

文章编号 1000-5013(2000)01-0076-04

混合培养发酵 *L*-苹果酸的研究

胡纯铿^① 王国川^②

(① 华侨大学化工学院, 泉州 362011; ② 福建惠泉啤酒集团股份有限公司, 惠安 362100)

摘要 采用 A-23 菌株和 V-81 菌株混合培养发酵 *L*-苹果酸, 分别探讨碳源浓度对 A-23 菌株和 V-81 菌株发酵水平的影响. 试验表明, A-23 菌株产延胡索酸能力强, V-81 菌株具有高活性延胡索酸酶. 在此基础上, 研究 A-23 菌株和 V-81 菌株混合培养方式对发酵 *L*-苹果酸的影响. 结果表明, A-23 菌株接入含有 $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 葡萄糖的混合发酵培养基中培养 3 d, 后接入 V-81 菌株并继续培养 2 d, 产酸水平最高, *L*-苹果酸浓度达 $73.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 对投糖浓度的摩尔转化率达 65.6%.

关键词 *L*-苹果酸, 混合发酵, 无根根霉, 普通变形杆菌

中图分类号 TQ 921

文献标识码 A

L-苹果酸是生物体代谢过程中产生的一种重要有机酸, 它在食品工业、临床医药、化学工业和饲料工业等领域中都有十分重要的应用^[0,2]. 几十年来, 人们已尝试过多种方法^[0~11]进行 *L*-苹果酸生产的研究. 早期采用的直接提取法, 系从天然动植物材料中提取 *L*-苹果酸, 现已意义不大; 化学合成法生产的苹果酸在应用上受到限制^[0]; 非糖质原料发酵法尚处于实验室水平; 酶转化法已率先进入工业生产规模; 近几年在糖质原料发酵工艺中, 一步发酵法和混合发酵法都有较大进展, 但有关的研究报道尚少. 日本 Takao 等人^[0]采用混合培养发酵 *L*-苹果酸, 产物对投糖浓度的摩尔转化率为 56.7%; 蒋明珠等人^[6]采用根霉和细菌混合发酵 *L*-苹果酸, 投糖浓度为 $120 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 产酸水平为 $52.0 \sim 54.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 换算为对投糖浓度的摩尔转化率为 58.3%~61.3%. 本工作采用 A-23 菌株和 V-81 菌株混合培养发酵 *L*-苹果酸. 其投糖浓度可达 $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, *L*-苹果酸产酸水平达 $73.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 对投糖浓度的摩尔转化率为 65.6%.

1 材料与方法

1.1 菌株

无根根霉 *Rhizopus arrhizus* A-23 和普通变形杆菌 *Proteus vulgaris* V-81^[00].

1.2 培养基

(1) 根霉斜面保藏培养基: 马铃薯葡萄糖培养基. (2) 根霉种子培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 葡萄糖 20, 尿素 1.0, 玉米浆 3.0, KH_2PO_4 0.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.066, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01, 玉米粉 30, 琼脂 1.0, pH 自然. (3) 根霉发酵培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 葡萄糖 80, 尿素

收稿日期 1999-04-19

作者简介 胡纯铿(1964-), 男, 讲师

基金项目 2000 福建企业横向科研合作基金资助项目

1. 0, 玉米浆 0. 5, KH_2PO_4 0. 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0. 4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0. 044, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0. 01, 甲醇 15, CaCO_3 50 (CaCO_3 和尿素分开进行灭菌, 甲醇在接种前加入), pH 值自然. (4) 细菌斜面保藏培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基. (5) 细菌种子培养基: 见文献[10]. (6) 细菌发酵培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 延胡索酸 40, 尿素 1. 0, KH_2PO_4 0. 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0. 4, 玉米浆 0. 5, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0. 044, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0. 01, 甲醇 15, CaCO_3 50 (CaCO_3 和尿素分开灭菌, 甲醇在接种前加入), pH 自然. (7) 混合发酵培养基($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$): 葡萄糖 150, 尿素 1. 8, 玉米浆 0. 85, KH_2PO_4 0. 3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0. 4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0. 044, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0. 01, 甲醇 15, CaCO_3 90 (CaCO_3 和尿素分开灭菌, 甲醇在接种前加入), pH 自然.

1. 3 培养方法

(1) 根霉培养: 根霉斜面菌种于马铃薯葡萄糖培养基上, 在 31℃ 条件下培养 7 d. 液体种子在 30~32℃ 条件下于旋转式摇床上振荡培养 16 h. 按 10% 接种量将液体种子接入根霉发酵培养基, 在 30~32℃ 条件下, 先于往复式摇床上培养 1 d, 后移至旋转式摇床上培养 3 d. (2) 细菌培养: 细菌斜面菌种于 30℃ 培养 3 d. 液体种子于 30~32℃ 旋转式摇床培养 2 d. 按 20% 接种量接于细菌发酵培养基中, 培养 2 d. (3) 混合培养: 按 10% 接种量将根霉液体种子接入混合发酵培养基中, 先在往复式摇床上培养 1 d, 再在旋转式摇床上培养 2 d, 后按 20% 接种量接入细菌液体种子, 继续培养 2 d. 培养温度为 30~32℃.

