

# *Lactobacillus diolivorans* 二醇脱水酶激活因子 基因的克隆、测序与功能鉴定\*

孟晓蕾 唐悦 齐向辉 韦宇拓 黄日波\*\*

(广西大学广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530004;  
广西大学生命科学与技术学院, 南宁 530004; 南宁中诺生物工程公司, 南宁 530003)

**摘要** 根据二醇脱水酶与甘油脱水酶的激活因子基因序列同源性分析, 设计简并引物从 *L. diolivorans* 基因组 DNA 中扩增出了假定的二醇脱水酶激活因子基因 (*gldG*、*gldH*) 全序列, 补全了 GenBank 中该基因序列的未知部分, 构建了表达质粒 pSE-*gldGH*, 以 *E. coli* BL21 为宿主, 进行诱导表达. 表达产物的变性与非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分析表明: *gldGH* 表达产生 68 ku、13 ku 两个蛋白质, 它们经金属螯合亲和层析与凝胶过滤得到共纯化, 纯化产物即假定的激活因子为分子质量约 325 ku 的蛋白质聚集体, 由这两个蛋白质以等摩尔量组成, 因此假定的激活因子可能为  $\alpha_4\beta_4$  亚基结构. 以 *L. diolivorans* 二醇脱水酶为对象, 进行激活实验, 结果证实 *gldGH* 表达产物具备二醇脱水酶激活因子的功能.

**关键词** 二醇脱水酶, 激活因子, 功能鉴定, 1,3-丙二醇, *Lactobacillus diolivorans*  
**学科分类号** Q786

甘油脱水生成 3-羟基丙醛是微生物合成 1,3-丙二醇 (1,3-PD) 的关键反应, 微生物中存在两种同工酶二醇脱水酶 (EC 4.2.1.28) 和甘油脱水酶 (EC 4.2.1.30) 均能催化此反应. 目前报道的基本为辅酶 B<sub>12</sub> 依赖型脱水酶, 在体外反应过程中存在快速的反应失活现象<sup>[1]</sup>, 这与缺少其激活因子有很大的关系<sup>[2~4]</sup>. 已研究发现, 在脱水酶基因序列附近, 往往存在对应的激活因子<sup>[5~7]</sup>, 激活因子能够使反应失活的脱水酶重新具备催化能力<sup>[2]</sup>. 因此, 对脱水酶激活因子的研究, 将有助于深入了解脱水酶的激活和失活的反应机制, 为此类酶的应用提供理论依据.

*Lactobacillus diolivorans* 是 2002 年分离得到的乳酸杆菌新种, 该菌在厌氧条件下, 能转化 1,2-丙二醇生成丙醛, 然后歧化生成正丙醇与丙酸<sup>[8]</sup>, 也能厌氧发酵甘油转化成 1,3-PD<sup>[9]</sup>, 由此可以推测 *L. diolivorans* 应具备二醇脱水酶或甘油脱水酶及其激活因子. 本研究根据 GenBank 公布的 *L. diolivorans* 的二醇脱水酶激活因子基因大亚基 *gldG* 的部分序列<sup>[9]</sup>, 通过 Blast 检索激活因子基因的同源性设计简并引物扩增此激活因子的全基因, 并进行功能鉴定, 为深入研究脱水酶激活因子的激

活机制提供新的实验基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

*Lactobacillus diolivorans* (DSM14421) 购自 DSMZ 菌种保藏中心; 大肠杆菌菌株 *E. coli* JM109 与 BL21 由本实验室保存; 质粒 pSE380 购自 Invitrogen 公司; *L. diolivorans* 二醇脱水酶由本实验室纯化; pMD-18T 载体、限制性内切酶、LA Taq DNA 聚合酶、连接酶为 TAKARA 公司产品;  $\lambda$ DNA / Hind III marker 及 protein molecular mass marker 购自 MBI 公司; MBTH (3-甲基-苯并噻唑胺 C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>SN(CH<sub>3</sub>)C:NNH<sub>2</sub>·HCl)、Coenzyme B<sub>12</sub> (辅酶 B<sub>12</sub>)、1,2-丙二醇及丙醛购自 Sigma 公司; 其他为国产分析纯.

