

燃料乙醇技术

# 休哈塔假丝酵母 HDYXHT-01 利用木糖生产乙醇的发酵工艺优化

葛菁萍, 刘国明, 杨晓峰, 孙红兵, 凌宏志, 平文祥

黑龙江大学生命科学学院 微生物黑龙江省高校重点实验室, 哈尔滨 150080

**摘要:** 采用 Plackett-Burman (PB) 方法和中心组合设计 (Central composite design, CCD) 对休哈塔假丝酵母 *Candida shehatae* HDYXHT-01 利用木糖发酵生产乙醇的工艺进行优化。PB 试验设计与分析结果表明: 硫酸铵、磷酸二氢钾、酵母粉和接种量是影响木糖乙醇发酵的 4 个关键因素, 以乙醇产量为响应目标, 采用 CCD 和响应面分析法 (Response surface methodology, RSM), 确定了木糖乙醇发酵的最佳工艺为: 硫酸铵 1.73 g/L、磷酸二氢钾 3.56 g/L、酵母粉 2.62 g/L 和接种量 5.66%, 其他发酵条件为: 木糖 80 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L, pH 5.0, 培养温度 30 °C, 装液量 100 mL/250 mL, 摇床转速 140 r/min, 发酵时间 48 h, 在该条件下发酵液中乙醇产量可以达到 26.18 g/L, 是优化前的 1.15 倍。

**关键词:** 休哈塔假丝酵母, 木糖, 乙醇, 响应面分析法

## Optimization of xylose fermentation for ethanol production by *Candida shehatae* HDYXHT-01

Jingping Ge, Guoming Liu, Xiaofeng Yang, Hongbing Sun, Hongzhi Ling, and Wenxiang Ping

Key Laboratory of Microbiology of Heilongjiang Province, College of Life Science, Heilongjiang University, Harbin 150080, China

**Abstract:** Plackett-Burman (PB) design and central composite design (CCD) were applied to optimize of xylose fermentation for ethanol production by *Candida shehatae* HDYXHT-01. The PB results showed that  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , yeast extract and inoculum volume were the main affecting factors. With ethanol productivity as the target response, the optimal fermentation was determined by CCD and response surface analysis (RSM). The optimal fermentation conditions were  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.73 g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  3.56 g/L, yeast extract 2.62 g/L and inoculum volume 5.66%. Other fermentation conditions were xylose 80 g/L,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.1 g/L, pH 5.0 and 250 mL flask containing 100 mL medium and cultivated at 30 °C for 48 h and the agitation speed was 140 r/min. Under this

**Received:** October 13, 2010; **Accepted:** November 24, 2010

**Supported by:** National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA100702-6), National Natural Science Foundation of China (No. 31070446), Educational Commission of Heilongjiang Province (No. 11551z011), Key Scientific and Technological Projects of Heilongjiang Province (No. GA07B401-6), Special Fund for Scientific and Technological Innovative Talents in Harbin (No. RC2010XK002028), High-level Talents (Innovation Team) Projects of Heilongjiang University (No. htdt2010-17).

**Corresponding author:** Wenxiang Ping. Tel/Fax: +86-451-86609016; E-mail: wenxiangp@yahoo.com.cn

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2007AA100702-6), 国家自然科学基金 (No. 31070446), 黑龙江省教育厅重点项目 (No. 11551z011), 黑龙江省科技攻关重大项目 (No. GA07B401-6), 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目优秀学科带头人 (No. RC2010XK002028), 黑龙江大学高层次人才 (创新团队) 支持计划 (No. htdt 2010-17) 资助。

fermentation conditions, ethanol productivity was 26.18 g/L, which was 1.15 times of the initial.

**Keywords:** *Candida shehatae*, xylose, ethanol, response surface methodology

燃料乙醇作为一种安全、清洁的可再生代用燃料的出现,在一定程度上缓解了当今的石油资源危机,已经引起世界各国的高度关注。传统的乙醇发酵工业主要以糖质和粮食类淀粉质为原料,而中国作为人口大国,粮食原料的供应受到很大限制而且成本过高<sup>[1]</sup>,因此,以木质纤维素类资源为原料代替粮食进行乙醇发酵,具有十分重要的现实意义<sup>[2-3]</sup>。木糖是木质纤维原料水解产物中含量仅次于葡萄糖的一种单糖,含量可达到木质纤维水解糖类的35%以上<sup>[4]</sup>。木糖的乙醇发酵一直被人们视为木质纤维原料生物转化生产乙醇的关键因素,适宜的木糖发酵产率和乙醇浓度可以降低工艺总成本的25%以上<sup>[5]</sup>,因此提高木糖的乙醇发酵产率是该技术商业化生产的必要条件。通常用于乙醇发酵的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 只能发酵葡萄糖<sup>[6]</sup>,这样就造成了木糖的浪费。自然界中目前已发现能发酵木糖产乙醇的酵母菌主要有假丝酵母 *Candida*、毕赤氏酵母 *Pichia* 和管囊酵母 *Pachysolen* 3个属<sup>[7]</sup>,它们虽然可以利用木糖,但他们对乙醇的耐受力以及发酵速率远不及酿酒酵母<sup>[8]</sup>。因此,提高这些菌株的乙醇耐受力及提高其发酵速率,成为提高木糖利用率的研究热点。本文所用的休哈塔假丝酵母 *Candida shehatae* HDYXHT-01,是能直接利用木糖进行乙醇发酵并被认为最具有工业价值的菌种之一<sup>[9-10]</sup>,近几年,人们将目光集中在提高该菌株的乙醇利用率上面,采用育种手段<sup>[11-12]</sup>(包括诱变育种、定向驯化、原生质体融合)和优化发酵条件<sup>[7,13]</sup>等方法,相继获得了一些优良性状的菌株。