以上根霉、细菌的液体种子培养、发酵及混合发酵, 均在 250 mL 的三角瓶(装量为 25 mL)中进行.

1. 4 分析方法

延胡索酸的定量测定, 采用高锰酸钾滴定法; *L*-苹果酸的定量测定, 采用 2, 7-萘二酚法^[11]; 此外, 用酸度计测定 pH, 用蒽酮法^[12]测定糖等.

2 结果与讨论

2. 1 A-23 菌株发酵试验

根霉产延胡索酸能力和细菌延胡索酸酶活性, 它是影响混合培养发酵 *L*-苹果酸的关键因素. 为了提高 A-23 菌株延胡索酸发酵水平, 试验中尝试将根霉发酵培养基中的葡萄糖浓度(C_G)由 $80\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 提高到 $120\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 或 $150\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 分别考察 A-23 菌株对它们的转化情况, 结果见表 1. 由表可见: (1) A-23 菌株对不同浓度的葡萄糖转化都较彻底, 发酵液中的残糖浓度(C_{RG})很低; (2) A-23 菌株产延胡索酸能力随培养基中葡萄糖浓度的提高而递增, 当葡萄糖浓度为 $150\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 发酵液中的延胡索酸浓度(C_{FU})达 $78.9\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 对耗糖的摩尔转化率(R_{FU}^M)为 82. 7%; (3) A-23 菌株除产延胡索酸外, 尚可产一定浓度(C_{LMA})的 *L*-苹果酸.

表 1 A-23 菌株发酵试验结果

| | $C_G/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | $C_{FU}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | $C_{LMA}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | $C_{RG}/\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ | $R_{FU}^M/(\%)$ |
|-----|------------------------------------|---------------------------------------|--|---------------------------------------|-----------------|
| 80 | 80 | 43. 5 | 13. 1 | 1. 0 | 85. 4 |
| 120 | 120 | 63. 2 | 20. 9 | 1. 8 | 83. 0 |
| 150 | 150 | 78. 9 | 27. 6 | 2. 0 | 82. 7 |

2. 2 V-81 菌株发酵试验

在混合发酵中, 利用 V-81 菌株的延胡索酸酶活性^[10], 将 A-23 菌株发酵葡萄糖生成的延

胡索酸转化为 *L*-苹果酸. 试验中将细菌发酵培养基中的延胡索酸浓度(C_{FU}) 调为 $40\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, $60\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 探讨 V-81 菌株对不同浓度碳源的发酵情况, 结果如表 2 所示. 从表可见, 当延胡索酸浓度为 $80\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, V-81 菌株仍有很强的转化能力, *L*-苹果酸浓度(C_{LMA}) 可达 $72.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 对投入延胡索酸的质量转化率(R_{LMA}^W) 达 90.1%.

2.3 混合培养发酵 *L*-苹果酸

2.3.1 混合培养方式对发酵 *L*-苹果酸的影响 混合发酵工艺实质是将根霉的延胡索酸发酵和细菌的苹果酸转换发酵两个过程耦合在一起, 即以根霉的发酵产物作为细菌的发酵底物. 为探讨二者接入混合发酵培养基中的适宜时间, 试验中分别考察了 $t_A=0\text{ d}$ (A-23 菌株和 V-81 菌株同时接种), $t_A=1\text{ d}$ (A-23 菌株接种 1 d 后接入 V-81 菌株), $t_A=2\text{ d}$ (A-23 菌株接种 2 d 后接入 V-81 菌株) 和 $t_A=3\text{ d}$ (A-23 菌株接种 3 d 后接入 V-81 菌株) 等不同情况对混合发酵(周期为 5 d) *L*-苹果酸的影响, 结果见表 3. 由表可知, 二者同时接种, *L*-苹果酸产酸水平低, 发酵

表 2 V-81 菌株发酵试验结果

| $C_{FU}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | $C_{LMA}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | $R_{LMA}^W/(\%)$ |
|-------------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| 40 | 37.0 | 92.6 |
| 60 | 54.2 | 90.4 |
| 80 | 72.1 | 90.1 |

表 3 混合培养方式对发酵 *L*-苹果酸的影响

| t_A/d | $C_{LMA}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | $C_{FU}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ | $C_{RG}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ |
|----------------|--------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| 0 | 46.2 | 30.6 | 0 |
| 1 | 65.5 | 9.7 | 0 |
| 2 | 71.5 | 6.7 | 0 |
| 3 | 73.0 | 5.3 | 0 |

液中有较多的延胡索酸. 当 A-23 菌株先接种 2~3 d 后接入 V-81 菌株, 发酵 *L*-苹果酸理想, 残余的延胡索酸很少. 此外, 以上各种混合培养方式, 发酵 5 d, 培养基中葡萄糖均被耗尽(残糖浓度 $C_{RG}=0$).

