

生物法转化甘油生产 1,3-二羟基丙酮的研究进展

杨晓娜 卢文玉*

(天津大学化工学院 系统生物工程教育部重点实验室
天津化学化工协同创新中心合成生物学平台 天津 300072)

摘要: 1,3-二羟基丙酮(DHA)是一种重要的化工医药中间体,广泛应用于化妆品、医药和食品等领域,开展提高 DHA 生产效能的研究对于工业生产具有指导意义。甘油生物转化生产 DHA 是目前主要的工业生产方法,但存在菌株转化效能有待提高、底物和产物抑制、溶氧限制等问题。本文概述了 DHA 的生物合成途径、菌株改良策略、生产工艺及分离提取等方面的研究进展,指出利用代谢工程技术改造菌种、优化生产工艺、简化分离提纯方法是今后的研究方向。

关键词: 甘油, 1,3-二羟基丙酮, 生物转化

Research progress on the production of 1,3-Dihydroxyacetone by biotransformation

YANG Xiao-Na LU Wen-Yu*

(School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Key Laboratory of Systems Bioengineering, Ministry of Education; SynBio Research Platform, Collaborative Innovation Center of Chemical Science and Engineering, Tianjin 300072, China)

Abstract: 1,3-Dihydroxyacetone (DHA) is a kind of important chemical raw materials and pharmaceutical intermediates. It is widely used in cosmetics, pharmaceutical, food and other fields. Therefore, it is important to carry out studies on the production of DHA. Biotransformation of glycerol to DHA is the main method for industrial production of DHA. However, there exists substrate and product inhibition, and dissolved oxygen limitation during the production process. In this paper, the progress of DHA biosynthetic pathway, strain improvement, common production process, separation and extraction methods are summarized. In order to improve the strain productivity, it is important to optimize the metabolic pathway and production process, simplify the separation and purification routes in the future.

Keywords: Glycerol, 1,3-Dihydroxyacetone, Biotransformation

Foundation item: Application Base and Advanced Technology Research Project of Tianjin (No. 09JCYBJC09400)

***Corresponding author:** Tel: 86-22-27892132; Fax: 86-22-27400973; E-mail: wenyulu@tju.edu.cn

Received: July 08, 2015; **Accepted:** December 28, 2015; **Published online** (www.cnki.net): January 08, 2016

基金项目: 天津市应用基础及前沿技术研究计划面上项目(No. 09JCYBJC09400)

***通讯作者:** Tel: 86-22-27892132; Fax: 86-22-27400973; E-mail: wenyulu@tju.edu.cn

收稿日期: 2015-07-08; **接受日期:** 2015-12-28; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-01-08

1,3-二羟基丙酮(1,3-Dihydroxyacetone, DHA)是最简单的酮糖,分子中具有3个官能团,化学性质活泼,可参与多种化学反应,是一种重要的化工医药中间体,广泛应用于化工、医药、食品等领域^[1]。DHA的生产主要包括化学合成法和生物转化法。化学合成法存在原料成本高、反应条件苛刻、设备要求高、产品收率低以及污染环境等问题,其应用受到一定限制。生物转化法的优势在于反应条件温和、反应专一性强、环境污染小、底物利用率高。

本文对DHA的生物转化法研究进展进行综述,涉及如下几方面: DHA的生物合成途径、生产菌种改造、生产工艺优化、分离提取过程优化等。

1 1,3-二羟基丙酮的生物合成途径

涉及 DHA 生物合成的生化反应主要有 3 种:

(1) 第一种生化反应以甘油为底物,在甘油脱氢酶的作用下经甘油脱氢形成DHA。

很多微生物如氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)^[2]、木醋杆菌(*Acetobacter xylinum*)^[3]、大肠杆菌(*Escherichia coli*)^[4]、产气克雷伯氏菌(*Klebsiella aerogenes*)^[5]、弗托氏葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter frateurii*)^[6]等均具有这种功能。

