

文章编号: 1000-5013(2011)04-0414-04

# 罗伊乳杆菌转化甘油能力的原位再激活

王珍珠, 陈国, 陈宏文

(华侨大学 化工学院, 福建 泉州 362021)

**摘要:** 考察罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)静息细胞转化甘油的重复利用,甘油脱水酶的原位再激活,以及补加培养基对再激活甘油脱水酶的变化。结果表明:菌体经二次转化后基本丧失转化能力,甘油对胞内甘油脱水酶具有强烈的抑制灭活作用;确证胞内存在甘油脱水酶再激活体系;不具转化甘油能力的 *L. reuteri* 可被补加的培养基在一定程度上再激活,使其能够重复利用。

**关键词:** 罗伊氏乳杆菌;甘油脱水酶;原位再激活;静息细胞;甘油

**中图分类号:** TQ 920.1

**文献标志码:** A

3-羟基丙醛(3-HPA)可作为生物灭菌剂,在制备抗感染治疗剂、生物交联剂、新型生物材料等方面也具广泛的应用前景<sup>[1]</sup>。然而,常规化学法生产 3-羟基丙醛不但体系复杂,而且生产过程中产生的丙烯酸具有毒性,不利于工业生产。甘油脱水酶(GDHt, EC 4.2.1.30)属于依赖于辅酶 B<sub>12</sub> 酶类中的第 2 类酶<sup>[2]</sup>,可催化甘油、1,2-丙二醇(1,2-PD)、乙二醇等醇类脱水,生成 3-羟基丙醛、丙醛、乙醛等相应的醛类。有研究<sup>[3-4]</sup>表明,甘油是 GDHt 的自杀底物,会诱导辅酶维生素 B<sub>12</sub> 上的 C—Co 键发生不可逆的均裂,生成一个未知的烷基钴胺素类似物和 5'-脱氧腺苷,前者会紧密地结合在甘油脱水酶上,从而导致酶的失活。2001 年, Kajiura 等<sup>[5]</sup>提出甘油脱水酶复活因子再激活甘油脱水酶的机制。罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri*)的益生功能与甘油代谢产生的 3-羟基丙醛紧密相关,而甘油脱水酶是实现甘油向 3-羟基丙醛转化的关键酶。Ping 等<sup>[6]</sup>已克隆表达出罗伊氏乳杆菌甘油脱水酶基因。有研究发现,以葡萄糖和甘油作为混合培养基培养时,3-HPA 会进一步转化为 1,3-丙二醇(1,3-PD),所以利用静息细胞催化生产 3-HPA 是目前的主要工艺;以葡萄糖和甘油作为混合培养基,单位细胞的甘油利用效率明显高于利用静息细胞时的转化效率。这可能是葡萄糖与甘油混合培养时,胞内的甘油脱水酶会不断被再激活;而利用静息细胞转化时,甘油脱水酶无法再激活。本文研究罗伊氏乳杆菌转化甘油能力再激活机理,确证胞内存在甘油脱水酶再激活体系。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种与试剂

罗伊氏乳杆菌(*L. reuteri* CG001, 福建泉州华侨大学工业生物技术研究所);辅酶 CoB<sub>12</sub> (美国 Sigma 公司);3-甲基-2-苯并噻唑啉酮脲盐酸水合物(MBTH, 美国 Sigma 公司);其他试剂(上海国药集团化学试剂有限公司)。

### 1.2 培养基

(1) 发酵培养基。20 g · L<sup>-1</sup> 酵母膏, 20 g · L<sup>-1</sup> 葡萄糖, 1 g · L<sup>-1</sup> 醋酸钠, 1 g · L<sup>-1</sup> 柠檬酸铵, 1 g · L<sup>-1</sup> 磷酸氢二钾, 0.2 g · L<sup>-1</sup> 硫酸镁, 0.18 g · L<sup>-1</sup> 硫酸锰, 1 g · L<sup>-1</sup> 吐温 80。

