文章编号:1673-1689(2008)05-0078-05

菊芋原料同步糖化发酵生产丁二酸

董晋军[1,2]， 郑 璞[1,2]， 倪 晔[1,2]， 孙志浩*[1,2]
(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122；2. 江南大学 生物工程学院，江苏 无锡 214122)

摘 要：对菊芋原料发酵生产丁二酸进行了研究，用 *Actinobacillus succinogenes* 和 *Aspergillus niger* 同步糖化发酵，发现同步糖化发酵效果优于糖化后再发酵，在同步糖化发酵过程中还原糖质量浓度始终保持在 10～40 g/L，可以避免高浓度的还原糖对 *A. succinogenes* 的抑制。5 L 搅拌罐中同步糖化补料分批发酵 96 h 产丁二酸 98.2 g/L，对消耗糖产率 95.4%，生产强度 1.02 g/(L·h)。

关键词：丁二酸；菊芋；同步糖化发酵；*Actinobacillus succinogenes*；*Aspergillus niger*
中图分类号：TQ 920. 1 **文献标识码**：A

Production of Succinic Acid by Simultaneous Saccharification and Fermentation from *Jerusalem artichoke*

DONG Jin-jun[1,2], ZHENG Pu[1,2], NI Ye[1,2], SUN Zhi-hao*[1,2]
(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In the present work, the succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes* with simultaneous saccharification of sterilized jerusalem artichoke powder by *Aspergillus niger* was found to be superior to separate hydrolysis and fermentation (SHF). During the fermentation process, the reducing sugar concentration was maintained at a low level (10 g/L～40 g/L). The inhibitory effect of high initial reducing sugar concentration on the succinic acid fermentation could be eliminated. When fed batch SSF was carried out in a 5-L stirred bioreactor for 96 h, succinic acid concentration of 98.2 g/L, productivity of 1.02 g/(L·h), and yield of 95.4% were obtained.

Key words: succinic acid; *Jerusalem artichoke*; simultaneous saccharification and fermentation (SSF); *Actinobacillus succinogenes*; *Aspergillus niger*

收稿日期:2008-07-05.
基金项目:国家 863 计划项目(2006AA02Z235);长江学者和创新团队发展计划资助项目(IRT0532)
作者简介：董晋军(1981-)，男，山西长治人，工学硕士.
*通讯作者:孙志浩(1941-)，男，江苏无锡人，教授，博士生导师，主要从事发酵工程与生物催化研究. Email: sunw@public1. wx. js. cn.

万方数据

丁二酸，又名琥珀酸，是一种常见的天然有机酸。商品化的丁二酸主要是以液化石油气（LPG）或石油为原料用化学的方法合成的[1,2]。随着石油资源的日益枯竭以及温室效应日趋严重，发酵法生产丁二酸越来越受到人们的重视，近年来已成为全球研究热点[2]。

同步糖化发酵（Simultaneous saccharification and fermentation，SSF）被认为是利用可再生的多糖生物质原料（菊糖、淀粉和纤维素等）微生物法生产高附加值产品的一种有效方法[3]，由于同步糖化发酵具有节约能源，减少设备投入，避免产物或底物抑制，减少发酵时间等诸多优点，已被广泛应用于酒精[4-7]、乳酸[3,8,9]、丁醇[10,11]等产品的生产。

菊芋（Jerusalem artichoke），俗名洋姜、鬼子姜，菊科，多年生草本植物。主根上长出匍匐茎，其顶部膨大成块茎，形似马铃薯。适应性强，能在广泛的气候土壤条件下生长。可利用沙漠、盐碱地、山丘等边际土地或宅旁、地边零星土地种植。菊芋块根成分中除水分外，含大量菊糖（其结构为 β-1,2 键连接的末端为一个蔗糖基的多聚果糖[12]，聚合度为 32～34 的多糖），是工业中一种较廉价的非粮原料。

