

# 新型有机酸的 生物法制造技术

XINXING YOUJISUAN DE  
SHENGWUFA ZHIZAO JISHU

陈 坚   周景文   刘 龙   编著

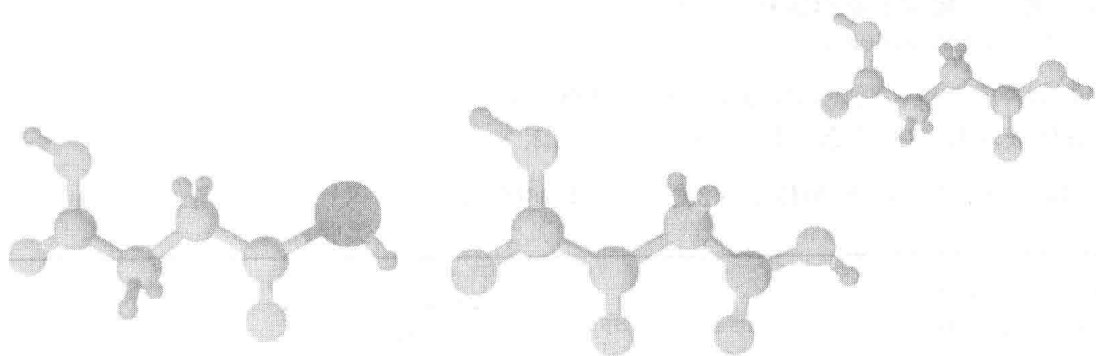
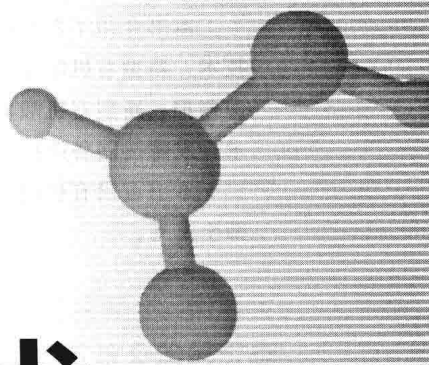


化学工业出版社

# 新型有机酸的 生物法制造技术

XINKING YOUJISUAN DE  
SHENGWUFA ZHIZAO JISHU

陈坚 周景文 刘龙 编著



化学工业出版社

· 北京 ·

本书介绍了新型有机酸的生物法制造相关技术,全书分为8章,具体介绍了新型有机酸生产技术;新型有机酸生产菌种选育的传统方法与先进技术;微生物合成新型有机酸的生理机制与代谢调控;新型有机酸发酵过程优化与控制;发酵法制备丙酮酸技术;发酵法制备 $\alpha$ -酮戊二酸技术;发酵法制备丙酸技术;酶转化法制备酮酸。

本书可供有机酸专业的科研人员、技术人员和管理人员参考使用,也可供大专院校相关专业师生参考。

## 图书在版编目(CIP)数据

新型有机酸的生物法制造技术/陈坚,周景文,刘龙等  
编著. —北京:化学工业出版社,2015.2  
ISBN 978-7-122-22603-7

I. ①新… II. ①陈…②周…③刘… III. ①生物工程-  
应用-有机酸发酵-生产工艺 IV. ①TQ921

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第300660号

---

责任编辑:赵玉清  
责任校对:徐贞珍

文字编辑:颜克俭  
装帧设计:关 飞

---

出版发行:化学工业出版社(北京市东城区青年湖南街13号 邮政编码100011)

印 刷:北京永鑫印刷有限责任公司

装 订:三河市胜利装订厂

787mm×1092mm 1/16 印张19¼ 字数448千字 2015年4月北京第1版第1次印刷

---

购书咨询:010-64518888(传真:010-64519686) 售后服务:010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书,如有缺损质量问题,本社销售中心负责调换。

---

定 价:88.00元

版权所有 违者必究

# 前 言

---

发酵工程是当代工业生物技术的重要领域和组成部分。随着生命学科和生物技术的飞速发展，作为工业生物技术核心的发酵技术，其发展更为迅速，内涵更加丰富，应用更加广阔，在社会经济中发挥着越来越重要的作用。

有机酸发酵是发酵工业的支柱产业之一。虽然国内外学术期刊每年发表大量发酵法生产有机酸的研究论文和综述性文章，内容涵盖了菌种选育、代谢工程改造、发酵过程优化和分离提取等，但自2000年无锡轻工大学（现江南大学）金其荣教授等主编的《发酵有机酸生产与应用手册》之后，国内已有十余年未出版发酵法生产有机酸的专著。近年来，随着工业生物技术的发展，特别是代谢工程技术和先进发酵优化技术的发展，研究人员综合运用微生物生理学、生物反应工程学和代谢工程最新理论和技术，从优化微生物自身基因型、调节胞内微环境和优化胞外宏观环境等方面着手，发展了一系列有机酸发酵法制备新技术。

新型有机酸是指一系列在食品、医药和化工等领域具有重要应用价值，但是长期以来由于其结构的复杂性和较高的化学反应活性无法在工业规模进行低成本生产的一系列有机酸。本书结合当前发酵法制备有机酸技术的最新进展，介绍了发酵法制备有机酸过程中涉及的菌种筛选、代谢工程改造和发酵过程优化的基本原理和技术，并系统介绍了本研究室完成的丙酮酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、丙酸等新型有机酸发酵法制备技术及其开发历程。尽管发酵法生产有机酸产品种类繁多，但是其生产思路和方法是可以通用或相互借鉴的。相信本书可以为开展类似研究的读者提供分析和解决问题的思路与方法，并对促进生物技术在我国有机酸生产领域的应用产生积极影响。

