

# 能量驱动对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵甘油 合成 1,3-丙二醇的影响

张延平, 饶治, 杜晨宇, 李春, 曹竹安

(清华大学化工系生物化工研究所, 北京 100084)

**摘要:**考察了外加能量对 *Klebsiella pneumoniae* 合成 1,3-丙二醇的影响,结果表明,外加 0.6~0.8 g/L 三磷酸腺苷(ATP)可以有效促进 *Klebsiella pneumoniae* 发酵甘油的还原代谢,1,3-丙二醇产量提高了 50%~70%,得率在发酵后期仍能维持在较高水平.利用休止细胞研究了甘油脱水酶催化失活后能量刺激复活的情况,结果表明外加三磷酸腺苷(ATP)对休止细胞中甘油脱水酶的复活有明显的驱动作用,经多次失活/驱动复活后甘油脱水酶活性可维持不变.

**关键词:**甘油脱水酶;三磷酸腺苷(ATP);1,3-丙二醇;克氏肺炎杆菌;甘油

**中图分类号:** TQ923 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2004)06-0567-05

## 1 前言

1,3-丙二醇(1,3-Propanediol,简称 1,3-PD)是一种重要的化工原料和化工材料,广泛用作有机溶剂和添加剂等,尤其是作为单体用于合成聚酯、聚醚、聚氨酯等材料<sup>[1]</sup>.新型聚酯材料聚对苯二甲酸丙二醇酯(Polytrimethylene Terephthalate,PTT)商业化以来,生物法合成 1,3-PD 因其环境友好性越来越受重视.

自然界中很多种微生物,如弗氏柠檬酸菌(*Citrobacter freundii*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、克氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)等都能通过发酵甘油合成 1,3-PD<sup>[1]</sup>.在这些微生物体内,甘油厌氧代谢主要有两条途径:(1)氧化代谢.甘油首先经甘油脱氢酶催化转化为二羟基丙酮,然后在二羟基丙酮激酶的作用下转化为磷酸二羟基丙酮,并进一步代谢成乙酸、乙醇、乳酸等.氧化途径合成(或再生)生物能三磷酸腺苷(ATP)和还原当量还原型辅酶 I(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸, NADH<sub>2</sub>),并伴随着微生物细胞的生长.(2)还原代谢.首先甘油脱水酶(Glycerol Dehydratase, GDHt)在辅酶维生素 B<sub>12</sub>(VB<sub>12</sub>)存在下将甘油转化为中间产物 3-羟基丙醛(3-HPA),然后经 1,3-PD 脱氢酶(1,3-Propanediol Dehydrogenase, PDDH)催化转化为 1,3-PD<sup>[2,3]</sup>.

甘油脱水酶是甘油转化为 1,3-PD 过程中的限速酶,它必须在辅酶 VB<sub>12</sub>的参与下才具有催化活性<sup>[4,5]</sup>,而且甘油脱水酶极易失活<sup>[4]</sup>.近来的研究发现在辅酶 VB<sub>12</sub>, ATP 及 Mg<sup>2+</sup>(或 Mn<sup>2+</sup>)存在的情况下,失活后的脱水酶可迅速复活<sup>[6,7]</sup>,这是菌体 dha 调节子上的一种类似伴侣蛋白功能的复活蛋白的作用,日本学者将其定义为复活因子,甘油脱水酶复活过程必须有能量 ATP 的参与<sup>[4,8,9]</sup>.

本工作针对 *Klebsiella pneumoniae* 发酵甘油后期合成 1,3-PD 速率下降快的问题,较为系统地研究了外加能量对产物合成和甘油脱水酶活性的影响.

收稿日期:2003-12-11,修回日期:2004-01-12

基金项目:“十五”国家科技攻关计划资助项目(编号:2001BA708B01-04)

作者简介:张延平(1978-),女,山东省潍坊市人,博士研究生,生物化工专业;曹竹安,通讯联系人,E-mail: cza-dce@mail.tsinghua.edu.cn.

## 2 实验材料与方法

### 2.1 菌种及培养条件

实验用菌种为克氏肺炎杆菌 *Klebsiella pneumoniae* L1(*K. pneumoniae* L1), 中国农业大学赠送.

