

根霉的研究

II. 根霉产生延胡索酸的研究* **

乐 华 爱

(中国科学院微生物研究所)

一、引 言

根霉有多种优良特性,如糖化力强的根霉用于酿酒工业,根霉的果胶酶可用于棉布脱胶及果汁澄清等,根霉能氧化生成甾体激素,并且是测定制霉菌素的合适菌种。我们分离和选择出的不同类型的优良根霉,已应用于这几方面了^[1-4]。根霉产生的有机酸,如延胡索酸与乳酸等都是重要的化工原料,特别是延胡索酸可用来合成塑料、假漆和树脂。板口谨一郎^[5], Буткевич^[6], Foster^[7]等都作了根霉发酵产生延胡索酸的条件及生理代谢的研究;相田浩^[8], Rhodes^[9,10]发表了摇瓶培养产生延胡索酸的条件和通气发酵的结果。国内王寅章^[11]曾选择过产生延胡索酸的根霉,并作了抑制剂对它的影响。我们从1959年初着手根霉产生有机酸的研究,本文报告产生延胡索酸根霉的分离、选择和发酵条件的研究结果。

二、实验部分

(一)菌种的分离和选择

1. 实验方法

菌种的分离是将五谷、土壤、腐败水果等样品,在馒头培养基上选择性培养后,再用稀释法平板分离,或直接稀释分离^[1]。

菌种的初选是用豆芽汁葡萄糖培养基,成分为10%豆芽汁 + 10%葡萄糖,100毫升锥形瓶内每瓶20毫升,8磅30分钟灭菌,接种后25°C培养1星期,取培养液5毫升,用0.1 N NaOH定总酸,纸上层析法测定所产酸的种类^[12],用苯甲醇溶剂(苯甲醇:正丁醇:水:甲酸 = 45:45:9:1)和酚溶剂(酚:水:甲酸 = 75:25:1)同时进行分析,以便确证产酸种类。

初选获得的产生延胡索酸的菌种,用 Буткевич 的硫酸铵合成培养基(KH_2PO_4 0.2%, NaCl 0.3%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, 葡萄糖 5%),静置置换法^[6,13]进行复选,用高锰酸钾冷时滴定法定延胡索酸^[6,14],容量法定钙^[15],纸层分析法鉴定所产酸的种类和其比例关系,菌体用滤纸压干称重。

本文1962年8月收到。

* 本文为1960年1月上海举行的生化学术会议上报告的一部分。

** 本研究工作由方心芳先生指导,特此志谢。

2. 实验结果

我們自 56 年开始, 从酒麴、五谷、土壤和腐敗水果等 456 个样品中分离出約 2,000 株根霉, 按照不同培养基上的培养特征分羣后, 挑选部分不同类型及有产酸可能的根霉 462 株, 用豆芽汁葡萄糖培养基进行产酸力的测定, 結果見表 1, 由表 1 可見酒麴中分离出的四川型和細小孢囊型的根霉产酸很少, 而上海型的根霉产酸較多。由腐敗水果、甘薯及土壤中分离出的在 37°C 不生长的黑根霉 (*Rhizopus nigricans*) 181 株都产酸极少, 而 37°C 生长旺盛的菌产酸較多, 由此可見, 根霉的产酸多少与种羣有相关性。

表 1 不同来源不同类型根霉产酸力的比較

样品来源	菌种类型	菌名	分离出菌株数	测定菌株数	产酸情况		
					0.1N 以上者(株)	0.05N 以上者(株)	0.05N 以下者(株)
酒 麴	上海型	<i>Rhizopus tonkinensis</i>	102	102	7	34	61
	四川型	<i>Rh. japonicus</i>	132	24	0	0	24
	細小孢囊型	<i>Rh. chinensis</i>	98	12	0	0	12
五谷、土壤、 腐敗水果	37°C 不生长型	<i>Rh. nigricans</i>	669	181	0	0	181
	37°C 生长型	<i>Rh. sp.</i>	146	55	1	45	12
	37°C 生长旺盛型	<i>Rh. oryzae</i>	206	88	1	37	50
共	計		1353	462	9	116	340

