

琥珀酸发酵研究进展*

张洪勋 罗海峰 庄绪亮

(中国科学院生态环境研究中心环境生物技术室 北京 100085)

摘要: 琥珀酸在化工和食品行业应用广泛。与传统化学方法相比,微生物发酵法生产琥珀酸具有诸多优点:生产成本具有竞争力;利用可再生的农业资源包括二氧化碳作为原料,避免了对石化原料的依赖;减少了化学合成工艺对环境的污染。主要介绍产琥珀酸微生物的来源和育种,代谢途径和发酵调控机制以及产品回收工艺的进展。

关键词: 琥珀酸, 代谢, 发酵

中图分类号: Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2003) 05-0102-05

RESEARCH PROCESS IN PRODUCTION OF SUCCINIC ACID BY FERMENTATION

ZHANG Hong-Xun LUO Hai-Feng ZHUANG Xu-Liang

(*Department of Environ-biotechnology, Research Center for Eco-Environmental, Sciences
Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085*)

Abstract: Succinic acid is widely used in the field of chemistry and food process. Compared to the traditional chemical synthesis, succinic acid production by fermentation has some benefits. The new process with competitive cost uses renewable agricultural resources including green house gas CO₂ instead of fossil fuels and reduces pollution from chemical synthesis. In this article, research progress in production of succinic acid by fermentation such as microorganisms, metabolic pathways and its regulation, fermentation and isolation are briefly reviewed.

Key words: Succinic acid, Metabolism, Fermentation

* 国家自然科学基金资助项目 (NO.30200004)

Project Granted by Chinese National Natural Science Fund (No.30200004)

收稿日期: 2002-10-13, 修回日期: 2002-03-10

琥珀酸(又称丁二酸)作为一种重要的化工原料在医药、食品以及表面活性剂等行业有着广泛的用途。然而,传统上的化学合成琥珀酸因成本 and 环境污染等原因使得琥珀酸作为基本化工原料的广泛应用受到限制。正因为如此,以微生物发酵法生产琥珀酸的研究与开发正在美国等国家深入地进行着。

发酵法生产琥珀酸有诸多优点。首先,据报道采用新的微生物发酵生产工艺和电渗析、液液萃取的回收新工艺,预计琥珀酸的成本价在2.20美元/kg(生产规模:5,000t/a)和0.55美元/kg(生产规模:75,000t/a)^[1],比传统的化学生产法成倍降低。由此可见,用传统的化学合成法生产琥珀酸将让位于发酵法;其次,因为琥珀酸的环境友好特性,成本的降低非常有利于该产品的广泛应用,琥珀酸作为有机合成中间体取代许多苯类化合物和其他石化产品的市场前景广阔,社会、环境效益显著^[1];第三,由于发酵法生产琥珀酸是以可再生糖源(如葡萄糖)和二氧化碳作为主要原料,因此新工艺本身不仅摆脱了对石化原料的依赖,而且开辟了温室气体二氧化碳利用的新途径。

目前我国发酵法生产琥珀酸尚未取得成功,仍处于实验室研究阶段。本文将着重介绍产琥珀酸菌种的来源和育种,代谢途径及调控,以及发酵和回收工艺研究概况。

1 产琥珀酸微生物

琥珀酸是许多严格厌氧菌和兼性厌氧菌的代谢中间体,可通过这类微生物的生理代谢活动由糖类或氨基酸而产生。产生琥珀酸的微生物有:丙酸产生菌,例如 *Propionibacterium species*, 典型的胃肠菌,例如 *E. coli*、*Pectinatus sp.*, 瘤胃菌,例如 *Actinobacillus succinogenes*^[2], *Bacteroides amylophilus*, *Brevibacterium divaricatum*, *Succinimonas amyolytica*, *Succinivibrio dextrinosolvens*, *Wolinella succinogenes*, 以及 *Ruminococcus flavefaciens* 等。一些乳酸菌的菌株也可产生琥珀酸。

