

研究报告

出芽短梗霉产聚苹果酸发酵条件的优化

陈曦¹ 鲍文娜² 黄美娟² 李怡辉¹ 潘海峰² 谢志鹏^{1,2*} 张建国²

(1. 浙江大学药学院 药物生物技术研究所 浙江 杭州 310058)

(2. 杭州宝晶生物股份有限公司 浙江 杭州 311106)

摘要:【背景】出芽短梗霉可发酵葡萄糖生成聚苹果酸,但存在转化率和转化效率低等瓶颈,阻碍其实现商业化生产。【目的】通过优化发酵培养条件,提高出芽短梗霉的聚苹果酸产量、糖酸转化率和生产强度。【方法】采用单因素试验优化适宜出芽短梗霉 BK-10 菌株产生聚苹果酸的培养条件,通过 Plackett-Burman 法对培养基组分筛选显著性影响因素,并对其培养基中无机盐进行正交试验优化,最后进行 5 L 发酵罐验证。【结果】最优培养基配方和培养条件: 100 g/L 葡萄糖, 1.5 g/L 尿素, 0.20 g/L KH_2PO_4 , 0.20 g/L ZnSO_4 , 0.05 g/L MgSO_4 , 0.75 g/L KCl , 30 g/L CaCO_3 , 0.01%吐温-80, 发酵温度 26 °C, 250 mL 摇瓶装液量 50 mL。【结论】通过优化,聚苹果酸的糖酸转化率达到 0.71 g/g,生产强度达到 0.89 g/(L·h),较优化前分别提高了 18.33%和 71.15%,为发酵葡萄糖合成聚苹果酸进而生产 L-苹果酸工艺的工业化生产奠定经济基础。

关键词: 出芽短梗霉, 聚苹果酸, 发酵条件, 优化

Optimization of fermentation conditions for polymeric acid production by *Aureobasidium pullulans* BK-10

CHEN Xi¹ BAO Wen-Na² HUANG Mei-Juan² LI Yi-Hui¹ PAN Hai-Feng²
XIE Zhi-Peng^{1,2*} ZHANG Jian-Guo²

(1. Institute of Pharmaceutical Biotechnology, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310058, China)

(2. Hangzhou Bioking Biochemical Engineering Co. Ltd., Hangzhou, Zhejiang 311106, China)

Abstract: [Background] Bottleneck problems such as poor yield and low productivity had been hindering the progress in commercial production of polymeric acid from glucose by *Aureobasidium pullulans*. [Objective] To enhance polymeric acid yield and productivity from *Aureobasidium pullulans* BK-10 by optimizing the fermentation medium and conditions. [Methods] Single-factor experiment, Plackett-Burman design and orthogonal experiment were adopted to evaluate the importance of various fermentation medium ingredients and optimize kinds of fermentation conditions. A 5 L fermentor experiment was conducted to verify the above optimized conditions.

*Corresponding author: Tel: 86-571-88206983; E-mail: xzp@zju.edu.cn

Received: April 18, 2017; Accepted: July 12, 2017; Published online (www.cnki.net): August 11, 2017

*通信作者: Tel: 86-571-88206983; E-mail: xzp@zju.edu.cn

收稿日期: 2017-04-18; 接受日期: 2017-07-12; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-08-11

[Results] The optimum fermentation medium consisted of 100 g/L glucose, 1.5 g/L urea, 0.20 g/L KH_2PO_4 , 0.20 g/L ZnSO_4 , 0.05 g/L MgSO_4 , 0.75 g/L KCl , 30 g/L CaCO_3 , 0.01% Tween-80, the optimal fermentation temperature was found 26 °C and the optimal working volume was 50 mL of fermentation medium in a 250 mL flask. **[Conclusion]** Yield of polymalic acid from glucose reached 0.71 g/g with an increase of 18.33%, and the productivity was 0.89 g/(L·h) which was increased by 71.15% as compared with the unoptimized conditions. These results show great economical potential for commercial production of polymalic acid even or L-malic acid by fermentation from glucose.

