

## 综述

# 己二酸的生物合成

韩丽, 陈五九, 元飞, 张媛媛, 王钦宏, 马延和

中国科学院天津工业生物技术研究所 中国科学院系统微生物工程重点实验室, 天津 300308

韩丽, 陈五九, 元飞, 等. 己二酸的生物合成. 生物工程学报, 2013, 29(10): 1374-1385.

Han L, Chen WJ, Yuan F, et al. Biosynthesis of adipic acid, 2013, 29(10): 1374-1385.

**摘要:** 己二酸是六碳二元羧酸, 主要用于生产尼龙、化纤和工程塑料等聚合物, 年需求量近 300 万 t。目前己二酸的工业生产主要是利用硝酸氧化芳烃合成己二酸等化学法获得, 不仅污染严重, 而且是个不可持续的过程, 需要发展可行的替代合成方法。近年来, 随着合成生物学和代谢工程的发展, 绿色、洁净的己二酸生物合成方法逐渐受到人们的关注和重视。文中就己二酸及其前体物的生物合成研究进展进行了综述, 并对可能的合成新途径做了展望。

**关键词:** 己二酸, 顺-顺-粘康酸, 生物合成, 代谢工程, 合成生物学

## Biosynthesis of adipic acid

Li Han, Wujiu Chen, Fei Yuan, Yuanyuan Zhang, Qinhong Wang, and Yanhe Ma

Key Laboratory of Systems Microbial Biotechnology, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** Adipic acid is a six-carbon dicarboxylic acid, mainly for the production of polymers such as nylon, chemical fiber and engineering plastics. Its annual demand is close to 3 million tons worldwide. Currently, the industrial production of adipic acid is based on the oxidation of aromatics from non-renewable petroleum resources by chemo-catalytic processes. It is heavily polluted and unsustainable, and the possible alternative method for adipic acid production should be developed. In the past years, with the development of synthetic biology and metabolic engineering, green and clean biotechnological methods for adipic acid production attracted more attention. In this study, the research advances of adipic acid and its precursor production are reviewed, followed by addressing the perspective of the possible new pathways for adipic acid production.

**Received:** June 28, 2013; **Accepted:** August 19, 2013

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2011CBA00807), Research Equipment Program of Chinese Academy of Sciences (No. YZ201153).

**Corresponding author:** Qinhong Wang. Tel/Fax: +86-22-84861950; E-mail: wang\_qh@tib.cas.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2011CBA00807), 中国科学院科研装备项目 (No. YZ201153) 资助。

**Keywords:** adipic acid, *cis,cis*-muconic acid, biosynthesis, metabolic engineering, synthetic biology

己二酸 (Adipic acid) 俗称肥酸, 简称 AA 或 ADA, 是含有 6 个碳的脂肪族二元羧酸。天然的己二酸主要在人体尿液中存在, 而植物及微生物中未见有己二酸存在的相关报道。己二酸主要作为尼龙、化学纤维和工程塑料等聚合物的单体原料<sup>[1]</sup>。另外, 己二酸在食品行业中也有应用, 可以作为食品添加剂、调味剂以及染料、香料等。

2010 年, 全球己二酸产量约为 260 万 t, 预计到 2016 年将达到 330 万 t。当前己二酸的主要生产方法是以环己醇和环己酮混合物为原料的硝酸氧化法(KA 油法), 占全球生产能力的 90%以上<sup>[2]</sup>。在 KA 油法中, 强氧化性硝酸的使用严重腐蚀设备, 而且产生的副产物氮氧化物被认为是引起全球变暖和臭氧减少的原因之一, 给环境造成了极大的污染。随着环境立法的日趋完善和公众环保意识的不断加强, 研究开发清洁无害的己二酸生产工艺越来越受到人们的重视, 一些符合 21 世纪绿色化工要求、环境友好的新型化学催化工艺不断被开发出来<sup>[3-4]</sup>。但是这些新工艺由于催化剂的成本和催化效率, 以及生产能力和规模化等问题, 还未能实现广泛的产业化应用。

随着工业生物技术的快速发展, 特别是基因工程技术、生物催化剂的快速筛选与改造技术、代谢工程技术、进化工程技术以及合成生物技术等的进步, 生物合成己二酸引起了人们的关注<sup>[5]</sup>。美国 Verdezyne 公司 2010 年宣称已经获得可以以烷烃类、植物油和糖类为原料生产己二酸的酵母基因工程菌, 并将投入大规模生产<sup>[6]</sup>, 荷兰 DSM 公司、美国 Genomatica 公司也正在积极开展生物合成己二酸项目。本文将对目前生物合成进行己二酸及其前体物顺,顺-粘康酸的生产进行综述, 并对己二酸生物合成新途径进行展望。

## 1 己二酸前体物顺,顺-粘康酸的生物合成

顺,顺-粘康酸是含有共轭双键的六碳二元酸, 可以通过化学加氢转变为己二酸。研究人员在化工厂以及被污染的土壤中分离得到一些可以降解芳香族类化合物的微生物, 可以把苯甲酸、苯、苯酚以及甲苯等的化合物转化为顺,顺-粘康酸, 这些微生物包括节杆菌 *Arthrobacter*、假单胞菌 *Pseudomonas*、鞘氨醇杆菌 *Sphingobacterium* 和假丝酵母 *Candida* 等<sup>[7-8]</sup> (表 1)。尽管通过转化苯、苯甲酸等芳香族化合物可以得到顺,顺-粘康酸, 然而由于芳香族类原料依然受到石油资源的制约。针对原料的替代, 美国密歇根州立大学的 Frost 研究小组率先设计了葡萄糖到顺,顺-粘康酸的合成途径, 可以实现以可再生的葡萄糖为底物来生产顺,顺-粘康酸及最终目标产品己二酸 (图 1)。

### 1.1 芳香族类化合物可经微生物转化为顺,顺-粘康酸

早在 1988 年, Maxwell<sup>[22]</sup>利用一株假单胞菌 *Pseudomonas* sp. ATCC31916 的突变菌在含有甲苯的培养基中能够积累顺,顺-粘康酸。之后, Mizuno 等<sup>[12]</sup>分离并得到了一株节杆菌 *Arthrobacter* sp. T8628, 该菌可将有毒的化合物苯甲酸转化为顺,顺-粘康酸, 2 d 内可以积累 44 g/L。1995 年, Bang 等<sup>[13]</sup>利用恶臭假单胞菌 *P. putida* BM104 将苯甲酸转化为顺,顺-粘康酸, 以补料发酵的方式在 40 h 内可以生产 30 g/L 顺,顺-粘康酸, 并达到了 2.2 g/(L·h) 的产率。同一时期, Krivobok 等<sup>[21]</sup>对真菌降解并利用苯酚进行研究, 发现黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 809 这种小型真菌可以利用并降解苯酚, 降解后的产物中也含有顺,顺-粘康酸。

