

响应面法优化不同形态 热带假丝酵母发酵生产木糖醇的工艺

马伟超, 李一婧, 高文辉, 安建平*

(天水师范学院生命科学与化学学院, 甘肃天水 741001)

摘要: 利用Design Expert软件对菌丝型和酵母型热带假丝酵母发酵生产木糖醇实验进行设计及结果分析, 建立木糖和木糖醇浓度与4个关键因子(菌型、发酵温度、pH、初始木糖浓度)的二次多项式回归模型, 并对模型进行解析。结果表明: 菌丝型热带假丝酵母转化木糖为木糖醇的能力高于酵母型; 升高发酵温度, 有利于木糖转化为木糖醇, 而pH升高对转化过程并没有明显促进; 发酵液中初始木糖浓度与木糖转化率呈正相关关系; 获得最佳发酵工艺条件为菌种采用菌丝型酵母, 发酵温度37℃, pH8, 初始木糖浓度60mg/mL, 此时木糖醇浓度达到17.21mg/mL。

关键词: 热带假丝酵母, 形态, 木糖醇, 响应面

Optimization for xylitol fermentation by different forms of *Candida tropicalis* with response surface methodology

MA Wei-chao, LI Yi-jing, GAO Wen-hui, AN Jian-ping*

(The College of Life Science and Chemistry, Tianshui Normal University, Tianshui 741001, China)

Abstract: The xylitol fermentation experiments by using mycelial form and yeast-like form of *Candida tropicalis* were designed and the results were analyzed. The quadratic polynomial regression model including the concentration of xylose and xylitol, as well as four key factors (forms, fermentation temperature, pH, initial concentration of xylose) were established and analyzed by Design Expert software. The result showed that, the mycelial form had better ability for conversion of xylose to xylitol than yeast-like form; the increase of fermentation temperature was favor to xylose conversion, and a higher pH did not improve the xylose utilization; the initial xylose concentration had a positive correlation with the conversion rate of xylose. The optimal conditions for xylose fermentation were: mycelial type, fermentation temperature 37℃, pH 8.00, initial xylitol concentration 60mg/mL, the concentration of xylitol reached 17.21mg/mL.

Key words: *Candida tropicalis*; form; xylitol; response surface methodology

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2012)03-0145-05

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)是最常见的假丝酵母, 具有菌丝型(M)和单细胞酵母型(Y)两种形态。不同形态的酵母细胞在蛋白质组成结构和代谢酶以及物质转运等方面存在着明显差异^[1-2]。利用热带假丝酵母在以木糖为唯一碳源条件下发酵生产木糖醇时, 不同形态的酵母菌将木糖转运到菌体内并利用转化的能力不尽相同, 故产出木糖醇的效率也必然存在差异。本实验在前期对热带假丝酵母形态控制研究^[3]的基础上, 通过考察不同形态的热带假丝酵母对木糖利用率和木糖醇产率等指标, 利用响

应面法研究探讨热带假丝酵母的菌体形态变化对木糖醇发酵存在的影响, 并进一步优化发酵工艺, 为利用热带假丝酵母发酵生产木糖醇的工业化生产提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

热带假丝酵母(*Candida tropicalis*, 菌种保存号: CICC 1779) 购自中国普通微生物菌种保藏中心, 4℃保存; 麦芽汁培养基 10°Bx麦芽汁; YX培养基 木糖2%, 酵母膏0.02%, 氯化钙0.1%, 硫酸镁0.5%, 氯化钠0.1%, 磷酸二氢钾1.0%, 硫酸铵5% (24h后添加脯氨酸至终浓度为10mmol/L), pH6.5; YM培养基 麦芽汁0.3%, 蛋白胨0.5%, 酵母粉0.3%, pH4.5; 发酵培养基^[4] 木糖4%, 酵母膏0.25%, 蛋白胨0.25%, 磷酸二氢钾0.5%, 硫酸镁0.05%, 硫酸铵0.05%; 麦芽汁(10°Bx麦芽汁) 实验室自制; 木糖、木糖醇 均为

