

## 木薯粉同步糖化发酵(SSF)产丁二酸

申乃坤<sup>1,2</sup> 王青艳<sup>1,2</sup> 秦艳<sup>1,2</sup> 廖思明<sup>1,2</sup> 朱婧<sup>1</sup> 朱绮霞<sup>1</sup> 米慧芝<sup>1</sup> 黄日波<sup>1,2\*</sup>

(1. 广西科学院 非粮生物质酶解国家重点实验室 国家非粮生物质能源工程技术研究中心 广西生物炼制重点实验室 广西 南宁 530007)

(2. 广西大学 生命科学与技术学院 广西亚热带生物资源保护利用重点实验室 广西 南宁 530005)

**摘要:**【目的】通过优化产琥珀酸放线杆菌 GXAS137 同步糖化发酵木薯粉产丁二酸的发酵培养基,提高丁二酸产量,降低生产成本。【方法】在单因素试验的基础上,先利用 Plackett-Burman 试验设计筛选出影响丁二酸发酵的重要参数,再采用正交试验确定重要参数的最佳水平。【结果】价格低廉玉米浆可用作氮源,影响丁二酸产量的重要参数是木薯粉、玉米浆、碱式碳酸镁和糖化酶浓度。最佳条件为(g/L):木薯粉 100,玉米浆 14,糖化酶 2.0 AGU/g 底物,碱式碳酸镁 75。优化后丁二酸产量达到 69.31 g/L,丁二酸得率为 90.01%,生产强度为 1.44 g/(L·h)。与初始条件(52.34 g/L)相比,丁二酸浓度提高了 32.42%。并利用 1.3 L 发酵罐对 SSF 与 SHF 两种发酵工艺进行了比较,SSF 丁二酸产量(72.21 g/L)远高于 SHF (56.86 g/L)。【结论】产琥珀酸放线杆菌同步糖化发酵木薯粉丁二酸产量高,生产成本低,具有较好的工业化应用前景。

**关键词:**产琥珀酸放线杆菌,木薯粉,Plackett-Burman 试验,正交试验,丁二酸

## Succinic acid fermentation by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with cassava flour

SHEN Nai-Kun<sup>1,2</sup> WANG Qing-Yan<sup>1,2</sup> QIN Yan<sup>1,2</sup> LIAO Si-Ming<sup>1,2</sup> ZHU Jing<sup>1</sup>  
ZHU Qi-Xia<sup>1</sup> MI Hui-Zhi<sup>1</sup> HUANG Ri-Bo<sup>1,2\*</sup>

(1. State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Guangxi Academy of Science, Nanning, Guangxi, 530007, China)

(2. Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bio-resource Conservation and Utilization, College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005, China)

**Abstract:** [Objective] In order to raising yields and reducing production costs, we optimized succinic acid production from *Actinobacillus succinogenes* GXAS137 by simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with cassava flour as carbon source. [Methods] The important parameters were screened by the single factor experiment and Plackett-Burman design.

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31160023); 广西自然科学基金项目(No. 2013GXNSFBA019102); 广西科学院基金项目(No. 13YJ22SW); 八桂学者建设工程专项经费

\*通讯作者: Tel: 86-771-2503902; 邮箱: rbhuang@gxas.cn

收稿日期: 2013-10-29; 接受日期: 2014-01-06; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-01-16

Then, the optimum values of the parameters were obtained by orthogonal experiment design. **[Results]** The results showed that corn steep liquor (CSL) was used as a proper nutrient in the succinic acid production from cassava flour. The optimum medium compositions were determined as (g/L): cassava flour 100, CSL 14, glucoamylase dose 2.0 AGU/g substrate and  $\text{MgCO}_3$  75. The succinic acid yield reached 69.31 g/L at the optimal condition. The conversion rate of cassava to succinic acid reached 90.01% and succinic acid productivity was 1.44 g/(L·h). The succinic acid content increased by 32.42% than that without the optimized condition (56.86 g/L). The simultaneous saccharification fermentation (SSF) and separated hydrolysis and fermentation (SHF) were compared with 1.3 L fermenter. The results showed that the succinic acid of SSF (72.21 g/L) was superior than SHF. **[Conclusion]** The high-level succinic acid production and low production cost from cassava flour may facilitate industrial scale application in future.

