

# 琥珀酸发酵生产工艺及其产品市场

詹晓北<sup>1</sup> 朱一晖<sup>1</sup> Donghai Wang<sup>2</sup>

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡·214036;

2. Department of Biological and Agricultural Engineering, Kansas State University, Manhattan, KS 66506)

**摘要:** 发酵法生产的琥珀酸在食品、医药、表面活性剂、洗涤剂、绿色溶剂、生物可降解塑料和动植物生长刺激物等领域有广泛的应用前景,其衍生物的化学制品市场潜力每年超过  $2.7 \times 10^8$  kg。瘤胃微生物 *Actinobacillus succinogenes* 以葡萄糖为底物发酵生产琥珀酸盐的产率可达 110g/L。发酵生产工艺的改进,特别是产物提取技术的进步大大降低了生产的成本,使得发酵法生产琥珀酸在经济效益上极具吸引力。

**关键词:** 琥珀酸; 发酵; 工艺

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1005-9989(2003)02-0044-06

## Succinic acid production and potential market

ZHAN Xiao-bei<sup>1</sup> ZHU Yi-hui<sup>1</sup> Donghai Wang<sup>2</sup>

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze

University, Wuxi, 214036; 2. Department of Biological and Agricultural Engineering, Kansas State University, Manhattan, KS 66506)

**Abstract:** Succinic acid, produced from agricultural carbohydrates by fermentation, has a huge market for producing food and pharmaceutical products, surfactants and detergents, green solvents and biodegradable plastics, and ingredients of animal feeds to stimulate animal and plant growth. Succinic acid-derived products have a market potential to supply over  $2.7 \times 10^8$  kg industrial products per year. Current research showed that succinic yields can be reached as high as 110g/L from glucose by the newly discovered rumen organism *Actinobacillus succinogenes*. The cost of succinic acid production has been reduced significantly by using new fermentation methods and advanced separation technology for end-product recovery. The low processing cost makes succinic acid and succinic-acid-based chemicals economically attractive.

**Key words:** succinic acid; fermentation; technology

### 1 琥珀酸的用途和市场

琥珀酸是一种二羧酸,是三羧酸循环的中间产物,同时也是厌氧代谢的发酵产物之一(Gottschalk 1986),很多微生物生产琥珀酸盐做为它们能量代谢的主要终产物。琥珀酸已被美国FDA认定为GRAS(一般认为安全),这使得它可以用于多种用途。

当前,工业级琥珀酸的销售量超过1.5万t,大体上是通过石化法,从丁烷通过顺式丁烯二酐生产。目前,只有食品市场的琥珀酸是发酵法生产的。新的发酵工艺能使琥珀酸的销售价格降为2.20美元/kg(年产5000t),当年产量为7.5万t时,其销售价格将低于0.55美元/kg,这种价格可使琥珀酸打开新的商品化化学制品市场(J. G. Zeikus, 1999)。美国能源部现已投入700

万美元用于琥珀酸发酵法生产工业化的研究,目前已完成中试,将于近期投入生产。

琥珀酸存在四种主要的市场:最大的市场是作为表面活性剂、清洁剂添加剂和起泡剂;第二个市场是作为离子螯合剂,用于在电镀行业防止金属的溶蚀和点蚀;第三个市场是在食品行业中作为酸化剂、pH改良剂、风味物质和抗菌剂;第四个市场是和健康有关的产品,包括医药、抗生素、氨基酸和维生素的生产。琥珀酸的这四个市场总量每年超过四亿美元(J. G. Zeikus, 1999)。

发酵法生产的琥珀酸有潜力为大量生产化学制品提供可能,它可以作为很多重要的中间产物和专业化学制品。作为一种商品化的化学制品,它可以取代很多基于苯和石化中间产物的商品,这可减少在超过250种苯基化学制品的生产和消费过程中所产生的污染(Ahmed and Morris,