将产酸在 0.1 N 以上的根霉进行紙层分析, 結果表明, 根霉有产純乳酸的, 有产延胡索酸較純的(有时含极微量苹果酸), 有产乳酸和延胡索酸两种酸的, 以及产乳酸, 延胡索酸及苹果酸三种酸的根霉也很多。根据紙层分析結果, 选出产純乳酸較高的根霉 8 株, 产延胡索酸較純的根霉 17 株, 其他則多为产生两种酸或三种酸的。这些菌的来源見表 2。

从表 2 可見, 根霉产酸的种类与該菌生态分布有一定的关系, 产生純乳酸的根霉多自小麴中分出, 而产生延胡索酸的根霉大多是从五谷样品上分出的。

将初选产生延胡索酸的根霉, 用 Буткевич 的硫酸銨合成培养基置換发酵后, 选出四株产生延胡索酸較高的菌株, 它們都属米根霉羣 (*Rhizopus oryzae* group), 保藏菌号为 3.1246, 3.1253, 3.1260, 3.1261 (原分离菌号为 31.2, 269.1, 395.1, 3.785), 这四个菌株依培养特征(见图 1)和生态来源, 可以看出它們显然是属于不同类型。經鉴定后定名如下: 菌号 3.1246, 米根霉 (*Rhizopus oryzae*); 菌号 3.1253, 米根霉 (*R. oryzae*); 菌号 3.1260, 河內根霉 (*R. tonkinensis*); 菌号 3.1261, 日本根霉 (*R. japonicus*)。

菌种特性进一步試驗的結果, 表明这四株产延胡索酸高而較純的菌株, 在有碳酸鈣的豆芽汁葡萄糖培养基中, 時間久时 (10 天的紙譜分析結果) 又表现出各自的特点。如图 2 所示, 3.1246 和 3.1253 仍产生相当純的延胡索酸; 3.1260 除有大量延胡索酸外, 还有微量乳酸; 3.1261 則出現几乎等量的延胡索酸和苹果酸。根据不同培养基, 不同培养时期 (1, 3, 5, 7, 10, 12, 14 天) 的紙譜分析結果, 更表明了各菌株間的差异, 其中 3.1261 号根霉虽然活性很強, 但很不稳定, 延胡索酸的产生很快, 但又很快轉化成苹果酸, 且后者繼續消

表2 根霉产酸种类与来源

菌 株	样 品 来 源	产 酸 种 类
3.1245	五谷	延胡索酸
3.1246(31.2)*	五谷(北京粮食公司小站米)	”
3.1247	”	”
3.1248	”	”
3.1249	南瓜	”
3.1250	五谷	”
3.1251	”	”
3.1252	”	”
3.1253(269.1)	五谷(北京粮食公司东北绿豆)	”
3.1254	”	”
3.1255	”	”
3.1256	”	”
3.1257	”	”
3.1258	土壤	”
3.1259	”	”
3.1260(395.1)	土壤(甘肃省高占)	”
3.1261(3.785)	不知产地(澳门酒厂)	”
3.1262	小麩	乳 酸
3.1263	”	”
3.1264	”	”
3.1265	腐敗西红柿	”
3.1266	五谷	”
3.1267	土壤	”
3.1268	”	”
3.1269	”	”

