

利用甘油发酵耦联生产 3-羟基丙酸及 1,3-丙二醇重组菌的构建及筛选

王凤寰^{1*} 杨建国² 王晓楠² 谭天伟^{2*}

(1. 北京工商大学 食品学院 北京 100048)

(2. 北京化工大学 生命科学与技术学院 北京 100029)

摘要: 在肺炎克雷伯杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)代谢甘油生产 1,3-丙二醇(1,3-PD)的过程中, 为了减少有毒中间产物 3-羟基丙醛(3-HPA)的积累, 可将其转化为 3-羟基丙酸(3-HP), 从而实现 1,3-丙二醇和 3-羟基丙酸的联产。克隆来自于酿酒酵母的 NAD⁺依赖型的乙醛脱氢酶(ALDH)的基因 *aldh4*, 构建了表达载体 pKP-*aldh*, 转化 *K. pneumoniae*, 得到了有效表达乙醛脱氢酶的重组肺炎克雷伯杆菌(*K. pneumoniae* A⁺)。在此基础上, 使用紫外诱变联合菌种驯化的方法对 *K. pneumoniae* A⁺ 进行筛选, 获得了可耐受较高 3-HP 浓度(≥ 35 g/L)的重组肺炎克雷伯杆菌 *K. pneumoniae* A⁺5-3。发酵实验结果表明, *K. pneumoniae* A⁺5-3 可将 3-HPA 转化为 3-HP, 能够同时利用甘油耦联生产 3-HP 和 1,3-PD, 产量分别达到 5.0 g/L 和 74.5 g/L。

关键词: 3-羟基丙酸, 1,3-丙二醇, 乙醛脱氢酶, 重组肺炎克雷伯杆菌

Construction and screening of novel recombinant *Klebsiella pneumoniae* capable of co-producing 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol

WANG Feng-Huan^{1*} YANG Jian-Guo² WANG Xiao-Nan² TAN Tian-Wei^{2*}

(1. School of Food and Chemical Engineering, Beijing Technology and Business University, Beijing, 100048, China)

(2. College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing, 100029, China)

Abstract: 3-HPA was a toxic intermediate metabolite in the 1,3-PD pathway of *Klebsiella pneumoniae* and its accumulation could inhibit cell growth and glycerol utilization. In order to reduce the 3-HPA accumulation and produce 3-HP simultaneously, the *aldh* gene from a *Saccharomyces cerevisiae* encoding NAD⁺-dependent acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) was cloned and the expression vector pKP-*aldh* harboring *aldh* gene was constructed and transformed into *K. pneumoniae*. The resulting re-

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 20906003); 中国博士后基金项目(No. 20080440302)

* 通讯作者: Tel: 86-10-68988710, 86-10-64416691; ✉ 王凤寰: wangfenghuan@th.btbu.edu.cn; 谭天伟: twtan@mail.buct.edu.cn

收稿日期: 2011-03-29; 接受日期: 2011-07-14

combinant strain *K. pneumoniae* A⁺ could express the ALDH effectively. The bacteria was mutated by UV lights and screened in 3-HP tolerance plates to yield *K. pneumoniae* A⁺5-3. In the fed-batch fermentation of *K. pneumoniae* A⁺5-3, the final 3-HP and 1,3-PD concentration reached 5.0 g/L and 74.5 g/L, respectively, which were higher than those of wild-type *K. pneumoniae*.

Keywords: 3-Hydroxypropionic acid (3-HP), 1,3-Propanediol (1,3-PD), Acetaldehyde dehydrogenase (ALDH), Recombinant *Klebsiella pneumoniae*

3-羟基丙酸(3-Hydroxypropionic acid, 3-HP)是一种重要的化学合成中间体,被美国能源部列为最具开发潜力的化工产品之一^[1]。近年来,开发利用微生物法生产 3-HP 引起了人们的关注^[2]。

1,3-丙二醇(1,3-Propanediol, 1,3-PD)也是一种重要的化工原料,主要用于合成新型高分子材料——聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT)^[3],现在已有微生物发酵甘油生产 1,3-PD 的工业实例^[4]。

