

L-苹果酸研究进展

吴清平 周小燕

(广东省微生物研究所, 广州)

(一) 前言

苹果酸又名羟基琥珀酸或羟基丁二酸。L-型苹果酸广泛存在于自然界中, 而化学合成的苹果酸, 则为 L-型和 D-型的混合物^[1]。

早在本世纪 60 年代, 美、英等国就已开始采用化学合成法少量生产 DL-苹果酸。随着食品工业的发展, 一些国家相继建厂投产, 产量不断增加。目前国际市场上的苹果酸主要为 DL-苹果酸。然而由于 D-苹果酸的生理活性低, 美国粮食和药物管理局 (FDA) 规定: DL-苹果酸不能用于婴儿食品添加剂。因此, 广大消费者迫切要求生产天然苹果酸即 L-苹果酸, 从而掀起了一些国家竞相研究的热潮^[1-9]。

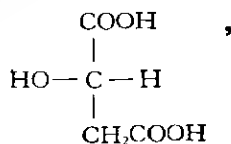
L-苹果酸广泛存在于水果和蔬菜中, 尤其以未成熟的水果中为多, 约占水果重量的 0.4—0.7%。早期获得的 L-苹果酸, 乃是从水果压榨汁中提取的^[1,10]。随着研究的深入, 本世纪初人们发现某些酵母及曲霉等在代谢过程中能积累 L-苹果酸, 从而开始了采用这些特定微生物发酵淀粉、糖类及富马酸转化法 (又名延胡索酸) 生产 L-苹果酸的研究, 但产酸率均较低, 因此没有工业生产价值^[11,12]。1959 年日本的 Kitahara 等^[1]利用短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 产生的富马酸酶催化化学合成的富马酸转化为 L-苹果酸获得成功, 打破了 L-苹果酸生产长期徘徊不前的局面。此后日本在这方面做了大量的研究, 在世界各国的 L-苹果酸研究中居领先地位。1974 年, 日本采用固定化富马酸酶的方法开始建厂进行小批量生产, 产品主要应用于医药工业, 但尚不能满足食品工业的大量需求^[1]。由于人们对化学合成的富马酸为原料生产 L-苹果酸尚有看法, 因此迄今包括日本在内的世界上许多国家仍在进行以天然糖质

原料利用霉菌单一菌种发酵^[1]、霉菌加细菌或酵母混种发酵^[13]生产 L-苹果酸的研究, 但均未形成工业化生产能力。

值得提出的是, 几十年来人们对 L-苹果酸的测定方法进行了长期研究, 已使方法日趋简便、精确与完善^[14-20]。随着科学技术的进步, 对 L-苹果酸在微生物中的代谢途径和积累机制进行了较深入研究, 并取得一定进展^[21-23]。另外, 人们对 L-苹果酸性质的研究, 促进了对它的开发和利用, 其用途愈来愈广泛^[1,2]。

(二) L-苹果酸的理化性质

L-苹果酸的化学结构式为,



分子式为 $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_5$, 分子量为 134.09。

在常温下, L-苹果酸为白色结晶或结晶性粉末, 无臭, 有爽快的酸味, 比重 1.601, 熔点 98—99℃。在 20℃ 下, 34% 的 L-苹果酸水溶液无旋光性, 加水稀释后可出现左旋, 当其浓度超过 34% 时, 又出现右旋。

由于 L-苹果酸分子中含有 —OH 基及 —COOH 基, 因此对极性溶媒的溶解度大, 化学性质较为活泼。在常温下它极易溶于乙醇及乙醚中, 在水中其溶解度随水温的升高而增大, 呈强酸性。其酸性随浓度的升高而增加, 可进行两步解离 ($K_1 = 3.9 \times 10^{-4}$, $K_2 = 7.5 \times 10^{-6}$)。另外, 它还能与醇类、浓硫酸、苯酚、过氧化氢、三氯乙醛及醋酸铅等发生反应, 并能与 β -萘酚、间苯萘酚及 2,7-萘二酚作用, 使溶液呈不同

