

淀粉为主原料L-苹果酸发酵的 较佳培养基研究

金其荣 刘吉泉 杨 光

(发酵系)

摘 要

讨论了以淀粉基质为主原料发酵生产L-苹果酸的条件。通过正交试验,得到了一较佳的培养基:淀粉12%,豆饼粉1.0%,玉米粉2%, $F_2SO_4 \cdot 7H_2O$ 700ppm,装液量(500毫升)70毫升。在此条件下,经5天发酵,L-苹果酸的积累量为7~7.6克/100毫升。

主题词: L-苹果酸; 发酵; 培养基

0 前 言

L-苹果酸是食品医药工业的重要酸味剂。它在饮料、果汁、果酱、果冻、糖果、药物、调味剂以及某些合成药物等方面有着广泛的用途。

目前,化学合成法以苯为原料,经催化气相氧化为马来酸,再经高温高压反应转化为DL-苹果酸,或以延胡索为原料通过固相化酶转化为L-苹果酸,由于国外消费者对化学合成与半合成产品作为食用酸的安全性持怀疑态度,所以,以粮食为原料生产L-苹果酸,各国都竞相研究。

迄今文献报道,以淀粉质为原料直接发酵生成L-苹果酸,产酸率约为3%,转化率对糖约30%,且尚未工业化生产^[1,2]。

我国柠檬酸生产以薯干为原料,如果能筛选出直接能利用薯干原料的L-苹果酸产生菌,对柠檬酸单一产品的工厂来说,能利用现有设备,生产出L-苹果酸新产品,提高工厂的竞争能力是有利的。

作者在1982年从土壤里分离、筛选、诱变获得的几株L-苹果酸产生菌,以可溶性淀粉为原料,在适宜摇瓶培养条件下,积累L-苹果酸为3.31克/100毫升,转化率30%以上^[3]。

为了进一步提高L-苹果酸产生菌的产酸率与转化率,对上述菌株进行多次反复诱变处理,获得1株不产黄霉毒素的ASP.flavus UVTI,它能直接利用淀粉生物合成L-苹果酸,(经传代15代产酸活性不下降。本文以此菌株为重点,对以可溶性淀粉为主原料的较佳培养基确定方面介绍如下。

1 材料与方法

使用菌株: ASP.favus UVTI

原料与试剂: 可溶性淀粉(CP), 豆饼粉、玉米粉(本院发酵厂赠送)、山芋粉(无锡第二制药厂赠送)

斜面固体培养基: 4~50B'e 麦芽汁, 2%琼脂

无机盐基础培养液: KH_2PO_4 0.015%, K_2HPO_4 0.015%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 500ppm, NaCl 10ppm, CaCO_3 6% (分别灭菌)。

15%山芋粉为主发酵培养基: 配制时添加 0.1~0.2% α -淀粉酶, 60℃保温液化, 添加适量氮源和无机盐培养液, 灭菌、接种摇瓶培养

L-苹果酸的定性检出、定量测定方法参阅有关文献^[3]。

2 试验结果

我们采用正交试验来确定较佳培养基成分配比。按表1因素水平对照表和表2所示正交试验表进行摇瓶试验, 按表3将淀粉与豆饼粉进行交互作用, 其方差分析结果见表4。

表1 因素水平对照表

因素 水平	A 淀粉 (%)	B 豆饼粉 (%)	A × B 淀粉 × 豆饼粉	C 玉米粉 (%)	A × C 淀粉 × 玉米粉	D $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ppm)	E 装液量 (ml)
1	10	0.8		2.0		500	70
2	12	1.0		1.5		700	50

表2 正交试验表

因素 试验	淀粉 (%)	豆饼粉 (%)	淀粉 × 豆饼粉	玉米粉 (%)	淀粉 × 玉米粉	$\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PPm)	装液量 (ml)	产酸 (g/dl)
1	(1)10	(1)0.8	(1)	(1)2	(1)	(1)500	(1)70	6.65
2	(1)10	(1)0.8	(1)	(2)1.5	(2)	(2)700	(2)50	5.81
3	(1)10	(2)1.0	(2)	(1)2	(1)	(2)700	(2)50	6.09
4	(1)10	(2)1.0	(2)	(2)1.5	(2)	(1)500	(1)70	6.18
5	(2)12	(1)0.8	(2)	(1)2	(2)	(1)500	(2)50	6.40
6	(2)12	(1)0.8	(2)	(2)1.5	(1)	(2)700	(1)70	6.85
7	(2)12	(2)1.0	(1)	(1)2	(2)	(2)700	(1)70	7.62
8	(2)12	(2)1.0	(1)	(2)1.5	(1)	(1)500	(2)50	6.57
K_1	24.73	25.71	26.65	26.74	26.16	25.80	27.30	
K_2	27.44	26.46	25.52	25.41	26.03	26.37	24.87	
R	2.71	0.75	1.13	1.33	0.15	0.57	2.43	
$S_1 = R^2/8$	0.918	0.070	0.160	0.228	0.003	0.041	0.738	

