

不同 pH 调节剂对产琥珀酸放线杆菌 NJ113 发酵产丁二酸的影响

杨卓娜, 姜岷, 李建, 方晓江, 叶贵子, 白雪飞, 郑晓宇, 韦萍

南京工业大学生物与制药工程学院 材料化学工程国家重点实验室, 南京 210009

摘要: 在 3 L 发酵罐中分别采用不同的碱性物质作为 pH 调节剂, 考察其对产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* NJ113 厌氧发酵制备丁二酸的影响。结果表明: Ca^{2+} 、 NH_4^+ 调节剂对菌体生长代谢有较大阻碍作用, 丁二酸产量较低; 采用含 Na^+ 调节剂, 在发酵中后期菌体出现絮凝现象严重, 且产丁二酸能力骤降; 采用含 Mg^{2+} 调节剂, 整个发酵过程菌体代谢旺盛, 发酵效果较佳。根据各碱性物质的调节能力以及对菌体生长代谢的影响, 选择 NaOH、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 和 Na_2CO_3 、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 分别作为混合碱组分调节 pH, 并对两组混合碱中各物质的质量比例进行优化。结果表明, 以 NaOH、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 混合, 两者质量比为 1:1 时, 发酵效果最好, 丁二酸质量浓度高达 69.8 g/L, 质量收率 74.5%。该种混合碱配比可有效替代碱式 MgCO_3 调节 pH, 既达到高产丁二酸的目的, 又可降低生物制备丁二酸的成本。

关键词: pH 调控, 产琥珀酸放线杆菌 NJ113, 丁二酸, 发酵, 混合碱

Effects of different neutralizing agents on succinate production by *Actinobacillus succinogenes* NJ113

Zhuona Yang, Min Jiang, Jian Li, Xiaojiang Fang, Guizi Ye, Xuefei Bai, Xiaoyu Zheng, and Ping Wei

State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, College of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing University of Technology, Nanjing 210009, China

Abstract: Different neutralizing agents were used as pH controller to investigate their effects on the growth and succinic acid production of *Actinobacillus succinogenes* NJ113. The fermentation results showed that $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 and NH_4OH were not suitable for succinic acid production by *A. succinogenes* NJ113 because of their negative effects on cell growth. When Na-base was used, cells would flocculate and lump, and due to the sodium ion concentration reaching to a high level, OD_{660} dropped sharply after 12 h of fermentation. Mg-base was better because there was no significant inhibition by magnesium ion. Two combined neutralizing agents were used to maintain pH level, one with NaOH and $\text{Mg}(\text{OH})_2$ while the other with Na_2CO_3 and $\text{Mg}(\text{OH})_2$. The optimum ratios of the combined neutralizing agents were both 1:1(g:g) when using 100 g/L glucose. When NaOH and $\text{Mg}(\text{OH})_2$ were chosen with the ratio of 1:1(g:g), 69.8 g/L of the succinic acid and 74.5% of the yield was obtained.

Received: January 29, 2010; **Accepted:** May 14, 2010

Supported by: National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2009CB724701), National Natural Science Foundation of China (No. 20606017), State Key Laboratory of Materials-Oriented Chemical Engineering, “Qinglan Project” of Jiangsu Province, “The Six Talent Summit” of Jiangsu Province (No. 06-A-047).

Corresponding author: Min Jiang. Tel: +86-25-83172078; Fax: +86-25-83172075; E-mail: jiangmin@njut.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2009CB724701), 国家自然科学基金 (No. 20606017), 材料化学工程国家重点实验室基金, 江苏省“青蓝工程”, 江苏省“六大人才高峰” (No. 06-A-047) 资助。

Keywords: pH control, *Actinobacillus succinogenes* NJ113, succinic acid, fermentation, mixed neutralizing agents

丁二酸, 又名琥珀酸, 是一种二元羧酸, 作为重要的 C4 平台化合物, 广泛应用于食品、医药、香料、洗涤剂、精细化工产品、表面活性剂生物可降解材料等方面。丁二酸的传统生产方法是以石油为原料用化学法进行炼制合成。而随着石油资源日益枯竭, 微生物发酵法生产丁二酸以其环境友好性、可利用废弃的生物质资源、能够固定温室气体 CO₂ 等优点, 成为研究的热门课题, 为已存在的丁二酸化学制品市场提供一种新型的环保产品来源^[1]。

