微生物学报 29 (2): 129—136, 1989
Acta Microbiologica Sinica

无根根霉 R25 和普通变形杆菌 P1 混合培养发酵 L-苹果酸的研究

蒋明珠 白照熙 张俊贤 谢 红
吴芷萍 许孟琴 孙文敬
(山西省生物研究所，太原)

所筛的41株属于根霉属的菌株，均具有从葡萄糖产生延胡索酸的能力。其中，R25 产延胡索酸能力最高，同时产生部分 L-苹果酸。该菌株被鉴定为无根根霉（*Rhizopus arrhizus*）。普通变形杆菌（*Proteus vulgaris*）P1 具有强的延胡索酸酶活性，可将延胡索酸转化为 L-苹果酸。

无根根霉 R25 在含有 12% 葡萄糖的培养基中，31℃ 振荡培养 3 天，进行延胡索酸发酵。然后接入在液体培养基中 31℃生长 2 天的普通变形杆菌 P1。在同样条件下发酵 2 天，L-苹果酸产量可达 5.48g/100ml。在含有 18% 的薯干粉培养基中发酵，能得到相同的产量。发酵产物经分离提纯为白色结晶，经纸色谱、红外光谱分析和熔点测定，与已知的 L-苹果酸一致。

关键词 L-苹果酸；无根根霉；普通变形杆菌

L-苹果酸用途广泛，是食品工业和制药工业重要的酸味剂之一。毛霉目的真菌，尤其是根霉属能利用糖类大量产生延胡索酸[1,2]。某些细菌能产较多的延胡索酸酶，可将延胡索酸转化为 L-苹果酸[3]。本文报道用无根根霉 R 25 和普通变形杆菌 P1 混合培养发酵 L-苹果酸的研究结果。

材 料 和 方 法

(一) 菌种

1. 从土壤、果实、种子等样品分离根霉 30 株，另收集中国科学院微生物研究所保藏根霉 11 株，筛选延胡索酸产生菌。

2. 从中国科学院微生物研究所、卫生部药物生物制品检验所和山西省卫生防疫站收集有关细菌 12 株，筛选产延胡索酸酶活高的菌株。

(二) 培养基

1. 根霉平板分离培养基：马丁氏培养基。

2. 根霉斜面保藏培养基： 马铃薯葡萄糖培养基。

3. 根霉种子培养基 (%)：葡萄糖 2，尿素 0.1，玉米浆 0.3，KH_2PO_4 0.03，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.025，$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0066，$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.001，玉米粉 3，琼脂 0.1。自然 pH。

4. 根霉筛选发酵培养基(%)：葡萄糖(或淀粉)8，尿素 0.1，玉米浆 0.05，KH_2PO_4 0.03，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04，$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0044，$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.001，甲醇 1.5，$CaCO_3$ 5。自然 pH。尿素和 $CaCO_3$ 分别灭菌，甲醇接种前加入。

5. 根霉发酵培养基 (%)：葡萄糖 12，尿素 0.15，玉米浆 0.075，KH_2PO_4 0.03，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04，$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0044，$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.001，甲醇 1.5，$CaCO_3$ 7.5。自然 pH。尿素和 $CaCO_3$ 分别灭菌，甲醇接种前加入。

6. 细菌斜面保藏培养基 (%)：牛肉膏 0.3，蛋白胨 1.0，NaCl 0.5，琼脂 2，pH 6.7。

7. 细菌种子培养基 (%)：葡萄糖 0.5，蛋白胨 1.0，牛肉膏 0.3，酵母膏 0.3，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$

本文于 1987 年 4 月 6 日收到。

0.3，pH 6.7。

8. 细菌发酵培养基(%)：延胡索酸 4.0，尿素 0.1，KH_2PO_4 0.03，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.04，玉米浆 0.05，$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.0044，$FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0.001，甲醇 1.5，$CaCO_3$ 5。自然 pH。尿素分别灭菌，甲醇接种前加入。

