

# 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

郑璞<sup>1</sup>, 周威<sup>1</sup>, 倪晔<sup>1</sup>, 姜岷<sup>2</sup>, 韦萍<sup>2</sup>, 孙志浩<sup>1</sup>

1 江南大学生物工程学院 教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214122

2 南京工业大学制药与生命科学学院, 南京 210009

**摘要:** 琥珀酸放线杆菌是发酵生产有应用前景的生物基原料-丁二酸的微生物。本研究从牛瘤胃中筛选获得一株琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* CGMCC 1593, 分析了环境气体、pH、氧化还原电位(ORP)环境因素对琥珀酸放线杆菌 *A. succinogenes* CGMCC 1593 发酵生产丁二酸的影响。结果表明: CO<sub>2</sub> 不仅提供了 *A. succinogenes* CGMCC 1593 发酵生产丁二酸的最佳气体环境, 也是发酵生产丁二酸的底物之一; MgCO<sub>3</sub> 是 *A. succinogenes* CGMCC 1593 发酵过程较好的 pH 调节剂, 发酵过程维持 pH7.1~6.2, 可满足菌体生长与产酸的要求; 发酵液初始 ORP 过低, 不利于菌体生长, ORP 在 -270 mV 时对丁二酸产生有利。在菌体对数生长期结束时, 通过 Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O 降低发酵液 ORP 到 -270 mV, 发酵 48 h 时可产丁二酸 37 g/L, 摩尔产率达到 129%。这对深入研究 *A. succinogenes* CGMCC 1593 发酵生产丁二酸具有参考价值。

**关键词:** 丁二酸, 厌氧发酵, 琥珀酸放线杆菌, 氧化还原电位

## Environmental Factors Affecting the Succinic Acid Production by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC 1593

Pu Zheng<sup>1</sup>, Wei Zhou<sup>1</sup>, Ye Ni<sup>1</sup>, Min Jiang<sup>2</sup>, Ping Wei<sup>2</sup>, and Zhihao Sun<sup>1</sup>

1 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 College of Life and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

**Abstract:** *Actinobacillus succinogenes* is a promising candidate for the production of bio-based succinic acid. Previously, we isolated a succinic acid-producing strain *Actinobacillus succinogenes* CGMCC 1593 from bovine rumen. In this paper, the influence of the environmental factors such as gas phase, pH, ORP, on succinic acid production by *A. succinogenes* CGMCC 1593 was studied. The results showed that CO<sub>2</sub> was the optimum gas phase for anaerobic fermentation of *A. succinogenes* CGMCC 1593 as well as one of the substrate for the succinic acid synthesis. Using MgCO<sub>3</sub> as a pH regulator, the pH was maintained within 7.1–6.2 during the anaerobic fermentation for the cell growth and acid production of *A. succinogenes* CGMCC 1593. Our results showed that low initial ORP was disadvantageous for the growth of *A. succinogenes* CGMCC 1593 and an ORP of -270 mV was demonstrated to be beneficial to the succinic acid production. By adding Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O to decrease ORP to -270 mV at the end of exponential growth phase in batch culture of *A. succinogenes* CGMCC 1593, the succinic acid concentration reached 37 g/L and the yield of succinic acid was 129% at 48 h. This work might provide valuable information for further optimization of succinic acid fermentation by *A.*

**Received:** March 4, 2008; **Accepted:** March 12, 2008

**Supported by:** the National High-Tech Research and Development Program of China (No. 2006AA02Z235), the Natural Science Foundation of Jiangsu province, China (No. BK2005201).

**Corresponding author:** Zhihao Sun. Tel: +86-510-85918252; Fax: +86-510-85918252; E-mail: sunw@public1.wx.js.cn

国家 863 项目(No. 2006AA02Z235)和江苏省自然科学基金前期预研项目(No. BK2005201)资助。

*succinogenes* CGMCC 1593.

**Keywords:** succinic acid, anaerobic fermentation, *Actinobacillus succinogenes*, oxidation-reduction potential culture

丁二酸(Succinic acid)是一种重要的 C4 平台化合物, 是 1, 4-丁二醇、四氢呋喃、 $\gamma$ -丁内酯、N-甲基吡咯烷酮、己二酸等重要大宗化学品和专用化学品的基本原料, 是重要的食品添加剂和饲料添加剂, 也是合成聚丁二酸丁二醇酯(PBS)、聚乙二醇丁二酸酯(PES)、聚丙二醇丁二酸酯(PPS)等可生物降解高分子材料的原料。目前, 以生物基原料发酵生产丁二酸, 因为石油资源的减少与石化原料价格的上涨, 正受到人们的关注。丁二酸也被认为是继柠檬酸后最具市场潜力的发酵有机酸产品。发酵法生产丁二酸的另一显著优点, 是发酵过程利用气体 CO<sub>2</sub>, 有利于缓解温室效应, 因此也被看成一种非常绿色的工业技术<sup>[1,2]</sup>。

