

微生物磷酸葡萄糖变位酶的研究进展

刘连^{1,2} (1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 湖北武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 从磷酸葡萄糖变位酶对碳代谢和细菌细胞形态的影响、细菌致病性、在细菌高效产氢中的作用、细菌脂多糖生物合成中的作用和维持酵母细胞内 Ca^{2+} 平衡的作用等方面, 介绍了微生物磷酸葡萄糖变位酶的研究进展。

关键词 磷酸葡萄糖变位酶; 葡萄糖-1-磷酸; 葡萄糖-6-磷酸

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)07-02821-02

Research Progress of Phosphoglucumutase in Microorganism

LIU Lian (State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan, Hubei 430072)

Abstract The research progress on phosphoglucumutase in microorganism was reviewed from several aspects, including the influence of carbon metabolism and bacterial cell morphology, the pathogenicity of bacteria, the role of efficient production of hydrogen in bacteria, LPS biosynthesis in bacteria and maintain intracellular Ca^{2+} balance in yeast.

Key words Phosphoglucumutase; Glucose-1-phosphate; Glucose-6-phosphate

在糖酵解途径中, 磷酸葡萄糖变位酶(PGM)将葡萄糖-6-磷酸转换成葡萄糖-1-磷酸。葡萄糖-1-磷酸是细胞内低聚糖和多聚糖通过底物磷酸化降解的产物^[1]。在合成代谢中, 葡萄糖-1-磷酸是多糖和核苷酸合成的前体^[2]。

PGM 在生物界细菌、植物、动物中普遍存在。一些微生物中的 PGMs 已有相关报道, 如醋酸杆菌 (*Acetobacter xylinum*)^[3]、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)^[4]、绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)^[5]、嗜嗜热古菌 (*Pyrococcus horikoshii* OT3)^[6] 和极端嗜热古菌 (*Thermococcus kodakaraensis*)^[2]。笔者对微生物磷酸葡萄糖变位酶的最新进展进行了综述, 并且根据当前研究现状进行了展望。

1 磷酸葡萄糖变位酶对碳代谢的影响

在大肠杆菌中糖酵解是一个重要的中间碳代谢的基本途径。乳糖和麦芽糖的代谢涉及糖酵解中间产物——葡萄糖-1-磷酸的形成^[7-8]。大肠杆菌 PGM 由 Joshi 和 Handler 纯化和鉴定^[4]。大肠杆菌 PGM 和兔 PGM 分子量(62 kDa)相同, 在活性位点有相同的氨基酸序列和酶活反应所需要的相同条件^[4]。大肠杆菌 K-12 PGM 突变会使磷酸葡萄糖变位酶活性降低。该突变株在乳糖基质上生长不好, 但积累直链淀粉。这是因为不能产生足够多的直链淀粉, 通过积累麦芽糖而诱导麦芽糖代谢的酶^[9]。大肠杆菌 K-12 突变株是磷酸葡萄糖变位酶缺陷株。该突变株部分阻断了从麦芽糖或半乳糖代谢中产生的葡萄糖-1-磷酸的代谢, 但没有完全阻断葡萄糖-1-磷酸的代谢。该突变株仍能够在加有半乳糖的培养基上生长。乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 菌株 19435 有 β -PGM 和 α -PGM 2 种 PGM。 β -PGM 在麦芽糖代谢中催化可逆的 β -葡萄糖-1-磷酸和 β -葡萄糖-6-磷酸的相互转化^[10], 在葡萄糖培养基上生长的乳酸乳球菌 β -PGM 的合成被抑制, 而无论在麦芽糖或葡萄糖培养基上, α -PGM 活

