

基于甘油的 1,3-丙二醇生物合成的代谢局限及其改造策略

杨苗苗*, 员君华*, 张欢欢, 张国艳, Hossain Zabed, 齐向辉

江苏大学 食品与生物工程学院, 江苏 镇江 212013

杨苗苗, 员君华, 张欢欢, 等. 基于甘油的 1,3-丙二醇生物合成的代谢局限及其改造策略. 生物工程学报, 2018, 34(7): 1069-1080.

Yang MM, Yun JH, Zhang HH, et al. Bottlenecks and modification strategies of 1,3-propanediol biosynthesis from glycerol. Chin J Biotech, 2018, 34(7): 1069-1080.

摘要: 粗甘油是生物柴油生产中的主要副产物, 一些微生物可将甘油转化为重要化工原料 1,3-丙二醇 (1,3-PD), 而利用这些微生物野生菌株生物合成 1,3-PD 会存在一些局限性, 如底物抑制、产物抑制等。文中从 1,3-丙二醇的甘油生物转化途径与这些局限性出发, 总结了生物合成中存在的问题, 并针对这些问题提出了一些基于基因敲除或基因过表达等基因工程技术的改造方法, 综述了利用基因工程菌生物转化甘油生成 1,3-丙二醇的最新研究进展。

关键词: 甘油, 1,3-丙二醇, 生物转化, 生物合成, 基因工程

Bottlenecks and modification strategies of 1,3-propanediol biosynthesis from glycerol

Miaomiao Yang*, Junhua Yun*, Huanhuan Zhang, Guoyan Zhang, Hossain Zabed, and Xianghui Qi

School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, Jiangsu, China

Abstract: Crude glycerol is the main by-product of biodiesel production. A few microorganisms can transfer crude glycerol to 1,3-propanediol (1,3-PD) that is an important chemical material. There exist many limitations such as substrate inhibition, product inhibition when wild strains are used in 1,3-PD biosynthesis. In this review, based on the microbial transformation of 1,3-propanediol from glycerol and its limitations, some strategies using genetic engineering such as knockout or gene overexpression were summarized. The latest research progresses in biosynthesis of 1,3-propanediol from glycerol by genetically engineered strains are discussed.

Received: December 25, 2017; **Accepted:** February 28, 2018

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31571806), National Key Research and Development Program (No. 2017YFC1600806), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2017M621657), High-level Talents Project of Six Talent Peaks in Jiangsu Province (No. SWYY-018).

*These authors contributed equally to this work.

Corresponding author: Xianghui Qi. Tel: +86-511-88797059; Fax: +86-511-88780201; E-mail: qxh@ujs.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31571806), 国家重点研发计划 (No. 2017YFC1600806), 中国博士后基金 (No. 2017M621657), 江苏省“六大人才高峰”项目 (No. SWYY-018) 资助。

网络出版时间: 2018-03-26

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20180326.0836.001.html>

Keywords: glycerol, 1,3-propanediol, bioconversion, biosynthesis, genetic engineering

1,3-丙二醇 (1,3-propanediol, 1,3-PD) 是一种无色物质, 味道微甜, 具有粘性, 易溶于水和乙醇, 在化工、食品、医学、化妆品等领域具有十分广泛的应用^[1-5]。1,3-PD 可以通过化学途径合成, 但合成工艺条件苛刻、能耗高、释放有毒中间体且产品精制难度较大, 这些都增加了 1,3-PD 的生产成本^[6]。因此, 寻找一种低成本、低能耗的代替方法, 将为 1,3-PD 的生产带来巨大效益。粗甘油是生物柴油生产中的一种主要副产物^[7-9], 自然条件下一些微生物可以直接利用甘油作为底物, 高效地合成 1,3-PD, 这不仅解决了 1,3-PD 化学法生产成本较高的问题, 又有效地回收利用了生物柴油生产中的副产品。这些 1,3-PD 生产菌株包括短乳杆菌 *Lactobacillus brevis*、肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae*、巴氏梭状芽孢杆菌 *Clostridium pasteurianum*、丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* 和弗氏柠檬菌 *Citrobacter freundii* 等^[10-16]。尽管上述自然界中分离的野生菌用于生产 1,3-PD 具有较高的效率, 但这些菌本身的某些性质限制了其产率的继续提高, 利用基因工程的技术对这些野生菌进行定向改造^[17], 可以打破这些限制, 甚至可以对本身不能进行甘油转化生成 1,3-PD 的菌株进行基因工程手段的改造, 引入 1,3-PD 代谢途径来生产 1,3-PD。例如, 美国杜邦公司利用玉米中的糖分为底物, 将 *dhaB*、*dhaT* 和可转化糖为甘油的基因 *GPPI/2* 克隆到工程菌中, 实现了以葡萄糖为底物生产 1,3-PD, 并用于工业化生产, 被公认为是利用基因工程方法使代谢物产业化的典范。基因工程方法如敲除和相关基因的过表达均可被用来构建高效或高产的 1,3-PD 工程菌株。