**Keywords:** *Actinobacillus succinogenes*, Cassava flour, Plackett-Burman design, Orthogonal experiment design, Succinic acid

丁二酸(又名琥珀酸),是一种重要的 C4 平台化合物,广泛应用于食品、医药、香料等工业,可取代苯合成 250 种以上的化工产品<sup>[1]</sup>。微生物发酵法生产丁二酸因其环境友好、可利用废弃的生物资源、能够固定温室气体  $\text{CO}_2$  等优点,成为近年来国内外的研究热点<sup>[2]</sup>。

木薯(Cassava)具有易种、耐干旱贫瘠、淀粉含量高(干片可达 70%以上)等优点,是一种极具潜力的非粮作物<sup>[3]</sup>。目前丁二酸生产的原料主要有:葡萄糖、糖蜜、纤维素等,而产琥珀酸放线杆菌发酵木薯粉产丁二酸的研究还未见报道。

在众多产丁二酸的微生物中,产琥珀酸放线杆菌以其产量高(最高达 110 g/L<sup>[4]</sup>)、耐受性强等优点,成为最具发展前景的生产菌之一<sup>[5]</sup>。McKinlay 等以葡萄糖为碳源,对氮源、无机盐、维生素及生物素等进行了优化,得到合成培养基 AM3,丁二酸可达 70 g/L<sup>[6]</sup>。Borges 等以甘蔗渣水解液为碳源,优化培养基组成,丁二酸可达 22.5 g/L<sup>[7]</sup>。Zhu 等研究  $\text{CO}_2$  浓度对丁二酸发酵的影响,结果表明: $\text{MgCO}_3$  不仅可以对发酵 pH 值进行调节,而且可以提供发酵所需的  $\text{CO}_2$ ,丁二酸可达 56.1 g/L,仅比通  $\text{CO}_2$  组(61.92 g/L)低 7.03%<sup>[8]</sup>。张敏等对大肠杆菌发酵木薯粉产丁二酸进行研究,对先糖化后发酵(SHF)和同步糖化发酵(SSF)两种模式进行比较,并对发酵温度、糖化酶用量等进行了优化,最终丁二酸可达 61.2 g/L<sup>[9]</sup>。由以上分析可知,影响该菌发

酵的因素众多,培养基中的碳源、氮源、无机盐及 pH 调节剂等对丁二酸有较大影响。而且发酵所需的氮源多是价格昂贵的酵母粉,增加丁二酸生产成本,需要寻找廉价替代氮源。

Plackett-Burman (P-B)试验和正交试验是比较常见的发酵优化的实验设计,在生化、微生物工程等方面的应用也越来越多<sup>[10-11]</sup>。本文以前期筛选到的丁二酸高产菌株(*Actinobacillus succinogenes* GXAS137)为实验菌株,对同步糖化发酵(Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)木薯粉产丁二酸的培养基进行了优化,利用 P-B 试验对影响丁二酸发酵的主要因子进行了筛选,再利用正交试验对筛选出的关键因子浓度进行进一步优化,并对 SSF 与先糖化后发酵(Separate Hydrolysis and Fermentation, SHF)两种发酵模式进行了比较。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:**产琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*) GXAS137<sup>[12]</sup>为课题组前期筛选获得。

**1.1.2 原料及酶制剂:**(1)木薯粉:淀粉含量 70%,广西产。(2)耐高温淀粉酶:Liquozyme Supra,购自诺维信公司,标准酶活力为 90 KNU/g。(3)糖化酶:Dextrozyme DX,购自诺维信公司,标准酶活 500 AGU/mL<sup>[13]</sup>。

**1.1.3 培养基:** (1) 种子培养基(g/L): 葡萄糖 10.0, 酵母提取物 5.0, 蛋白胨 5.0, NaCl 2.0,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  8.5,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  15.5,  $\text{NaHCO}_3$  2.0, 半胱氨酸盐酸盐 1.0, pH 自然,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

(2) 原木薯粉发酵培养基(g/L): 木薯粉 70.0, 酵母提取物 10.0, NaCl 5.0,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1.0,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{CaCl}_2$  0.5,  $\text{MgCO}_3$  70.0,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min。

**1.1.4 主要仪器及试剂:** (1) 主要仪器: 高效液相色谱, HPLC 美国戴安公司 U-3000 色谱; DG250 小型厌氧工作站, Don Whitley Scientific; 1.3 L 发酵罐, Eppendorf BioFlo/CelliGen 115; (2) 所用试剂均为国产分析纯或生化试剂。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 培养及发酵条件:** (1) 发酵过程: 将甘油保藏的菌种接种到液体种子培养基进行活化,  $37^\circ\text{C}$  培养 15 h 后, 按体积比 8% 接种量接种于装有 92 mL 发酵培养基的三角摇瓶(容积为 250 mL)中进行发酵, 置  $37^\circ\text{C}$  二氧化碳培养箱发酵 48 h, 进行产物分析。

