

含甘油脱水酶激活因子编码基因的产 1,3-丙二醇新型重组菌的构建 Construction of Novel Recombinant Strain Harboring Glycerol Dehydratase Reactivating Factor Capable of Producing 1,3-propanediol

张晓梅, 诸葛健*

ZHANG Xiao-Mei and ZHUGE Jian*

江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036

School of Biotechnology, Southern Yangtze University, The Key Laboratory of Industrial Biotechnology Ministry of Education, Wuxi 214036, China

摘 要 利用 PCR 技术扩增来源于弗氏柠檬杆菌(*Citrobacter freundii*)的甘油脱水酶编码基因 *dhaB* 以及甘油脱水酶激活因子编码基因 *dhaG* *dhaF*, 将其与 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的编码基因 *yqhD* 串联在温控表达载体 pHsh 上, 构建重组菌 *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB*-*dhaG*-*dhaF*-*yqhD*)。SDS-PAGE 分析显示, 融合表达产物的分子量同核酸序列测定的推导值相符。与未串联甘油脱水酶激活因子编码基因的重组菌 *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB*-*yqhD*)相比, 1,3-丙二醇的产量提高了 28%。

关键词 甘油脱水酶激活因子, 重组大肠杆菌, 1,3-丙二醇

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0841-05

Abstract The *dhaB* gene encoding glycerol dehydratase and *dhaG* *dhaF* gene encoding glycerol dehydratase reactivating factor from *Citrobacter freundii* were amplified by PCR. The temperature control expression vector pHsh harboring *yqhD*, *dhaB*, *dhaG* and *dhaF* gene was transformed into *E. coli* JM109 to yield the recombinant strain *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB*-*dhaG*-*dhaF*-*yqhD*). The results from SDS-PAGE analysis show that the recombinant product was consistent with the molecular weight predicted from gene sequence. The fermentation result show that the yield of 1,3-propanediol was increased by 28% compared with *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB*-*yqhD*).

Key words Glycerol dehydratase reactivating factor, recombinant *Escherichia coli*, 1,3-propanediol

1,3-丙二醇(1,3-Propanediol, 简称 1,3-PD)是一种重要的溶剂和化工原料, 以 1,3-PD 与对苯二甲酸合成的聚酯 PTT(聚对苯二甲酸丙二醇酯)在合成纤维材料、聚酯膜、工程塑料和纺织服装材料领域应用前景非常广泛^[1]。随着 PTT 商业化, 生物法合成 1,3-PD 因其环境友好性越来越受重视^[2]。

生物法合成 1,3-PD 通常都是以甘油做底物, 经

甘油脱水酶(编码基因 *dhaB*)及 1,3-丙二醇氧化还原酶(编码基因 *dhaT*)催化完成^[3]。甘油脱水酶在催化甘油转化为 3-羟基丙醛的同时, 会出现甘油导致的自杀性失活现象。失活的主要原因是甘油导致辅酶 B₁₂ 的 C—Co 键发生不可逆断裂, 形成 5'-脱氧腺苷和烷基钴氨素类似物(即被修饰的辅酶)^[4], 同时烷基钴氨素与脱水酶紧密结合, 致使甘油脱水酶

将 PMD18-T-*dhaG* 与 PMD18-T-*dhaF* 重组载体分别经上海华诺生物工程技术服务有限公司进行测序,测序结果表明,*dhaG* 基因全长 400bp,*dhaF* 基因全长 1800bp,运用 BLAST 进行序列分析,表明本研究克隆得到的 *dhaG* 基因与公布的弗氏柠檬杆菌的 *dhaG* 同源性的 99.5%,*dhaF* 基因与公布的弗氏柠檬杆菌的 *dhaF* 同源性的 99.5%。

檬杆菌的 *dhaF* 同源性为 99%。而由所测序列推导出的蛋白氨基酸序列与公开的氨基酸序列完全一致。

2.3 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

以 *E. coli* JM109(pHsh)为对照,重组菌 *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB-dhaG-dhaF-yqhD*)全细胞 SDS-PAGE 电泳分析如图 3 所示,从图 3 可以看出,在 67、61、43、21、17 和 16kD 处出现蛋白质特征带,其中 61、21 和 16kD 三条蛋白条带正好对应甘油脱水酶 DHAB 三个亚基分子量的位置^[16],而 67 和 17kD 的蛋白条带正好对应甘油脱水酶激活因子 DHAG 及 DHAF 分子量的位置^[7];说明已经存在表达产物。另外 43kD 与 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶 YQHD 蛋白大小相符^[9],说明表达产物中已经存在 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶蛋白。