* 括弧内数字为原始分离菌号, 1960年在生化学术会议上报告时曾用分离菌号。

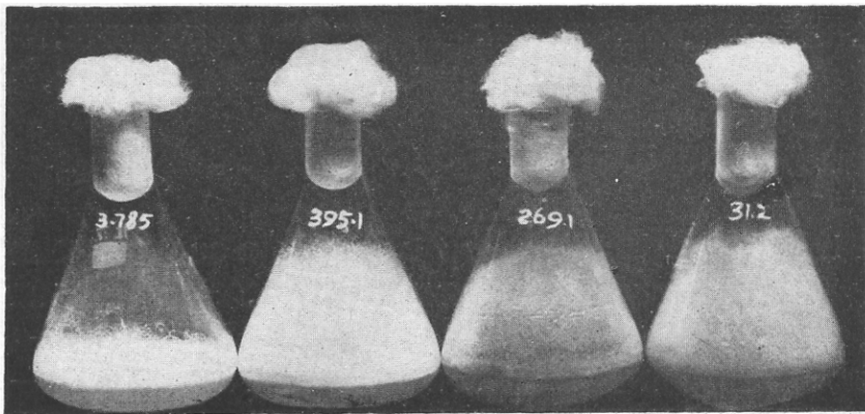


图1 四株根霉在 Баринава 合成培养基上生长情况

失,此现象受培养基的影响变化很大,所以不能作为生产用菌。3.1253在各种培养条件下,不同培养时期都以产延胡索酸为主,延胡索酸的累积有时较其他菌稍缓,但较稳定,唯延胡索酸钙结晶颗粒较细,在 Баринава 合成培养基上产量也相当高,所以是一个有希望的

菌种。3.1246 和 3.1253 較近似,但产量不如 3.1253 高。3.1260 的产物較杂,且較易受培养基的影响,除以延胡索酸为主外,有时出現乳酸或苹果酸。但是在 Баринава 合成培养基上,却产相当純的延胡索酸,产量往往比其他菌高而且延胡索酸鈣結晶顆粒粗大,生产

时易收获。是一个較好的菌。因此,选出 3.1253 和 3.1260 两菌重点进行发酵条件的試驗。

(二)根霉产生延胡索酸的条件

1. 实验方法

以 Баринава^[16]合成液($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3%, KN_2PO_4 0.066%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.033%, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.003%, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.005%, 葡萄糖 5%)为基础培养基,靜止培养,置換发酵法进行各种条件的試驗。实验操作为:200 毫升錐形瓶內每瓶装 50 毫升培养基,8 磅 30 分钟灭菌,接种时加 1% CaCO_3 ,接种后 30°C 培养 4 天,傾去培养液,菌膜用 1%

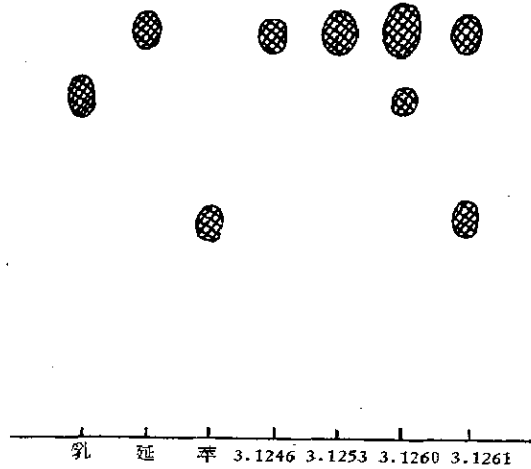


图2 四株根霉的产酸特性

NaCl 溶液洗三次,每次用 10 毫升。然后加入 50 毫升发酵液(葡萄糖 10% 和 CaCO_3 6%)。30°C 发酵,隔天輕輕搖动,在不同培养时期进行产物分析,大都在 30°C 发酵 10 天終止,进行最后分析,温度試驗是在第 7 天时分析的。

培养物自温箱中取出后,立即常压 30 分钟灭菌,然后用足够量的热水使形成的延胡索酸鈣結晶溶解,必要时先将結晶研磨以便溶解,用布氏漏斗加致密的双层滤紙吸滤,使所有的延胡索酸鈣溶液与碳酸鈣分开,以热水将菌体和殘余物洗到滤液遇草酸鉍无沉淀时为止,一般使总体积达到 250 毫升或 500 毫升。用高锰酸鉀冷时滴定法定延胡索酸^[6,14],1 毫升 0.05 N KMnO_4 冷时滴定相当于 0.630 毫克延胡索酸。用容量法定鈣^[15],以求得总的含酸量及延胡索酸占总酸的百分数。滤液酸化后进行紙层分析,以确定产酸种类和比例关系,即取滤液 5 毫升,1 滴滴加入 2 N H_2SO_4 調节 pH 至 2—3,根据产酸多少,适当点样后用苯甲醇溶剂扩展,溴酚蓝显色。

