

提高肺炎克雷伯氏菌产 1,3-丙二醇的分子生物学方法研究进展

王世伟^{*1}, 王卿惠^{2,3}, 向文胜², 郝健^{*3}, 李婷婷¹, 赵晨晨¹, 周智博¹

1 齐齐哈尔大学生命与农林学院 抗性基因工程与寒地生物多样性保护重点实验室, 黑龙江 齐齐哈尔 161005

2 东北农业大学生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030

3 中国科学院上海高等研究院生物精炼实验室, 上海 201210

王世伟, 王卿惠, 向文胜, 郝健, 李婷婷, 赵晨晨, 周智博. 提高肺炎克雷伯氏菌产 1,3-丙二醇的分子生物学方法的研究进展[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2362-2377

Wang Shiwei, Wang Qinghui, Xiang Wensheng, Hao Jian, Li Tingting, Zhao Chenchen, Zhou Zhibo. Molecular biological methods for improving the production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*: a review[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2362-2377

摘 要: 1,3-丙二醇(1,3-propanediol, 1,3-PD)可用于工业合成多种化合物, 包括聚酯、聚醚和聚氨酯。发酵法生产 1,3-PD 具有巨大潜力。本文从代谢途径分析入手, 梳理了肺炎克雷伯氏菌厌氧代谢途径的相关酶及催化作用, 较详细地综述了其产 1,3-PD 关键酶的分子改造、基因工程菌株的构建和关键酶基因表达、副产物相关代谢酶基因敲除等方面的最新进展, 并展望了其今后的发展前景。

关键词: 肺炎克雷伯氏菌; 1,3-丙二醇; 分子生物学; 方法; 进展

基金项目: 2021 年度黑龙江省大学生创新创业训练计划项目(202110232101)

Supported by: College Student's Innovation and Entrepreneurship Training Program of Heilongjiang Province in 2021 (202110232101)

***Corresponding authors:** E-mail: WANG Shiwei: wsw888535@shou.com; HAO Jian: haoj@sari.ac.cn

Received: 2021-10-19; **Accepted:** 2021-12-19

Molecular biological methods for improving the production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*: a review

WANG Shiwei^{*1}, WANG Qinghui^{2,3}, XIANG Wensheng², HAO Jian^{*3}, LI Tingting¹, ZHAO Chenchen¹, ZHOU Zhibo¹

1 Key Laboratory of Resistance Gene Engineering and Preservation of Biodiversity in Cold Areas, College of Life Sciences and Agriculture and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar 161005, Heilongjiang, China

2 School of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

3 Lab of Biorefinery, Shanghai Advanced Research Institute, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201210, China

Abstract: 1,3-propanediol (1,3-PD) can be used for chemical synthesis of a variety of compounds, including polyesters, polyethers and polyurethanes. Fermentation has great potential to improve 1,3-PD production. This study summarized the enzymes in the anaerobic metabolic pathways of *Klebsiella pneumoniae* and the catalysis, and reviewed the molecular modification of key enzymes in 1,3-PD production of *K. pneumoniae*, construction of genetically engineered strains and the expression of key enzyme genes, and knockout of by-product-related metabolic enzyme genes. Moreover, we also described the development prospects of 1,3-PD.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; 1,3-propanediol; molecular biology; methods; progress

1,3-丙二醇(1,3-propanediol, 1,3-PD)常作为聚酯多元醇的生产原料, 也作为聚醚多元醇的起始剂和聚氨酯扩链剂^[1]。在有机化工领域, 1,3-PD 作为单体可合成聚对苯二甲酸丙二醇酯(polytrimethylene terephthalate, PPT)^[2]。目前 1,3-PD 的生产仍然主要靠化学合成法, 其合成条件苛刻、成本高、易造成环境污染。例如, 荷兰 Shell 公司以乙烯为原料, 在 280 °C 高温下, 以贵重的金、银作为催化剂, 先将底物氧化成环氧乙烷, 再通过加氢和 CO 才能转化为 3-羟基丙醛, 后者再经氢化作用, 最终完成 1,3-PD 的合成^[3]。相比之下, 微生物发酵法生产 1,3-PD 具有明显优势, 其优点是经济环保, 符合绿色化工的要求, 因此越来越受到人们的重视^[4]。尽管如此, 生物合成法也会受到一些环境胁迫的影响, 如甘油和 1,3-PD 的浓度、3-羟基丙醛积累及副产物的合成, 这些问题亟须解决。然而, 利用分子生物学技术, 采用基因工程、酶工程和代谢工程等方法, 可望解决上

述问题^[5]。利用代谢工程策略能很好地解决环境胁迫问题^[6]; 通过对相关酶蛋白进行改造, 过表达或共表达相关酶基因, 对氧化途径中相关副产物合成基因进行敲除, 可以大幅度提高 1,3-PD 的产量^[7], 是未来微生物发酵法生产 1,3-PD 的必然趋势。

1 产 1,3-丙二醇代谢途径和关键酶

1.1 肺炎克雷伯氏菌产 1,3-丙二醇代谢途径和相关酶

肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)甘油厌氧代谢是一个歧化反应, 包括还原和氧化 2 个途径。如图 1 所示, 在还原途径中, 菌体将甘油转化为 1,3-PD, 需要甘油脱水酶(glycerol dehydratase)和 1,3-丙二醇氧化还原酶(1,3-propanediol oxydoreductase)参与。作为关键酶, 1,3-丙二醇氧化还原酶将中间的代谢产物 3-羟基丙醛转化为最终产物 1,3-PD。在氧化反应途径中, 在甘油脱氢酶(glycerol dehydrogenase)

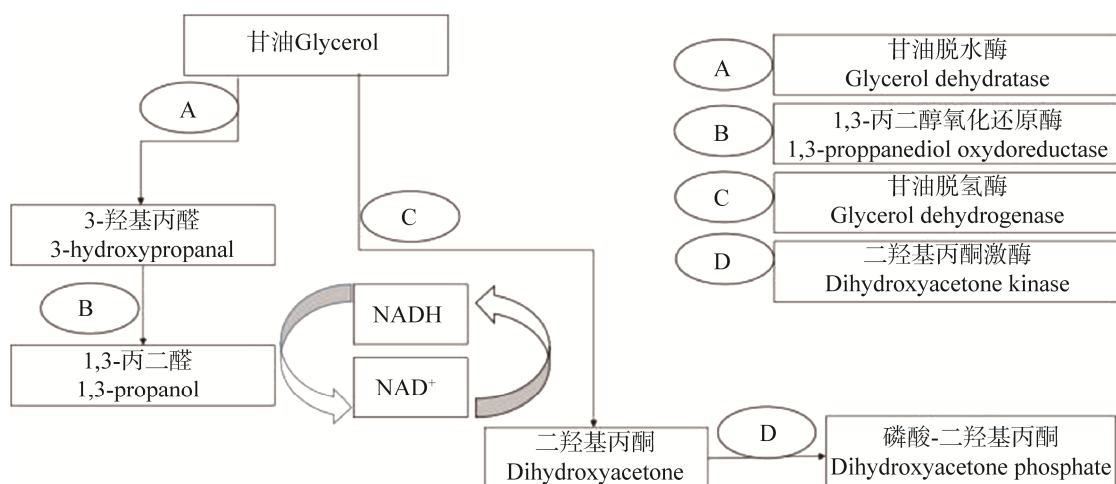


图 1 甘油转化成 1,3-丙二醇的主要途径

Figure 1 Main pathway for bioconversion glycerol to 1,3-propanediol.

作用下, 甘油被转化为二羟基丙酮(dihydroxyacetone), 同时辅酶 NAD^+ 被还原为 NADH 。产物二羟基丙酮在二羟基丙酮激酶(dihydroxyacetone kinnase)作用下, 被转化为磷酸-二羟基丙酮(dihydroxyacetone phosphate), 同时消耗 1 分子 ATP ^[8]。

如图 2 所示, 磷酸-二羟基丙酮之后进入糖酵解途径, 依次代谢被转化为 3-磷酸甘油醛、磷酸烯醇式丙酮酸和丙酮酸, 同时产生乙酸、乙醇和乳酸等副产物, 并伴随细胞的生长。

上述发酵过程中的 4 种酶, 即甘油脱水酶、甘油脱氢酶、二羟基丙酮激酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶, 分别由 *dhaB*、*dhaD*、*dhaK* 和 *dhaT* 基因编码, 并且都由 *dha* 系统调控^[9]; 而且只能在厌氧条件下被 *dha* 调节子诱导^[10]。因此, 了解代谢途径和酶功能特点可为相关酶或酶基因的改造奠定基础。

1.2 甘油脱水酶及其改造

肺炎克雷伯氏菌甘油脱水酶(Dha B)的 α 、 β 、 γ 亚基的 3 个编码基因由一个启动子控制, 启动子有再激活特性^[11]。Jiang 等^[12]克隆了编码甘油脱水酶的基因, 并在细胞内外对甘油脱

