

途径工程生产 1,3-丙二醇的研究进展

杨登峰 韦宇拓 杜丽琴 黄日波

(广西大学生物技术实验中心, 广西南宁 530005)

摘要: 利用基因工程技术生产 1,3-丙二醇, 特别是途径工程的利用已取得了重大突破。利用生物技术生产 1,3-丙二醇的成本比化学法的低 25%, 它将逐步实现工业化生产。介绍了一步法生产 1,3-丙二醇的超级基因工程菌所需的 3-磷酸甘油脱氢酶(GPD1)、甘油 3-磷酸酶(GPP2)、甘油脱水酶(dhaB)和 1,3-丙二醇氧化还原酶(dhaT), 并对关键酶 dhaB 进行了分析, 同时介绍了穿梭质粒和甘油-3-磷酸酶积累对生产的影响。最后, 对今后的研究重点和策略进行了探讨。

关键词: 1,3-丙二醇; 基因工程菌; 途径工程; 甘油脱水酶

中图分类号: TQ923; TQ223.162

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2004)11-0024-03

Advances in production of 1,3-propanediol by pathway engineering

YANG Deng-feng, WEI Yu-tuo, DU Li-qin, HUANG Ri-bo

(Biotechnology Research Center, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: The technology for production of 1,3-propanediol by the gene engineering has been broken through, especially by the pathway engineering. The cost of production was 25% lower than that by the traditional chemical production. The industrialized production will be realized in the future. Glycerol 3-phosphate dehydrogenase(GPD1), glycerol 3-phosphatase (GPP2), glycerol dehydratase (dhaB) and 1,3-propanediol oxidoreductase (dhaT) are introduced, which construct the super gene engineering for producing the 1,3-propanediol. The key enzyme, dhaB, are analyzed. The effect of the accumulation of shuttle plasmid and glycerol 3-phosphatase on production is introduced. Finally, the focus and the strategy are also discussed for the future.

Key words: 1,3-propanediol; gene-engineered strain; pathway engineering; glycerol dehydratase

自从 19 世纪人们发现 1,3-丙二醇(PDO)以来, 其以多方面优越的特性, 在化学、酶学、遗传学乃至微生物生理学中^[1-4]成为人们关注的焦点。正因为如此, 1,3-PDO 的生产和应用已引起众多世界跨国公司的高度重视。

当前世界上生产 1,3-PDO 的方法有丙烯醛法、环氧乙烷法、微生物发酵法、羟甲基法、酸氢化法及山梨糖醇法等, 其中, 前 2 种方法是工业化生产的主要方法, 但它们都需要在高温和贵金属催化剂作用下进行, 副产物多, 致使产品分离纯化较困难, 生产成本相应较高。因此, 人们已渐渐把目光转移到生物法生产上, 并进行了大量的研究工作。

美国杜邦(Du Pont)、杰能科(Genencor)、陶氏(Dow)、法国罗盖特(Roquette Freres)、德国拜耳(Bayer)、赫司特(Hoechst)、英国卜内门(ICI)等公司都投入巨额资金和庞大科研力量进行生物技术的研究, 在许多方面已取得令人瞩目的成果^[5-7]。值得一提的是, Du Pont 公司已实现采用廉价的玉米或谷物作为底物, 通过与单一微生物接触, 一步法制备 1,3-PDO, 并在全世界范围内申请了专利^[8]。该公司已

逐步向工业化生产转型, 最近, 又将其北卡罗来州金斯顿(Kingston)的 Sorona™聚对苯二甲酸丙二醇酯装置扩能到 3.5 万 t/a。生物法制造聚对苯二甲酸丙二醇酯的总费用比现在从石油化工产品制造要便宜 25%。该研究是以生物技术为特征的“绿色化工”向传统石油化工提出强有力的挑战的杰出典范, 预计 2006 年实现生物转化法生产 1,3-PDO 的工业化。

