

从原料到产品：生物基丁二酸研究进展*

税宗霞¹ 秦 晗¹ 吴 波¹ 谭芙蓉¹ 王景丽¹ 何明雄^{1,2**}

¹农业部沼气科学研究所, 生物质能技术研究中心 成都 610041

²农业部农村可再生能源开发与利用重点实验室 成都 610041

摘 要 丁二酸作为一种重要的有机化工原料及中间体, 广泛用于生物高分子、食品与医药等行业, 市场潜在需求量巨大; 同时作为一种优秀的C4平台化合物, 被认为是未来12种最具发展前景的生物炼制产品之一. 近年来随着石化资源的日益枯竭及环境污染问题的日益严峻, 以生物质为原料生产丁二酸等生物基产品的研究备受国内外研究者的关注. 本文从产丁二酸菌种的种类及常见菌株产丁二酸的代谢途径、产丁二酸工程菌的改造、丁二酸发酵过程控制与优化、丁二酸的分离提取工艺等4个方面综述近年来国内外生物基丁二酸研究进展, 其中以产丁二酸工程菌的改造为重点展开详细阐述. 为提高菌株产丁二酸的能力, 研究者们常采用代谢工程技术改造菌株, 皆取得显著效果. 近来也出现了利用ARTP法和基因组重排技术选育高产丁二酸的菌株. 此外, 高效的丁二酸发酵与其发酵原料, 发酵过程中相关控制因素如pH、CO₂和H₂浓度以及发酵方式密切相关; 相比其他的丁二酸分离法, 原位分离法回收丁二酸具备优势. 最后对产丁二酸菌种的改造进行展望, 认为利用适应性进化和最小基因组等技术筛选优良丁二酸生产菌是未来的趋势. 图3 表2 参109

关键词 丁二酸; 代谢工程; ARTP; 基因组重排技术; 原位分离法

CLC Q939.97

From raw materials to products: research progress in bio-based succinic acid*

SHUI Zongxia¹, QIN Han¹, Wu Bo¹, TAN Furong¹, WANG Jingli & HE Mingxiong^{1,2**}

¹Biomass Energy Technology Research Centre, Biogas Institute of Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, China

²Key Laboratory of Development and Application of Rural Renewable Energy, Ministry of Agriculture, Chengdu 610041, China

Abstract Succinic acid is regarded as an organic chemical raw material and intermediate, which has huge potentials in biopolymer, food, and medicine applications. Meanwhile, succinic acid is an excellent C4 platform chemical and has been evaluated to be one of the top 12 value-added chemicals from biomass by the US Department of Energy. In recent years, with the increasing depletion of fossil resources and other environmental pollution problems, researchers paid more and more attention on production of succinic acid from biomass feedstocks. This article reviews the recent research progress on the production of succinic acid by microbial fermentation, including the species and metabolic pathways of the main succinic-acid-producing microbes, the progress of genetic engineering strategy and metabolic engineering technology for construction of succinic acid producing strains, the fermentation process control and optimization, and extraction process of succinic acid, with emphasis on the second part. In order to improve the ability of the strains to produce succinic acid, researchers genetically engineered these strains and made some achievements so far. Recently, APTR and genome shuffling are also used to breed succinic acid producing strains. In addition, efficient production of succinic acid is closely related to the raw materials and relevant control factors such as pH, the concentration of H₂ and CO₂, as well as fermentative modes. Among the succinic acid production methods *in situ* separation has significant superiority in extracting succinic. Finally, this paper also forecasts achieving a cost-effective process for bio-succinic acid production, and a trend to screen excellent succinic acid producing strains by adaptive evolutionary and minimal genome technology in the future.

Keywords succinic acid; metabolic engineering; ARTP; genome shuffling; *in situ* separation

收稿日期 Received: 2014-07-17 接受日期 Accepted: 2014-09-15

*四川省青年科学基金项目 (2015JQ0047)、四川省科技支撑计划项目 (2014NZ0045) 和国家自然科学基金项目 (31000028) 资助 Supported by Youth Science and Technology Foundation of Sichuan Province (2015JQ0047), the Sichuan Key Technology R & D Program (2014NZ0045) and the National Natural Science Foundation of China (31000028)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: hemingxiong@caas.cn)

随着石化资源的日益枯竭及环境污染问题的日益严峻, 物质资源以其储量丰富、可再生和环境友好型等优势, 将成为一种重要的替代资源^[1]. 因此, 近年来以生物质为原料生产能源、大宗化学品或高附加值产品的研究备受国内外研究者的关注. 在众多化学品中, 丁二酸被美国能源部认为是未来12种最具发展前景的大宗生物炼制产品之一, 且位居其首^[2].

丁二酸是一种常见的天然有机酸, 因其首次于1550年从琥珀中蒸馏所得, 因此丁二酸又称为琥珀酸 (Succinic acid, SA)^[3]. 作为一种优秀的“C4平台化合物”, 丁二酸在食品、化学、医药工业以及其他领域有着广泛的应用. 其中丁二酸最大的应用潜力是作为大规模工业原料的应用, 从而可以取代很多基于苯和石化中间产物的商品, 如可用于合成聚丁二酸丁二醇酯 (Poly butylene succinate, PBS)、聚丁二酸己二醇酯 (Poly hexylene succinate, PHS) 等新型生物可降解原料, 应用前景十分广阔. 丁二酸的市场价格约为2 400-3 000美元/t, 预计到2015年丁二酸的年需求量将达到10万 t^[3], 相当于一个大于2亿美元的需求市场. 据透明度市场研究 (Transparency Market Research) 于2013年最新发布的报告显示, 预计在2018年将达到价值8亿美元的丁二酸市场需求量^[4]. 近年来, 随着丁二酸应用领域的不断开拓, 市场上对丁二酸的需求猛增, 预计未来年需求量将突破2 500万 t^[5]. 如此迅猛增长的需求速度以及庞大的需求量, 促使人们迫切地探寻有关丁二酸生产方法的研究.

传统的丁二酸生产方法是采用石化法从丁烷通过顺丁烯二酸酐生产^[6], 但因石油资源危机、环境污染、生产工艺的复杂和成本等原因使得利用化学合成受到严重的限制^[7]. 基于这些限制, 近年来研究者逐步将视线集中在利用生物技术手段产丁二酸的方法上, 尤其是以可再生的生物质资源为原料的微生物发酵法. 利用微生物发酵法产丁二酸, 具有成本低、污染小、环境友好等优势, 且在发酵过程中温室气体CO₂可作为原料之一被微生物吸收利用, 因此可在一定程度上减缓温室效应^[8-10]. 由此可见, 开发高效的生物法产丁二酸策略具有十分重要的经济和环境效益.

本文从生物技术的上中下游阶段, 即产丁二酸菌株的筛选及改造、产丁二酸发酵过程工艺研究、丁二酸的分离纯化3个阶段阐述和分析近年来国内外有关丁二酸方面的研究进展以及研究重点, 并对今后在生物基丁二酸方面的发展趋势进行展望, 旨在为今后相关研究提供良好的借鉴, 同时为丁二酸工业化生产奠定良好的基础.

1 菌种

利用微生物发酵法产丁二酸, 优良菌种的选择是制备丁二酸的一个关键步骤, 它会直接影响到目标产物的产量和回收率. 作为三羧酸 (柠檬酸) 循环 (TCA) 的中间产物, 丁二酸是一些厌氧和兼性厌氧微生物代谢途径中的共同中介物.

1.1 天然产丁二酸的菌种及代谢途径

1.1.1 菌种类 自然界中可代谢生成丁二酸的菌种类种类繁多, 但目前研究的热点主要集中在一些具有高效产丁二酸或遗传背景清晰等优势显著的菌种上.

丁二酸生产菌大多数是从动物体内如牛瘤胃中分离得到的, 如产琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)^[11-12]、产琥珀酸厌氧螺菌 (*Anaerobiospirillum succ-*

iniciproducens)^[13]、曼海姆产琥珀酸菌 (*Mannheimia succiniciproducens*)^[14]. 通过微生物发酵, 它们能生产大量的混合性酸, 包括丁二酸. 由于微生物发酵培养基中存在盐类, 所以发酵液中的有机酸包括丁二酸是以盐溶液形式存在的. 为便于书写, 该文中有机酸盐统一简称为某某酸, 如丁二酸盐简称为丁二酸. 这些菌作为嗜CO₂菌, 可以利用高浓度的CO₂并结合糖类物质作为碳源产丁二酸^[15]. 菌株130Z是Guettler等人于1999年从牛瘤胃中分离得到的一种革兰氏阴性兼性厌氧菌, 该菌被命名为*A. succinogenes* ATCC 55618. 研究发现, *A. succinogenes*可耐高渗透压、高糖以及高盐, 且能够以广泛的碳源为原料生产丁二酸. *A. succinogenes*130Z在78 h内可将133 g/L葡萄糖消耗生成105 g/L丁二酸, 该菌是目前产量最优的野生型产丁二酸菌株^[5, 12]. *A. succiniciproducens*是从小猎犬的体内分离得到的一种革兰氏阴性严格厌氧菌, 该菌一般不能耐受高渗透压以及高盐, 且最优底物葡萄糖浓度一般在20-80 g/L之间, 该菌可利用的发酵底物较为广泛. 该菌在被分离后的第10年里, 即在1991年Samuelov等人首次报道了利用该菌生产丁二酸的研究. 研究发现, 在最优条件下 (pH = 6.2, 高浓度CO₂), *A. succiniciproducens*大量繁殖, 可迅速发酵20 g/L葡萄糖生成约16 g/L丁二酸. 在高糖浓度下, 丁二酸最高浓度可达65 g/L^[16-17]. *M. succiniciproducens*是从牛瘤胃中分离得到的一株可产丁二酸的革兰氏阴性球杆菌, 该菌由Lee等人命名为*M. succiniciproducens* MBEL55E, 它可在有氧或厌氧条件下利用广泛的碳源发酵生成各种产物. 作为嗜CO₂菌, *M. succiniciproducens*在CO₂充足的厌氧条件下, 可利用20 g/L葡萄糖生成13.5 g/L丁二酸^[14].

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 由于遗传背景清楚、易操作调控、生长迅速等优点一直以来是研究者的关注焦点. 一般认为, 野生型*E. coli*在有氧环境中, 丁二酸仅作为TCA循环中的中间产物, 没有积累; 在厌氧条件下, *E. coli*微生物发酵是一个产生混合酸的发酵, 是以产乙醇、乙酸、甲酸、乳酸为主要发酵产物的过程, 而只是生成了很少量的丁二酸, 仅占7.8%. 丁二酸产量一般不超过0.2 mol/mol葡萄糖, 即若以20 g/L葡萄糖发酵, 丁二酸的理论值不超过2.7 g/L, 产量甚少^[17-18]. 虽然*E. coli*丁二酸产量较低, 但因为其基础研究比较深入, 能够采用各种分子生物学的技术对菌种进行改造, 所以采用*E. coli*发酵丁二酸也已经成为一个热点.

谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 是一种好氧、生长快速的革兰氏阳性菌, 由于其遗传背景清晰且基因操作手段成熟, 已被广泛应用于氨基酸等化学品工业化生产中. Dominguez等人于1993年首次发现在溶氧不足的情况下, *C. glutamicum*代谢产物为乳酸、丁二酸和乙酸; 研究结果显示, 在供氧不足的情况下, 以100 g/L葡萄糖发酵生成了15.7 g/L的乳酸和2.3 g/L的丁二酸^[19].

此外, 早在1999年Arikawa等人曾以酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 为出发菌株开展过该菌产丁二酸的相关研究^[20], 但在此后的10年内鲜见有相关的文献报道. 与常见丁二酸生产菌如*A. succinogenes*和*A. succiniciproducens*相比, *S. cerevisiae*具广泛的底物谱和对酸以及高渗透压的高耐受性, 且它是第一个完成基因组测序的真核生物, 易于基因操作, 因此至2010年后陆续有利用该菌种开展的丁二酸生产研究的报道^[21-26]. 近年来, 运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 因其高效的糖利用效率、耐高渗透压和高糖以及出

色的产乙醇能力受到广泛关注, 研究中发现 *Z. mobilis* 同样地具有生产丁酸的能力^[27-28].

除以上野生型丁二酸生产菌种外, 据报道自然界中存在的一些乳酸杆菌 (*Lacticacid bacteria*)、脆弱类杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 和丙酸盐生产菌等菌种也能在特定的条件下不同程度地分泌丁二酸^[29-31], 只是可能由于这些菌种研究背景不够清晰或产丁二酸量极少的自身缺陷等原因, 因此目前还没有出现这些菌种进行过多的丁二酸生产的研究报道。

1.1.2 丁二酸生产菌的代谢途径 为提高菌种的丁二酸生产能力,有必要对目前重点研究菌种的代谢途径进行分析.已有的代谢途径的分析主要是通过胞外酶活性分析、基因组分析和发酵平衡的测定等方法来研究的^[32],近来也出现了利用¹³C原子标记技术^[33]分析代谢中间产物的位置来研究丁二酸的代谢途径.分析结果显示,不同产丁二酸菌代谢生成丁二酸的途径略有不同(图1,图2,图3).

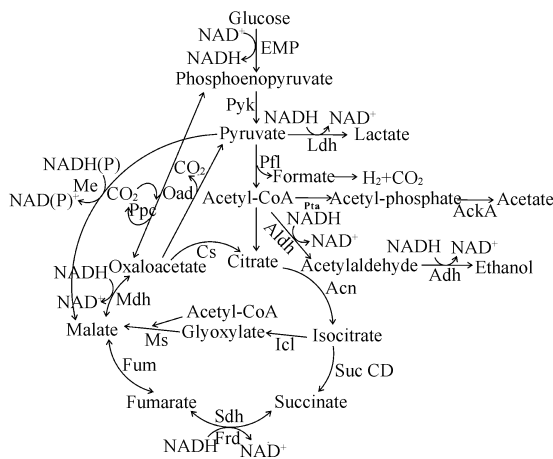


图1 野生 *E. coli* 产丁二酸代谢途径^[3, 4]。(1) 代谢物: 葡萄糖, 磷酸烯醇式丙酮酸, 丙酮酸, 乳酸, 甲酸, 乙酰CoA, 乙酰磷酸, 乙酸, 乙醛, 乙醇, 柠檬酸, 异柠檬酸, 乙醛酸, 丁二酸, 延胡索酸, 苹果酸, 草酰乙酸, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸还原态 (NADH), 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化态 (NAD⁺); (2) 酶: 丙酮酸激酶 (Pyk), 乳酸脱氢酶 (Ldh), 丙酮酸甲酸裂解酶 (Pfl), 磷酸转乙酰酶 (Pta), 乙酸激酶 (AckA), 乙醛脱氢酶 (Aldh), 乙醇脱氢酶 (Adh), 顺乌头酸酶 (Acn), 异柠檬酸裂解酶 (Icl), 苹果酸合成酶 (Ms), 琥珀酸CoA合成酶 (SucCD), 丁二酸脱氢酶 (Sdh), 延胡索酸脱氢酶 (Frd), 延胡索酸酶 (Fum), 苹果酸脱氢酶 (Mdh), 柠檬酸合成酶 (Cs), 苹果酸酶 (Me), 草酰乙酸脱羧酶 (Oad), 磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶 (Ppc); (3) 代谢途径: 糖酵解 (EMP)。

Fig. 1 Succinic acid production pathway in wild-type *E. coli* ^[13, 34]. (1) Metabolites: glucose, phosphoenolpyruvate, pyruvate, lactate, formate, acetyl-CoA, acetyl-phosphate, acetate, acetaldehyde, ethanol, citrate, isocitrate, glyoxylate, succinate, fumarate, malate, oxaloacetate, reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide (NADH), nicotinamide adenine dinucleotide, (NAD⁺); (2) Enzymes: pyruvate kinase (Pyk), lactic dehydrogenase (Ldh), pyruvate formate lyase (Pfl), phospho transacetylase (Pta), acetate kinase (AckA), acetaldehyde dehydrogenase (Aldh), alcohol dehydrogenase (Adh), aconitase (Acn), isocitrate lyase (Icl), malate synthase (Ms), succinyl CoA synthetase (SucCD), succinate dehydrogenase (Sdh), fumarate dehydrogenase (Frd), fumarase (Fum), malate dehydrogenase (Mdh), citrate synthase (Cs), malic enzyme (Me), oxaloacetate decarboxylase (Oad), phosphoenolpyruvate carboxylase (Ppc); (3) Metabolic pathway: Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP).

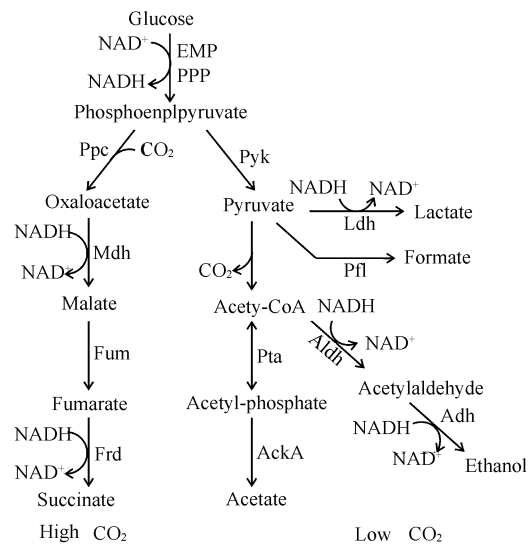


图2 野生 *A. succinogenes* 和野生 *A. succiniciproducens* 产丁二酸代谢途径^[17]. 代谢途径: 磷酸戊糖途径 (PPP).

Fig. 2 Succinic acid production pathway in wild-type *A. succinogenes* and *A. succiniproducens*. Metabolic pathway: Pentose Phosphate Pathway (PPP).

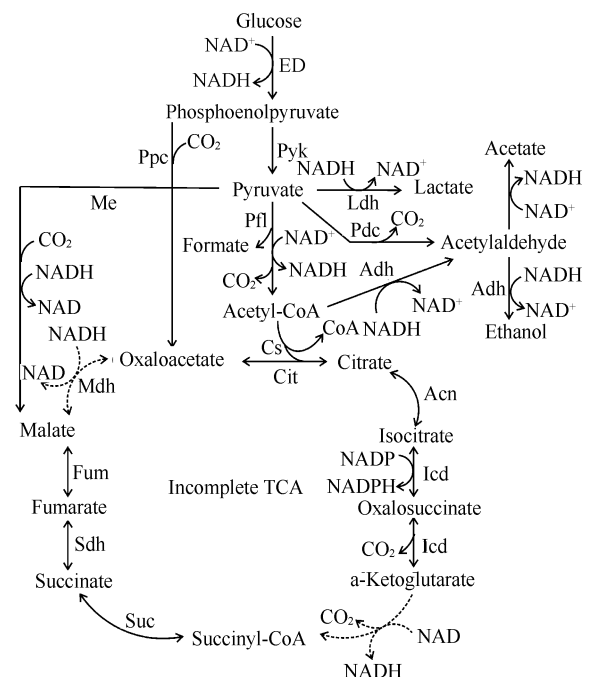


图3 野生 *Z. mobilis* 产丁二酸代谢途径^[27]。(1) 代谢物: 草酰琥珀酸, α -酮戊二酸, 琥珀CoA, 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸还原态 (NADPH), 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化态 (NADP); (2) 酶: 丙酮酸脱羧酶 (Pdc), 异柠檬酸脱氢酶 (Icd), 柠檬酸裂解酶 (Cit); (3) 代谢途径: ED途径。

Fig. 3 Succinic acid production pathway in wide-type *Z. mobilis* [27]. (1) Metabolites: oxalosuccinate, α -ketoglutarate, succinyl-CoA, reduced form of nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate (NADPH), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP); (2) Enzymes: pyruvate decarboxylase (Pdc), isocitrate dehydrogenase (Icd), citrate lyase (Cit); (3) Metabolic pathway: Entner-Doudoroff (ED).

