

以微生物合成有機酸之代謝工程

Organic Acid Biosynthesis of Microorganism by Metabolic Engineering

謝欣如

工研院材化所(MCL/ITRI) 研究員

隨著生物科技的進步，微生物的代謝學與生理學研究已臻成熟，配合基因體學、蛋白質體學、合成生物學與代謝工程的認知，許多客製化的重組基因菌株(tailor-made microorganism)已用於工業生產。透過模擬生物的代謝路徑及微生物生化反應的代謝物流量平衡，進一步提供最精確的關鍵酵素所在，生產化學品、蛋白質或藥物，不但加速研發成果的應用，也使許多新產品得以快速研發上市，創造研發與產業雙贏局面，提升國內產業研發的競爭力。本文主要針對檸檬酸、琥珀酸、3-羥基丙酸與衣康酸的工業生產菌株，代謝合成路徑與製程技術演進，進行詳細介紹。

With the advancement of biotechnology in recent years, the microbial metabolism and the physiology science research reached their maturing stage. Combined with genomics, proteomics, synthetic biology and metabolic engineering of awareness, they resulted in a number of customized recombinant strains (tailor - made microorganisms) being in production. Through the simulation of biological metabolism, biochemical reactions balance and the accurate allocation of the key enzymes, chemicals, proteins and pharmaceuticals and food supplements were synthesized. It not only sped up the application developments, but also created many new markets for new products, and secured a win-win situation to enhance the competitiveness of the research and development by domestic industry. In this paper, metabolic synthesis pathway, process evolution and other detailed descriptions are made on citric acid, succinic acid, 3 - hydroxy acid and itaconic acid in industrial production strains.

關鍵字/Key words

客製化重組基因菌株(tailor-made microorganism)、檸檬酸(citric acid)、琥珀酸(succinic acid)、3-羥基丙酸(3-hydroxy acid)、衣康酸(itaconic acid)

一、前言

石油危機儼然已成為經濟與科學發展上的一大障礙，涉及石化下游產業鏈相關產品的製造成本與售價，如何尋求替代石油的資源是目前的一大挑戰。因此，美國能源部(Department of Energy; DOE)針對特定的有機化學品提出一系列的基礎化學品(building-block chemicals)，以生物精煉(bio-refinery)的觀念切入綠色化學品的開發，寄望利用可再生資源製造生質化學品，成為生態環境材料(Eco-materials)的一大發展趨勢。在工業生產的有機酸中，以微生物生產的檸檬酸(citric acid)、琥珀酸(succinic acid)與乳酸(lactic acid)等都是相當成功的實例，其產率已可提升到99%(表一)。

過去十年來代謝工程已成為生物科學的共通橋樑，以現代基因工程為載具，改質與

增進原核或真核細胞的各種性質與代謝途徑，同時也發展出許多代謝工程數學演算工具，以闡明代謝途徑的建構與估算細胞生理學的各種特性，也藉由NMR與GC/Mass光譜學決定細胞內代謝流的產品與同素異構物(allotrope)。例如DNA微陣列(DNA microarray)的推廣應用，確實協助並促進基因體學/蛋白質體學的進步，如genotype-change/phenotype-assessment cycles等重要的研究成果，即是幫助研究者瞭解機能(function)與基因型(genotype)之間的相關性，以及在臨床與醫藥上應用，如結構-機能關係(structure-function relationships)，此更涉及功能基因體學與基因組序列的活性等，已成為具有強大功能的研發載具。對於菌種改良的研發，代謝工程的運用如DNA微陣列、定向演化(directed evolution)、tracers for flux measurement等，

▼表一 微生物生產檸檬酸、乳酸及琥珀酸的產率分析

Concentration (g/L)	Productivity g/(Lh)	Yield (g/g)	Carbon source	Organism	Cultivation
Citric acid					
200			Glucose	<i>Aspergillus niger</i>	Shake flask
113.5		0.71	Beet, cane molasse	<i>Aspergillus niger</i>	
114	0.61	0.76	Cane molasse	<i>Aspergillus niger</i>	
40	0.1	0.99	n-Paraffin	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
42.9		0.56	Fatty acid, glucose	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
140	0.73	0.82	Sucrose	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
Lactic acid					
771	5.4			<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Continous product extraction
	52–144			<i>Lactobacillus spp.</i>	Cell-recycle
				<i>Lactobacillus spp.</i>	Electrodialysis
29		3.1	Whey	<i>Lactobacillus amylophilus</i>	Immobilization and recycling
40 ^b	0.63 ^b	0.78	Red lentil flour	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
58	0.6	0.95 ^b	Cassava bagasse	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	
51.7		0.58	Xylose	<i>Pichia stipitis</i>	
95	2.2	0.68	Oat	<i>Rhizopus oryzae</i>	
122		0.80	Glucose	<i>Rhizopus spp.</i>	
70		0.61	Cane juice	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Neutralized culture
		0.93	Glucose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Low pH
Succinic acid					
35.6 ^b	1.01 ^b	0.82 ^b	Wheat	<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Biorefining strategy
52	1.8	0.76	Glucose	<i>Mannheimia succiniciproducens</i>	
43	0.72	0.53	Glucose	<i>Escherichia coli</i>	Aerobic batch
58.3	1.08	0.62	Glucose	<i>Escherichia coli</i>	Aerobic fed-batch
55.2	1.15		Cane molasse	<i>Actinobacillus succinogenes</i>	Inexpensive medium
83	10.4	0.89	Glucose	<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>	Electrodialysis

^aThe data have been taken from the cited publications. If the publication has not given a parameter, no data have been given.