水酶基因进行了表达, 结果发现其酶活性有不同幅度的提高; 改变 β 亚基氨基酸能调节 Co-N 键长度, 影响 Co-C 键均裂速率, 进而改变甘油脱水酶的活性; 构建了不含编码 β 亚基基因的质粒 pET-32a-*gldAC* 的突变文库, 发现突变菌株的甘油脱水酶表达活性均有所提高; 通过半柔性对接模型模拟, 结果发现, 再激活因子与 ATP、CTP 或 GTP 的结合无显著差异, 这为寻找廉价配体取代 ATP 提供了依据。Qi 等^[13]克隆了编码甘油脱水酶的基因, 并完成了在大肠杆菌 XL10 Gold 中的表达; 通过 PoPMuSiC 程序预测了该酶的突变位点, 并基于同源性建模构建 3D 结构的位点突变, 经合理设计开发了 2 个基因突变体, 突变酶的 pH 稳定性比野生菌株相同酶更强。可见, 通过突变文库构建酶 β 亚基缺失突变株或经同源建模构建该酶 3D 结构位点的突变, 能显著提高甘油脱水酶的活性和稳定性, 这为其他关键酶的改造供了有益参考。

1.3 产 1,3-丙二醇关键酶的结构和功能研究

1.3.1 1,3-丙二醇氧化还原酶纯化及特性研究

纯化酶蛋白分子或克隆表达酶蛋白是其结

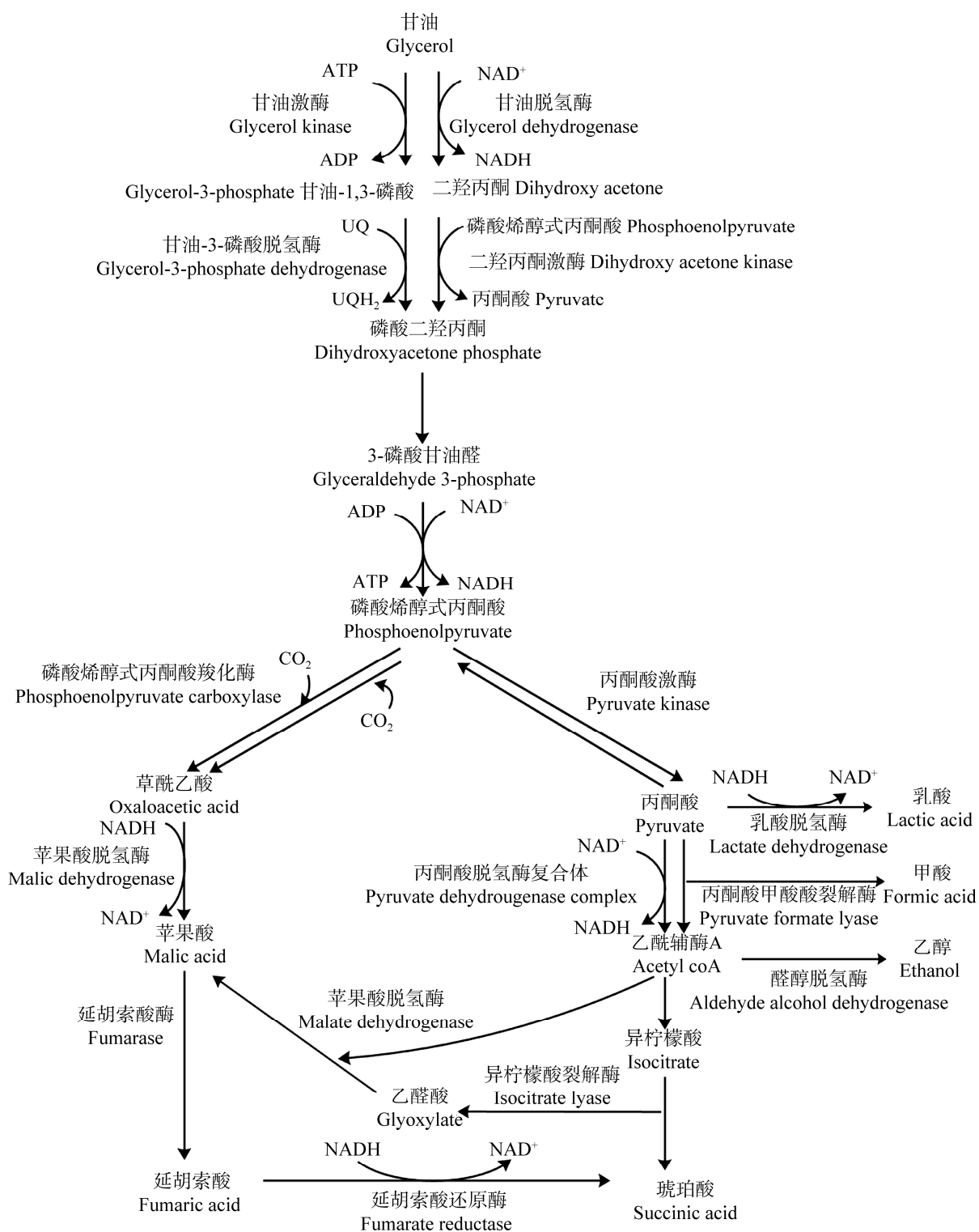


图2 甘油代谢途径和氧化过程

Figure 2 Main pathway for glycerol metabolism and oxidation process.

构和性质研究的基础。Johnson 等^[14]在厌氧发酵条件下以甘油为底物纯化了 1,3-丙二醇氧化还原酶(Dha T), 该酶是由 45 000+/-3 000 Da 多肽组成, 构成八聚体或六聚体, 在有氧代谢过程中其不具活性, 在厌氧条件下该酶才起作用。Wang 等^[15]以肺炎克雷伯氏菌 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得该酶的编码基因 *dhaT*, 并将其克隆到 pMD18-T 载体中, 测序后于大肠杆菌表达载体中亚克隆 *dhaT* 并表达, 获得分子量为 42 kDa 的酶蛋白, 该酶在 pH 9.5 和 30 °C 时活性最高。Lama 等^[16]克隆、表达、纯化了肺炎克雷伯氏菌 J2B 的 DhaT, 发现该酶对底物 3-羟基丙醛(3-hydroxypropionaldehyde, 3-HPA) 的活性比乙醛、丙醛和丁醛等类似底物均高; 在生理条件下, DhaT 主要催化正向反应, 但 Dha T 与自身底物 3-HPA 孵育时高度不稳定。可见, 关键酶存在稳定性差的问题亟需解决。

1.3.2 对 Dha T 同源建模或结晶的研究

同源建模(homology modeling)是从蛋白质的氨基酸序列出发, 研究目标蛋白 3D 结构的可信度较高的方法。Zheng 等^[17]通过同源建模预测了 1,3-丙二醇氧化还原酶的二级和三级结构, 推断该酶属于铁激活脱氢酶 NAD(P)依赖性的醇脱氢酶 III 族。可见, 同源模建的方法简便易行。Marçal 等^[18]进一步研究发现该酶单体结构与其他醇脱氢酶结构密切相关。酶整体排列呈十聚体结构, 组成酶催化形式。二聚体通过离子强烈相互作用相结合, 这是该酶在体内高度稳定的原因。Marçal 等^[19]进一步在大肠杆菌过表达重组制备物中获得 DhaT 单晶, 研究表明, 该酶晶体属于空间群 P21, 晶胞参数为 $a=91.9$ 、 $b=226.6$ 、 $c=232.6$ Å、 $[\beta]=92.9^\circ$; 晶体不对称单位中可能含有 2 个十聚体, 其 VM

值为 $3.07 \text{ Å}^3 \text{ Da}^{-1}$, 估计溶剂含量为 59%; 利用同步辐射收集了衍射数据, 晶体分辨率达到 2.7 Å。我们对红球菌腈水合酶进行了纯化、结晶和酶学性质研究, 并应用分子模拟实现了底物和酶的对接, 发现酶催化底物具有宽泛性^[20-21]。肺炎克雷伯氏菌代谢途径相关酶蛋白分子性质和功能研究都可以借鉴上述方法。

1.3.3 产 1,3-丙二醇代谢关键酶蛋白的改造

在甘油歧化氧化途径中, 改造酶蛋白分子可消除 1,3-PD 形成过程中的 NADH 提供限制。Ma 等^[22]在代谢通量分析基础上发现, “松弛”DhaT 对 NADH 和 NADPH 的专一性可增加 1,3-PD 的产量, 维持 NADH-NAD⁺ 循环; 因此, 通过蛋白质合理设计计算丙氨酸(Ala)扫描突变活性位点残基, 进而发现 Asp41 是辅酶保持特异性的关键残基, 与 Asp41Ala 相比, Asp41Gly 能减弱 Asp41 与 NADPH 腺嘌呤端核糖 2'-羟基酯化磷酸基之间的排斥作用, 通过定点突变实现了对 Dha T 的“松弛”, 减弱了酶对 NADH 和 NADPH 的专一性, 进而增加了 1,3-PD 产量。Li 等^[23]研究发现, 底物 3-羟基丙醛能与 DhaT 的半胱氨酸(Cys)残基上的巯基反应, 导致酶的失活; 丙氨酸是其他 DhaT 中半胱氨酸位置上的常见氨基酸, 使用定点突变法将肺炎克雷伯氏菌 J2B 的 DhaT 的 4 个半胱氨酸残基分别或组合替换成丙氨酸, 结果双突变和三突变体酶活性显著高于野生型, 而且双突变体动力学特性也多于野生型。可见, 酶的定点突变可以改变酶的性质, 甚至一个特定氨基酸的改变就能改变酶的性质, 进而提高酶的稳定性。经过定点突变对酶进行改造, 不仅能“松弛”酶对 NADH 和 NADPH 的专一性, 也可以提高酶对底物 3-HPA 的稳定性、还原当量的利用率和 1,3-PD 的产量。