收稿日期: 2011-04-18 * 通讯联系人

作者简介: 马伟超(1980-), 男, 硕士, 讲师, 研究方向: 生物技术商业应用。

基金项目: 甘肃省科学技术厅项目(090NKCE081); 天水师范学院中青年教师科研资助项目(TSA0918)。

分析纯,南京奥多福尼生物科技有限公司;其它药品均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 两态型热带假丝酵母菌的培养 根据前期对热带假丝酵母形态控制研究成果^[3],在20mL YX、YM培养基中分别接入活化菌后摇匀,分别调节其pH为6.5和4.5。将YX在215r/min、42℃下摇床培养,YM在215r/min、27℃下摇床培养。4d后取样镜检,观察其生长及丝化状况并测定OD₆₀₀值。

1.2.2 木糖浓度测定^[5] 在25mL具塞试管中加入1mL待测样品和3mL DNS试剂,混合均匀,沸水浴12min,冷却,25mL容量瓶中定容。在波长490nm处测定吸光度值,根据标准曲线回归方程计算出样品木糖浓度。

1.2.3 木糖醇含量测定方法^[5] 取待测样品0.5mL与0.5mL高碘酸钾试剂混匀,静置8min后加氯化亚锡试剂0.5mL和变色酸试剂5mL,沸水浴30min,冷却后于25mL容量瓶中定容摇匀,在波长570nm处测定吸光度值,根据标准曲线回归方程计算出样品木糖醇浓度。根据下式可计算出木糖转化率:木糖转化率=木糖醇浓度/初始培养基中木糖浓度。

1.2.4 木糖醇发酵条件优化 实验设计采用响应面中心组合设计理论。响应面中心组合设计分析模型能用较少的实验次数进行全面分析研究^[6-7]。菌型,发酵温度(℃),pH及初始木糖浓度(mg/mL)的真实值分别用X₁、X₂、X₃及X₄表示,按照公式(1)对因子进行编码。

$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X \quad \text{式(1)}$$

式中:x_i-自变量编码值;X_i-自变量真实值;X₀-实验中心点自变量真实值;ΔX-自变量变化的步长。

根据实验设计,实验数据假设由最小二乘法拟合的二次多项式为:

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^n b_i X_i + \sum_{i,j=1}^n b_{ij} X_i X_j \quad \text{式(2)}$$

式(2)中,当n=4,则方程(2)可变为:

$$Y = b_0 + b_1 X_1 + b_2 X_2 + b_3 X_3 + b_4 X_4 + b_{11} X_{12} + b_{22} X_{22} + b_{33} X_{32} + b_{44} X_{42} + b_{12} X_1 X_2 + b_{13} X_1 X_3 + b_{14} X_1 X_4 + b_{23} X_2 X_3 + b_{24} X_2 X_4 + b_{34} X_3 X_4 \quad \text{式(3)}$$

式中:Y-响应值(木糖浓度(mg/mL)/木糖醇浓度(mg/mL)/木糖转化率(%));b₀-截距项;b₁、b₂、b₃及b₄-线性系数;b₁₂、b₁₃、b₁₄、b₂₃、b₂₄及b₃₄-交互项系数;b₁₁、b₂₂、b₃₃及b₄₄-二次项系数。

在发酵实验的基础上,对4个因素(菌型、pH、发酵温度、初始木糖浓度)进行研究,菌型取2个水平,其余都是3个水平,共54个实验点。评价指标:木糖浓度(mg/mL)、木糖醇浓度(mg/mL)和木糖转化率(%)。

表1 实验设计因素水平及编码

水平	因素			
	A 菌型	B 发酵温度(℃)	C pH	D 初始木糖浓度(mg/mL)
-1	酵母型	27	6	20
0		32	7	40
1	菌丝型	37	8	60

