

NAU



南京农业大学
NANJING AGRICULTURAL UNIVERSITY

发酵工程



第七章 典型工业发酵工艺

第七章 各论

❧第一节 维生素C两步法发酵工艺

❧第二节 谷氨酸发酵工艺

第一节 两步发酵法生产维生素C

- 维生素C的结构和性质
- 维生素C的生产方法
- 维生素C的生产工艺进展

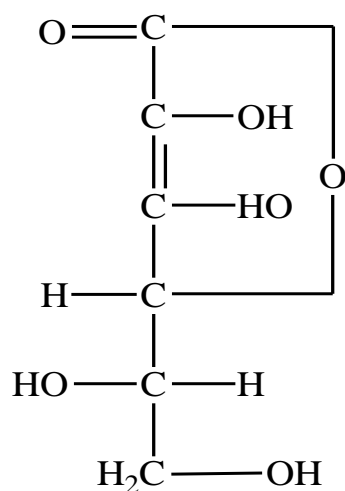
1、维生素C

又名抗坏血酸 (Ascorbic acid) 是细胞氧化-还原反应中的催化剂，它释放两个氢原子后变成氧化型维生素C。有供氢体存在时，脱氢抗坏血酸可以接受两个氢原子变成抗坏血酸，参与机体新陈代谢，增加机体对感染的抵抗力。

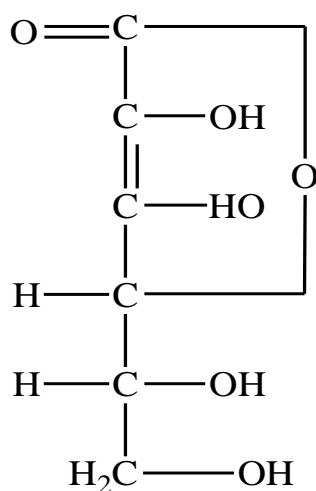
用于防止坏血酸（败血症）和抵抗传染性疾病，促进创伤和骨折愈合，以及用作辅助治疗药物。

2、维生素C的化学结构

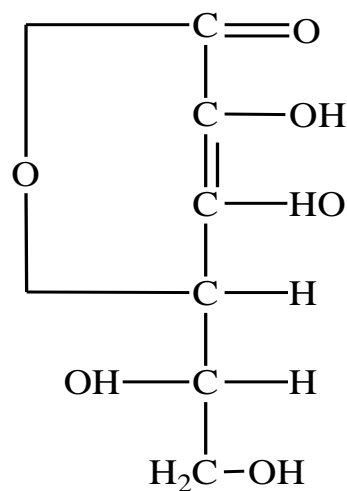
维生素C(多羟基不饱和内酯衍生物)分子中有两个手性碳原子,故有4种光学异构体,其中L (+) 抗坏血酸效果最好, 其他三种临床效果很低或无效。



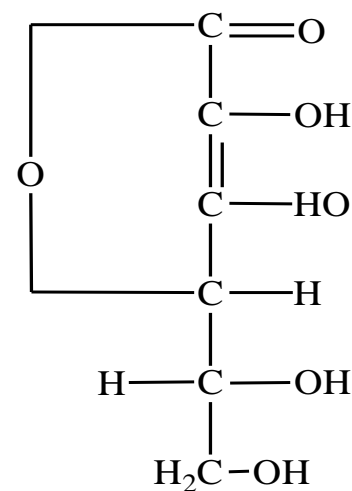
L-抗坏血酸



D-抗坏血酸



L-异 抗坏血酸



D-异抗坏血酸

3、维生素C的性质

白色粉末，无臭、味酸、熔点190-192℃，易溶于水，略溶于乙醇，不溶于乙醚、氯仿及石油醚等。

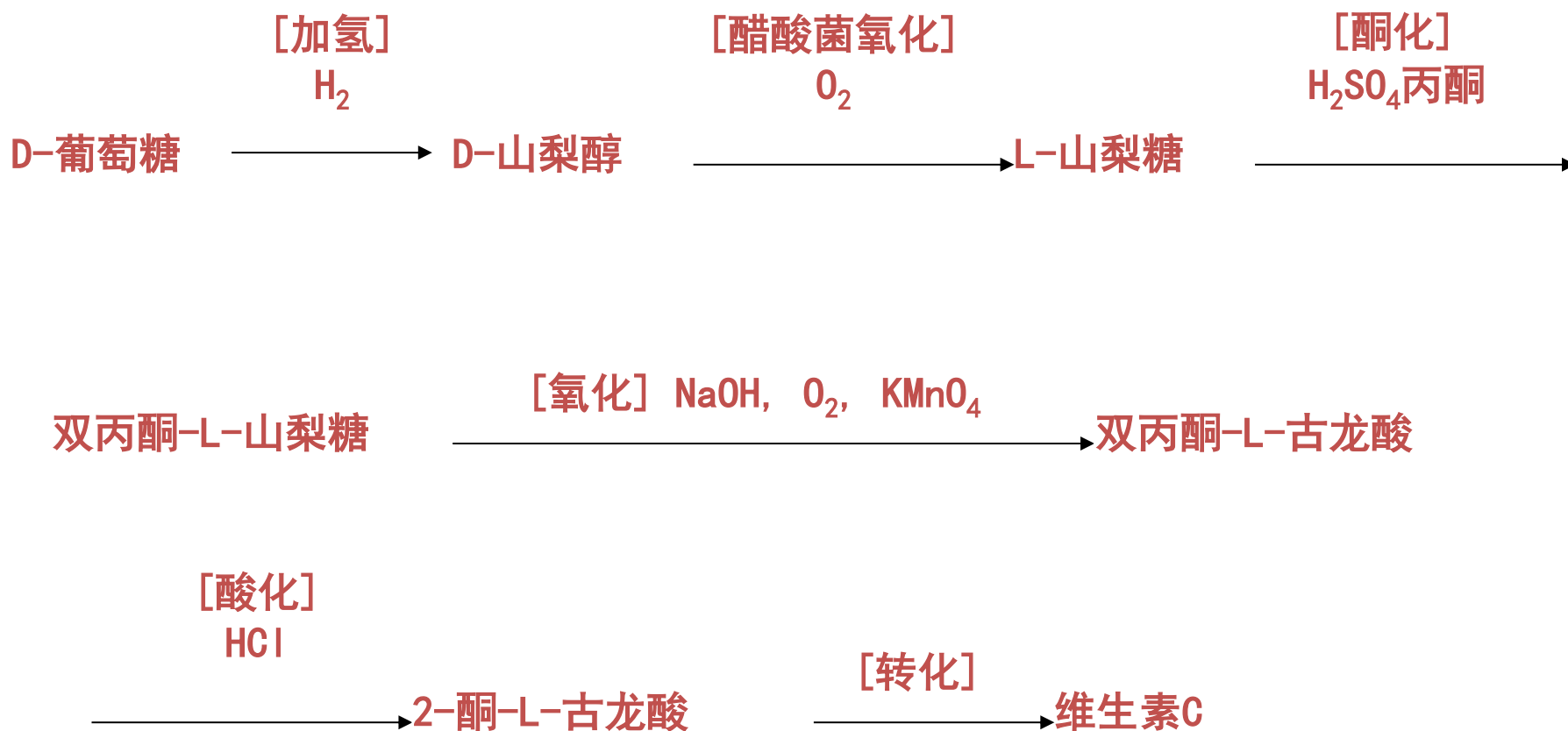
是一种还原剂，易受光、热、氧等破坏，**尤其在碱液中或有微量金属离子存在时，分解更快**，但干燥结晶较稳定。