Keywords: *Aureobasidium pullulans*, Polymalic acid, Fermentation condition, Optimization

聚苹果酸(Polymalic acid, PMLA)是一种以L-苹果酸为唯一单体、完全生物可降解性的高分子聚合物,具有极佳的水溶性、易修饰性^[1]、易代谢性^[2]和生物相容性^[3],其水解产物L-苹果酸可作为酸味剂和调味剂广泛应用于食品工业^[4],在医药工业和化学工业中也有着巨大的市场潜力^[5]。微生物发酵合成PMLA正逐渐成为生产L-苹果酸的技术热点^[6]。

常用发酵产PMLA的微生物有出芽短梗霉(*Aureobasidium pullulans*)^[7]和多头绒孢菌(*Physarum polycephalum*)等^[8]。近年来,研究多集中于出芽短梗霉这一类与酵母有密切关系的真菌,Nagata等利用出芽短梗霉生产PMLA的产量可达到47 g/L^[9];刘双江利用出芽短梗霉生产PMLA的产量为9.8 g/L^[10];Zhang等利用出芽短梗霉进行10 L罐发酵生产PMLA的产量可达到57.2 g/L,生产强度为0.35 g/(L·h)^[11];Zou等利用纤维床固定化生物反应器和葡萄糖流加工艺,在5 L罐上用出芽短梗霉生产PMLA产量可达到144.2 g/L、糖酸转化率0.55 g/g、发酵周期192 h、生产强度0.74 g/(L·h),为迄今所见报道的最高水平^[12]。即便如此,出芽短梗霉发酵产PMLA仍存在糖酸转化率低、发酵周期过长、生产强度不足等技术问题,难以满足商业化生产所需要的经济性需求。本文以实验室保存的一株具有产PMLA能力的出芽短梗霉为研究对象,力图通过优化发酵培养基组成和发酵调控策略提升糖酸转化率、缩短发酵周期,为后续的工业生产奠定基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌种

本实验室保存的一株产聚苹果酸的出芽短梗霉菌BK-10。

1.1.2 培养基

种子培养基(g/L):葡萄糖60.0, NH_4NO_3 3.0, 酵母粉3.0, CaCO_3 10.0。发酵培养基(g/L):葡萄糖60.0–100.0, NH_4NO_3 2.0, KH_2PO_4 0.1, MgSO_4 0.1, KCl 0.5, ZnSO_4 0.1, CaCO_3 30.0^[12]。PDA培养基(g/L):PDA干粉43.0。

1.1.3 主要试剂和仪器

葡萄糖、硝酸铵、碳酸钙、氯化钾和硫酸镁等均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司;PDA干粉,杭州微生物试剂有限公司。

生物净化工作台,苏州宏瑞源科技股份有限公司;制冰机和全自动高压灭菌锅,上海迭戈生物科技有限公司;电子天平,北京鑫开元电子显示仪器有限责任公司;小型离心机,Eppendorf公司;台式冷冻离心机,长沙湘仪离心机仪器有限公司;恒温水浴锅,常州高德仪器制造有限公司;电热恒温干燥箱,恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司;pH计,上海仪电科学仪器股份有限公司。

1.2 培养方法

将保存的出芽短梗霉菌株接种涂布于PDA平板上,于30 °C培养48 h。挑取单菌落一环接种于30 mL种子培养基中,26 °C、220 r/min培养48 h。

取 4 mL 菌液接种于 50 mL 液体发酵培养基中, 26 °C、220 r/min 培养 7 d。

1.3 聚苹果酸测定方法

取 10 mL 发酵液于 10 000 r/min 离心 10 min 去除菌体, 用移液管取 5 mL 上清液置于带有盖子的试管中, 同时加入等体积的 1 mol/L H₂SO₄ 溶液, 于 90 °C 条件下静置水解 12 h, 将聚苹果酸完全水解为单体 L-苹果酸。高效液相色谱法(HPLC)检测水解前后的苹果酸含量, 两者之差即为聚苹果酸的量。

