

## 发酵法生产琥珀酸的研究进展

王金主<sup>1</sup>, 袁建国<sup>2</sup>, 王元秀<sup>1</sup>, 李峰<sup>2\*</sup>

(1. 济南大学 化学化工学院, 山东 济南 250022; 2. 山东食品发酵工业研究设计院, 山东 济南 250013)

**摘要:** 琥珀酸广泛用于食品、医药与化工领域, 现对琥珀酸的生产菌株改良, 代谢调控与条件优化, 以及发酵生产中存在的问题, 及今后发展方向等作一综述。

**关键词:** 琥珀酸; 发酵; 代谢

中图分类号: Q935

文献标识码: A

文章编号: 1672-979x(2010)01-0054-05

### Progress on Production of Succinic Acid by Fermentation

WANG Jin-zhu<sup>1</sup>, YUAN Jian-guo<sup>2</sup>, WANG Yuan-xiu<sup>1</sup>, LI Feng<sup>2\*</sup>

(1. School of Chemistry and Chemical Engineering, University of Jinan, Jinan 250022, China; 2. Shandong Food & Fermentation Industry Research and Design Institute, Jinan 250013, China)

**Abstract:** Succinic acid is widely used in the fields of food, medical and chemical products. This paper mainly introduces the succinic acid-producing strain improvement, metabolic control and optimization, some questions in fermentation and development prospect.

**Key Words:** succinic acid; fermentation; metabolism

琥珀酸(丁二酸, succinic acid)作为三羧酸循环的中间代谢产物和某些微生物的代谢终产物存在于人体、动植物及微生物中。琥珀酸广泛应用于食品和医药、化工领域。目前主要以石油等资源为原料化学合成琥珀酸, 成本高, 能耗

大且污染环境。发酵法生产琥珀酸能利用大气中的CO<sub>2</sub>, 减小温室效应, 避免对石化原料的依赖, 成为国内外研究的热点。2004年, 美国能源部公布的12种最有潜力大宗产品中, 琥珀酸排第一位。此后美国FDA认定琥珀酸为“一般认为安

收稿日期: 2009-03-23

作者简介: 王金主(1977-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 研究方向发酵工程 E-mail: loxuehuve@sina.com

\*通讯作者: 李峰, 男, 高级工程师, 研究方向发酵工程和酶工程 E-mail: jinglu2088@sina.com

- treatment and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life[J]. *Food Chem*, 2009, 114 (4) : 1470-1476.
- [17] Millette M, Tien C L, Smoragiewicz W, et al. Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads[J]. *Food Control*, 2007, 18 (7) : 878-884.
- [18] 潘丽军, 刘兰花, 曾敏. Nisin和植酸复合抑制腌制蔬菜中G-腐败菌的效果研究[J]. *食品工业科技*, 2008, 29 (2) : 263-268.
- [19] Solomakos N, Govaris A, Koidis P, et al. The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in mined beef during refrigerated storage[J]. *Food Microbiol*, 2008, 25 (1) : 120-127.
- [20] Kim E L, Choi N H, Bajpai V K, et al. Synergistic effect of nisin and garlic shoot juice against *Listeria monocytogenes* in milk[J]. *Food Chem*, 2008, 110 (2) : 375-382.
- [21] 邓明, 哈益明, 严奉伟, 等. Nisin, EDTA和山梨酸钾在冷却肉贮藏保鲜中的交互效应分析[J]. *食品科技*, 2005, 30(9): 66-70.
- [22] 于见亮, 李开雄, 卢士玲. Nisin, 茶多酚, 壳聚糖复合保鲜冷却羊肉的配比优化研究[J]. *肉类工业*, 2007, 17 (12) : 27-30.
- [23] Staszewski M V, Jagus R J. Natural antimicrobials: Effect of Microgars<sup>TM</sup> and nisin against *Listeria innocua* in liquid cheese whey[J]. *Int Dairy J*, 2008, 18 (3) : 255-259.
- [24] 吕晓楠, 吴兆亮, 赵艳丽, 等. Nisin与山楂提取物复配的抑菌性能研究[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37 (15) : 6839-6840.
- [25] Nguyen V T, Gidley M J, Dykes G A, et al. Potential of a nisin-containing bacterial cellulose film to *Listeria monocytogenes* on processed meats[J]. *Food Microbiol*, 2008, 25 (3) : 471-478.
- [26] Sivarooban T, Hettiarachchy N S, Johnson M G. Physical and antimicrobial properties of grape seed extract, nisin, and EDTA incorporated soy protein edible films[J]. *Food Res Int*, 2008, 41 (8) : 781-785.
- [27] Blank E P, Kelly A L, Fitzgerald G F. The combined effect of high pressure and nisin on inactivation of microorganisms in milk[J]. *Innovat Food Sci Emerg Technol*, 2005, 6 (3) : 286-292.