根据表2中R值的大小, 确定正交表中各因素对产酸影响的先后顺序为:
淀粉>装液量>玉米粉>淀粉×豆饼粉>豆饼粉> Fe^{2+} >淀粉×玉米粉。

表3 淀粉豆饼粉的交互作用

淀 粉 \ 豆饼粉	0.8%	1.0%
(1) 10%	$5.81 + 6.65 = 12.46$	$6.09 + 6.18 = 12.27$
(2) 12%	$6.4 + 6.85 = 13.25$	$7.62 + 6.57 = 14.19$

表4 方 差 分 析

方差来源	偏差平方和	自 由 度	均 方 和	F比	显 著 性
S_A	$S_A = S_1 = 0.918$	1	0.918	306.00	**
S_B	$S_B = S_2 = 0.070$	1	0.070	23.30	
$S_{A \times B}$	$S_{A \times B} = S_3 = 0.160$	1	0.160	53.30	*
S_C	$S_C = S_4 = 0.228$	1	0.228	76.00	*
S_D	$S_D = S_5 = 0.041$	1	0.041	13.67	
S_E	$S_E = S_7 = 0.738$	1	0.738	246.04	*
$S_e = S_{A \times C}$	$S_e = S_6 = 0.003$	1	0.003		

注: **为显著影响; *为有些影响

$$F_{\text{比}} = S_i / S_e \quad i = A \rightarrow E$$

按正交试验结果分析可知:

(1) 培养基中, 淀粉水平改变, 对产酸有显著影响, 根据 I_A 、 II_A 的大小, 选取2水平为宜。

(2) 培养基中豆饼粉水平改变对产酸没有显著影响, 可任意取, 按 I_B 、 II_B 的大小, 选用2水平。

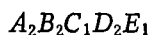
(3) 培养基中淀粉与豆饼粉交互作用对产酸有一定影响, 参照表3, 淀粉取2水平, 豆饼取2水平为宜。

(4) 培养基中玉米粉对产酸有一定影响, 根据 I_C 、 II_C 的大小, 选取1水平为宜。

(5) 培养基中 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 水平改变对产酸无明显影响, 根据 I_D 、 II_D 的大小, 选取2水平。

(6) 培养基装液量对产酸有显著影响, 根据 I_E 、 II_E 的大小, 选取1水平为宜, 即70毫升较好, 这说明该菌株发酵产酸时, 对溶解氧要求不太高, 工业生产时通风量可低一些。

综上所述, 发酵培养基较佳配方为:



即淀粉12%, 豆饼粉1.0%, 玉米粉2%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 700ppm, 装液量(500毫升三角瓶) 70毫升添加适量无机盐培养液。为了考虑摇瓶中蒸发水量损失, 培养基中预先添加18~20%

水, 33~35℃培养 5 天, 稳定产酸 7~7.6 克/100 毫升

我们使用此菌株, 以 15% 山芋粉为主原料, 添加极少量无机盐, 培养 5 天其产酸为 4.6 克/100 毫升, 如果添加极少量副原料, 在同样培养条件下, 其产酸为 5.6 克/100 毫升, 经纸层析, 从图谱上发现除 L-苹果酸外, 尚有极少量柠檬酸。对于山芋粉为主原料的较佳培养基配方和培养条件, 尚有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 木下祝郎. 新版发酵工业, 1975, 179
- [2] 鲛岛广年, 奈良高. 微生物发酵生产, 1979, 190
- [3] 金其荣等. 无锡轻工业学院学报, 1982, 创刊号

Studies on a Better Medium For L-malic acid Fermentation By using Starch as The Main Substrate

Jin Qirong, Liu Jiquan, Yang Guang

Abstract

In this paper, The condition of L-malic acid fermentation by using starch as the main substrate is discussed. By means of crossed test, a better medium composition is found, Starch 12%, Corn flour 2%, Soya-bean cake meal 1%, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 700 ppm, and Loading capacity (500ml flask) 70ml. Under this condition, the amount of L-malic acid formation after 5-day fermentation is 7~7.6 g/dl

Subjectwords: L-malic acid, Fermentation, Medium.