



生产琥珀酸盐有新招

提起“发酵”，我们首先想到的是什么呢？面包？啤酒？从谷物或其他作物中获得酒精？那么提起琥珀酸盐我们又能想到什么呢？从2001年开始，Rice 大学教授、生物化学家 George Bennett 和生物工程学家辛嘉耀（Ka-Yiu San）就致力于改造大肠杆菌，使其能把糖转化为具有多种工业用途的琥珀酸盐。随着“绿色”琥珀酸盐的商品化，他们的努力获得了回报。

琥珀酸盐有什么用途？它可作为食品调味剂、药剂稳定剂。它还可用于生产其他工业用化学品，包括丁二醇，四氢呋喃和吡咯烷酮，并最终用于

生产溶剂、涂料、防冻液、塑料、燃料添加剂、织物、地毯等。

琥珀酸盐最初是用昂贵的方法从石化产品中生产出来的。Rice 大学研究组的目标是用可再生的原料生产出有利于环境保护的琥珀酸盐。Bennett 说：“我们想用可再生的农业原料生产出这种有用的产品，以缓解对有限的石油资源的过度使用。”

能源部化学专家 Gene Petersen 指出：“能源部（DOE）预见未来，生物学家将用生物原料合成燃料和化合物。”从1994年开始，DOE 启动了不

可再生原料替代计划，致力于研究从生物原料合成化学品。Petersen说：“最可能合成的化合物是有机酸，例如琥珀酸、醋酸、柠檬酸。”

这一评估促使能源部开始资助国家实验室和大学研究与发酵相关的项目。2004年，以Petersen为共同作者，能源部发布了题为《生物来源高附加值化合物》(Top Value Added Chemicals from Biomass,)的报告第一卷(第二卷将于2006年发布)。报告将琥珀酸盐列为12类“基础”化合物之首。所谓“基础”化合物，是指那些可以通过生物反应从糖类合成的化合物，它们带有多个功能基团，可以转化为新的有用的化合物。

2001年，以石化产品为原料生产了1千万磅琥珀酸盐，平均每磅销售价为2美元。AgRenew公司(Manhattan, Kansas)的首席研发科学家Praveen Vadlani指出：“只要我们能用更有效的生物转化方法生产琥珀酸盐，就会有市场。”Vadlani预计，大量生产价廉又有利于环境的琥珀酸盐，

会激励人们更广泛地使用它，例如将其作为生物高分子材料或化合物。

优化葡萄糖合成途径

Bennett指出：“从葡萄糖合成琥珀酸盐有多条途径。”从糖类合成琥珀酸有多种生化通路。含六个碳原子的葡萄糖降解生成含三个碳原子的丙酮酸盐。丙酮酸盐不仅能生成含四个碳原子的琥珀酸盐，而且能生成乳酸盐、乙醇、醋酸盐等其他化合物。关键在于加速从丙酮酸盐合成琥珀酸盐的反应，阻断合成乳酸盐、乙醇等其他化合物的反应。

这些通路有的是有氧的，有的是无氧的。Bennett和花了四年时间，建立了大肠杆菌有氧和无氧环境下的代谢通路，使之能利用葡萄糖大量合成纯的、商品化的琥珀酸盐。相比之下，无氧代谢通路更有效些，能从1克葡萄糖合成1.44克琥珀酸钠；有氧代谢通路的效率约为前者的四分之一。

Bennett和辛教授改造了一株大肠杆菌，命

名为SBS550MG。该菌株包含六个基因改造位点，可以通过两种不同的无氧代谢途径生成琥珀酸盐——乙醛酸途径和糖酵解途径。为了达到这一目的，研究者切除了大肠杆菌中四个基因位点，包括乳酸盐和乙醇合成基因；激活乙醛酸途径，以加速葡萄糖合成琥珀酸盐。同时还引入了两个外源基因，以提高琥珀酸盐的产量。

这两条合成琥珀酸盐的途径涉及不同的生化反应，相互之间没有竞争或干扰。事实上，Bennett和辛教授设计的路线是互补的。辛教授说：“SBS550MG快速有效地将葡萄糖转化为琥珀酸盐，产量高、产品纯，几乎不含副产品。高压液相色谱分析表明超过90%的葡萄糖最终转化为琥珀酸盐。”