全产品” (generally regarded as safe, GRAS)。

现对琥珀酸的用途、发酵合成法、生产菌株的代谢途径以及菌株的国内外改良现状作一回顾, 并分析琥珀酸的应用前景以及菌株的改造趋势。

### 1 琥珀酸的性质和用途

纯净琥珀酸为无色晶体, 无嗅、有酸味、可燃, 是一种二羧基四碳酸(图1), 是三羧酸循环和厌氧发酵的中间代谢物, 部分微生物能量代谢的终产物可产生琥珀酸盐。天然品主要存在于海藻、地衣和真菌中。

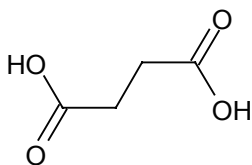


图1 琥珀酸结构式

琥珀酸作为四碳饱和二羧酸, 可衍生转化为四氢喹啉、1,4-丁二醇、 $\gamma$ -丁内酯、马来酸和反丁烯二酸等衍生物化学制品。

在食品行业, 琥珀酸作为酸味剂、调味剂用于饮料与糖食品, 其钠盐可改善豆酱、酱油等佐料的口味<sup>[1]</sup>。琥珀酸是影响啤酒口味的重要有机酸, 还可用作奶类制品的铁强化剂以及新型乳化剂<sup>[2]</sup>。

在医药行业, 琥珀酸用于合成镇静剂、pH 调节剂、避孕药、抗癌药物、抗生素及维生素等。维生素E琥珀酸酯( $\alpha$ -生育酚琥珀酸酯)能抑制人类乳腺、子宫内膜、前列腺和淋巴等组织肿瘤的生长, 对正常细胞无影响<sup>[3]</sup>。

在化学工业, 琥珀酸用于生产染料、树脂、工程塑料、酯类和农药等; 电镀用的pH调节剂和助焊剂, 锡膏的助焊酸; 合成除锈剂、去垢剂, 铝、锌的刻蚀剂; 还可用于润滑剂、添加剂及弹性体纺织品中, 在表面活性剂领域的应用尤为广泛。

此外, 琥珀酸盐还可用作除草剂和除冰剂, 促进种子发芽抗病毒。在动物瘤胃中作为缓冲剂和动物能量的来源。纤维素经琥珀酸酰化后可提高吸水性, 淀粉被琥珀酸酰化后可作为增稠剂。

### 2 琥珀酸的生产方法和生产菌株

琥珀酸的生产方法有化学合成法和发酵法。化学合成法主要有石蜡氧化法、氯乙酸甲酯氧化水解法和五氧化二钒催化加氢法等。发酵法是利用细菌及其它微生物以淀粉、糖或其它原料为底物生产琥珀酸及其衍生物。

食草反刍动物的瘤胃能预消化大分子糖类, 其特殊

微生态环境为厌氧及兼性厌氧微生物提供了良好的繁殖条件, 是适合琥珀酸生成的充满 $\text{CO}_2$ 的环境。目前大多数琥珀酸产生菌都是从反刍动物瘤胃中分离的, 如从牛瘤胃中分离的*Actinobacillus succinogenes* (产琥珀酸放线杆菌), *Anaerobiospirillum succiniciproducens* (产琥珀酸厌氧螺菌)。

产琥珀酸菌的种类繁多, 目前研究较多的有: 产琥珀酸放线杆菌<sup>[4]</sup>, 产琥珀酸厌氧螺菌<sup>[4]</sup>、*Mannheimia succiniciproducens*<sup>[4,5]</sup> (曼海姆产琥珀酸菌) 和*Escherichia coli* (大肠杆菌)<sup>[4,6,7]</sup>。此外, 有产琥珀酸的霉菌<sup>[8]</sup>和乳酸菌。纸色谱、高效液相色谱法(HPLC)和高效毛细管电泳法(HPCE)是检测是否筛选到产琥珀酸菌株及产量高低的常用方法。