以生物法制备丁二酸, CO₂、pH 是影响菌体生长和丁二酸产量的关键因素^[2-3]。CO₂ 在菌体的生长代谢过程中作为碳源被菌体利用, 合成目的产物丁二酸。环境 pH 的改变不仅会引起菌体内外部化学环境和酶活力的变化, 对细胞代谢产生影响, 而且还可以影响 CO₂ 的溶解水平, 以及 HCO₃⁻、CO₃²⁻ 的解离平衡, 进而影响丁二酸的合成。所以在发酵过程中维持 pH 在适宜水平, 对提高菌体的代谢活性和产酸能力具有重要作用。

产琥珀酸放线杆菌发酵最佳 pH 为 7.0^[4]。在发酵过程中, 有机酸的积累会导致 pH 下降, 需要添加 pH 调节剂来维持环境的中性水平。MgCO₃ 是较好的中和剂^[3], 具有较好的调节能力。在发酵培养基中添加 MgCO₃ 固体, 能够将 pH 维持在适宜的水平, 菌体在发酵过程中表现出较高的代谢活性。但是 MgCO₃ 成本较高, 消耗量较大, 且增加了下游产品分离提取的难度, 不利于生物法制备丁二酸的工业化。因此, 需要选择合适的 pH 调节剂并制定合理的调节策略来优化生产工艺, 降低生物制备丁二酸的生产成本。

初糖浓度对菌体发酵产酸有重要影响。较高的初糖浓度会延长菌体的延滞期, 降低最大菌体量, 但是能够提高丁二酸的绝对产量^[2]。本文采用 Ca(OH)₂、CaCO₃、NaOH、Na₂CO₃、NaHCO₃、Mg(OH)₂、碱式 MgCO₃ 作为 pH 调节剂, 考察不同 pH 调节方式对 *A. succinogenes* NJ113 厌氧发酵产丁二酸的影响。根据以上各碱性物质的调节能力和特性制定了采用混合碱调控 pH 的策略, 并确定混合成

分及其最佳配比, 为优化丁二酸发酵工艺提供有价值的技术参数。

1 材料与方法

1.1 菌种

产琥珀酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes* NJ113, 保存号 CGMCC 1716, 本实验室筛选并保存。

1.2 培养基

种子培养基 (g/L): 葡萄糖 10 (分消), 酵母膏 5, NaHCO₃ 10, NaH₂PO₄·2H₂O 9.6, K₂HPO₄·3H₂O 15.5; pH 6.8, 121℃ 灭菌 15 min。

发酵培养基 (g/L): 葡萄糖 80~100, 酵母膏 10, KH₂PO₄ 3, MgCl₂·6H₂O 0.3, CaCl₂ 0.3, NaCl 1, Na₂HPO₄ 0.31, NaH₂PO₄ 1.6, 121℃ 灭菌 15 min。葡萄糖 121℃ 分消 15 min 后单独加入。固体 CaCO₃、碱式 MgCO₃ 在灭菌前加入发酵培养基中, 其他碱液以流加形式加入, 控制 pH 在 7.0。实验数据均重复 3 次, 取平均值。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养

冻存于 -70℃ 冰箱的菌种, 接到种子培养基中, 120 r/min, 37℃ 活化 10 h 后作为种子液。

1.3.2 分批发酵培养

在 3 L 发酵罐 (BioFlo 110 fermenter; NBS) 进行分批发酵培养, 装液量为 1.5 L, 接种量 5%。搅拌转速 200 r/min, 温度 37℃, CO₂ 通气量 0.25 L/min。

1.4 分析方法

1.4.1 葡萄糖含量的测定

生物传感分析仪 (SBA240C, 山东省科学院生物研究所)。

1.4.2 有机酸含量测定

采用高效液相方法 (HPLC) 测得有机酸^[5] (戴安 Ultimate3000 系列)。色谱柱: Alltech Prevail Organic Acid (250 mm×φ4.6 mm, 5 μm), 流动相: 25 mmol/L KH₂PO₄; pH 2.5; 流动相流速: 1 mL/min; 紫外检测波长: 215 nm; 进样量 20 μL; 柱温为室温。采用 Ca²⁺ 调节时, 用 HCl 调节离心后沉淀的 pH 至

2.5, 使少量沉淀丁二酸钙溶解, 经离心后采用高效液相方法测得上清液中丁二酸含量。

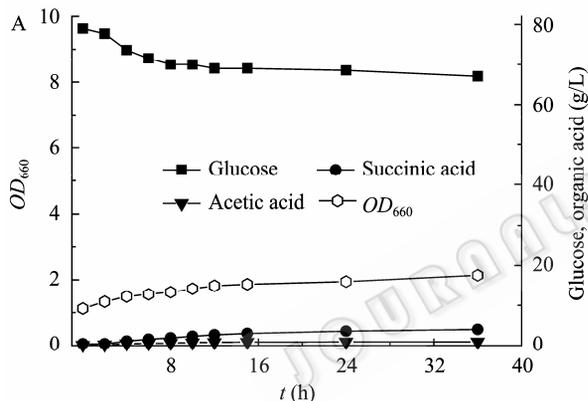
1.4.3 菌体浓度的测定

取 1 mL 菌液, 稀释若干倍, 用紫外可见分光光度计 (Spectrumlab 752S) 于 660 nm (OD_{660}) 处测定吸光值。若发酵液中含有 $Mg(OH)_2$ 或 $MgCO_3$, 稀释前在待测样中加入适量 2 mol/L HCl, 再进行吸光值测定。