(2) 木薯粉同步糖化发酵(SSF): 木薯粉与蒸馏水混合, 加入氮源、无机盐等其他营养成分, 调节 pH 至 5.5, 加入耐高温淀粉酶(0.12 KNU/g 木薯粉), 迅速加热到  $85\text{--}90^\circ\text{C}$ , 液化 30 min, 加入碳酸镁,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min, 加入适量糖化酶, 接种发酵。

(3) 木薯粉先糖化后发酵(SHF): 将木薯粉按照 SSF 优化浓度与蒸馏水混合, 调节 pH 5.5, 加入耐高温淀粉酶(0.12 KNU/g 木薯粉), 迅速加热到  $85\text{--}90^\circ\text{C}$ , 液化 30 min, 冷却至  $60^\circ\text{C}$ , 调节 pH 值为 4.2–4.5, 然后加入糖化酶,  $60^\circ\text{C}$  水浴糖化 2 h, 加入其他营养成分及碳酸镁,  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 20 min, 接种发酵。

(4) 1.3 L 发酵罐中进行厌氧发酵, 装液量 0.8 L, 培养基成分和三角摇瓶发酵培养基相同。接种量 8%, 发酵温度  $37^\circ\text{C}$ , 搅拌转速 150 r/min, 通气为 100%  $\text{CO}_2$ , 通气量为 0.2 mL/min。

**1.2.2 分析测定方法<sup>[14]</sup>:** (1) 有机酸测定: HPLC 法, 戴安 Utimat3000, 自动进样器, 色谱柱为

AminexHPX-87H 300 mm $\times$ 7.8 mm, 流动相 5 mmol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , pH 2.5, 柱温  $45^\circ\text{C}$ , 进样量 10  $\mu\text{L}$ , 流速 0.6 mL/min, 紫外检测器波长 210 nm。

(2) 残糖测定: HPLC 法, 采用紫外与示差检测器联用的检测方法, 示差检测器温度  $50^\circ\text{C}$ 。

(3) 样品处理: 发酵液在室温下 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 然后用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  的无菌滤膜过滤, 用高效液相色谱(HPLC)检测发酵液丁二酸及残糖浓度。

(4) 丁二酸产率(%)定义为: 每消耗 1 g 葡萄糖所产生丁二酸的克数。

## 2 结果与分析

### 2.1 底物浓度对木薯粉同步糖化发酵产丁二酸的影响

木薯粉浓度对菌体的生长及代谢有重要影响, 分别选择 60、70、80、90、100、110 g/L 木薯粉进行同步糖化(SSF)发酵试验, 其他成分与原发酵培养基相同, 发酵 48 h 后, 分析测定样品, 每组设 3 个平行, 结果取平均值(下同)。

从图 1 可知, 当木薯粉浓度低于 90 g/L 时, 丁二酸产量随木薯粉浓度的增加而增加; 但当木薯粉浓度超过 90 g/L 时, 丁二酸的产量随着木薯粉浓度增加而降低。因此, 木薯粉同步糖化发酵产丁二酸最适的底物浓度为 90 g/L。

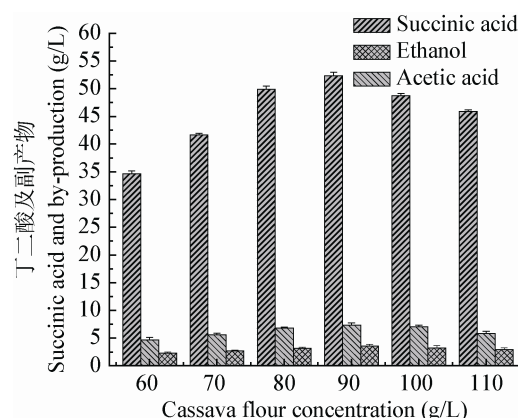


图 1 木薯粉浓度对丁二酸发酵的影响

Figure 1 Effect of cassava flour concentration on the production of succinic acid

## 2.2 氮源对木薯粉同步糖化发酵产丁二酸的影响

产琥珀酸放线杆菌对氮源要求较高,本身不能合成生物素、烟酸、甲硫氨酸等生长因子<sup>[15]</sup>,需要添加氮源提供生长所需的氨基酸和维生素等生长因子。从本实验室研究结果可知,酵母粉为丁二酸发酵的最适氮源,但价格较高,会增加丁二酸生产成本,阻碍丁二酸工业化生产,需要寻找价格低廉合适的替代氮源。以 90 g/L 的木薯粉为碳源,氮源含氮量为 1.0 g/L,分别选取酵母粉(10 g/L)、蛋白胨(8 g/L)、玉米浆粉(11.67 g/L),豆粕粉(11.67 g/L),硫酸铵(3.33 g/L),对照不加入任何氮源,加入其他营养成分,发酵 48 h 后,分析测定样品,其结果如图 2 所示。