表 1 转化芳香族化合物生产顺,顺-粘康酸的微生物总结

Table 1 Summary of microorganisms for conversing the aromatic compound to *cis,cis*-muconic acid

Chemicals	Microorganisms	References
Acenaphthylene	<i>Stenotrophomonas</i> sp. RMSK	[9]
Aniline	<i>Candida methanosorbosa</i> BP-6	[10]
Benzoic acid	<i>Alcaligenes eutrophus</i> ATCC17697	[11]
	<i>Arthrobacter</i> sp. T8628	[12]
	<i>Pseudomonas putida</i> BM104	[13]
	<i>Sphingobacterium</i> sp. GCG	[14-15]
Benzyl alcohol	<i>Gordonia</i> sp. strain MTCC 4818	[16]
Catechol	<i>P. putida</i> KT2440-JD1	[17]
Chrysene	<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. PNK-04	[18]
Diethyl hexyl benzoate	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> ATCC13808	[19]
Mandelate	<i>P. aeruginosa</i> 132/278	[20]
Phenol	<i>Candida albicans</i> TL3	[8]
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i> 809	[21]
Toluene	<i>Pseudomonas</i> sp. ATCC31916	[22]

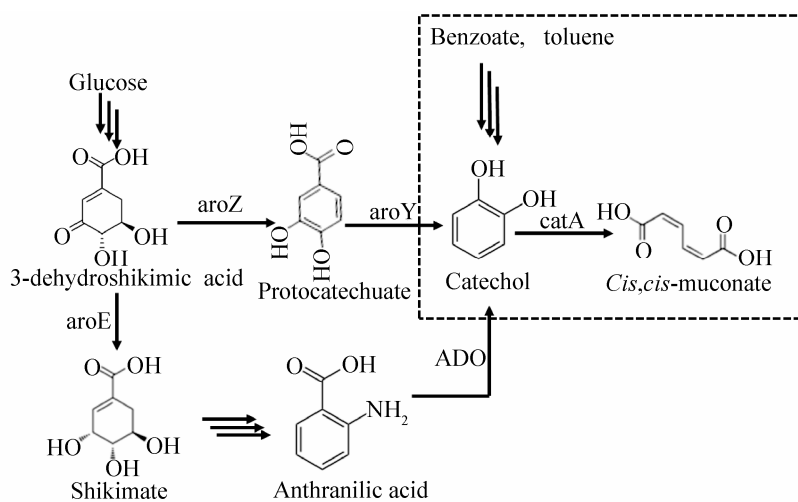


图 1 顺,顺-粘康酸合成途径(框内为苯甲酸类芳香族氨基酸可以通过微生物转化为中间代谢产物顺,顺-粘康酸)

Fig.1 Biosynthesis pathway of *cis,cis*-muconic acid. Aromatic compounds can be conversed into *cis,cis*-muconic acid. aroZ: 3-dehydroshikimate dehydratase; aroY: protocatechuate decarboxylase; catA: catechol 1,2-dioxygenase; aroE: shikimate dehydrogenase; ADO: anthranilate 1,2-dioxygenase.

2004年, Wu等<sup>[14]</sup>在台湾一家聚苯乙烯化工厂的污水中分离得到一株可以降解苯甲酸从而合成顺,顺-粘康酸的鞘氨醇杆菌 *Sphingobacterium* sp.。Wu等对培养基进行优化,并指出 catA (Catechol-1,2-dioxygenase) 作为加氧酶,需要2个三价 Fe 离子作为辅因子实现酶活。因此在培养基中添加 EDTA-FeCl<sub>3</sub> 可以显著提高顺,顺-粘康酸的产量。之后, Wu等<sup>[15]</sup>对鞘氨醇杆菌进行突变,得到突变株 M4113/M4115,其中 M4115 在含有 2.0 g/L 苯甲酸钠的培养基中 28 h 可以积累 0.56 g/L 顺,顺-粘康酸。另外,在培养基中添加 EDTA-FeCl<sub>3</sub>, M4113 以及 M4115 的顺,顺-粘康酸产量分别提高了 6%和 17%。2012年, Duuren等<sup>[17]</sup>利用恶臭假单胞菌突变株 *P. putida* KT2440-JD1,通过控制 pH 以补料发酵的方式,使得最大产率达到 0.6 g (4.3 mmol)/(g·h)。

## 1.2 从葡萄糖直接合成顺,顺-粘康酸

由于利用芳香族类化合物生产顺,顺-粘康酸,其原料依然来源于石化资源,因此 Draths 和 Frost<sup>[23]</sup>在 1994 年以大肠杆菌为出发菌株,通过引入 3 个外源基因,3-脱氢莽草酸脱水酶 *aroZ* (3-dehydroshikimate dehydratase)、原儿茶酸脱羧酶 *aroY* (Protocatechuate decarboxylase) 和儿茶酚 1,2-双氧化酶 *catA*,实现了以可再生的葡萄糖作为碳源合成顺,顺-粘康酸。2002年, Frost 等在其之前工作基础之上,对工程大肠杆菌进行优化改造。将两个拷贝来源于肺炎克雷伯氏菌 *Klebsiella pneumoniae* 3-脱氢莽草酸脱水酶基因 (*aroZ*) 整合到大肠杆菌基因组中,同样来源于肺炎克雷伯氏菌原儿茶酸脱羧酶基因 (*aroY*) 以及来源于醋酸钙不动杆菌 *Acinetobacter calcoaceticus* 的 *catA* 基因在质粒上发挥作用。Frost 等对芳香族氨基酸合成途径中的 DAHP 合酶 (3-Deoxy D-arabino heptulosonic acid 7-phosphate synthase) 也进行了

