

甘油歧化为 1,3-丙二醇的代谢及关键酶研究进展

Progress in Metabolism and Crucial Enzymes of Glycerol Conversion to 1,3-propanediol

田平芳, 谭天伟*

TIAN Ping-Fang and TAN Tian-Wei*

北京化工大学生命科学与技术学院 北京 100029

College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China

摘 要 微生物发酵生产 1,3-丙二醇因对环境友好而成为研究热点。通过对发酵菌种、代谢途径、调节子和关键酶的分析,阐述了微生物转化甘油为 1,3-丙二醇的分子机理。尤其对还原途径的限速酶-甘油脱水酶的分子结构及再激活因子进行了详细分析,为菌种的遗传改造提供了理论依据。

关键词 1,3-丙二醇,甘油脱水酶,再激活因子

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)02-0201-05

Abstract 1,3-propanediol production by microbial fermentation has become the research hot spot for its amiability with the environment. Here the molecular mechanism of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol was outlined by elucidating the fermentation strains, metabolic pathways, regulon and key enzymes. Of enzymes, glycerol dehydrogenase, the velocity-limiting enzyme in glycerol reductive pathway, was emphatically discussed with regard to its molecular structure and reactivating factors. This paper aims to provide the basis for genetic modification of fermentation strains.

Key words 1,3-propanediol, glycerol dehydrogenase, reactivating factor

聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT)是由 1,3-丙二醇(1,3-PD)和对苯二甲酸聚合而成的新型优质聚酯材料。PTT 在纺织、塑料及食品包装等方面具有广阔的应用前景。现今 1,3-PD 的生产主要依靠化学法,设备投资大、成本高、污染环境。微生物发酵生产 1,3-PD 条件温和、操作简便、绿色环保^[1~3]。由于野生菌转化碳源为 1,3-PD 的产率较低,构建高转化率、遗传稳定的发酵基因工程菌成为研究热点。深入理解甘油歧化为 1,3-PD 的分子机理,可为工程菌

构建和发酵调控提供理论依据^[4~6]。

1 转化甘油为 1,3-PD 的菌种

目前从自然界分离获得的菌种只能以甘油为碳源,无法直接转化葡萄糖为 1,3-PD。研究发现,能够转化甘油为 1,3-PD 的菌种主要有肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、产气克雷伯氏菌(*Klebsiella aerogenes*)、弗氏柠檬杆菌(*Citrobacter freundii*)^[7,8]、乳杆菌属的短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)和布氏乳杆菌

Received: October 16, 2006; Accepted: November 17, 2006.

This work was supported by the grants from Key Project of National Programs for Fundamental Research and Development(973) of China (No. 2003CB716002) and Research Project for Young Teachers of Beijing University of Chemical Technology (No. QN0403).

* Corresponding author. Tel: +86-10-64416091; E-mail: twtan@mail.buct.edu.cn

国家 973 高技术研究与发展计划项目(No.2003CB716002)和北京化工大学青年基金项目(No.QN0403)资助
© 中国科学院微生物研究所期刊编辑部 http://journals.im.ac.cn

(*Lactobacillus buchnerii*)^[9]以及巴氏梭状芽孢杆菌(*Clostridium pasteurianum*)^[10]和梭菌属的丁酸梭状芽孢杆菌(*Clostridium butyricum*)^[11]。甘油经微生物代谢除产生 1,3-PD 外,还能产生乙酸、乙醇、丁酸等副产物。由于底物、产物和副产物都能抑制微生物生长^[12]。由于 *K. pneumoniae* 具有相对较强的甘油耐受力,和较高的 1,3-PD 转化率,且属兼性菌,因此成为工程菌构建的首选菌种。策略上可对 *K. pneumoniae* 本身直接进行遗传改造,或构建其基因表达载体,再转化大肠杆菌等模式宿主菌。近年发现产 1,3-PD 的新菌种,如梭菌属的乳酸菌和 1 种嗜热菌(*Caloramator viterbensis*)^[13~15]。此外,利用宏基因组研究方法,可从未培养微生物中筛选更多生产 1,3-PD 的基因资源^[16,17]。