性没被抑制^[10]。乳酸乳球菌 PGM 被认为在 Leloir 途径中乳糖的利用、细胞壁多糖和胞外多糖的合成中所必需的^[11-13]。在许多的革兰氏阳性菌中 PGM 缺失引起细胞壁多态性, 多糖含量发生改变, 在葡萄糖基质上生长缺陷^[14-16]。PGM 是糖原合成的一个关键酶。如果在这一步将 PGM 突变, 理论上会对糖原合成或分解产生影响, 从而对碳水化合物储存产生影响^[17-18]。研究表明, PGM 酶活和糖原合成存在很强的正相关性, 戈登链球菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中 PGM 缺失仍能合成糖原^[19]。

2 磷酸葡萄糖变位酶对细菌细胞形态的影响

PGM 将葡萄糖-6-磷酸转化成葡萄糖-1-磷酸。葡萄糖-1-磷酸是 UDP-葡萄糖的前体。UDP-葡萄糖是多种代谢途径的糖基供体。在革兰氏阳性菌种, UDP-葡萄糖是合成胞壁酸、脂胞壁酸、膜糖脂、荚膜和胞外多糖的前体^[20,15]。

PGM 缺失会产生很大的影响。最常见的为细胞形态变化和生长速度减慢^[21-22,15]。枯草芽孢杆菌 PGM 缺失突变株细胞形态发生变化, 引起膜糖脂的缺失, 如果增加 Mg^{2+} , 则是可逆的, 又会产生膜糖脂^[15]。这些突变体合成生物膜的能力下降。这可能是由于不能合成胞外多糖。改变胞壁酸的含量和结构不能合成 UDP-葡萄糖^[23]。PGM 缺失使得 UDP-葡萄糖的合成受阻。UDP-葡萄糖是各种细胞壁聚合物的重要糖基供体, 引起糖基磷酸聚合物代谢的异常, 因此改变细胞形态^[23]。枯草芽孢杆菌 PGM 缺失引起的细胞形态改变, 可能是由于葡萄糖 1-磷酸代谢的不足^[15]。

3 磷酸葡萄糖变位酶与细菌致病性

肺炎链球菌是呼吸感染的一个重要原因。PGM 缺失使其病毒性减少, 可能是由于荚膜量的减少^[14,21]。海豚链球菌是一种鱼病原体, 能感染人类。PGM 缺失使得荚膜量和毒性减少。这可能是由于增加了吞噬清除的敏感性^[22]。格式链球菌 PGM 缺失, 细胞呈现多表型, 降低了在固定相有机体中的存活率, 增加了细胞裂解能力, 降低了在感染性心内膜炎的毒性^[23]。其他研究表明, 海豚链球菌和肺炎链

基金项目 国家自然科学基金项目(30825003)。

作者简介 刘连(1984-), 女, 湖南湘潭人, 博士研究生, 研究方向: 微生物分子遗传学, E-mail: llian2004@163.com。

收稿日期 2013-02-28

球菌 PGM 缺失引起的部分毒性减弱。这可能是由于荚膜表达的减少^[21-22]。

4 磷酸葡萄糖变位酶在细菌高效产氢中的作用

耐热的 PGM 最有潜力的应用之一是通过酶介导的从糖和水分中生产高产量的氢气^[24-26]。氢经济概念提出了一种有前途的清洁的可再生能源^[27-28]。一种体外合成生物学的方法——合成生物转换途径表明,组装 13~14 个酶和 1 个辅酶能将多糖(淀粉和纤维物质)和水转化成 12 分子 H₂ 和 6 分子 CO₂(每分子葡萄糖)^[24-25]。糖氢转换途径因其独特的特性呈现了氢经济概念的创新,例如高效产氢,反应条件温和(大气压力和低温),产品分离简单,产物清洁无污染,完全适合于聚合物电解质膜燃料电池^[26]。相对于高成本的嗜常温酶来说,重组耐高温的酶对于增加氢的产量和降低酶成本起着重要的作用^[26]。在体外合成的酶途径中,PGM 在将葡萄糖-1-磷酸转换成葡萄糖-6-磷酸中起重要作用^[29]。