^bDenotes optimal values of different cultures reported in the corresponding publication.

(Ref: Michael Sauer, 2007)

使分子生物學(molecular biology)的發展更為精進。

二、有機酸案例介紹

有機酸藉由微生物發酵生產，2010年以生物技術製程生產的化學品，其市場佔有率預估將由5%提高到20%，更促使下游產品鏈開發更多高價值的衍生產物。表二為微生物生產有機酸之年產量說明。

(一)檸檬酸 (citric acid)

檸檬酸($C_6H_8O_7$, 2-hydroxy-propane-1,2,3-tricarboxylic acid)已廣泛被應用於食品、化學及醫藥產業，其用途包括酸味添加劑、pH調整劑及抗氧化劑。檸檬酸早在1784年就從檸檬汁中被分離出來，1893年Wehmer首次開發以檸檬酸黴屬(citromyces)為檸檬酸生產菌株，接著1919年比利時建立第一個檸檬酸生

產製程，在1930~1940年間為檸檬酸發酵技術的興盛時期，其中以黑黴菌(*Aspergillus niger* *A. niger*)的研究最為盛行，*A. niger*利用葡萄糖或蔗糖為主要碳源，在pH2.5~3.5的培養基為檸檬酸最佳生產條件，可抑制草酸(oxalic acid)與葡萄糖酸(gluconic acid)等副產物的生成。

目前利用*A. niger*以深層發酵法(submerged fermentation)生產之檸檬酸年產量達88公噸，後續有關菌種開發的研究中，將利用一般食用油及甘油的解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、酚類資化酵母菌(*Candida tropicalis*)及紅酵母屬(*Rhodotorula* spp.)也納入檸檬酸生產的工業菌株，但缺點是生成異檸檬酸(isocitric acid; $C_6H_8O_7$)副產物。目前解決方案為利用實驗設計法尋求最適化生產配方組成，以期降低異檸檬酸的生成，達到高檸檬酸/異檸檬酸比值。

▼表二 微生物生產有機酸之年產量說明

Number of carbon atoms	Organic acid	Annual production (t)	Annual production by microbial process (t) ^b	Projected market volume (t)	Use (examples)
C ₂	Acetic acid	7 000 000	190 000		Vinylacetate for polymers, ethylacetate as 'green' solvent
C ₂	Oxalic acid	124 000	—		Synthetic intermediate, complexing agent
C ₃	Acrylic acid	4 200 000	—		Polymer production
C ₃	3-hydroxypropionic acid	n.a.	—	Up to 3 600 000	Potential substitute for acrylic acid and production of biodegradable polymers
C ₃	Lactic acid	150 000	150 000		Food and beverages, biodegradable polymer production
C ₃	Propionic acid	130 000	n.a.		Food and feed
C ₄	Butyric acid	50 000	n.a.		Therapeutics, aroma, fragrance
C ₄	Fumaric acid	12 000	—	>200 000	Food and feed, polyester resins
C ₄	Malic acid	10 000	—	>200 000	Potential to replace maleic anhydride
C ₄	Succinic acid	16 000	—	>270 000	Potential to replace maleic anhydride, manufacture of tetrahydrofuran, polymers
C ₅	Itaconic acid	15 000	15 000		Specialty monomer
C ₅	Levulinic acid	450	—	High	Possible precursor for bulk chemicals
C ₆	Adipic acid	2 500 000	—		Production of nylon 6,6 esters used as plasticizers and lubricants
C ₆	Ascorbic acid	80 000	—		Food additive
C ₆	Citric acid	1 600 000	1 600 000		Food additive
C ₆	Glucaric acid	n.a.	—	High	Production of new nylons, new building-block
C ₆	Gluconic acid	87 000	87 000		Food additive, metal chelator

Abbreviation: n.a., no data are available.

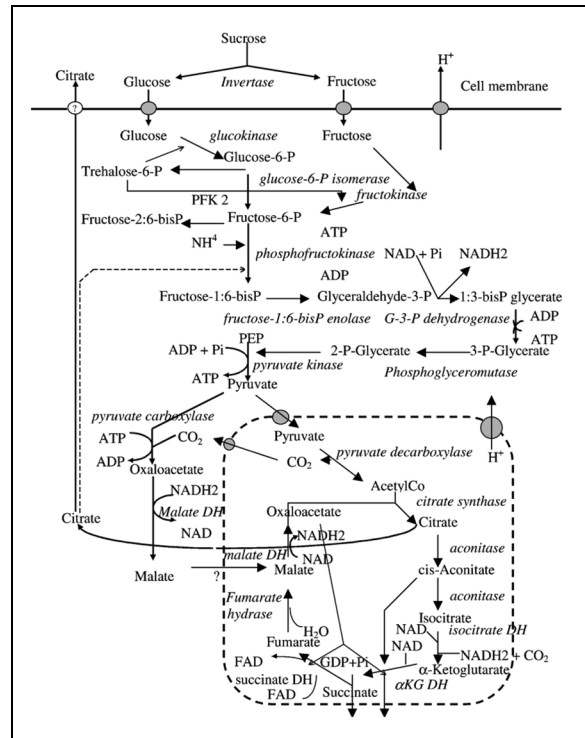
^aThese numbers are intended to give the reader an impression of the order of magnitude in which relevant acids are on the market. One should be aware that reliable market data are not often found in the public domain.

