

少根根霉利用木糖和葡萄糖分步发酵制备富马酸

刘宁¹, 李霜¹, 何皓¹, 吴华¹, 黄和¹, 嵇松杨²

(1. 南京工业大学制药与生命科学学院, 江苏 南京 210009; 2. 北京盈信阳光生物技术有限公司, 北京 100086)

摘要: 将木糖与葡萄糖分别用于少根根霉种子培养及发酵产富马酸 2 个阶段, 少根根霉利用木糖进行种子培养时, 最适木糖浓度为 30 g/L, 摇瓶最适孢子浓度为 $(4\sim6)\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 最佳种龄 32~40 h, 最适接种量为 8%(φ), 在含有 100 g/L 葡萄糖的产酸发酵培养基中发酵 72 h 后, 富马酸最高浓度达 53.51 g/L. 研究表明, 可以利用木糖替代葡萄糖进行少根根霉的种子培养, 分步发酵制备富马酸.

关键词: 富马酸; 木糖; 葡萄糖; 少根根霉; 分步发酵

中图分类号: TQ92 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2008)04-0794-04

1 前言

富马酸是一种重要的化学品, 可广泛用于化工、涂料、树脂、食品、医药等领域. 当前富马酸生产的主流技术是顺酐异构法. 随着化石资源日益枯竭, 研究利用可再生的生物质资源发酵制备富马酸成为大势所趋^[1,2]. 利用少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)等丝状真菌经耗氧发酵产富马酸, 使用的原料主要为葡萄糖^[3-5]. 当前全球粮食价格大幅上涨, 导致了发酵法制备富马酸的成本增加, 开拓以廉价非粮来源的基质制备富马酸势在必行.

木质纤维素来源于玉米秸秆、玉米芯、甘蔗渣、废木屑等工农业废弃物, 是最丰富的生物质资源. 木质纤维素分步水解可得到以木糖为主的半纤维素水解液和以葡萄糖为主的纤维素水解液, 其中木糖含量可达总糖的 30%^[6,7], 对木糖的高效合理利用是实现木质纤维素资源化的关键. 目前对木糖的利用主要集中在生产燃料乙醇、木糖醇等工业产品^[7,8]; 少数研究报道真菌可以利用木糖生产富马酸、乳酸等有机酸^[9-11], 但普遍存在产酸量低、生产速率差、糖酸转化率低等问题. Kautola 等^[9]以木糖为唯一碳源对少根根霉进行固定化培养发酵 9~10 d, 富马酸最高产量为 15.3 g/L, 最高生产速率仅为 71 mg/(L·h). 可见单一使用木糖进行发酵产富马酸的生产经济性较差, 制约了木糖的工业化利用.

本研究提出利用木糖和葡萄糖分步发酵制备富马酸的新策略, 将木糖用于少根根霉的种子培养, 以葡萄糖为碳源批次发酵产富马酸. 目前, 利用不同的碳源分步发酵制备富马酸的工艺路线尚未有报道, 该方法有效避免了利用木糖发酵产富马酸产率低等问题, 可为利用木质纤维素资源制备富马酸奠定基础.

2 材料与方法

2.1 菌种

少根根霉(*Rhizopus arrhizus*)ME-F22-2, 经本实验室诱变育种后保藏^[11].

2.2 培养基

产孢斜面培养基(g/L): 葡萄糖 4, 乳糖 6, 甘油 10, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1, 酵母膏 3, KH_2PO_4 0.4, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, NaCl 30, 琼脂 50.

种子培养基(g/L): 葡萄糖或木糖 40, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5, 酵母膏 2.4, KH_2PO_4 0.8, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01. 用 H_2SO_4 调节 pH 至 3.5.

产酸发酵培养基(g/L): 葡萄糖 100, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.8, 酵母膏 0.4, KH_2PO_4 0.4, $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.4, $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01. 以 CaCO_3 为中和剂, 添加过量的 CaCO_3 保持培养基的 pH 基本为 5.5.

2.3 培养方法

菌株在产孢斜面上培养 5~7 d, 用无菌的 0.05 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 6.8)冲洗, 稀释为 10^7 mL^{-1} 的孢子悬浮液.

在含有 50 mL 木糖种子培养基的 250 mL 凹槽摇瓶中接入适量孢子悬浮液, 置于 34℃ 摇床, 120 r/min 培养 18~50 h.