### 3 生产菌株改良

除紫外线、钴60、激光、微波及亚硝基胍等方法外, 超高静压也用于诱变筛选琥珀酸菌。目前流行应用计算机模拟改造菌株基因, 然后将模拟结果实现在拟改造的菌株上, 如大肠杆菌和曼海姆产琥珀酸菌的改造。

### 4 代谢调控

#### 4.1 代谢途径

产琥珀酸菌株的代谢途径决定了琥珀酸的产量。产琥珀酸放线杆菌对高浓度葡萄糖有较好的耐受性, 这对发酵十分有利, 其代谢途径见图2; 曼海姆产琥珀酸菌的代谢途径见图3; 大肠杆菌琥珀酸合成途径见图4, 大肠杆菌产琥珀酸的途径较复杂, 多达6种。

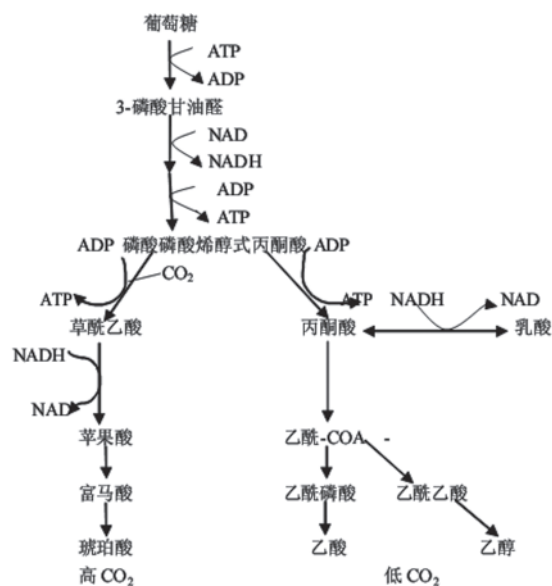


图2 产琥珀酸放线杆菌和产琥珀酸厌氧螺菌的代谢途径

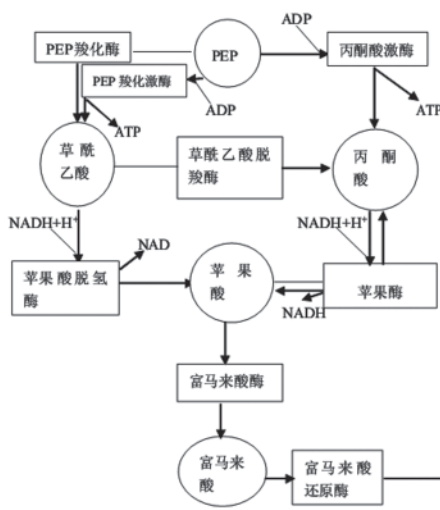


图3 曼海姆产琥珀酸菌的代谢途径

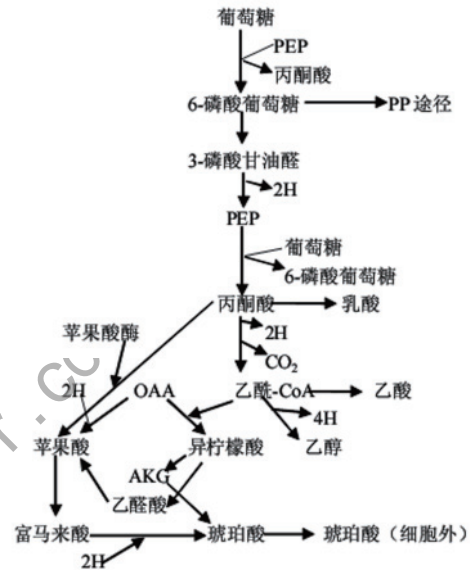


图4 大肠杆菌琥珀酸合成途径

#### 4.2 代谢调控

Vemuri 等<sup>[6]</sup>将编码 *Rhizobium etli* 丙酮酸羧化酶基因的质粒转移到大肠杆菌 AFP111 中 (AFP111/pTrc99A-*pyc*)，通过好

