广西科学 Guangxi Sciences 2015,22(1):20～26

网络优先数字出版时间:2015-01-26

网络优先数字出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/45.1206.G3.20150126.1547.009.html

非粮生物质制备生物基丁二酸的研究进展*

Progress in Microbial Production of Succinic Acid Using Non-food Biomass Feedstock

吴　昊,马江锋,吴明科,张　敏,陈可泉,姜　岷**

WU Hao,MA Jiang-feng,WU Ming-ke,ZHANG Min,CHEN Ke-quan,JIANG Min

(南京工业大学生物与制药工程学院,江苏南京　211816)

(College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering,Nanjing Tech University,Nanjing,Jiangsu,211816,China)

摘要:丁二酸(Succinic acid)是重要的碳四平台化合物,拥有巨大的潜在市场需求量。随着能源危机和粮食安全问题的日益严重,利用非粮生物质原料提高生物基丁二酸的竞争力成为研究的热点。文中从生产菌种的选育、非粮生物质原料的利用与产物提取3个方面对国内外相关研究进展进行综述,最后探讨该领域中所面临的问题与研究方向,并展望其发展前景。

关键词:丁二酸　非粮生物质　菌种选育　发酵　提取

中图分类号:Q815　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1005-9164(2015)01-0020-07

Abstract:Succinic acid is an important C4-platform chemical,which has huge market potential in applications. Diminishing petroleum reserves and increasing concerns on food security have resulted in worldwide interests in the study of bio-succinic acid production using non-food biomass feedstock. This article reviewed recent advances in the production of succinic acid by microbial fermentation,including discovery and screening of the succinic-acid-producing microbes, utilization of non-food biomass feedstock, and product recovery technology. Finally, we discussed the limitation of this progress and proposed the future research needs for succinic acid production using non-food biomass feedstock.

Key words:succinic acid,non-food biomass,strain screening,fermentation,recovery

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20150126.009

0　引言

丁二酸又名琥珀酸(Succinic acid),是一种重要的四碳二元羧酸平台化合物,可用于制备表面活性剂、离子螯合剂、医药中间体和食品添加剂等多种产品,其中以丁二酸为前体合成的聚丁二酸丁二醇酯(PBS),属于可完全生物降解塑料,且具有优良的力学性能和耐热性,市场需求巨大[1],目前全球PBS装置的总产能已超过14万t[2],按此估算丁二酸的年需求量也将达到数十万吨。

化石基丁二酸主要是顺丁烯二酸酐(马来酸酐)通过电解法生产,其过程伴随大量温室气体和污染物的排放,且原料来源自石油和煤炭。然而,在自然界中有多种厌氧菌和兼性厌氧菌可利用各种糖类物质发酵合成丁二酸[3],且生物合成过程可吸收温室气体CO_2用于菌株的生长及代谢,因此生物法制备丁二酸已成为全球的研究热点[1,3]。目前,国内外丁二酸的生物制备法已进入中试或试生产阶段,如Reverdia公司在2010年建成生物法制备丁二酸工业化示范装

收稿日期:2015-01-05

作者简介:吴　昊(1976-),男,副教授,主要从事生物工程及分离工程方面的研究。

*国家重点基础研究发展计划(973计划)项目(No.2009CB724701),国家高技术研究发展计划(863项计划)项目(No.2011AA02A203),国家自然科学基金项目(No.21076105)和江苏高校优势学科建设工程项目资助。

**通讯作者:姜　岷(1972-),男,教授,主要从事工业微生物的育种及发酵工程方面的研究,E-mail:bioengine@njtech.edu.cn。

置，并在 2012 年宣布年产 1 万 t 的丁二酸生产装置正式投产[4]；日本三井化学和美国 BioAmber 公司建设的产值 3 万 t/年的生物基丁二酸生产装置将于 2015 年投入工业化运行[5]。在国内，南京工业大学和中科院天津工业生物技术研究所等科研院所均与有关企业合作开展工业中试研究[6,7]。需要指出的是，目前已经投产或正在建设的生物基丁二酸工业化项目基本以玉米或大麦等粮食作为主要原料。2008 年以来，世界粮食价格迅速上涨，尽管 2014 年下半年国际原油价格大幅下降，但粮食价格依然保持上涨趋势，而丁二酸属于大宗化学品，原料价格的波动将直接影响生物基丁二酸与化学基丁二酸的竞争。可见，扩大原料范围，降低原料成本是实现生物基丁二酸可持续工业化生产的关键之一。非粮生物质资源包括非食用的淀粉类和糖类作物、不可食用的糖蜜和乳清、农林畜牧业废弃物以及生活和工业生产产生的有机废弃物[8]，因此利用各种非粮生物质厌氧发酵制备丁二酸受到广泛关注。本文主要对非粮生物质制备丁二酸在菌株的选育改造、原料的利用与发酵技术、产品分离提取等方面的研究进展进行综述，并对其应用前景进行展望。

