

微生物转化生产木糖醇中工业化原料 培养基组成的优化

李耕 章克昌 徐柔 高修功

(生物工程学院)

摘要 对用酵母转化木糖醇中工业化原料培养基组成的优化进行了较系统的研究,研究中采用了 Plackett-Burman^[1]和响应曲面法,得到了一个完全用工业化原料组成的优化培养基,摇瓶转化率最高达 80.4%。实验结果表明,在保持较高转化率的前提下,发酵培养基可以采用较廉价的工业化原料。

关键词 木糖;酵母;木糖醇;工业化原料

中图分类号 Q97

0 引言

木糖醇是一种天然存在的五碳糖醇,是人和动物碳水化合物代谢的普通中间产物^[2],广泛存在于各种果蔬中,但含量很少^[3,4]。1987年3月在荷兰召开的国际食品添加剂会议上,木糖醇被正式列为国际A级(安全级)食品添加剂,并在各国医药、食品等部门得到广泛应用。目前,商业化生产木糖醇的方法只有氢化法,但氢化法的生产过程较为复杂,安全要求高,使得木糖醇价格高,应用市场没有得到很好地开拓。而微生物法生产木糖醇,可以弥补氢化法的许多缺点。本实验室在用较优原料转化木糖为木糖醇已取得较好结果的基础上,对发酵培养基工业化原料的替代进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

Candida WQ-1 由本实验室保存的 C. Rux 经选育而成。

1.2 培养基(g/L)

- 1) 斜面保藏培养基 葡萄糖 50; 酵母膏 5; 麦芽汁 30; 琼脂 20
- 2) 液体种子培养基 木糖 20; 酵母膏 2.5; 酵母氮基 1.5; 蛋白胨 2.5
- 3) RSA 法优化培养基 玉米浆 30; 豆饼水解液 10; 添加剂 X 2; K₂HPO₄ 1;

收稿日期: 1996-01-23

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5; $(NH_4)_2SO_4$ 20; $CaCO_3$ 20; 木糖 浓度按需要而定

1.3 主要实验室药品与试剂

木糖(江苏滨海东方木糖厂及德国 MERCK 产品),木糖醇(美国),玉米浆(无锡酶制剂厂提供),高碘酸,氯化亚锡,变色酸,地衣酚^[5]。

1.4 培养条件

培养基经 0.1MPa, 20min 灭菌,冷却,接种后将 250ml 摇瓶置于旋转式摇瓶机上,控制转速 160r/min,培养温度 32 C,并隔时取样分析。

1.5 分析方法

木糖、木糖醇含量测定 离子色谱法^[5]、化学法^[6]。

2 结果与讨论

2.1 重点因素选择试验

发酵培养基中各组分对转化率影响的情况,因涉及到的因素多,很难用一些常规方法处理。Plackett-Burman 是一种以不完全平衡块为原理的实验设计,能够从众多变量中快速、有效地筛选出最为重要的一些因素,供进一步详细研究用,具有数据处理简单,可适用于多个实验因子等优点。

本实验对培养基中各组分对转化率影响的情况进行了研究。选用试验次数 $N = 8$ 的实验设计,考察了 6 个因素。实验设计及结果见表 1,各因素所代表的参数、水平及分析结果见表 2。培养基中木糖质量分数为 5%, $CaCO_3$ 质量分数为 2%,其余各成分按表 2 安排。

表 1 $N = 8$ 的 Plackett-Burman 实验设计与结果

实验号	A	B	C	D	E	F	G	转化率 (%)
1	+	+	+	-	+	-	-	73.1
2	-	+	+	+	-	+	-	65.5
3	-	-	+	+	+	-	+	69.1
4	+	-	-	+	+	+	-	79.6
5	-	+	-	-	+	+	+	75.2
6	+	-	+	-	-	+	+	65.0
7	+	+	-	+	-	-	+	76.3
8	-	-	-	-	-	-	-	61.4

表 2 因素、水平及影响效果

因素代码	参 数	水平 (%)		效果	t 值	置信概率 (%)
		低(-)	高(+)			
A	添加剂 X	0.1	0.4	5.7	3.8	90
B	$(NH_4)_2SO_4$	0.5	3	3.75	2.5	75
C	豆饼水解液	0.5	3	-4.95	3.3	90
D	甲醇	0.5	2	3.95	2.63	75
E	玉米浆	1.0	5	7.2	4.8	90
F	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ + K_2HPO_4	0	0.1	1.35	0.9	
(G)	空白			1.5		

分析结果表明,添加剂 X、豆饼水解液、玉米浆三因素对转化率影响显著,其置信概率为 90%,而其它因素对转化率影响显著的置信概率只有 75%。

2.2 RSA 法优化培养基

响应曲面分析法(RSA)是数学与统计学相结合的产物,由于采用了合理的实验设计,能以最经济的方式,用很少的实验数量和时间对实验进行全面研究,从而取得明确、有目的结论。Box 及其合作者于 50 年代完善了响应曲面分析法。特别是在培养基优化上已经证明很有效^[7,8]。通过重点因素选择实验,我们确定了三个对转化率影响显著的因子,以这三个因子为研究对象,进一步考察它们对转化率的影响,并对培养基的组成进行优化。设豆饼水解液(X_1),玉米浆(X_2),添加剂 X(X_3)三个因素为自变量,以转化率(Y)为响应值,设计了三因素三水平的实验。发酵培养基中的其他组分为(g/L):木糖 50, K_2HPO_4 1,

MgSO₄ · 7H₂O 0.5, 硫酸铵 20, 碳酸钙 20. 实验安排及结果见表 3.