本文以木糖为唯一碳源,将 Plackett-Burman (PB)<sup>[14]</sup>方法和中心组合设计 (Central composite design, CCD)<sup>[15]</sup>相结合,采用响应面分析法 RSM (Response surface methodology)<sup>[16]</sup>,对休哈塔假丝酵母 HDYXHT-01 木糖乙醇发酵工艺进行了优化,以

期提高该菌株对木糖的转化率及乙醇得率。本研究初步摸索和确定了休哈塔假丝酵母 HDYXHT-01 发酵木糖产生乙醇能力,其木糖利用率、木糖转化率、乙醇耐受力及乙醇产量都处于较高水平,这有利于进一步利用该菌株进行诱变育种及发酵木质纤维素水解产物进行产醇研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种

休哈塔假丝酵母 *Candida shehatae* HDYXHT-01, 黑龙江大学微生物重点实验室提供,由本实验室自行分离并保存,其发酵木糖的性能良好。

#### 1.1.2 培养基

种子培养基 (g/L): 木糖 20, 蛋白胨 20, 酵母粉 10, pH 自然, 108 °C 灭菌 20 min。

木糖初始发酵培养基 (g/L): 木糖 80, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2, 酵母粉 5, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.25, 无水 CaCl<sub>2</sub> 0.25, pH 自然, 108 °C 灭菌 20 min。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 种子液的制备

挑取斜面菌种一环,接入装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 三角瓶中,30 °C、140 r/min 培养 24 h。

#### 1.2.2 发酵液的制备

将种子液按 5% 的接种量接入发酵培养基中,装液量为 100 mL/250 mL 三角瓶,在 30 °C、140 r/min 以兼性厌氧的方式培养 48 h。

### 1.3 分析方法

发酵液中的木糖及乙醇含量通过高效液相色谱 (HPLC) 进行分析。HPLC 条件: 分析系统为 SCL-10A, 包括 LC-10ATvp 泵, RID-10A 示差检测器以及 HPX-87H (300 mm×7.8 mm, Aminex HPX-87H Ion exclusion column) 色谱柱; 分析条件

为示差检测器温度 40 ℃, 色谱柱温度 65 ℃, 流动相用 0.005 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 流速为 0.8 mL/min, 上样量 20  $\mu\text{L}$ , 发酵液分析时间 18 min。

发酵液处理: 取 1 mL 发酵液于 1.5 mL 离心管中, 13 000 r/min 离心 10 min, 保留上清液用于 HPLC 分析。

#### 1.4 PB 设计筛选显著因子试验

培养基成分以及培养条件对发酵结果有重要的影响。为了提高发酵过程的效率, 需要对培养基成分和培养条件进行优化。根据本实验室的单因素试验结果确定, 硫酸铵、酵母粉、磷酸二氢钾对发酵结果影响较显著, 此外还进一步考察 pH 值、接种量、培养温度和装液量等培养条件因素影响是否显著。

本试验应用 PB 试验设计筛选显著因子, 选择硫酸铵 ( $X_1$ )、磷酸二氢钾 ( $X_2$ ) 和酵母粉 ( $X_3$ )、pH 值 ( $X_4$ )、接种量 ( $X_5$ )、培养温度 ( $X_6$ ) 和装液量 ( $X_7$ ) 这 7 个因子, 以及  $X_8$ 、 $X_9$ 、 $X_{10}$ 、 $X_{11}$  这 4 个虚拟因子, 以乙醇产量为响应值, 应用 Design-Expert 7.1.3 软件进行设计 (表 1), 筛选显著性因素, 并通过逐步回归分析, 获得多元一次回归方程。