热纤杆菌 PGM 被用来作为生产高产量的酶介导的从纤维物质和水中生产高产量氢^[25],还可以低成本从多糖和磷酸生产葡萄糖-6-磷酸,而不用使用高价格的 ATP^[29]。有研究认为,热纤梭菌 PGM 很活跃,在纤维和纤维二糖生长介质中分别负责糖流向的 75% 和 50%^[30-31]。

5 磷酸葡萄糖变位酶在细菌脂多糖生物合成中的作用

PMM/PGM 在脂多糖生物合成中起重要作用^[5,32]。葡萄糖-1-磷酸不只是葡萄糖和乳糖代谢中糖酵解的中间产物,还是 LPS 中心区域生物合成糖核苷酸的前体^[33]。绿脓杆菌的 PMM/PGM 由 *algC* 编码,催化甘露糖-1-磷酸和甘露糖-6-磷酸的相互转化。甘露糖-1-磷酸用于海藻酸生物合成和 GDP-鼠李糖的合成,是脂多糖 A-band 的组成成分。它又能催化葡萄糖-1-磷酸和葡萄糖-6-磷酸的相互转化。葡萄糖-1-磷酸是 UDP-葡萄糖和 dTDP-鼠李糖的前体,是脂多糖核心的组成部分^[5]。

6 酶对维持酵母细胞内 Ca²⁺ 平衡的作用

在啤酒酵母中通过 Li⁺ 抑制 PGM 酶活,改变细胞内的 Ca²⁺ 平衡^[34]。啤酒酵母在以半乳糖作为碳来源时,PGM 缺失(*pgm1*Δ/*pgm2*Δ)引起细胞内的葡萄糖-1-磷酸到葡萄糖-6-磷酸速率的增加^[34]。

啤酒酵母在半乳糖作为唯一碳源时,PGM 基因缺失(*pgm1*Δ/*pgm2*Δ),不能生长^[35],啤酒酵母 *pgm2* 缺失,生长缓慢,大量增加 Ca²⁺ 的吸收和积累^[36]。啤酒酵母 PGM 对于维持细胞内 Ca²⁺ 平衡起重要作用。这是因为葡萄糖-6-磷酸和葡萄糖-1-磷酸的相对浓度直接与 Ca²⁺ 的吸收和积累相偶联^[37]。

7 研究展望

PGM 在生物界中普遍存在,属于磷酸己糖变位酶家族。磷酸葡萄糖变位酶具有重要的生物学活性。在糖酵解途径中,PGM 将葡萄糖-6-磷酸转换成葡萄糖-1-磷酸,市场潜力巨大。随着生物信息学和其他科学技术的发展,研究者将会对磷酸葡萄糖变位酶有更全面、深入的认识。综上所述,微生物 PGM 的研究还有很多方面有待进一步拓展,已成