2. 实验結果

(1) 碳酸鈣对菌絲形成及菌絲活性的影响

用 Баринава 合成培养基接种,加 1% CaCO_3 或无 CaCO_3 的实验結果表明:在含 CaCO_3 的培养基內,菌丛生长旺盛,置換后有較高的发酵力,无 CaCO_3 的生长較弱,分析結果見表 3,表 3 指出,在菌体重量方面,有 CaCO_3 的都比沒有 CaCO_3 的重 3—5 倍,因菌不同而有区别。在延胡索酸产量方面,一般有 CaCO_3 的比沒有 CaCO_3 的高 2—4 倍,这与 Баринава^[16] 的实验結果大致相同(但因菌种不同而有区别),这里有一个例外,3.1261 生长在沒有 CaCO_3 的培养基中延胡索酸的含量比有 CaCO_3 的高,这是因为該菌活性很强,在生长旺盛的条件下,很快形成延胡索酸,但又很快将其轉化成苹果酸,这可由菌体重量和延胡索酸占总酸的百分数看出,加有 CaCO_3 的菌体重,而延胡索酸仅占总酸的 62.99%,紙譜分析結果証明有苹果酸存在。在糖收率方面,也是有 CaCO_3 的都比沒有 CaCO_3 的

表 3 碳酸鈣对菌絲形成和菌絲活性的影响

菌号	生长培养基	发酵滤液中鈣总量(克)	延胡索酸产量(克)	延胡索酸占总酸%	延胡索酸对原料糖的收率*(%)	湿菌体重(克)	菌体活性**
3.1246	Баринова 合成液 加 1% CaCO ₃	0.480	1.188	85.47	23.76	1.56	0.76
3.1253	”	0.535	1.350	87.15	27.00	1.53	0.88
3.1260	”	0.680	1.569	79.69	31.38	1.60	0.98
3.1261	”	0.357	0.652	62.99	13.04	1.40	0.47
3.1246	Баринова 合成液 无 CaCO ₃	0.308	0.764	85.71	15.28	0.50	1.53
3.1253	”	0.240	0.644	92.67	12.88	0.43	1.50
3.1260	”	0.207	0.400	66.55	8.00	0.26	1.54
3.1261	”	0.437	1.025	80.91	20.41	0.52	1.97

* 回收率 = $\frac{\text{所产延胡索酸克数}}{\text{原料葡萄糖克数}} \times 100$

** 菌体活性 = $\frac{\text{延胡索酸量(克数)}}{\text{湿菌体重量(克数)}}$

高,而菌体活性則相反。这是因为菌生长旺盛,菌体重量增加,单位重量菌体的效能不能无限制的相应提高。根据大部分菌在有 CaCO₃ 时有优越性,所以以后的实验在接种时都加 1% 碳酸鈣。

(2) 不同氮源的試驗

无氮基础培养基添加各种氮源, 30°C 生长 4 天, 置换 10% 葡萄糖和 6% CaCO₃ 的发酵液, 30°C 发酵 10 天, 分析结果见表 4。不同氮源試驗结果指出, 因氮源不同, 菌体重方面, 最好的与最坏的能相差 3—6 倍。延胡索酸的产量能相差 4—8 倍, 但因菌种不同而有差别。一般生长旺盛, 置换后不收缩者形成结晶快而多, 延胡索酸的产量也高。但不同菌种的最适氮源是不一致的, 3.1253 号菌以 (NH₄)₂SO₄ 最好, 收率达 35.92%, 尿素第二;