微生物中通常含有3种类型的甘油脱氢酶: 1) 依赖NAD⁺的GDH (EC1.1.1.6), 主要存在于细胞质中, 先将甘油转化为DHA, DHA进一步磷酸化, 进入糖酵解和三羧酸循环途径。2) 依赖NADP⁺的GDH (EC1.1.1.72和EC1.1.1.156), 多存在于霉菌和动物组织中, 可将甘油氧化为甘油醛或DHA。3) 既不依赖 NADP⁺、也不依赖 NAD⁺ 的 GDH (EC1.1.99.22), 该酶位于葡萄糖酸杆菌属的细胞膜上, 如弱氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter suboxydans*)、氧化葡萄糖酸杆菌(*Gluconobacter oxydans*)等^[7-8]。

在上述菌种中, GDH (EC1.1.1.6) 和 GDH (EC1.1.99.22)经常会同时存在。甘油氧化生成 DHA 具有 2 条途径^[9-10]: 1) 甘油在膜结合甘油脱氢酶的

作用下在周质空间生成 DHA, 形成的 DHA 直接释放到培养基中, 该反应无需 ATP 和辅因子 NAD⁺, 当胞内糖酵解途径及三羧酸循环缺乏时, 该途径可为细胞生长及其他代谢过程提供能量。2) 甘油进入细胞内, 在胞内甘油脱氢酶的催化下生成 DHA, 然后转变为磷酸二羟丙酮(DHAP); 也可在磷酸激酶催化下形成 3-磷酸甘油, 再经 3-磷酸甘油脱氢酶催化生成 DHAP, DHAP 进入磷酸戊糖循环途径, 该过程需要 ATP 及辅因子 NAD⁺。此外, 甘油在细胞膜上也可被膜结合乙醇脱氢酶催化形成甘油酸^[11]。甘油在氧化葡萄糖酸杆菌中的代谢途径如图 1 所示。

(2) 第二种生化反应是以甲醇为底物, 在二羟基丙酮合成酶的作用下形成。具有该功能的微生物包括两类: 一类为仅包含DHA合成酶的甲醇营养型酵母, 如多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)^[12]等; 另一类是既能产生甘油脱氢酶又能产生DHA合成酶的甲醇营养型酵母, 如膜璞毕赤酵母(*Pichia membranifaciens*)^[13]。在甲醇营养型酵母中主要通过木糖单磷酸途径生成DHA, 即甲醇首先氧化成甲醛, 然后与5-磷酸木酮糖在DHA合成酶的作用下生成DHA和3-磷酸甘油醛, 如图2所示。

(3) 第三种生化反应以果糖为底物转化得到, 该类反应存在于运动发酵单胞菌的 ED 途径, 在代谢果糖生成乙醇的过程中会伴随副产物 DHA 的产生, 其反应实质是 3-P-甘油醛→磷酸二羟基丙酮→DHA^[14]。

2 生物转化 DHA 的菌种改造

氧化葡萄糖酸杆菌是一种革兰氏阴性专性好氧菌, 属于醋酸杆菌家族, 因该菌生产性能相对稳定, 可通过膜结合甘油脱氢酶一步法转化甘油生成 DHA, 且DHA能快速释放到发酵液中, 因此成为目前生产DHA的首选工业菌株。当前, 生物法转化甘油生产DHA存在以下几方面的问题: 底物抑制、产物抑制和溶氧限制。研究发现, 高浓度的底物甘油会影响菌株生长和甘油转化率^[15]。DHA的存在则会严重影响细胞对甘油的摄入速度^[16], Stasiak等研究