调控改造。由于 DAHP 合酶受到底物的反馈抑制,通过选用一个对底物反馈调节不敏感的同工酶 *aroF*<sup>FBR</sup> 可以消除这种反馈抑制。同时为了增加由 DAHP 到 3-脱氢奎尼酸 (3-dehydroquininate) 的流量,将 *aroB* 整合到基因组上。这种将外源基因整合到基因组而并非是在质粒上的方式将减轻工程菌株的代谢负担,从而减小对菌株生长的影响。利用新的工程菌,通过分批补料发酵,可以使顺,顺-粘康酸在 48 h 后的产量达到 36.8 g/L,糖酸的摩尔转化率达到 22%。利用铂为催化剂,可以使发酵液中的顺,顺-粘康酸氢化为己二酸,转化率可达 96%<sup>[24]</sup>。但是 Frost 等的顺,顺-粘康酸合成途径使用了 IPTG 诱导型启动子,这无疑将会增加生产成本,并且带来操作上的不便。我们课题组在 Frost 等研究的基础之上,将诱导型启动子改造为组成型启动子,同样实现了顺,顺-粘康酸的生产,为降低生产成本提供了可能<sup>[25]</sup>。

Sun 等<sup>[26]</sup>以大肠杆菌色氨酸生物合成分支中的中间代谢物邻氨基苯甲酸出发,引入邻氨基苯甲酸 1,2-双加氧酶 (Anthranilate 1,2-dioxygenase) ADO 和儿茶酚 1,2-双加氧酶,从而可以将邻氨基苯甲酸盐转化为儿茶酚,再进一步转化为粘康酸(图 1)。通过过量表达莽草酸合成途径中的一些关键基因,并阻断色氨酸的生物合成,以及过量表达谷氨酸合成酶来增强谷氨酸盐再生系统,可以增加邻氨基苯甲酸盐的产量,最后获得的大肠杆菌工程菌可以在简单碳源培养基中通过摇瓶发酵产生 389.96 mg/L 的粘康酸。

最近,分别来自德国和美国的两个独立研究小组<sup>[27-28]</sup>在酿酒酵母中也成功地构建了顺,顺-粘康酸的合成途径。相对于大肠杆菌而言,酿酒酵母的发酵过程可以保持在较低的 pH 值状态下,不需要后续加入大量的盐来达到较低的 pH 值,这对于顺,顺-粘康酸的分离及纯化具有较大的优势,可

以节约大量成本。Weber 等<sup>[27]</sup>在酿酒酵母中表达异源基因 3-脱氢莽草酸脱水酶、原儿茶酸脱羧酶以及儿茶酚 1,2-双加氧酶并阻断由 3-脱氢莽草酸到莽草酸这一竞争步骤来提高由 3-脱氢莽草酸到原儿茶酸的流量,最终得到 1.56 mg/L 顺,顺-粘康酸。Curran 等<sup>[28]</sup>将来源于柄孢壳菌属 *Podospira anserina* 的 3-脱氢莽草酸脱水酶、阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* 的原儿茶酸脱羧酶以及假丝酵母菌属 *Candida albicans* 的儿茶酚 1,2-双加氧酶克隆到酿酒酵母中,得到粘康酸的产量为 5 mg/L。通过进一步的遗传改造,包括将 Aro3 (DAHP synthase) 基因敲除同时表达一个突变的对反馈抑制不是很敏感的 Aro4 (DAHP synthase) 基因,以去除芳香族氨基酸合成途径中的反馈抑制,通过计算机模拟进行代谢流量分析之后再敲除 Zwf1 (Glucose-6-phosphate dehydrogenase gene),过量表达 TKL1 (Transketolase gene) 从而增加整条途径前体物质的流量,以及平衡异源途径中的各个酶等,最终得到了产量为 141 mg/L 粘康酸的酵母菌株,是出发菌株的 24 倍。

### 1.3 顺,顺-粘康酸合成途径中的儿茶酚 1,2-双加氧酶

儿茶酚 1,2-双加氧酶能够将儿茶酚转化为顺,顺-粘康酸,研究人员对儿茶酚 1,2-双加氧酶进行了较多的研究,这些研究对顺,顺-粘康酸的合成也都具有重要的应用价值。Fujiwara 等<sup>[29]</sup>对假单胞菌 *P. arvilla* C-1 中的 catA 进行研究,发现这种含有铁离子的双加氧酶不仅可以作用于邻苯二酚,而且还可以作用于更多的邻苯二酚衍生物,如 4-甲基邻苯二酚、4-氯邻苯二酚、4-甲酰苯邻二酚等。Mayer 等<sup>[30]</sup>用 <sup>18</sup>O 标记法研究儿茶酚 1,2-双加氧酶时发现其不仅对底物焦棓酸可进行双加氧,同时也可进行单加氧。Kou 等<sup>[31]</sup>研究表明恶臭假单胞菌 84103 中的 catA 酶,发现该酶的最适 pH 值的

范围是 7.5~8.0,最适温度为 25~30 °C, Cu<sup>2+</sup>和 Zn<sup>2+</sup>抑制酶的活性。Nakai 等<sup>[32]</sup>从不同假单胞菌中克隆并得到了多个 catA 基因,同时通过不同来源的 catA 基因的比对发现酪氨酸、组氨酸在酶的铁离子中心是非常保守的。Di Nardo 等<sup>[33]</sup>将来源于不动杆菌 *A. radioresistens* S13 的 catA 基因固定化后发现其最适 pH 值由原来的 8.5 变到 9.5,最适温度也由原来的 30 °C 上升到 50 °C,同时保留其催化其他底物的活性。2011 年, Duuren 等<sup>[34]</sup>对恶臭假单胞菌 KT2440 进行诱变获得突变株 KT2440-JD1,该突变株不能利用苯甲酸作为唯一碳源,在葡萄糖共同存在的条件才能生长并且积累顺,顺-粘康酸,产率达到 0.18 g/(g DCW·h)。进一步优化培养条件后,顺,顺-粘康酸的产率可达到 1.4 g/(g DCW·h)。通过转录组数据的分析,发现在 KT2440-JD1 中原来的 catR 操纵子被破坏,而在其后的 ben 操纵子高度活跃,ben 操纵子中含有另一个儿茶酚-1,2-双加氧酶 catA2。2013 年, Guzik 等<sup>[35]</sup>从嗜麦芽寡养单胞菌 *Stenotrophomonas maltophilia* KB2 得到儿茶酚 1,2-双加氧酶,并对其 pH 值等进行分析发现其可以很好地应用于粘康酸合成途径。到目前为止,已经有很多 catA 基因被陆续克隆和报道,包括来自于产碱杆菌属 *Alcaligenes* sp.、不动杆菌 *Acinetobacter* sp.、鞘氨醇单胞菌 *Sphingomonas* sp.、嗜麦芽寡养单胞菌 *S. maltophilia* 等<sup>[29-35]</sup>。

catA 与底物儿茶酚的晶体结构很早就由 Earhart 等<sup>[36]</sup>解析出来,他们的研究发现了 3 种不同类型与底物结合的同工酶晶体结构,由不同的亚基组成,包括  $\alpha\alpha$ 、 $\alpha\beta$  和  $\beta\beta$ ,分子量分别为 59 000、63 000 和 67 000 Da。基于 catA 的蛋白结构,我们课题组通过计算模拟,构建了一系列 catA 的突变体,可以有效提高酶活以及顺,顺-粘康酸的产量,相关研究结果有待发表。