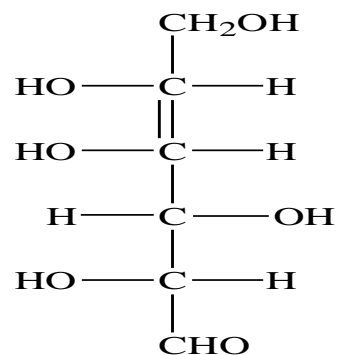
4、维生素C的生产方法

(一) 莱氏法

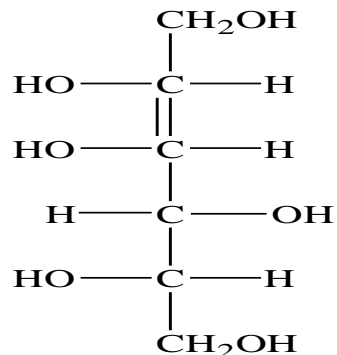
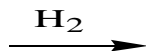
莱氏法: 是维生素C生产的经典方法, 是由Reichstein和Grussner研究开发的。系以葡萄糖作为起始原料, 经催化加氢制成D-山梨醇, 再经醋酸杆菌深层发酵氧化制得收率很高的L-山梨糖, L-山梨糖经丙酮和硫酸处理 (生产上俗称丙酸化) 生成双丙酮-L-山梨糖 (简称双酮糖), 再用苯或甲苯提取, 提取液经水法除去单酮山梨糖后蒸去溶剂而后分离出来, 用高锰酸钠氧化、水解、酯化、转化、中和便得VC。

工艺路线

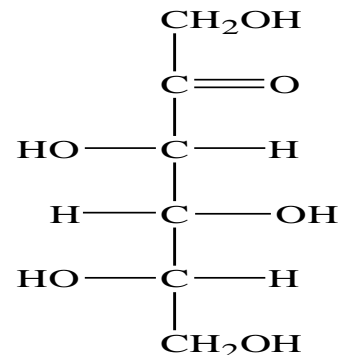
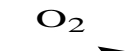




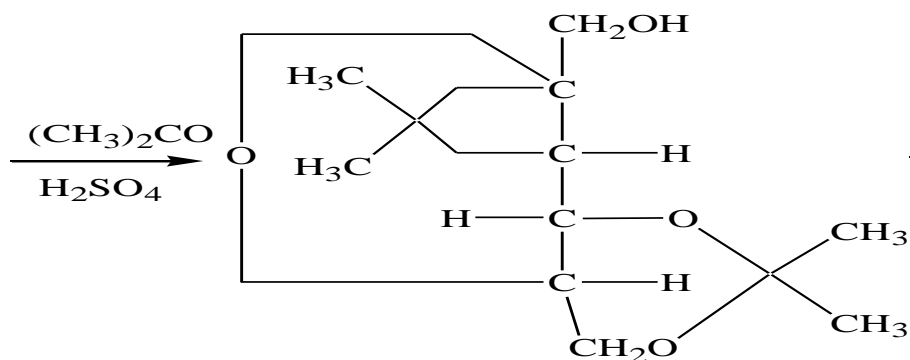
D-葡萄糖



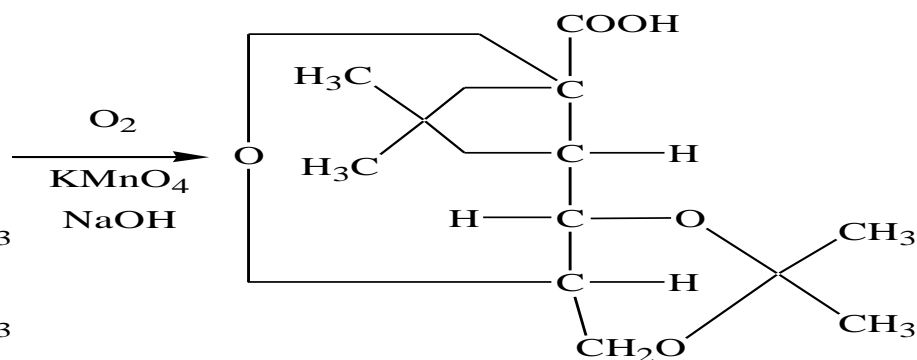
D-山梨醇



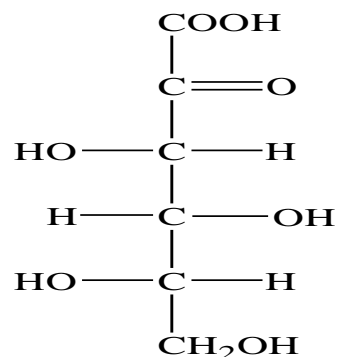
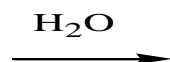
L-山梨醇



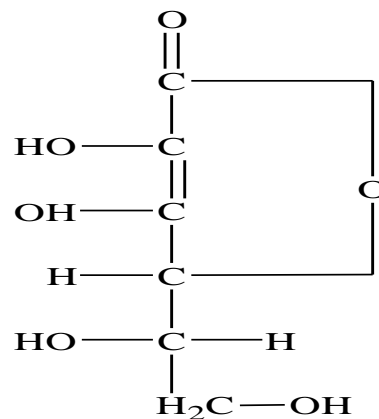
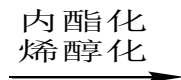
双丙酮-L-山梨糖



双丙酮-L-古龙酸



2-酮基-L-古龙酸



维生素-C

(二) 二步发酵法

二步发酵法是相对莱氏法而言的，是中国科学院微生物研究所和北京制药厂于1975年合作发明的，此法进一步发展了维生素C的生产，是目前唯一成功应用于维生素C工业生产的微生物转化法。

过程为山梨醇发酵生成山梨糖后，山梨糖又经第二步细菌氧化，直接生成2-酮基-L-古龙酸，而废除了丙酮化和化学氧化两个步骤。

(二) 两步发酵法

与国际上同类工作先进水平比较，**中国微生物所等单位所发明的用于维生素C生产的二步发酵法**具有4大优势：

1. 以生物氧化代替化学氧化，省掉了酮化反应；
2. 节约了大量易燃、易爆、有毒的化工原料，大大减少了“三废”处理，改善了劳动条件，利于安全生产；
3. 减少工业用粮、生产工序和生产设备，缩短了生产周期，降低了原料成本；
4. 与国外二步发酵法比较，其发酵规模和产酸量均居领先地位。

以当年北京制药厂年产150吨维生素C车间为例：

采用二步发酵法新工艺后，每年可节约丙酮297吨（相当于237.8万斤粮食）；节省其他化工原料2600多吨和主要设备58台；降低了原料成本10%。据报，目前国内已有年产3万多吨维生素C的生产能力，若全部开动生产，其产生的经济效益和社会效益、生态环保效益是无法估量的。