1 1,3-PD 的生物合成

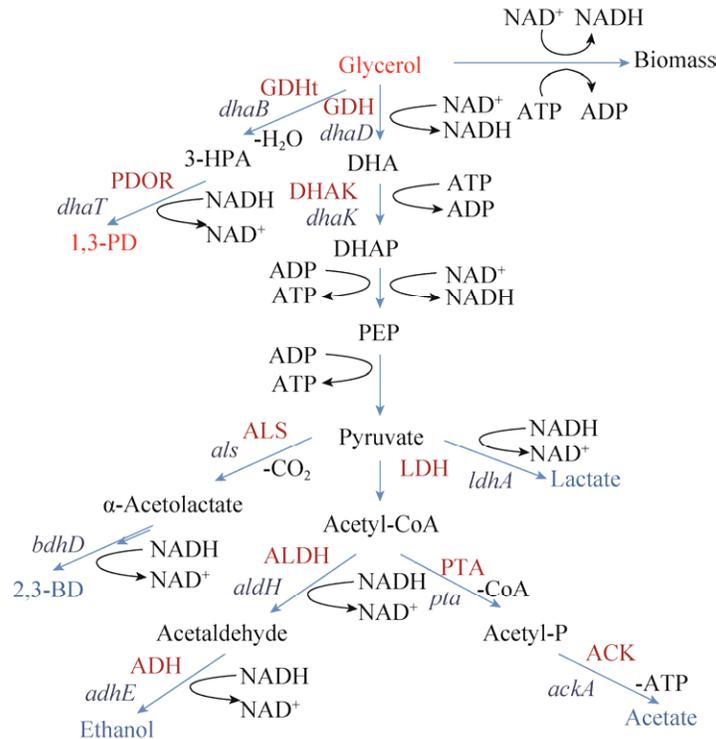
1.1 生物合成途径

在自然条件中, 甘油歧化是 1,3-PD 的唯一生成途径, 一般在厌氧条件下进行^[18-21]。在这些微生物中,

甘油可以通过简单扩散或促进扩散两种不同方式渗透到膜中^[22], 当甘油跨过细胞膜后, 会进入两个平行的代谢途径: 氧化代谢途径和还原代谢途径(图 1)。

在氧化途径分支中, 甘油在甘油脱氢酶 (Glycerol dehydrogenase, GDH) 的催化下, 生成二羟丙酮 (Dihydroxyacetone, DHA), 这步反应需要 NAD^+ 作为辅酶; 之后, DHA 在 ATP 的参与下, 经磷酸二羟丙酮激酶 (Dihydroxyacetone kinase, DHAK) 催化生成磷酸二羟丙酮 (Dihydroxyacetone phosphate, DHAP), 再在 NAD^+ 辅酶参与下, 生成磷酸烯醇式丙酮酸 (Phosphoenolpyruvate, PEP), 之后进入碳代谢如糖酵解、三羧酸循环等主流代谢途径和其他代谢途径^[23-24]。由 PEP 转化产生的丙酮酸会进一步产生次级代谢产物, 如乙酸、琥珀酸、乳酸、丁酸、正丁醇、乙醇、2,3-丁二醇 (2,3-butanediol, 2,3-BD) 等, 这些代谢产物构成了利用微生物生产 1,3-PD 的主要副产物。

