

响应面法优化少根根霉发酵合成富马酸*

刘 宁¹, 张 昆¹, 何 皓¹, 李 霜¹, 嵇松扬², 黄 和¹

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 利用少根根霉发酵生产富马酸, 考察了不同浓度的初始葡萄糖以及有机氮源酵母膏和无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 对富马酸的合成的影响。在此基础上运用响应曲面分析方法优化了富马酸产量以及转化率, 葡萄糖和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度为162.0g/L、3.08g/L时, 富马酸的产量最大为75.15g/L; 葡萄糖和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度为121.2g/L、2.23g/L时, 富马酸的转化率最大为55.16%, 在原来基础上产量有了明显的提高, 优化效果较好, 通过验证实验值与预测值基本相符。

关键词 富马酸, 优化, 少根根霉, 响应曲面

富马酸(fumaric acid)是一种重要的大宗化学品, 可广泛应用于食品、化工、医药、涂料、树脂等领域。当前富马酸生产的主流技术是顺酐异构法, 其原料苯的毒性严重限制了富马酸在食品及医药等方面的应用^[1,2]。近年来随着石油价格的不断上涨, 富马酸的生产成本也不断提高, 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。

发酵法制备富马酸的常用菌种为根霉菌(*Rhizopus*), 如米根霉(*R. oryzae*)、少根根霉(*R. arrhizus*)以及黑根霉(*R. nigricans*)等, 使用的原料有葡萄糖、木糖、淀粉等, 在发酵过程中产生的主要副产物为苹果酸、乳酸等杂酸^[3~8]。我国山西微生物研究所的白照熙等筛选出了一株具有产富马酸能力的少根根霉并对其培养条件进行了初步的优化, 考察了单因素对富马酸合成的影响^[9,10], 但存在着产量偏低、副产物较多, 发酵时间较长等问题。发酵法制备富马酸难以实现产业化的瓶颈在于富马酸产量低及糖质原料的转化率低下。

本文以少根根霉为发酵菌种, 采用中心复合设计对发酵培养基的碳源、氮源等关键影响因素进行响应面实验, 利用 STATISTICA 6.0 软件(StatSoft, USA)分析实验数据, 求得理论最佳值使富马酸产量以及转化率最大化, 为进一步实现工业化生产富马酸奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌 种

第一作者: 硕士研究生(黄和教授为通讯作者)。

* 国家自然科学基金(20576054), 863 计划(2006AA02Z240)

收稿日期: 2008-01-29

出发菌株: 少根根霉(*Rhizopus arrhizus* ME-F21), 本实验室保藏。

1.2 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(总氮含量 9.8%) 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 40, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, 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, 琼脂 2, 硫酸调节 pH 3.5。

发酵基本培养基(g/L): 葡萄糖 100, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2, 酵母膏(总氮含量 9.8%) 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, 甲醇 15 mL。使用 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。

1.3 培养方法

菌株在产孢斜面上培养 5~7 d 之后, 使用无菌的 0.05 mol/L 磷酸缓冲溶液(pH 6.8)将孢子冲洗下来, 稀释至 10^5 个/mL 的孢子悬浮液。

在含有 50 mL 种子培养基的 250 mL 凹槽摇瓶中接入 2 mL 孢子悬浮液。接种后置于 34℃ 摇床, 220 r/min 培养 18~24 h。

将 4 mL 培养好的种子液转接于装有 50 mL 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。

1.4 样品制备及分析方法

样品制备: 发酵液中添加适量 1 mol/L HCl 中和过量的 CaCO_3 , 于 60℃ 水浴 30 min, 抽滤获得清

液。

残糖测定:SAC-40 生物传感仪。

富马酸含量测定:高效液相色谱法(HPLC)DI-ONEX HPLC P680 工作站,Alltech 有机酸色谱柱 C₁₈柱 250 mm×4.6 mm;紫外检测波长 210 nm;流速:1 mL/min;进样量:20 μL;流动相:25 mmol/L KH₂PO₄,pH2.5;柱温:35℃。

菌体生物量的测定:抽滤,无菌水洗脱,菌丝体 80℃烘干至恒重后,称重得到生物量。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖浓度的影响

采用 1.8 g/L(NH₄)₂SO₄ 以及 0.4 g/L 酵母膏为氮源,考察 50~200 g/L 的初糖浓度对富马酸产量以及转化率(% ,g 富马酸/100 g 葡萄糖,下同)的影响,5 个平行试验取平均值,结果如表 1 所示。