在含有 50 mL 葡萄糖种子培养基的 250 mL 凹槽摇瓶中接入适量孢子悬浮液, 置于 34℃ 摇床, 220 r/min 培养 18~50 h.

取 4 mL 种子培养液转接于装有 50 mL 产酸发酵培养基的 250 mL 凹槽摇瓶中, 并添加灭菌的 CaCO_3 , 置于 34℃ 摇床 160 r/min 发酵培养.

收稿日期: 2008-03-27, 修回日期: 2008-06-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 20576054); 国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(编号: 2006AA02Z240); 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号 2007CB707805)

作者简介: 刘宁(1982-), 女, 河北省保定市人, 硕士研究生, 生物化工专业; 黄和, 通讯联系人, Tel: 025-86990023, E-mail: biotech@njut.edu.cn.

2.4 分析方法

样品制备: 停止发酵后添加适量 1 mol/L HCl, 调节发酵液至酸性并水浴加热使富马酸溶解, 抽滤后取上清液用于分析检测。

葡萄糖测定采用 SAC-40 生物传感仪, 木糖测定采用 DNS 法。

富马酸含量测定: 高效液相色谱法(HPLC), DIONEX HPLC P680 工作站, Alltech 有机酸色谱柱 250 mm×4.6 mm, 紫外检测波长 210 nm, 流速 1 mL/min, 进样量 20 μ L, 流动相 25 mmol/L KH_2PO_4 , pH 2.5, 柱温为室温。

菌体干重的测定: 抽滤, 无菌水洗脱, 菌丝体 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重后, 称重得到菌体干重, 菌体浓度用 g/L 表示(干重, 下同)。

3 结果与讨论

3.1 不同碳源对少根根霉生长的影响

分别使用 40 g/L 葡萄糖和木糖为种子培养碳源, 比较少根根霉的菌体生长、耗糖及种子液 pH, 结果见图 1。以葡萄糖为碳源培养少根根霉时, 停滞期较短, 20 h 后达到稳定期, 生物量约为 5.32 g/L。由于容易利用葡萄糖合成有机酸, 种子液 pH 下降迅速, 导致对菌体生长的抑制, 20 h 后菌体生物量没有明显增加。以木糖为碳源培养少根根霉时, 前期菌体生长相对缓慢, 30 h 生物量达 5.42 g/L, 由于少根根霉较难利用木糖产酸^[9,11], 培养过程中 pH 下降缓慢, 菌体生物量持续增加, 培养 50 h 后少根根霉的生物量达到 6.39 g/L。可见少根根霉利用木糖进行菌体生长, 可以获得较高的生物量。

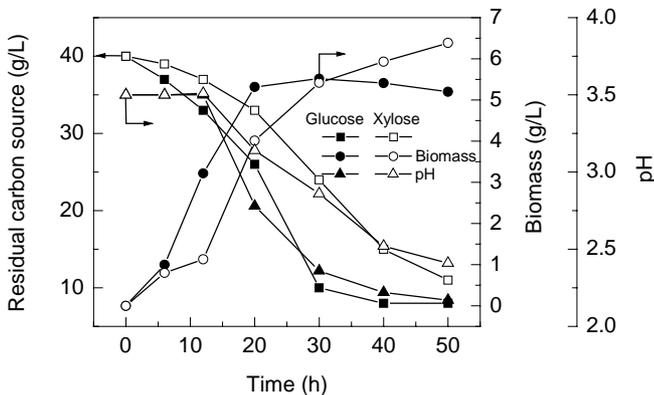


图1 碳源对少根根霉生长的影响

Fig.1 Effect of carbon sources on growth of *Rhizopus arrhizus*

3.2 孢子浓度对种子培养的影响

分别接种不同量浓度为 10^7 mL^{-1} 的孢子悬浮液至含 40 g/L 木糖的种子培养基, 培养 36 h 后, 菌体生物

量、木糖残余浓度及形态如表 1 所示。菌体生物量随孢子浓度提高而增加, 木糖残余浓度随孢子浓度增加而降低。同时孢子浓度影响菌体形态, 孢子液接种量为 2%~6%(φ)时, 种子培养形态为均匀分散的菌丝球, 接种量超过 8%(φ)后, 菌丝缠绕形成团块状。少根根霉形态对发酵影响很大, 一般分散的菌丝球易于营养物质及氧气的传递, 对产酸有利^[12]。结合生物量及菌体形态等因素, 摇瓶孢子浓度以 $(4\sim6)\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$ 为宜。

