

探討以酵母菌發酵生產木糖醇之研究

吳芳禎¹ 劉岳儒² 施英隆^{2*}

¹大葉大學食品暨應用生物科技學系

^{2*}大葉大學環境工程學系

51591 彰化縣大村鄉學府路 168 號

*ils@mail.dyu.edu.tw

摘要

木糖醇為天然糖醇的一種，可用於食品、醫學以及保健食品，為用途廣泛的天然物。本研究以 *Candida tropicalis* BCRC21436 做為實驗菌株，進行生產木糖醇最適化之探討。先以一次一因子實驗探討 *C. tropicalis* 發酵生產木糖醇實驗最適條件，結果發現 *C. tropicalis* 最適條件為 125 rpm、40°C、pH 6，木糖醇產量為 25.03 g/L。以 *C. tropicalis* 進行回應曲面法找尋最適生產木糖醇之條件，將一次一因子所得條件做為中心點進行 2³ 因子設計實驗，經一階回應曲面實驗後發現 125 rpm、40°C、pH 6 仍為 *C. tropicalis* 生產木糖醇之最佳條件，以此點為原點進行陡升路徑實驗，結果發現最高木糖醇產量點仍為原點，將此點做為中心混成實驗之原點進行尋找極值點之實驗。結果發現二階回應曲面實驗設計之迴歸方程式無法適切表達此模式在實驗數據上之適用性，因此本研究發現一次一因子實驗所得之最適條件，亦是一階回應曲面時所得之最佳條件，此為目前以 *C. tropicalis* 生產木糖醇之最適條件，此條件應可作為後續以生物法進行工業化大量生產木糖醇之參考依據。

關鍵詞：酵母菌，木糖醇，回應曲面法

Production of Xylitol through Yeast Fermentation

FANG-CHEN WU¹, YUE-RU LIU² and ING-LUNG SHIH^{2*}

¹Department of Food and Applied Biotechnology, Da-Yeh University

^{2*}Department of Environmental Engineering, Da-Yeh University

No. 168, University Rd., Dacun, Changhua 51591, Taiwan, R.O.C.

*ils@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

In this study, *Candida tropicalis* BCRC 21436 was used as an experimental strain to be optimized for the production of xylitol. The optimal conditions for the production of xylitol from *C. tropicalis* were studied using the one-factor-at-a-time method. The optimal conditions for *C. tropicalis* were found to be an agitation speed of 125 rpm, a temperature of 40°C, and a pH of 6. These conditions resulted in xylitol production of 25.03 g/L. In addition to the one-factor-at-a-time method, the response surface method (RSM) was used to optimize the production of xylitol by this strain. In

the 2³ factorial design experiment, the linear temperature term was demonstrated to have a significant effect on xylitol production, Furthermore, the first-order with interaction model proved adequate ($R^2 = 0.997$). The optimal condition was then assessed using the steepest ascent method and central composite design. However, the regression equation of the second-order response surface experiment could not fit the applicability of this model for the experimental data. The one-factor-at-a-time method and the RSM method both indicated that 125 rpm, 40°C, and pH 6 were the optimal conditions for xylitol production by *C. tropicalis*. This is by far the most suitable set of conditions for the production of xylitol from *C. tropicalis*. These conditions should be used as a reference point for subsequent industrial production of xylitol through biological methods.

Keywords: Yeast fermentation, Xylitol, Response surface method

一、前言

木糖醇為天然五碳糖醇的一種，存在於許多水果與蔬菜中 [26]，但含量很低，不易萃取。木糖醇有與蔗糖相當的甜度，食用時會帶來清涼感，無致齲性，因此被廣泛應用於食品與醫藥領域中。由於木糖醇不容易被人體吸收，可在缺乏胰島素的情況下被代謝，產生的熱量約為蔗糖的 40%，但甜度約為蔗糖的 90%，因此其目前最重要之應用為當作糖尿病患者之代糖使用 [27]，又由於食用時有一種清涼感，因此也常用於維生素片劑之薄塗層、漱口水、飲料、糖果、口香糖或清涼含錠中 [8, 11]。醫學研究顯示，木糖醇不會和其他碳水化合物或糖一樣被口腔中產生齲齒細菌所利用，且能抑制鏈球菌 (*Streptococcus mutans*，一種造成蛀牙的主要微生物) 與酸的產生，可減緩口腔中 pH 值下降從而減少牙齒酸蝕與齲齒的發生。亦有研究報告指出木糖醇可以有效的降低孩童中耳炎的發生，可能與其可以協助清除常引發中耳炎的鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 甚至嗜血桿菌 (*Hemophilus influenzae*) 與污垢，協助免疫防衛系統正常運作有關 [24]。由於木糖醇之胰島素非依賴性代謝、低熱能、低升糖指數、抗生素、無致癌性與藥理活性等特性 [7, 22]，使得木糖醇受到全球的高需求，目前已超過 50 個國家批准其使用於食品、藥品和口腔健康產品 [20]。

目前木糖醇的製備方式為生物法與化學法兩種，傳統上製造木糖醇多採用化學法，化學法是以玉米芯與甘蔗渣等農業廢棄物為原料，經酸水解產生木糖、葡萄糖後，經過純化處理取得高純度木糖後，在高溫高壓下透過鎳催化氫化，再經脫色、濃縮、結晶等步驟而得到純木糖醇 [7, 12]。木糖醇的產量約為木聚糖部分的 50-60%，由於繁複的純化程序，所得產物非常昂貴 [15, 17-18]。由於化學過程費時費力，且耗費大量能源，因此近年生物法已被開發成替代方法。生物

法能有效降低生產成本，其中發酵法不需純化木糖也能簡化木糖醇的分離步驟。在自然界中能生成木糖醇的細菌只有少數，雖黴菌也能生產木糖醇，但目前較受到重視的是真菌，尤其是念珠菌屬 (*Candida*) 的酵母菌 [19]。本研究使用葡萄糖與木糖做為碳源，*Candida tropicalis* 與 *Candida guilliermondii* 為生產菌株，進行發酵生產木糖醇的探討，以一次一因子及回應曲面實驗設計探討 pH、溫度及搖瓶速度，對念珠菌屬 (*Candida*) 生產木糖醇影響，並期望找出最適之生產條件。

二、材料與方法

(一) 菌種

本研究所使用之木糖醇生產菌株為 *Candida tropicalis* BCRC 21436 與 *Candida guilliermondii* CRC 21559，菌株係由生物資源保存及研究中心所購買。