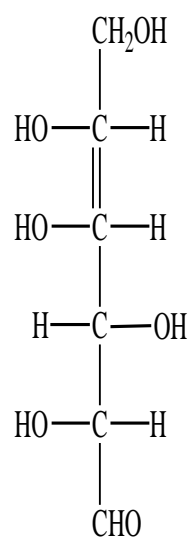
(1) 工艺路线

第一步:

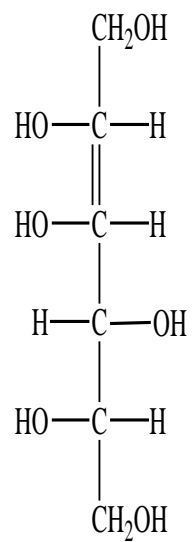
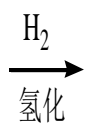


第二步:

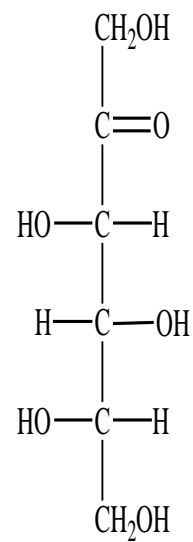
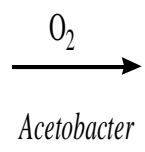




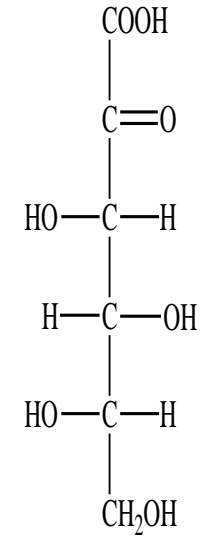
D-葡萄糖



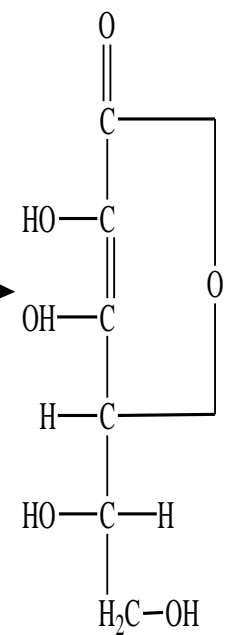
D-山梨醇



L-山梨醇



2-酮基-L-古龙酸



维生素-C

(2) 工艺过程

- a、第一步发酵** 以D-葡萄糖为原料，加氢催化生成D-山梨醇，再加入假单孢杆菌氧化获得L-山梨糖。
- b、第二步发酵** L-山梨糖通过小菌氧化葡萄糖酸杆菌和大菌巨大芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌等伴生菌混合发酵得维生素C前体2-酮基-L-古龙酸。

c、提取 采用弱碱性离子交换树脂从发酵液中直接提取2-酮基-L-古龙酸（新工艺），用甲醇-硫酸溶液洗脱,将洗脱液直接内酯化、烯醇化为维生素C（新工艺）。

d、精制 将上述维生素C通过活性炭脱色，于结晶罐内加入晶种结晶，冷乙醇洗涤，低温干燥，即可获得精品维生素C。

①加热沉淀法

加热沉淀法是2-酮基-L古龙酸分离提纯的传统工艺，分离手段较为落后。此工艺通用氢型树脂，调 pH至蛋白质的等电点后加热除蛋白。采用此工艺会造成有效成分在高温下降解损失，且发酵液直接通过树脂柱，造成树脂表面污染，降低树脂的交换容量和收率。两次通过树脂柱带进了大量水分，也增大了浓缩耗能。

②化学凝聚法

化学凝聚法是通过加入化学絮凝剂来除去蛋白质、菌体、色素等杂质，避免了加热沉淀时有效成分的损失。季光辉等采用化学凝聚法对VC发酵液进行预处理，使2-酮基-L-古龙酸的滤液质量提高，提取前步收率提高5.2%，VC总收率提高2.5%以上。以壳聚糖为主凝剂，聚丙烯酰胺为助凝剂，通过化学凝聚法除蛋白工艺。提取收率由原来的76%提高到82%，古龙酸优级品率由原来的35%提高到60%，成本比原来降低20%。

但是化学凝聚法也存在许多不足，比如在处理后的发酵液离心后所得的上清液中任然存在一定量的蛋白，如果发酵液染菌则处理效果更不明显，上清液浑浊，严重影响了产品的品质和收率。此外，化学凝聚法在操作过程中也会对环境造成污染。

③超滤法

超滤是一种新兴的膜处理技术，此法具有操作方便、节能、不造成新的环境污染等优点，因此在2-酮基-L-古龙酸的分离提纯中的应用日益广泛。此法与加热沉淀法不同的是，可在常温下操作，可减少有效成分的损失；在用膜除蛋白的过程中，无任何新的化学物质加入，可减少对树脂的污染和损耗，降低酸碱用量，减少三废排放。与化学凝聚法不同的是，在处理染菌的发酵液时仍可达到较好的处理效果。我国的东北制药厂1995年从丹麦引进目前全国最大膜面积的平板超滤装置后，2-KLG的分离提纯成本比原先的化学凝聚法节约了600万元，其收率和生产的自动化、连续化程度也明显提高。

转化工艺

无论是莱氏法还是二步发酵法制得的2-酮基-L-古龙酸，目前在生产上都是通过化学反应过程转化为VC。根据所选试剂的不同，二步发酵法可分为酸转化法和碱转化法。

①酸转化法

VC化学转化生产，自莱氏法建立以来就采用浓盐酸催化2-酮基-L-古龙酸，一步制得 VC。国外有关学者对此法进行了许多研究。印度 Ahmedbad Textile工业研究协会研究表明，在以饱和氯代烃(如 CHCl_3)、芳烃(如苯、甲苯)为溶剂，由 2-酮基-L-古龙酸与浓盐酸在 $60-75^\circ\text{C}$ 下反应 4-6h，可制得纯度为90 % 的粗VC。美国学者YOD ICE 等于1985年报道了2-酮基-L-古龙酸与浓盐酸在表面活性剂 $\text{Me}(\text{CH}_2)_5\text{N} + \text{Me}_3\text{Cl}$ 的甲苯溶液中反应，可制得纯度超过99%的VC。

②碱转化法

我国 VC生产厂家均采用碱法转化2-酮基-L-古龙酸生产VC。东北制药总厂等生产单位将2-酮基-L-古龙酸与甲醇在浓硫酸催化下生成2-酮基-L-古龙酸甲酯，该酯在 NaHCO_3 作用下发生内酯化反应生成VC钠盐。该法避免了酸催化的上述缺点，且操作工艺简单，反应条件温和，适合于规模化生产，但是在生产中的反应周期过长，甲醇单耗高。有些单位尝试用 CH_3ONa 代替 NaHCO_3 进行碱转化，转化率可高达92.6%，但产品质量较差，且甲醇钠价格贵，造成生产成本较高。