^bThe '—' indicates that these acids are not microbially produced on an industrial level to our knowledge.

(Ref: Michael Sauer, 2007)

在*A. niger*合成檸檬酸的代謝路徑中，涉及水楊羥酸呼吸代謝作用(salicylhydroxamic acid, SHAM-sensitive respiration)及菌株內糖分解代謝(glycolytic metabolism)與ATP/NADH能量轉換，這些因素都會影響生合成檸檬酸的產量多寡。在檸檬酸的發酵製程上，以實驗設計法-回應曲面法(response surface methodology；RSM)計算出最適化的菌株生產培養基組成，以孢子接種濃度 10^8 spores/ml，培養於240.1g/L甜菜糖蜜(beet molasses)，10.5g/L玉米漿(corn steep liquor)中，起始pH值4.0與通氣量6,500ml/min，控制發酵溫度為31.5℃，其檸檬酸產率可達87.81%，提升14倍之多。

在發酵過程中，添加微量元素(Zn, Mn, Fe, Cu, heavy metals, alkaline metals)的濃度控制，實為檸檬酸產量的一大變因。在*A. niger*的組成代謝(cellular anabolism)中，錳離子扮演極為重要的角色，包括細胞壁合成、孢子形成與二次代謝物生合成。在孢子出芽生殖後，聚集形成菌絲球，直徑小於0.5mm是高產量檸檬酸的必備條件。例如細胞內在缺乏錳離子的條件下，造成銨鹽濃度過高，而抑制磷酸果糖激酶(phosphofructokinase；PFK)對葡萄糖的轉化能力，而當葡萄糖濃度過高時，會抑制2-酮戊二酸去氫酶(2-oxoglutarate dehydrogenase)的活性，導致代謝的上下游大量累積終端產物，而出現不平衡的代謝流現象，最終影響檸檬酸的生合成，如圖一所示。



Ref: Maria Papagianni, 2007

▲圖一 檸檬酸生合成路徑圖

- (1) 在糖解代謝後，由丙酮酸激酶(pyruvate kinase)累積大量丙酮酸(pyruvate)，用以提高進入三羧酸循環(tricarboxylic acid cycle；TCA cycle)中合成檸檬酸的上游基質，增進檸檬酸生合成的累積量。
- (2) 檸檬酸合成酶(citrate synthase)為一個可逆反應的催化酶，反應如下： $2\text{acetyl CoA} + \text{oxaloacetate} \leftrightarrow \text{citrate}^{3-} + \text{H}^+ + \text{CoA-SH}$ ，藉由發生硫酯(thioester)水解反應，平衡反應會趨向檸檬酸的合成，草酸鹽(oxaloacetate)的濃度亦會影響以乙醯輔酶(acetyl CoA)為基質的酵素動力平衡常數 K_m 。

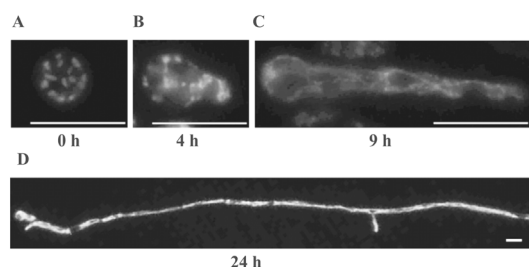
*A. niger*細胞膜上有檸檬酸轉運蛋白(transporter)存在，而已糖攝取(hexose uptake)或磷酸化作用(phosphorylation)控制著檸檬酸的生

產，另外藉由攝取高濃度葡萄糖，也有助檸檬酸的生成；再者，pH2.0下檸檬酸鹽快速以非解離形式藉由轉運蛋白擴散出細胞。

在改質菌種研發上，也運用到突變法供作高產率檸檬酸菌株的篩選，包含紫外線照射(ultraviolet irradiation；UV)、甲磺酸乙酯(ethyl methane sulfonate；EMS)及吖啶橙(acridine orange；AO)，以 *A. niger* UMIP 2564 為例，其檸檬酸產率可達60.25%，比野生株高出3倍之多，再進行第二次突變，檸檬酸產量可再提升4.5~7.5倍之多，產率也可達74.56%。

在基因改質菌株的研究上，以交替氧化酶基因(alternative oxidase gene；*aox1*)融合綠螢光蛋白(enhanced green fluorescent protein；EGFP)，建構在持續性表達(constitutive expression)的載體上，利用視覺表達分析系統的監控，即可利用顯微鏡觀察分生孢子(conidium)出芽生長時相對 $aox1$ 的表達情況，如圖二所示。

近年來已發展出相當多的酵母菌作為檸檬酸的工業生產菌株，以 *Yarrowia lipolytica* 為例，已開發出多達27株的 *Yarrowia* 進化株，



(Ref: Takasumi Hattori, 2008)

▲圖二 螢光顯微鏡觀察AOXEGFP-1在單一分生孢子出芽生長的情形

包含針芽孢酵母(*Aciculoconidium aculeatum*)、假絲酵母(*Candida hispaniensis*, *Candida bentonensis*)，如表三所示。其皆可利用甘油為主要營養碳源，並在限制菌株氮源的生長條件下，可合成檸檬酸，以 *Y. lipolytica* NRRL YB-423 為例，供給40g/L甘油為碳源，可生合成21.6g/L檸檬酸，達到54%轉化率，檸檬酸與異檸檬酸比例也從11.3降低為2~6。