(二) 培養基與培養方法

配置 100 mL 活化培養基於 250 mL 錐形瓶中，滅菌後待冷卻至室溫取出 5 mL 培養基放入試管，再加入 2 mL 甘油保存之菌液，在 24°C 下靜置培養 24 小時。將已培養 24 小時之上述活化培養基加入剩餘 95 mL 活化培養基中，在 25°C 下靜置培養 48 小時。之後將已培養完成之菌液以 10% (v/v) 轉接至含 100 mL 生產培養基之 250 mL 錐形瓶中，培養基在 30°C、100 rpm 中搖瓶培養 168 小時。活化培養基含 Yeast extra 10 g/L、Pepton 20 g/L、Glucose 20 g/L，生產培養基含 Yeast extra 10 g/L、MgSO₄ 0.2 g/L、KH₂PO₄ 15 g/L、Xylose 50 g/L。

(三) 培養基條件探討

以一次一因子方式探討各種培養因子之影響。探討轉速之影響時，將活化培養後之菌液 10% (v/v) 接種於 100 mL

生產培養基，並將培養基於 35°C (*C. guilliermondii*) 與 30°C (*C. tropicalis*)，起始 pH 6 及不同轉速(75 rpm、100 rpm、125 rpm、150 rpm) 條件下搖瓶培養 168 小時，並於每 24 小時取點分析。探討溫度之影響時，將活化後之菌液 10% (v/v) 接種於 100 mL 生產培養基，將培養基在起始 pH 6，不同溫度 (25°C、30°C、35°C、40°C)，轉速為 125 rpm，搖瓶培養 168 小時，並於每 24 小時取點分析。探討溫 pH 之影響時，將活化後之菌液 10% (v/v) 接種於 100 mL 之生產培養基，生產培養基先以不同濃度 H₂SO₄ 與 NaOH 將培養基起始 pH 調整為 pH 3、pH 4、pH 5、pH 6 之不同 pH 條件，將培養基在 125 rpm、40°C 培養 168h 並於每 24 小時取點分析。探討不同接菌量之影響時，將活化培養基之菌液以 5%、10%、15%、20% (v/v) 接種於 100 mL 之生產培養基，將培養基在 pH 6、125 rpm、40°C 培養 168h 並於每 24 小時取點分析。

(四) 糖類與木糖醇分析

本實驗以高效能液相層析儀 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 進行分析。將培養完畢後之發酵液以離心機在 4°C、10,000 rpm 下離心 10min，取得上清液。以 0.45 μm 過濾膜將上清液過濾後，注入 HPLC 分析，HPLC 分析裝置使用之管柱為 00H-0135-K0, Vastech Scientific Co.,

Ltd，偵測器為 RI Detector (Bischoff 8020, Germany)，幫浦使用 HITACHI L-2130，每次試樣的注射量 (Injection volume) 為 20 μl，以去離子水做為沖提液 (mobile phase)，在流速 (Flow rate) 0.6 mL/min、溫度 (Temperature) 85°C 下進行分析，分析完成帶入檢量線便能得知木糖與木糖醇之變化。

三、結果與討論

(一) *Candida guilliermondii* 與 *Candida tropicalis* 生產木糖醇比較

本研究先行探討兩株木糖醇生產菌株 *Candida tropicalis* BCRC21436 與 *Candida guilliermondii* BCRC21559 生產木糖醇之比較。將菌液 10% (v/v) 接種於 100 mL 生產培養基中，在 35°C (*C. guilliermondii*) 與 30°C (*C. tropicalis*)，起始 pH 6 及 100 rpm 條件下搖瓶培養 168 小時。實驗結果如圖 1 所示，結果顯示 *Candida tropicalis* 的木糖消耗速率與 *Candida guilliermondii* 相當，但木糖醇最高產量，*C. tropicalis* 在培養 12 h 時可達 12.10 g/L 而 *C. guilliermondii* 在培養 168 h 則為 10.18 g/L。另外 *C. tropicalis* 在培養 168h 後木糖全部消耗完畢，但 *C. guilliermondii* 在培養 168h 後木

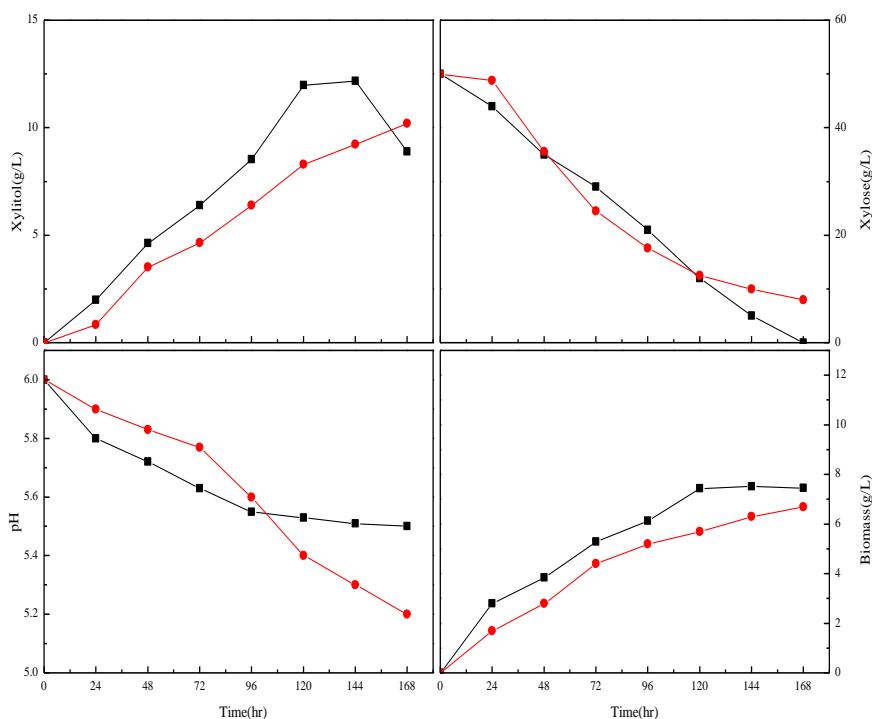


圖 1. *C. guilliermondii* 與 *C. tropicalis* 生產木糖醇比較 (■) *Candida tropicalis* ; (●) *Candida guilliermondii*