## 2 通过生物转化法直接合成己二酸

己二酸前体物顺,顺-粘康酸的异源途径的设计与合成填补了由葡萄糖为底物生产己二酸的空白,这种通过构建原本在生物体内不存在的代谢途径,从而合成某种化合物的方法已经被广泛使用<sup>[37-38]</sup>。然而,由于顺,顺-粘康酸到己二酸仍需要进行化学加氢,尽管这种方法很简单,但是在一定程度上增加了生产己二酸的成本,因此直接利用微生物生产己二酸的研究更加吸引人们的关注。研究发现,环己烷、环己醇等底物可以经过微生物直接转化为己二酸。一些长链的烷烃类也可以在微生物体内经过 $\omega$ 氧化途径氧化形成长链二元酸,并进一步代谢生产己二酸。

### 2.1 由环烃类直接转化为己二酸

2000年,Cheng等<sup>[39]</sup>通过Cosmid构建土壤棒杆菌 *Acinetobacter* sp. SE19 基因组文库,筛选到土壤棒杆菌氧化环己醇基因簇,得到了一个大小为14 kb,含有从环己醇到己二酸的转化途径的基因簇,因此生物转化环烷烃到环己醇进而转化成为己二酸的途径得以确定(图2)。Cheng等通过异源表达得到可氧化环己醇生产己二酸的大肠杆菌,其己二酸的含量为400 ppm。Brzostowicz等<sup>[40]</sup>分离得到一株可以在添加环己酮以及环己醇的培养条件下生长的菌株表皮短杆菌 *Brevibacterium*

*epidermidis* HCU,通过Out-PCR技术发现该菌中由环己酮到己二酸转化途径中存在两个不同的基因簇<sup>[41]</sup>,并且与之前Cheng等报道的土壤棒杆菌 *Acinetobacter* sp. SE19 相关基因簇是不同的。但是由于环烃类化合物仍来源于不可再生的石化资源,因此也限制了利用环烃类化合物生产己二酸的发展。

### 2.2 $\omega$ 氧化途径可以实现由脂肪酸到己二酸的转化

$\omega$  氧化途径是生物体内存在的脂肪酸代谢途径的一种,不同于 $\beta$ 氧化途径对脂肪酸 $\beta$ 位上的碳进行氧化, $\omega$ 氧化途径主要氧化脂肪酸远离羧基端上的碳。 $\omega$ 氧化途径分为3个阶段,脂肪酸首先在一些P450氧化酶体系的作用下,远离羧基端的碳上连接的氢被氧化为羟基,氧化后的羟基在醇脱氢酶的作用下被氧化为醛基,醛基在醛脱氢酶的作用下被氧化为羧基,从而形成二元酸。

美国Verdezyne公司<sup>[6]</sup>在石油污染的土壤中分离得到了一株可以以烷烃或者脂肪酸作为碳源的酵母菌株,这种酵母菌株利用 $\omega$ 氧化途径和 $\beta$ 氧化途径将烷烃以及脂肪酸转化为供细胞生长的能量以及中间代谢产物。阻断这一菌株中的 $\beta$ 氧化途径,可以将烷烃以及脂肪酸转化为包括己二酸在内的二元酸(图3)。Verdezyne公司对该种酵母进行遗传改造,包括对 $\beta$ 氧化途径中的第一个酶

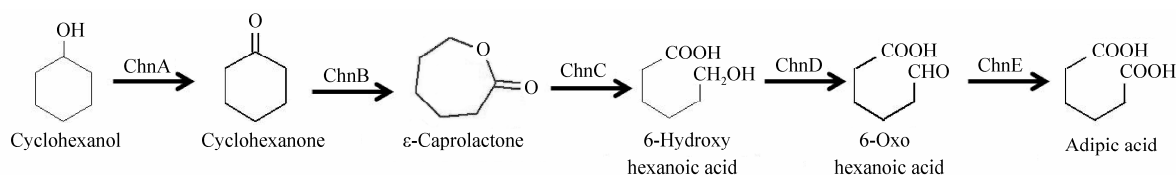


图2 从环己醇到己二酸合成途径<sup>[39]</sup>

Fig.2 Pathway from cyclohexanol to adipic acid<sup>[39]</sup>. ChnA: cyclohexanol dehydrogenase; ChnB: cyclohexanone monooxygenase; ChnC: acetyl-hydrolase; ChnD: alcohol dehydrogenase; ChnE: aldehyde dehydrogenase.