氧与厌氧两步发酵法用 IPTG 诱导表达 76 h 后，琥珀酸产量达 99.2 g/L，见表 1。

表1 琥珀酸产生菌产琥珀酸状况的比较

产琥珀酸菌	发酵方式	底物	发酵时间/h	琥珀酸产量/g·L <sup>-1</sup>	琥珀酸产率/g·L <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup>	文献
产琥珀酸放线杆菌	反复补料分批式	葡萄糖	38.5	33.9	0.88	[17]
产琥珀酸放线杆菌 130 Z	分批式	葡萄糖	84	66.4	0.79	[4]
产琥珀酸放线杆菌 FZ 53	分批式	葡萄糖	78	105.8	1.34	[18]
曼海姆产琥珀酸菌	分批式	葡萄糖	7.5	14	1.87	[5]
曼海姆产琥珀酸菌	分批式	乳清	11	13.5	1.22	[19]
产琥珀酸厌氧螺菌	连续式	乳清	34	24	2.1	[20]
产琥珀酸厌氧螺菌	流加式	葡萄糖、甘油	22	29.6	1.35	[21]
产琥珀酸厌氧螺菌	分批式	葡萄糖	30	33	1.1	[22]
重组大肠杆菌 AFP111 (pTrc99A- <i>pyc</i> )	两步流加分批式	葡萄糖	76	99.2	1.30	[23]
重组大肠杆菌 HL27659K	流加式	葡萄糖	59	58.3	0.98	[24]

Jang 等<sup>[9]</sup>发现一种穿梭质粒可携带大肠杆菌启动子在产琥珀酸放线杆菌、曼海姆产琥珀酸菌中表达，可用于琥珀酸表达基因，使琥珀酸产量提高一个档次。Lin 等<sup>[10]</sup>利用先好氧发酵后厌氧发酵方法使琥珀酸盐产量和生产力与理论水平相当。研究还发现，CO<sub>2</sub>浓度、电子还原力和关键酶的酶活水平都能决定菌株的琥珀酸产率<sup>[11]</sup>。将含有 PEP 羧化酶基因 *pck* 质粒在敲除 *ppc* 基因的大肠杆菌突变株 K-12 *ppc* 中过度表达，能使琥珀酸产量提高 6.5 倍。Lee 等<sup>[12]</sup>通过敲除阻断曼海姆产琥珀酸菌中的 *ldhA*、*pfkB*、*pta* 和 *ackA* 基因后得新菌

株，产酸量为每 g 葡萄糖 0.9 g，几乎没有乙酸等杂酸形成。

#### 5 发酵条件优化

研究发现，产琥珀酸放线杆菌 130Z 及其变异株具有氟乙酸盐耐受力，发酵 84 h 可生产 66.4 g/L 琥珀酸<sup>[4]</sup>，见表 1。有研究<sup>[1,13]</sup>筛选出菌株 CGMCC 1593，诱变选育后，经初筛和复筛得到的 SF-9 菌株在 5 L 发酵罐上发酵 36 h，琥珀酸产量达 40.51 g/L，但有乳酸、甲酸和乙酸等副产物。迄今 Guettler 等的琥珀酸发酵产量最高是 110 g/L。产琥珀酸放线杆菌是目前琥珀酸发酵最具工业化潜力的菌株。

产琥珀酸厌氧螺菌(ATCC 29305)在最优条件下(pH 6.2, 高浓度CO<sub>2</sub>)琥珀酸产量可达35 g/L。它还能利用成本较低的木质纤维素水解物<sup>[14]</sup>, 产酸量达24 g/L。不同碳源对提高琥珀酸产量的影响不大, 主要是控制接种量和加入适量的Na<sup>+</sup>和Mg<sup>2+</sup><sup>[15]</sup>。加入一定量的碳酸钠<sup>[16]</sup>可提高大肠杆菌AFP 18菌株的产酸率。

大肠杆菌产琥珀酸量较低。研究发现不同糖类的产酸量不同, 用葡萄糖做底物时最高。Stols等<sup>[25]</sup>发现, 在大肠杆菌突变株NZNIII中表达NAD<sup>+</sup>依赖的大肠杆菌苹果酸酶后再用于琥珀酸发酵, 使琥珀酸产量从0.65 g/g 葡萄糖升到1.2 g/g 葡萄糖。Lee等<sup>[21]</sup>向培养基添加一定比例的甘油, 使琥珀酸产率达到160%, 且琥珀酸与乙酸之比为31.7:1, 提高了琥珀酸的纯度。此后用玉米提取物取代酵母提取物作氮源, 得到每g 葡萄糖0.89 g 的产量, 与用酵母提取物的结果一样<sup>[26]</sup>。