丁二酸是许多厌氧和兼性厌氧微生物的代谢中间产物。自上世纪 90 年代后美国首先申请了微生物发酵法生产丁二酸技术的专利, 其中厌氧螺菌 *Anaerobiospirillum succiniciproducens* ATCC 29305 和琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 产丁二酸分别达到 43 g/L 和 70 g/L<sup>[3,4]</sup>。但现在还未见其工业化规模生产的报道。2002 年, 韩国报道了新分离菌株 *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, 发酵产丁二酸 13.5 g/L, 生产强度 1.87 g/(L·h)<sup>[5]</sup>。国内生物质原料发酵法生产丁二酸的研究目前则处于起步阶段。

本研究室从牛瘤胃中筛选获得了一株产丁二酸琥珀酸放线杆菌 *A. succinogenes* CGMCC 1593<sup>[6]</sup>。由于 *A. succinogenes* CGMCC 1593 是源于瘤胃厌氧环境的革兰氏阴性兼性厌氧菌, 除丁二酸外, 乙酸、甲酸等都是其发酵葡萄糖等碳水化合物的产物, 而发酵环境的变化直接影响到这些产物的分布。本文着重考察了发酵环境中气体、pH、氧化还原电位(Oxidation-reduction potential culture, ORP)因素对 *A. succinogenes* CGMCC 1593 生长与产酸的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

#### 1.1.1 菌 株

琥珀酸放线杆菌 *A. succinogenes* CGMCC 1593,

由本实验室从牛的瘤胃中分离获得<sup>[6]</sup>。

#### 1.1.2 培 养 基

种子培养基: 葡萄糖 10 g, 酵母膏 5 g, 玉米浆(Corn-steep liquor, CSL) 5 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 9.6 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 20.3 g, NaHCO<sub>3</sub> 10 g, 定容至 1 L, pH 自然, 115°C 灭菌 15 min。

发酵培养基: 葡萄糖 20~50 g, 酵母膏 0~10 g, CSL 6~20 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.5 g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.5 g, NaCl 1 g, MgCl<sub>2</sub> 0.2 g, CaCl<sub>2</sub> 0.2 g; 另加混合维生素溶液 3 mL, 其组分为(mg/L): 叶酸 20 mg, 硫胺素 20 mg, 烟酸 20 mg, 硫辛酸 20 mg, 核黄素 20 mg, VB<sub>12</sub> 20 mg, VB<sub>6</sub> 20 mg, 泛酸 50 mg。将培养基定容至 1 L, pH 调至 6.5, 115°C 灭菌 20 min。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 培 养 条 件

将菌种接种到液体种子培养基进行活化培养 16 h 后, 按 5% 接种量接种于装有 50 mL 发酵培养基的厌氧瓶(培养瓶容积 150 mL)中进行发酵, 置于 100% CO<sub>2</sub> 环境中 37°C 厌氧培养 48~60 h。

在 5 L 搅拌发酵罐(BIOFLO 110, New Brunswick Scientific, Edison, NJ, USA) 中进行厌氧发酵, 装液量 3.5 L, 培养基成份和厌氧瓶发酵培养基相同。接种量 5%, 发酵温度 37°C, 使用两组圆盘六平直叶涡轮搅拌桨, 搅拌转速 200 r/min, 通气为 100% CO<sub>2</sub>。

#### 1.2.2 发 酵 产 物 分 析

采用离子排斥 HPLC 法分析葡萄糖、丁二酸、乙酸、乳酸、甲酸等发酵产物<sup>[7]</sup>。Waters1512 二元泵, Waters 2414 RI 检测器, Breeze 色谱工作站; BioRad 公司 Aminex HPX-87H 离子色谱柱(300 mm × 7.8 mm, 9 μm); 流动相 10 mmol/L 硫酸; 柱温 55°C; 流速 0.5 mL/min; 进样量 10 μL。