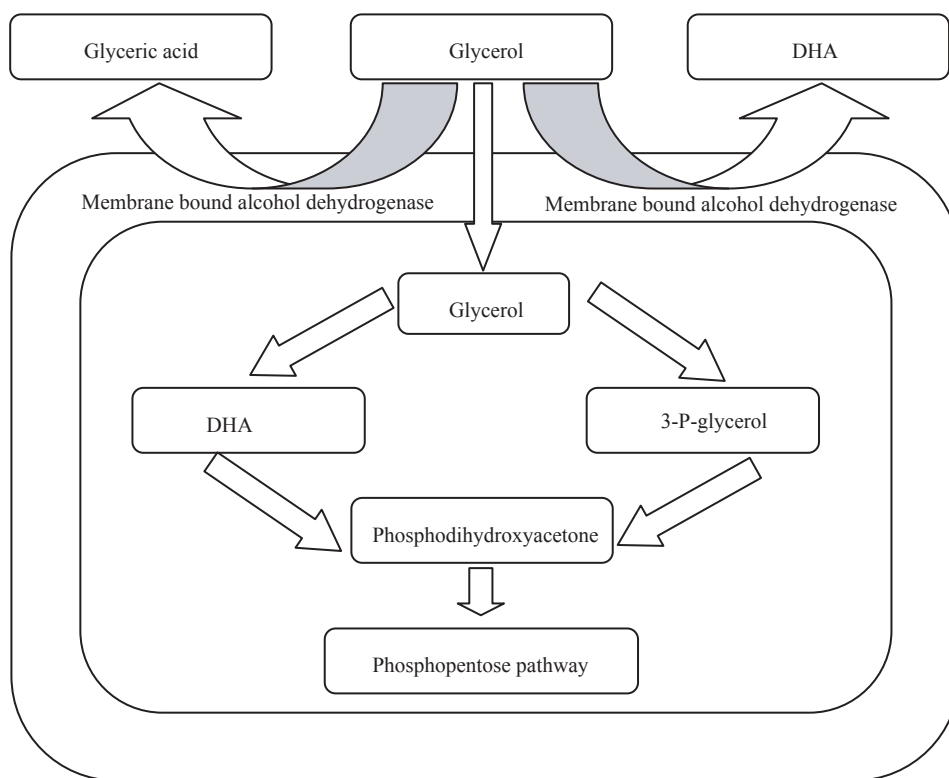


图1 甘油在氧化葡萄糖酸杆菌中的代谢途径

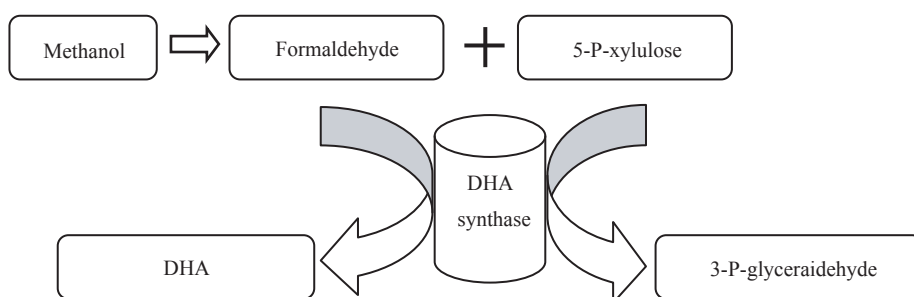
Figure 1 Pathways of glycerol in *Gluconobacter oxydans*

图2 甲醇营养型酵母中的代谢途径

Figure 2 Pathways of methylotrophic yeasts

发现 DHA 在很低的浓度下就会抑制菌体有丝分裂活动(20–30 g/L), 当 DHA 浓度达到 70 g/L 时, 细胞分裂基本停止^[17]。氧化葡萄糖酸杆菌是一种专性好氧微生物, 通过有氧呼吸获取能量。因此, 生物转化过程中, 溶氧影响着菌体的最终生物量和代谢产物的终浓度。为了有效解决上述问题, 菌种改造是首选策略。

2.1 传统菌种选育

传统菌种改良包括诱变筛选、菌株驯化等。Ma 等采用激光诱变获得突变株 GM51, 甘油脱氢酶的活性提高了 75.17%, 通过培养条件优化, 甘油投料浓度为 100 g/L 时, 获得 91.5% 的 DHA 产率^[18]。Hu 等通过紫外诱变获得具有较高 DHA 产率且耐受较高浓度 DHA 的菌株 *Gluconobacter oxydans*

ZJB11001, 通过溶氧控制策略优化发酵条件, 在 15 L 发酵罐上经过 72 h 分批补料发酵后, 获得 209.6 g/L 的 DHA^[19]。Hu 等采用离子束诱变获得突变株 *Gluconobacter oxydans* ZJB09113, 最高 DHA 浓度为 40.0 g/L, 比未优化前提高了 196.3%^[20]。

