

我国 D-异抗坏血酸钠的研究和生产现状

孙文敬 白照熙 谢红 蒋明珠

(山西省生物研究所,太原)

D-异抗坏血酸钠是一种广泛使用的食品抗氧化剂和防腐助色剂。国外在 50 年代末就开始用间接发酵法生产 D-异抗坏血酸钠,我国在 80 年代初才开展这方面的研究^[1]。1984 年,国内采用间接发酵法大规模生产此产品。我国的 D-异抗坏血酸钠工业起步较晚,但发展迅速。到目前为止,我国已有六、七个厂家生产此产品,形成了约 600 吨的年生产能力,除满足国内市场需求外,还大量出口美国、加拿大、日本、澳大利亚和西欧。

间接发酵法生产 D-异抗坏血酸钠,首先是由细菌发酵 D-葡萄糖产生 2-酮基-D-葡萄糖酸(以下简称 2KG),然后经化学合成和精制等过程而得成品。本文主要介绍国内 D-异抗坏血酸钠研究和生产现状,同时也介绍国外这方面的一些情况。

(一) 2KG 发酵

1. 菌种: 1940 年,Stubbs 等^[2]从 5-酮基-D-葡萄糖酸发酵液中分离出一株食爬虫假单胞菌(*Pseudomonas reptilivora*),它是一株 2KG 高产菌株,对葡萄糖的转化率可达 82%。此后,各国学者报道了许多具有产生 2KG 能力的菌株,它们分属于假单胞菌属^[3]、欧文氏菌属(*Erwinia*)^[4]、沙雷氏菌属(*Serratia*)^[5]、葡糖杆菌属(*Glucanobacter*)^[6]和醋杆菌属(*Acetobacter*)^[7]。国外优良的 2KG 生产菌株主要为荧光假单胞菌(*Ps. fluorescens*)^[3]、粘质沙雷氏菌(*S. marcescens*)^[5]和鸡血藤欧文氏菌(*E. millisia*)^[4]等。投糖 18%,粘质沙雷氏菌对糖的转化率可达 95%以上;投糖 24%,转化率为 85—90%。

国内优良的 2KG 产生菌有如下几种:球状节杆菌(*Arthrobacter globiformis*) K1022^[8]、恶臭假单胞菌(*Ps. putida*) E301^[9]、产酮产碱菌(*Alcaligenes ketogenes*) E54^[10]和荧光假单胞菌 K1005^[11]等。这些菌株均是未经诱变处理的野生型菌株,产酸稳定。发酵培养基中葡萄糖浓度为 16—20% 时,这些菌株对糖的克分子转化率一般可达 90% 以上。目前国内工厂大生产上使用的菌株为经过毒理试验的荧光假单胞菌 K1005 和球状节杆菌 K1022。

中试结果表明,投糖浓度为 18% 左右时,荧光假单胞菌 K1005 对糖的克分子转化率波动不大,平均可达 91.7%。该菌活性稳定,对糖的转化率高^[11]。西安制药厂和南京制药厂的生产性试验结果表明,采用

球状节杆菌 K1022,投糖浓度 18%,发酵周期 30 小时,2KG 对糖的克分子转化率可达 80.7%;发酵周期 61 小时,克分子转化率为 89.5%^[12]。目前,西安制药厂和南京制药厂交叉使用荧光假单胞菌 K1005 和球状节杆菌 K1022。安徽朝阳制药厂、湖南安乡食品添加剂厂、浙江湖州食品添加剂厂和连云港酶制剂厂在生产上使用荧光假单胞菌,它们的发酵转化率稳定在 80—90% 之间。

2. 发酵:不同的 2KG 产生菌对碳源的利用情况不同,但它们大多能够较好地利用葡萄糖或葡萄糖酸钙产生 2KG。在工业生产中,国内外厂家一般使用葡萄糖作碳源。国内使用工业葡萄糖作碳源的厂家有:西安制药厂、南京制药厂和安徽朝阳制药厂等。湖州食品添加剂厂和安乡食品添加剂厂等采用大米粉糖化液代替葡萄糖作碳源。大米粉糖化采用双酶水解法,其糖化收率可达 95—98%。