2 1,3-PD 的代谢途径、调节子与关键酶

2.1 代谢途径与调节子

甘油歧化为 1,3-PD 包括氧化途径和还原途径^[4~6]。氧化途径包括:(1)甘油在甘油脱氢酶(GDH)催化下生成 2-羟基丙酮(DHA),此酶需厌氧环境,以 NAD⁺ 为辅酶;(2)DHA 在 ATP 及 2-羟基丙酮激酶(DHAK)作用下,生成磷酸二羟丙酮(DHAP);(3)DHAP 进一步生成丙酮酸,然后通过乙酰 CoA 进入三羧酸循环或生成其它小分子醇、酸等代谢产物。氧化途径产生 ATP 和还原力 NADH₂,并伴随着微生物细胞的生长^[4~6]。还原途径包括:(1)在维生素 B12(VB12)存在下,甘油脱水酶(glycerol dehydratase, EC 4.2.1.30)将甘油转化为 3-羟基丙醛(3-HPA);(2)在还原力存在下,1,3-PD 氧化还原酶(1,3-propanediol oxidoreductase)催化 3-HPA 生成 1,3-PD^[14](图 1)。还原途径消耗氧化途径产生的过量 NADH₂,使微生物细胞内的还原物质达到平衡。在所有已发现的可将甘油歧化为 1,3-PD 的野生菌中,编码甘油代谢所需酶的基因都位于二羟基丙酮(*dha*)的调节子上。该调节子包括:甘油脱水酶(*dhaB*、*C*、*E*)、1,3-PD 氧化还原酶(PDOR)、甘油脱氢酶 GDH(*dhaD*)、二羟基丙酮激酶 DHAK(*dhaK*)的编码基因和调节基因(*dhaR*) (图 2)。

2.2 甘油脱水酶

2.2.1 甘油脱水酶的结构 在 *K. pneumoniae* 的 *dha* 调节子中, *dhaB* 编码甘油脱水酶, *dhaT* 编码 1,3-PD 氧化还原酶,这两种酶是甘油歧化为 1,3-PD 的关键酶,其中甘油脱水酶是限速酶(图 1)。甘油脱水酶包括 α 、 β 和 γ 三个功能亚基,分别由 3 个阅读框

(*dhaB1*、*dhaB2*、*dhaB3*)编码,中间间隔 2~12 个碱基对,它们共用 1 个启动子^[18]。这 3 个亚基可以折叠成空间结构,中心区域构成活性中心,晶体结构研究表明,该 3 亚基先形成 $\alpha\beta\gamma$ 结构单元再形成二聚体 $\alpha\beta\gamma_2$ ^[19]。*dhaB3* 随后的 *dhaB4* 对于甘油脱水酶的结构是非必需的,但含有 *dhaB1*、*dhaB2*、*dhaB3* 和 *dhaB4* 的基因工程菌比只含 *dhaB1*、*dhaB2*、*dhaB3* 的重组菌得到更高产量的 1,3-PD^[20]。事实上, *dhaB4* 作为甘油脱水酶再激活因子^[21,22]。甘油脱水酶以 VB₁₂ 为辅基,发酵过程中微量流加 B₁₂ 即能满足微生物代谢需要^[23]。

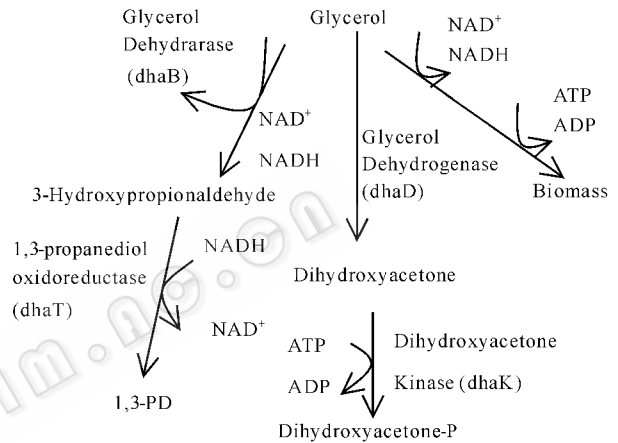


图 1 甘油歧化为 1,3-丙二醇的代谢途径
Fig. 1 Metabolic pathway of Glycerol conversion to 1,3-propanediol