2.3.2 混合培养发酵 *L*-苹果酸进程 试验中控制 $t_A=3\text{ d}$, 发酵周期为 5 d, 进行混合培养发酵 *L*-苹果酸, 定期测定发酵液中 *L*-苹果酸(LMA) 浓度, 延胡索酸(FU) 浓度和残糖(RG) 浓度, 结果如图 1 所示. 图 1 表明, 发酵 3 d, 延胡索酸积累到最高水平, 达 $68.6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 此时糖已耗尽. 接入 V-81 菌株后, 延胡索酸快速

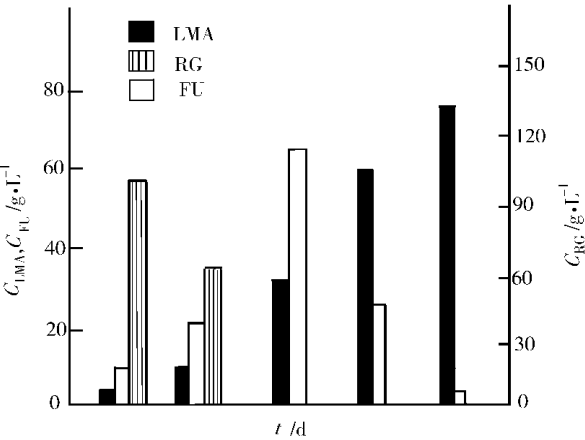


图 1 混合培养发酵 *L*-苹果酸进程

转化为 *L*-苹果酸; 至第 5 d 时, 延胡索酸已基本耗尽; *L*-苹果酸的最终浓度可达 $73.3\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 其对投糖浓度的摩尔转化率为 65.6%.

3 结束语

本研究采用 A-23 菌株和 V-81 菌株混合培养发酵 *L*-苹果酸, 投糖浓度达 $150\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 根霉先接入混合发酵培养基中 3 d, 后接入细菌继续发酵 2 d, 产酸理想, *L*-苹果酸最终浓度可达

参 考 文 献

- 1 胡纯铿. *L*-苹果酸产生菌黄曲霉 *Aspergillus flavus* H-98 发酵特性的研究[J]. 食品与发酵工业, 1999, 25(2): 19~22
- 2 胡纯铿. 固定化黄曲霉生产 *L*-苹果酸的研究[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 1999, 20(3): 240~245
- 3 金其荣. *L*-苹果酸产生菌的选育[J]. 无锡轻工学院学报, 1982, (创刊号): 89~97
- 4 Takao S, Hotta K. Conversion of fumaric acid fermentation to *L*-malic acid fermentation by the association of *Rhizopus arrhizus* and *Proteus vulgaris*[J]. J. Ferment. Technol., 1976, 54(4): 197~204
- 5 Takao S, Yokota A, Tanida M. *L*-Malic acid fermentation by a mixed culture of *Rhizopus arrhizus* and *Paecilomyces variotii*[J]. J. Ferment. Technol., 1983, 61(6): 643~645
- 6 蒋明珠, 白照熙, 张俊贤. 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[J]. 微生物学报, 1989, 29(2): 129~136
- 7 Yamamoto K, Tosa T, Yamashita K et al. The production of *L*-malic acid by *Brevibacterium ammoniagenes* immobilized with polyacrylamide gel[J]. Eur. J. Appl. Microbiol., 1976, (3): 169~175
- 8 Takata I, Kayashima K, Tosa T et al. Improvement of stability of fumarase activity of *Brevibacterium flavum* by immobilization with κ -carrageenan and polyethyleneimine[J]. J. Ferment. Technol., 1982, 60(5): 431~437
- 9 Yakawa H, Yamagata H, Terasawa M. Production of *L*-malic acid by the cell reusing process[J]. Process Biochemistry, 1986, 21: 164~166
- 10 胡纯铿. 细胞转化法生产 *L*-苹果酸的研究[J]. 华侨大学学报(自然科学版), 1999, 20(4): 349~353
- 11 Goodban A E, Stark J B. A method for rapid determination of *L*-malic acid[J]. Anal. Chem., 1957, 29: 283~287
- 12 北京大学生物系生物化学教研室编. 生物化学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1985. 30~31

A Study on *L*-Malic Acid Fermentation by Mixed CultureHu Chunkeng^① Wang Guochuan^②

(① College of Chem. Eng., Huaqiao Univ., 362011, Quanzhou;

② Fujian Huiquan Brewage Group Inc., Huian, 362100)

Abstract *L*-malic acid fermentation was performed by a mixed culture of strain A-23 and strain V-81. The effect of concentration of carbon source on the fermentation level of both strain A-23 and strain V-81 was investigated. The experimental results showed that strain A-23 was very capable of producing fumaric acid while strain V-81 had strong fumarase activity. On the basis of above investigation, the influence of the way for a mixed culture of strain A-23 and strain V-81 on *L*-malic acid fermentation was further studied. The result indicated that the highest *L*-malic acid yield was acquired when strain A-23 was inoculated and cultured in the mixed fermentation medium containing $150 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ glucose for 3 days, then strain V-81 was inoculated and cultured for 2 days. The concentration of *L*-malic acid reached $73.3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ while its molar conversion rate to initial glucose concentration in the medium amounted to 65.6%.

Keywords *L*-malic acid, mixed fermentation, *Rhizopus arrhizus*, *Proteus Vulgaris*