表 1 不同初始葡萄糖浓度对富马酸合成的影响

初始糖浓度 /g · L ⁻¹	发酵时间 /h	残糖 /g · L ⁻¹	富马酸产量 /g · L ⁻¹	苹果酸 /g · L ⁻¹	转化率 /%
50	40	0	20.13	6.21	40.26
80	60	0	37.81	5.88	47.26
100	72	0	50.29	5.75	50.29
120	80	3	59.92	5.41	51.21
140	96	4	68.25	4.98	50.18
160	108	12	69.12	4.94	46.70
200	132	25	70.94	4.68	40.54

富马酸的产量随初始糖浓度升高呈缓慢增加趋势,转化率呈先升后降趋势。初始葡萄糖为 200 g/L 时富马酸产量达到最大 70.94 g/L,此时转化率仅 40%左右,同时发酵时间及残糖含量显著增加,可能与过高的初始葡萄糖浓度引起发酵停滞期的延长及高糖产生的细胞脱水抑制了生长^[11]有关。因此综合考虑选择考察初始葡萄糖浓度为 100~160 g/L。

2.2 氮源浓度的影响

在富马酸发酵培养基中既包括无机氮源又包括有机氮源,其中酵母膏不仅可以充当氮源,而且其中含有多种微量元素,例如 Fe、Mn、Co 等以及各种微生物生长必需的生长因子,这些都直接影响细胞生长以及产物代谢中的各种酶活性,或作为其辅基直接参与酶促反应。通常认为在菌体能够满足其生长因子的基础上使用无机氮源,其代谢途径会大为简化。因此考察了添加相同氮含量(约为 0.5 g/L)的酵母膏以及(NH₄)₂SO₄ 对富马酸产量以及细胞生长的影响作用,使用初始葡萄糖浓度 120 g/L,5 个平行样取平

均值,结果见表 2 所示。

表 2 不同酵母膏以及(NH₄)₂SO₄ 添加量对富马酸合成的影响

酵母膏	氮源/g · L ⁻¹	富马酸 /g · L ⁻¹	苹果酸 /g · L ⁻¹	干重 /g · L ⁻¹	转化率 /%
	(NH ₄) ₂ SO ₄				
5	0	51.95	6.21	8.9	43.29
4.8	0.2	50.78	6.02	8.7	42.31
2.5	1.15	57.25	5.75	7.9	47.70
0.4	2.2	66.28	4.90	7.2	55.68
0	2.3	62.16	4.02	5.3	51.80

单纯使用相同氮含量的有机氮源酵母膏或者无机氮源(NH₄)₂SO₄ 的富马酸产量均不及使用采用含少量酵母膏(0.4 g/L)的混合氮源时的高,且后者的转化率也最高,而单纯使用酵母膏为氮源导致菌体生长旺盛,主要副产物苹果酸含量较多。少量添加酵母膏提供了菌体生长必需的生长因子以及微量元素,刺激菌体生长对产酸有促进作用,因此确定添加少量酵母膏,并进一步考察作为主要氮源的(NH₄)₂SO₄ 的添加量(0~5 g/L)对富马酸合成的影响,结果见图 1。

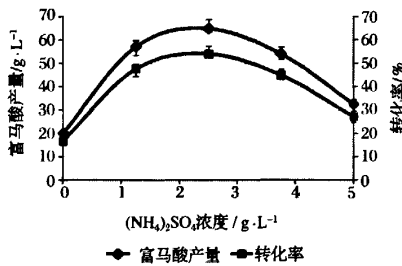


图 1 不同(NH₄)₂SO₄ 的浓度对富马酸合成的影响

如图 1 所示,初始糖浓度为 120 g/L、酵母膏为 0.4 g/L 时,富马酸产量以及转化率随(NH₄)₂SO₄ 的浓度增加呈先增后降趋势,在(NH₄)₂SO₄ 浓度为 2.5 g/L 时达到最高,分别为 64.89 g/L 以及 54.08%,但过量添加(NH₄)₂SO₄ 导致产量和转化率明显下降,因此选择进一步考察(NH₄)₂SO₄ 浓度为 1~4 g/L。

2.3 响应面分析(RSA)试验

响应面分析法(RSA)是综合试验分析和数学建模最经济合理的实验设计。它以回归法作为函数恒算工具,通过多项式近似,以此对影响目标产物富马酸的 2 个重要因素葡萄糖和(NH₄)₂SO₄ 进行综合分析。采用中心复合试验安排葡萄糖(x₁)以及(NH₄)₂SO₄(x₂)的浓度水平,试验设计以及结果见表 3。