二醇脱水酶(Diol dehydratase, EC 4.2.1.28)是甘油脱水酶的同工酶,具有相似的底物专一性,也由一个基因簇编码,称为 *pdu* 操纵子,其所包含基因可以编码再激活蛋白和与 VB₁₂ 再生有关的酶^[24]。Tobimatsu 等发现,甘油脱水酶 α 亚基氨基酸序列的 121-406 区域与二醇脱水酶具有 83% 的同源性,而 N-端和 C-端保守性相对较低; β 亚基中 90-143 区域与二醇脱水酶同源性高达 91%,表明 α 和 β 亚基的中间序列为功能区域,这为基因分子改造提供了依据^[18]。与二醇脱水酶相比,甘油脱水酶中 α 与 β 亚基的结合更为紧密,提示其对辅酶 VB₁₂ 更高的亲和性^[19]。其他菌种的甘油脱水酶结构与 *K. pneumoniae* 同源。例如, *C. freundii* 的甘油脱水酶是由 *dhaB*、*dhaC* 和 *dhaE* 编码的^[8]。调节子和代谢网络相似性体现了菌种进化上的亲缘关系。

2.2.2 甘油脱水酶再激活因子:已如前述,甘油脱水酶(*dhaB*)的活性强烈依赖辅酶 VB₁₂。VB₁₂ 在甘油存在下发生自杀失活(suicide inactivation),其中的 C5-甲基发生不可逆断裂,形成 5-脱氧腺苷和烷基

钴胺素类似物。被修饰的 VB_{12} 和甘油脱水酶紧密结合,使酶失去活性。在再激活蛋白、ATP、 Mg^{2+} 和游离 VB_{12} 存在下,被修饰的 VB_{12} 能够被完整的 VB_{12} 替代,使甘油脱水酶重新被激活^[22, 25, 26]。Kajiura 等发现, *K. pneumoniae* 中的再激活蛋白是由 *gdrA* 和 *gdrB* 编码形成的(*gdrA*)₂(*gdrB*)₂ 蛋白复合体,在 ATP、 Mg^{2+} 和完整 VB_{12} 存在下,可复活由甘油或氧气引起失活的甘油脱水酶。再激活蛋白使游离完整的 VB_{12} 置换与甘油脱水酶结合的缺失腺嘌呤的 VB_{12} 。当 ADP 存在时,再激活蛋白表现极低的 ATP 水解活性,而与甘油脱水酶本身结合,再激活蛋白与甘油脱水酶- VB_{12} 复合体发生作用, VB_{12} 被释放出来。而当 ATP 存在下,失活的甘油脱水酶蛋白-再激活蛋白复合体发生解离,独立存在的甘油脱水酶(脱辅基酶蛋白)恢复催化功能。整个激活过程包括两个步骤:依赖 ADP 的 VB_{12} 释放及依赖 ATP 的脱辅基酶蛋白-再激活蛋白的解离。从机理来看,再激活蛋白属于分子伴侣的范畴^[22]。结晶学研究也证明了这一点,因为再激活蛋白和甘油脱水酶在结构上具有相似性^[27]。在 *C. freundii* 中, *dhaF* 和 *dhaG* 编码甘油脱水酶的再激活蛋白(图 2), Northern 杂交表明这两基因在甘油发酵时表达。 *dhaF* 与编码甘油脱水酶的 *dhaBCE* 一起转录,而 *dhaG* 与 *dhaT* 同时表达。 *DhaF-DhaG* 形成复合体,在 VB_{12} 、ATP 和 Mg^{2+} 存在下, *DhaF-DhaG* 复合体迅速激活由甘油或氧气抑制的甘油脱水酶以及甘油-辅酶 B_{12} 复合体。 *DhaF-DhaG* 复合体和 *DhaF* 虽具 ATP 水解活性,但与甘油脱水酶的再激活不直接相关。 *DhaF-DhaG* 可以激活 *K. pneumoniae* 中的甘油脱水酶- VB_{12} 复合体以及甘油抑制的甘油脱水酶,但对 *C. pasteurianum* 的甘油脱水酶和肠内细菌的二醇脱水酶无效,表明 *K. pneumoniae* 与 *C. pasteurianum* 中甘油脱水酶结构上的差异^[7, 26]。