目前还没有发现天然的微生物能够将生物质直接转化为 3-HP, Cargill-Dow 公司开发了利用基因工程菌表达丙氨酸 2,3-氨基变位酶,以碳水化合物生产 3-羟基丙酸的工艺^[5]。韩国学者近年来对生物法生产 3-HP 进行了研究:在重组大肠杆菌中表达丙二酰-CoA 还原酶、乙酰-CoA 脱羧酶、生物素酶以及转氢酶基因,构建的基因工程菌可以利用葡萄糖为底物产生 1.2 mmol/L 的 3-HP^[6];构建了以甘油为底物的重组大肠杆菌,表达甘油脱水酶和乙醛脱氢酶基因,3-HP 产量为 0.58 g/L^[7];另外通过敲除甘油脱水酶以及过表达乙醛脱氢酶基因,重组菌的 3-HP 产量为 2.07 g/L^[8]。国内江南大学^[9]采用类似的思路构建了重组大肠杆菌,以甘油为底物,3-HP 产量为 4.92 g/L,其他有关生物法生产 3-HP 的报道还很少。

在 1,3-PD 的生产菌株 *K. pneumoniae* 中,3-羟基

丙醛(3-HPA)是一种中间代谢产物。过多的 3-HPA 积累会抑制菌体的生长和甘油的代谢^[10]。本研究在 *K. pneumoniae* 中表达来自于酿酒酵母的 NAD⁺依赖型的乙醛脱氢酶,构建重组基因工程菌,将 3-HPA 转化为 3-HP,同时循环再生 NADH,探索利用生物法发酵甘油耦联生产 3-HP 及 1,3-PD 的新方法,目前尚未有相关的文献报道,研究思路见图 1。另外,还对构建的重组菌进行了紫外诱变、驯化筛选出一株能够耐受高浓度 3-HP 的菌株。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 *E. coli* DH5α 和肺炎克雷伯杆菌 *K. pneumoniae* 由本实验室保存。质粒 pMD 18-T 购于 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司,酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因组 DNA 和质粒 pKP-*dhaTB* 由先前实验构建及保存,质粒 pKP-*aldH* 由本实验构建。

1.2 试剂

各种限制性内切酶、Ex Taq DNA 聚合酶、dNTP 均购于 TaKaRa 公司, DNA 连接酶购于 Promega 公司,质粒提取试剂盒及 DNA 回收试剂盒购于 OMEGA 公司, NADH、NAD⁺ 购于 Amresco 公司, 3-羟基丙酸及 1,3-丙二醇标品购于 Sigma 公司,其他

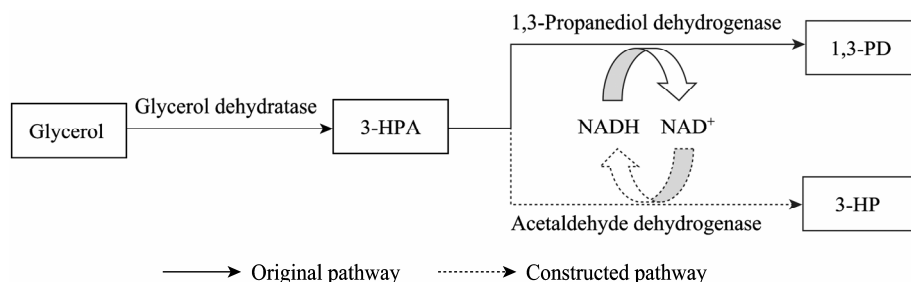


图 1 重组肺炎克雷伯杆菌联产 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇代谢途径示意图

Fig. 1 Illustration of 3-HP and 1,3-PD metabolic pathway in recombinant *K. pneumoniae*

试剂均为国产分析纯或生化试剂。引物合成和测序由北京三博远志公司完成。

1.3 培养基和培养条件

1.3.1 培养基: LB 培养基(g/L): 蛋白胨 10, 酵母提取物 5, NaCl 10, pH 7.0。固体培养基中加入 1.5%的琼脂。如需要, 加入氨苄青霉素(100 mg/L)或硫酸卡那霉素(50 mg/L)。