1994)。图1是以琥珀酸为基础的化学制品和专业化学制品的路线图。琥珀酸和它的大多数衍生物的生产目前还处在进一步研究和发展阶段。由于琥珀酸的结构是饱和的二羧酸,可以转化为1,4-丁二醇、四氢呋喃、 $\gamma$ -丁内酯和其它四碳的化学制品,在世界范围内的市场超过 $2.76 \times 10^8 \text{kg/年}$ 。在

将琥珀酸转化成这些中间化学制品的化学催化技术方面也已经取得了重要的发展。例如,琥珀酸可以容易地氢化成1,4-丁二醇,然后还可以进一步羰基化成己二酸(Sado and Tajima, 1980; Dake et al., 1987; Jain et al. 1989)。

以下是一些目前正处于研究阶段或开发阶段

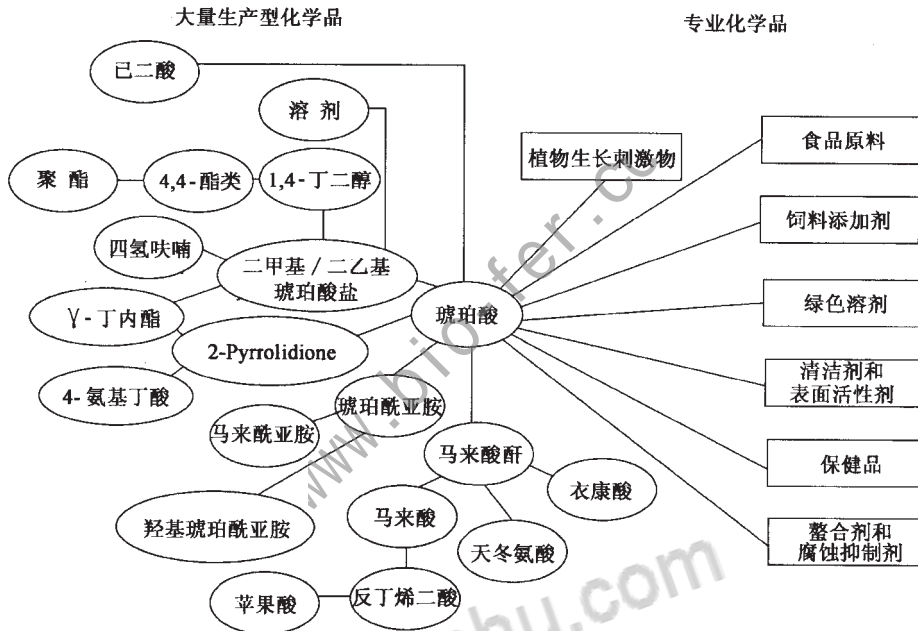


图1 以琥珀酸为基础的化学制品

的以琥珀酸为基础的中间化学制品(J. G. Zeikus, 1999)：

(1)N-甲基吡咯烷酮：N-甲基吡咯烷酮已被推荐替代二氯甲烷作为一种溶剂,由于它比二氯甲烷的挥发性小得多,因此它能回收使用而不会将有毒物质排放到大气中。二氯甲烷市场是每年百万t；

(2)1,4-丁二醇：1,4-丁二醇是聚丁烯对苯二酸树脂,是汽车工业和机电零件的主要工业溶剂和原材料。作为“比钢还硬”的工程塑料,其市场增长很快；

(3) $\gamma$ -丁内酯：它是一种化学中间产物,以及脱漆剂和纺织品的组成成分。它是丙酮酸盐衍生物的原材料；

(4)己二酸：做为尼龙的前体物质,己二酸是润滑剂、泡沫体和食品制造的原材料；

(5)四氢呋喃：四氢呋喃是一种溶剂,及粘剂、打印墨水和磁带的成分；

(6)线性脂肪族酯：它们是用于制造树脂、塑料和其它工业、消费最终新产品的重要化合物。

琥珀酸盐还可以用做反刍动物和单胃动物如猪的饲料添加剂。琥珀酸盐可以增加瘤胃中丙酸盐的产生,还可作为肝糖物质和蛋白质合成的前体物

质。此外,琥珀酸可作为小猪和其它单胃动物的缓冲物和能量来源,从而为碳水化合物发酵生产的粗琥珀酸盐可找到一个新市场,即作为动物营养的特殊功能产品以减小抗生素的使用(Bergen and Bates, 1997)。琥珀酸还可以作为植物的助长剂(Kinnersley et al., 1997)。

