

研究报告

寄生曲霉 CICC40365 利用木糖产 L-苹果酸的发酵条件优化

吴悦^{1,2,3} 潘丽军^{1,2,3*} 李兴江^{1,2,3} 姜绍通^{1,2,3}

(1. 合肥工业大学 生物与食品工程学院 安徽 合肥 230009)

(2. 安徽省农产品精深加工重点实验室 安徽 合肥 230009)

(3. 合肥工业大学 农产品加工研究院 安徽 合肥 230009)

摘要:【目的】为提高 L-苹果酸产量及木糖利用率,以寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus* CICC40365)为菌种,木糖为碳源,对其发酵工艺及木糖代谢途径进行初步研究。【方法】采用单因素试验和响应曲面法(Box-Behnken 设计)对培养基和发酵条件进行优化。【结果】获得最佳培养基配方为:木糖 100.0 g/L、硫酸铵 2.0 g/L、酵母浸粉 3.0 g/L、硫酸镁 0.20 g/L、硫酸锰 0.15 g/L、硫酸亚铁 0.08 g/L、碳酸钙 80.00 g/L, L-苹果酸的产量为 53.58 g/L,较优化前提高 40.5%。发酵条件较好组合为:接种量为 8% (体积比)、摇瓶装液量 60 mL/250 mL、发酵温度 32 °C、摇床转速 170 r/min、发酵周期 8 d, L-苹果酸的产量为 55.47 g/L。Mg²⁺、Mn²⁺对木糖代谢中相关酶的影响研究表明,木酮糖激酶在该菌株代谢木糖过程中起着重要作用。【结论】寄生曲霉 CICC40365 能够较好地利用木糖发酵产 L-苹果酸,其产量及木糖的利用效率均得到提高。

关键词: 寄生曲霉, 木糖, L-苹果酸, 响应曲面法, 木酮糖激酶

Optimization of fermentation process for L-malic acid with xylose by *Aspergillus parasiticus* CICC40365

WU Yue^{1,2,3} PAN Li-Jun^{1,2,3*} LI Xing-Jiang^{1,2,3} JIANG Shao-Tong^{1,2,3}

(1. School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009, China)

(2. Key Laboratory for Agriculture Products Proceeding of Anhui Province, Hefei, Anhui 230009, China)

(3. Institute of Agriculture Products Processing Technology, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009, China)

Abstract: [Objective] To increase the yield of L-malic acid and the utilization rate of xylose, the *Aspergillus parasiticus* CICC40365 was used as the strain to produce L-malic acid with xylose, and the fermentation technology in shake flask was investigated in the work. [Methods] The medium components and fermentation conditions were optimized through single factor experiments and response surface methodology. [Results] The optimal medium components were as follows: the xylose, (NH₄)₂SO₄, yeast extract powder, MgSO₄, MnSO₄·H₂O, FeSO₄·7H₂O and CaCO₃ were 100.0, 2.0,

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31071636, 31101352); 安徽省科技计划项目(No. 1206c0805017)

*通讯作者: Tel: 86-551-62919379; ✉: panlijun1955@163.com

收稿日期: 2013-07-05; 接受日期: 2013-09-22; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2013-10-29

3.0, 0.20, 0.15, 0.08 and 80.00 g/L, respectively. The yield of malic acid from the optimal condition was 53.58 g/L and it was 40.5% higher than that of original condition. The reasonable fermentation conditions were inoculum ratio 8% (*V/V*), the liquid volume in the shake flask 60 mL/250 mL, fermentation temperature 32 °C, rotation speed 170 r/min, leading to the 55.47 g/L yield of L-malic acid. Meanwhile, the effect of Mg^{2+} , Mn^{2+} on the relative enzymes in the xylose metabolism indicated that the xylulokinase played an important role in the process of xylose metabolism. **[Conclusion]** The xylose can be better utilized to produce L-malic acid through fermentation with *Aspergillus parasiticus* CICC40365, and the yield of L-malic acid and utilization rate of xylose were improved effectively through this experiment.

Keywords: *Aspergillus parasiticus*, Xylose, L-malic acid, Response surface methodology, Xylulokinase

L-苹果酸(L-malic acid, 简称 LMA)是生物体内三羧酸循环的成员之一,它是一种重要的有机酸^[1-3],被广泛应用于食品、化妆品、医药等领域^[4-6]。

L-苹果酸的主要生产方法有直接提取法、转换法、发酵法^[7]。目前发酵法生产 L-苹果酸的研究相对较少,发酵法主要分为一步法和两步法。一步发酵法是采用一种微生物直接利用糖质原料进行发酵产 L-苹果酸;两步发酵法是两种不同功能的微生物,将糖质原料先转化为延胡索酸,再转化为 L-苹果酸。后者对发酵条件要求很严格,并且发酵周期长,产酸率较低,副产物也较多,不适合工业化生产^[8-10];而一步发酵法可以避免上述缺点,且产物安全性高,备受消费者青睐。对于直接利用糖质原料一步发酵法产 L-苹果酸的菌种多为黄曲霉(*Aspergillus flavus*)和裂褶菌属,以色列 Battat 等^[6]报道利用黄曲霉 ATCC13697 发酵产苹果酸,产酸达 113 g/L,生产强度为 0.59 g/(L·h);胡纯铿^[3]报道了黄曲霉 H-98 发酵产 L-苹果酸,最高产酸超过 50 g/L。钱秀萍等^[7]报道了裂褶菌利用葡萄糖、果糖产 L-苹果酸的产量分别为 10.48 g/L 和 6.28 g/L。虽然利用黄曲霉发酵的产酸量很高,但是发酵中可能会产生黄曲霉毒素,存在安全隐患,而该研究所采用的寄生曲霉,未见有文献报道利用其发酵产 L-苹果酸,且安全性有保障。

本文以寄生曲霉(*Aspergillus parasiticus* CICC40365)为菌种,木糖为碳源,采用单因素和响应曲面法对发酵培养基和发酵条件进行优化,获得最适发酵条件;考察几种金属离子对寄生曲霉

CICC40365 菌株木糖代谢中相关酶的影响,为植物纤维素水解液中木糖的生物转化提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:寄生曲霉 CICC40365,合肥工业大学生物与食品工程学院农产品加工研究院实验室保藏。

