

米根霉在氮源限制下的木糖代谢和关键酶特性

余洋, 徐晴, 李霜*

南京工业大学生物与制药工程学院, 南京 210009

摘要: 【目的】解析氮源浓度对米根霉木糖代谢途径及产物的影响, 提高木糖利用率。【方法】以木糖为碳源, 考察不同氮源浓度下米根霉的生物量、有机酸积累量、木糖代谢关键酶(木糖还原酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)活力以及胞内还原力(NADH/NAD^+ 、 $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$)的差异。【结果】富氮条件下(2.4 g/L 尿素), 木糖代谢速率达 2.03 g/(L·h), 木糖还原酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活力以及胞内还原力较高, 生物量达 18.01 g/L, 几乎不积累有机酸; 限氮条件下(0.15 g/L 尿素), 木糖还原酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活力以及胞内还原力水平降低, 生物量仅 4.02 g/L, 富马酸积累量为 6.55 g/L, 残余木糖量较高; 氮源浓度为 0.6 g/L 时, 木糖还原酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活力以及 $\text{NADPH}/\text{NADP}^+$ 处于前二者之间, 此时生物量 9.11 g/L, 有机酸积累量较大, 其中富马酸为 12.28 g/L。【结论】充足的氮源可使米根霉通过木糖代谢关键酶与胞内还原力的协同效应强化木糖代谢活力, 通过优化氮源浓度后, 米根霉可积累更多有机酸。

关键词: 米根霉, 木糖, 氮源限制, 有机酸, 富马酸

中图分类号: Q935 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2013) 11-1189-06

米根霉 (*Rhizopus oryzae*) 是重要的工业微生物, 可用于富马酸、L-乳酸等大宗有机酸的发酵制备。随着有机酸产业链的迅速发展, 以木质纤维素为原料发酵制备有机酸已成为相关产业的终极目标^[1]。木质纤维素原料中木糖组分含量可达总糖的 30% 左右, 提高微生物对木糖的利用率将是促使木质纤维素替代其他高价原料的前提。

对于米根霉为代表的丝状真菌而言, 氮源限制 (nitrogen limitation) 造成的环境胁迫是积累有机酸的重要营养特征^[2]。以葡萄糖为底物时, 米根霉在氮饥饿的情况下会大量积累富马酸、L-苹果酸等有机酸而不是生物量。Ding 等^[3]以葡萄糖为底物, 氮

(N) 源浓度由 2.0 g/L 降低至 0.1 g/L 时, 米根霉发酵产富马酸的产量则由 14.4 g/L 提升至 40.3 g/L。Kautola 等^[4]采用固定化根霉菌并优化木糖为碳源的培养条件, 经 10d 发酵, 富马酸的最高转化率为 23.7%, 生产强度仅为 0.071 g/(L·h)。本课题组曾对根霉菌以木糖为底物的代谢特征进行了分析, 结果表明木糖为碳源时, 胞内还原力 (NADH/NAD^+) 和 ATP 含量较高, 代谢反应应以促进蛋白质、脂肪等合成为主, 几乎不积累有机酸^[5]。本文拟从 N 源限制的环境胁迫角度, 进一步研究米根霉对木糖的代谢特征, 为木糖的高效利用提供理论指导。

基金项目: 国家自然科学基金(21076104, 21106065); 国家“973 项目”(2009CB724701); 国家“863 计划”(2011AA02A206); 江苏省“青蓝工程”项目

* 通信作者。Tel: +86-25-83172094; E-mail: lishuang@njut.edu.cn

作者简介: 余洋(1988-), 男, 江苏南京人, 硕士研究生。E-mail: yuyang-323@hotmail.com

收稿日期: 2013-04-12; **修回日期:** 2013-05-21

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种: 米根霉 (*Rhizopus oryzae*) ME-F12 (ATCC 20344 的诱变菌株), 南京工业大学代谢工程实验室保藏。