本文承广东省微生物研究所陆大京研究员的审阅, 深表谢意。

的颜色^[17]。

(三) L-苹果酸在微生物中的代谢途径

L-苹果酸是生物体代谢过程中所产生的重要有机酸。在微生物中,它的产生与多条重要的代谢途径有关,出现于三羧酸循环(TCA)及其支路乙醛酸循环中,也是 CO_2 固定反应的产物^[23,24]。

几十年来,人们对L-苹果酸在微生物中的代谢途径进行了研究,尤其对裂褶菌(*Schizophyllum commune*)代谢途径的研究比较深入^[3,8,11,21,23,24]。目前从事这方面工作的研究者大都认为 CO_2 固定反应是L-苹果酸生成及积累的重要过程。其证据有3个:

1. 在糖质原料培养基中,必需有 CaCO_3 才能使L-苹果酸有效地积累起来。早在1925年,Kostychev等^[11]利用酵母发酵蔗糖时,发现只有在 CaCO_3 存在的条件下,才能测出L-苹果酸的存在。后人的许多实验均证实了这一点^[13,24]。

2. 把 $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ 加入C或把 $^{14}\text{CO}_2$ 通入)培养基中,发酵后 ^{14}C 主要集中于L-苹果酸及L-天门冬氨酸中。1973年,Elhissy等^[3]发现赭曲霉(*Aspergillus ochraceus*)及黑色葡萄状穗霉(*Stachybotrys aspera*)的菌丝吸收 $\text{H}^{14}\text{CO}_3^-$ 后, ^{14}C 主要进入L-苹果酸及L-天门冬氨酸中。后来人们在研究青霉(*Penicillium isoriaeforme*)、裂褶菌及黑曲霉(*A. niger*)的代谢物时,亦得出了类似结果^[21,24]。

3. 生物素、丙酮酸及磷酸烯醇丙酮酸(PEP)对L-苹果酸的合成具有促进作用。1967年,Tachibana等利用裂褶菌固定 CO_2 产生L-苹果酸时,发现加入在羧化及脱羧反应中起辅酶作用的生物素能使L-苹果酸的积累大大增加,而且当将生物素及丙酮酸同时加入培养基中时,效果更加明显。1985年,Takiyuki等利用裂褶菌固定 CO_2 发酵淀粉生产L-苹果酸时,又发现在细胞抽提物中加入磷酸烯醇丙酮酸能明显提高L-苹果酸产量,而加入苹果酸脱氢酶却没有作用。从而较明确地提出了L-苹果酸在裂褶菌中的可能代谢途径^[24]。

L-苹果酸在微生物中的代谢途径($\text{C}_3 + \text{C}_1 = \text{C}_4$)与植物光合作用中的 C_4 途径相似。许多实验说明给正在培养中的微生物一定的光照及 O_2 等条件,同样能促进L-苹果酸的合成及积累^[21,24,25]。此外,可溶性的无机磷,合适的碳、氮源和某些金属离子等均有利于L-苹果酸的合成^[8]。

除了 CO_2 固定作为L-苹果酸合成的重要过程之外,一些实验还证实了L-苹果酸积累尚有一些特殊机制在起作用。1983年,Tachibana等^[23]在产酸培养基中加入核黄素,利用裂褶菌发酵生产L-苹果酸的过程中,发现在发酵液中产生了两种新的代谢物——黄素物质 SF_1 (VB_2 -酸)及 SF_2 (VB_2 -醛)和它们专一性辅助的新酶。它们直接与形成FMN及FAD的过程相竞争,一方面造成辅助催化L-苹果酸脱羧为丙酮酸的FAD明显缺乏,使L-苹果酸的分解减少;另一方面由于 SF_1 及 SF_2 的直接作用,有利于L-苹果酸积累和分泌。另外,一些实验^[22]还表明,表面活性剂脂肪酸酯可促进L-苹果酸的积累及分泌,但其作用机制有待于进一步研究。