表 1. 不同菌株轉化木糖生產木糖醇結果表

| 菌株 | Xylitol (g/L) | Reference |
|---|-------------------|---------------------------------------|
| <i>Candida tropicalis</i> | 12.0 | [10]; Kwon <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Candida guilliermondii</i> | 0.43 | [6]; Carvalho <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Candida mogii</i> TISTR5892 | 5.70 | [25]; Wannawilal <i>et al.</i> (2015) |
| <i>Candida athensensis</i> SB18 | 0.98 | [28]; Zhang <i>et al.</i> (2012) |
| <i>D. hansenii</i> UFV -170D | 1.00 | [23]; Sampaio <i>et al.</i> (2008) |
| <i>D. hansenii</i> SM-139 | 0.65 | [13]; Misra <i>et al.</i> (2012) |
| <i>K. marxianus</i> YZJ015 | 1.49 | [28]; Zhang <i>et al.</i> (2014) |
| <i>K. marxianus</i> IIPE453 | 6.10 | [9]; Kumar <i>et al.</i> (2015) |
| <i>P. caribbica</i> HQ222812 | 1.83 | [14]; Mukherji <i>et al.</i> (2013) |
| <i>Candida tropicalis</i> BCRC21436 | 12.10 (25.03)* | This study |
| <i>Candida guilliermondii</i> BCRC21559 | 10.18 | This study |

*括弧內數值為優化後之產量

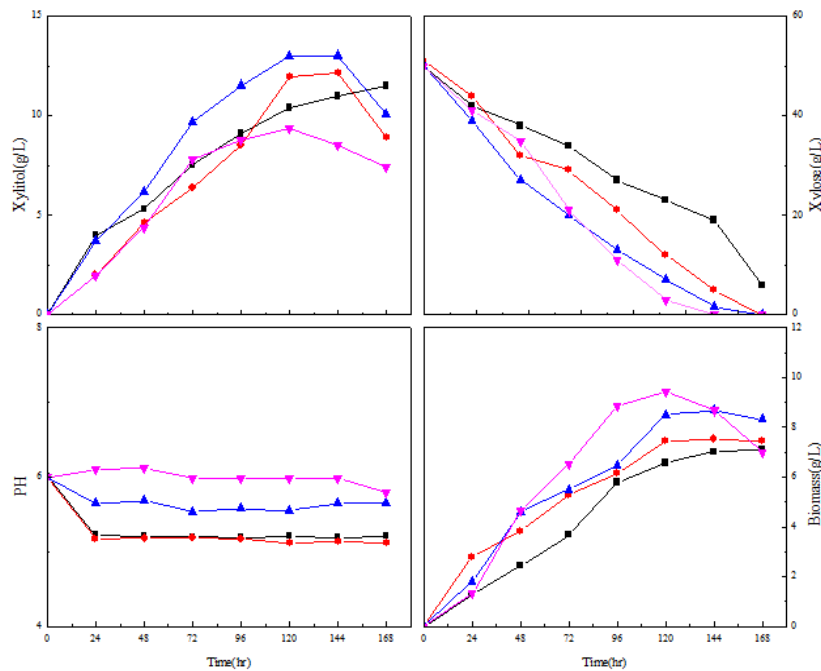


圖 2. 不同轉速對於 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之影響轉速：(■) 75 rpm；(●) 100 rpm；(▲) 125 rpm；(▼) 150 rpm

糖仍有剩餘，菌體量在培養 168h 後 *C. tropicalis* 較 *C. guilliermondii* 為高。表 1 所列為目前已知可生產木糖醇之菌株及產量，但是由於生產條件並不一致，無法直接比較，然而本研究所選之兩菌株，具有高產量之潛力，*C. tropicalis* 在本實驗條件下已和文獻記載之產量相當 [10]，因此選擇 *C. tropicalis* 作為後續探討之菌株，期能優化其木糖醇之生產條件。

(二) 轉速對 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之影響

本實驗將活化培養後之菌液 10% (v/v) 接種於 100 mL 生產培養基，並將培養基在 30°C，起始 pH 6 及不同轉速(75

rpm、100 rpm、125 rpm、150 rpm) 條件下搖瓶培養 168 小時。實驗結果如圖 2 所示，結果顯示，當培養至 120 小時，各種轉速下菌體皆為最高，此時木糖醇產量亦幾乎達到最高，當轉速為 75 rpm、100 rpm、125 rpm、150 rpm；木糖醇之產量分別為 11.5 g/L、12.7 g/L、13 g/L 及 9.4 g/L，因此較適之轉速為 100 rpm 或 125 rpm，因此選擇 125 rpm 進行後續之實驗。過去文獻亦曾探討以木糖為基質生產木糖醇之搖瓶培養，發現在靜置 (0 rpm) 時培養基處於厭氧狀態，導致菌體初期生長緩慢，而延長了生長時間，另外在厭氧環境下許多微生物如 *Candida parapsilosis* 與 *Candida utilis* 皆無

法代謝木糖 [4]，而過快的轉速會使菌體生長完成後，因過量的氧氣提供開始消耗木糖進行呼吸代謝的程序，導致木糖醇產量降低 [2]，在同一研究中亦發現轉速 75 rpm 為最適。另有研究以 *Pichia caribbica* 與 *Candida guilliermondii* BCRC 21326 做為菌株並探討轉速對其生產木糖醇之影響，以 50 rpm、100 rpm、150 rpm 作為條件進行探討，結果顯示 150 rpm 為最適轉速 [1]。

(三) 溫度對 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之影響

本實驗將活化後之菌液 10 % (v/v) 接種於 100 mL 生產培養基，培養基在起始 pH 6，不同溫度 (25°C、30°C、35°C、40°C)，轉速為 125 rpm，搖瓶培養 168 小時。實驗結果如圖 3 所示，結果發現培養溫度越高木糖醇產率越高。當培養至 120 小時，在各種培養溫度下木糖醇之產量皆達到高點，溫度為 25°C、30°C、35°C 及 40°C 時，木糖醇之產率分別為 8.08 g/L、11.5 g/L、21.6 g/L 及 25.3 g/L。因此選擇溫度 40°C 作為 *C. tropicalis* 後續生產木糖醇之實驗。根據文獻記載，很多酵母菌在 24°C~45°C 都能生產木糖醇，而最適生長溫度通常為 30°C [18]，然而研究發現以 *Candida guilliermondii* 進行發酵木糖生產木糖醇時，木糖醇產率會依溫度上升而有下降趨勢，最適溫度在 35°C~40°C 範圍 [3]，亦有研究以 *Candida sp.* B-22 進行發酵木糖生產木糖醇實驗