作者撰写此书，一方面得益于作者所工作的学院拥有发酵工程国家重点学科点，本学科可追溯至1952年，并在发展过程中积累了发酵过程优化研究与工程实践的丰富经验；另一方面受助于作者所在研究室许多年轻的博士生和硕士生，他们和作者一起完成了与本书内容相关的8项国家级和部省级科研项目，包括国家973计划、863计划、国家自然科学基金项目和江苏省产学研等项目，这些项目研究成果组成了本书主体。此外，本书在编写过程中也参考了近年来在国内外学术期刊、行业期刊、相关专著以及互联网新媒

体上发展的相关研究论文、综述文章和市场分析等，在此一并致谢。

参与本书写作的有：陈坚、周景文、刘龙、堵国成、张伟平、吕永坤、管宁子、宋阳等。作者特别感谢中国工程院院士、江南大学生物工程学院伦世仪教授的鼓励和指导，感谢所在研究室的博士、硕士研究生给予的帮助。

作者力图在本书中注重结合理论性和实践性，突出系统性和科学性，体现前沿性和创新性，但限于作者的学术功底、研究经验和写作能力，书中定有不少错误。若蒙赐教，不胜感谢！

作者

2014 年 10 月

# 目 录

## 第 1 章 新型有机酸生产技术 ■ 001

|                            |     |
|----------------------------|-----|
| 1.1 概述 .....               | 001 |
| 1.1.1 有机酸的定义和分类 .....      | 001 |
| 1.1.2 羧酸的性质 .....          | 003 |
| 1.2 发酵法生产有机酸的历史与现状 .....   | 005 |
| 1.2.1 有机酸与人类文明发展 .....     | 006 |
| 1.2.2 主要有机酸市场情况 .....      | 007 |
| 1.3 主要有机酸及其发酵法生产 .....     | 012 |
| 1.3.1 $C_1$ 有机酸 .....      | 012 |
| 1.3.2 $C_2$ 有机酸 .....      | 014 |
| 1.3.3 $C_3$ 有机酸 .....      | 016 |
| 1.3.4 $C_4$ 有机酸 .....      | 022 |
| 1.3.5 $C_5$ 有机酸 .....      | 027 |
| 1.3.6 $C_6$ 有机酸 .....      | 031 |
| 1.3.7 其他 .....             | 041 |
| 1.4 有机酸的化学合成与发酵生产的比较 ..... | 044 |
| 1.4.1 有机酸的化学合成法存在的问题 ..... | 044 |
| 1.4.2 发酵法生产有机酸及其优势 .....   | 046 |
| 1.4.3 有机酸发酵微生物 .....       | 048 |
| 1.4.4 发酵法生产有机酸存在的问题 .....  | 049 |
| 1.5 展望 .....               | 051 |
| 参考文献 .....                 | 052 |

## 第 2 章 新型有机酸生产菌种选育的传统方法与先进技术 ■ 053

|                       |     |
|-----------------------|-----|
| 2.1 概述 .....          | 053 |
| 2.2 诱变育种原理与技术 .....   | 054 |
| 2.2.1 物理诱变技术 .....    | 054 |
| 2.2.2 化学诱变技术 .....    | 057 |
| 2.3 代谢控制育种 .....      | 058 |
| 2.3.1 营养缺陷型育种技术 ..... | 058 |
| 2.3.2 拮抗育种技术 .....    | 059 |

|                         |     |
|-------------------------|-----|
| <b>2.4 适应性进化</b>        | 060 |
| 2.4.1 适应性进化应用于提高环境适应性   | 061 |
| 2.4.2 适应性进化应用于表型优化      | 062 |
| 2.4.3 适应性进化应用于潜在代谢途径的激活 | 062 |
| <b>2.5 基因组重排</b>        | 063 |
| 2.5.1 基因组重排技术的优点        | 064 |
| 2.5.2 基因组重排技术的原理        | 064 |
| 2.5.3 基因组重排技术的应用        | 066 |
| 2.5.4 基因组重排技术存在的问题与展望   | 067 |
| <b>2.6 菌种筛选技术</b>       | 067 |
| 2.6.1 传统筛选技术            | 067 |
| 2.6.2 高通量筛选技术           | 068 |
| <b>2.7 小结</b>           | 069 |
| 参考文献                    | 069 |

## 第3章 微生物合成新型有机酸的生理机制与代谢调控 ■ 071

|                             |     |
|-----------------------------|-----|
| <b>3.1 概述</b>               | 071 |
| <b>3.2 碳中心代谢途径调控过程的生理机制</b> | 072 |
| 3.2.1 葡萄糖转运和磷酸化对碳中心代谢途径的调控  | 073 |
| 3.2.2 糖酵解途径关键酶的代谢特性         | 075 |
| 3.2.3 碳中心代谢途径的辅因子调控机制       | 077 |
| <b>3.3 酸胁迫与高渗胁迫能力强化</b>     | 081 |
| 3.3.1 有机酸发酵过程中的酸胁迫和高渗胁迫     | 081 |
| 3.3.2 微生物应对酸胁迫的主要响应机制       | 083 |
| 3.3.3 微生物应对高渗胁迫的主要响应机制      | 084 |
| 3.3.4 酸胁迫和高渗胁迫对有机酸积累的正调控    | 091 |
| <b>3.4 微生物合成新型有机酸的代谢调控</b>  | 093 |
| 3.4.1 代谢调控的关键作用靶点           | 094 |
| 3.4.2 代谢工程策略                | 095 |
| <b>3.5 小结</b>               | 099 |
| 参考文献                        | 099 |