檸檬酸工業生產菌株 *Yarrowia lipolytica* NCIM 3589 在 RSM Doehlert 計算下，最適化菌株培養條件為0.2682g/L酵母萃取物(yeast extract)、54.4081g/L粗甘油(raw glycerol)及13.6936% salt solution concentration，其產量可達77.3999g/L。酵母菌利用生質柴油的副產物10%(w/w)粗甘油，取代日益昂貴的葡萄糖，作為菌株主要生長與生產檸檬酸的基因工程改質。由代謝工程的角度，藉由提升檸檬酸生合成上游的基質供給效率，建構新的重組菌株，以利檸檬酸生產，如圖三所示。由圖一已知檸檬酸的上游基質為丙酮酸(pyruvate)，藉由過量表現(over-expression)甘油去氫酶(glycerol dehydrogenase, *dhaD*)，不但提升甘油的利用率，也相對提升丙酮酸在細胞內的累積量，增加檸檬酸生合成的上游基質累積量，有利於提高檸檬酸生合成效率。

(二)琥珀酸(succinic acid)

琥珀酸($C_4H_6O_4$)已廣泛應用於界面活性劑與清潔劑中，作為離子螯合物，也用於食品產業作為酸味劑、香料劑或抗菌劑。目前對琥珀酸的研究已有相當的成果，包含好氧的大腸桿菌與瘤胃厭氧真菌皆可生合成琥珀酸，

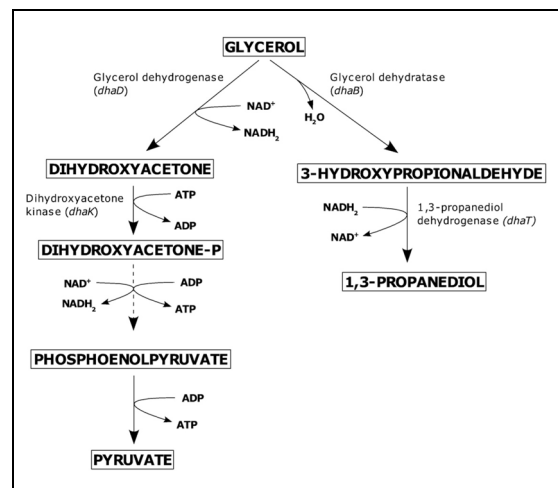
▼表三 檸檬酸生產菌株

Species	NRRL accession number	CA (g/L)	ICA (g/L)	CA/ICA ratio	Source
<i>Y. lipolytica</i>	YB-423	21.6	1.9	11.3	Corn wet milling plant
	Y-1094	20.6	4.7	4.4	Unknown
	Y-2180	19.2	6.2	3.1	<i>Drosophila</i> sp.
	Y-1095	19.0	3.3	5.8	Unknown
	Y-12975	18.3	11.0	1.7	Clinical
	Y-7677	18.2	7.6	2.4	Unknown
	Y-7208	18.1	3.7	4.9	Refrigerated frankfurter
	Y-1694	18.1	10.5	1.7	Yeast starter culture contaminant
	Y-17536	17.6	6.2	2.8	Vegetable salad
	Y-7817	16.7	5.9	2.8	Canadian bacon
	Y-6795	16.2	3.4	4.7	Soil
	YB-1353	15.8	6.4	2.5	Fly larva
	Y-1093	15.7	6.3	2.5	Unknown
	Y-5386	14.0	3.9	3.6	Petroleum storage tank
	Y-7207	11.4	2.2	5.2	Unknown
	Y-7317	11.3	2.8	4.1	Unknown
	Y-17014	10.4	1.8	5.7	Compost soil
	Y-7484	9.9	1.9	5.2	Clinical, sputum
	Y-11853	9.6	2.2	4.4	Unknown
	Y-6049	9.1	2.9	3.1	Petroleum storage tank
	YB-4681	7.9	1.4	5.8	Soil/feces, rookery
	YB-419	5.5	1.8	3.0	Corn wet milling plant
	YB-523	4.8	2.3	2.1	Corn wet milling plant
	Y-7212	3.6	0.6	6.0	Unknown
	Y-5383	3.3	0.9	3.8	Petroleum storage tank
	Y-7751	3.0	0.6	5.1	Meat
	Y-5476	1.4	0.3	4.7	Unknown
<i>Aciculoconidium aculeatum</i>	YB-4297	0.0	0.0	0.0	<i>Drosophila pinicola</i>
	YB-4298	0.0	0.0	0.0	<i>Drosophila occidentalis</i>
<i>Candida bentonensis</i>	YB-2364	0.0	0.0	0.0	Apple cider
<i>Candida hispaniensis</i>	Y-5579	0.0	0.4	0.0	Insect larva
	Y-5580	0.0	0.2	0.0	Insect larva

^a *Y. lipolytica* strains listed in order of high to low CA production. Medium contained 40 g/L glycerol. Abbreviations: CA, citric acid; ICA, D-isocitric acid. (Ref: William E. Levinson, 2006)

其缺點為需要昂貴且複雜的生長培養基，近年來研究已傾向利用簡青黴 (*penicillium simplicissimum*) 菌屬作為琥珀酸的生產菌株。

利用大腸桿菌 (*Escherichia coli* AFP111) 生產琥珀酸的研究中，藉由突變改質厭氧或兼性厭氧微生物中代謝途徑的關鍵酶-丙酮酸甲酸裂解酶 (pyruvate formate lyase, *pfl*)、 NAD^+ 的氧化還原酶-乳酸去氫酶 (lactate dehydrogenase, *ldhA*) 及葡萄糖磷酸轉移酶 (glucose-phosphotransferase enzyme II, *ptsG*)，並且控制 CO_2 的濃度 (0%~50%)，琥珀酸的產率可從4%提升到75%。另外，乙醛酸循環 (glyoxylate cycle) 也在琥珀酸生合成的路徑上，為TCA cycle的一種變化形式，不斷加入乙醯輔酶A (Acetyl CoA)，形成琥珀酸與乙醯酸 (glyoxylate)，更多的代謝工程控制正用於琥珀酸代謝流的研究，利用化學計量分析