時發現，其最佳生產木糖醇溫度為 35°C~40°C [5]，在此研究同時亦發現 *Debaryomyces hansenii* NRRL Y-7426 生產木糖醇最佳溫度為 28°C~37°C，而另有研究指出 *C. tropicalis* 培養溫度超過 37°C 時木糖醇的產率會跟著下降 [23]。

(四) pH 對 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之影響

本實驗將活化後之菌液 10 % (v/v) 接種於 100 mL 之生產培養基，生產培養基 pH 調整為 pH 3、pH 4、pH 5、pH 6 之不同 pH 條件，將培養基在 125 rpm、40°C 培養 168hr。實驗結果如圖 4 所示，結果發現在起始 pH6 時木糖醇產量在培養 120 小時達到最高 (25.03 g/L)，而在起始 pH 3、pH 4、pH 5 時，木糖醇產量皆在 144 小時達到最高，分別為 21.5 g/L、22.8 g/L 及 24.6 g/L。結果亦顯示，*C. tropicalis* 在 pH 3、pH 4、pH 5、pH 6 時皆能穩定生長，因此 *C. tropicalis* 能在較偏酸的环境下生長及生產木糖醇，而此次木糖醇最佳產率在 pH 5 及 pH 6。pH 值對於微生物來說是相當重要的條件，而適合酵母菌生長的 pH 值通常介於 4~6 之間。研究曾發現 *Candida guilliermondii* NRC 5578 生產木糖醇的最適 pH 值為 6，此研究同時也發現 *Candida boidinii* 生產木糖醇之最適條件為 pH 7 [16]。另有研究指出以 *candida sp.* 生產木糖醇最適 pH 為 4-6 [5]，此差異性應為培養基組成、培養條件以及菌株間的差異所導致。

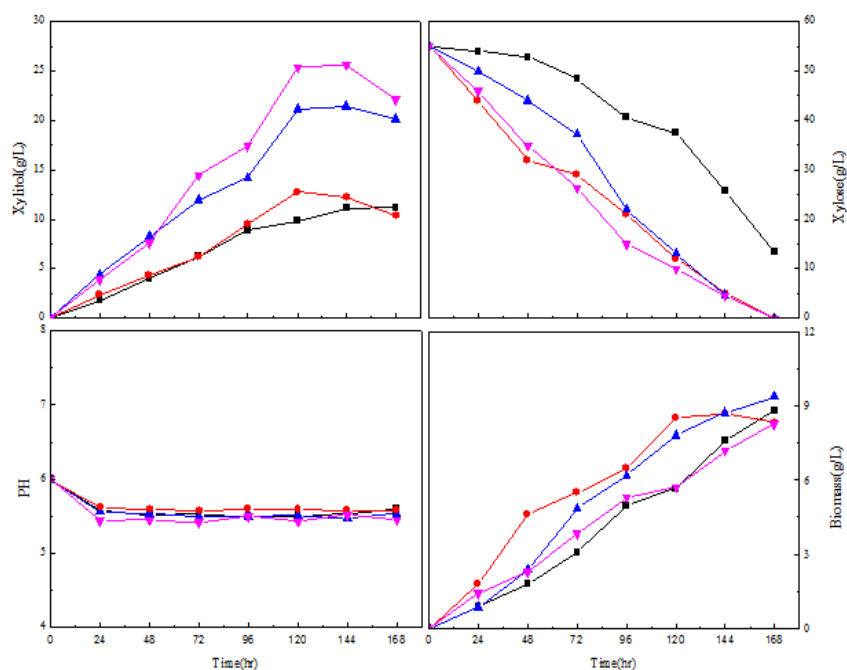


圖 3. 不同溫度對於 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之影響溫度：(■) 25°C；(●) 30°C；(▲) 35°C；(▼) 40°C

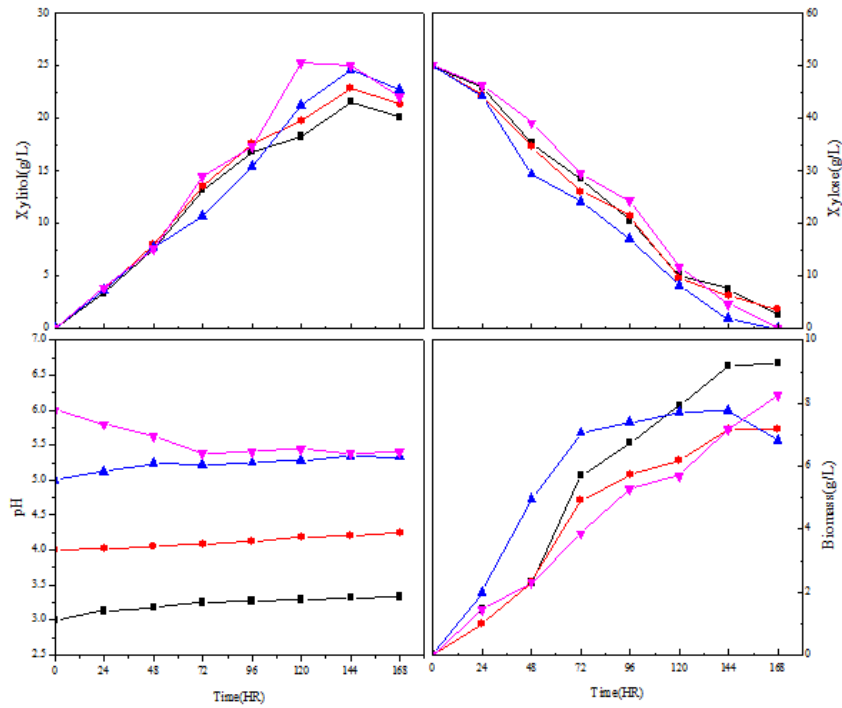


圖 4. 不同 pH 對於 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之影響 pH: (■) pH 3 ; (●) pH 4 ; (▲) pH 5 ; (▼) pH 6