特别注意：

在生产中，第一步要严格控制反应过程的pH为8.0~8.5，避免葡萄糖的C-2位差向异构物被还原成甘露醇。整个发菌期间，要保持葡萄糖酸杆菌数量的一定，小菌将L-山梨糖转化为2-酮基-L-古龙酸，而大菌本身不产酸，是搭配菌，其作用仅是通过刺激小菌的生长而促进小菌产酸。2-酮基-L-古龙酸首先在甲酯中用浓硫酸催化酯化成2-酮基-L-古龙酸甲酯，再加入碳酸氢钠转化成维生素C盐，经离子交换树脂酸化，在50~55℃下减压烘干即得粗品。

二步发酵法与莱氏法进行同等生产规模的经济指标比较， 其优缺点如下：

(1) 原料消耗 两步发酵法原料总单耗比莱氏法减少31.2%。

(2) 成本 两步发酵法原料成本比莱氏法降低了23.3%，工厂成本降低了3.6%。

(3) 质量 差别不大，在外观、含量、烘烤消光值、分解点、细度等主要控制项目上，两步发酵法略优；但在加速破坏试验中，莱氏法产品稳定性较好。

(4) 能耗 两步发酵法比莱氏法高出15%。

(5) 总收率（对山梨醇） 莱氏法比两步发酵法高出10%左右，主要原因是第二步微生物氧收率仍较低。

(6) 安全 两步发酵法由于革除了丙酮、苯（或甲苯）、氯气等大量易燃易爆或有毒的化工原料，有利于安全生产。

第二节 谷氨酸生产工艺

- 谷氨酸生产概述
- 谷氨酸生产流程
- 谷氨酸生产工艺

• 谷氨酸生产概述

- 起初工业化生产采取小麦或大豆蛋白质水解制取。
- 1957年，日本率先采用微生物发酵生产，并实现工业化，被誉为现代发酵工业的重大创举，使发酵工业进入调节调控水平。
- 目前世界产谷氨酸钠30吨/年，占氨基酸总量的2/3。
- 我国现有200余家生产，年产量达15万吨，居世界首位。