许多琥珀酸产生菌是从瘤胃中分离出来的,鉴于瘤胃中微生态环境比较复杂,所以给分离工作提出了很高的要求,目前大多学者的分离方法都是基于最大可能的创造与瘤胃相似的分离环境而达到对目标瘤胃菌的分离。如果反刍动物将草料如干草、谷类如玉米作为其部分食物,就会出现许多能够降解纤维素和糖类大分子物质的瘤胃微生物,由于瘤胃复杂的微生态环境,使得这些瘤胃菌可以代谢纤维素和糖类大分子物质而生成许多特有的代谢产物,如 *Ruminococcus flavefaciens* 和 *Fibrobacter succinogenes* 就是瘤胃中主要的消化纤维素厌氧菌以及主要的乙酸、琥珀酸产生菌,而 *Actinobacillus succinogenes*^[1] 则是利用糖类物质代谢产生琥珀酸的瘤胃菌的代表。

2 主要琥珀酸产生菌的代谢途径

在众多的琥珀酸产生菌中,目前研究的最多的是 *Actinobacillus succinogenes*^[3,4] 和 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*^[5-7]。*Actinobacillus succinogenes* 是一种从瘤胃中分离、耐渗透压的兼性厌氧细菌,它可以在厌氧下利用和同化很多糖类,例如葡萄糖,纤维二糖,果糖,半乳糖,蔗糖,乳糖和甘露醇等,这种细菌可以高产琥珀酸,同时伴随有乙酸、甲酸和乙醇等少量副产物产生;*Anaerobiospirillum succiniciproducens* 是一种严格厌氧细菌,从猎犬的口腔中分离,革兰氏阴性,可以利用葡萄糖等产生琥珀酸,乳酸,甲酸和乙酸等。虽然二者来源不同,但二者具有相似的代谢途径^[1](图1)。

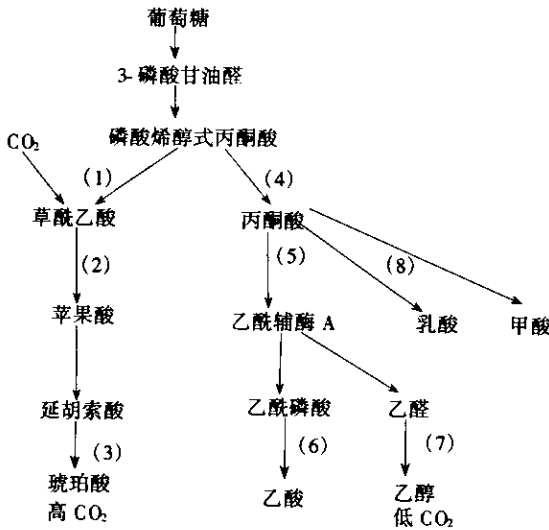


图 1 琥珀酸产生菌的葡萄糖代谢途径

- 1 磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶, 2 苹果酸脱氢酶, 3 延胡索酸还原酶, 4 丙酮酸激酶, 5 丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶, 6 乙酸激酶, 7 乙醇脱氢酶, 8 乳酸脱氢酶

由图 1 代谢途径可以看出, 磷酸烯醇式丙酮酸是琥珀酸发酵的一个非常重要的中间体, 在厌氧条件下, 磷酸烯醇式丙酮酸可被两种不同的酶催化, 它们是磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶和丙酮酸激酶。磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶是一种固定二氧化碳的酶, 在有二氧化碳存在的情况下, 它可以 将磷酸烯醇式丙酮酸转化为草酰乙酸, 进而被后续的苹果酸脱氢酶、延胡索酸酶和延胡索酸脱氢酶转化而生成琥珀酸; 而丙酮酸激酶不能固定二氧化碳, 它可将磷酸烯醇式丙酮酸转化为丙酮酸, 进而生成乙酰辅酶 A, 由此进入了典型的混合酸发酵而产生乳酸, 乙酸, 甲酸和乙醇等产物。

由此可见, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶是琥珀酸分支代谢中的关键酶之一, 它的活性高低直接影响着这类细菌代谢的产物的种类和多少, 琥珀酸的发酵调控的关键是对磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的调控。另外, 苹果酸脱氢酶, 延胡索酸酶和延胡索酸脱氢酶也在琥珀酸的分支代谢中有着重要的作用^[8]。