## 第4章 新型有机酸发酵过程优化与控制 ■ 100

|                    |     |
|--------------------|-----|
| <b>4.1 概述</b>      | 100 |
| <b>4.2 分批发酵技术</b>  | 101 |
| 4.2.1 培养基的设计及优化    | 101 |
| 4.2.2 分批发酵过程的模型化研究 | 108 |

|            |                        |     |
|------------|------------------------|-----|
| <b>4.3</b> | <b>流加发酵技术</b>          | 110 |
| 4.3.1      | 流加发酵技术简介               | 111 |
| 4.3.2      | 流加培养原理                 | 112 |
| 4.3.3      | 发酵过程中常用的流加策略           | 114 |
| <b>4.4</b> | <b>高细胞密度发酵技术</b>       | 119 |
| 4.4.1      | 高细胞密度发酵简介              | 119 |
| 4.4.2      | 高细胞密度培养生长环境的优化策略       | 121 |
| 4.4.3      | 高细胞密度培养的培养模式           | 122 |
| 4.4.4      | 最大细胞密度的理论计算            | 123 |
| <b>4.5</b> | <b>分阶段控制策略</b>         | 128 |
| 4.5.1      | 分阶段发酵模型的建立             | 128 |
| 4.5.2      | 溶氧的分阶段控制               | 129 |
| 4.5.3      | pH 的分阶段控制              | 131 |
| 4.5.4      | 温度的分阶段控制               | 133 |
| <b>4.6</b> | <b>基于复杂生理参数的在线控制策略</b> | 135 |
| 4.6.1      | 生物量的估计                 | 136 |
| 4.6.2      | 噪声测量                   | 136 |
| 4.6.3      | 生物学控制-反馈和前馈            | 136 |
| 4.6.4      | 自适应控制和自适应模型            | 137 |
| 4.6.5      | 故障诊断                   | 137 |
| 4.6.6      | 改进控制的经验方法              | 137 |
| <b>4.7</b> | <b>目标产物原位消除策略</b>      | 138 |
| 4.7.1      | 膜法发酵                   | 138 |
| 4.7.2      | 电渗析发酵                  | 139 |
| 4.7.3      | 提取发酵                   | 140 |
| 4.7.4      | 吸附发酵                   | 141 |
| <b>4.8</b> | <b>小结</b>              | 142 |
|            | 参考文献                   | 142 |

## 第5章 发酵法制备丙酮酸技术 ■ 143

|            |                                            |     |
|------------|--------------------------------------------|-----|
| <b>5.1</b> | <b>概述</b>                                  | 143 |
| <b>5.2</b> | <b>丙酮酸高产菌株育种技术</b>                         | 144 |
| 5.2.1      | 乙酸渗漏型丙酮酸高产菌株的选育                            | 144 |
| 5.2.2      | 氟丙酮酸敏感型丙酮酸高产菌株的选育                          | 147 |
| 5.2.3      | 以无机氮源为唯一氮源丙酮酸高产菌株的选育                       | 147 |
| <b>5.3</b> | <b>辅因子工程技术强化光滑球拟酵母丙酮酸积累速率</b>              | 149 |
| 5.3.1      | 内源 $\text{NAD}^+/\text{H}$ 再生系统对丙酮酸合成过程的影响 | 150 |
| 5.3.2      | 异源 $\text{NAD}^+/\text{H}$ 再生系统对丙酮酸合成过程的影响 | 154 |

|                                         |     |
|-----------------------------------------|-----|
| <b>5.4 代谢工程技术强化光滑球拟酵母高渗透压耐受能力</b> ..... | 164 |
| 5.4.1 高渗胁迫对光滑球拟酵母的系统生物学研究 .....         | 164 |
| 5.4.2 过程优化和代谢工程技术强化光滑球拟酵母渗透压胁迫耐受 .....  | 169 |
| <b>5.5 丙酮酸发酵过程优化策略</b> .....            | 177 |
| 5.5.1 维生素浓度和流加策略的优化 .....               | 177 |
| 5.5.2 葡萄糖流加策略的优化 .....                  | 180 |
| 5.5.3 基于动力学模型温度控制策略的优化 .....            | 186 |
| 5.5.4 分阶段溶氧发酵过程优化策略 .....               | 192 |
| <b>5.6 小结</b> .....                     | 196 |
| 参考文献 .....                              | 197 |

## 第6章 发酵法制备 $\alpha$ -酮戊二酸技术 ■ 198

|                                                               |     |
|---------------------------------------------------------------|-----|
| <b>6.1 概述</b> .....                                           | 198 |
| <b>6.2 <math>\alpha</math>-酮戊二酸高产菌株育种技术</b> .....             | 201 |
| 6.2.1 $\alpha$ -酮戊二酸高产菌株筛选 .....                              | 201 |
| 6.2.2 $\alpha$ -酮戊二酸高产菌株高通量诱变育种 .....                         | 201 |
| <b>6.3 碳中心代谢途径调控强化解脂亚洛酵母生产<math>\alpha</math>-酮戊二酸</b> .....  | 204 |
| 6.3.1 调控乙酰辅酶A代谢促进 $\alpha$ -酮戊二酸的生成 .....                     | 204 |
| 6.3.2 强化丙酮酸回补途径促进 $\alpha$ -酮戊二酸的积累 .....                     | 206 |
| <b>6.4 转运蛋白工程技术强化解脂亚洛酵母胞外积累<math>\alpha</math>-酮戊二酸</b> ..... | 211 |
| <b>6.5 <math>\alpha</math>-酮戊二酸发酵过程优化与放大</b> .....            | 214 |
| 6.5.1 基础发酵过程优化 .....                                          | 215 |
| 6.5.2 分阶段pH控制发酵过程优化策略 .....                                   | 218 |
| 6.5.3 解脂亚洛酵母发酵生产 $\alpha$ -酮戊二酸中试放大 .....                     | 220 |
| <b>6.6 小结</b> .....                                           | 226 |
| 参考文献 .....                                                    | 226 |