表 1 PB 试验设计因素及其水平取值

Table 1 Experimental variables and levels of variables for PB design

Source	Variable	Level		
		-1	0	1
$X_1$	( $\text{NH}_4$ ) $_2\text{SO}_4$ (g/L)	0	1	2
$X_2$	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)	1	3	5
$X_3$	Yeast extract (g/L)	0	1.25	2.50
$X_4$	pH	4.0	4.5	5.0
$X_5$	Inoculum volume (%)	1	3	5
$X_6$	Cultural temperature (°C)	30.0	32.5	35.0
$X_7$	Liquid volume (mL/250 mL flask)	50	75	100

#### 1.5 中心组合设计 (CCD)

应用 Design-Expert 7.1.3 软件, 采用 Box-Behnken 的 CCD 方法<sup>[15]</sup>对 PB 筛选出的显著因

子进行试验设计, 同时固定其他因素。根据试验所得数据进行方差分析和回归分析并拟合获得二次回归方程, 预测乙醇产量最大值及其所对应关键因子的浓度。

#### 1.6 响应面模型的分析验证

用 Design-Expert 7.1.3 软件将优化试验数据与响应面模型进行拟合, 得到模型中的各个系数。对该多元二次方程进行性状分析和方差分析, 确定出其极值点以及取得极值的相应自变量的取值, 按照计算所得到的参数进行发酵验证试验, 以验证模型的可靠性, 并确定最后的优化结果。

#### 1.7 发酵罐放大发酵试验

按响应面优化的培养基组成配制发酵培养基, 装入 5 L 发酵罐, 将培养好的种子液按优化得到的接种量接入到发酵罐中。发酵罐装液量 3 L, 培养温度 30 ℃, 转速 40 r/min, 通氧量 0.1 vvm, 发酵周期 48 h。

## 2 结果与分析

#### 2.1 PB 设计结果与分析

用 PB 设计筛选影响乙醇产量的显著因素, 试验设计及结果见表 2。

采用 Design-Expert 7.1.3 软件对试验数据进行分析 (表 3), 获得多元一次拟合回归方程:  $Y=8.33+1.54X_1+1.33X_2+3.83X_3+0.20X_4+1.18X_5-0.94X_6+0.28X_7$ , 通常 Prob ( $P$ )> $F$  值小于 0.05 视为显著, 此模型的  $P>F$  值为 0.0216, 表明该模型显著, 模型在被研究的回归区域拟合很好; 负相关系数  $R^2=0.9451$ , 说明相关性较好, 校正决定系数 Adj  $R^2=0.8490$  表明 84.90% 的试验数据的变异性可用此回归模型来解释; 变化系数  $C_V$  越低, 试验的可信度和精确度越高,  $C_V$  值等于 17.24%, 表示 PB 试验的可信度和精确度较好; 精密度 (Adeq precision) 是有效信号与噪音的比值, 大于 4.0 视为合理, 本试验精密度达到了 9.539。

表 2 PB 试验设计与结果

Table 2 Experimental design and results of PB design

Run	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	$X_5$	$X_6$	$X_7$	$X_8$	$X_9$	$X_{10}$	$X_{11}$	Ethanol productivity (g/L)
1	0.2	5	0.5	5	5	30	100	1	1	-1	-1	8.90
2	2.0	5	0.5	4	1	34	50	1	1	-1	1	7.10
3	0.2	1	0.5	5	1	34	100	-1	1	1	1	3.60
4	2.0	1	2.5	5	1	34	100	1	-1	-1	-1	9.70
5	0.2	1	2.5	4	5	34	50	1	1	1	-1	10.90
6	0.2	1	0.5	4	1	30	50	-1	-1	-1	-1	1.30
7	2.0	5	2.5	4	1	30	100	-1	1	1	-1	16.00
8	0.2	5	2.5	4	5	34	100	-1	-1	-1	1	11.80
9	2.0	5	0.5	5	5	34	50	-1	-1	1	-1	9.00
10	2.0	1	0.5	4	5	30	100	1	-1	1	1	8.30
11	2.0	1	2.5	5	5	30	50	-1	1	-1	1	14.80
12	0.2	5	2.5	5	1	30	50	1	-1	1	1	11.80

从表 3 中可看出,  $X_1$  (硫酸铵)、 $X_2$  (磷酸二氢钾)、 $X_3$  (酵母粉) 因子的  $P>F$  值均小于 0.05, 为显著影响因素,  $X_5$  (接种量) 的  $P>F$  值为 0.0653, 接近于显著, 其余因子不显著, 所以选择  $X_1$ 、 $X_2$ 、 $X_3$  和  $X_5$  4 个因子进行中心组合设计。