2KG 发酵时,投糖浓度一般控制在 16—20% 之间,并用 CaCO₃ 中和由其转化形成的酸。投糖浓度过高,发酵周期延长,对糖的转化率降低。Nunheimer 等^[11]报道,在 2KG 发酵中如果不用 CaCO₃ 中和 2KG,而用氨控制发酵液的 pH,就可达到提高投糖浓度,缩短发酵周期的目的。发酵起始葡萄糖浓度不少于 13%,一般采用 18—22%。接种后,细菌大量生长,再可加入葡萄糖,浓度可高达 30%,而发酵转化率不会受到影响。发酵过程中,pH 从 6.5 降至 5.5 左右时,通氨保持 pH 在 5.2—5.8 之间。通氨最好使用气体氨,因为它进入培养基底层后,产生的气泡很容易分散到整个发酵培养基中。

玉米浆、酵母膏、蛋白胨、聚脲、尿素、KNO₃、NaNO₃、(NH₄)₂SO₄ 和 NH₄NO₃ 等均可作为氮源,但生产上一般采用酵母膏、玉米浆、(NH₄)₂SO₄ 和尿素等。

2KG 产生菌一般要求较大的通气量,其发酵培养基的起始 pH 大多控制在 6.7—7.0 之间。金属离子特别是铁、铜离子对 2KG 产生菌一般无明显影响。

在已报道的 2KG 生产菌株中,绝大多数的发酵温度控制在 28—30℃。发酵温度过低,发酵周期明显延长;发酵温度过高,产物对糖的转化率降低^[13]。国内绝大多数厂家把发酵温度控制在 28—30℃ 之间,产物对糖的转化率达 90% 左右,发酵周期 60 小时左右。

南京制药厂控制发酵温度在 30—35℃ 之间,其发酵转化率较低,一般可达 80% 左右,但其发酵周期较短(约 30 小时),从经济角度考虑,还是比较合算的。

实验结果表明,无论是国内的荧光假单胞菌 K1005、球状节杆菌 K1022、产酮产碱菌 E54,还是国外的鸡血藤欧文氏菌、假单胞菌 NRRL B-334 等,它们的发酵过程基本相同^[6,13~16]。随着葡萄糖的消耗,发酵液的旋光值由正值转向负值,2KG 逐渐积累,葡萄糖消耗殆尽,2KG 的量达到了最高峰。发酵前期,发酵液的 pH 值明显下降;随着发酵的继续,pH 值略有回升,并逐渐趋于稳定。工厂大生产也证明,荧光假单胞菌 K1005 和球状节杆菌 K1022 的发酵过程基本相同。

值得注意的是,国外在 2KG 发酵工艺改进方面进行了较多的研究。除采用通氨法提高发酵投糖浓度外,还有人^[17]用“部分细胞再循环”(partial cell recycle)来促进 2KG 的形成,即通过一个细胞再循环装置,连续而又自动地从发酵罐的流出液中,以一定比例回收菌体细胞,并使细胞返回到发酵罐中。在发酵过程中,产物形成速率与微生物形成速率、浓度及其生理特性直接相关。“部分细胞再循环”增加了菌体的浓度,因而比一般发酵罐中的产物形成速率要快。虽然该工艺尚处于实验阶段,但有工业化的可能。

(二) 产物提取及其化学转化

细菌发酵产生的 2KG,因多采用 CaCO₃ 中和,所以在发酵液中常以钙盐的形式(即 2KGCa)存在。间接发酵法生产 D-异抗坏血酸钠,其发酵产物的提取和化学转化大致有如下两条不同的工艺路线:

1. 旧工艺:首先从发酵液中提取出 2KGCa 结晶,然后以此为前体加酸和甲醇进行酯化,所得甲酯溶解在甲醇中后,加碱性甲醇转化得 D-异抗坏血酸钠盐粗品,粗品经精制得其成品。

2KGCa 结晶的提取,首先是将发酵液提温,板框压滤(或离心)得到含有 2KGCa 的滤液,然后减压浓缩至一定体积,冷冻处理,甩滤即可得到 2KGCa 结晶^[11]。国外 2KGCa 的提取与此基本相同。

许多学者曾对此工艺酯化反应的条件进行了深入的研究。从国外的报道来看,HNO₃^[18]、H₂SO₄^[19]或 HClO₄^[20]存在的条件下,甲醇对 2KG 的酯化效果无明显差异,酯化收率均在 70% 以上;而国内研究结果表明,在酯化反应中,使用 HNO₃ 明显好于使用 H₂SO₄^[11]。鉴于此,国内采用旧工艺生产时,通常是以 HNO₃ 进行酯化反应的。

