

L(+)-酒石酸发酵法生产工艺改进的研究

杨 阳* 李文鹏 陆鲁生 陆和生

(云南大学生命科学与化学学院生物技术系,云南省工业微生物发酵工程重点实验室 昆明 650091)

关键词 L(+)-酒石酸,发酵法生产,后提取

中图分类号 Q939.97 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0345-04

虽然具有广泛用途的 L(+)-酒石酸的生产方法有 4 种^[1],但目前研究最多,最具工业生产前景的方法,是应用化学合成的前体为底物,发酵生产 L(+)-酒石酸的方法。该法中的微生物发酵转化适宜在弱碱性的条件下进行,通常都是把顺式环氧琥珀酸制备成相应的二钠盐来作为前体,再进行微生物转化生成 L(+)-酒石酸。张建国^[2]、黄腾华等人^[3]在实验室按以上路线生产 L(+)-酒石酸,孙志浩等人^[4]以明胶为载体固定化微生物细胞生产 L(+)-酒石酸,张建国等人^[5]在他们自己工作的基础上进一步探讨了细胞固定化的方法,找到了一种具有较高酶活性回收率和操作稳定性的固定化方法^[5]。

我们从土壤中筛选出 L(+)-酒石酸的产生菌,采用以上工艺,在实验室中成功地得到了 L(+)-酒石酸。但在实验过程中我们也发现该工艺存在发酵液菌体过滤困难,提取得率不高等问题。若采用离子交换法提取,同样存在以上问题,且对离子交换柱的容量要求大,再生费时费料。针对以上不足,经过大量实验和深入研究,我们提出了以顺式环氧琥珀酸二钾为前体的改进新工艺。

1 材料和方法

1.1 材料

前体顺式环氧琥珀酸二钾由本实验室制备,其余试剂均为市售分析纯、化学纯和工业级。L(+)-酒石酸样品:美国贝克公司产品、连云港发酵厂产品以及本室制备的样品。

高压液相色谱仪(HPLC);751-GW 分光光度计(上海分析仪器总厂);WZZ-1S 数字式自动旋光仪(上海物理光学仪器厂)。

1.2 菌种

Corynebacterium validum Lu 336,由本实验室筛选并保藏。

1.3 前体合成的方法

参照 Payne G B 和 Williams P H 的方法^[6]。但由于采用循环工艺,前体合成原料采用后提取过程中的副产物顺丁烯

二酸氢钾。

1.4 分析方法

1.4.1 顺式环氧琥珀酸盐的定量测定:用苯胺冰醋酸比色法。

1.4.2 L(+)-酒石酸盐的定量测定:用旋光法、比色法和高压液相色谱(HPLC)法。比色法参照刘叶青、黄腾华等人的钒酸铵比色法^[7,8]。

1.5 后提取方法

1.5.1 发酵液中 L(+)-酒石酸二钾的沉淀:利用 L(+)-酒石酸氢钾溶解度低的性质(在 20℃约为 0.5%),把发酵液中的 L(+)-酒石酸二钾转化成 L(+)-酒石酸氢钾沉淀。有两种途径:一是直接在发酵液中加入含有大量 L(+)-酒石酸的浓缩结晶后的母液,二是加入硫酸或盐酸。

1.5.2 L(+)-酒石酸氢钾的转化:把与发酵液分离后的 L(+)-酒石酸氢钾沉淀调浆,加入顺丁烯二酸酐和碳酸钙,搅拌反应,生成 4 水 L(+)-酒石酸钙沉淀和顺丁烯二酸氢钾溶液。该反应产物的重量完全符合反应方程式的当量关系,并通过云南大学实验中心红外光谱仪(美国伯乐公司 FTS-40 型 FT-IR)的测定,其结果与标准红外光谱图(Sadtler Standard Infrared Grating Spectra)比较,证明它们就是 4 水 L(+)-酒石酸钙和顺丁烯二酸氢钾。前者用硫酸酸解得 L(+)-酒石酸溶液,后者用于前体合成。

1.5.3 有关物质的溶解度:L(+)-酒石酸氢钾、四水 L(+)-酒石酸钙、顺丁烯二酸钙、L(+)-酒石酸二钾的溶解度见有关手册和辞典^[9-11]。顺式环氧琥珀酸二钾、顺式环氧琥珀酸氢钾、顺丁烯二酸二钾、顺丁烯二酸氢钾的溶解度未能查到文献值,但实验表明,这些物质的溶解度都较大。