表 3 PB 设计方差分析和回归分析表

Table 3 Variance analysis and regression analysis of the PB design

Source	SS	MS	$F$	$P>F$	Coefficient estimate	Standard error
Model	182.15	26.02	9.84	0.0216		
$X_1$	22.96	22.96	8.68	0.0421	1.54	0.52
$X_2$	21.33	21.33	8.07	0.0469	1.33	0.47
$X_3$	112.85	112.85	42.67	0.0028	3.83	0.59
$X_4$	0.48	0.48	0.18	0.6920	0.20	0.47
$X_5$	16.80	16.80	6.35	0.0653	1.18	0.47
$X_6$	6.75	6.75	2.55	0.1854	-0.94	0.59
$X_7$	0.96	0.96	0.36	0.5787	0.28	0.47
Residual	10.58	2.64				
Cor total	192.73					
$R^2=0.9451$			$C_V=17.24\%$			
Adj $R^2=0.8490$			Adeq precision=9.539			

2.2 CCD 优化设计结果与响应面分析

对 PB 试验中筛选出的显著因素硫酸铵、磷酸二氢钾、酵母粉、接种量 4 因子采用 Design-Expert 7.1.3 进行中心组合设计, 各因素水平取值见表 4, 其他因素取值则根据正效应因素取较高值、负效

应因素取较低值 (即 pH 5.0, 温度 30 ℃, 装液量 100 mL/250 mL), 共进行 30 次试验, 中心组合设计及结果见表 5。

表 4 中心组合设计因素及其水平取值

Table 4 Experimental variables and levels of central composite design

Variable	Level				
	-2	-1	0	+1	+2
$X_1$ : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/L)	0.0	1.0	2.0	3.0	4.0
$X_2$ : $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g/L)	0.0	2.0	4.0	6.0	8.0
$X_3$ : Yeast extract (g/L)	0.0	1.5	3.0	4.5	6.0
$X_4$ : Inoculum volume (%)	1.5	3.0	4.5	6.0	7.5

采用 Design-Expert 7.1.3 对中心组合设计试验结果进行分析, 获得拟合二次多项式回归方程:  $Y=25.42-1.35X_1-1.48X_2-0.49X_3+1.23X_4+0.069X_1X_2+0.34X_1X_3+1.21X_1X_4+1.13X_2X_3+0.44X_2X_4-0.56X_3X_4-0.59X_1^2-3.29X_2^2-2.45X_3^2-0.61X_4^2$ , 对回归方程分析结果见表 6, 结果表明回归方程一次项  $X_1$ 、 $X_2$  和  $X_4$  对乙醇产量的线性效应显著 ( $P<0.05$ ),  $X_1X_4$ 、 $X_2X_3$  对乙醇产量的交互作用显著 ( $P<0.05$ ),  $X_1^2$ 、 $X_2^2$ 、 $X_3^2$  对乙醇产量的曲面效应显著。回归模型显著 ( $P<0.0001$ ), 可用来进行响应值预测。 $F$  值为 10.08, 多元相关系数为  $R^2=0.9039$ , 表明 90.39% 的乙醇产生的变化可以由此模型解释, 说明模型对实际情况拟合较好; 校正决定系数 Adj  $R^2=0.8142$  表明 81.42% 的试验数据的变异性可用此回归模型来解释。

表 5 中心组合设计及其结果

Table 5 Experiment design and results of central composite design

Run	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	Predictive value of ethanol productivity (g/L)	Actual value of ethanol productivity (g/L)	Run	$X_1$	$X_2$	$X_3$	$X_4$	Predictive value of ethanol productivity (g/L)	Actual value of ethanol productivity (g/L)
1	1.00	2.00	1.50	3.00	22.84	23.50	16	3.00	6.00	4.50	6.00	18.68	19.00
2	3.00	2.00	1.50	3.00	16.91	18.00	17	0.00	4.00	3.00	4.50	24.31	23.00
3	1.00	6.00	1.50	3.00	16.60	16.80	18	4.00	4.00	3.00	4.50	18.93	17.00
4	3.00	6.00	1.50	3.00	10.94	13.00	19	2.00	0.00	3.00	4.50	15.23	14.20
5	1.00	2.00	4.50	3.00	20.03	21.10	20	2.00	8.00	3.00	4.50	9.31	7.10
6	3.00	2.00	4.50	3.00	15.47	17.10	21	2.00	4.00	0.00	4.50	16.60	16.00
7	1.00	6.00	4.50	3.00	18.31	21.10	22	2.00	4.00	6.00	4.50	14.65	12.00
8	3.00	6.00	4.50	3.00	14.03	14.60	23	2.00	4.00	3.00	1.50	20.51	17.10
9	1.00	2.00	1.50	6.00	23.11	24.80	24	2.00	4.00	3.00	7.50	25.43	25.60
10	3.00	2.00	1.50	6.00	22.01	20.20	25	2.00	4.00	3.00	4.50	25.42	25.60
11	1.00	6.00	1.50	6.00	18.64	18.00	26	2.00	4.00	3.00	4.50	25.42	24.80
12	3.00	6.00	1.50	6.00	17.81	19.00	27	2.00	4.00	3.00	4.50	25.42	25.90
13	1.00	2.00	4.50	6.00	18.08	17.00	28	2.00	4.00	3.00	4.50	25.42	25.40
14	3.00	2.00	4.50	6.00	18.35	20.40	29	2.00	4.00	3.00	4.50	25.42	25.20
15	1.00	6.00	4.50	6.00	18.13	19.30	30	2.00	4.00	3.00	4.50	25.42	25.60