另一分支是还原途径分支。甘油首先在甘油脱水酶 (GDHt, glycerol dehydratase) 的作用下生成 3-羟基丙醛 (3-hydroxypropanaldehyde, 3-HPA), GDHt 是控制甘油分解的限速酶, 对甘油转化起着至关重要的作用。随后, 经 1,3-丙二醇氧化还原酶 (1,3-propanediol oxidoreductase, PDOR) 催化, 3-HPA 转化为 1,3-PD^[25]。在从甘油到 1,3-PD 厌氧转化的过程中, 当所有的乙酰 CoA 均进入 TCA 循环, 未经氧化磷酸化生成乙酸, 其最大理论产量为 0.875 mol/mol 甘油。然而, 在大多数情况下, 为了产生更多的 ATP, 乙酸大量生成, 此时以乙酸为唯一副产品的最大理论收率为 0.72 mol/mol^[17]。鉴于通过生物合成 1,3-PD 的诸多优点, 利用甘油合成 1,3-PD 是目前的研究热点。然而, 生物转化甘油生成 1,3-PD 亦存在着一些局限性, 利用基因工程的方法来改造微生物菌株, 可以有效改善这些问题, 表 1 列出了这些工程菌生产 1,3-PD 的情况。

图 1 甘油的代谢通路图^[26]Fig. 1 Metabolic pathways of glycerol catabolism^[26].

1.2 转化途径中的关键酶及其基因

由上述甘油的还原途径可见，GDHt (EC 4.2.1.30) 和 PDOR (EC 1.1.1.202) 是生物法生产 1,3-PD 的两种关键酶，而编码该关键酶的基因存在于 *dha* 调节子上，该调节子包括 GDHt 的编码基因 (*dhaB*)、PDOR 的编码基因 (*dhaT*)、GDH 的编码基因 (*dhaD*)、DHAK 的编码基因 (*dhaK*) 和调节基因 (*dhaR*)，不同 1,3-PD 生产菌的 *dha* 调节子构成亦不同。

GDHt 是甘油歧化途径中的关键功能性分子，是 1,3-PD 生物转化中的限速酶。在 *K. pneumoniae*、*C. pasteurianum* 的 *dha* 调节子中，编码 GDHt 的基因是 *dhaB*，由 3 个阅读框 (*dhaB1*、*dhaB2*、*dhaB3*) 分别编码该酶的 3 个功能亚基，即 α 、 β 和 γ 亚基，它们共用一个启动子，以 $\alpha 2\beta 2\gamma 2$ 二聚体的形式存在。而 *C. freundii* 的 GDHt 是由 *dhaB*、

dhaC 和 *dhaE* 编码的，其结构与 *K. pneumoniae* 中的 GDHt 同源，具有较高的相似性，这两种 GDHt 均以辅酶维生素 B₁₂ 为辅基，在 1,3-PD 发酵过程中微量流加 B₁₂，可以满足微生物转化的需要。而在 *C. butyricum* 中，GDHt 的编码基因由 *dhaB1*、*dhaB2* 组成，*dhaB1* 编码 *dhaB2* 的激活蛋白，该菌中的 GDHt 对氧气极其敏感，与细胞膜的通透性有关，但 *C. butyricum* 中的 GDHt 并不是辅酶维生素 B₁₂ 依赖型，由于辅酶 B₁₂ 成本较高，这也使得工业上利用 *C. butyricum* 生物转化 1,3-PD 具有独特的优势。

PDOR 由 *dhaT* 基因编码，是甘油与 1,3-PD 代谢途径中的另一关键性酶，直接将甘油还原途径中的中间产物 3-HPA 还原为 1,3-PD，同时消耗 NADH 生产 NAD⁺，微生物通过该反应步骤消耗还原力 NADH，使微生物细胞内的还原力达到平

