

100 L 罐中深层发酵生产 *L*-苹果酸的研究*景晓辉¹ 丁友士² 王之婉²

(1 南通工学院化工系,南通 226007) (2 南通食品工程集团公司发酵厂,南通 226001)

摘 要 报道了温特曲霉(*Aspergillus wentii* F-891)发酵 *L*-苹果酸的工艺特点,在 100 L 罐上研究了通风量、温度、pH 值及发酵培养基中富马酸浓度等因素对深层发酵富马酸生产 *L*-苹果酸的影响。确定了最佳发酵条件,其中富马酸浓度 11%,通风量 1:1.05(发酵前期)~1:1.28 v/v/m(发酵中后期),温度 30℃(发酵前期)~25℃(中后期),初始 pH 值 6.0~6.2,发酵周期 108 h 左右,富马酸平均转化率 83.52%,平均产 *L*-苹果酸 10.23%。

关键词 *L*-苹果酸,深层发酵,富马酸

L-苹果酸是一种重要的有机酸,在医药、化工和食品工业上有着广泛应用。与柠檬酸相比,*L*-苹果酸的酸味别致,调配出的食品、饮料更接近天然果汁风味,是一种优良的食品添加剂^[1]。近年来,一种以酸为底物,利用微生物菌体的富马酸酶合成 *L*-苹果酸的技术,以其产酸水平高,发酵周期短,能耗低,操作程序简单等优势引起国内外科技界的关注^[2~4]。

文中以温特曲霉为出发菌株,经⁶⁰Co 诱变后获得 1 株优良的温特曲霉 F-891,用其直接发酵富马酸生产 *L*-苹果酸,在摇瓶发酵试验的基础上,进行了 100 L 罐发酵试验研究。

1 材料与方法

1.1 主要原料与试剂

富马酸:工业级,苏州合成化工厂;NaOH:工业级;NaCl, KCl:化学纯,上海兴达化学试剂厂;NaNO₃, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O, MnSO₄·H₂O, KH₂PO₄:化学纯,上海医药集团化学试剂分公司。

1.2 菌 种

以山西省生物研究所提供的温特曲霉(*Aspergillus wentii*)为出发菌株,经⁶⁰Co 诱变选育得到温特曲霉 F-891 菌株。

1.3 培养基及培养条件

(1)斜面培养基(g/L):蛋白胨 1.6,葡萄糖 4,粗乳糖 6, KCl 0.5, NaCl 4.0, MgSO₄·7H₂O 0.3, KH₂PO₄ 0.4, FeSO₄·7H₂O 0.2, MnSO₄·H₂O 0.25, 琼脂 30, 玉米浆 1 mL, pH 自然。30℃ 培养 4 d。

第一作者 硕士 副教授。

* 中国食品协会及江苏省食品协会技术开发项目(No. 40-5-1)发酵部分

收稿时间 2004-09-08, 改回时间 2005-01-05

(2)种子培养基(g/L):豆饼粉 5,蔗糖 20, NaNO₃ 3, KH₂PO₄ 1, KCl 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.5, FeSO₄·7H₂O 0.02, pH 自然。30℃ 培养 16~24 h, 旋转式摇床 280 r/min。

(3)发酵培养基(%):富马酸 11,蔗糖 1.1,浓 H₃PO₄ 0.11,氨水 0.15, MgSO₄·7H₂O 0.1, FeCl₃ 0.07, 以 NaOH 调 pH 值至 6~7。培养条件:25~31℃, 发酵罐压力 0.10 MPa, 接种量 10%。

1.4 主要设备、仪器

100 L 发酵罐:自制, DN400 mm, 高径比 2, 搅拌器采用箭尾式, 搅拌转速 400 r/min, 电机功率 0.6 kW, 往复式摇床:DXY, 频率 1.6 Hz, 振幅 100 mm; 酸度计:PHS-25; 自动指示旋光仪:WZZ-1, 消毒器:YXQ-WF32。

1.5 分析测定方法^[5]

L-苹果酸定性测定采用纸层析法;*L*-苹果酸定量测定采用 2,7-萘二酚法;*L*-苹果酸旋光性测定:将提纯产品配制成 8.5% 水溶液, 用 WZZ-1 自动指示旋光仪按 GB613 测定;富马酸测定采用高锰酸钾滴定法, pH 值用酸度计测定。

2 结果与讨论

2.1 通风量的影响^[6]

不同通风量的发酵试验结果如图 1 所示(富马酸初始浓度 11%, 培养温度 30℃)。由图 1 可见, 发酵前期, 通风量的改变对产酸的影响很小, 虽然通风量由 1:1 提高到 1:1.3, 产酸速率依然相当缓慢, 但在进入发酵中期, 随着风量的提高, 产酸速率明显加快, 当通风量增加到 1:1.3 时, 在 48~108 h 间产酸速率几乎直线上升, 产酸峰值在 120 h。说明本菌种以富马酸为底物发酵产 *L*-苹果酸在发酵前期(0~48 h)对溶