为研究者关注的焦点。

参考文献

- [1] CAMPBELL P N, CREASEY N H, PARR C W. The specificity of muscle phosphorylase[J]. *Biochem J*, 1952, 52: 448-452.
- [2] RASHID N, KANAI T, ATOMI H, et al. Among multiple phosphomannomutase gene orthologues, only one gene encodes a protein with phosphoglucomutase and phosphomannomutase activities in *Thermococcus kodakaraensis*[J]. *J Bacteriol*, 2004, 186: 6070-6076.
- [3] KVAM C, OLSVIK E S, KINLEY-MCKEE J, et al. Studies on recombinant *Acetobacter xylinum* alpha-phosphoglucomutase[J]. *Biochem J*, 1997, 326: 197-203.
- [4] JOSHI J G, HANDLER P. Phosphoglucomutase. I. Purification and properties of phosphoglucomutase from *Escherichia coli*[J]. *J Biol Chem*, 1964, 239: 2741-2751.
- [5] YE R W, ZIELINSKI N A, CHAKRABARTY A M. Purification and characterization of phosphomannomutase/phosphoglucomutase from *Pseudomonas aeruginosa* involved in biosynthesis of both alginate and lipopolysaccharide[J]. *J Bacteriol*, 1994, 176: 4851-4857.
- [6] AKUTSU J, ZHANG Z, TSUJIMURA M, et al. Characterization of a thermostable enzyme with phosphomannomutase /phosphoglucomutase activities from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus horikoshii* OT3[J]. *J Biochem*, 2005, 138: 159-166.
- [7] FUKASAWA T, KOKURA K, KURAHASHI K. A new enzymatic defect of galactose metabolism in *Escherichia coli* K-12 mutants[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1962, 7: 121-125.
- [8] KALCKAR H M, KURAHASHI K, JORDAN E. Hereditary defects in galactose metabolism in *Escherichia coli* mutants. I. Determination of enzyme activities[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1959, 45: 1776-1780.
- [9] ADHYA S, SCHWARTZ M. Phosphoglucomutase mutants of *Escherichia coli* K-12[J]. *J Bacteriol*, 1971, 108: 621-626.
- [10] QIAN N, STANLEY G A, HAHN-HAGERDAL B, et al. Purification and characterization of two phosphoglucomutases from *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* and their regulation in maltose- and glucose-utilizing cells[J]. *J Bacteriol*, 1994, 176: 5304-5311.
- [11] GROSSIORD B, VAUGHAN E E, LUESINK E, et al. Genetics of galactose utilisation via the Leloir pathway in lactic acid bacteria[J]. *Lait*, 1998, 78: 77-84.
- [12] DELCOUR J, FERAÏN T, DEGHORAIN M, et al. The biosynthesis and functionality of the cell-wall of lactic acid bacteria[J]. *Antonie Leeuwenhoek*, 1999, 76: 159-184.
- [13] KLEEREBEZEM M, VAN KRANENBURG R, TUINIER R, et al. Exopolysaccharides produced by *Lactococcus lactis*: from genetic engineering to improved rheological properties[J]. *Antonie Leeuwenhoek*, 1999, 76: 357-365.
- [14] HARDY G G, MAGEE A D, VENTURA C L, et al. Essential role for cellular phosphoglucomutase in virulence of type 3 *Streptococcus pneumoniae*[J]. *Infect Immun*, 2001, 69: 2309-2317.
- [15] LAZAREVIC V, SOLDÓ B, MEDICO N, et al. *Bacillus subtilis* α-phosphoglucomutase is required for normal cell morphology and biofilm formation[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71: 39-45.
- [16] LEVANDER F, RADSTROM P. Requirement for phosphoglucomutase in exopolysaccharide biosynthesis in glucose- and lactose-utilizing *Streptococcus thermophilus*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 2734-2738.
- [17] RAY JR W J, ROSCELLI G A. A kinetic study of the phosphoglucomutase pathway[J]. *J Biol Chem*, 1964, 239: 1228-1236.
- [18] HIROSE M, SUGIMOTO E, SASAKI R, et al. Crystallization and reaction mechanism of yeast phosphoglucomutase[J]. *J Biochem*, 1970, 68: 449-457.
- [19] RYU Y G, BUTLER M J, CHATER K F, et al. Engineering of primary carbohydrate metabolism for increased production of actinorhodin in *Streptomyces coelicolor*[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72: 7132-7139.
- [20] BOELS I C, RAMOS A, KLEEREBEZEM M, et al. Functional analysis of the *Lactococcus lactis galU* and *galE* genes and their impact on sugar nucleotide and exopolysaccharide biosynthesis[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2001, 67: 3033-3040.
- [21] HARDY G G, CAIMANO M J, YOTHER J. Capsule biosynthesis and basic metabolism in *Streptococcus pneumoniae* are linked through the cellular phosphoglucomutase[J]. *J Bacteriol*, 2000, 182: 1854-1863.
- [22] BUCHANAN J T, STANNARD J A, LAUTH X, et al. *Streptococcus iniae* phosphoglucomutase is a virulence factor and a target for vaccine development[J]. *Infect Immun*, 2005, 73: 6935-6944.

