



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103627738 B

(45) 授权公告日 2015. 07. 15

(21) 申请号 201310630635. 5

(22) 申请日 2013. 12. 02

(73) 专利权人 山东阜丰发酵有限公司

地址 276600 山东省临沂市莒南县城隆山路
北段

(72) 发明人 李德衡 严纪文 李树标 刘建阳
张文丽 贾召鹏 鲁守斌

(51) Int. Cl.

C12P 7/46(2006. 01)

C12R 1/67(2006. 01)

C12R 1/69(2006. 01)

(56) 对比文件

US 3063910 B, 1962. 11. 13,

CN 102618589 A, 2012. 08. 01,

CN 101255450 A, 2008. 09. 03,

CN 1597923 A, 2005. 03. 23,

刘建军 等. 糖质原料直接发酵生产 L- 苹果
酸的工艺条件. 《食品与发酵工业》. 2005, (第 1
期),

田三德 等. L- 苹果酸一步发酵法的工艺研
究及浅析. 《食品科技》. 2008, (第 6 期),

王国川 等. 混合培养发酵 L- 苹果酸的研
究. 《华侨大学学报(自然科学版)》. 2000, 第 21
卷(第 1 期), 76-79.

审查员 高雅

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种直接发酵法生产 L- 苹果酸的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种直接发酵法生产 L- 苹果
酸的方法, 以霉菌为出发菌株, 葡萄糖为主要生
产原料, 添加一定量的碳酸钙和有机无机混合氮
源, 通过摇床培养考察生产 L- 苹果酸的发酵条
件. 通过对发酵菌株、发酵温度、培养基初始 pH、
转速和接种量等参数的优化, 其产酸水平最高可
达 150. 3g/L. 其具有广阔的应用前景。

1. 一种直接发酵法生产 L- 苹果酸的方法, 其特征在于, 将霉菌混合菌液按照 10% 的体积比的接种量接入种子罐中进行培养, 温度 34℃, 转速为 180r/min, 培养 16 小时得到液体 A, 其中, 种子罐的培养基组分为: 蔗糖 3g, NaNO_3 0.2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02g, MgSO_4 0.02g, KH_2PO_4 0.1g, pH 值 6.0; 然后按照液体 A : 发酵罐培养基为 1 : 10 的体积比例转入发酵罐中培养, 温度 34℃, 培养 6d, 所述发酵罐培养基组分为: 葡萄糖 80g/L, 加玉米浆 10g/L, 碳酸钙 75g/L, KH_2PO_4 0.1g/L, K_2HPO_4 0.1g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L, MgSO_4 2 g/L, NaCl 0.2g/L, pH 值 6.0;

所述霉菌混合菌液为: 米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 和黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 两种菌液体积比为 3 : 1, 两种菌液中菌体的浓度均为 $1 \times 10^8 \text{CFU/mL}$;

所述米曲霉为米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) ACCC30584, 所述黄曲霉为黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) ATCC13697。

一种直接发酵法生产 L- 苹果酸的方法

[0001] 技术领域 本发明属于微生物发酵技术领域,具体涉及一种直接发酵法生产 L- 苹果酸的方法。

背景技术

[0002] 苹果酸,又名羟基丁二酸、羟基琥珀酸或 1- 羟基乙烷二羧酸,分子式为 $C_4H_6O_5$,分子量 134.09,结构式为 $HOOCH(OH)CH_2COOH$ 。苹果酸具有右旋(D- 型)和左旋(L- 型)两种旋光异构体及 DL- 型外消旋体三种型式产品。其中 L- 苹果酸,广泛存在于生物体中,作为三羧酸循环的一员参与细胞代谢;D- 苹果酸人体不易代谢,吸入或吞咽其对人体有害,作为手性合成的手性源,可以合成许多重要的有机化合物;等量 L- 苹果酸和 D- 苹果酸的混合物为外消旋 DL- 苹果酸,在化学工业方面用途广泛。

[0003] L- 苹果酸是天然果酸的重要组成部分,广泛存在于自然界蔬菜和其它水果中,其呈味作用明显,酸味持久柔和、风味别致、解渴爽口、性质稳定,是优良的酸味剂和调酸剂,是国际公认的安全、无毒无害的食用有机酸。此外,它还具有重要的生理功能,可食药两用,对加强机体健康有所裨益。例如,我国是肝炎高感染、高发病国家,据统计,人群感染各类肝炎病毒者达 10% 左右,目前对肝炎的治疗尚无特效药。发挥苹果酸护肝作用,将其与民间治疗肝病的草药配伍,开发成护肝产品,作为肝病患者及健康人的日常保健食品,可以加强人体新陈代谢,提高免疫力。总之苹果酸的应用领域十分广阔。