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细菌的培养.

*L. diolivorans* 的培养使用 MRS 培养基(g/L):

\*国家“863”高技术研究与发展计划资助项目(2003AA001039).  
\*\* 通讯联系人. Tel: 0771-3235706, E-mail: riboh@public.nn.gx.cn  
收稿日期: 2006-06-20, 接受日期: 2006-09-29

蛋白胨 10.0, 牛肉浸膏 10.0, 酵母提取物 5.0, 葡萄糖 20.0, Tween80 1.0,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  2.0, NaAc 5.0, 柠檬酸铵 2.0,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.05, pH 6.2~6.5, 4/5 装液量, 30°C 静置培养 60 h, 用于基因组 DNA 的提取.

*E. coli* JM109 与 BL21 菌株在作为宿主培养时, 使用 LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0, 其中含 100 mg/L 氨苄青霉素.

**1.2.2** *L. diolivorans* 二醇脱水酶激活因子基因(*gldG*、*gldH*)的克隆和表达.

基因组 DNA 提取, DNA 酶切、连接、细菌感受态制备和转化等均参照文献[10]进行.

*gldGH* 的克隆与测序. 根据 GenBank 中登记号为 gi:37542650 的 CDS 序列与所有甘油脱水酶和二醇脱水酶激活因子基因序列的同源比对结果, 设计以下简并引物: 上游引物 5' ATGAMACGYGT-AATTGGYGTWGATAT 3', 下游引物 5' TTA-YTTCTTRAATGGMACTCC 3' (M 代表 A 或 C, Y 代表 C 或 T, W 代表 A 或 T, R 代表 A 或 G). PCR 条件按 94°C 预变性 2 min, 然后 94°C 40 s, 58°C 40 s, 72°C 1 min 15 s, 完成 30 个循环后 72°C 延伸 10 min. PCR 产物纯化后连接到 pMD-18T 载体上进行测序分析.

*gldGH* 基因的表达. 根据测序结果设计以下引物: 上游引物 5' TGCCCATGGTTCACCACC-ATCACCATCATATGAAACGTGTAATTGG 3', 下游引物 5' GCGGTCGACTTATTTCTTAAATGG-CAC T 3'. 在上游引物的 5' 端加入了 *Nco* I 酶切位点, 同时加入了编码 6 个组氨酸的碱基序列, 以便使用金属螯合亲和层析法纯化重组表达蛋白; 在下游引物的 5' 端加入了 *Sal* I 酶切位点, 以便于连接到表达载体 pSE380 上. 扩增得到的目的片段与 pSE380 表达载体连接, 连接产物转化 *E. coli* JM109 感受态细胞, 经提取质粒, 酶切电泳验证, 筛选得到重组质粒命名为 pSE380-*gldGH*. 将重组质粒 pSE380-*gldGH* 导入 *E. coli* BL21, 接种于 LB 培养液中, 37°C 振荡培养至  $A_{600} = 0.6$  时, 加 IPTG 到终浓度为 1 mmol/L 进行诱导表达 10 h.

**1.2.3** 酶的纯化.

金属螯合亲和层析: 离心收集 750 ml 诱导表达后的培养物, 使用超声波法破碎细胞后, 离心收集粗酶液, 并用 0.45  $\mu$ m 微孔膜过滤后注入镍亲和层析柱 (Amersham, 1.5 cm  $\times$  5cm), 然后用洗涤缓冲液 (50 mmol/L 咪唑、50 mmol/L 磷酸钾缓冲

液、150 mmol/L KCl、0.2% 1,2- 丙二醇, pH 8.0) 洗涤, 最后用洗脱缓冲液 (150 mmol/L 咪唑、50 mmol/L 磷酸钾缓冲液、150 mmol/L KCl、0.2% 1,2- 丙二醇, pH 8.0) 洗脱, 流速 0.5 ml/min, 以每管 1.5 ml 收集.