HPLC 测定条件如下: 色谱柱为 Phenomenex Rezex ROA, 柱温 40 °C, 流动相为 5 mmol/L H₂SO₄, 进样量 10 μL, 流速 0.6 mL/min, 检测波长 210 nm^[12]。

1.4 杂多糖测定方法

取 10 mL 发酵液样品于 10 000 r/min 离心 10 min 去除菌体, 将上清液稀释 100 倍, 取 2 mL 加入 5% 的苯酚溶液 1 mL, 摇匀后迅速加入 5 mL 浓硫酸摇匀, 室温放置 8 min, 42 °C 水浴中静置 18 min, 取出冷却至室温测定 490 nm 处的吸光值, 与标准曲线比对即为发酵样品中杂多糖的含量^[13]。

1.5 实验设计

1.5.1 单因素试验

采用单因素试验考察碳源、氮源、碳酸钙^[14]、吐温-80^[15]、装液量、接种量等因素对出芽短梗霉 BK-10 生物合成聚苹果酸的影响。

1.5.2 Plackett-Burman 设计实验

选取 n=12 的 Plackett-Burman 设计对单因素试验选择的 6 个因素进行价效考查; 并设计 5 项虚拟项(B、D、F、H、K)(表 1)。

1.5.3 正交试验设计

通过正交试验考察发酵培养基中无机盐 MgSO₄、KH₂PO₄、ZnSO₄、KCl 对出芽短梗霉 BK-10 生物合成聚苹果酸的影响。根据之前优化结果, 实验中固定葡萄糖浓度 100.0 g/L, 尿素浓度 1.5 g/L, 按照表 2 进行发酵实验, 优化培养基条件。

1.5.4 5 L 发酵罐实验验证

基于摇瓶优化结果, 在 5 L 发酵罐中进行发酵验证, 具体操作如下。

表 1 因素和水平设计

Table 1 Factors and levels of Plackett-Burman (PB) design

Code	Parameters	Levels	
		Low (-1)	High (+1)
A	Glucose (g/L)	70.00	100.00
C	Medium volume (mL)	50.00	70.00
E	CaCO ₃ (g/L)	20.00	30.00
G	Tween-80 (%)	0.01	0.05
J	Carbamide (g/L)	1.00	1.50
L	Inoculation amount (%)	8.00	10.00

表 2 正交试验因素 L₁₆(4⁴)水平

Table 2 Factors and levels of orthogonal experiment

Level	A MgSO ₄ (g/L)	B KH ₂ PO ₄ (g/L)	C ZnSO ₄ (g/L)	D KCl (g/L)
1	0.05	0.05	0.05	0.25
2	0.10	0.10	0.10	0.50
3	0.15	0.15	0.15	0.75
4	0.20	0.20	0.20	1.00

取-80 °C 保存的甘油菌 BK-10, 转接 100 μL 至 30 mL 种子培养基中, 26 °C、220 r/min 培养 48 h 作为一级种子。取一级种子 1 mL 接种于 300 mL 种子培养基中, 26 °C、220 r/min 培养 48 h 作为二级种子。将 300 mL 二级种子液接种至装有 3 L 发酵培养基的 5 L 发酵罐中。发酵罐设置转速为 600 r/min, 通气 200 L/h, 培养基中葡萄糖耗完即结束发酵, 发酵液于室温 5 000 r/min 离心 10 min 去除菌体等固形物, 准确量取上清液体积, 测定上清液中聚苹果酸浓度, 计算转化率和生产强度。

2 结果与分析

2.1 聚苹果酸发酵的单因素试验结果

依次对培养基中碳源、无机氮源和有机氮源的种类及其浓度、碳酸钙和表面活性剂吐温-80 浓度进行了优化, 综合考察菌体生长情况、产聚苹果酸和杂多糖含量。结果如图 1A-F 所示。最终确定出芽短梗霉 BK-10 的最适碳源、最适氮源分别为葡萄糖和尿素。对其最适浓度进行考察后, 确定葡萄糖、尿素、碳酸钙、吐温-80 的最适浓度分别为 100.0 g/L、1.5 g/L、30.0 g/L、0.01% (质量体积比)。