Mori 等研究发现二醇脱水酶也存在相似的再激活机制^[25, 28],二醇脱水酶再激活蛋白的编码基因为 *ddrA*、*ddrB*,根据蛋白分子量推测其为二聚体 A_2B_2 。该再激活蛋白在 VB_{12} 、ATP 和 Mg^{2+} 存在下不仅能复活因甘油失活的甘油脱水酶- VB_{12} 的复合体,还能复活因氧气失活的甘油脱水酶。有意思的是,二醇脱水酶的再激活蛋白可以复活失活的甘油脱水酶,但甘油脱水酶的再激活蛋白却不能复活失去活性的二醇脱水酶,表明它们专化性的差异^[22, 29]。尽管 ATP 的水解是再激活蛋白必需的,但 ATP 的水解与复活

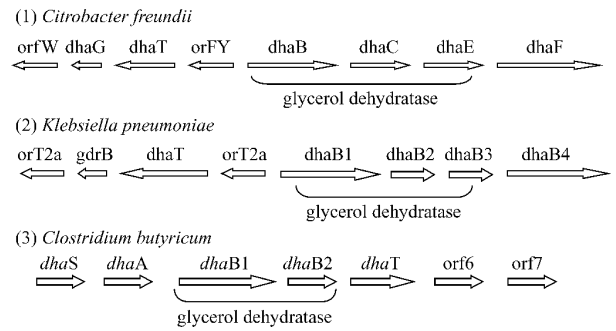


图 2 1,3-PD 的调节子

Fig. 2 The regulon of 1,3-PD

无直接联系^[28],再激活因子通过与脱辅基酶蛋白结合而抑制 ATP 酶的活性^[18]。最近研究发现,位于乙醇胺解氨酶基因的上游存在再激活因子 *eutA* 基因,其再激活机理与甘油脱水酶及二醇脱水酶大致相同^[30],表明这种机制的保守性。

C. butyricum 是目前发现的唯一不依赖 VB_{12} 的菌株^[11],将其代谢途径导入 *K. pneumoniae* 中,有望省略发酵中流加 VB_{12} 。 *C. butyricum* 与 *K. pneumoniae* 甘油脱水酶活性中心的催化部位和结合部位存在哪些差异? *K. butyricum* 在进化中是丢失或是改变了激活机制?尚待研究。随着研究的不断深入,其他菌的再激活原理将被逐步揭示,有望从中获得规律性的认识。

2.3 1,3-PD 氧化还原酶

通过 PRESAGE(<http://presage.berkeley.edu>)搜索得知,1,3-PD 氧化还原酶属于乙醇脱氢酶第三家族^[31],在 *K. pneumoniae* 中由连续基因 *dhaT* 编码,转录方向与甘油脱水酶基因相反,由另一启动子控制^[18]。与 *K. pneumoniae* 不同, *C. butyricum* 调节子中的基因在同一方向转录^[11](图 2)。为实现 *dhaB*、*dhaT* 基因的高效表达,构建载体时须借鉴自然菌中基因簇的排布模式。Skraly 等将 *K. pneumoniae* 的 *dhaT* 和 *dhaB* 置于同一启动子下,转化大肠杆菌后进行发酵, *dhaB* 和 *dhaT* 均得到高表达。发酵分为 2 个阶段。第一阶段主要是菌体生长,主要产物为 1,3-PD 和乙酸;第二阶段细胞生长较少,主要产物是 1,3-PD 和丙酮酸。发酵时需添加微量的 B_{12} 以使甘油脱水酶发挥作用^[23]。Wang 等研究了 *K. pneumoniae* 甘油脱水酶、甘油脱氢酶、1,3-PD 氧化还原酶的表达谱,利用双向电泳技术发现,依赖磷酸烯醇式丙酮酸的二羟丙酮激酶(DHAK 2)和一个推断的氧化还原酶(HOR)也直接参与了甘油代谢和 1,3-PD 的形成,表明甘油代谢存在复杂的分子机制^[32]。