生物量以 660 nm 处的吸光度来表示(OD<sub>660</sub>)。

氧化还原电位(ORP), 用标准氧化还原电极(Mettler toledo)测定 mV。

丁二酸产率(%)定义为每消耗 1 mol 葡萄糖所产生丁二酸的 mol 数<sup>[8]</sup>。

## 2 结果与讨论

### 2.1 环境气体对 *A. succinogenes* CGMCC 1593 生长与产酸的影响

以 20 g/L 葡萄糖为底物, 比较 *A. succinogenes* CGMCC 1593 在空气、N<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub> 条件下的生长与产酸情况(表 1): 好氧条件(通空气)下 *A. succinogenes* CGMCC 1593 主要生成丙酮酸、乙酸、甲酸和乳酸, 丁二酸仅为 0.4 g/L; 当气体环境为 100% N<sub>2</sub> 时, 菌体生长不佳, 发酵残糖高; 在充满 CO<sub>2</sub> 的条件下, 则菌体生长良好, 代谢终产物主要为丁二酸(14.1 g/L), 丁二酸的摩尔产率为 109.2%, 杂酸为乙酸和少量的

甲酸, 并且未检测到乳酸和丙酮酸的生成。表明 *A. succinogenes* CGMCC 1593 产生丁二酸的途径是: 磷酸烯醇式丙酮酸经 PEP 羧化激酶途径固定 CO<sub>2</sub> 产生草酰乙酸、富马酸、丁二酸的代谢过程。

比较不同二氧化碳供应水平对发酵的影响(表 2), 得出随着 CO<sub>2</sub> 供应比例的增加, 丁二酸的产量呈现明显的增加趋势, 说明足够多的 CO<sub>2</sub> 供应在丁二酸发酵过程中具有重要的作用, CO<sub>2</sub> 也是 *A. succinogenes* CGMCC 1593 丁二酸合成代谢的底物, 因此, 充足的 CO<sub>2</sub> 能够使更多的碳源流向丁二酸, 从而提高了丁二酸的产率。

表 1 气体环境对琥珀酸发酵的影响

Table 1 Fermentation of *A. succinogenes* CGMCC 1593 under different gas phase conditions

Gas phase	Biomass (OD <sub>660</sub> )	Residual glucose (g/L)	Succinic Acid(g/L)	Acetic Acid(g/L)	Pyruvic Acid(g/L)	Lactic acid(g/L)	Formic Acid(g/L)	Succinic acid Yield(%)
Air	3.3	0.9	0.4	4.8	5.4	2.2	4.3	3.2
N <sub>2</sub>	2.6	6.5	0.9	2.9	2.7	2.1	2.8	6.7
CO <sub>2</sub>	4.4	0.3	14.1	3.6	ND	ND	1.7	109.2

Cells were grown anaerobically with an initial glucose concentration of 20 g/L, yeast extract concentration of 6 g/L, and CSL concentration of 6 g/L

表 2 不同 CO<sub>2</sub> 水平对 *A. succinogenes* CGMCC 1593 发酵的影响

Table 2 Effects of CO<sub>2</sub> concentration on glucose fermentation by *A. succinogenes* CGMCC 1593

CO <sub>2</sub> concentration (%)	Biomass (OD <sub>660</sub> )	Residual Glucose (g/L)	Succinic acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Pyruvic acid (g/L)	Lactic acid/(g/L)	Formic acid (g/L)	Succinic acid yield (%)
0	2.5	7.1	0.4	3.1	3.3	1.4	3.1	4.7
10	2.8	4.5	4.9	3.0	2.9	1.2	2.9	49.6
25	3.3	1.8	8.3	3.8	1.9	0.8	2.6	69.6
50	3.9	0.8	11.5	4.0	0.7	0.3	2.4	91.4
100	4.3	0.1	13.8	3.9	ND	ND	1.9	106.1

Cells were grown anaerobically with an initial glucose concentration of 20 g/L, yeast extract concentration of 6 g/L, and CSL concentration of 6 g/L

### 2.2 不同 pH 对 *A. succinogenes* CGMCC 1593 生长与产酸的影响

有报道表明<sup>[3,9,10]</sup>培养液 pH 是影响丁二酸产生菌的发酵产酸的另一个关键因素。以 35 g/L 的葡萄糖为底物, 发酵过程中流加 3 mol/L 的 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 溶液将发酵 pH 分别控制在 5.7、6.0、6.2、6.7、7.2, 结果(图 1)在 pH 为 6.0~7.2 范围内时, 丁二酸/乙酸(W/W)比率变化不大, pH 6.7 时产丁二酸量达到 27.3 g/L, 摩尔产率 120.7%。

比较 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (3 mol/L)、NaOH (3 mol/L)、NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O (4 mol/L)、MgCO<sub>3</sub> (40 g/L)和 CaCO<sub>3</sub> (40 g/L)等五种缓冲剂调节发酵过程 pH 的情况(控制 pH 范围在 6.0~7.2), 结果: 氨水对菌株生长有一定的毒性; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 或 NaOH 控制发酵 pH 时, 菌体在发