琥珀酸在专业化学制品和材料上的新用途正在迅速增长。琥珀酸钠是一种风味增强剂,它能代替味精。同时琥珀酸二赖氨酸也是低钠食品的咸味增强剂(Turk, 1993)。琥珀酸可作为绿色化学制品和材料的中间物质,例如,二乙基琥珀酸是清洁金属表面或油漆剥落的有效溶剂,二琥珀酸乙二胺是EDTA的替代品(Zwicker et al., 1997)。新型生物可降解塑料是一种酯,它包含琥珀酸和1,4-丁二醇。琥珀酸的其它潜在用途包括：(1)赖氨酸残基的琥珀酸酰化能提高食品中大豆蛋白的物理和功能属性；(2)生产改性的琥珀酸酰亚胺用于燃料的组成成分和水的净化(Wollenberg and Frank, 1998)；(3)用于纤维素的琥珀酸酰化以提高水的吸收性；(4)琥珀酸酰化淀粉作为增稠剂(Diamantoglou and Meyer, 1988)。

## 2 琥珀酸发酵法生产工艺

当前,大部分的琥珀酸是通过化学法生产的。但是,在化学工业中,由于需要降低由石化方法产生的污染,绿色技术越来越成为一种趋势,因此需要研究一种即可利用再生资源又无污染的生产方法。

琥珀酸发酵的工业潜能早在 1980 年就被认识到了(Zeikus, 1980),近年来发酵法生产琥珀酸已成为有机酸发酵研究的热门课题,它为已存在的琥珀酸化学制品市场提供一种经济的琥珀酸来源。利用微生物菌种,以农业产物玉米、木薯等为基本原料,不仅可以得到安全的食品医药级产品,同时还能农产品的深加工及转化为高附加值产品提供一条可行的途径(Jain et al, 1989; Zeikus et al, 1995)。

### 2.1 菌种

琥珀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,例如,琥珀酸盐通过丙酸盐生产菌例如 *Propionibacterium* 种,典型的胃肠细菌例如 *Escherichia coli*, *Pectinatus* sp., *Bacteroides* sp. 和瘤胃细菌例如 *Puminooccus flavefaciens*, *Actinobacillus succinogenes*, *Bacteroides amylophilus*, *Prevotella ruminicola*, *Succinimonas amylolytica*, *Succinivibrio dextrinisolvans*, *Wolinella succinogenes*, *Cytophaga succinicans* 从糖和氨基酸发酵生成的(Bryant and Small, 1956; Bryant et al., 1958; Scheifinger and Wolin, 1973; Davis et al., 1976; Van der Werf et al., 1997; Guettler et al., 1999)。据报道一些 *Lactobacillus* 在特定的培养基上也可不同程度地产生琥珀酸(Kaneuchi et al., 1988)。

大部分的琥珀酸盐生产菌都是从瘤胃中分离出来的,因为在整个生态系统中,琥珀酸盐作为丙酸盐的一种重要的前体物质,它可被瘤胃壁吸收,进一步氧化用于为动物提供能量和生物合成前体物质。动物可食用草料(如干草)和谷物(如玉米),因此有大量不同的瘤胃微生物。*Ruminococcus flavefaciens* 和 *Fibrobacter succinogenes* 是瘤胃中纤维素的主要消化厌氧菌和乙酸、琥珀酸的主要生产菌(Weimer, 1993)。当动物食物中的淀粉含量高时,*Succinivibrio dextrinisolvans* 在瘤胃中富集,它的葡萄糖发酵的终产物为琥珀酸盐、醋酸盐、甲酸盐和乳酸盐(O'Herrin and Kenealy, 1993)。*Actinobacillus succinogenes* 130Z 是一种反刍动物的兼性厌氧菌,它能够利用大量的底物,例如 L-阿拉伯糖、纤维二糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、乳糖、麦芽糖、甘露糖醇、甘露聚糖、蔗糖、木糖和水杨苷(Guettler et al., 1999)。瘤胃微生物可以生产高浓度的琥珀酸盐,同