2 肺炎克雷伯氏菌甘油代谢途径的关键酶基因、辅酶基因的表达研究

2.1 肺炎克雷伯氏菌关键酶基因的表达研究

2.1.1 在原核或真核宿主中的异源表达

肺炎克雷伯氏菌甘油脱水酶基因 *dhaB* 和 1,3-PD 氧化还原酶基因 *dhaT*, 分别由 2 个不同启动子控制以不同方向转录。Skraly 等^[24]在单个启动子控制下, 将 *dhaB* 和 *dhaT* 基因重组到操纵子中并在大肠杆菌中表达; 在甘油和葡萄糖补料分批共发酵中, 含有操纵子的大肠杆菌 1,3-PD 的产量得以提高, 实现了以甘油和葡萄糖共底物产 1,3-PD 的初步设想。同样地, 肺炎克雷伯氏菌 *dhaB*、*dhaT* 及编码甘油脱水酶的再激活因子 *gdrA* 也受到不同启动子控制, 并以不同方向转录。Wang 等使用 2 种不相容质粒 pET28a 和 pET22b, 通过质粒相互竞争, 构成大肠杆菌内选择性压力下, 使用这 2 种不相容的质粒共表达了 *dhaB* 和 *dhaT* 基因, 结果提高了重组大肠杆菌 1,3-PD 的产量; 在编码大肠杆菌乙醇脱氢酶基因 *yqhD* 替代 *dhaT* 的情况下, 重组大肠杆菌的最终 1,3-PD 浓度高达 13.2 g/L; 可见, 相关基因“串联”共表达可提高工程化大肠杆菌 1,3-PD 的产量; 将不同宿主来源的同源基因进行替换, 能进一步提高酶的活性表达^[25]。Ma 等^[26]克隆了肺炎克雷伯氏菌 *dha* 操纵子, 分别在大肠杆菌和酿酒酵母 W303-1A 中异源表达, 结果发现, 含有 *dha* 操纵子的重组大肠杆菌能以甘油为原料合成 1,3-PD, 但重组酵母 W303-1A-*dha* 却不能, 因此重新构建了含有 pZ-BT 质粒的重组酿酒酵母 W303-1A-BT, 重组酵母中均检测到了 DhaB 和 DhaT 活性, 并产生了 1,3-PD^[26]; 可见, 关键酶基因异源表达可

在原核或真核微生物中进行, 对启动子和酶基因进行修饰、替换能有效提高重组酶活性。

2.1.2 以菌体自身细胞为宿主的基因工程改造

在肺炎克雷伯氏菌自身宿主的还原途径中引入其他途径, 通过增加中间产物耐受性可以提高终产物产量。3-羟基丙醛积累常导致细胞死亡和发酵异常, 从而限制了 1,3-PD 产量的提高。Guo 等^[27]将聚羟基丁酸途径引入肺炎克雷伯氏菌中提高了 1,3-PD 产量, 具体方法是构建含聚- β -羟基丁酸合成酶基因(*phbC*)、3-酮硫裂解酶基因(*phbA*)、乙酰乙酰 CoA 还原酶基因(*phbB*) 这 3 个基因的 pDK 质粒, 并转化自身宿主肺炎克雷伯氏菌, 经 IPTG 诱导, 检测到聚- β -羟基丁酸(PHB)的生成; 然后再通过优化 IPTG 浓度, 使肺炎克雷伯氏菌工程菌株不仅能正常生产 1,3-PD, 同时也积累聚- β -羟基丁酸; 当初始葡萄糖为 70 g/L 时, 野生型菌株即可停止生长和发酵, 而工程菌发酵正常, 72 h 后 1,3-PD 浓度和产量均得到了提高; 在肺炎克雷伯氏菌中过表达 1,3-丙二醇氧化还原酶同功酶 *yqhD* 基因, 也可提高 1,3-PD 浓度。朱建国等^[28]以大肠杆菌基因组为模板, 经过 PCR 扩增获得 1,3-丙二醇氧化还原酶的同功酶 *yqhD* 基因, 并与四环素抗性基因 *TetR* 一起插入 pUC18 质粒, 构建重组 pUC18-*yqhD*-*TetR* 载体, 并转化 *Klebsiella pneumoniae* ME308, 结果发现, 重组菌中 1,3-丙二醇氧化还原酶活力远高于对照菌株。

一般来说, 将 3-HPA 转化为 1,3-PD 是提高甘油合成 1,3-PD 产率且避免 3-HPA 积累的重要策略, 这取决于 1,3-丙二醇氧化还原酶活性和甘油氧化途径中的还原当量。如表 1 所示, Zhuge 等^[29]利用双 *tac* 启动子构建了 3 个重组菌, 分别为 *K. pneumoniae*/pEtac-*yqhD*、

表 1 菌株的基因共表达提高 1,3-丙二醇产量

Table 1 Co-expressing genes for the enhancement of 1,3-propanediol synthesis in bacterial strains

Host strains	Co-expressed genes	Fermentation types	Glycerol types	Titer (g/L)	Yield (mol/mol)	Productivity (g/(L·h))	References
<i>Klebsiella pneumoniae</i> CICIM B0057	<i>dhaT</i> and <i>yqhD</i>	Batch	Refined	18.30	0.57	—	[29]
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KG1	<i>dhaD</i> and <i>dhaT</i>	Fed-batch	Refined	90.76	0.64	3.03	[30]
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KCTC 2242	<i>Fah</i> , <i>gdh</i> and <i>udh</i>	Fed-batch	Refined	86.00	0.59	2.69	[31]

Note: -: Not detected.

K. pneumoniae/pEtac-*dhaT* 和 *K. pneumoniae*/pEtac-*dhaT-tac-yqhD*, 分别或共表达了大肠杆菌氧化还原酶同工酶 *yqhD* 基因和肺炎克雷伯氏菌 *dhaT* 基因, 结果表明, 3 株重组菌发酵液中 3-HPA 产生峰值均小于亲本菌株; *dhaT* 的表达减少了副产物乙醇和乳酸等形成, 1,3-PD 的摩尔产率略微提高; *yqhD* 表达尽管未提高 1,3-PD 的摩尔产率, 但增加了发酵液中的乙醇浓度; 推测是 NADPH 参与将 3-HPA 转化为 1,3-PD, 使更多 NADH 用于乙醇生产; 2 个基因共表达的工程菌副产物生产减少, 并通过 NADH 和 NADPH 两个辅助因子催化 3-HPA 向 1,3-PD 转化, 提高了 1,3-PD 摩尔产率。

Zhao 等^[30]发现在微需氧条件下, 共表达 *dhaD* 和 *dhaT* 基因不影响 1,3-PD 浓度, 但能提高 1,3-PD 的摩尔产率, 降低副产物浓度, 其中, 乳酸、乙醇和琥珀酸的浓度均有所降低, 3-羟基丙醛浓度能显著降低。Wang 等^[31]为了提高肺炎克雷伯氏菌中的 1,3-PD 浓度和耐受性, 利用多模块工程方法提高 1,3-PD 浓度、降低副产物浓度、提高 1,3-PD 的耐受性; 通过调控共底物转运系统, 使突变体 1,3-PD 浓度、产率和产量进一步提高; 最后, 引入 NADH 再生途径, 获得了产率高达 2.69 g/L 的重组菌株。可见, 增加关键酶基因的表达和增加还原当量同样重要, 能促使代谢流量向 1,3-PD 方向流动, 使目标产物提高成为可能。

在肺炎克雷伯氏菌代谢甘油合成 1,3-PD 过

程中, 存在乙酸溢流、TCA 循环活性低等问题, 影响了 1,3-PD 的合成。谢梦梦等^[32]敲除了乙醛酸循环抑制因子 *iclR*, 过表达了 TCA 循环中琥珀酸脱氢酶基因(*sdhC*)和苹果酸脱氢酶基因(*mdh*), 缓解了乙酰辅酶 A 节点碳流溢出, 结果发现, 敲除 *iclR* 后乙酸积累量降低, 1,3-PD 产量提高; 在 *Klebsiella pneumoniae* Lric 中单独过表达 *sdhC* 或 *mdh* 基因, 1,3-PD 产量均得以提高; 共表达 *sdhC* 和 *mdh* 基因后, 菌株甘油利用能力增强, 与 *K. pneumoniae* Lric 相比, 1,3-PD 产量显著提高; 敲除 *iclR* 激活乙醛酸循环, 过表达 *sdhC* 和 *mdh* 能强化 TCA 循环, 弱化乙酸溢流, 增强甘油利用率, 促进合成 1,3-PD。由此可见, 乳酸合成代谢流是复杂的, 因此实验中要仔细分析代谢流去向和相关酶的代谢机制, 采用基因删除或过表达和共表达手段有目的地增加 1,3-PD 产量。

