

# 微生物催化合成丙烯酸的研究进展\*

## Advances in the Research of Acrylic Acid Production by Microbial Catalysis

谢能中, 王青艳, 朱绮霞, 秦艳, 陈东, 李亿, 黄日波\*\*

XIE Neng-zhong, WANG Qing-yan, ZHU Qi-xia, QIN Yan, CHEN Dong, LI Yi, HUANG Ri-bo

(广西科学院国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

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

**摘要:** 丙烯酸是一种重要的平台化合物, 从它出发可以合成一系列市场广阔、附加值高的产品。传统的丙烯酸化学合成法以不可再生的化石资源为原料, 并对环境造成严重污染。本文从可持续发展及环境保护的角度出发, 综述丙烯酸的微生物合成途径以及合成关键酶等方面的研究进展, 分析探讨不同生物合成途径的优劣之处, 并展望利用微生物高产丙烯酸存在的瓶颈以及有潜力的发展方向。

**关键词:** 丙烯酸 平台化合物 微生物催化 可再生资源 代谢工程

中图分类号: TQ225.13<sup>+</sup>1 文献标识码: A 文章编号: 1002-7378(2013)03-0149-05

**Abstract:** Acrylic acid, an important platform chemical with considerable value and huge market demand, is widely used in synthesizing a series of commodity chemical. Acrylic acid is conventionally produced from the petrochemical industry. Unfortunately, petrochemical carbon sources are not renewable and cause serious environmental pollution. In this review, research developments on different biosynthetic pathways and enzymes for acrylic acid, were discussed. In addition, the advantages and disadvantages of each pathway were compared and explained. Finally, the existing bottlenecks in biosynthesis of high-yield acrylic acid, and the potential development direction in this field were elucidated.

**Key words:** acrylic acid, platform chemical, microbial catalysis, renewable carbohydrates, metabolic engineering

### 丙烯酸(Acrylic Acid)作为重要的三碳平台化

收稿日期: 2013-06-10

作者简介: 谢能中(1981-), 男, 博士, 主要从事合成生物学和代谢工程, 开发先进的微生物技术路线, 生产生物基平台化合物和绿色能源的研究。

\* 广西千亿元重大科技攻关工程项目(桂科攻 11107008-4), 广西自然科学基金项目(2012GXNSFBA053063、2013GXNSFDA019007), 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科重 12118004-3、桂科重 12118004-4、桂科重 1348004-5), 广西科学院基本科研业务费项目(12YJ25SW01、12YJ25SW02)资助。

\*\* 通讯作者: 黄日波(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事酶工程研究。Email: rbhuang@gxas.ac.cn.

合物, 是重要的有机合成原料及合成树脂单体。其分子具有特殊的双键结构和酸性官能团, 化学性质活泼, 易于进行聚合、酯化等反应, 其聚合物具有无色透明、粘性、弹性、对光稳定、不易风化等特点。利用这些特性, 丙烯酸可以合成一系列高附加值的产品, 广泛应用于涂料、合成纤维、合成橡胶、塑料、皮革、造纸、粘合剂、包装材料、水处理、冶金采矿、日用化工产品等领域。全球丙烯酸年产量达到 420 万 t, 这在有机化学产品的排名中居第 25 位, 而且其市场需求量还在不断增加<sup>[1]</sup>。

目前,全球所有丙烯酸大型生产装置均采用丙烯氧化法生产,其原料来源于不可再生的化石资源,并会产生大量的 $\text{CO}_2$ 、 $\text{SO}_x$ 、 $\text{NO}_x$ 。随着能源危机的加剧以及人们环保意识的增强,研究者从可持续发展和环境保护角度出发,利用生物技术方法展开了微生物催化合成丙烯酸的研究<sup>[2]</sup>。与化学法相比,环境友好的微生物法具有低污染、低能耗且工艺相对简单的优点,符合社会可持续发展的要求,最终有可能成为丙烯酸工业化生产的主要途径<sup>[3]</sup>。本文简要综述利用微生物催化合成法生产丙烯酸的研究和进展,并对未来生物合成方法进行展望,为后续研究提供参考。