1 生产菌株及其选育

1.1 生产菌株

具有丁二酸生产性能的微生物主要分为细菌及真菌类[1,3]，由于绝大部分非粮生物质含有多种糖类，因此能利用非粮生物质的丁二酸生产菌株应具有利用多种糖类的能力，目前已经公开报道的菌株主要包括 3 类。

来自动物瘤胃的兼性厌氧革兰氏阴性菌 *A. succinogenes*（产琥珀酸放线杆菌）一直受到关注，该菌能直接在厌氧条件下利用多种碳源合成丁二酸，如纤维二糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、果糖、木糖、半乳糖、甘露糖、阿拉伯糖、甘露醇、山梨醇及水杨苷等，该菌具有较高的产物耐受性，是目前研究较多的菌种[3]。*M. succiniciproducens*（产琥珀酸曼氏杆菌）同样是来自瘤胃的兼性厌氧革兰氏阴性菌，可利用的碳源种类几乎与 *A. succinogenes* 相同，但生产性能不高[9]。*A. succiniciproducens*（产琥珀酸厌氧螺菌）是一种严格厌氧革兰氏阴性菌，该菌同样以丁二酸为主要代谢产物，可利用葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖、甘油和乳糖作为碳源[2]，但是因为该菌严格厌氧，且不能耐受高渗透压，所以限制了其应用[10]。

野生型 *E. coli*（大肠杆菌）属于革兰氏阴性菌，能够广泛利用多种碳源，包括葡萄糖、甘露醇和果糖等六碳糖以及木糖和阿拉伯糖等五碳糖。虽然野生型 *E. coli* 在厌氧条件下的混合酸发酵途径仅能积累少量丁二酸，但经过基因工程改造可消除竞争性途径中的有机酸产物，并增强丁二酸合成途径中的关键酶，从而大幅提高 *E. coli* 的丁二酸产量，如 Vemuri 等从重组 *E. coli*（失活丙酮酸甲酸裂解酶基因 *pfl* 以及乳酸脱氢酶基因 *ldh*）中筛选出葡萄糖转移酶基因 *ptsG* 产生自发突变的菌株 AFP111，该突变株不再产生甲酸和乳酸[11]，再以 AFP111 为出发菌株，导入丙酮酸羧化酶基因 *pyc*，增加丁二酸途径的代谢流量，通过好氧-厌氧二阶段发酵培养，丁二酸产量达 99.2 g/L，生产速率达 1.3 g/(L·h)[12]。此外还可通过分子改造或进化代谢选育的手段恢复或增强 *E. coli* 菌株在厌氧条件下对五碳糖的利用能力[13,14]。

C. glutamicum（谷氨酸棒杆菌）属于革兰氏阳性兼性厌氧菌，该菌是氨基酸工业的主要生产菌，可以利用蔗糖、麦芽糖、葡萄糖、甘露糖、甘油和纤维二糖等碳源。在有氧条件下，该菌可大量合成氨基酸，而在缺氧的条件下，*C. glutamicum* 生长受到抑制，但细胞可通过 PEP 羧化酶合成草酰乙酸（另有少量草酰乙酸从 PEP 羧化激酶、丙酮酸羧化激酶途径合成），草酰乙酸再经反向 TCA 途径合成丁二酸[15]，但同时会产生大量乳酸。Shohei 等[16]通过失活 *C. glutamicum* 中的乳酸脱氢酶基因（*ldh*）并导入丙酮酸羧化酶（*pyc*）基因，经好氧-厌氧二阶段发酵培养，丁二酸产量达到 146 g/L，收率达到 0.92 g/g。针对野生型 *C. glutamicum* 不能利用五碳糖的问题，在重组 *C. glutamicum* 中构建五碳糖的代谢途径，使其最终能够利用五碳糖生产丁二酸[17]。

1.2 多种糖类利用能力的改造

非粮生物质水解液中含有多种糖类，一些丁二酸生产菌株会优先利用某些糖类（如葡萄糖），但对其它糖类缺乏相应的代谢途径或利用能力低下，因此，将这些菌株进行改造使其能同步利用混合糖是实现非粮生物质原料高效利用的关键之一。

五碳糖是木质纤维素原料中的常见还原糖，Andersson 等[13]以 *E. coli* C600（ATCC23724）为出发菌株，通过敲除 *pfl*、*ldh* 和 *ptsG*，获得的菌株 AFP184 可同时利用五碳糖和六碳糖，丁二酸产量可达 48 g/L，收率达 1.04 g/g。Liu 等[14]针对 *E. coli* 利用木糖能力差的问题，以无木糖利用能力的出发菌株进行常压室温等离子体（ARTP）诱变，筛选出一系列能在厌氧条件下进行木糖代谢的突变株，在此基础上以高浓度木糖作为选择性压力，通过进化代谢提高菌株的木糖利用能力，获得性能稳定的木糖利用菌株