1.4.4 菌体干重的测定

将干燥 10 mL 离心管称重 (G1), 取 5 mL 发酵液于离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 倒出上清液, 5 mL 0.9% 的生理盐水洗涤 2 次, 将沉淀物连同离心管置于 60℃ 烘箱中烘干至恒重, 取出称重 (G2):

$$\text{细胞干重 } W (\text{g/mL}) = (G2-G1)/5.$$



2 结果

2.1 不同 pH 调节剂对菌体生长和丁二酸产量的影响

2.1.1 Ca^{2+} 调节剂 ($Ca(OH)_2$ 、 $CaCO_3$)

在 3 L 发酵罐中分别采用 $Ca(OH)_2$ 、 $CaCO_3$ 调节 pH 进行发酵, 初始葡萄糖 80 g/L, 结果见图 1。采用 $Ca(OH)_2$ 调节, 菌体几乎不生长, 丁二酸质量浓度小于 5 g/L (图 1A)。采用事先添加 $CaCO_3$ 调节 pH 发酵, 菌体生长比 $Ca(OH)_2$ 调节发酵时稍好, 但仍受到明显抑制。 $CaCO_3$ 的溶解能力差, 不能将 pH 维持在适合菌体生长的水平, 发酵过程中 pH 不断降低, 至发酵结束, pH 降至 5.6 (图 1B), 丁二酸产量仅为 17.5 g/L。

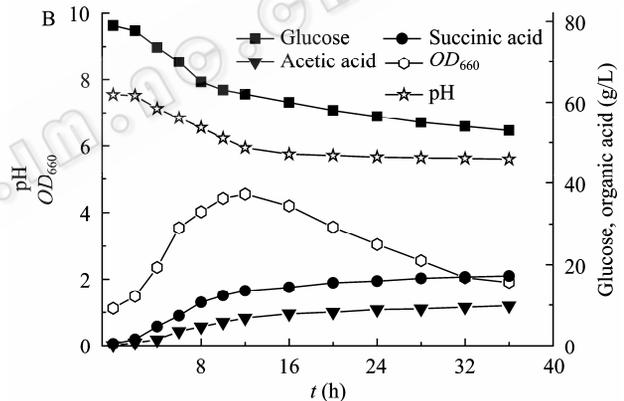


图 1 采用 2.5 mol/L $Ca(OH)_2$ (A) 和 40 g/L $CaCO_3$ (B) 调节 pH 的发酵过程图

Fig. 1 Time courses of the succinic acid fermentation using 2.5 mol/L $Ca(OH)_2$ (A) and 40 g/L $CaCO_3$ (B) to buffer pH.

已有研究表明, Ca^{2+} 对丁二酸生产菌 *Mannheimia succiniciproducens* 具有毒害作用^[6]。 Ca^{2+} 可以改变细胞膜正常的流动性和通透性^[7], 致使菌体不能进行正常的胞内外物质能量传递, 从而无法生长代谢。

2.1.2 Na^+ 调节剂 ($NaOH$ 、 Na_2CO_3 、 $NaHCO_3$)

在 3 L 发酵罐中分别采用 $NaOH$ 、 Na_2CO_3 、 $NaHCO_3$ 调节 pH, 发酵过程见图 2。发酵前期, 菌体生长旺盛, 大量合成产物丁二酸, 至中后期菌体 OD_{660} 均呈明显下降趋势, 菌体絮凝现象严重, 丁二酸的生产能力也逐渐下降。对比发酵结果 (表 1) 可知, 采用 $NaOH$ 调节, 丁二酸产量最高, 为 41.94 g/L, 但是糖利用率较仅有 66.67%, 有较多葡萄糖残留, 发酵液中积累的 Na^+ 达到 2.1 mol/L。 Na_2CO_3 、