表 3 响应面试验设计因素水平以及结果

实验号	因素水平		实际浓度/g·L ⁻¹		富马酸产量 y ₁ /g·L ⁻¹		转化率 y ₂ /%	
	x ₁	x ₂	葡萄糖	(NH ₄) ₂ SO ₄	y ₁	y ₁ *	y ₂	y ₂ *
1	-1.414	0.00	87.57	2.50	45.33	44.97	52.10	49.20
2	-1.00	1.00	100.00	4.00	33.81	36.98	34.50	38.16
3	0.00	0.00	130.00	2.50	68.92	69.66	54.70	54.85
4	-1.00	-1.00	100.00	1.00	49.10	46.28	50.10	50.98
5	0.00	-1.414	130.00	0.38	35.91	40.40	39.90	41.12
6	0.00	1.41	130.00	4.62	51.20	47.23	40.00	37.28
7	1.00	1.00	160.00	4.00	67.65	69.94	45.10	45.72
8	1.00	-1.00	160.00	1.00	54.68	50.99	40.50	38.34
9	1.41	0.00	172.43	2.50	70.72	71.60	44.20	45.60
10	0.00	0.00	130.00	2.50	70.40	69.66	55.00	54.85

其中 y₁ 表示富马酸实际产量, y₂ 表示转化率, y₁* 表示预测的产量, y₂* 表示预测的转化率。

利用多项式回归对实验数据拟合,得到以下 2 个方程,其中 Eq1 为产量的二次多项式拟合方程,Eq2 表示转化率的二次多项式拟合方程:

Eq1: $y_1^* = -66.859 + 1.565 \times x_1 - 0.00632 \times x_1^2 + 9.915 \times x_2 - 5.744 \times x_2^2 + 0.157 \times x_1 \times x_2$

Eq2: $y_2^* = 7.411 + 0.753 \times x_1 - 0.00414 \times x_1^2 + 1.895 \times x_2 - 3.478 \times x_2^2 + 0.112 \times x_1 \times x_2$

运用 Statistica 软件回归分析实验数据,其对富马酸产量(y₁)及其转化率(y₂)影响的统计学数据分

别见表 4、5,2 者的确定系数 R² 分别达到了 95.8%、91.4%,均大于 75%,说明模型与实验结果拟合很好;Adj R² 也分别达到 90.6%、80.7%。对于富马酸的产量而言,葡萄糖浓度的一次项和二次项、(NH₄)₂SO₄ 的二次项以及 2 者的相互作用都达到了统计显著(P<0.05)或边际显著(0.05<P<0.1)的影响水平;对于转化率而言,葡萄糖、(NH₄)₂SO₄ 浓度的二次项以及交互作用的影响更为突出。

表 4 富马酸产量实验变量分析

因素	平方和	自由度	均方	F	P 值
(1)葡萄糖(L)	709.290 8	1	709.290 8	37.937 17	0.003 526
葡萄糖(Q)	147.953	1	147.953	7.913 422	0.048 166
(2)(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	46.611 07	1	46.611 07	2.493 043	0.189 495
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	763.476 1	1	763.476 1	40.835 33	0.003 078
1L by 2L	199.699 3	1	199.699 3	10.681 13	0.030 841
误差	74.785 83	4	18.696 46		
Total SS	1793.99	9			

表 5 富马酸转化率实验变量分析

因素	平方和	自由度	均方	F	P 值
(1)葡萄糖(L)	12.934 4	1	12.934 4	1.340 98	0.311 294
葡萄糖(Q)	63.431 4	1	63.431 4	6.576 28	0.062 345
(2)(NH ₄) ₂ SO ₄ (L)	14.738 6	1	14.738 6	1.528 03	0.284 035
(NH ₄) ₂ SO ₄ (Q)	279.911 4	1	279.911 4	29.019 93	0.005 742
1L by 2L	102.010 0	1	102.010 0	10.575 93	0.031 315
误差	38.582 0	4	9.645 5		
Total SS	448.949 0	9			

通过比较产量模型 1 与转化率模型 2 可见,葡萄糖对于富马酸产量的影响大于对其转化率的影响;氮源(NH₄)₂SO₄ 的二次项系数为负,而且对富马酸转化率的影响统计显著,而其线形影响不明显,这说明在实验浓度范围内存在一个合适的(NH₄)₂SO₄ 浓度,可以促进富马酸合成的同时不会导致葡萄糖用于菌体的过量生长而降低转化率既糖酸转化率。

为直观地显示葡萄糖和无机氮源(NH₄)₂SO₄ 浓

度对富马酸产量和转化率的影响,绘制出模型拟合的三维响应面(图 3、图 4)。通过模型回归分析得到在实验区域内存在最大值,当葡萄糖、(NH₄)₂SO₄ 浓度分别为 162.0、3.08 g/L 时,方程(1)预测的富马酸产量最大值为 75.15 g/L,当葡萄糖、(NH₄)₂SO₄ 浓度分别为 121.2、2.23 g/L 时,方程(2)预测的富马酸转化率最大值为 55.16%。