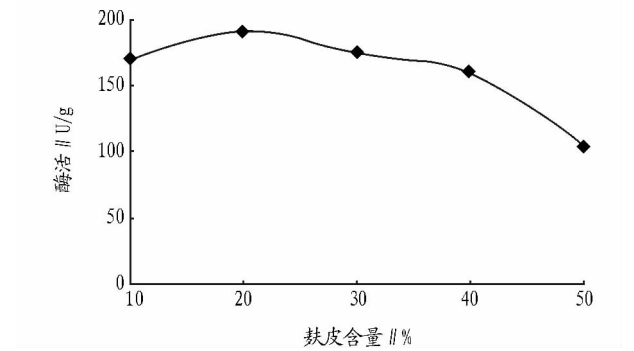


图 5 麸皮含量对酶活的影响

响最大的因素是固态发酵时间,接种量、培养温度次之,含水量的影响最小。所以,绿色木霉固态产酶发酵的最优条件为 A1B3C1D2,即培养温度 30 ℃,培养时间 5 d,接种量 5%,含水量 250%。

表 2 固态产酶发酵条件的正交试验结果

试验号	因素				酶活 U/g
	A	B	C	D	
1	1	1	1	1	202.29
2	1	2	2	2	219.54
3	1	3	3	3	198.36
4	2	1	2	3	133.69
5	2	2	3	1	168.93
6	2	3	1	2	226.85
7	3	1	3	2	145.12
8	3	2	1	3	193.48
9	3	3	2	1	172.68
K1	206.73	160.37	207.54	181.30	
K2	176.49	193.98	175.30	197.17	
K3	170.43	199.30	170.80	175.18	
R	36.30	38.93	36.74	21.99	

3 结论

通过对绿色木霉不同培养条件进行研究,发现不同因素对固态发酵条件下纤维素酶活的影响有明显的影 响。通过正交优化,得出绿色木霉固态产酶发酵的最优条件是 A1B3C1D2,即培养温度 30 ℃,培养时间 5 d,接种量 5%,含水量 250%。由于影响纤维素酶活的因素较多,同时纤维素的降解是一个比较复杂的过程,需要多种微生物的综合作用,靠单一菌种的处理不能达到理想的效果^[8-10]。所以,今后可进一步研究微生物产酶体系之间的协同效应,进行多菌种的混合发酵,以进一步提高秸秆资源的综合利用效率。

参考文献

[1] 刘兴博,何堤,宋炜. 秸秆资源利用及秸秆饲料加工技术[J]. 农机化研究,2007(12):218-220.

[2] 欧义芳,黄秋莲. 纤维素生物转化在农业肥料和饲料中的应用[J]. 纤维素科学与技术,2002,10(1):57-62.

[3] 邢廷铄. 农作物秸秆饲料加工与应用[M]. 北京:金盾出版社,2008.

[4] 耿冰,郭美锦,张嗣良. pH 值对绿色木霉(*Trichoderma viride*) 产纤维素酶的影响[J]. 工业微生物,2008,38(5):1-6.

[5] 姜绪林. 绿色木霉固态发酵产纤维素酶的研究[D]. 无锡:江南大学,2005.

[6] 王福荣. 生物工程分析与检验[M]. 北京:中国轻工业出版社,2005.

[7] 王文华,刘娅,江英. 绿色木霉产特定纤维素酶条件优化研究[J]. 中国酿造,2008(13):25-27.

[8] 宋颖琦,刘睿倩,杨谦,等. 纤维素降解菌的筛选及其降解特性的研究[J]. 哈尔滨工业大学学报,2002,34(2):197-200.

[9] 李日强,张峰. 不同菌株固态发酵玉米秸秆生产饲料蛋白的比较研究[J]. 生态学报,2001,21(9):1512-1518.