表 6 中心组合试验结果二阶方差分析

Table 6 Anove for response surface quadratic model

Source	SS	df	MS	F	P>F	Coefficient estimate	Standard error
Model	599.76	14	42.84	10.08	<0.0001		
$X_1$	43.47	1	43.47	10.23	0.0060	-1.35	0.42
$X_2$	52.51	1	52.51	12.36	0.0031	-1.48	0.42
$X_3$	5.70	1	5.70	1.34	0.2648	-0.49	0.42
$X_4$	36.26	1	36.26	8.53	0.0105	1.23	0.42
$X_1X_2$	0.08	1	0.08	0.018	0.8957	0.07	0.52
$X_1X_3$	1.89	1	1.89	0.44	0.5149	0.34	0.52
$X_1X_4$	23.28	1	23.28	5.48	0.0335	1.21	0.52
$X_2X_3$	20.48	1	20.48	4.82	0.0443	1.13	0.52
$X_2X_4$	3.15	1	3.15	0.74	0.4028	0.44	0.52
$X_3X_4$	4.95	1	4.95	1.16	0.2975	-0.56	0.52
$X_1^2$	24.70	1	24.70	5.81	0.0292	-0.95	0.39
$X_2^2$	296.25	1	296.25	69.71	<0.0001	-3.29	0.39
$X_3^2$	164.50	1	164.50	38.71	<0.0001	-2.45	0.39
$X_4^2$	10.26	1	10.26	2.41	0.1412	-0.61	0.39
Residual	63.75	15	4.25				
Pure error	0.73	5	0.15				
Cor total	663.51	29					
$R^2=0.9039$				Adj $R^2=0.8142$			
$C_v=10.53\%$				Adeq precision=11.056			

利用 Design-Expert 7.1.3 软件对上述模型进行了优化处理, 确定最优硫酸铵 1.73 g/L、磷酸二氢钾 3.56 g/L、酵母粉 2.62 g/L 和接种量 5.66%, 其他条件根据 PB 试验选择 pH 5.0, 温度 30 °C 及装液量 100 mL/250 mL,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  根据单因素最佳值添加 0.1 g/L, 模型理论预测该条件下乙醇产量最大值为 26.30 g/L (图 1)。

### 2.3 验证试验结果

为了验证模型的可靠性, 在最优条件下, 进行重复试验 4 次, 分别得到乙醇产量 26.30、26.10、25.70、26.60 g/L, 乙醇产量的平均值为 26.18 g/L, 与预测值 26.30 g/L 非常接近, 预测精度达到了 99.54%, 这表明试验值和实际值间有很好的拟合性, 优化模型可靠。优化前在 80 g/L 木糖发酵培养基中发酵 48 h, 乙醇产量为 22.70 g/L, 优化后在同样的条件下乙醇得率为 0.41 g/g, 乙醇产率 0.55 g/(L·h), 木糖利用率 79.81%, 乙醇产量达到了 26.18 g/L, 是

优化前的 1.15 倍, 这表明在单因素试验的基础上, 利用 PB 设计及响应面设计对培养条件的优化取得了良好的效果。

### 2.4 休哈塔假丝酵母 HDYXHT-01 发酵罐放大试验结果

以木糖为唯一碳源, 利用 5 L 发酵罐为反应器, 按照优化培养基配方进行了乙醇发酵试验。得到了休哈塔假丝酵母 HDYXHT-01 发酵曲线, 结果见图 2。

由图 2 可以看出, 休哈塔假丝酵母 HDYXHT-01 在发酵罐中, 木糖利用率随着发酵时间的延长而缓慢升高, 48 h 达最大值 80.49%; 在整个发酵过程中, 乙醇的产量在前期增长得较慢, 后期增长得较快, 到发酵 48 h, 乙醇的产量达到最高为 26.90 g/L; 乙醇得率也随发酵时间的延长而升高, 在 4~16 h 增长较慢, 从 20 h 以后增速加快, 48 h 达最大值 0.42 g/g; 乙醇产率从 4~8 h 增长较快, 8~16 h 几乎变化很小, 在 20 h 后开始增大, 在 48 h 达最大值 0.56 g/(L·h)。