好氧种子培养基碳源为葡萄糖, 初始浓度 20 g/L; 厌氧发酵培养基碳源为甘油, 初始浓度 20 g/L, 其它组分同文献[3]. *K. pneumoniae* L1 先好氧培养 6~8 h, 使 OD<sub>650</sub> 达到 3~5, 然后以 5% 的接种量转入厌氧培养.

### 2.2 实验设计

在厌氧培养基中添加适量 ATPNa<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O(BEBCO 产品分装, 北京鼎国生物技术发展中心销售), 使之终浓度分别为 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 g/L. 通过测定发酵过程 1,3-PD 的浓度变化研究外源能量 ATP 对 *K. pneumoniae* L1 厌氧代谢的影响.

将厌氧培养指数生长期后期(约 20 h)的发酵液离心收集菌体, 取适量加入 30 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 8.0)体系, 使体系组成为: 辅酶 VB<sub>12</sub> 15 μmol/L, ATP 3 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 3 mmol/L, KCl 50 mmol/L, 甘油 20 g/L, 细胞 0.4 g/L<sup>[4,10]</sup>. 37°C 反应, 待甘油脱水酶明显失活时(约 6 h)再添加辅酶 VB<sub>12</sub> 及 ATP, 如此反复. 通过测定反应体系中 1,3-PD 及 3-羟基丙醛(3-HPA)的浓度变化来反映甘油脱水酶的活性变化.

### 2.3 生物量的测定

菌体浓度通过测定发酵液在 650 nm 处的吸光度值 OD<sub>650</sub> 来衡量, 所用仪器为 Agilent 8453 紫外-可见分光光度计(安捷伦科技有限公司生产).

### 2.4 3-HPA 的测定

甘油转化为 1,3-PD 过程的中间产物 3-HPA 的测定借鉴甘油脱水酶酶活分析方法<sup>[10]</sup>: 将反应液离心, 取上清液经适当稀释后取 0.5 mL, 与 0.5 mL 0.1% 的 MBTH(3-甲基-2-苯并咪唑, 一水合盐酸结晶, ICN Biomedicals Inc. 生产)溶液混合, 37°C 反应 15 min 后, 加 1 mL H<sub>2</sub>O, 测定 315 nm 处的吸光度 A<sub>315</sub>. 3-HPA 浓度与 A<sub>315</sub> 的换算关系为: C<sub>3-HPA</sub> = 2.5A<sub>315</sub> × 稀释倍数.

### 2.5 代谢产物的 HPLC 分析

发酵液中的甘油、1,3-PD 及副产物乙酸、乙醇、乳酸等采用 SHIMADZU 10A 型高效液相色谱(岛津制作所生产)测定. 色谱柱为 Aminex HPX-87H 柱, 柱温 65°C; 流动相为 0.005 mol/L 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.8 mL/min; 检测器为 RID-10A 型折光示差检测器<sup>[11]</sup>.

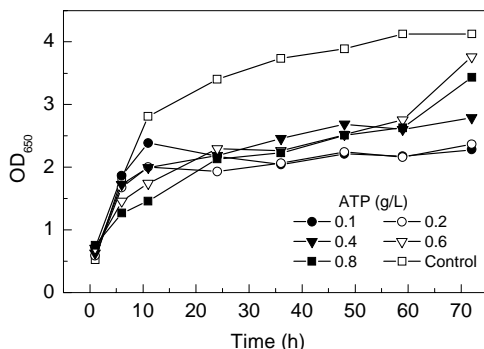


图 1 ATP 对 *K. pneumoniae* L1 菌体生长的影响

Fig.1 Effects of ATP on bacterium growth of *K. pneumoniae* L1

## 3 实验结果与分析

### 3.1 外源 ATP 对菌体生长的影响

利用外源添加的方式研究了 ATP 驱动对实验菌株 *K. pneumoniae* L1 代谢过程的影响. 外源能量对菌体生长的影响情况见图 1, 图中 Control 为没有外源添加 ATP 的空白对照(下同). 由图可见, 与对照相比, 添加外源能量物质在一定程度上抑制菌体的增长, 这可能与长期的生物进化过程有关. 作为酶的天然载体和生存环境, 微生物细胞都是以最经济

和有利于自身的方式来对碳源和能源进行分配,通过调控各种酶的活性和表达量来合成所需的各种物质,并为细胞提供能量.在外加能源的情况下,菌体可以直接利用外源能量进行代谢,这在一定程度上削弱了菌体生长产能的驱动力.另外,ATP 的加入也可能在一定程度上提高了甘油脱水酶的酶活,使甘油还原代谢途径得到加强,中间产物 3-HPA 积累,对细胞产生毒害作用.