注:-1代表低水平;0代表中间水平;+1代表高水平。

本实验设计、数据分析及模型建立皆由Design Expert 7.1.4.0软件(Stat-Ease公司)辅助完成,其实验设计因素水平及编码见表1。

2 结果与分析

2.1 模型建立与显著性检验

实验设计及结果见表2。实验数据的统计与分析由Design Expert 7.1.4.0软件辅助完成。

表2 实验设计及结果

Table 2 Experimental design and result

实验组	A	B	C	D	Y1终木糖 浓度 (mg/mL)	Y2木糖醇 浓度 (mg/mL)	Y3木糖 转化率 (%)
1	-1	0	-1	-1	1.40	0.54	2.91
2	-1	0	1	0	19.48	3.43	16.70
3	1	0	-1	0	11.45	6.59	23.07
4	-1	1	-1	0	1.92	4.66	12.24
5	-1	-1	1	0	24.56	1.95	12.66
6	-1	1	-1	1	0.38	12.62	21.17
7	-1	-1	-1	-1	0.63	0.16	0.83
8	-1	-1	-1	1	40.47	1.80	9.21
9	1	1	-1	-1	0.32	4.40	22.37
10	1	0	1	-1	3.02	5.47	32.21
11	1	1	-1	0	0.49	9.46	23.94
12	-1	-1	0	1	47.18	1.89	14.78
13	1	0	1	1	14.82	14.34	31.74
14	-1	0	0	-1	2.68	1.03	5.93
15	-1	-1	1	-1	3.81	1.29	7.96
16	1	1	1	0	1.43	11.04	28.62
17	-1	1	1	0	2.97	4.45	12.01
18	1	0	-1	1	33.70	5.99	22.78
19	-1	0	1	-1	4.15	2.06	13.00
20	-1	1	0	1	2.13	12.24	21.15
21	-1	0	-1	1	34.86	4.22	16.80
22	1	0	1	0	8.66	9.31	29.69
23	1	1	-1	1	1.33	15.04	25.64
24	-1	1	0	0	1.16	9.95	25.62
25	1	1	0	1	1.81	14.11	24.24
26	1	-1	-1	-1	0.59	0.34	1.74
27	-1	-1	0	-1	2.43	0.68	3.89
28	1	-1	1	-1	2.86	1.05	6.13
29	-1	-1	-1	0	16.29	1.66	6.99
30	1	0	0	-1	2.16	4.51	25.26
31	1	1	1	1	2.36	17.21	29.85
32	1	0	0	1	24.26	8.46	23.68
33	1	1	0	-1	0.96	2.71	14.26
34	1	0	-1	-1	0.90	5.37	28.14
35	1	-1	1	0	14.48	3.55	13.89
36	-1	1	1	1	3.16	15.92	28.01
37	-1	0	-1	0	20.43	2.23	11.38
38	-1	1	-1	-1	0.17	2.13	10.75
39	1	1	1	-1	3.18	1.11	6.60
40	1	-1	-1	1	47.18	1.11	8.67
41	-1	0	1	1	40.69	3.91	20.26
42	-1	-1	1	1	51.02	2.49	27.70
43	1	-1	0	-1	3.90	1.25	7.79
44	-1	-1	0	0	21.81	1.65	9.04
45	-1	0	0	1	38.88	2.38	11.28
46	1	-1	-1	0	14.36	2.31	9.01

续表

实验组	A	B	C	D	Y1终木糖 浓度 (mg/mL)	Y2木糖醇 浓度 (mg/mL)	Y3木糖 转化率 (%)
47	1	-1	0	1	35.26	4.85	19.61
48	-1	1	0	-1	0.30	2.88	14.62
49	1	1	0	0	1.06	9.50	24.39
50	-1	1	1	-1	5.79	1.74	12.24
51	1	0	0	0	8.47	8.36	26.50
52	1	-1	0	0	16.69	2.65	11.39
53	1	-1	1	1	34.10	3.65	14.10
54	-1	0	0	0	18.56	2.12	9.89