凝胶过滤: 收集金属螯合亲和层析中目的蛋白的洗脱峰部分, 加入 S-300H 柱 (Amersham, 100 mm  $\times$  100 cm), 用缓冲液 (50 mmol/L 磷酸钾缓冲液, pH 8.0) 洗脱, 流速 0.35 ml/min, 操作温度为 4°C. 收集目的蛋白的峰值部分, 用于酶功能检测.

**1.2.4** 酶活力的检测

参照文献[2]的方法进行 *L. diolivorans* 二醇脱水酶的失活与激活. 失活体系: 0.03 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 8.0), 0.05 mol/L KCl, 0.3 mol/L 1,2- 丙二醇, 11  $\mu$ mol/L 维生素 B<sub>12</sub>. 失活条件: 在失活体系中加入一定单位的 *L. diolivorans* 二醇脱水酶, 37°C, 30 min. *L. diolivorans* 二醇脱水酶的激活: 100  $\mu$ l 激活反应体系内含 0.03 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH 8.0), 1.2 mol/L 1,2- 丙二醇, 21  $\mu$ mol/L 辅酶 B<sub>12</sub>, 24 mmol/L ATP, 24 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.25 U 已失活的纯化后脱水酶, 14  $\mu$ g 激活因子, 37°C 反应一定的时间后, 加 100  $\mu$ l 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液 (pH 3.6) 终止反应, 加 200  $\mu$ l 0.1% MBTH, 37°C 15 min. 之后稀释一定倍数在 305 nm 处测吸光值, MBTH 与反应产物丙醛的复合物在 305 nm 处的消光系数为 13.22 mmol<sup>-1</sup>·cm<sup>-1</sup>·L. 可在不同的反应时间取样检测, 分析激活程度与时间的关系.

**1.2.5** 蛋白质的检测分析. 蛋白质浓度测定: 按 Bradford<sup>[11]</sup>法, 以牛血清白蛋白为标准进行测定. 聚丙烯酰胺凝胶电泳: 参照 Laemmli<sup>[12]</sup>的方法, 进行变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE); 参照 Andersson<sup>[13]</sup>的方法, 进行非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 用考马斯亮蓝 (R-250) 进行显色. 使用生物软件 BandScan Version 4.5 进行 SDS-PAGE 中蛋白质条带的吸光度分析.