衡。在 *K. pneumoniae* 中由连续基因 *dhaT* 编码，转录方向与甘油脱水酶基因相反，由另一启动子控制；而在 *C. butyricum* 调节子中，两种酶的编码基因在同一方向转录。在 1,3-PD 生产途径中，PDOR 酶的活性会受到许多抑制，导致 1,3-PD 产量降低，因此，为实现 *dhaB*、*dhaT* 基因的高效表达，构建载体时须借鉴自然菌中基因簇的排布模式。表 2 列出了应用不同的蛋白改造方法对以上两种酶的改造策略。

2 甘油转化生成 1,3-PD 过程中的底物抑制与产物抑制

甘油以及 1,3-PD 产物的积累都对细胞的生长具有抑制作用，且导致了 GDHt 不可逆的失活，降低了 1,3-PD 的产率。Colin 等^[27]研究了 *C. butyricum* CNCM1211 中甘油和 1,3-PD 对细菌的抑制作用，结果表明，细菌的生长速率与甘油的浓度成反比，当甘油初始添加浓度达到 150 g/L 时菌体的生长受到明显抑制，浓度达到 160 g/L 时，细菌几乎不生长；当 1,3-PD 的初始添加量达到 65 g/L 时，细菌的生长率达到最大值，由于甘油的代谢产生 1,3-PD，1,3-PD 在培养基中的终浓度为 70 g/L。Daria 等^[28]也研究了 1,3-PD 对 *C. butyricum* DSP1 生产性能的影响，在接种之前将 1,3-PD 添加到培养基中，得出了相近的结果，当外源添加的 1,3-PD 浓度达到 60 g/L 时，菌株的活性相对较高，添加的初始浓度达到 80 g/L 时，对菌体来说是致命的。

由于 GDHt 是 1,3-PD 发酵过程中的关键酶，尤其是在甘油浓度较高时，提高酶的浓度或活性可以有效提高 1,3-PD 的产率^[29]。首先，利用基因工程的技术对 GDHt 编码基因 *dhaB* 进行过表达是一个有效的解决方案。Oh 等^[30]首先获得了一株不产生副产物的 *K. pneumoniae* 突变株，命名为 AK-VOT，通过去除甘油氧化途径，阻断除乙酸外其他副产物的生成，获得了 1,3-PD 高产菌株，

之后，过表达 *dhaB* 和/或 *dhaT* 基因，进一步研究以期提高 1,3-PD 产量。结果表明，相比于 *dhaB* 和 *dhaT* 基因同时过表达，单独过表达 *dhaB* 的突变株 1,3-PD 的产量较高。其次，采用定向进化、理性设计或非理性设计的方法对酶分子进行改造，获得活性更高、稳定性更好的新型 GDHt，也可将甘油底物尽快转化。Qi 等^[31-32]采用生物信息学的方法对 GDHt 进行理性设计和非理性设计，并研究了重组酶在不同 pH 值下的酶活力及稳定性，酶学性质的分析表明，相比于原始酶，经过定点突变理性设计的酶的活力提高到 1.5–2.0 倍，对 pH 的稳定性也提高到原始酶的 1.5–2.0 倍；采用易错 PCR 的非理性改造和定点饱和突变理性改造相结合的方法得到的改造 GDHt 酶活力提高到 8.3 倍。利用这种改造后的酶进行 1,3-PD 的发酵，也可以促进底物的尽快转化，减少抑制。一些对 1,3-PD 具有较高耐受性的菌种也被分离获得，例如，Papanikolaou 等^[33]选用的是从死水池中分离得到的 *C. butyricum* F2b，该菌株表现出良好的 1,3-PD 耐受性，耐受水平达到 80 g/L。*C. butyricum* VPI 3266 和 *C. butyricum* DSM 5431 也具有较高的 1,3-PD 耐受性^[23]，其 1,3-PD 产量确有提高。利用诱变育种的方式对菌株进行定向进化，经过高通量筛选也可能获得 1,3-PD 的高耐受菌株，同时这也是解决底物抑制的方法之一。另外，采用连续发酵的方式将代谢产物移除，对于提高产量也有一定的益处。

