

L-苹果酸的应用及研究进展

刘建军 姜鲁燕 赵祥颖 李丕武 田延军 张家祥

(山东省食品发酵工程重点实验室, 济南 250013)

摘要 L-苹果酸是一种天然有机酸,具有重要的生理功能,在食品、医药、化工、建材等领域具有广泛的用途。L-苹果酸的生产方法已由最原始的果汁提取法发展为提取法、合成法、发酵法以及固定化酶或细胞法。本文简述了L-苹果酸的应用和生产工艺方法的研究进展。

关键词 L-苹果酸,合成,发酵,固定化酶

Research and Application on L-Malic Acid

Liu Jianjun Jiang Luyan Zhao Xiangying Li Piwu Tian Yanjun Zhang Jiexiang

(Lab of Food Fermentation Engineering in Shandong Province Jinan 250013)

Abstract L-malic acid, a natural organic acid with many important physiological functions, had been extensively used in food industry, medical field et al. It's uses and some production methods were introduced in this paper. Furthermore, the advance of studying on the production technique of L-malic acid was also reviewed.

Key words L-malic acid, Synthesize, Fermentation, Immobilized enzyme

L-苹果酸是一种重要的天然有机酸,是生物体内三羧酸循环成员之一,又名羟甲基丁二酸、羟基琥珀酸或1-羟基乙烷二羧酸,分子式为 $C_4H_6O_5$,化学结构式为 $HOOCCH(OH)CH_2COOH$,易溶于水,是一种酸性较强的有机酸,其电离常数 K_1 为 4.0×10^{-4} 、 K_2 为 9×10^{-6} 。分子内含有一个不对称碳原子,有两个对映体,即L-苹果酸和D-苹果酸,分别呈左旋和右旋,自然界存在的苹果酸都是L-型,苹果、樱桃、葡萄、柠檬等水果中含有丰富的苹果酸,尤其是未成熟的苹果中含有0.5%左右的有机酸,其中苹果酸占97.2%以上^[2],苹果酸因此而得名。

L-苹果酸口感接近天然苹果的酸味,与柠檬酸相比,具有酸度大、味道柔和、滞留时间长等特点,目前已广泛用于高档饮料、食品等行业,已成为继柠檬酸、乳酸之后用量排第三位的食品酸味剂。本文简述了L-苹果酸的应用、生产方法的进展情况。

1 L-苹果酸的应用

1.1 L-苹果酸在食品工业中的应用

苹果酸具有明显的呈味作用,其酸味柔和、爽快,与柠檬酸相比刺激性缓慢、保留时间长,具有特殊的香味,并且不损伤口腔和牙齿等特点。苹果酸与柠檬酸配合使用,可以模拟天然果实的酸味特征,使口感更自然、协调、丰满。清凉饮料、粉末饮料、乳酸饮料、乳饮料、果汁饮料中均可添加苹果酸改善其口感和风味,苹果酸常与人工合成的二肽甜味剂阿斯巴甜(ASPARTME)配合使用,作为软饮料的风味固定剂。也可用作天然果子露保色剂、蛋黄酱乳稳定剂、果酱调整剂、甜味辅助剂、酵母生长促进剂^[3]等。在欧美各国及日本食品饮料生产中,苹果酸已成为不可缺少的基本原料之一。目前,美国年消耗在1500万磅以上,其中90%用于食品和饮料加工^[4]。另外,苹果酸可形成许多衍生物,日本近几年已成功地将苹果酸盐应用于减糖、减盐食品中,应用苹果酸某些盐类代替食盐浸

渍咸菜时,其咸味仅有食盐 1/5 - 1/7 情况下,而浸渍效果却是食盐的两倍,同时可以做为肾炎患者的食盐代用品,在豆浆中添加苹果酸钙盐,可有效地改善其口感和风味;利用苹果酸的抗疲劳、护肝、肾、心脏作用可以开发保健饮料。食品中添加 L-苹果酸可使 pH 得到调整,加上其本身所具有的抗菌作用,L-苹果酸亦被广泛应用于其他食品工业,如用作水产品的保鲜剂等。