2.2 基因工程技术改造菌种

2005 年 *Gluconobacter oxydans* ATCC 621H 的基因组测序成功^[21], 利用代谢工程技术改造菌株生产 DHA 的研究逐步增多。关于此方面的研究主要集中在以下 2 个方面: (1) 通过表达或抑制相关基因, 改善现有生产菌的代谢途径; (2) 将关键酶基因在模式菌中表达, 构建新的代谢途径。

2.2.1 改善现有菌株代谢途径: 研究者们对现有生产菌的代谢途径进行了研究, Gätgens 等分别利用启动子 *gdh* 和 *tufB* 过量表达 *Gluconobacter oxydans* 膜系脱氢酶 *sldAB*, 提高了菌体和 DHA 的浓度。当以 550 mmol/L 甘油作为底物时, 过量表达 *sldAB* 基因的菌株中 DHA 的积累达到 350 mmol/L, 对照菌株为 200–280 mmol/L^[22]。Habe 等则对代谢旁路进行了有效抑制, 根据甘油在 *Gluconobacter oxydans* 细胞膜上可同时被膜结合甘油脱氢酶和膜结合乙醇脱氢酶催化生成 DHA 和甘油酸的原理, 通过敲除膜结合乙醇脱氢酶得到的 $\Delta adhA$ 突变株可以在 3 d 内转化 220 g/L 甘油生成 125 g/L DHA, 其静息细胞经过 3 d 可转化 230 g/L 甘油生成 139.7 g/L DHA, 实验同时还证明了甘油酸的升高既抑制 DHA 的生产, 也抑制细胞生长^[11]。李明华在其研究基础上, 在乙醇脱氢酶缺失突变株中同时过量表达膜结合甘油脱氢酶 *sldAB* 和透明颤菌血红蛋白, 采用静息细胞催化法, 在 34 h 内转化了 400 g/L 甘油, DHA 的产量累计达 385.32 g/L, 平均产率 96.33%^[23]。Matsutani 等绘制了菌株 *Gluconobacter thailandicus* NBRC325 的基因组序列草图^[24]。李华等则从腐烂的水果中筛选到一株能发酵生产 DHA 的弗托氏葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter frateurii* HD924, 该菌能发酵 80 g/L 的甘油产生 63.04 g/L 的 DHA^[25]。

本实验室 Wu 等首先对氧化葡萄糖酸杆菌的甘油的三维结构和结合位点进行了分子模拟^[26]; 而后 Wu 等重构和验证了 *Gluconobacter oxydans* 621H 的全基因组代谢网络 iXW433。重构模型包含 433 个基因, 859 个反应, 985 个代谢物, 模型预测的代谢状态与 *Gluconobacter oxydans* 的实验数据高度一致^[27]。在此基础上, 作者则分别过表达了甘油运输蛋白基因 *glpF* 和甘油脱氢酶基因 *GDH*, 结果发现 *glpF* 的过表达可有效促进菌种生长, 而 *GDH* 的过表达则能够提高甘油转化率, 促进 DHA 的生产。

2.2.2 关键酶基因在模式菌中的异源表达: 将 *Gluconobacter oxydans* 中的甘油脱氢酶基因在模式菌中异源表达也是提高 DHA 产率的有效途径。魏东芝等通过扩增氧化葡萄糖杆菌基因组中甘油脱氢酶的编码基因 *gdh* 和 NADH 脱氢酶编码基因 *ndh*, 构建的质粒 pET-*gdh* 和 pET-*ndh* 单独或共同转入大肠杆菌中。利用该基因工程菌代谢甘油生产 DHA, DHA 的浓度可达 10–85 g/L^[28]。Yang 等利用大肠杆菌共同表达来自于大肠杆菌的 *gldA* 基因和来自于粪肠球菌的 *nox* 基因, 获得大肠杆菌重组菌 D4, DHA 产率达到 0.13 g/(h·g 湿细胞)^[29]。