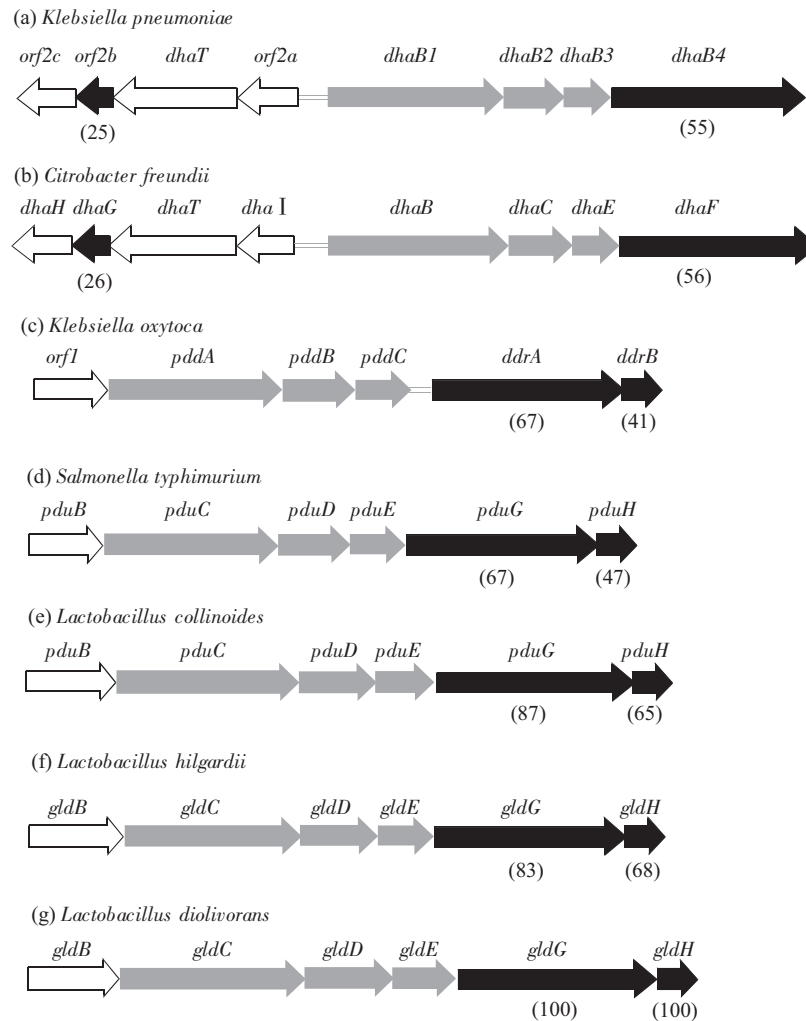
## 2 结 果

### 2.1 *gldGH* 基因结构分析

将测序获得的 *gldGH* 基因序列提交至 GenBank, 其接受号为 DQ534544. 经分析, 该序列与已知的其他脱水酶激活因子序列的碱基同源性在 60%~76%; 含大 (*gldG*)、小 (*gldH*) 2 个读码框,

此特征与二醇脱水酶激活因子情况相符, 且 2 个读码框相邻, 属于二醇脱水酶激活因子的结构特征 (图 1); 与其他激活因子大、小亚基的氨基酸同源

性分别为 55%~87%和 25%~68%, 并且与二醇脱水酶激活因子的同源性明显大于与甘油脱水酶激活因子的同源性 (图 1)。



**Fig. 1 Genetic organization of genes participating in glycerol fermentation (a,b) and for 1,2-propanediol utilization (c to g)**

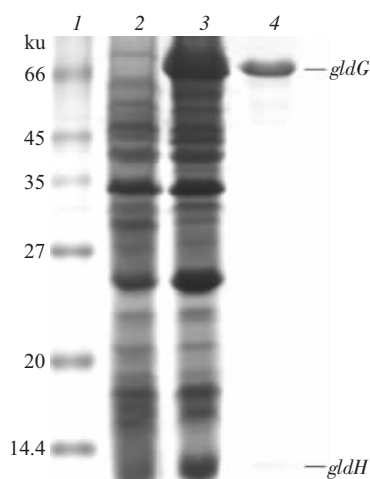
(a) *K. pneumoniae*<sup>[5]</sup>; (b) *C. freundii*<sup>[7]</sup>; (c) *K. oxytoca*<sup>[6]</sup>; (d) *S. typhimurium*<sup>[14]</sup>; (e) *L. collinoides*<sup>[15]</sup>; (f) *L. hilgardii*<sup>[9]</sup>; (g) *L. diolivorans*<sup>[9]</sup>. Arrows and arrowheads represent length, location, and orientation of potential genes. Black arrows indicate open reading frames encoding homologs of the three structural subunits of glycerol or diol dehydratase; Gray arrows indicate open reading frames encoding homologs of the two structural subunits of glycerol or diol dehydratase reactivating factor. The amino acid sequence identities with respect to the corresponding genes of the *gldGH* from *L. diolivorans* are shown in parentheses, which were the results run on the DiAlign Web Server (<http://www.genomatix.de>).

## 2.2 *gldGH* 基因表达产物的电泳分析

用 SDS-PAGE 检测 *gldGH* 基因在 *E. coli* BL21 中的重组表达产物, 结果如图 2, 所表达的重组蛋白质大小为 68 ku、13 ku, 分别对应测序结果中的 *gldG*、*gldH* 2 个读码框. 这 2 个蛋白质经金属螯合

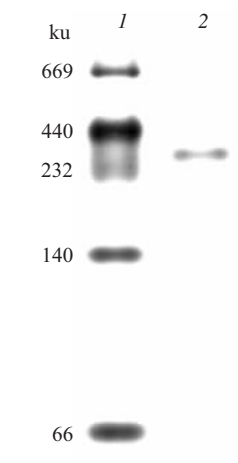
亲和层析与凝胶过滤后, 同时得到纯化, 说明两者相互结合, 应同属于重组酶的必要组成, 并且根据 SDS-PAGE 中各蛋白质条带的吸光度分析结果与分子质量计算出两个重组蛋白在重组酶中的摩尔比为 0.99 : 1. 同时用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测纯