(三) 分离、筛选及培养方法

1. 根霉分离及筛选：用马丁氏平板培养基进行分离，31℃培养 3—6 日，选取毛状真菌接于马铃薯葡萄糖斜面培养基，培养 7 日左右镜检。将分离和收集的根霉菌种接于马铃薯葡萄糖斜面培养基上，31℃培养 7 天。取一环菌于种子培养基中(250ml 三角瓶装 25ml)，30—32℃ 旋转式摇床上振荡培养 12—15h，按 8% 的接种量接入根霉筛选发酵培养基(500ml 三角瓶装 50 ml)，30—32℃ 往复式摇床上振荡培养 3 天。对发酵液中的延胡索酸进行定性定量分析，筛选延胡索酸产生菌。

2. 根霉发酵试验：先在往复式摇床上振荡培养 1 天，再移于旋转式摇床培养 3 天。液体种子培养，接种量和培养温度同筛选。

3. 细菌发酵试验：斜面菌种于 30℃ 培养 3 天。取一环菌苔于种子培养基中，30—32℃旋转式摇床培养 2 天，按 16%接种量接于发酵培养基中，发酵 2 天左右。

4. 根霉和细菌混合发酵：根霉、细菌的斜面和液体种子培养分别按根霉和细菌发酵试验进行。根霉在往复式摇床培养 1 天，再在旋转式摇床培养 2 天，按 16% 接种量接入细菌液体种子，继续培养 2 天。温度为 30—32℃。

根霉、细菌和混合发酵均在 250 ml 三角瓶(装 25ml)中进行。

(四) 分析方法

1. 有机酸定性测定：用纸色谱法。展开剂为正丁醇：甲酸：水(5:3:1，V/V)，上行法展开。显色剂为 0.02% 溴甲酚绿：0.05% 甲基红：0.5mol/L NaOH (1:1:0.5，V/V)，与标准品的 R_f 值进行比较。

2. 延胡索酸定量测定：采用高锰酸钾法[4]。

3. L-苹果酸定量测定：采用 2,7-萘二酚法[5]。

4. 其它测定方法：用蒽酮法[6]定糖；用精密 pH 试纸测 pH；用 721 分光光度计在波长 690nm 处测细菌种液光密度(种液稀释 10 倍)；用平板稀释法计数细菌。

实 验 结 果

(一) 延胡索酸产生菌的筛选与鉴定

纸色谱和延胡索酸定量结果表明，分离和收集的 41 株根霉均能利用葡萄糖和淀粉产生延胡索酸(表 1)，它们利用葡萄糖产酸的能力均强于利用淀粉产酸的能力。新分离的根霉 R25 产延胡索酸最高。除产生延胡索酸外，还产生一定量的 L-苹果酸。该菌经鉴定为无根根霉(图 1)。

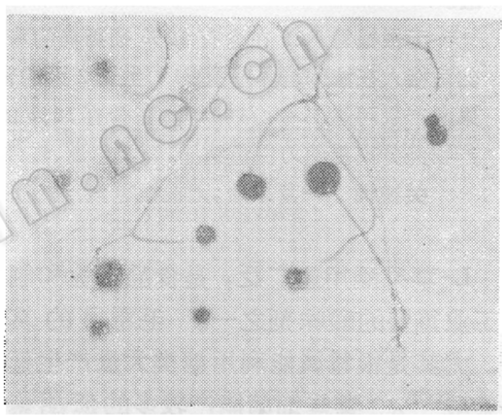

图 1 无根根霉 R25 (×140)