(四) L-苹果酸的测定

早期对L-苹果酸的测定,是从确定植物抽提物及水果中的有机酸含量而开始的。现已从化学方面及生物学方面对L-苹果酸的测定方法进行了全面深入的研究,使L-苹果酸的测定逐步从手工操作,过渡到仪器自动化分析,方法日趋多样,愈来愈简便、精确。到目前为止,化学方法有:滴定法、旋光法、纸层析法、薄层层析法、2,7-萘二酚法、气相色谱法、液相色谱法、离子色谱法、荧光分光光度法及毛细管等速电泳法等^[14-20];生物学方法有:裂殖酵母法和酶法等^[15,24]。

在这些化学方法中,早期发展起来的滴定法及旋光法特异性差,易受杂质干扰,误差大,人们已很少采用了。取而代之的纸层析法及薄层层析法^[16],能同时对大批样品进行定性或半定量测定,方法简便,成本极低,现仍为许多人所接受^[2,24]。1957年,由Goodban等^[17]建立的

2, 7-萘二酚法, 由于能作比较准确的 L-苹果酸含量分析, 且所需仪器简单、成本低, 因此现被作为定量测定中比较经典的方法而广泛使用^[4,9,26]。然而, 随着分析仪器的迅速发展, 这种方法显得较麻烦, 许多有条件的地方采用了自动化程度高、重现性好的气相色谱法或液相色谱法来进行定量分析^[18,26]。因为样品前处理较复杂, 所以近年来, 操作简便、灵敏、快速的离子色谱法^[14]及荧光分光光度法^[15]应运而生, 并得到迅速发展。但由于这两种方法所需仪器昂贵、成本高、因此普及困难。毛细管等速电泳法^[20]与上述方法比较起来, 具有快速、准确、成本低的特点, 但这种仪器目前尚未普遍使用。

作为 L-苹果酸生物学测定方法的裂殖酵母法及酶法, 虽操作简易、误差较小, 但由于催化反应的酶本身特异性不高, 易于催化其它底物, 使测定结果产生误差。同时, 酶制剂的保存及裂殖酵母的来源也会给分析工作带来困难, 因而它们的应用也受到相当大程度的限制^[15]。

(五) L-苹果酸的生产

L-苹果酸的生产经过人们的不断努力, 已从早期单一的直接提取法, 发展到今天的多种生产方法。按生产原料的不同, 大致可将 L-苹果酸的生产分为 5 种:

1. 直接提取法^[19]。把石灰乳直接加入富含 L-苹果酸的果汁及蔬菜汁中, 形成的 L-苹果酸钙沉淀用硫酸处理, 然后再回收游离的 L-苹果酸。

2. 拆分法。在一定条件下, 糖醛、 β -内酯、环戊二烯及丁烯二酸等均可合成 DL-苹果酸。将化学合成的 DL-苹果酸拆分就可获得 L-苹果酸^[1]。

3. 利用微生物转化富马酸生产 L-苹果酸。到目前为止, 筛选出来具有较高富马酸酶活性的菌种有短乳杆菌、产氨短杆菌 (*Brevibacterium ammoniagenes*)、黄色短杆菌 (*B. flavum*)、脱氮副球菌 (*Paracoccus denitrificans*)、副肠杆菌 (*Paracolobacterium sp.*)、解脂假丝酵母 (*Candida lipolytica*) 及温特曲霉 (*A. wentii*) 等^[1,2,4,7,27,28]。现在工业生产上多采用产氨

短杆菌及黄色短杆菌含有的富马酸酶催化化学合成的富马酸一步转化生产 L-苹果酸。目前采用的方法有固定化酶与固定化细胞两种。由于固定化细胞比固定化酶有着许多优点, 其副反应可通过胆汁预先处理固定化凝胶粒子得到解决, 因此当前工业生产正朝着固定化细胞方向发展^[1,4,27]。深入的研究还表明, 采用卡拉胶 (carrageenan) 与聚乙烯亚胺 (polyethyleneimine) 代替聚丙烯酰胺 (polyacrylamide) 等作为固定化细胞的凝胶载体, 可减少毒性, 提高固定化细胞中富马酸酶的活性, 使固定化细胞半衰期寿命得到延长, 相对生产能力增加数倍^[1,27]。目前日本采用此法的转化率已高达 98% 以上^[4]。