[0004] 近年来, L- 苹果酸市场逐渐启动, 国际市场对苹果酸的需求量快速增加,已呈现严重供不应求的局面,需求量一直以年均 10% 左右的高速度增长和保持。由于用天然产物提取或者化学合成工艺生产苹果酸的方法成本过高, , 因此用微生物的方法合成 L- 苹果酸是今后大规模生产的趋势。

[0005] 利用微生物发酵法生产 L- 苹果酸,目前主要有三种方法,一种是直接发酵法,一般采用糖类为原料,用霉菌直接发酵生产 L- 苹果酸;一种是两步发酵法,即先用根霉菌将糖类发酵成富马酸,在由酵母将底物富马酸转化成 L- 苹果酸的工艺;另一种是酶转化法,即用微生物生产的延胡索酸酶将底物富马酸转化为 L- 苹果酸。以糖质为原料发酵苹果酸工艺中,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。本发明以霉菌为出发菌株,葡萄糖为主要生产原料,通过摇床培养考察葡萄糖生产 L- 苹果酸的发酵条件,通过对发酵温度、培养基初始 pH、转速和接种量等参数的优化,其产酸水平最高可达 150.3g/L。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种直接发酵法生产 L- 苹果酸的方法,本专利以霉菌为出发菌株,葡萄糖为主要生产原料,通过摇床培养考察糖蜜生产 L- 苹果酸的发酵条件,通过对碳酸钙浓度、氮源的选择、发酵温度和转速的优化,克服了现有技术的不足,进行了多次探索和试验,获得一种生产苹果酸的方法。

[0007] 本发明的技术方案是通过如下方式实施的:

[0008] 一种直接发酵法生产 L- 苹果酸的方法,其包括如下步骤:

[0009] 将霉菌混合菌液(米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和黄曲霉(*Aspergillus flavus*)两种菌液体积比为 3:1,两种菌液中菌体的浓度均约为 1×10^8 CFU/mL)按照 10% (体积比)的接种量接入种子罐中进行培养,在温度为 34℃,摇床转速为 180r/min,培养 16 小时得到液体 A,其中,种子罐的培养基组分为:蔗糖 3g, NaNO_3 0.2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02g, MgSO_4 0.02g, KH_2PO_4 0.1g, pH 值 6.0。然后按照液体 A:发酵罐培养基为 1:10 的体积比例转入发酵罐中培养,温度 34℃,培养 6d,所述发酵罐培养基组分为:葡萄糖 80g/L,加玉米浆 10g/L,碳酸钙 75g/L, KH_2PO_4 0.1g/L, K_2HPO_4 0.1g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L, MgSO_4 2 g/L, NaCl 0.2g/L, pH 值 6.0;

[0010] 1. 一种直接发酵法生产 L- 苹果酸的方法,其特征在于发酵时,500mL 三角瓶装一定量的培养液,接入霉菌孢子悬液,在一定的温度下,以一定转速,培养 6d。

[0011] 2. 步骤 1 所述的培养基:葡萄糖 80g/L,加玉米浆 10g/L,碳酸钙 75g/L, KH_2PO_4 0.1g/L, K_2HPO_4 0.1g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g/L, MgSO_4 2 g/L, NaCl 0.2g/L, pH 值 6.0。

[0012] 3. 步骤 1 所述的孢子悬液的制备过程为:米曲霉(*Aspergillus oryzae*),黄曲霉(*Aspergillus flavus*)两种菌液的体积比为 3:1,两种菌液中菌体的浓度均约为 1×10^8 CFU/mL,按照 10% (体积比)的接种量接入种子罐中进行培养,在温度为 34℃,摇床转速为 180r/min,培养 16 小时得到。

[0013] 4. 步骤 3 所述的种子罐培养基(每升):蔗糖 3g, NaNO_3 0.2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.02g, MgSO_4 0.02g, KH_2PO_4 0.1g, pH 值 6.0。

[0014] 5. 步骤 1 所述的最佳摇床转速为 180r/min。

[0015] 6. 步骤 1 所述的最佳发酵温度为 34℃。

[0016] 本发明技术方案通过对现有技术的改进,带来一系列的有益效果:

[0017] 1、本发明在现有技术的基础上,通过大量试验发现,采用米曲霉(*Aspergillus oryzae*),黄曲霉(*Aspergillus flavus*)两种菌液按照一定比例混合,二者之间具备一定的协同作用,比常规的米曲霉发酵方法,能够大大提高苹果酸的产量,采用最优比例 3:1 混合,其他条件不变的前提下,产量可提高 30%左右。

[0018] 2、培养基筛选:在单因素试验的基础上,以 L- 苹果酸产量为响应值,选取对 L- 苹果酸产量影响显著的因素以及因素较好的水平区间,根据 Box-Behnken 中心组合试验设计原理,采用响应面分析法对发酵培养基参数进行优化,获得最优培养基组成。每组试验重复 3 次,结果取其平均值,由于本申请发酵阶段采用添加两种霉菌,针对两种霉菌的种子培养及发酵培养,摸索最佳的培养成分配方,种子培养阶段主要进行菌体繁殖生长,碳源的消耗量相对要小得多,而且高浓度的碳源底物可阻止细胞生长速度和酶的分泌表达。且苹果酸的积累是一个复杂的代谢过程,与许多酶的活性有关,而金属离子作为酶的激活剂或者抑制剂也直接或间接影响苹果酸的积累,针对黄曲霉与米曲霉两种霉菌的发酵液对金属离子的耐性,应用二次通用旋转组合设计最佳金属离子浓度,针对不同阶段,对培养基进行合理的配伍,能够获得最佳的生产效率,最终获得 L- 苹果酸产量为 150.3 g/L,且残糖含量最小为 0.7g/L。

[0019] 具体实施方法

[0020] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0021] 实施例 1

[0022] 将霉菌混合菌液(米曲霉(*Aspergillus oryzae*),黄曲霉(*Aspergillus flavus*)两种菌液的体积比为 3 : 1,两种菌液中菌体的浓度均约为 1×10^8 CFU/mL)按照 10% (体积比)的接种量接入种子罐中进行培养,在温度为 34℃,摇床转速为 180r/min,培养 16 小时得到液体 A,其中,种子罐的培养基组分为:蔗糖 3g, NaNO₃ 0.2g, (NH₄)₂SO₄ 0.5g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01g, MnSO₄ · H₂O 0.02g, MgSO₄ 0.02g, KH₂PO₄ 0.1g, pH 值 6.0。然后按照液体 A : 发酵罐培养基为 1 : 10 的体积比例转入发酵罐中培养,温度 34℃,培养 6d 得苹果酸发酵液,所述发酵罐培养基组分为:葡萄糖 80g/L,加玉米浆 10g/L,碳酸钙 75g/L, KH₂PO₄ 0.1g/L, K₂HPO₄ 0.1g/L, (NH₄)₂SO₄ 2g/L, MgSO₄ 2 g/L, NaCl 0.2g/L, pH 值 6.0 ;所述米曲霉为米曲霉(*Aspergillus oryzae*)ACCC30584(例如参见 CN2011102578402),所述黄曲霉为黄曲霉(*Aspergillus flavus*)ATCC 13697 (参见参考文献:Organic acids: old metabolites, new themes Israel Goldberg ET AL, Journal of Chemical Technology and Biotechnology);

[0023] L- 苹果酸的测定:采用 2,7-萘二酚显色法,取样品溶液 1.0 mL,加入 6.0 mL 分析纯的浓硫酸,再加入 0.1 mL 2,7-萘二酚溶液,接着在 100℃水浴中加热 15-20 min,取出待冷却至室温后,于 385 nm 下进行比色测定,以蒸馏水作对照校正仪器零点。用标准样品先作标准曲线,以苹果酸含量为横坐标,385 nm 处吸收值即 OD₃₈₅ 为纵坐标,通过未知样品在 385 nm 处的 OD 值,则可在标准曲线上查得相应的苹果酸含量。检测 L- 苹果酸产量为 150.3 g/L,且残糖含量为 0.7g/L。

[0024] 实施例 2

[0025] 本实施例说明两种菌协同培养对产酸的影响:将米曲霉菌液(米曲霉菌液中菌体的浓度为 1×10^8 CFU/mL)按照 10% (体积比)的接种量接入种子罐中进行培养,在温度为 34℃,摇床转速为 180r/min,培养 16 小时得到液体 A,其中,种子罐的培养基组分为:蔗糖 3g, NaNO₃ 0.2g, (NH₄)₂SO₄ 0.5g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01g, MnSO₄ · H₂O 0.02g, MgSO₄ 0.02g, KH₂PO₄ 0.1g, pH 值 6.0。然后按照液体 A : 发酵罐培养基为 1 : 10 的体积比例转入发酵罐中培养,温度 34℃,培养 6d 得苹果酸发酵液,所述发酵罐培养基组分为:葡萄糖 80g/L,加玉米浆 10g/L,碳酸钙 75g/L, KH₂PO₄ 0.1g/L, K₂HPO₄ 0.1g/L, (NH₄)₂SO₄ 2g/L, MgSO₄ 2 g/L, NaCl 0.2g/L, pH 值 6.0 ;所述米曲霉优选为米曲霉(*Aspergillus oryzae*)ACCC30584 (例如参见 CN2011102578402)。