## 第7章 发酵法制备丙酸技术 ■ 227

|                                 |     |
|---------------------------------|-----|
| <b>7.1 概述</b> .....             | 227 |
| 7.1.1 丙酸的生产 .....               | 228 |
| 7.1.2 丙酸杆菌 .....                | 229 |
| 7.1.3 微生物细胞响应酸性环境的耐受机制 .....    | 229 |
| 7.1.4 基于组学技术的丙酸杆菌的生理特性研究 .....  | 230 |
| <b>7.2 丙酸高产菌株育种技术</b> .....     | 232 |
| 7.2.1 基因组改组技术简介 .....           | 232 |
| 7.2.2 基因组改组技术提高产酸丙酸杆菌耐酸性能 ..... | 233 |
| <b>7.3 胞内微环境水平的耐酸机制解析</b> ..... | 237 |

|                                    |            |
|------------------------------------|------------|
| 7.3.1 微生物生理学分析 .....               | 237        |
| 7.3.2 基于蛋白质组学的耐酸机制解析 .....         | 240        |
| <b>7.4 基于代谢组学的解析提高丙酸产量 .....</b>   | <b>249</b> |
| 7.4.1 产酸丙酸杆菌改组菌株和原始菌株发酵特性的比较 ..... | 249        |
| 7.4.2 产酸丙酸杆菌代谢组学分析 .....           | 250        |
| 7.4.3 丙酸合成的关键代谢物及代谢途径 .....        | 254        |
| 7.4.4 外源添加关键代谢物提高丙酸产量 .....        | 256        |
| <b>7.5 小结 .....</b>                | <b>259</b> |
| 参考文献 .....                         | 259        |

## 第 8 章 酶转化法制备酮酸 ■ 261

|                                                                                       |            |
|---------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| <b>8.1 概述 .....</b>                                                                   | <b>261</b> |
| <b>8.2 L-氨基酸脱氨酶转化 L-苯丙氨酸生产 <math>\alpha</math>-苯丙酮酸 .....</b>                         | <b>265</b> |
| 8.2.1 <i>P. mirabilis</i> L-氨基酸脱氨酶在大肠杆菌中的表达 .....                                     | 265        |
| 8.2.2 全细胞催化剂转化 L-苯丙氨酸生产 $\alpha$ -苯丙酮酸条件优化 .....                                      | 266        |
| 8.2.3 L-氨基酸脱氨酶定向进化 .....                                                              | 269        |
| 8.2.4 L-氨基酸脱氨酶定点饱和突变 .....                                                            | 270        |
| 8.2.5 大肠杆菌代谢改造 .....                                                                  | 271        |
| <b>8.3 L-氨基酸脱氨酶转化 L-蛋氨酸生产 <math>\alpha</math>-氨酮基-<math>\gamma</math>-甲硫基丁酸 .....</b> | <b>276</b> |
| 8.3.1 <i>P. vulgaris</i> L-氨基酸脱氨酶在大肠杆菌中的表达 .....                                      | 276        |
| 8.3.2 定向进化和定点突变提高催化效率 .....                                                           | 278        |
| 8.3.3 全细胞转化催化剂的细胞固定化 .....                                                            | 280        |
| <b>8.4 L-氨基酸脱氨酶转化 L-谷氨酸生产 <math>\alpha</math>-酮戊二酸 .....</b>                          | <b>281</b> |
| 8.4.1 在枯草芽孢杆菌和大肠杆菌中异源表达 L-氨基酸脱氨酶 .....                                                | 282        |
| 8.4.2 关键条件因素对全细胞转化生产 $\alpha$ -KG 的影响 .....                                           | 283        |
| 8.4.3 阻止底物向胞内的转运以减少细胞催化剂对底物的吸收消耗 .....                                                | 284        |
| 8.4.4 全细胞转化 L-谷氨酸生产 $\alpha$ -KG 的过程优化 .....                                          | 285        |
| <b>8.5 全细胞转化 L-亮氨酸生产 <math>\alpha</math>-酮异己酸 .....</b>                               | <b>286</b> |
| 8.5.1 重组质粒 pET28a-lad 的构建 .....                                                       | 286        |
| 8.5.2 全细胞催化剂的制备及优化 .....                                                              | 286        |
| 8.5.3 全细胞反应条件优化 .....                                                                 | 288        |
| 8.5.4 在过量亮氨酸的条件下的流加策略优化 .....                                                         | 291        |
| 8.5.5 氨基酸脱氨酶催化过程和催化位置分析 .....                                                         | 293        |
| <b>8.6 小结 .....</b>                                                                   | <b>294</b> |
| 参考文献 .....                                                                            | 294        |

# 第 1 章

## 新型有机酸生产技术

### 1.1 概述

#### 1.1.1 有机酸的定义和分类

##### 1.1.1.1 有机酸的定义

有机酸 (organic acids) 是指一些具有酸性的有机化合物。有机酸多溶于水或乙醇, 呈显著的酸性, 难溶于其他有机溶剂。有挥发性或无。在有机酸的水溶液中加入氯化钙或醋酸铅或氢氧化钡溶液时, 能生成水不溶的钙盐、铅盐或钡盐的沉淀。最常见的有机酸是羧酸, 其酸性源于羧基 ( $-\text{COOH}$ )。在植物的叶、根, 特别是果实中广泛分布, 如柑橘、苹果、柠檬、乌梅、五味子、覆盆子等。常见的植物中的有机酸有脂肪族的一元、二元、多元羧酸, 如酒石酸、草酸、苹果酸、枸橼酸、抗坏血酸 (即维生素 C) 等; 亦有芳香族有机酸, 如苯甲酸、水杨酸、咖啡酸等。除少数以游离状态存在外, 一般都与钾、钠、钙等结合成盐, 有些与生物碱类结合成盐。脂肪酸多与甘油结合成酯或与高级醇结合成蜡。有的有机酸是挥发油与树脂的组成成分。