L-苹果酸阈值(最初感觉到酸味的浓度)为 0.0019%,其酸味度比柠檬酸高,几种食用有机酸的酸味度见表 1。表中数据表明,添加 100 克苹果酸比添加 100 克柠檬酸几乎要强 1.25 倍,或者说 80 克的苹果酸和 100 克的柠檬酸形成的酸味强度是相当的,因此要达到相同的酸味强度使用 L-苹果酸可以减少用量 20%。随着发酵法生产 L-苹果酸工艺技术的日趋完善,生产成本也将逐渐降低,其在食品工业中的新用途也将不断的开发出来。

表 1 几种主要食用有机酸的酸味度^[5]

有机酸名称	酸味度*	相当于 100 克柠檬酸酸味度的添加量(克)
柠檬酸(一水)	100	
苹果酸	125	80
柠檬酸(无水)	110	90
酒石酸	130	77
乳酸(50%)	60	160
富马酸	165	55

注:酸味度是指将 100 克一水柠檬酸所得到的酸味强度定为 100,而其它有机酸 100 克所得到的酸味强度与之比较所得到的数值。

1.2 苹果酸的生理功能及在医药工业中的应用

L-苹果酸在生物体内处于三羧酸循环和乙醛酸循环的交叉位点,同时是两个循环的代谢中间产物,在生物体内具有重要的生理功能。由于苹果酸在物质代谢途径中所处的特殊位置,可直接参与人体代谢,被人体直接吸收,实现短时间内向肌体提供能量,消除疲劳,起到抗疲劳、迅速恢复体力的作用。在药物中添加苹果酸可增加其稳定性,促进药物在人体的吸收、扩散;复合氨基酸输液生产中就是利用 L-苹果酸这一功能而用它来调节 pH 值的,同时作为混合氨基酸输液组分之一,可提高氨基酸利用率,用于治疗尿毒症、高血压等和减少抗癌药物对正常细胞的侵害,用于癌症放、化疗后的辅助药物,用于烧伤治疗可以促进伤口愈合;L-

苹果酸可以促进氮代谢,降低血氨浓度,对肝脏有保护作用,是治疗肝不全、肝衰竭、肝癌尤其是肝功能障碍导致的高血氨症的良药;L-苹果酸作为治疗心脏病基础液成分之一,用于 K^+ 、 Mg^{2+} 的补充,保持心肌的能量代谢,对心肌梗塞的缺血性心肌层起到保护作用;L-苹果酸是乳酸钙注射液的稳定剂,也可作为抗癌药的前体及用作动物生长促进剂^[6]。

L-苹果酸的衍生物也具有重要的作用,L-苹果酸钾是良好的钾补充药,具有防止水肿、高血压及脂肪积聚的功效;最近研究表明,L-苹果酸钠能有效地保护肾脏和骨髓,使抗癌药 CODP 产生的毒副作用大大降低,而药物活性不变,因此有助于减少化疗而引起的副作用;L-苹果酸钙可作为青少年、孕妇、中老年人的补钙剂;日本新近开发的聚苹果酸树脂是一种可用于生物体内的高分子材料,作为血管吻合剂,用于抗癌药物中能使药物缓慢释放,延长药效,提高治疗效果。

1.3 苹果酸在其它工业上的应用

苹果酸具有抗氧化和较强的螯合作用,作为保色剂和增效剂,广泛用于染料工业;在化学工业方面,由于苹果酸能调节 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、洗涤剂、废气脱硫剂、锅炉水垢清洁剂、空气清洁剂和除臭剂,特别是清除室内鱼腥臭、香烟臭及食品贮藏室的异味,也可代替柠檬酸作为各种金属表面或容器的除锈剂。苹果酸是制备特殊性能聚合物的单体,用苹果酸聚合可合成生物降解塑料,有利于环境保护;在建材行业,苹果酸添加在水泥中,可缩短凝固时间,防止碱性聚合反应发生,提高混凝土的强度,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、美观;此外,苹果酸还可作为饲料添加剂,如含 0.4% 苹果酸钠的饲料,可使鸡的体重增加 12%。苹果酸能改善汽车排气质量,如在汽油中添加 10% 的 0.003% 苹果酸乙醇溶液,可使废气中的一氧化碳含量下降 60%、碳氢化合物减少 40%^[6];日本扶桑公司开发的苹果酸制剂已应用于海带养殖业^[5]。