作者用菊芋块根打浆滤渣后的多糖糖浆进行同步糖化发酵生产丁二酸。

1　材料与方法

1.1　试剂及材料

菊芋：江西省赣南祖有种养场产品；干物质质量分数 23.6%，菊糖质量分数 16.8%。$MgCO_3$（工业级）：浙江鑫富公司产品；玉米浆：河北康欣公司产品，酵母膏（分析纯）、磷酸盐（分析纯）：上海国药公司产品，CO_2 气体：无锡市新南气体有限公司产品；其余试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.2　主要仪器

5 L 搅拌式发酵罐：BIOFLO 110，美国 New Brunswick Scientific 公司产品；高速组织捣碎机：DS-1，上海标本模型厂产品；多用途冷冻离心机：Thermo IEC 产品；752 紫外可见光分光光度计：上海精密科学仪器有限公司产品；灭菌锅：YXQ-LS，上海博讯实业有限公司产品；超净工作台：SW-CJ，苏州净化设备有限公司产品；隔水式电热恒温培养箱：PYX-DHS，上海跃进医疗器械厂产品；数显控温水浴锅：HH-4，常州金坛荣华仪器厂产品；电子天平：瑞士 Mettler 公司产品；高效液相色谱仪：美国 Waters 公司产品；RI 检测器：美国 Waters 公司产品；双波长紫外可见光检测器：美国 Waters 公司产品；Aminex HPX-87H 离子色谱柱：300 mm × 7.8 mm，9 μm，美国 BioRad 产品。

1.3　菌种

A. succinogenes SF-9 和 F3-10：作者所在实验室选育和保藏[13]；*Asp. niger* SL-09：江南大学生物工程学院张伟国教授惠赠。

1.4　菊芋糖浆制备与丁二酸发酵

菊粉酶制备方法与培养基见文献[14]，菊芋糖浆制备方法见文献[15]，丁二酸发酵方法与培养基见文献[16]。同步糖化（水解）发酵方法在 5 L 的搅拌发酵罐中进行，装液量 3.5 L，同步糖化（水解）发酵在发酵培养基灭菌后，培养基温度降低到 60℃时将制备的菊粉酶（*Asp. niger* SL-09 培养液）按菊粉酶 40 U/g 总糖加入量接入发酵罐，60℃保温 10 min 后将温度降为 37℃，接入琥珀酸放线杆菌 *A. succinogenes*，接种量 5%，发酵温度 37 ℃，采用 $MgCO_3$ 调节 pH 值，搅拌转速 200 r/min，通气为 100% CO_2，通气量 0.1 $m^3/(m^3 \cdot min)$。

补料分批发酵时控制发酵液中的菊芋糖质量浓度为 15～40 g/L，用蠕动泵以一定速度流加总糖质量浓度为 200 g/L 的菊芋水解糖溶液或菊芋浆。

1.5　分析方法

1.5.1　有机酸的测定　采用离子排斥 HPLC 法分析葡萄糖及丁二酸，乙酸和甲酸等发酵产物。美国 Waters 高效液相色谱仪，Waters 2414 RI 检测器，Breeze 色谱工作站；Aminex HPX-87H 离子色谱柱（300 mm×7.8 mm，9 μm；美国 Bio-Rad）；流动相 10 mmol/L 硫酸；柱温 55 ℃；体积流量 0.5 mL/min；进样量 10 μL。

1.5.2　糖的测定　葡萄糖、果糖等糖类含量的测定采用 Zobax NH_2 氨基柱（250 mm × 4.6 mm，5μm；Agilent，USA），流动相：体积分数 75% 乙腈；体积流量 1 mL/min，进样量 10 μL。总糖测定采用 DNS 法[17]，测定时选用果糖为标准物。取 1 mL 培养液离心上清液，用 1 mol/L 的 H_2SO_4 溶液调 pH 1.0，煮沸 30 min，用 1 mol/L 的 NaOH 调 pH 7.0，再用蒸馏水定容稀释到合适的浓度。取 1 mL 酸化处理后的样品，加入 3 mL DNS 试剂，煮沸 10 min，自然冷却，定容到 25 mL，测定 550 nm 处的吸光度，再根据标准曲线计算出菊芋总糖的质量浓度。