1.1.2 培养基:(1) PDA 培养基(g/L):马铃薯 200,葡萄糖 20,琼脂 20, pH 自然。(2) 基础发酵培养基(g/L):木糖 100, $(NH_4)_2SO_4$ 2, 酵母浸粉 3, KH_2PO_4 0.2, $MgSO_4$ 0.1, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.1, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05, $CaCO_3$ 80, pH 7.0, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.1.3 主要试剂:木糖为上海源叶生物科技有限公司生产的分析纯试剂,纯度 99%;其他试剂均为国药集团生产的分析纯试剂。

1.1.4 仪器和设备:高效液相色谱(HPLC)为惠普 1100 系列高效液相系统;721 型可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;HC-3018R 高速冷冻离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;全自动高压灭菌锅,Tege SANYO Industry;恒温气浴摇床,上海申胜生物技术有限公司;恒温培养箱,上海一恒科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 菌种活化:将斜面保存的菌种转接至平板培养基上,置于 32 °C 恒温培养箱内培养 3-5 d,于 4 °C 保存备用。

1.2.2 发酵条件:以洗孢子的形式将平板培养基上

的菌种接入 250 mL 三角瓶中,装液量 20%,接种量 10% (孢子悬液浓度为 1×10^7 个/mL), 32 °C、200 r/min 的条件下振荡培养 7 d。每组试验做 3 个平行,发酵液用于测定 L-苹果酸产量,结果取平均值。

1.3 检测方法

1.3.1 还原糖的测定:采用 DNS 法^[11]。

1.3.2 L-苹果酸的测定:采用 HPLC 法。将发酵液以 1:1 的比例与 0.5 mol/L 硫酸溶液进行混合,在 60 °C 水浴 30 min,置于 8 000 r/min 离心 15 min,进行高效液相色谱法(HPLC)检测。检测条件:色谱仪型号 Waters e2695,色谱柱 Ultimate® LP-C18, 5 μ m, 4.6 mm \times 250 mm;检测器 Waters 2996;进样量 20 μ L;流速 0.8 mL/min;流动相 20 mmol 磷酸盐溶液, pH 2.7。

1.3.3 生物量测定:发酵液过滤得残渣,用 0.01 mol/L 的 HCl 溶液充分洗涤,除去过量的 CaCO_3 ,再用蒸馏水洗涤,得残留菌体,于 80 °C 烘干至恒重称量。

1.3.4 木糖还原酶(XR)及木糖醇脱氢酶(XDH)酶活检测:见参考文献^[12]。

1.3.5 木酮糖激酶(XK)酶活检测:见参考文献^[13]。

1.4 试验设计

1.4.1 培养基配方单因素试验:根据 1.2.2 的发酵条件,1.1.2 中的基础发酵培养基,进行单因素试验,分别考察不同氮源种类及其质量浓度、磷酸二氢钾、硫酸镁、硫酸锰、硫酸亚铁和碳酸钙的质量浓度对 L-苹果酸产量的影响,以确定主要的影响因素及水平区间。每组试验进行 3 次重复,结果取其平均值,采用方差法分析处理试验数据。

1.4.2 响应面试验优化培养基配方:在单因素试验的基础上,以 L-苹果酸产量为响应值,选取对 L-苹果酸产量影响显著的因素以及因素较好的水平区间,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理^[14],采用响应面分析法对发酵培养基参数进行优化,获得最优培养基组成。每组试验重复 3 次,结果取其

平均值。

1.4.3 发酵条件单因素试验:根据 1.4.2 得到的最优配方配制发酵培养基,分别考察接种量、摇瓶装液量和发酵温度对 L-苹果酸产量的影响,试验重复 3 次,结果取其平均值,采用方差法分析处理试验数据。

2 结果与分析

2.1 单因素试验

2.1.1 氮源种类对 L-苹果酸产量的影响:将硫酸铵、硝酸铵、尿素、酵母浸粉、蛋白胨分别以 2 g/L 添加至发酵培养基中,考察不同氮源种类对 L-苹果酸产量的影响。

图 1 仅列出发酵终点数据,结果表明,硫酸铵和酵母粉是该菌株发酵产 L-苹果酸较好的氮源。这是由于硫酸铵通常是霉菌类微生物所偏好优先采用的无机氮源,可被快速利用,有助于微生物生长代谢;酵母粉中含有丰富的营养物质,有利于菌体迅速增长,促进寄生曲霉生物量的积累,同时能提供良好的产酸环境,故能获得更好的产酸效果。因此,选择硫酸铵和酵母粉作为氮源。

2.1.2 硫酸铵质量浓度对 L-苹果酸产量的影响:将 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L 硫酸铵分别添加至基础培养基中进行试验,考察其对 L-苹果酸产量的影响,结果如图 2 所示。

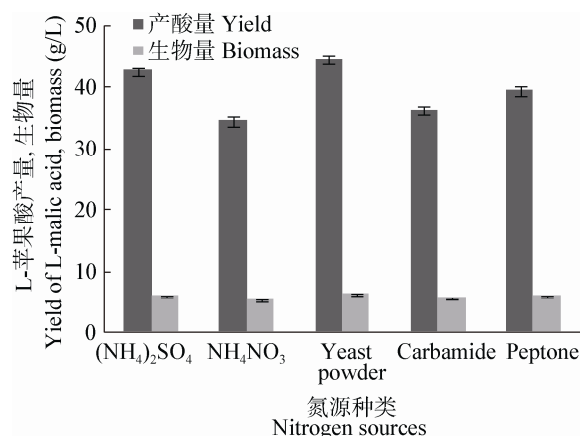


图 1 氮源种类对 L-苹果酸产量的影响

Figure 1 Effect of different nitrogen sources on the yield of L-malic acid

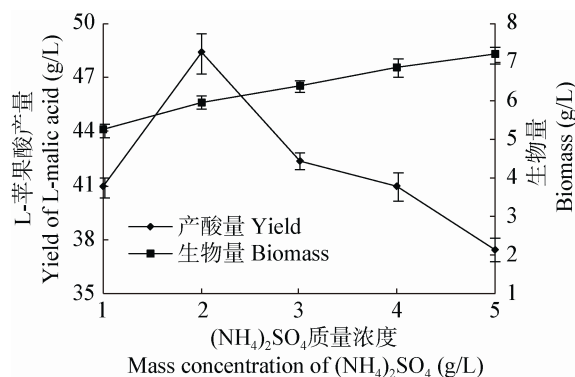


图2 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 质量浓度对 L-苹果酸产量的影响
Figure 2 Effect of mass concentration of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on the yield of L-malic acid