以上是极具代表性的丁二酸生产菌的代谢途径,从代谢途径分析可知,以葡萄糖为直接碳源,在经过糖酵解(Embden-Meyerhof Pathway, EMP)、磷酸戊糖途径(Pentose Phosphate Pathway, PPP)或Entner-Doudoroff途径(ED)后生成代谢过程中的重要节点即磷酸烯醇式丙酮酸(PEP), PEP主要经过3条途径生成丁二酸:在厌氧条件下的TCA循环的还原分支,也称为发酵途径,丁二酸理论值为2 mol/mol葡萄糖;在好氧条件下的TCA循环的氧化分支,丁二酸理论值为1 mol/mol葡萄糖;乙醛酸途径,该途径在有氧条件下从本质上来说是活跃的,丁二酸理论值为1.7 mol/mol葡萄糖^[3]。代谢途径展示的不仅是一种物质的代谢过程,也反映了物质代谢之间的能量代谢。从这些代表性的代谢途径中我们不难发现,生成丁二酸的过程中需要大量的CO₂以及还原力NADH。代谢中不仅生成丁二酸,还生成大量的副产物如乙醇、乙酸、乳酸、甲酸等。

1.2 产丁二酸菌株的改造

为进一步提高丁二酸菌种的生产能力,截至目前已进行了大量的生产菌改造工作。菌种改造大多结合代谢工程和基因工程等方式对菌株进行定向改造,或采用诱变的方式对菌株进行随机突变。

1.2.1 利用代谢工程和基因工程构建丁二酸工程菌株 从代谢途径可知,野生型产丁二酸菌发酵是生成混合酸的过程,在碳源一定的情况下,为提高丁二酸的产量,就得严格控制其他副产物的生成,或采用有效手段来强化丁二酸的生成途径。目前常利用代谢工程和基因工程技术对目标菌株进行改造,但该技术的前提是需要具备成熟的基因操作工具和被研究菌种遗传背景、基因组信息较为清晰。常采用的策略是通过敲除或失活丁二酸竞争途径中的酶基因或酶,从而阻断旁路代谢途径;或通过过量表达生成或影响丁二酸代谢途径中的关键酶,从而增强或增加丁二酸代谢的生成途径,或有的研究中是把这些策略进行了结合。目前在研究产丁二酸菌株的基因工程改造中,研究比较广泛的是对*E. coli*、*M. succiniciproducens*以及*C. glutamicum*等工程菌株的改造。而由于缺乏相应的基因操作工具,截至目前仍未有关于对*A. succinogenes*和*A. succiniciproducens*的代谢工程和基因工程改造提高丁二酸产量的研究报道^[5]。

(1) 敲除丁二酸竞争途径中的关键酶基因:以野生型*E. coli*为例。针对丁二酸生成的竞争途径,目前研究中主要是对生成的终副产物乳酸、乙酸、甲酸和乙醇的关键酶基因乳酸脱氢酶基因(*ldh*)、乙酸磷酸转移酶基因和乙酸激酶基因(*pta-ackA*)、丙酮酸甲酸裂解酶基因(*pfl*)、乙醇脱氢酶基因(*adh*)进行敲除^[35-36]。菌株经过基因敲除后,发酵产丁二酸的量均有所提高。

Jantama等人在此基础上,还对影响丁二酸生成的其他旁路途径的酶进行了失活研究:他们以*E. coli* C(ATCC 8739)作为模式菌株,采用两次同源重组的方法对乳酸脱氢酶(*LdhA*)、乙醇脱氢酶(*AdhE*)、乙酸激酶(*AckA*)、甲酸转运子-丙酮酸甲酸裂解酶(*FocA-pflB*)、甲基乙二醛合成酶(*MgsA*)和丙酮酸氧化酶(*PoxB*)进行失活得到KJ073,进一步失活苏氨酸脱缩酶(*TdcD*)和2-丁酮酸甲酸裂解酶(*TdcE*)、柠檬酸裂解酶(*CitF*)、天冬氨酸转氨酶(*AspC*)

和苹果酸酶(*SfcA*)等;结合代谢进化,丁二酸的浓度从80 g/L增加到83 g/L,得率和生产强度分别从0.79 g/g和0.82 g/L/h提高到0.92 g/g和0.88 g L⁻¹ h⁻¹^[37]。

在*E. coli*中,丁二酸潜在生成途径有乙醛酸途径。对此有报道通过敲除aceBAK操纵子阻遏物的基因(*iclR*)以激活乙醛酸途径^[38]。在有氧条件下,丁二酸通过TCA循环的氧化分支形成中间产物,随后被丁二酸脱氢酶(*Sdh*)催化,若对该酶失活则丁二酸可以终产物形式存在。针对以上现象, Lin等人通过敲除丁二酸脱氢酶基因(*sdh*)、丙酮酸氧化酶的基因(*poxB*)、乙酸磷酸转移酶基因和乙酸激酶基因(*pta-ack*)和aceBAK操纵子阻遏物的基因(*iclR*)及编码磷酸转移酶系统的基因(*ptsG*),获得重组*E. coli*,构建出了包含乙醛酸途径和TCA循环氧化支路的丁二酸合成途径;通过好氧分批发酵结果显示,该菌株在59 h后丁二酸的生成量为58.3 g/L,丁二酸对葡萄糖的得率为0.56 g/g,发酵液中积累了6.1 g/L的丙酮酸和3.0 g/L的乙酸^[39-40]。

此外在其他菌种中也开展了类似的工作。Raab等利用代谢工程策略对*S. cerevisiae*的丁二酸脱氢酶基因(*sdh1*, *sdh2*)和异柠檬酸脱氢酶基因(*idh1*, *idp1*)进行敲除,可使丁二酸在胞内大量累积;通过以葡萄糖为碳源摇瓶发酵,该突变菌株可产3.62 g/L丁二酸,是野生株产丁二酸产量的4.8倍,得率为0.11 mol/mol葡萄糖^[21]。Lee等通过构建基因组规模的代谢模型,了解不同条件下的代谢流分布,然后通过敲除*ldhA*、*pflB*、*pta*、*ackA*基因,获得一株高产菌株*M. succiniciproducens* LPK7,该菌株几乎不产甲酸、乙酸和乳酸,分批培养丁二酸产量可以达到52.4 g/L,丁二酸得率和产率分别达到0.76 g/g、1.8 g L⁻¹ h⁻¹^[41]。Liu等以*C. glutamicum* ATCC13032为出发菌,首先敲除乳酸脱氢酶基因(*ldh*)获得单基因敲除菌株,然后在此基础上对该菌的丙酮酸脱氢酶系的E1 α 酶基因(*aceE*)敲除,获得一株双缺失突变株;发酵结果表明,与供试菌相比,单基因敲除菌株的丁二酸产量和转化率分别提高了94.9%和32%,且主要的副产物乳酸产量有大幅度的降低;但丙酮酸脱氢酶失活的双基因敲除菌株不能完全消除副产物乙酸的生成,较单基因敲除菌株乙酸的产量降低了37.9%,丁二酸的产量只是略有提高^[42]。

*Z. mobilis*为革兰氏阴性兼性厌氧菌,因其较快的糖吸收速率、高效代谢产某种特定产物(乙醇)的能力及其相对较小的基因组(利于遗传操作)等优点,使得它成为通过遗传工程改造成其他代谢物的理想宿主^[43-45](其代谢途径见图3,虚线表示不存在该反应)。在Kim等的报道中,通过破坏丙酮酸脱羧酶基因(*pdc*)和乳酸脱氢酶基因(*ldh*)可以使*Z. mobilis*过量生产丁二酸,其得率可达1.73 mol/mol葡萄糖,为理论值的86%),比其他一些生产丁二酸的细菌如*A. succinogenes*和*M. succiniciproducens*(约1.34 mol/mol葡萄糖)高出约30%^[46],这些结果与Seo等人的研究^[27-28]一致。由此可见,利用重组*Z. mobilis*进行微生物发酵产丁二酸具有重要的应用价值。

(2) 丁二酸生成途径关键酶基因过表达:有关该方面的研究早在上世纪八九十年代,研究者们以*E. coli*为出发菌开展了一系列的工作。如Goldberg等通过过量表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*Ppc*)或丙酮酸羧化酶(*Pyc*)来加强产丁

二酸途径, 丁二酸的得率和生产强度得到大大提高^[47-48]. 同时Liang等人研究了过量表达苹果酸脱氢酶 (Mdh) 对 *E. coli* 厌氧发酵的影响, 通过单一性厌氧条件发酵48 h, 能够消耗13.5 g/L 葡萄糖并生产4.3 g/L丁二酸, 得率为0.32 g/g^[49]. 由此可见, 通过代谢途径中关键酶的过量表达提高丁二酸的得率是可行的策略.

(3) 外源基因的引入: 丁二酸的合成需要大量的还原力, 一些微生物如 *E. coli* 中有转氢酶可催化NADPH转化为NADH, 但在 *C. glutamicum* 的基因组中却不存在该酶. 于是Yamauchi等将 *E. coli* 转氢酶基因 *udhA* 和 *pntAB* 引入野生型 *C. glutamicum* ATCC13032, 并对重组菌在有氧、微氧条件下的代谢性能进行研究; 结果表明在有氧条件下, 转氢酶的引入没有引起主要的代谢改变; 在微氧条件下, 在引入 *udhA* 基因下代谢没有明显的改变; 然而, 在引入 *pntAB* 基因的情况下, 乳酸、乙酸、丁二酸整体生产水平有所提高; 在引入 *pntAB* 基因后NADH/NAD⁺比例有所提高, 由此证明外源基因 *pntAB* 在 *C. glutamicum* 中表达后, 该转氢酶加强了NADPH转化生成NADH的过程, 同时增加了NADH/NAD⁺的比例^[50].

(4) 相关方法的有效结合: Cao等利用Xer/dif重组酶系统对 *E. coli* CICIM B0013进行代谢途径的调控研究; 结果显示, 在敲除了乙酸激酶和磷酸乙酰转移酶基因 (*ackA-pta*)、乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*)、丙酮酸甲酸裂解酶基因 (*pflB*)、乙醇脱氢酶基因 (*adhE*) 等丁二酸合成竞争途径中关键酶基因后, 所获得的重组菌株 *E. coli* CICIM B0013-1040发酵液中以丁二酸为主要产物; 随后对其PTS系统进行修饰并适当增强PEP羧化酶基因 (*ppc*) 表达剂量, 成功获得一株具备较强丁二酸生产能力的菌株 *E. coli* CICIM B0013-1050 (pTH-ppc); 该菌株厌氧转化葡萄糖36 h, 丁二酸产量达到36.2 g/L, 生产强度为1.01 g L⁻¹ h⁻¹, 葡萄糖对丁二酸的转化率达64.3%, 经高效液相色谱 (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) 检测, 无乳酸、乙酸、甲酸、乙醇生成^[51].

E. coli DC1515是敲除葡萄糖磷酸转移酶基因 (*ptsG*)、乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*)、丙酮酸甲酸裂解酶基因 (*pflA*) 的菌株, 具有发酵生产丁二酸的潜力. 为进一步提高菌株DC1515的丁二酸生产能力, 王丹等将枯草芽孢杆菌丙酮酸羧化酶基因 (*pyc*) 转入其中; 在DC1515中扩增异源丙酮酸羧化酶基因 (*pyc*), 可以增加一条由丙酮酸 (Pyr) 到丁二酸前体草酰乙酸 (Oaa) 的代谢通路, 有利于进一步提高其丁二酸产量; 用乳糖代替IPTG诱导 *pyc* 表达, 优化诱导条件后, *pyc* 过表达菌株的丁二酸产量达15.17 g/L, 为对照菌株的1.78倍; 间歇补加乳糖2次至浓度为1 g/L, 丁二酸产量可进一步增至17.54 g/L^[52]. 姜岷课题组借助Red重组系统和位点特异性重组技术, 敲除了野生 *E. coli* W3110中的基因 *pfl* 和基因 *ldh*, 获得一株双突变菌JM307 ($\Delta pfl \Delta ldh$), 并向该双突变菌中引入丙酮酸羧化酶基因 (*pyc*), 可增加一条由丙酮酸到丁二酸前体草酰乙酸 (Oaa) 的代谢通路, 有利于进一步提高其丁二酸产量; 该突变株在8 g/L初糖条件下, 发酵48 h, 菌体密度 ($D_{600\text{ nm}}$) 可提高至2.5, 丁二酸产量为2.8 g/L, 乙酸含量很低, 无甲酸、乳酸生成^[53]. 另有Okino等将 *C. glutamicum* 中乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*) 进行敲除并表达来自于根瘤菌的丙酮酸羧化酶基因 (*pyc*), 丁二酸产量达到146 g/L, 乙酸产量达

到16 g/L, 丁二酸的质量得率和生产强度分别达到0.92 g/g和3.2 g L⁻¹ h⁻¹^[54].