(2) 缺失培养基(分别缺失以下完整培养基组分之一)。20 g · L<sup>-1</sup> 酵母膏, 20 g · L<sup>-1</sup> 葡萄糖, 7 g · L<sup>-1</sup> 醋酸钠, 1 g · L<sup>-1</sup> 柠檬酸铵, 3 g · L<sup>-1</sup> 磷酸氢二钾, 0.2 g · L<sup>-1</sup> 硫酸镁, 0.18 g · L<sup>-1</sup> 硫酸锰, 1 g ·

收稿日期: 2010-11-03

通信作者: 陈国(1978-),男,副教授,主要从事酶与应用酶学的研究。E-mail:chenguo@china.com.cn.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20906035);福建省自然科学基金资助项目(E0810017)

$L^{-1}$  吐温 80,  $1.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乳酸,  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  乙醇,  $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  氯化钴,  $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  谷氨酸钠。

### 1.3 实验方法

(1) 细胞培养及静息细胞收集. 取经培养活化的 *L. reuteri*, 按 1% 接种量接种于 1 L 培养基中, 于  $37^\circ\text{C}$  下厌氧培养 24 h. 离心收集菌体, 用  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸钾缓冲液 ( $\text{pH}=7.2$ ) 洗涤两次. 菌体沉淀按 1 g 湿菌体加入 7 mL 的磷酸钾缓冲液 ( $\text{pH}=7.2$ ) 的比例重悬后, 可得菌悬液。

(2) 全细胞转化甘油及 1,2-丙二醇. 分别等体积加入  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘油和  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  1,2-PD (转化菌质量浓度为  $9.8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 于 10 mL 的 A, B 两组菌悬液中, 在  $37^\circ\text{C}$  下转化 2 h 后, 测相应的产物浓度; 转化完成后, 离心洗涤菌体, 如前所述进行二次转化和三次转化, 并测定相应的产物浓度. 将 3 次转化后离心洗涤收集的菌体, 互换底物进行第 4 次转化, 2 h 后测定相应的产物浓度。

(3) 甘油脱水酶的原位再激活. 在 20 mL 菌悬液中加入 1% 甲苯后, 于室温下剧烈震荡 5 min, 经磷酸钾缓冲液洗涤 2 次后, 重悬于 20 mL 磷酸钾缓冲液中. 取 A, B, C, D 共 4 支试管, 分别加入 10 mL 反应液 (含  $15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  辅酶  $\text{B}_{12}$ ,  $0.03 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸钾缓冲液 ( $\text{pH}=7.2$ ),  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl) 及经甲苯处理过的菌体; 然后, 置于  $37^\circ\text{C}$  水浴中恒温, 每隔 5 min 测产物的浓度. 其中: A, B 试管加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘油, A 管在初始时加入  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP 和  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , B 管在反应 30 min 后加入  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP 和  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ; C, D 试管加入  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  1,2-PD, D 管在初始时加入  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ATP 和  $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ 。

(4) 培养基对甘油脱水酶的再激活. 取 40 mL 菌悬液, 等体积加入  $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘油, 于  $37^\circ\text{C}$  下转化 2 h 后, 测定 3-HPA 的浓度; 然后, 将菌重新离心洗涤, 连续转化 3 次, 至其不具备甘油转化能力后, 收集菌体. 分别添加不同成分缺失培养基, 于  $37^\circ\text{C}$  下, 将菌再培养 4 h, 测定培养前、后菌的浓度变化, 并进行甘油转化。

(5) 代谢产物检测. 在 1 mL 样品中加入 3 mL 的浓盐酸、0.75 mL 色氨酸试剂, 于  $37^\circ\text{C}$  下水浴保温 20 min; 然后, 于 560 nm 处测定吸光度, 并通过标准曲线计算得到 3-HPA 浓度<sup>[7-8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 重复利用 *L. reuteri* 转化甘油及 1,2-PD

在实际工业生产中, 细胞的重复利用率 ( $\gamma$ ) 对降低生产成本是至关重要的. 考察重复利用 *L. reuteri* 静息细胞转化  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘油和  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  1,2-PD 的情况, 如图 1 所示。