有机酸可与醇反应生成酯。羧基是羧酸的官能团, 除甲酸 ( $\text{HCOOH}$ ) 外, 羧酸可看做是烃分子中的氢原子被羧基取代后的衍生物。可用通式  $(\text{Ar})\text{R}-\text{COOH}$  表示。羧酸在自然界中常以游离状态或以盐、酯的形式广泛存在。羧酸分子中羟基上的氢原子被其他原子或原子团取代的衍生物叫取代羧酸。重要的取代羧酸有卤代酸、羟基酸、酮酸和氨基酸等。磺酸 ( $-\text{SO}_3\text{H}$ )、亚磺酸 ( $\text{RSO}_2\text{H}$ )、硫酸 ( $\text{RCOSH}$ ) 等也属于有机酸。这些化合物中的一部分参与动植物代谢的生命过程, 有些是代谢的中间产物, 有些具有显著的生物活性, 能防病、治病, 有些是有机合成、工农业生产和医药工业的原料。

##### 1.1.1.2 羧酸的分类

(1) 按官能团 羧酸的官能团是羧基, 除甲酸外, 都是由羟基和羧基两部分组成。根据羟基的结构不同, 分为脂肪酸和芳香酸。羧基与脂肪羟基相连接者, 称为脂肪酸; 脂肪酸又根据羟基的不饱和程度分为饱和脂肪酸和不饱和脂肪酸。若脂肪羟基中不含有不饱和键, 则称为饱和脂肪酸; 若脂肪羟基中含有不饱和键, 则称为不饱和

脂肪酸。羧基与芳香羟基相连接者，称为芳香酸。羧酸还可以根据其分子中所含羧基的数目不同分为一元羧酸、二元羧酸和多元羧酸。分子中含有一个羧基的称为一元羧酸；分子中含有两个羧基的称为二元羧酸；把分子中含有两个以上羧基的羧酸统称为多元羧酸。

## (2) 按用途

① 食品工业用有机酸 用于食品工业的产品，如苹果酸，可用配制饮料、果汁，也可用于加工果酱、糖果等。

② 医药工业用有机酸 用于医药工业的产品，如枸橼酸，具有收缩、增固毛细血管并降低其通透性的作用，还能提高凝血功能及血小板数量，缩短凝血时间和出血时间，具有一定的止血作用。

③ 饲料工业用有机酸 用于饲料工业的产品，如乳酸、延胡索酸，作为饲料添加剂使用。

④ 其他工业用有机酸 用于其他工业的产品，如衣康酸，可用于腈纶化纤、树脂、涂料等领域。

## (3) 按原料

① 粮食原料 小麦、玉米、大米、其他粮食。

② 非粮食原料 木薯、马铃薯、高粱、石油、秸秆、玉米芯、废糖蜜、其他非粮食。

## (4) 按生产用菌种

① 细菌发酵生产有机酸 细菌用石油发酵生产柠檬酸，乳酸菌发酵生产乳酸等。

② 酵母发酵生产有机酸 光滑球拟酵母发酵生产丙酮酸，解脂亚洛酵母发酵生产 $\alpha$ -酮戊二酸。

③ 真菌发酵生产有机酸 黑曲霉发酵生产柠檬酸等，土曲霉发酵生产衣康酸。

## (5) 按发酵方式

① 好氧发酵有机酸 柠檬酸、衣康酸、葡萄糖酸等。

② 厌氧发酵有机酸 L-乳酸、乙酸、丁二酸等。

③ 兼性厌氧发酵有机酸 DL-乳酸、酒石酸、苹果酸等。

## (6) 按分子结构

① 一元羧酸 甲酸、乙酸、乳酸、葡萄糖酸、丙酮酸、曲酸、其他有机一元酸。

② 二元羧酸 丁二酸、苹果酸、酒石酸、衣康酸、草酸、马来酸、富马酸、柠康酸、其他有机二元酸。

③ 多元羧酸 柠檬酸、乌头酸、其他有机多元酸。

## (7) 按碳原子数

①  $C_1$  甲酸。

②  $C_2$  乙酸，草酸。

③  $C_3$  丙酸，丙酮酸，丙烯酸，3-羟基丙酸，乳酸。

④  $C_4$  延胡索（富马酸），苹果酸，丁酸，丁二酸（琥珀酸），酒石酸。

⑤  $C_5$  琥珀酸，衣康酸， $\alpha$ -酮戊二酸。

⑥  $C_6$  柠檬酸，抗坏血酸，葡萄糖酸，葡萄糖二酸，草酰乙酸，己二酸，葡萄

糖二酸，乙酰丙酸，曲酸。

⑦ 其他 长链二元酸等。

### 1.1.1.3 羧酸的命名

羧酸常用俗名和系统命名。常用俗名往往是由其来源而得，如干馏蚂蚁得到蚁酸（甲酸），从酿制食用醋中得到醋酸（乙酸）。油脂水解得到高级脂肪酸，如软脂酸（棕榈酸）、硬脂酸、油酸、亚油酸和亚麻酸等。