▲圖三 甘油生成丙酮酸的路徑圖

(stoichiometric analysis)與擬穩態 (pseudo-steady-state) 假設，來論證 CO_2 在磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (phosphoenol pyruvate, PEP carboxylase) 路徑中，藉減少TCA cycle分支流對琥珀酸生成的影響，提高琥珀酸的累積，如圖四所示。

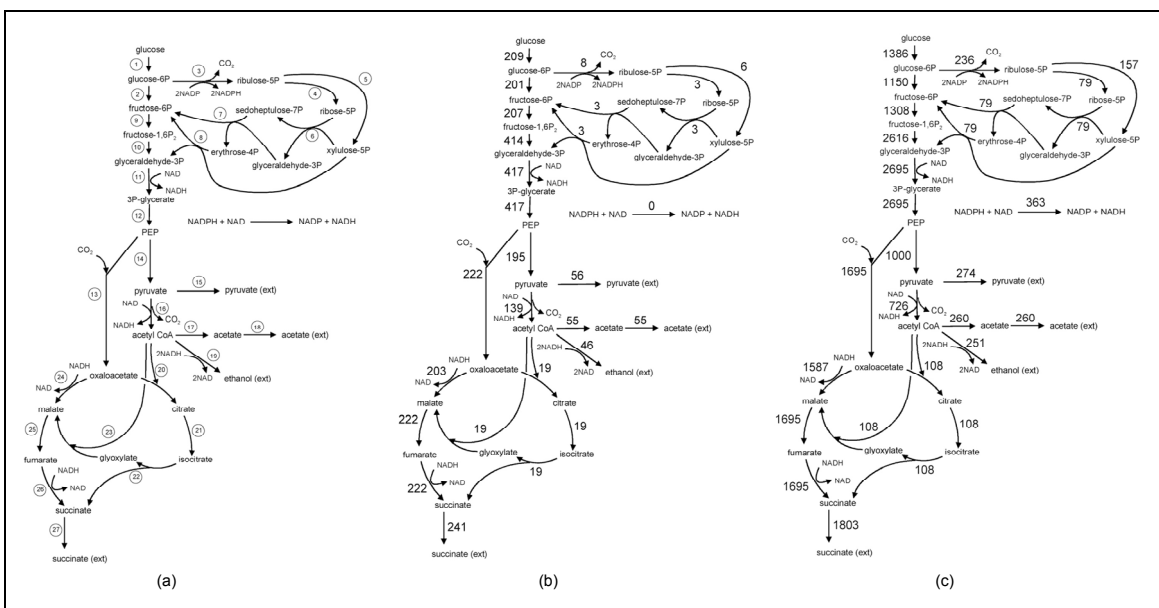
(三)3-羥基丙酸(3-hydroxypropionic acid)

3-羥基丙酸($C_3H_6O_3$, 3-HP)是一個重要的平台化學品，其 T_g 為170~184°C， T_m 為143°C，因其在結構式上比乳酸(lactic acid, 2-hydroxypropionic acid)少甲基團的側鏈，而減少許多立體障礙，使其可作為許多特用化學品的前驅物(precursor)，如1,3-丙二醇(1,3-propanediol, 1,3-PD, $C_3H_8O_2$, MW 76.09)、丙烯酸(acrylic acid, $C_3H_4O_2$, MW 72.06)、丙烯酸甲酯(methyl acrylate, $C_4H_6O_2$, MW 86.09)、丙烯醯胺(acrylamide, C_3H_5NO , MW 71.08)、丙二酸(malonic acid, $C_3H_4O_4$, MW 104.06)、 β -丙內酯(β -propiolactone, $C_3H_4O_2$, MW 72.06)及丙烯腈(acrylonitrile, C_3H_3N , MW 53.06)。

工業應用上可作為聚合物塗佈的交聯劑、金屬的潤滑劑及紡織品的抗靜電劑。

化學合成3-羥基丙酸可分為三條路徑，包含(1)oxidation from 1,3-propanediol；(2)oxidation from 3-hydroxypropionaldehyde (3-HPA)；(3)hydration from acrylic acid。其中(1)(2)皆須有Pd觸媒，而(3)則需要有液態酸或固態酸存在，此些方法都是高成本且低效率的化學合成法。反觀以生物法合成具有四個優勢，包含(1)不需仰賴石油來源；(2)無 CO_2 污染問題；(3)無有機溶劑或是酸液的產生；(4)溫和的操作條件。