## 1 乳酸辅酶 A 途径

乳酸可作为丙烯酸生产的可再生中间原料。用厌氧发酵法生产乳酸始于 19 世纪 80 年代,以葡萄糖为碳源,乳酸的实际转化率接近 90%,目前已实现大规模低成本生产。利用乳酸化学催化脱水可以生成丙烯酸,但化学过程的缺点是要求高温,并且丙烯酸产率也不高。研究者发现在严格的厌氧条件下,丙酸梭菌(*Clostridium propionicum*)等厌氧菌可以还原乳酸产生丙酸,乳酸辅酶 A 和丙酰辅酶 A 是中间代谢产物<sup>[4]</sup>。从图 1 可以看出,乳酸辅酶 A 途径涉及两条平行的路线:氧化路线和还原路线。在氧化路线中,乳酸在乳酸脱氢酶等酶的作用下最终被氧化成为乙酸。这个过程会产生 4 个电子和 4 个质子,以及维持菌体生长和繁殖所需的腺嘌呤核苷三磷酸。而通过相应的还原路线可以得到这些电子的受体——丙酰辅酶 A,后者接受电子后被还原成为丙酰辅酶 A,最后脱辅酶 A 得到丙酸。氧化路线和还原路线通过还原当量相连接,成为一个偶联的过程,使得整个乳酸辅酶 A 途径达到氧化还原平衡。由于两条路线相互偶联,因此不能单从还原路线上孤立地分析丙烯酸的生成,而应从整个代谢途径上分析产物形成与菌体生长及副产物之间的关系。在这个代谢过程中,每 3 mol 的乳酸会最终转化成 1 mol 乙酸和 2 mol 丙酸<sup>[3]</sup>。丙酰辅酶 A 是还原路线的一个中间代谢产物,一般情况下它会在丙酰辅酶 A 脱氢酶的作用下接受电子成为丙酰辅酶 A。丙酰辅酶 A 脱氢酶抑制剂的加入,能够导致丙酰辅酶 A 的积累,这样便有利于形成丙烯酸。3-丁炔酸是一种研究得比较多的抑制剂,它可以有效地抑制丙酰辅酶 A 脱氢酶的活性<sup>[4,5]</sup>。

然而,通过乳酸还原的途径来产生丙烯酸还存

在一些问题。其中最大障碍在于辅酶再生,因为在乳酸向乙酸转化的过程中,会产生大量的还原型辅酶,如果没有足够多的受体接受电子,就不能维持氧化还原的平衡从而抑制菌体的生长。这就促使了丙酰辅酶 A 接受电子还原为丙酰辅酶 A,而非脱辅酶 A 成为丙烯酸。所以,在没有其他电子受体存在的条件下,丙酰辅酶 A 最终会全部还原成为丙酸而不是丙烯酸。许多研究集中在寻找外源电子受体,如亚甲基蓝的加入可以代替丙酰辅酶 A 接受电子,最终可以积累 2 mM 的丙烯酸<sup>[4]</sup>。其次是平衡系数的问题。在乳酸辅酶 A 脱水成为丙酰辅酶 A 的反应中,丙酰辅酶 A 和乳酸辅酶 A 摩尔浓度之比只有 0.5%<sup>[6]</sup>,过低浓度的丙酰辅酶 A 影响了丙烯酸的进一步转化。利用化学催化的方法使乳酸脱水同样受到低平衡比率的影响<sup>[7]</sup>。此外,在阻断丙酰辅酶 A 脱氢成为丙酰辅酶 A 反应的研究中,3-丁炔酸是一个比较有效的丙酰辅酶 A 脱氢酶抑制剂,但是需要加入的量很大( $> 10\text{mM}$ )<sup>[4,5]</sup>,所以仍需要寻找更理想的酶活抑制剂。