甲酯的转化反应一般采用如下两种方法:一是碳酸氢钠转化法,即甲酯在甲醇中溶解后,再加入碳酸氢钠甲醇液进行转化。另外一种方法是氢氧化钠转化法,即在甲酯中加入氢氧化钠甲醇液进行转化。研究结果表明,用氢氧化钠进行转化,无论是粗钠盐的收率

还是粗钠盐的质量,均优于使用碳酸氢钠^[21]。目前国内外生产中普遍采用氢氧化钠转化法。

近藤修^[20]报道,在 HNO₃ 存在条件下酯化,所得甲酯中检不出 Ca⁺⁺。但林耀辉等^[11]研究结果表明,所得甲酯中仍有微量 Ca⁺⁺ 存在。转化反应后,采用简单的溶解、脱色和结晶的精制方法,成品澄明度难予合格。为使成品澄明度合格,国内研究人员在精制时采用加草酸铵的方法除去 Ca⁺⁺。

中试结果表明,采用旧工艺,钙盐提取收率可达 75.8%;酯化收率可达 75.9%;转化收率为 83.0%;精制收率为 83.3%;产品对糖的克分子总收率可达 36.5%^[11]。目前国内采用旧工艺的厂家有:湖州食品添加剂厂、安乡食品添加剂厂和连云港酶制剂厂等。

从国内的生产中可以看出,旧工艺有其明显的优点即对设备的要求较为粗放,但它也存在着若干缺陷:首先是发酵液过滤困难且损失较大;其次是 2KGCa 提取收率低,一般只有 75% 左右,大大影响了产品对糖的总收率;第三是采用 HNO₃ 酯化所得甲酯质量较差,对其后的转化和精制收率影响较大。此外,由于在酯化反应中 HNO₃ 用量较大,HNO₃ 为强氧化剂,产品为还原剂,产品中稍有 HNO₃ 残留,就会引起产品变黄,使产品质量难以得到保证。

Hathaway^[22]曾对此工艺进行过改进,即提取出 2KGCa 后,加浓 H₂SO₄ 过滤除去 CaSO₄ 沉淀,浓缩滤液,加甲醇和浓 H₂SO₄ 酯化,但在生产中使用这种方法并未取得较好的结果。

2. 新工艺:所谓新工艺即不提取出 2KGCa,而是采取净化发酵液的方法除去 2KGCa 中的 Ca⁺⁺。净化发酵液经浓缩得糊状的 2KG,然后直接加甲醇和少量 H₂SO₄ 进行酯化,其它步骤与旧工艺基本相同。

Jaffe 等^[23]用 H₂SO₄ 处理发酵液,沉淀出 85—97% 的 Ca⁺⁺,其滤液用活性炭处理,通过离子交换树脂得 2KG 水溶液。减压浓缩此溶液至含水量为 19—30% 时,加甲醇且在惰性气体如 N₂ 保护的条件下进行酯化,酯化收率可达 90% 以上。国内新工艺与此基本相同,但也存在着一些差异:一是国内在净化发酵液时采用了更为简便的方法;其次是酯化反应在惰性气体保护的条件下进行,酯化时要加入少量 H₂SO₄^[24,25]。这种工艺的生产性试验结果见表 1。目前国内采用新工艺的厂家有:西安制药厂、南京制药厂和安徽朝阳制药厂。

新工艺采用净化发酵液的方法,从根本上解决了发酵液难以过滤的问题,同时简化了生物步骤;净化发酵液的方法减少了 2KG 的损失,提高了产品对糖的总收率;采用 H₂SO₄ 酯化所得甲酯质量较好,使转化和精制收率得到提高;由于在酯化反应中 H₂SO₄ 用量很少,减小了酸对设备的腐蚀,且保证了产品质量^[22]。

采用通氨法进行高糖发酵时,发酵液中的 2KG 以

表 1 新工艺生产性试验结果^[23]