为节约成本, 寻找可再生的廉价底物也是一种趋势。利用玉米秸秆水解液、甘蔗糖蜜和酶水解菊芋糖浆作为底物也可以生产琥珀酸。Lee等<sup>[27]</sup>发现按不同比例将乳糖与半乳糖混合不会影响琥珀酸的生产, 乳糖不会抑制半乳糖发酵产琥珀酸。Lennartsson研究了木糖、葡萄糖及木糖和葡萄糖各一半时*Escherichia coli* AFP 菌株的产酸率, 发现一半木糖和一半葡萄糖混合后产酸率比单独木糖或葡萄糖高, 产量为52 g/L。为了更好的利用原料, 可建立琥珀酸厌氧发酵模型分析琥珀酸产量, 以清楚地看到最好的发酵条件。

## 6 琥珀酸的提取工艺

提取琥珀酸主要有沉淀、蒸馏、电渗透和提取等方法。Huh等<sup>[28]</sup>先取得99.8%的提取率, 后真空蒸馏结晶, 提取率73.1%。Davison等<sup>[29]</sup>用不同的吸附树脂吸附后再生的方法提取琥珀酸, 混合XUS 40285和XFS-40422树脂作吸附剂, 吸附性质稳定且琥珀酸提取率达到95%以上。

## 7 发酵合成存在的问题及展望

大量生产琥珀酸时问题较多。控制厌氧条件很难做到, 解决厌氧问题能节省很大一部分成本。国内琥珀酸产量与国外报道的最高产量110 g/L尚有一定差距。目前对大肠杆菌的基础研究较透彻, 其生长代谢速度快, 是最有潜力的改造菌株, 但产酸能力差, 发酵困难, 基因工程构建菌株耗资多, 菌株易退化, 工业生产还有一定难度。发酵同时产生大量杂酸也是亟待解决的问题。

筛选或构建一株能用于工业化生产的高产菌株, 并优化出最佳培养条件是研究的热点。改造琥珀酸产生菌的趋势主要是用基因敲除技术改变菌株代谢途径或构建出新代谢途

径, 同时用计算机模拟方法改造菌株。再是筛选新的菌株, 经特定诱变筛选出不用优良性状的菌株, 然后通过DNA改组技术递归融合, 筛选出高产菌株。在得到优秀菌株的基础上找到廉价底物, 优化发酵工艺和研究控制发酵条件使代谢流最大限度的流向琥珀酸。

## 参考文献

- [1] 朱蕾蕾, 刘宇鹏, 孙志浩, 等. 一株琥珀酸产生菌的筛选及鉴定[J]. 微生物学通报, 2007, 34(1): 80-84.
- [2] 陈晓晖. 琥珀酸产生菌的分离鉴定, 诱变选育及发酵条件优化[D]. 安徽: 合肥工业大学农产品加工及贮藏工程系, 2007-12.
- [3] 李春波, 邵斌. 维生素E及其琥珀酸酯和琥珀酸钙在保健食品中的应用[J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(2): 190-192.
- [4] Song H, Lee S Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39: 352-361.
- [5] Lee P C, Lee S Y, Hong S H, et al. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen[J]. *Appl Microb Biotechnol*, 2002, 58: 663-668.
- [6] Vemuri G N, Eiteman M A, Altman E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(4): 1715-1727.
- [7] Lin H, Bennett G N, San K Y. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield[J]. *Metab Eng*, 2005, 7: 116-127.
- [8] 孙莹, 林剑, 刘晓艳, 等. 琥珀酸产生菌SH-24菌株的初步鉴定[J]. 食品与生物技术学报, 2007, 26(5): 88-91.
- [9] Jang Y S, Jung Y R, Lee S Y, et al. Construction and characterization of shuttle vectors for succinic acid-producing rumen bacteria[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(17): 5411-5420.
- [10] Lin H, Bennett G N, San K Y. Metabolic engineering of aerobic succinate production systems in *Escherichia coli* to improve process productivity and achieve the maximum theoretical succinate yield[J]. *Metab Eng*, 2005, 7: 116-117.
- [11] 郑璞, 周威, 倪晔, 等. 环境因素对琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* CGMCC 1593 发酵生产丁二酸的影响[J]. 生物工程学报, 2008, 24: 1051-1055.
- [12] Lee S H, Song H, Lee S Y. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(3): 1939-1948.
- [13] 刘宇鹏, 朱蕾蕾, 孙志浩, 等. 琥珀酸发酵高产菌株的选育[J]. 工业微生物, 2007, 37(2): 1-6.
- [14] Lee P C, Lee S Y, Hong S H, et al. Biological conversion of wood hydrolysate to succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*[J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25: 111-114.