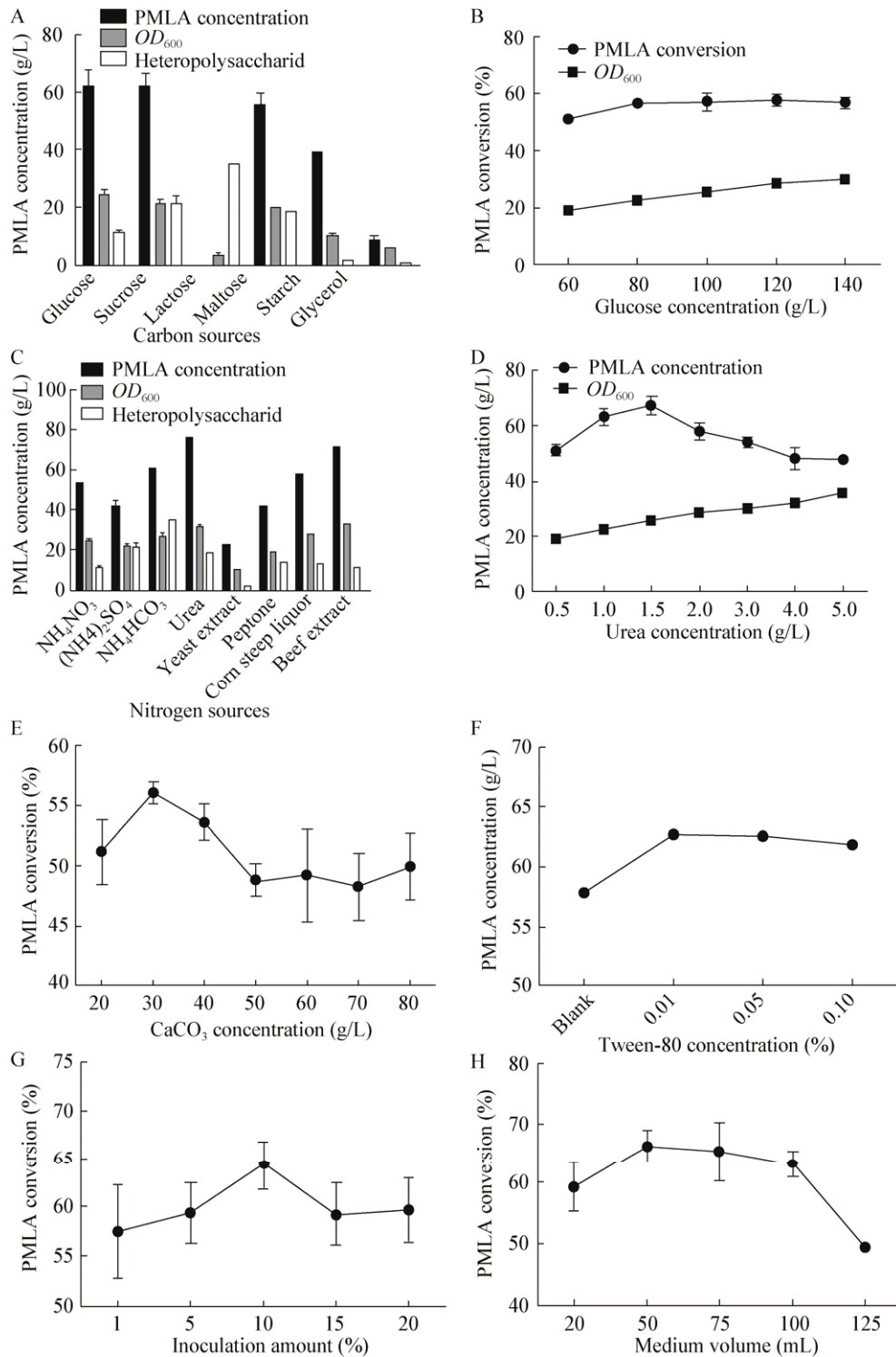


图 1 出芽短梗霉 BK-10 发酵产聚苹果酸单因素试验结果

Figure 1 The results of single factor experiment of PMLA produced by *A. pullulans* BK-10

注: A: 碳源; B: 葡萄糖最适浓度; C: 氮源; D: 尿素最适浓度; E: 碳酸钙浓度; F: 吐温-80 浓度; G: 接种量; H: 装液量.