表 4 不同氮源对 3.1253 和 3.1260 兩株根霉生长发酵的影响

菌号	氮源种类及用量	发酵滤液中鈣总量(克)	延胡索酸产量(克)	延胡索酸占总酸%	糖收率(%)	湿菌体重(克)	菌体活性
3.1253	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2575%(N = 0.054%)	0.705	1.796	88.00	35.92	1.37	1.31
	尿素 0.1169%(N = 0.054%)	0.560	1.350	83.26	27.00	1.28	1.05
	NH ₄ NO ₃ 0.1567%(N = 0.054%)	0.095	0.215	78.10	4.00	0.85	0.25
	蛋白胍 0.5%(N = 0.054%)	0.530	1.318	85.90	26.36	1.34	0.98
	蛋白胍 0.1%(N = 0.01%)	0.160	0.414	89.37	8.28	0.22	1.88
	NaNO ₃ 0.3316%(N = 0.054%)	0.010	0.006	2.00	1.20	<0.01	—
3.1260	(NH ₄) ₂ SO ₄ 0.2575%(N = 0.054%)	0.470	1.099	80.76	21.98	1.45	0.76
	尿素 0.1169%(N = 0.054%)	0.760	1.852	83.62	37.04	1.71	1.08
	NH ₄ NO ₃ 0.1567%(N = 0.054%)	0.482	1.217	87.12	24.34	0.88	1.38
	蛋白胍 0.5%(N = 0.054%)	0.840	1.977	81.29	39.54	1.92	1.03
	蛋白胍 0.1%(N = 0.01%)	0.252	0.487	66.60	9.74	0.41	1.19
	NaNO ₃ 0.3316%(N = 0.054%)	0.025	0.009	12.40	1.80	<0.01	—

3.1260 則以 0.5% 蛋白胨最好,收率达 39.54%, 尿素第二; 根霉不能利用 NaNO_3 为氮源。

(3) 不同碳源的試驗

无碳基础培养基添加 5% (或 2.5%, 1%) 的各种碳源及碳酸鈣, 30°C 生长 4 天, 結果两菌都利用葡萄糖, 淀粉生长最旺盛, 对蔗糖則有差别, 只 3.1253 生长旺盛, 3.1260 則很弱。它們都利用甘油但較糖略差。也利用苹果酸、琥珀酸、延胡索酸、酒精和醋酸, 但生长較弱, 5% 酒精不生长, 2.5% 酒精微长, 醋酸在 2.5% 时已不生长, 1% 醋酸 4 天时微长, 12 天时明显生长。

不同碳源的生长发酵試驗是以尿素为氮源的基础培养基, 加 5% 葡萄糖, 蔗糖或淀粉为碳源, 30°C 生长 4 天后, 将每种碳源分別置換 10% 葡萄糖, 10% 蔗糖或 8% 淀粉, 30°C 发酵 10 天, 进行分析。实验結果表明: 菌种不同对碳源的利用能力有显著的差别, 3.1253 能利用葡萄糖, 蔗糖和淀粉产生大量的延胡索酸。而 3.1260 只能利用葡萄糖和淀粉, 不能利用蔗糖, 凡在蔗糖培养基上生长的菌丛都非常弱, 菌体重量很少, 置換后菌膜收縮至原体积的 1/10, 不能发酵产生延胡索酸, 而在葡萄糖或淀粉培养基上, 生长旺盛的菌丛置換蔗糖后发酵結果也很差。結果列于表 5。