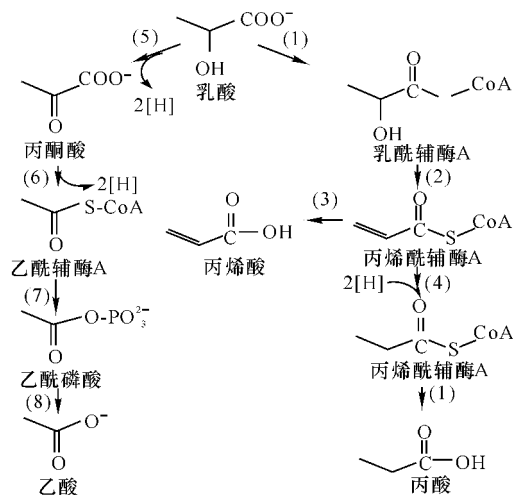


图 1 丙酸梭菌中的乳酸辅酶 A 途径<sup>[4]</sup>

(1)丙酰辅酶 A 转移酶;(2)乳酸辅酶 A 脱水酶;(3)丙酰辅酶 A 转移酶;(4)丙酰辅酶 A 脱氢酶;(5)(R)-乳酸脱氢酶;(6)丙酮酸脱羧酶复合物;(7)磷酸乙酰转移酶;(8)乙酸激酶。

## 2 丙酸氧化途径

在有氧条件下,丙酸梭菌等微生物可以将丙酸氧化成为丙酰辅酶 A,后者结合一分子水成为乳酸辅酶 A 或者 3-羟基丙酰辅酶 A,接着可以进一步被氧化成为乙酰辅酶 A 而进入三羧酸循环。图 2 是研究者推测的丙酸氧化途径<sup>[8]</sup>,一般被认为是乳酸辅酶 A 途径的逆反应。由于这些微生物还同时

具有丙烯酰辅酶 A 转移酶的活力,丙烯酰辅酶 A 也能够脱辅酶 A 成为丙烯酸。1980 年 Dalal 等<sup>[9]</sup>利用丙酸梭菌休止细胞转化丙酸,在有氧条件下可以积累 3 g/L 丙烯酸。O'Brien 等<sup>[10]</sup>也做了类似的研究,他们收集在严格厌氧条件下生长起来的丙酸梭菌作为休止细胞,在氧气和亚甲基蓝同时存在的条件下,每克休止细胞反应 6 h 可以积累 0.133 mol 丙烯酸,转化率为 18.5%。利用丙酸氧化途径生产丙烯酸会遇到与乳酰辅酶 A 途径类似的问题,就是需要添加亚甲基蓝等电子受体来实现氧化型辅酶的再生。