丁二酸的产率（yield）定义为每消耗 1 g 总糖所能产生的丁二酸克数。糖利用率定义为消耗糖占投入糖的质量分数（对于菊芋糖，糖以总糖表示）。

万方数据

2 结果与讨论

2.1 不同初始还原糖质量浓度对发酵菊芋糖浆产酸的影响

用菊粉酶水解的菊芋鲜块茎水解糖浆进行丁二酸发酵，初始总还原糖质量浓度分别为30、45、55、65、80 g/L时，$MgCO_3$的加入量为初始总还原糖质量浓度的80%，结果见表1。

表1 不同初始还原糖质量浓度的发酵菊芋糖浆产酸结果*

Tab. 1 Effect of initial sugar on fermentation by *A. succinogenes* SF-9 from jerusalem artichoke

质量浓度/(g/L)				丁二酸产率/%	糖利用率/%
初始总还原糖	残还原糖	丁二酸	乙酸等杂酸		
30	0.22	19.13	9.56	64.2	99.3
45	2.50	32.32	7.53	76.0	94.4
55	5.21	40.08	8.52	80.5	90.5
65	6.20	46.54	11.75	79.1	90.5
80	18.08	46.61	12.42	75.3	77.4

*培养在150 mL的厌氧瓶中进行，培养时间48 h，每个实验做3个平行样。

由表1可以看出，以初始还原糖质量浓度为65～80 g/L时丁二酸的产量为最高，达到46.54～46.61 g/L，初始还原糖质量浓度为65 g/L时，丁二酸对消耗糖产率79.1%，糖利用率90.5%。说明过高的还原糖对产酸有抑制作用。

2.2 酶水解菊芋菊芋糖浆发酵生产丁二酸

2.2.1 酶水解菊芋糖浆分批发酵生产丁二酸 使用菊粉酶水解的菊芋鲜块根水解糖浆，在5 L搅拌发酵罐中进行分批发酵。接种量为体积分数5%，发酵温度37℃，搅拌转速200 r/min，通气为100% CO_2，通气量0.1 $m^3/(m^3 \cdot min)$，结果如图1所示。

5 L搅拌罐分批发酵，48 h总投入菊粉酶水解菊芋鲜块茎糖浆按最终体积计还原糖质量浓度为55.38 g/L，发酵剩余还原糖质量浓度为3.32 g/L，产丁二酸40.52 g/L，对消耗糖产率77.8%，糖利用率94.0%，生产强度0.84 g/(L·h)。

2.2.2 酶水解菊芋糖浆补料分批发酵生产丁二酸 使用菊粉酶水解的菊芋鲜块根水解糖浆，在5 L搅拌罐中进行补料分批发酵，初始还原糖质量浓度为55 g/L，当发酵液残糖降为30 g/L时，用蠕动泵以一定速度流加总还原糖质量浓度为200 g/L的菊芋酶水解糖浆溶液，将发酵液中的糖质量浓度控制在10～30 g/L。实验结果如图2所示。

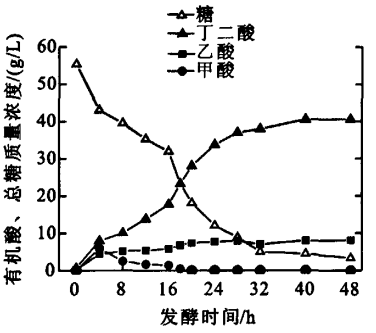


图1 菊粉酶水解菊芋鲜块根糖浆分批发酵生产丁二酸结果(5 L的搅拌罐)

Fig. 1 Time courses of batch fermentation from jerusalem artichoke hydrolysate by Asp. niger SL-09 in a 5 L stirred bioreactor