3 琥珀酸发酵代谢调控与育种

前已述及, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶是琥珀酸分支代谢中的关键酶之一, 也是主要生化反应的限速酶, 它受好多因素的影响和调控, 最突出的因素是二氧化碳^[8]和生物素的影响。二氧化碳对磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶的调控表现在二氧化碳水平的高低可以调节磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的活性, 在琥珀酸产生菌中, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶可以固定二氧化碳而合成草酰乙酸, 在低的二氧化碳水平下 (二氧化碳和葡萄糖的摩尔比为 1:10), *Actinobacillus succinogenes* 发酵葡萄糖以产乙醇为主要产物, 而 *Anaerobiospirillum succiniciproducens* 则发酵葡萄糖以产乳酸为主要产物; 在高的二氧化碳水平下 (二氧化碳和葡萄糖的摩尔比为 1:1), 二者发酵葡萄糖均以琥珀酸为主要产物。二氧化碳对磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶的调控机理在于二氧化碳水平与磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶的活性相关联。随着二氧化碳水平的提高, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶的酶活提高, 而乙醇脱氢酶和乳酸脱氢酶活性降低, 所以, 在高二氧化碳水平下, 磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶可以固定二氧化碳而合成草酰乙酸, 进而生成大量的琥珀酸。生物素是许多羧化酶的辅基, 对提高磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶的活性也有重要作用, 作者在研究中发现 (尚未发表), 在培养基中添加 400μg/L 的生物素时, 对提高琥珀酸的产率有利, 同时可以最大限度的降低副产物乳酸的生成, 可见, 生物素的加入, 提高了磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶的活性, 而部分的抑制了丙酮酸激酶的活性。

Podkovyrov 和 Zeikus 将 *Anaerobiospirillum succiniciproducens* 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶纯化后发现, 该酶对氧稳定, 最适 pH 在 6.5~7.1 之间, 在 pH5.0~9.0 都比较稳定, 该酶在有 Mn^{2+} , Co^{2+} 和 Mg^{2+} 的情况下, 表现出最大的活性。这一研究成果对基因工程菌的构建提供了宝贵的信息。近几年, 通过在 *E. coli* 中过度表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶的基因来提高琥珀酸的产量已成为基因工程领域研究的热点之一^[9,10]。

目前, 琥珀酸高产菌株的选育工作集中于两方面: 其一是运用传统的诱变方法, 在特异性很强的选择性平板上筛选琥珀酸高产菌株, 如 Guetter 和 Jain^[11] 等人从出发菌株 *Anaerobiospirillum succiniciproducens* 中选育出抗氟代乙酸的变异株, 相对于出发菌株而言, 变异株产琥珀酸的能力有了很大的提高, 同时, 副产物乙酸有较大减低, 而且, 选择培养基中的氟代乙酸浓度越高, 选择出的变异株的产琥珀酸的能力愈强; Guetter^[12] 等人还筛选出 *Actinobacillus succinogenes* 的抗 8g/L 氟代乙酸的变异株, 琥珀酸产量达到 110g/L, 这是目前琥珀酸发酵中所报道的最高产量; 但作者在研究中发现(尚未发表), 选育出的 *Actinobacillus succinogenes* 抗氟代乙酸的变异株并未提高琥珀酸的产量, 反而提高了副产物乳酸的产量。根据对 *Actinobacillus succinogenes* 的琥珀酸分支代谢途径分析, Guetter 等人在美国专利中筛选出的 *Actinobacillus succinogenes* 的抗氟代乙酸的变异株的高性能的理论解释值得去深入探讨; 其二是运用分子生物学方法来构建基因工程菌, 这方面的报道日渐增多, 已成为高产琥珀酸细菌育种工作的方向。例如 Laiveni-neks^[13] 等人对 *Anaerobiospirillum succiniciproducens* 的磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶基因进行了克隆, 测序后, 虽然在 *E. coli* 中得到了过度表达, 但琥珀酸的产量有限, 而 Millard^[14] 等人构建的基因工程菌 *E. coli* 却获得了高产, 琥珀酸产量达到 45 g/L。