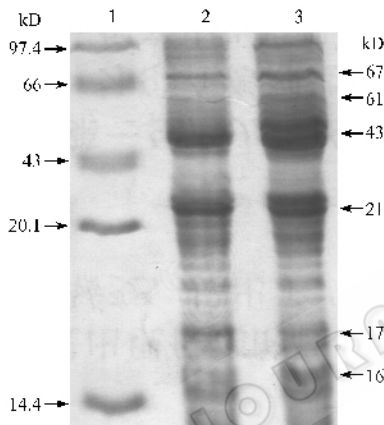


图 3 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳分析
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells
1: protein markers(kD); 2: *E. coli* JM109 (pHsh) control ; 3: *E. coli* JM109 (pHsh-*dhaB-dhaG-dhaF-yqhD*) after 42°C induction for 4h.

2.4 重组菌质粒稳定性分析

E. coli JM109(pHsh-*yqhD-dhaG-dhaF-dhaB*)和 *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB-yqhD*)在添加氨苄青霉素以及不添加氨苄青霉素的条件下,连续转种 5 次,统计其在不同平板上形成的菌落数。从表 1 可以看出,传 100 代后 *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB-dhaG-dhaF-yqhD*)的质粒保持率为 87%,而 *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB-yqhD*)的质粒保持率为 90%,说明重组菌质粒的稳定性并未因串联四个基因而显著降低。

2.5 重组菌发酵特性

以 50g/L 甘油为唯一碳源的发酵培养基,在 5 L 发酵罐上有氧发酵的实验结果见图 4。从图 4 可以看出,与重组菌 *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB-yqhD*)相比,*E. coli* JM109(pHsh-*dhaB-dhaG-dhaF-yqhD*)以温度诱导发酵至第 24h 后 1,3-PD 产量提高了

28%,1,3-PD 的产量、转化率和生产能力分别达到 36.5 g/L、72.6%和 1.30g/L/h。由图 4 还表明,重组菌 *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB-dhaG-dhaF-yqhD*)的甘油消耗速率也有较大程度的提高,但细胞生长情况与重组菌 *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB-yqhD*)基本一致。

表 1 重组菌连续转种后在不含抗生素平板上的菌落数

Table 1 The recombinant strain colonies in plate		
Generations	pHsh- <i>dhaB-dhaG-dhaF-yqhD</i> Amp (-)	pHsh- <i>dhaB-yqhD</i> Amp (-)
20	100	100
40	96	98
60	93	94
80	90	92
100	87	90

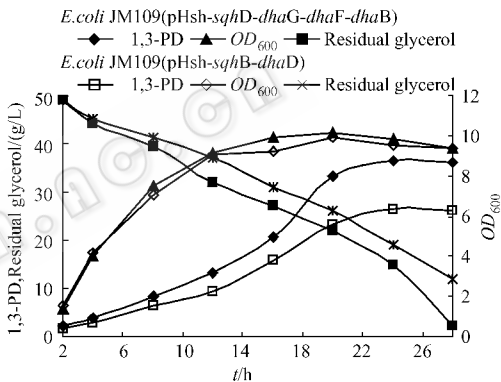


图 4 重组菌 *E. coli* JM109(pHsh-*yqhD-dhaG-dhaF-dhaB*)及 *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB-yqhD*)的发酵过程
Fig. 4 Time profile of batch fermentation in 5L fermentor using *E. coli* JM109(pHsh-*yqhD-dhaG-dhaF-dhaB*) or *E. coli* JM109(pHsh-*dhaB-yqhD*)

3 讨论

甘油在产 1,3-PD 微生物体内合成途径是由甘油脱水酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶所构成催化链的还原途径来实现的。实验发现,甘油脱水酶在催化甘油转化为 3-羟基丙醛的同时,会出现甘油导致的自杀性失活现象,且不因甘油脱水酶辅酶 B₁₂ 浓度的增加而得到解除,可能需要某种激活因子的协同作用。本研究利用 PCR 技术扩增出来源于弗氏柠檬菌的甘油脱水酶激活因子编码基因 *dhaG* 及 *dhaF*,将它们与 pHsh-*dhaB-yqhD* 串联表达,成功构建了含有甘油脱水酶激活因子编码基因的新型产 1,3-丙二醇重组菌 *E. coli* JM109(pHsh-*yqhD-dhaG-dhaF-dhaB*)。