Note: A: Carbon sources; B: Glucose concentration; C: Nitrogen sources; D: Urea concentration; E: $CaCO_3$ concentration; F: Tween-80 concentration; G: Inoculation amount; H: Medium volume.

依次对种龄、培养温度、装液量和接种量等因素进行考察。最终确定出芽短梗霉 BK-10 的最适培养条件为: 种龄 48 h, 培养温度 26 °C, 培养 7 d, 装液量 20%, 接种量 10%。

使用优化后的培养基在优化后的培养条件下进行验证实验, 最终聚苹果酸产量达到 77.48 g/L, 转化率达到 0.69 g/g, 较优化前提高了 54.36%。

2.2 Plackett-Burman (PB)设计实验结果

根据表 1 和 Minitab 17 软件得到 PB 实验设计。由表 3 得到 PB 设计的各因素水平以及效应评价(表 4)。由表 4 可知碳源浓度、氮源浓度和接种量

影响出芽短梗霉 BK-10 聚苹果酸产量的可信度大于 95%, 达到显著水平。

2.3 无机盐的正交试验结果

通过表 2 和 Minitab 17 软件得到 $L_{16}(4^4)$ 正交试验设计, 正交试验结果如表 5 所示。从极差分析可以得到影响聚苹果酸发酵的主次因素顺序依次为: $\text{KH}_2\text{PO}_4 > \text{ZnSO}_4 > \text{MgSO}_4 > \text{KCl}$ 。当 KH_2PO_4 浓度为 0.20 g/L, ZnSO_4 浓度为 0.20 g/L, MgSO_4 浓度为 0.05 g/L, KCl 浓度为 0.75 g/L 时, 聚苹果酸的产量最高, 各因素的最佳组合为: B4C4A1D3。

表 3 n=12 的 Plackett-Burman (PB)实验设计与响应值表

Table 3 Experimental design and response of Plackett-Burman (n=12)

Serial number	A	(B)	C	(D)	E	(F)	G	(H)	J	(K)	L	PMLA conversion (%)
1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	34.6
2	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	55.8
3	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	59.5
4	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	43.2
5	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	38.6
6	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	54.3
7	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	44.3
8	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	55.6
9	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	51.3
10	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	42.1
11	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	56.1
12	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	50.1

表 4 Plackett-Burman 设计的各因素水平及效应评价

Table 4 Factor levels and effect estimates of Plackett-Burman design

Code	Factors	Levels		t value	Prob>t	Importance
		Low (-1)	High (+1)			
A	Glucose (g/L)	70.00	100.00	11.59	0.000	1
J	Carbamide (g/L)	1.00	1.50	4.73	0.005	2
L	Inoculation amount (%)	8.00	10.00	2.81	0.038	3
C	Medium volume (mL)	50.00	70.00	2.25	0.074	4
E	CaCO ₃ (g/L)	20.00	30.00	1.88	0.119	5
G	Tween-80 (%)	0.01	0.05	0.60	0.577	6

表 5 正交试验结果与分析

Table 5 Result and analysis of orthogonal experiment

Code	A	B	C	D	PMLA conversion (%)
1	1	1	1	1	22.64
2	3	3	1	3	55.54
3	4	4	1	4	47.66
4	2	2	1	2	40.15
5	2	4	3	1	61.24
6	4	3	2	1	60.29
7	3	2	4	1	43.84
8	1	4	4	3	65.98
9	4	1	4	2	50.51
10	1	3	3	2	39.64
11	2	3	4	4	62.33
12	2	1	2	3	23.22
13	3	1	3	4	32.01
14	3	4	2	2	56.64
15	4	2	3	3	21.34
16	1	2	2	4	28.00
K_1	39.07	32.09	41.50	47.00	
K_2	46.73	33.33	42.04	46.73	
K_3	47.01	54.45	38.56	41.52	
K_4	44.95	57.88	55.66	42.50	
R	7.94	25.79	17.11	5.48	