时还生成醋酸盐、丙酮酸盐、甲酸盐或乙醇。从其它动物的消化系统中分离得到的微生物也能生产琥珀酸盐。例如,从猎犬口中分离得到的 *Anarobiospirillum succiniciproducens* 是一种革兰氏阴性专性厌氧菌,它能从葡萄糖和乳糖生成琥珀酸盐、醋酸盐、甲酸盐、乙醇和乳酸盐。

### 2.2 琥珀酸的发酵和提取工艺

为了得到一种经济上可行的琥珀酸发酵生产工艺,必须遵守几个重要的发酵和产物纯化标准,例如发酵必须是利用廉价的原料和营养成分获得高产量以及高产物浓度。琥珀酸的最佳发酵过程在大约中性 pH 下进行,然而,酸的产生会降低 pH。为了避免对微生物发酵起不良影响的过低的发酵培养基 pH,必须通过加碱来调节 pH,所以发酵产物是有机酸盐而不是我们所需要的有机酸;另外,发酵罐中的不溶性物质,例如死细胞、蛋白等,需要从最终产品中除去。因此,典型的下游过程包括除去细胞和蛋白一类的杂质;浓缩,将琥珀酸盐转化为游离的琥珀酸,将游离的琥珀酸提高到所需的浓度等过程。过去,产品提取、浓缩、酸化、纯化过程中效率不高,使得以发酵为基础的生产工艺不能实现。通常下游纯化过程的费用要占最终产品成本的 60%~70%。

通过对工艺的不断改进,并结合一些最近的新技术,发酵法从碳水化合物生产以琥珀酸为基础的化学制品,并将琥珀酸从它的稀发酵液中提取和纯化成为现实,并且在经济上极具吸引力。

下面分别介绍几种琥珀酸发酵和提取工艺:

(1)从发酵液中提取有机酸的经典方法是液/液萃取,这在化学工业中是一种效果良好、使用广泛的方法(Hanson, 1971),并且在过去 20 年对以发酵为基础的产品的生产技术的改进起了一些作用。在这一领域有很多的专利和综述文章(KingandPaul, 1987; KingandStarr, 1992; BanielandEyal, 1995; KingandPoole, 1995; Baniel, 1998a, b; Banieletal, 1998)。使用这种方法的缺点是在提取过程中需使用大量有机溶剂,在食品级和医药级产品的生产中将对最终产品的质量有不良影响。

(2)Datta 等人在 No. 5168055 等美国专利中提出了一种生产工艺,它包括了从碳水化合物发酵生成琥珀酸钙和将盐转变成酸并纯化两个过程(Datta 1992; Datta et al. 1992; Berglund et al. 1991)。这种工艺在发酵过程中采用添加氢氧化钙调节 pH 值,使得在发酵过程同时结晶出琥珀酸钙。发酵液经过简单的过滤得到菌体、蛋白



等不溶物质与琥珀酸钙的混合沉淀，然后通过不断的洗涤，除去沉淀中的菌体和蛋白等物质。洗后的晶体通过加入浓硫酸转变为可溶的琥珀酸和不可溶的硫酸钙，游离的琥珀酸通过过滤、活性炭或离子交换树脂纯化，然后再结晶成纯琥珀酸晶体。工艺流程如图 2 所示。