研究发现由于敲除了乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*) 和丙酮酸甲酸裂解酶基因 (*pflB*), 会导致辅酶NADH/NAD⁺不平衡, 厌氧条件下不能利用葡萄糖生长代谢. 因此Liu等在双突变菌株基础上构建了烟酸转磷酸核糖激酶 (Nicotinic acid phosphoribosyl transferase) 的重组菌 *E. coli* NZN111/pTrc99a-pncB, 通过加入诱导剂在厌氧摇瓶发酵过程中检测到该酶活较出发菌株提高了11倍, 辅酶NAD(H)的总量提高了3.85倍, 特别是NAD⁺的浓度提高了5.17倍^[55], 这些指标的提高将有利于糖代谢朝向丁二酸生成方向进行.

1.2.2 采用诱变的方式对菌株进行随机突变 优良菌种的选育除通过以上的不同方式获得以外, 诱变育种技术也是获得优良、稳定、高产菌株的方式之一.

常采用的方式是通过物理法和化学法进行诱变. 物理法主要是指利用紫外线对菌株进行诱变, 同时大多结合一些化学试剂如亚硝基胍 (Nitrosoguanidine, NTG)、甲基磺酸乙酯 (Ethylmethylsulfone, EMS) 和硫酸二乙酯 (Diethyl sulfate, DES) 等进行诱变^[56-58]. 经诱变后的菌株, 然后在特定环境下筛选获得性状优良的突变株. 经过诱变后的菌株较原始菌株对极端环境适应性变得更强, 丁二酸的产量有大幅度的提高, 但经过这些诱变方法所获得的菌株遗传稳定性不高, 同时由于大量有毒试剂的使用存在一定的安全隐患以及对环境的污染问题.

近来有思清源生物科技公司与清华大学合作研发的常压室温等离子体诱变育种系统 (Atmospheric and Room-Temperature Plasmas, ARTP), 为优良菌株的选育提供了一条高效、便捷、安全、快速的新方法. 该设备可用于高效地构建基因突变库及其辅助分子生物学技术获得稳定高产菌株, 姜岷课题组利用该设备开展了相关的工作.

E. coli AFP111是 *E. coli* NZN111 ($\Delta pflAB \Delta ldhA$) 的葡萄糖磷酸转移酶 (PtsG) 自发突变株, 由于该菌在厌氧条件下, ATP供给不足导致该菌不能代谢木糖, 因此姜岷等采用ARTP技术对该菌株诱变, 并以木糖为碳源进行筛选获得了一株可代谢木糖并积累丁二酸的突变株DC111; 该突变株在发酵培养基中, 72 h内可消耗10.52 g/L木糖产6.46 g/L的丁二酸, 丁二酸对木糖的得率达到了0.78 mol/mol; 且突变株中伴有ATP产生的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (Pck) 途径得到加强, Pck的比酶活相对于出发菌株提高了19.33倍, 使得其在厌氧条件下能够有足够的ATP供给来代谢木糖发酵产丁二酸^[59]. 与此同时, 姜岷等人利用突变株 *E. coli* AFP111开展了代谢进化实验, 经过菌株进化该菌株能充分利用80%来自玉米秸秆水解液的木糖厌氧发酵产丁二酸, 丁二酸产量达21.1 g/L, 产率高达76%^[60]. 由此可见, 利用该技术对菌种诱变可有效改善菌种的生长性能以及生产能力, 目前该技术在产丁二酸菌的应用还仅限于对 *E. coli* 的报道, 且相关研究甚少. 因此, 在今后研究中有必要利用该技术对其他丁二酸生产菌开展一系列的工作.

此外, 基因组重排技术 (Genome shuffling) 在菌种改进方面也取得了突出的成果. Zheng等以 *A. succinogenes* CGMCC 1593为出发菌展开了基因组重排提高丁二酸产量的研究; 他

们所采取的筛选策略是首先将*A. succinogenes* CGMCC 1593在96孔板的发酵培养基中培养,从中筛选出11株优良丁二酸生产菌,然后用于原生质体融合;在经过3轮基因组重排后,得到F3-II-3-F菌株,该菌在48 h补料式发酵中发酵130.8 g/L葡萄糖,丁二酸产量达95.6 g/L,生产强度为1.99 g L⁻¹ h⁻¹,相比母系菌株发酵90.2 g/L葡萄糖生成55.2 g/L丁二酸,基因组重排菌株丁二酸产量提高了73%^[61]。

2 产丁二酸发酵的过程控制与优化

微生物发酵中,优良菌种的选择固然关键,但在发酵过程中除基本的营养供给细胞的生长和生理维持之外,发酵培养液中的其他影响因素如基本的碳源、CO₂浓度、H₂以及培养液中pH值甚至是不同的发酵方式,同样地,在高产丁二酸发酵过程中起着重要的决定性作用。

2.1 发酵原料方面

在丁二酸生产制备过程中,原料成本占有极其重要的比例,因此寻求廉价的生物质原料来替代传统的葡萄糖和酵母膏原料作为碳、氮源制备丁二酸已经成为经济型生产的重要因素^[62]。同时,廉价的生物质原料的利用也为农业废弃资源的高效开发和利用开拓了一条新型的可行途径,具有深远的影响意义。而常见生物质资源主要包括农作物、木材及其废弃物,以及人类在生产生活过程中所形成的可再利用的废弃物等等,其优势在于可再生、资源丰富、低污染、低成本。

目前研究中常用的农作废弃物或残渣主要有甘蔗蔗渣^[63-64]、玉米秸秆、玉米穗及其水解物^[65-67]、木薯^[68]、稻草^[69]、小麦秸秆^[70]等,近年来利用这些原料开展的一系列工作也已取得不同程度的成果(相关研究见表1)。研究结果表明,生物质资源替代或部分替代传统原料生产丁二酸的策略是有效可行的,产丁二酸量相比是相差无几的,但这些廉价生物质的利用却使发酵成本大大降低了。但是生物质资源的利用还需要对其进行酸、碱或酶的预处理从而获得水解液,目前在预处理阶段还存在一定的技术难点,且在处理过程中会产生一些抑制因子如呋喃甲醛、酚类化合物和弱酸等可能会对发酵过程产生抑制作用^[71],克服这些瓶颈也将是今后研究的重点。

2.2 发酵过程的控制

2.2.1 CO₂ 从代谢途径可知,CO₂是作为碳源被微生物利用用于合成丁二酸的。不同微生物固定CO₂产丁二酸的代谢途径及能力有所差异,涉及CO₂固定途径中主要的关键酶有PEP羧化激酶、PEP羧化酶和丙酮酸羧化酶(Pyc)等^[72]。PEP羧化激酶是野生株*A. succiniciproducens*、*A. succinogenes*、*M. succiniciproducens*厌氧合成丁二酸代谢途径中C3途径向C4途径转换的关键酶^[62, 73]。而在*E. coli*和*C. glutamicum*中,通过过量表达固定CO₂的关键酶PEP羧化酶或引入丙酮酸羧化酶催化丙酮酸合成草酰乙酸,能够提高CO₂固定效率,提高C4途径的代谢通量^[54, 74]。发酵液中CO₂浓度高低对丁二酸产量的影响在McKinlay等人的研究^[75]中得以验证。他们在研究中发现,*A. succinogenes*发酵产丁二酸过程中,在高CO₂摩尔比的培养环境下(100 mol CO₂/100 mol葡萄糖),PEP羧化合成草酰乙酸的能力提高,丁二酸为主要还原性产物;但在低CO₂

水平下(10 mol CO₂/100 mol葡萄糖),*A. succinogenes*以乙醇为主要还原性代谢产物。因此有必要在发酵过程中通过控制CO₂的浓度来提高丁二酸的产率。常用方法是直接通入外来CO₂,或在培养基中添加碳酸盐成分。CO₂或碳酸盐在培养溶液中主要是以HCO₃⁻和CO₃²⁻的形式存在,而以何种形式存在主要是由培养液的pH决定^[3]。此外,近年来也通过基因工程手段在生产菌株中过量表达或引入可固定CO₂的关键酶,同样地取得了显著的成果^[76]。

2.2.2 H₂ 除了CO₂的供给,H₂作为一种潜在电子供体同样能够影响细胞的代谢过程。Lee等发现H₂和CO₂混合气体的厌氧条件下,有利于增加*A. succiniciproducens*的生物量和发酵生成丁二酸;经过H₂和CO₂比例的优化发现,相对于100% CO₂气体的通入,当在通入5% H₂和95% CO₂时,丁二酸的产量和产率分别增加了5.8%(0.86 vs 0.91 g/g)和80%(1 vs 1.8 g L⁻¹ h⁻¹);他们分析得出这种结果原因是由于通入H₂使得细胞的氧化换电位有所下降,并使得NADPH循环得以加强^[77]。因此,外源H₂的补充被推断主要起着两个重要的作用:降低了细胞内的氧化还原电位这有利于细胞量的生成;H₂作为电子供体,促进了葡萄糖转化为丁二酸。同样地,在Stols等的研究中也表明外源提供H₂可以为过量表达苹果酸的*E. coli* NZN111提供大量的代谢还原力,使得丁二酸质量得率从0.65 g/g增长到1.20 g/g^[78]。外源提供H₂同样地可以提高过量表达丙酮酸脱羧酶的*E. coli* AFP111的丁二酸产率,并且还能在一定程度上减少延胡索酸的积累^[79]。

2.2.3 pH 如前所述,发酵液中的pH值同样地会影响丁二酸的生产。产丁二酸菌大多生长环境为中性,但发酵产丁二酸是生成混合酸的过程,发酵液中的pH值除影响CO₂的存在形式外,更重要的是由于环境中pH的下降会抑制微生物的生长,从而影响发酵效率,因此发酵过程中对pH的调控以及优化尤为重要。pH的调控主要是以添加pH调节剂的方式进行的,常用的调节剂为MgCO₃,它可满足菌体生长与产酸的要求,但其成本相对较高(成本约920\$/t)。因此,针对此问题,杨卓娜和Li等人研究比较了不同pH调节剂对*A. succinogenes* NJ113发酵产丁二酸的影响,并对这些不同调节剂质量比例进行优化后发现,当选用NaOH、Mg(OH)₂以质量比为1:1混合时(成本约320\$/t),发酵效果最好,在达到高产丁二酸目的的同时,生产成本降低了65%以上^[85, 99]。这些结果目前还仅限于利用*A. succinogenes*的研究,是否适用于其他丁二酸生产菌的生产要求以及其他菌株发酵产丁二酸的最佳pH调控策略,还有待研究者们进一步探索。