诱变培养基(g/L): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3.4, KH_2PO_4 1.3, $(NH_4)_2SO_4$ 3, $MgSO_4$ 0.24, $CaCO_3$ 0.5, 酵母提取物 3, 甘油 20, LiCl 2, 3-HP 10, 微量元素 5 mL/L, 琼脂 15。

驯化培养基(g/L): 3-HP 20–45; 其余与诱变培养基相同。

发酵培养基(g/L): $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 3.4, KH_2PO_4 1.3, $(NH_4)_2SO_4$ 3, $MgSO_4$ 0.24, $CaCO_3$ 0.5, 酵母提取物 3, 甘油 20, 微量元素 5 mL/L。如需要, 加入硫酸卡那霉素(50 mg/L)。

微量元素溶液(g/L): $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1, $ZnCl_2$ 0.07, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.1, $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025, H_3BO_3 0.06, $Na_2MO_4 \cdot 2H_2O$ 0.035, $CoCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.2, HCl (37%) 4 mL。

1.3.2 培养条件: 斜面及平板培养: 37 °C 恒温培养 24 h。

种子液培养: 用无菌环从新鲜的平板培养基中挑取单菌落, 转接 50 mL 摇瓶, 装液量 10 mL, 37 °C 恒温 150 r/min 振荡培养 16 h。

摇瓶发酵培养: 250 mL 摇瓶, 装液量 100 mL, 棉塞封口, 接种量 5%, 37 °C 恒温 150 r/min 振荡培养 24 h。

发酵罐培养: 在 5 L 发酵罐中进行, 装液量 2 L, 接种量 10%, 通入 0.4 vvm 的空气进行微氧发酵培养, 搅拌转速 300 r/min, 发酵温度 37 °C, 自动加入 5 mol/L 的 KOH 维持 pH 7.0, 发酵过程中的甘油浓度用改进的高碘酸钠氧化法测定, 流加甘油溶液(60%)维持发酵液甘油浓度在 10–20 g/L, 发酵时间 30 h。

1.4 分子克隆及表达

分子克隆技术, 例如基因组 DNA 提取、聚合酶

链式反应(PCR)、质粒纯化、限制性酶切、连接及转化以及重组蛋白表达 SDS-PAGE 均按照常规标准方法进行^[11]。

1.4.1 *aldH* 基因的克隆及表达载体的构建: 根据 NCBI 公布的酿酒酵母 Z75282 ALDH 基因序列设计合成 PCR 引物:

上游 A1: 5'-ACCGGAATTCATGTTTCAGTAG ATCTACGC-3'

下游 A2: 5'-ACCGAAGCTTTTACTCGTCCAATT TGGC-3'

引物两端分别引入 *EcoR* I 酶切位点和 *Hind* III 酶切位点, 下划线处为引入酶切位点。

以酿酒酵母基因组 DNA 为模板, A1 和 A2 为引物扩增 *aldH* 基因。凝胶电泳分离纯化后 T-A 克隆至 pMD18-T 中, 转化大肠杆菌 DH5 α , 蓝白斑筛选阳性克隆。提取质粒 pMD18-T-*aldH* 酶切及测序鉴定, 将测序正确的 pMD18-T-*aldH* 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切, 与同样进行酶切的载体 pKP-*dhaTB* 连接, 构建乙醛脱氢酶表达载体 pKP-*aldH*, 转化大肠杆菌 DH5 α 。

1.4.2 重组质粒转化肺炎克雷伯杆菌: 因为肺炎克雷伯杆菌(*K. pneumoniae*)的生理生化特性与大肠杆菌非常相近, 因此其感受态的制备及转化均按照大肠杆菌的操作方法进行。从大肠杆菌 DH5 α 中提取质粒 pKP-*aldH*, 进行酶切鉴定后, 转化 *K. pneumoniae*, 得到重组肺炎克雷伯杆菌(*K. pneumoniae* A⁺)。