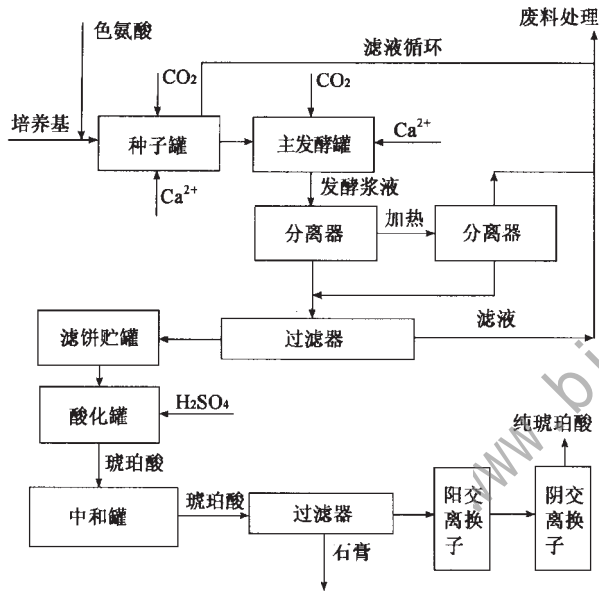


图 2 典型的琥珀酸生产工艺流程

这种工艺的缺点是要处理大量的固体和浆液，并且每生产出 1mol 的琥珀酸产品，就产生出等量的石膏副产物。而且发酵过程中气味和颜色的污染使得这种副产物不适用于商业用途，所以这种副产物的价值极低。另外，生产过程中要消耗硫酸、CaO 或 Ca(OH)<sub>2</sub>，并且这些物质在整个生产过程中不会重新生成，无法循环利用。

(3) 另一个有更高潜力用于商品化生产琥珀酸，并且较环保的生产工艺是采用电渗析技术 (Zeikus et al. 1995)。图 3 是进行两级膜电渗析酸化和通过结晶得到最后产品的工艺流程。碳水化合物通过酶水解，然后和其它营养物质混合，打入种子发酵罐和主发酵罐中。在发酵过程中，由于微生物需要二氧化碳，将二氧化碳充入发酵罐中。用 NaOH 中和发酵液，形成可溶的琥珀酸钠盐。全部的发酵液用微过滤器分离出细胞和大的不溶的颗粒。过滤后的琥珀酸钠打入分批的脱盐电渗析单元，在这里由于直接电流的作用，离子部分和非离子部分（糖）以及大分子物质（蛋白质和多糖）分离开。脱盐的电渗析膜，包含离子交换部分，有一固定的电荷。有固定的正电荷的膜选择性地允许琥珀酸离子通过而排除钠离子，负电荷的膜选择性地允许钠离子通过而排除琥珀酸离子。通过这种机制，琥珀酸钠和其它离子的部分通过离子交换膜与浓缩的糖、蛋白质及氨基酸分离开。这种浓缩的琥珀酸钠溶液经过一系列的螯合离子交换柱，用钠离子取代二价离子，使琥珀酸全部以钠盐的形式存在，这一软化的过程要避免两级膜的结垢。然后琥珀酸钠溶液打入分批的两级膜电渗析单元，在这里离子部分被转变为它们相对应的酸，并生成碱然后分离开。两级膜是一种新型的膜，它在水溶液中从水产生质子和氢氧根离子，并能使离子向相反电荷的电极迁移。随着这一过程的进行，琥珀酸钠被转变成琥珀酸。钠离子通过阳离子膜和氢氧根结合形成氢氧化钠，可重新用于发酵罐中的中和反应。最后，琥珀酸