2.1.3 以肺炎克雷伯氏菌突变菌株为宿主的基因工程改造

与野生菌株相比, 突变菌株相关代谢途径关键酶基因已经有不同程度的改造。因此, 使用突变菌为宿主, 进一步构建工程菌株提高 1,3-PD 产量可能会更具有优势。Oh 等^[33]对肺炎克雷伯氏菌突变株 AK 进行遗传改造, 建立了以甘油为原料生产 1,3-PD 的高效方法, 利用噬菌体 *t5p* (DE20) 启动子和 *rho* 非依赖性转录终止信号, 设计了能表达 *dhaB* 基因和/或 *dhaT* 基因的重组菌株; 研究发现表达 *dhaT* 的 AK/pConT

重组菌, 副产物形成被消除, IPTG 诱导被免除, 1,3-PD 产率达到最大。Seo 等^[34]发现大肠杆菌多拷贝 *yqhD* 同源物基因引入, 恢复了肺炎克雷伯氏菌 *DhaT* 缺陷突变株生产 1,3-PD 的能力; 而且由于甘油氧化途径被破坏, 副产物不再生成, 重组菌依赖 NADP 的 1,3-PD 氧化还原酶活性显著增强; 可见, 突变菌株为宿主的再度工程化, 不仅能消除副产物的形成、提高 1,3-PD 的产量, 而且减少了后续 1,3-PD 纯化的难度。Zhu 等^[35]表达了肺炎克雷伯氏菌乳酸和乳酸/2,3-丁二醇缺陷株中编码醛脱氢酶的基因 *puuC*, 研究发现, 过表达该基因抑制了乳酸和乳酸/2,3-丁二醇缺陷菌株中 1,3-PD 生成, 增加了 3-羟基丙酸生成; 同时发现, 在乳酸缺陷菌株中, 只有适度表达 *puuC* 才能提高 1,3-PD 产量; 代谢通量分布比较还发现, 3-羟基丙酸形成可能在细胞代谢中起重要作用, 经适度表达 *puuC* 能提高乳酸缺陷菌株 1,3-PD 产量。可见, 突变株是研究代谢通路变化机理的理想宿主, 通过在突变株中过表达代谢酶的相关基因, 能探索代谢通路、研究催化机制。

2.2 运用辅因子(NADH/NAD⁺)工程策略对不同宿主细胞进行改造

适当地添加 NADH 有利于提高肺炎克雷伯氏菌 1,3-PD 的产量。Lu 等^[36]在肺炎克雷伯氏菌中分别或同时过表达大肠杆菌木糖异构酶基因(*xylA*)和木酮糖激酶基因(*xylB*), 发现与亲本相比, *xylA* 和 *xylB* 过表达及共表达显著增加了木糖消耗量, 提高了 1,3-PD 浓度, 甘油转化率、NADH 和 NADH/NAD⁺ 比值均有提高。为了提高肺炎克雷伯氏菌的还原力, 强化 1,3-PD 的合成, 付晓萌等^[37]在肺炎克雷伯氏菌中异源表达了 *xylA* 基因, 发现在添加不同浓度辅助底物木糖情况下, 重组菌甘油共发酵代谢产物和 NADH 呈规律性变化; 与对照相比, 重组菌内

NADH 和 1,3-PD 均大幅度提高。可见, 表达木糖代谢途径中关键酶基因, 如强化木糖异构酶基因将导致木糖经磷酸戊糖途径积累大量还原力, 因此促进了 1,3-PD 的生成, 同时表明以辅助底物和生理底物共发酵能解决还原力不足的问题, 增加 1,3-丙二醇的产量; ED 途径能将葡萄糖分解生成乙醇, 其中吡啶核苷酸转氢酶能直接催化 NADP(H)与 NAD(H)之间氢负离子可逆转移, 调控分解代谢和合成代谢过程中 NADH 与 NADPH 之间的动态平衡。Wang 等^[38]采用辅因子工程策略, 构建以 ED 通路和转氢化酶(吡啶核苷酸氧化还原酶)为基础的 NADH 再生体系, 应用于葡萄糖和甘油混合物制备二醇, 研究发现, NADH/NAD⁺ 比值的提高将直接影响中枢碳途径基因转录水平和细胞生长; 在工程化菌体 KP-APZDUT 内, NADH/NAD⁺ 比值比初始工程菌株 KP-T 提高了 92.8%, 二醇浓度、转化率和产率均有所提高。Lu 等^[39]发现, 敲除 *arcA* 基因能激活 TCA 循环中相关基因的转录水平, 使 NADH/NAD⁺ 比率增加, 从而使 PD 浓度和菌体产量都得到提高; 进一步敲除 *ldhA* 基因消除乳酸积累, 使 1,3-PD 浓度继续提高; 删除 *crr* 基因增强葡萄糖和甘油共同利用, 进而削弱葡萄糖效应, 促使 1,3-PD 产量和甘油转化率继续提高。*arcA* 和 *crr* 基因缺失对 TCA 循环活性及葡萄糖和甘油的共同利用产生了积极影响, 导致摇瓶中还原当量生成增强。这些发现为肺炎克雷伯氏菌经强化 TCA 循环减弱葡萄糖效应、增加 1,3-PD 生物合成的还原当量提供了新信息。

2.3 以葡萄糖为底物生产 1,3-丙二醇工程菌株的改造

截至目前尚无直接以葡萄糖为底物转化生成 1,3-PD 天然微生物的报道, 因此有必要构建能以葡萄糖为底物直接转化 1,3-PD 的工程菌。

Zheng 等^[40]将在各自 *lac* 启动子控制下编码 3-磷酸甘油脱氢酶的基因(*gpd1*)和 3-磷酸甘油酯酶的基因(*gpp2*)重组到质粒 pUC18K 中,并将其转化野生型肺炎克雷伯氏菌,使重组菌表达了这 2 种重组酶。尽管在摇瓶培养中 1,3-PD 浓度偏低,但为直接以葡萄糖作为底物转化 1,3-PD 提供了新思路。Liang 等^[41]构建了一株大肠杆菌工程菌株,通过表达酿酒酵母 *gpd1* 和 *gpp2* 基因及肺炎克雷伯氏菌操纵子 *dha*, 创立了一条以葡萄糖为底物生产 1,3-PD 的应激代谢途径,分批培养表明,在不添加任何诱导剂情况下,1,3-PD 积累量达到 12.1 g/L。Lama 等^[42]研究发现,肺炎克雷伯氏菌 J2B 能将甘油转化为 1,3-PD,并合成辅酶 B12;为了将糖酵解途径与甘油合成 1,3-PD 途径连接起来,他们过表达了酵母 *gpd1* 和 *gpp2* 基因,破坏了甘油氧化途径,通过甘油脱水酶基因和 1,3-PDO 氧化还原酶基因同源过表达提高了甘油对 1,3-PD 转化率。可见,为了构建以葡萄糖为底物直接生产 1,3-PD 的应激代谢途径,对 *gpd1* 和 *gpp2* 进行表达,同时对脱水酶基因和 1,3-PD 氧化还原酶基因过表达,可显著提高 1,3-PD 的转化率。

3 氧化途径中相关基因的敲除策略

在肺炎克雷伯氏菌中,氧化途径产生的副产物消耗碳源,严重抑制菌体生长。同时,乙酸、乙醇和丁酸等副产物积累也会形成反馈抑制作用,不利于还原途径目标产物的生成。Lee 等^[43]通过代谢工程策略,敲除肺炎克雷伯氏菌的副产物形成途径,然后在培养基中加入甘露醇并消除甘油同化途径,而且对转录调控 *dha* 操纵子进行修饰,从而提高了 1,3-PD 产量;经添加少量甘露醇的分批发酵结果表明,1 mol 甘油原料可获得 0.76 mol 1,3-PD。