1.4.3 重组质粒 pKP-*aldH* 在 *K. pneumoniae* 中的表达: 因 pkP 为肺炎克雷伯杆菌的组成型启动子, 只要底物甘油存在, 甘油经过甘油脱氢酶的氧化产物 2-羟基丙酮可直接诱导 pkP。接种 *K. pneumoniae* A⁺ 至发酵培养基中, 同时以 *K. pneumoniae* 为对照, 进行培养, 培养 16 h 后收集菌体进行 SDS-PAGE 分析。

1.5 菌种诱变及驯化筛选

由于 3-HP 对细胞有毒, 当发酵液中的 3-HP 浓度较高时, 细胞的生长会受到抑制, 因此, 对重组 *K. pneumoniae* A⁺ 进行了紫外诱变及驯化实验。

1.5.1 紫外诱变: 挑取平板培养基上生长良好的 *K.*

pneumoniae A⁺单菌落, 摇瓶培养 12 h, 取 1 mL 菌液, 进行不同倍数(10^{-4} – 10^{-10})的稀释, 取 0.1 mL 均匀涂布到诱变培养基上, 紫外线(功率 15 W, 距离 20 cm)诱变一定的时间(5 s, 10 s, 20 s, 30 s), 使得致死率在 90%左右, 37 °C 培养 24 h, 计算菌落数, 3 次实验取平均值。

1.5.2 菌种驯化及筛选: 挑取诱变培养基上生长良好的 *K. pneumoniae* A⁺菌落, 转接至含 3-HP (20 g/L) 的驯化培养基上, 37 °C 培养 24 h, 继续挑取长势良好的菌落, 转接至含 3-HP (25 g/L) 的驯化培养基上, 37 °C 培养 24 h, 以此类推, 每轮驯化提高 3-HP 浓度 5 g/L, 直至 3-HP 终浓度为 40 g/L。

挑取在含较高浓度 3-HP 的驯化培养基上生长良好的 *K. pneumoniae* A⁺单菌落, 转接至摇瓶培养基中, 每株菌设两个平行实验, 同时以出发菌株 *K. pneumoniae* A⁺作为对照, 微氧培养 24 h, 将 3-HP 含量较高的菌株作为上罐发酵的菌株。

1.6 测定方法

1.6.1 酶活测定: 乙醛脱氢酶 ALDH 活力测定按照文献[12]的方法进行。乙醛脱氢酶的酶活定义为: 常温下催化乙醛转化为乙酸时, 340 nm 处每分钟 NAD⁺消耗的微摩尔数或者 NADH 生成的微摩尔数。

1.6.2 生物量及代谢物浓度测定: 生物量测定采用比浊法测定(OD_{600})。发酵液中底物和产物浓度采用岛津高效液相色谱仪 10AVP 测定, 色谱柱为 Bio-Rad 公司 Amines HPX-87H 有机酸离子交换柱, 柱温 65 °C, 流动相为 5 mmol/L H₂SO₄, 流速为 0.6 mL/min。使用示差折光及紫外检测器, 使用外标法定量。

2 结果

2.1 乙醛脱氢酶基因 *aldH* 的克隆及表达载体的构建

2.1.1 乙醛脱氢酶基因 *aldH* 的克隆: PCR 扩增的乙醛脱氢酶基因 *aldH* 如图 2 所示, 测序结果显示, *aldH* 大小为 1 824 bp, 由 ATG 起始, TAA 中止, 编码的 ALDH 大小为 61 kD。测序结果在 NCBI 数据库进行 BLAST 序列分析, *aldH* 基因与公布的酿酒酵母的基因同源性为 99%, 氨基酸序列同源性 100%。

2.1.2 表达载体 pKP-*aldH* 的构建及转化 *K. pneumoniae*: 表达载体 pKP-*aldH* 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切鉴定, 结果如图 3 所示, 含有 5.3 kb 和 1.8 kb 两条片段, 与预期相符, 重组载体图谱见图 4。重组质粒 pKP-*aldH* 转化至克雷伯肺炎杆菌 *K. pneumoniae* 中, 阳性克隆 *K. pneumoniae* A⁺用于蛋白表达及酶分析。