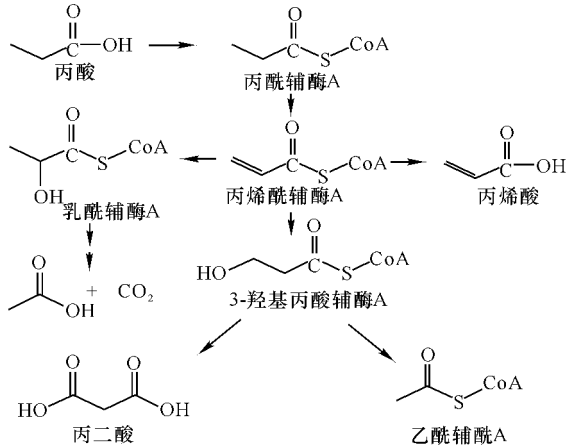


图 2 推测的丙酸氧化途径<sup>[8]</sup>

### 3 3-羟基丙酸途径

3-羟基丙酸循环是在绿色丝状菌 (*Chloroflexus aurantiacus*)、布氏酸菌 (*Acidianus brierleyi*)、瑟杜生金属球菌 (*Metallospira sedula*)、双能酸菌 (*Acidianus ambivalens*)、硫化叶菌 (*Sulfolobus* sp.) VE6、金属硫化叶菌 (*Sulfolobus metallicus*) 等自养生物中发现的二氧化碳固定途径(图 3),丙烯酰辅酶 A 是该循环的一个中间代谢产物<sup>[11]</sup>。绿色丝状菌可以将少量的 3-羟基丙酸分泌到胞外,这表明结合分泌机理和基因组信息,我们也许能够找到生产该循环中各种代谢产物的方法<sup>[11]</sup>。在这个循环中,3-羟基丙酸首先转化为 3-羟基丙酰辅酶 A,后者在 3-羟基丙酰辅酶 A 脱水酶的作用下脱水成为丙烯酰辅酶 A,紧接着被还原成丙酰辅酶 A。该途径的优势是能够利用光合作用不断地将二氧化碳转化为 3-羟基丙酸循环的各种中间代谢产物,节约了碳源,并且有利于保护环境。如果利用代谢工程和辅酶工程对菌株的光合模块、二氧化碳固定模块、3-羟基丙酸循环等代谢途径进行优化,通过遗传修饰与改造有效

提高二氧化碳的固定效率和丙烯酰辅酶 A 的合成通量,同时异源表达丙烯酰辅酶 A 转移酶就可以实现丙烯酸的高效生产<sup>[11]</sup>。

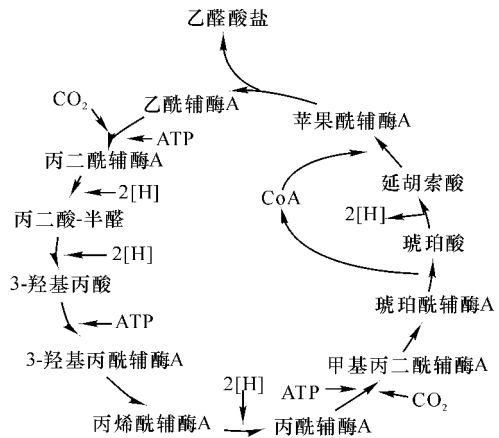


图 3 绿色丝状菌中的 3-羟基丙酸循环<sup>[11]</sup>

### 4 丙烯酰胺与丙烯腈转化途径

丙烯酰胺与丙烯腈是以化石资源为原料得到的产品,研究者发现有些微生物可以利用其代谢产生丙烯酸。红球菌 (*Rhodococcus*) AJ270 是一株可在以乙酰胺为主要碳源的培养基中生长的菌株,其产生的酰胺酶能够转化丙烯酰胺生成丙烯酸。Colby 等<sup>[12]</sup>采用树脂对 AJ270 菌株进行吸附催化丙烯酰胺合成丙烯酸,发现分步加入丙烯酰胺比一次性加入丙烯酰胺能获得更高的丙烯酸浓度,丙烯腈的水解率从 59% 提高到 66%。

到目前为止,微生物法合成丙烯酸的途径中产量最高的是利用玫瑰红红球菌 (*Rhodococcus rhodochrous*) 催化丙烯腈。该菌在诱导的条件下能够产生高活力的腈水解酶催化丙烯腈生成丙烯酸。Nagasawa 等<sup>[13]</sup>利用玫瑰红红球菌进行丙烯腈补料转化,丙烯酸的产量达到了 390 g/L。研究者进一步将腈水解酶在大肠杆菌中进行过量表达,发现该酶可以催化各种腈类化合物产生对应的羧酸,对发酵条件进行优化,能够获得更高产量的丙烯酸<sup>[14]</sup>。罗晖等<sup>[15]</sup>采用诱变方法得到一株名为玫瑰红红球菌 tg1-A6 突变株,在培养温度 28℃、初始 pH 值 7.0、摇床转速 200 r/min、种龄 20 h、接种量 6% 条件下,腈水解酶活力达到 21.96 U/ml。在 100 ml 反应体系中经过 10 h 连续 43 次补加底物丙烯腈,丙烯酸的产量达到了目前报道的最高水平 414.5 g/L。