化后的重组蛋白, 结果如图 3, 重组酶聚合体的分子质量约 325 ku. 根据以上数据推算出该酶的聚合体可能为  $\alpha_4\beta_4$  结构, 不同于在此之前所研究的各种微生物来源的二醇和甘油脱水酶激活因子所一致具备的约 160 ku 分子质量以及  $\alpha_2\beta_2$  结构<sup>[5~7]</sup>.



**Fig. 2 SDS-PAGE analysis of expression product on a 14% gel**

1: Protein mass marker; 2: *E. coli* BL21 containing pSE380; 3: *E. coli* BL21 containing pSE-*gldGH*; 4: Purified expression product of *gldGH*.



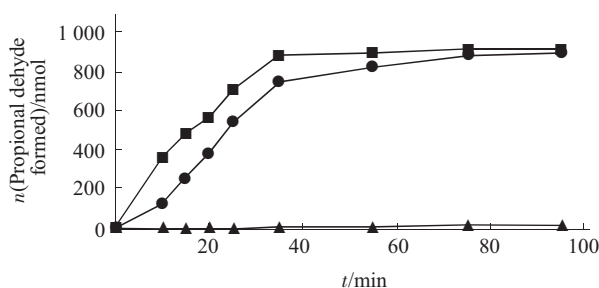
**Fig. 3 PAGE (nondenaturing) analysis of the purified expression product of *gldGH* on a gradient gel (5%~15%)**

1: Protein molecular mass marker; 2: Purified expression product of *gldGH*.

### 2.3 *gldGH* 基因表达产物的酶功能检验

*gldGH* 表达产物的酶功能检验结果如图 4 所示, 激活程度随激活反应时间而逐渐变大, 与一般的激活反应情况一致. 在整个反应过程中, 阴性对照(含失活的二醇脱水酶)中只产生了微量的丙醛,

说明经失活处理的二醇脱水酶符合激活反应的实验要求, 不会干扰对 *gldGH* 表达产物的酶功能检测; 阳性对照(含有活力的二醇脱水酶)中 95% 以上的丙醛产生在反应的前 30 min, 仅少量丙醛在剩余的时间里以相当缓慢的速度产生, 说明二醇脱水酶在恒速反应 30 min 后基本失去酶活力, 符合该类酶的反应特征; 激活反应(含失活的二醇脱水酶与纯化的 *gldGH* 表达物)中丙醛的生成量在前 30min 内一直以较恒定的速度增长, 之后的丙醛生成速度明显下降, 但丙醛的量仍在增加, 最后几乎达到阳性对照的水平, 说明 *gldGH* 表达产物具备脱水酶激活因子的酶功能.



**Fig. 4 Reactivation of diol dehydratase of *L. diolivorans* by purified *gldGH***

The cobalamin-inactivated diol dehydratases (0.025 U) were incubated with 1.2 mol/L 1,2-propanediol as the substrate for the indicated time periods with 14  $\mu\text{g}$  of purified recombinant expression complex of *gldGH* of *L. diolivorans*, 21  $\mu\text{mol/L}$  coenzyme  $\text{B}_{12}$ , 24 mmol/L ATP and 24 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  (●—●); or without recombinant expression complex of *gldGH* and with 21  $\mu\text{mol/L}$  coenzyme  $\text{B}_{12}$ , 24 mmol/L ATP and 24 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  as negative control (▲—▲). Diol dehydratase (0.025 U) was incubated with 1.2 mol/L 1,2-propanediol, 21  $\mu\text{mol/L}$  coenzyme  $\text{B}_{12}$ , 24 mmol/L ATP and 24 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  as a positive control (■—■).

