

反应分离耦合技术生产 L-苹果酸工艺过程的优化研究

胡永红* 欧阳平凯 沈树宝 陈武领

(南京化工大学制药与生命科学学院,南京 210009)

摘 要 运用生物反应分离耦合原理,以富马酸钙为底物,采用游离延胡索酸酶,直接转化生成苹果酸钙。该法相对目前广泛采用的包埋式固定化方法具有工艺流程短、操作简便、转化率、收率高等特点。研究结果表明,转化温度为 40℃、pH 为 7.0~7.5 时,每升延胡索酸酶液能在 20~28h 间将 3.2kg 的富马酸钙转化生成苹果酸钙,转化率达 99.9%,富马酸在产品中的残留在 0.1% 左右,产品符合美国药典标准,成本与化学合成法生产的 DL-苹果酸相当。

关键词 耦合过程,富马酸钙,苹果酸钙,延胡索酸酶

中图分类号 Q814.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0503-03

生物反应和产物分离过程耦合可以实现高底物浓度的发酵或酶转化,消除或减轻产物对生物催化剂的抑制,提高反应速率。同时,还可以起到降低产物分离能耗、简化产物分离过程、降低生产成本的作用,具有十分广阔的应用前景。

作为近年来兴起的集反应过程和产物分离过程于一体的新技术,将其应用于 L-苹果酸生产的研究过程,也取得了重大突破。传统 L-苹果酸生产工艺中,富马酸钠在延胡索酸酶的作用下,转化生成苹果酸钠是典型的可逆反应,转化率为 70%~80%^[1-4],反应液中苹果酸含量为 10%,虽然采用优化的高浓度富马酸铵体系,可以提高转化率达 88%~90%^[5],酶转化液中苹果酸含量达 20%,较普通采用的富马酸钠体系提高了 1 倍,但成本仍然无法与化学合成法生产的 DL-苹果酸抗衡。随着反应分离耦合研究的不断发展,能否采用该法生产 L-苹果酸?本文探讨,巧妙地运用溶解度的差别,在游离延胡索酸酶的催化下,使生成的 L-苹果酸钙盐不断地从溶液中析出,反应不断地向着生成产物的方向移动,转化率高达 99.9%,单位体积酶发酵液对富马酸钙的转化量达 320% (W/V),大幅度提高了目的产物在酶转化液中的浓度,显著降低了分离成本。

1 材料与方法

1.1 试剂

富马酸:工业级,苏州合成化工厂;碳酸钙:工业

级,泗联化工厂。

1.2 菌株

本文所用的菌株是由我院筛选并保存的产氨短杆菌 MA-2 (*B. ammoniagenes* MA-2) 和黄色短杆菌 MA-3 (*B. flavum* MA-3)。

1.3 培养基组成

1.3.1 斜面培养基:上述两株菌均于普通肉汤培养基中培养,其成分为:蛋白胨 1%,牛肉膏 0.5%,氯化钠 0.5%。

1.3.2 产氨短杆菌 MA-2 发酵培养基成分:柠檬酸氢二铵 3%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 玉米浆 4.5%, 用 30% NaOH 调节 pH 至 7.5 左右,灭菌后备用。

1.3.3 黄色短杆菌 MA-3 发酵培养基成分:丙二酸 2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 玉米浆 2% 用 30% NaOH 调节 pH 至 7.5 左右,灭菌后备用。

1.4 培养条件

产氨短杆菌 MA-2 于 32~34℃ 下培养 24~36h, 摇瓶接种量为 10%, 培养时间为 24h, 摇床转速 180r/min。黄色短杆菌 MA-3 培养温度为 30~32℃, 其余条件同产氨短杆菌 MA-2。

1.5 仪器

DU650 分光光度计 (Beckman), MD100-2 电子分析天平 (上海第三分析仪器厂), JJ-1-型定时电动搅拌器 (金坛国华仪器厂), HHS14-型电热恒温水浴锅 (常州国华仪器厂)。

收稿日期:2001-02-19,修回日期:2001-06-15。

基金项目:化工部“九·五”攻关项目基金(98-C-06)和国家自然科学基金(29976019)资助。

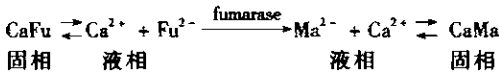
* 通讯作者。Tel:86-25-3316755; Fax:86-25-3411316; E-mail:wgyang@jlonline.com