其利用代謝工程路徑推測可有12種路徑生合成3-羥基丙酸，如圖五所示，所牽涉的關

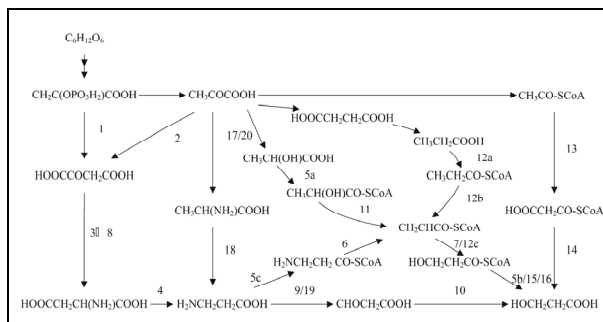


▲圖四 大腸桿菌利用葡萄糖生合成琥珀酸的路徑圖 (A)擬穩態代謝流示意圖；(B)3% CO_2 ；(C)50% CO_2 代謝流分析(mol/g h) (Ref: Shiyong Lu, 2009)

* Key enzymes in the pathways are as follows: 1, glucokinase; 2, phosphoglucosomerase; 3, 6-phosphogluconate dehydrogenase; 4, ribose-5P isomerase; 5, ribulose-5P 3-epimerase; 6, transketolase; 7, transaldolase; 8, transketolase; 9, phosphofructokinase; 10, fructose biphosphate aldolase; 11, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase; 12, phosphoglycerate mutase and enolase; 13, PEP carboxylase; 14, pyruvate kinase; 16, pyruvate dehydrogenase complex; 17, phosphoacetyltransferase and acetate kinase; 19, acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase; 20, citrate synthase; 21, aconitase; 22, isocitrate lyase; 23, malate synthase; 24, malate dehydrogenase; 25, fumarate; and 26, fumarate reductase.

鍵酵素過多，且大多是異種(heterologous)來源，如表四所示。其中又以綠絲菌(*Chloroflexus aurantiacus*)的3-羥基丙酸循環中，可自營固碳CO₂為最節省能源與成本，但這些路徑經過細胞內熱力學的ATP與NADH消長的平衡估算，並不都是得到正面訊息，因此在代謝途徑的基因工程改質重組菌株要達到高3-羥基丙酸累積門檻，評估目前已知的生物資訊訊息仍然是一大挑戰。

預估全球3-羥基丙酸市場需求為363萬噸/年，美商卡吉爾氏公司(Cargill Incorporated)與美國DOE已投資600萬美元從事3-羥基丙酸微生物生物轉化法的研究，如圖六所示。目前學術相關研究成果專注於利用重組大腸桿菌(*Escherichia coli* SH254)轉殖來自克雷白氏肺炎菌(*Klebsiella pneumoniae*)DSM 2026的*dhaB*基因(glycerol dehydratase)與來自*E. coli* K-12 MG1655的*aldH*基因(aldehyde dehydrogenase)，生合成路徑如圖七所示。以甘油為主要培養碳源，利用提升轉殖入的蛋白活性*dhaB*(37.0 U mg/1 protein)與*aldH*(22.8 U mg/1 protein)，3-羥基丙酸轉化率可達到58%，觀察目前生質柴油的產量日益增加，估算副產物甘油占生質柴油10%，全球每年可由生質柴油取得800百萬磅甘油，美國每年可由生質柴油取得320百萬磅甘油，換算甘油價格為每公斤11.34美元(1/2葡萄糖價格)，對於能以甘油為主要碳源的微生物應用在生物轉化反應，的確達到節省成本的需求，為有效利用再生碳源的最佳典範。



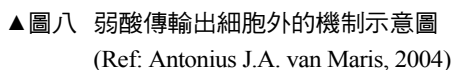
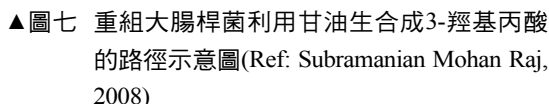
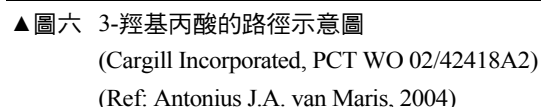
▲圖五 利用葡萄糖為主要碳源生成3-羥基丙酸路徑圖 (Ref: Xinglin Jiang, 2009)

* Enzymes involved: 1, phosphoenolpyruvate carboxylase; 2, pyruvate carboxylase; 3, aspartate aminotransferase; 4, aspartate decarboxylase; 5 (5a, 5b, and 5c), CoA transferase; 6, β -alanine-CoA ammonia lyase; 7, 3-HP-CoA dehydratase; 8, glutamate dehydrogenase; 9, 4-aminobutyrate aminotransferase; 10, 3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase; 11, lactyl-CoA dehydratase; 12, OS17 enzyme (consists of three functional domains: 12a, CoA synthetase; 12b, dehydrogenase; 12c, 3-HP dehydratase); 13, acetyl-CoA carboxylase; 14, malonyl-CoA reductase; 15, 3-hydroxypropionyl-CoA hydrolase; 16, 3-hydroxyisobutryl-CoA hydrolase; 17, pyruvate-glutamate transaminase; 18, alanine 2,3-aminomutase; 19, β -alanine-2-oxoglutarate aminotransferase; 20, alanine dehydrogenase

▼表四 3-羥基丙酸生化合成所需關鍵酵素 (Ref: Xinglin Jiang, 2009)