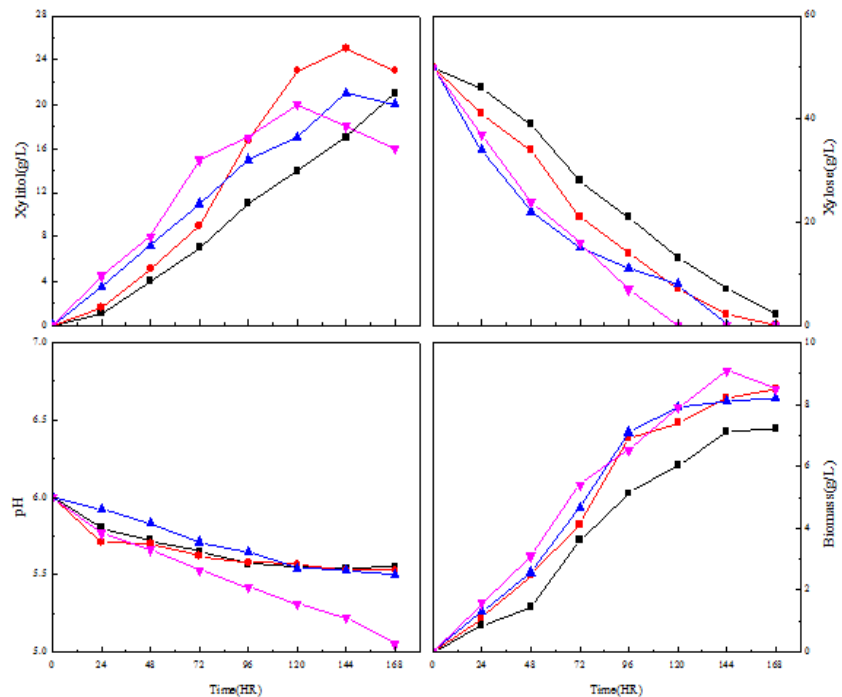


圖 5. 不同接菌量對於 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之影響接菌量: (■) 5% ; (●) 10% ; (▲) 15% ; (▼) 20%

(五) 不同接菌量對 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之影響

本實驗將活化培養基之菌液以 5%、10%、15%、20% (v/v) 接種於 100 mL 之生產培養基，調整至 pH 6，將培

養基在 125 rpm、40°C 培養 168hr。實驗結果如圖 5 所示，結果顯示，無論起始菌量為多少，菌體生長皆穩定生長至 144 小時達到最高點，起始接菌量為 20% 時菌量最高，起始

菌量 5% 時菌量最低，起始接種量為 10% 及 15% 之菌量相當。當起使接種量為 10% 及 15% 時木糖醇產量皆在培養 144 小時達到最高，分別為 24 g/L 及 20.49 g/L，但起始接種量為 20% 時，木糖醇產量在培養 120 小時達到最高 18.08 g/L，而起始接種量為 5%，木糖醇之產量在培養 168 小時達到最高 21.8 g/L。因此推測過多的菌量會使菌體大量消耗碳源進行快速生長，當菌體生長完成時能夠轉化為木糖醇的碳源減少，間接導致了木糖醇產量的下降。因此接種 10% 菌量為較適宜。

(六) 以回應曲面法探討 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之最適條件

上述為以一次一因子實驗方式進行 *Candida tropicalis* 生產木糖醇產量之探討，然而此種方法無法探討到因子間之交互作用，且所需實驗次數將相當多也很耗時。因此本研究亦利用回應曲面法探討 *C. tropicalis* 生產木糖醇之最適條件。

1. 2³ 因子實驗設計

本研究以轉速 (X₁)、pH (X₂) 及溫度 (X₃) 為獨立變數，木糖醇產量則做為因變數進行 2³ 之因子設計。2³ 之因子設計各實驗之木糖醇產量如表 2 所示，由此可得知產量最高為第 10 組實驗，木糖醇產量為 24.82 g/L，此實驗結果經迴歸分析 (表 3) 所產生之迴歸方程式如方程式 (1)：

$$Y = 4.026 + 2.82X_1 - 0.28X_2 - 4.03X_3 - 0.28X_1X_2 - 2.82X_1X_3 + 0.28X_2X_3 \quad (1)$$

此方程式裡 Y 為木糖醇之產量 (g/L)，而係數 (effect) 則代表了不同因子對木糖醇產量之影響程度，由方程式可推斷轉速 (X₁) 對木糖醇產量有正影響，而 pH 值 (X₂) 及溫度 (X₃) 則為負影響，因此若提高轉速將有助於提高木糖醇產量。由表 3 亦可發現溫度之影響相當顯著 (p < 0.05)，而 pH 及轉速之影響則較不顯著，因此如果要得到更高的木糖醇

表 2. 2³ 部分因子設計實驗表

| Factor No | X ₁ (rpm) | X ₂ (pH) | X ₃ (°C) | 木糖醇產量 g/L |
|-----------|----------------------|---------------------|---------------------|-----------|
| 1 | 100 | 5 | 35 | 2.42 |
| 2 | 150 | 5 | 35 | 14.81 |
| 3 | 100 | 7 | 35 | 2.41 |
| 4 | 150 | 7 | 35 | 12.66 |
| 5 | 100 | 5 | 45 | 0 |
| 6 | 150 | 5 | 45 | 0 |
| 7 | 100 | 7 | 45 | 0 |
| 8 | 150 | 7 | 45 | 0 |
| *9 (C) | 125 | 6 | 40 | 24.25 |
| *10 (C) | 125 | 6 | 40 | 24.82 |

*9 (C)、*10 (C) 為中心濃度
X₁：轉速 (rpm)；X₂：pH；X₃：溫度 (°C)

表 3. 2³ 部分因子設計迴歸分析表

| Parameter | Coeff. | Pure Error | T | P |
|-------------------------------|--------|------------|----------|----------|
| Mean/Interc. | 4.026 | 0.26775 | 15.0784 | 0.042159 |
| X ₁ | 2.82 | 0.26775 | 10.5686 | 0.060058 |
| X ₂ | -0.28 | 0.26775 | -1.0093 | 0.497042 |
| X ₃ * | -4.03 | 0.26775 | -15.0784 | 0.042159 |
| X ₁ X ₂ | -0.28 | 0.26775 | -1.0000 | 0.5 |
| X ₁ X ₃ | -2.82 | 0.26775 | -10.5686 | 0.060058 |
| X ₂ X ₃ | -0.28 | 0.26775 | 1.0093 | 0.497042 |

R-sqr=0.997
X₁：轉速 (rpm)；X₂：pH；X₃：溫度 (°C)
T：T test
*Probability < 5%

表 4. 2³ 部分因子設計變異數分析表

| Parameter | SS | df | MS | F | P |
|-------------------------------|----------|----|----------|----------|----------|
| X ₁ | 64.0599 | 1 | 64.0599 | 111.6959 | 0.060058 |
| X ₂ | 0.5843 | 1 | 0.5843 | 1.0188 | 0.497042 |
| *X ₃ | 130.3951 | 1 | 130.3951 | 227.3591 | 0.042159 |
| X ₁ X ₂ | 0.5735 | 1 | 0.5735 | 1.0000 | 0.500000 |
| X ₁ X ₃ | 64.0599 | 1 | 64.0599 | 111.6959 | 0.060058 |
| X ₂ X ₃ | 0.5843 | 1 | 0.5843 | 1.0188 | 0.497042 |
| Pure Error | 0.012 | 2 | 0.006 | | |
| Total SS | 260.8305 | 7 | | | |