此外,研究者<sup>[16]</sup>发现硝基愈疮木胶节杆菌 (*Arthrobacter nitroguajacolicus*) 也能够转化丙烯

腈成为丙烯酸。该菌的腈水解酶最适转化 pH 值为 7.6, 最适转化温度为 40°C, 其活力受到  $Hg^{2+}$ 、 $Ag^{+}$  和  $Cu^{2+}$  的强烈抑制, 而被  $Ni^{2+}$  和  $Ca^{2+}$  所激活, 1 mM 浓度的  $Ni^{2+}$  或  $Ca^{2+}$  能够提高 163% 和 158% 的酶活力。利用微生物转化丙烯腈生产丙烯酸, 具有腈水解酶专一性强、反应条件温和、流程简单、副产物少、转化率高、环境友好的优点, 但需要以化石产品为原料, 与当前可持续发展的思路不相符。

## 5 微生物直接发酵糖产生丙烯酸

微生物直接发酵糖产生丙烯酸是将淀粉、纤维素等可再生资源降解为葡萄糖, 然后进一步发酵产生丙烯酸(图 4)。在许多生物体中, 丙烯酸主要以辅酶 A 酯的形式存在, 后者是一种相当常见的电子受体<sup>[4]</sup>。Straathof 等<sup>[1]</sup>对这些代谢途径进行分析, 总结了从可再生资源出发到丙烯酸的不同代谢途径, 其中一些代谢途径(如乙酰辅酶 A 途径)已经得到证实, 另外的只是推测的途径(如  $\beta$ -丙酮酰辅酶 A 途径), 这些途径具体的代谢过程还不是很清楚。在微生物和藻类中葡萄糖首先被代谢成为丙酮酸这个重要的中间代谢产物。从丙酮酸出发, 某些微生物或者藻类可以在特定的条件下经过不同的代谢途径来积累丙烯酰辅酶 A, 最后在丙烯酰辅酶 A 转移酶的作用下得到目的产物丙烯酸。这些代谢途径可以简单的分为 5 类: 乙酰辅酶 A 途径、丙酮酸氧化途径、 $\beta$ -丙酮酰辅酶 A 途径、3-羟基丙酮酸途径和二甲基磺基丙酮酸酯(Dimethylsulfoniopropionate, DMSP)途径。

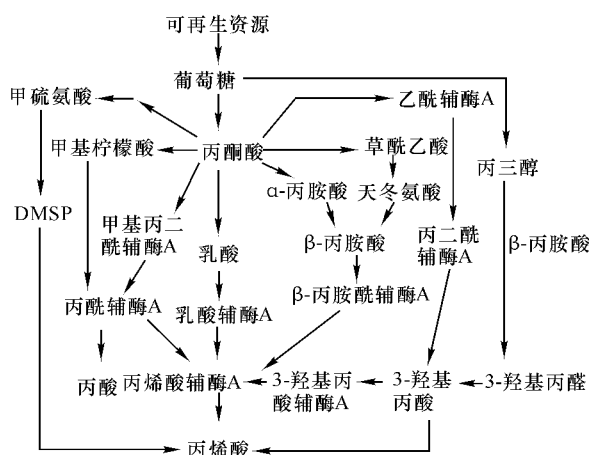


图 4 利用可再生资源生产丙烯酸的代谢途径<sup>[1]</sup>

目前发现埃氏巨型球形菌(*Megasphaera elsdenii*)可以直接发酵葡萄糖产丙烯酸。当培养基添加阻断剂 3-丁炔酸的情况下, 加入 6 mM 电子受体亚甲基蓝, 丙烯酸产量提高了 36.5%<sup>[17]</sup>。此