Rice大学的科学家和AgRenew公司的生物工程专家组成团队，加速这一实验成果进入市场。在Vadlani的指导下，AgRenew公司将完善这一方法，用玉米和高粱取代实验室采用的葡萄糖，生产琥珀酸盐。Vadlani指出：“我们对这一



甜蜜的事业：研究人员正在改良技术，利用生物原料如高粱(上图)取代石油生产琥珀酸盐。另一个小组，MBI国际公司，利用离子交换进一步纯化琥珀酸盐生成琥珀酸(右图)。



Left to right: Photodisc; MBI International

技术充满信心。一旦技术成熟，我们会把原料改为玉米秆或其他农业废物。”

跟随者和竞争者

多元化天然产品公司 (DNP, Scottville, Michigan) 的首席科学家 Kris Berglund 也感受到了市场对“绿色”琥珀酸盐的新的需求。DNP 也利用大肠杆菌发酵糖类来生产柠檬酸盐,但他们使用的菌株是能源部 (DOE) 在“原料多样化计划”中生产的专利菌株。与 Bennett 和辛教授的方法不同, DNP 的发酵过程首先是一个有氧反应,然后是一个厌氧反应,中间需要添加二氧化碳。Berglund 说:“葡萄糖提供 6 个碳原子,二氧化碳提供 2 个碳原子,最后生成两分子琥珀酸盐,每个含有 4 个碳原子。”

DNP 正和农业-工业研发公司 (ARD, Pomacle, France) 合作,大规模生产以农产品为原料的柠檬酸盐。这一合资项目于 2005 年 8 月 30 日由法国总统 Jacques Chirac 宣布开始的。为了寻找合作伙伴共同生产生物来源琥珀酸盐, Berglund 走访了世界各地,并最终选择了 ARD, 因为“他们和我们有着相同的理念,希望用生物大分子产品取代石油化工产品。”

第一年,坐落于香槟生产区的 ARD 工厂将利用小麦和甜菜生产 200 吨琥珀酸盐。DNP 同时希望在美国也建造一个大的工厂。Berglund 说:“据我们所知,我们是第一个利用生物原料商业化生产琥珀酸盐的公司。”虽然生产才刚刚起步,“客户已有购买意向了”,特别是将其用作香精、稳定剂、酸化剂的食品生产商。客户青睐“绿色”琥珀酸盐,认为这是一种天然成分,会受到有机食物消费者的欢迎。

消费者也争相购买 DNP 公司的含琥珀酸盐的防冻液。琥珀酸盐可以降低水的冰点,取代了市场上现有的防冻液中的甲酸盐和乙酸盐。这些化合物不仅会腐蚀飞机上的金属合金、塑料和橡胶部件,而且会破坏机场的混凝土表面和照明设备的塑料和金属部件。据 Berglund 说,国家航空部将很快批准 DNP 防冻液的使用。DNP 公司还利用琥珀酸盐生产其他产品,包括可生物降解的、不会污染环境或破坏大气层的溶剂;可减少废气排放的柴油添加剂;以及可生物降解的、用于纤维织物或塑料生产的聚酯。

DNP 公司没有透露生产的细节,但是“我们的方法可以和任何传统的石化生产工艺相媲美。”据粗略估算,如果石油价格为每桶 25 美元, DNP

可以每磅不到 1 美元的价格出售琥珀酸盐。随着石油储备的下降和石油价格的上升, Berglund 预计:“工艺的经济效益将更加可观。”

其他公司也紧随其后。位于 Lansing 的密西根生物技术学院 (MBI) 也开发了相关的专利技术。该技术利用从奶牛的瘤胃 (反刍动物的第一胃,如同一个发酵罐) 中分离得到的一种细菌 *Actinobacillus succinogenes*。MBI 的科学家建立了一株变异株,可以利用生物大分子糖类通过厌氧反应得到琥珀酸盐,大约 1 克葡萄糖可以生产 1 克琥珀酸盐。不同类型的生物大分子糖类,包括玉米秆、玉米纤维、蔗糖,都可以用于发酵生产。

MBI 的方法也需要通入二氧化碳。微生物学家、MBI 质量管理主任 Bernie Steele 说:“这是没有温室效应的发酵过程,因为我们的工艺消耗二氧化碳,而不是产出二氧化碳。”他预见把公司的生物来源琥珀酸盐生产线和酒精生产线相连,后者的生产废料是二氧化碳。把一个生产线的副产品用于另一个生产线的生产原料,这样的生物精炼工程将最大限度提高经济效益。