3.1 肺炎克雷伯氏菌氧化途径的初始相关基因敲除策略

3.1.1 甘油脱氢酶和二羟丙酮激酶基因敲除对 1,3-PD 合成的影响

肺炎克雷伯氏菌生产 1,3-PD 过程中受氧化途径中形成副产物的影响。甘油脱氢酶和二羟丙酮激酶是甘油氧化途径初始步骤的重要酶。Seo 等^[44]为了消除副产物的合成,构建了 2 个甘油氧化代谢支链失活的突变株,一个从染色体 DNA 中敲除编码甘油脱氢酶(Dha D)和二羟丙酮激酶(Dha K)结构基因,另一个从染色体 DNA 中敲除了推断的表达转录激活因子基因,结果发现 2 个重组菌株的 1,3-PD 产量均高于野生型 Cu 菌株。Horng 等^[45]采用同源重组的方法使肺炎克雷伯氏菌 *dhaD* 和 *dhaK* 基因失活,从单交换或双交换同源重组突变体中筛选得到经 PCR 证实的 *dhaD/dhaK* 双突变菌株 TC100,实验发现菌株 TC100 的乳酸和 2,3-丁二醇合成停止,但积累了乙醇;经阿拉伯糖 P (BAD)启动子调控,1,3-PD 产率得到迅速提高。可见,副产物基因敲除并利用合适启动子调控可提高 1,3-PD 产量。

3.1.2 丙酮酸乙酰辅酶 A 开关或系统的酶基因敲除对 1,3-丙二醇合成的影响

丙酮酸脱氢酶复合物(AcoABCD)和丙酮酸甲酸裂解酶(PFL)是丙酮酸到乙酰辅酶 A 的开关。Zhou 等^[46]在肺炎克雷伯氏菌中分别删除这 2 条通路,研究“开关”在 1,3-PD 生产中的作用,结果发现在野生型菌株中 2 个酶均有活性,并在乙酰辅酶 A 形成中活性相同;而且丙酮酸甲酸裂解酶基因(*pflB*)突变菌株能产生高水平乳酸;乳酸脱氢酶基因(*ldh*)缺失能消除乳酸的合成;*pflB-ldhA* 突变菌株中甘油与 1,3-PD 转化率均比野生型菌株高,但 1,3-PD 产量却有所下降;相比之下, *AcoABCD* 突变菌株 1,3-丙二

醇产率有所提高, 但底物转化率却降低, 最后通过合理调节丙酮酸乙酰辅酶 A 开关提高了 1,3-PD 转化率或产率。可见, 提高 1,3-PD 产量需综合考虑代谢流量的分配和再分配及生物量变化问题。正常情况下, 缺乏丙酮酸甲酸裂解酶(PFL)会使肺炎克雷伯氏菌厌氧生长受限。Bao 等^[47]结合正常细胞内的氧化还原状态并考虑到乙醇脱氢酶基因(*adhE*)缺失并未抑制菌株生长的事实, 推测 PFL 缺陷型肺炎克雷伯氏菌生长缺陷很可能归因于从丙酮酸到乙酰辅酶 A 的碳通量缺乏; 同时考虑到丙酮酸相应的转录因子(*pdhR*)作为乙酰辅酶 A 生成的负转录调节基因能促进缺乏 PFL 肺炎克雷伯氏菌厌氧生长, 因此对 *pdhR* 进行了缺失改造, 通过改造 PFL 缺陷型肺炎克雷伯氏菌工程菌株表现出高效 1,3-PD 生产能力。可见, 删除丙酮酸转录因子 *pdhR* 降低乙酰辅酶 A 生成的负调节作用, 也能有效提高 1,3-PD 的产量。

3.2 肺炎克雷伯氏菌不同副产物相关基因的敲除策略

3.2.1 乙酸合成途径的基因敲除策略

副产物乙酸是影响 1,3-PD 产量提高的瓶颈。在肺炎克雷伯氏菌生产 1,3-PD 过程中, 如何减少有毒副产物乙酸的积累是一个重要课题。近年有报道可以通过敲除相关基因提高 1,3-PD 的产量。如表 2 所示, Lin 等^[48]删除了参与乙酸合成 2 条途径的 3 个关键酶基因, 即丙酮酸氧化酶基因(*poxB*)、磷酸转乙酰激酶基因(*pta*)和乙酸激酶基因(*ackA*), 结果发现, *poxB* 缺失

严重抑制细胞生长, 在需氧培养中 *poxB* 突变体出现异常高的乙酸盐积累, 在厌氧培养中无法产生内源性 CO₂ 供应; 另外, 进一步敲除 *pta* 和 *ackA*, *poxB* 突变株的需氧和厌氧生长缺陷都得到了纠正, 并阻断了乙酸合成的其他途径, *poxB-pta-ackA* 突变株乙酸分泌减少、1,3-PD 生产提高。

3.2.2 乳酸脱氢酶基因或乙醛脱氢酶基因敲除对 1,3-丙二醇合成的影响

如表 2 所示, Chen 等^[49]敲除乳酸脱氢酶基因(*ldhA*)和参与乙醇合成的乙醛脱氢酶基因(*aldH*), 获得 2 个单突变株和 1 个双突变株; 经分批补料发酵, 与原菌株相比, 突变菌株的产 1,3-PD 能力增强, 副产物浓度降低。Oh 等^[50]发现乳酸脱氢酶基因 Δ *ldhA* 突变体经重复补料分批培养, 最大 1,3-PD 产量和生产率分别达到 81.1 g/L 和 3.38 g/(L·h); 使用乙酰乳酸合酶基因缺失突变菌株 Δ (*ldhA als*)降低了主要的副产物 2,3-BD 水平, 1,3-PD 水平达到 50%。Xu 等^[51]通过敲除 D-乳酸脱氢酶的 *ldhA* 基因, 构建了肺炎克雷伯氏菌 HR526 缺乏 D-乳酸途径突变菌株, 活性最低突变型 1,3-PD 浓度、转化率和产率均有提高; 在指数后期切断 D-乳酸途径, NADH/NAD⁺增加一半以上, 最终导致产物浓度变化。

3.2.3 乳酸脱氢酶基因和其他脱氢酶基因双敲除对 1,3-丙二醇合成的影响

乳酸脱氢酶能以 NADH 为辅因子催化丙酮酸还原生成乳酸, 同时 NADH 被氧化为 NAD⁺。

表 2 菌株的基因共敲除提高 1,3-丙二醇产量

Table 2 Co-deleted genes for the enhancement of 1,3-propanediol synthesis in bacterial strains

Host strains	Co-deleted genes	Fermentation type	Glycerol type	Titer (g/L)	Yield (mol/mol)	Productivity (g/(L·h))	References
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KG5	<i>Pox, pta, ackA</i>	Fed-batch	Refined	76.80	0.66	2.56	[48]
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 2-1	<i>ldhA, aldH</i>	Fed-batch	Refined	87.50	0.70	3.60	[49]
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>ldhA, ldhA als</i>	Fed-batch	Crude	81.10	-	3.38	[50]

利用 λ Red 重组对肺炎克雷伯氏菌乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*)^[52] 或乙醛脱氢酶基因 (*aldH*)^[53] 进行改造, 能获得 *ldhA* 或 *aldH* 基因缺失菌株, 缺陷菌株乳酸或乙醇浓度显著降低, 1,3-PD 浓度、甘油转化率均有所提高。Park 等^[54] 在生物信息学基因模拟敲除基础上, 敲除了肺炎克雷伯氏菌乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*) 和苹果酸脱氢酶基因 (*mdh*), 最大限度地增加二醇产量, 减少副产物生成, 解决了细胞生长迟缓问题。Park 等^[55] 敲除了肺炎克雷伯氏菌乳酸脱氢酶基因 (*ldhA*) 和苹果酸脱氢酶基因 (*mdh*), 并优化搅拌速度, 以纯甘油为底物生产出 125 g/L 二醇, 5 L 生物反应器补料分批发酵, 产率高达 2.0 g/(L·h); 以工业生物柴油厂获得的粗甘油为底物进行了 5 000 L 生物反应器中试, 其中 1,3-PD 浓度达 70 g/L。Xin 等^[56] 协调了产酸克雷伯氏菌甘油代谢的氧化和还原分支, 选择乳酸生产途径与 1,3-PD 生产途径耦合, 然后依次阻断 2,3-丁二醇、乙醇、乙酸盐和琥珀酸盐等途径, 使 D-乳酸生物合成改善, 反过来促进了 1,3-PD 生产, 通过用凝结芽孢杆菌的 *ldhL* 代替 *ldhD*, 实现了 1,3-PD 和 L-乳酸高效共生产。可见, 通过基因工程方法敲除副产物相关基因, 无论是单基因还是双基因敲除均可能提高 1,3-PD 浓度。

3.2.4 抑制乙酰乳酸合成酶(ALS)提高 1,3-丙二醇的产量

肺炎克雷伯氏菌从甘油发酵产 1,3-PD 过程中 2,3-丁二醇是主要副产物之一。负责编码 2,3-丁二醇(BD)合成的 3 个酶基因分别是乙酰乳酸脱羧酶基因(*budA*)、乙酰乳酸合成酶基因(*budB*)和 2,3-丁二醇脱氢酶基因(*budC*)。丙酮酸盐形成 2,3-BD 的第一步由乙酰乳酸合成酶(ALS)催化, 这是一种与 1,3-PD 氧化还原酶竞争辅因子 NADH 的酶。Zhou 等^[57] 利用 Red 重组酶辅助基因替换技术, 获得肺炎克雷伯氏菌 ALS 突变体