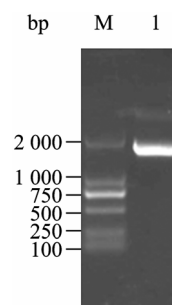


图 2 PCR 扩增的 *aldH* 基因

Fig. 2 PCR Product of *aldH*

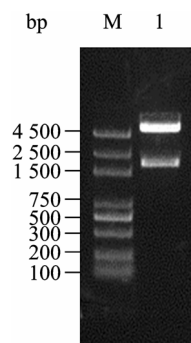


图 3 质粒 pKP-*aldH* 双酶切验证

Fig. 3 Identification of plasmid pKP-*aldH*

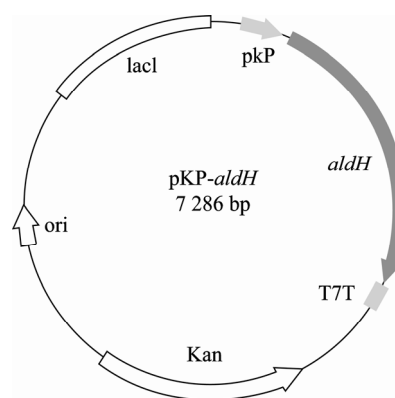


图 4 重组载体 pKP-*aldH* 构建示意图

Fig. 4 Construction of pKP-*aldH*

2.2 重组菌 *K. pneumoniae* A⁺中乙醛脱氢酶的表达及酶活测定

重组菌 *K. pneumoniae* A⁺和对照菌 *K. pneumoniae* 摇瓶培养总蛋白的 SDS-PAGE 分析如图 5 所示。可以看出, *K. pneumoniae* A⁺表达了来自于酿酒酵母的乙醛脱氢酶基因, 分子量大小约为 66 kD, 与预期的一致。

收集摇瓶中培养 12 h 的细胞, 超声波破碎离心制得细胞粗提液, 进行酶活分析, 结果见表 1。由表中可以看出, 重组菌的乙醛脱氢酶酶活原始菌比原始菌提高了 167%, 幅度不是很大, 可能是由于克雷伯肺炎杆菌本身含有的醛脱氢酶, 同样具有催化乙醛生成乙酸的活性。

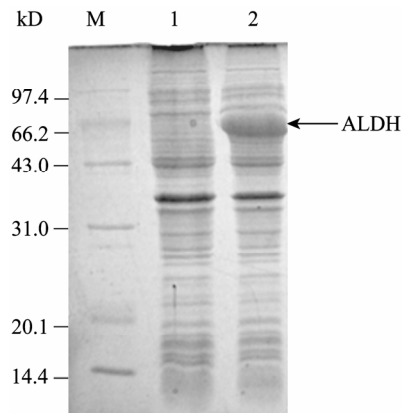


图 5 重组菌全菌总蛋白的 SDS-PAGE 分析
Fig. 5 SDS-PAGE analysis of crude protein fractions
Note: 1: *K. pneumoniae*; 2: *K. pneumoniae* A⁺.

表 1 摇瓶培养中乙醛脱氢酶活性比较	
Table 1 Enzyme activities of parent and recombinant strains in flask cultures	
菌株 Strains	乙醛脱氢酶(ALDH)酶活 Enzyme activity (U/mL)
<i>K. pneumoniae</i>	5.35
<i>K. pneumoniae</i> A ⁺	14.28

2.3 重组 *K. pneumoniae* A⁺的诱变及驯化结果

2.3.1 紫外诱变结果: 通过预实验确定紫外诱变的稀释率为 10⁻⁵ 倍, 紫外照射 10 s 的致死率在 90% 左右, 平板上长势较好的菌落数分别为 65、63、53。