2.2 发酵条件对终木糖浓度的影响

利用Design Expert 7.1.4.0软件对实验结果进行分析,回归模型方差分析见表3。结果显示,所得回归方程达到显著($p<0.0001$),决定系数 $R^2=0.9453$,这表明94.53%的实验数据的变异性可用此回归模型来解释。

由表3可以看出,B因子(温度)($p<0.0001$)和D因子(初始木糖浓度)($p<0.0001$)对终木糖浓度影响极显著;A因子(菌型)($p=0.0003$)影响显著;而C因子(pH)($p=0.5784$)影响不显著;在交互项中,BD($p<0.0001$)影响极显著;AC、AD和BB均影响显著,其它项影响均不显著。这说明菌型、温度和初始木糖浓度的主效应明显,且温度和初始木糖浓度两个因素对木糖浓度有交互作用的影响。依据系数估计值 $A=-2.18$ 、 $B=-9.63$ 和 $D=11.51$,可知影响因子主效应的主次顺序为:初始木糖浓度>温度>菌型。通过逐步回归分析及式(3)获得终木糖浓度对影响木糖浓度各因子-菌型(A)、温度(B)、pH(C)、初始木糖浓度(D)的二次多项式回归模型为:

$$Y_2=14.32-2.18 \times A-9.63 \times B+0.38 \times C+11.51 \times D+0.94 \times A \times B-1.79 \times A \times C-1.68 \times A \times D+0.12 \times B \times C-10.02 \times B \times D-1.27 \times C \times D-4.68 \times B^2+0.22 \times C^2+2.34 \times D^2 \quad \text{式(4)}$$

由式(1)、(4)得出:

表3 木糖回归模型方差分析

Table 3 ANOVA for regression model of xylose

来源	系数 估计值	平方和	自由度	均值平方	F值	P值
模型	14.32	11396.83	13	876.68	53.16	<0.0001
A	-2.18	255.71	1	255.71	15.51	0.0003
B	-9.63	3339.25	1	3339.25	202.50	<0.0001
C	0.38	5.18	1	5.18	0.31	0.5784
D	11.51	4768.30	1	4768.30	289.16	<0.0001
AB	0.94	31.62	1	31.62	1.92	0.1738
AC	-1.79	115.56	1	115.56	7.01	0.0116
AD	-1.68	101.64	1	101.64	6.16	0.0173
BC	0.12	0.37	1	0.37	0.02	0.8824
BD	-10.02	2410.80	1	2410.80	146.19	<0.0001
CD	-1.27	38.96	1	38.96	2.36	0.1321
B ²	-4.68	262.98	1	262.98	15.95	0.0003
C ²	0.22	0.59	1	0.59	0.04	0.8514
D ²	2.34	65.88	1	65.88	3.99	0.0525
残差		659.62	40	16.49		
校正 总和		12056.44	53			

$$Y_2=-269.57979+13.70680 \times B+0.83407 \times C+3.84399 \times D+0.024687 \times B \times C-0.10022 \times B \times D-0.063707 \times C \times D-0.18725 \times B^2+0.22107 \times C^2+5.85760E-003 \times D^2 \quad \text{式(5)}$$

$$Y_2=-254.12451+14.08168 \times B-2.74916 \times C+3.67596 \times D+0.024687 \times B \times C-0.10022 \times B \times D-0.063707 \times C \times D-0.18725 \times B^2+0.22107 \times C^2+5.85760E-003 \times D^2 \quad \text{式(6)}$$