4. 利用微生物发酵糖质原料生产 L-苹果酸。采用此法的生产途径有两条: 第一条是用单一菌种一步发酵生产 L-苹果酸, 所用的菌种有黄曲霉 (*A. flavus*)、寄生曲霉 (*A. parasiticus*)、米曲霉 (*A. oryzae*)、裂褶菌、胶质干朽菌 (*Merulius tremellosus*) 及出芽短梗霉 (*Aureobasidium pullulans*) 等^[1,24]; 第二条是混种发酵两步生产 L-苹果酸, 首先采用少根根霉 (*Rhizopus arrhizus*) 或华根霉 (*R. chinensis*) 把糖质原料转化成富马酸, 然后利用膜醭毕赤酵母 (*Pichia Membranefaciens*)、普通变形杆菌 (*Proteus vulgaris*) 及宛氏拟青霉 (*Paecilomyces varioti*) 之一, 把富马酸转化成 L-苹果酸^[13]。由于发酵周期较长, 产酸率相对较低、副产物较多, 因此直到目前为止还尚未见有应用于大规模工业生产的报告^[1]。

5. 利用微生物发酵非糖质原料生产 L-苹果酸。目前人们已成功地采用布伦假丝酵母 (*C. brumptii* IFO 0731) 发酵正构石蜡 (n-paraffins), 宛氏拟青霉 AHU9417、9254 及 8007 发酵乙醇、甘油、醋酸及丙酸等, 类产碱菌 (*Alcaligenes sp.* T501) 发酵马来酸, 其转化率分别达 80%、48% 及 98.4%。但这些非糖质原料发酵生产 L-苹果酸的试验目前仍处于实验室阶段, 尚未投入工业生产^[6,9,26]。

有关发酵液中 L-苹果酸的提取方法, 随采

取的发酵方法不同而有所差别。采用微生物发酵富马酸直接转化生产 L-苹果酸的途径,其提取方法相对简单,目前常用的有阴、阳离子交换树脂交换法及非极性多孔合成吸附剂填充柱吸附法等两种^[1,2,5,29]。而利用微生物发酵糖质原料生产 L-苹果酸的途径,其提取方法相对复杂,与从发酵液中提取柠檬酸的方法相似。

(六) L-苹果酸的用途

L-苹果酸在水中溶解度大、酸味柔和、风味别致、质地稳定,其用途相当广泛^[1,2],归结起来主要有如下几个方面:

1. 在食品工业上, L-苹果酸是国际上公认的一种安全性食品添加剂,也是一种优良的调酸剂和保鲜剂。与柠檬酸相比, L-苹果酸的刺激较为缓慢,酸味可保留较长时间,与柠檬酸配合使用,可以模拟天然果实的酸味特征,使甜酸口感显得自然、丰满。调谐。现在欧美及日本各国的食品生产中,它已成为不可缺少的基本原料之一。另外,由于食品中添加 L-苹果酸可使 pH 值得到调整,加上其本身固有的抗菌作用,因此 L-苹果酸亦被广泛地用于其它食品工业,如作水产品的保鲜剂等。

2. 在医药上, L-苹果酸具有重要的生理功能。L-苹果酸直接参与人体代谢,对人体的健康有帮助。可用于治疗贫血、肝功能不全、肝衰竭,并可作混合氨基酸注射液的组分和乳酸钙注射液的安定剂。把 L-苹果酸加入药物中还可增进药物的稳定性、改善人体对药物的吸收能力。L-苹果酸钾可作为钾的重要来源,亦具防止水肿、血压过高及脂肪积聚之功效。L-苹果酸及其盐类还能作动物的生长促进剂。