从图 2 可以看出:木薯粉发酵产丁二酸的最适氮源为酵母粉(42.37 g/L),其次为玉米浆(40.98 g/L),硫酸铵为氮源时较差(10.15 g/L)仅略高于对照(9.85 g/L)。由以上分析可知,酵母粉为氮源产量略优于玉米浆,但玉米浆价格远低于酵母粉,考虑到生产成本及产业化生产等因素,选择玉米浆作为木薯粉产丁二酸发酵的氮源。

## 2.3 糖化酶用量对木薯粉同步糖化发酵产丁二酸的影响

木薯粉同步糖化发酵产丁二酸过程中,糖化酶与菌体发酵最适温度、pH 值存在较大差异,菌体

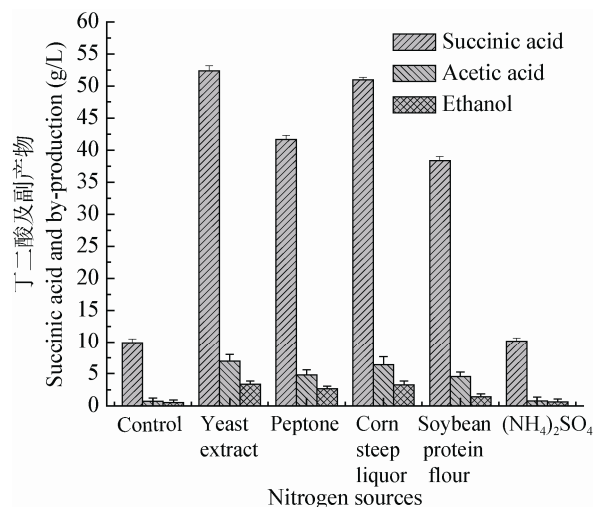


图 2 不同氮源对丁二酸发酵的影响

Figure 2 Effect of different nitrogen sources on the production of succinic acid

发酵的最适温度 37 °C、pH 值为 6.86,而糖化酶的最适温度 60 °C、pH 值为 4.2–4.5,而且发酵培养基中的  $Mn^{2+}$ 、 $Fe^{2+}$  等金属离子对糖化酶具有一定的抑制作用<sup>[16-17]</sup>,导致糖化酶在发酵条件下酶活较低、糖化能力下降。考察了添加不同量的糖化酶(1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 AGU/g 底物)对发酵的影响,结果如图 3 所示。

由图 3 可知,当糖化酶用量为 1.0–2.0 AGU/g 底物时,丁二酸浓度随着糖化酶量的增加而升高,而当糖化酶量为高于 2.0 AGU/g 底物时,丁二酸的产量会随糖化酶用量增加而降低。这说明木薯粉的糖化速率是影响丁二酸产量的重要因素。当糖化酶用量过低(低于 2.0 AGU/g 底物)时,木薯粉糖化速率低于菌体的耗糖速率,酵液的糖浓度不能满足菌体生长及代谢,丁二酸的生产速率对糖化速率的增加而增加;当糖化酶用量过高(高于 2.0 AGU/g 底物)时,木薯粉糖化速率高于菌体的耗糖速率,发酵液中的糖会随时间延长逐渐积累,产生底物抑制,从而影响丁二酸产量。因此,糖化酶最适用量为 2.0 AGU/g 底物,远高于木薯乙醇同步糖化发酵时糖化酶的添加量(1.21 AGU/g 底物),主要是因为乙醇发酵的 pH 值与糖化酶最适 pH (4.5)接近,而丁二酸发酵的 pH 值在中性(7.0)附近。

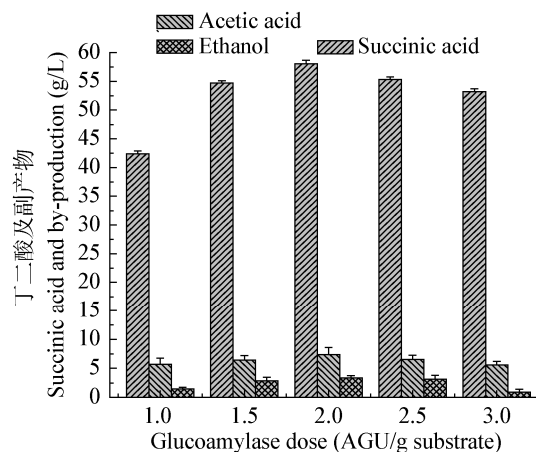


图 3 糖化酶用量对丁二酸发酵的影响

Figure 3 Effect of different glucoamylase dose on the production of succinic acid