3 DHA 生物合成的生产工艺

甘油生物转化生产 DHA 的生产工艺包括发酵法、静息细胞催化法、固定化细胞法等。这些方法各有优缺点, 但都存在着底物抑制、产物抑制、溶氧限制等问题。

3.1 传统发酵法

发酵法生产 DHA 是在含有甘油的培养基中接入菌种, 发酵后从发酵液中提取 DHA。该方法优点是菌体生长与甘油转化相偶联、操作简单、易于控制, 缺点是底物甘油存在抑制。Bauer 等采用半连续双阶重复补料分批发酵法, 可以获得 220 g/L 的 DHA^[16]。Hu 等在鼓泡塔生物反应器中培养 *Gluconobacter oxydans* ZJB09112, 获得 (161.9±5.9) g/L DHA, 甘油转化率为 (88.7±3.2)%^[30]。Hu 等采用 pH 变速控制的恒氧分批补料策略, 在 15 L 发酵罐中经

72 h 发酵获得 (175.9 ± 6.7) g/L DHA, 转化率达到 (0.87 ± 0.04) g/g^[31]。Grey 等将玻璃试管作为 *Gluconobacter oxydans* 转化甘油生产 DHA 的反应器, 采用基于 HPLC 的快速分光法(每分钟可处理 3 个样品)测定 DHA 浓度, 发现试验结果具有可重复性, 反应速率在整个反应过程中保持不变, 同时氧扩散系数高^[32]。

3.2 静息细胞催化法

静息细胞催化法生产过程分为 2 个阶段: 细胞培养阶段和甘油催化阶段。该方法可一定程度消除甘油对产物的抑制作用, 缩短反应时间, 便于分离纯化, 缺点是操作过程较复杂。Hu 等利用 *Gluconobacter oxydans* ZJB09113 在内部环流生物反应器进行静息细胞催化, 72 h 获得 (156.3 ± 7.8) g/L 的 DHA, 甘油转化率达 $89.8\% \pm 2.4\%$ ^[33]。Zhou 等设计了利用依赖于 NAD^+ 甘油脱氢酶(GldA)催化 DHA 生成的重组大肠杆菌, 共表达了 NAD^+ 氧化酶(NOX)和 NAD^+ 转运子(NTT4), 分别用于辅因子再生和胞外 NAD^+ 的摄入。发现高细胞 NAD(H) 水平对全细胞生物催化还原有益^[34]。

3.3 固定化细胞法

固定化细胞法具有细胞可重复利用、易于产物分离、稳定性好、细胞活性可长期保持等优点, 然而也存在氧气不易扩散、对介质依赖性大等缺点。Kumar 等将甘油脱氢酶吸入磁性可分离介孔二氧化硅中, 经戊二醛处理后形成甘油脱氢酶纳米酶反应器, 24 d 后固定化酶活性仍能保持原来的 64%, 经过 7 个批次重复利用后酶活保持在 39%^[35]。Zheng 等通过制备二氧化硅包覆磁性 Fe_3O_4 纳米颗粒共价固定甘油脱氢酶, 发现固定化的甘油脱氢酶与游离甘油脱氢酶具有几乎相同的活性, 而对 DHA 的抑制敏感性则下降了 1.3 倍, 重复利用 10 个周期后酶活性仅下降了 9%^[36]。

4 DHA 提取分离

生物转化法生产 DHA, 由于 DHA 在水相溶解度大、热敏, 因此分离提取成本高、能耗大。目前报

道的 DHA 提取分离方法包括浓缩结晶法、溶剂萃取法、膜分离法、醇沉蒸发-结晶法等。

4.1 浓缩结晶法

浓缩结晶法的难点在于 DHA 在水中溶解度大、处理液粘度大^[37], 另外菌体、蛋白质等杂质也对 DHA 后续结晶造成困难。William^[38]先将发酵液通过阳、阴离子交换树脂柱, 然后真空蒸发, 再加入乙醇或正丁醇, 最后得到 DHA 结晶。Martínez 等^[39]发现甲醇是形成 DHA 结晶的最优选择。郑裕国等使用硅胶吸附层析柱, 采用乙酸乙酯-乙醇混合溶剂进行淋洗, 产品收率达 60%。浓缩结晶法的 DHA 回收率偏低, 另外由于水的存在导致蒸发能耗增大^[40]。

