

文章编号 :1009 - 038X( 2001 )01 - 0020 - 04

# 基于遗传算法的木糖醇发酵培养基的优化

陈宏文<sup>1</sup>, 方柏山<sup>1</sup>, 谢晓兰<sup>1</sup>, 胡宗定<sup>2</sup>

( 1. 华侨大学化工学院, 福建泉州 362011 ; 2. 天津大学化工学院, 天津 300072 )

**摘 要 :**运用遗传算法,利用莫格假丝酵母由木糖生产木糖醇的发酵培养基进行优化,用 40 个实验样本完成了 6 种培养基成分、50 个浓度水平的优化任务.实验结果表明,利用遗传算法可优化培养基成分含量,取得更好的发酵效果.按照优化后的培养基组成,由 50 g/L 木糖获得了 29.7 g/L 木糖醇,理论转化率为 65.1%,比优化前提高了 3.5%.

**关键词 :**木糖 ; 木糖醇 ; 培养基 ; 遗传算法

中图分类号 :Q935

文献标识码 :A

## Medium Optimization for Production of Xylitol by Genetic Algorithms

CHEN Hong-wen<sup>1</sup>, FANG Bai-shan<sup>1</sup>, XIE Xiao-lan<sup>1</sup>, HU Zong-ding<sup>2</sup>

( 1. College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362011, China ; 2. College of Chemical Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China )

**Abstract :** Medium optimization of the batch fermentation for producing xylitol from D-xylose by *Candida mogii* using genetic algorithm( GA ) is studied. The 50 concentration levels of 6 medium components are optimized within 40 experiments. The results show that GA can be applied in the medium optimization and better results are obtained. By employing optimized medium composition, a final xylitol concentration of 29.7 g/L is obtained from 50 g/L xylose with a theoretical yield of 65.1% of that is improved by 3.5% compared to the results with the medium before optimization.

**Key words :** xylose ; xylitol ; medium ; genetic algorithms

木糖醇(分子式  $C_5H_{12}O_5$ )是一种五碳糖醇,是人体正常代谢的中间产物<sup>[1]</sup>.木糖醇集甜味剂、营养剂、治疗剂于一体,具有多种优良特性,广泛用于国防、医药、化工、日化、涂料及食品等行业<sup>[2]</sup>.

目前国内外工业规模生产木糖醇采用的是化学法.自从 1966 年 Onishi 和 Suzuki 首次报道许多酵母菌能利用 D-木糖生产木糖醇以来<sup>[3]</sup>,国际上实验室规模发酵法生产木糖醇的研究报导颇多,其中不

乏有关发酵培养基优化的研究.然而,这些研究所采用的方法是传统的单因素试验法或因于设计法.基于利用莫格假丝酵母由木糖发酵法生产木糖醇的研究,本文引用 GA 法于木糖醇发酵法培养基优化研究,以期一方面提高木糖醇产量,另一方面降低培养基成本,为今后扩大木糖醇发酵规模及研究用游离酶连续生产木糖醇奠定基础,并为研究其它发酵产品的培养基优化积累经验.

收稿日期 :1999 - 12 - 23 ;修订日期 :2000 - 09 - 06.

基金项目 :国家自然科学基金( 29776025 )和生物反应器工程国家重点实验室开发项目资助课题.

作者简介 :陈宏文( 1969 - ),女,浙江德清人,工学硕士,讲师.

# 1 材料

## 1.1 菌种

莫格假丝酵母( *Candida mogii* ATCC 18364 )源于美国 Rockville MD , 4 ℃ 下用马铃薯琼脂保存.

## 1.2 原料和试剂

D-木糖由福建漳州糖厂提供 ,木糖醇系美国 Sigma 公司产品 ,其它药品均为常规药品.

## 1.3 培养基

1.3.1 斜面培养基 马铃薯琼脂培养基.

1.3.2 种子培养基( g/L ) 木糖 40 ,葡萄糖 20 , (  $\text{NH}_4$  ) $_2$   $\text{HPO}_4$  4 , (  $\text{NH}_4$  ) $_2$   $\text{SO}_4$  1 ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  4 ,  $\text{MgSO}_4$  1 , 酵母浸膏 6 ,蛋白胨 6.5 ; pH 5.