## 3 讨 论

随着对二醇脱水酶和甘油脱水酶反应机理研究的深入, 它们的激活因子得以发现. 激活因子在稳定脱水酶催化活力, 提高产物生成效率上体现出了重要性, 因此在生物法生产 1,3-PD 的工业过程中有助于提高生产效率, 降低生产成本. 现有理论推测, 辅酶  $\text{B}_{12}$  与脱水酶蛋白结合后形成具催化活力的全酶, 在催化底物脱水生成产物后, 全酶上的辅酶  $\text{B}_{12}$  分子的 C—Co 键断裂转变成钴胺素衍生物, 此钴胺素衍生物继续与脱水酶蛋白结合成为无催化活力的酶复合物, 而在 ATP 和  $\text{Mg}^{2+}$  存在下, 可以



由对应的脱水酶激活因子帮助解下此钴胺素衍生物, 形成可与辅酶 B<sub>12</sub> 结合并继续催化反应进行的脱水酶<sup>[2]</sup>.

目前, 已研究的激活因子均来源于肠杆菌科的微生物<sup>[5~7]</sup>, 因此有必要补充来自其他科属的激活因子的相关信息, 以利于综合比较深入研究. 本文完成了首个乳杆菌科的激活因子的功能鉴定, 并且根据结果显示, 此二醇脱水酶激活因子的亚基结构与此前研究的所有二醇和甘油脱水酶激活因子不同, 不是它们共有的  $\alpha_2\beta_2$  结构<sup>[5~7]</sup>, 而可能为  $\alpha_4\beta_4$  结构. 在激活因子对脱水酶的激活过程中, 激活因子与脱水酶存在酶分子的相互作用<sup>[2, 3]</sup>.  $\alpha_2\beta_2$  与  $\alpha_4\beta_4$  两种亚基结构类型的激活因子在体积与三维结构上会存在明显的不同, 因此两者与脱水酶的酶分子相互作用在空间结构上应有所不同, 并有可能导致在激活效率上存在差异.

为研究具有不同亚基结构激活因子的结构与激活功能, 本研究的后续工作应从两方面展开: 一是克隆表达与 *L. diolivorans* 二醇脱水酶激活因子同源性较高的 *L. collinoides* 和 *L. hilgardii* 二醇脱水酶激活因子, 测定其分子质量与亚基聚合状态, 并与本实验室现有的肠杆菌科的脱水酶及其激活因子进行交叉激活实验, 分析乳杆菌来源的激活因子的亚基结构与功能是否存在特殊性; 二是进行 *L. diolivorans* 二醇脱水酶激活因子的结晶工作, 并通过晶体的 X 射线衍射分析其三维空间结构, 比较其他  $\alpha_2\beta_2$  结构的激活因子相关数据, 研究其结构与功能的关系. 相信这些研究将有助于进一步了解甘油和二醇脱水酶的激活机制, 并有可能通过相关基因的理性设计构建更经济地生产 1,3-PD 的基因工程菌.