由图 2 可以看出, 硫酸铵质量浓度达到 2 g/L 时, L-苹果酸产量最大(48.35 g/L); 高于 2 g/L 时, 产酸量呈下降趋势。对试验数据方差分析结果表明, 硫酸铵质量浓度对 L-苹果酸产量的影响高度显著($P<0.01$), 因此取硫酸铵的质量浓度为 2 g/L 左右较为适宜。

2.1.3 酵母粉质量浓度对 L-苹果酸产量的影响: 将 1.0、2.0、3.0、4.0、5.0 g/L 酵母粉分别添加至基础培养基中进行试验, 考察其对 L-苹果酸产量的影响, 结果如图 3 所示。

实验结果表明, 酵母粉质量浓度达到 3 g/L 时, L-苹果酸产量最大, 为 48.79 g/L。高于该浓度时, 产量逐渐下降。这是因为酵母粉的营养丰富, 能够

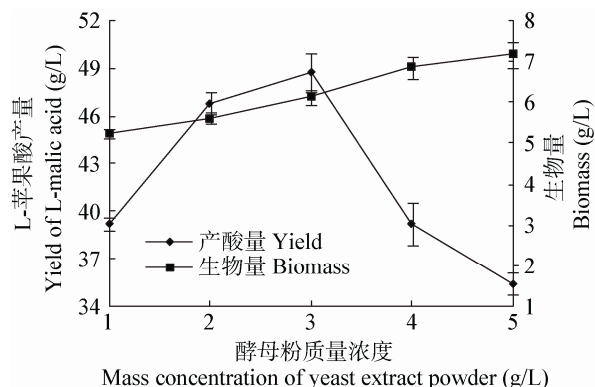


图3 酵母粉质量浓度对 L-苹果酸产量的影响
Figure 3 Effect of mass concentration of yeast extract powder on the yield of L-malic acid

较好地促进菌体生长, 若添加量过多, 则会导致菌体过于旺盛, 而影响代谢产物的积累。方差分析结果表明, 酵母粉对 L-苹果酸产量影响高度显著($P<0.01$), 因此取酵母粉质量浓度为 3 g/L 左右较为适宜。

2.1.4 磷酸二氢钾质量浓度对 L-苹果酸产量的影响: 将 0、0.1、0.2、0.3、0.4 g/L 的 KH_2PO_4 添加至基础培养基进行试验, 考察其对 L-苹果酸产量的影响, 结果如图 4 所示。

由图 4 可知, KH_2PO_4 质量浓度在 0.1 g/L 时产酸最高达 50.44 g/L。方差分析结果表明, KH_2PO_4 对 L-苹果酸产量影响显著($P<0.01$), 因此 KH_2PO_4 的较适质量浓度为 0.1 g/L。

2.1.5 硫酸镁质量浓度对 L-苹果酸产量的影响: 将 0、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5 g/L 的 MgSO_4 添加至基础培养基进行试验, 考察其对 L-苹果酸产量的影响, 结果如图 5 所示。

由图 5 可以看出, L-苹果酸产量随着 MgSO_4 质量浓度先增加后降低, 在 0.2 g/L 时产量达到最大, 为 51.48 g/L。这是因为镁离子通常是大多数酶的激活离子, 少量的镁离子可促进微生物生长代谢, 而高浓度的镁离子会抑制菌种的生长及 L-苹果酸的产量^[15]。方差分析结果表明, MgSO_4 对产酸量影响高度显著($P<0.01$), 因此取 MgSO_4 质量浓度为 0.2 g/L 左右较为适宜。

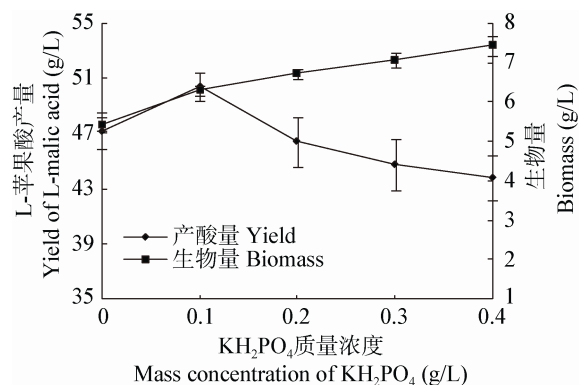


图4 KH_2PO_4 质量浓度对 L-苹果酸产量的影响
Figure 4 Effect of mass concentration of KH_2PO_4 on the yield of L-malic acid

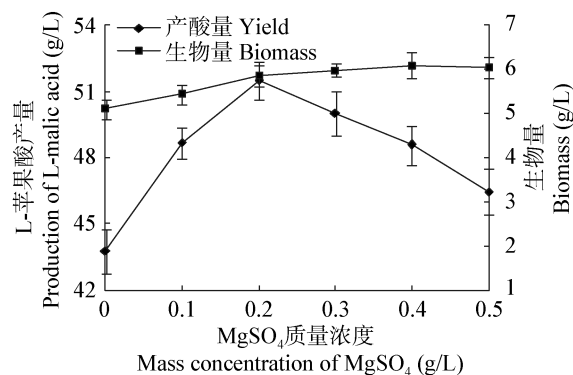
图5 MgSO_4 质量浓度对 L-苹果酸产量的影响

Figure 5 Effect of mass concentration of MgSO_4 on the yield of L-malic acid

2.1.6 硫酸锰质量浓度对 L-苹果酸产量的影响:

将 0、0.05、0.10、0.15、0.20 g/L 的 MnSO_4 添加至基础培养基进行试验,考察其对 L-苹果酸产量的影响,结果如图 6 所示。

由图 6 可知,当 MnSO_4 浓度为 0.15 g/L 时, L-苹果酸产量达到最高(51.98 g/L)。过高或过低的 MnSO_4 浓度均不利于发酵。方差分析结果表明, MnSO_4 对 L-苹果酸产量影响高度显著($P < 0.01$),因此取 MnSO_4 质量浓度为 0.15 g/L 左右较为适宜。