XY113，其细胞生长速度提高 1.1 倍，木糖消耗速率提高 1.6 倍，丁二酸的产量提高 1.2 倍。为了让 *C. glutamicum* 具有利用五碳糖的能力，Kawaguchi 等[18]将 *E. coli* 中的木糖异构酶基因（*xylA*）和木酮糖激酶基因（*xylB*）导入到 *C. glutamicum* R 构建木糖代谢途径，在木糖为唯一碳源时，该菌能在有氧条件下生长并在氧缺乏条件下积累丁二酸。Sasaki 等[19]通过在 *C. glutamicum* 过量表达阿拉伯糖转运蛋白基因（*araE*），实现菌株对木质纤维素水解液中五碳糖和六碳糖的共利用，该菌可在 14 h 内同时将混合糖（葡萄糖 35 g/L，木糖 17.5 g/L，阿拉伯糖 7 g/L，纤维二糖 7 g/L）消耗完毕。

蔗糖是糖蜜中的主要成分，但目前报道的大多数 *E. coli* 不能利用蔗糖。为了拓展对蔗糖的利用能力，Chan 等[20]构建了重组 *E. coli* KJ122，将蔗糖利用基因（*cscKB* 和 *cscA*）导入其中，使该菌株具有代谢蔗糖和糖蜜生产丁二酸的能力。Ma 等[21]利用表面展示技术，构建重组质粒 pTrcC-*cscA*，蔗糖水解酶 CscA 可展示于 *E. coli* 细胞表面，与细胞内表达相比，该菌的蔗糖水解酶活力提高 1900 倍，能直接利用蔗糖和糖蜜发酵生产丁二酸。

2 非粮生物质的利用与发酵技术

2.1 甘蔗糖蜜发酵制备丁二酸

甘蔗糖蜜是蔗糖工业的主要副产物，含糖量达 48%以上，以蔗糖为主，并含少量葡萄糖和果糖。我国甘蔗糖蜜年产量约 400～500 万 t，全球年产量为 5500～6000 万 t。由于糖蜜中含有乙醛、酚类及重金属等不利于发酵的成分，需要进行预处理。杨卓娜等[22]通过比较不同的糖蜜预处理方法对 *A. succinogenes* NJ113 发酵性能的影响，发现经硫酸处理的糖蜜发酵效果最好，丁二酸产量为 46.9 g/L，比未经处理的糖蜜高 12.6%，质量收率为 0.72 g/g。Huang 等[23]在优化 *A. succinogenes* 培养基的基础上，采用糖蜜补料分批发酵 60 h 内产出 64.3 g/L 的丁二酸。通过基因改造和进化代谢手段选育出可利用蔗糖的重组 *E. Coli* KJ122-pKJSUC-24T，以甘蔗糖蜜为碳源，厌氧发酵 72 h 可产丁二酸 56 g/L，质量收率达 0.96 g/g[20]。Ma 等[21]利用细胞表面锚定有蔗糖水解酶的重组 *E. Coli* AFP111/pTrcC-*cscA*，以甘蔗糖蜜为碳源进行两阶段发酵，厌氧发酵 34 h，丁二酸产量达到 36.3 g/L，生产速率显著提高，达 1.04 g/(L·h)。

2.2 淀粉质非粮作物发酵制备丁二酸

木薯是重要的热带、亚热带作物，具有产量高、耐贫瘠的优势。全球鲜木薯产量超过 2 亿 t，中国产量约 730 万 t，主要集中于广西。鲜木薯中的淀粉含量为 24%～32%，还含有蛋白质、脂肪和维生素等营养成分，木薯干片的淀粉含量达 70%以上，生木薯粉中的亚麻仁苦苷具有毒性，限制其在食品中的广泛应用。目前利用木薯制备丁二酸已有报道。张敏等[24]对木薯淀粉进行糖化，利用 *E. coli* AFP111 进行有氧-厌氧两阶段发酵，比较先糖化后发酵（SHF）和同步糖化发酵（SSF）两种模式，最终获得 61 g/L 丁二酸。而 *E. coli* NZN111 能直接利用木薯粗粉同步糖化生产丁二酸，提高细胞浓度后，丁二酸产量可达 127 g/L[25]。申乃坤等[26]对 *A. succinogenes* 利用木薯淀粉开展类似研究，同步糖化发酵可减少底物抑制，丁二酸产量达 72 g/L。以上研究表明木薯具有较好的丁二酸生产性能。

菊芋是一种适合在荒漠环境中种植的高产耐旱耐盐碱植物，其块茎中含有大量淀粉和多聚果糖。任玮等[27]利用菊粉酶水解菊芋制备的水解糖液（总糖浓度 53.5 g/L）发酵制备丁二酸，丁二酸的质量产率达 0.83 g/g。Gunnarsson 等[28]用 0.2%稀硫酸替代菊粉酶直接水解菊芋块茎，再利用 *A. succinogenes* 进行发酵，获得 47.9 g/L 丁二酸。董晋军等[29]对菊芋采用 *A. succinogenes* 和 *Asp. Niger* 同步糖化发酵，补料分批发酵 96 h 产丁二酸 98.2 g/L，质量产率达 0.95 g/g。