4.2 溶剂萃取法

溶剂萃取法根据溶质在不同溶剂中分配比率的不同来进行分离。张小飞采用强酸性树脂, 通过加入乙醛与 DHA 发生可逆缩醛反应, 与甲苯同步萃取耦合实现了 DHA 的有效分离^[41]。溶剂萃取法能耗低、生产能力强、分离效率高等, 但是萃取过程中产生的缩醛产物水解困难、收率低、催化剂易受发酵液中盐离子的影响。

4.3 膜分离法

膜分离法利用具有选择性的特殊半透膜分开溶液中的某些组分。DHA 是小分子物质, 可透过半透膜与发酵液中的大分子物质分离。冯屏等利用膜生物反应器连续发酵生产 DHA, 在生产过程中及时分离出产物和菌体, 获得了较高的催化稳定性和生产效率, 简化了分离纯化步骤^[42]。

4.4 醇沉-蒸发结晶法

醇沉工艺常被用来提取或去除核酸、蛋白、多糖等大分子, 向发酵液中加入乙醇可以沉降大分子, 同时可回收有机酸盐等小分子物质。本研究组采用醇沉-蒸发法同时去除发酵液中的蛋白质和盐离子, 再结合结晶操作获得 DHA 晶体^[43]。该方法同时去除盐离子和蛋白质, 减少了分离提取步骤, 降低了分离提取成本。

5 展望

目前, DHA 的工业化生产主要集中于美国、日本、德国等发达国家。我国起步较晚, 但近年来也在传统诱变及基因重组工程菌构建、静息细胞催化、发酵过程优化、反应器选择等方面取得了显著成效。本课题组也在菌种诱变、基因工程菌种改造、甘油脱氢酶分子模拟、发酵工艺优化、分离提取等方面分别进行了一些工作^[18,26-27,44]。纵观国内外研究现状, 尽管对利用甘油生物法生产 DHA 的研究取得了一定进展, 但相关技术还有待完善。针对工业化生产 DHA 研究的几点建议: (1) 开发优势菌种, 直接以粗甘油为底物高效生产 DHA; (2) 挖掘更多基因信息, 研究影响菌种生产 DHA 的调控机制(辅因子调控), 揭示生产菌种全局代谢过程, 利用代谢工程技术改造已有代谢途径, 构建新的代谢途径; (3) 根据菌种特性, 优化生产工艺, 降低底物和产物对菌种的抑制, 优化分离提纯工艺, 降低生产成本。