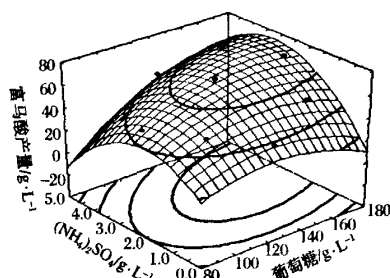


图3 富马酸产量模型的三维响应曲面以及等高线图

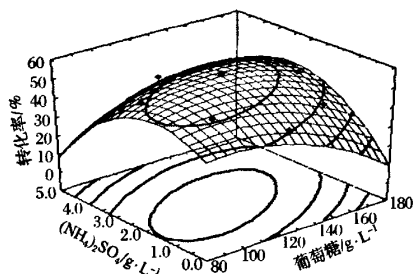


图4 富马酸转化率模型的三维响应曲面以及等高线图

为了检验模型预测的准确性,在该优化条件下进行发酵实验,所得的富马酸产量和转化率分别为 75.82 g/L、56.82%,与预测最大值接近,可见该模型能较好地预测实际发酵情况,对于富马酸发酵研究有指导作用。

3 结论

通过单因素实验确定碳源葡萄糖以及氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的浓度范围,确定使用无机氮源 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 并添加少量酵母膏提供生长因子对富马酸合成有利,采用响应面分析法对少根根霉合成富马酸的重要影响因素葡萄糖浓度以及 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度进行了优化与评价,得到影响富马酸产量以及转化率的二次多项式回归模型,利用统计学方法对 2 个模型

进行了显著性检验,在葡萄糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度分别为 162.0、3.08 g/L 时,可得到富马酸产量最大值为 75.15 g/L,当葡萄糖、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 浓度分别为 121.2、2.23 g/L 时,可得到富马酸转化率最大值为 55.16%。通过验证分别得到富马酸产量和转化率为 75.82 g/L、56.82%,与试验预测吻合良好,且产量较单因素试验提高了 9.7%。

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(7):81~83
- 2 Anon. IB market forecast: fumaric acid [J]. Industrial Bioprocessing,2005,27: 11
- 3 Rhodes R A, Moyer A J, Smith M L, et al. Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* [J]. Appl Microbiol, 1958,7(2): 74~80
- 4 Rhodes R A, Lagoda A A, Misenheimer T J, et al. Production of fumaric acid in 20-liter fermentors [J]. Appl Microbiol, 1962,10(1):9~15
- 5 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
- 6 Carta F S, Soccol C R, Ramos L P, et al. Production of fumaric acid by fermentation of enzymatic hydrolysates derived from cassava bagasse [J]. Bioresource Technology, 1999, 68(1): 23~28
- 7 Lorraine B, Ling N D, Thomas K N, et al. Fermentation process for carboxylic acids [P]. 1989, US4877731
- 8 Gangl I C, Weigand W A, Keller F A. Economic comparison of calcium fumarate and sodium fumarate production of *Rhizopus arrhizus* [J]. Appl Biochem Biotechnol, 1990, 24/25: 663~677
- 9 白照熙,蒋明珠,谢红,等.延胡索酸产生菌的筛选[J].食品与发酵工业,1988,14(4): 32~36
- 10 张俊贤,蒋明珠,白照熙,等.无根根霉 R25 产延胡索酸的发酵条件[J].食品与发酵工业,1988,14(5): 34~40
- 11 储炬,李友荣.现代工业发酵调控学[M],北京:化学工业出版社,2002

Optimizing Fermentation Conditions for Fumaric Acid Using Response Surface Analysis

Liu Ning¹, Zhang Kun¹, He Hao¹, Li Shuang¹, Ji Songyang², Huang He¹

1(College of Life Science and Pharmaceutical Engineering Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China)

2(WinHonor Bioscience Limited corporation, Beijing 100086, China)

ABSTRACT The production and yield of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus* cultivated on different concentrations of glucose as carbon source and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and yeast extract as nitrogen sources were investigated. As the concentration of initial glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ has important influence on biosynthesis of fumaric acid. They were optimized in shake flasks using response surface analysis to determine the optimal levels for production and yield. The maximum fumaric acid production (75.15 g/L) was obtained consistently in flask fermentation using the optimized concentrations of glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (162.0 g/L and 3.08 g/L, respectively), and the maximum yield (55.16%) was obtained using the optimized concentrations of glucose and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (121.2 g/L and 2.23 g/L, respectively).

Key words fumaric acid, optimization, *Rhizopus arrhizus*, response surface analysis