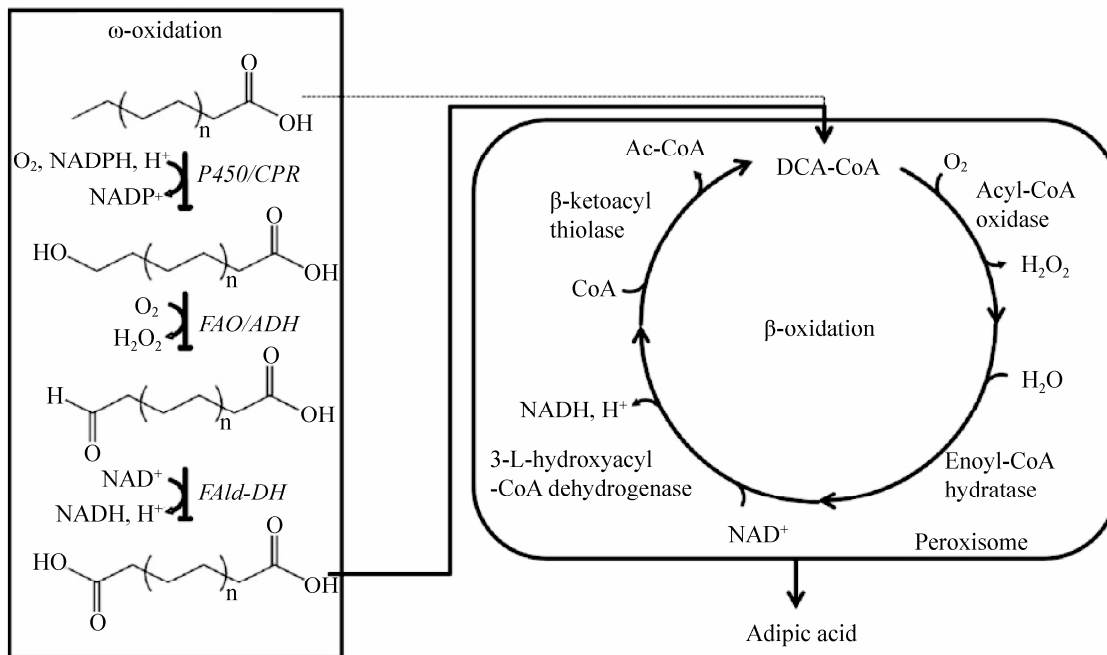


图3 基于 $\omega$ 氧化的己二酸合成途径<sup>[6]</sup>

Fig.3 Adipic acid biosynthetic pathway via  $\omega$  oxidation<sup>[6]</sup>.

酰基辅酶 A 氧化酶 (acyl-coA oxidase) 进行选择敲除, 得到可以将烷烃以及脂肪酸大部分转化为己二酸的酵母菌株, 转化率约为 0.60 g/g (椰子油为底物) 或者 0.69 g/g (椰子油皂角为底物)。进一步将  $\omega$  氧化途径中的酶进行强化, 得到产量提高 5 倍的菌株。通过二阶段发酵方式, 包括第一阶段在商业化的培养基中进行细胞生长, 之后将脂肪酸类底物持续地加入进行发酵生产, 在大约 144 h 时可以积累己二酸达到 50 g/L, 从而为利用植物油资源生产己二酸提供了可能。

### 3 己二酸生物合成新途径

随着代谢工程和合成生物学的发展, 越来越多的化学品可以通过人工设计合成途径来生产<sup>[39,42]</sup>。近年来研究人员也不断在开拓新的己二酸生物合成途径。

#### 3.1 由葡萄糖经由 $\alpha$ -酮己二酸到己二酸的合成途径

Djurdjevic 等<sup>[43]</sup>在大肠杆菌中成功构建由  $\alpha$ -酮戊二酸到戊烯二酸的合成途径 (图 4)。Parthasarathy 等<sup>[44]</sup>尝试了将上述途径中的酶应用于由  $\alpha$ -酮己二酸到 2-烯-己二酸的合成过程, 将这一途径中的关键酶 2-羟基戊二酸单酰辅酶 A 脱氢酶 (2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase) 进行纯化和功能表征发现其可以与 6 碳的(R)-2-羟基己二酰辅酶 A ((R)-2-hydroxyadipoyl-CoA) 作用生成 (E)-2-己烯二酰辅酶 A ((E)-2-hexenediyl-CoA)。同时, 对这一途径中的戊烯二酸辅酶 A 转移酶 (Glutaconate CoA transferrase) 进行底物特异性的研究, 发现其更依赖于底物分子中含有完整 CoA 类的物质, 而对 CoA 类以外的酰基基团则没有特异性, 戊烯二酸辅酶 A 转移酶可以选择戊二酸、

(E)-戊烯二酸、(R)-2-羟戊二酸以及己二酸作为底物, 以此推断它对比 2-羟基戊二酸多一个碳的 2-羟基己二酸完全可以起作用。另外, Parthasarathy 等经过实验证明 2-羟戊二酸脱氢酶 (2-hydroxyglutarate dehydrogenase) 具有很高的底物特异性, 由于其酶活性中心的精氨酸的存在导致该酶可塑性差。因此只要找到合适的 2-羟基己二酸脱氢酶 (2-hydroxyadipate dehydrogenase), 就可以实现由 2-酮基己二酸到 2-烯-己二酸的生物合成途径。Dang 等<sup>[45-46]</sup>在脑癌的细胞中发现一种异柠檬酸脱氢酶 (Isocitrate dehydrogenase) 的突变体, 该酶可以催化依赖于 NADPH 的由  $\alpha$ -酮基戊二酸到(R)-2-羟戊二酸 ((R)-2-hydroxyglutarate) 的还原反应。之后, Reitman 等<sup>[47]</sup>通过对催化类似反应的高异柠檬酸脱氢酶 (Homoisocitrate dehydrogenase) 的研究, 发现同样位点的突变可以将  $\alpha$ -酮己二酸转化为(R)-2-羟己二酸。这样, 由  $\alpha$ -酮己二酸到 2-烯-己二酸的途径中的各个酶就已经可以确定下来。而由 2-烯-己二酸到己二酸的步骤, Parthasarathy 等同样提出了构想, 来源于脱硫球菌属 *Desulfococcus multivorans* 的非羧化脱氢酶 (Noncarboxylating dehydrogenase) 可以将戊烯二酰辅酶 A (Glutaconyl-CoA) 转化为戊二酰辅酶 A (Glutaryl-CoA)<sup>[48]</sup>。因此 Parthasarathy 等推测该酶也可以作用于含有 6 个碳的 2-己烯二酰基辅酶 A (2-hexenedioyl-CoA), 他们还推测这个戊二酰辅酶 A 脱氢酶 (glutaryl-CoA dehydrogenase (Gcd)) 的作用机理或许与丁酰辅酶 A 脱氢酶 (Butyryl-coA dehydrogenase) 一样, 是与电子传递 Etf 以复合体的形式发挥作用的 (图 4)。

### 3.2 逆己二酸降解的合成途径探索

尽管己二酸在微生物体内并非天然存在, 但是通过计算设计, Burgard 等提出了几条合成己二酸的可能途径<sup>[49]</sup>, 包括逆己二酸降解途径合成己

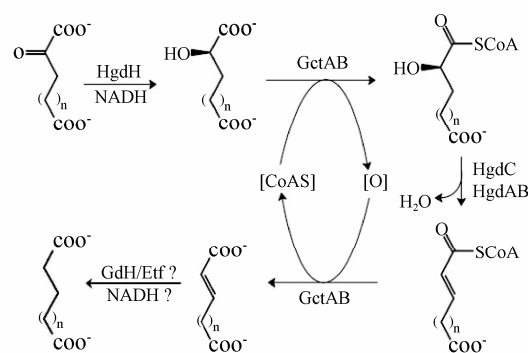


图 4 由  $\alpha$ -酮己二酸到己二酸生物合成途径<sup>[44]</sup>

Fig.4 Biosynthetic pathway of adipic acid from  $\alpha$ -ketoadipic acid<sup>[44]</sup>. HgdH: (R)-2-hydroxyglutarate dehydrogenase; GctAB: glutaconate CoA-transferase; HgdAB: (R)-2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase; HgdC: activator of HgdAB; GdH/Etf: glutaryl-CoA dehydrogenase/electron transferring flavoprotein.