### 3.2 外源 ATP 对 *K. pneumoniae* 合成 1,3-PD 的影响

图 2(a)是在培养基中添加 0.1~0.8 g/L ATP 时 *K. pneumoniae* L1 合成 1,3-PD 的情况.可见,外源 ATP 可不同程度促进 1,3-PD 的合成,而且越到发酵后期,促进作用越明显.经过 72 h 厌氧培养,外源添加 0.6 及 0.8 g/L ATP 可使 1,3-PD 浓度分别达到 10.2 和 9.4 g/L,比对照提高了 50%~70%.

另外还考察了单位菌体合成 1,3-PD 的情况,结果见图 2(b).在实验范围内,虽然外源 ATP 对菌体生长有一定的抑制,但单位菌体合成 1,3-PD 的能力提高了 1 倍左右,表明 ATP 对于菌体合成 1,3-PD 有非常重要的作用.在生物法合成 1,3-PD 的原始工艺中,菌体本身合成的 ATP 量较低,限制了甘油的还原代谢.因此,要提高 1,3-PD 合成能力,提高 ATP 的供给量是一个可行的思路.

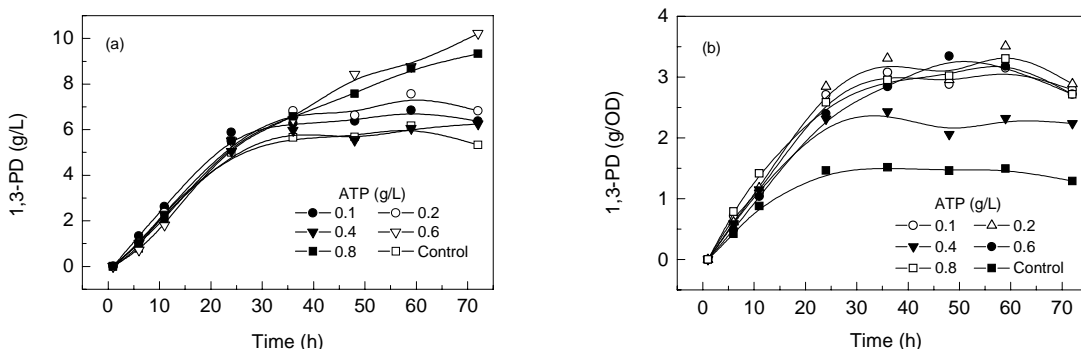


图2 外源能量对 *K. pneumoniae* L1 合成 1,3-PD 的影响  
Fig.2 Effect of ATP on 1,3-PD biosynthesis by *K. pneumoniae* L1

外源添加 ATP 对于 *K. pneumoniae* L1 发酵甘油合成 1,3-PD 得率的影响见图 3,表明在发酵前期(0~24 h)各实验条件下 1,3-PD 得率差别不大,平均 30%(w)左右;24 h 之后(图中虚线处),对照及添加较低浓度的 ATP(0.4 g/L)时 1,3-PD 得率迅速下降,而添加 0.6~0.8 g/L ATP 则能使 1,3-PD 得率维持在 30%以上,发酵全过程的 1,3-PD 得率也相应地由 13%提高到 30%以上.

### 3.3 ATP 对甘油脱水酶复活的驱动作用

前面的实验结果表明,一定浓度的 ATP 促进了 *K. pneumoniae* 合成 1,3-PD,单位菌体合成 1,3-PD 的量大大增加.这可能有两种作用机制:

一是 ATP 促使单位细胞表达的甘油脱水酶的量得到提高,二是 ATP 提高了甘油脱水酶在整个发酵过程尤其是发酵后期的平均比酶活.为了进一步了解 ATP 的作用机制,利用休止细胞,在不供给氮源的情况下遏制菌体生长和酶的进一步表达,即在酶量基本衡定的情况下,通过间歇添加 ATP