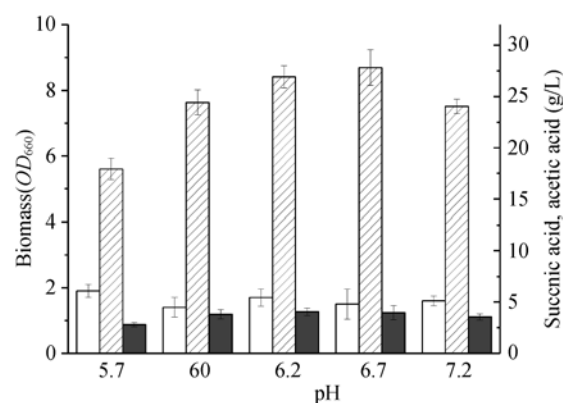


图 1 pH 对 *A. succinogenes* CGMCC 1593 发酵的影响  
Fig. 1 Effects of pH on glucose fermentation by *A. succinogenes* CGMCC 1593

□ OD<sub>660</sub>; ▨ succinic acid; ■ acetic acid

醇中后期出现菌体絮凝结块现象,这可能与该菌在一定的生理时期,细胞表面易产生黏联有关。而以MgCO<sub>3</sub>控制pH时,整个发酵过程pH从初始的7.1逐渐下降到发酵终了时的6.2左右,菌体生长情况良好,不易发生絮凝结块现象。

**2.3 不同氧化还原电位对 *A. succinogenes* CGMCC 1593 生长与产酸的影响**

在厌氧发酵葡萄糖过程中,氧化还原的平衡往往通过代谢产物的分泌而达到平衡,发酵液中的氧化还原电位(ORP)值,直接与代谢产物的分布相关<sup>[11]</sup>。在初始发酵液中分别添加0 g/L、0.026 g/L、0.048 g/L、0.26 g/L、0.48 g/L的Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O,测得相应的ORP分别为0 mV、-100 mV、-160 mV、-220 mV、-270 mV。接入*A. succinogenes* CGMCC 1593种子在100% CO<sub>2</sub>条件下开始发酵后,测得发酵液ORP分别-220 mV、-245 mV、-270 mV、-290 mV、-310 mV,此时菌体浓度(OD<sub>660</sub>)如图2所示。发酵48 h,产酸情况如表3。

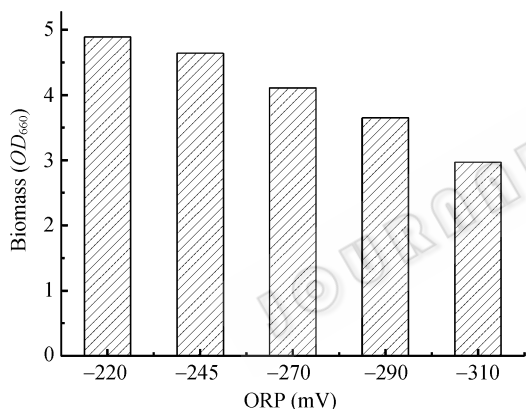


图2 氧化还原电位对*A. succinogenes* CGMCC 1593 菌体浓度的影响

Fig. 2 Effects of ORP on *A. succinogenes* CGMCC 1593 cell growth under anaerobic conditions

随着起始ORP的降低,*A. succinogenes* 菌体生长受到抑制,并且低电位值对菌体生长抑制作用不断增强。当ORP从-220 mV降至-310 mV时,菌体量下降了43%。而ORP的降低,副产物甲酸和乙酸的积累也减少。但丁二酸的产量与ORP值成正态分布,丁二酸的产量最高到34 g/L,摩尔产率为127%。丁二酸产量先升后降,可能是由于低还原电位值下菌体量的减少所致。

若在*A. succinogenes* 菌体浓度达到最大时,降低发酵ORP值,则有可能提高丁二酸的产量。因此,在5L发酵罐中进行试验,结果如图3。当测定OD<sub>660</sub>不再增加时,用Na<sub>2</sub>S·9H<sub>2</sub>O调节ORP到-270 mV,发酵48 h丁二酸浓度为37 g/L,摩尔产率达到129%。