2.3.2 菌种驯化及筛选: 将诱变后生长良好的总计 181 个单菌落进行驯化筛选, 在不同 3-HP 浓度的驯化培养基中能够生长的菌落数见图 6。随着驯化

培养基中 3-HP 浓度的提高, 能够生长的菌落数越来越少, 最终有 9 株菌能够耐受 35 g/L 的 3-HP, 只有 1 株菌可以耐受 40 g/L 的 3-HP。

将筛选得到的在含较高浓度 3-HP 的驯化培养基上生长的单菌落 10 株以及出发菌株 *K. pneumoniae* A⁺进行摇瓶培养, 测定 3-HP 浓度, 结果见图 7。选择摇瓶实验中 3-HP 产量最高的 3 号菌株标记为 *K. pneumoniae* A⁺5-3, 进行下一步发酵实验。

2.4 发酵结果分析

将摇瓶实验中 3-HP 产量最高的重组菌 *K. pneumoniae* A⁺5-3, 在 5L 发酵罐中进行了微氧批式流加发酵实验, 以原始菌 *K. pneumoniae* 为对照, 发酵过程如图 8 所示。

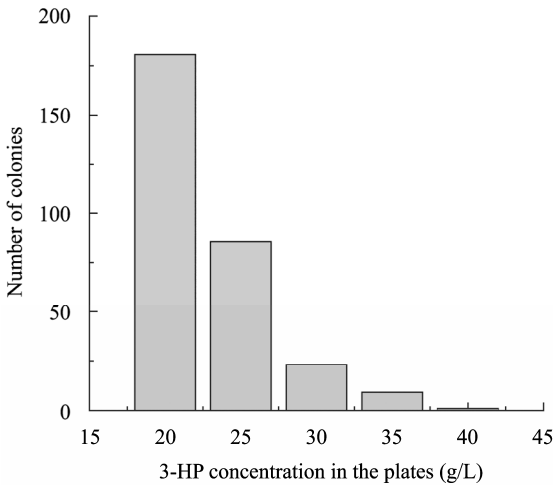


图 6 驯化筛选培养基上生长的菌落数
Fig. 6 Numbers of colonies in the tolerance plates

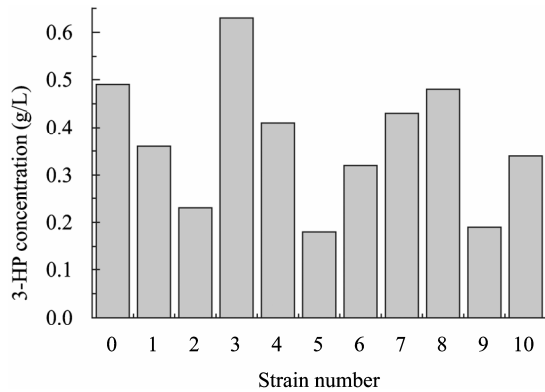


图 7 不同菌株摇瓶培养的 3-HP 浓度
Fig. 7 Concentration of 3-HP after flask culture

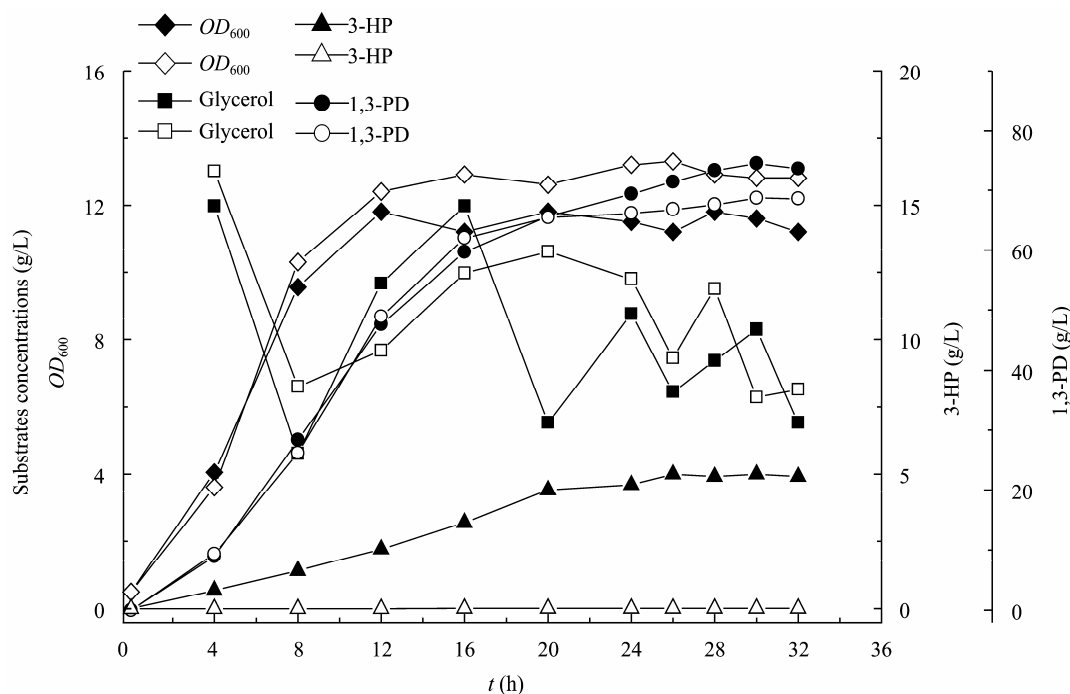


图 8 重组菌 *K. pneumoniae* A⁺5-3 和原始菌 *K. pneumoniae* 发酵过程曲线重组菌(◆;■;▲;●); 原始菌(◇;□;△;○)

Fig. 8 Comparison of 3-HP fed-batch fermentation between *K. pneumoniae* A⁺5-3 and *K. pneumoniae*

Note: *K. pneumoniae* (◆, ■, ▲, ●); *K. pneumoniae* A⁺5-3 (◇, □, △, ○).