- [15] Lee P C, Lee W G, Lee S Y, *et al.* Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production[J]. *Proc Biochem*, 1999, 35: 49-55.
- [16] Andersson C, Helmerius J, Hodge D, *et al.* Inhibition of succinic acid production in metabolically engineered *Escherichia Coli* by neutralizing agent, organic acids, and osmolarity[J]. *Biotechnol Prog*, 2009, 25(1): 116-123.
- [17] Urbance S E, Pometto A L, DiSpirito A A, *et al.* Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinogenes* using plastic composite support bioreactors[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 65: 664-670.
- [18] Guettler M V, Jain M K, Rumler D. Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants: US, Patent 5573931[P]. 1996.
- [19] Lee P C, Lee S Y, Hong S H, *et al.* Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor[J]. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2003, 26: 63-67.
- [20] Samuelov N S, Datta R, Jain M K, *et al.* Whey fermentation by *Anaerobiospirillum succiniciproducens* for production of a succinate-based animal feed additive[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1999, 65: 2260-2263.
- [21] Lee P C, Lee W G, Lee S Y, *et al.* Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 72(1): 41-48.
- [22] Nghiem N P, Davison B H, Suttle B E, *et al.* Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 1997, 63: 565-576.
- [23] Vemuri G N, Eiteman M A, Altman E. Succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations depends on the time of transition from aerobic to anaerobic conditions[J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2002, 28: 325-332.
- [24] Lin H, Bennett G N, San K Y. Fed-batch culture of a metabolically engineered *Escherichia coli* strain designed for high-level succinate production and yield under aerobic conditions[J]. *Biotechnol Bioeng*, 2005, 90: 775-779.
- [25] Stols L, Donnelly M I. Production of succinic acid through overexpression of NAD<sup>+</sup>-dependent malic enzyme in an *Escherichia coli* mutant[J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63(7): 2695-2701.
- [26] Lee P C, Lee W G, Lee S Y, *et al.* Fermentative production of succinic acid from glucose and corn steep liquor by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*[J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2000, 5: 379-381.
- [27] Lee P C, Lee S Y, *et al.* Succinic acid production by *anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC 29305 growing on Galactose, Galactose/Glucose, and Galactose/Lactose[J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, 18(11): 1792-1796.
- [28] Huh Y S, Jun Y S, Hong Y K, *et al.* Effective purification of succinic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*[J]. *Process Biochem*, 2006, 41: 1461-1465.
- [29] Davison B H, Nghiem N P, Richardson G L. Succinic acid adsorption from fermentation broth and regeneration[J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2004(113-116): 652-670.

## 《生物医学工程研究》征定启事

《生物医学工程研究》(CN—1413/R), 是中国科技核心期刊。

本刊立足于生物医学工程研究前沿, 主要栏目有: 论著、科研简讯、新技术与新方法、专题讲座、新产品评价等。主要刊登人工器官、生物材料、生物力学、组织工程等领域的新技术、新方法、新技术, 读者对象主要为大专院校、医疗、科研院所从事生物医学工程研究、教学的师生、临床医生、工程技术人员及有关人员, 具有可读性和实用性。

《生物医学工程研究》为季刊大16开, 季末25日出版。定价每期10.00元(包括邮费), 全年4期共40.00元

需订阅者可直接与《生物医学工程研究》编辑部联系, 同时请汇款。银行汇款寄山东生物医学工程学会, 帐号: 000000131003800000290, 开户行: 济南齐鲁银行燕山支行。

本刊收到定单和汇款后将按期邮寄刊物。

编辑部地址: 山东济南市解放路11号 邮 编: 250013

电 话: 0531-88933885 88562189 E-mail: sdbme@163.com