1.1.2 培养基配方 (g/L): 种子培养基: 葡萄糖 30, $MgSO_4$ 0.5, KH_2PO_4 0.6, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0176, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.000498, 尿素 2, $CaCl_2$ 0.5, 接种前调节 pH 为 2.5; 发酵培养基: 木糖 60, $MgSO_4$ 0.5, KH_2PO_4 0.6, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0176, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.000498, 尿素 0.15、0.3、0.6、1.2、2.4 (对应不同碳氮比分别为 400.5、200.5、100.5、50.5、25.5), $CaCO_3$ 50。

1.1.3 培养方法: 调整米根霉孢子悬浮液浓度为 10^7 /mL, 取 1 mL 接种至 50 mL 种子培养基, 置于 35°C 摇床, 转速为 200 r/min, 培养 30 h 后成为种子液; 将 5 mL 种子液在 $8000 \times g$ 、4°C 离心机中快速离心 2 min, 弃上清, 将菌体接入装有 40 mL 已灭菌发酵培养基的摇瓶中, 置于 35°C 摇床, 转速为 200 r/min, 培养 84 h。

1.2 糖浓度的测定

发酵液取样 1 mL, $5000 \times g$ 、4°C 离心 1 min 取适量上清液。采用 3,5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定木糖浓度。

1.3 细胞干重的测定

将发酵液抽滤, 蒸馏水洗涤 3 次, 60°C 烘干至恒重, 称重。

1.4 有机酸的测定

P 680 型戴安系列, Chromeleon 工作站; Sepax HP-C 18 色谱柱 (46 mm \times 250 mm, 5 μ m), 流动相 V (0.1% 磷酸): V (乙腈) = 65:35; 柱温 25°C; 紫外检测波长 210 nm; 流速 0.6 mL/min; 进样量 20 μ L。

1.5 转化率、生产强度的计算

转化率: 每生成 1 g 目标产物所消耗的木糖含量, 单位 g/g; 生产强度: 每小时生成富马酸的浓度, 单位 g/(L·h)。NADH、 NAD^+ 、NADPH、 $NADP^+$ 的测定: 胞内物质的提取参考 Yu 等的方法^[6]; 检测原理及步骤主要参考 Liu 等的方法^[7]。

1.6 酶活的测定

酶活性检测在 SpectraMax M5 (Molecular

Devices 公司) 上进行。控制室温度为 37°C, 反应所需混合物加入到石英比色皿中, 最后加入细胞抽提液或者底物达到总体积为 1 mL, 并且启动反应。在波长 340 nm 测量 NADH、NADPH 的变化。每单位酶活性 U 定义为每分钟每毫克蛋白质转化 1 μ mol 底物所需的辅酶的量。每个样品平行测定 3 次。具体测定体系如下。木糖还原酶^[8]: 100 mmol/L D-木糖, 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液 (pH 6.5), 0.2 mmol/L NADPH; 6-磷酸葡萄糖脱氢酶^[9]: 0.1 mol/L Tris-HCl (pH 7.5), 6 mmol/L $MgCl_2$, 2 mmol/L 6-磷酸葡萄糖, 1 mmol/L 二硫苏糖醇 (DL-Dithiothreitol), 1 mmol/L $NADP^+$ 。

2 结果和讨论

2.1 不同 N 源浓度对米根霉生物量的影响

以木糖为碳源, 尿素为氮源, 调整尿素浓度, 使得碳氮比 (C/N) 分别为 400.5、200.5、100.5、50.5、25.5, 其结果如图 1 所示。

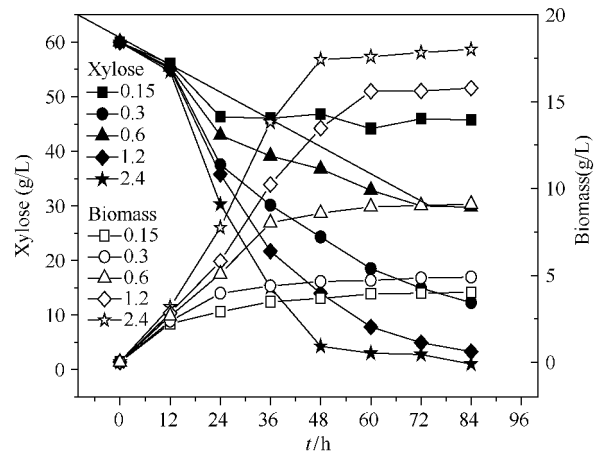


图 1. N 源浓度对米根霉木糖利用及生物量积累的影响

Figure 1. Effects of nitrogen concentrations on xylose consumption and biomass accumulation.