1.3.3 发酵培养基( g/L ) 取 100 g/L 木糖溶液 110 mL 于三角瓶中 ,木糖溶液与一定配比的培养基成分分开灭菌后( 121 ℃ ,20 min ) ,混合于同一 300 mL 三角瓶 ,用 HCl 和 NaOH 调节至 pH 5 ,即得到装液量为 220 mL ,初始木糖质量浓度为 50 g/L 的发酵培养基.

# 2 方法

## 2.1 培养方法

2.1.1 种子培养 挑取保存在斜面上的菌种三环 , 接到盛有 170 mL 种子培养基的 300 mL 三角瓶中 , 于 30 ℃ 下培养 48 h ,摇床转速 200 r/min .所得菌体离心洗涤两次 ,悬浮于 5 mL 无菌生理盐水中备用.

2.1.2 发酵 将 5 mL 种子悬浮液接入发酵培养基中 ,30 ℃ 下培养 96 h ,摇床转速 200 r/min .

## 2.2 分析方法

细胞含量测定采用干重法 ,木糖用对 - 溴苯胺试剂法<sup>[4]</sup> ,木糖醇用 Nash 试剂法<sup>[5]</sup>.

## 2.3 优化方法——GA

2.3.1 实验方案 所考察的木糖醇发酵培养基由 7 种成分组成 ,除了因  $\text{CaCl}_2$  的含量较低 ,固定为 0.1 g/L 外 ,其它 6 种成分及其含量如下 :酵母浸膏 0.1 ~ 10 g/L ,蛋白胨 0.04 ~ 4.0 g/L (  $\text{NH}_4$  ) $_2$   $\text{SO}_4$  0.05 ~ 5.0 g/L (  $\text{NH}_4$  ) $_2$   $\text{HPO}_4$  0.05 ~ 5.0 g/L ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.1 ~ 10 g/L ,  $\text{MgSO}_4$  0.005 ~ 0.5 g/L .把每个组分划分为 50 等分 ,即成为 6 因素 50 水平的培养基优化问题.

2.3.2 GA 的应用 根据 GA 的基本原理<sup>[4]</sup> ,从随机产生的初始种群出发 ,通过选择、交叉、变异等遗传操作 ,使群体一代一代地进化到搜索空间中越来越好的区域.

采用多参数二进制编码方式 .因每个参数分为

50 个水平 ,故每个参数的子串长度  $l$  为 6 即可(  $2^6 = 64$  ).6 个参数组合在一起形成长度  $L$  为 36 的染色体( 即一个个体 ).为了提高个体之间的竞争力 ,本文引入适应度函数线性转换.

由 GA 随机产生初始种群 ,种群大小取 10 ,即 10 种实验方案 .每种实验方案平行做两次 ,取两次测得的木糖醇含量平均值作为适应度函数值 .通过分析  $2 \times 10$  批实验数据 ,用转轮选择法( 适应度比例法 )从种群中挑选出优良个体作为父代繁殖子孙 .随机配对后 ,每代个体之间通过单点交叉( 概率为  $P_c = 0.6$  ) ,单点变异( 概率为  $P_m = 0.05$  )产生新的基因型和基因组合 ,交流各自的优秀基因组成 .所产生的新子代码串经解码 ,即可得到一组新的实验方案 .如此重复 ,直至得到较满意的解为止.

# 3 结果与讨论

运用 GA 进行了 4 代共 80 瓶摇瓶实验 ,如果每个参数的取值划分为 10 个区域 ,每个区域包括 10 个浓度水平 ,从第 0 代到第 3 代各参数取值变化情况如表 1 ~ 6 所示.

由 GA 产生的每一代实验方案中 ,随着进化的进行 ,各个参数逐渐收敛到一个或几个区域里 ,每个区域里个体数目的多少与该区域上一代的适应度函数值大小有关.