Fig. 1 *Rhizopus arrhizus* R25

(二) 影响无根根霉 R25 产延胡索酸的重要因素

1. 甲醇：甲醇对 R25 产延胡索酸影响较大，不加甲醇产延胡索酸很低，加甲醇的量以 1.5% 为宜，过多的甲醇对产延胡索酸并无好处(图 2)。

2. 氮源：尿素浓度为 0.1% 时产延胡索酸较高，随着尿素浓度增加，延胡索酸量逐渐减少，而 L-苹果酸量逐渐递增(图 3)。

3. 培养(振荡)方式：结果表明，在往复式摇床上振荡 1 天后移入旋转式摇床振荡 3 天，延胡索酸产量最高(5.17g/100

表 1　根霉产延胡索酸的能力

Table 1　Ability of fumaric acid production by *Rhizopus*

菌　种 Species	碳　源 Carbon source	延胡索酸 Fumaric acid (g/100ml)	L-苹果酸 L-maric acid (g/100ml)	残　糖 Residual sugar (%)
Rhizopus sp. R25	葡萄糖 glucose 淀　粉 starch	3.90 3.43	1.01 0.97	0.25 0.61
Rhizopus sp. R7	葡萄糖 glucose 淀　粉 starch	0.78 0.65	0.30 0.30	0.61 0.33
Rhizopus sp. R11	葡萄糖 glucose 淀　粉 starch	0.88 0.78	0.25 0.22	0.63 1.31
Rhizopus sp. R14	葡萄糖 glucose 淀　粉 starch	0.48 0.38	0.37 0.46	0.28 0.54
R. nigricans 3.38	葡萄糖 glucose 淀　粉 starch	3.00 2.35	0.85 0.65	0.10 0.49
R. arrhizus 3.3477	葡萄糖 glucose 淀　粉 starch	3.68 2.95	1.06 0.86	0.24 0.58
R. javanicus 3.273	葡萄糖 glucose 淀　粉 starch	2.85 1.90	1.33 1.20	0.06 0.36
R. chinensis 3.817	葡萄糖 glucose 淀　粉 starch	0.50 0.20	0.75 0.38	0.79 2.72
R. delemar 3.230	葡萄糖 glucose 淀　粉 starch	0.20 0.20	0.50 0.25	0.16 0.24
R. cohnii 3.2746	葡萄糖 glucose 淀　粉 starch	0.40 0.20	0.63 0.50	2.40 1.95

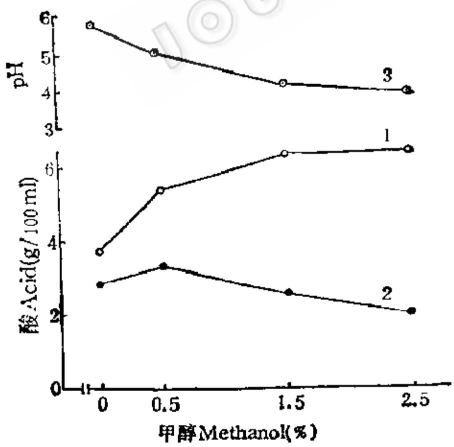

图 2　甲醇对产延胡索酸的影响

Fig. 2　Effect of methanol on fumaric acid production

1. 延胡索酸 Fumaric acid
2. L-苹果酸 L-malic acid
3. pH

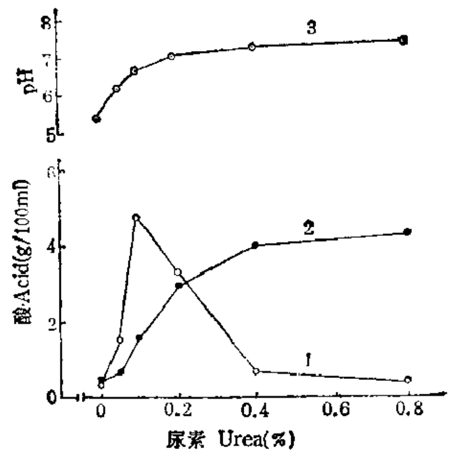

图 3　尿素对产延胡索酸的影响

Fig. 3　Effect of urea on fumaric acid production

1. 延胡索酸 Fumaric acid
2. L-苹果酸 L-malic acid
3. pH

表 2 不同细菌转化延胡索酸为 L-苹果酸的能力

Table 2 Ability of various bacterium to convert fumaric acid to L-malic acid

菌种 Species	pH	L-苹果酸 L-malic acid 纸色谱 Paper chromatogram	产量 Product (g/100ml)
Proteus vulgaris P1	7.2	+	2.28
P. vulgaris P2	7.2	+	2.23
P. mirabilis 49005	7.7	+	2.63
Aerobacter aerogenes 45102	7.2	−	
Pseudomonas fluorescens 1.55	6.4	−	
Serratia marcescens 1.646	7.5	−	
Lactobacillus brevis 1.7	8.0	−	
Bacillus subtilis 1.108	6.7	−	
Escherichia coli E1	6.4	−	
E. coli E2	6.7	+	0.85
E. coli E3	7.3	−	
E. coli E4	7.0	+	0.85