由图 1 可见, A 组菌体经一次转化后, 3-HPA/甘油的转化率骤降, 在二次转化中转化率不到 1%, 三次转化基本检测不到 3-HPA. 说明甘油对静息细胞中甘油脱水酶的自我抑制作用非常显著. A 组菌体第 4 次以 1,2-PD 为底物进行转化, 丙醛/1,2-PD 的转化率为 13.5%. 说明当菌体不具备甘油转化能力时, 仍具有转化 1,2-PD 的能力, 但转化率相对直接用 1,2-PD 为底物的 B 组较低, 即无活性的甘油脱水酶体系对 1,2-PD 底物仍具有活性, 只是催化能力变弱。

由图 1 可见, B 组菌体以 1,2-PD 为底物经 3 次转化后, 其转化 1,2-PD 的能力并无明显下降, 而在底物转换为甘油后, 其 3-HPA/甘油的转化率下降, 且低于 A 组第 1 次的转化率. 说明 1,2-PD 对菌体转化无明显抑制作用, 但其转化甘油的能力同样下降, 比直接利用甘油为底物时下降得慢. 因此, 若希望重复利用菌体转化甘油, 必须对胞内的甘油脱水酶体系进行再激活。

### 2.2 甘油脱水酶的原位再激活

为证明 *L. reuteri* 胞内也存在这种再激活体系, 参考 Toraya 的方法<sup>[9]</sup>, 利用经甲苯处理过的通透性好的静息细胞转化  $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  甘油及 1,2-PD, 考察复活因子 ATP 和  $\text{Mg}^{2+}$  对甘油脱水酶再激活的影响, 如图 2 所示. 从图 2 中可看出, 通透细胞可转化甘油及 1,2-PD. 在初始加入 ATP 和辅酶  $\text{B}_{12}$  不

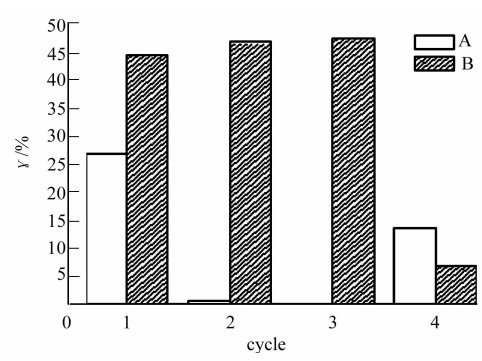


图 1 转化甘油及 1,2-PD 的转化率比较  
Fig. 1 Comparison of conversion rate between glycerol and 1,2-PD

会对 1,2-PD 的最终转化率产生影响,这与前述转化 1,2-PD 时甘油脱水酶不会失活的推论相吻合.

在转化甘油时,初始加入 ATP 和辅酶 B<sub>12</sub> 会使 3-HPA 增加 30% 左右;转化 30 min 后,转化率不再增加时,加入 ATP 和辅酶 B<sub>12</sub> 会使 3-HPA 增加 25% 左右. 因此,可以说明 *L. reuteri* 胞内存在再激活体系,ATP 及辅酶 B<sub>12</sub> 是甘油脱水酶原位复活的关键因素.

从图 2 还可发现,在转化 40 min 后,3-HPA 浓度并无明显的增加,而丙醛浓度增长速率也在这一时间点开始减缓. 由此推测,可能是辅酶 B<sub>12</sub> 的量决定着最终的转化率.

2.3 补加培养基再激活甘油脱水酶

甘油对甘油脱水酶有强烈的自杀抑制作用,而 *L. reuteri* 胞内存在的再激活体系可在一定程度上解决这一问题. 因此,*L. reuteri* 静息细胞在转化甘油时重复利用率不高的问题,可望通过胞内自身代谢体系对甘油脱水酶进行再激活来解决. 通过对经二次转化后完全不具备甘油转化能力的静息细胞补加不同成分培养基,进行再培养 4 h,使细胞再进行一定程度的代谢活动生成 ATP,以激活胞内甘油脱水酶的再生体系. 考察培养后静息细胞生长及甘油转化率的前后变化,结果如图 3,4 所示.