表 1 不同孢子浓度对种子培养的影响
Table 1 Effect of spore concentration on seed culture

Inoculum (% φ)	Spore conc. ($\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$)	Residual xylose (g/L)	Biomass (g/L)	Morphology
2	2	27.3	4.44	Discrete pellets
4	4	18.5	5.54	Discrete pellets
6	6	16	5.96	Discrete pellets
8	8	13.7	5.98	Clumped, coalesced growth
10	10	11.4	6.18	Clumpy growth

3.3 种龄对富马酸产量的影响

接种 4%(φ)少根根霉孢子悬浮液至木糖种子培养基培养 18~48 h, 以接种量 8%(φ)转接入含 100 g/L 葡萄糖的产酸发酵培养基, 种子液生物量、发酵 72 h 后的残糖及富马酸产量如表 2 所示。种龄较短(<24 h)的种子液生物量较少, 发酵结束时残糖多, 产酸少; 种龄过长(>40 h)虽然菌体生物量较多, 但接种后产酸能力差。选择种龄为 32~40 h 的种子, 可以获得尽量多的细胞量, 又能保持较高的细胞活力, 对产酸有利, 富马酸产量较高。

表 2 种龄对发酵产富马酸的影响
Table 2 Effect of seed age on the fermentation

Seed age (h)	Biomass (g/L)	Residual glucose (g/L)	Fumaric acid (g/L)
18	2.83	24	31.1
24	4.37	11	42.9
32	5.47	3	52.4
40	5.96	5	48.2
48	6.13	13	33.8

3.4 木糖浓度对生物量及发酵产富马酸的影响

将木糖浓度为 20~50 g/L 的种子培养基培养 36 h 后接种至含 100 g/L 葡萄糖的产酸发酵培养基中, 种子培养基中木糖利用率、生物量及富马酸产量见表 3。种子培养基中木糖初始浓度为 20 g/L 左右时, 木糖利用率高达 97%, 但少根根霉的生物量较少, 后继发酵富马酸产量低; 木糖初始浓度为 30~40 g/L 时, 少根根霉的生物量及富马酸产量差异不显著, 而木糖的利用率由 62% 降至 45%; 木糖初始浓度为 50 g/L 时, 种子培养基中残留木糖较多, 木糖利用率降至 32%, 对后继产酸发酵过程中葡萄糖的利用产生了一定的抑制作用, 富马酸产量仅为 41.4 g/L。综合考虑种子培养基的木糖利用率及产酸结果, 最适木糖浓度选择 30 g/L。

表3 木糖初始浓度对生物量及发酵产富马酸的影响

Table 3 Effect of initial concentration of xylose on the seed culture and fermentation

Initial xylose (g/L)	Residual xylose (g/L)	Availability of xylose (%)	Biomass (g/L)	Fumaric acid (g/L)
19.4	0.4	97.9	4.01	34.2
30.2	11.3	62.6	5.49	51.9
42.1	22.8	45.8	5.63	53.1
50.4	34.1	32.3	5.52	41.4

3.5 接种量对发酵产富马酸的影响

以 30 g/L 的木糖种子培养基培养 36 h 后, 分别以不同接种量接种至含 100 g/L 葡萄糖的产酸发酵培养基中, 发酵不同时间后的残余葡萄糖量、生物量及富马酸生成量见表 4. 接种量的大小通常取决于菌体在发酵培养基中的生长繁殖速度, 对发酵影响较大. 接种量为 4% (φ) 时, 产酸发酵过程菌体生长缓慢, 72 h 生物量仅为 5.79 g/L, 富马酸产量仅为 29.6 g/L. 接种量为 12% (φ) 时, 产酸发酵过程生物量快速增长, 达到 7.05 g/L, 耗糖速率快, 营养成分快速被利用, 导致发酵液中营养不足, 影响富马酸合成, 糖酸转化率下降. 因此, 最适接种量为 8% (φ).