芭蕉芋是一种适合西南热带、亚热带山区种植的高产作物，鲜芋中淀粉含量约 20%～25%，块茎干片中的淀粉含量达 60%以上，主要种植于云贵川地区，由于芭蕉芋适口性较差，不能直接作为食品。刘宇鹏等[30]酶解芭蕉芋制备糖浆，在不外加氮源的情况下，可产丁二酸 13.69 g/L，说明糖浆中含有一定的有机氮源，而添加 38.55 g/L 玉米浆后，丁二酸产量增加至 62 g/L。

2.3 乳清原料发酵制备丁二酸

乳清是奶酪生产过程的副产物，乳清中含有 3%～8%的乳糖。Lee 等[31,32]研究发现，在补加有机氮源后，*A. succiniciproducens* ATCC 29305 和 *M. succiniciproducens* MBEL55E 均可利用乳清发酵制备丁二酸，但产量均低于 16 g/L，菌体都有较长的延滞期，生产水平较低。Wan 等[33]将 50 g/L 的乳清作为 *A. succinogenes* 130Z 的碳源，制备的丁二酸不足 22 g/L，产率 0.57 g/g。可见乳清作为碳源发酵效果并不理想，需要对菌株进行进一步的改造以提高对乳糖的耐受性和利用能力。

2.4 木质纤维素类生物质发酵制备丁二酸

木质纤维素类生物质是地球上最丰富的可再生资源，农林业产生的残渣是主要来源，其中含有的纤维素、半纤维素可水解为寡糖或单糖，可作为丁二酸的发酵碳源，相关研究主要集中于具有五碳糖利用能力的瘤胃菌。Kim 等[34]采用蒸汽爆破和酶解的方式获得橡木渣水解糖液，*M. succiniciproducens* MBEL55E 可同时利用其中的木糖与葡萄糖，连续发酵的生产强度达 3.19 g/(L·h)，但对糖收率仅 0.55 g/g。Zheng 等[35]比较了 *A. succinogenes* 利用玉米秸秆、玉米芯、稻草和麦草等廉价生物质制备丁二酸的可行性，通过稀碱预处理和酶法降解获得糖液，分批发酵结果表明：玉米秸秆水解糖液利用率最高，玉米芯次之，采用补料分批发酵制备丁二酸可达 53 g/L。Zheng 等[36]在此基础上以纤维素酶与纤维二糖酶同步糖化玉米秸秆发酵制备丁二酸，加入经预处理后的玉米秸秆 70 g/L，同步糖化发酵可得丁二酸 47.4 g/L。Borges 等[37]利用经过 $Ca(OH)_2$ 中和处理的甘蔗渣稀酸水解液作为碳源，可发酵制备 22.5 g/L 丁二酸，但对糖产率仅为 0.43 g/g。黄秀梅等[38]利用活性炭和 $Ca(OH)_2$ 去除玉米秸秆水解液中的发酵抑制物（糠醛及羟甲基糠醛），再用 *A. succinogenes* 进行发酵，丁二酸产量达到 66.23 g/L。

近年来，有关基因工程菌利用秸秆原料制备丁二酸的研究已有报道。Liu 等采用可以利用木糖的重组 *E. coli* BA204，以木糖为主的甘蔗渣稀酸水解液为碳源，可生产 15.85 g/L 丁二酸，质量收率为 0.89 g/g[19]，利用玉米秸秆稀酸水解液时，可产丁二酸 23.1 g/L[39]。Wang 等[40]构建重组 *E. coli* SD121，在有氧-厌氧两阶段发酵过程中，能同步消耗以蒸汽爆破和酶解的方式获得的玉米秸秆水解糖液中的葡萄糖和木糖，最终产丁二酸 57.8 g/L，质量收率为 0.87 g/g。Wang 等[41]报道了重组 *C. glutamicum* 利用玉米芯稀酸水解液生产丁二酸，水解液经过活性炭脱毒处理后，可生产 40.8 g/L 丁二酸，质量收率为 0.69 g/g。

