

黄曲霉发酵薯干粉水解液生产 L-苹果酸

令其荣 许赣荣 包惠燕 吴燕萍

(无锡轻工大学生物工程系, 无锡 214036)

摘要 经选育和诱变得一株产苹果酸的黄曲霉菌 TH5007, 通过发酵条件的优化, 以薯干粉的水解液为主要原料, 发酵 5d L-苹果酸可达到 6% 左右。在总酸中苹果酸含量平均达 72% 以上, 杂有机酸主要是柠檬酸, 延胡索酸的含量在 0.02% 以下。补糖发酵比分批发酵产酸性能更佳。

关键词 L-苹果酸, 直接发酵, 黄曲霉菌, 薯干粉

从 50 年代末期开始, 一些国家进行了直接发酵法生产 L-苹果酸的研究^[1-4]。但采用直接发酵法大规模生产 L-苹果酸在国内外都尚未见报道。我们从 1981 年开始研究黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 的 L-苹果酸发酵^[5], 近年来, 对菌种筛选, 诱变及发酵工艺条件的优化作了大量的工作, 摇瓶发酵总酸最高可达 9% 以上, 总酸中苹果酸含量达 72% 以上, 苹果酸一般可达 6% 左右。转化率 60% 左右(重量比)。本生产工艺的最大特点在于可利用较粗放的发酵原料甘薯(山芋干), 经液化后, 利用菌种本身所具有的糖化酶, 无需经过糖化工序也可直接用于发酵。

1 材料与方法

1.1 菌种

出发菌株: 黄曲霉 T2803, 经 γ 射线处理, DES 诱变处理, 然后再经这两种方法的联合处理, 最后再经 NTG 诱变处理。得到一产酸较为稳定的菌株 TH5007。

1.2 培养基(%)

平板分离培养基: NaNO_3 0.3, K_2PO_4 0.1, KCl 0.05, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.001, 蔗糖 3.0, 琼脂 2, 自然 pH。为确保单菌落, 可加 0.1% 的 OP 乳化剂, 以限制菌落的大小。

生孢子培养基: 葡萄糖 0.4, 乳糖 0.6, 甘油 1, 尿素 0.06, 蛋白胨 0.16, 玉米浆 0.1, K_2PO_4 0.04, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.025, 以及其它无机离子, 琼脂 2, 自然 pH。

制霉菌素平板: 在上述平板培养基中, 加入含制霉菌素的 75% 乙醇溶液。麸曲培养基: 麸皮, 经 60 目过筛, 加水适量, 装三角瓶, 灭菌条件: 0.1MPa, 30min。

发酵培养基: 一是用葡萄糖为碳源, 另一是以山芋干粉为原料, 经 α -淀粉酶液化至碘色反应合格, 过滤取液化液。再配以适量的无机盐和豆饼粉。补加糖则用 CP 级葡萄糖。碳酸钙另外灭菌, 接种前与培养基混合。

1.3 分析方法

总酸测定: 采用酸碱滴定法。先用与碳酸钙当量的硫酸使碳酸钙中和, 使苹果酸游离出来, 加热处理 10min, 用蒸馏水恢复原体积, 过滤, 取滤液进行酸碱滴定。

苹果酸测定: 高压液相色谱法。仪器: HP1050, HPLC; 操作条件: 碳 18 柱, $100 \times 4.6\text{mm}$, 流动相: 0.5% 磷酸二氢铵, pH, 2.5, 流速 1ml/min。紫外线波长 214nm, 衰减: 2。以色谱纯苹果酸作为对照。

其它有机酸的定性及定量测定, 也采用高压液相色谱法。方法同上。

残糖测定: 采用 DNS 比色法。

菌体量的测定: 采用相对值, 即将发酵液恢复原体积后, 吸取 10ml, 3000r/min, 离心 10min, 观察沉淀的菌体体积。

1994-12-20 收稿

2 结果

2.1 菌种诱变前后产酸性能的比较

原出发菌株 T2803 产酸为 2.5%，经诱变复筛，得到产酸稳定在 4.5% 以上的一批菌株，最后确定 TH4100 产酸性能较好，经反复纯化得到一高产菌株 TH5007，经 10 批传代实验，产酸均高于 4.8%，以总酸计平均达 4.84%，经高压液相色谱检测，TH5007 不仅比原出发菌株的总酸高，且苹果酸含量也相应提高。

表 1 不同氮源及其浓度对产酸及菌体量的影响

氮源浓度 (%)	NH ₄ Cl			尿 素				(NH ₄) ₂ SO ₄			豆 饼 粉		
	0.05	0.10	0.15	0.02	0.06	0.10	0.20	0.06	0.10	0.20	0.25	0.50	1.0
产酸(%)	2.8	3.2	2.9	2.6	3.4	3.8	1.8	3.3	3.6	3.8	4.2	4.7	3.8
菌体量 (ml)	2.5	2.3	2.4	1.2	1.4	1.7	1.9	1.3	1.7	1.9	1.9	2.2	2.3
残糖(%)	2.4	2.0	2.4	2.3	1.8	1.5	2.5	1.4	1.3	1.9	0.6	0.5	0.4