将 30℃ 生长 2 天的斜面菌株直接接入发酵培养基，3 天后测 L-苹果酸。

Each strain was grown on a nutrient agar slant at 30℃ for 2 days and then transferred into fermentation medium. L-malic acid was measured after 3 days.

ml)，在旋转式摇床上振荡 4 天次之 (5.06 g/100ml)。往复式摇床上振荡 2 天后移入旋转式摇床或在往复式摇床上振荡 4 天，产酸均不理想，产酸分别为 4.78g/100ml 和 4.12g/100ml。

(三) 具有延胡索酸酶活细菌的筛选

为选择具有延胡索酸酶活性的细菌，对分属于 8 个不同种的 12 株细菌进行了转化延胡索酸为 L-苹果酸能力的测定。结果 (表 2) 表明，属于变形杆菌属的普通变形杆菌和奇异变形杆菌均具有延胡索酸酶活性。进一步试验表明，普通变形杆菌 P1 具有较高的延胡索酸酶活性，延胡索酸浓度为 4% 时，L-苹果酸产量可达 3.51g/100ml，重量转化率达 87.3% (图 5)。

(四) 普通变形杆菌 P1 转化延胡索酸为 L-苹果酸的影响因素

1. 种子培养基：P1 在转化延胡索酸为 L-苹果酸时用斜面菌种接种，用量大，极不经济。因此，采用正交试验综合考察各因素 (葡萄糖、蛋白胨、牛肉膏、酵母膏) 对细菌光密度的影响，找出一个适宜的液体种子培养基十分必要。

结果 (图 4) 表明，蛋白胨，牛肉膏和酵母膏对细菌光密度的影响随浓度增高而递增。其中蛋白胨 R 值最大，影响最显著。在所提供的试验水平范围内，根据正交试验结果分析，较适宜的种子培养基成分 (%) 为：葡萄糖 0.5，蛋白胨 1，牛肉膏 0.3，酵母膏 0.3，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.3。用该培养基培养的种子，按 16% 的接种量进行发酵试验，其转化率达 87.3%，接近用斜面菌种直接接种的水平。