2 结果

2.1 发酵情况

分别以顺式环氧琥珀酸二钠和顺式环氧琥珀酸二钾为底物(见表 1)。

表 1 两种底物的发酵

Table 1 Fermentation of two substrates

| Substrate | Flask volume/mL | Substrate total concentration in FL/% | pH | Yield/% |
|---------------------|-----------------|---------------------------------------|---------|---------|
| CEOSNa ₂ | 500 | 9.5 | 7.5~8.0 | 8.8 |
| CEOSNa ₂ | 5000 | 10.0 | 7.5~8.0 | 9.2 |
| CEOSK ₂ | 500 | 14.0 | 7.5~8.0 | 13.5 |
| CEOSK ₂ | 5000 | 15.5 | 7.5~8.0 | 14.3 |

2.2 L(+)酒石酸氢钾的沉淀

2.2.1 用盐酸调 pH₀

表 2 发酵液 pH 值与 L(+)酒石酸氢钾沉淀的关系

Table 2 Relationship between pH of fermented liquor and deposition of LTAHK

| No. | Volume of FL/mL | LTA in FL/% | Begin pH | End pH | Dep. time/h | LTA after dep. in FL/% | LTAHK/g |
|-----|-----------------|-------------|----------|--------|-------------|------------------------|---------|
| ① | 50 | 8.3 | 8.0 | 1.0 | 1 | 2.70 | 2.5 |
| ② | 50 | 8.3 | 8.0 | 2.0 | 1 | 2.08 | 3.1 |
| ③ | 50 | 8.3 | 8.0 | 3.0 | 1 | 1.11 | 4.0 |
| ④ | 50 | 8.3 | 8.0 | 4.0 | 1 | 2.12 | 3.0 |
| ⑤ | 50 | 8.3 | 8.0 | 5.0 | 1 | 3.74 | 2.3 |

2.2.2 最佳 pH 的确定:

表 3 最佳的 pH

Table 3 Best pH

| No | Volume of FL/mL | LTA in FL/% | Begin pH | End pH | Dep. time/h | LTA after dep. in FL/% | LTAHK/g |
|----|-----------------|-------------|----------|--------|-------------|------------------------|---------|
| ① | 50 | 8.3 | 8.0 | 2.5 | 12 | 0.78 | 3.8 |
| ② | 50 | 8.3 | 8.0 | 2.7 | 12 | 0.73 | 3.9 |
| ③ | 50 | 8.3 | 8.0 | 3.0 | 12 | 0.57 | 4.0 |
| ④ | 50 | 8.3 | 8.0 | 3.1 | 12 | 0.52 | 4.2 |
| ⑤ | 50 | 8.3 | 8.0 | 3.5 | 12 | 0.59 | 4.0 |

2.2.3 用母液和盐酸调 pH 的比较:

表 4 母液和盐酸调 pH 的比较

Table 4 Comparison of mother liquor and hydrochloric acid used for pH

| | Volume of FL/mL | LTA in FL/% | Begin pH | End pH | LTA after dep. in FL/% | LTAHK dep/g | Dep. rate/% |
|-----|-----------------|-------------|----------|--------|------------------------|-------------|-------------|
| ML | 50 | 14.0 | 8.5 | 3.1 | 0.89 | 16.5 | 94.0 |
| | 100 | 12.3 | 8.5 | 3.1 | 0.72 | 29.2 | 94.8 |
| HCl | 50 | 14.0 | 8.5 | 3.1 | 0.52 | 8.3 | 95.0 |
| | 100 | 12.3 | 8.5 | 3.1 | 0.49 | 14.7 | 95.5 |

2.2.4 用硫酸和盐酸调 pH 的比较:

表 5 硫酸和盐酸调 pH 的比较

Table 5 Comparison of hydrochloric acid and sulfuric acid used for pH

| | Volume of FL/mL | LTA in FL/% | Begin pH | End pH | LTA after dep. in FL/% | LTAHK dep/g | Dep. rate/% |
|-----|-----------------|-------------|----------|--------|------------------------|-------------|-------------|
| SA | 70 | 14.0 | 8.5 | 3.1 | 0.50 | 11.7 | 95.0 |
| | 100 | 12.3 | 8.5 | 3.1 | 0.49 | 14.7 | 95.3 |
| HCl | 70 | 14.0 | 8.5 | 3.1 | 0.44 | 11.8 | 96.0 |
| | 100 | 12.3 | 8.5 | 3.1 | 0.48 | 14.8 | 95.7 |