2.4 木薯粉同步糖化发酵产丁二酸重要因素筛选

根据单因素试验和前期研究结果<sup>[12,15]</sup> , Plackett-Burman 试验选用实验次数 N-12 的设计, 对 9 个因素进行考察 ,并余留 2 个空项以估计实验误差。每个因素取 2 个水平, 以丁二酸浓度(g/L) 的平均值为响应值 Y, 每组实验设置平行 3 个。Plackett-Burman 实验设计因素及水平见表 1 ,实验设计矩阵见表 2 ,对表 2 进行统计分析, 结果见表 3。“Prob>F”小于 0.05 ,表明因素的影响是显著的。“Model Prob>F”等于 0.003 7 ,表明模型是显著的。

通过表 4 分析, 选择了“Prob>F”小于 0.05 的 4 个因素 X<sub>1</sub>、X<sub>2</sub>、X<sub>4</sub>、X<sub>6</sub> 即木薯粉、玉米浆、糖化酶和 MgCO<sub>3</sub> 浓度, 是影响丁二酸发酵的重要因素。

2.5 各因素正交试验

用正交试验设计对发酵影响较大 4 个因素 :木薯粉(A)、玉米浆(B)、糖化酶(C)、碳酸镁(D)进行优化, 选用 L<sub>16</sub>(4<sup>5</sup>)正交设计表进行试验设计 ,其中 (E)为空列, 作为试验误差以衡量试验准确性。试验因素水平设计如表 5 所示, 结果见表 6 ,方差分析结果见表 7。

表 1 Plackett-Burman 设计实验参数和水平 Table 1 Factors levels of Plackett-Burman design			
代码 Code	变量 Variables	水平(-1) Level (-1)	水平(+1) Level (+1)
X <sub>1</sub>	Cassava flour (g/L)	90.00	100.00
X <sub>2</sub>	Corn steep liquor (g/L)	11.50	12.50
X <sub>3</sub>	NaCl (g/L)	5.00	8.00
X <sub>4</sub>	Glucoamylase (AGU/g substrate)	1.80	2.20
X <sub>5</sub>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (g/L)	3.00	4.00
X <sub>6</sub>	MgCO <sub>3</sub> (g/L)	55.00	60.00
X <sub>7</sub>	MnCl <sub>2</sub> (g/L)	1.00	1.50
X <sub>8</sub>	CaCl <sub>2</sub> (g/L)	2.00	2.50
X <sub>9</sub>	MgCl <sub>2</sub> (g/L)	2.00	2.50

表 2 Plackett-Burman 试验设计表和结果 Table 2 Experimental design of Plackett-Burman and corresponding results										
序号 No.	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>	X <sub>9</sub>	丁二酸 Succinic acid (g/L)
1	1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	58.07±0.53
2	-1	1	-1	-1	1	1	1	-1	1	59.28±0.38
3	1	1	-1	1	-1	-1	-1	-1	1	61.38±0.63
4	1	1	1	-1	-1	1	-1	1	-1	61.69±0.38
5	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	1	1	58.66±0.41
6	-1	-1	1	1	-1	-1	1	1	1	57.55±0.40
7	1	-1	-1	1	-1	1	1	-1	-1	61.35±0.38
8	-1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	59.00±0.54
9	1	-1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	60.28±0.33
10	-1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	58.81±0.42
11	-1	1	-1	1	1	-1	-1	1	-1	60.34±0.57
12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	63.08±0.36

注：表中的数据为 3 组数据的平均值，以平均数±标准差表示(下同)。  
Note: Each value is an average of three parallel replicates and is represented as mean ± standard deviation (The same below).

表 3 单变量方差分析  
Table 3 Univariate analysis of variance

来源 Source	自由度 Degree of freedom	调整平方和 Sum of squares	调整均方 Mean square	F 值 F value	P 值 Prob>F
Model	9	26.75	6.69	11.13	0.003 7
Error	2	4.21	0.60		
Total error	11	30.96			

Note: Values of “Prob>F” less than 0.05 indicate model terms are significant. The model *F*-value of 11.13 implies the model is significant. There is only a 0.37% chance that a “Model *F*-value” this large could occur due to noise.

表 4 参数估计和各因素影响  
Table 4 Parameter estimation and effects of different factors

变量 Variables	自由度 Degree of freedom	相关系数 Coefficient estimate	标准误 Standard error	P 值 Prob>F	顺序 Order
Intercept	1	59.950	0.22	0.003 7	0
$X_1$	1	1.010	0.22	0.002 7	1**
$X_2$	1	0.840	0.22	0.007 0	2**
$X_3$	1	0.120	0.22	0.641 3	5
$X_4$	1	0.470	0.22	0.075 4	4*
$X_5$	1	0.014	0.22	0.973 7	9
$X_6$	1	0.530	0.22	0.050 8	3*
$X_7$	1	-0.240	0.22	0.310 5	6
$X_8$	1	-0.065	0.22	0.840 8	8
$X_9$	1	0.086	0.22	0.756 6	7

Note: Values of “Prob>F” less than 0.003 7 indicate model terms are significant. In this case  $X_1$ ,  $X_2$ ,  $X_4$ ,  $X_6$  are significant model terms. \*: Significant for a 90 confidence level; \*\*: Significant for a 95 confidence level.