Enzyme	ID	Source
3-Hydroxyisobutryl-CoA hydrolase	EC 3.1.2.4	<i>Homo sapiens</i>
3-Hydroxyisobutyrate dehydrogenase	EC 1.1.1.31	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
3-Hydroxypropionyl-CoA dehydratase	EC 4.2.1.-	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
3-Hydroxypropionyl-CoA hydrolase	EC 3.1.2.-	<i>Candida rugosa</i>
4-Aminobutyrate aminotransferase	EC 2.6.1.19	<i>Clostridium acetobutylicum</i>
Acetyl-CoA carboxylase	EC 6.4.1.2	<i>Escherichia coli</i>
Aspartate aminotransferase	EC 2.6.1.1	-a
Aspartate decarboxylase	EC 4.1.1.11	-a
CoA transferase	EC 2.8.3.1	<i>Megasphaera elsdenii</i>
Glutamate dehydrogenase	EC 1.4.1.2	-a
Lactyl-CoA dehydratase	EC 4.2.1.54	<i>Megasphaera elsdenii</i>
Malonyl-CoA reductase	EC 1.1.1.-	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
OS17 enzyme	EC 6.2.1.17	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>
PEP carboxylase	EC 4.1.1.31	-a
Pyruvate carboxylase	EC 6.4.1.1	-a
β -Alanine-CoA ammonia lyase	EC 4.3.1.6	<i>Clostridium propionicum</i>

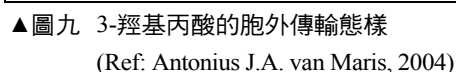
由於3-羥基丙酸屬弱酸(pKa 4.51)，當胞內累積過多的3-羥基丙酸時，會適時地輸送到胞外，而傳輸的機制主要分為兩大類型(圖八)。包含



(1)Primary transport：以生化反應產生的溶質濃度差作為自由能的驅動力，主要藉由細胞膜上的ATP-Binding-Cassette(ABC)轉運蛋白與ATPases產生的質子傳輸來傳輸一般的藥物或有機酸；(2)Secondary transport: 分為單向運輸(uniport)、同向運輸(symport)與反向運輸(antiport)三種，利用貯存電化學能差產生的自由能為驅動力，作為攝取或是傳輸溶質。

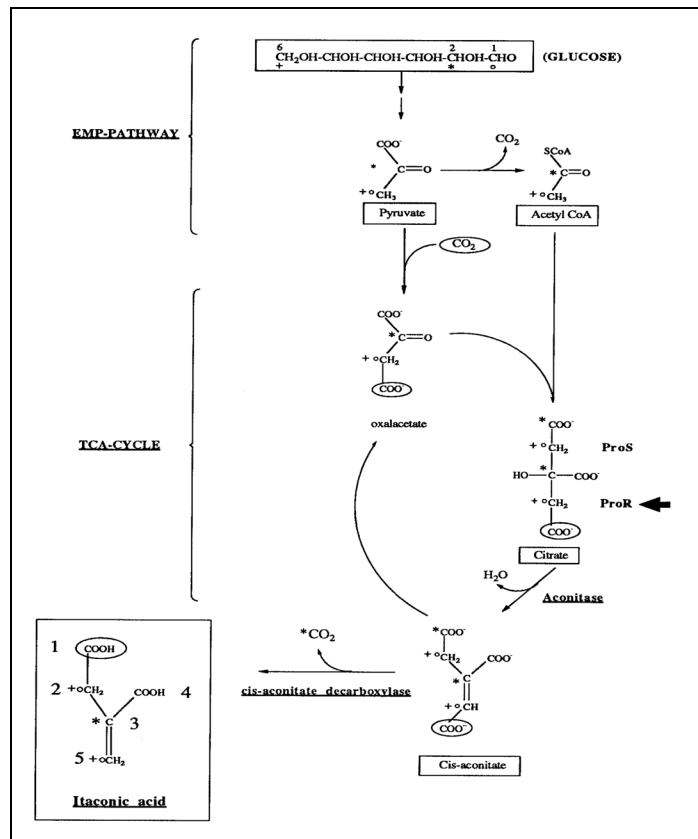
3-羥基丙酸的胞外傳輸式樣(圖九)，依胞外pH與胞內外溶質的濃度比例作為傳輸的重要影響因子考量，分為A、B、C、D四大區，Line C傳輸條件為胞內外溶質比例到達4與pH 2.86時啟動，當胞內外溶質比例過高時，細胞啟動A、B兩區的傳輸模式，D區的傳輸模式的化學計量為1 ATP/ acid molecule。

衣康酸(methylenesuccinic acid, $C_5H_6O_4$)
為一個不飽和的二羧酸，主要應用於樹脂、
合成纖維、塗佈及塗料黏合劑的共聚物。目



前已可利用土黴菌(*Aspergillus terreus*)做大量生產，每年產量15,000噸(表二)，中國瑯琊台集團為全球第二大供應商，生合成路徑如圖十所示，其中以順式烏頭酸去羧酶(*cis*-aconitate decarboxylase, *cad*)為生合成衣康酸的關鍵酵素，目前研發狀況已可利用大腸桿菌或酵母菌來生合成衣康酸，至於要進行大量生產還有一大瓶頸需要克服。也有研究報告指出利用篩菌的方式，可篩選到擔子菌類酵母菌(*Pseudozyma antarctica* NRRLY-7808)生合成衣康酸，利用80g/L葡萄糖達到衣康酸產量30g/L與轉化率為37.5%。全球各研發團隊也投入相當人力從事衣康酸的研發，日本靜岡大學Okabe教授是第一個將CAD定序的研發團隊，後續荷蘭TNO、日本RITE(Research

Institute of Innovative Technology for the Earth)及美國農業部也紛紛投入此一研發領域(表五)。工研院材化所也有相關



▲圖十 衣康酸生合成路徑圖(Ref: P. Bonnarne, 1995)