表4 接种量对葡萄糖发酵产富马酸的影响

Table 4 Effect of inoculum volume on the fermentation

Inoculum (% φ)	Time (h)	Residual glucose (g/L)	Biomass (g/L)	Fumaric acid (g/L)
4	24	82	1.91	6.25
	48	55	2.88	17.9
	72	28	3.59	29.6
8	24	56	4.72	12.9
	48	20	6.84	41.8
	72	3	7.25	52.5
12	24	36	5.51	11.6
	48	8	6.71	40.1
	72	0	7.05	36.7

3.6 以木糖和葡萄糖为种子培养基对产富马酸的影响

将分别培养 20 h 的葡萄糖种子液^[4]及 36 h 的木糖种子液, 以接种量 8% (φ) 接种至含 100 g/L 葡萄糖的产酸发酵培养基中, 发酵过程的葡萄糖消耗、生物量增加及富马酸产生情况如图 2 所示. 发酵前 12 h, 2 种不同碳源培养的种子对葡萄糖的消耗速率差异不显著, 但 12 h 后利用木糖培养的种子其菌体生长速率及产富马酸速率相对较缓慢. 由此可见在种子培养阶段用木糖、产酸发酵阶段用葡萄糖为碳源, 导致了停滞期略有延长, 菌体细胞需要适应并代谢葡萄糖. 发酵结束时, 不同种子的菌体生物量及残余葡萄糖基本一致. 以葡萄糖为种子碳源时, 产酸发酵 60 h 时富马酸产量最高达 53.72 g/L, 发酵液中葡萄糖基本耗尽, 持续发酵菌体消耗富马酸, 产量略有下降; 以木糖为种子碳源, 产酸发酵 60 h 富马酸产量为 50.4 g/L, 持续发酵至 72 h, 富马酸产量最高

达 53.51 g/L. 由此可见, 可以利用木糖替代葡萄糖进行少根根霉的种子培养, 分步利用木糖和葡萄糖制备富马酸的工艺路线具有较好的可行性.

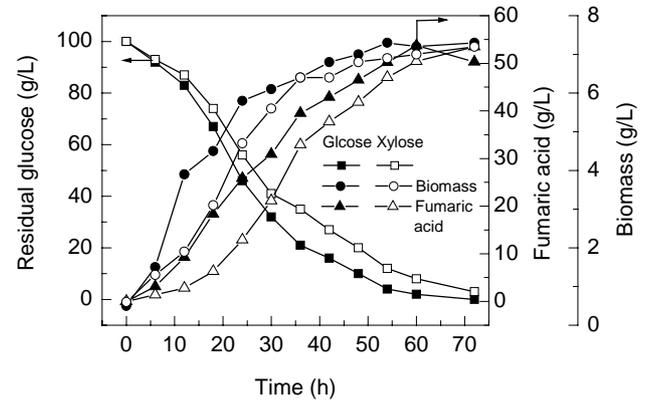


图2 以木糖和葡萄糖为碳源培养的种子对产酸发酵的影响
Fig.2 Fermentation results with glucose and xylose as carbon sources of seed culture medium

前期研究^[11]表明, 少根根霉利用 100 g/L 木糖发酵产富马酸最高产量仅为 7.3 g/L. 而少根根霉分步利用木糖和葡萄糖发酵产富马酸时, 种子培养基中木糖利用率达 62.6%, 富马酸最高产量为 53.51 g/L, 避免了单纯使用木糖发酵产酸过低的问题. 采用木糖、葡萄糖分步发酵工艺后, 种子培养时间和产酸发酵时间均推迟约 10~12 h, 但考虑到未来使用工农业废弃木质纤维素, 来源丰富而且廉价, 同时种子培养基所需木糖浓度相对较低, 可以减少浓缩等工艺的成本^[6], 因此利用木糖部分替代葡萄糖, 分步发酵制备富马酸仍具有经济性.

长期以来对木糖的利用趋向于合成乙醇、乳酸等代谢终产物, 而微生物通过磷酸戊糖途径代谢木糖^[13]主要产生还原力 NADPH 及生物大分子如核酸等的碳骨架, 用于微生物的生长所需^[14]. 本研究利用微生物代谢木糖的特点, 将其用于支持少根根霉菌体生长, 避免了微生物代谢木糖积累富马酸的转化率低等问题, 开创性地提出利用木糖和葡萄糖分步发酵的策略.