1.6 分析方法

富马酸含量的测定详见文献[2],苹果酸含量的测定详见文献[3],游离细胞延胡索酸酶酶活测定详见文献[2]。

2 生物反应与分离耦合生产 L-苹果酸过程及原理

传统 L-苹果酸生产工艺即国内外普遍采用的固定化延胡索酸酶生产工艺是将底物富马酸配成富马酸钠或富马酸铵,在延胡索酸酶作用下进行水合,生成相应的苹果酸盐,由于该反应是可逆的,富马酸钠盐平均转化率低,产物浓度低,分离成本高。基于上述原因及近年来反应分离耦合原理在乙醇、乳酸等产品中成功地运用,现利用该原理,将富马酸钙晶体直接转化成苹果酸钙晶体:



式中, Fu^{2-} 代表富马酸根, Ma^{2-} 代表苹果酸根。众所周知,富马酸钙在水中的溶解度很小,40℃时为 $9.12 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$,但苹果酸钙在同样条件下的溶解度更小,只有 $6.75 \times 10^{-2} \text{ mol/L}$ ^[6],均与液相中的酸根离子存在平衡转化关系。在反应分离耦合过程中,在延胡索酸酶的作用下,富马酸钙不断溶解并在延胡索酸酶的催化下将其转化生成 L-苹果酸钙并且结晶析出。

3 结果与讨论

3.1 酶反应温度对耦合转化率的影响

考察了不同温度对产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 反应分离耦合生产 L-苹果酸的影响。结果如图 1,在所研究的温度范围内,随着反应温度的升高,其转化率增大,40℃时为最大,酶转化反应处

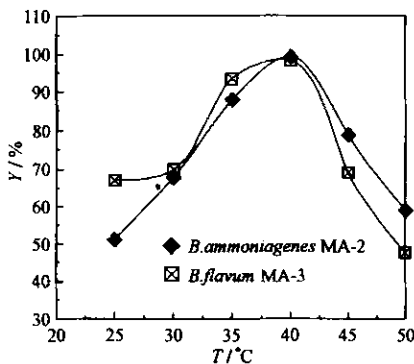


图 1 温度对转化反应的影响
Fig.1 Effect of temperature on the conversion yield of reaction

于最佳状态。

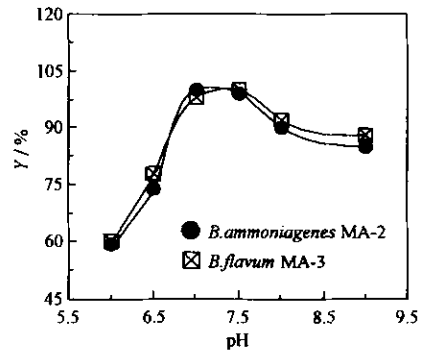


图 2 pH 对转化反应的影响
Fig.2 Effect of pH on the conversion yield of reaction

3.2 pH 对酶反应分离耦合的影响

由图 2 可知,当 $\text{pH} = 7.0 \sim 7.5$ 时,转化反应的平均转化率为最大值,超过这一范围,转化率下降,这说明延胡索酸酶在该反应分离耦合过程中不同氢离子浓度对其催化活力有显著变化,当耦合体系处于中性偏碱性条件下其与底物结合而表现出最大酶活力且转化率最高。

3.3 不同酶量对分离耦合反应的影响

在底物富马酸钙大量存在时,形成中间产物的量取决于延胡索酸酶的浓度,延胡索酸酶分子愈多,则底物富马酸钙转化为产物苹果酸钙的量亦相应地增加,研究中取 320g 富马酸钙,分别加入不同量的产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 发酵液,结果表明,在一定范围内,随着两菌酶发酵液量的增加,转化率不断上升,当两菌酶发酵液量增至一定值其转化率即为恒定值,如图 3 所示,最佳酶液量为 100 mL,此时两菌酶转化率达 99.9%。

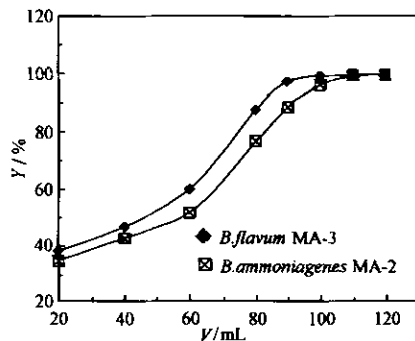


图 3 酶液体积对转化反应的影响
Fig.3 Effect of volume of suspension on the conversion yield of reaction