3 中间产物 3-HPA 的及时转化

3-HPA 能够阻止细菌细胞生长，广泛应用于生物杀菌剂和抗感染治疗剂。其确切机制目前尚不十分清楚^[34]。在甘油还原生成 1,3-PD 时，3-HPA 是其中间产物，它不仅会延缓细菌的生长，而且 GDHt 和 PDOR 都对高浓度的 3-HPA 极其敏感，培养基中 3-HPA 的积累会导致微生物中的反馈机

制的触发,降低 GDHt 的合成以降低 3-HPA 的生成水平,减少对菌体的毒害作用^[35],从而导致 1,3-PD 的生成水平也相应降低,这个过程会导致代谢活动中不可逆转的后果,成为 1,3-PD 生产中的一个严重缺陷,也是 1,3-PD 生产中一个主要的影响因素^[36]。因此,PDOR 的浓度或活性是代谢中的关键影响因子,在保证 GDHt 一定活力的情况下,研究者们主要采取以下方法来降低 3-HPA 的影响。

3.1 提高 PDOR 活力

PDOR 是一种氧化还原酶,许多学者研究了其氧化与还原活性。Qi 等^[37]从 *C. freundii* 中克隆出 PDOR 编码基因 *dhaT*,转化 *E. coli* 获得高效表达的 PDOR,研究了其酶学性质,发现相比于其氧化活力,PDOR 的还原活力的作用条件更温和,最适反应 pH 为 7.0,温度为 37 °C。Qi 等^[38]还从 *L. brevis* 中克隆到 *dhaT*,获得新型重组 PDOR,最适反应 pH 为 7.5,温度为 37 °C,这对于 1,3-PD 的最终生成是有利的,对酶的 3D 结构分析表明,不同来源的两种 PDOR 均属于 III 型乙醇脱氢酶。

将 *dhaT* 进行原始菌株中的过表达是提高 PDOR 活力的最直接的一种方法。由于 PDOR 的酶促反应依赖于辅酶 NADH^[39],当副产物途径被阻断时,这些突变体内细胞的氧化还原力 NADH/NAD⁺较高,因此,进一步研究过表达基因 *dhaB* 和 *dhaT*,使用这些多余的 NADH,以提高 1,3-PD 产量。Cui 等^[12]在两株 *K. pneumoniae* KG1-3 (只阻断 2,3-丁二醇途径的突变株)和 KG1-5 (阻断 2,3-BD 和乳酸途径的突变株)中将基因 *dhaT* 过表达。结果表明,在菌株 KG1-5 中,氧化还原平衡力恢复正常,产量提高明显,甘油 1,3-PD 的产量也恢复到正常水平的 60%。

还有学者将 PDOR 编码基因转化大肠杆菌,采用共转化的方法,达到提高酶浓度与活力的目的。Yun 等^[40]从 *C. butyricum* 中克隆得到 *dhaT* 基

因,使其在 *E. coli* BL21 中高效表达,将转化 *E. coli* 与 *C. butyricum* 混合,采用全细胞生物催化的方法进行甘油到 1,3-PD 的转化,由于 PDOR 的催化需要辅酶 NADH,因此额外添加了 NADH 来实现还原力的平衡。结果表明,PDOR 的全细胞生物催化有效提高了 1,3-PD 的产量,相比于单独利用 *C. butyricum* 发酵提高了 2 倍,1,3-PD 的产量为 25.88 g/L,转化率为 0.54 g/g 甘油。

许多研究人员还在寻找生产 1,3-PD 自然菌株中原始酶以外的方法来转化 3-HPA。其中一种方法是从其他的菌株中寻找可以催化 3-HPA 为 1,3-PD 的酶,通过代谢工程构建异源重组菌株。例如,大肠杆菌中存在一种 PDOR 的同工酶,被命名为 PDORI,由 *yqhD* 基因编码,该酶被证实是与 *K. pneumoniae* 中的 PDOR 有相同功能的氧化还原酶。许多研究人员研究了该基因,并构建了含有该基因的工程菌来增加 1,3-PD 的产量。Zhu 等^[41]构建了 *K. pneumoniae* 的重组菌体,将原始菌株中导入 *yqhD* 基因来提高酶的浓度。重组 *K. pneumoniae* 突变体最终的 1,3-PD 浓度达到 67.6 g/L,与原始株相比,产量提高了 125.33%,摩尔转化率达到 0.62 mol / mol。重组酶活性检测表明,相比原始菌株,酶活力提高了 10 倍。此外,3-HPA 浓度与原始菌株相比降低了 22.4%。因此,利用基因的过表达相关基因是解决 1,3-PD 生物生产中中间代谢产物 3-HPA 对细菌的抑制问题的一种有效方法。