表 1 采用不同含 Na^+ 调节剂发酵结果的对比^a

Table 1 Results of succinic acid production using different Na-base for pH control

| Na-base | NaOH | Na_2CO_3 | $NaHCO_3$ |
|--------------------------------------|----------|------------|-----------|
| Initial glucose (g/L) | 78.4±0.7 | 80.1±0.3 | 78.7±0.5 |
| Residual glucose (g/L) | 26.2±0.5 | 8.3±0.4 | 1.4±0.2 |
| Succinic acid (g/L) | 41.9±0.2 | 39.9±0.1 | 37.8±0.2 |
| Acetic acid (g/L) | 11.8±0.1 | 12.3±0.2 | 12.1±0.1 |
| Glucose utilization ^b (%) | 66.7±0.2 | 90.1±0.5 | 98.7±0.8 |
| Succinic acid yield ^c (%) | 55.6±0.1 | 58.2±0.1 | 59.7±0.1 |
| Na^+ ^d (mol/L) | 2.1±0.2 | 1.9±0.4 | 1.5±0.3 |

a: each value is an average of three parallel replicates; b: glucose utilization is defined as the percentage of the concentrations of glucose utilized by the bacteria in initial total glucose; c: succinic acid yield is defined as the percentage of the concentrations of succinic acid in initial total glucose; d: the concentrations of Na^+ in the media at end of fermentation using different Na-base on pH control.

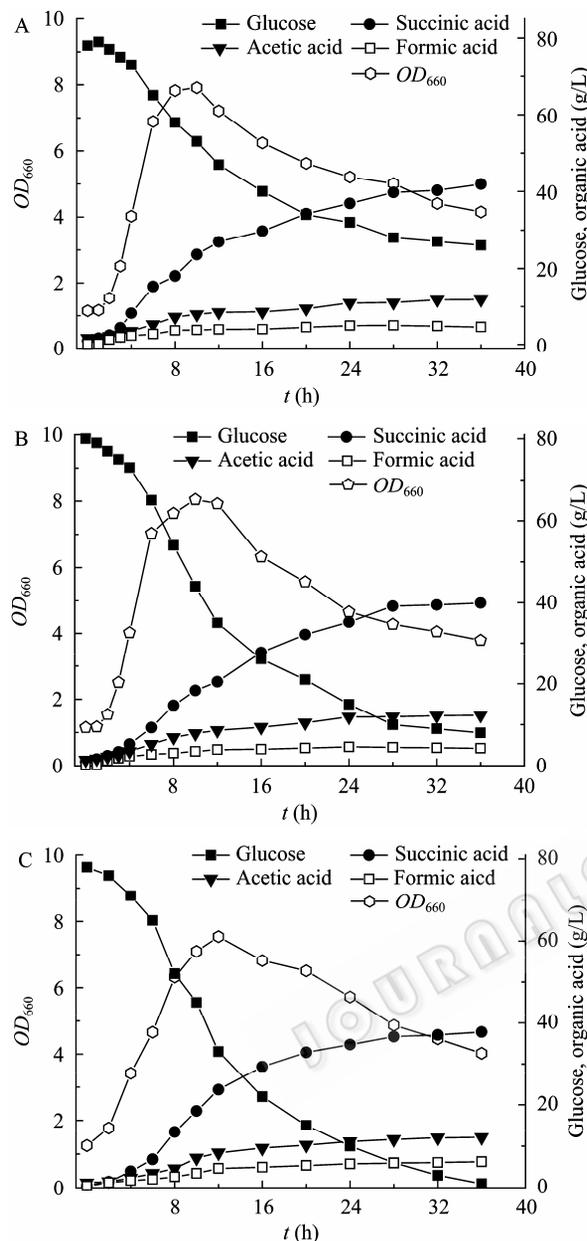


图2 采用 10 mol/L NaOH (A)、2.5 mol/L Na₂CO₃ (B) 和 2.4 mol/L NaHCO₃ (C) 调节 pH 的发酵过程图

Fig. 2 Time courses of the succinic acid fermentation using 10 mol/L NaOH (A), 2.5 mol/L Na₂CO₃ (B) and 2.4 mol/L NaHCO₃ (C) to buffer pH at 7.0.