二酸, 经由赖氨酸形成己二酸等。下面将对逆己二酸降解途径合成己二酸的途径进行详细介绍。

己二酸在微生物体内可以降解为琥珀酰 CoA 及乙酰 CoA<sup>[50]</sup>。依据这种现象, 或许可以通过设计己二酸逆降解途径实现己二酸的生产。要构建己二酸逆降解途径, 依次需要将乙酰辅酶 A 以及琥珀酰辅酶 A 经过琥珀酰辅酶 A: 乙酰辅酶 A 转移酶 (Succinyl-coA: Acetyl-CoA transferase), 3-羟基酰基辅酶 A 脱氢酶 (3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)、3-羟基己二酰辅酶 A 水合酶 (3-hydroxyadipyl-CoA dehydratase)、烯脂酰辅酶 A 还原酶 (enoyl-CoA reductase) 以及己二酸辅酶 A 合酶 (Adipyl-coA synthetase) 的作用, 通过琥珀酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A 聚合, 逐步合成己二酸, 具体步骤如图 5 所示。

己二酸在生物体内的降解还可通过 3-酮基己二酸 (3-oxoadipate), 最终形成琥珀酰 CoA 及乙酰 CoA。与上述思路相似, 也可以设计己二酸合成途径经由琥珀酰辅酶 A 以及乙酰辅酶 A 形成 3-酮基己二酰辅酶 A 之后, 再经 3-酮基己二酰辅酶 A 转



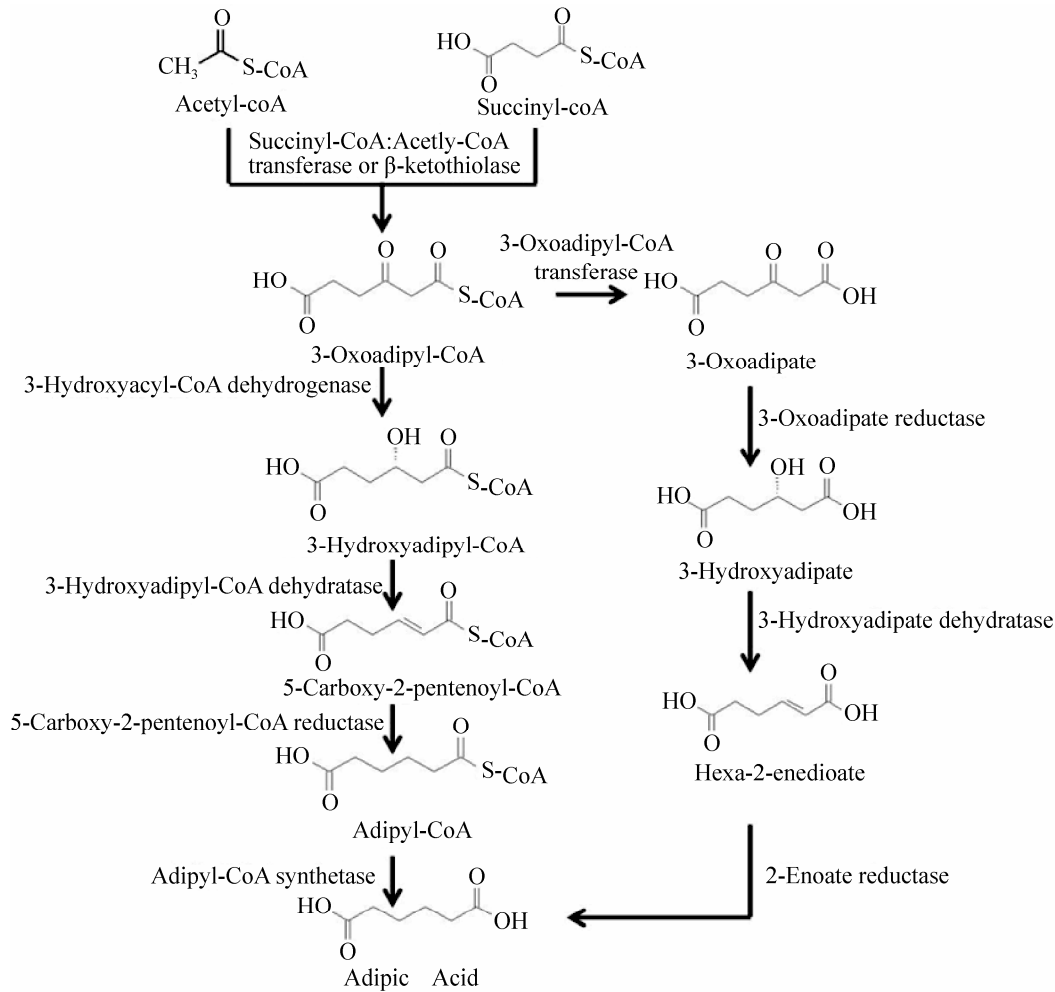


图5 逆己二酸降解合成己二酸途径

Fig.5 Biosynthesis pathway of adipic acid by reversal adipate degradation.