2.5 其它非粮生物质发酵制备丁二酸

麦麸是面粉加工中的主要副产物，富含淀粉和小麦朊蛋白，Dorado 等[42]利用淀粉酶和蛋白酶水解获得含有大量葡萄糖、麦芽糖和游离氨基氮的酶解液，将其作为 *A. succinogenes* 发酵的碳源，无需添加酵母粉，即可产 50.6 g/L 的丁二酸。玉米籽皮是玉米加工的副产物，含有少量淀粉和大量木质纤维素，吴昊等[43]利用稀酸水解处理，并用活性炭吸附除去大部分糠醛和酚类抑制物后，用 *A. succinogenes* 进行发酵生产丁二酸，产量增加至 42.3 g/L。木薯渣是木薯粉加工的主要副产物，含有大量淀粉和少量的木质纤维素，Shi 等[44]采用淀粉酶和纤维素酶两阶段水解获得木薯渣水解液，将 *C. glutamicum* 固定于聚氨酯空心球上进行重复批式发酵，但丁二酸产量仅 22 g/L，质量收率为 0.63 g/g。酒糟是谷物固态酿酒过程中形成的主要残渣，其中含有糖类、淀粉、木质纤维素和粗蛋白及维生素。周小兵等[45]先用纤维素酶处理白酒酒糟，再用糖化酶和 *A. succinogenes* 进行同步糖化发酵，240 g/L 的干白酒糟可产丁二酸 32 g/L，且无需再添加任何氮源。Chen 等[46]对日本清酒的酒糟进行液化糖化处理，再用 *A. succinogenes* 130Z 进行发酵获得 48 g/L 丁二酸，质量收率达 0.75 g/g，而酵母粉用量减少 75%，玉米浆可完全省去。

3 产品的分离与提取

目前，国内外应用于生物基丁二酸提取的分离技术主要包括：膜分离、结晶、吸附/离子交换和萃取等。非粮生物质原料制备的可发酵糖液中的色素含量较高（如糖蜜和木质纤维素水解液制备的发酵液为棕黑色），增加了产品提取难度；且部分杂质对菌体生长和代谢具有一定的抑制作用，导致丁二酸的产物浓度较低，增加下游常规浓缩处理的能耗。由此可见，非粮生物质原料制备丁二酸的品质和成本与其提取方法有直接关系，开发高效低耗的丁二酸提取方法的关键在于脱色与产物的浓缩技术。

3.1 非粮生物基丁二酸的脱色处理

发酵液中的显色化合物多属于酚类化合物、含氮聚合物及醛酮缩合物，这些化合物种类繁杂，其分子量范围从数百直至十万。吸附或离子交换法是比较成熟的脱色手段，孙超等[47]发现，在酸性条件下粉末活性炭对甘蔗糖蜜丁二酸发酵液的脱色率达 97%。大孔树脂是一类常见的脱色吸附剂，对具有极性基团或携带电荷的色素物质具有良好的选择性，并具有易于再生的优点。采用 AB-8 型大孔树脂与粉末活性炭对糖蜜发酵液进行两步脱色，一步脱色率达 80%，二步脱色率达 98%，与单独采用粉末活性炭脱色相比，活性炭用量减少 91%[47]。Li 等[48]采用其合成的聚苯乙烯树脂对棉花秸秆水解液制备的丁二酸发酵液进行脱色处理，在 pH 值 4.0，60℃ 条件下的脱色率可达 96%。而 Li 等[49]利用丁二酸与色素含量及溶解度的差异，直接从发酵液中结晶提取丁二酸，避免了传统的脱色操作，但其结晶收率与纯度只有 70%和 90%，可见，直接结晶法并不能直接获得合格产品，需要和其它提取方法相结合。

3.2 低浓度发酵液体系中丁二酸的富集与浓缩

浓缩过程中溶剂的相变是高耗能的主要原因，因此，在不发生相变的前提下将丁二酸从发酵液中移出并富集，可起到类似于浓缩的效果，并节省能量。电渗析利用阴阳离子交换膜的选择透过性，在电场力的作用下，分别将丁二酸根与不带电的糖类、蛋白质分离，从而达到分离与浓缩丁二酸的目的，Isabelle等[50]通过电渗析将发酵液中的低浓度丁二酸钠浓缩至83 g/L。丁二酸具有两个羧基，并在不同pH值下表现出不同的解离状态，因此，可利用吸附或离子交换作用提取并通过优化洗脱条件实现丁二酸的富集。Davison等[51]筛选的XUS 40285树脂对丁二酸的吸附量为0.06 g/g，该树脂可将副产的乙酸与丁二酸完全分离，用热水即可解吸丁二酸，通过优化解吸条件，将丁二酸由吸附前的10 g/L浓缩至40～110 g/L(解吸液)，但是由于发酵液的污染，树脂再生效果仅能维持10次的循环使用。以上研究成果虽不能完全替代蒸发浓缩，但有利于减少低浓度丁二酸的浓缩能耗。

4 存在的问题与展望

随着全球能源危机和粮食安全问题的日益严重，利用非粮生物质原料制备丁二酸已经成为研究热点，但要实现其工业化生产，还面临着很多潜在的问题，需要从生物炼制的全流程开展工作，主要包括以下3个方面：