[10] 张伟心,马艳玲,霍玉鹏. 混合菌发酵玉米秸秆生产菌体蛋白饲料的研究[J]. 饲料研究,2000(6):5-7.

[11] QU E J, XIE Z, MA M X, et al. Screening for a novel *Trichoderma viride* strain highly producing Cellulase via ultraviolet mutagenesis[J]. Agricultural Science & Technology, 2011, 12(10): 1410-1412, 1416.

[12] 李慧君,李波,吴琳. 绿色木霉 F6 降解玉米秸秆的固体发酵条件优化[J]. 安徽农业科学,2012,40(24):12204-12207.

(上接第 2822 页)

[23] BIZZINI A, MAJCHERCZYK P, BEGGAH-MÖLLER S, et al. Effects of α-phosphoglucomutase deficiency on cell wall properties and fitness in *Streptococcus gordonii*[J]. Microbiology, 2007, 153:490-498.

[24] ZHANG Y H P, EVANS B R, MIELENZ J R, et al. High-yield hydrogen production from starch and water by a synthetic enzymatic pathway[J]. PLoS ONE, 2007(2):456.

[25] YE X, WANG Y, HOPKINS R C, et al. Spontaneous high-yield production of hydrogen from cellulosic materials and water catalyzed by enzyme cocktails[J]. Chem Sus Chem, 2009, 2:149-152.

[26] ZHANG Y H P. A sweet out-of-the-box solution to the hydrogen economy: is the sugar-powered car science fiction[J]. Energy Environ Sci, 2009, 2:272-282.

[27] SCHULTZ M G, DIEHL T, BRASSEUR G P, et al. Air pollution and climate-forcing impacts of a global hydrogen economy[J]. Science, 2003, 302:624-627.

[28] GRANT P M, STARR C, OVERBYE T J. A power grid for the hydrogen economy[J]. Sci Am, 2006, 295:76-83.

[29] WANG Y, ZHANG Y. A highly active phosphoglucomutase from *Clostridium thermocellum*: cloning, purification, characterization and enhanced thermostability[J]. J Appl Microbiol, 2010, 108:39-46.

[30] ZHANG Y H P, LYND L R. Kinetics and relative importance of phosphorytic and hydrolytic cleavage of cellodextrins and cellobiose in cell extracts of *Clostridium thermocellum*[J]. Appl Environ Microbiol, 2004, 70:1563-1569.

[31] ZHANG Y H P, LYND L R. Cellulose utilization by *Clostridium thermocellum*: bioenergetics and hydrolysis product assimilation[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102:7321-7325.

[32] GOLDBERG J B, HATANO K, PIER G B. Synthesis of lipopolysaccharide O side chains by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 requires the enzyme phosphomannomutase[J]. J Bacteriol, 1993, 175:1605-1611.

[33] ZHOU D, STEPHENS D S, GIBSON B W, et al. Lipopolysaccharide biosynthesis in pathogenic *Neisseria*: cloning, identification, and characterization of the phosphoglucomutase gene[J]. J Biol Chem, 1994, 269:11162-11169.

[34] CSUTORA P, STRASSZ A, BOLDIZSAR F, et al. Inhibition of phosphoglucomutase activity by lithium alters cellular calcium homeostasis and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Am J Physiol Cell physiol, 2005, 289:58-67.

[35] DARAN J M, BELL W, FRANÇOIS J. Physiological and morphological effects of genetic alterations leading to a reduced synthesis of UDP-glucose in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. FEMS Microbiol Lett, 1997, 153:89-96.

[36] FU L, MISETA A, HUNTON D, et al. Loss of the major isoform of phosphoglucomutase results in altered calcium homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biol Chem, 2000, 275:5431-5440.

[37] AIELLO D, FU L, MISETA A, et al. Intracellular glucose 1-phosphate and glucose 6-phosphate levels modulate Ca²⁺ homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. J Biol Chem, 2002, 277:45751-45758.