来源于弗氏柠檬菌的 DHAF-DHAG 复合体与 Toraya 等人发现的二醇脱水酶复活蛋白 DDRA-
© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

DDRB 复合体一样具有二亚基四聚体结构,分子量同样在 150kD 左右。但不同的是,DHAF-DHAG 复合体的两个亚基并非在同一个转录单元,而是分别随甘油脱水酶基因及 1,3-丙二醇氧化还原酶基因表达,并且转录方向相反。DHAF-DHAG 复合体还可以有效地激活肺炎克雷伯杆菌中失活的甘油脱水酶及脱水酶-氰钴氨素的复合体^[7,8],而 DDRA-DDRB 复合体只激活产酸克雷伯氏菌中失活的甘油脱水酶及脱水酶-氰钴氨素的复合体^[6]。

美国杜邦公司将酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中 3-磷酸甘油脱氢酶编码基因 *Dar1*、1,3-磷酸甘油酯酶编码基因 *Gpp2*、肺炎克雷伯杆菌中的甘油脱水酶编码基因 *dhaB*、甘油脱水酶激活因子编码基因 *orfX orfZ* 以及大肠杆菌中非特异性的氧化还原酶编码基因 *yqhD* 在大肠杆菌中共同表达,该重组菌在甘油脱水酶辅酶 B_{12} 存在时能转化葡萄糖为 1,3-丙二醇,其产量高达 129g/L,转化率为 34%^[9]。本研究构建的重组菌 *E. coli* JM109(pHsh-*yqhD-dhaG-dhaF-dhaB*)转化甘油为 1,3-丙二醇的产量虽只有 36.5g/L,但其转化率已达到 72.6%,并可以利用更加廉价的维生素 B_{12} 代替辅酶 B_{12} 完成催化甘油转化为 3-羟基丙醛的反应,而且不需要 IPTG 为诱导物,不需要厌氧环境,为微生物法合成 1,3-丙二醇的研究提供新的有现实意义的思路。

REFERENCES(参考文献)

[1] Biebl H, Menzel K, Zeng AP, *et al.* Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 289 – 297.

[2] Zeng AP, Biebl H. Bulk chemicals from biotechnology: The case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, **74**: 239 – 259.

[3] Skraly FA, Lytle BL, Cameron DC, *et al.* Construction and characterization of 1,3-propanediol operon. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **1**: 98 – 105.

[4] Yamanishil 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.

[5] Toraya T. Radical catalysis of B₁₂ enzymes: structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases. *Cell Mole Life Sci*, 2000, **57**: 106 – 127.

[6] Toraya T, Mori K. A reactivating factor for coenzyme B₁₂-dependent diol dehydratases. *J Biol Chem*, 1999, **274**: 3372 – 3377.

[7] 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.

[8] 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**: 4110 – 4113.

[9] Emptage M, Haynie SL, Laffend LA, *et al.* Process for biological of 1,3-propanediol with high titer. US 6514733, 2003.

[10] Zhang XM(张晓梅), Tang XM(唐雪明), Zhuge B(诸葛斌), *et al.* Cloning and over expressing of gene *yqhD* encoding 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme in *Escherichia coli*. *Journal of Food Science and Biotechnology* (食品与生物技术), 2006, **4**: 83 – 86.

[11] Zhang XM, Li Y, Zhuge B, *et al.* Construction of novel recombinant *Escherichia coli* capable of producing 1,3-propanediol and optimization of fermentation parameters by statistical design. *World J Microbiol Biotechnol*, 2006, **22**: 945 – 952.

[12] Nagaraja CE, Gatenby AA, Hsu AK, *et al.* Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant microorganism. US 6013494, 2000.

[13] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, *et al.* Current Protocols in Molecular Biology (颜子颜, 王海林, 译). Beijing: Science Press, 1998.

[14] Zhang XM(张晓梅), Tang XM(唐雪明), Zhuge B(诸葛斌), *et al.* Construction of novel recombinant *Escherichia coli* capable of producing 1,3-propanediol. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2005, **21**: 743 – 748.

[15] Kajiur 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**: 36514 – 36519.

[16] Daniel R, Bobik TA, Gottschalk G, *et al.* Biochemistry of coenzyme B₁₂-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. *FEMS Microbiol Reviews*, 1999, **22**: 553 – 566.