2 苹果酸生产方法及研究进展

早期获得的 L-苹果酸是从水果压榨汁中提取的。二十世纪初,人们发现某些酵母和曲霉在代

谢过程中积累苹果酸,由于产酸率太低,难以应用于工业化生产。随着科学技术的发展,二十世纪六十年代初,美国等国开始采用化学合成法生产少量 DL-苹果酸,1967年,美国食品与药物管理局就将苹果酸列为安全食用酸。但由于 DL-苹果酸中的 D-型苹果酸是非生理性的,肌体必须借助于肝脏分泌的消旋酶作用于 D-苹果酸,并由 D-2 羟基-细胞色素 C-氧化还原酶将 D-苹果酸转化成 L-苹果酸^[7],所以 DL-苹果酸应用于食品工业受到一定的限制。1970年美国食品与药物管理局规定外消旋的 DL-苹果酸不能用于婴幼儿食品。因此人们开始致力于 L-苹果酸的研究开发。

目前,L-苹果酸的生产方法已由早期的单一的提取法发展到以下几种方法:提取法、化学合成法、一步发酵法、二步发酵法、固定化酶或细胞转化法。

2.1 提取法生产 L-苹果酸

把石灰乳直接加入富含 L-苹果酸的果汁中,形成 L-苹果酸钙盐,再用 H₂SO₄ 溶解收集到的钙盐,然后浓缩回收苹果酸,这种直接提取法由于果汁中含量相对较少,原料来源有限,生产成本很高,批量生产有困难,因此这一工艺方法应用局限性较大。

2.2 化学合成法生产 L-苹果酸^[6]

此法的最终产物是 DL-苹果酸。在催化剂存在下,苯氧化生成富马酸或马来酸,然后加压与水蒸汽共热形成 DL-苹果酸,也可以糠醛为原料,经双氧水处理,在超声波作用下转变而成。生产的 DL-苹果酸经拆分、提取获得 L-苹果酸。这种方法由于生产工艺比较复杂,工艺条件要求高,分离精制技术难度大,加之原料为化工产品,应用受到限制,目前仅有少部分厂子采用。

2.3 一步发酵法(直接发酵法)

当前,国际上公认的以发酵法生产的食品添加剂可视为“纯天然”产品,随着人们食品安全、保健意识的增强,直接发酵法生产 L-苹果酸的研究引起了人们的广泛关注。一步发酵法又称直接发酵法,即采用一种微生物直接发酵糖质原料或非糖质原料^[8](如正构烷烃)生成 L-苹果酸的方法。近年来,直接发酵法生产 L-苹果酸的研究进展很快,以色列 Battat 等人^[9-12]报道黄曲霉(ATCC13697)以葡萄糖为碳源,16升发酵罐发酵,万方数据

通过条件优化培养 190 小时,产酸高达 11.3%,但据报道该菌产生对人体有害的黄曲霉毒素,并且产生 L-苹果酸的同时,伴有其他四碳酸产生,所以工业应用价值不大。日本田渊武士等报道的稗疣黑粉孢菌摇瓶发酵 168 小时,L-苹果酸达 5.2%^[13]。我国山西生物研究所、无锡轻院、广东微生物研究所、福建师大、广西大学等单位也进行了这方面的前期研究工作^[14-16]。作者等人多年来致力于直接发酵法生产 L-苹果酸的研究,并且从土壤中分离筛选、诱变获得一株直接利用淀粉质原料生产 L-苹果酸的高产菌株 *Aspergillus flavus* HA5800,经条件优化,7000 升发酵罐产酸达 8.68%,糖酸转化率达 83.5%,发酵周期 112 小时,为 L-苹果酸产业化奠定了基础。