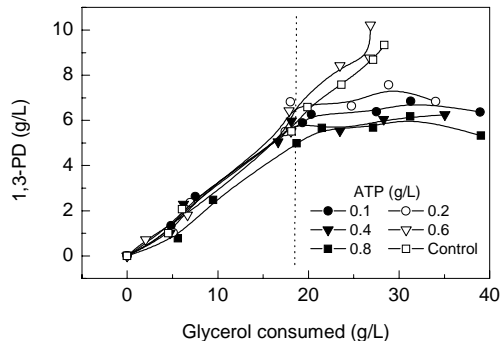


图3 外源能量对 1,3-丙二醇得率的影响  
Fig.3 Effect of ATP on weight yields of 1,3-PD from glycerol by *K. pneumoniae* L1

和辅酶的方式刺激催化活性下降的细胞使之恢复活性,结果如图4所示.图4(a)给出的是甘油脱水酶能量驱动复活过程中底物甘油及还原代谢产物1,3-PD和3-羟基丙醛(3-HPA)的浓度变化,图中虚线处表示添加ATP及辅酶 $VB_{12}$ 的时刻.

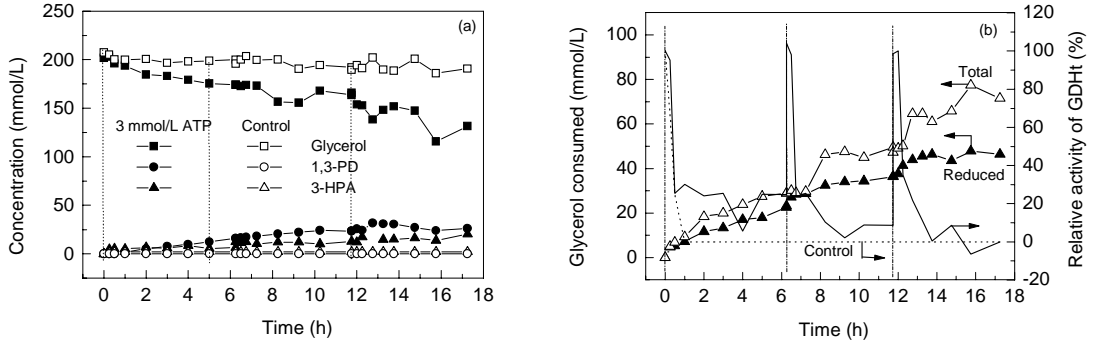


图4 ATP对甘油脱水酶复活的驱动作用

Fig.4 Effect of ATP on reactivation of inactive glycerol dehydratase

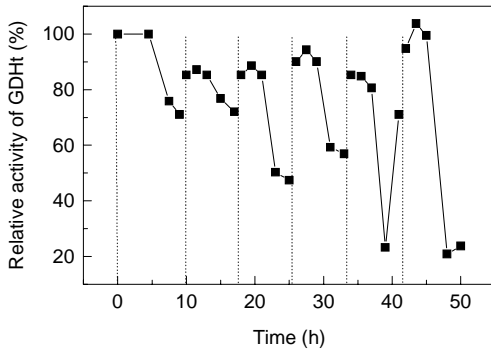


图5 六次失活/复活后时甘油脱水酶的活性变化

Fig.5 Relative activity of glycerol dehydratase during 6 cycles of deactivation/reactivation

增加甘油脱水酶失活/复活的循环数,结果如图5.可见,多次“失活/刺激”后,酶活基本恢复.

文献分析一般认为在实际发酵体系中超过 $15 \mu\text{mol/L}$ 的辅酶 $VB_{12}$ 即已足够甘油脱水酶使用,因此,维持发酵过程中甘油脱水酶催化活性的关键是ATP的供给.这可以从两个方面考虑,一是利用代谢调控和基因调控的手段提高甘油氧化代谢途径及菌体生长过程中产生的净ATP量,二是通过能量耦合的方式提供更多的ATP.这些方面的工作目前还不成熟,需要深入研究.

## 4 结论

发酵体系中添加 $0.6\sim 0.8 \text{ g/L}$ 生物能ATP,单位菌体细胞合成1,3-PD的能力提高近1倍,1,3-PD在发酵液中的合成浓度可提高 $50\%\sim 70\%$ ,表明外源ATP可以促进甘油的还原代谢;足够的ATP存在可以促使失活的甘油脱水酶有效地复活;维持发酵体系中较高的ATP浓度是提高*K. pneumoniae*发酵甘油合成1,3-PD能力的有效途径.