2.2.4 发酵方式方面 微生物在有氧和厌氧条件下培养时,其生理和代谢路径有很大的差别^[100-101]。如*E. coli*作为兼性厌氧菌,其有氧条件下野生型菌株不以丁二酸为终产物,但在有氧条件下其比生长速率及细胞密度均高于厌氧,因此采用先有氧快速培养获得高密度的菌体细胞,进而厌氧发酵生产丁二酸的两阶段发酵模式,可大幅提高丁二酸的生产速率^[3, 102]。近年来有相关研究者针对该问题进行了研究,他们以*E. coli*为发酵菌株,研究了其有氧转厌氧的最佳时机;当在最佳转厌氧条件下,丁二酸浓度在94 g/L以上,生产能力可达1.3-1.76 g L⁻¹ h⁻¹^[100, 103]。

同时当以生物质为发酵原料时,主要涉及有两种发

表1 不同生物质资源发酵生产丁二酸的产量

Table 1 Succinic acid production from different biomass

底物 Substrate	发酵方式 Method	微生物 Microbe	丁二酸量 Succinic acid			参考文献 Reference
			浓度 Conc. ^a (g/L)	得率 Yield ^b (g/g)	生产力 Prod. ^c (g/L h)	
玉米秸秆糖醇液 Corn stover sugar alcohol	厌氧批次 Anaerobic batch	<i>A. succinogenes</i>	29.10	0.85	0.61	[80]
玉米、小麦、水稻秸秆 Corn stover, wheat stover and rice stover	厌氧批次 Anaerobic batch		40.21; 30.06; 39.07	0.5; 0.38; 0.49	0.56; 0.42; 0.54	[81]
玉米秸秆水解液 Corn fiber hydrolysate	厌氧批次 Anaerobic batch		70.30	0.96	0.63	[82]
玉米秸秆水解液 Corn straw hydrolysate	厌氧批次 Anaerobic batch		35.40	0.73	0.98	[83]
玉米秸秆水解糖 Corn straw hydrolysate	厌氧补料 Anaerobic fed-batch		42.70	0.83	0.81	[84]
玉米秸秆、废酵母水解液 Corn straw and waste yeast hydrolysate	厌氧批次 Anaerobic batch		56.40	0.73	ND	[85]
玉米籽皮 Cornhusk	厌氧批次 Anaerobic batch		42.30	0.62	0.98	[86]
玉米皮 Cornhusk	厌氧批次 Anaerobic batch		35.80	0.72	0.75	[87]
木薯粉和玉米浆 Cassava flour and corn steep liquor	厌氧批次 Anaerobic batch		69.31	0.90	1.44	[88]
稻壳酒糟 Spirit-based distillers grains	厌氧批次 Anaerobic batch		32.00	0.13	ND	[89]
啤酒废酵母酶解液 Yeast zymolysis solution	厌氧批次 Anaerobic batch		34.60	0.69	0.72	[90]
甘蔗糖蜜和乳清粉 Sugarcane molasses and whey powder	厌氧批次 Anaerobic batch		32.54	0.81	1.55	[91]
菊芋 Jerusalem artichoke	厌氧批次 Anaerobic batch		98.20	0.95	1.02	[92]
蔗糖 Sucrose	厌氧补料 Anaerobic fed-batch		60.50	0.83	2.16	[93]
木薯淀粉和未加工的木薯 Cassava starch and crude cassava powder	厌氧批次 Anaerobic batch	<i>E. coli</i>	127.1; 106.1	0.86; 0.66	3.23; ND	[68]
木薯淀粉 Cassava starch	厌氧批次 Anaerobic batch		61.20	0.89	1.36	[94]
蔗糖和甘蔗糖蜜 Sucrose and sugarcane molasses	厌氧批次 Anaerobic batch		51.00; 62.00	0.91; 0.96	1.05; 0.77	[95]
玉米秸秆酶解液 Corn stalk enzymatic hydrolysate	双阶段有氧批次 Dual phase aeration batch		57.80	0.87	0.80	[96]
餐厨垃圾水解液 Mixed food waste hydrolysate	有氧批次 Aerobic batch		29.90	0.22	0.48	[97]
玉米穗轴的稀酸水解 Corn cob hydrolysates	厌氧批次 Anaerobic batch	<i>C. glutamicum</i>	40.80	0.69	0.85	[98]

a: 发酵液中的丁二酸浓度; b: 丁二酸得率由丁二酸产量 (g) 除以糖的消耗量 (g) 得到; c: 丁二酸产率由产生的丁二酸浓度除以总的发酵时间得到; d: ND表示没有获得数据。

a: Succinic acid concentration in fermentation broth. b: Succinic acid yield was calculated as grams of succinic acid produced divided by grams of the sugar consumed. c: Succinic acid productivity was calculated as succinic acid concentration produced divided by overall incubation time. d: ND = No data available.

酵方式即分步酶解发酵 (Separate enzymatic hydrolysis and fermentation, SHF) 和同步糖化发酵 (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF). SHF是两步过程, 即先对生物质水解, 然后利用水解液进行发酵; SSF是对生物质糖化和发酵同步进行的一步发酵方式. Akhtar等人综述中提及通过SSF方式利用生物质资源 (木质纤维素) 所产丁二酸浓度和生产力较通过SHF方式要低一些, 但SSF所具备的其他显著优势基本可替代SHF, 如通过原位同步水解和发酵方

式, 可利用水解后的单糖或多糖消除对酶制剂的抑制作用; 通过SSF可直接利用糖化产生的葡萄糖转化为丁二酸, 步骤单一; 相比SHF, 纤维素更多地在SSF中迅速地被转化为葡萄糖^[71]. 针对丁二酸产量问题, SSF可通过利用基因工程菌株和改善发酵条件弥补其不足. 在Chen等人利用*E. coli* NZN111同步糖化发酵木薯研究中发现, 当在SSF用于厌氧阶段, 并在优化条件下, 发酵木薯淀粉生产丁二酸产率高达0.86 g/g, 木薯淀粉在SSF过程中几乎被全部水解; 通过改变细胞密度,

可获得127.13 g/L丁二酸;当天然木薯粉直接用于SSF,可生成106.17 g/L丁二酸^[68].由此可见SSF发酵更优于SHF,且SSF用于厌氧发酵产丁二酸效果更佳.

除通过以上单因素的调控实现高效产丁二酸外,近年来也不断出现了研究者们对这些发酵条件的综合优化.他们利用统计学方法,如通过Plackett-Burman (PB) 试验设计筛选影响丁二酸发酵的重要参数,再采用正交试验设计或响应面分析法优化发酵工艺参数对发酵条件优化.这些有效措施是实现低成本、高产率丁二酸发酵的重要前提,同时这些研究成果也是在今后的工业化生产中值得参考的标准.

③ 丁二酸的提取工艺

微生物发酵法产丁二酸,由于在发酵液中丁二酸是以盐溶液形式存在的,且在发酵液中存在多种其他物质,如残糖、副产物(乙醇、乙酸、乳酸、甲酸、丙酮酸等)、生物大分子(蛋白质、核酸、多糖)、盐类等,因此丁二酸后续的回收提取工艺是比较困难的^[104].据报道丁二酸的提取成本占整个生产成本的50%-70%^[105],那么采用经济高效的提取工艺对提高丁二酸的得率、纯度和降低丁二酸生产成本是十分必要的.生物法产丁二酸的下游处理工艺主要有3个重要步骤:第一步是通过膜过滤或离心法去除菌体;第二步是利用蒸发、絮凝、电渗析、吸附、萃取、离子交换等法除去杂质对丁二酸进行初分离;最后采用真空蒸发和结晶对丁二酸进行纯化.目前采用的发酵液中丁二酸的提取方法主要有直接结晶法、沉淀法、膜分离法、萃取法、色谱法等,对比可知这些方法各有其优缺点(表2).

此外,近年来通过萃取、膜分离或吸附等操作对处于发酵期间的发酵液进行丁二酸分离的原位分离法(*in situ* separation, ISPR)也常应用于丁二酸回收中. ISPR的使用可减少化学品的添加,且勿需额外的能耗投入,重要的是可降低终产物对发酵体系的抑制作用,但该法过程较复杂,如若

使用吸附剂,其再生需大量酸或碱. Li等人对*A. succinogenes* 发酵葡萄糖所得丁二酸进行原位分离,可将发酵时间从48 h延长至126 h,在经第6次分离后获得最高丁二酸浓度为145.2 g/L,丁二酸对葡萄糖得率为0.55 g/g,生产力达1.3 g L⁻¹ h⁻¹;与批次发酵48 h相比(丁二酸浓度为73.8 g/L,得率为0.57 g/g,生产力为1.54 g L⁻¹ h⁻¹), ISPR不仅维持较高的生产力和得率,而且大大提高了丁二酸的终浓度^[106].此外, Wang等人采用了一种新型的基于超滤膜发酵分离丁二酸同步的替代系统,在这个集成系统中,通过分离出酸和补充新鲜培养基可缓和终产物对*E. coli*的抑制作用.高密度细胞使得发酵时间从75 h维持到130h,丁二酸浓度从53 g/L增加到73 g/L;在这个系统中,丁二酸被结晶分离,回收率达85%-90%^[107].

近年来通过对提取方法的探究及提取工艺参数的优化,逐渐形成一种丁二酸高效、低成本制备的下游工艺,也为规模化应用奠定了基础.