2. 种令：为找出合适的移种时间，观察了种令与菌株活力的关系 (图 5)。结果表明，种令达到 24h 以后，菌株活力达到最

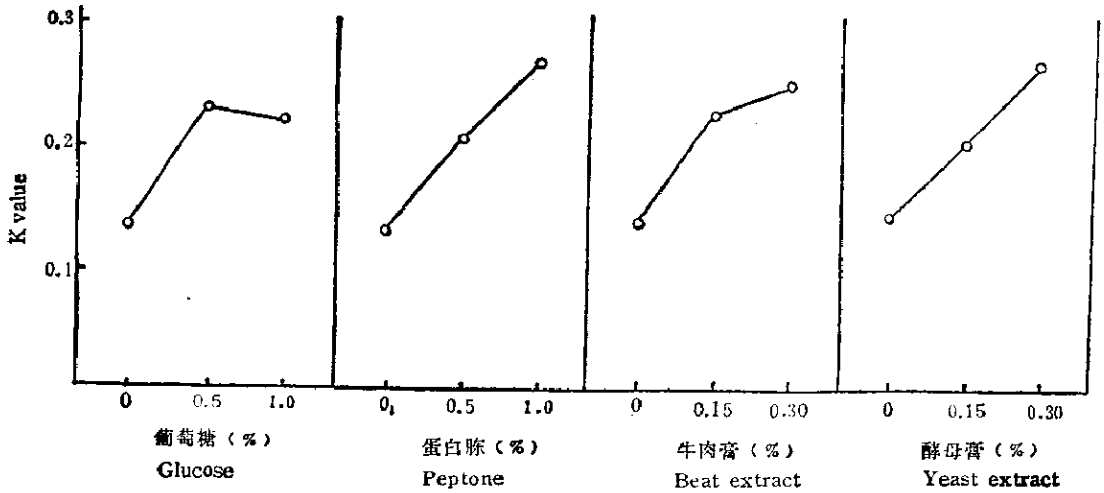

图 4　不同浓度的葡萄糖、蛋白胨、牛肉膏和酵母膏按 $L_9(3^4)$ 综合考察对细菌光密度的影响

Fig. 4　Effect of different concentration of glucose, peptone, beat extract and yeast extract on the optical density of the inoculum liquid (with orthogonal experiment table $L_9(3^4)$)

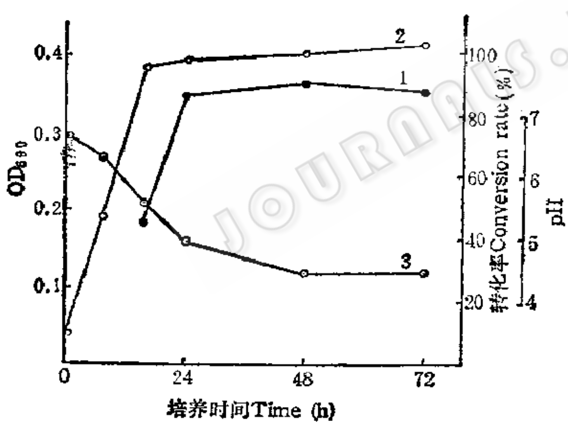

图 5　种令与菌株活力的关系

Fig. 5　Correlation between the age and activity of strain

1. L-苹果酸转化率 L-malic acid conversion rate
2. OD_{690}
3. pH

大值，72h 之内其活力稳定。移种时间以 24—48 为宜。

（五）无根根霉 R25 和普通变形杆菌 P1 混合培养发酵 L-苹果酸

1. 普通变形杆菌 P1 接种量对混合发酵 L-苹果酸的影响：结果表明，25ml 发酵液接种量为 1、2、4、6ml 时，L-苹果酸产量分别为 4.10、4.59、5.20、5.41g/100ml，普通变形杆菌 P1 接种量愈大，混合培养发酵 L-苹果酸产量愈高。

2. 普通变形杆菌 P1 接种时间对混合发酵 L-苹果酸的影响：结果表明，普通变形杆菌 P1 与无根根霉 R25 同时接入根霉发酵培养基中进行混合培养，对产 L-苹果酸不利，发酵 5 天仅产 L-苹果酸 2.35 g/100ml。但根霉生长 1 天后，在 1—4 天范围内接入细菌混合发酵，对产 L-苹果酸无不利影响，产 L-苹果酸量相差不大，均达 5.10g/100ml 以上。

3. 用薯干粉代替葡萄糖混合培养发酵 L-苹果酸：结果（表 3）表明，薯干粉经 α-淀粉酶液化后，可替代葡萄糖产 L-苹果酸。当薯干粉浓度为 18% 时，L-苹果酸的产量相当于 12% 葡萄糖时的产量。

4. 无根根霉 R25 和普通变形杆菌 P1 混合培养发酵 L-苹果酸的过程：在细菌

表 3 薯干粉对混合培养产 L-苹果酸的影响

Table 6 Effect of sweet potato mash on the production of L-malic acid by the mixed culture

薯干 Sweet potato mash (%)	pH	产酸量 Acid (g/100ml)	
		L-苹果酸 L-malic acid	延胡索酸 Fumaric acid
10	7.5	3.19	0.20
15	7.0	4.66	0.35
18	7.0	5.47	0.78

接入前(图 6A),根霉迅速利用葡萄糖构建菌体，在 72h 内葡萄糖几乎全部被耗尽。随着葡萄糖的消耗，延胡索酸大量产生。在此同时，L-苹果酸也有所积累，发酵液pH值略有下降。细菌接入后(图 6B),延胡索酸量急剧减少，L-苹果酸迅速增加，产量可达 5.48g/100ml。发酵液 pH 值有所回升。