外, 加入甲萘醌、蒽醌、联苯醌作为电子受体替代亚甲基蓝, 培养基中能够分别积累 8.39 mM、6.12 mM、5.44 mM 的丙烯酸<sup>[18]</sup>。

## 6 总结与展望

我国是近 10a 来全球丙烯酸产业发展最快的国家, 2010 年产量到 102.8 万 t(占世界总产能的 22.1%), 10a 平均增长率高达 23.3%。随着丙烯酸产业链不断延长, 下游产品需求量的不断增长, 我国丙烯酸市场未来仍将继续发展, 预计未来 5a 内将保持 14% 的增长速度<sup>[19]</sup>。然而, 随着化石资源的日益枯竭以及人们环保意识的逐渐增强, 迫切需要大力开展可再生资源生物转化生产丙烯酸的研究, 这是走可持续发展道路的前提条件。

利用微生物直接发酵糖生产丙烯酸的方法不但避免了使用化石产品为原料, 也解决了环境污染的问题, 具有发酵条件温和、产物分离工艺流程简单、原料可再生和来源广阔成本低等优点, 是未来生物法生产丙烯酸的研究热点。但该途径目前存在以下问题: (1) 丙烯酸具有成对的双键结构而被认为是 Michael 电子受体, 能够与谷胱甘肽反应导致后者在体内的损耗, 因此几乎对所有的生物都有毒害性<sup>[20]</sup>; (2) 微生物代谢网络复杂, 丙烯酸产率较低, 如何实现丙烯酸的低成本生物制造是一个非常严峻的问题。

传统的针对单个或几个基因的过量表达或敲除不一定能获得预期增强主产物代谢途径的效果, 如何利用后基因组时代的代谢工程、系统生物学和合成生物学手段构建能高效生产丙烯酸的细胞工厂是解决这些问题的关键所在。近年来, 高通量、低成本的基因测序及合成技术发展与公司化运作推动了微生物基因组测序的快速发展, 几乎所有重要工业微生物模式种的基因组全序列和相应的代谢途径都已经或即将公布。基因组学、转录组学、蛋白组学和代谢组学的飞速发展, 有助于人们鉴别微生物体内各种分子及其相互作用, 解析代谢途径、模块、网络的功能和调控机制, 最终完成整个微生物代谢活动的路线图<sup>[21]</sup>。在深刻认识细胞整体及代谢特性的前提下, 研究者能够设计新的代谢途径并阻断副产物代谢途径, 设计、构建和优化以获得更加简单和高效的细胞工厂, 最终利用糖蜜、纤维素等廉价可再生原料实现丙烯酸的大规模、低成本、环境友好和可持续性生产。

微生物的选择性、抗逆性及发酵性能可以通过

选择性压力<sup>[22]</sup>、基因重排<sup>[23]</sup>及上述的代谢工程、系统生物学和合成生物学手段得到大幅提升。更高强度的菌株发酵速率可以结合过程工艺的优化来实现,例如原位分离技术的使用一方面可以解除产物对菌体的毒性,降低丙烯酸发酵菌株的抑制,另一方面还可以推动酶反应向丙烯酸的方向进行,显著提高发酵强度和转化率,这将是丙烯酸和其他大宗有机酸实现高强度、低成本发酵的一个技术方向。