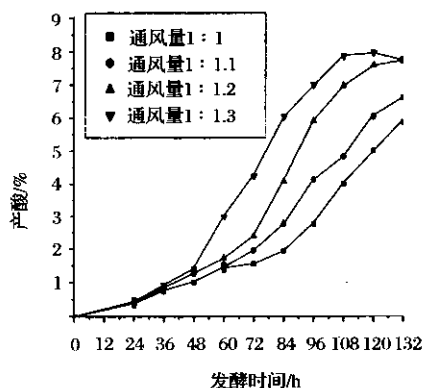


图1 通风量对产酸的影响

氧要求不高,主要是培菌过程,富马酸、L-苹果酸及 pH 值的变化均很小,这与摇瓶发酵试验结果基本吻合。进入发酵中期(48 h 以后),富马酸的浓度速率下降和 L-苹果酸产酸速率增加很快,即产酸过程中耗氧速率迅速增加,因此必须加大通风量。分别在这 2 个阶段控制不同的通风量进行试验,结果见表 1。

表1 不同通风量对发酵的影响

发酵液体积 /L	发酵前期 通风量 /v/v/m	发酵中后期 通风量 /v/v/m	产 L- 苹果酸/%	富马酸 转化率/%
50	1:1	1:1.2	7.61	64.11
50	1:1	1:1.3	8.05	67.95
50	1:1	1:1.4	7.29	61.84
65	1:1.05	1:1.3	8.43	75.11
65	1:1.2	1:1.3	7.58	70.35
65	1:1.05	1:1.28	8.77	77.87
65	1:1.05	1:1.25	8.08	74.66

由表 1 可知,通风量对富马酸的转化率的影响明显,发酵阶段对空气量的要求大于培菌阶段,发酵前期通风量应控制在 1:1.05,而进入发酵中后期要将通风量增加至 1:1.28。

2.2 恒温发酵与变温发酵

经摇瓶试验得出培养温度与发酵温度均控制在 $(30 \pm 1)^\circ\text{C}$ 为好,但在 100 L 罐试验过程中,发现 30°C 并非是整个过程的温度,在产酸速率较快的发酵产酸阶段,温度控制在 $25 \sim 26^\circ\text{C}$ 即采取变温发酵比恒温发酵的效果更好,见图 2。

由图 2 可见,进入产酸期后适当降低温度可提高产酸速率,使产酸峰值点前移,从而缩短发酵周期。同时说明温特曲霉 F-891 酶反应最佳温度为 $25 \sim 26^\circ\text{C}$ 。因此 48 h 前温度控制在 30°C ,48 h 后应降低至 $25 \sim 26^\circ\text{C}$ 。

2.3 pH 试验

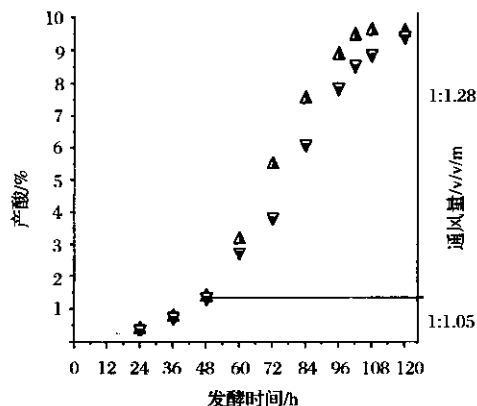


图2 温度对产酸的影响

温特曲霉摇瓶发酵的适宜 pH 为 $7^{[4]}$,但在 100 L 罐试验时却产生了菌体衰老快、发酵成熟早、时间短、富马酸转化率低、L-苹果酸产酸率低的问题。经分析认为,种子接入发酵罐后,在前期种子培养阶段菌体生长繁殖所利用的碳源主要是加进的蔗糖,当菌体繁殖到一定程度时,蔗糖基本耗尽。菌体要继续生长繁殖就必须利用富马酸,而由于富马酸在发酵液中是以钠盐形式存在,富马酸被转化后,钠离子与发酵过程中的 CO_2 生成 Na_2CO_3 ,从而使体系的 pH 值上升。菌体生长越快, pH 值上升亦越快, $\text{pH} > 7.5$ 后,温特曲霉的酶活性则受到抑制。pH 值上升越快,抑制越强,当 $\text{pH} > 8$ 后,温特曲霉菌体出现自溶,其酶活性也开始丧失,结果使转化率降低。要提高转化率,必须抑制发酵过程中 pH 的上升速度,延长适宜的 pH 保留时间。为此首先降低初始 pH 值。实验结果表明,如初始 pH 值低于 6.0,则发酵培养只长菌丝不产酸。当发酵培养基的初始 pH 值控制在 6.0~6.2 时则可以减缓发酵过程中 pH 的上升速度,但要延长适宜的 pH 保留时间还必须与降低发酵温度,加大风量结合方能收到最佳结果。见图 3。