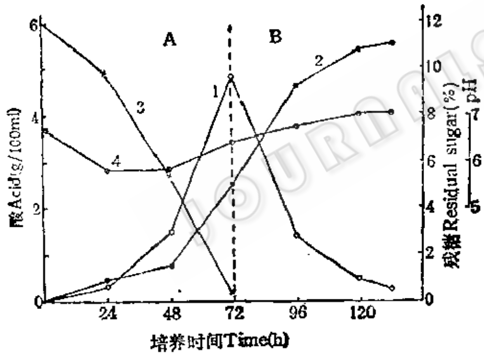

图 6 无根根霉 R25 延胡索酸发酵过程 (A) 与无根根霉 R25 和普通变形杆菌 P1 混合培养发酵 L-苹果酸过程 (B)

Fig. 6 Time course of fumaric acid fermentation by *R. arrhizus* R25 (A) and that of L-malic acid fermentation by mixed culture of *R. arrhizus* R25 and *P. vulgaris* P1 (B)

1. 延胡索酸 Fumaric acid
2. L-苹果酸 L-malic acid
3. 残糖 Residual sugar
4. pH

(六) L-苹果酸提取与发酵产物鉴定

1. L-苹果酸的提取：先提取出发酵

发酵液
Fermentation liquid

↓ 稀释后过滤除去菌体和残存碳酸钙
Remove the microbial cells and $CaCO_3$ by filtration after dilution

清液
Supernatant

↓ 减压浓缩
Concentrate under reduced pressure

浓缩液 1
Concentration liquid 1

↓ 冷却
Cool

L-苹果酸钙粗结晶
Calcium L-malate crystal

↓ + H_2SO_4

L-苹果酸
L-malic acid

↓ 过 732 阳树脂 (H^+ 型),水洗
Pass through a cation exchange resin 732 (H^+ type) and wash with water

洗脱液 1
Eluant 1

↓ 过 301 阴树脂 (OH^- 型),水洗
Pass through a anion exchange resin 301 (OH^- type) and wash with water

洗脱液 2
Eluant 2

↓ 减压浓缩
Concentration under reduced pressure

浓缩液 2
Concentration liquid 2

↓ 冷却
Cool

L-苹果酸粗结晶
L-malic acid crystal

↓ 重结晶
Recrystallization

纯品
Purified product

图 7 L-苹果酸提取流程图

Fig. 7 Scheme of experimental procedure for L-malic acid

液中的 L-苹果酸钙，然后用 H_2SO_4 中和钙离子，过阳、阴树脂柱，浓缩得 L-苹果酸，提取的大体过程如图 7。

2. 发酵产物的鉴定：测定提取成品熔点为 100—102℃，纸色谱为单一斑点，R_f 值与标准品 L-苹果酸（美国）相同。采用红外光谱仪（美国 PE-240 型）测定其吸收光谱，与标准品完全相符（图 8）。确定由发酵液提取的结晶样品系 L-苹果酸。

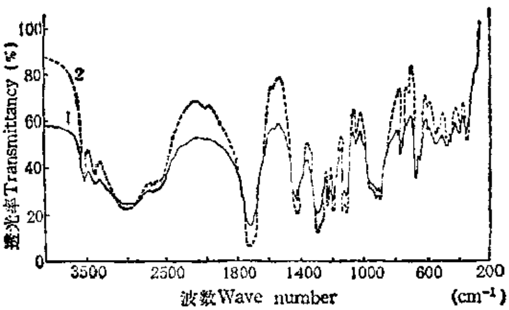

图 8　L-苹果酸红外光谱

Fig. 10　IR spectrum of L-malic acid

1. L-苹果酸（美国）L-malic acid (U. S.)
2. 提纯的发酵物结晶 Purified fermentative product

讨　论

在自然界中，微生物很少是纯培养，微生物之间保持着共生、互生和拮抗的关系。许多传统的发酵食品，是多种微生物共同作用的结果。随着微生物分离、纯化技术的发展，目前绝大多数微生物发酵产品均采用单一菌种发酵。