表 5 正交实验因子与水平  
Table 5 The factors and levels of orthogonal experiment

水平 Levels	因素 Factors				
	木薯粉(A) Cassava flour (A) (g/L)	玉米浆(B) Corn steep liquor (B) (g/L)	糖化酶(C) Glucoamylase (C) (AGU/g substrate)	碳酸镁(D) MgCO <sub>3</sub> (D) (g/L)	空白(E) Blank (E)
1	80	12.0	2.0	60	0
2	90	13.0	2.5	70	0
3	100	14.0	3.0	75	0
4	110	15.0	3.5	80	0

表 6 正交试验结果  
Table 6 The results of orthogonal experiment

序号 No.	因素 Factors					丁二酸 Succinic acid (g/L)
	A	B	C	D	E	
1	1	2	3	3	2	48.44±0.24
2	2	4	1	2	2	61.16±0.16
3	3	4	3	4	3	59.16±0.37
4	4	2	1	1	3	61.04±0.28
5	1	3	1	4	4	48.32±0.14
6	2	1	3	1	4	57.28±0.25
7	3	1	1	3	1	57.96±0.18
8	4	3	3	2	1	67.32±0.31
9	1	1	4	2	3	44.60±0.19
10	2	3	2	3	3	67.88±0.26
11	3	3	4	1	2	65.76±0.33
12	4	1	2	4	2	56.76±0.26
13	1	4	2	1	1	48.12±0.30
14	2	2	4	4	1	60.28±0.18
15	3	2	2	2	4	65.36±0.25
16	4	4	4	3	4	56.08±0.34
$k_1$	47.37	54.15	57.12	58.05	58.42	
$k_2$	61.65	58.78	59.53	59.61	58.03	
$k_3$	62.06	62.32	58.05	57.59	58.17	
$k_4$	60.30	56.13	56.68	56.13	58.00	
$R$	14.79	8.17	2.85	3.48	0.42	

表 7 正交实验方差分析结果  
Table 7 Analysis of variance of orthogonal design of experiment

来源 Source	离差平方和 Sum of squared deviation	自由度 Degrees of freedom	均值方差 Mean variance	$F$ 检验 $F$ test	显著性 Significance
A	591.99	3	197.33	89.82	<0.01
B	149.98	3	49.99	22.76	<0.01
C	19.06	3	6.35	2.89	<0.05
D	24.65	3	8.21	3.74	<0.05
E	6.59	3	2.19	1.00	>0.05

极差分析与方差分析结果表明, A、B 因素达到极显著水平, C、D 因素达到显著水平, 各因素作用的主次顺序为  $A>B>D>C$ 。即木薯粉浓度>玉米浆添加量>碳酸镁添加量>糖化酶添加量。根据表 7 中数据分析, 选择混合原料高温高浓度发酵的最佳条件为  $A_3B_3C_2D_3$ , 即木薯粉浓度 100 g/L, 玉

米浆添加量 14 g/L, 糖化酶添加量为 2.5 AGU/g 底物, 碳酸镁添加量为 75 g/L。此组合在正交表中未出现, 在最优条件下进行验证试验, 实验结果(取 3 个平行的平均值)如下: 发酵 48 h, 丁二酸为 69.31 g/L, 乙酸 13.71 g/L, 乙醇 8.45 g/L, 丁二酸得率为 90.01%, 生产强度为 1.44 g/(L·h)。与初始条件

(52.34 g/L)相比, 丁二酸浓度提高了 32.42%。

## 2.6 同步糖化发酵(SSF)与先糖化后发酵(SHF)发酵罐对比试验

在最优条件进行 1.3 L 厌氧发酵罐发酵试验, 同时将 SHF 与 SSF 两种发酵模式进行比较, SSF 除糖化方式及加入糖化酶酶量不同外, 其他与 SSF 均相同, 发酵过程残糖、丁二酸及其主要副产物乙酸的浓度变化(数据取平均值)见图 4。