(  $\text{NH}_4$  ) $_2$   $\text{SO}_4$  浓度的优化见表 1 .第 0 代 ,随机产生实验方案 ,几乎覆盖整个取值范围 ;而到第 3 代 ,90% 的实验集中到 4.50 ~ 5.0 g/L 的初始质量浓度范围内 ,即收敛到同一个质量浓度区域 ,这表明该参数与其它参数没有交互作用 .此外 ,在第 3 代 , (  $\text{NH}_4$  ) $_2$   $\text{HPO}_4$  有 90% 的实验集中到初始质量浓度为 0.50 ~ 1.96 g/L 范围内 ,见表 2 .酵母浸膏、蛋白胨均为 100% 的实验分别收敛在 3.0 ~ 4.9 g/L 和 0.04 ~ 0.76 g/L 的初始质量浓度范围 ,见表 3 ~ 4 ,即收敛到相邻的质量浓度区域 ,这可认为它们与其它参数没有明显的交互作用.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{MgSO}_4$ ( 表 5 ~ 6 )则收敛到两个有间隔的浓度区域 .如在最后一代 40% 的  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  的质量浓度值在 0.1 ~ 0.90 g/L 范围内 ,50% 在 5.0 ~ 5.9 g/L 范围内 ,50% 的  $\text{MgSO}_4$  质量浓度值分布在 0.25 ~ 0.295 g/L 范围内 ,40% 在 0.35 ~ 0.395 g/L ,说明这些参数与其它参数有交互作用.

优化前后木糖醇发酵培养基及产量的变化情况如表 7 所示.

表 1 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 初始质量浓度区域分布

Tab.1 The initial (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration distribution

| 质量浓度/(g/L) | 区域分布/% |       |       |       |
|------------|--------|-------|-------|-------|
|            | 第 0 代  | 第 1 代 | 第 2 代 | 第 3 代 |
| 0.05~0.45  | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 0.50~0.95  | 10     | 0     | 0     | 0     |
| 1.00~1.45  | 10     | 0     | 0     | 0     |
| 1.50~1.95  | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 2.00~2.45  | 10     | 10    | 10    | 10    |
| 2.50~2.95  | 10     | 0     | 0     | 0     |
| 3.00~3.45  | 20     | 20    | 20    | 0     |
| 3.50~3.95  | 10     | 10    | 0     | 0     |
| 4.00~4.45  | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 4.50~5.00  | 30     | 60    | 70    | 90    |

表 2 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 初始质量浓度区域分布

Tab.2 The initial (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> concentration distribution

| 质量浓度/(g/L) | 区域分布/% |       |       |       |
|------------|--------|-------|-------|-------|
|            | 第 0 代  | 第 1 代 | 第 2 代 | 第 3 代 |
| 0.05~0.45  | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 0.50~0.95  | 20     | 10    | 30    | 20    |
| 1.00~1.45  | 10     | 30    | 20    | 20    |
| 1.50~1.95  | 20     | 20    | 40    | 50    |
| 2.00~2.45  | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 2.50~2.95  | 10     | 10    | 0     | 0     |
| 3.00~3.45  | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 3.50~3.95  | 30     | 20    | 0     | 0     |
| 4.00~4.45  | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 4.50~5.00  | 10     | 10    | 10    | 10    |

表 3 酵母浸膏初始质量浓度区域分布

Tab.3 The initial YE concentration distribution

| 质量浓度/(g/L) | 区域分布/% |       |       |       |
|------------|--------|-------|-------|-------|
|            | 第 0 代  | 第 1 代 | 第 2 代 | 第 3 代 |
| 0.1~0.9    | 10     | 30    | 30    | 40    |
| 1.0~1.9    | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 2.0~2.9    | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 3.0~3.9    | 20     | 10    | 0     | 0     |
| 4.0~4.9    | 0      | 0     | 10    | 0     |
| 5.0~5.9    | 30     | 30    | 30    | 50    |
| 6.0~6.9    | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 7.0~7.9    | 20     | 10    | 0     | 0     |
| 8.0~8.9    | 20     | 20    | 30    | 10    |
| 9.0~10     | 0      | 0     | 0     | 0     |

表 4 蛋白胨初始质量浓度区域分布

Tab.4 The initial PEP concentration distribution

| 质量浓度/(g/L) | 区域分布/% |       |       |       |
|------------|--------|-------|-------|-------|
|            | 第 0 代  | 第 1 代 | 第 2 代 | 第 3 代 |
| 0.04~0.36  | 20     | 30    | 50    | 40    |
| 0.40~0.76  | 20     | 40    | 50    | 60    |
| 0.80~1.16  | 10     | 0     | 0     | 0     |
| 1.20~1.56  | 20     | 10    | 0     | 0     |
| 1.60~1.96  | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 2.00~2.36  | 20     | 20    | 0     | 0     |
| 2.40~2.76  | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 2.80~3.16  | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 3.20~3.56  | 10     | 0     | 0     | 0     |
| 3.60~4.00  | 0      | 0     | 0     | 0     |