2.1.7 硫酸亚铁质量浓度对 L-苹果酸产量的影响: 将 0、0.01、0.03、0.05、0.07、0.10 g/L 的硫酸亚铁添加至基础培养基进行试验,考察其对 L-苹果酸产量的影响,结果如图 7 所示。

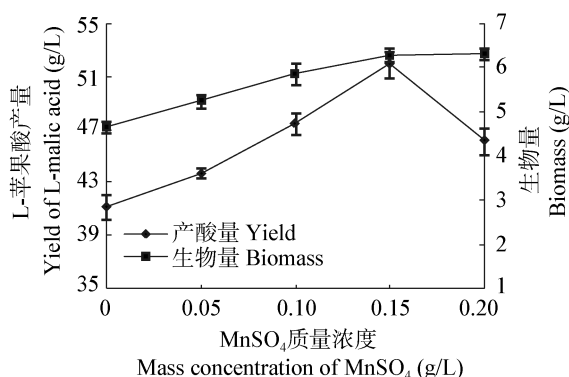
图6 $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 质量浓度对 L-苹果酸产量的影响

Figure 6 Effect of mass concentration of $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ on the yield of L-malic acid

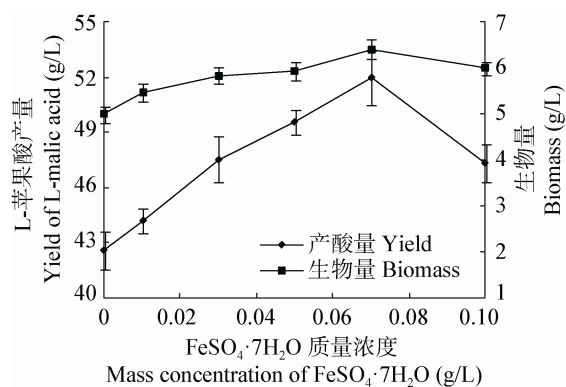
图7 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度对 L-苹果酸产量的影响

Figure 7 Effect of mass concentration of $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on the yield of L-malic acid

由图 7 可知, L-苹果酸产量随硫酸亚铁质量浓度的增加而逐渐增大,当其浓度为 0.07 g/L 时,产酸量达到最大(51.96 g/L)。方差分析结果表明,硫酸亚铁对 L-苹果酸产量影响高度显著($P < 0.01$),因此取硫酸亚铁质量浓度为 0.07 g/L 左右较为适宜。

2.1.8 碳酸钙质量浓度对 L-苹果酸产量的影响: 将 60、70、80、90、100 g/L 的 CaCO_3 添加至基础培养基进行试验,考察其对 L-苹果酸产量的影响,结果如图 8 所示。

由图 8 可以看出,碳酸钙质量浓度为 80 g/L 时, L-苹果酸的产量达到最大,为 49.98 g/L;当超过这一值时产酸量趋于不变,因此取 CaCO_3 浓度为 80 g/L 左右较为适宜。

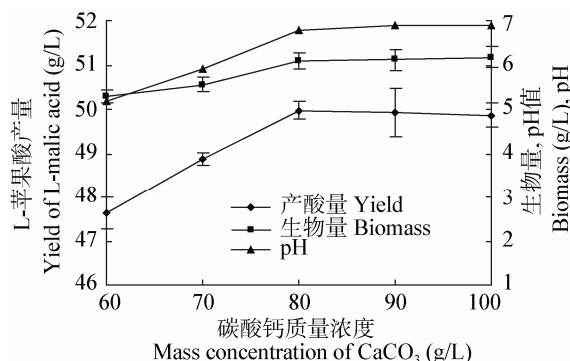
图8 CaCO_3 质量浓度对 L-苹果酸产量的影响

Figure 8 Effect of mass concentration of CaCO_3 on the yield of L-malic acid

2.2 响应面试验

2.2.1 响应面试验结果与分析 根据以上单因素试验结果,选取硫酸锰、硫酸亚铁、酵母粉、硫酸铵的质量浓度 4 个因素进行 Box-Behnken 试验设计,各因素水平编码见表 1。

根据表 1 的因素水平编码,进行 Box-Behnken 中心组合试验设计,方案与结果见表 2。

2.2.2 回归模型的建立及其显著性检验: 利用 Design-Expert 软件对试验数据进行多元二次回归拟合,得到的回归方程模型为:

$$Y=53.35-0.96X_1+1.74X_2-0.12X_3+0.54X_4-0.50X_1X_2+1.13X_1X_3-0.75X_1X_4+1.47X_2X_3+0.93X_2X_4-0.80X_3X_4-2.30X_1^2-3.97X_2^2-4.12X_3^2-4.82X_4^2。$$

回归方程及偏回归系数方差分析结果见表 3。

表 1 培养基响应面因素水平编码表				
Table 1 Factors and levels in the response surface analysis for optimizing medium composition				
代号 Code	因素 Factors (g/L)	编码及水平 Coded levels		
		-1	0	1
X_1	硫酸锰 $MnSO_4$	0.10	0.15	0.20
X_2	硫酸亚铁 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05	0.08	0.10
X_3	酵母粉 Yeast extract powder	2.00	3.00	4.00
X_4	硫酸铵 $(NH_4)_2SO_4$	1.50	2.00	2.50

