离子交换树脂层析净化后木糖醇液,按文献[9]的方法用活性炭吸附,以进一步脱臭、脱色处理。活性炭(广东汕头试剂厂生产,粉末状,化学纯),吸附处理的具体条件为:pH6.0,45℃,脱色时间80min。

1.2.4 结晶分离

经活性炭脱色、脱臭处理过的木糖醇液浓缩至木糖醇浓度为80%左右,自然降温,木糖醇即结晶析出。待木糖醇晶体不再增长后,过滤式离心分离出晶体,烘干即得第一次木糖醇结晶产品。收集分离出晶体后的木糖醇结晶母液,再次浓缩至一定的固形物含量,分离出第二次结晶产品。如此继续,直至不能有效纯化产品,放弃结晶。

1.2.5 分析方法

固形物含量的测定采用手持式糖量计。木糖、阿拉伯糖、木糖醇标准购自Sigma公司,含量测定采用HPLC法:Waters510泵,410示差折光检测器,U_{6k}手

动进样器,N2000色谱工作站,Benson BC-100 Ca+2碳水化合物柱,300×7.8mm,柱温为85℃,流动相为重蒸水,流速0.5ml/min。脱色效果测定采用分光光度法,420nm波长下测定试样的吸光度^[5],脱色效果以脱色率来表示。

$$\text{脱色率} = \frac{\text{脱色前色值} - \text{脱色后色值}}{\text{脱色前色值}} \times 100\%$$

$$\text{样品色值} = \frac{A}{C}$$

式中,A:样液在420nm下的吸光度;

C:样液的固形物含量。

2 结果与分析

2.1 超滤对木糖醇发酵液的净化作用

比较表1中超滤是否对后续离子交换过程的影响可以发现,发酵过程中加入的酵母膏深色物质以及木质纤维水解过程中产生的许多有色物质,在超滤的过程中均能有效除去。不经超滤处理的发酵液中直接通过离子交换树脂,pH变化直接造成大量蛋白质沉淀,造成柱床堵塞,使实际操作很难进行,而且发酵液中许多非离子型色素也无法通过离子交换过程来去掉。而所用的三种不同截留分子量的超滤膜,对于蔗渣半纤维素水解物的木糖醇发酵液,色素的脱除率均达到78.9%以上。显然,超滤不仅是除去发酵液中蛋白质、多糖等干扰结晶物质的有效手段,同样也是极为有效的脱色手段。因此,超滤是木糖醇发酵液必不可少的净化步骤。

结果同时表明(表1),三种超滤膜的脱色效果是比较接近的,但对于木糖醇的截留率,则表现较大的差别。截留分子量10000的超滤膜虽能允许木糖醇自由的通过,但由于超滤过程除去色素等不够完全,树脂极易饱和,给后一步的处理增加负担。截留分子量为1000的超滤膜,虽然大大地减轻了对离子交换树脂过程的负担,但对木糖醇的截留率达到16%左右,这意味着每一批溶液在超滤后期,必须用大量的水反复置换超滤,才能保证得到较高的木糖醇回收率,这显然提高了生产成本。相对而言,截留分子量5000的超滤膜对于木糖醇发酵液的净化是比较合适的,它不仅本身有较高的脱色率(84.8%),而且对木糖醇通过率也达到了90%以上,尤其是,这种截留分子量的超滤膜,已经能够保证后续的离子交换过程有效进行。

2.2 离子交换层析的净化作用

阴、阳离子交换树脂柱层析是发酵液脱盐净化的必要手段,它不仅能有效降低结晶木糖醇中的灰分含量,尤其是重金属含量,同时它也能有效脱除发酵液中的离子型色素。在本试验的阴、阳离子分开装柱的条件下,

发酵液在离子交换前的电导率为 $11500\mu\text{s}/\text{cm}$, 离子交换后的电导率为 $201\mu\text{s}/\text{cm}$, 去离子程度达到 98.2%, 这个结果与文献[5]是相近的, 此时发酵液已经除去了 99.0% 的色素成分(见表 1)。

表 1 不同截留分子量超滤膜对木糖醇发酵液的脱色效果

Table 1 The effect of ultrafiltration on decoloration of xylitol fermentative broth with different cutmolecular weight membrane

超滤膜切割分子量	木糖醇透过率(%)	超滤过程脱色率(%)	离子交换过程脱色率(%)	总脱色率(%)
对照	100	0	34.22	34.22
1000	84.5	88.01	95.92	99.5
5000	90.8	84.8	93.55	99.0
10000	97.5	78.9	91.86	98.3