羧酸的系统命名原则与醛相似。

① 饱和一元脂肪酸的命名

a. 选择含羧基在内的最长碳链作为主链，根据主链碳原子的数目称为某酸。如己酸、丁酸。

b. 从羧基碳原子开始用阿拉伯数字对主链碳原子依次编号，也常用希腊字母，把与羧基直接相连的碳原子的位置定为 $\alpha$ 位，依次为 $\beta$ 、 $\gamma$ 等。如 $\alpha$ -酮戊二酸、 $\gamma$ -氨基丁酸。

c. 有侧链或取代基时，将其位次、数目和名称写于“某酸”之前。如3-羟基丁酸。

② 饱和多元脂肪酸的命名饱和二元脂肪酸的命名是选择含有两个羧基的最长碳链作为主链，称为某二酸。如乙二酸（草酸）、丁二酸（琥珀酸）。

③ 不饱和脂肪酸的命名不饱和脂肪酸命名时，选择含羧基和不饱和键在内的最长碳链为主链，称为某烯酸，并把不饱和键的位置写在“某烯酸”之前。当主链碳原子的数目大于10时，则在中文数字后加个“碳”字。如十八碳四烯酸、二十二碳四烯酸。

④ 芳香酸的命名芳香酸是以脂肪酸为母体，把芳香羟基作为取代基进行命名。如苯甲酸、对苯二甲酸。

## 1.1.2 羧酸的性质

### 1.1.2.1 羧酸的物理性质

常温下，在饱和一元脂肪酸中，甲酸、乙酸、丙酸为具有强烈刺激性气味的无色液体，含4~9个碳原子的羧酸为具有腐败气味的油状液体，癸酸以上为蜡状固体。二元羧酸和芳香酸都是结晶性固体。羧酸的沸点随着相对分子质量的增加而升高。羧酸的沸点比相对分子质量相近的醇为高，如甲酸和乙醇的相对分子质量相同，甲酸的沸点为100.5℃，乙醇的沸点为78.5℃。这是由于羧酸分子间可以形成两个氢键，而且缔合成双分子二聚体，低级的羧酸甚至在气态下即缔合成二聚体。

一元脂肪族羧酸随碳原子数增加，水溶性降低。低级羧酸可与水混溶，高级一元羧酸不溶于水，但能溶于有机溶剂。多元羧酸的水溶性大于相同碳原子的一元酸。

### 1.1.2.2 羧酸的化学性质

羧酸的官能团是羧基，是由羰基和羟基（—OH）相连而成的。但羧酸的性质并

不是羰基和羟基性质的加合，而是具有羧基自身的性质。杂化轨道理论认为，羧基中的碳原子是以  $sp^2$  杂化的。碳原子的 3 个  $sp^2$  杂化轨道分别与 2 个氧原子、1 个羟基的碳原子或 1 个氢原子形成 3 个  $\sigma$  键，并处于同一平面上。羧基碳原子上未参与杂化的 p 轨道与羰基氧原子上的 p 轨道从侧面平行重叠形成  $\Pi$  键。羟基中的氧原子上有一对未共享电子对，可与  $\Pi$  键形成 p- $\Pi$  共轭体系。在 p- $\Pi$  共轭体系中，电子的离域使羟基氧原子上的电子云向羰基转移，导致羟基氧上的电子云密度有所降低，羰基碳上的电子云密度有所增加。因此，p- $\Pi$  共轭效应导致氧氢间电子云更偏向氧原子，增强了氧氢键的极性，有利于羟基中氢原子的解离，故羧酸表现出明显的酸性；并且羰基碳与其相连的两个氧原子间的键长趋于平均化，其正电性减弱，所以羰基的性质不明显，不易与亲核试剂（如 HCN、 $NaHSO_3$  等）发生加成反应。根据羧酸的结构特点，羧酸应具有下列主要的化学性质。

**(1) 酸性** 羧酸显酸性，是由于羧基中的 p- $\Pi$  共轭效应的影响，使羟基氧原子上的电子云密度降低，从而增强了氢氧键的极性，易于解离出质子。解离后生成的羧基负离子，由于氧上的负电荷通过 p- $\Pi$  共轭而得到分散，使其稳定性增加。

羧酸一般都是弱酸，其酸性强弱可以用  $pK_a$  来表示，通常羧酸的  $pK_a$  在 3~5 之间，比强的无机酸弱，但比酚类（苯酚的  $pK_a$  为 9.96）、碳酸（ $pK_a$  为 6.38）要强，因此羧酸能与氢氧化钠、碳酸钠等反应生成羧酸盐，也能与碳酸氢钠反应，同时生成  $CO_2$ ，而酚则不能发生此反应。



羧酸的钠盐、钾盐和铵盐一般易溶于水，制药工业中常利用此性质，将水溶性差的药物转变成易溶于水的羧酸盐，以便制备注射剂使用。例如含有羧基的青霉素 G 的水溶性极差，转变成钾盐或钠盐后水溶性增强，便于临床使用。

**(2) 羧基中羟基的取代反应** 羧基中的羟基在一定条件下，可被羟氧基（—OR）、卤素（—X）和酰氧基取代，分别生成酯、酰卤和酸酐等羧酸衍生物。

羧酸与醇在强酸（如硫酸等）催化下，生成酯和水的反应，称为酯化反应。该反应是羧酸分子中羧基上的羟基与醇分子中羟基上的氢原子结合生成水，其余部分结合生成酯。酯化反应是可逆反应，其逆反应是水解反应，即酯水解为羧酸和醇。酯化反应的速度很慢，在通常情况下，该可逆反应需要很长时间才能达到平衡。为了加快反应速率、缩短到达平衡的时间，常加入浓硫酸等作催化剂，并在加热的条件下进行。羧酸与醇发生酯化反应，生成的酯称为羧酸酯。一般所称的酯，通常是指羧酸酯。从结构上分析，酯可以看做是由酰基和羟氧基组成的化合物。酰基是指羧酸分子中去掉羧基上的羰基后剩余的部分。羧酸酯根据分子中相应的羧酸和醇来命名，称“某酸某酯”。