4 结论

本研究将木糖与葡萄糖分别用于少根根霉种子培养及发酵两个阶段, 少根根霉利用木糖为种子培养碳源时, 最适木糖浓度 30 g/L, 摇瓶最适孢子浓度 $(4\sim6)\times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 最佳种龄 32~40 h; 以 8% (φ) 接种量接种至含 100 g/L 葡萄糖的产酸发酵培养基中, 发酵 72 h 富马酸最高浓度达 53.51 g/L. 少根根霉利用木糖和葡萄糖分步发酵产富马酸的新工艺有望为木质纤维素资源的全利用提供新的途径.

参考文献:

- [1] 李学坤, 张昆, 高振, 等. 富马酸的合成及应用 [J]. 现代化工, 2005, 25(增刊): 81-83.
- [2] Engel C R, Straathof A J, Zijlmans T W, et al. Fumaric Acid Production by Fermentation [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2008, 78(3): 379-389.
- [3] Lorraine B, Ling N D, Thomas K N, et al. Fermentation Process for Carboxylic Acids [P]. US Pat.: 4877731, 1989-10-31.
- [4] Petruccioli M, Angiani E, Federici F. Semicontinuous Fumaric Acid Production by *Rhizopus arrhizus* Immobilized in Polyurethane Sponge [J]. Process Biochem., 1996, 31(5): 463-469.
- [5] Cao N, Du J, Chen C, et al. Production of Fumaric Acid by Immobilized *Rhizopus* Using Rotary Biofilm Contactor [J]. Appl. Biochem. Biotechnol., 1997, 63(16): 387-394.
- [6] 何北海, 林鹿, 孙润仓, 等. 木质纤维素化学水解产生可发酵糖研究 [J]. 化学进展, 2007, 19(7/8): 1141-1145.
- [7] 李巍峰, 张晓梅, 陈冠军, 等. 木糖发酵酒精代谢工程的研究进展 [J]. 过程工程学报, 2006, 6(1): 138-143.
- [8] 孙昆山, 吴绵斌, 夏黎明. 利用可再生纤维素资源生物转化生成木糖醇的研究进展 [J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(9): 74-78.
- [9] Kautola H, Linko Y Y. Fumaric Acid Production from Xylose by Immobilized *Rhizopus arrhizus* Cells [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1989, 31(5/6): 448-452.
- [10] Maas R, Bakker R, Eggink G, et al. Lactic Acid Production from Xylose by the Fungus *Rhizopus oryzae* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2006, 72(5): 861-868.
- [11] 刘宁, 周晨, 高振, 等. 少根根霉利用木糖产富马酸的菌种选育 [A]. 第四届全国化学工程与生物化工年会论文集 [C]. 2007. 1033.
- [12] Byrne G S, Ward O P. Growth of *Rhizopus arrhizus* in Fermentation Media [J]. J. Ind. Microbiol., 1989, 4: 155-161.
- [13] 牟建楼, 王颀, 张伟, 等. 木糖发酵微生物的研究进展 [J]. 纤维素科学与技术, 2004, 12(2): 35-40.
- [14] 沈同, 王镜岩, 赵邦悌, 等. 生物化学, 第2版 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 103-104.

Stepped Utilization of Xylose and Glucose in Fermentation of Fumaric Acid by *Rhizopus arrhizus*LIU Ning¹, LI Shuang¹, HE Hao¹, WU Hua¹, HUANG He¹, JI Song-yang²

(1. College of Life Science and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing, Jiangsu 210009, China;

2. WinHonor Bioscience Limited Corporation, Beijing 100086, China)

Abstract: The fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus* using xylose as the carbon source of seed culture medium and glucose as carbon source of fermentation medium was studied. In the seed culture, the biomass of *Rhizopus arrhizus* obtained using xylose was more than that using glucose. The conditions of the seed culture were optimized. The results showed that the optimal xylose concentration was 30 g/L, the suitable spore concentration range $(4\sim6)\times 10^5$ mL⁻¹ and the seed age range 32~40 h. The final concentration of fumaric acid was 53.51 g/L in the fermentation medium containing 100 g/L glucose. The result implies that the problem of low conversion rate of xylose could be avoided, and the availability of xylose improved, which would facilitate further study on the stepped utilization of lignocellulose hydrolysate in fermentation of fumaric acid.

Key words: fumaric acid; xylose; glucose; *Rhizopus arrhizus*; stepped utilization