从图 3 中可看出,菌体在补加培养基再培养后,菌的质量浓度变化不大,可推断菌体没有再生长,而转化甘油的能力都有不同程度的提高. 其中,缺少硫酸镁、醋酸钠、磷酸氢二钾、柠檬酸铵、硫酸锰成分的培养基转化率相对较低,而缺失氯化钴、谷氨酸、乙醇成分的培养基转化率相对较高. 主要原因可能是 Mg<sup>2+</sup> 和 Mn<sup>2+</sup> 离子可以促进失活的甘油脱水酶和 ATP 的结合,是甘油脱水酶再激活的必需二价金属离子<sup>[6]</sup>,而醋酸钠、磷酸氢二钾、柠檬酸铵等几种成分可能和胞内 ATP 的合成相关. 因此,这几种成分的缺失势必会限制甘油脱水酶的再激活. 谷氨酸钠和乙醇是代谢途径的终产物,对代谢过程有一定的阻遏作用. 但总体上来说,经新鲜培养基再培养后,菌体转化甘油的能力可在一定程度得到恢复.

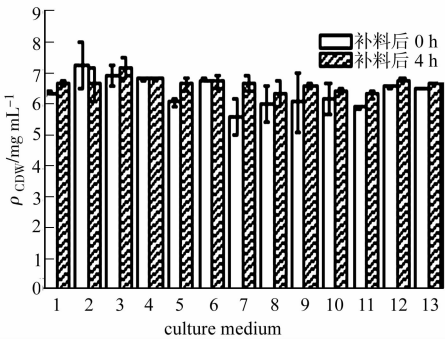


图 3 培养前后菌体浓度的变化  
Fig. 3 Variation of cell density before and after culture

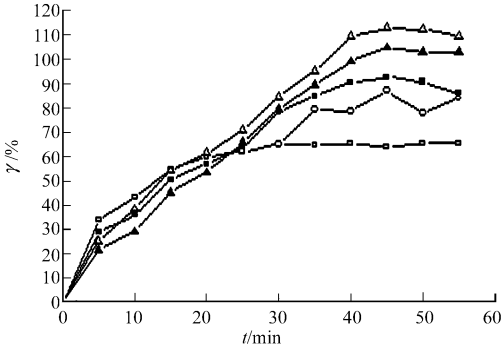


图 2 静息细胞转化甘油及 1,2-PD 原位再激活

Fig. 2 Glycerol and 1,2-PD conversion by in situ reactivation of resting cells

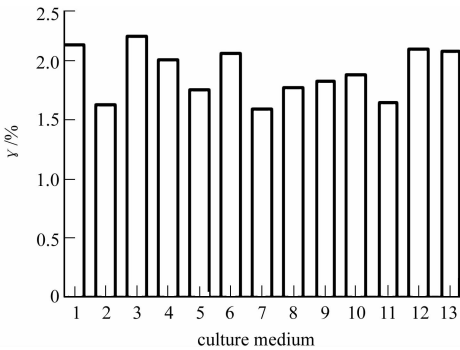


图 4 活化后转化率比较

Fig. 4 Comparison of conversion rate before and after reactivation

3 结论

目前对甘油脱水酶再激活的研究报道甚多,但相关报道大多集中在其复活因子的基因工程及甘油脱水酶的异源表达方面,对于利用菌体自身存在的再激活体系及自身再生资源进行再激活的报道较少.

通过考察重复利用罗伊氏乳杆菌转化甘油的情况,可发现在第 2 次转化时,菌的转化率急剧下降,而在第 3 次转化时则基本测定不到 3-HPA;而以 1,2-PD 为底物时未发现这种情况. 说明甘油对胞内甘油脱水酶具有强烈的抑制灭活作用,势必会影响菌的重复利用,进而限制菌在工业生产中的应用.