4 发酵工艺与回收工艺

琥珀酸发酵是典型的厌氧发酵。由于二氧化碳在琥珀酸产生菌代谢过程中起着至关重要的作用, 因此目前对发酵工艺的研究主要集中于如何让琥珀酸产生菌在代谢过程中最大限度地利用二氧化碳, 当前研究者大多采用了持续不断地通入二氧化碳的发酵工艺保证了琥珀酸产生菌对二氧化碳的固定, 这是琥珀酸发酵工艺之中与其他有机酸发酵不同的地方。

目前从发酵液中回收有机酸的方法主要有以下两种: 其一是目前化工行业所普遍采用的液液萃取法, 这种方法许多研究者已经申请了相关的专利; 其二是在发酵过程中加入碱类物质的边发酵边结晶的方法。有关从发酵液中回收琥珀酸的报道主要集中于液液萃取法上, 即使用疏水的三元胺类物质(如三丙基胺、三丁基胺和三戊基胺)从发酵液的混合物中萃取出琥珀酸。近几年又有了新的回收方法的报道, 如在发酵过程中在产物罐内加入氢氧化钙后生成琥珀酸钙盐, 随后将琥珀酸钙盐结晶回收琥珀酸的方法和 Zeikus^[15] 等人所使用的电渗析酸化和结晶同步进行的回收方法。

5 结论及展望

从已公开的报道来看, 无论是生产成本、市场, 还是工艺和产品的环境效益, 以微生物发酵方法生产琥珀酸与传统的化学合成法相比具有的优点显而易见。近年的理论和实验研究加深了对琥珀酸产生菌的生理特性的认识, 特别是分子生物学技术的飞速发展, 构建新的高产的基因工程菌已成为可能。同时对琥珀酸的发酵和提取技术的

发展也为大规模工业化生产琥珀酸奠定了基础。因此, 研究与发展琥珀酸的生物合成工艺十分必要, 且前景乐观。

参 考 文 献

- [1] Zeikus J G, Jain M K, Elankovan P. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 545 ~ 552.
- [2] Guettler M V, Jain M K. *Int J Syst Bacteriol*, 1999, **49**: 207 ~ 216.
- [3] Park D H, Zeikus J G. *Journal of Bacteriology*, 1999, **181**: 2403 ~ 2410.
- [4] Park D H, Zeikus J G. *Appl Enviro Microbiol*, 1999, **65**: 2912 ~ 2917 .
- [5] Lee P C, Lee W G, Kwon S, *et al.* *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, **54**: 23 ~ 27.
- [6] Lee P C, Lee W G, Lee S Y, *et al.* *Process Biochemistry*, 1999, **35**: 49 ~ 55.
- [7] Lee P C, Lee W G, Lee S Y, *et al.* *Biotechnol and Bioengineer*, 2001, **72**: 41 ~ 48.
- [8] Van der Werf M J, Guetter M V, Jain M K, *et al.* *Arch Microbiol*, 1997, **167**: 332 ~ 342.
- [9] Gokarn R R, Eiteman M A, Altman E. *Biotechnology Letter*, 1998, **20**: 795 ~ 798.
- [10] Gokarn R R, Eiteman M A, Altman E. *Appl Enviro Microbiol*, 2000, **66**: 1844 ~ 1850.
- [11] Guettler M V, Jain M K. US Patent, 1996, 5521075.
- [12] Guettler M V, Jain M K. US Patent, 1996, 5573931.
- [13] Laivenieks M, Vieille C, Zeikus J G. *Appl Enviro Microbiol*, 1997, **63**: 2273 ~ 2280.
- [14] Millard C S, Chao Y P, Liao J C. *Appl Enviro Microbiol*, 1996, **62**: 1808 ~ 1810.
- [15] Zeikus J G, Elankovan P, Grethlein A. *Chem Proc*, 1995, 71 ~ 72