▼表五 全球衣康酸申請專利彙整表

Pat./Pub. Num	Country	Filing Date	Title	Assignee
EP2017344A1 WO200914437A1	NL	20.07.2007	Production of itaconic acid	TNO
US7479381B1	US	15.12.2006	Production of itaconic acid by <i>Pseudozyma antarctica</i>	United States Secretary of Agriculture
JP2008182936	JP	29.01.2007	<i>Cis</i> -aconitic acid decarboxylation enzyme and gene encoding the same	RITE
JP2009027999	JP	30.07.2007	DNA encoding <i>cis</i> -aconitic acid decarboxylase, method for producing the <i>cis</i> -aconitic acid decarboxylase, and method for producing itaconic acid	National UNIV corp shizuoka UNIV
CN200710116325	CN	29.12.2007	Cultivating method for high-yield itaconic acid strain	Qingdao Langtatai Group Co Ltd.
US6171831B1	TW	22.02.2000	Method for the production of itaconic acid using <i>Aspergillus terreus</i> solid state fermentation	Nation Science Council

Ref: ITRI/UCL V200 (ITRI MCL V200)

計畫持續進行研發，包含菌種開發、菌種改質、發酵放大工程與開發衣康酸新應用，寄望擴大衣康酸市場，再將技術轉移廠商承接，加速國內產業競爭力。

三、結論

利用代謝工程來協助重組菌株進行有機酸發酵已是目前的研究趨勢，目的在降低生產成本、縮短發酵時間並簡化分離純化步驟，因此建構一株高產率基因重組生產菌株，已成為工業生產菌株的必備條件。後續發酵放大工業生產時所應考慮的，即是基因重組菌株的基因/製程穩定性，建立此利基點後，才能使其衍生物順利研發與開發新型終端產品，最終達成新態樣產品生產，使業界廠商蒙惠，以提升國內產業的競爭力。

參考文獻

1. Antonius J.A. van Maris, Wil N. Konings, Johannes P. van Dijken, and Jack T. Pronk. Microbial export of lactic and 3-hydroxypropanoic acid: implications for industrial fermentation processes. *Metabolic Engineering*. 2004; 6:245–255.
2. Daniel E Stafford and Gregory Stephanopoulos. Metabolic engineering as an integrating platform for strain development. *Current Opinion in Microbiology*. 2001; 4:336–340.
3. Gervásio Paulo da Silva, Matthias Mack, Jonas Contiero. Glycerol: A promising and abundant carbon source for industrial microbiology. *Biotechnology Advances*. 2009; 27:30–39.
4. H.S. Grewal and K.L. Kaira. Fungal production of citric acid. *Biotechnology Advances*. 1995; 13(2): 209–234.
5. Maria Papagianni. Advances in citric acid fermentation by *Aspergillus niger*: Biochemical aspects, membrane transport and modeling. *Biotechnology Advances*. 2007; 25:244–263.
6. Michael Sauer, Danilo Porro, Diethard Mattanovich and Paola Branduardi. Microbial production of organic acids: expanding the markets. *Trends in Biotechnology*. 2007; 26(2):
7. P. Bonnarne, B. Gillet, A. M. Sepulchre, C. Role, J. C. Beloeii, and C. Ducrocq. Itaconate Biosynthesis in *Aspergillus terreus* *Journal of Bacteriology*. 1995; 3573–3578.
8. Sarat Babu Imandi, VeeraVenkata Ratnam Bandaru, Subba Rao Somalanka, Hanumantha Rao Garapati. Optimization of medium constituents for the production of citric acid from byproduct glycerol using Doehlert experimental design. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007; 40 :1367–1372.
9. Shiyang Lu, Mark A. Eiteman, Elliot Altman. Effect of CO₂ on succinate production in dual-phase *Escherichia coli* fermentations. *Journal of Biotechnology*. 2009; e-published.
10. Subramanian Mohan Raj, Chelladurai Rathnasingh, Ji-Eun Jo, Sunghoon Park. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain. *Process Biochemistry* 2008; 43:1440–1446.
11. Takasumi Hattori, Yuki Honda, Kuniki Kino, and Kohtaro Kirimura. Expression of alternative oxidase gene (aox1) at the stage of single-cell conidium in citric acid-producing *Aspergillus niger*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008; 105 (1):55–57.
12. T. Venter, J. L. F. Kock, P. J. Botes, M. S. Smit, A. Hugo, and M. Joseph. Acetate enhances citric acid production by *Yarrowia lipolytica* when grown on sunflower oil. *System. Appl. Microbiol*. 2004; 27:135–138.
13. Walid A. Lotfy, Khaled M. Ghanem, Ehab R. El-Helow. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: I. mutagenesis and cost reduction studies. *Bioresource Technology*. 2007; 98:3464–3469.
14. Walid A. Lotfy, Khaled M. Ghanem, Ehab R. El-Helow. Citric acid production by a novel *Aspergillus niger* isolate: II. Optimization of process parameters through statistical experimental designs. *Bioresource Technology*. 2007; 98:3470–3477.
15. William E. Levinson, Cletus P. Kurtzman, Tsung Min Kuo. Production of itaconic acid by *Pseudozyma Antarctica* NRRL Y-7808 under nitrogen-limited growth conditions. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006; 39:824–827.
16. William E. Levinson, Cletus P. Kurtzman, Tsung Min Kuo. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007; 41: 292–295.
17. Xinglin Jiang & Xin Meng & Mo Xian. Biosynthetic pathways for 3-hydroxypropionic acid production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2009; 82:995–1003.