参考文献

- [1] Mishra R, Jain SR, Kumar A. RETRACTED: Microbial production of dihydroxyacetone[J]. *Biotechnology Advances*, 2008, 26(4): 293-303
- [2] Deppenmeier U, Hoffmeister M, Prust C. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 60(3): 233-242
- [3] Nabe K, Izuo N, Yamada S, et al. Conversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized whole cells of *Acetobacter xylinum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1979, 38(6): 1056-1060
- [4] Asnis RE, Brodie AF. A glycerol dehydrogenase from *Escherichia coli*[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1953, 203(1): 153-159
- [5] Streekstra H, de Mattos MJT, Neijssel OM, et al. Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture[J]. *Archives of Microbiology*, 1987, 147(3): 268-275
- [6] Liu YP, Sun Y, Tan C, et al. Efficient production of dihydroxyacetone from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Gluconobacter frateurii*[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 142: 384-389
- [7] Yamada H, Nagao A, Nishise H, et al. Formation of glycerol dehydrogenase by microorganisms[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1982, 46(9): 2325-2331
- [8] Claret C, Bories A, Soucaille P. Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*[J]. *Current Microbiology*, 1992, 25(3): 149-155
- [9] Claret C, Salmon JM, Romieu C, et al. Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1994, 41(3): 359-365
- [10] Deppenmeier U, Ehrenreich A. Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*[J]. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2009, 16(1/2): 69-80
- [11] Habe H, Fukuoka T, Morita T, et al. Disruption of the membrane-bound alcohol dehydrogenase-encoding gene improved glycerol use and dihydroxyacetone productivity in *Gluconobacter oxydans*[J]. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2010, 74(7): 1391-1395
- [12] O'Connor ML, Quayle JR. Pentose phosphate-dependent fixation of formaldehyde by methanol-grown *Hansenula polymorpha* and *Candida boidinii*[J]. *Journal of General Microbiology*, 1980, 120(1): 219-225
- [13] Liu ZQ, Hu ZC, Zheng YG, et al. Optimization of cultivation conditions for the production of 1,3-dihydroxyacetone by *Pichia membranifaciens* using response surface methodology[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2008, 38(3): 285-291
- [14] Viikari L, Berry DR. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1988, 7(3): 237-261
- [15] Blazejak S, Sobczak E. Bioconversion of glycerol into dihydroxyacetone DHA using *Acetobacter xylinum*[J]. *Acta Alimentaria Polonica*, 1988, 14(2): 207-216
- [16] Bauer R, Katsikis N, Varga S, et al. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process[J]. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 2005, 28(1): 37-43
- [17] Stasiak-Różańska L, Blazejak S, Gientka I. Effect of glycerol and dihydroxyacetone concentrations in the culture medium on the growth of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* ATCC621[J]. *European Food Research and Technology*, 2014, 239(3): 453-461
- [18] Ma LJ, Lu WY, Xia ZD, et al. Enhancement of dihydroxyacetone production by a mutant of *Gluconobacter oxydans*[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2010, 49(1): 61-67
- [19] Hu ZC, Zheng YG. Enhancement of 1,3-Dihydroxyacetone Production by a UV-induced Mutant of *Gluconobacter oxydans* with DO Control Strategy[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2011, 165(5/6): 1152-1160
- [20] Hu ZC, Liu ZQ, Xu JM, et al. Improvement of 1,3-dihydroxyacetone production from *Gluconobacter oxydans* by ion beam implantation[J]. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 2012, 42(1): 15-28
- [21] Prust C, Hoffmeister M, Liesegang H, et al. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23(2): 195-200
- [22] Gätgens C, Degner U, Bringer-Meyer S, et al. Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 76(3): 553-559
- [23] Li MH. Improvement of dihydroxyacetone production in *Gluconobacter oxydans* by gene recombination[D]. Shanghai: Doctoral Dissertation of East China University of Science and Technology, 2010 (in Chinese)
- [24] 李明华. 基因重组技术优化氧化葡萄糖酸杆菌催化制备二羟基丙酮的研究[D]. 上海: 华东理工大学博士学位论文, 2010
- [25] Matsutani M, Kawajiri E, Yakushi T, et al. Draft genome sequence of dihydroxyacetone-producing *Gluconobacter thailandicus* strain NBRC3255[J]. *Genome Announcements*, 2013, 1(2): e00118-e00113
- [26] Li H, Liu YP, Sun Y, et al. Isolation and identification of a strain producing high 1,3-dihydroxyacetone[J]. *Industrial Microbiology*, 2013, 43(4): 23-28 (in Chinese)
- [27] 李华, 刘宇鹏, 孙杨, 等. 一株高产二羟基丙酮菌株的筛选及鉴定[J]. *工业微生物*, 2013, 43(4): 23-28
- [28] Wu XS, Xia ZD, Yang XN, et al. Molecular simulation of pyrroloquinoline quinone-dependent glycerol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans*[J]. *Molecular Simulation*, 2012, 38(12): 1377-1385