7.0% 左右。

2.2.2 玉米粉用量对产酸的影响：实验结果表明，在培养基中加入少量的玉米粉对产酸具有促进作用。玉米粉用量的试验范围为 1.0%—2.0%，考虑到玉米粉中含有的淀粉量与山芋粉中的淀粉含量相当，故加入玉米粉时，相应扣除山芋粉的用量。当玉米粉用量为 1.0% 和 1.5% 时，发酵液中总酸均为 5.0%，玉米粉用量为 2.0% 时，总酸为 5.1%。故玉米粉用量以 1.0%—1.5% 为宜。低于 0.5%，总酸有较明显的下降。

2.2.3 碳源种类及补糖对产酸的影响：经试验，TH5007 对大多数碳源均能利用（数据未列出）。从降低生产成本的角度出发，我们尤其重视薯干粉液化醪的直接发酵。该菌具有一定的糖化酶系，故薯干粉只需经过液化，而无需经过糖化也可直接发酵。在摇瓶实验中我们研究了分批发酵法和补加糖发酵法对产酸的影响。

在总糖浓度一定时，使用葡萄糖时，比用薯干粉液化醪作碳源时产酸要高（数据未列出）。进一步试验，发现补糖时间对于提高产酸有一定的关系。当总糖（葡萄糖）都为 13%，初糖为 10% 时，以发酵 72h 补糖时的产酸及转化率最

2.2 发酵工艺条件

2.2.1 氮源及其浓度对产酸的影响：在被试的无机氮源中，NaNO₃ 和 NH₄NO₃ 不利于产酸，其余几种氮源对发酵产酸试验的结果见表 1c。试验结果表明，在蛋白胨、牛肉膏、豆饼粉等有机氮源中，用量均为 0.5%，豆饼粉是效果较好，且较为经济的氮源。为进一步证实豆饼粉用量对产酸的影响，经过进一步实验，在其它条件也加以改变的情况下，豆饼粉的用量为 0.3%—0.5% 之间时产酸最为理想，发酵液中总酸达

高（分别为 7.33% 及 63.51%）。这说明即使是采用葡萄糖，其初始浓度太高对产酸也不利。应采用补糖法。

在以薯干粉液化醪分批发酵时，初糖浓度分别为(%)：6.5, 7.8, 9.7, 11.7, 13，不补加糖，也发现初糖浓度为 9.7% 的产酸最高，转化率也较理想 (76.3%)。初糖浓度最低时，产酸最低 (5.1%)，但转化率最高，达 78.5%，初糖浓度最高者不仅产酸较低 (5.3%)，而且转化率最低，仅 40.8%。

当薯干粉液化醪初始浓度不同，并在发酵后 72h 补加葡萄糖使总糖都达到 13% 时，发现初料浓度越低者的产酸最高，且转化率最高。这里有两种可能，其一是初糖浓度低，对提高产酸有利；其二因补加的糖是葡萄糖，较适合于菌体发酵产酸。

通过试验还发现，以薯干粉液化醪配制初

表 2 补糖时间与产酸的关系

补加糖时间 (h)	0	24	48	72	96
产酸(%)	5.28	6.68	6.39	7.33	6.97
残糖(%)	ND	0.84	0.76	ND	0.70

注：总糖为 13%；ND：未测定

始培养基,并补加蔗糖时,菌体生长不正常,发酵液呈灰黑色,发酵终了,产酸也不高。

2.2.4 碳酸钙用量: 碳酸钙作为中和剂,使发酵生成的苹果酸及时被中和生成苹果酸钙。经对比试验,碳酸钙用量在6%—8%时,产酸可达到峰值,超过8.0%时,对产酸无促进效果。

2.2.5 无机盐对产酸及杂酸含量的影响: 薯干粉含有丰富的无机离子,但由于不同批次质量相差较大,所含的无机离子的种类及含量都会有一定的波动,故在试验中没有进行定性及定量分析。考察无机离子对产酸的影响时,主要是对培养基中再加入的这部份无机盐。经实验,发现 K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $FeSO_4$, $MgSO_4$, $MnSO_4$ 等对产酸及苹果酸的含量有一定的影响(数据未列出)。根据无机盐单项试验和正交试验并结合高压液相色谱分析结果,有关的初步结论如下:

KH_2PO_4 及 K_2HPO_4 : 磷酸盐浓度在0.015%—0.02%之间时,0.015%时效果最好,进一步再降低磷酸盐浓度,色谱图的出峰也表明,培养基加入的磷酸盐越多,最终发酵液中残留的磷酸盐也越多,反而对提取不利。

$MnSO_4$: $MnSO_4$ 的添加量在0, 0.004%及0.01%时,发现不加锰盐时,产酸明显减少。而以0.004%时产酸效果较佳($FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 用量在0.03—0.07%之间)。

$FeSO_4$: 当添加的 $MnSO_4$ 为0.004%时,改变 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 的用量,情况则较为复杂。当 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 的用量从0增至0.03%时,产酸有所下降,杂酸(柠檬酸)有所增加,当继续增至0.07%时,产酸增加,且杂酸浓度降低。再增加 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 的用量,则产酸下降。当加量为0.1%左右时发酵液中苹果酸的纯度较高,产酸也较为理想。