使用优化后的培养基进行验证实验, 最终聚苹果酸产量达到 79.23 g/L, 转化率达到 0.71 g/g, 较优化前提高了 58.84%。发酵周期由 7 d 缩短至 5 d, 生产强度达到 0.66 g/(L·h), 较优化前提高了 108.19%。

2.4 5 L 发酵罐实验验证

综合上述实验结果设计表 6 进行 5 L 发酵罐实验验证。结果表明尿素和牛肉膏对聚苹果酸的产量均有所提升, 但以牛肉膏作为氮源发酵周期更短; 在培养基中添加 0.01% 吐温-80 对聚苹果酸的产生有促进作用, 但是对以牛肉膏为氮源的发酵中反而增加了发酵时间, 进而影响了生产强度。

表 6 优化结果的 5 L 发酵罐

Table 6 Fermentation of optimization in 5 L fermentor

Carbamide	Tween-80	Time (h)	Biomass (g/L)	PMLA (g/L)	Productivity (g/(L·h))	Yield (g/g)
NH ₄ NO ₃	-	136	64.2	71.20	0.52	0.60
	+	146	66.7	80.57	0.55	0.69
Urea	-	136	67.2	76.57	0.56	0.67
	+	112	71.8	78.71	0.70	0.70
Beef extract	-	88	71.1	78.71	0.89	0.71
	+	111	56.3	81.59	0.73	0.70

从表 6 结果可知, 在培养基组分为 100 g/L 葡萄糖, 1% 牛肉膏, 0.2 g/L KH₂PO₄, 0.2 g/L ZnSO₄, 0.05 g/L MgSO₄, 0.75 g/L KCl, 30 g/L CaCO₃ 时 5 L 发酵罐的实验结果最好。如图 2 所示, 此时聚苹果酸浓度为 78.71 g/L, 糖酸转化率为 0.71 g/g, 生产强度为 0.89 g/(L·h)。与文献[12]报道的最高发酵水平相比, 糖酸转化率和生产强度分别提高了 29.09% 和 20.27%。

3 结论

本研究优化了出芽短梗霉 BK-10 发酵生产聚苹果酸的培养基组分和摇瓶培养条件。得到菌株 BK-10 摇瓶的最适培养基组分和最适培养条件: 100 g/L 葡萄糖, 1.5 g/L 尿素, 0.20 g/L KH₂PO₄, 0.20 g/L ZnSO₄, 0.05 g/L MgSO₄, 0.75 g/L KCl, 30 g/L CaCO₃, 0.01% 吐温-80, 种龄 48 h, 培养温度 26 °C, 培养 5 d, 250 mL 三角瓶装液量 20%, 接种量 10%。

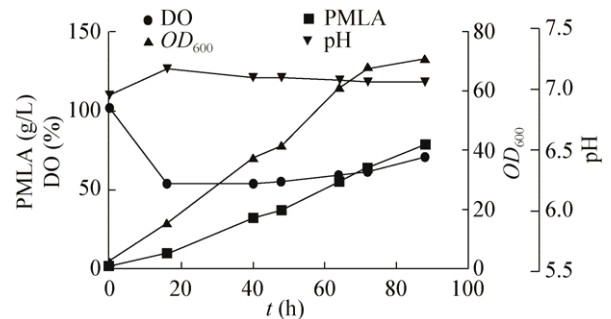


图 2 出芽短梗霉 BK-10 的 5 L 罐发酵结果

Figure 2 Fermentation of *A. pullulans* BK-10 in 5 L fermentor

优化后聚苹果酸产量可达到 79.23 g/L, 转化率达到 0.71 g/g, 生产强度达到 0.66 g/(L·h), 分别较优化前提高了 52.10%、58.84%和 108.19%, 而且发酵周期由 7 d 缩短至 5 d。