1 原始菌株生产 1,3-丙二醇

1.1 原始菌株的代谢途径

在自然界中, 1,3-PDO 是主要由甘油为底物发酵得到的。通常情况下, 传统微生物发酵法生产 1,3-PDO 是以甘油作为惟一碳源和能源, 进行厌氧 1,3-PDO 发酵。其中包括 2 步反应: 由甘油脱水酶将甘油脱水生成 3-羟基丙醛(3-HPA), 再由 1,3-PDO 氧化还原酶将 3-HPA 还原为 1,3-PDO, 产生的 1,3-PDO 是细胞代谢终产物, 可在发酵液中高度聚集。在甘油歧化为 1,3-PDO 的同时, 还伴有另一条甘油代谢途径, 即甘油脱水酶将甘油转化为二羟丙酮(DHA), 而后二羟丙酮激酶将 DHA 磷酸化为磷酸

收稿日期: 2004-05-20; 修回日期: 2004-08-25

基金项目: 国家高技术研究发展计划(“863”计划)资助项目(2003AA001039)

作者简介: 杨登峰(1979-), 男, 硕士生; 黄日波(1958-), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 广西科学院院长, 主要从事微生物生物技术、酶工程及相关产品的研发, 0771-3230336, priboh@gxu.edu.cn, riboh@public.nn.gx.cn。

二羟丙酮(DHAP),此过程中产生的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)供给甘油歧化为 1,3-PDO 途径,形成的 DHAP 则进入糖酵解途径^[9-11]。该代谢途径如图 1 所示。

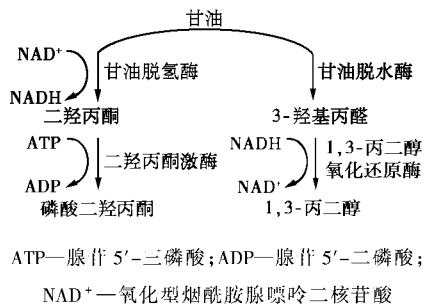


图 1 甘油的代谢途径

许多细菌都具有产生 1,3-PDO 的能力,如柠檬酸菌属(*Citrobacter*)、梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)、肠杆菌属(*Enterbacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebisella*)、乳酸菌属(*Lactobacillus*),其中对高产的克雷伯氏肺炎杆菌和丁酸梭状芽孢杆菌研究较多^[12-14]。

1.2 原始菌株发酵现状

传统的发酵方法是利用天然的原始菌株,针对 pH 值、温度、厌氧条件及培养基中 C、N 对代谢发酵过程的影响,确立 1,3-PDO 生产的最佳发酵条件。用正交实验对其发酵条件进行优化,找到最适 pH 值、温度、溶氧量等。国内外都已有许多这方面的研究报告,最高产量为 60~70 g/L。虽然从产量上看并不低,但是由于传统发酵自身无法克服的弊端,如发酵周期长、发酵后期容易污染、发酵产物较多及不易分离,加之传统发酵只能以附加值较高的甘油为底物,所以生产成本的降低空间是有限的。

2 基因工程菌生产 1,3-丙二醇

2.1 基因工程菌的基本代谢途径

基因工程菌的构建方法大致有以下 4 种途径:

(1) 将 1,3-PDO 生产菌的编码甘油脱水酶(dhaB)、编码 1,3-PDO 氧化还原酶(dhaT)基因克隆到甘油生产菌中,从而获得能直接将葡萄糖转化为 1,3-PDO 的基因工程菌;

(2) 将甘油生产菌的编码 3-磷酸甘油脱氢酶(GPD1)、编码甘油 3-磷酸酶(GPP2)基因克隆到 1,3-PDO 产生菌中;

(3) 将 1,3-PDO 产生菌的 dha 基因克隆到 *E. coli* 中,获得能转化甘油为 1,3-PDO 的基因工程菌;

(4) 将 1,3-PDO 的 dhaB、dhaT 基因和甘油产生菌的 GPD1、GPP2 基因克隆到 *E. coli* 中,从而获得能将葡萄糖转化为 1,3-PDO 的基因工程菌。