- 1010-1014
- [27] Wu XS, Wang XY, Lu WY. Genome-scale reconstruction of a metabolic network for *Gluconobacter oxydans* 621H[J]. Biosystems, 2014, 117: 10-14
- [28] Wei DZ, Ma XY, Zheng Y, et al. Gene engineering bacteria for producing dihydroxy acetone, constructing method, and application: CN, 101092604A[P]. 2007-12-26 (in Chinese)
魏东芝, 马兴元, 郑宇, 等. 生产二羟基丙酮的基因工程菌, 其构建方法及其用途: 中国, 101092604A[P]. 2007-12-26
- [29] Yang W, Zhou YJ, Zhao ZK. Production of dihydroxyacetone from glycerol by engineered *Escherichia coli* cells co-expressing *gldA* and *nox* genes[J]. African Journal of Biotechnology, 2013, 12(27): 4387-4392
- [30] Hu ZC, Liu ZQ, Zheng YG, et al. Production of 1, 3-dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112[J]. Journal of Microbiology Biotechnology, 2010, 20(2): 340-345
- [31] Hu ZC, Zheng YG, Shen YC. Dissolved-oxygen-stat fed-batch fermentation of 1, 3-dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2010, 15(4): 651-656
- [32] Grey C, Vilorio-Cols M, Jungvid H, et al. Process development of oxygen-demanding reactions utilizing a simple design with parallel glass tube reactors—Evaluated using *Gluconobacter oxydans* DSM24525[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2012, 30(5/6): 441-445
- [33] Hu ZC, Zheng YG, Shen YC. Use of glycerol for producing 1, 3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(14): 7177-7182
- [34] Zhou YJ, Yang W, Wang L, et al. Engineering NAD⁺ availability for *Escherichia coli* whole-cell biocatalysis: a case study for dihydroxyacetone production[J]. Microbial Cell Factories, 2013, 12: 103
- [35] Kumar GS, Wee Y, Lee I, et al. Stabilized glycerol dehydrogenase for the conversion of glycerol to dihydroxyacetone[J]. Chemical Engineering Journal, 2015, 276: 283-288
- [36] Zheng MQ, Zhang SP. Immobilization of glycerol dehydrogenase on magnetic silica nanoparticles for conversion of glycerol to value-added 1,3-dihydroxyacetone[J]. Biocatalysis and Biotransformation, 2011, 29(6): 278-287
- [37] Zhu Y, Youssef D, Porte C, et al. Study of the solubility and the metastable zone of 1,3-dihydroxyacetone for the drowning-out process[J]. Journal of Crystal Growth, 2003, 257(3/4): 370-377
- [38] William C. Process for the production of dihydroxyacetone: US, 4076589[P]. 1978-02-28
- [39] Martínez-Gallegos JF, Burgos-Cara A, Caparrós-Salvador F, et al. Dihydroxyacetone crystallization: process, environmental, health and safety criteria application for solvent selection[J]. Chemical Engineering Science, 2015, 134: 36-43
- [40] Zheng YG, Hu ZC, Liu ZQ, et al. 1,3-dihydroxyacetone producing by microbiology: CN, 1821418A[P]. 2006-08-23 (in Chinese)
郑裕国, 胡忠策, 柳志强, 等. 微生物法生产二羟基丙酮: 中国, 1821418A[P]. 2006-08-23
- [41] Zhang XF. Studying on the bioconversion of glycerol into dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*[D]. Chengdu: Master's Thesis of Southwest Jiaotong University, 2006 (in Chinese)
张小飞. 氧化葡萄糖酸杆菌转化甘油生产二羟基丙酮的研究[D]. 成都: 西南交通大学硕士学位论文, 2006
- [42] Feng P, Zhou JC, Xu YP, et al. Production of dihydroxyacetone by continuous cultivation with membrane bioreactor[J]. Food and Fermentation Industries, 2003, 29(12): 40-43 (in Chinese)
冯屏, 周家春, 徐玉佩, 等. 膜生物反应器连续发酵法制取二羟基丙酮的研究[J]. 食品与发酵工业, 2003, 29(12): 40-43
- [43] Ma LJ, Lu WY, Xia ZD, et al. Extraction of 1,3-Dihydroxyacetone from the Fermentation Broth[J]. Journal of Chemical Engineering of Chinese Universities, 2010, 24(4): 620-625 (in Chinese)
马立娟, 卢文玉, 夏振东. 发酵液中1,3-二羟基丙酮的分离提取研究[J]. 高校化学工程学报, 2010, 24(4): 620-625
- [44] Ma LJ. Study of 1,3-dihydroxyacetone product by biotechnology[D]. Tianjin: Doctoral Dissertation of Tianjin University, 2009 (in Chinese)
马立娟. 生物法生产1,3-二羟基丙酮产品研究[D]. 天津: 天津大学博士学位论文, 2009