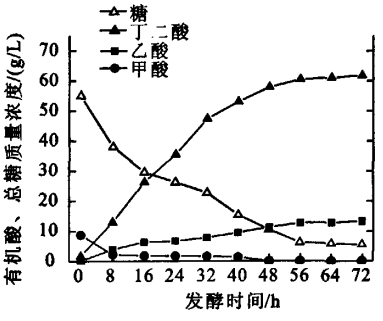


图2 酶水解菊芋鲜块茎糖浆补料分批发酵生产丁二酸结果

Fig. 2 Time courses of succinic acid production in fed batch fermentation from jerusalem artichoke hydrolysate by *Asp. niger* SL-09 hydrolysis in a 5 L stirred bioreactor

5 L的搅拌罐补料分批发酵，72 h总投入菊芋水解糖浆按最终体积计还原糖质量浓度为84.0 g/L，发酵剩余还原糖质量浓度为5.54 g/L，产丁二酸61.81 g/L，对消耗糖产率78.8%，糖利用率93.4%，生产强度0.86 g/(L·h)。通过补料分批发酵方式，有效地控制培养液中的还原糖浓度，可使投入的总糖量增加，即能在一定程度上提高发酵产酸浓度，但产率、糖利用率与生产强度没有改善。

2.3 菊芋原料同步糖化发酵生产丁二酸

2.3.1 菊芋原料分批同步糖化发酵生产丁二酸 用菊芋鲜块茎经打浆机打浆滤去纤维渣后的浆液，以其含总糖量(果糖计)计算配制培养液，在5 L的搅拌罐中，经消毒灭菌、冷却至40℃后，加入发酵制备的菊粉酶40 U/g总糖，再按体积分数5%接种量接入丁二酸发酵用种子液，进行同步糖化发酵，初始总糖质量浓度为64.9 g/L，发酵温度37 ℃，搅拌转速200 r/min，通气为100% CO_2，通气量0.1 m^3/

万方数据

(m^3 · min)，实验结果如图 3 所示。

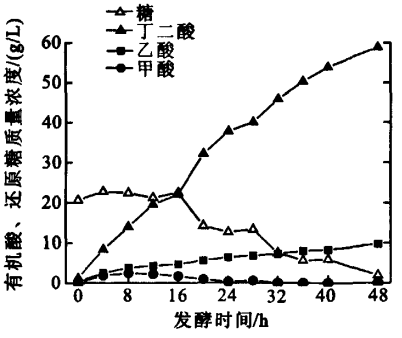


图 3　菊芋原料同步糖化发酵生产丁二酸结果(5 L 的搅拌罐)

Fig. 3　Time courses of succinic acid production in SSF from jerusalem artichoke by *Asp. niger* SL-09 and *A. succinogenes* SF-9 in a 5 L stirred bioreactor

由图 3 可见，5 L 的搅拌罐菊芋原料同步糖化发酵 48 h，一次性投入总糖 64.9 g/L，残余总糖 1.9 g/L，产丁二酸 58.93 g/L，对消耗糖产率 93.6%，糖利用率 97.0%，生产强度 1.23 g/(L · h)。由此可见，菊芋原料同步糖化发酵与菊芋原料先糖化后再发酵的方法相比，发酵各项指标水平都有显著提高，说明采用边糖化边发酵方法可以减少培养液中还原糖的质量浓度，避免因还原糖浓度过高而造成的对菌种发酵的抑制作用。

2.3.2　*菊芋原料同步糖化的补料分批发酵生产丁二酸*　打浆滤渣后的菊芋浆在 5 L 的搅拌罐中进行加酶同步糖化的补料分批发酵，初始总糖质量浓度为 40 g/L，当发酵液残还原糖降为 30 g/L 以下时，用蠕动泵以一定速度流加总糖质量浓度为 200 g/L 的菊芋浆液，使发酵液中的还原糖质量浓度控制在 10～30 g/L，实验结果如图 4 所示。