表 5 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 初始质量浓度区域分布

Tab.5 The initial KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> concentration distribution

| 质量浓度/(g/L) | 区域分布/% |       |       |       |
|------------|--------|-------|-------|-------|
|            | 第 0 代  | 第 1 代 | 第 2 代 | 第 3 代 |
| 0.1~0.9    | 10     | 30    | 30    | 40    |
| 1.0~1.9    | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 2.0~2.9    | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 3.0~3.9    | 20     | 10    | 0     | 0     |
| 4.0~4.9    | 0      | 0     | 10    | 0     |
| 5.0~5.9    | 30     | 30    | 30    | 50    |
| 6.0~6.9    | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 7.0~7.9    | 20     | 10    | 0     | 0     |
| 8.0~8.9    | 20     | 20    | 30    | 10    |
| 9.0~10     | 0      | 0     | 0     | 0     |

表 6 MgSO<sub>4</sub> 初始质量浓度区域分布

Tab.6 The initial MgSO<sub>4</sub> concentration distribution

| 质量浓度/(g/L)  | 区域分布/% |       |       |       |
|-------------|--------|-------|-------|-------|
|             | 第 0 代  | 第 1 代 | 第 2 代 | 第 3 代 |
| 0.005~0.045 | 10     | 10    | 10    | 0     |
| 0.050~0.095 | 20     | 10    | 0     | 0     |
| 0.100~0.145 | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 0.150~0.195 | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 0.200~0.245 | 0      | 0     | 0     | 0     |
| 0.250~0.295 | 30     | 40    | 40    | 50    |
| 0.300~0.345 | 10     | 0     | 0     | 0     |
| 0.350~0.395 | 20     | 40    | 50    | 40    |
| 0.400~0.445 | 10     | 0     | 0     | 0     |
| 0.450~0.500 | 0      | 0     | 0     | 10    |

表 7 优化前后培养基组成比较

Tab.7 The medium composition and production before and after optimization

| 培养基组成                                             | 优化前<br>质量浓度/<br>( g/L ) | 优化后<br>质量浓度/<br>( g/L ) | 变化率/<br>% | 培养基组成                           | 优化前<br>质量浓度/<br>( g/L ) | 优化后<br>质量浓度/<br>( g/L ) | 变化率/<br>% |
|---------------------------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-----------|
| ( NH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>  | 5                       | 4.59                    | - 8.2     | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> | 10                      | 0.45                    | - 95.5    |
| ( NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 5                       | 1.05                    | - 79.0    | MgSO <sub>4</sub>               | 0.5                     | 0.37                    | - 26      |
| 酵母浸膏                                              | 10                      | 3.72                    | - 62.8    | CaCl <sub>2</sub>               | 0.1                     | 0.1                     | /         |
| 蛋白胨                                               | 4                       | 0.69                    | - 82.8    | 木糖醇                             | 28.1                    | 29.7                    | + 5.7     |

研究表明 :运用 GA 能够以较少的实验次数( 2 × 40 )在较大搜索区域内 ,完成培养基优化任务 .而用正交设计需要 50<sup>2</sup> 次实验 ,全部实验次数为 50<sup>6</sup> .因此 ,GA 不仅提高了发酵水平 ,而且大幅度降低了培养基成分含量 .

参考文献 :

[ 1 ] HOLLMANN S ,TOUSTER O. The L-xylulose-xylitol enzyme and other polyol dehydrogenase of guinea pig liver mitochondria[ J ]. **J Biol Chem** ,1957 225 87.

[ 2 ] 尤 新 .木糖醇的生产和应用[ M ].北京 :中国轻工业出版社 ,1984.1 ~ 3.

[ 3 ] ONISHI H ,SUZUKI T. The production of xylitol , L-arabinitol and ribitol by yeasts[ J ]. **Agric Biol Chem** , 1966 30( 11 ) 39 ~ 44.

[ 4 ] LISE DESCHATELETS , ERNEST K C YU. A simple pentose assay for biomass conversion studies[ J ]. **Appl Microbiol Biotechnol** , 1986 , 24 379 ~ 385.

[ 5 ] SONG HAE BOK , ARNOLD L DEMAINE. An improved colorimetric assay for polyols[ J ]. **Analytical Biochemistry** , 1977 81 :18 ~ 20.