由图 4 可知, 木薯粉同步糖化发酵(SSF)产丁二酸过程中, 糖浓度维持在较低水平(不超过 40 g/L), 丁二酸的浓度增加较快, 表明糖化产生的葡萄糖很快被菌体利用并转化成丁二酸, 最终丁二酸浓度及转化率达到 72.21 g/L, 93.78%; 而先糖化后发酵(SHF)丁二酸的浓度及生产速率明显低于 SSF, 最终丁二酸浓度及转化率为 56.86 g/L, 73.84%。这是因为 SHF 产丁二酸过程中, 糖浓度较高(最高达 78 g/L), 而前期研究结果<sup>[15]</sup>表明: 当葡萄糖浓度 70 g/L 时, *Actinobacillus succinogenes* GXAS137 产丁二酸浓度达到最大。Urbance 等<sup>[18]</sup>研究也表明, 产琥珀酸放线杆菌可耐 160 g/L 的葡萄糖, 糖浓度为 65 g/L 时丁二酸浓度达到最高, 葡萄糖过高会对菌体代谢产生抑制。因此, 木薯粉 SHF 产丁二酸过程中, 过高的糖浓度影响了丁二酸的产量

及生产速率。此外, 与 SHF 相比, SSF 模式糖化和发酵在同一个反应器中进行, 省略了糖化工段, 节省了设备投资, 降低了能耗, 同时还减少了因蒸煮而造成的可发酵性糖的损失<sup>[19-20]</sup>。但因受到丁二酸发酵条件(温度、pH 值及金属离子等)的限制, 糖化酶的活性受到抑制, SSF 中加入的糖化酶量远高于 SHF (0.80 AGU/g 底物), 但综合考虑生产成本, 木薯粉产丁二酸过程中 SSF 模式远优于 SHF 模式。

## 3 讨论

目前丁二酸生产原料多集中在葡萄糖、糖蜜、大米及纤维素等原料<sup>[21-23]</sup>, 发酵所需氮源为价格昂贵酵母粉, 其添加成本占生产成本 5%左右, 若用进口酵的母粉可达 10%, 导致丁二酸生产成本偏高, 不适合丁二酸大规模生产。与葡萄糖原料(约 5 000 元/t)、酵母粉(约 6 200 元/t)作为氮源相比, 以木薯粉为原料(约 2 000 元/t)、玉米浆(约 2 800 元/t)作为氮源生产丁二酸, 每吨丁二酸可节约成本 500 元左右(以丁二酸 70 g/L、转化率为 90%计)。由此可见, 以玉米浆为氮源木薯粉同步糖化发酵生产丁二酸, 可大大降低生产成本, 为丁二酸工业化生产提供了新的非粮原料来源。

微生物发酵法是为丁二酸专业化学制品市场提供丁二酸的一种经济的方法。但是, 大量产品每公斤的价格必须从 0.55 美元下降至 0.45 美元才能打开丁二酸为基础的工业产品新市场<sup>[24]</sup>。丁二酸生产成本除上游发酵成本外, 下游处理成本约占生产成本的 60%–70%<sup>[25]</sup>, 因为丁二酸发酵过程中需要加入  $\text{MgCO}_3$  或碱类物质调控 pH 值, 发酵产物是丁二酸盐, 下游处理需要将丁二酸盐转化为游离的丁二酸, 在经过浓缩、结晶、纯化等一系列过程获得固体丁二酸产品。因此, 在简化丁二酸提取工艺及降低成本方面仍有大量工作要做, 这在一定程度上制约了丁二酸产业化发展。但是随着提取工艺不断改进, 并结合最近的新技术, 将丁二酸从发酵醪液中提取和纯化的成本逐渐降低, 使生物发酵制备丁二酸更具竞争性<sup>[26]</sup>。

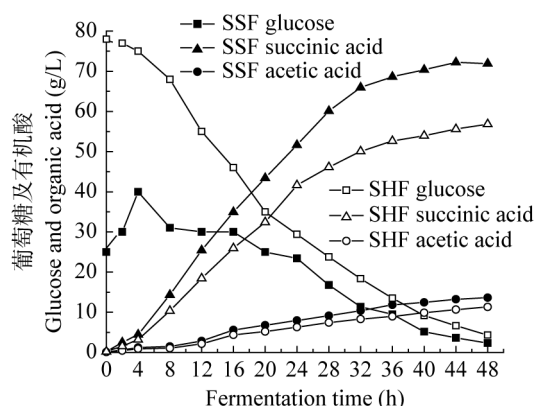


图 4 SSF 与 SHF 发酵罐对比试验结果

Figure 4 The fermentor results of simultaneous saccharification fermentation (SSF) and separated hydrolysis and fermentation (SHF)



随着丁二酸高产菌株选育、发酵与分离工艺及后处理工艺技术的提高及优化,丁二酸发酵生产的成本有望大幅度降低,发酵法将成为工业化生产丁二酸的主要方法,并且有望取代化学合成方法。