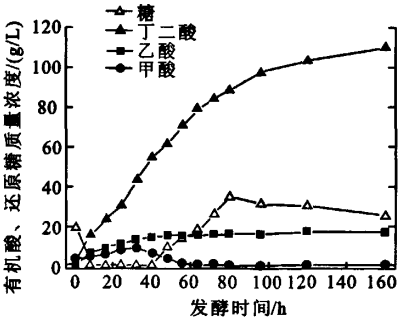


图 4　菊芋浆分批补料同步糖化发酵生产丁二酸结果(5 L 的搅拌罐)

Fig. 4　Time courses of succinic acid production in fed batch SSF from jerusalem artichoke by *Asp. niger* SL-09 and *A. succinogenes* F3-10 in a 5 L stirred bioreactor

5 L 的搅拌罐补料分批同步糖化发酵，96 h 产丁二酸 98.2 g/L(继续延长时间至 120 h 可以达到处 04.2 g/L，至 160 h 可以达到 110.9 g/L，总投入菊芋糖浆按最终体积计还原糖质量浓度为 134.4 g/L，发酵剩余总糖质量浓度为 31.5 g/L，对消耗糖产率 95.4%，糖利用率 76.6%，生产强度 1.02 g/(L · h)。

通过同步糖化发酵又补料分批发酵方式，发酵水平有更大提高，大幅度提高了发酵产酸浓度，产率与生产强度也有改善。这主要也是由于边糖化边发酵的方法降低了培养液中还原糖的浓度。但糖利用率下降，这是由于过高地追求产酸浓度而忽视了残余糖的充分利用，可以根据菌体生长和代谢情况进行补料(包括补菊粉酶)来有效控制发酵液中的残总糖。

2.4　同步糖化和分别糖化发酵生产丁二酸比较

将同步糖化和分别糖化发酵生产丁二酸的有关数据比较见表 2。

表 2　菊芋为原料同步糖化和分别糖化发酵生产丁二酸比较

Tab. 2　Comparison of SSF and SHF in succinic acid production from jerusalem artichoke

发酵方式	投入糖质量浓度/(g/L)	发酵时间/h	丁二酸质量浓度/(g/L)	杂酸质量浓度/(g/L)	丁二酸/杂酸质量浓度/(g/L)	丁二酸生产强度/[g/(L · h)](48 h*)	残糖质量浓度/(g/L)	糖利用率/%	丁二酸产率/%
分批发酵(酶解糖)	55.4	48	40.5	3.32	5.01	0.84	3.32	94.0	77.8
补料分批发酵(酶解糖)	84.0	48	61.8	13.3	4.64	1.29	5.54	93.4	78.8
同步糖化(分批发酵)	64.9	72	58.9	9.78	6.02	0.82 (1.23)	1.92	97.0	93.5
同步糖化补料(分批发酵)	134.4	96	98.2	16.02	6.13	1.02 (1.29)	31.5	76.6	95.4

* 指 48 h 时的丁二酸生产强度

万方数据

由表可见：从丁二酸产量来看，同步糖化发酵方式优于先糖化后发酵方式，补料分批发酵优于分批发酵；从杂酸含量来看，同步糖化发酵方式较先糖化后发酵方式杂酸相对丁二酸含量少；将同步糖化方式和补料分批发酵方式组合后效果最优。

3 结 语

菊芋原料同步糖化分批发酵 48 h，产丁二酸 58.93 g/L，较分别糖化分批发酵提高 34.5%。生产强度 1.23 g/(L·h)，丁二酸/杂酸值为 6.02；菊芋原料同步糖化补料分批发酵 96 h，产丁二酸 98.2 g/L，生产强度 1.02 g/(L·h)，丁二酸与杂酸质量浓度比值为 6.13。

菊芋原料同步糖化发酵又补料分批发酵方式，大幅度提高了发酵产丁二酸浓度，产率与生产强度也有改善，但糖利用率下降，需要进一步研究进行补料和补菊粉酶，控制菌体生长和代谢情况，控制发酵液中的残总糖。

同步糖化发酵不仅节约了糖化设备以及糖化过程中能源消耗，而且有助于提高生产效率，说明同步糖化发酵是发酵法生产丁二酸中较有前景的一种发酵方式。

参考文献(References)：

[1]Zeikus J G, Jain M K, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 1999, 51: 545－552.