- [19] Yamanishi M , Yunoki M , Tobimatsu T , *et al.* The crystal structure of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase in complex with cobalamin and propane-1,2-diol. *Eur J Biochem* ,2002 ,**269** :4484 – 4494.
- [20] Diaz-Torres M , Dunn-Coleman N , Chase M , *et al.* Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant organisms comprising genes for Vitamin B₁₂ transport , US. Pat No. 6136576 ,1997 – 11-13.
- [21] Tobimatsu T , Kajiura H , Yunoki M , *et al.* Identification and expression of the genes encoding a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Bacteriol* , 1999 ,**181**(13) :4110 – 4113.
- [22] Kajiura H , Mori K , Tobimatsu T , *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem* , 2001 , **276** (39) : 36514 – 36519.
- [23] Skraly FA , Lytle BL , Cameron DC. Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon. *Applied and Environmental Microbiology* , 1998 ,**64**(1) : 98 – 105.
- [24] Tobimatsu T , Hara T , Sakaguchi M , *et al.* Molecular cloning , sequencing , and expression of the genes encoding adenosylcobalamin-dependent diol dehydrase of *Klebsiella oxytoca* . *J Biol Chem* , 1995 , **270** : 7142 – 7148.
- [25] Toraya T , Mori K. A reactivating factor for coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase. *J Biol Chem* , 1999 , **274** : 3372 – 3377.
- [26] Seifert C , Bowien S , Gottschalk G , *et al.* Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B₁₂-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii* . *Eur J Biochem* , 2001 , **268** : 2369 – 2378.
- [27] Liao DI , Reiss L , Turner I , *et al.* Structure of glycerol dehydratase reactivatase : a new type of molecular chaperone. *Structure* , 2003 , **11**(1) : 109 – 119.
- [28] Mori K , Toraya T. Mechanism of reactivation of coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratase by a molecular chaperone-like reactivating factor. *Biochemistry* , 1999 , **38** : 13170 – 13178.
- [29] Tobimatsu T , Kajiura H , Toraya T. Specificities of reactivating factors for adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase. *Archives of Microbiology* , 2000 , **174**(1-2) : 81 – 88.
- [30] Mori K , Bando R , Hieda N , *et al.* Identification of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent ethanolamine ammonia lyase. *Journal of Bacteriology* , 2004 , **186**(20) : 6845 – 6854.
- [31] Bairoch A. PROSITE : a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Res.* , 1991 , **19** : 2241 – 2245.
- [32] Wang W , Sun J , Hartlep M , *et al.* Combined use of proteomic analysis and enzyme activity assays for metabolic pathway analysis of glycerol fermentation by *Klebsiella pneumoniae* . *Biotechnol Bioeng* , 2003 , **83**(5) : 525 – 536.
- [33] Stemmer WP. Rapid evolution of a protein *in vitro* by DNA shuffling. *Nature* , 1994 , **370**(6488) : 389 – 391.
- [34] Zhang YP(张延平) , Liu M(刘铭) , Cao ZA(曹竹安) . Construction of *K. pneumoniae* recombinants of aldehyde dehydrogenase gene knockout. *China Biotechnology* (中国生物工程杂志) , 2005 **25**(12) 34 – 38.