3. 工业上的其它用途。由于 L-苹果酸具抗氧化作用和较强的螯合作用,因此广泛地应用于印染工业作为保色剂和增效剂。在化学工业方面,由于 L-苹果酸可调节 pH 值,因此可作牙膏及烟草的调味剂、皮肤清洁剂、焊锡助焊剂、空气清新剂、洗涤剂助剂和废气脱硫剂,还可代替柠檬酸作为各种金属容器及表面的除锈剂。在建材上,添加适量的 L-苹果剂于水泥中,可缩短凝固时间,防止碱性凝聚反应的发

生,提高混凝土的强度。L-苹果酸还可代替草酸作为各种石块的表面清洗剂,使其表面变得光滑、平整和美观。

参 考 文 献

- [1] 金其荣: 食品科学, **2**: 12—19, 1988.
- [2] 杨廉婉等: 微生物学报, **20**(3): 296—302, 1980.
- [3] Elhissy, F. T.: *Fac. Sci., Assint. Univ.*, **2**(1) 13—29, 1973. (C. A. 84:147413e)
- [4] Hideaki, Y. et al.: *Process Biochem.*, **21**:164—166, 1986.
- [5] Nakachi, A. et al.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP*, 61178948, 1986.
- [6] Shunichi, S. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **41** (6): 967—973, 1977.
- [7] SWAM Progetti S. P. A.: *Japan Kokai*, 75155681, 1975.
- [8] Tachibana, S. et al.: *Hokko kogaku Zasshi*, **45** (7):602—606, 1967. (C. A. 69: 1972w)
- [9] Takao, S. et al.: *J. Ferment.*, **55** (2):196—199, 1977.
- [10] Lee, Y. K.: *Brit UK Pat. Appl.*, 203141a. 1980.
- [11] Kostychev, S. et al.: *Z. Physiol. Chem.*, **146**:276, 1925. (C. A. 20:474)
- [12] Teizo, T. et al.: *Bull. Agric. Chem. Soc. Japan*, **4**:34—38, 1928.
- [13] Takao, S. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **6** (16): 643—645, 1983.
- [14] 胡正芝等: 食品与发酵工业, **1**: 8—24, 1987.
- [15] 黄志先等: 食品与发酵工业, **6**: 26—29, 1985.
- [16] David, M. et al.: *Bot. Kozl.*, **67** (2):155—157, 1980. (C. A. 95:202141u)
- [17] Goodban, A. E. et al.: *Anal. Chem.*, **29**:283—287, 1957.
- [18] Hsiao-Tsulo, W. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, **130**: 1051—1059, 1984.
- [19] Selmece, G. et al.: *Elcilmiszervi-Zigalasi Kozl.*, **27**(3):135—138, 1981. (C. A. 98:15395e)
- [20] Farkas, J. et al.: *Kvasny Prum.*, **28** (11):256—260, 1982. (C. A. 98:124064s)
- [21] Piskorz-Binczycka.: *Acta. Biol. Cracov., Ser. Bot.*, **21**(2):93—100, 1978. (C. A. 91: 136780r)
- [22] Sasaki, Y. et al.: *Hakko Kogaku Zasshi*, **45**(3): 211—217, 1967. (C. A. 69:9729b)
- [23] Tachibana, S. et al.: *Molecular and Cellular Biochem.*, **51**:149—160, 1983.
- [24] Takayuki, S. et al.: *J. Brew. Soc. Japan*, **80**(10): 677—681, 1985.
- [25] Suzuki, Y.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP*, 60133881, 1985.
- [26] Takuhei, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, **50** (1): 89—94, 1986.
- [27] Takaka, J. et al.: *J. Ferment. Technol.*, **60** (5): 431—437, 1982.
- [28] Yasudo, A. et al.: *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP*, 7976894, 1979.
- [29] Seipenbusch, R.: *Ger. Offen. DE.*, 3434918, 1986, (C. A. 105:59476z)