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

[3]Sreenath H K, Moldes A B, Koegel R G, et al. Lactic acid production by simultaneous saccharifkation and fermentation of alfalfa fiber[J]. **J Biosci Bioeng**, 2001, 92: 518－523.

[4]Rudolf A, Alkasrawi M, Zacchi G, et al. A comparison between batch and fed－batch simultaneous saccharification and fermentation of steam pretreated spruce[J]. **Enzyme Microb Technol**, 2005, 37: 195－204.

[5]Ohgren K, Burab R, Lesnickic G, et al. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam－pretreated corn stover[J]. **Process Biochem**, 2007, 42: 834－839.

[6]Itoh H, Wada M, Honda Y, et al. Bioorganosolve pretreatments for simultaneous saccharification and fermentation of beech wood by ethanolysis and white rot fungi[J]. **J Biotechnol**, 2003, 103: 273－280.

[7]Ballesteros M, Oliva J M, Negro M J, et al. Ethanol from lignocellulosic materials by a simultaneous saccharification and fermentation process (SFS) with Kluyveromyces marxianus CECT 10875[J]. **Process Biochem**, 2004, 39: 1843－1848.

[8]Anuradha R, Suresh A K, Venkatesh K V. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid[J]. **Process Biochem**, 1999, 35: 367－375.

[9]Huang L P, Jin B, Lant P, et al. Simultaneous saccharification and fermentation of potato starch wastewater to lactic acid by *Rhizopus oryzae* and *Rhizopus arrhizus*[J]. **Biochem Eng J**, 2005, 23: 265－276.

[10]Qureshi N, Saha B C, Hector R E, 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.

[11]Qureshi N, Saha B C, Cotta M A. Butanol production from wheat straw by simultaneous saccharification and fermentation using Clostridium beijerinckii: Part II-Fed-batch fermentation[J]. **Biomass Bioenergy**, 2008, 32(2): 176－183.

[12]Vandamme E J, Derycke D J. Microbial inulinase: Fermentation process, properties, and application[J]. **Adv Appl Microbiol**, 1983, 29: 139－176.

[13]刘宇鹏，郑璞，倪晔，等. *Actinobacillus succinogenes* 抗氟乙酸突变株的选育及其代谢流量分析[J]. 生物工程学报. 2008, 24(3):460－467.
LIU Yu-peng, ZHENG Pu, NI Yie, et al. Breeding of monofluoroacetate-resistant strains of *Actinobacillus succinogenes* and the mechanism based on metabolic flux analysis[J]. **Chin J Biotech**, 2008, 24(3): 460－467. (in Chinese).

[14]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 Wei, DONG Jin-jun, ZHENG Pu, et al. Procution of succinic acid using enzymatic Jerusalem artichoke by inulinase from *Aspergillus niger*[J]. **Industrial Microbiology**, 2008, 38(3): 1－5. (in Chinese)

[15]过鑫富，孙志浩. 利用菊芋原料发酵生产丁二酸的方法：中国，9686.9[P]. 2007-10-01.

[16]Liu Y P, Zheng P, Sun Z H, et al. Economical succinic acid production from cane molasses by *Actinobacillus succinogenes* [J]. **Bioresource Technology**, 2008, 99: 1736－1742.

[17]Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid regent for determination of reducing sugar[J]. **Anal Chem**, 1959, 31: 426－428.

(责任编辑：朱明)

万方数据