(1)合理选择非粮生物质原料。非粮生物质并非等同于廉价产品，如乳清的价格远高于葡萄糖的价格。麦麸、玉米籽皮等农产加工副产物在饲料行业存在稳定的消费市场，菊芋是生产菊糖保健品的原料，供给上的竞争关系不能忽略。秸秆等木质纤维素原料价格低廉，但收集和运输成本不可忽视，木质纤维素原料需要进行复杂的水解处理，水解液的糖浓度低，甚至需要脱毒处理，这些问题严重削弱原料的成本优势。因此要充分考虑原料的价格趋势、供应能力、处理难度和微生物的利用效率。而木薯和糖蜜等富含糖分的非粮生物质具有稳定的供应和相对合理的价格，易于被微生物利用，是目前较为适宜的非粮生物质原料。

(2)丁二酸生产菌株的性能和发酵调控手段还有待提高。现有菌株对非粮生物质特别是对低劣生物质的利用效率不高，主要表现在产物浓度低、发酵周期长。需要通过基因改造与进化代谢手段，进一步提高菌株对混合糖的利用效率，加快代谢速度；此外提高菌株对发酵抑制物、低pH值、高产物浓度和高渗透压等极端工况环境的抗逆性，减少部分菌株对有机氮源的依赖也是提高菌株生产性能的重要方向。在发酵调控方面，需要采取多种手段削弱底物和产物抑制，增强从碳源到丁二酸的代谢通量，最终达到提高生产性能和降低后续成本的目的。

(3)优化非粮生物质来源的丁二酸的提取技术。很多非粮生物质制备的糖液中含有大量杂质(如高浓度的色素和无机盐等)，增加了精制纯化产品的难度；大部分非粮生物质制备丁二酸的产量普遍较低(<60 g/L)，导致后期浓缩能耗迅速增加。这些问题直接关系到丁二酸的提取成本和产品质量，需要开发高效低耗的提取路线。

丁二酸属于美国能源部2004年公布的12种重要生物炼制产品之一，具有成熟的市场和巨大的发展潜力。以生物乙醇为代表的生物炼制产业的发展已表明：发展非粮原料的生物炼制，是生物法生产大宗基础化学品的必由之路。可以预见，随着科技进步，非粮生物质制备丁二酸的高效制备技术将获得突破，并逐步应用于生物基丁二酸的工业化生产。

参考文献：

[1] Bechthold I, Karlheinz B, Kabasci S, et. al. Succinic acid: A new platform chemical for biobased polymers from renewable resources[J]. Chem Eng Technol, 2008, 31(5): 647-654.

[2] 王斌，许斌. 聚丁二酸丁二醇酯(PBS)的现状及进展[J]. 化工设计，2014，24(3)：3-7.
Wang B, Xu B. Actuality and advance in poly butylene succinate (PBS) [J]. Chemical Engineering Design, 2014, 24(3): 3-7.

[3] Song H, Lee S Y. Production of succinic acid by bacterial fermentation[J]. Enzyme Microb Technol, 2006, 39: 352-361.

[4] 李雅丽. Reverdia全球首套大型生物基丁二酸生产装置将投运[J]. 石油化工技术与经济，2012，28(3)：58.
Li Y L. Reverdia the world's first set of big bio-based succinic acid production facility will be put into operation[J]. Technology & Economics in Petrochemicals, 2012, 28(3): 58.

[5] 中国石化有机原料科技情报中心站. BioAmber公司建设生物基丁二酸和BDO生产装置[J]. 石油炼制与化工，2012，43(1)：35.
Scientific and Technological Information Junction Center of Organic Materials in Sinopec. BioAmber company constructed production facility of bio-based succinic acid and BDO[J]. Petroleum Processing and Petrochemicals, 2012, 43(1): 35.

[6] 陶炎. 生物法制取丁二酸中试取得突破[N]. 中国石化报，2014-03-10 (3).
Tao Y. Pilot plant test of producing succinic acid by biological method had made a breakthrough[N]. China Petrochemical News, 2014-03-10 (3).

[7] 劲博. 发酵法生产丁二酸中试技术通过验收[N]. 中国

石化报,2014-03-13 (2).
Jing B. Pilot technology of producing succinic acid by fermentation through the acceptance[N]. China Petrochemical News,2014-03-13 (2).

[8] **谢光辉. 非粮生物质原料体系研发进展及方向[J]. 中国农业大学学报**,2012,17(6):1-19.
Xie G H. Progress and direction of non-food biomass feedstock supply research and development in China[J]. Journal of China Agricultural University,2012,17(6):1-19.

[9] 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 Microbiol Biotechnol,2002,58(5):663-668.

[10] Tee W,Korman T M,Waters M J,et al. Three cases of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* bacteremia confirmed by 16S rRNA gene sequencing[J]. J Clin Microbiol,1998,36(5):1209-1213.

[11] 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.

[12] 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.

[13] Andersson C,Hodge D,Berglund K A,et al. Effect of different carbon sources on the production of succinic acid using metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. Biotechnol Prog,2007,23:381-388.

[14] Liu R M,Liang L Y,Jiang M,et al. An engineering *Escherichia coli* mutant with high succinic acid production in the defined medium obtained by the atmospheric and room temperature plasma [J]. Process Biochem,2013,48:1603-1609.