R-sqr = 0.997
X₁ : 轉速 (rpm) ; X₂ : pH; X₃ : 溫度
SS : Sum of squares
dF : Degrees of freedom
MS : Mean square
F : F test
*Probability < 5%

表 5. 陡升路徑實驗結果

| Step | Factor | 轉速 (rpm) | pH | 溫度 | Xylitol (g/L) |
|-------------------|--------|----------|------|-------|---------------|
| (1) New Base | | 125 | 6 | 40 | |
| (2) Unit | | 25 | 1 | 5 | |
| (3) Slope | | 1 | -0.1 | -1.43 | |
| (4) Correspondent | | 25 | -0.1 | -7.15 | |
| (5) Experiment | | | | | |
| | No.1 | 125 | 6 | 40 | 24.4 |
| | No.2 | 150 | 5.9 | 33 | 19 |
| | No.3 | 175 | 5.8 | 26 | 17 |
| | No.4 | 200 | 5.7 | 19 | 11 |
| | No.5 | 225 | 5.6 | 12 | 8 |

醇產量，必須降低溫度。由表 3 中可得知，此一階迴歸方程式的檢定係數 (R-Sqr=0.997)，代表實驗值與預測值有相當之一致性，而從表 4 中可以看出溫度對木糖醇的生產有顯著的影響。

2. 陡升實驗設計

陡升實驗可迅速有效的搜尋極值點所在區域，透過 2³ 因子設計實驗後，以此實驗之最高點做為陡升實驗之原點並由 2³ 因子設計實驗迴歸運算得知，將轉速 (X₁) 提高並且降低溫度 (X₃) 與降低 pH (X₂) 值能增加木糖醇產量，並以此三因子之係數比決定陡升的路徑，再將實驗點逐次延伸，若下一個實驗回應點較上次低，代表已到極值點附近，此時陡升路徑實驗即為結束。陡升實驗設計表與結果如表 5 所示，由此得知木糖醇產量仍以第一組實驗 (陡升實驗之原點) 為最高 (24.4 g/L)。

3. 中心混成實驗設計

透過陡升路徑實驗後便已趨近於極值點，但若是尋找極值點的位置可使用中心混成實驗設計。中心混成實驗設計需要以陡升路徑所找尋到極值點附近條件進行，將找尋到的條件以各單位水準範圍做適當的左右延展，做出立體化曲面進而尋找到極值點。依照陡升路徑的實驗結果，將第一組 (125 rpm、40°C、pH 6) 實驗點的培養條件做為新的原點，並重新設定嘗試範圍，中心混成實驗設計表與結果如表 6。在進行迴歸分析後 (表 7) 發現 3 個環境因子對木糖醇的產量皆沒有顯著影響。從二階回應曲面圖與等高線圖來看轉速只能維持在 120 rpm~130 rpm 之間，而溫度條件必須維持在 35°C 以上 40°C 以下，pH 則必須維持在 6，這時木糖醇的產量才會增加，圖 6 為轉速與 pH 對生產木糖醇影響之二階回應曲面圖與等高線圖，其他二階回應曲面圖與等高線圖則未顯示。而此次複迴歸分析所得方程式為方程式 (2)

$$Y=18.96281+2.51774X_1+0.12644X_2-3.41836X_3-4.92518X_1^2-3.68510X_2^2-2.48222X_3^2-0.22250X_1X_2-2.28600X_1X_3+0.17200X_2X_3 \quad (2)$$

在表 6 中可得知木糖醇產量最高為第 16 組，而第 16 組的培養條件為 125 rpm、40°C、pH 6，在此條件下木糖醇產量為 25.13 g/L，此結果 2³ 因子實驗設計之最高木糖醇產量(24.82 g/L)，且條件相同。另外迴歸分析結果如表 7 所示，檢定係數 (R-sqr=0.66728) 顯示迴歸方程式沒有辦法適切的表達出此模式在實驗數據上的適用性。從中心混成實驗設計的變異數分析表 (表 8) 中可以得知 F 檢定也不具有顯著性，缺適

檢定 (lack-of-fit) 達顯著水準 (p>0.05)，皆表示此次迴歸所得到的二次多項式模式適切性不佳。因此往後將以一次一因子所得之最適條件，亦是一階回應曲面時所得之最佳條件作為以 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之最適條件。

(七) 以最適條件生產木糖醇

由上述以一次一因子方法與回應曲面實驗設計法探討 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之最適條件。結果發現 *C. tropicalis* 最適條件為 125 rpm、40°C、pH 6。木糖醇產量為 25.03 g/L。圖 7 為以此條件進行 3 重複實驗所得結果，結果顯示此條件可重複有效的生產高產量之木糖醇，此為目前以 *Candida tropicalis* 生產木糖醇之最適條件。

表 6. 中心混成實驗設計表

| Factor No | 轉速 (rpm) | pH | 溫度 | Xylitol (g/L) |
|-----------|------------|--------------|--------------|---------------|
| 1 | -1 (100) | -1 (5) | -1 (35) | 2.45 |
| 2 | -1 (100) | -1 (5) | 1 (45) | 0 |
| 3 | -1 (100) | 1 (7) | -1 (35) | 2.48 |
| 4 | -1 (100) | 1 (7) | 1 (45) | 0 |
| 5 | 1 (150) | -1 (5) | -1 (35) | 14.77 |
| 6 | 1 (150) | -1 (5) | 1 (45) | 0 |
| 7 | 1 (150) | 1 (7) | -1 (35) | 13.02 |
| 8 | 1 (150) | 1 (7) | 1 (45) | 0 |
| 9 | -1.68 (83) | 0 (6) | 0 (40) | 4.9 |
| 10 | 1.68 (167) | 0 (6) | 0 (40) | 7.1 |
| 11 | 0 (125) | -1.68 (4.32) | 0 (40) | 8.3 |
| 12 | 0 (125) | 1.68 (7.68) | 0 (40) | 10.7 |
| 13 | 0 (125) | 0 (6) | -1.68 (31.6) | 9.2 |
| 14 | 0 (125) | 0 (6) | 1.68 (48.4) | 0 |
| 15 (C) | 0 (125) | 0 (6) | 0 (40) | 24.72 |
| 16 (C) | 0 (125) | 0 (6) | 0 (40) | 25.13 |