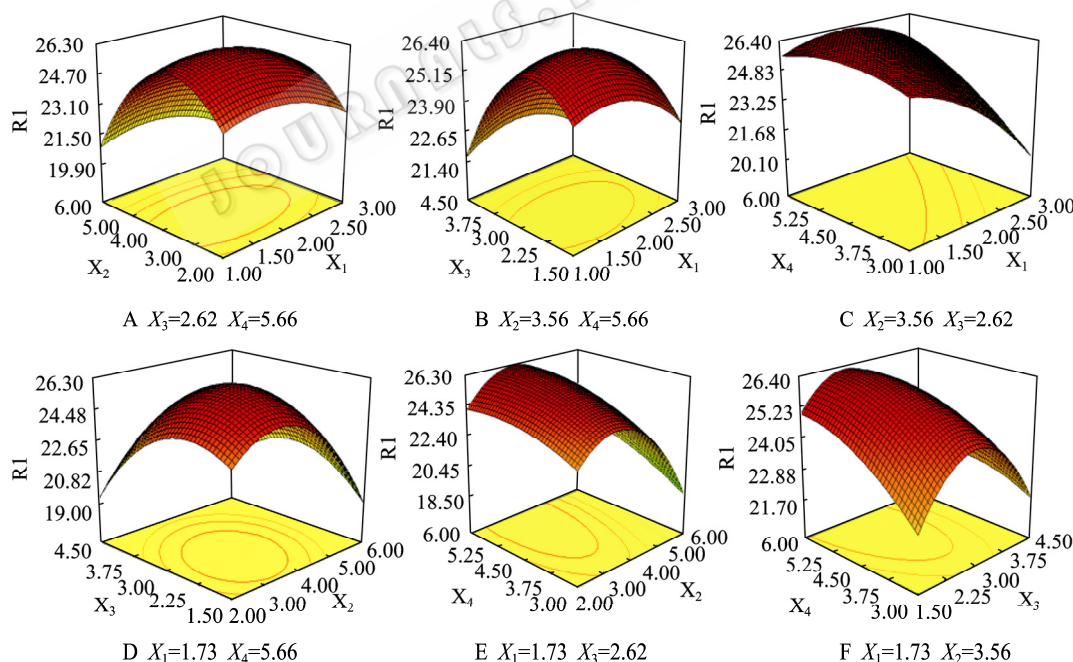


图 1 乙醇产量的响应面图

Fig. 1 Response surface methodology of ethanol productivity. (A)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_1$ ) vs  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $X_2$ ) with constant levels of yeast extract ( $X_3$ ) and inoculation volume ( $X_4$ ). (B)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_1$ ) vs yeast extract ( $X_3$ ) with constant levels of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $X_2$ ) and inoculation volume ( $X_4$ ). (C)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_1$ ) vs inoculation volume ( $X_4$ ) with constant levels of  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $X_2$ ) and yeast extract ( $X_3$ ). (D)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $X_2$ ) vs yeast extract ( $X_3$ ) with constant levels of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_1$ ) and inoculation volume ( $X_4$ ). (E)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $X_2$ ) vs inoculation volume ( $X_4$ ) with constant levels of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_1$ ) and yeast extract ( $X_3$ ). (F) yeast extract ( $X_3$ ) vs inoculation volume ( $X_4$ ) with constant levels of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ( $X_1$ ) and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $X_2$ ).

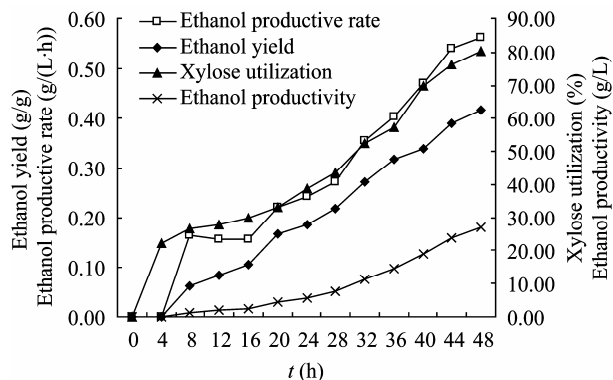


图2 休哈塔假丝酵母 HDYXHT-01 发酵曲线

Fig. 2 Fermentation curve of *Candida shehatae* HDYXHT-01.

这个试验结果初步说明了该菌株在进行发酵罐放大培养时,仍然具有较强的利用木糖产乙醇的能力,但由于发酵罐发酵条件和摇瓶不同,所以需要在今后的试验中进行再次优化,该试验结果同时亦为该菌利用木质纤维素水解液中的木糖奠定了一定的基础。

### 3 讨论

本研究通过响应面设计和分析,对影响休哈塔假丝酵母 HDYXHT-01 木糖发酵的 4 个因素(硫酸铵、磷酸二氢钾、酵母粉和接种量)进行了系列分析,获得了以这 4 个因素为自变量的二次多项式回归方程:

$$Y = 25.42 - 1.35X_1 - 1.48X_2 - 0.49X_3 + 1.23X_4 + 0.069X_1X_2 + 0.34X_1X_3 + 1.21X_1X_4 + 1.13X_2X_3 + 0.44X_2X_4 - 0.56X_3X_4 - 0.59X_1^2 - 3.29X_2^2 - 2.45X_3^2 - 0.61X_4^2$$