[15] Inui M,Murakami S,Okino S,et al. Metabolic analysis of *Corynebacterium glutamicum* during lactate and succinate productions under oxygen deprivation conditions [J]. J Mol Microbiol Biotechnol,2004,7(4):182-196.

[16] Okino S,Suda M,Jojima T,et al. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2008,81(3):459-464.

[17] Wieschalka S,Blombach B,Bott M,et al. Bio-based production of organic acids with *Corynebacterium glutamicum* [J]. Microbiol Biotechnol,2012(6):87-102.

[18] Kawaguchi H,Vertès A A,Okino S,et al. Engineering of a xylose metabolic pathway in *Corynebacterium glutamicum* [J]. Appl Environ Microbiol,2006,72:3418-3428.

[19] Sasaki M,Jojima T,Kawaguchi H,et al. Engineering of pentose transport in *Corynebacterium glutamicum* to improve simultaneous utilization of mixed sugars[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2009,85:105-115.

[20] Chan S,Kanchanatawee S,Jantama K. Production of succinic acid from sucrose and sugarcane molasses by metabolically engineered *Escherichia coli* [J]. Bioresour Technol,2012,103:329-336.

[21] Ma J,Li F,Liu R M,et al. Succinic acid production from sucrose and molasses by metabolically engineered *E. coli* using a cell surface display system[J]. Biochem Eng J,2014,91:240-249.

[22] **杨卓娜,李建,黄秀梅,等. 利用甘蔗糖蜜厌氧发酵产丁二酸的研究[J]. 中国酿造**,2010,5:35-38.
Yang Z N,Li J,Huang X M,et al. Succinic acid production by anaerobic fermentation from cane molasses[J]. China Brewing,2010,5:35-38.

[23] Shen N K,Wang Q Y,Qin Y,et al. Optimization of succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes* GXAS137 using response surface methodology (RSM)[J]. Food Sci Biotechnol,2014,23(6):1911-1919.

[24] **张敏,马江锋,徐冰,等. 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(7):29-32.
Zhang M,Ma J F,Xu B,et al. Succinic acid fermentation from cassava starch[J]. China Bewing,2011(7):29-32.

[25] Chen C X,Ding S P,Wang D Z,et al. Simultaneous saccharification and fermentation of cassava to succinic acid by *Escherichia coli* NZN111 [J]. Bioresour Technol,2014,163:100-105.

[26] **申乃坤,王青艳,秦艳,等. 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 N K,Wang Q Y,Qin Y,et al. Succinic acid fermentation by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with cassava flour [J]. Microbiology,2014,41(8):1507-1515.

[27] **任玮,董晋军,郑璞,等. 酶水解菊芋糖浆发酵生产琥珀酸的初步研究[J]. 工业微生物**,2008,38(3):1-5.
Ren W,Dong J J,Zheng P,et al. Production of succinic acid using enzymatic *Jerusalem artichoke* by inulinase from *Aspergillus niger* [J]. Industrial Microbiology,2008,38(3):1-5.

[28] Gunnarsson I B,Karakashev D,Angelidaki I. Succinic acid production by fermentation of *Jerusalem artichoke* tuber hydrolysate with *Actinobacillus succinogenes* 130Z[J]. Ind Crops Prod,2014,62:125-129.

[29] **董晋军,郑璞,倪晔,等. 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 J J,Zheng P,Ni Y,et al. Production of succinic acid by simultaneous saccharification and fermentation from *Jerusalem artichoke* [J]. Journal of Food and Biotechnology,2008,27(5):78-82.

[30] **刘宇鹏,陈万河,陈梁,等. 芭蕉芋糖浆发酵生产丁二酸培养基的优化[J]. 食品与发酵工业**,2011,37(4):97-101.
Liu Y P,Chen W H,Chen L,et al. Optimization of fermentation medium for succinic acid production using *Canna edulis* ker syrup[J]. Food and Fermentation Industries,2011,37(4):97-101.

[31] Lee P C,Lee W G,Kwon S,et al. Batch and continuous cultivation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens*

