

1,3-二羟基丙酮生物技术法生产及其在生物体内的代谢

张勇, 郑裕国* (浙江工业大学生物工程研究所, 浙江 杭州 310014)

摘要:目的 介绍了微生物转化甘油生产二羟基丙酮的作用机理, 以及二羟基丙酮在生物体内的代谢情况。方法 综合最新国内外文献资料, 阐述了甘油作为微生物发酵底物, 逐步转化为二羟基丙酮的过程, 以及二羟基丙酮在生物体内随着糖和脂肪代谢途径进入, 从而分解代谢。结果和结论 目前发现微生物转化甘油生产二羟基丙酮的合成途径有两条; 而二羟基丙酮在生物体内也至少有两条分解代谢途径。

关键词:二羟基丙酮; 生物转化; 甘油; 代谢途径

中图分类号: TQ463.24 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2005)07-0622-03

Biotechnological production and metabolism of 1,3-dihydroxyacetone

ZHANG Yong, ZHENG Yu-guo (Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE Introduce action mechanism of dihydroxyacetone produced by microbial transformation from glycerol, and metabolism of dihydroxyacetone in organisms. **METHOD** By making a summary of the last articles, it expounds the course of biotransformation from glycerol to dihydroxyacetone step by step, and the catabolism course of dihydroxyacetone after it enters the metabolism pathway of sugar and fat. **RESULTS AND CONCLUSION** At present, two pathways from glycerol to dihydroxyacetone in microbial transformation method are discovered, while there are at least two catabolism pathways of dihydroxyacetone in organisms.

KEY WORDS: dihydroxyacetone; biotransformation; glycerol; metabolic pathway

1 概述

1,3-二羟基丙酮(1,3-Dihydroxyacetone, 简称 DHA)是最简单的酮糖, 呈白色晶体, 易溶于水, 以及乙醇、丙酮等有机溶剂^[1]。

DHA 是一种重要的化工原料、医药中间体和食品添加剂, 在国外已得到广泛的实际应用^[1~5]。

1,3-二羟基丙酮衍生物是有机合成化学中一类非常重要的中间体, 其用途极其广泛: 可用于羟醛缩合反应制取各种手性化合物; 经生物或化学法还原可得到具有光学活性的仲醇; 直接用于光化学反应中的 Diels-Alder 加成反应制备糖类化合物或经进一步反应用于该类加成反应; 与卡宾发生插入反应; 与 2,2-二烷氧基环丙烷衍生物作用制备内酯; 用于制备一些桥环化合物进而开环得到众多有用的环状化合物。此外, 以 1,3-二羟基丙酮衍生物为中间体合成的一些化合物表现出一定的抗病毒活性, 如抗艾滋病病毒等。

2 微生物转化甘油生产二羟基丙酮的作用途径及机理^[7,8,9,10]

微生物转化甘油生产二羟基丙酮的机理是利用微生物代谢产生的甘油脱氢酶作用, 使甘油分子结构中 2 位 C 上的羟基进行脱氢反应, 生成 1,3-二羟基丙酮(DHA)。生物转化

法生产 DHA 与过去化学合成法相比具有专性强、反应条件温和、底物利用率高、转化率高、生产工艺简单和副产物少等优点, 生物转化技术已日趋成熟, 该技术已广泛应用于各类物质的生产, 如抗生素、甾体激素、氨基酸等。生物转化法生产 DHA 的研究在国外研究历史悠久, 1848 ~ 1849 年 Bertrand 发现醋酸杆菌 (*Acetobacter*) 能将甘油转化为 DHA。此后人们就开始研究甘油的代谢途径及微生物转化甘油生产 DHA。到 20 世纪 60 ~ 70 年代, 国外已用生物转化法工业化生产了 DHA。

甘油通过协助扩散进入细胞后, 有两种代谢途径。

第一条代谢途径, 甘油不需 ATP 也不需辅酶因子 NAD, 就可被细胞膜上的甘油脱氢酶一步直接氧化成二羟基丙酮, 这一过程的电子传递链由泛醌、细胞色素 O 和细胞色素 O 还原性酶组成, 在没有代谢抑制剂存在时, 电子从基质转移到氧, 所以氧是电子及还原当量的最终接受体, 并且这一电子传递的特异链被耦合到 ADP 氧化磷酸化的过程形成 ATP, 所以当细胞中糖酵解途径及羧酸代谢途径缺乏时, 这一过程就是提供细胞生长及其它代谢所需能量的不可缺少的途径, 合成的二羟基丙酮因为是细胞代谢过程中所形成的有毒物质, 部分可被二羟基丙酮激酶作用转变成磷酸二羟基丙酮,