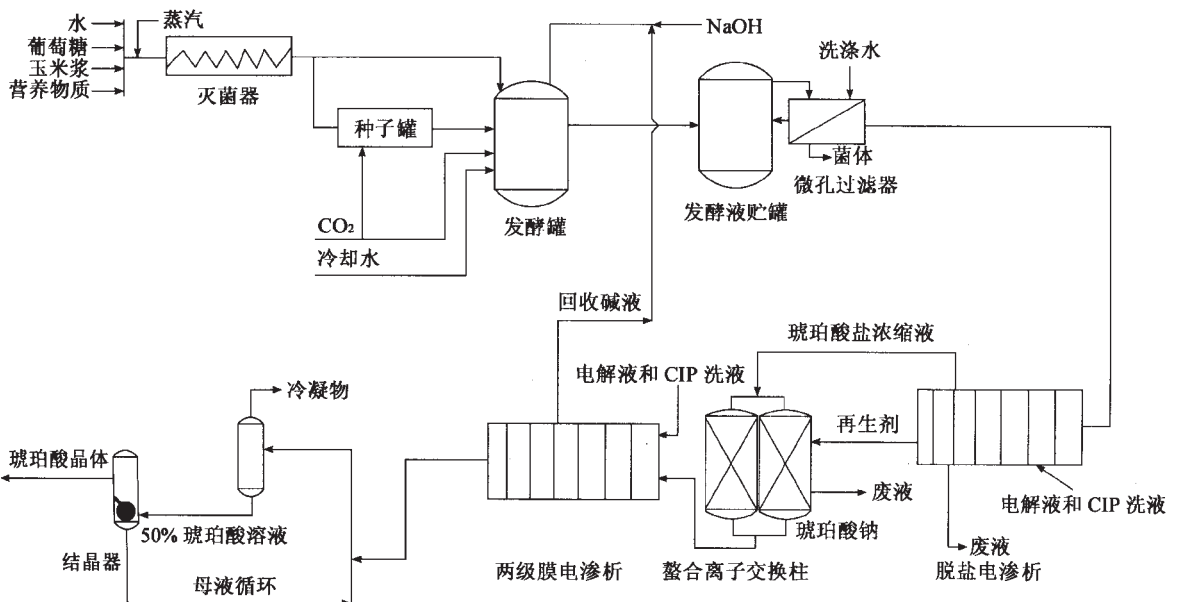


图 3 两级膜电渗析法流程图

溶液经过一个蒸发结晶器以产生非常纯的琥珀酸晶体 (Glassner and Datta, 1992)。

Berglund 和 Glassner 等人在美国专利 No. 5034105 和 No. 5143834 中也提出了相似的生产工艺。这些方法共同的缺点是操作费用相当高, 如膜的消耗和电渗析中的电能消耗。这种工艺的另一局限性是不能处理二价离子, 因此, 发酵过程中用

氢氧化镁或氢氧化钙中和的发酵液不能用这种方法酸化或纯化。

(4)Kris A. Berglund 等人在美国专利 5958744 中提出了一种即不消耗大量的试剂, 也不产生大量副产物的生产和纯化琥珀酸的工艺, 在生产过程中硫酸铵副产物可实现循环利用。