米根霉在不同 N 源浓度条件下, 发酵 0–12 h 内的糖耗速率和生物量积累速率差异不显著, 而发酵 24 h 后则存在明显差异。N 源浓度在 0.3–2.4 g/L 时, N 源浓度与木糖消耗速率和生物量积累呈显著正相关。N 源丰富的培养基中 (C/N 为 25.5), 木糖消耗最快, 发酵 48 h 木糖几乎消耗殆尽, 生物量达到 18.01 g/L, 木糖平均消耗速率为 1.2 g/(L·h), 最大消耗速率达 2.1 g/(L·h); 而极限 N 条件

下 (C/N 为 400.5), 发酵 24 h 后木糖几乎不再被消耗, 前 24 h 的木糖平均消耗速率为 0.6 g/(L·h), 残糖浓度达 45.78 g/L, 生物量仅 4.02 g/L; C/N 分别为 200.5、100.5 和 50.5 时, 木糖消耗速率随 N 源浓度增大而增大, 生物量分别是 4.91、9.11 和 15.79 g/L。Ding 等^[3] 在利用 80 g/L 初始葡萄糖浓度发酵富马酸时, N 源浓度由 0.1 g/L 提高至 1.0 g/L, 葡萄糖消耗速率从 1.1 g/(L·h) 增大至 2.2 g/(L·h)。窦畅等^[5] 的研究表明, 在相同 C/N 发酵时, 木糖为碳源时生物量更高。丰富的 N 源有助于提高木糖

代谢速率, 并促进米根霉生物量的积累。该现象被证明存在于包括米根霉在内的不同生物体系中^[10-12], 木糖的利用有利于生物大分子物质的合成, 丰富的 N 源更为生物大分子如蛋白质、脂肪等提供了充足的原料, 从而细胞生物量的积累也会增大。

2.2 不同 N 源浓度对米根霉发酵木糖产有机酸的影响

在不同 N 源浓度下, 测定发酵 84 h 时发酵液中有机酸的含量, 结果如表 1 所示。

表 1. 不同 N 源浓度对米根霉发酵木糖产富马酸的影响

Table 1. Effect of different nitrogen concentrations on fumaric acid production

Nitrogen concentration / (g/L)	Residual sugar / (g/L)	L-malic acid / (g/L)	Citric acid / (g/L)	α -Ketoglutaric acid / (g/L)	Fumaric acid / (g/L)	Yield of fumaric acid / (g/g)
0.15	44.07 ± 0.69	1.87 ± 0.06	0.58 ± 0.14	0.37 ± 0.09	6.55 ± 0.25	0.41
0.3	29.79 ± 0.77	3.72 ± 0.23	1.06 ± 0.19	0.68 ± 0.13	8.31 ± 0.19	0.27
0.6	12.27 ± 0.43	5.84 ± 0.17	1.47 ± 0.22	0.91 ± 0.11	12.28 ± 0.21	0.26
1.2	3.31 ± 0.55	1.35 ± 0.22	0.55 ± 0.12	0.29 ± 0.08	5.36 ± 0.28	0.09
2.4	1.05 ± 0.26	0.36 ± 0.03	0.46 ± 0.07	0.25 ± 0.13	0.27 ± 0.11	0.005