基金项目: 浙江省科技厅资助项目

* 通讯作者, 男, 教授, 博导, E-mail: zhengyg@zjut.edu.cn

然后进入磷酸戊糖循环途径,其它则被完全排出到培养液中。KCN 能抑制甘油脱氢酶、细胞色素(O 与 C)氧化酶的活性,明显地抑制二羟基丙酮的合成,大大降低了氧气消耗,抑制氧化磷酸化过程,阻碍细胞生长。

第二条代谢途径,甘油进入细胞后,在磷酸激酶作用下磷酸化成甘油-3-磷酸(Glycerol-3-P),然后经细胞质内甘油-3-磷酸脱氢酶作用转变成磷酸二羟基丙酮即二羟基丙酮-磷酸,然后二羟基丙酮-磷酸进入磷酸戊糖循环途径,为细胞的代谢和生长提供物质和能量。这一过程需 ATP,也需辅酶因子 NAD,在正常情况下,微生物细胞在以甘油作为唯一碳源培养基上生长时其能量来源主要是甘油的细胞质代谢。KCN 以及抗霉素 A 都能抑制细胞色素 C 氧化酶的活性,对电子传递及还原性辅酶的再生都有影响,但抗霉素 A 不抑制细胞生长及二羟基丙酮的合成。所有的去耦合试剂(NaN_3 , 短杆菌肽(gramicidin), 2,4-二硝基苯酚(2,4-DNP))都强烈抑制甘油的细胞质代谢,抑制细胞生长,促进甘油转化成二羟基丙酮。培养基中有短杆菌肽时,微生物细胞的呼吸频率加大,二羟基丙酮合成速率提高,但培养液中却有副产物琥珀酸形成,是琥珀酸脱氢酶还原延胡索酸所致, NaN_3 虽也能加速二羟基丙酮的合成,但却降低细胞的呼吸活动,同时培养液中也能检测到副产物琥珀酸。在没有抑制剂与去耦合试剂存在时,甘油既在细胞膜上代谢也在细胞质中代谢,但醋酸杆菌属细胞生产二羟基丙酮却只有一条途径,那就是通过细胞膜上的甘油脱氢酶作用,将甘油进一步氧化为二羟基丙酮。

3 二羟基丙酮在生物体内的代谢途径

二羟基丙酮(DHA)作为一个生物代谢中间产物,参与到生物的代谢中,发挥着极其重要的作用。其代谢途径主要有两条:

(1)从糖酵解途径(EMP)^[6]中进入

二羟基丙酮在消耗 1 分子 ATP 的情况下,被二羟基丙酮激酶(dihydroxyacetone kinase)磷酸化,生成一份子的磷酸二羟基丙酮。这一步相当重要,是二羟基丙酮参与生物体内代谢的必要一步。磷酸二羟基丙酮在磷酸丙糖异构酶(triose phosphate isomerase)的催化下迅速转化为 3-磷酸甘油醛。3-磷酸甘油醛在有 NAD^+ 和 H_3PO_4 时,被磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase)所催化,形成 1,3-二磷酸甘油酸。在 Mg^{2+} 存在下,1,3-二磷酸甘油酸可被磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase)所催化,将磷酸基转给 ADP 形成了 3-磷酸甘油酸和 ATP。同样,在 Mg^{2+} 存在下,磷酸甘油酸变位酶可以催化磷酸基从 3-磷酸甘油酸的 C_3 移至 C_2 ,生成 2-磷酸甘油酸。

在 Mg^{2+} 和 Mn^{2+} 存在下,经烯醇化酶(enolase)催化,2-磷酸甘油酸脱水形成磷酸烯醇式丙酮酸。紧接着,在丙酮酸激酶(pyruvate kinase)催化下,磷酸烯醇式丙酮酸上的高能磷酸键转移到 ADP 上,从而形成 ATP 和烯醇式丙酮酸,此反应需 K^+ 、 Mg^{2+} 或 Mn^{2+} 参加,基本上为不可逆反应。在 pH7.0 时烯醇式丙酮酸分子迅速重排形成丙酮酸,这一步反应不需