表 3 响应面分析实验安排及结果

实验号	豆饼水解液	因玉米浆	素添加剂 X	转化率 (%)	实验号	豆饼水解液	因玉米浆	素添加剂 X	转化率 (%)
1	-1(0.5%)	1(2.5%)	0(0.2%)	62.5	9	1.(1.5%)	-1	0	70.8
2	-1	0(3.0%)	-1(0.1%)	70.4	10	1	0	-1	74.3
3	-1	0	1(0.3%)	64.1	11	1	0	1	55.8
4	-1	1(3.5%)	0	76.7	12	1	1	0	71.7
5	0(1.0%)	-1	-1	72.6	13	0	0	0	78.2
6	0	-1	1	60.3	14	0	0	0	79.5
7	0	1	-1	74.2	15	0	0	0	80.4
8	0	1	1	68.9					

各实验因子对响应值的影响可用下列函数表示:

$$Y = 79.4 - 0.137X_1 + 3.16X_2 - 5.3X_3 - 5.9X_1^2 - 3.05X_2^2 - 7.32X_3^2 - 3.33X_1X_2 - 3.05X_1X_3 + 1.75X_2X_3$$

从方差分析表 4 可以看出,用回归方程描述因子与响应值之间的关系时,其因变量与自变量之间的线性关系是显著的 ($F > f_{0.01}(9,5)$),线性相关系数为 0.974. 对回归方程各项方差的进一步检验也可以看出,方程的失拟项很小,因此可用回归方程代替实验真实点对实验结果进行分析. 回归方程各项的方差分析(表 5)表明,方程一次项、二次项、交互项的影响显著,各个具体实验因子对响应值的影响并不是简单的线性关系.

表 4 回归方程方差分析表

方差来源	自由度	平方和	均方差	F 值	相关系数
回归	9	718.6	79.84	20.64	0.974
残差	5	19.34	3.868		
总离差	14	737.9			

注: $f_{0.01}(9,5) = 10.2$

表 5 回归方程方差分析表

方差来源	自由度	均方差	F 值	显著性
一次项	3	33.87	83.07	*
二次项	3	35.57	87.19	*
交互项	3	10.41	25.52	*
失拟项	3	1.877	4.602	
误差	2	0.6115	2	

注: $f_{0.01}(3,2) = 99.2$; $f_{0.05}(3,2) = 19.2$;

$f_{0.1}(3,2) = 9.16$;

图 1、图 2 是响应面分析立面图和平面图,从图中可直观地看出各因子对响应值影响的

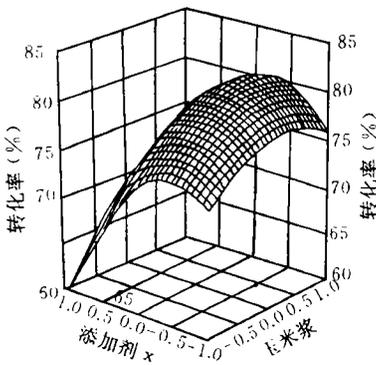


图 1 $Y = f(X_2, X_3)$ 响应面分析立面图

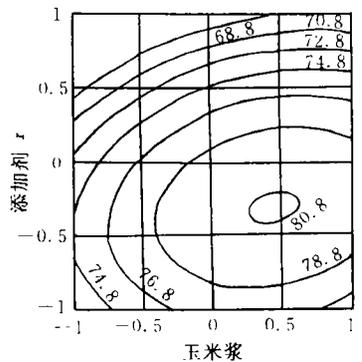


图 2 $Y = f(X_2, X_3)$ 响应面分析平面图

变化趋势。

对回归方程取一阶偏导等于零并整理可得培养基最优配比:

$$X_1 = 0.954\% \quad X_2 = 3.24\% \quad X_3 = 0.171\%$$

考虑到培养基实际配制的方便,取豆饼水解液为1%,玉米浆为3%,添加剂X为0.2%。因此,用工业化原料替代实验室试剂级药品作为培养基组成是可行的,得到的优化培养基有利于木糖的转化,这对于进一步降低生产成本,发展微生物转化法生产木糖醇有着重要的意义。

参 考 文 献

- 1 Plackett R L., Burman J P. *Biometrika*. 1946,55:29
- 2 Hollmann S, Touster O J. *Biol. Chem.* 1957,225:87
- 3 Washuttle J, Riederer P, Banchen E J. *Food Sci.* 1973,38:1262
- 4 Makinen K K, Soderling E J. *Food Sci.* 1980,45:367
- 5 李 耕. 微生物法转化木糖为木糖醇的研究. [硕士学位论文]. 无锡轻工大学生物工程学院,1995
- 6 吴 星等. 用玉米蕊水解液发酵木糖醇的研究. *无锡轻工大学学报*,1993,12(1):23~26
- 7 Uiroyuki Horitsu, Yuuichi Yahashi, et al. *Biotechnology and Bioengineering*. 1992,40:1085~1092
- 8 Jussi Tammissola, Heikki Ojamo, et al. *Biotechnology and Bioengineering*. 1993,42:1301~1310

Optimization of Composition of Industrial Raw Material Medium on Bioconversion of Xylose to Xylitol by Yeast

Li Geng Zhang Kechang Xu Rou Gao Xiugong

(School of Bioengineering)

Abstract Systematic studies were carried out on the optimization of the Composition of industrial raw material medium for Conversion of Xylose to Xylitol by yeast. This optimizing medium only industrial was for mulated via Plackett-Bumman design and Response Surface Analysis (RSA). A highest conversion rate of 80.4% was obtained in 250ml shaking-flask fermentation experiment using this optimizing medium. The result indicated the cheap industrial raw materials could be used for preparation of fermentation medium while maintaining the conversion rate at the same higher level.

Subject-words Xylose: Yeast: Xylito: Industrial raw material