(Δ ALS), 乙酰乳酸合成酶比活力显著低于野生型菌株; 通过补料分批发酵, 该突变株 1,3-PD 浓度、产率和转化率比亲本都有所提高。Lu 等^[58] 设计 3 个单独反义 RNAs 抑制 *BudA-C* 表达, 与亲本相比, *BudB* 和 *BudC* 活性降低的同时, *BudA* 的 mRNA 水平大幅度降低; *BudC* 活性降低对细胞生长和碳分布无影响, 但 *BudA* 和 *BudB* 活性的降低却使 BD 浓度降低了 35%, 有效提高了 1,3-PD 产率; *bud* 操纵子编码 2,3-丁二醇合成相关基因, 其中包括 *BudB*、*BudA*、*BudC* 及转录调节因子 *BudR*。陆信曜等^[59] 采用过量表达和反义 RNA 抑制实验发现, 过表达 *budR* 使得 *BudB* 和 *BudC* 酶活提高、1,3-PD 产量下降、2,3-丁二醇含量增加, 同时乙酸含量显著降低; 然而反义 RNA 抑制 *budR* 表达后, *BudB* 和 *BudC* 酶活分别降低, 重组菌生物量、2,3-丁二醇、乙酸、乳酸等均略有降低, 而 1,3-PD 产量却提高约 10%。肺炎克雷伯氏菌乙酰乳酸合成酶 ALS 缺陷突变株甘油代谢存在缺陷, 不能产生 1,3-PD 或 2,3-丁二醇^[60]。为了恢复 1,3-PD 生产, Lee 等^[60] 将运动发酵单胞菌丙酮酸脱羧酶基因(*pdc*)和醛脱氢酶基因(*aldB*)导入 ALS 缺陷突变体中, 以激活丙酮酸向乙醇的转化; *pdc* 和 *aldB* 异源表达有效地恢复了缺陷突变体的甘油向 2,3-BD 合成的代谢, 阻止丙酮酸的积累, 提高了 1,3-PD 产量。肺炎克雷伯氏菌利用甘油生产 1,3-PD 过程中, 伴随乳酸和 2,3-丁二醇等有害副产物形成。Lee 等^[61] 利用代谢工程方法删除了副产物形成途径基因, 并消除甘油同化途径, 将甘露醇共同添加到培养基的同时对 *dha* 操纵子转录调控进行了基因改造, 结果显著提高了 1,3-PD 的产量; 在分批发酵与少量甘露醇共投料发酵过程中, 1 mol 甘油能产 0.76 mol 的 1,3-PD。可见, 删除 ALS 相关基因, 或在 ALS 突变菌株中导入某些脱氢酶基因, 并对

适当的操纵子基因进行调控, 可以作为 1,3-PD 生产的重要途径。

4 新途径的研究和拓展

4.1 磷酸转移酶系统(PTS)相关酶基因敲除对 1,3-丙二醇合成的影响

肺炎克雷伯氏菌甘油代谢受到相关代谢途径影响, 需要对这些途径进行深入探索。Jeng 等^[62]发现磷酸烯醇丙酮酸盐(PEP)碳水化合物磷酸转移酶系统(PTS)中的 *EIIA* 同系物 KPN00353, 在微需氧条件下能够与甘油激酶(GlpK)结合, 对 1,3-PD 产生起负调节作用; 通过结构模拟发现其上的 H65 残基是关键, 这个组氨酸残基突变为天冬氨酸、谷氨酸盐、精氨酸和谷氨酰胺后, 其对肺炎克雷伯氏菌产生 1,3-PD 负调控消失。可见, 通过分子生物学技术对这种负调控加以抑制有望提高 1,3-PD 的产量。肺炎克雷伯氏菌 PTS 参与了葡萄糖转运及碳代谢调控。陆竞争等^[63]利用 Red 重组技术分别敲除了 PTS 系统中与葡萄糖特异性转运相关基因, 即编码葡萄糖特异性转运膜透性酶 EIIBCgl 的 *cptsG* 基因和编码胞浆可溶性葡萄糖特异性转运酶 EIIBAGlc 的 *crr* 基因, 结果发现, 敲除 *ptsG* 和 *crr* 基因后甘油转化率较野生菌分别提高 26.2% 和 42.7%, 其中突变株 *K. pneumoniae* Δcrr 的 1,3-PD 的产量提高 35.8%。可见, 敲除 *ptsG* 和 *crr* 基因改造 PTS 系统能够有效提高底物甘油利用率, 强化 1,3-PD 合成。

4.2 新代谢途径的发现和代谢网络的进展

在产 1,3-PD 相关代谢途径中, 甘油三磷酸(G3P)是另一种代谢产物。Zhu 等^[64]发现, 在以甘油为底物进行厌氧生长时, 大肠杆菌工程菌体内 G3P 水平明显高于天然产 1,3-PD 的肺炎克雷伯氏菌, 并且 G3P 水平随着甘油浓度增加而增加, 而在肺炎克雷伯氏菌中, G3P 浓度却保

持相对恒定; 向发酵培养基中添加延胡索酸能刺激厌氧 G3P 脱氢酶活性, 使厌氧 G3P 脱氢酶比活力提高; 细胞内 G3P 浓度降低, 1,3-PD 产量显著提高。在缺乏外源电子受体下 G3P 积累使 G3P 脱氢酶活性降低, *E. coli* Lin6 突变株负责将甘油转化为 G3P 的甘油激酶浓度降低, 1,3-PD 产量显著提高。可见, G3P 积累是厌氧发酵抑制 1,3-PD 产量的重要原因。Pan 等^[65]研究了肺炎克雷伯氏菌代谢途径中通量变化与 1,3-PD 产量的关系, 在动态通量平衡分析基础上, 结合基因组尺度通量平衡分析和胞外代谢物动力学模型, 构建了一种优化计算方法; 通过优化计算; 获得更为扩展的代谢途径, 包括 3 条途径或位点, 即在二羟丙酮(DHA)节点处引出一条磷酸戊糖途径(PPP)以提供更多还原当量和 3-磷酸甘油酯(3PG)节点处合成氨基酸分支, 以及三羧酸循环(TCA)中 α -酮戊二酸位点引出谷氨酸和其他氨基酸的合成代谢途径; 在此基础上, 分析了代谢途径中重要节点动态通量分布与 1,3-PD 收率的关系, 发现从 DHA 到 PPP 动态通量变化与产量呈正相关, TCA 循环中流量变化与 1,3-PD 产率呈正相关。

肺炎克雷伯氏菌甘油分解代谢能产生中间产物二羟丙酮。Sun 等^[66]利用葡萄糖分解代谢途径的重定向构建了肺炎克雷伯氏工程菌, 使用葡萄糖产生甘油和二羟基丙酮: 首先敲除编码磷酸丙糖异构酶的 *tpiA* 基因, 过表达谷氨酸棒杆菌的二羟基丙酮磷酸脱磷酸化酶(*hdpA*)后, 工程菌株能以高水平利用葡萄糖生产二羟基丙酮和甘油; 敲除编码甘油醛 3-磷酸脱氢酶的酶(*gapA*)基因后, 进一步增加产物的形成。由此可见, 代谢途径编织成复杂的代谢网络。代谢网络新代谢途径的发现, 必然对甘油歧化代谢途径的氧化和还原代谢网络有更清晰的认识, 同时结合代谢路径的新发现, 通过合理设计对

肺炎克雷伯氏菌进行改造, 将促进以甘油或辅助底物生产 1,3-PD 的动力。

5 展望

野生菌株转化碳源为 1,3-PD 的效率较低, 构建基因工程菌株是必然趋势。提高 1,3-PD 产量涉及复杂的发酵代谢网络和途径, 其中网络途径中许多酶的作用也十分复杂。提高 1,3-PD 产量取决于代谢流、还原当量和生物量总体平衡。代谢途径复杂多变, 新途径有待发现, 因此需要从代谢网络整体把握基因的改造和酶的调节。可以经代谢流量平衡和控制分析, 寻找关键节点和关键酶, 有针对性地对野生菌进行改造。这需要多种分子生物学技术结合和集成才能完成, 单一技术无法实现 1,3-PD 产量的突破。菌种改造需要遵循系统生物学原则, 从基因组、蛋白组、代谢组入手进行全面控制和改造。随着代谢网络分支和途径的更新, 发酵控制研究的深入势必会更新和优化分子改造的方法和策略。