for the production of succinic acid from whey[J]. Appl Microbiol Biotechnol,2000,54:23-27.
[32] 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.
[33] Wan C X,Li Y B,Shahbazi A,et al. Succinic acid production from cheese whey using *Actinobacillus succinogenes* 130Z[J]. Appl Biochem Biotech,2008,145:111-119.
[34] Kim D Y,Yim S C,Lee P C,et al. Batch and continuous fermentation of succinic acid from wood hydrolysate by *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E[J]. Enzyme Microb Technol,2004,35:648-653.
[35] Zheng P,Dong J J,Sun Z H,et al. Fermentative production of succinic acid from straw hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes* [J]. Bioresour Technol,2009,100:2425-2429.
[36] Zheng P,Fang L,Xu Y,et al. Succinic acid production from corn stover by simultaneous saccharification and fermentation using *Actinobacillus succinogenes* [J]. Bioresour Technol,2010,101:7889-7894.
[37] Borges E R,Pereira J N. Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes* [J]. J Ind Microbiol Biotechnol,2011,38:1001-1010.
[38] **黄秀梅,李建,陈可泉,等. 利用玉米秸秆水解液厌氧发酵产丁二酸的研究**[J]. **中国酿造**,2009(6):31-34.
Huang X M,Li J,Chen K Q,et al. Succinic acid produced by anaerobic fermentation from corn stalk hydrolysate[J]. China Brewing,2009(6):31-34.
[39] Bao H J,Liu R M,Liang L Y,et al. Succinic acid production from hemicellulose hydrolysate by an *Escherichia coli* mutant obtained by atmospheric and room temperature plasma and adaptive evolution[J]. Enzyme Microb Technol,2014,66:10-15.
[40] Wang D,Li Q,Yang M H,et al. Efficient production of succinic acid from corn stalk hydrolysates by a recombinant *Escherichia coli* with *ptsG* mutation[J]. Process Biochem,2011,46:365-371.
[41] Wang C,Zhang H L,Cai H,et al. Succinic acid production from corn cob hydrolysates by genetically engineered *Corynebacterium glutamicum* [J]. Appl Biochem Biotechnol,2014,172:340-350.
[42] Dorado M P,Lin S K C,Koutinas A,et al. Cereal-based biorefinery development:Utilisation of wheat milling by-products for the production of succinic acid[J]. J Biotechnol,2009,143:51-59.
[43] **吴昊,姚嘉旻,刘宗敏,等. 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):267-272.
Wu H,Yao J M,Liu Z M,et al. Feasibility for producing succinic acid by fermentation of cornhusk dilute acid hydrolysate after detoxification[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering,2009,25(2):267-272.
[44] Shi X C,Chen Y,Ren H F,et al. Economically enhanced succinic acid fermentation from cassava bagasse hydrolysate using *Corynebacterium glutamicum* immobilized in porous polyurethane filler[J]. Bioresour Technol,2014,174:190-197.
[45] **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**,2013,39(2):7-10.
Zhou X B,Zheng P. Study on fermentation production of succinic acid from spirit-based distillers' grains[J]. Food and Fermentation Industries,2013,39(2):7-10.
[46] Chen K,Zhang H,Miao Y L,et al. Succinic acid production from enzymatic hydrolysate of sake lees using *Actinobacillus succinogenes* 130Z[J]. Enzyme Microb Technol,2010,47:236-240.
[47] **孙超,郑璞,孙志浩. 发酵丁二酸提取液的脱色工艺研究**[J]. **食品与发酵工业**,2008,34(4):1-5.
Sun C,Zheng P,Sun Z H. Decoloration of the succinic acid fermentation broth[J]. Food and Fermentation Industries,2008,34(4):1-5.
[48] Li Q,Lei J D,Zhang R Y,et al. Efficient decolorization and deproteinization using uniform polymer microspheres in the succinic acid biorefinery from bio-waste cotton (*Gossypium hirsutum* L.) stalks[J]. Bioresour Technol,2013,135:604-609.
[49] Li Q,Wang D,Wu Y,et al. One step recovery of succinic acid from fermentation broths by crystallization [J]. Sep Purif Technol,2010,72:294-300.
[50] Isabelle M S,Sophie D,Philippe S. A new process for the continuous production of succinic acid from glucose at high yield,titer and productivity[J]. Biotechnol Bioeng,2008,99(1):129-135.
[51] Davison B H,Nghiem N P,Richardson G L. Succinic acid adsorption from fermentation broth and regeneration[J]. Appl Biochem Biotechnol,2004,113:653-669.

(责任编辑:陆　雁,黎贞崇)

(**上接第** 19 **页** Continue from page 19)

[67] Fitzpatrick J,Kricka W,James T C,et al. Expression of three *Trichoderma reesei* cellulase genes in *Saccharomyces pastorianus* for the development of a two-step process of hydrolysis and fermentation of cellulose [J]. Journal of Applied Microbiology,2014,117:96-108.
[68] Chang J J,Ho F J,Ho C Y,et al. Assembling a cellulase cocktail and a cellodextrin transporter into a yeast host for CBP ethanol production [J]. Biotechnology for Biofuels,2013,6:19.
[69] Takashima S,Nakamura A,Masaki H,et al. Cloning,sequencing,and expression of a thermostable cellulase gene of *Humicola grisea* [J]. Bioscience,Biotechnology and Biochemistry,1997,61(2):245-250.
[70] Zou G,Shi S H,Jiang Y P,et al. Construction of a cellulase hyper-expression system in *Trchoderma reesei* by promoter and enzyme engineering [J]. Microbial Cell Factories,2012,11:21.

(责任编辑:陆　雁,黎贞崇)