## 参考文献

- [1] Bechthold K, Bretz S, Kabasci R, et al. Succinic acid: A new platform chemical for biobased polymers from renewable resources[J]. Chemical Engineering and Technology, 2008, 31(5): 647-654.
- [2] Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 51(5): 545-552.
- [3] Dai D, Hu ZY, Pu GQ, et al. Energy efficiency and potentials of cassava fuel ethanol in Guangxi region of China[J]. Energy Conversion and Management, 2006, 47: 1686-1699.
- [4] Guettler MV, Jain MK, Rumler D. Method for making succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants: US patent 5573931[P]. 1996.
- [5] Guettler MV, Rumler D, Jain MK. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(1): 207-216.
- [6] McKinlay JB, Zeikus JG, Vieille C. Insights into *Actinobacillus succinogenes* fermentative metabolism in a chemically defined growth medium[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2005, 71(11): 6651-6656.
- [7] Borges ER, Pereira N Jr. Succinic acid production from sugarcane bagasse hemicellulose hydrolysate by *Actinobacillus succinogenes*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(8): 1001-1011.
- [8] Zhu LW, Wang CC, Liu RS, et al. *Actinobacillus succinogenes* ATCC 55618 fermentation medium optimization for the production of succinic acid by response surface methodology[J]. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012. DOI: 10.1155/2012/626137.
- [9] 张敏, 马江峰, 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, 232(7): 29-32.
- [10] Aghaie E, Pazouki M, Hosseini MR, et al. Response surface methodology (RSM) analysis of organic acid production for Kaolin beneficiation by *Aspergillus niger*[J]. Chemical Engineering Journal, 2009, 147(2/3): 245-251.
- [11] 黄宇彤, 伍松陵, 杜连祥. 玉米酒精超高浓度发酵工艺条件的优化[J]. 食品工业科技, 2002, 23(8): 66-69.
- [12] 申乃坤, 秦艳, 黄日波, 等. 一株丁二酸高产菌株的筛选鉴定及初步发酵研究[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(10): 57-62.
- [13] Olsen HS, Pedersen S, Festersen RM. Alcohol product processes: US patent 20090017511[P]. 2009.
- [14] 申乃坤, 秦艳, 王青艳, 等. 响应面优化产琥珀酸放线杆菌生产丁二酸[J]. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1473-1483.
- [15] Liu YP, Zheng P, Sun ZH, et al. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes*[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(6): 1736-1742.
- [16] 李卫芬, 许梓荣, 孙建义, 等. 金属离子对糖化酶活性的影响[J]. 浙江农业大学学报, 1999, 25(3): 296-298.
- [17] Sergio B, Mauricio T, Maris L, et al. Comparative kinetic effects of Mn (II), Mg (II) and the ATP/ADP ratio on phosphoenolpyruvate carboxykinases from *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Protein Journal, 2007, 26(4): 265-269.
- [18] Urbance SE, Pometto AL 3rd, Dispirito AA, et al. Evaluation of succinic acid continuous and repeat-batch biofilm fermentation by *Actinobacillus succinogenes* using plastic composite support bioreactors[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2004, 65(6): 664-670.
- [19] Zhao J, Xia LM. Simultaneous saccharification and fermentation of alkaline pretreated corn stover to ethanol using a recombinant yeast strain[J]. Fuel Process Technology, 2009, 90(10): 1193-1197.
- [20] Qureshi N, Saha BC, Hector RE, et al. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using *Clostridium beijerinckii*: Part I-Batch fermentation[J]. Biomass Bioenergy, 2008, 32(2): 168-175.
- [21] Chen KQ, Zhang H, Mao YL. Simultaneous saccharification and fermentation of acid-pretreated rapeseed meal for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2011, 48(4): 339-344.
- [22] Xi YL, Dai WY, Xu R, et al. Ultrasonic pretreatment and acid hydrolysis of sugarcane bagasse for succinic acid production using *Actinobacillus succinogenes*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36(11): 1779-1785.
- [23] Du C, Lin SK, Koutinas A, et al. A wheat biorefining strategy based on solid-state fermentation for fermentative production of succinic acid[J]. Bioresource Technology, 2008, 99(17): 8310-8315.
- [24] Baniel AM, Eyal AM. Citric acid extraction: US patent 5426220[P]. 1995.
- [25] 詹晓北, 朱一晖, Wang DH. 琥珀酸发酵工艺及其产品市场[J]. 食品科技, 2003(2): 44-49.
- [26] 武敏敏, 刘宏娟, 张建安, 等. 发酵法生产丁二酸的研究进展及其应用前景[J]. 现代化工, 2008, 28(11): 33-37.