移酶作用形成 3-酮基-己二酸, 3-酮基己二酸依次经过 3-酮基己二酸还原酶 (3-oxoadipate reductase)、3-羟基己二酸水合酶 (3-hydroxyadipate dehydratase) 以及烯脂还原酶 (2-enoate reductase) 形成己二酸 (图 5)。要实现上述两条合成途径, 关键是要发掘出合适的、能完成各步反应的酶。本课题组通过前期探索, 初步在大肠杆菌中构建了逆己二酸降解的合成途径, 获得的工程菌可以

积累大约 300 mg/L 的己二酸 (结果待发表), 进一步的途径优化提高生产能力和效率的工作正在进行。

#### 4 总结与展望

从葡萄糖到己二酸前体物质顺,顺-粘糠酸的生物合成为己二酸生产开辟了一条初步可行的道路, 然而由于顺,顺-粘糠酸到己二酸的过程需要通

过贵金属铂催化的化学氢化才能实现, 这将使生产工艺相对复杂, 增加了生产成本<sup>[24]</sup>。而通过生物转化环己烷、环己醇等芳环化合物来直接合成己二酸, 因为原料来自不可再生的石化资源, 转化效率也不高, 使得生产成本居高不下。通过  $\omega$  氧化使植物油 (如椰子油、棕榈油等) 转化为己二酸的途径, 也因为原料成本不低, 也需要进一步降低成本。因此, 通过设计以低廉、可再生的原料 (葡萄糖等) 到己二酸合成新路线, 是实现经济性生产己二酸的重要途径。

尽管生物合成己二酸总体上还处于研发阶段, 但是合成生物学和代谢工程的研究进展, 以及生命科学与生物技术的不断发展必将快速推动包括己二酸在内的各类化学品和化工原料的生物合成。用人工设计和合成的微生物细胞来实现己二酸生物制造, 原料来自可再生的生物质资源的各种糖类, 而不必消耗石油等不可再生资源, 生产过程完全采用生物过程, 不使用有毒有害的化学试剂, 也不产生任何环境污染。可以预计一旦经济上可行的生物合成生产工艺被推广使用, 将极大促进经济的发展和解决困扰制约国民经济发展的生态环境问题, 保持国家安全、稳定和可持续发展, 创造重大的社会效益。

## REFERENCES

- [1] Cavani F, Alini S. Synthesis of adipic acid: on the way to more sustainable production//Cavani F, Centi G, Perathoner S, et al. Sustainable Industrial Chemistry. Weinheim: Wiley VCH, 2009: 367–425.
- [2] Van de Vyver S, Román-Leshkov Y. Emerging catalytic processes for the production of adipic acid. Catal Sci Tech, 2013, 3(6): 1465–1479.
- [3] Usui Y, Sato K. A green method of adipic acid synthesis: organic solvent-and halide-free oxidation of cycloalkanones with 30% hydrogen peroxide. Green Chem, 2003, 5(4): 373–375.
- [4] Damm M, Gutmann B, Kappe CO. Continuous-flow synthesis of adipic acid from cyclohexene using hydrogen peroxide in high-temperature explosive regimes. ChemSusChem, 2013, 6(6): 978–982.
- [5] Polen T, Spelberg M, Bott M. Toward biotechnological production of adipic acid and precursors from biorenewables. J Biotechnol, 2013, 167(2): 75–84.
- [6] Beardslee T, Picataggio S. Bio-based adipic acid from renewable oils. Lipid Technol, 2012, 24(10): 223–225.
- [7] Van Duuren J, Brehmer B, Mars A, et al. A limited LCA of bio-adipic acid: manufacturing the nylon-6,6 precursor adipic acid using the benzoic acid degradation pathway from different feedstocks. Biotechnol Bioeng, 2011, 108(6): 1298–1306.
- [8] Tsai SC, Tsai LD, Li YK. An isolated *Candida albicans* TL3 capable of degrading phenol at large concentration. Biosci Biotechnol Biochem, 2005, 69(12): 2358–2367.
- [9] Nayak AS, Veeranagouda Y, Lee K, et al. Metabolism of acenaphthylene via 1,2-dihydroxynaphthalene and catechol by *Stenotrophomonas* sp. RMSK. Biodegradation, 2009, 20(6): 837–843.
- [10] Mucha K, Kwapisz E, Kucharska U, et al. Mechanism of aniline degradation by yeast strain *Candida methanosorbosa* BP-6. Pol J Microbiol, 2010, 59(4): 311–315.
- [11] Ampe F, Uribe Larrea JL, Aragao G, et al. Benzoate degradation via the ortho pathway in *Alcaligenes eutrophus* is perturbed by succinate. Appl Environ Microbiol, 1997, 63(7): 2765–2770.
- [12] Mizuno S, Yoshikawa N, Seki M, et al. Microbial production of *cis,cis*-muconic acid from benzoic acid. Appl Microbiol Biotechnol, 1988, 28(1): 20–25.
- [13] Bang SG, Choi CY. Do-stat fed-batch production of *cis,cis*-muconic acid from benzoic acid by *Pseudomonas putida* BM104. J Ferment Bioeng, 1995, 79(4): 381–383.
- [14] Wu CM, Lee S, Lee Y, et al. Microbial synthesis of *cis,cis*-muconic acid by *Sphingobacterium* sp. GCG generated from effluent of a styrene monomer(SM) production plant. Enzyme Microb Technol, 2004, 35: 598–604.
- [15] Wu CM, Wu CC, Su CC, et al. Microbial synthesis of *cis,cis*-muconic acid from benzoate by *Sphingobacterium* sp. mutants. Biochem Eng J, 2006,