REFERENCES

- [1] 修志龙, 姜莉莉, 傅宏鑫, 周瑾洁, 权春善. 微生物发酵法生产 1,3-丙二醇的研究新进展[J]. 微生物学杂志, 2016, 36(6): 1-9
Xiu ZL, Jiang LL, Fu HX, Zhou JJ, Quan CS. New progress in microbial fermentation of 1,3-propanediol[J]. Journal of Microbiology, 2016, 36(6): 1-9 (in Chinese)
- [2] 李晓妹, 张霖, 高大成, 师文静, 樊亚超. 发酵法生产 1,3-丙二醇的研究进展[J]. 化工进展, 2017, 36(4): 1395-1403
Li XS, Zhang L, Gao DC, Shi WJ, Fan YC. Progress on the production of 1,3-propanediol by fermentation[J]. Chemical Industry and Engineering Progress, 2017, 36(4): 1395-1403 (in Chinese)
- [3] 杨云, 殷冉, 裴建军. 微生物发酵法制备 1,3-丙二醇的研究进展[J]. 化工时刊, 2017, 31(12): 24-28
Yang Y, Yin R, Pei JJ. Progress in microbial fermentation of 1,3-propanediol[J]. Chemical Industry Times, 2017, 31(12): 24-28 (in Chinese)
- [4] Wang XL, Zhou JJ, Shen JT, Zheng YF, Sun YQ, Xiu ZL. Sequential fed-batch fermentation of 1,3-propanediol from glycerol by *Clostridium butyricum* DL07[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2020, 104(21): 9179-9191
- [5] Russmayer H, Egermeier M, Kalemasi D, Sauer M. Spotlight on biodiversity of microbial cell factories for glycerol conversion[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(6): 107395
- [6] Fokum E, Zayed HM, Yun J, Zhang G, Qi X. Recent technological and strategical developments in the biomanufacturing of 1,3-propanediol from glycerol[J]. International Journal of Environmental Science and Technology, 2021, 18(8): 2467-2490
- [7] 吴家鑫, 张国栋, 齐鹏, 何继红, 赵梅仙, 葛辛玫. 微生物法生产 1,3-丙二醇的代谢及关键酶研究进展[J]. 化学通报, 2014, 77(12): 1171-1175
Wu JX, Zhang GD, Qi P, He JH, Zhao MX, Ge XM. Progress in metabolism and key enzymes of microbial production of 1,3-propanediol[J]. Chemistry, 2014, 77(12): 1171-1175 (in Chinese)
- [8] Jiang W, Wang SZ, Wang YP, Fang BS. Key enzymes catalyzing glycerol to 1,3-propanediol[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 57
- [9] 田平芳, 谭天伟. 甘油歧化为 1,3-丙二醇的代谢及关键酶研究进展[J]. 生物工程学报, 2007, 23(2): 201-205
Tian PF, Tan TW. Progress in metabolism and crucial enzymes of glycerol conversion to 1,3-propanediol[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(2): 201-205 (in Chinese)
- [10] 张宏蕊, 金平, 刘树臣. 发酵产 1,3-丙二醇的关键酶研究进展[J]. 化学与生物工程, 2011, 28(3): 1-4
Zhang HR, Jin P, Liu SC. Research progress of key enzymes for production of 1,3-propanediol by fermentation[J]. Chemistry and Bioengineering, 2011, 28(3): 1-4 (in Chinese)
- [11] Liu JZ, Xu W, Chistoserdov A, Bajpai RK. Glycerol dehydratases: biochemical structures, catalytic mechanisms, and industrial applications in 1,3-propanediol production by naturally occurring and genetically engineered bacterial strains[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 179(6): 1073-1100
- [12] Jiang W, Li WJ, Hong Y, Wang SZ, Fang BS. Cloning, expression, mutagenesis library construction of glycerol dehydratase, and binding mode simulation of its reactivase with ligands[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2016, 178(4): 739-752
- [13] Qi XH, Guo Q, Wei Y, Xu H, Huang RB. Enhancement

- of pH stability and activity of glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae* by rational design[J]. Biotechnology Letters, 2012, 34(2): 339-346
- [14] Johnson EA, Lin EC. *Klebsiella pneumoniae* 1,3-propanediol: NAD⁺ oxidoreductase[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169(5): 2050-2054
- [15] Wang FH, Qu HJ, Huang H, Tan TW. High-level expression of the 1,3-propanediol oxidoreductase from *Klebsiella pneumoniae* in *Escherichia coli*[J]. Molecular Biotechnology, 2005, 31(3): 211-219
- [16] Lama SM, Ro SM, Seol E, Sekar BS, Ainala SK, Thangappan J, Song H, Seung D, Park S. Characterization of 1,3-propanediol oxidoreductase (DhaT) from *Klebsiella pneumoniae* J2B[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2015, 20(6): 971-979
- [17] Zheng YY, Cao Y, Fang BS. Cloning and sequence analysis of the *dhaT* gene of the 1,3-propanediol regulon from *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(3): 251-255
- [18] Marçal D, Rêgo AT, Carrondo MA, Enguita FJ. 1,3-propanediol dehydrogenase from *Klebsiella pneumoniae*: decameric quaternary structure and possible subunit cooperativity[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(4): 1143-1151
- [19] Marçal D, Rego AT, Fogg MJ, Wilson KS, Carrondo MA, Enguita FJ. Crystallization and preliminary X-ray characterization of 1,3-propanediol dehydrogenase from the human pathogen *Klebsiella pneumoniae*[J]. Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications, 2007, 63: 249-251
- [20] Wang SW, Dai YJ, Wang JX, Shen YB, Zhai Y, Zheng H, Wang M. Molecular insights into substrate specificity of *Rhodococcus ruber* CGMCC3090 by gene cloning and homology modeling[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2013, 52(2): 111-117
- [21] 王世伟, 王敏, 王卿惠. *Rhodococcus ruber* CGMCC3090 腈水合酶纯化、酶学性质及结晶研究[J]. 中国生物工程杂志, 2017, 37(10): 42-52
- Wang SW, Wang M, Wang QH. Purification, crystallization and characterization of a nitrile hydratase from *Rhodococcus ruber* CGMCC3090 strain[J]. China Biotechnology, 2017, 37(10): 42-52 (in Chinese)
- [22] Ma CW, Zhang L, Dai JY, Xiu ZL. Relaxing the coenzyme specificity of 1,3-propanediol oxidoreductase from *Klebsiella pneumoniae* by rational design[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 146(4): 173-178
- [23] Li ZB, Ro SM, Sekar BS, Seol E, Lama S, Lee SG, Wang, Guangyi Park S. Improvement of 1,3-propanediol oxidoreductase (DhaT) stability against 3-hydroxypropionaldehyde by substitution of cysteine residues[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2016, 21: 695-703
- [24] Skraly FA, Lytle BL, Cameron DC. Construction and characterization of a 1,3-propanediol operon[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64(1): 98-105
- [25] Wang FH, Qu HJ, Zhang DW, Tian PF, Tan TW. Production of 1,3-propanediol from glycerol by recombinant *E. coli* using incompatible plasmids system[J]. Molecular Biotechnology, 2007, 37(2): 112-119
- [26] Ma Z, Rao ZM, Xu LY, Liao XR, Fang HY, Bin ZG, Jian ZG. Expression of *dha* operon required for 1,3-PD formation in *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Current Microbiology, 2010, 60(3): 191-198
- [27] Guo XC, Liu HJ, Wang YP, Zhang JA, Liu DH. Construction of polyhydroxybutyrate pathway in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2013, 29(10): 1504-1514
- [28] 朱建国, 李霜, 纪晓俊, 等. 1,3-丙二醇氧化还原酶同功酶基因 *yqhD* 在肺炎克雷伯氏菌中的表达研究[J]. 食品与发酵工业, 2008, 34(8): 5-10
- Zhu JG, Li S, Ji XJ, et al. Expression of gene *yqhD* encoding 1,3-propanediol oxydoreductase isoenzyme in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Food and Fermentaton industries, 2008, 34(8): 5-10 (in Chinese)
- [29] Zhuge B, Cheng Z, Fang HY, Zhuge J, Permaul K. Expression of 1,3-propanediol oxidoreductase and its isoenzyme in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87(6): 2177-2184
- [30] Zhao L, Zheng Y, Ma XY, Wei DZ. Effects of over-expression of glycerol dehydrogenase and 1,3-propanediol oxidoreductase on bioconversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2009, 32(3): 313-320
- [31] Wang M, Wang GQ, Zhang T, Fan LH, Tan TW. Multi-modular engineering of 1,3-propanediol biosynthesis system in *Klebsiella pneumoniae* from co-substrate[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(2): 647-657
- [32] 谢梦梦, 胡会涛, 陆信曜, 宗红, 诸葛斌. 强化乙醛酸和 TCA 循环对克雷伯氏菌合成 1,3-丙二醇的影响[J].