表 2 Box-Behnken 中心组合试验设计方案与结果						
Table 2 Box-Behnken central composite design matrix and corresponding experimental results						
试验	Number	X_1	X_2	X_3	X_4	L-苹果酸产量 Yield of L-malic acid (g/L)
	1	1	0	0	1	45.20±0.37
	2	0	-1	0	-1	42.85±0.29
	3	0	-1	0	1	42.47±0.45
	4	0	0	0	0	52.75±0.35
	5	0	1	0	-1	44.17±0.44
	6	0	0	0	0	53.63±0.61
	7	1	1	0	0	47.50±0.58
	8	-1	0	0	1	47.85±0.49
	9	1	0	1	0	46.17±0.29
	10	0	0	-1	1	46.16±0.38
	11	-1	-1	0	0	45.52±0.61
	12	0	1	0	1	47.49±0.64
	13	0	1	1	0	48.73±0.27
	14	-1	1	0	0	50.19±0.42
	15	0	0	1	-1	44.14±0.35
	16	-1	0	1	0	46.82±0.27
	17	0	-1	1	0	42.17±0.42
	18	0	1	-1	0	46.16±0.71
	19	1	-1	0	0	44.83±0.55
	20	1	0	-1	0	44.15±0.36
	21	-1	0	0	-1	46.52±0.31
	22	0	0	0	0	53.66±0.66
	23	-1	0	-1	0	49.31±0.47
	24	0	-1	-1	0	45.50±0.38
	25	0	0	1	1	44.45±0.68
	26	0	0	-1	-1	42.65±0.43
	27	0	0	0	0	53.04±0.52
	28	1	0	0	-1	46.87±0.34
	29	0	0	0	0	53.67±0.54

表 3 回归方程的方差分析					
Table 3 Analysis of variance for the fitted quadratic regression equation					
变异源	平方和	df	均方	F 值	P 值
Source of variance	Sum of squares		Mean square	F value	P-value (Prob>F)
模型 Model	340.62	14	24.23	49.17	<0.0001
X_1	11.00	1	11.00	22.24	0.0003
X_2	36.40	1	36.40	73.57	<0.0001
X_3	0.18	1	0.18	0.35	0.5613
X_4	3.43	1	3.43	6.94	0.0196
X_1X_2	1.00	1	1.00	2.02	0.1770
X_1X_3	5.09	1	5.09	10.28	0.0063
X_1X_4	2.25	1	2.25	4.55	0.0512
X_2X_3	8.70	1	8.70	17.59	0.0009
X_2X_4	3.42	1	3.42	6.92	0.0198
X_3X_4	2.56	1	2.56	5.17	0.0392
X_1^2	34.41	1	34.41	69.55	<0.0001
X_2^2	102.34	1	102.34	206.84	<0.0001
X_3^2	110.02	1	110.02	222.35	<0.0001
X_4^2	150.51	1	150.51	304.21	<0.0001
残差 Residual	6.93	14	0.49		
失拟项 Lack of fit	6.19	10	0.62	3.38	0.125 9
纯误差 Pure of error	0.73	4	0.18		
总和 Cor total	347.55	28			

由表 3 可知，该回归模型 $P<0.0001$ ，失拟项 $P>0.05$ ，说明该模型回归方程显著，失拟不显著。模型的决定系数 $R^2=0.9801$ ，说明该模型的拟合程度很好，能较好地反映各因素于响应值变化的关系，可用于木糖发酵产 L-苹果酸的理论预测。回归方程中的 X_1 、 X_2 、 X_4 、 X_1X_3 、 X_2X_3 、 X_2X_4 、 X_3X_4 、

X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 、 X_4^2 对 L-苹果酸产量影响高度显著， X_1X_4 对 L-苹果酸产量影响显著。

该回归模型的响应面趋势图和等高线图解见图 9–12，硫酸锰、硫酸亚铁、酵母粉、硫酸铵及其交互作用对 L-苹果酸产量的影响可以从图中直观地反映出来^[16-17]。

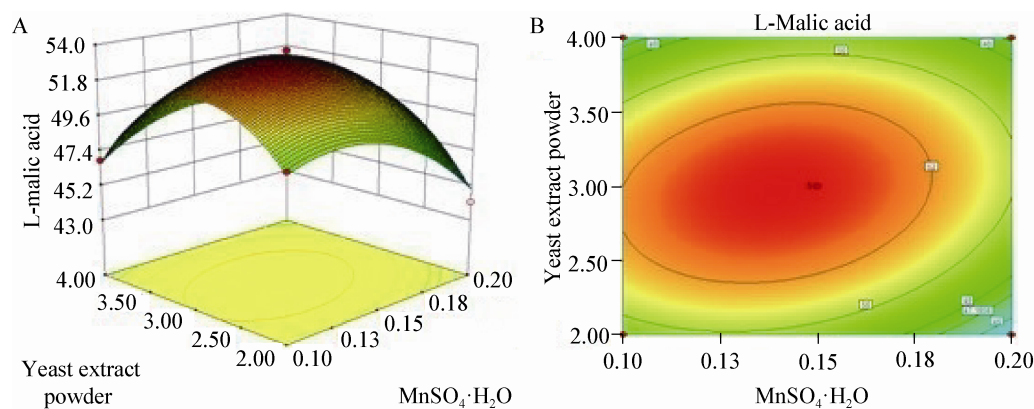


图 9 酵母粉和 $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度对 L-苹果酸产量的响应面(A)和等高线(B)
Figure 9 Response surface (A) and contour plots (B) for the interactive effects of yeast extract powder and $\text{MnSO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$ on yield of L-malic acid

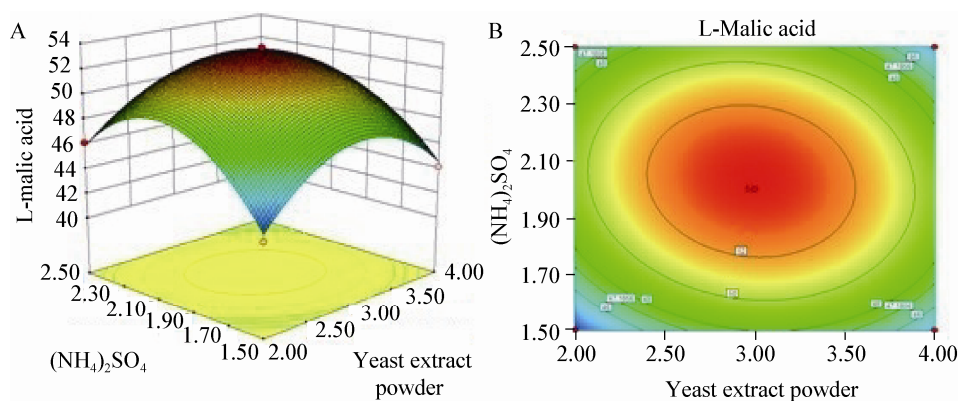


图 10 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和酵母粉质量浓度对 L-苹果酸产量的响应面(A)和等高线(B)