- 29(1/2): 35–40.
- [16] Chatterjee S, Mallick S, Dutta TK. Pathways in the degradation of hydrolyzed alcohols of butyl benzyl phthalate in metabolically diverse *Gordonia* sp. strain MTCC 4818. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2005, 9(2): 110–120.
- [17] van Duuren JB, Wijte D, Karge B, et al. pH-stat fed-batch process to enhance the production of *cis,cis*-muconate from benzoate by *Pseudomonas putida* KT2440-JD1. *Biotechnol Prog*, 2012, 28(1): 85–92.
- [18] Nayak AS, Sanjeev Kumar S, Santosh Kumar M, et al. A catabolic pathway for the degradation of chrysene by *Pseudoxanthomonas* sp. PNK-04. *FEMS Microbiol Lett*, 2011, 320(2): 128–134.
- [19] Nalli S, Cooper DG, Nicell JA. Interaction of metabolites with *R. rhodochrous* during the biodegradation of di-ester plasticizers. *Chemosphere*, 2006, 65(9): 1510–1517.
- [20] Rosenberg S. Regulation of the mandelate pathway in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 1971, 108(3): 1257–1269.
- [21] Krivobok S, Benoit-Guyod JL, Seigle-Murandi F, et al. Diversity in phenol-metabolizing capability of 809 strains of *Micromycetes*. *New Microbiol*, 1994, 17(1): 51–60.
- [22] Maxwell PC. Process for the production of muconic acid: US, 4731328. 1988-03-15.
- [23] Draths KM, Frost JW. Environmentally compatible synthesis of adipic acid from D-glucose. *J Am Chem Soc*, 1994, 116(1): 399–400.
- [24] Niu W, Draths KM, Frost JW. Benzene-free synthesis of adipic acid. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(2): 201–211.
- [25] Wu YQ, Zhang YY, Tu R, et al. Construction of synthetic promoters for *Escherichia coli* and application in the biosynthesis of *cis,cis*-muconic acid. *Chin J Biotech*, 2013, 29(6): 760–771 (in Chinese).  
吴元庆, 张媛媛, 涂然, 等. 大肠杆菌合成启动子的构建及在顺,顺-粘康酸生物合成中的应用. *生物工程学报*, 2013, 29(6): 760–771.
- [26] Sun X, Lin Y, Huang Q, et al. A novel muconic acid biosynthetic approach by shunting tryptophan biosynthesis via *Anthranilate*. *Appl Environ Microbiol*, 2013, 79(13): 4024–4030.
- [27] Weber C, Bruckner C, Weinreb S, et al. Biosynthesis of *cis,cis*-muconic acid and its aromatic precursors, catechol and protocatechuic acid, from renewable feedstocks by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 2012, 78(23): 8421–8430.
- [28] Curran KA, Leavitt JM, Karim AS, et al. Metabolic engineering of muconic acid production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab Eng*, 2013, 15: 55–66.
- [29] Fujiwara M, Golovleva LA, Saeki Y, et al. Extradial cleavage of 3-substituted catechols by an intradiol dioxygenase, pyrocatechase, from a *Pseudomonad*. *J Biol Chem*, 1975, 250(13): 4848–4855.
- [30] Mayer RJ, Que L, Jr.  $^{18}\text{O}$  studies of pyrogallol cleavage by catechol 1,2-dioxygenase. *J Biol Chem*, 1984, 259(21): 13056–13060.
- [31] Kou XF, Li Q. The preparation and properties of catechol-1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida*. *Acta Microbiol Sin*, 1990, 30(5): 397–399 (in Chinese).  
寇秀芬, 李钦. 臭味假单胞菌邻苯二酚 1, 2-双加氧酶的制备和一般性质. *微生物学报*, 1990, 20(5): 397–399.
- [32] Nakai C, Uyeyama H, Kagamiyama H, et al. Cloning, DNA sequencing, and amino acid sequencing of catechol 1,2-dioxygenases (pyrocatechase) from *Pseudomonas putida* mt-2 and *Pseudomonas arvilla* C-1. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 321(2): 353–362.
- [33] Di Nardo G, Roggero C, Campolongo S, et al. Catalytic properties of catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter radioresistens* S13 immobilized on nanosponges. *Dalton Trans*, 2009, (33): 6507–6512.
- [34] van Duuren JB, Wijte D, Leprince A, et al. Generation of a catR deficient mutant of *P. putida* KT2440 that produces *cis,cis*-muconate from benzoate at high rate and yield. *J Biotechnol*, 2011, 156(3): 163–172.
- [35] Guzik U, Hupert-Kocurek K, Sitnik M, et al. High activity catechol 1,2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in *cis,cis*-muconic acid production. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 103(6): 1297–1307.
- [36] Earhart CA, Hall MD, Michaud-Soret I, et al. Crystallization of catechol-1,2 dioxygenase from *Pseudomonas arvilla* C-1. *J Mol Biol*, 1994, 236(1): 377–378.

- [37] Mampel J, Buescher JM, Meurer G, et al. Coping with complexity in metabolic engineering. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(1): 52–60.
- [38] Lee JW, Na D, Park JM, et al. Systems metabolic engineering of microorganisms for natural and non-natural chemicals. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(6): 536–546.
- [39] Cheng Q, Thomas SM, Kostichka K, et al. Genetic analysis of a gene cluster for cyclohexanol oxidation in *Acinetobacter* sp. strain SE19 by *in vitro* transposition. *J Bacteriol*, 2000, 182(17): 4744–4751.
- [40] Brzostowicz PC, Gibson KL, Thomas SM, et al. Simultaneous identification of two cyclohexanone oxidation genes from a new *Brevibacterium* sp. using mRNA differential display. *J Bacteriol*, 2000, (182): 4241–4248.
- [41] Brzostowicz PC, Blasko MS, Rouvière PE. Identification of two gene clusters involved in cyclohexanone oxidation in *Brevibacterium epidermidis* strain HCU. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 58(6): 781–789.
- [42] Dhamankar H, Prather KL. Microbial chemical factories: recent advances in pathway engineering for synthesis of value added chemicals. *Curr Opin Struct Biol*, 2011, 21(4): 488–494.
- [43] Djurdjevic I, Zelder O, Buckel W. Production of glutaconic acid in a recombinant *Escherichia coli* strain. *Appl Environ Microbiol*, 2011, 77(1): 320–322.
- [44] Parthasarathy A, Pierik AJ, Kahnt J, et al. Substrate specificity of 2-hydroxyglutaryl-CoA dehydratase from *Clostridium symbiosum*: toward a bio-based production of adipic acid. *Biochemistry*, 2011, (50): 3540–3550.
- [45] Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 2009, 462(7274): 739–744.
- [46] Dang L. A biocatalyst inspired by cancer. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(11): 874–875.
- [47] Reitman ZJ, Choi BD, Spasojevic I, et al. Enzyme redesign guided by cancer-derived IDH1 mutations. *Nat Chem Biol*, 2012, 8(11): 887–889.
- [48] Wischgoll S, Demmer U, Warkentin E, et al. Structural basis for promoting and preventing decarboxylation in glutaryl-coenzyme a dehydrogenases. *Biochemistry*, 2010, 49(25): 5350–5357.
- [49] Burgard A, Pharkya P, Osterhout R. Microorganisms for the production of adipic acid and other compounds: US, 7799545B2. 2009-03-27.
- [50] Thykaer J, Christensen B, Nielsen J. Metabolic network analysis of an adipoyl-7-ADCA-producing strain of *Penicillium chrysogenum*: elucidation of adipate degradation. *Metab Eng*, 2002, 4(2): 151–158.

(本文责编 郝丽芳)