要酶的参与。

得到产物丙酮酸继续代谢,有三种去路^[6]:

a、变为乙酰 CoA:在有氧条件下丙酮酸进入线粒体变成乙酰 CoA 参加三羧酸循环,最后氧化成 CO_2 和 H_2O 。

b、生成乳酸:在厌氧情况下,丙酮酸接受 3-磷酸甘油醛脱氢酶形成的 NADH 上的氢,在乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase)催化下,形成乳酸。

c、生成乙醇:在酵母菌或其他微生物中,丙酮酸可经丙酮酸脱羧酶(pyruvate decarboxylase)的催化,以焦磷酸硫胺素为辅酶,脱羧变成乙醛,继而在醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase)的催化下,由 NADH 还原形成乙醇。

(2)甘油三酸酯合成途径^[6]

在高等动、植物组织中可以合成甘油三酸酯。二羟基丙酮经二羟基丙酮激酶磷酸化后,生成磷酸二羟基丙酮,磷酸二羟基丙酮经扩散作用进入细胞中,在 α -磷酸甘油脱氢酶(glycerol phosphate dehydrogenase)的作用下,以 NADH 为辅酶,还原为 L- α -磷酸甘油。同样的,若以甘油为起始物,在甘油激酶(glycerol kinase)的作用下,也可生成 L- α -磷酸甘油。L- α -磷酸甘油中的羟基可在磷酸甘油转酰基酶(glycerol phosphate acyl transferase)催化下和脂酰辅酶 A 反应生成溶血磷脂酸(Lysophosphatidic),随后又与另一分子脂酰辅酶 A 结合形成磷脂酸(Phosphatidic acid)。磷脂酸接着被磷脂酸磷酸酶水解形成甘油二酯,此中间产物又在甘油二酯转酰基酶催化下与第三个脂酰辅酶 A 分子作用生成甘油三酸酯。这样合成的甘油三酸酯就被贮存到动物肝脏或高等植物细胞组织中。

4 结语

二羟基丙酮作为一种医药中间体、多功能试剂、化妆品有效成分、生物代谢中间产物和食品饲料添加剂在很多行业发挥着重大的作用。二羟基丙酮在生物体内的代谢途径现在所发现的仅限于上述两条,也很有可能在今后的试验工作中进一步发现其更多的代谢途径。对于这些内容的研究,将有利于我们采用微生物转化法更有方向性的转化生产出高产率、高转化率和高安全性的二羟基丙酮。近些年国内市场对生物转化的 1,3-二羟基丙酮产品需求量逐年增大,但是生物转化法生产二羟基丙酮在国内尚属空白,其发酵提取技术还有待于进一步提高来适应产业化要求。

参考文献

- [1] 郑裕国,张霞,沈寅初,等.微生物转化甘油生产 1,3-二羟基丙酮的菌株筛选[J].浙江工业大学学报,2001,29(2):124.
- [2] C. Claret, J. M. Salmon, C. Romieu, A. Bories. Physiology of Gluconobacter oxydans during dihydroxyacetone production from glycerol[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1994, 41: 359-365.
- [3] United States Patent[P], 4,076,589, 1978.
- [4] Shigeki Yamada, Koichi Nabe, Nobuhiko Izuo, Mitsuru Wada, Ichiro Chibata. Fermentative Production of Dihydroxyacetone by Acetobacter suboxydans ATCC 621[J]. J Ferment Technol, 1979, 57(3):215-220.

- [5] Shigeki Yamada, Koichi Nabe, Nobuhiko Izuo, Mitsuru Wada, and Ichiro Chibata. enzymatic production of dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans* ATCC 621[J]. J. Ferment Technol, 1979, 57 (3):221-226.
- [6] 沈同,王镜岩. 生物化学[M],第二版,下册,北京:高等教育出版社,2002.
- [7] Fulmer EI, Underkofler LA. Oxidation of polyhydric alcohols by *Acetobacter suboxydans*[J]. J Sci, 1947, 21:251-270.
- [8] Hauge HG , King TE , Cheldelin VH. Alternate conversions of glycerol to dihydroxyacetone in *Acetobacter suboxydans*[J] . J Biochem, 1955, 214:1-9.
- [9] Magasanik B, Brooke MS, Karibian D. Metabolic pathways of glycerol dissimilation[J]. J Bacteriol, 1953, 66:611-619.
- [10] Hauge JG, King TE, Cheldelin VH. Oxidation of dihydroxyacetone via the pentose cycle in *Acetobacter suboxydans*[J]. J Biochem, 1955, 214:11-26.
- [11] Williams PJE B, Rainbow C. Enzymes of the tricarboxylic acid cycle in acetic acid bacteria[J]. J Gen Microbiol, 1964, 35: 237-247.

收稿日期:2005-04-30