表5 不同碳源对根霉生长和發酵的影响

菌号	基 质 轉 类 生长基质 → 发酵基质	发酵滤液 中鈣总量 (克)	延胡索酸 产 量 (克)	延胡索酸 占总酸 %	糖收率 (%)	湿 菌 体 重 (克)	菌 体 活 性
3.1253	葡萄糖 → 葡萄糖	0.495	1.134	79.22	22.68	0.97	1.17
	葡萄糖 → 蔗 糖	0.505	1.154	79.01	23.08	1.23	0.94
	葡萄糖 → 淀 粉	0.402	1.137	97.56	28.42	0.93	1.22
	蔗 糖 → 葡萄糖	0.430	0.954	76.62	19.08	1.15	0.83
	蔗 糖 → 蔗 糖	0.600	1.373	79.03	27.46	0.97	1.42
	蔗 糖 → 淀 粉	0.467	1.131	83.61	28.27	0.90	1.26
	淀 粉 → 葡萄糖	0.467	1.134	83.78	22.68	0.69	1.64
	淀 粉 → 蔗 糖	0.545	1.130	83.02	26.20	0.83	1.58
	淀 粉 → 淀 粉	0.475	1.167	84.86	29.17	0.86	1.36
3.1260	葡萄糖 → 葡萄糖	0.545	1.351	85.61	27.02	0.86	1.57
	葡萄糖 → 蔗 糖	0.162	0.274	58.21	5.48	1.04	0.26
	葡萄糖 → 淀 粉	0.522	1.216	80.38	30.04	1.03	1.18
	蔗 糖 → 葡萄糖	0.135	0.095	24.29	1.90	0.05	1.90
	蔗 糖 → 蔗 糖	0.070	0.019	9.43	0.38	0.06	0.32
	蔗 糖 → 淀 粉	0.070	0.025	12.28	0.62	0.03	0.83
	淀 粉 → 葡萄糖	0.470	1.017	74.78	20.34	1.07	1.05
	淀 粉 → 蔗 糖	0.100	0.139	56.60	2.78	0.84	0.17
	淀 粉 → 淀 粉	0.405	0.805	68.68	20.12	0.88	0.91

(4) 不同的生长温度和发酵温度对根霉形成延胡索酸的影响

Баринава 合成培养基接种后, 先在各种不同温度 25°C, 30°C, 35°C 生长 4 天, 置換 10% 葡萄糖和 6% CaCO_3 的发酵液, 然后将每种温度下生长的菌, 分別放到 25°C, 30°C,

35°C 温箱内发酵 7 天,而后进行分析,结果列于表 6。实验结果表明生长温度影响大,发酵温度无大影响,但因菌种不同而有区别。3.1253 的最适生长发酵温度为 30°C,延胡索酸的产量比 25°C 生长发酵者高 3 倍,3.1260 虽然也以 30°C 生长发酵者产量最高,但它受温度因子的影响小,25—35°C 之间的差别不大,这是因为 3.1260 在置换后还能继续生长,因此在发酵 7 天时,在各种温度下菌膜的生长情况已无大区别。所以延胡索酸的产量受温度因子的影响小。而 3.1253 在置换后不能继续生长,原生长温度低时菌丛生长略慢,最后的菌体重量较轻,所以产量低。

表 6 不同温度对根霉生长和发酵的影响

菌号	温度(°C) (生长—发酵)	发酵滤液中 钙总量 (克)	延胡索酸 产量 (克)	延胡索酸 占总酸 %	糖收率 (%)	湿菌体重 (克)	菌体 活性
3.1253	25—25	0.175	0.334	65.85	6.68	0.42	0.75
	25—30	0.250	0.428	59.19	8.57	0.46	0.92
	25—35	0.198	0.324	57.25	6.49	0.47	0.69
	30—25	0.400	0.690	59.57	13.79	0.59	1.16
	30—30	0.550	1.055	66.27	21.11	0.73	1.44
	30—35	0.628	1.077	59.30	21.35	0.76	1.42
	35—25	0.535	0.954	61.52	19.09	0.77	1.23
	35—30	0.560	1.018	62.60	20.35	0.85	1.19
	35—35	0.625	0.958	53.06	19.15	0.82	1.16
3.1260	25—25	0.640	1.184	63.92	27.68	0.92	1.29
	25—30	0.700	1.241	61.27	24.82	0.90	1.38
	25—35	0.590	1.134	66.38	22.68	0.87	1.30
	30—25	0.720	1.269	60.66	25.38	1.10	1.15
	30—30	0.700	1.644	81.14	32.88	1.20	1.37
	30—35	0.730	1.455	68.86	29.10	1.00	1.46
	35—25	0.570	1.313	79.59	26.26	1.07	1.23
	35—30	0.640	1.335	72.08	26.70	1.13	1.18
	35—35	0.530	1.036	67.70	20.72	0.90	0.98