羧酸可以和磷的卤化物（如五氯化磷、三氯化磷和氯化亚砷等）发生反应生成酰卤。

一元羧酸除甲酸外与脱水剂（如五氧化二磷等）共热，两个分子羧酸间脱去 1 个分子水生成酸酐。某些二元羧酸加热，也发生分子内脱水，生成较稳定的具有五元或六元环的酸酐。

羧酸分子中的 $\alpha$ -碳原子上的氢原子具有一定的活泼性。但因羧基中的羟基与羰基形成p- $\pi$ 共轭体系,使羧基碳上的电子云密度从羟基氧原子上得到部分补充。因而羧酸 $\alpha$ -氢原子的活性较醛酮的 $\alpha$ -氢原子弱,发生在该处的取代反应也较醛酮为慢。例如羧酸 $\alpha$ 氢原子的卤代反应常常需在催化剂(如红磷等)的存在下才能进行,生成 $\alpha$ -卤代酸,且 $\alpha$ -氢原子是逐步被取代的。

(3) **脱羧反应** 羧酸分子经加热脱去羧基放出二氧化碳的反应称为脱羧反应。通常一元脂肪酸比较稳定,不易发生脱羧反应。但在特殊的条件下,如碱石灰(氢氧化钠和氧化钙混合物)与乙酸钠共热,则可脱羧生成甲烷。芳香羧酸比较容易脱羧,由于苯环与羧基之间的吸电子作用,有利于羧基与苯环之间的键断裂,尤其是2,4,6-三硝基苯甲酸更容易脱羧而形成1,3,5-三硝基苯。脱羧反应在生物体内的许多生化反应中占有重要地位,此反应在生物体内脱羧酶作用下进行的。

(4) **二元羧酸的热解反应** 二元羧酸除可以发生羧基的所有反应外,由于分子中两个羧基的相互影响,具有某些特殊性质。二元羧酸对热不稳定,当加热这类羧酸时,随着两个羧基间碳原子数的不同,可发生不同的反应。有的发生脱羧反应,有的发生脱水反应,有的脱羧反应与脱水反应同时进行。

乙二酸、丙二酸受热时,发生脱羧反应,生成少1个碳原子的一元羧酸。丁二酸、戊二酸加热时分子内不发生脱羧反应而发生脱水反应,生成环状的酸酐。

己二酸、庚二酸在 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 存在下加热时,则分子内脱水和脱羧生成环酮。含8个以上碳原子的脂肪二元酸受热时,不能发生上述反应生成大于六元的环酮,而是分子间脱水,生成高分子链状的缩合酸酐。这说明,在有可能形成环状化合物的条件下,都有一种形成张力较小的五元环或六元环的趋势。

## 1.2 发酵法生产有机酸的历史与现状

有机酸作为一类重要的产品,可广泛应用于食品、化工、农药、医药、饲料等工业部门。如柠檬酸、苹果酸、曲酸等可作为食品添加剂的酸味剂,柠檬酸还可作为防腐剂、抗氧化剂增效剂、护色剂等。乳酸、醋酸、富马酸、丙酮酸、衣康酸、琥珀酸等可作为重要的化工中间体,用于生产具有特殊功能的有机高分子材料、医药、农药、染料等。有些有机酸具有特殊的营养保健功能,或可作为药物使用。如L-苹果酸具有抗疲劳、保护心脏、促进羧酸盐的代谢、促进线粒体呼吸、改善记忆能力、增强钙的活性、降低抗癌药物的毒副作用、增强机体抗氧化能力等生理功能;可作为治疗肝功能不全、肝衰竭、肝癌,特别是多氨症的有效药物。丙酮酸则因其特殊的瘦身减肥功能而受到追捧。

有机酸的传统用途是用作食品添加剂用的酸味剂。除食醋直接作调味品外,以柠檬酸最为典型,其他许多小品种有机酸亦以酸味剂为其重要用途。目前发酵有机酸的主要市场仍然是在食品中的应用,这是化工方法生产的有机酸所不能替代的。塑料与人类生活息息相关,充分体现了化学化工100年来对世界做出的杰出贡献。但是也带来了负面影响,造成了严重的环境危害。与石油化工高分子材料相比,生物高分子材

料具有原料可再生、产品可生物降解的特点。生物降解塑料是一种新型环保材料，可以被自然界的多种微生物或动植物体内的酶分解、代谢，最终转化为二氧化碳和水而回归环境，能从根本上解决塑料污染的问题。典型的生物高分子材料是传统化学聚合技术和工业发酵技术完美结合的产品。工业发酵可以直接生物合成聚合物，但通常是用发酵方法合成高分子材料的单体，再通过化学方法使单体聚合为高分子材料。发酵有机酸是生物高分子材料的重要单体之一。

### 1.2.1 有机酸与人类文明发展

有机酸的使用可以追溯到史前文明时代。原始人类就发现很多果实中具有因柠檬酸等有机酸导致的强烈的酸味及防腐效果，并应用于食品加工和贮藏过程中。有机酸发酵历史悠久。早在远古时代，人们就可以酿造出不同风味的醋，如葡萄醋、米醋和蜜醋等。随着对微生物的研究进展，人们陆续发现霉菌和细菌可以利用葡萄糖等碳水化合物生成多种有机酸。人们最早大量进行发酵法生产的有机酸是乙酸（醋酸）。而柠檬酸是现代发酵工业首个实现大规模生产的有机酸。

#### 1.2.1.1 乙酸的发现与发酵法生产

醋几乎贯穿了整个人类文明史。在全世界范围内都可以找到乙酸发酵细菌（醋酸杆菌）。每个民族在酿酒的时候，不可避免地会发现由于酒精饮料暴露于空气后导致的酸化现象。在中国，传说杜康的儿子黑塔曾因酿酒时间过长得到醋。在古罗马，人们将发酸的酒放在铅制容器中煮沸，能得到一种高甜度的糖浆，叫做“sapa”。“sapa”富含一种有甜味的铅糖，即乙酸铅，这导致了罗马贵族大范围的铅中毒现象。公元8世纪时，波斯炼金术士贾比尔，用蒸馏法浓缩了醋中的乙酸。