其中,式(5)是酵母型,式(6)是菌丝型。

2.3 发酵条件对木糖醇浓度的影响

表4为木糖醇回归模型方差分析,所得回归方程达到显著($p<0.0001$),决定系数 $R^2=0.8718$,表明87.18%的实验数据的变异性可用此回归模型来解释。由表4可以看出,三个因子A(菌型)($p<0.0001$),B(温度)($p<0.0001$),D(初始木糖浓度)($p<0.0001$)对木糖醇浓度影响极显著;C因子(pH)($p=0.0457$)影响达到显著水平;在交互项中,BD($p<0.0001$)影响极显著,其它项影响均为不显著。这表明菌型、温度和初始木糖浓度的主效应明显,且温度和初始木糖浓度两个因子对木糖醇浓度有交互作用的影响。依据系数估计值 $A=1.33$ 、 $B=3.25$ 和 $D=2.88$,可知影响因子主效应的主次顺序为:温度>初始木糖浓度>菌型。通过逐步回归分析及式(3)获得木糖醇浓度对影响木糖醇浓度的因子-菌型(A)、温度(B)、pH(C)、初始木糖浓度(D)的二次多项式回归模型为:

$$Y_1=5.14+1.33 \times A+3.25 \times B+0.65 \times C+2.88 \times D+0.30 \times A \times B+0.25 \times A \times C+0.38 \times A \times D-0.14 \times B \times C+2.55 \times B \times D+0.71 \times C \times D+0.14 \times B^2+0.060 \times C^2-0.24 \times D^2 \quad \text{式(7)}$$

由式(1)、(7)得出:

$$Y_1=20.71800-0.57446 \times B-0.93123 \times C-0.88921 \times D-0.028804 \times B \times C+0.025473 \times B \times D+0.035337 \times C \times D+5.41104E-003 \times B^2+0.060049 \times C^2-6.04618E-004 \times D^2 \quad \text{式(8)}$$

$$Y_1=14.57369-0.45463 \times B-0.43763 \times C-0.85150 \times D-0.028804 \times B \times C+0.025473 \times B \times D+0.035337 \times C \times D+5.41104E-003 \times B^2+0.060049 \times C^2-6.04618E-004 \times D^2 \quad \text{式(9)}$$

表4 木糖醇回归模型方差分析

Table 4 ANOVA for regression model of xylitol

来源	系数 估计值	平方和	自由度	均值平方	F值	P值
模型	5.14	966.74	13	74.36	20.92	<0.0001
A	1.33	95.09	1	95.09	26.75	<0.0001
B	3.25	379.15	1	379.15	106.64	<0.0001
C	0.65	15.12	1	15.12	4.25	0.0457
D	2.88	297.65	1	297.65	83.72	<0.0001
AB	0.3	3.23	1	3.23	0.91	0.3462
AC	0.25	2.19	1	2.19	0.62	0.4369
AD	0.38	5.12	1	5.12	1.44	0.2372
BC	-0.14	0.50	1	0.5	0.14	0.7102
BD	2.55	155.73	1	155.73	43.8	<0.0001
CD	0.71	11.99	1	11.99	3.37	0.0738
B ²	0.14	0.22	1	0.22	0.062	0.805
C ²	0.06	0.043	1	0.043	0.012	0.9127
D ²	-0.24	0.70	1	0.7	0.2	0.6592
残差		142.22	40	3.56		
校正 总和		1108.96	53			

其中,式(8)是酵母型,式(9)是菌丝型。

2.4 发酵条件对木糖转化率的影响

木糖转化率回归模型方差分析见表5,表中所得回归方程达到显著($p<0.0001$),决定系数 $R^2=0.6351$,表明63.51%的实验数据的变异性可用此回归模型来解释。由表5可知,对木糖转化率影响极显著的因子有A(菌型)($p=0.0002$),B(温度)($p<0.0001$),D(初始木糖浓度)($p<0.0001$);因子C(pH)($p=0.018$)影响达到显著水平。这表明菌型、温度和初始木糖浓度的主效应明显。依据系数估计值 $A=3.26$ 、 $B=4.79$ 和 $D=4.28$,可知影响因子的主效应主次顺序为:温度>初始木糖浓度>菌型。通过逐步回归分析及式(3)获得木糖转化率对影响木糖转化率的因子-菌型(A)、温度(B)、pH(C)、初始木糖浓度(D)的二次多项式回归模型为

$$Y_3=16.56+3.26\times A+4.79\times B+2.38\times C+4.28\times D+1.19\times A\times B-0.86\times A\times C-1.18\times A\times D-1.87\times B\times C+0.15\times B\times D+1.50\times C\times D \quad \text{式(10)}$$