对该模型进行优化处理,确定了最佳发酵条件为硫酸铵 1.73 g/L、磷酸二氢钾 3.56 g/L、酵母粉 2.62 g/L、接种量 5.66%、pH 5.0、温度 30 °C、装液量 100 mL/250 mL,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.1 g/L,模型理论预测该条件下乙醇产量最大值为 26.30 g/L。利用该优化条件进行批次发酵发现,乙醇平均产量为 26.18 g/L,与预测值 26.30 g/L 非常接近,预测精度达到了 99.54%,这表明试验值和实际值间有很好的拟合性,优化模型可靠。

通过优化发酵条件,试验菌株的发酵性能得到很大提高,优化前乙醇产量为 22.70 g/L,优化后达

到 26.18 g/L,是优化前的 1.15 倍,这表明在单因素试验的基础上,利用 PB 设计及响应面设计对培养条件的优化取得了良好的效果。5 L 发酵罐放大培养 48 h 后,木糖利用率为 80.49%、乙醇产量为 26.90 g/L,乙醇得率 0.42 g/g、乙醇产率 0.56 g/(L·h)。对该菌株的乙醇耐受性进行研究发现,其乙醇耐受能力为 3% (V/V),其经过乙醇耐受驯化后的菌株(YHFK-2,数据未显示)的乙醇耐受能力可以达到 4% (V/V)。利用本试验的优化条件得到的乙醇产量也处于较高水平,周逢云等<sup>[11]</sup>在对休哈塔假丝酵母发酵木糖产乙醇的试验中,驯化筛选出一株 TZ-8 高产乙醇菌株,认为在其最适发酵条件下(木糖初始浓度 40 g/L,温度为 30 °C,转速 90~110 r/min,初始 pH 4.5~5.0),乙醇产量为 11.02 g/L,乙醇得率为 0.311 g/g,木糖利用率达到 86.9%。陈叶福等<sup>[12]</sup>对休哈塔假丝酵母 CICC1766 进行了紫外线诱变,得到的突变株在木糖浓度为 60 g/L 的条件下,乙醇产量为 23.64 g/L,相比原始菌株提高了 14.98%,乙醇得率达到 0.394 g/g;再对突变株进行氮离子注入诱变,得到了一株乙醇产量为 25.08 g/L 的突变株,乙醇得率为 0.418 g/g,达到理论得率的 90.8%。岳瑞雪等<sup>[7]</sup>利用休哈塔假丝酵母 CICC1766 发酵 60 g/L 木糖,其乙醇产量为 20.52 g/L,乙醇得率为 0.34 g/g,达到理论值的 74.5%,对乙醇的耐受能力为 3% (V/V)。由此可见,本文得到的发酵结果,木糖浓度和转化率比文献报道的都要高。

出发菌株较高的底物耐受能力,也是获得高产菌株的必要前提。从现有的研究结果来看,休哈塔假丝酵母在利用木糖产醇时,木糖利用率会受到木糖浓度的影响<sup>[7,11-12]</sup>,这是因为当木糖质量浓度较高时,会对与辅酶 NADPH 相关的木糖还原酶(XR)的活力产生抑制作用,这种抑制作用会受到氧气浓度及生成的木糖醇的含量影响<sup>[17]</sup>。在研究休哈塔假丝酵母 HDYXHT-01 时也发现,木糖浓度越高,木糖的利用率越低,当木糖浓度达到 100 g/L 时,木糖利用率只有 65%左右,木糖浓度为 80 g/L 时,木糖利用率为 70.75%,这与林影等<sup>[13]</sup>的研究结果是类似

的。但是对于 HDYXHT-01 菌株来说, 当木糖浓度为 80 g/L 时, 其乙醇产量和发酵强度却是最高的, 发酵到 48 h 时分别为 22.70 g/L 和 0.39 g/(L·h) (未优化前数据), 并且在该木糖浓度下, 利用本研究优化的发酵条件, 乙醇产量可以提高到 26.18 g/L, 乙醇得率达到理论值的 89.13%, 远远高于其他报道<sup>[7,11-12]</sup>。由此可见, 休哈塔假丝酵母 HDYXHT-01 的较高乙醇产量与该菌株能适应较高的底物浓度有一定的关系。