Figure 10 Response surface (A) and contour plots (B) for the interactive effects of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and yeast extract powder on yield of L-malic acid

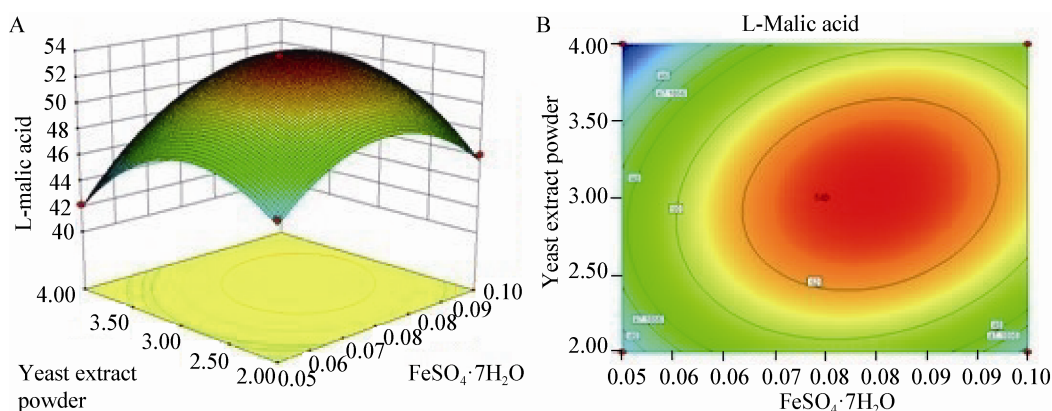


图 11 酵母粉和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度对 L-苹果酸产量的响应面(A)和等高线(B)

Figure 11 Response surface (A) and contour plots (B) for the interactive effects of yeast extract powder and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on yield of L-malic acid

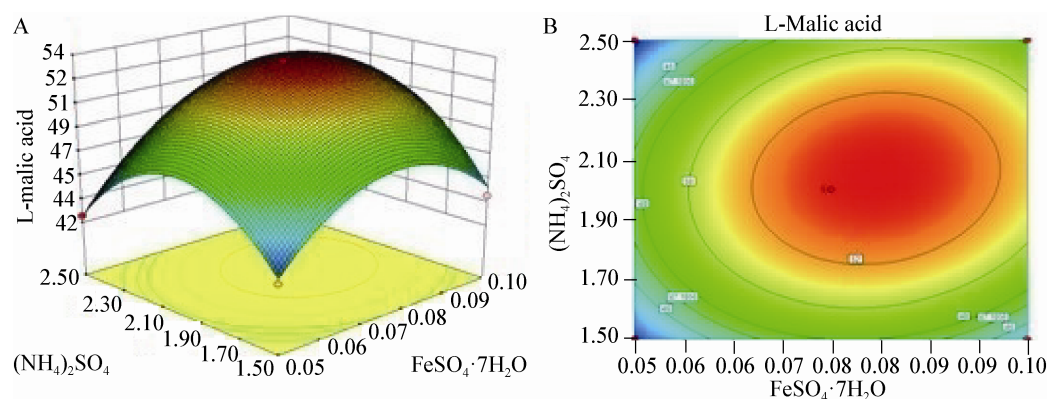


图 12 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 质量浓度对 L-苹果酸产量的响应面(A)和等高线(B)

Figure 12 Response surface (A) and contour plots (B) for the interactive effects of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ on yield of L-malic acid

从图 9 可以看出,当把硫酸铵和硫酸亚铁固定于零水平时,随着酵母粉和硫酸锰质量浓度的增加,L-苹果酸产量均呈先增大后减小的趋势,等高线呈椭圆形,说明两因素的交互作用较强。从图 10 可知,当把硫酸锰和硫酸亚铁固定于零水平时,L-苹果酸产量随着酵母粉和硫酸铵质量浓度的增加而先升高后降低,响应曲面的坡度陡峭,表明这两个因素的交互效应显著。同理,从图 11 和图 12 可以看出,酵母粉和硫酸亚铁、硫酸铵和硫酸亚铁对 L-苹果酸产量的交互作用影响类似于图 10。

2.2.3 响应面因素水平优化结果及模型验证:对回归模型进行响应面分析,得到 L-苹果酸产量预测达到最大值时各因素水平为:硫酸锰 0.14 g/L,硫酸亚铁 0.08 g/L,酵母粉 2.98 g/L,硫酸铵 2.05 g/L。预测值为 53.712 g/L,当显著性水平 $\alpha=0.05$ 时,L-苹果酸产量的 95%的预测区间为[53.059 4 g/L, 54.364 6 g/L]。

为验证回归模型预测值的准确性,将上述最优组合条件圆整为:硫酸锰 0.15 g/L,硫酸亚铁 0.08 g/L,酵母粉 3.0 g/L,硫酸铵 2.0 g/L,进行重复 5 次的验证性试验,得到 L-苹果酸产量平均值为 53.58 ± 0.37 g/L,该值落在响应值的 95%预测区间[53.059 4 g/L, 54.364 6 g/L]内。说明该回归模型可用于本发酵产 L-苹果酸产量的预测。经圆整后的最优组合条件与 Box-Behnken 中心组合试验设计方案表 2 中的中心点一致。

2.3 发酵条件单因素试验结果

2.3.1 装液量对 L-苹果酸产量的影响:在 250 mL 摇瓶中,分别装入 40、50、60、70、80、90 mL 体积的优化后培养基,考察摇瓶装液量对 L-苹果酸产量的影响,结果如图 13 所示。

由图 13 可知,当摇瓶装液量在 40–60 mL/250 mL 时,装液量过低,部分水分蒸发,菌丝体会粘附于三角瓶内壁上,从而影响发酵效果;装液量大于 60 mL/250 mL 时,溶氧率偏低,产酸量下降^[18]。因此摇瓶装液量以 60 mL/250 mL 适宜。

2.3.2 接种量对 L-苹果酸产量的影响:菌悬液分

别以 4%、6%、8%、10%、12%接种至最优发酵培养基中,考察接种量对 L-苹果酸产量的影响,结果如图 14 所示。

图 14 表明,接种量为 8%时,L-苹果酸的产量达到最大;超过 8%后,产酸量略有降低。这是因为接种量过高,造成菌丝体结团从而影响通氧过程,而接种量过少,菌体的延滞期加长,生长缓慢,不利于菌株高产 L-苹果酸。因此,寄生曲霉的接种量以 8%为宜。