由公式(1)、(10)得出:

$$Y_3=-104.01725+3.27274\times B+12.17603\times C-0.29831\times D-0.37304\times B\times C+1.45012E-003\times B\times D+0.074967\times C\times D \quad \text{式(11)}$$

$$Y_3=-96.02704+3.74855\times B+10.46552\times C-0.41613\times D-0.37304\times B\times C+1.45012E-003\times B\times D+0.074967\times C\times D \quad \text{式(12)}$$

其中,式(11)是酵母型,式(12)是菌丝型。

表5 木糖转化率回归模型方差分析

Table 5 ANOVA for regression model of conversion rate of xylose

来源	系数估计值	平方和	自由度	均值平方	F值	P值
模型	16.56	2529.17	10	252.92	7.49	<0.0001
A	3.26	575.57	1	575.57	17.03	0.0002
B	4.79	824.94	1	824.94	24.41	<0.0001
C	2.38	204.30	1	204.3	6.05	0.018
D	4.28	659.17	1	659.17	19.51	<0.0001
AB	1.19	50.94	1	50.94	1.51	0.2262
AC	-0.86	26.33	1	26.33	0.78	0.3823
AD	-1.18	49.97	1	49.97	1.48	0.2306
BC	-1.87	83.49	1	83.49	2.47	0.1233
BD	0.15	0.50	1	0.5	0.015	0.9033
CD	1.5	53.95	1	53.95	1.6	0.2132
残差		1452.90	43	33.79		
校正总和	3982.06	53				

2.5 模型交互项解析

由表3~表5可知:对终木糖浓度的影响,交互项BD达极显著水平,AC、AD达显著水平;对于木糖醇浓度的影响,交互项BD达极显著水平;对木糖转化率的影响,各交互项均不显著。故选择交互项BD解析其对终木糖浓度和木糖醇浓度的影响。

由图1可知,当 $pH=7.0$ 时,初始木糖浓度与终木糖浓度的关系为正相关,发酵温度与终木糖浓度的关系为反相关。发酵温度较高时,木糖的利用率较高。当

发酵温度为 37°C 时,即使初始木糖浓度为 60mg/mL ,终木糖浓度仍处于较低水平。这说明发酵温度、初始木糖浓度及其交互作用对木糖的利用率影响很大。比较酵母型(图1a)和菌丝型(图1b)的响应面图,前者较后者陡峭,表明在同一发酵温度和初始木糖浓度条件下,菌丝型发酵液中终木糖浓度低于酵母型,这就表明菌丝型利用木糖的能力优于酵母型。

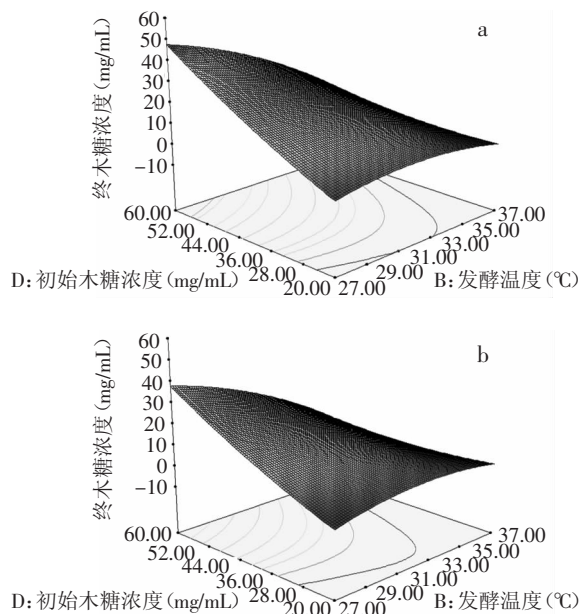


图1 初始木糖浓度与发酵温度对终木糖浓度的影响

Fig.1 Effect of initial xylose concentration and fermentation temperature on final concentration of xylose