2.3 1(+)-酒石酸钙的形成

表 6 1(+)-酒石酸钙的形成
Table 6 Formation of Calcium Tartrate (1(+)-TACa)

| LTAHK/g | MA/g | CaCO ₃ /g | Vol. of liq/mL | LTA after react. in liquid/% | LTACa/g | Dep. rate/% |
|---------|------|----------------------|----------------|------------------------------|---------|-------------|
| 67.5 | 36.0 | 36.0 | 600 | 0.082 | 86.5 | 92.7 |
| 12.0 | 6.3 | 6.4 | 80 | 0.047 | 15.5 | 93.2 |
| 12.0 | 6.3 | 6.4 | 80 | 0.062 | 15.6 | 94.0 |
| 13.0 | 6.8 | 6.9 | 87 | 0.075 | 17.4 | 96.8 |

2.4 检测

2.4.1 顺式环氧琥珀酸二钠和顺式环氧琥珀酸二钾的对比:分别称取等摩尔的上述两种盐,再根据投料数量和最终体积的计算,量取适量合成的顺式环氧琥珀酸二钾溶液(长时间的放置,溶液中残留的双氧水已基本被除去),配成 3 种等摩尔浓度的溶液,按苯胺冰醋酸比色法在完全相同的条件下进行分析检测。所得结果表明,在实验误差范围内,3 种溶液的吸光度是一致的。

2.4.2 1(+)-酒石酸、1(+)-酒石酸二钠、1(+)-酒石酸二钾的对比:分别称取等摩尔的上述 3 种盐,配成 3 种等摩尔浓度的溶液,在相同的条件下用钒酸铵比色法进行分析检测。其结果也表明,在实验误差范围内,以上 3 种溶液的吸光度是一致的。

2.4.3 1(+)-酒石酸的检测:经查阅表明,1(+)-酒石酸的定量检测方法主要为比色法。为进一步验证其可靠性,我们采用了高压液相色谱(HPLC)法、旋光法与比色法进行了比较。

实验表明,与 HPLC 法相比较,比色法测定 1(+)-酒石酸稳定性较好,结果可靠,操作方便,对仪器设备的要求不高,完全适用于生产中发酵液和产品的检测。旋光法也较方便,但更适宜用来作定性和半定量的测定。

3 讨论

有报道表明^[2],当发酵液的 pH 为偏酸性或中性时,底物转化成酒石酸的速度很小,pH 调至 8.0 左右时,转化速度显著加快,其加快的原因可能是菌体自身溶菌的结果。菌体的自溶,使 1(+)-酒石酸外氧化酶能释放到培养基中,1(+)-酒石酸就能很快形成,大大提高转化率。但菌体的大量自溶,使发酵液的过滤变得困难,若直接用钙盐沉淀,不仅沉淀不完全,而且沉淀会裹带很多其他杂质,后提取率不高。以顺式环氧琥珀酸二钾为前体的发酵法生产改进工艺,与原工艺相比有以下优点:

(1)产酸高:由于前体流加浓度提高,在基本相同条件下用环氧琥珀酸二钾为前体比用环氧琥珀酸二钠为前体的产酸量高 20% ~ 30% ;

(2)后提取率高:只要控制得好,至少可达 80% ;

(3)约 50% 左右的钾离子可反复使用:用沉淀 1(+)-酒石酸钙后的顺丁烯二酸氢钾溶液合成前体,能达到原工艺前

体合成的转化率;

(4)前体合成后的溶液可以直接用于发酵流加,省去了把前体浓缩结晶提纯的工序,同时节省了大量能源,有利于降低生产成本;

(5)采用成本较低的碳酸钙来形成 1(+)-酒石酸钙沉淀;

(6)直接从发酵液中沉淀出 1(+)-酒石酸氢钾后,就可使用简便的方法移去液相,从而避免了发酵液的过滤,且结晶母液中的 1(+)-酒石酸可充分利用;

(7)从 1(+)-酒石酸氢钾沉淀出发,可生产一些 1(+)-酒石酸盐的其他产品,如二钾、钾钠、铈钾等,使产品多样化。

新工艺的缺点主要为:

(1)使用的氢氧化钾较氢氧化钠成本高;

(2)若用结晶母液调发酵液的酸度,硫酸和碳酸钙的用量要相应增加,同时增加浓缩的量,但不损失钾离子,若用硫酸调,只增加调的部分,碳酸钙用量和浓缩量都不增加,但要损失钾离子;