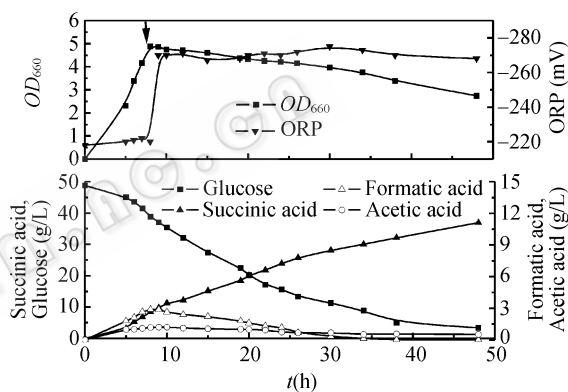


图3 5L发酵罐中厌氧发酵结果

Fig. 3 Batch fermentation of *A. succinogenes* CGMCC1593 Cells were grown anaerobically with 50 g/L glucose and 15 g/L CSL (initial concentrations). Symbols are OD<sub>660</sub> (■), ORP (▼), glucose (○), succinic acid (▲), acetic acid (●), formic acid (△)

表3 不同ORP对*A. succinogenes* CGMCC 1593 发酵的影响

Table 3 Effects of ORP on glucose fermentation by *A. succinogenes* CGMCC 1593

ORP (mV)	Residual glucose (g/L)	Succinic acid (g/L)	Acetic acid (g/L)	Formic acid (g/L)	Succinic acid yield (%)
-220	8.3	28.8	1.1	2.8	105.4
-245	7.0	30.7	1.0	1.7	109.0
-270	8.9	34.2	0.8	0.0	127.0
-290	8.3	32.7	0.7	0.0	119.4
-310	9.9	29.9	0.7	0.0	113.9

Cells were grown anaerobically with an initial glucose concentration of 50 g/L and CSL concentration of 20 g/L (without containing yeast extract)

3 结论

通过考察环境气体、pH、ORP 环境因素对

*Asuccinogenes* CGMCC 1593 发酵的影响, 得到较佳的发酵策略为: 发酵过程维持 CO<sub>2</sub> 的气体环境, MgCO<sub>3</sub> 控制 pH7.1~6.2, 当菌体对数生长期结束时, 用 Na<sub>2</sub>S · 9H<sub>2</sub>O 调节 ORP 至-270 mV。此时, 发酵 48 h 产生丁二酸 37 g/L, 摩尔产率达到 129%。这对于深入研究优化 *A. succinogenes* CGMCC 1593 发酵产酸策略具有一定的应用价值。

## REFERENCES

- [1] Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 545-552.
- [2] McKinlay JB, Vieille C, Zeikus JG. Prospects for a bio-based succinate industry. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**: 727-740.
- [3] Datta R. Process for the production of succinic acid by anaerobic fermentation. United States Patent: 5143833, 1992.
- [4] Guettler MV, Jain MK, Soni BK. Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. United States Patent: 5504004, 1996.
- [5] Lee PC, Lee SY, Hong SH, Chang HN. Isolation and characterization of a new succinic acid-producing bacterium, *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, from bovine rumen. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **58**: 663-668.
- [6] Zhu LL, Liu YP, Zheng P, Sun ZH. Screening and identification of a strain of *Actinobacillus succinogenes* producing succinic acid by anaerobic fermentation. *Microbiology*, 2007, **34**(1): 80-84. 朱蕾蕾, 刘宇鹏, 郑璞, 等. 一株琥珀酸产生菌的筛选及鉴定. *微生物学通报*, 2007, **34**(1): 80-84.
- [7] Liu YP, Zheng P, Sun ZH. Determination of succinic acid and other metabolites from fermentation broth by ion-exclusion liquid chromatography. *Food and Fermentation Industries*, 2006, **32**(12): 119-123. 刘宇鹏, 郑璞, 孙志浩. 采用离子排斥色谱法分析发酵液中的琥珀酸等代谢产物. *食品与发酵工业*, 2006, **32**(12): 119-123.
- [8] Van der Werf MJ, Guettler MV, Jain MK, Zeikus JG. Environmental and physiological factors affecting the succinate product ratio during carbohydrate fermentation by *Actinobacillus* sp.130Z. *Arch Microbiol*, 1997, **167**: 332-342.
- [9] Lee PC, Lee WG, Kwon S, Lee SY, Chang HN. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> supply and glucose concentration. *Enzyme Microb Technol*, 1999, **24**: 549-554.
- [10] Samuelov NS, Lamed R, Lowe S, Zeikus JG. Influence of CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub> level and pH on growth, succinate production, and enzyme activities of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *Appl Environ Microbiol*, 1991, **57**: 3013-3019.
- [11] Sridhar J, Eiteman MA. Metabolic flux analysis of clostridium thermosuccinogenes. *Appl Biochem Biotechnol*, 2001, **94**: 51-69.

## 《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论(不用单列标题书写)。目的(Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法(Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果(Results): 本文最后得出的结果(实验数据部分)。结论(Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。

凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的(如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。