由图2可知,当 $pH=7.0$ 时,发酵温度和初始木糖浓度与木糖醇浓度的关系均为正相关。发酵温度较低时,需增加初始木糖浓度才能提高木糖醇产量;同

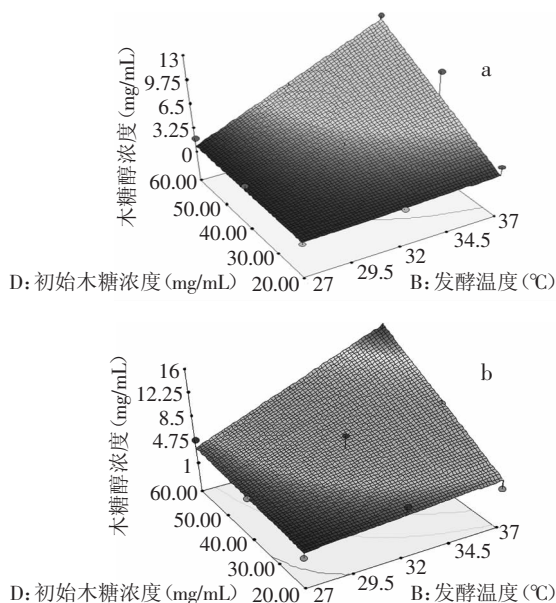


图2 初始木糖浓度与发酵温度对木糖醇产量的影响

Fig.2 Effect of initial xylose concentration and fermentation temperature on xylitol production

(下转第194页)

- [3] 魏练平,毛非鸿,蒋立科,等. 橡子营养成分及其加工利用的初步研究[J]. 安徽农学通报,2007,13(9):137.
- [4] 郑菲,黄亮,李安平,等. 响应面法优化橡实壳中多酚提取工艺条件[J]. 食品与机械,2011(1):49-51.
- [5] 谢碧霞,谢涛. 我国橡实资源的开发利用[J]. 中南林学院学报,2002,22(3):37-41.
- [6] Chiou J W. The antioxidant activity and the chemical structure of selected components of acorns and their potential use as inhibitors of milk oxidation[J]. Diss Abstr Int B,1990,50(11):4836.
- [7] 张志健,王勇. 我国橡子资源开发利用现状与对策[J]. 氨基酸和生物资源,2009,31(3):10-14.
- [8] Guo X W. A method to extract chemical components from Chinese herbs-ultrasonic method[J]. Natural Product Research and Development,1999,11(3):37-40.
- [9] Josefine P,Hansolof J. Aqueous polymer two-phase systems

- formed by new thermoseparating polymers[J]. Bioseparation,2000(9):105-116.
- [10] Vania G L,Aparecida B M,Igorgose B S,et al. Separation of Cd and Ni from Ni-Cd batteries by an environmentally safe methodology employing aqueous two-phase systems[J]. Journal of Power Sources,2009,193:908-913.
- [11] Chethanas S,Chetan A N,Raghavarao KSMS. Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains[J]. Journal of Food Engineering,2007,81:679-687.
- [12] 江咏,李晓玺,李琳,等. 双水相萃取技术的研究进展及应用[J]. 食品工业科技,2007,28(10):235-238.
- [13] 高强,崔岩岩,陈火林,等. 丙酮-硫酸铵双水相体系分离纯化红花红色素[J]. 化学研究与应用,2007,19(6):679-682.
- [14] 王志华,马会民,马泉莉,等. 双水相萃取体系的研究[J]. 应用化学,2001,18(3):173-175.