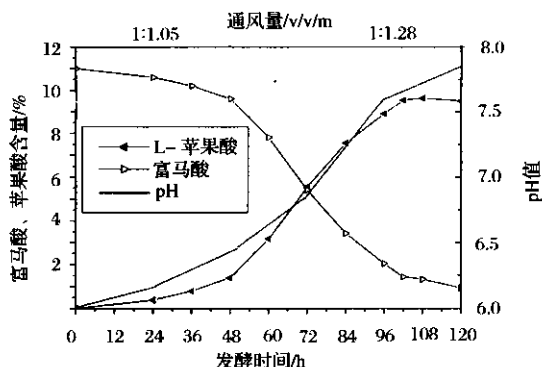


图3 发酵进程曲线

从图 3 可看出,当发酵培养 48 h 时, pH 达到

6.4 左右 ,此后进入产酸期 ,为使产酸期 pH 值控制在最佳范围 ,此时将温度由 30℃ 降低至 25~26℃ ,同时通风量增至 1:1.28 ,则可充分发挥酶的活性使产酸直线上升。由图也可见产酸高峰出现在 108 h ,因此适宜的发酵周期为 108 h 左右。

2.4 富马酸初始浓度

当发酵培养基中富马酸浓度在 8.0%~12% 范围内时 ,富马酸转化率和苹果酸产率随富马酸初始浓度逐步增加 ,浓度达到 12% 后转化率和产酸却随富马酸初始浓度的增加而下降 ,浓度超过 14% 后转化率和产酸明显下降 ,说明富马酸浓度过高对菌种有抑制作用 ,控制在 11% 左右为好。

2.5 100 L 发酵罐连续运行试验

采用经⁶⁰Co 诱变选育得到温特曲霉 F-891 菌株以富马酸为底物深层发酵 L- 苹果酸的优化工艺条件为 :富马酸初始浓度 11% ;接种量 10% ;前期发酵培养温度 30℃ ,通风量 1:1.05v/v/m ,pH 值 6.0~6.2 ;后期发酵温度 25~26℃ ,通风量 1:1.28v/v/m ,pH 值<8 ;发酵周期 96~112 h。 并进行了 8 批连续试验 ,试验结果见表 2。

3 结 语

在优化的工艺条件下 ,100 L 发酵罐连续多批次运行平均产酸达 10.23% ,富马酸平均转化率达 83.52% ,平均产酸率提高 2.3% ,平均转化率提高 3.5% ,并稳定了发酵工艺。而且应用于 1 000 L 和 50 m³ 发酵罐放大试验和实际生产 ,形成了年产 150 t

L- 苹果酸的生产规模。

表 2 100 L 发酵罐连续运行试验结果				
批号	富马酸初始浓度 / %	发酵时间 /h	产酸 / %	富马酸转化率 / %
1	11	108	9.91	80.84
2	10.4	96	9.86	83.25
3	11.2	112	11.16	85.74
4 ¹⁾	10.6	88	7.4	76.31
5	10.6	104	10.68	85.08
6	11	108	11.25	88.64
7	11	112	10.36	82.53
8	10.8	108	10.87	85.78
平均	10.83	104.5	10.23	83.52

1) 该批号试验过程中 ,后期染菌。

参 考 文 献

1 刘建军 ,姜鲁燕 ,赵祥颖等 . L- 苹果酸的应用及研究进展 [J]. 中国食品添加剂 ,2003 (3) :53~56
2 施巧琴 ,吴松刚 ,郑 腾等 . L- 苹果酸产生菌 F-871 变株合成延胡索酸酶的研究 [J]. 菌物系统 ,2003 ,22 (2) :283~288
3 Peleg Y ,Rokem Js ,Goldberg I. A simple Plate-assay for the screening of L- malic acid producing microorganisms [J]. FEMS Microbiology Letter ,1990 ,67 :233~236
4 谢 红 ,高润香 ,孙文敬等 . 温特曲霉转富马酸为 L- 苹果酸的初步研究 [J]. 菌物系统 ,2000 ,20 (1) :11~14
5 南通发酵厂 . 食品添加剂 L- 苹果酸产品企业标准 Q/ 320601
6 周小燕 ,陈素云 ,吴清平等 . 通气条件对曲霉 N1-14' 产生 L- 苹果酸的影响 [J]. 食品与发酵工业 ,2000 ,26 (1) :11~14

L- Malic Acid Fermentation by Submerged Culture
Method in 100L Fermentor

Jing Xiaohui¹ Ding Youtu² Wang Zhiwan²

1(Department of Chemical Engineering ,Nantong University ,Nantong ,226007 ,China)

2(Ferment Factory of Nantong Food Engineering Group Company ,Nantong ,226001 ,China)

ABSTRACT In this paper , strain F-891 , which could convert fumaric acid to L- malic acid , was used to produce L- malic acid. The effects of fermentation factors on the production of L- malic acid in 100 L fermentor were investigated and the optimum conditions were obtained. The optimum conditions were : concentration of fumaric acid 11% ; air velocity (v/v/m) 1:1.05 (0~48h) and 1:1.28 (48~108 h) ; original pH 6.0~6.2 ; temperature 30℃ (0~48h) and 25℃ (48~108h) ; fermentation period 108 hours. Our results showed that under optimum conditions the average conversion rate of fumaric acid was 83.52% and L- malic acid yield was 10.23% .

Key words L- malic Acid , submerged culture , fumaric acid