• 谷氨酸发酵生产流程

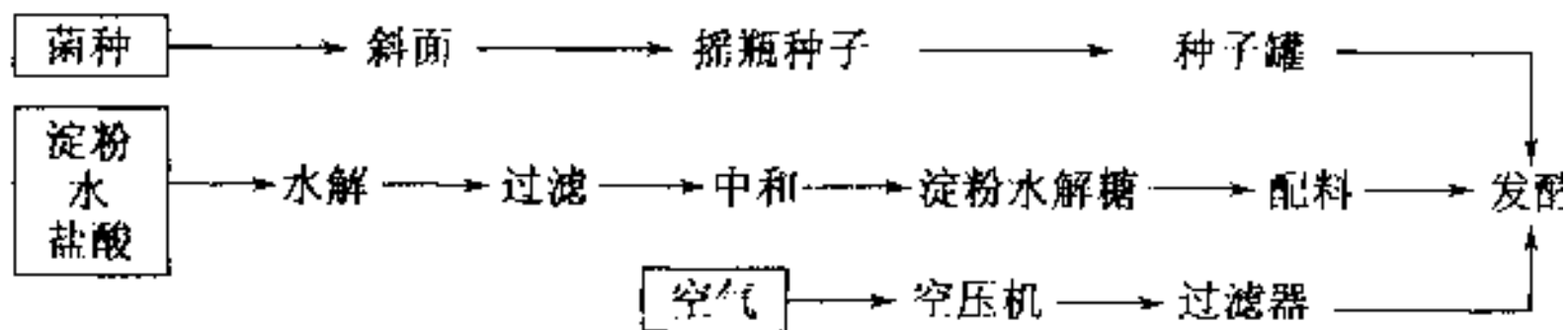


图 9-1 谷氨酸发酵工艺流程

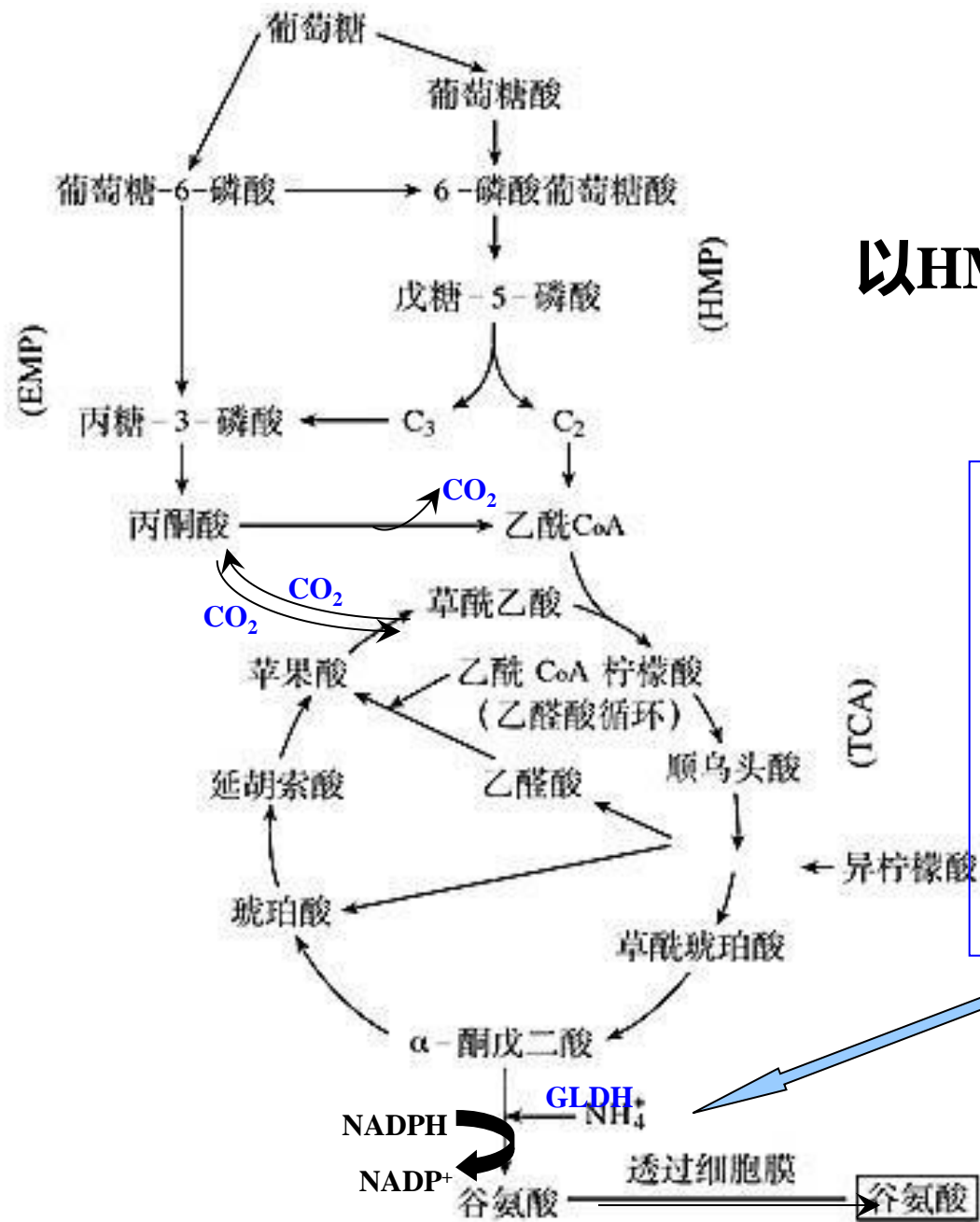
- 谷氨酸生产工艺

- 谷氨酸产生菌株特点

- 革兰氏阳性
- 不形成芽胞
- 没有鞭毛，不能运动
- 需要生物素作为生长因子
- 在通气条件下才能产生谷氨酸
- 不易被低浓度的谷氨酸抑制

- **谷氨酸生物合成机理**

由三羧酸循环中产生的 α -酮戊二酸，在谷氨酸脱氢酶和氢供体存在下进行还原性氨化作用而得到。



以HMP为主，HMP 约占90%

氨的导入方式：

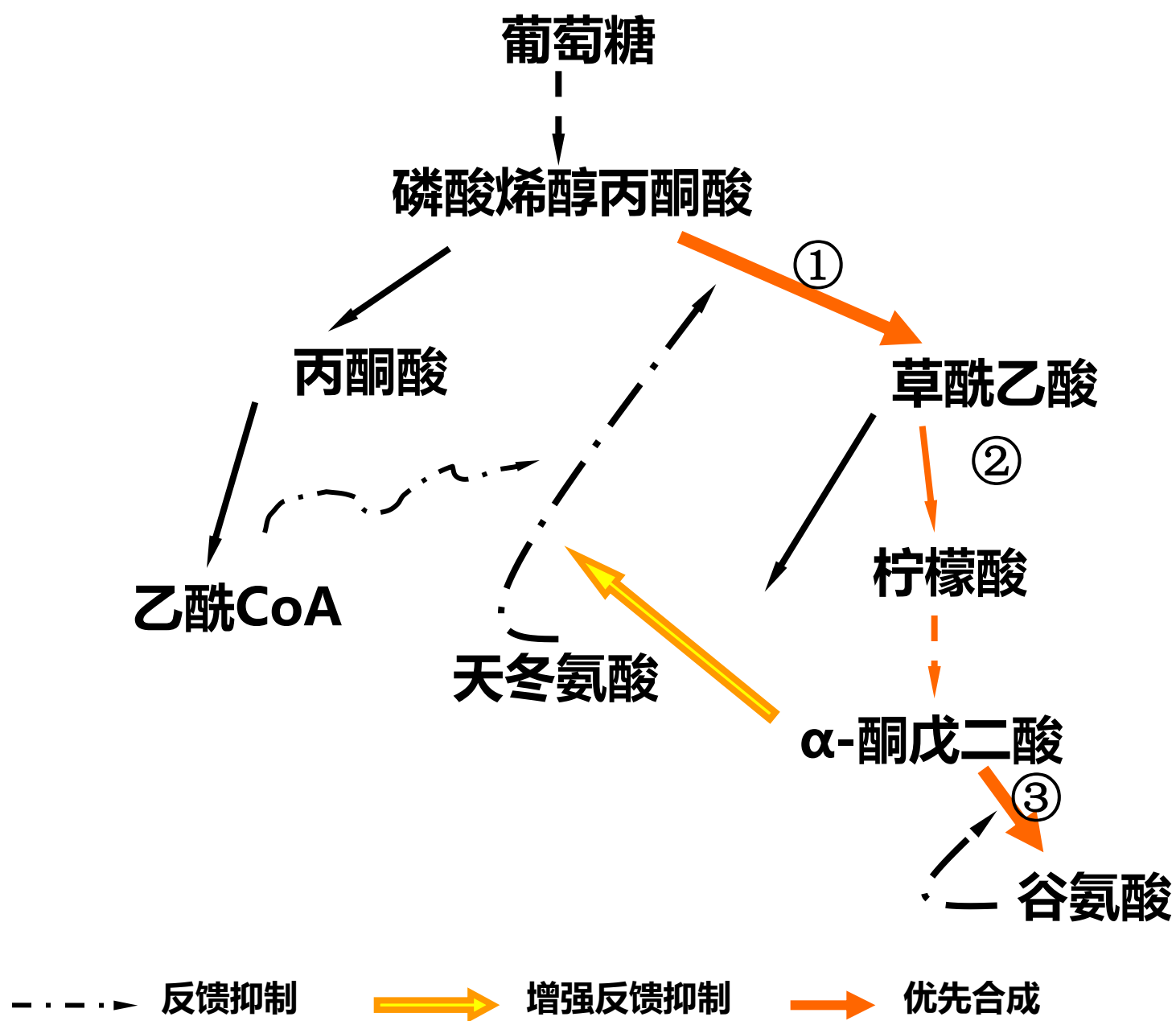
α -酮戊二酸还原氨基化→谷氨酸

由天冬氨酸或丙酮酸通过氨基转移，
将氨基转给 α -酮戊二酸

谷氨酸合成酶途径

图 5-7 谷氨酸的生物合成途径

GLDH: 谷氨酸脱氢酶



谷氨酸合成调节机制

- 影响谷氨酸合成的因素

因素	代谢途径
氧	乳酸或琥珀酸 $\xrightleftharpoons[\text{不足}]{\text{适量}}$ 谷氨酸
NH_4^+	α -酮戊二酸 $\xrightleftharpoons[\text{缺乏}]{\text{适量}}$ 谷氨酸 $\xrightleftharpoons[\text{适量}]{\text{过量}}$ 谷氨酰胺
pH	谷氨酰胺或N-乙酰谷氨酰胺 $\xrightleftharpoons[\text{过量}]{\text{适量}}$ 谷氨酸
磷酸盐	缬氨酸 $\xrightleftharpoons[\text{过量}]{\text{亚适量}}$ 谷氨酸

- **谷氨酸生产工艺**

1.1 淀粉的酸水解工艺

- 1、调浆：**干淀粉用水调成10-11°Bx ([白利度](#)) 的淀粉乳，加盐酸0.5-0.8%至pH 1.5。
- 2、糖化：**蒸汽加热、加压糖化25min。
- 3、中和：**冷却至80℃，烧碱中和至pH 4.0-5.0（避免产生焦糖又保证过滤，中和为沉淀胶体）。
- 4、脱色：**活性炭脱色和脱色树脂。活性炭用量为0.6-0.8%，在70℃及酸性条件下搅拌后过滤。

谷氨酸生产工艺

淀粉的酶法糖化工艺

以大米或碎米为原料时采用大米浸泡磨浆，再调成15°Bx，pH 6.0，加细菌 α -淀粉酶在85 °C下液化30 min，加糖化酶60 °C糖化24 h，过滤后可供配制培养基。