2.3.3 发酵温度对 L-苹果酸产量的影响:发酵温度分别为 28、30、32、34、36 °C,考察发酵温度对 L-苹果酸产量的影响,结果如图 15 所示。

由图 15 可知,寄生曲霉 CICC40365 菌株产 L-苹果酸的最适发酵温度为 32 °C。

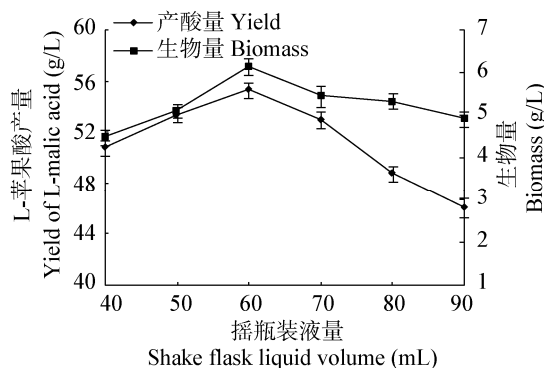


图 13 摇瓶装液量对 L-苹果酸产量的影响
Figure 13 Effect of the shake flask liquid volume on yield of L-malic acid

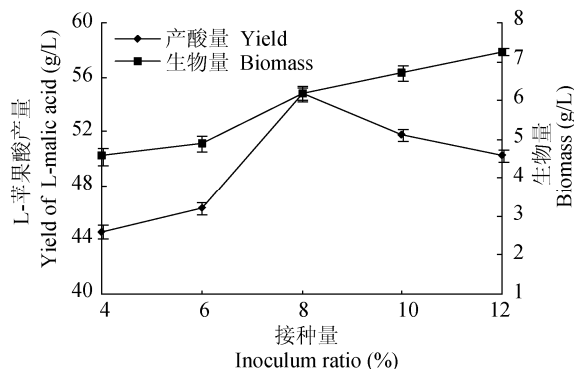


图 14 接种量对 L-苹果酸产量的影响
Figure 14 Effect of the inoculum ratio on yield of L-malic acid

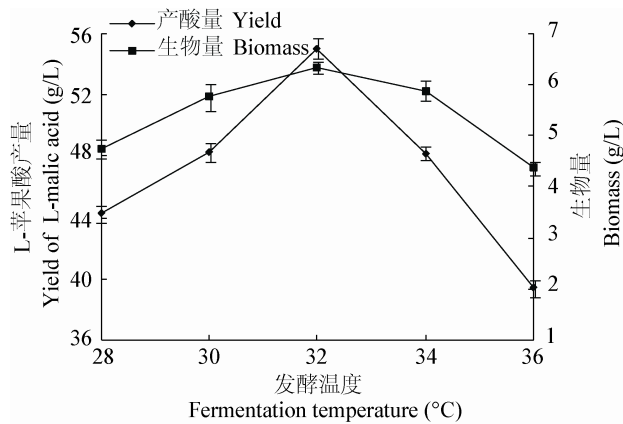


图 15 发酵温度对 L-苹果酸产量的影响

Figure 15 Effect of the fermentation temperature on yield of L-malic acid

2.4 寄生曲霉发酵产 L-苹果酸摇瓶发酵进程曲线

采用优化的培养基和发酵条件, 寄生曲霉 CICC40365 发酵产 L-苹果酸的发酵进程见图 16。

从图 16 中可以看出, 0–72 h 时 L-苹果酸产量和生物量增长缓慢, 木糖的消耗也较慢; 而在 72–192 h 之间 L-苹果酸产量和生物量快速增加, 与此同时木糖的消耗加快; 在 192–240 h L-苹果酸产量几乎不增加, 最终达到 55.54 g/L, 生物量也趋于稳定为 6.24 g/L, 此时木糖的浓度降至 10 g/L 以下; 整个过程中 pH 值随发酵时间的变化很小, 始终保持在 7.0 左右。

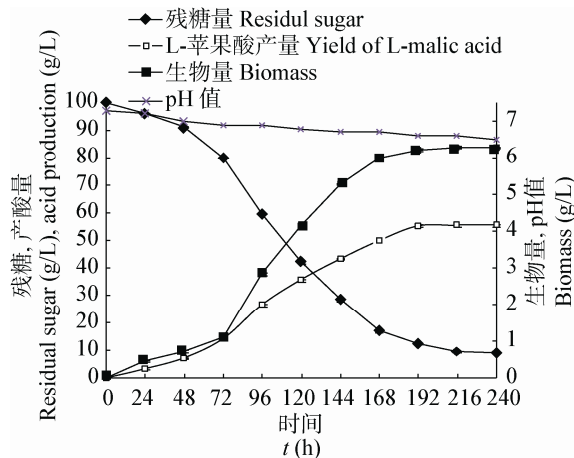


图 16 寄生曲霉 CICC40365 优化条件下发酵进程曲线
Figure 16 Fermentation curve of *Aspergillus parasiticus* CICC40365 under optimized condition

2.5 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 对相关酶的影响

XR、XDH、XK 为该菌株木糖代谢途径中的关键酶, 而 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 等金属离子是这些酶的激活离子, 尤其是激酶将 ATP 上的磷酸转移到受体的过程中, 常常需要 Mg^{2+} 或者 Mn^{2+} 的激活^[19-20]。因此, 在保持基础发酵培养基其他成分及条件不变的情况下, 分别考察 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 对 XR、XDH、XK 酶活的影响, 结果如图 17、18 所示。

由图 17 和 18 可知, 当培养基中不含有 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 时, XK 的酶活明显低于 XR 和 XDH, 说明 XK 为木糖代谢过程中的一种重要的酶, 由于 XK 酶活低, 使菌株体内木糖醇和木酮糖大量积累, 对 XR 和 XDH 也产生了抑制作用, 从而大大降低