但是，近年来一些作者利用微生物的不同生理特性，采用混合培养的方法发酵微生物产品。据报道，根霉利用糖类产生大量延胡索酸，将膜醭毕赤酵母（*Pichia membranaefaciens*）[7]，宛氏拟青霉（*Paecilomyces varioti*）[8]或普通变形杆菌[3]接入发酵液中可将延胡索酸转为 L-苹果酸；接入产气肠杆菌（*Enterobacter aerogenes*）可转化为琥珀酸[9]；在补加磷酸铵的条件下接入普通变形杆菌可转为天冬氨酸[10]。裂褶菌（*Schizophyllum commane*）和蘑菇（*Agaricus campestris*）利用糖质原料产生大量丙酮酸，接入产气肠杆菌可将丙酮酸转化为色氨酸[11]。两种甚至多种微生物混合培养进行转换发酵的研究值得深入进行，它可以从另一侧面去发掘微生物造福人类的潜力。

国内有关转换发酵的研究，尚未见报道。Takao 和 Hotta[3] 采用细菌斜面菌种进行根霉和细菌混合培养转化延胡索酸为 L-苹果酸发酵，L-苹果酸为初糖浓度（实为投糖浓度的 50%）的重量转化率 84.4%。本文采用细菌液体种子接种，投糖 12%，产 L-苹果酸达 5.20—5.48g/100ml，若按上述方法计算，其重量转化率可达 86.7—91.3%。用 18% 的薯干粉可替代 12% 的葡萄糖，产 L-苹果酸 5.47g/100ml。

参 考 文 献

[1] Rhodes, R. A. et al.: *Appl. Microbiol.*, **7**: 74—80, 1959.
[2] 乐爱华：微生物学报，**8**(4)：377—385，1962。
[3] Takao, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **54**: 179—204, 1976.
[4] 福井作藏：實验化学讲座，丸善株式会社，**25**：57，1958。
[5] Goodban, A. E. et al.: *Anal. Chem.*, **29**: 283—287, 1957.
[6] 张宽厚：细菌生理学，科学出版社，北京，第 275—276 页，1961 年。
[7] Takao, S. et al.: *Agr. Biol. Chem.*, **42**(9): 1793—1794, 1978.
[8] Takao, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **61**(6): 643—645, 1983.
[9] Sasaki, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **48**(12): 776—781, 1970.
[10] Takao, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **50**(11): 751—757, 1972.
[11] 高尾彰一：日本醸造协会雑誌，**80**(10)：719—721，1985。

STUDIES ON L-MALIC ACID FERMENTATION BY MIXED CULTURE OF *RHIZOPUS ARRHIZUS* R25 AND *PROTEUS VULGARIS* P1

Jiang Mingzhu Bai Zhaoxi Zhang Junxian Xie Hong
Wu Zhiping Xu Mengqin Sun Wenjing
(Shanxi Institute of Biology, Taiyuan)

During the screeing of 41 strains of the genus Rhizopus, all strains of Rhizopus were found to be capable of producing fumaric acid from glucose. Among these, the strain R25 which showed the highest yield of fumaric acid accompanied with some L-malic acid, was identified as *Rhizopus arrhizus*. *Proteus unlgaris* P1 exhibited a high fumarase activity to convert fumaric acid to L-malic acid.

When *R. arrhizus* R25 was shake-cultured to produce fumaric acid at 31°C for 3 days in the medium containing 12% of glucose, and then associated with *P. vulgaris* P1 grown at 31°C for 3 days in liquid medium, after 2 days, L-malic acid yields was 5.48 g/100 ml. Similar yields of L-malic acid were obtained in the medium containing 18% sweet potato mash. The product isolated and purified from broth was white crystal. The R_f value, infrared adsorption spectrum and melting point of this crystal coincided with those of the authentic L-malic acid.

Key words

L-malic acid; *Rhizopus arrhizus; Proteus vulgaris*