由图 8 可知, 原始菌 *K. pneumoniae* 在对数生长期时, 1,3-PD 快速合成, 进入稳定期后基本停滞, 最终浓度为 68.6 g/L, 整个过程不产 3-HP。而重组菌 *K. pneumoniae* A⁺5-3 的发酵过程分为两阶段, 第一阶段, 菌体快速生长, 1,3-PD 合成速度也较快, 而 3-HP 合成较慢; 第二阶段, 生长变缓, 1,3-PD 合成速度降低, 而 3-HP 合成加快, 最终 3-HP 浓度达到 5.0 g/L, 1,3-丙二醇产量为 74.5 g/L。重组菌的生物量略低于原始菌, 由于中间代谢产物 3-HPA 同时转化为 3-HP 和 1,3-PD, 有可能在胞内形成了 NADH/NAD⁺微循环再生, 提高产物的生成效率。因此, 在产生 3-HP 的同时, 1,3-PD 的浓度也比原始菌有所提高。经过诱变驯化后的菌株 *K. pneumoniae* A⁺5-3 的 3-HP 浓度相对文献报道的较高, 但是和预想的结果差距还比较大, 这表明就目前的发酵水平来说, 产量并不依赖于菌株对产物 3-HP 的耐受力, 而可能是 3-HP 代谢途径活力不够, 或者代谢受多方面因素的影响和控制。

3 讨论

肺炎克雷伯杆菌是一种革兰氏阴性菌, 与大肠杆菌相似, 较容易进行培养和生物转化, 能够通过构建重组菌稳定表达外源蛋白。而且, 该菌与肺炎克雷伯球菌不同, 不具有致病性。目前, 已有研究者将该菌进行重组, 作为 1,3-PD 生产菌并应用于工业化生产。

在肺炎克雷伯杆菌的代谢途径中, 甘油经甘油脱水酶催化代谢为 3-HPA, 3-HPA 是一种中间代谢产物, 在丙二醇氧化还原酶的作用下消耗辅酶 NADH 产生 1,3-PD, 过多的 3-HPA 积累会抑制菌体的生长和甘油的代谢, 主要原因是当 3-羟基丙醛浓度达到一定值时, NAD⁺浓度增大, 抑制了丙二醇氧化还原酶的活性, 进一步引起 3-HPA 的积累, 而 3-HPA 又反馈抑制了甘油脱水酶的活性, 使甘油发酵生产 1,3-PD 的代谢调控失衡。将 3-HPA 转化成为其他有价值的产品, 成为研究者们关注的方向。