## 参考文献:

- [1] Biebl H, Menzel K, Zeng A P, et al. Microbial Production of 1,3-Propanediol [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1999, 52: 289–297.
- [2] Zeng A P, Biebl H. Bulk Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3-Propanediol Production and the New Trends [J]. Adv. Biochem. Eng. Biotechnol., 2002, 74: 239–259.
- [3] Ahrens K, Menzel K, Zeng A P, et al. Kinetic, Dynamic and Pathway Studies of Glycerol Metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in Anaerobic Continuous Culture: III. Enzymes and Fluxes of Glycerol Dissimilation and 1,3-Propanediol Formation [J]. Biotechnol. Bioeng., 1998, 59: 544–552.
- [4] 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 B<sub>12</sub>-dependent Glycerol Dehydratase of *Citrobacter freundii* [J]. Eur. J. Biochem., 2001, 268: 2369–2378.
- [5] Liao D L, Reiss L, Turner L, et al. Structure of Glycerol Dehydratase Reactivase: A New Type of Molecular Chaperone [J]. Structure, 2003, 11: 109–119.
- [6] Toraya T. Radical Catalysis of B<sub>12</sub> Enzymes: Structure, Mechanism, Inactivation and Reactivation of Diol and Glycerol Dehydratases [J]. CMLS, Cell Mol. Life Sci., 2000, 57: 106–127.
- [7] Toraya T, Mori K. Reactivating Factor for Coenzyme B<sub>12</sub>-dependent Diol Dehydratase [J]. J. Biol. Chem., 1999, 274(6): 3372–3377.
- [8] Kajiur H, Mori K, Tobimatsu T, et al. Characterization and Mechanism of Action of a Reactivating Factor for Adenosylcobalamin-dependent Glycetol Dehydratase [J]. J. Biol. Chem., 2001, 276(39): 36514–36519.
- [9] Mori K, Toraya T. Mechanism of Reaction of Coenzyme B<sub>12</sub>-dependent Diol Dehydratase by a Molecular Chaperone-like Reactivating Factor [J]. Biochemistry, 1999, 38: 13170–13178.
- [10] Tobimatsu T, Kajiura H, Yunoki M, et al. Identification and Expression of the Genes Encoding a Reactivating Factor for Adenosylcobalamin-dependent Glycerol Dehydratase [J]. J. Bacteriol., 1999, 181(13): 4110–4113.
- [11] Cocaigh-Bousquet M, Garrigues C, Novak L, et al. Rational Development of a Simple Synthetic Medium for the Sustained Growth of *Lactococcus lactis* [J]. J. Appl. Bacteriaol., 1995, 79: 108–116.

## Effect of ATP Addition on 1,3-Propanediol Biosynthesis from Glycerol by *Klebsiella pneumoniae*

ZHANG Yan-ping, RAO Zhi, DU Chen-yu, LI Chun, CAO Zhu-an

(Inst. Biochem. Eng., Dept. Chem. Eng., Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**Abstract:** Biosynthesis of 1,3-propanediol (1,3-PD) attracted much attention recently. Glycerol dehydratase, the key enzyme of the biosynthesis of 1,3-PD from glycerol, tends to undergo mechanism-based inactivation by glycerol during catalysis, and the inactive dehydratase was rapidly reactivated in the presence of AdoCbl, ATP and Mg<sup>2+</sup> (or Mn<sup>2+</sup>). In this paper, the effect of ATP on biosynthesis of 1,3-PD from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* L1 was investigated. Although bacterium growth was inhibited with ATP addition in fermentation medium, the capability of 1,3-PD biosynthesis by *K. pneumoniae* cells per OD was increased. By addition of 0.6~0.8 g/L ATP, the reductive metabolism of glycerol was strengthened and the titer of 1,3-propanediol increased by 50%~70%. The yield of 1,3-PD was also improved, especially in the latter phase of fermentation compared with a rapidly decreased yield in control experiment. For seeing about the simulative effect of ATP on 1,3-PD biosynthesis, rest *K. pneumoniae* cells were used in this work. It indicated that ATP could reactivate the inactive glycerol dehydratase effectively, and the activity of dehydratase would not decrease observably during repetitious reactivation. ATP was an important factor affecting the catalysis activity of glycerol dehydratase and even the biosynthesis of 1,3-PD from glycerol by *K. pneumoniae*. Keeping ATP in a higher concentration in the fermentation system was a logical approach to improve 1,3-PD biosynthesis.

**Key words:** glycerol dehydratase; ATP; 1,3-propanediol; *Klebsiella pneumoniae*; glycerol