文艺复兴时期，人们通过金属醋酸盐的干馏制备冰醋酸。16世纪德国炼金术士安德烈亚斯·利巴菲乌斯（Andreas Libavius）就描述了这种方法，并且拿由这种方法产生的冰醋酸来和由醋中提取的酸相比较。仅仅是因为水的存在，导致了醋酸的性质发生如此大的改变，以至于在几个世纪里，化学家们都认为这是两个截然不同的物质。法国化学家阿迪（Pierre Adet）证明了它们两个是相同的。

1847年，德国科学家阿道夫·威廉·赫尔曼·科尔贝（Adolph Wilhelm Hermann Kolbe）第一次通过无机原料合成了乙酸。这个反应的历程首先是二硫化碳经过氯化转化为四氯化碳，接着是四氯乙烯的高温分解后水解并氯化，产生三氯乙酸，最后一步通过电解还原产生乙酸。1910年时，大部分的冰醋酸提取自干馏木材得到的煤焦油。首先是将煤焦油通过氢氧化钙处理，然后将形成的乙酸钙用硫酸酸化，得到其中的乙酸。在这个时期，德国生产了约10000t的冰醋酸，其中30%被用来制造靛青染料。目前每年世界范围内的乙酸需求量在650万吨左右。其中大约150万吨是循环再利用的，剩下的500万吨是通过石化原料直接制取或通过生物发酵制取。

#### 1.2.1.2 柠檬酸的发现与发酵法生产

现代发酵工业最早实现发酵法生产的有机酸是柠檬酸。柠檬酸的发现始于8世纪

波斯炼金术士阿布·穆萨·贾比尔·伊本·哈扬。到了1784年，柠檬酸被卡尔·威廉·舍勒（Carl Wilhelm Scheele）首次从柠檬汁中结晶分离出来。19世纪中期，路易斯·巴斯德（Louis Pasteur）就发现某些微生物可以大量地在胞外积累有机酸，并导致葡萄酒的酸败。柠檬酸的工业制造开始于1890年的意大利柠檬汁工厂。

1891年，德国科学家 Wehmer 首先发现一种青霉菌（*Penicillium* sp.）能以糖类为原料积累柠檬酸，随后开始了发酵法生产的研究。然而，直到第一次世界大战阻碍了意大利的柠檬出口之前，在工业上利用微生物制造柠檬酸都没有被提上日程。1917年，美国食品化学家 James Corey 发现某些类型的黑曲霉（*Aspergillus niger*）可以高效地制造柠檬酸。1919年，美国辉瑞（Pfizer）公司开始用浅盘法大规模生产。黑曲霉在含有蔗糖或葡萄糖的培养基中进行培养，可以积累柠檬酸。糖类的来源包括玉米浆、糖蜜发酵液、玉米粉的水解产物或其他廉价的糖类溶液等。在去除菌体之后，向剩余的溶液中加入氢氧化钙，使柠檬酸反应生成柠檬酸钙沉淀，分离出沉淀之后再加入硫酸就可以得到柠檬酸。这一制造技术在1990年左右仍然是柠檬酸最主要的工业规模制造方法。硫酸钙沉淀工艺直到20世纪90年代才逐渐被色谱法和膜法取代。

20世纪30年代开始，逐步阐明三羧酸循环（TCA循环）的每一步反应都有相应酶催化。如果采用某种方法阻断TCA循环中的某一步反应，就会大量积累相应的中间代谢物。基于这一原理，结合代谢控制育种现已能用发酵法制备柠檬酸、异柠檬酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、琥珀酸、苹果酸、延胡索酸等TCA循环中的有机酸。此外，一些微生物特有的代谢途径，可以合成一些大部分微生物中不存在的有机酸，如解脂亚洛酵母能利用奇数烃生成甲基柠檬酸和甲基异柠檬酸。醋酸杆菌、假单胞杆菌以及青霉等，可以把基质中的羟基、醛基、甲基等氧化生成羧基，生成一些大部分微生物不能自身合成的有机酸。进入20世纪70年代，由于食品、医药、化学合成等工业的发展，有机酸需求骤增，发酵生产有机酸逐渐发展成为近代重要的工业领域。目前大约有二十多种有机酸已可用发酵法进行工业生产。有机酸发酵工业是生物工程领域中的一个重要且较为成熟的分支，在世界经济发展中，占有一定的地位。

我国是世界上最早利用和发酵生产有机酸的国家之一，由于有机酸发酵是生物体内的基本代谢过程，又和人民群众的生活密切相关，半个多世纪以来，有机酸工业从无到有，尤其是近20年出现了蓬勃发展的趋势。1968年，我国利用薯干粉原料深层发酵生产柠檬酸获得成功，成为我国柠檬酸生产的一大特色。自2010年以来，我国柠檬酸年产量稳定在100万吨左右，占世界产量的65%左右，稳居全球最大的柠檬酸生产国地位。由于我国柠檬酸产能增长过快，已出现严重的供大于求局面。目前，全国柠檬酸产能已过剩30%~40%，设备利用率不足60%，再加上技术创新滞后及国际市场竞争激烈，柠檬酸产业经济效益呈下滑态势。

### 1.2.2 主要有机酸市场情况

生物发酵是生物产业的重要组成部分。经过几十年的发展，尤其是近20年的快速增长，已经发展成为一个重要的工业体系。生物发酵产业2013年产值接近3000亿