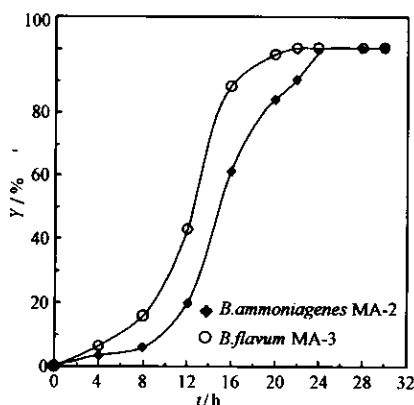


图4 反应分离耦合进程曲线

Fig. 4 Conversion curve of integrated process

3.4 反应分离耦合进程曲线

在两只 1L 的烧杯中分别加入 100 mL 产氨短杆菌 MA-2、黄色短杆菌 MA-3 培养液及底物富马酸钙,在搅拌状态下连续取样分析,结果如图 4 所示,在开始反应的前 6h 左右转化效率持续一个很低的水平,随着时间的推移反应转化率不断上升,当反应进行至 24h 左右,总体转化率达 99.9%。采用上述优化条件进行中试,不同批次的 1t 延胡索酸酶培养液可转化 3.2 t 富马酸钙,转化效率达 99.9%,转化时间为 20~28h,纯化所得 L-苹果酸纯度大于 99.9%,富马酸残留量在 0.1% 左右,各项指标均符合美国药典标准,经成本核算为 1.6 万元/t,与化学合成法生

产的 DL-苹果酸相当。

由此可见,采用反应与分离耦合技术生产 L-苹果酸是目前最好的选择。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Takata I, Kayashima K, Tosa T *et al.* Improvement of stability of fumarase activity of *B. flavum* by immobilization with K-carrageenan and polyetheneimine. *Journal of Fermental Technology*, 1982, 60(5): 431 ~ 439
- [2] Neufeld R J, Peleg Y, Pines O, *et al.* L-Malic acid formation by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* amplified for fumarase. *Enzyme Microbial Technology*, 1991, 13(12): 991 ~ 997
- [3] Takata I, Tosa T *et al.* Reasons for the high stability of fumarase activity of *B. flavum* cells immobilized with K-carrageenan gel. *Applied Biotechnology*, 1983, 8(1): 39 ~ 48
- [4] Kozo Y, Tetsuya T, Kiyokazu Y *et al.* Continuous Production of L-malic acid by immobilized *Brevibacterium ammoniagenes* cell. *European Journal of Applied Microbiology*, 1976, 3: 169 ~ 175
- [5] HU Y H (胡永红), OUYANG P K (欧阳平凯). A new method and the kinetics of production of L-malic acid on immobilized cells. *Chemical Reaction Engineering and Technology* (化学反应工程与工艺), 1995, 11(1): 13 ~ 17
- [6] HU Y H (胡永红), CHEN W L (陈武领), OUYANG P K (欧阳平凯). Dissolution behaviors for substrate calcium fumarate and product calcium malate in L-malic acid production. *Journal of Nanjing University of Chemical Technology* (南京化工大学学报), 1999, 21(3): 35 ~ 38

Study on the Optimal Conditions in Simultaneous Reaction and Separation for L-malic Acid Production

HU Yong-Hong* OUYANG Ping-Kai SHEN Shu-Bao CHEN Wu-Ling

(College of Life Science and Pharmacy, Nanjing University of Chemical Technology, Nanjing 210009, China)

Abstract Based on the principle of coupling reaction and separation process, free cells containing fumarase were used for producing L-malic acid. The calcium fumarate was used as substrate to produce calcium malate directly. This new method was more advantageous than the traditional immobilized cells conversion system in aspects such as simple equipment and operation, high conversion efficiency and the yield of product. The results showed that at reaction temperature 40°C, pH7.0 ~ 7.5, reaction time 20 ~ 28h, the conversion efficiency was up to 99.9% and about 3.2kg calcium fumarate was converted to calcium malate per liter enzyme suspension. Also, L-malic acid produced in free fumarase system satisfied USP criterion, the residual fumaric acid was less than 0.1% and the cost was approximately to that of DL-malic acid produced by chemical synthesis.

Key words integrated process, calcium fumarate, calcium malate, fumarase

Received: February 19, 2001

This work was supported by Grant from China Ministry of Chemical Industry (98-G-06) and National Science Foundation (29976019)

* Corresponding author. Tel: 86-25-3316755; Fax: 86-25-3411316; E-mail: wgyang@jlonline.com