糖蜜原料

不宜直接用来作为谷氨酸发酵的碳源，因含丰富的生物素。

预处理方法：活性炭或树脂吸附和亚硝酸法破坏以减少糖蜜中的生物素。

也可以在发酵液中加入表面活性剂吐温60或添加青霉素。

2.1 菌种扩大培养

1、**斜面培养**：主要产生菌是棒状杆菌属、短杆菌属、小杆菌属、节杆菌属。

我国各工厂目前使用的菌株主要是钝齿棒杆菌和北京棒杆菌及各种诱变株。生长特点：适用于糖类原料，需氧，以生物素为生长因子。

斜面培养基：蛋白胨、牛肉膏、氯化钠组成的pH 7.0-7.2琼脂培养基，32 °C培养18-24 h。

菌种扩大培养

2、一级种子培养：由葡萄糖、玉米浆、尿素、磷酸氢二钾、硫酸镁、硫酸铁及硫酸锰组成。pH 6.5 - 6.8。1000ml装200-250ml振荡，32℃培养12h。

菌种扩大培养

3、二级种子培养：用种子罐培养，料液量为发酵罐投料体积的1%，用水解糖代替葡萄糖，于32℃进行通气搅拌7-10h。种子质量要求：二级种子培养结束时，无杂菌或噬菌体污染，菌体大小均一，呈单个或八字排列。活菌数为 10^8 - 10^9 /ml。

3.1 谷氨酸发酵

1、**适应期**：尿素分解出氨使pH上升。糖不利用。2-4h。措施：接种量和发酵条件控制使该期缩短。

2、**对数生长期**：糖耗快，尿素大量分解使pH上升，氨被利用pH又迅速下降；溶氧急剧下降后维持在一定水平；菌体浓度迅速增大，菌体形态为排列整齐的八字形；不产酸；12h。**措施**：采取流加尿素办法及时供给菌体生长必须的氮源及调节pH在7.5-8.0；维持温度30- 32℃

谷氨酸发酵

3、菌体生长停止期：谷氨酸合成，糖和尿素分解产生 α -酮戊二酸和氨用于合成谷氨酸。**措施：**及时流加尿素以提供足够的氨并使pH维持在7.2-7.4。大量通气，控制温度34-37 °C。

4、发酵后期：菌体衰老，糖耗慢，残糖低。**措施：**营养物耗尽酸浓度不增加时，及时放罐。

发酵周期一般为30h。

谷氨酸发酵控制

(1) 生物素：作为催化脂肪酸生物合成最初反应的关键酶乙酰CoA的辅酶，参与脂肪酸的生物合成，进而[影响磷脂的合成](#)。当磷脂含量减少到正常时的一半左右时，细胞发生变形，谷氨酸能够从胞内渗出，积累于发酵液中。生物素过量，则发酵过程菌体大量繁殖，不产或少产谷氨酸，代谢产物中乳酸和琥珀酸明显增多

谷氨酸发酵控制

(2) 种龄和种量的控制

一级种子控制在11-12h，二级控制在7-8h。接种量为1%。过多，菌体娇嫩，不强壮，提前衰老自溶，后期产酸量不高。

谷氨酸发酵控制

(3) pH

发酵前期，幼龄细胞对pH较敏感，pH过低，菌体生长旺盛，营养成分消耗大，转入正常发酵慢，长菌不长酸。

谷氨酸脱氢酶最适pH为7.0-7.2，转氨酶最适pH 7.2-7.4。在发酵中后期，保持pH不变。过高转为谷氨酰胺，过低氨离子不足

谷氨酸发酵控制

(4) 通风：不同种龄、种量，培养基成分，发酵阶段及发酵罐大小要求通风量不同。

在长菌体阶段，通风量过大，生物素缺乏，抑制菌体生长。

在发酵产酸阶段，需要大量通风供氧，以防过量生成乳酸和琥珀酸，但过大通风，则大量积累 α -酮戊二酸。

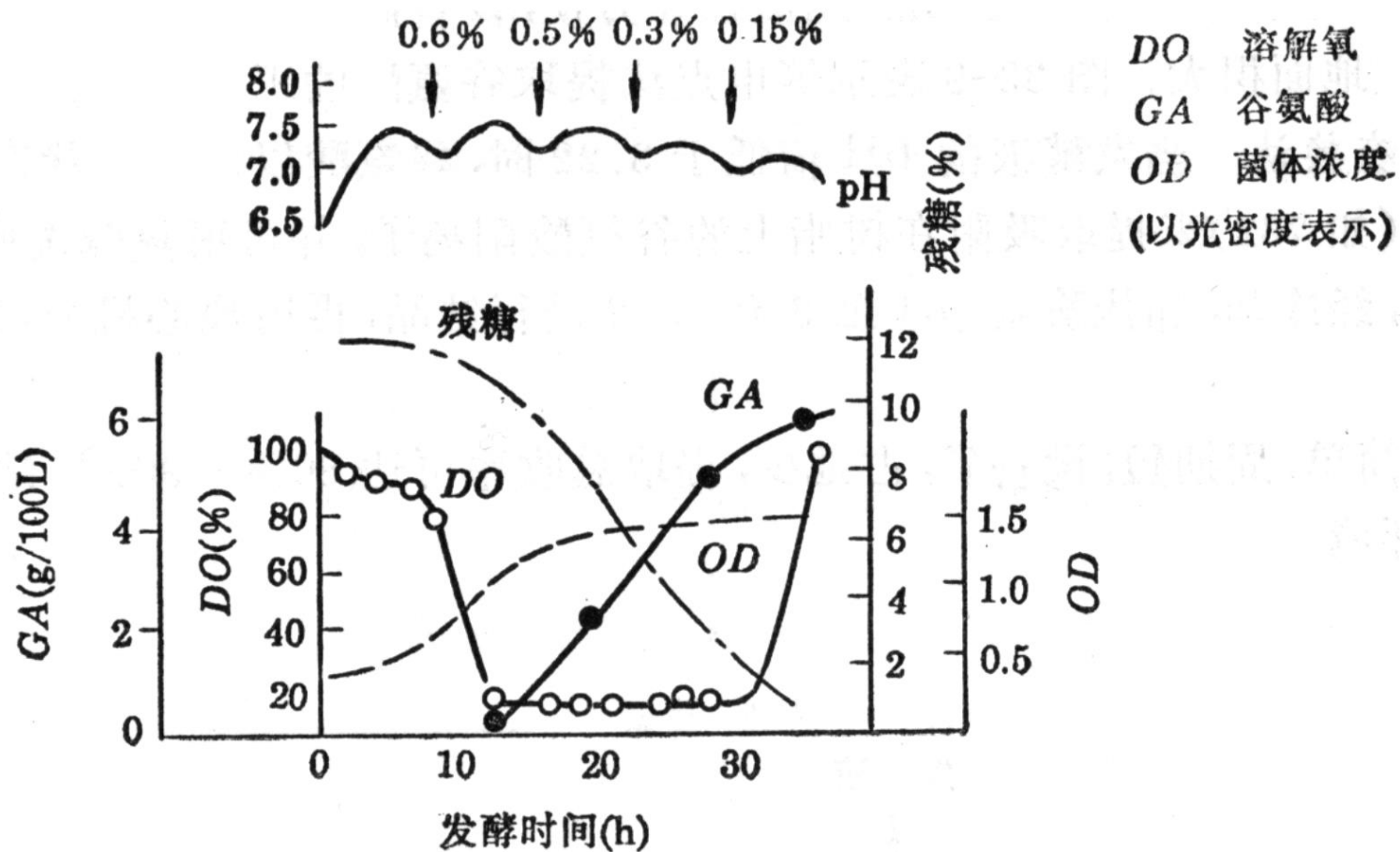


图 9.6 B_9 菌谷氨酸发酵代谢变化曲线

4.1 谷氨酸的提取

1、等电点法：操作简单，收率60%。周期长，占地面积大。

谷氨酸等电点pH 3.22。谷氨酸晶体有两种，分别为 α -型和 β -型。 α -型晶体轴长接近，晶体粗壮，颗粒大，易分离； β -型晶体长短不一，针壮或鳞片壮，晶粒细，不易沉淀析出。操作中应控制条件以利于形成 α -型晶体。