4 结论与展望

生物基丁二酸生产的核心在于发酵菌种的选择与改造.目前丁二酸生产菌主要集中在*A. succinogenes*、*A. succiniciproducens*、*M. succiniciproducens*、*C. glutamicum*和重组*E. coli*、*S. cerevisiae*,但这些菌种也各存在缺陷.其中,*E. coli*以及*C. glutamicum*的菌株培养过程需要采用好氧-厌氧两阶段培养产丁二酸,这会降低了整个生产过程的丁二酸得率.*A. succiniciproducens*不耐高浓度底物且产物浓度低,且该菌属于严格厌氧菌,这限制了其工业生产前景.*M. succiniciproducens*与*A. succinogenes*均是兼性厌氧菌,具有耐高产物与底物浓度的特点,但副产物较多造成了分离提取的困难.尽管已通过代谢工程技术对发酵菌种进行改造,获得副产物量有所减少且可利用生物质糖发酵生产丁二酸的重组菌株,但由于这些菌株基本采用厌氧发酵方式,且依然伴随大量副产物的形成.同时,这些菌种在极端情况下(如

表2 丁二酸提取方法比较^[104, 108]
Table 2 Comparison of succinic acid extraction methods^[104, 108]

提取方法 Extraction method	优点 Advantages	缺点 Disadvantages	收率和纯度 Product yields and purity (%)
直接结晶法 Direct crystallization	操作简单 Simple operation	低产量,低纯度;高能耗;需要除盐、除蛋白 Low yield and purity; high energy consumption; desalination and deproteinization required	75; 90-97
沉淀法(钙盐法、铵盐法) Precipitation (Calcium salt, ammonium salt)	简单易操作 Simple operation	化学试剂需求量大,且不可重复利用,产生硫酸钙残渣,高能耗,对装备腐蚀强 Large chemical dosage; reagents unrecyclable; calcium sulfate residue; high energy cost; high corrosiveness	66-69; 99
膜分离法 Membrane separation 微滤、超滤、纳滤 Microfiltration, ultrafiltration, nanofiltration	高产率,高纯度 High yield and purity	膜污染严重 Serious membrane pollution	75; > 99.4
萃取法 Extraction	高产率,低能耗 High output and low energy consumption	过程复杂,成本高 Complicated and costly	73.09; 99.76
色谱法 Chromatography	易于规模化 Easy to scale up	色谱柱填料需不断再生,再生需大量的酸和碱 Chromatographic medium needing frequent regeneration that demands a large quantity of acid and alkali	95; > 91

生物质水解液中的抑制因子、高糖浓度以及产物抑制、高渗透压等现象)的生长会受到严重抑制。这些不足都成为今后工业化生产的障碍,因此发酵菌种的优选仍将是今后的研究重点。如前所述, *Z. mobilis* 具备生物基丁二酸生产的潜力,在He等人对其在生物炼制中的应用综述^[44, 109]表明利用该菌进行丁二酸生产具有绝对的优势,对此本实验室也提出了一种利用*Z. mobilis*生产丁二酸的策略。针对发酵菌株受到抑制因子的胁迫现象,近年来出现了利用适应性进化(Adaptive evolution)提高菌株对终产物或一些抑制因子的耐受性。我们课题组利用*Z. mobilis*在产物抑制及耐受性菌种的适应性进化筛选方面展开了研究,并取得一定的研究成果(待发表)。在产丁二酸菌种方面,未来的研究重点不仅需要利用现代生物组学技术结合系统生物学研究来阐明菌株复杂的表型分子机制;更需要结合生物信息学和合成生物学技术构建和选育具有优良特性的工程菌株,为纤维素生物物质的高效与高值转化丁二酸奠定基础。目前,一些新的菌株改造技术,如转座子诱变技术、基因组重组、全局转录调控工程技术和最小基因组等技术正逐步应用于菌种改造。

在丁二酸生产的发酵阶段,通过对不同因素的调控研究虽已取得一定的成果,但是对这些发酵条件的优化参数还仅限于实验室阶段,是否能良好地应用于工业化生产还有待进一步的研究。同样地,丁二酸分离回收技术还需从经济成本、高回收率和纯度三方面综合考虑。

参考文献 [References]

- Lang A, Kopetz H, Parker A. Australia: biomass energy holds big promise [J]. *Nature*, 2012, **488** (7413): 590-591
- Werpy T, Petersen G, Aden A, Bozell J, Holladay J, White J, Manheim A, Eliot D, Lasure L, Jones S. Top value added chemicals from biomass. Volume 1-results of screening for potential Candidates from sugars and synthesis gas [R]. Richland Washington: Pacific Northwest National Laboratory, 2004
- Cheng KK, Zhao XB, Zeng J, Zhang JA. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives [J]. *Biofuels Bioprod Biorefining*, 2012, **6** (3): 302-318
- Succinic acid market for 1,4-BDO, resin, coatings, dyes & inks, pharmaceutical, polyurethane, food, plasticizers, cosmetics, solvents & lubricants and de-icing solutions applications - global industry analysis, size, share, growth. trends and forecast, 2012 - 2018 [R]. 2013
- Litsanov B, Brocker M, Oldiges M, Bott M. Succinic acid [M]. *Bioprocessing of Renewable Resources to Commodity Bioproducts*, 2014: 435-472
- 张洪勋, 罗海峰, 庄绪亮. 琥珀酸发酵研究进展[J]. *微生物学通报*, 2003, **30** (5): 102-106 [Zhang HX, Luo HF, Zhuang XL. Research process in production of succinic acid by fermentation [J]. *Microbiology*, 2003, **30** (5): 102-106]
- 郑璞, 周威, 倪晔, 姜岷, 韦萍, 孙志浩. 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** (6): 1051-1055 [Zheng P, Zhou W, Ni Y, Jiang M, Wei P, Sun ZH. Environmental factors affecting the succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC 1593 [J]. *Chin J Biotechnol*, 2008, **24** (6): 1051-1055]
- Zeikus J, Jain M, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51** (5): 545-552
- Hatti-Kaul R, Törnqvall U, Gustafsson L, Börjesson P. Industrial biotechnology for the production of bio-based chemicals a cradle-to-grave perspective [J]. *Trends Biotechnol*, 2007, **25** (3): 119-124
- Kamm B, Kamm M. Principles of biorefineries [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, **64** (2): 137-145
- Beauprez JJ, Mey M De, Soetaert WK. Microbial succinic acid production: natural versus metabolic engineered producers [J]. *Process Biochem*, 2010, **45** (7): 1103-1114
- Guettler MV, Rumler D, Jain MK. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen [J]. *Int J Syst bacteriol*, 1999, **49** (1): 207-216
- Rifkin GD, Opdyke JE. *Anaerobiospirillum succiniciproducens* septicemia [J]. *J Clin Microbiol*, 1981, **13** (5): 811
- Lee P, Lee S, Hong S, Chang H. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58** (5): 663-668
- Song H, Lee SY. Production of succinic acid by bacterial fermentation [J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006, **39** (3): 352-361
- Samuelov N, Lamed R, Lowe S, Zeikus J. Influence of CO₂-HCO₃⁻ levels and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57** (10): 3013-3019
- 王庆昭, 赵学明. 琥珀酸发酵菌种研究进展[J]. *生物工程学报*, 2007, **23** (4): 570-576 [Wang QZ, Zhao XM. The research progress of succinic acid fermentation strains [J]. *Chin J Biotech*, 2007, **23** (4): 570-576]
- Wendisch VF, Bott M, Eikmanns BJ. Metabolic engineering of *Escherichia coli* and *Corynebacterium glutamicum* for biotechnological production of organic acids and amino acids [J]. *Curr Opin Microbiol*, 2006, **9** (3): 268-274
- Dominguez H, Nezondet C, Lindley N, Cacaig M. Modified carbon flux during oxygen limited growth of *Corynebacterium glutamicum* and the consequences for amino acid overproduction [J]. *Biotechnol Lett*, 1993, **15** (5): 449-454
- Arikawa Y, Kuroyanagi T, Shimozaki M, Muratsubaki H, Enomoto K, Kodaira R, Okazaki M. Effect of gene disruptions of the TCA cycle on production of succinic acid in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biosci Bioeng*, 1999, **87** (1): 28-36
- Raab AM, Gebhardt G, Bolotina N, Weuster Botz D, Lang C. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the biotechnological production of succinic acid [J]. *Metab Eng*, 2010, **12** (6): 518-525
- Otero JM, Cimini D, Patil KR, Poulsen SG, Olsson L, Nielsen J. Industrial systems biology of *Saccharomyces cerevisiae* enables novel succinic acid cell factory [J]. *PLoS ONE*, 2013, **8** (1): e54144
- Ito Y, Hirasawa T, Shimizu H. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to improve succinic acid production based on metabolic profiling. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2014, **78** (1): 151-159
- Yan D, Wang C, Zhou J, Liu Y, Yang M, Xing J. Construction of reductive pathway in *Saccharomyces cerevisiae* for effective succinic acid fermentation at low pH value. *Bioresour Technol*, 2014, **156**: 232-239
- Agren R, Otero JM, Nielsen J. Genome-scale modeling enables

- metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for succinic acid production [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, **40** (7): 735-747
- 26 Raab AM, Lang C. Oxidative versus reductive succinic acid production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Bioeng Bugs*, 2011, **2** (2): 120-123
- 27 Lee KY, Park JM, Kim TY, Yun H, Lee SY. The genome-scale metabolic network analysis of *Zymomonas mobilis* ZM4 explains physiological features and suggests ethanol and succinic acid production strategies [J]. *Microb Cell Fact*, 2010, **9** (1): 94
- 28 Seo JS, Chong HY, Kim JH, Kim JY. Method for mass production of primary metabolites, strain for mass production of primary metabolites, and method for preparation thereof: US, 20090162910A1 [P]. 2009-06-25
- 29 Bryant MP, Small N. Characteristics of two new genera of anaerobic curved rods isolated from the rumen of cattle [J]. *J Bacteriol*, 1956, **72** (1): 22
- 30 Rotstein OD, Wells CL, Pruett TL, Sorenson JJ, Simmons RL. Succinic acid production by *Bacteroides fragilis*: a potential bacterial virulence factor [J]. *Arch Surgery*, 1987, **122** (1): 93-98
- 31 武敏敏, 刘宏娟, 张建安, 薛建伟, 李晋平. 发酵法生产丁二酸研究进展及其应用前景[J]. 现代化工, 2008, **28** (11): 33-37 [Wu MM, Liu HJ, Zhang JA, Xue JW, Li JP. Research advances in microbiol fermentation of succinic acid and its prospect [J]. *Mod Chem Ind*, 2008, **28** (11): 33-37]
- 32 张玉秀, 张云剑, 李强. 产琥珀酸放线杆菌发酵生产琥珀酸的研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2008, **28** (12): 102-106 [Zhang YX, Zhang YJ, Li Q. Research progress in succinic acid fermentation of *Actinobacillus succinogenes* [J]. *China Biotechnol*, 2008, **28** (12): 102-106]
- 33 McKinlay JB, Shachar-Hill Y, Zeikus JG, Vieille C. Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC-MS analyses of ¹³C-labeled metabolic product isotopomers [J]. *Metab Eng*, 2007, **9** (2): 177-192
- 34 Jantama K, Haupt M, Svoronos SA, Zhang X, Moore J, Shanmugam K, Ingram L. Combining metabolic engineering and metabolic evolution to develop nonrecombinant strains of *Escherichia coli* C that produce succinate and malate [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, **99** (5): 1140-1153
- 35 Chatterjee R, Millard CS, Champion K, Clark DP, Donnelly MI. Mutation of the *ptsG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli* [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, **67** (1): 148-154
- 36 Andersson C, Hodge D, Berglund KA, Rova U. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Biotechnol Progr*, 2007, **23** (2): 381-388
- 37 Jantama K, Zhang X, Moore J, Shanmugam K, Svoronos S, Ingram L. Eliminating side products and increasing succinate yields in engineered strains of *Escherichia coli* C [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2008, **101** (5): 881-893
- 38 Sánchez AM, Bennett GN, San KY. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity [J]. *Metab Eng*, 2005, **7** (3): 229-239
- 39 Lin H, Bennett GN, San KY. 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** (2): 116-127
- 40 Lin H, Bennett GN, San KY. Chemostat culture characterization of *Escherichia coli* mutant strains metabolically engineered for aerobic succinate production: a study of the modified metabolic network based on metabolite profile, enzyme activity, and gene expression profile [J]. *Metab Eng*, 2005, **7** (5): 337-352
- 41 Lee SJ, Song H, Lee SY. Genome-based metabolic engineering of *Mannheimia succiniciproducens* for succinic acid production [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, **72** (3): 1939-1948
- 42 刘学胜, 贾全栋, 张伟国. 产丁二酸谷氨酸棒状杆菌基因缺失代谢工程菌株的构建[J]. 微生物学通报, 2013, **40** (5): 739-748 [Liu XS, Jia QD, Zhang WG. Construction a metabolic engineering strain to produce succinic acid from *Corynebacterium glutamicum* by gene deletion mutation [J]. *Microbiology*, 2013, **40** (5): 739-748]
- 43 何明雄, 祝其丽, 潘科, 胡启春. 利用木质纤维素类物质发酵生产乙醇重组菌株研究进展[J]. 应用与环境生物学报, 2009, **15** (4): 579-579 [He MX, Zhu QL, Pan K, Hu QC. Progress in ethanol production with lignocellulosic biomass by different recombinant strains [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2009, **15** (4): 579-579]
- 44 He MX, Wu B, Qin H, Ruan ZY, Tan FR, Wang JL, Shui ZX, Dai LC, Zhu QL, Pan K. *Zymomonas mobilis*: a novel platform for future biorefineries [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2014, **7** (1): 101
- 45 Seo JS, Chong H, Park HS, Yoon KO, Jung C, Kim JJ, Hong JH, Kim H, Kim JH, Kil JI. The genome sequence of the ethanologenic bacterium *Zymomonas mobilis* ZM4 [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, **23** (1): 63-68
- 46 Kim JY, Kim JH, Chong H. Development of succinic acid producing *zymomonas mobilis* strain [C]. Nashville: Abstract 28th Symp Biotechnol for Fuels and Chemicals, 2006
- 47 Goldberg I, Lonberg-Holm K, Bagley E, Stieglitz B. Improved conversion of fumarate to succinate by *Escherichia coli* strains amplified for fumarate reductase [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1983, **45** (6): 1838-1847
- 48 Gokarn R, Eiteman M, Altman E. Expression of pyruvate carboxylase enhances succinate production in *Escherichia coli* without affecting glucose uptake [J]. *Biotechnol Lett*, 1998, **20** (8): 795-798
- 49 Liang LY, Liu RM, Ma JF, Chen KQ, Jiang M, Wei P. Increased production of succinic acid in *Escherichia coli* by overexpression of malate dehydrogenase [J]. *Biotechnol Lett*, 2011, **33** (12): 2439-2444
- 50 Yamauchi Y, Hirasawa T, Nishii M, Furusawa C, Shimizu H. Enhanced acetic acid and succinic acid production under microaerobic conditions by *Corynebacterium glutamicum* harboring *Escherichia coli* transhydrogenase gene *pntAB* [J]. *J Gen Appl Microbiol*, 2014, **60** (3): 112-118
- 51 曹剑磊, 周丽, 张梁, 王正祥, 石贵阳. 产琥珀酸重组大肠杆菌的构建和发酵性能[J]. 应用与环境生物学报, 2010, **16** (6): 851-857 [Cao JL, Zhou L, Zhang L, Wang ZX, Shi GY. Construction and fermentation of succinate-producing recombinant *Escherichia coli* [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2010, **16** (6): 851-857]
- 52 王丹, 毛雨, 马兰, 李强, 李望良, 邢建民, 苏志国. 乳糖诱导丙酮酸羧化酶基因在大肠杆菌中的表达及对丁二酸产量的影响[J]. 生物工程学报, 2009, **25** (9): 1338-1344 [Wang D, Mao Y, Ma L, Li Q, Li WL, Xing JM, Su ZG. Expression of heterogenous pyruvate carboxylase in *Escherichia coli* with lactose as inducer and its effect on succinate production [J]. *Chin J Biotech*, 2009, **25** (9): 1338-1344]
- 53 岳方方, 姜岷, 马江锋, 于丽, 刘树文, 韦萍. 产琥珀酸大肠杆菌工程菌株的构建[J]. 中国酿造, 2010, **29** (2): 25-29 [Yue FF, Jiang M, Ma JF,

- Yu L, Liu SW, Wei P. Construction of engineered *Escherichia coli* for succinate production [J]. *China Brewing*, 2010, **29** (2): 25-29]
- 54 Okino S, Noburyu R, Suda M, Jojima T, Inui M, Yukawa H. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, **81** (3): 459-464
- 55 刘嵘明, 马江锋, 梁丽亚, 徐冰, 王光明, 张敏, 姜岷. 过量表达烟酸转磷酸核糖激酶对大肠杆菌NZN111 产丁二酸的影响[J]. 生物工程学报, 2011, **27** (10): 1438-1447 [Liu RM, Ma JF, Liang LY, Xu B, Wang GM, Zhang M, Jiang M. Effect of overexpression of nicotinic acid phosphoribosyl transferase on succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111 [J]. *Chin J Biotech*, 2011, **27** (10): 1438-1447]
- 56 王丹, 张静, 张晶, 王玉华. 耐酸性高产琥珀酸放线杆菌的诱变选育[J]. 食品科技, 2012 (8): 18-21 [Wang D, Zhang J, Zhang J, Wang YH. Mutagenesis breeding of *Actinobacillus succinogenes* for aciduric and high-producing [J]. *Food Sci Technol*, 2012 (8): 18-21]
- 57 刘璇, 郑璞, 倪晔, 董晋军, 孙志浩. 基因组改组技术选育耐酸性琥珀酸放线杆菌[J]. 微生物学通报, 2009, **36** (11): 1676-1681 [Liu X, Zheng P, Ni Y, Dong JJ, Sun ZH. Breeding *Actinobacillus succinogenes* with Acid-tolerance by genome shuffling [J]. *Microbiology*, 2009, **36** (11): 1676-1681]
- 58 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, 2007 [Chen XH. Isolation, Identification, mutation breeding and fermentation condition optimization of a strain for producing succinic acid [D]. Anhui: Hefei University of Technology, 2007]
- 59 万青, 曹伟佳, 张常青, 刘嵘明, 梁丽亚, 陈可泉, 马江锋, 姜岷. 常压室温等离子体诱变高效利用木糖产丁二酸菌株[J]. 生物工程学报, 2013, **29** (11): 1692-1695 [Wan Q, Cao WJ, Zhang CQ, Liu RM, Liang LY, Chen KQ, Ma JF, Jiang M. Mutating *Escherichia coli* by atmospheric and room temperature plasmas for succinic acid production from xylose [J]. *Chin J Biotechnol*, 2013, **29** (11): 1692-1695]
- 60 Jiang M, Wan Q, Liu R, Liang L, Chen X, Wu M, Zhang H, Chen K, Ma J, Wei P. Succinic acid production from corn stalk hydrolysate in an *E. coli* mutant generated by atmospheric and room-temperature plasmas and metabolic evolution strategies [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, **41** (1): 115-123
- 61 Zheng P, Zhang K, Yan Q, Xu Y, Sun Z. Enhanced succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* after genome shuffling [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2013, **40** (8): 831-840
- 62 刘嵘明, 梁丽亚, 吴明科, 姜岷. 微生物发酵生产丁二酸研究进展[J]. 生物工程学报, 2013, **29** (10): 1386-1397 [Liu RM, Liang LY, WU MK, Jiang M. Progress in microbial production of succinic acid [J]. *Chin J Biotech*, 2013, **29** (10): 1386-1397]
- 63 Liu YP, Zheng P, SuZH n, Ni Y, Dong JJ, Zhu LL. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes* [J]. *Bioresour Technol*, 2008, **99** (6): 1736-1742
- 64 Borges ER, Pereira Jr N. Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2011, **38** (8): 1001-1011
- 65 Zheng P, Fang L, Xu Y, Dong JJ, Ni Y, Sun ZH. Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes* [J]. *Bioresour Technol*, 2010, **101** (20): 7889-7894
- 66 Li X, Zheng Z, Wei Z, Jiang S, Pan L, Weng S. Screening, breeding and metabolic modulating of a strain producing succinic acid with corn straw hydrolyte [J]. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, **25** (4): 667-677
- 67 Yu J, Li Z, Ye Q, Yang Y, Chen S. Development of succinic acid production from corncob hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, **37** (10): 1033-1040
- 68 Chen C, S Ding, D Wang, Z Li, Q Ye. Simultaneous saccharification and fermentation of cassava to succinic acid by *Escherichia coli* NZN111 [J]. *Bioresour Technol*, 2014, **163**: 100-105
- 69 Zheng P, Dong JJ, Sun ZH, Ni Y, Fang L. Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes* [J]. *Bioresour Technol*, 2009, **100** (8): 2425-2429
- 70 Li Q, Siles JA, Thompson IP. Succinic acid production from orange peel and wheat straw by batch fermentations of *Fibrobacter succinogenes* S85 [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **88** (3): 671-678
- 71 Akhtar J, Idris A, Aziz RA. Recent advances in production of succinic acid from lignocellulosic biomass [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2014, **98** (3): 987-1000
- 72 Lin H, San KY, Bennett GN. Effect of *Sorghum vulgare* phosphoenolpyruvate carboxylase and *Lactococcus lactis* pyruvate carboxylase coexpression on succinate production in mutant strains of *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **67** (4): 515-523
- 73 Oh IJ, Lee HW, Park CH, Lee SY, Lee J. Succinic acid production by continuous fermentation process using *Mannheimia succiniciproducens* LPK7 [J]. *J Microbiol Biotechnol*, 2008, **18** (5): 908-912
- 74 Wang D, Li Q, Mao Y, Xing J, Su Z. High-level succinic acid production and yield by lactose-induced expression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *ptsG* mutant *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, **87** (6): 2025-2035
- 75 McKinlay JB, Zeikus JG, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71** (11): 6651-6656
- 76 奚永兰, 陈可泉, 李建, 马江锋, 隋姗姗, 叶贵子, 姜岷. 琥珀酸发酵过程中固定CO₂的研究进展[J]. 化工进展, 2010, **29** (7): 1314-1319 [Xi YL, Chen KQ, Li J, Ma JF, Sui SS, Ye GZ, Jiang M. Progress of CO₂ fixation in succinic acid fermentation process [J]. *Chem Ind Eng Prog*, 2010, **29** (7): 1314-1319]
- 77 Lee PC, Lee WG, Kwon S, Lee SY, Chang HN. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H₂/CO₂ supply and glucose concentration [J]. *Enzyme Microb Technol*, 1999, **24** (8): 549-554
- 78 Donnelly MI, Stols L. Production of succinic acid through overexpression of NAD⁺-dependent malic enzyme in an [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1997, **63** (7): 2695-2701
- 79 Vemuri G, Eiteman M, 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
- 80 叶小金, 王红蕾, 徐洪章, 薛冬桦. 玉米秸秆糖醇发酵产丁二酸及表征[J]. 食品科学, 2014, **35** (23): 161-165 [Ye XJ, Wang HL, Xu HZ, Xue H. Fermentation and characterization of succinic acid by corn stover sugar alcohol [J]. *Food Sci*, 2014, **35** (23): 161-165]
- 81 孔德城, 郑璞, 董晋军, 倪晔, 孙志浩. 碱预处理秸秆同步糖化发酵生产丁二酸[J]. 食品与发酵工业, 2012, **37** (10): 1-5 [Kong DC, Zheng P, Dong JJ, Ni Y, Sun ZH. Succinic acid production from alkali pretreated stalk by simultaneous saccharification and fermentation [J]. *Food Ferment Ind*, 2012, **37** (10): 1-5]