对甘油脱水酶的原位激活研究证明其自身确实存在再激活体系,确定利用罗伊氏乳杆菌自身再生资源进行甘油转化能力再激活的可行性. 在此基础上,进一步考察加入新鲜培养基对 *L. reuteri* 进行再

培养后,其甘油转化率的变化,可以发现再培养后,甘油转化率相对于最后一次转化有一定程度的恢复,且培养基中的  $Mg^{2+}$  和  $Mn^{2+}$  离子是再激活反应的必需因子,而醋酸钠、磷酸氢二钾、柠檬酸铵等多种培养基成分可能与 ATP 合成相关,是不可或缺的。

对于激活程度不高的问题,可能是由于胞内的辅酶  $B_{12}$  的累积量不足,导致不能有效地再激活菌转化甘油的能力。如何提高胞内辅酶  $B_{12}$  的累积,进而更有效的再激活罗伊氏乳杆菌转化甘油的能力,还有待进一步的研究。深入研究罗伊氏乳杆菌中甘油脱水酶本身的再激活体系,并利用其自身资源进行复活,将更有利于提高其在工业上的应用,实现细胞的重复利用,连续高效稳定生产 3-HPA。

参考文献:

[1] VOLLENWEIDER S,LACRPOX C. 3-Hydroxypropionaldehyde: Applications and perspectives of biotechnological production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2004,64(1):16-27.

[2] TORAYA T,YAMANISHI M,MUGUNCMA H,et al. An electron paramagnetic resonance study on the mechanism-based inactivation of adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase by glycerol and other substrates[J]. Biochim Biophys Acta,1997,1337(1):11-16.

[3] TORAYA T. Radical catalysis of  $B_{12}$  enzymes: Structure, mechanism, inactivation, and reactivation of diol and glycerol dehydratases[J]. Cellular and Molecular Life Sciences,2000,57(1):106-127.

[4] DANIEL R,BOBIK TA,GOTTSCHALK G. Biochemistry of coenzyme  $B_{12}$ -dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes[J]. FEMS Microbiology Reviews,1999,22(5):553-566.

[5] KAJIURA H,MORI K,TOBIMATUSU T,et al. Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase[J]. Journal of Biological Chemistry,2001,276(39):36514-36519.

[6] 平丽英,柳志强,薛亚平,等. 罗伊乳酸杆菌甘油脱水酶基因的克隆及其在大肠杆菌中的表达[J]. 生物工程学报,2009,25(12):1983-1988.

[7] LÜTJI-PENG Q,SCHARER S,PUHAN Z. Production and stability of 3-hydroxypropionaldehyde in *Lactobacillus reuteri*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2002,60(1/2):73-80.

[8] TORAYA T,KUNO S,FUKUI S. Distribution of coenzyme  $B_{12}$ -dependent diol dehydratase and glycerol dehydratase in *Enterobacteriaceae* and *Propionibacteriaceae*[J]. Journal of Bacteriology,1980,141(3):1439-1442.

[9] HONDA S,TORAYA T,FUKUI S. In situ reactivation of glycerol-inactivated coenzyme  $B_{12}$ -dependent enzymes, glycerol dehydratase and diol dehydratase[J]. Journal of Bacteriology,1980,143(3):1458-1465.

# In Situ Reactivation of the Ability of *Lactobacillus reuteri* Converting Glycerol

## WANG Zhen-zhu, CHEN Guo, CHEN Hong-wen

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Quanzhou 362021, China)

**Abstract:** In this paper, reusing of *Lactobacillus reuteri* resting cell, reactivation of *Glycerol dehydratase* in situ and reacting converting glycerol of *Lactobacillus reuteri* by adding fresh culture medium were studied. The results indicated that the *Lactobacillus reuteri* would lose its transformation ability after converting twice, glycerol had strong inhibitory activity to *Glycerol dehydratase* inside the cell and it was confirmed the cell owned a reactivating system for *Glycerol dehydratase*, and *Lactobacillus reuteri* which wasn't able to convert glycerol could react to a certain extent by adding culture medium, and it could convert glycerol again.

**Keywords:** *Lactobacillus reuteri*; *Glycerol dehydratase*; in situ reactivation; resting cell; glycerol