## REFERENCES

- [1] Zhao L, Li ZG, Li HY, et al. Research progress on pretreatment technologies of lignocellulose. *Chem Bioeng*, 2007, 24(5): 5–8.  
赵律, 李志光, 李辉勇, 等. 木质纤维素预处理技术研究进展. *化学与生物工程*, 2007, 24(5): 5–8.
- [2] Lopez MJ, Vargas-García M, Suárez-Estrella F, et al. Lignocellulose-degrading enzymes produced by the ascomycete *Coniochaeta ligniaria* and related species: application for a lignocellulosic substrate treatment. *Enzyme Microb Technol*, 2007, 40(4): 794–800.
- [3] Yu B, Qi L. Research status of lignocellulosic materials for fuel ethanol. *Chem Ind Eng Prog*, 2006, 25(3): 244–249.  
于斌, 齐鲁. 木质纤维素生产燃料乙醇的研究现状. *化工进展*, 2006, 25(3): 244–249.
- [4] Fang XN, Huang W, Xia LM. Effects of inhibitors in hemicellulosic hydrolysate on xylitol production. *J Zhejiang Univ: Eng Sci*, 2005, 39(4): 547–551.  
方祥年, 黄炜, 夏黎明. 半纤维素水解液中抑制物对发酵生产木糖醇的影响. *浙江大学学报: 工学版*, 2005, 39(4): 547–551.
- [5] Hong JF, Zhang MH, Liu C, et al. Progress in metabolic engineering of xylose-utilizing recombinant strains to produce ethanol. *Food Ferm Ind*, 2005, 31(1): 114–118.  
洪解放, 张敏华, 刘成, 等. 代谢木糖生产乙醇的基因工程菌研究进展. *食品与发酵工业*, 2005, 31(1): 114–118.
- [6] Sedlak M, Edenberg HJ, Ho NWY. DNA microarray analysis of the expression of the genes encoding the major enzymes in ethanol production during glucose and xylose co-fermentation by metabolically engineered *Saccharomyces* yeast. *Enzyme Microb Technol*, 2003, 33(1): 19–28.
- [7] Yue RX, Chen YF, Xiao DG, et al. Xylose fermentation by *Candida shehatae* to produce ethanol. *Liquor-Making Sci Technol*, 2007(9): 45–47.  
岳瑞雪, 陈叶福, 肖冬光, 等. 休哈塔假丝酵母发酵木糖生产乙醇的研究. *酿酒科技*, 2007(9): 45–47.
- [8] Claassen PAM, van Lier JB, Lopez CAM, et al. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, 52(6): 741–755.
- [9] Agbogbo FK, Coward-Kelly G, Torry-Smith M, et al. Fermentation of glucose/xylose mixtures using *Pichia stipitis*. *Process Biochem*, 2006, 41(11): 2333–2336.
- [10] Telli-Okur M, Eken-Saraçoğlu N. Fermentation of sunflower seed hull hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. *Bioresour Technol*, 2008, 99(7): 2162–2169.
- [11] Zhou FY, Tang B, Zhang QQ, et al. Ethanol production of xylose fermentation by *Candida shehatae*. *J Anhui Univ Technol Sci: Nat Sci*, 2007, 22(4): 25–28.  
周逢云, 汤斌, 张庆庆, 等. 休哈塔假丝酵母发酵木糖产乙醇的研究. *安徽工程科技学院学报: 自然科学版*, 2007, 22(4): 25–28.
- [12] Chen YF, Dong BY, Yue RX, et al. Breeding of *Candida shehatae* mutant overproducing ethanol from xylose. *Food Ferm Ind*, 2008, 34(10): 1–5.  
陈叶福, 董博宇, 岳瑞雪, 等. 发酵木糖高产乙醇休哈塔假丝酵母突变株的选育. *食品与发酵工业*, 2008, 34(10): 1–5.
- [13] Lin Y, Zhang JB, Xiang ZF. Production of ethanol by fermentation of xylose using *Candida* sp.. *J South China Univ Technol: Nat Sci*, 2006, 34(5): 33–36.  
林影, 张聚宝, 向柱方. 假丝酵母 *Candida* sp. 木糖发酵生产乙醇. *华南理工大学学报: 自然科学版*, 2006, 34(5): 33–36.
- [14] Hao XC, Yu XB, Liu ZY, et al. The Application of response surface methodology in optimization of microbial media. *Food Res Dev*, 2006, 27(1): 38–41.  
郝学财, 余晓斌, 刘志钰, 等. 响应面方法在优化微生物培养基中的应用. *食品研究与开发*, 2006, 27(1): 38–41.
- [15] Li GQ, Lin CW, Jiang Y, et al. Optimization of the microwave extraction technology of the total flavonoids of *Blumea riparia* (BL.) DC by response surface analysis. *Nat Prod Res Dev*, 2009, 21(6): 1052–1056.  
黎贵卿, 林翠梧, 江燕, 等. 运用响应面设计优化微波提取滇桂艾纳香总黄酮工艺的研究. *天然产物研究与开发*, 2009, 21(6): 1052–1056.
- [16] Li W, Du W, Liu DH. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology. *J Mor Catal*, 2007, 45(3/4): 122–127.
- [17] Nollet V, Preziosi-Belloy L, Delgenes JP, et al. Xylitol production from xylose by two yeast strains: sugar tolerance. *Curr Microbiol*, 1993, 27(4): 191–197.