由表 1 可见, 在贫 N 源条件下 (C/N 为 400 - 100), 各种有机酸的积累浓度随 N 源浓度增加而增加; N 源浓度为 0.6 g/L 时, 各种有机酸的积累浓度均达到最大, 富马酸积累量达 12.28 g/L, 但该条件下富马酸转化率并非最大, 值得关注的是苹果酸的积累度也达到了 5.84 g/L。当 N 源浓度大于 0.6 g/L, 上述有机酸浓度随 N 源浓度的增大而显著减小, 增大 N 源浓度至 2.4 g/L, 发酵液中几乎不能有效积累有机酸。结合图 1 中不同氮源浓度下的生物量数据可知, 米根霉在 N 源丰富时, 生物量积累较高, 初级代谢产物的有机酸较少; 而限制 N 源时, 以木糖为碳源仍难以获得较高的有机酸积累, 残糖浓度较高。Ding 等^[3] 以葡萄糖为碳源, 当尿素浓度为 0.2 g/L 时 (C/N 约为 400), 富马酸积累量约 37 g/L; 而本研究中 C/N 为 400 时, 木糖代谢已明显受到抑制, 残糖高达 44 g/L, 表明米根霉代谢木糖和葡萄糖存在显著的差别。

当 N 源浓度分别为 0.15、0.6、2.4 g/L 时, 米根霉利用木糖的代谢差异较大且具有典型性, 因此深入研究细胞生理生化状况, 将更清晰地解析 N 源浓度对米根霉利用木糖的影响。

2.3 不同 N 源浓度对米根霉胞内还原力水平及富马酸合成的影响

不同 N 源浓度下米根霉胞内还原力的大小,

主要通过 NADH/NAD⁺ 和 NADPH/NADP⁺ 体现出来^[13-14]。不同 N 源浓度下米根霉胞内 NADH/NAD⁺、NADPH/NADP⁺ 的数值以及富马酸产量, 其结果如图 2 所示。

在各种条件下的发酵过程中, 米根霉胞内 NADPH/NADP⁺ 均呈现先增大后降低的趋势, 而 NADH/NAD⁺ 表现为在发酵后期 (36 - 72 h) 显著增加。米根霉胞内 NADPH/NADP⁺ 与 N 源浓度具有显著的正相关, 来自磷酸戊糖途径 (Pentose phosphate pathway, PPP) NADPH 的增加, 表明 N 源丰富时 PPP 代谢活跃, 产生大量还原力, 可促进合成反应的进行; 这一结果也有助于解释图 1 中氮源浓度与生物量呈正相关的实验现象。限制 N 源浓度为 0.15 g/L 尿素时, 胞内 NADPH/NADP⁺ 水平较低, 而 NADPH 作为米根霉木糖代谢第一步反应木糖还原酶的辅酶, 导致木糖代谢速率降低, 这解释了米根霉在该条件下发酵 24 h 后几乎不再消耗木糖的现象。胞内 NADH/NAD⁺ 在发酵中后期增加, 尤其是 N 源浓度为 0.6 g/L 尿素时, 胞内 NADH/NAD⁺ 达最大值, 富马酸积累量亦最大, 表明有机酸合成途径与 NADH 丰度具有一定的相关性。

2.4 N 源浓度对米根霉代谢过程中关键酶活性的影响

2.4.1 木糖还原酶 (Xylose Reductase, XR): 木

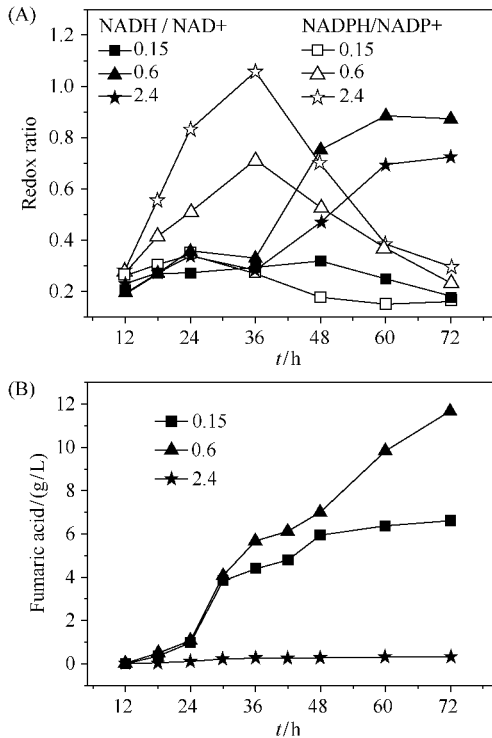


图 2. 不同 N 源浓度对米根霉胞内还原力 (A) 和富马酸积累 (B) 的影响

Figure 2. Effects of nitrogen concentrations on intracellular redox ratio (A) and fumaric acid accumulation (B).