甘油生产菌主要是酵母,如酿酒酵母、毕赤酵母,但因为甘油并不是酵母表达系统的主要产物,相对副产物较多,所以使得 1,3-PDO 的后提取比较困难,分离提纯比较烦琐,不适合用于工业化生产。因而,将 dhaB 和 dhaT 基因转入酵母的研究相对较少。

对 1,3-PDO 产生菌的研究集中在高产的克雷伯氏肺炎杆菌和丁酸梭状芽孢杆菌上,而由于克雷伯氏肺炎杆菌是致病菌,也渐渐被淘汰。较之酵母表达系统,梭菌虽是细菌的表达系统,但是要求严格的厌氧条件,所以应用于生产极其困难。

目前,后 2 种方法具有代表性:欧共体国家的公司,如德国 GBF (Gesellschaft für Biotechnologische Forschung)、汉高(Henkel)等,针对甘油过剩的现状,开展用肠道细菌和梭状芽孢杆菌将甘油转化为 1,3-PDO 的研究;Du Pont 公司和 Genencor 公司合作,利用基因工程菌将廉价原料玉米一步法转化为 1,3-PDO。

2.2 利用代谢途径的进一步构建

以葡萄糖为直接底物生产 1,3-PDO,总共需要 4 个基因,即 GPD1、GPP2、dhaB 和 dhaT,其中,GPD1 是葡萄糖转化为甘油的限速酶,dhaB 是甘油转化为 1,3-PDO 的限速酶。dhaB 和 dhaT 是严格厌氧的酶,所以,对 dhaB 的研究成为目前研究的热点之一。

2.2.1 甘油脱水酶中的辅酶 B12

作为整个代谢途径的限速酶,甘油脱水酶在 1,3-PDO 的生产中起着至关重要的作用,对它的研究进展必将影响到 1,3-PDO 工业化的步伐。从肺炎克雷伯氏菌、弗氏柠檬酸菌及巴氏梭菌中分离出的甘油脱水酶都是属于依赖辅酶 B12 的甘油脱水酶。作为最大的辅酶,B12 不但难以穿透细胞壁,而且价格昂贵,虽然用量很少,但已成为工业化生产的绊脚石。Du Pont 公司^[15]通过增加 3 个与辅酶 B12 相关的运转及结合蛋白来提高辅酶 B12 穿透细胞壁的数量,但效果不十分理想。令人振奋的是,最近,在丁酸梭菌中,已经分离出不需要辅酶 B12 的新型甘油脱水酶,这将大大加快 1,3-PDO 的工业化进程。

2.2.2 严格厌氧的甘油脱水酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶

甘油脱水酶和 1,3-PDO 氧化还原酶都是严格厌氧的酶,一旦遇氧便会失活,这为工业化生产带来了极大的困难。人们已经通过途径工程的方法,构

建具有甘油脱水酶激活因子的工程菌。另一方面, Du Pont 公司做了良好的尝试, 并取得了令人满意的结果。通过用大肠杆菌 K12 中的氧化还原酶来替代 1,3-PDO 氧化还原酶, 从而改变了代谢途径, 使 1,3-PDO 的产量大大提高^[16]。

已有利用微氧进行发酵生产 1,3-PDO 的报道^[17], 该微生物微氧发酵法生产 1,3-PDO 技术的特点是: 所使用的微生物细胞不仅在厌氧条件下, 而且在微氧条件下都能将甘油转化为 1,3-PDO。其优点是: 发酵工艺简单经济, 既简化了操作条件, 降低了生产成本, 又缩短了发酵时间, 提高了生产效率, 而且微氧条件下发酵液中 1,3-PDO 的浓度与厌氧发酵相当或略高一些, 为微生物发酵法生产 1,3-PDO 的工业化提供了简单经济的发酵方法。

2.2.3 穿梭质粒的应用

通过基因工程的方法, 构建既可以在大肠杆菌中, 又可以在原始菌株中表达的穿梭质粒, 将这种质粒转化进原始菌株, 使得原始菌株在原始产量的基础上又有了新的提高。与具有转化子大肠杆菌相比, 产量有明显提高。