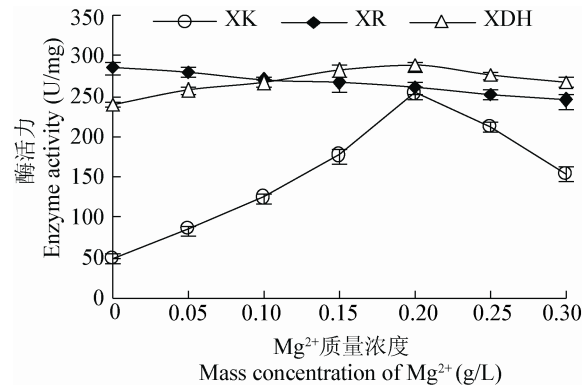
图 17 Mg^{2+} 质量浓度对 XR、XDH、XK 酶活的影响

Figure 17 Effect of mass concentration of Mg^{2+} on the activity of XR, XDH and XK

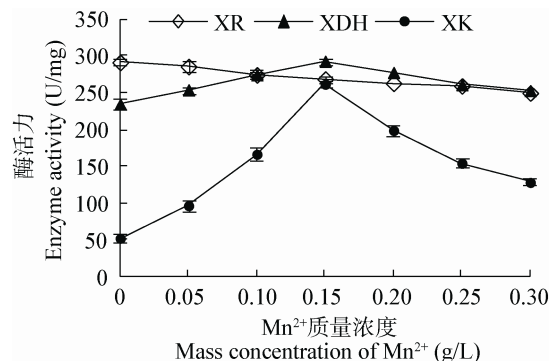
图 18 Mn^{2+} 质量浓度对 XR、XDH、XK 酶活的影响

Figure 18 Effect of mass concentration of Mn^{2+} on the activity of XR, XDH and XK

了对木糖的代谢能力。而 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 在一定浓度范围内对 XK 的激活效果明显,且 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 的激活作用随着质量浓度的增大而增加,当 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 的浓度分别为 0.20 g/L 和 0.15 g/L 时, XK 的酶活力达到最大,同时该浓度下 L-苹果酸的产量也处于较高水平;同时, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 对 XDH 也有一定的激活作用,但 Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 的激活作用随浓度变化的影响不大;对 XR 有一定的抑制作用。

3 讨论

论文研究表明,寄生曲霉 CICC40365 能够较好地以木糖发酵产 L-苹果酸,在最佳发酵条件下 L-苹果酸的产量可达到 55.47 g/L。XR 为该菌株木糖代谢过程中的一种重要酶, Mg^{2+} 、 Mn^{2+} 对 XK 有明显的激活作用, XK 的激活可提高该菌株木糖代谢能力,并相应地增加 L-苹果酸的产量。说明采用一步发酵法生产 L-苹果酸的方法过程简单,生产成本较低,适合工业化生产,且产物安全性高,具有广阔的应用前景;同时,研究结果可为该菌株利用植物纤维素水解液中木糖进行生物转化提供参考。

参 考 文 献

- [1] 汪多仁, 陈体庆. L-苹果酸的开发与利用[J]. 饮料工业, 2004, 7(1): 21-25.
- [2] 吴军林, 吴清平, 张菊梅. L-苹果酸抗氧化作用机理研究[J]. 食品科技, 2010, 35(2): 194-197.
- [3] 胡纯铿. L-苹果酸产生菌黄寄生曲霉 *Aspergillus flavus* H-98 发酵特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 1999, 5(2): 19.
- [4] 郝夕祥, 张家祥, 田延军, 等. L-苹果酸生产、提取及一步发酵法发酵机理研究[J]. 山东食品发酵, 2010(3): 3-6.
- [5] Pines O, Even-Ram S, Elnathan N, et al. The cytosolic pathway of L-malic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of fumarase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1996, 46: 393-399.
- [6] Battat E, Peleg Y. Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor[J]. Biotechnology Bioengineering, 1991, 37(11): 1108-1116.
- [7] 钱秀萍, 杨庆尧. 几种营养条件对裂褶菌生长及产 L-苹果酸的影响[J]. 食用菌学报, 1996, 3(3): 18-24.
- [8] 田三德, 吴艳娜, 解尚云, 等. L-苹果酸一步发酵法的工艺研究及浅析[J]. 食品科技, 2008(6): 106-108.
- [9] 景晓辉, 丁友士. 液体深层发酵法生产 L-苹果酸的研究[J]. 中国酿造, 2005(9): 25-28.
- [10] Yoav P, Barak A, Scrutton MC. Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1989, 30(2): 69-75.
- [11] 王俊刚, 张树珍, 杨本鹏, 等. 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定甘蔗茎节总糖和还原糖含量[J]. 甘蔗糖业, 2008(5): 5-49.
- [12] Jin YS, Jeffries TW. Changing flux of xylose metabolites by altering expression of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2003, 106(1/3): 277-285.
- [13] Luccio ED, Petschacher B, Voegtli J, et al. Structural and kinetic studies of induced fit in xylulosekinase from *Escherichia coli*[J]. Journal of Molecular Biology, 2007, 265(3): 783-798.
- [14] 潘丽军, 陈锦权. 试验设计与数据处理[M]. 南京: 东南大学出版社, 2008: 201-210.
- [15] 刘建军, 赵祥颖, 天延军, 等. 糖质原料直接发酵生产 L-苹果酸的工艺条件[J]. 食品与发酵工业, 2005, 31(1): 5-9.
- [16] Li W, Du W, Liu D. Optimization of whole cell-catalyzed methanolysis of soybean oil for biodiesel production using response surface methodology[J]. Journal of Molecular Catalysis B Enzymatic, 2007, 45(3/4): 122-127.
- [17] Ambat P, Ayyanna C. Optimizing medium constituents and fermentation conditions for citric acid production from palmyra jaggery using response surface method[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17(4): 331-335.
- [18] 韩卫强, 王芳, 谭天伟, 等. 接种量和装液量对少根根霉直接发酵生木薯粉生产富马酸的影响[J]. 北京化工大学学报: 自然科学版, 2011, 38(5): 95-99.
- [19] 张颖, 马瑞强, 洪浩舟, 等. 微生物木糖发酵产乙醇的代谢工程[J]. 生物工程学报, 2010, 26(10): 1436-1443.
- [20] 付晓芬, 江均平, 张杰, 等. 微生物利用木糖发酵 L-乳酸代谢途径的研究[J]. 食品工业科技, 2009, 30(8): 359-362.