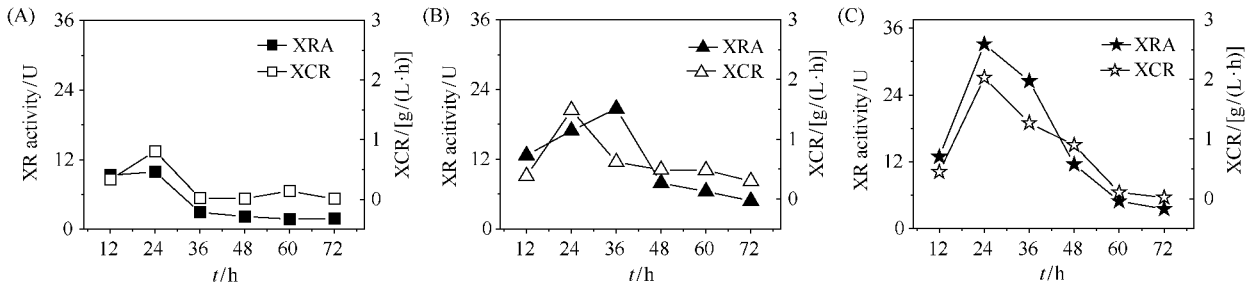


图 3. N 源浓度对木糖还原酶 (XR) 活力和木糖耗糖速率 (XCR) 的影响

Figure 3. Effect of nitrogen concentration on xylose reductase (XR) activity and xylose consumption rate (XCR). A: 0.15 g/L; B: 0.6 g/L; C: 2.4 g/L.

酸生成 NADPH 和 6-磷酸葡萄糖酸内酯, 后者可进一步转化为 5-磷酸木酮糖, 经一系列反应后生成 3-磷酸甘油醛及 6-磷酸果糖, 进入糖酵解途径继续代谢^[16]。在不同 N 源浓度下测定米根霉的 G6PD 活力 (G6PD activity), 结果如图 4 所示。

G6PD 活力呈现出与 XR 活力相似的规律, 即随着 N 源浓度的增加, C/N 减小, G6PD 活力增加。在 N 源浓度为 0.15 g/L (C/N 为 400) 时, G6PD 活力从 12 h 的 9.69 U 降低至 30 h 的 1.11U, 逐渐减小至几

糖还原酶 (XR) 是催化木糖代谢第一步反应的酶, 酶活高低可反映木糖的代谢情况^[15]。不同 N 源浓度下, 测定米根霉 XR 活力 (XR activity), 并计算木糖消耗速率 (Xylose consumption rate, XCR), 结果如图 3。

XR 活力与 XCR 具有相似的变化趋势, 两者随 N 源浓度的增加而加大。N 源浓度为 0.15 g/L 时 (如图 3-A), 发酵 24 h 时 XR 活力达最大值为 9.89 U, 此时 XCR 达最大值为 0.81 g/(L·h), 发酵 36 h 时 XR 活力迅速降低至 2.92 U, XCR 也随之降至 0.02 g/(L·h), 此后 XR 活力维持在较低水平, 木糖几乎不再被消耗。随着 N 源浓度升高, XR 活力和 XCR 均显著增加, N 源浓度为 2.4g/L 时, XR 活力高达 33.14U, XCR 最大值达 2.03 g/(L·h)。丰富的 N 源不仅促进了辅酶 NADPH 的合成^[8,15], 还增大了 XR 自身的合成量^[5]; 因此, 米根霉的 XR 活力随 N 源浓度增加而增强。不同 N 源浓度下, XCR 与 XR 活力的趋势高度一致 (图 3), 表明 XR 活力高低直接影响米根霉的木糖代谢速率。