经阴、阳离子交换层析后, 流出液 pH 值呈(或接近)中性, 是后续的活性炭脱色以及木糖醇结晶的适宜 pH 值^[9], 溶液中盐类不同, 使流出液达到中性所需要的阴阳离子树脂搭配比例也不同。图 1 的结果表明, 当阴、阳树脂体积的搭配比例约为 1.5:1 时, 流出液基本为中性, 故本试验采用的发酵液宜选用阴、阳树脂体积的搭配比例约为 1.5:1。

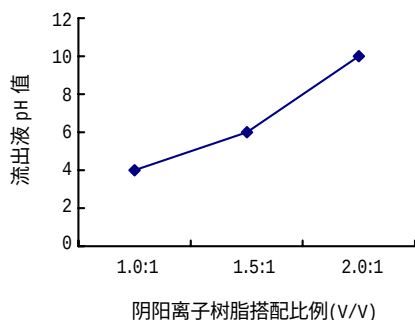


图 1 离子交换树脂体积的搭配比例对流出液 pH 值的影响

Fig.1 The effect of different value ratio of anion resin to cation resin on pH of effluent

2.3 活性炭的脱色作用

木糖醇液进一步采用活性炭脱色、脱臭处理, 活性炭处理的条件参照文献[9]。从图 2 的结果表明, 随活性炭用量增加, 脱色效果不断增强, 当活性炭用量达到可溶性固形物含量的 2.5%(W/V)之后, 继续增加活性炭用量, 脱色效果已经不明显, 而木糖醇回收率则

随活性炭用量的增加而下降。显然, 对于本工艺条件预处理过的木糖醇发酵液而言, 采用相当于可溶性固形物含量 2.5% 的活性炭处理是较合适的, 此时的木糖醇液的色值已接近 0。

本研究中确定的活性炭用量远低于谢晓兰^[9]等人用于

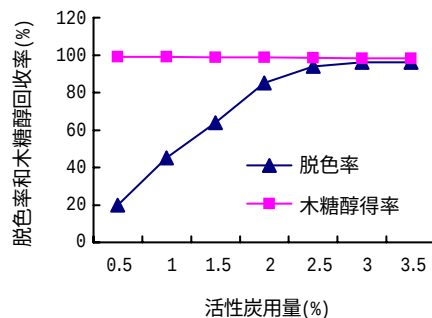


图 2 活性炭用量对木糖醇液的脱色效果和木糖醇回收率的影响

Fig.2 The effect of active charcoal dosage applied in xylitol liquid on its decolouration rate and the xylitol recovery

木糖醇发酵液脱色的活性炭用量(16.75g/100ml)。其原因在于, 本研究中的木糖醇发酵液在活性炭处理之前, 已经过了超滤与离子交换净化, 大量的色素物质已经被去除的缘故。

2.4 结晶木糖醇的批量制备

按前述优化过的工艺制备结晶木糖醇, 即: 离心除去菌体的发酵液, 首先以截留分子量 5000 的超滤膜进行超滤, 再经柱床体积比为 1.5:1 的阴、阳离子交换树脂柱层析, 按木糖醇液可溶性固形物含量的 2.5% 的活性炭进行脱色, 脱臭, 此时的木糖醇液的总脱色率为 99.9%。然后将木糖醇液浓缩至木糖醇浓度为 80% 左右, 自然降温放置结晶。

蔗渣水解物为基质制备的木糖醇发酵液 100L, 其中含木糖醇 16.5kg, 表 2 表明, 第一次结晶获得的木糖醇占原料量的 54.8%, 木糖醇含量达到 98.5%。而结晶母液继续浓缩之后, 所获得的第二、三次结晶晶体则必须需重结晶处理, 才能得到木糖醇含量为 98.5% 的产品, 占原料量的 15.80%。采取本工艺从发酵液到含量为 98.5% 的木糖醇回收率可达到 70.6%。

分析结晶母液的成分变化(表 3), 并与表 2 的结果比较可以发现, 尽管母液中的木糖含量并不高, 当木糖

表 2 批量制备木糖醇的主要理化指标

Table 2 The primary index of xylitol produced in scale-up preparation

	外观	滋味与气味	木糖醇(kg)	纯度(%)	回收率(%)	木糖(%)	阿拉伯糖(%)
第一次结晶体	白色晶状粉末	无异味, 味甜	9.04	>98.5	54.8	0	0
第二次结晶体	白色晶状粉末	无异味, 味甜	3.82	93.6	23.2	0	0.3
第三次结晶体	淡黄色晶状粉末	无异味, 味甜	0.92	81.6	5.6	1.5	8.3
二、三两次晶体的重结晶体	白色晶状粉末	无异味, 味甜	2.60	>98.5	15.80	0	0

表3 结晶母液的糖类组成含量变化

Table 3 Variation of sugar contents in crystallizing mother liquor

	木糖醇(%)	阿拉伯糖(%)	木糖(%)
纯化的木糖醇糖液	90.86	7.98	2.10
第一次结晶母液	81.71	15.90	4.38
第二次结晶母液	66.08	29.63	8.34
第三次结晶母液	65.56	30.08	8.86