### 参 考 文 献

- Daniel R, Bobik T A, Gottschalk G. Biochemistry of coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol and diol dehydratases and organization of the encoding genes. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, **22** (5): 553~566
- Kajiura H, Mori K, Tobimatsu T, *et al.* Characterization and mechanism of action of a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Biol Chem*, 2001, **276** (39): 36514~36519
- Yamanishi M, Yunoki M, Tobimatsu T, *et al.* The crystal structure of coenzyme B<sub>12</sub>-dependent glycerol dehydratase in complex with cobalamin and propane-1,2-diol. *Eur J Biochem*, 2002, **269** (18): 4484~4494
- Andres S, Wiezer A, Bendfeldt H, *et al.* Insights into the genome of the enteric bacterium *Escherichia blattae*: cobalamin (B (12)) biosynthesis, B (12)-dependent reactions, and inactivation of the gene region encoding B (12)-dependent glycerol dehydratase by a new Mu-like prophage. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 2004, **8** (3): 150~168
- Mori K, Tobimatsu T, Hara T, *et al.* Characterization, sequencing, and expression of the genes encoding a reactivating factor for glycerol-inactivated adenosylcobalamin-dependent diol dehydratase. *J Biol Chem*, 1997, **272** (51): 32034~32041
- Tobimatsu T, Kajiura H, Yunoki M, *et al.* Identification and expression of the genes encoding a reactivating factor for adenosylcobalamin-dependent glycerol dehydratase. *J Bacteriol*, 1999, **181** (13): 4110~4113
- 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*. *Eur J Biochem*, 2001, **268** (8): 2369~2378
- Krooneman J, Faber F, Alderkamp A C, *et al.* *Lactobacillus diolivorans* sp. nov., a 1, 2-propanediol-degrading bacterium isolated from aerobically stable maize silage. *Int J Syst Evol Micr*, 2002, **52**: 639~646
- Gorga A, Claisse O, Lonvaud-Funel A. Organisation of the encoding glycerol dehydratase of *Lactobacillus collinoides*, *Lactobacillus hilgardii* and *Lactobacillus diolivorans*. *Sci Aliments*, 2002, **22** (1~2): 151~160
- Sambrook J, Russe D W. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 3rd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72** (3): 248~254
- Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the head of bacteriophage. *Nature*, 1970, **227** (259): 680~685
- Andersson L O, Borg H, Mikaeleson M. Molecular weight estimation of proteins by electrophoresis in polyacrylamide gels of graded porosity. *FEBS Lett*, 1972, **20** (2): 199~202
- Bobik T A, Havemann G D, Busch R J, *et al.* The propanediol utilization (*pdu*) operon of salmonella enterica serovar typhimurium LT2 includes genes necessary for formation of polyhedral organelles involved in coenzyme B<sub>12</sub>-dependent 1,2-propanediol degradation. *J Bacteriol*, 1999, **181** (19): 5967~5975
- Sauvageot N, Muller C, Hartke A, *et al.* Characterisation of the diol dehydratase pdu operon of *Lactobacillus collinoides*. *FEMS Microbiol Lett*, 2002, **209** (1): 69~74

## Cloning, Sequencing and Characterization of Genes Encoding Diol Dehydratase Reactivating Factor of *Lactobacillus diolivorans*\*

MENG Xiao-Lei, Tang Yue, QI Xiang-Hui, WEI Yu-Tuo, HUANG Ri-Bo\*\*

(Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresource Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530004, China;

College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

Sinozyme Biotech Co. Ltd, Nanning 530003, China)

**Abstract** It was reported that glycerol and 1,2-propanediol was converted to 1,3-propanediol and 1-propanol in *Lactobacillus diolivorans*(DSM14421) under the anaerobic condition, respectively. Its putative genes encoding diol dehydratase, a key enzyme in the pathway, were sequenced. However, their reactivating factor (*gldG* and *gldH*) was not completely sequenced. Based on several glycerol dehydratase and diol dehydratase reactivating factors sequence alignment, it was amplified from *L. diolivorans* with degenerated primers. Then it was inserted into expression vector pSE380. A recombinant plasmid pSE-*gldGH* was constructed and transformed into *Escherichia coli* BL21. Recombinant *gldG* and *gldH* protein were co-purified by metal chelating affinity chromatography and gel filtration from cell-free extracts of *E. coli* overexpressing the *gldGH* genes. They existed a putative reactivating factor, with an apparent molecular mass of 325 000. The protein complex consisted of equimolar amounts of the two subunits with  $M_r$  of 68 000 ( $\alpha$ ) and 13 000 ( $\beta$ ), encoded by the *gldG* and *gldH* genes, respectively. Therefore, its subunit structure was most likely  $\alpha_4\beta_4$ , different from the common structure  $\alpha_2\beta_2$  of the other diol or glycerol dehydratase reactivating factors. In the presence of free adenosylcobalamin, ATP, and  $Mg^{2+}$ , the factor reactivated diol dehydratase from *L. diolivorans*, which had been inactivated to be enzyme-cyanocobalamin complex.

**Key words** diol dehydratase, reactivating factor, characterization, 1,3- propanediol, *Lactobacillus diolivorans*

---

\*This work was supported by a grant from The National 863 High-Tech R&D Program of China (2003AA001039)

\*\*Corresponding author . Tel: 86-771-3235706, E-mail: riboh@public.nn.gx.cn

Received: June 20, 2006 Accepted: September 29, 2006