2.4.2 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶 (Glucose 6-phosphate Dehydrogenase, G6PD): G6PD 是 PPP 中的关键酶, 它利用辅酶 NADP⁺ 催化葡萄糖-6-磷

乎为零; N 源浓度增至 0.6 g/L 时, G6PD 的活力由 12 h 的 13.81U 逐渐降低至 72 h 的 1.19 U, 而当 N 源浓度为 2.4 g/L, 此时 C/N 为 25.5 时, G6PD 的活力在发酵 24 h 最大, 达 17.80 U, 后相对缓慢地降低至 36 h 的 11.63 U, 此后迅速在 48 h 降低至 2.54 U 并最后减小至 1.54 U。

G6PD 以 NADP⁺ 为还原氢受体, 细胞内 NADP⁺ 水平将直接影响 G6PD 的活力, 因此 N 源对 NADP⁺ 含量的影响同样也影响了 G6PD 的活力。N 源浓度

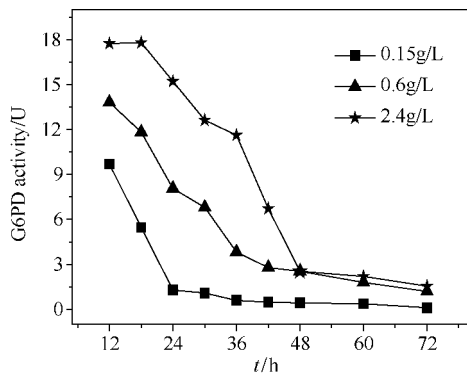


图 4. N 源浓度对 6-磷酸葡萄糖脱氢酶活力 (G6PD activity) 的影响

Figure 4. Effect of nitrogen concentrations on G6PD activity.

增大,细胞中 PPP 活跃,生成大量 NADPH,细胞合成反应增加;NADPH 为 XR 提供还原力,而 XR 催化反应生成的 NADP⁺ 又作为 G6PD 的还原氢受体,以此往复,N 源浓度越大,木糖代谢越快^[17]。

3 结论和展望

米根霉在不同 N 源浓度下的代谢差异表明:极度限氮(0.15 g/L 尿素)时米根霉胞内还原力水平低下,木糖代谢速率低,细胞生物量低,有机酸积累量不高但转化率较高;增加 N 源浓度促进了 PPP 代谢活力,胞内还原力丰度较高,细胞生物量高,有机酸转化率降低;通过对 N 源浓度的优化,可以获得有机酸积累量与转化率的相对统一。

米根霉以葡萄糖和木糖为碳源时,在相同的 C/N 条件下(C/N 为 400)表现出截然不同的代谢结果,有必要进一步通过转录组等研究来揭示细胞代谢差异的实质,为木糖代谢途径的改造提供分子基础。

参考文献

[1] Edward M. Rubin. Genomics of cellulosic biofuels. *Nature*, 2008, 454: 841-845.

[2] Goldberg I, Rokem JS, Pines O. Organic acids: old metabolites, new themes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 2006, 81(10): 1601-1611.

[3] Ding Y, Li S, Dou C, Yu Y, Huang H. Production of fumaric acid by *Rhizopus oryzae*: role of carbon-nitrogen ratio. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 164:1461-1467.

[4] Helena K, YYLinko. Fumaric acid production from xylose by immobilized *Rhizopus oryzae* cells. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1989, 31: 448-452.

[5] Dou C, Xu Q, Song P, Jiang L, Li S. Metabolism of *Rhizopus oryzae* with xylose or glucose as carbon resource. *Acta Microbiologica Sinica*, 2011, 51(4): 468-473. (in Chinese)

窦畅,徐晴,宋萍,江凌,李霜.米根霉利用木糖与葡萄糖的代谢差异. *微生物学报*, 2011, 51(4): 468-473.

[6] Yu S, Wen J, Li S. Metabolic profiling of a *Rhizopus oryzae* fumaric acid production mutant generated by femtosecond laser irradiation. *Bioresource Technology*, 2012, 114: 610-615.