利用淀粉质原料生产 L-苹果酸的微生物目前主要有:黄曲霉(*Asp. flavus*)、米曲霉(*Asp. oryzae*)、寄生曲霉(*Asp. parasiticus*)等,这些微生物最大的特点就是三羧酸循环中苹果酸到草酰乙酸这一步的苹果酸脱氢酶缺失或处于低水平使得苹果酸得以积累。这些菌株大多具有糖化淀粉的能力,可以直接利用淀粉质原料,原料来源十分丰富,发酵工艺条件温和,产品为 L 型,因此一步发酵法与其他方法相比更具优势,尤其近十年来,这一领域的研究工作不断取得进展,值得强调的是 L-苹果酸产生菌常常在产生 L-苹果酸同时,也产生许多杂酸,如柠檬酸、富马酸、琥珀酸等,选育优良的苹果酸产生菌是实现一步发酵法 L-苹果酸工业化生产的关键。

2.4 二步发酵法(混合发酵法)生产 L-苹果酸

二步发酵法即采用两种不同功能的微生物,其中之一先将糖质或其他原料转化生成富马酸(延胡索酸),另一种微生物将富马酸转化成 L-苹果酸,两种微生物可先后加入,也可同时加入。Takad^[17-18]等报道先用少根根霉(*Rhizopus ahirrhizus*)或华根霉(*Rhizopus chinensis*)把糖质原料转化成富马酸,然后利用膜醯毕赤酵母(*Pichia membranaefaciens faciens*)、普通变形杆菌(*proteus vulgaris*)及宛氏拟青霉(*paeciomyces varioti*)之一,把富马酸转化成 L-苹果酸的研究。我国山西生物研究所进行了利用无根根霉(*Rhizopus arirrhizus*)R₂₅和普通变形杆菌(*proteus vulgaris*)P₁混合发酵 L-苹果酸的研究^[19],首先无根根霉 R₂₅

在含有 12g/dL 葡萄糖或含有 18g/dL 薯干粉培养基中,完成富马酸发酵,然后接入经液体培养成熟的普通变形杆菌 P₁,继续发酵 2 天,L-苹果酸产量可达 5.2-5.48g/dL。二步发酵法,由于涉及到两种微生物,培养条件要求比较严格,发酵周期较长,产酸率相对较低,副产物较多,当前尚未见应用于规模生产的报道。尽管如此,但该工艺方法仍是值得仔细研究的 L-苹果酸生产工艺之一。

2.5 固定化酶或细胞转化法生产 L-苹果酸^[6,12]

利用具有高活性富马酸酶的微生物细胞或富马酸酶,采用固定化酶或细胞反应器,将富马酸转化成 L-苹果酸。虽然固定化细胞和固定化酶均有应用,但由于酶的提取技术复杂,收率不高,成本昂贵,因而在实际生产中多用固定化细胞。采用的载体主要有藻酸钙凝胶、角叉菜胶及聚丙烯酰胺凝胶等。含有较高活性富马酸酶的微生物有短杆菌、产氨短杆菌、黄气短杆菌、解脂假丝酵母及温特曲霉等。此工艺一般包括两步:一是固定化细胞的制备:将产酶菌株培养成熟后,收集菌体细胞,包埋菌体,制备固定化酶或细胞,用于生产 L-苹果酸,通常在 37℃ 条件下运行,转化半衰期可达 160 天左右;二是 L-苹果酸制备:先将富马酸和 CaCO₃ 反应转化成为富马酸钙,再经转化柱作用生成苹果酸钙,经提取得 L-苹果酸。目前这种方法生产 L-苹果酸的转化率可达 98% 以上,但由于生产成本较高和人们对食用以化学合成原料富马酸生产的 L-苹果酸存有疑虑,从混合液中把 L-苹果酸和富马酸彻底分开难度较大,产品质量很难达到出口要求等原因,所以这种方法生产 L-苹果酸也具有一定的局限性。日本自二十世纪 70 年代开始采用这种工艺小批量生产 L-苹果酸,但发展不快,产量至今不大。我国八十年代末九十年代初,固定化酶或细胞转化法生产 L-苹果酸的研究达到了高潮,全国各地相继建设了多条生产线,但由于固定化酶的转化率低、半衰期短,国产富马酸质量不稳定,生产成本相对较高,另外,L-苹果酸中残留的富马酸分离去除有困难,富马酸含量超标,难以达到 0.05% 以下的出口标准要求,产品一直未能进入国际市场,加之是以化工产品富马酸为原料,人们食用存有疑虑,使得绝大多数厂子处于关停并转状态,因此,选育优良的产酶菌株、加强相关配套