生产和纯化方法的第一步是生产出琥珀酸二

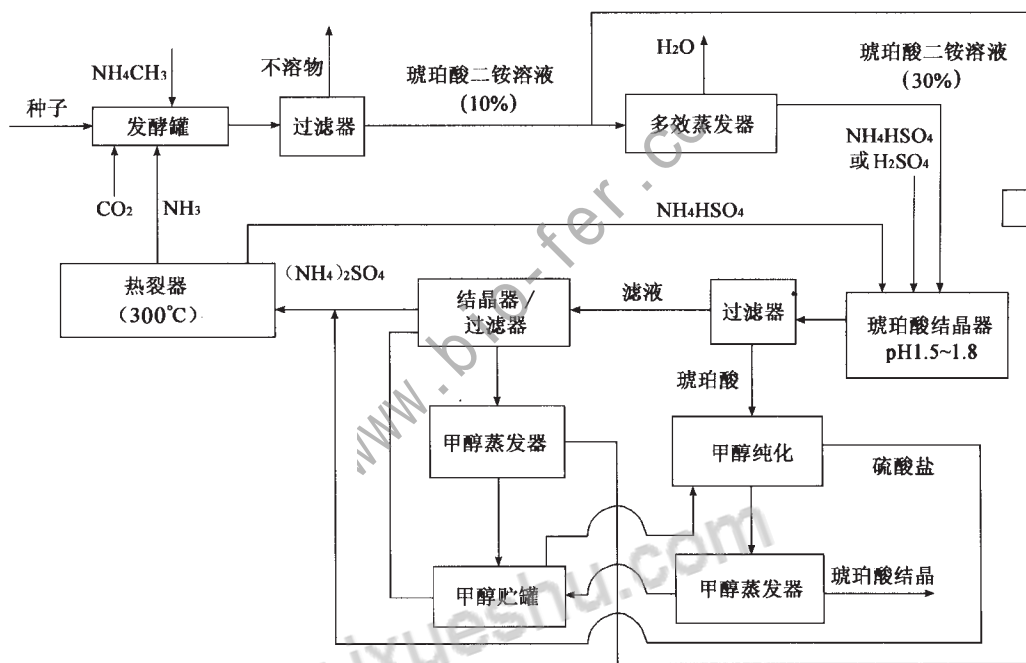


图4 两级膜电渗析法流程图

铵, 如图4所示, 碳水化合物通过琥珀酸生产菌在发酵罐中厌氧发酵。用氨将 pH 控制在 6.0 以上, 最佳情况在 7.0 左右。

从发酵罐出来的琥珀酸二铵 (6% ~ 10%) 稀溶液通过过滤器除去死细胞和蛋白质等不溶杂质, 然后通过多效蒸发器浓缩至 25% ~ 30%。在琥珀酸结晶器中, 加入硫酸氢铵或硫酸, 将浓缩液的 pH 调至 1.5 ~ 1.8。在这个低的 pH 值下, 琥珀酸离子被硫酸氢铵质子化形成硫酸铵和琥珀酸, 并且在这么低的 pH 值下, 琥珀酸的溶解度很低, 所以结晶出来。得到的浆液通过过滤器过滤然后洗涤, 结晶的琥珀酸在甲醇纯化器中溶解在甲醇中将琥珀酸从一些共结晶的硫酸盐中分离出来。硫酸盐如果存在的话, 在甲醇中相对不溶, 可以滤出与后道流程产生的硫酸盐一起进入热分解器中。琥珀酸甲醇溶液中的甲醇可在蒸发器中蒸发, 产生纯的结晶琥珀酸, 蒸发的甲醇可以被收集然后贮存于甲醇贮罐中。

从过滤器中出来的滤液包括硫酸铵、残留的琥珀酸、硫酸氢铵和硫酸, 在结晶器中与甲醇混合。甲醇可使所有的硫酸盐结晶出来, 滤出的硫

酸盐与甲醇纯化器中滤出的硫酸盐混合进入热分解器中。这个步骤是为了将残留的琥珀酸从硫酸盐中分离出来, 以减少送入热分解器中的硫酸盐混入有机物, 在分解过程中造成焦化。硫酸盐大部分为硫酸铵, 部分为残留的硫酸氢铵和硫酸, 将其置于热分解器中, 温度维持在 200 ~ 310°C 左右, 在 300°C 可获最佳效果。在这个温度范围内, 硫酸铵裂解成为氨和硫酸氢铵, 也可能形成硫酸。

硫酸氢铵、残留的硫酸和残留的未分解的 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 可循环到琥珀酸结晶罐, 氨可加到发酵罐中以维持中性 pH。

结晶器中出来的滤液包含甲醇和残留的琥珀酸, 在甲醇分离器中蒸馏后, 残留的琥珀酸和一些硫酸盐水溶液与发酵罐出来的稀琥珀酸二铵溶液混合一起进入多效蒸发器浓缩。

这样就完成了一个闭合的清洁生产流程, 整个工艺流程中, 结晶的琥珀酸是唯一的产物。

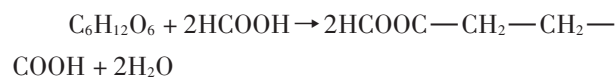
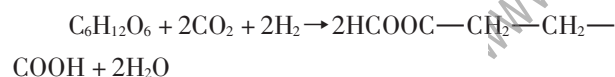
### 3 未来的发展方向

发酵法是为琥珀酸专业化学制品市场提供琥珀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 美元才能打开琥珀酸为基础的工业产品的新市场。发酵法生产琥珀酸也为农业碳水化合物产品打开一个重要的市场。在 20 世纪最后的 10 年, 发酵法生产的乳酸已成为以生物为基础的商品化学制品, 与乙醇和柠檬酸一样成为绿色的化学制品。在 21 世纪的最初 10 年, 琥珀酸生产菌产率的提高和低耗的产品提取工艺可以使琥珀酸进行商品化规模的生产。应该提到的是葡萄糖的商品价格约为 0.18 美元/kg, 且每公斤葡萄糖可以产出超过 1kg 的琥珀酸, 因此未来琥珀酸的产品价格降至 0.35 美元/kg 看来是合理的(J. G. Zeikus et al., 1999)。琥珀酸的化学理论产率为:



能利用  $\text{H}_2$  和  $\text{HCOOH}$  的菌株的理论化学产率还能再提高:



这些琥珀酸盐的理论产率在实践中还没能达到。目前发现, 在采用电子介质的电学生物反应器中,  $\text{H}_2$  能被电流所取代作为电子供体以提高琥珀酸盐产量(J. G. Zeikus et al., 1999)。Actinobacillus 菌发酵葡萄糖过程中加上电流, 电流可以促进葡萄糖的利用、菌体生长、提高琥珀酸盐产量约 25%, 并且降低乙酸盐产量约 50%。遗传工程技术现在被用于 A. succinogenes 菌, 以获得从 1mol 葡萄糖和 2mol 二氧化碳合成 2mol 琥珀酸盐的理论产率。

同样的, 在降低琥珀酸提取方法费用上仍有大量的任务要完成。降低操作单元的数量和研究

出低费用液体萃取过程, 看上去是提高整个过程经济的可行方法。

参考文献:

- [1] J G Zeikus, M K Jain, P Elankovan. Biotechnology of succinic acid production and market for derived industrial products. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 51: 525 ~ 545
- [2] Berglund, et al. Succinic acid production and purification. US Patent: 5958744, 1999
- [3] Datta, et al. Process for the production of succinic acid by anaerobic fermentation. US Patent: 5143833, 1992
- [4] Classner, et al. Process for the production and purification of succinic acid. US Patent: 5143834, 1992
- [5] Cuettler, et al. Process for the making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. US Patent: 5723322, 1998
- [6] Datta, et al. Fermentation and purification process for succinic acid. US Patent: 5168055, 1992
- [7] Berglund, et al. Carboxylic acid purification and crystallization process. US Patent: 5034105, 1991
- [8] Guettler, et al. Process for making succinic acid, microorganisms for use in the process and methods of obtaining the microorganisms. US Patent: 5504004, 1996
- [9] Baniel AM. Recovery of carboxylic acid from organic solution that contains an amine and an extraction enhancer. US patent: 5780276, 1998a
- [10] Baniel AM. Recovery of carboxylic acid from organic solution that contains an amine and an extraction enhancer. US patent: 5773653, 1998b
- [11] Guettler MV, et al. Actinobacillus succinogenes sp. nov., a novel succinic acid producing strain from the bovine rumen. Int J Syst Bacteriol, 49: 207 ~ 216
- [12] Nghiem NP, et al. Production of succinic acid by Anaerobiospirillum succiniciproducens. Appl Biochem Biotechnol, 63 ~ 65: 565 ~ 576
- [13] O' Herrin SM, et al. Glucose and carbon dioxide metabolism by Succinivibrio dextrinosolvens. Appl Environ Microbiol, 59: 748 ~ 755

(上接第 35 页)

氨基酸和海产品特有的鲜香味, 从而成功地开发出高档次的牡蛎鲜味油。该产品主要有以下几个特点: (1) 产品氨基酸基本达到动物完全蛋白质的要求; (2) 赋予产品新的营养成分, 如功能性物质牛磺酸和丰富的矿物质与微量元素等; (3) 赋予产品特有的海鲜香味, 提高产品档次和市场价值。因此, 牡蛎鲜味油的开发拓宽了海洋生物在食品中的利用价值。

参考文献:

- [1] 高福成, 等. 新型海洋食品. 中国轻工业出版社, 1999. 69 ~ 72
- [2] 王维香, 等. 海鲜调味料的研制. 中国调味品, 1998, (5): 20 ~ 21
- [3] 李道明, 等. 海豹鲜味酱油的研制. 湛江海洋大学学报, 1998, (18): 52 ~ 56
- [4] 王庆华, 等. 牡蛎营养口服液的研制. 湛江海洋大学学报, 1998, (18): 65 ~ 68
- [5] 宋文泽. 名特海产品加工技术. 北京: 农业出版社, 1996. 230 ~ 235