- 食品与发酵工业, 2020, 46(19): 17-22
- Xie MM, Hu HT, Lu XY, Zhong H, Zhuge B. Strengthening glyoxylate bypass and the TCA cycle improved 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(19): 17-22 (in Chinese)
- [33] Oh BR, Seo JW, Heo SY, Luo LH, Hong WK, Park DH, Kim CH. Efficient production of 1,3-propanediol from glycerol upon constitutive expression of the 1,3-propanediol oxidoreductase gene in engineered *Klebsiella pneumoniae* with elimination of by-product formation[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2013, 36(6): 757-763
- [34] Seo JW, Seo MY, Oh BR, Heo SY, Baek JO, Rairakhwada D, Luo LH, Hong WK, Kim CH. Identification and utilization of a 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme for production of 1,3-propanediol from glycerol in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 85(3): 659-666
- [35] Zhu CQ, Jiang X, Zhang YQ, Lin J, Fu SL, Gong H. Improvement of 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae* by moderate expression of *puuC* (encoding an aldehyde dehydrogenase)[J]. Biotechnology Letters, 2015, 37(9): 1783-1790
- [36] Lu XY, Fu XM, Zong H, Zhuge B. Overexpressions of *xylA* and *xylB* in *Klebsiella pneumoniae* lead to enhanced 1,3-propanediol production by cofermentation of glycerol and xylose[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2016, 26(7): 1252-1258
- [37] 付晓萌, 诸葛斌, 陆信曜, 宗红, 方慧英, 宋健. 异源表达木糖异构酶基因对克雷伯氏菌合成 1,3-丙二醇的影响[J]. 微生物学通报, 2015, 42(11): 2079-2086
- Fu XM, Zhuge B, Lu XY, Zong H, Fang HY, Song J. Impact of the heterologous expression of xylose isomerase gene on the biosynthesis of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiology China, 2015, 42(11): 2079-2086 (in Chinese)
- [38] Wang M, Zhou Y, Tan T. Cofactor engineering for enhanced production of diols by *Klebsiella pneumoniae* from co-substrate[J]. Biotechnology Journal, 2017, 12(11): 1700176
- [39] Lu XY, Ren SL, Lu JZ, Zong H, Song J, Zhuge B. Enhanced 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae* by a combined strategy of strengthening the TCA cycle and weakening the glucose effect[J]. Journal of Applied Microbiology, 2018, 124(3): 682-690
- [40] Zheng Y, Zhao L, Zhang JG, Zhang HY, Ma XY, Wei DZ. Production of glycerol from glucose by coexpressing glycerol-3-phosphate dehydrogenase and glycerol-3-phosphatase in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 105(5): 508-512
- [41] Liang QF, Zhang HJ, Li SN, Qi QS. Construction of stress-induced metabolic pathway from glucose to 1,3-propanediol in *Escherichia coli*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 89(1): 57-62
- [42] Lama SM, Seol E, Park S. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* J2B for the production of 1,3-propanediol from glucose[J]. Bioresource Technology, 2017, 245: 1542-1550
- [43] Lee JH, Jung MY, Oh MK. High-yield production of 1,3-propanediol from glycerol by metabolically engineered *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biotechnology for Biofuels, 2018, 11: 104
- [44] Seo MY, Seo JW, Heo SY, Baek JO, Rairakhwada D, Oh BR, Seo PS, Choi MH, Kim CH. Elimination of by-product formation during production of 1,3-propanediol in *Klebsiella pneumoniae* by inactivation of glycerol oxidative pathway[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 84(3): 527-534
- [45] Horng YT, Chang KC, Chou TC, Yu CJ, Chien CC, Wei YH, Soo PC. Inactivation of *dhaD* and *dhaK* abolishes by-product accumulation during 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2010, 37(7): 707-716
- [46] Zhou JD, Wang DX, Wang CH, Gu JJ, Kim CH, Shi JP, Jiang B, Wang M, Hao J. The role of the pyruvate acetyl-CoA switch in the production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2017, 181(3): 1199-1210
- [47] Bao WJ, Wei RQ, Liu XX, Dong SF, Chen TY, Fu SL, Gong H. Regulation of pyruvate formate lyase-deficient *Klebsiella pneumoniae* for efficient 1,3-propanediol bioproduction[J]. Current Microbiology, 2020, 77(1): 55-61
- [48] Lin J, Zhang YQ, Xu DF, Xiang G, Jia ZX, Fu SL, Gong H. Deletion of *poxB*, *pta*, and *ackA* improves 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2016, 100(6): 2775-2784
- [49] Chen LF, Ma CL, Wang RM, Yang JL, Zheng HJ. Deletion of *ldhA* and *aldH* genes in *Klebsiella pneumoniae* to enhance 1,3-propanediol production[J]. Biotechnology Letters, 2016, 38(10): 1769-1774

- [50] Oh BR, Lee SM, Heo SY, Seo JW, Kim CH. Efficient production of 1,3-propanediol from crude glycerol by repeated fed-batch fermentation strategy of a lactate and 2,3-butanediol deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbial Cell Factories, 2018, 17(1): 92
- [51] Xu YZ, Guo NN, Zheng ZM, Ou XJ, Liu HJ, Liu DH. Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 104(5): 965-972
- [52] 陈利飞, 李猛, 马春玲, 杨建楼. 克雷伯氏菌产 1,3-丙二醇 *ldhA* 基因缺失菌株的构建[J]. 生物技术通报, 2015, 31(3): 121-126
- Chen LF, Li M, Ma CL, Yang JL. Construction a metabolic engineering strain to produce 1,3-propanediol from *Klebsiella pneumoniae* by *ldhA* gene deletion mutation[J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(3): 121-126 (in Chinese)
- [53] 杨建楼, 郑海杰, 马春玲, 王瑞明, 陈利飞. 克雷伯氏菌产 1,3-丙二醇 *aldH* 基因缺失菌株的构建[J]. 中国酿造, 2016, 35(4): 56-60
- Yang JL, Zheng HJ, Ma CL, Wang RM, Chen LF. Construction of 1,3-propanediol-producing *Klebsiella pneumoniae* strain with *aldH* gene deletion[J]. China Brewing, 2016, 35(4): 56-60 (in Chinese)
- [54] Jong Myoung Park, Chelladurai Rathnasingh, Hyohak Song. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* based on *in silico* analysis and its pilot-scale application for 1,3-propanediol and 2,3-butanediol co-production[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2016, 44(3): 1-11
- [55] Park JM, Rathnasingh C, Song H. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* based on *in silico* analysis and its pilot-scale application for 1,3-propanediol and 2,3-butanediol co-production[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2017, 44(3): 431-441
- [56] Xin B, Tao F, Wang Y, Liu HY, Ma CQ, Xu P. Coordination of metabolic pathways: enhanced carbon conservation in 1,3-propanediol production by coupling with optically pure lactate biosynthesis[J]. Metabolic Engineering, 2017, 41: 102-114
- [57] Zhou S, Huang YH, Mao XL, Li LL, Guo CY, Gao YL, Qin QW. Impact of acetolactate synthase inactivation on 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*[J]. PLoS One, 2019, 14(4): e0200978
- [58] Lu XY, Ji GJ, Zong H, Bin ZG. The role of *budABC* on 1,3-propanediol and 2,3-butanediol production from glycerol in *Klebsiella pneumoniae* CICIM B0057[J]. Bioengineered, 2016, 7(6): 439-444
- [59] 陆信曜, 季广建, 宗红, 诸葛斌. *budR* 表达水平对克雷伯氏菌甘油代谢的影响[J]. 食品与发酵工业, 2016, 42(4): 24-27
- Lu Xinyao, J Gangjian, Zong Hong, Zhuge Bin. Influence of expression level of *budR* on glycerol metabolism of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(4): 24-27
- [60] Lee SM, Hong WK, Heo SY, Park JM, Jung YR, Oh BR, Joe MH, Seo JW, Kim CH. Enhancement of 1,3-propanediol production by expression of pyruvate decarboxylase and aldehyde dehydrogenase from *Zymomonas mobilis* in the acetolactate-synthase-deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2014, 41(8): 1259-1266
- [61] Lee JH, Jung MY, Oh MK. High-yield production of 1,3-propanediol from glycerol by metabolically engineered *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biochnology for Biofuels, 2018, 11: 104
- [62] Jeng WY, Panjaitan NSD, Horng YT, Chung WT, Chien CC, Soo PC. The negative effects of KPN00353 on glycerol kinase and microaerobic 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 2441
- [63] 陆竞争, 任顺利, 诸葛斌, 陆信曜, 宗红, 方慧英, 宋健. 磷酸转移酶系统关键基因敲除对 *Klebsiella pneumoniae* 产 1,3-丙二醇的影响[J]. 食品与发酵工业, 2017, 43(8): 22-26
- Lu JZ, Ren SL, Zhuge B, Lu XY, Zong H, Fang HY, Song J. The effects of knocking out key genes in phosphotransferase system on 1,3-propanediol production of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Food and Fermentation Industries, 2017, 43(8): 22-26 (in Chinese)
- [64] Zhu MM, Lawman PD, Cameron DC. Improving 1,3-propanediol production from glycerol in a metabolically engineered *Escherichia coli* by reducing accumulation of sn-glycerol-3-phosphate[J]. Biotechnology Progress, 2002, 18(4): 694-699
- [65] Pan DT, Wang XD, Shi HY, Yuan DC, Xiu ZL. Dynamic flux balance analysis for microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Bioprocess and Biosystems Engineering, 2018, 41(12): 1793-1805
- [66] Sun SQ, Wang YK, Shu L, Lu XY, Wang QH, Zhu CG, Shi JP, Lye GJ, Baganz F, Hao J. Redirection of the central metabolism of *Klebsiella pneumoniae* towards dihydroxyacetone production[J]. Microbial Cell Factories, 2021, 20(1): 123