甘油经甘油脱水酶 GDHt 和乙醛脱氢酶 ALDH 催化生成 3-HP, 自然界现有的微生物体内没有这条代谢途径, 3-HPA 是该途径的唯一中间产物。本研究提供了一种微生物发酵联产 3-HP 和 1,3-PD 的新途径, 利用重组克雷伯肺炎杆菌, 表达来源于酿酒酵母的乙醛脱氢酶 ALDH, 该酶能催化 3-HPA 生成 3-HP, 从而将 3-HP 与 1,3-PD 的代谢途径相偶联, 既减少了中间产物 3-HPA 的积累, 又会在胞内形成 NADH/NAD⁺微循环, 同时生产 3-HP 和 1,3-PD。

构建的重组菌有效地表达了乙醛脱氢酶, 经产物耐受性诱变驯化及筛选后, 3-HP 产量达到 5.0 g/L, 高于文献报道的水平, 但由于微生物代谢过程非常复杂, 仅仅表达关键代谢途径的酶基因, 并不能有效地实现 3-HP 的生产, 主要产物还是 1,3-PD。虽然产物 3-HP 浓度不是很高, 本实验还是开辟了一条新的微生物生产 3-HP 途径, 这对将来研究奠定了一定的基础, 接下来的工作需要探索新的思路和方法, 例如敲除副产物途径、减少竞争抑制等, 以期实现 3-HP 的高产。

参 考 文 献

- [1] Werpy T, Petersen G. Top value added chemicals from biomass[C]. Energy Efficiency and Renewable Energy, Washington DC, 2004.
- [2] Warnecke TE, Lynch MD, Karimpour-Fard A, et al. A genomics approach to improve the analysis and design of strain selections[J]. Metabolic Eng, 2008, 10(3/4): 154–165.
- [3] Saxena RK, Anand P, Saran S, et al. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities[J]. Biotechnol Adv, 2009, 27(6): 895–913.
- [4] Zheng ZM, Guo NN, Hao J, et al. Scale-up of micro-aerobic 1,3-propanediol production with *Klebsiella pneumonia* CGMCC 1.6366[J]. Process Biochem, 2009, 44(8): 944–948.
- [5] Liao HH, Gokarn RR, Gort SJ, et al. Nucleic acid and polypeptide sequences for alanine 2,3-aminomutase and their use for production of beta-alanine, pantothenate, 3-hydroxypropionic acid, and 1,3-propanediol[P]: WO, 2003062173A2.
- [6] Rathnasingh C, Catherine JC, Raj SM, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid through malonyl CoA pathway from glucose by recombinant *Escherichia coli* BL21[J]. J Biotechnol, 2010, 150(S1): 22.
- [7] Raj SM, Rathnasingh C, Jo JE, et al. Production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol by a novel recombinant *Escherichia coli* BL21 strain[J]. Process Biochem, 2008, 43(12): 1440–1446.
- [8] Luo LH, Seo JW, Kim DH, et al. A novel microbial system for efficient production of 3-hydroxypropionic acid from glycerol using *Klebsiella pneumoniae*[J]. J Biotechnol, 2010, 150(S1): 78.
- [9] 张晓梅, 诸葛斌, 许正宏, 等. 产 3-羟基丙酸重组菌的构建及其转化甘油的研究[J]. 生物技术通报, 2009(8): 104–108.
- [10] Celińska E. Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering[J]. Biotechnol Adv, 2010, 28(4): 519–530.
- [11] 萨姆布鲁克, 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [12] Saigal D, Cunningham SJ, Farrés J, et al. Molecular cloning of the mitochondrial aldehyde dehydrogenase gene of *Saccharomyces cerevisiae* by genetic complementation[J]. J Bacteriol, 1991, 173(10): 3199–3208.