2.2.4 甘油-3-磷酸积累的影响

在原始菌株中, 甘油-3-磷酸的量基本是恒定的, 与 1,3-PDO 的产量并没有直接的联系; 但在基因工程菌中, 甘油-3-磷酸随着 1,3-PDO 的增加而增加, 成为抑制 1,3-PDO 产生的抑制剂。通过途径工程, 增加甘油-3-磷酸脱氢酶的表达, 来减少甘油-3-磷酸的含量, 可以将 1,3-PDO 的产量提高约 2.5 倍^[18]。

3 展望

随着人们对甘油歧化过程中代谢途径和基因调控机理认识的不断深入, 运用现代生物途径工程技术可以获得高产的基因工程菌: ①继续筛选关键酶——甘油脱水酶, 尤其是在未培养微生物中; ②通过对其催化机理的研究进行人为改造, 如 DNA shuffling 或定点突变, 得到既不需辅酶 B12 又可以在好氧条件下发酵的甘油脱水酶; ③使用强启动子增加

关键酶的表达量, 有望提高 1,3-PDO 的产量; ④在构建工程菌的同时, 插入噬菌体热溶解基因, 使工程菌易于裂解而自动释放出胞内聚合物; ⑤将关键酶固定化, 便于工业化, 将是未来的研究方向。

参考文献

- [1] Deckwer W-D. [J]. *FFMS Microbiology Reviews*, 1995, 16(2-3): 143-149.
- [2] Cameron D C, Altaras N E, Hoffman M L, et al. [J]. *Biotechnology Progress*, 1998, 14(1): 116-125.
- [3] Toraya T. [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2000, 57(1): 106-127.
- [4] Zeng An-ping, Biebl H. [J]. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 2002, 74: 239-259.
- [5] E I du Pont de Nemours and Company. Production of 1,3-propanediol from glycerol by recombinant bacteria expressing recombinant diol dehydratase [P]. US 5821092, 1998-10-13.
- [6] Genencor International Inc. Method for the recombinant production of 1,3-propanediol [P]. US 6136576, 2000-10-24.
- [7] Roquette Freres. Process for the production of 1,3-propanediol by fermentation [P]. US 6406895B1, 2002-06-18.
- [8] E I du Pont de Nemours and Company. Bioconversion of a fermentable carbon source to 1,3-propanediol by a single microorganism [P]. US 5686276, 1997-11-11.
- [9] Zeng A N, Ross A, Biebl H, et al. [J]. *Biotechnology & Bioengineering*, 1994, 44(8): 902-911.
- [10] Fischer R J, Helms J, Durre P. [J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(21): 6959-6969.
- [11] Forage R G, Lin E C C. [J]. *Journal of Bacteriology*, 1982, 151(2): 591-599.
- [12] Homman T, Carmen T, Deckwer W D, et al. [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991, 33(2): 121-126.
- [13] Colin T, Bories A, Moulin G. [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(2): 201-205.
- [14] Saint-Amans S, Girbal L, Andrade J, et al. [J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(5): 1748-1754.
- [15] E I du Pont de Nemours and Company. Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant organisms comprising genes for vitamin B12 transport [P]. US 6432686B1, 2002-08-13.
- [16] E I du Pont de Nemours and Company. Process for the biological production of 1,3-propanediol with high titer [P]. US 6514733B1, 2003-02-04.
- [17] Chen X, Zhang D J, Qi W T, et al. [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 63(2): 143-146.
- [18] Marie M Z, Patricia D L, Douglas C C. [J]. *Biotechnology Progress*, 2002, 18(4): 694-699. ■

你了解粉体加工技术及相关行业信息吗?

请浏览 中国粉体工业信息网 www.chinapowder.cn

粉碎 分级 纳米颗粒制备 混合 分散 改性 造粒 干燥 烧结 散料输送 贮存 粉体检测 粉尘爆炸控制等

010-62772725 62772135(Fax)

清华大学材料系逸夫技术科学楼 2713 室