[7] Liu X, Ji X, Huang H. An improved sampling protocol for analysis of intracellular metabolites in *Mortierella alpina*. *Biotechnol Letter*, 2012, 34(12): 2275-82.

[8] EN Yablochkova, OI Bolotnikova, NP Mikhailova, NN Nemova, AI Ginak. The activity of xylose reductase and xylitol dehydrogenase in yeasts. *Microbiology*, 2003, 72: 414-417.

[9] Fernanda GR, Marcela ZR, Attilio Converti, Michele V, Adalberto PJ. Kinetic and thermodynamic aspects of glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and synthesis. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, 32: 107-113.

[10] Gazetta ML, Contiero J. Influence of nitrogen source and sucrose concentration on inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* in fed-batch fermentation. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(56): 12012-12017.

[11] Schmidt CG, Furlong EB. Effect of particle size and ammonium sulfate concentration on rice bran fermentation with the fungus *Rhizopus oryzae*. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 36-41.

[12] Xu Q, Li S, Fu Y, Tai C, Huang H. Two-stage utilization of corn straw by *Rhizopus oryzae* for fumaric acid production. *Bioresource Technology*, 2010, 101: 6262-6264.

[13] Qin Y, Dong ZY, Liu LM, Chen J. Manipulation of NADH metabolism in industrial strains. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25(2): 161-169. (in Chinese)

秦义,董志姚,刘立明,陈坚.工业微生物中 NADH 的代谢调控. *生物工程学报*, 2009, 25(2): 161-169.

[14] Alexeeva S, Hellingwerf J, Teixeira de Mattos MJ. Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic

conditions. *Bacteriology*, 2003, 185 (1):204-209.

- [15] Ronald H, Maas W, Jan S, Gerrit E, Ruud AW. Xylose metabolism in the fungus *Rhizopus oryzae*: effect of growth and respiration on L (+)-lactic acid production. *Journal Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2008, 35:569-578.
- [16] Duan YX, Chen T, Chen X, Zhao XM. Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase enhances riboflavin production in *Bacillus subtilis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 85:1907-1914.
- [17] Thomas J. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current Opinion in Biotechnology*, 2006, 17:320-326.

Effects of nitrogen-limitation on xylose metabolism and key enzymes activity in *Rhizopus oryzae*

Yang Yu, Qing Xu, Shuang Li*

College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: [Objective] We studied the effects of nitrogen concentration on xylose metabolism and organic acid production in *Rhizopus oryzae*. [Methods] We studied the effect of different nitrogen concentration in media on biomass, organic acids accumulation, activity of key enzymes (xylose reductase, XR, glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PD) involved in the metabolism and intracellular redox ratios of *R. oryzae*. [Results] Both intracellular redox ratios and key enzymes activities stayed low, resulting in 4.02 g/L biomass, 6.55 g/L fumaric acid production and high concentration of residual xylose under nitrogen-limitation conditions (0.15 g/L urea). Intracellular redox ratios and activity of key enzymes increased under rich nitrogen culture (2.4 g/L urea), leading to high biomass 18.01 g/L, high xylose uptake speed 2.03 g/(L·h) but low fumaric acid production (0.27 g/L). When concentration of urea was 0.6 g/L, biomass 9.11 g/L and fumaric acid 12.28 g/L, NADPH/NADP⁺, XR and G6PD activities were medium whereas NADH/NAD⁺ reached the highest compared to those in rich nitrogen or nitrogen limitation. [Conclusion] Sufficient nitrogen source strengthened the xylose metabolic activity by promoting the key enzymes activity and intracellular redox ratios in *R. oryzae*. Optimized nitrogen concentration will enhance fumaric acid production with *R. oryzae*.

Keywords: *Rhizopus oryzae*, xylose, nitrogen limitation, organic acid, fumaric acid

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Nature Science Foundation of China (21076104, 21106065), by the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (2009CB724701), by the National Programs for High Technology Research and Development of China (2011AA02A206) and by the Qing Lan Project of Jiangsu Province

* Corresponding author. Tel: +86-25-83172094; E-mail: lishuang@njut.edu.cn

Received: 12 April 2013 / Revised: 21 May 2013