15 (C) 及 16 (C) 為中心點重複二次

表 7. 中心混成實驗設計迴歸分析表

| Parameter | Coeff. | Pure Error | T | P |
|-------------------------------|----------|------------|----------|----------|
| Mean/Interc. | 18.96281 | 4.561003 | 4.15760 | 0.005960 |
| X ₁ | 2.51774 | 2.127750 | 1.18329 | 0.281450 |
| X ₁ X ₁ | -4.92518 | 2.387982 | -2.06249 | 0.084764 |
| X ₂ | 0.12644 | 2.127750 | 0.05943 | 0.954543 |
| X ₂ X ₂ | -3.68510 | 2.387982 | -1.54319 | 0.173730 |
| X ₃ | -3.41836 | 1.773890 | -1.92758 | 0.102186 |
| X ₃ X ₃ | -2.48222 | 1.059777 | -2.34221 | 0.057670 |
| X ₁ X ₂ | -0.22250 | 2.688611 | -0.08276 | 0.936737 |
| X ₁ X ₃ | -2.28600 | 2.150889 | -1.06282 | 0.328758 |
| X ₂ X ₃ | 0.17200 | 2.150889 | 0.07997 | 0.938864 |

R-sqr=0.66728

X₁: 轉速 (rpm); X₂: pH; X₃: 溫度

*Probability < 5%

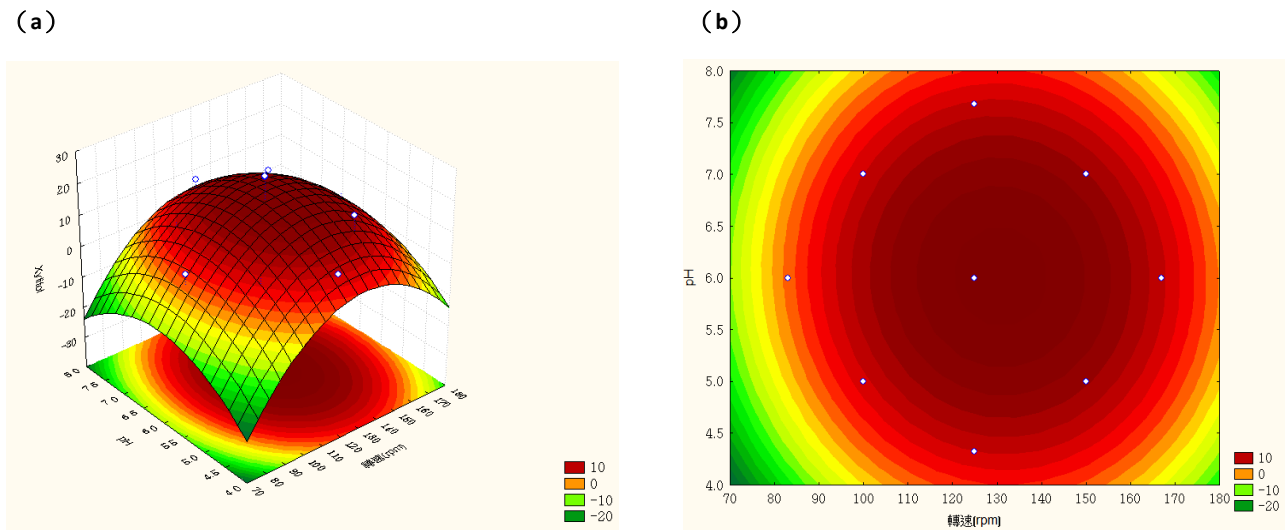


圖 6. 轉速與 pH 對生產木糖醇影響二階回應曲面圖 (a) 與等高線圖 (b)

表 8. 中心混成實驗設計變異數分析表

| Parameter | SS | df | MS | F | P |
|-------------------------------|----------|----|----------|-----------|----------|
| X ₁ | 80.970 | 1 | 80.9702 | 1.400165 | 0.281450 |
| X ₁ X ₁ | 245.996 | 1 | 245.9961 | 4.253850 | 0.084764 |
| X ₂ | 0.204 | 1 | 0.2042 | 0.003531 | 0.954543 |
| X ₂ X ₂ | 137.715 | 1 | 137.7155 | 2.381424 | 0.173730 |
| X ₃ | 214.869 | 1 | 214.8685 | 3.715582 | 0.102186 |
| X ₃ X ₃ | 317.246 | 1 | 317.2458 | 5.485926 | 0.057670 |
| X ₁ X ₂ | 0.396 | 1 | 0.3960 | 0.0068495 | 0.936737 |
| X ₁ X ₃ | 65.322 | 1 | 65.3224 | 1.129579 | 0.328758 |
| X ₂ X ₃ | 0.370 | 1 | 0.3698 | 0.006395 | 0.938864 |
| Pure Error | 346.974 | 16 | 57.8290 | | |
| Total SS | 1042.832 | 15 | | | |

R-sqr=0.66728
 X₁ : 轉速 (rpm) ; X₂ : pH; X₃ : 溫度

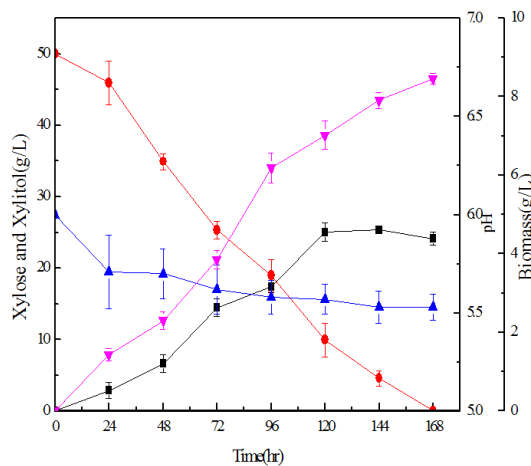


圖 7. 以最適條件生產木糖醇之 3 重複實驗

(■) Xylitol ; (●) Xylose ; (▲) pH ; (▼) Biomass

四、結論

木糖醇為天然糖醇的一種，可用於食品、醫學以及保健食品，為用途廣泛的天然物。本研究先行探討兩株木糖醇生產菌株 *Candida tropicalis* BCRC21436 與 *Candida guilliermondii* BCRC21559 生產木糖醇之比較，發現 *C. tropicalis* 較 *C. guilliermondii* 為更合適之菌株。再以一次一因子方法與回應曲面實驗設計法探討 *C. tropicalis* 生產木糖醇之最適條件。結果發現此二方式所得 *C. tropicalis* 生產木糖醇最適條件皆為 125 rpm、40℃、pH 6，木糖醇產量為 25.03 g/L，此為目前以 *C. tropicalis* 生產木糖醇之最適條件(表 1)，此條件應可作為後續以生物法進行工業化大量生產木糖醇之參考依據。