经过十年的研发工作, MBI 目前正在寻找合作者扩大“绿色”琥珀酸盐的生产规模。Steele 说:“利用生物原料转化为能量或化合物的技术已经成熟了。”

琥珀酸盐的未来用途

琥珀酸盐将来不仅可以作为食品添加剂,还可作为新型的生物大分子如聚丁烯琥珀酸盐,一种可降解的塑料。它过去是用石油生产的,被广泛用于胶卷、包装袋、一次性卫生用品、园艺薄膜的包装。Berglund 说:“有客户等着购买琥珀酸盐用

于生产高分子材料。”其他较硬的可降解塑料,如聚乳酸,可用于制造饮料杯,食物托盘、容器和花盆。这些“绿色”替代品正取代了过去用石油生产的产品。

Petersen 说:“工业巨头,如 Cargill 和杜邦,许诺用生物原料进行生产。这给生物发酵业带来了光明的未来。”Cargill 公司用玉米等可再生原料生产多达 3 亿磅的聚乳酸 (商品名 NatureWorks PLA)。杜邦公司现在是用石化原料生产 Sorona (一种 1,3-聚丙二醇高分子材料,用于增加纤维织物的柔软度和延展度)。2006 年,杜邦将转而使用发酵工艺从玉米糖中生产 1,3-丁二醇。这个以玉米为原料生产的高分子材料,商品名为 Bio-PDO, 是杜邦生物原料产品部研发的第一个产品。

尽管有市场,前途并不明朗。一般来说,寻找经济有效的方法,把可再生的生物原料转化为日用化合物,大约需要 10 年;关于 NatureWorks PLS 的基础研究从 20 世纪 80 年代就开始了。Petersen 承认:“尽管从环境考虑,我们希望能摒弃石化产品,但这不是轻而易举的。”

但 Bennett 认为, Cargill 和杜邦正在进行的规模化生产表明他们对发酵工艺有长远的商业兴趣。他预见有更多的公司涉足生物产品领域,通过工艺改造提高琥珀酸盐及其他生物产品的经济效益。随着石油价格的上涨以及发酵工艺的效益提高, Vadlani 认为,公司将用不同的工艺生产相同的终产品。

—Carol Potera

译自 EHP 113:A832-A835 (2005)

参 考 读 物

- Chatterjee R, Millard CS, Champion K, Clark DP, Donnelly MI. 2001. Mutation of the *pstG* gene results in increased production of succinate in fermentation of glucose by *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 67(1):148-154.
- Guettler MV, Rumler D, Jain MK. 1999. *Actinobacillus succinogenes* sp. nov., a novel succinic-acid-producing strain from the bovine rumen. *Int J Syst Bacteriol* 49 (pt 1): 207-216.
- Sanchez AM, Bennett GN, San KY. 2005. Novel pathway engineering design of the anaerobic central metabolic pathway in *Escherichia coli* to increase succinate yield and productivity. *Metab Eng* 7(3):229-239.
- Werpy T, Petersen G, eds. 2004. Top Value Added Chemicals from Biomass. Volume I—Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas. Springfield, VA: National Technical Information Service. Available: <http://www.nrel.gov/docs/fy04osti/35523.pdf>.

就在纽约和华盛顿遭受 9.11 恐怖袭击数周后，含有炭疽芽孢的信件被寄往纽约的报社、电视台和国会的两位参议员。尽管信件仅仅几封，却造成 22 人感染（炭疽）并有 5 人死亡。更为严重的是，这次的生物恐怖袭击让人们为今后是否还有范围更广的恐怖袭击而感到惶恐不安。如今佛罗里达中央大学（University of Central Florida）的学者们正在研发一种可以迅速生产数以千万份计、更为安全的炭疽疫苗的新技术以应对今后可能发生的炭疽袭击。

早在 1960 年，美国的微生物学家就用炭疽杆菌生产炭疽疫苗。该菌的毒素主要是由水肿因子（EF），致死因子（LF）和保护性抗原（PA）构成的。水肿毒素使感染的局部水肿，致死因子造成细胞坏死或丧失活力，这两种毒素产生侵害都需要保护性抗原在细胞上形成的通道——保护性抗原和蛋白质受体联结后产生一种联合体，让这两种毒素附着其上。