NaHCO₃ 能够提供额外的 CO₃²⁻、HCO₃⁻, 有利于菌体合成丁二酸, 但是两者溶解性和碱性均较低, 流加过程对发酵液的稀释作用显著, 以 NaHCO₃ 尤为严重, 虽然糖利用率较高 (98.7%), 但是丁二酸质量浓度仅为 37.77 g/L。

在细胞的代谢过程中, Na⁺有十分重要的作用, 它能够影响跨膜 pH 梯度、细胞渗透压以及胞内 pH 调控水平^[8]。Pyung 等报道, 当培养基中 NaCl 质量浓

度高于 4 g/L 时, *Anaerobiospirillum succinicproducens* 最高 OD₆₆₀ 值呈现下降趋势, 丁二酸的产量也随之下降^[9]。在发酵过程中采用含 Na⁺调节剂, 则 Na⁺不断积累。至发酵中后期, 发酵液中 Na⁺浓度均处于较高水平, 造成高渗环境。这对菌体有较大的负面作用, 使细胞不能正常代谢, 最终导致衰亡。

2.1.3 Mg²⁺ 调节剂 (Mg(OH)₂、碱式 MgCO₃)

Mg²⁺ 是许多酶的激活剂, 在丁二酸合成途径中的关键酶——磷酸烯醇式丙酮酸羧化激酶需要 Mg²⁺ 作为辅助因子^[10]。图 3 是分别采用 Mg(OH)₂、MgCO₃ 调节 pH 的发酵过程, 初始葡萄糖浓度 80 g/L。Mg²⁺ 在发酵液中的积累对菌体生长没有明显的抑制作用, 发酵中后期, OD₆₆₀ 缓慢下降, 菌体仍有较高的代谢活性。采用 Mg(OH)₂ 调节, 由于碱液流加的稀释作用, 丁二酸质量浓度仅为 42.92 g/L (图 3A)。以碱式 MgCO₃ 调节 pH, 发酵效果最佳, 至发酵结束, 丁二酸质量浓度达 57.36 g/L (图 3B), 质量收率为 71.86%。

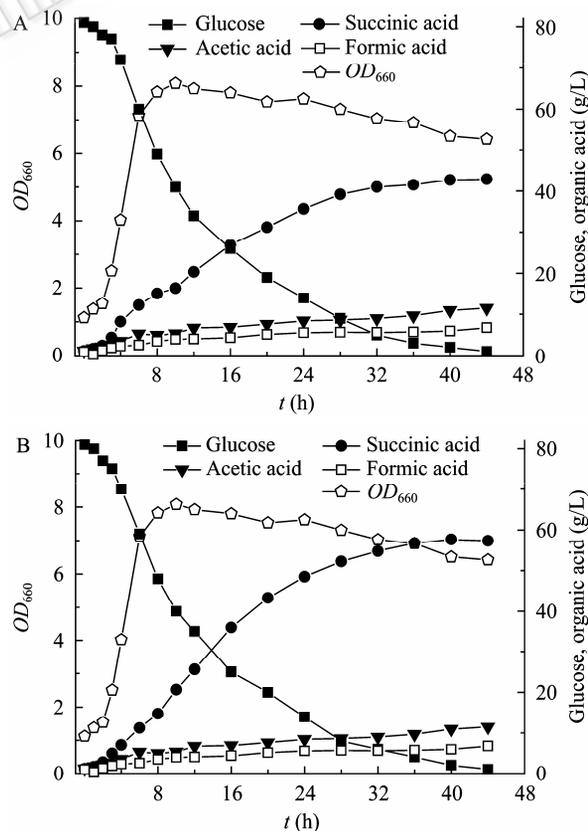


图3 采用 (A) 15% Mg(OH)₂ 和 (B) 70 g/L 碱式 MgCO₃ 调节 pH 的发酵过程图

Fig. 3 Time courses of the succinic acid fermentation using 2.6 mol/L Mg(OH)₂ (A) and 70 g/L MgCO₃ (B) to buffer pH at 7.0.

2.1.4 NH_4^+ 调节剂 (氨水)

氨水调节 pH 的发酵过程如图 4 所示。发酵液中 NH_4^+ 对细胞生长的抑制作用较为强烈, 菌体对糖的利用能力较低, 导致大量的葡萄糖残留。至发酵结束, 丁二酸质量浓度仅为 23.5 g/L。

细胞膜对 NH_4^+ 有较高的通透性^[11], NH_4^+ 的渗入会造成胞内 pH 水平发生变化, 细胞需要更多的能量将 NH_4^+ 泵出, 可见, 环境中较高 NH_4^+ 浓度会降低细胞对能量的利用效率。当能量供给不足时, 受胞内 NH_4^+ 的影响, 胞内的 pH 发生变化, 影响细胞无法正常的生长代谢, 最终导致死亡^[11-13]。

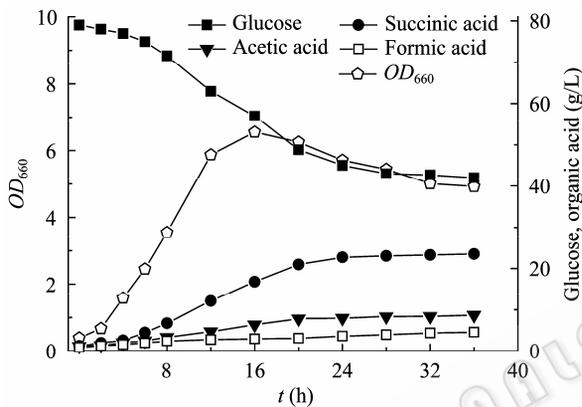


图 4 采用 14 mol/L 氨水调节 pH 的发酵过程图

Fig. 4 Time course of the succinic acid fermentation using 14 mol/L NH_4OH to buffer pH at 7.0.