技术的研究工作、改进工艺是这一工艺方法推广应用的关键。

综观以上几种生产方法,目前国内外正在积极研究及已经中试或批量生产的方法主要是转化法和一步发酵法,又以一步发酵法生产 L-苹果酸的工艺最经济、最有发展前途。该方法生产成本低、潜力大、产品安全性高、原料来源丰富,目前,存在的问题仍是缺少优良生产菌株,在研究选育优良菌株的同时,注重加强提取工艺等相关技术的研究,搞好上下游工程配套技术的研究开发是非常必要的。

参考文献

1. 金其荣. 有机酸发酵工艺学[M]. 北京:中国轻工业出版社, 1989. 557.
2. 陈陶声等. 有机酸发酵生产手册[M]. 北京:中国化学工业出版社, 1991. 221.
3. 徐积恩. 苹果酸的生产及应用[J]. 食品饲料添加剂信息, 1993. 3:18-21.
4. 包惠燕. 以山芋粉为原料发酵生产 L-苹果酸的研究. 无锡轻工业学院硕士论文, 1991.
5. 张穆润. 苹果酸的市场动态及新用途[J]. 辽宁食品发酵, 1996. 4:49-52.
6. 王博彦, 金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册[M]. 北京:中国轻工业出版社, 2000. 542.
7. K. H. 贝斯勒等. 营养学基础知识(译)[M]. 北京:人民卫生出版社, 1979.
8. Takao S, Tanida M, Kuwabara H. L-malic acid production from non-sugar carbon sources by *Paecilomyces variotii*[J]. J. Ferment. Technol. 1977. 55:196-199.
9. Peleg Y, Stieglitz B, Goldberg I, et al. Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. I. Biochemical aspects of acid biosynthesis[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. 28:69-75.
10. Battat E, Peleg Y, Bercovitz A, et al. Optimization of L-malic acid production by *Aspergillus flavus* in a stirred fermentor[J]. Biotechnol. Bioeng. 1991. 27:1108-1116.
11. Peleg Y, Rahamim E, Keasel M, et al. Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. II. Crystals and hairlike processes formed by *Aspergillus flavus* in L-malic acid production medium[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1988. 28:76-79.
12. Peleg Y, Barak A, Scrutton MC, et al. Malic acid accumulation by *Aspergillus flavus*. III. ¹³C-NMR and isoenzyme analysis[J]. Appl. Microbiol. Biotechnol. 1990. 30:176-183.
13. 田渊武士等. 日本专利 平 3-180187, 1991.
14. 吴清平, 周小燕等. L-苹果酸产生菌的筛选及高产突变株诱变选育[J]. 真菌学报, 1993. 12(4):304-312.