据 Stephen Leppla，美国过敏与感染性疾病研究中心（NIAID）的一名资深研究员说，如果没有保护性抗原，炭疽杆菌就不会引起感染，“它将从根本上失去活力，毒力也会减弱”。如今的炭疽疫苗正是基于这个原理，将无毒力的保护性抗原接种到体内以产生抗体。这样，将来如发生炭疽暴露，这些抗体就可以中止感染。

寻求保护性抗原

可是，如何获得大量的保护性抗原是个问题。仅有一家公司，密执安州蓝星市的生物港公司（BioPort）经 FDA 许可，获准在美国生产炭疽疫苗。据生物港公司发言人 Kimberly Brenne Root 女士介绍，公司用发酵法每年仅能生产八百万份炭疽疫苗。这对于满足美国国防部（DOD）和卫生福利部（HHS）储备并为军人接种的需要来说已足够了，但无法满足遭遇广泛袭击时为大量市民的接种。

2004 年，为了生产更多的疫苗，美国政府将一个 8.775 亿美元的合同授予加利福尼亚州布里斯班的 VaxGen 公司，要在 2006 年年底生产 7500 万份疫苗。然而，一系列的挫折还是造成了拖延。2006 年 5 月 10 日，公司官员证实，即便以最快的速度，第一批疫苗也不可能于 2007 年下半年之前交付。

同时，生物港公司生产的疫苗的不安全性也引起了人们的关注。几名参加过海湾战争的人员报告说接种后出现健康方面问题。还有报告说该疫苗会引起心脏病、心血管疾病、癫痫、海湾战争综合征，甚至死亡。有正式记录的副作用包括接种部位的疼痛肿胀，炎症、类流感症状、不适、皮疹、关节痛和头痛等。生物港公司的疫苗可能被少量的水肿因子和致死因子所污染而导致了不良反应。

为了解决这些问题，亨利·丹尼尔（Henry Daniell），佛罗里达中央大学的分子生物学和微生物学教授，一直致力于研究获得大量不含水肿因子和致死因子的“干净的”保护性抗原的方法。现在他认为终于找到了。

翻开新的一页

丹尼尔和他的研究小组先从炭疽杆菌分离到保护性抗原的基因，然后把这基因插入烟草作物中。“这对烟草作物有很多好处，”丹尼尔说，“这些烟草作物可以生产出大量生物质……还有，我们不想在粮食作物中生产疫苗以免交叉污染或者在装运时和别的粮食混在一起”。（虽然烟草在装运时也可能被搞混，但点燃烟草吸烟时其中所含的保护性抗原会遭到破坏。）更重要的是，丹尼尔说：“烟草作物的基因操作非常简单。”

丹尼尔的小组选择从叶绿体而不是细胞核插入基因，因为他们可以得到更多的保护性抗原。收获烟草时，丹尼尔的小组发现

每株作物都产出了约 150 毫克炭疽保护性抗原，这样就可以从每英亩烟草作物中得到用于制造 3.6 亿份疫苗的保护性抗原。由于仅提取烟草中的保护性抗原，所以由此生产的疫苗比发酵法的疫苗更纯。

把保护性抗原给小鼠接种，这些啮齿类动物体内就产生了很高水平的抗保护性抗原的抗体。免疫后的小鼠被送往美国过敏与感染性疾病研究中心接受炭疽毒素试验。Leppla 给小鼠注射 150 毫克的炭疽毒素——小鼠致死量的 1.5 倍。但小鼠存活了，证明这种新方法可以生产有效的疫苗。这个发现发表在 2005 年 12 月的《感染与免疫》

（*Infection and Immunity*）一文上。

可行性考虑

印度新德里 Jawaharlal Nehru 大学的生物技术中心主任 Rakesh Bhatnagar，也从事植物生产炭疽疫苗的研究。他签署过一份商业合同，合同要求生产的炭疽杆菌保护性抗原的数量超过了当时生物港用发酵法生产的能力。他相信丹尼尔的研究很重要，它表明植物中提取的保护性抗原可以保护动物免于感染炭疽。但他也认为植物生产疫苗还需假以时日。

“目前研究人员只在少数植物进行了蛋白质表达，也只在小动物身上试验，”Rakesh Bhatnagar 说，“植物疫苗的研发还有很长的路要走，因为该行业要求高生产力的成功运作。另外，每项工作须得到政府许可，这都需要时间。但是，如果让我估计的话，也许还要花十年时间。”

丹尼尔却不同意这样的估计。他说，如今用于对付生物恐怖的

妙用烟草 对抗炭疽