2、离子交换法：用阳离子交换树脂提取吸附谷氨酸形成的阳离子，再用热碱洗脱，收集相应流分，再加盐酸结晶。收率可达80~90%。

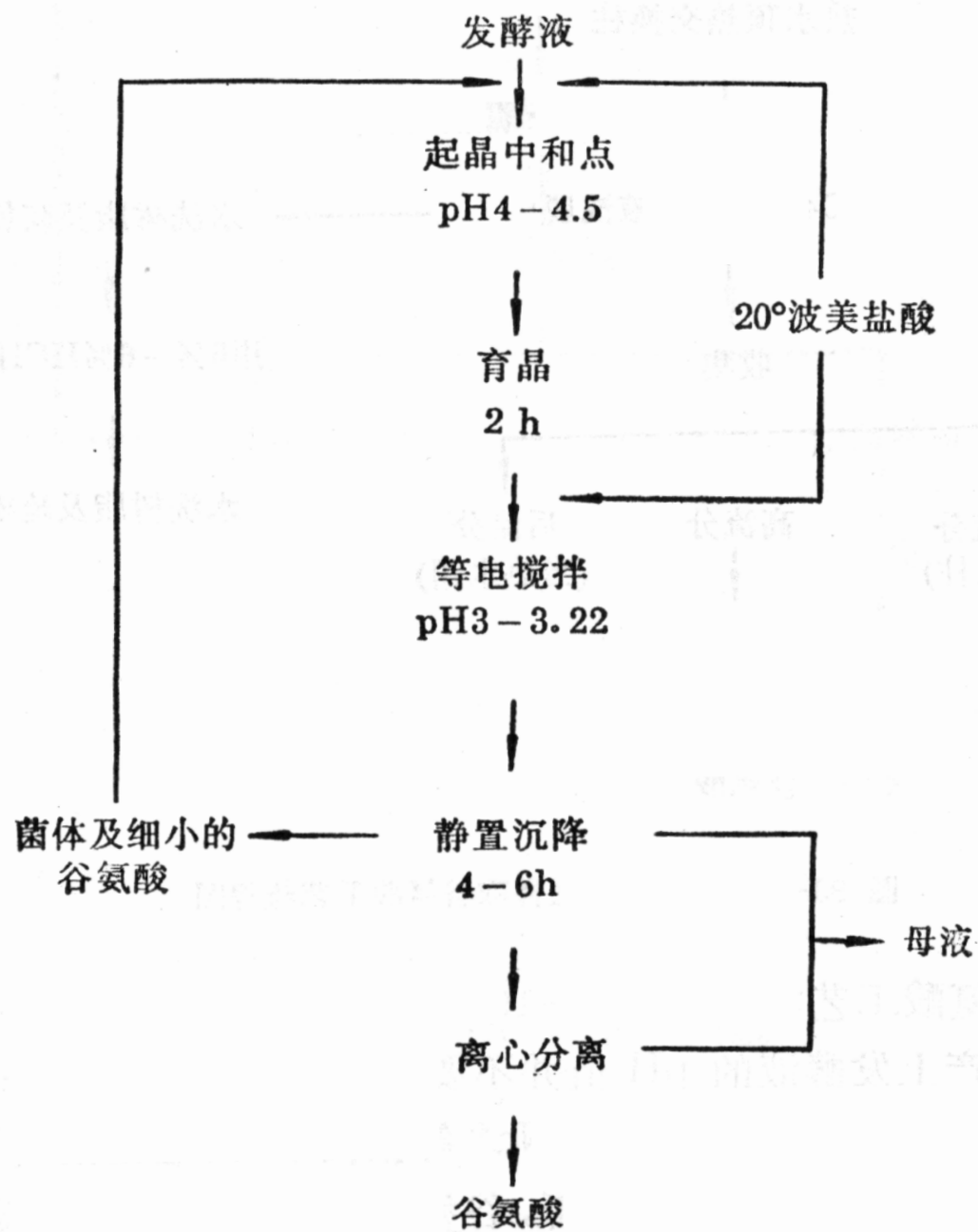


图 9.7 等电点法提取谷氨酸工艺流程图

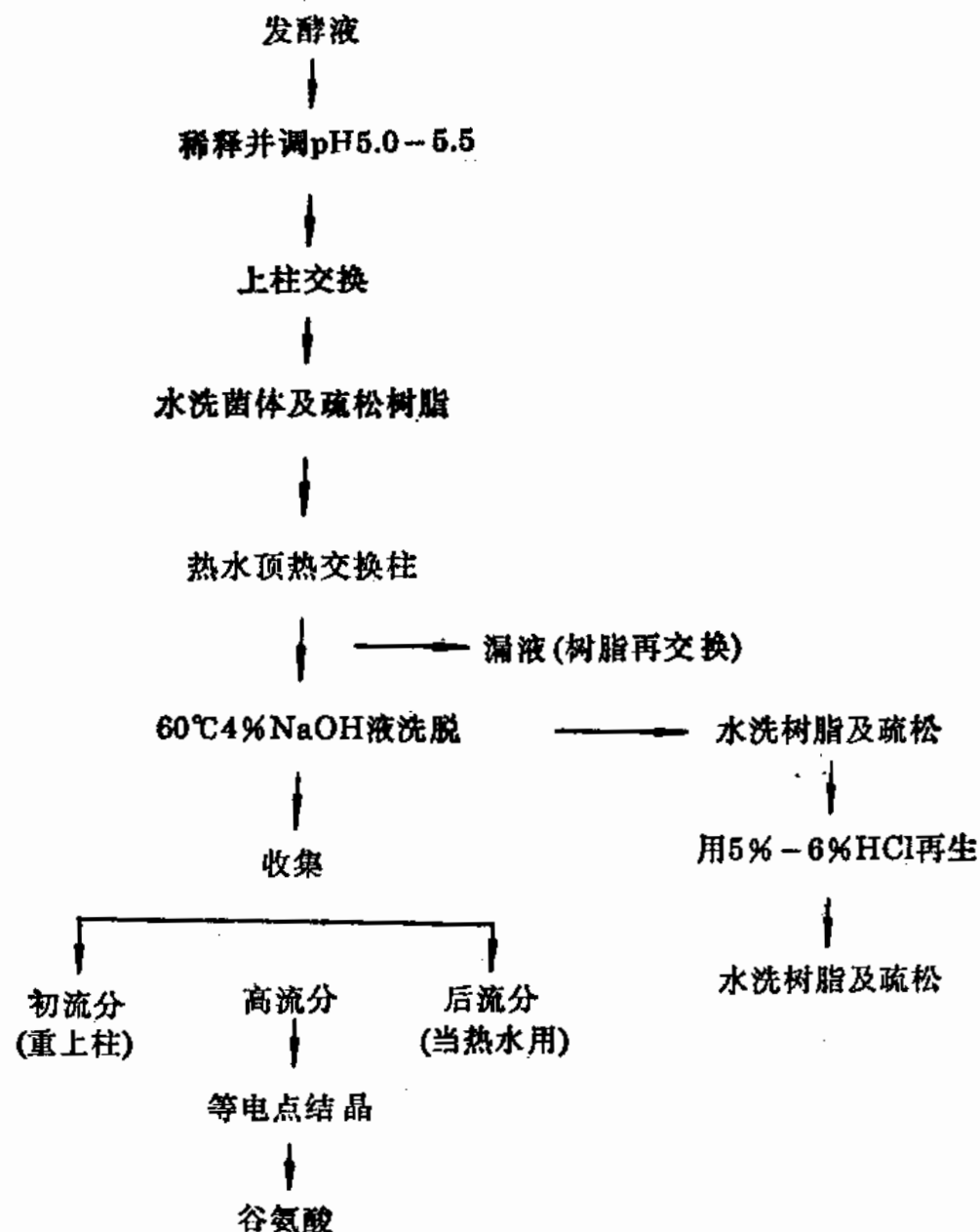


图 9.8 离子交换法提取谷氨酸工艺流程图

味精生产工艺

- 谷氨酸制造味精的工艺流程

味精——谷氨酸单钠，具有强鲜味，由谷氨酸用适量的碱中和得到，目前已经是人们日常生活中的常用烹调用品，国内消耗量很大。

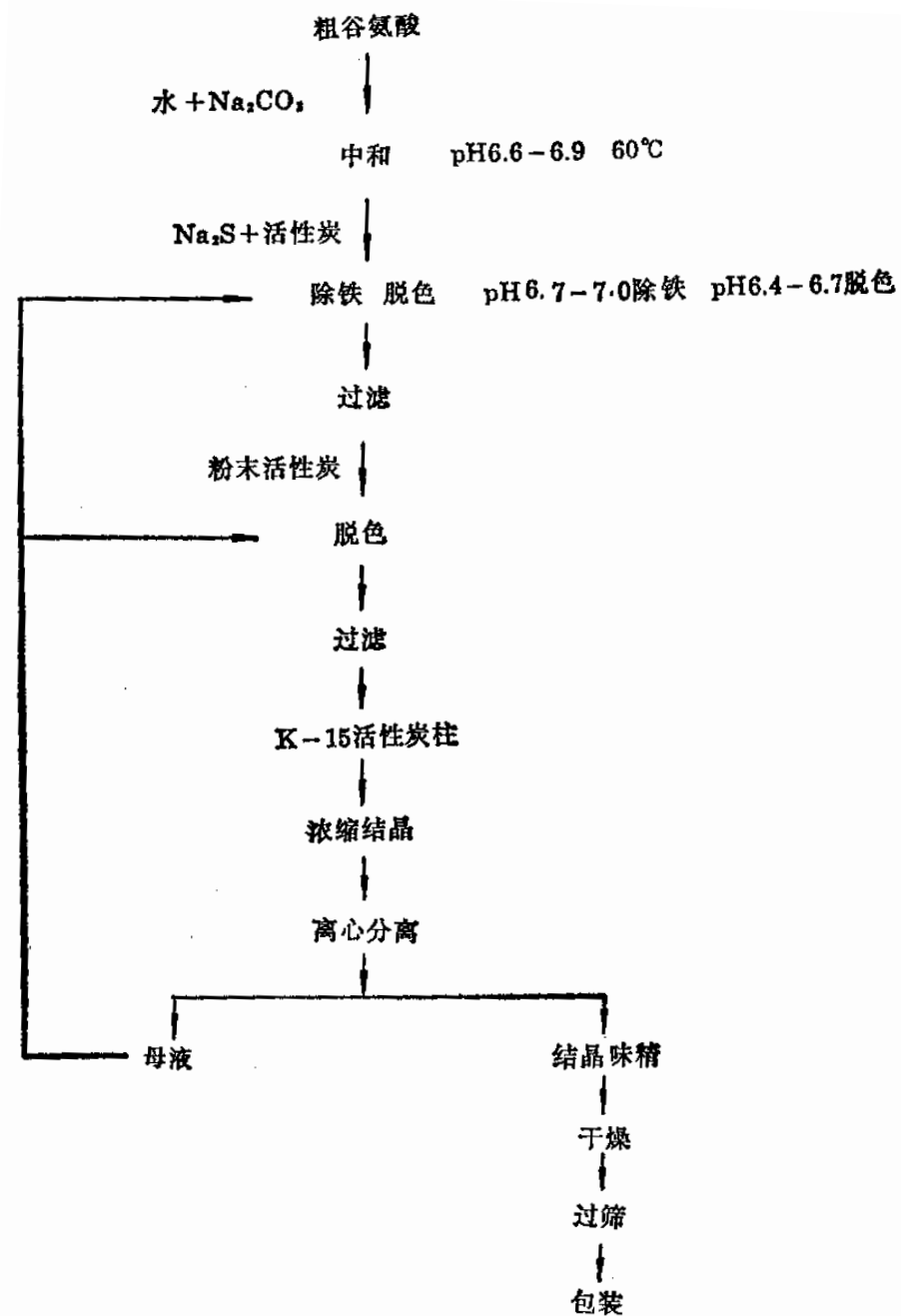


图 9.9 由谷氨酸制造味精的工艺流程图

工艺要点

1.中和：应使谷氨酸单钠盐的量最大，应向谷氨酸溶液中加入 Na_2CO_3 ，温度控制在 65°C ，浓度 $21\text{-}24^\circ\text{Brix}$ （[白利度](#)），pH 6.6-6.8，不超过7.0，否则生成二钠盐；

2.中和液的脱色与除铁

生产上要求脱色、除铁后，液体透光率达90%以上， Fe^{2+} 浓度低于5mg/L。

3.中和液的浓缩和结晶

当溶液浓缩到 $29.5\text{-}30.5^\circ\text{Brix}$ 时，加入晶体， $65\text{-}70^\circ\text{C}$ 结晶12-20h。

谷氨酸发酵研究新进展

- **继续选育突变菌株：**转化率高、高生物素含量下保持高产酸、提高原料利用率、拓宽原料来源、简化操作。
- **生物工程新技术应用：**DNA重组技术、原生质体融合技术、固定化细胞技术，产量提高了1倍。
- **改进发酵工艺：**开拓原料、改进流加工工艺、计算机控制。