收率(%)	厂家	西安制药厂		南京制药厂	
	菌株	球状节杆菌 K1022	荧光假单胞菌 K1005	球状节杆菌 K1022	荧光假单胞菌 K1005
发酵转化率		89.9	92.0	79.9	77.5
酸化收率		83.5	96.6	96.6	94.7
酯化收率		76.1	68.0	82.1	78.6
转化率		88.5	86.7	87.3	86.5
精制收率		90.0	90.0	88.0	86.5
产品对糖的克分子总收率		45.2	47.1	48.7	43.1

铵盐形式存在。发酵完毕,将发酵液过滤,除去菌体和其它杂质,过阳离子交换树脂脱铵,得 2KG 水溶液。减压浓缩至比重 1.3 左右时,可直接加酸和甲醇进行酯化反应^[23]。

(三) 生产中尚待解决的问题

我们认为国内 D-异抗坏血酸钠工业生产中存在着如下几个尚待解决的问题:

1. 发酵投糖浓度低: 与国外相比,我国 2KG 发酵的投糖浓度较低,一般不超过 20%,而国外系采用通氮控制发酵液 pH 值的方法使投糖浓度可达 30% 以上。国内生产 D-异抗坏血酸钠的能耗较高,它在生产成本中占有相当大的比例,采用高糖发酵,无疑会减小能耗,降低生产成本。

2. 酯化收率较低: 与国外先进水平相比,国内酯化反应的收率较低。其原因可能是,酯化反应所需的条件尚未得到较好满足,有待解决。

3. 生产能力小: 随着食品工业的迅速发展,D-异抗坏血酸钠的需求量愈来愈大。目前,国内市场逐渐打开,国外市场供不应求,而我国现有的六、七个厂家,规模均为年产 50—100 吨左右,全国总的生产能力仅 600 多吨,远远不能满足国内外市场的需要,所以有必要扩大其生产能力。此外,生产能力的扩大有助于生产成本的降低。目前国内生产成本较高,其中车间经费和企业管理费占有一定比例,扩大生产能力可降低单位产品的车间经费和企业管理费。

此外,还应加快进行旧工艺的技术改造工作。只有这样,我国才能真正形成 600 多吨的年生产能力,并随着生产能力的扩大,将成为食品添加剂 D-异抗坏血酸钠的生产大国之一。

参 考 文 献

1. 蒋明珠等: 微生物学通报, 10(3): 103—106, 1983.
2. Stubbs JJ et al.: *Ind. Eng. Chem.*, 32(12): 1626—1631, 1940.
3. Nunheimer TD et al.: U.S. Patent, 3, 255, 093, 1966.
4. Suzuki Y and K Uchida: *Agr. Biol. Chem.*, 29(5): 456—461, 1965.
5. Misenheimer TJ et al.: *Appl. Microbiol.*, 13(3): 393—396, 1965.
6. Asai T and Y Ikeda: *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, 22: 50, 1948.
7. Kulka D and T K Walkew: *Arch. Biochem. Biophys.*, 50: 169, 1954.
8. 白照熙, 蒋明珠: 食品与发酵工业, 3: 46—49, 1984.
9. 梁改芹等: 微生物学通报, 14(6): 246—249, 1987.
10. 尹光琳等: 微生物学报, 28(1): 6—11, 1988.
11. 林耀辉等: 食品与发酵工业, 4: 18—24, 1985.
12. 孙文敬等: 微生物学通报, 15(6): 282, 1983.
13. 蒋明珠等: 微生物学通报, 11(3): 105—107, 1984.
14. 蒋明珠等: 食品与发酵工业, 5: 33—38, 1984.
15. 曹桂芳等: 微生物学通报, 15(1): 7—11, 1983.
16. Preifer VF et al.: *Ind. Eng. Chem.*, 50: 1009—1012, 1958.
17. Bull DN: *Biotechnol. Bioeng.*, 23: 373—389, 1981.
18. 小原正郎: 特许公报, 昭 38-22562, 1963.
19. Matsui M et al.: *Agr. Biol. Chem.*, 27 (3): 185, 1963.
20. 近藤修: 特许公报, 昭 47-7247, 1972.
21. 白增梅等: 生物研究通报, 2(1): 24—27, 1984.
22. Hathaway RJ: U.S. Patent, 2, 918, 492, 1959.
23. Jaffe GM et al.: U.S. Patent, 3, 381, 027, 1968.
24. 张俊贤等: 生物研究通报, 2(3): 42—47, 1984.
25. 蒋明珠等: 食品与发酵工业, 待发表。