(下转 52 页)

3.3 饼干

油脂是饼干生产的主要原料,它可以使饼干具有良好的层次,调节产品风味,使产品具有良好的疏松度。一般用于饼干生产的油脂多为饱和脂肪酸,如:氢化猪油,人造奶油,氢化棉籽油等。这种饱和和油脂摄入过多,对人体不利。可以用结冷胶来减少饱和脂肪酸的用量。用3%的结冷胶加上0.2%柠檬酸钠盐溶解于去离子水中,加热混合液到90℃,然后将热的结冷胶溶液加入到制作饼干的面团中,也可以起到改良饼干的层次,使饼干具有良好的疏松度的作用^[10]。

它作为一种多糖,还可用作需进一步加工(例如油炸)的面包等面食的涂裹物,可以降低食品对油的吸附而生产出低热量的产品。包裹多糖的食品的风味增强更能满足消费者的需要。还可以用作冰激凌上作为稳定增稠剂,而且它的用量非常低。

5 结论与展望

由于结冷胶具有优异的性能,使用量低,具有冷、热条件下形成热可逆凝胶等特性,使得结冷胶在短时间内得到大量的应用。它已逐步代替琼脂和卡拉胶在食品工业上的应用。结冷胶生产成本仅比黄原胶略高一些,而销价是黄原胶的二倍,高达34美元/kg^[11]。所有这些,说明结冷胶具有极

高的商业利润和市场前景。

参考文献

1. Donald E. Pszczola. Gellan gum wins IFT's food technology industrial achievement award. Food Technology. 1993, 47(9): 94—96.
2. Sandford P. A. Food Hydrocolloids [M]. V01. 1. CRC Press, 1990, 167—199
3. 刘志皋. 食品添加剂手册[年]. 北京:中国轻工业出版社, 1996, 285.
4. Brian J. B. Wood. 发酵食品微生物学. 中国轻工业出版社, 2001. 217.
5. 王为平. 食品品质改良剂:亲水胶体的性质及应用—微生物代谢胶. 食品与发酵工业. 1997(23):76—79.
6. 赵谋明. 新型食品添加剂—Gellan gum. 食品工业科技. 1996, 6:71—75.
7. Arsenio M. et. al. structures and properties of gellan polymers produced by sphingomonas paucimobilis ATCC31461 from lactose compared with those produced from glucose and from cheese whey. Applied-and-Enviromental microbiology. 1999, 65(6):2485—2491.
8. 聂凌鸿, 彭华松. 微生物胞外多糖——结冷胶的生产与应用前景. 生命化学. 2002, 22(2):119—181.
9. D. H. Craston, P. Farnell et al. Determination of gellan gum by-capillary electrophoresis and CE—MS. Food technology. 2001, 73:141—145.
10. Andrew. J. Jay et. al sweet doughs laminated with hydrocolloid solutions. Research Disclosure. 1997. 398(418):1917.
11. 詹晓北. 结冷胶. 中国食品添加剂. 1999, 2:99—101.

(上接 56 页)

15. 胡纯铿, 陈哲超等. L-苹果酸产生菌 *Asperigulls flavus* HLD-12 产酸条件的研究[J]. 福建师范大学学报, 1994. 10(2):75—80.
16. 金其荣, 刘吉泉等. 淀粉为主原料 L-苹果酸发酵的较佳培养基的研究[J]. 无锡轻工业学院学报, 1989. 8(2):1—4.
17. Takao S, Hotta K. Conversion of fumaric acid fermentation to L-malic acid fermentation by the association of *Rhizopus arrhizus* and *Proteus vulgaris*[J]. J. Ferment. Technol. 1976. 54:179—204.

18. Takao S, Yokota A, Tanida M. L-malic acid fermentation by a mixed culture of *Rhizopus arrhizus* and *Paecilomyces variotii*[J]. J. Ferment. Technol. 1983. 61:643—645.
19. 蒋明珠, 白照熙等. 无根根霉 R₂₅ 和普通变形杆菌 P₁ 混合培养发酵 L-苹果酸的研究[J]. 微生物学报, 1989. 29(2):129—136.
20. 金其荣, 许赣荣等. 直接发酵法与酶转化法生产 L-苹果酸的比较[J]. 食品科学, 1994. 1:25—28.