#### 参考文献:

- [1] Straathof A J, Sie S, Franco T T, et al. Feasibility of acrylic acid production by fermentation[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 67(6): 727-734.
- [2] Willke T, Vorlop K D. Industrial bioconversion of renewable resources as an alternative to conventional chemistry[J]. Appl Microbiol Biotech, 2004, 66: 131-142.
- [3] Xu Z, Zhu L, Chen H. Acrylic acid[M]//Murray Moo Young. Comprehensive Biotechnology: Second Edition, Elsevier, 2011, 3: 201-206.
- [4] Danner H, Urmos M, Gartner M, et al. Biotechnological production of acrylic acid from biomass[J]. Appl Biochem Biotechnol, 1998, 70-72: 887-894.
- [5] Akedo M, Cooney C L, Sinskey A J. Direct demonstration of lactate-acrylate interconversion in *Clostridium propionicum* [J]. Biotechnology, 1983, 1: 791-794.
- [6] Schweiger G, Buckel W. Identification of acrylate, the product of the dehydration of (R)-lactate catalyzed by cell-free extracts from *Clostridium propionicum* [J]. FEBS Lett, 1985, 185: 253-256.
- [7] Varadarajan S, Miller D J. Catalytic upgrading of fermentation-derived organic acids[J]. Biotechnol Prog, 1999, 15: 845-854.
- [8] Akedo M. Biological formation of acrylic acid by *Clostridium propionicum* [D]. Dissertation, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, 1983.
- [9] Dalal R K, Akedo M, Cooney C L, et al. A microbial route for acrylic acid production[J]. Biosources Dig, 1980, 2: 89-97.
- [10] O'Brien D J, Panzer C C, Eisele W P. Biological production of acrylic acid from cheese whey by resting cells of *Clostridium propionicum* [J]. Biotechnol Prog, 1990, 6: 237-242.
- [11] Ishii M, Chuakrut S, Arai H, et al. Occurrence, biochemistry and possible biotechnological application of the 3-hydroxypropionate cycle[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2004, 64: 605-610.
- [12] Colby J, Snell D, Black G W. Immobilization of *Rhodococcus* AJ270 and use of entrapped biocatalyst for the production of acrylic acid[J]. Chemistry Monthly, 2000, 131: 655-666.
- [13] Nagasawa T, Nakamura T, Yamada H. Production of acrylic acid and methacrylic acid using *Rhodococcus rhodochrous* J1 nitrilase[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 34: 322-324.
- [14] Luo H, Fan L, Chang Y H, et al. Gene cloning overexpression, and characterization of the nitrilase from *Rhodococcus rhodochrous* tg1-A6 in *E. coli* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2010, 160(2): 393-400.
- [15] 罗晖, 王铁钢, 于慧敏, 等. *Rhodococcus rhodochrous* tg1-A6 腈水解酶的表达和催化研究[J]. 现代化工, 2006, 26: 109-113.
- [16] Shen M, Zheng Y G, Shen Y C. Isolation and characterization of a novel *Arthrobacter nitroguajacolicus* ZJUTB06-99, capable of converting acrylonitrile to acrylic acid[J]. Process Biochem, 2009, 44: 781-785.
- [17] 李晶. 埃氏巨球形菌发酵法生产丙烯酸研究[D]. 北京: 北京化工大学生命科学与技术学院, 2008.
- [18] 袁其朋, 李晶. 一种利用细菌发酵生产丙烯酸的方法: 中国, CN 101555496[P]. 2009-10-14.
- [19] 春梅, 李欣平. 关于我国丙烯酸产业发展的几点思考[J]. 现代化工, 2011, 31: 6-11.
- [20] Freidig A P, Verhaar H J M, Hermens J L M. Comparing the potency of chemicals with multiple modes of action in aquatic toxicology: acute toxicity due to narcosis versus reactive toxicity of acrylic compounds [J]. Environ Sci Technol, 1999, 33: 3038-3043.
- [21] 张延平, 李寅, 马延和. 细胞工厂与生物炼制[J]. 化学进展, 2007, 19: 1076-1083.
- [22] Steiner P, Sauer U. Long-term continuous evolution of acetate resistant *Acetobacter aceti* [J]. Biotechnol Bioeng, 2003, 84: 40-44.
- [23] Patnaik R, Louie S, Gavrilovic V, et al. Genome shuffling of *Lactobacillus* for improved acid tolerance[J]. Nat Biotechnol, 2002, 20: 707-712.

(责任编辑:尹 闯)