通过上述实验结果可得, 采用含 Ca^{2+} 、 NH_4^+ 调节剂, 菌体生长受到较强的抑制作用, 产酸能力较低, 所以这两类调节剂不适用于 *A. succinogenes* NJ113 产丁二酸的 pH 控制; 采用含 Na^+ 调节剂, 在发酵中后期菌体絮凝现象严重, 耗糖速率、产丁二酸能力迅速下降; Mg^{2+} 调节剂对菌体的生长和代谢没有明显的抑制作用, 菌体在发酵过程中保持较高的活力。综合各类调节剂对发酵过程的影响, 后续实验采用 NaOH 、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 和 Na_2CO_3 、 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 两种混合碱分别调节 pH, 以弥补单碱调节的不足。

2.2 混合碱调节 pH 对菌体生长以及丁二酸产量的影响

2.2.1 NaOH 和 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 不同的混合比例调节 pH 对发酵结果的影响

用 NaOH 和 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 混合溶液作为 pH 调节剂, 初始葡萄糖 100 g/L, 在 3 L 发酵罐中考察调控效果。

控制混合碱中 OH^- 浓度为 6 mol/L (按 1 mol $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 提供 2 mol OH^- 计), NaOH 和 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 质量比为 3:1、2:1、1:1、1:2、1:3, 结果见图 5。

从图 5 中可看出, 随着混合碱液中 NaOH 添加比例降低, 葡萄糖的残留量逐渐减少。当 NaOH 和 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 的质量比为 1:1 时, 无葡萄糖剩余, 丁二酸的质量浓度最高可达 69.8 g/L, 发酵液中 Na^+ 浓度为 0.86 mol/L, 与采用 NaHCO_3 调节的 Na^+ 浓度相比, 降低了 42.6%。继续减少混合碱中 NaOH 的添加比例, 菌体仍然能够将葡萄糖全部耗完, 但是混合碱的稀释作用逐渐显著, 丁二酸质量浓度呈现下降趋势。

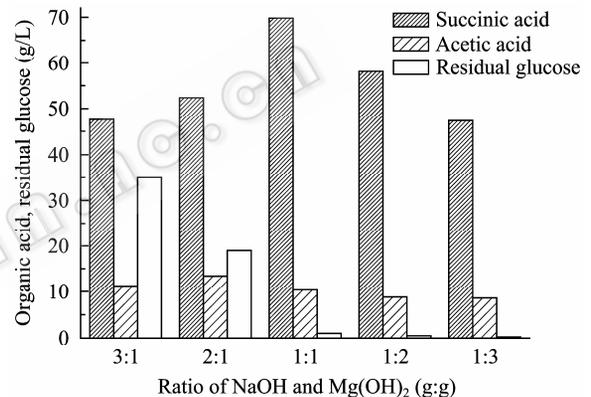


图 5 不同比例的 NaOH 和 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 混合调节 pH 对发酵结果的影响

Fig. 5 Comparison of different ratio of NaOH and $\text{Mg}(\text{OH})_2$ on production of succinic acid in batch fermentation.

2.2.2 Na_2CO_3 和 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 不同的混合比例调节 pH 对发酵结果的影响

采用 Na_2CO_3 和 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 以不同比例混合 (3:1、2:1、1:1:2、1:3) 调节 pH, 控制混合碱中 OH^- 浓度为 6 mol/L (按 1 mol Na_2CO_3 提供 2 mol OH^- 计), 初始葡萄糖 100 g/L。发酵结果见图 6。随着 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 添加量的不断增加, 葡萄糖残留量逐渐减少, 丁二酸质量浓度逐渐增大。当 Na_2CO_3 和 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 质量比达到 1:1 时, 葡萄糖无剩余, 丁二酸质量浓度最高, 为 55.4 g/L, 发酵液中 Na^+ 浓度为 0.95 mol/L, 比采用 NaHCO_3 调节的 Na^+ 浓度降低了 36.7%。继续增加混合碱中 $\text{Mg}(\text{OH})_2$ 添加量, 葡萄糖仍然能够消耗完全, 但是丁二酸的浓度有所下降。