上述最适培养基配方和培养条件在 5 L 发酵罐上进行了验证, 结果表明优化结果主要表现在两个方面: 一方面使糖酸转化率从 0.60 g/g 提升至 0.71 g/g, 提高了 18.33%; 另一方面通过优化缩短了出芽短梗霉 BK-10 的发酵周期, 由原先的 140 h 缩短至 88 h, 生产强度由 0.52 g/(L·h)提升至 0.89 g/(L·h), 提高了 71.15%, 糖酸转化率和生产强度均超过已报道^[12]的最高水平。

REFERENCES

- [1] Caruelle JP, Barritault D, Jeanbat-Mimaud V, et al. Bioactive functionalized polymer of malic acid for bone repair and muscle regeneration[J]. *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, 2000, 11(9): 979-991
- [2] Kajiyama T, Taguchi T, Kobayashi H, et al. Synthesis of high molecular weight poly (α , β -malic acid) for biomedical use by direct polycondensation[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 2003, 81(3): 525-530
- [3] Kajiyama T, Kobayashi H, Taguchi T, et al. Synthesis of activated poly(α , β -malic acid) using N-hydroxysuccinimide and its gelation with collagen as biomaterials[J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2004, 24(6/8): 815-819
- [4] Goldberg I, Rokem JS, Pines O. Organic acids: old metabolites, new themes[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2010, 81(10): 1601-1611
- [5] Vrsaloviæ PA, Zeliæ B, Vasiæ-Raëki Ð. Modelling of continuous L-malic acid production by porcine heart fumarase and fumarase in yeast cells[J]. *Chemical and Biochemical Engineering Quarterly*, 2009, 23(4): 519-525
- [6] Sauer M, Porro D, Mattanovich D, et al. Microbial production of organic acids: expanding the markets[J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(2): 100-108
- [7] Vert M. Chemical routes to poly(β -malic acid) and potential applications of this water-soluble bioresorbable poly(β -hydroxy alkanoate)[J]. *Polymer Degradation and Stability*, 1998, 59(1/3): 169-175
- [8] Rathberger K, Reisner H, Willibald B, et al. Comparative synthesis and hydrolytic degradation of poly(L-malate) by myxomycetes and fungi[J]. *Mycological Research*, 1999, 103(5): 513-520
- [9] Nagata N, Nakahara T, Tabuchi T, et al. Fermentative production of poly(β -L-malic acid), a polyelectrolytic biopolyester, by *Aureobasidium* sp.[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2008, 57(4): 638-642
- [10] Liu SJ. Production of polymalic acid by *Aureobasidium pullulans* CBS 591.75 and DSM2404 in 2 L and 20 L fermenters[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 1997, 13(3): 279-283 (in Chinese)
刘双江. 出芽短梗霉菌株 CBS591.75 和 DSM2404 发酵生产聚苹果酸的研究[J]. *生物工程学报*, 1997, 13(3): 279-283
- [11] Zhang HL, Cai J, Dong JQ, et al. High-level production of poly (β -L-malic acid) with a new isolated *Aureobasidium pullulans* strain[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 92(2): 295-303
- [12] Zou X, Zhou YP, Yang ST. Production of polymalic acid and malic acid by *Aureobasidium pullulans* fermentation and acid hydrolysis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013, 110(8): 2105-2113
- [13] Zhang ZJ, Liu JH, Li SF, et al. Determination of polysaccharides content in *Ganoderma Lucidum* by Phenol-Sulfuric acid method[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 27(2): 193-195 (in Chinese)
张志军, 刘建华, 李淑芬, 等. 灵芝多糖含量的苯酚硫酸法检测研究[J]. *食品工业科技*, 2006, 27(2): 193-195
- [14] Chi ZM, Liu TT, Chi Z, et al. Occurrence and diversity of yeasts in the mangrove ecosystems in Fujian, Guangdong and Hainan Provinces of China[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2012, 52(3): 346-353
- [15] Liu YS, Wu JY. Effects of Tween 80 and pH on mycelial pellets and exopolysaccharide production in liquid culture of a medicinal fungus[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(4): 623-628