(3)由于流程增加,相应的设备、操作和维修费用也会有所增加。

从生产角度考虑,我们认为通过酸率和后提取率的大幅度提高,基本可以抵消原料成本的升高,而且还简化了一些工序,对实现大规模工业化生产非常有利。

缩写说明

CEOSNa₂ 顺式环氧琥珀酸二钠(Disodium cis-epoxysuccinate)

CEOSK₂ 顺式环氧琥珀酸二钾(Dipotassium cis-epoxysuccinate)

FL 发酵液(Fermented liquor)

1(+)-TA(TA, LTA) 1(+)-酒石酸(1(+)-tartaric acid)

1(+)-TACa·4H₂O 四水 1(+)-酒石酸钙(Calcium tartrate)

1(+)-TAHK(LTAHK) 1(+)-酒石酸氢钾(Potassium hydrogen tartrate)

1(+)-TAK₂ 1(+)-酒石酸二钾(Dipotassium tartrate)

MA 顺丁烯二酸酐(Maleic anhydride)

MHK 顺丁烯二酸氢钾(Potassium hydrogen maleate)

ML 母液(Mother liquor)

SA 硫酸(Sulfuric acid)

REFERENCES(参考文献)

- methods of L(+)-tartaric acid. *Food and Fermentation Industries*(食品与发酵工业), 1987, 6: 68 ~ 70
- [2] ZHANG J G(张建国), HUANG T H(黄腾华). Productivity of L(+)-tartaric acid using microbial conversin method. *Industrial Microbiology*(工业微生物), 1990, 20(2): 7 ~ 14
- [3] HUANG T H(黄腾华), QIAN X M(钱晓梅). Production of L(+)-tartaric acid. *Industrial Microbiology*(工业微生物), 1991, 21(4): 14 ~ 17
- [4] SUN Z H(孙志浩), ZHENG F(郑璞), DAI X T(戴雪泰) *et al.* Production of L(+)-tartaric acid by immobilized nocardia tartaricans SW13-57. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1995, 11(4): 372 ~ 376
- [5] ZHANG J G(张建国), QIAN A J(钱亚娟). Production of L(+)-tartaric acid by immobilized *Corynebacterium* sp. JZ-1. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报) 2000, 16(2): 188 ~ 191
- [6] Payne G B, Williams P H. Reactions of hydrogen peroxide. IV. sodium tungstate catalyzed epoxidation of α, β -unsaturated acids. J. *Organic Chemistry*, 1959, 24: 55 ~ 56
- [7] LIU Y Q(刘叶青), YAN X K(严希康), ZHOU W L(周文龙) *et al.* Colorimetric analysis of tartaric acid. *Industrial Microbiology*(工业微生物), 1983, 13(6): 32 ~ 37
- [8] HUAN T H(黄腾华), QIAN X M(钱晓梅). Quantitative analysis of L(+)-tartrate in fermented liquor. *Industrial Microbiology*(工业微生物), 1989, 19(4): 37 ~ 40
- [9] Handbook of Analytical Chemistry, Book One, 2nd ed, Chemical Industries Press(化学工业出版社), 1999
- [10] Ivan Heilbron, Bunbury H M. Dictionary of Organic Compounds, London: Eyre & Spottiswoode, 1953
- [11] CRC Handbook of Chemistry and Physics 65th 1984 ~ 1985

Study on the Improvement of Process Technology of L(+)-Tartaric Acid Fermentation

YANG Yang* LI Wen-Peng LU Lu-Sheng LU He-Sheng

(College of Life Science and Chemistry, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract This work proposes an improved process technology of L(+)-tartaric acid produced by using cis-epoxysuccinates as the substrate for fermentation. The key to the question is to apply dipotassium cis-epoxysuccinate as the substrate instead of disodium cis-epoxysuccinate. As compared with the original process technology, the improved one has prominent advantages: 1. High yield of acid, increased by 20% ~ 30% over the old one; 2. High rate of recovery, from about 60% to 80%; 3. One of the raw materials is cheaper, the KOH is expensive than NaOH, but half of the K ions could be used cyclically, and the varied products could be obtained easily; 4. The tough working procedure of filtration of fermented liquor could be evaded, the total working procedures might increase to some extent, but the cost of production will be reduced obviously, it is advantageous to industrial production.

Key words L(+)-tartaric acid, fermentation, recovery

Received: December 1, 2000

* Corresponding author. Tel: 86-871-5032823; E-mail: w52y47@ynmail.com