(5) 不同培养时期对延胡索酸产量的影响

3.1260 号根霉在 Барينو́ва 合成培养基中, 30°C 生长 4 天, 置换 10% 葡萄糖和 6% CaCO₃ 的发酵液, 30°C 发酵 5, 7, 10 天时分析结果列于表 7, 由表 7 可见, 延胡索酸的产量随时间而增加, 但它的速度在 7 天之后减慢了, 最后的总产量以 10 天最高, 但延胡索酸

表 7 不同发酵时间对 3.1260 号根霉产生延胡索酸的影响

发酵时间 (天)	发酵滤液中 钙总量 (克)	延胡索酸产量 (克)	延胡索酸占总酸 %	糖收率 (%)	湿菌体重 (克)	菌体活性
5	0.460	0.775	58.17	15.50	0.92	0.84
7	0.700	1.644	81.14	32.88	1.20	1.37
10	0.990	1.947	67.92	38.94	1.07	1.81

占总酸的百分数以 7 天最高。

(6) 大瓶培养实验结果

以上试验的最适条件,即 3.1260 号根霉用 0.5% 蛋白胍 ($N = 0.054\%$) 的 Баринова 合成培养基。3.1253 用 0.2575% ($(NH_4)_2SO_4$ ($N = 0.054\%$)) 的 Баринова 合成培养基。1000 毫升锥形瓶,每瓶装 200 毫升培养液,接种时加 1% $CaCO_3$,每种培养基各接种 40 大瓶,30°C 生长 5 天(因瓶较大,时间延长 1 天),置换 10% 葡萄糖液(200 毫升)和 6% $CaCO_3$ (12 克),30°C 发酵 10 天。各菌大都在 6—7 天时开始形成结晶,10 天时多已布满结晶,只有个别的 1—2 瓶未形成结晶。发酵结束时,将结晶收获,3.1260 号根霉获得 665 克延胡索酸钙粗结晶。3.1253 号根霉获得 361 克延胡索酸钙粗结晶。

三、摘 要

1. 由酒麴、五谷、土壤和腐败水果等 456 个样品中分离出近 2000 株根霉,经研究发现,根霉产酸多少及种类与种属有关,与生态分布也有一定关系,如产延胡索酸多的菌,大都属米根霉属 (*Rhizopus oryzae* group)。它们多自五谷样品中分离出。

2. 选择出优良的产生延胡索酸的根霉两株——3.1253 号和 3.1260 号,并进行了发酵条件的研究,结果表明:碳酸钙对根霉生长发酵的影响很大,有碳酸钙的比没有碳酸钙的好,增加碳酸钙使 3.1253 提高产量 2 倍,使 3.1260 提高 4 倍。