- 82 Chen KQ, Li J, Ma JF, Jiang M, Wei P, Liu ZM, Ying HJ. Succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* using hydrolysates of spent yeast cells and corn fiber [J]. *Bioresour Technol*, 2011, **102** (2): 1704-1708
- 83 Chen K, Jiang M, Wei P, Yao J, Wu H. Succinic acid production from acid hydrolysate of corn fiber by *Actinobacillus succinogenes* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2010, **160** (2): 477-485
- 84 方林. 玉米秸秆原料发酵生产丁二酸工艺研究[D]. 无锡: 江南大学, 2009 [Fang L. Studies on the fermentative production of succinic acid from corn stalk [D]. Wuxi: Jiangnan University, 2009]
- 85 Li J, Zheng XY, Fang XJ, Liu SW, Chen KQ, Jiang M, Wei P, Ouyang PK. A complete industrial system for economical succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* [J]. *Bioresour Technol*, 2011, **102** (10): 6147-6152
- 86 吴昊, 姚嘉旻, 刘宗敏, 陈可泉, 左鹏, 姜岷, 韦萍. 玉米籽皮稀酸水解液脱毒发酵制备丁二酸的可行性[J]. 农业工程学报, 2009, **25** (2): 264-272 [Wu H, Yao JM, Liu ZM, Chen KQ, Zuo P, Jiang M, Wei P. Feasibility for producing succinic acid by fermentation of cornhusk dilute acid hydrolysate after detoxification [J]. *Transactions CSAE*, 2009, **25** (2): 264-272]
- 87 姜岷, 姚嘉旻, 吴昊, 万永敏, 陈可泉, 孙娜娅, 于丽. 稀酸水解玉米皮制备丁二酸发酵糖液的研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, **33** (10): 6-9 [Jiang M, Yao JM, Wu H, Wan YM, Chen KQ, Sun NY, Yu L. Preparation of saccharifying liquid for succinic acid by fermentation from cornhusks sulphuric acid hydrolysis [J]. *Food Ferment Ind*, 2008, **33** (10): 6-9]
- 88 申乃坤, 王青艳, 秦艳, 廖思明, 朱婧, 朱绮霞, 米慧芝, 黄日波. 木薯粉同步糖化发酵(SSF)产丁二酸[J]. 微生物学通报, 2014, **41** (8): 1507-1515 [Shen NK, Wang QY, Qin Y, Liao SM, Zhu J, Zhu QX, Mi HZ, Huang RB. Succinic acid fermentation by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with cassava flour [J]. *Microbiology*, 2014, **41** (8): 1507-1515]
- 89 周小兵, 郑璞. 以白酒酒糟为原料发酵产丁二酸[J]. 食品与发酵工业, 2013 (2): 7-10 [Zhou XB, Wang QY, Qin Y, Liao SM, Zhu J, Zhu QX, Mi HZ, Huang RB. Fermentative production of succinic acid from spirit-based distillers' grains [J]. *Food Ferment Ind*, 2013 (2): 7-10]
- 90 姜岷, 王倩楠, 陈可泉, 韦萍. 啤酒废酵母酶解液作为有机氮源厌氧发酵制备丁二酸的研究[J]. 食品科技, 2007, **32** (10): 238-242 [Jiang M, Wang QN, Chen KQ, Wei P. Research on the production of succinic acid by anaerobic fermentation with yeast zymolys is solution as organic nitrogen source [J]. *Food Sci Technol*, 2007, **32** (10): 238-242]
- 91 张九花, 奚永兰, 徐蓉, 戴文宇, 陈可泉, 姜岷. 利用甘蔗糖蜜与乳清粉厌氧发酵制备丁二酸[J]. 化工进展, 2012, **31** (12): 2756-2760 [Zhang JH, Xi YL, Xu R, Dai WY, Chen KQ, Jiang M. Preparation of succinic acid using sugarcane molasses and whey powder [J]. *Chem Ind Eng Prog*, 2012, **31** (12): 2756-2760]
- 92 董晋军, 郑璞, 倪晔, 孙志浩. 菊芋原料同步糖化发酵生产丁二酸[J]. 食品与生物技术学报, 2008, **27** (5): 78-82 [Dong JJ, Zheng P, Ni Y, Sun ZH. Production of succinic acid by simultaneous saccharification and fermentation from Jerusalem artichoke [J]. *J Food Biol Technol*, 2008, **27** (5): 78-82]
- 93 Jiang M, Dai W, Xi Y, Wu M, Kong X, Ma J, Zhang M, Chen K, Wei P. Succinic acid production from sucrose by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 [J]. *Bioresour Technol*, 2014, **153**: 327-332
- 94 张敏, 马江锋, 徐冰, 梁丽亚, 刘嵘明, 王光明, 姜岷. 利用木薯淀粉为原料发酵生产丁二酸的研究[J]. 中国酿造, 2011, **30** (7): 29-32 [Zhang M, Ma JF, Xu B, Liang LY, Liu RM, Wang GM, Jiang M. Succinic acid fermentation from cassava starch [J]. *China Brewing*, 2011, **30** (7): 29-32]
- 95 Chan S, Kanchanatawee S, Jantama K. Production of succinic acid from sucrose and sugarcane molasses by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. *Bioresour technol*, 2012, **103** (1): 329-336
- 96 Wang D, Li Q, Yang M, Zhang Y, Su Z, Xing J. Efficient production of succinic acid from corn stalk hydrolysates by a recombinant *Escherichia coli* with *ptsG* mutation [J]. *Process Biochem*, 2011, **46** (1): 365-371
- 97 Sun Z, Li M, Qi Q, Gao C, Lin CSK. Mixed food waste as renewable feedstock in succinic acid fermentation. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, **174** (5): 1-12
- 98 Wang C, Zhang H, Cai H, Zhou Z, Chen Y, Chen Y, Ouyang P. Succinic acid production from corn cob hydrolysates by genetically engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2014, **172** (1): 340-350
- 99 杨卓娜, 姜岷, 李建, 方晓江, 叶贵子, 白雪飞, 郑晓宇, 韦萍. 不同pH调节剂对产琥珀酸放线杆菌NJ113发酵产丁二酸的影响[J]. 生物工程学报, 2010, **26** (11): 1500-1506 [Yang ZN, Jiang M, Li J, Fang XJ, Ye GZ, Bai XF, Zheng XY, Wei P. Effects of different neutralizing agents on succinate production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113 [J]. *Chin J Biotech*, 2010, **26** (11): 1500-1506]
- 100 Vemuri G, Eiteman M, 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** (6): 325-332
- 101 Krishnakumar J. Biological production of succinic acid using a cull peach medium [D]. South Carolina: Clemson University, 2013
- 102 Donnelly M, Millard CS, Nghiem NP, Stols L. Method for the production of dicarboxylic acids: US, 5869301A [P]. 1999
- 103 刘树文, 姜岷, 马江峰, 陈可泉, 于丽, 岳方方, 徐冰. 有氧生长调控策略对大肠杆菌工程菌厌氧发酵生产丁二酸的影响[J]. 中国酿造, 2010, **29** (6): 94-96 [Liu SW, Jiang M, Ma JF, Chen KQ, Yu L, Yue FF, Xu B. Effect of aerobic cell-growth control on anaerobic succinate fermentation by engineering strain of *E. coli* [J]. *China Brewing*, 2010, **29** (6): 94-96]
- 104 Cheng KK, Zhao XB, Zeng J, Wu RC, Xu YZ, Liu DH, Zhang JA. Downstream processing of biotechnological produced succinic acid [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2012, **95** (4): 841-850
- 105 Bechthold I, Bretz K, Kabasci S, Kopitzky R, Springer A. Succinic acid: a new platform chemical for biobased polymers from renewable resources [J]. *Chem Eng Technol*, 2008, **31** (5): 647-654
- 106 Li Q, Wang D, Hu G, Xing J, Su Z. Integrated bioprocess for high-efficiency production of succinic acid in an expanded-bed adsorption system [J]. *Biochem Eng J*, 2011, **56** (3): 150-157
- 107 Wang C, Ming W, Yan D, Zhang C, Yang M, Liu Y, Zhang Y, Guo B, Wan Y, Xing J. Novel membrane-based biotechnological alternative process for succinic acid production and chemical synthesis of biobased Poly (butylene succinate) [J]. *Bioresour Technol*, 2014, **156**: 6-13
- 108 Sun Y, Yan L, Fu H, Xiu Z. Salting-out extraction and crystallization of succinic acid from fermentation broths [J]. *Process Biochem*, 2014, **49** (3): 506-511
- 109 何明雄, 吴波, 谭芙蓉, 王景丽, 税宗霞, 秦晗, 代立春, 胡启春. 运动发酵单胞菌在生物炼制中的研究进展[J]. 生物技术进展, 2014, **4** (5): 331-339 [He MX, Wu B, Tan TR, Wang JL, Shui ZX, Qin H, Dai LC, Hu QC. Research progress of *zymomonas mobilis* on biorefinery system [J]. *Curr Biotechnol*, 2014, **4** (5): 331-339]