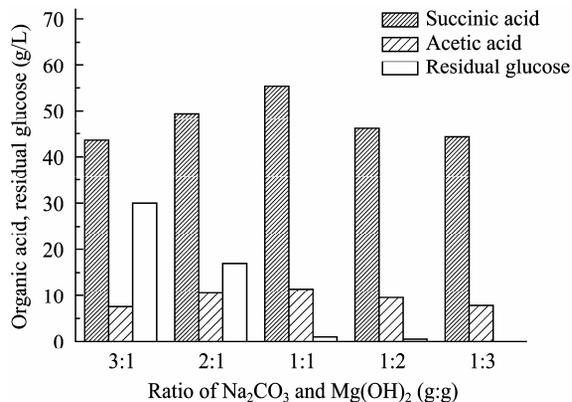


图 6 不同比例的 Na₂CO₃ 和 Mg(OH)₂ 混合调节 pH 对发酵结果的影响

Fig. 6 Comparison of different ratio of Na₂CO₃ and Mg(OH)₂ on production of succinic acid in batch fermentation.

含 Na⁺调节剂与含 Mg²⁺调节剂混合至适当比例, 既缓解了 Na⁺的过量积累, 提高菌体对糖的利用率, 又降低了 Mg(OH)₂对发酵液的稀释程度。与 Na₂CO₃和 Mg(OH)₂混合调节 pH 发酵的最佳结果相比, 采用 NaOH 和 Mg(OH)₂以 1:1 混合调节 pH 发酵的效果更好。

表 2 的对比结果可知, 以 NaOH 和 Mg(OH)₂ 1:1 混合调节 pH, 在高糖浓度下进行丁二酸发酵, 菌体能够有效利用碳源进行产物合成, 丁二酸的产量以及收率与碱式 MgCO₃ 发酵结果相近。同时, 采用混合碱发酵, 能够有效降低丁二酸的生产成本, 具有工业应用的潜质。

表 2 混合碱与碱式 MgCO₃ 调节 pH 发酵结果对比
Table 2 Results of succinic acid production using mixed neutralizing agents and MgCO₃ for pH control respectively

| Base | Mixture of NaOH and Mg(OH) ₂ (ratio of 1:1) | MgCO ₃ |
|-------------------------|--|-------------------|
| Initial glucose (g/L) | 99.3±0.7 | 99.5±0.3 |
| Residual glucose (g/L) | 0.2±0.1 | 0.4±0.1 |
| Succinic acid (g/L) | 69.8±0.2 | 75.1±0.2 |
| Acetic acid (g/L) | 10.4±0.1 | 13.5±0.2 |
| Succinic acid yield (%) | 74.5±0.3 | 75.5±0.2 |

3 讨论

不同的碱性物质对 *A. succinogenes* NJ113 厌氧发酵产丁二酸表现出不同的调节能力。采用含 Ca²⁺、NH₄⁺调节剂进行发酵时, 菌体生长受阻, 对糖的利用能力较低, 产物丁二酸的合成量较少。采用含 Na⁺

调节剂, 发酵中后期 Na⁺造成的高渗环境对菌体有毒害作用, 菌体代谢能力骤降, 糖利用率较低。而含 Mg²⁺调节剂对菌体的生长与代谢没有明显的阻碍作用, 细胞能够保持较高的代谢活性。

根据上述结果, 本实验采用混合碱调节策略, 即以 NaOH、Mg(OH)₂ 和 Na₂CO₃、Mg(OH)₂ 混合分别控制 pH, 以改善在高糖浓度下菌体对糖利用率低、丁二酸合成量少等问题。采用 NaOH、Mg(OH)₂ 质量比 1:1 混合调节 pH, 发酵效果最佳, 丁二酸质量浓度最高, 可达 69.8 g/L, 质量收率达到 74.5%。以该种混合碱配比调节 pH 发酵效果较好, 可能是由于在该种混合配比下, Mg²⁺能够及时有效地与丁二酸根形成络合结构^[14], 且 Mg²⁺的供给速率与丁二酸的生产速率达到一定的平衡, 在保证 pH 维持在适宜水平的前提下, 降低产物对菌体活性的抑制作用。Sergio 等报道在添加 Mg²⁺能够提高 PEP 羧化激酶的活性^[15]。PEP 羧化激酶是合成产物丁二酸的关键酶, PEP 羧化激酶活力的提高, 能够促进 PEP 转化为 OAA, 进一步合成目标产物丁二酸。同时, Mg²⁺也能够提高胞内高能化合物的储备, 为胞内代谢以及胞内外的物质运输提供更多能量支持^[16]。在混合碱中, Na⁺浓度得到有效控制, 削弱了 Na⁺对环境的高渗作用, 有利于菌体的正常代谢。因此, 采用混合碱的 pH 调节策略, 能够充分弥补单碱调节的不足, 改善在高糖浓度下菌体对糖利用率低、丁二酸合成量少等问题, 达到高产丁二酸的目的; 同时, 与碱式碳酸镁的发酵效果相近, 可有效降低生物制备丁二酸的成本, 为优化生物制备丁二酸的生产工艺奠定良好的基础。

REFERENCES

[1] Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**(5): 545-552.