氮源方面,3.1253 以硫酸铵为氮源的产量最高,而 3.1260 以蛋白胍最好,两菌都不能利用硝酸钠。

碳源方面,3.1253 能利用葡萄糖,蔗糖和淀粉,3.1260 则只能利用葡萄糖和淀粉而不能利用蔗糖。

生长发酵的最适温度是 30°C,而温度对生长相的影响大,对发酵相的影响小,对 3.1253 的影响更为显著。

参 考 文 献

- [1] 乐华爱、方心芳:根霉的研究(I)酿酒根霉的研究。微生物学通讯,1:86—89;151—168,1959。
- [2] 薛迪庚、梁玉贞:脱除棉纤维果胶的细菌酶与真菌酶的初步选择报告。染整生产技术报导,第 6 期 39 页,1959 年。
- [3] 黄鸣龙等:副肾皮酮酯的合成。化学学报,25:295—300,1959。
- [4] 生物制品检定所未发表资料:黑根霉作制霉素的测定菌已推广应用。
- [5] 坂口隆一郎、高桥甫:リゾープス属の酸发酵について。化学的研究,第 7 集生化学有机化学,1—42,1950。
- [6] Буткевич В. С.: Избранные Труды том 1, стр. 474—529, 1957。
- [7] Foster J. W.: Chemical Activities of Fungi Academic Press, New York, N. Y. 351—377, 1949。
- [8] 相田浩: *Rhizopus* 属によるフタル酸の生产。发酵协会志,10:16—24,1952。
- [9] Rhodes R. A. et al.: Production of fumaric acid by *Rhizopus arrhizus*. *Appl. Microbiol* 7: 74—80, 1959。
- [10] Rhodes R. A., Smith M. L., et al.: Production of fumaric acid in 20 liter fermentors. *Bacteriol. Proc.* 41. 1960。
- [11] 王寅章: I. II. III. 属于 *Rhizopus* 属的一种霉菌的延胡索酸发酵。上海自然科学研究所汇报,11:67—76,1941;12:21—24;195—204,1942。
- [12] Stark J. B. et al.: Paper chromatography of organic acid. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 23: 413—415, 1951。
- [13] Butkewitsch W. u. Fedoroff M. Ueber Bildung von Fumarsäure in der Zuckerkulturen von *Mucor stolonii* (*Rhizopus nigricans*) und sein Verhalten zur Brenztraubensäure. *Biochem. Zschr.* 206: 440,

1929.

- [14] Butkewitsch W. u. Fedoroff M. Ueber die Umwandlung der Essigsäure durch *Mucor stolonifer* in Bernstein- und Fumarsäure und das Verfahren zur Trennung und quantitativen Bestimmung dieser Säuren. *Biochem. Zschr.* **207**: 302, 1929.
- [15] 王 璉, 戚文彬: 分析化学下册, 495—496 页, 高等教育出版社, 1958.
- [16] Барынова С. А.: Влияние pH, азота, фосфора и серы на развитие *Rhizopus nigricans* и его активность к кислотообразованию. *Микробиология* **16**: 461—468, 1947.

ИССЛЕДОВАНИЕ РОДА *RHIZOPUS*

II. ИЗУЧЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ ФУМАРОВОЙ КИСЛОТЫ У КУЛЬТУР *RHIZOPUS*

Юэ Хуа-ай

(Институт микробиологии АН КНР)

1. Выделены 2000 штаммов *Rhizopus* из заквасок, почвы, зерновых, гнилых фруктов и других, всего 456 образцов. Основываясь на данных по изучению культуральной характеристики и кислотообразования у этих штаммов, установлено, что природа и количество образованных ими органических кислот зависят от членов этого рода, а также и связываются с их экологическим распространением. Высокопродуктивные культуры принадлежат к группе *Rhizopus oryzae*. В большинстве случаев они были выделены из зерновых.

2. Были отобраны 2 культуры № 3.1253 и № 3.1260, образующие максимальное количество фумаровой кислоты. Сравнительно исследовалось влияние карбоната кальция, разных источников углерода и азота и температуры на их развитие и активность к кислотообразованию.

Оказалось влияние CaCO_3 на фумаровокислое брожение и развитие *Rhizopus*. Присутствие CaCO_3 вызывает сильное увеличение их биомасс и выходов изучаемых органических кислот. При наличии CaCO_3 в среде штамм № 3.1253 накапливает фуманат кальция на 2 раза больше, чем контрольный опыт, а № 3.1260—4 раз.

Показано, что первый штамм (3.1253) использует $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ лучше других источников азота, а второй штамм (3.1260) пептон. Оба штамма не могут потреблять нитрата натрия.

Штамм № 3.1253 хорошо усваивает глюкозу, сахарозу и декстрин, а другой штамм не имеет инвертазы и использует только глюкозу и декстрин.

Оптимальная температура для их развития и процесса фумаровокислого брожения 30° . Установлено, что влияние фактора температуры на фазу роста культуры оказалось сильнее, чем на фазу брожения.