(上接第148页)

理,初始木糖浓度在低水平时,需升高发酵温度才能提高木糖醇浓度。当发酵温度和初始木糖浓度均在低水平时,木糖醇浓度最低;随着二因素水平同时升高,木糖醇浓度逐渐升高。当发酵温度为37℃、初始木糖浓度为60mg/mL时,木糖醇浓度达到最高水平。这说明发酵温度、初始木糖浓度及其交互作用对木糖醇产量的影响很大。比较酵母型(图2a)和菌丝型(图2b)的响应面图,后者较前者陡峭,说明在同一发酵温度和初始木糖浓度下,菌丝型发酵液中木糖醇浓度高于酵母型发酵液,这就表明菌丝型木糖醇产量高于酵母型。

2.6 实验预测

基于Design Expert软件的优化功能获得最优发酵条件,木糖醇的最大预测值为17.21mg/mL,此时四个关键因子的取值如表6所示:菌丝型热带假丝酵母,发酵温度37℃,pH8,初始木糖浓度60mg/mL。为了验证模型的有效性,取响应值为17.21mg/mL,进行了6组模型验证实验,结果见表6:木糖醇浓度预测值与实测值相近,相对误差均在2%以下,证明应用响应面法优化木糖醇发酵工艺的关键影响因子是可行的。

表6 木糖醇浓度的模型预测值及实验值

Table 6 Experimental and predicted values of xylitol concentration

编号	因子			木糖醇浓度(mg/mL)		相对误差(%)
	菌型	发酵温度(℃)	pH	初始木糖浓度(mg/mL)	预测值 真实值	
1	菌丝型	37	8	60	17.21 17.19	0.13
2	菌丝型	37	8	60	17.21 17.32	0.63
3	菌丝型	37	8	60	17.21 17.02	1.13
4	菌丝型	37	8	60	17.21 16.95	1.49
5	菌丝型	37	8	60	17.21 17.26	0.30
6	菌丝型	37	8	60	17.21 17.14	0.43

3 结论

本实验利用菌丝型和酵母型热带假丝酵母发酵

生产木糖醇,定期测定发酵液中木糖的减少量和木糖醇的增加量,利用Design Expert 软件对实验进行设计及结果分析,分别建立木糖浓度,木糖醇浓度与4个关键因子(菌型、发酵温度、pH、初始木糖浓度)的二次多项式回归模型并对模型进行解析。结果表明,菌丝型热带假丝酵母转化木糖为木糖醇的能力高于酵母型;升高发酵温度,有利于木糖转化为木糖醇,而pH升高对转化过程并没有明显促进;发酵液中初始木糖浓度与木糖转化率呈正相关关系。最终基于Design Expert 软件的优化功能获得了最优发酵工艺条件——菌丝型酵母,发酵温度37℃,pH8,初始木糖浓度60mg/mL,此时木糖醇浓度达到17.21mg/mL。采用该工艺进行实验室发酵的实测值与预测值很相近,相对误差均小于2%。

参考文献

- [1] Arraes F B M, Benoliel B, Burtet R T,et al. General metabolism of the dimorphic and pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*[J]. Genetics and Molecular Research, 2005,4(2):290-308.
- [2] Hahn-Hagerdal B, Jeppsson H, Skoog K, et al. Biochemistry and physiology of xylose fermentation by yeasts[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1994,16:933-943.
- [3] 马伟超,李一婧,任伟亮,等. 热带假丝酵母两态型的控制研究[J]. 中国酿造,2010(12):104-108.
- [4] 邓立红,王艳辉,张扬,等. 热带假丝酵母发酵生产木糖醇的研究[J]. 食品与发酵工业,2004,30(9):37-40.
- [5] 王旭,苏桂峰. 假丝酵母发酵玉米芯半纤维素水解液生产木糖醇[J]. 中国酿造,2009(6):42-45.
- [6] 张军伟,傅大放,彭奇均,等. 响应面法优化酸水解稻秆制木糖的工艺参数[J]. 农业工程学报,2009,25(11):253-256.
- [7] Rodrigues D C G A, Silva S S, Felipe M G A. Using response-surface methodology to evaluate xylitol production by *Candida guilliermondii* by fed-batch process with exponential feeding rate[J]. Journal of Biotechnology, 1998,62:73-77.