參考文獻

1. 郭威志 (民 96), 菌種篩選及玉米穗軸水解液之發酵生產木糖醇, 朝陽科技大學應用化學系碩士論文。
2. 陳玉青 (民 93), 酵母菌發酵木糖生產木糖醇-培養基最適化, 朝陽科技大學應用化學系碩士論文。
3. Barbosa, M. S. S., M. B. De Medeiros, I. M. De Mancilha, H. Schneider and H. Lee (1998) Screening of yeasts for production of xylitol from D-xylose and some factors which affect xylitol yield in *Candida guilliermondii*. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology*, 3(4), 241-251.
4. Barnett, J. A. (1976) The utilization of sugars by yeasts. *Advances in Carbohydrates Chemistry and Biochemistry*, 32, 125-234
5. Cao, N. J., R. Tang, C. S. Gong and L. F. Chen (1994) The effect of cell density on the production of xylitol from D-xylose by yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 45-46, 515-519.
6. Carvalho, W., L. Canilha and S. S. Silva (2008) Semi-continuous xylose-to-xylitol bioconversion by Ca-alginate entrapped yeast cells in a stirred tank reactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 31(5), 493-498.
7. Granstrom, T. B., K. Izumori and M. Leisola (2007) A rare sugar xylitol. Part I. The biochemistry and biosynthesis of xylitol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74(2). 277-281.
8. Hyvönen, L. and P. Koivistoinen (1982) Food technological evaluation of xylitol. In: *Advances in Food Research*, 28, 373-400. Chichester, C. O., E. M. Mrak, and G. F. Stewart, Eds. Academic press, New York.
9. Kumar, S., P. Dheeran, S. P. Singh, I. M. Mishra and D. K. Adhikari (2015) Bioprocessing of bagasse hydrolysate for ethanol and xylitol production using thermotolerant yeast. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 38(1), 39-47.
10. Kwon, S. G., S. W. Park and D. K. Oh (2006) Increase of xylitol productivity by cell-recycle fermentation of *Candida tropicalis* using submerged membrane bioreactor. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(1), 13-18.
11. Mäkinen, K. K. (1992) Dietary prevention of dental caries by xylitol-clinical effectiveness and safety. *Journal of Applied Nutrition*, 44, 16-28.
12. Melaja, A. J. and L. Hämäläinen (1997) Process for making xylitol. U.S. patent 4,008,285, February 15.
13. Misra, S., S. Raqhuwanshi and R. K. Saxena (2012) Fermentation behavior of an osmotolerant yeast *D. hansenii* for xylitol production. *Biotechnology Progress*, 28(6), 1457-1465.
14. Mukherji, R., K. Joshi-navare and A. Prabhune (2013) Crystalline xylitol production by a novel yeast, *Pichia caribbica* (HQ222812) and its application for quorum sensing inhibition in gram-negative marker strain *Chromobacterium violaceum* CV026. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 169 (6), 1753-1763.
15. Nigam, P and D. Singh (1995) Processes for fermentative production of xylitol-sugar substitute. *Process Biochemistry* 30(2), 7-24.
16. Nolleau, V., L. Preziosi-Belloy, J. P. Delgenes and J. M. Navarro (1993) Xylitol production from xylose by two yeast strains: sugar tolerance. *Current Microbiology*, 27(4), 191-197.
17. Parajó, J. C., H. Domínguez and J. M. Domínguez (1998) Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*, 65(3), 191-201.
18. Parajo, J. C., H. Dominguez and J. M. Dominguez (1998) Biotechnological production of xylitol. Part 3: Operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. *Bioresource Technology*, 66(1), 25-40.
19. Prakasham, R. S., R. S. Rao and P. J. Hobbs (2009) Current trends in biotechnological production of xylitol and future prospects. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 3(1), 8-36.
20. Rafiqul, I. S. M. and A. M. A. Mimi Sakinah (2012) Perspective bioproduction of xylitol by enzyme technology and future prospects *International Food Research Journal*, 19(2), 405-408.
21. Sampaio, F. C., V. M. Chaves-Alves, A. Converti, F. M. Lopes-Passos and J. L. Cavalcante-Coelho (2008) Influence of cultivation conditions on xylose -to- xylitol bioconversion by a new isolate of *Debaryomyces hansenii*. *Bioresource Technology*, 99(3), 502-508.
22. Schiweck, H. A. Bär, R. Vogel, E. Schwarz and M. Kunz (2003). Sugar alcohols. In: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 25, 413-426. Wiley- VCH, Weinheim.

-
23. Silva, S. S. and A. S. Afschar (1994) Microbial production of xylitol from D-xylose using *Candida tropicalis*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 11(4), 129-134.
24. Uhari M, T. Kontiokari, M. Koskela and M. Niemela (1996) Xylitol chewing gum in prevention of acute otitis media: Double blind randomized trial. *British Medical Journal*, 313(7066), 1180-1184.
25. Wannawilai S., S. Sirisansaneeyakul and Y. Chisti (2015) Benzoate-induced stress enhances xylitol yield in aerobic fed- batch culture of *Candida mogii* TISTR 5892. *Journal of Biotechnology*, 194, 58-66.
26. Washüttl, J., P. Riederer and E. Banchem (1973) A qualitative and quantitative study of suger-alcohols in several foods. *Journal of Food Science*, 38(7), 1262-1263.
27. Ylikahri, R. (1979) Metabolic and nutritional aspects of xylitol. In: *Advances in Food Research*, 25, 159-180. Chichester, C. O., E. M. Mrak, and G. F. Stewart, Eds. Academic press, New York.
28. Zhang, J., A. Geng, Y. C. Yao, Y. Lu and Q. Li (2012) Xylitol production from D-xylose and horticultural waste hemicellulosic hydrolysate by a new isolate of *Candida athensensis* SB18. *Bioresource Technology*, 105, 134-141.

收件：107.05.21 修正：107.09.03 接受：107.10.29