[2] Pyung CL, Woo GL, Sunhoon K, et al. Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: effects of the H₂/CO₂ supply and glucose concentration. *Enzyme Microbial Technol*, 1999, **24**(8): 549-554.

[3] Guettler MV, Jain MK, Rumler D. Method for making

- succinic acid, bacterial variants for use in the process, and methods for obtaining variants: US, 5573931. 1996-11-12.
- [4] Su L, Chen KQ, Cai T, *et al.* Research on anaerobic cultural condition of succinic acid producing strain *Actinobacillus succinogenes* 130Z. *Chin J Bioproc Eng*, 2007, **5**(2): 67-72.
苏溧, 陈可泉, 蔡婷, 等. *Actinobacillus succinogenes* 130Z 厌氧发酵产丁二酸条件初步研究. *生物加工过程*, 2007, **5**(2): 67-72.
- [5] Cai T, Su L, Chen KQ, *et al.* Application of HPLC in determination of organic acids in succinic acid anaerobic fermentation broth. *Chin J Bioproc Eng*, 2007, **5**(1): 66-69.
蔡婷, 苏溧, 陈可泉, 等. 高效液相色谱法在测定丁二酸厌氧发酵体系中有机的应用. *生物加工过程*, 2007, **5**(1): 66-69.
- [6] Hyohak S, Jeong WL, Sol C, *et al.* Effects of dissolved CO₂ levels on the growth of *Mannheimia succiniciproducens* and succinic acid production. *Biotechnol Bioeng*, 2007, **98**(6): 1296-1304.
- [7] Wang JY, Zhu SG, Xu CF. *Biochemistry*. Beijing: Higher Education Press, 2002: 598-599.
王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. *生物化学*. 北京: 高等教育出版社, 2002: 598-599.
- [8] Liu YP, Zheng P, Sun ZH, *et al.* Strategies of pH control and glucose-fed batch fermentation for production of succinic acid by *Actinobacillus succinogenes* CGMCC1593. *J Chem Technol Biotechnol*, 2008, **83**(5): 722-729.
- [9] Pyung CL, Woo GL, Sang YL, *et al.* Effects of medium components on the growth of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* and succinic acid production. *Process Biochem*, 1999, **35**: 49-55.
- [10] Podkovyrov SM, Zeikus JG. Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase, a catabolic CO₂-fixing enzyme, from *Anaerobiospirillum succiniciproducens*. *J Gen Microbiol*, 1993, **139**: 223-228.
- [11] Kleiner D. Energy expenditure for cyclic retention of NH₃, NH₄⁺ during N₂ fixation by *Klebsiella pneumoniae*. *FEBS Lett*, 1985, **187**(2): 237-239.
- [12] Buurman ET, Teixeira de Mattos MJ, Neijssel OM. Nitrogen-limited behaviour of micro-organisms growing in the presence of large concentrations of ammonium ions. *FEMS Microbiol Lett*, 1989, **49**(2): 229-232.
- [13] Buurman ET, Teixeira de Mattos MJ, Neijssel OM. Futile cycling of ammonium ions via the high affinity potassium uptake system (Kdp) of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol*, 1991, **155**(4): 391-395.
- [14] Li XJ, Hu KL, Huang YL. IR Spectra of dicarboxylate of Alkali-earth metal. *Spectroscopy Spectral Anal*, 2002, **22**(3): 392-395.
李小俊, 胡克良, 黄允兰. 红外光谱对碱土金属二元羧酸盐结构的研究. *光谱学与光谱分析*, 2002, **22**(3): 392-395.
- [15] 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*. *Protein J*, 2007, **26**(4): 265-269.
- [16] Wang F, Du GC, Gu ZB. The promoting effects of magnesium, manganese and zinc ions on the γ -CGTase production and the energy metabolism by *Bacillus macorous*. *Chem Bioeng*, 2008, **25**(7): 33-37.
王峰, 堵国成, 顾正彪. 镁锰锌金属离子对 γ -CGT 酶生产和能量代谢的促进影响. *化学与生物工程*, 2008, **25**(7): 33-37.