经过无机盐正交试验,初步选定无机盐的配比为:

KH_2PO_4 及 K_2HPO_4 : 分别为0.015%; $MnSO_4$: 0.004%; $FeSO_4$: 0.07%; $MgSO_4$: 0.01%。

在所试验的无机盐种类及其含量范围内,色谱分析结果表明: 发酵液中延胡索酸的含量

可以得到有效的控制。含量都在0.02%以下。这个浓度对产品的质量没有显著影响。苹果酸含量在72%以上。杂酸中主要成分是柠檬酸。在总酸中最高达20%,在发酵液中还有一些杂酸未加以定性。

2.2.6 通风量对产酸的影响: 主要考察了500ml三角瓶中装液量和摇床转速对产酸的影响。实验结果表明,当装液量在50—120ml之间,产酸可稳定在较高水平;当装液量小于50ml或大于120ml,产酸水平下降。当转速较低时,菌丝集结成球,附在瓶底成一圆盘状,产酸较低。当转速在250—300r/min时,产酸较高。我们还观察了在一个发酵周期中,改变摇瓶机的转速时,产酸曲线的变化。发酵36h,调低转速,产酸速率开始下降,发酵96h后,再调高转速,产酸速率则有明显上升。这说明溶氧对产酸有较大的影响。

3 讨论

我国甘薯原料较为丰富,价格便宜,是生产L-苹果酸的首选原料。发酵培养基中所添加的其它成分种类较少,含量也不高,生产成本较低,且甘薯粉液化后过滤的渣子可生产饲料酵母,可进一步降低生产成本。该菌种产酸的最佳碳源是葡萄糖。但是在发酵过程中,以葡萄糖为唯一碳源,初糖浓度高时,产酸及转化率均较低。以薯干粉液化醪为唯一碳源,初始浓度高也有同样的结果。说明初糖浓度高都不利于菌体产酸的代谢途径。在生产过程中,可以考虑初始培养基用一部分薯干粉液化醪配制,液化醪中实际上含有一定量的葡萄糖(浓度较低,正适合初期糖浓度应较低的情况)及未完全糖化的糊精,这部分糊精可随着菌体的生长被菌体所分泌的酶分解而被利用。长菌阶段结束后,再将一部分薯干粉液化醪再适当进行糖化(如加少量糖化酶)后再补加到发酵液中。这还需进一步试验其效果如何。如有必要,也可考虑补加玉米粉液化并糖化的葡萄糖浓缩液或工业葡萄糖。这样就可以在长菌阶段,控制较低的葡萄糖含量;而在产酸阶段,补加葡萄糖,使之

发酵成苹果酸。

直接发酵法的另一要求是发酵液中杂酸的含量应尽可能低,这不仅直接关系到 L-苹果酸的转化率,而且对后提取产品的纯度有较大的影响。经过对发酵液的多次高压液相色谱分析,在总酸中,苹果酸含量在 69.41%—74.41% 之间,平均 72.07% (九批平均值)。杂酸中最多的可能是柠檬酸,最高时可达总酸的 21.0%。为使杂酸含量尽可能降低,除了在菌种筛选方面要做必要的工作外,也应控制发酵条件。其中培养基中的无机离子的种类和含量对于杂酸的控制,可能有较大的影响,但这方面的工作仍

需进一步考察。

参 考 文 献

- [1] Abe S, Furuya A, Saito T, *et al.* Methods of producing L-malic acid by fermentation, U. S. Patent: 3, 063, 910, 1962.
- [2] Fabrizio F G, Antonio F, Pietrino D, *et al.* Applied Microbiol Biotechnol, 1984, 19: 427—429.
- [3] Emil B, Yoav P, Amir B, *et al.* Biotech and bioeng, 1991, 37: 1108—1116.
- [4] Saisamorn Lumyong, Atsushi Yokota, Fusao Tomita. 日本农芸化学会年会大会讲演要目, 1992, 66(3): 381.
- [5] 金其荣, 张楚民, 魏炜, 等. 无锡轻工业学院学报, 1982 年创刊号, 89.

USING SWEET POTATO POWDER HYDROLYSATE FOR DIRECT FERMENTATION OF L-MALIC ACID BY *ASPERGILLUS FLAVUS*

Jin Qirong Xu Ganrong Bao Huiyan Wu Yanping

(Department of Biotechnology, Wuxi Institute of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract A strain of *Aspergillus flavus* TH5007 producing L-malic acid was isolated and selected after a series of subsequent mutation. Various fermentation conditions were studied to obtain process optimization, characterized by the direct fermentation with the hydrolysate from sweet potato powder. The concentration of L-malic acid in the fermented broth can reached to about 6.0%. Among the total acids in the fermentation broth, The content of malic acid amounts to above 72%. Citric acid predominated in the other organic acids than malic acid. The content of fumaric acid can be controlled below 0.02%. Production of L-malic acid with the fed-batch process is better than that with the batch process.

Key words L-Malic acid, Direct fermentation process, *Aspergillus flavus*, Sweet potato