浓度超过木糖醇浓度的12.6%时,就很容易同木糖醇一起结晶出来。在木糖醇液中,阿拉伯糖含量远高于木糖,但只有当阿拉伯糖浓度超过木糖醇浓度的45.0%以后,才和木糖醇同时结晶出来。

表2、3清楚地显示,第二次结晶后的母液只有少量木糖醇晶体析出(5.6%),其中木糖醇的含量为81.6%,此时已有相对较多的木糖和阿拉伯糖析出,而且第二次结晶后的母液与第三次结晶后的母液,其中的木糖醇,阿拉伯糖及木糖的相对含量几乎不变。也就是说,两次结晶之后的木糖醇发酵液,将再难于继续通过结晶的方式提纯出溶液中的木糖醇。

3 结 论

蔗渣半纤维素水解物的木糖醇发酵液,经过超滤、离子交换树脂柱层析及活性炭吸附净化之后,总脱色率为99.9%,此时的木糖醇液已无色透明。控制木糖醇浓度为80%条件下结晶,第一次结晶的产品木糖醇含量可达98.5%,占原料量的54.8%,将结晶母液浓缩之后得到第二次和第三次结晶木糖醇,则必须经过重结晶之后,才能得出含量达到98.5%以上的产品。采取本工艺从发酵液中的木糖醇到含量为98.5%的木糖醇回收率可达到70.6%。

阿拉伯糖是半纤维素水解物的木糖醇发酵液最主要的杂质成分。虽然,阿拉伯糖并不易随木糖醇一起析出,但由于酵母几乎不能利用水解液中的阿拉伯糖,所以发

酵液中的阿拉伯糖始终维持在含量较高水平。尤其是,当结晶母液中阿拉伯糖含量达到木糖醇含量的45.0%左右,就会随木糖醇一起析出。寻找有效去除阿拉伯糖的手段,是提高半纤维素水解物木糖醇发酵工艺中终产品收率的重要课题。

发酵液中残余的木糖也是水解物木糖醇发酵液中主要存在的杂质。虽然一般木糖残余的浓度不会很高,但由于木糖很容易与木糖醇结晶一起析出,所以少量的木糖也会影响到木糖醇结晶体的纯度。发酵过程中使木糖尽可能完全消耗,同样是木糖醇发酵工艺中对于提高产品的质量与收率必须注意到的问题。

从半纤维素水解物的发酵液中制备结晶木糖醇的同类研究中,本文结果是到目前为止规模最大(发酵液100L),木糖醇回收率最高(从发酵液到98.5%产品总回收率为70.6%)研究报道,它对于促进相关研究将有重要的参考价值。

参考文献:

- [1] Emodi AXylitol. Its properties and food applications[J]. Food Technol, 1978, 32: 28-32.
- [2] Parañ J C, Dominguez H, Dominguez J M. Biotechnological production of xylitol, Part 1. interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis[J]. Biore Technol, 1998, 65: 191-201.
- [3] 黄伟, 方祥年, 夏黎明. 固定化细胞发酵半纤维素水解液产木糖醇的研究[J]. 林产化学与工业, 2004, (3): 27-29.
- [4] 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, 2002, (11): 27-29.
- [5] 应国清, 王普, 张峰, 等. 发酵法生产木糖醇的分离纯化工艺[J]. 中国医药工业杂志, 2002, (3): 117-123.
- [6] Gurgel P V, I M Mancilha, R P Pecanha, et al. Xylitol recovery from fermented sugarcane bagasse hydrolyzate[J]. Bioresource Technology, 1995, 52: 219-223.
- [7] Heikkilä Heikki, Nurmi Juha, Rahkila, et al. Method for the production of xylitol united states patent, 5081026. [P]. 1992(1):14. [3]
- [8] 谢晓兰, 方柏山. 木糖醇发酵液脱色条件的研究[J]. 泉州师专学报, 2000, 18(2): 117-123.

信 息

美研制出全新戒烟疫苗可阻尼古丁进入大脑

据俄罗斯报道,《华盛顿邮报》报道说,美国威斯康星大学医学系烟草研究中心的科学家开始研制一种全新的戒烟疫苗,吸烟者接种了这种疫苗后香烟中的尼古丁便不能进入人的大脑,这样香烟对烟民来说就不再产生强大的吸引力。

据统计,在美国每年有40万人死于抽烟这一不良嗜好。研究资料显示,尽管香烟对许多烟民来说都具有不可抗拒的吸引力,但事实上有70%的成年烟民还是想方设法想戒烟,而其中只有5%~7%的人能够依靠坚强的意志力来抛弃这一不良习惯。