[0026] 采用 2,7-萘二酚显色法测定 L- 苹果酸产量为 105.2 g/L

[0027] 实施例 3

[0028] 本实施案例说明碳酸钙浓度对生产 L- 苹果酸产量的影响,在使用糖质原料直接发酵 L- 苹果酸时,培养基中碳酸钙的存在是 L- 苹果酸有效积累的必要条件。因此,试验研究了碳酸钙浓度对两种霉菌生产 L- 苹果酸产量的影响,在发酵培养基中分别添加浓度为 0 g/L, 60 g/L, 65g/L, 70 g/L, 75 g/L, 80 g/L, 85g/L 的硫酸钙,发酵温度为 34℃,转速为 180r/min,发酵 6d。

[0029] 由表 1 可知,从经济角度分析,当添加碳酸钙浓度为 75g/L 时,可获得较高产量的 L- 苹果酸为 150.3 g/L,且残糖含量最小。

[0030] 表 1 :不同碳酸钙浓度对 L- 苹果酸产量的影响

[0031]

碳酸钙浓度 / (g/L)	L-苹果酸 / (g/L)	残糖 / (g/L)
0	6.3	—
55	91.2	3.8
60	100.7	3.0
65	124.6	1.9
70	132.5	1.1
75	150.3	0.7
80	151.6	1.3
85	152.8	1.6

[0032] 实施例 4

[0033] 本实施例说明不同氮源对本发明方法生产 L- 苹果酸产量的影响。氮源是合成菌体中蛋白质和核酸等含氮物质的主要来源,因此在微生物培养过程中其重要性仅次于碳源。菌体利用有机氮源较无机氮源缓慢,而无机氮源中铵盐的利用率较高,使用也最多,工业上多选用玉米浆和豆饼粉作为有机氮源。为了保证整个发酵过程中,可以持续的提供氮源,本试验选取了不同浓度的无机氮源和有机氮源的混合物作为发酵氮源,并研究了其对 L- 苹果酸产量的影响,其它参数同实施例 1。

[0034] 结果由表 2 可知,当发酵培养基中添加 10g/L 的玉米浆和 2g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 作为发酵氮源时,L- 苹果酸的产量最高。

[0035] 表 2 :不同氮源对 L- 苹果酸产量的影响

[0036]

氮源种类及浓度 / (g/L)	L-苹果酸 / (g/L)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 + 玉米浆 10	150.3
NH_4NO_3 2 + 玉米浆 10	131.2
尿素 2 + 玉米浆 10	127.7
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 + 豆饼粉 5	116.3
NH_4NO_3 2 + 豆饼粉 5	112.4
尿素 2 + 豆饼粉 5	117.5
玉米浆 10	97.8

[0037] 实施例 5

[0038] 本实施案例说明不同温度对苹果酸米曲霉生产 L- 苹果酸产量的影响，温度分别控制在 26℃, 28℃, 30℃, 32℃, 34℃, 36℃, 38℃, 添加 75g/L 的碳酸钙, 10g/L 的玉米浆和 2g/L 的硫酸铵, 在 180r/min 下, 发酵 6d, 其余操作参数同实施例 1。

[0039] 得出在温度为 34℃的条件下, 发酵产率最高。

[0040] 实施例 6

[0041] 本实施案例说明不同转速对苹果酸米曲霉生产 L- 苹果酸产量的影响，转速分别为 :140 r/min, 160 r/min, 180 r/min, 200 r/min, 220 r/min, 添加 75g/L 的碳酸钙, 10g/L 的玉米浆和 1g/L 的硫酸铵, 在 34℃条件下, 发酵 6d。

[0042] 得出在转速为 180 r/min 的条件下, 产苹果酸效率最高。

[0043] 以上列举的仅是本发明的最佳具体实施例。显然, 本发明不限于以上实施例, 还可以有许多变形。本领域的普通技术人员能从本发明公开的内容直接导出或联想到的所有变形, 均应认为是本发明的保护范围。