3.2 构建辅酶再生系统

如上所述,NADH/NAD⁺比较高时,NADH 作为还原当量对 1,3-PD 的生物合成起着关键的作用,构建辅酶再生系统,将有利于 1,3-PD 的生产。黄志华等^[42-43]选取 NAD⁺依赖型的甲酸脱氢酶 (Formate dehydrogenase, FDH) 为研究对象,利用基因工程的手段构建了含有该基因的重组质粒,在 *K. pneumoniae* 中表达了 *Candida boidinii*

的甲酸脱氢酶的基因 *fdh*, 构建了 NADH 再生系统, 对甘油代谢过程进行调控。结果表明, 通过分批补料发酵, 1,3-PD 的产量达到 78.6 g/L, 与原始菌株相比, 产量提高了 12.5 %。

3.3 3-HPA 流向其他途径

减少 1,3-PD 发酵中 3-HPA 浓度的另一种方法是将其部分转化为其他代谢物。例如, *K. pneumoniae* 中存在一种 NAD⁺ 依赖型的 γ -谷氨酰- γ -氨基丁酸醛脱氢酶 (PuuC), 由 *puuC* 基因编码, 可以将 3-HPA 氧化为 3-羟基丙酸 (3-HP), 3-HP 也是一种重要的化工产品^[10]。由于原始菌中的 *puuC* 表达量较少, Ashok 等^[44]将 *K. pneumoniae* DSM 2026 中的 *puuC* 基因过表达, PuuC 催化 3-HPA 生成 3-HP 时, 会产生较多的 NADH, 这些 NADH 也可以用于 1,3-PD 的合成, 达到了还原当量的充分利用。分批补料发酵中, 重组 *K. pneumoniae* (*puuC*) 菌株产生 16.0 g/L 3-HP 和 16.8 g/L 1,3-PD, 经过 24 h 转化, 甘油到 1,3-PD 的转化率可达 0.51 mol/mol, 转化率较高。这种将 3-HPA 流向其他途径的方式不仅降低了 3-HPA 对细胞的毒性, 使细菌代谢正常有序地进行, 而且为 3-HP 和 1,3-PD 的联产提供了参考。

4 生物转化中的副产物与应对策略

副产物的形成和维持氧化还原平衡是 1,3-PD 生产中的又一个瓶颈。如图 1 所示, 在甘油的歧化过程中, 除 1,3-PD 外可产生多种代谢产物如乙酸、琥珀酸、乳酸、丁酸等, 这些物质成为 1,3-PD 生产中的主要副产物。在甘油氧化分支, 甘油经几个 ATP 依赖的氧化还原酶催化, 转化为磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP)。同时, 在糖酵解代谢途径中, 葡萄糖也会转化为 PEP。以上生成的 PEP 可由丙酮酸激酶转化为丙酮酸, 生成一系列副产物。许多因素可以影响这一过程, 如外部条件和遗传条件等^[45]。因此, 改变其中的任何一个环节, 这些

副产品的质量和数量都将受到影响。这些副产物的形成会消耗甘油或葡萄糖中的碳, 从而导致流向其他产物的碳减少, 使 1,3-PD 的产量下降^[46]。另外, 这些副产物对细胞的生长也有抑制作用。因此, 利用基因工程的手段, 通过敲除相关基因来降低这些副产物的生成是一个较好的应对策略。然而, 这些途径可以调节细胞内氧化还原力的平衡, 因此, 在敲除这些相关基因时, 应保持氧化还原电位以满足目标代谢反应的正常运转。要避免不必要的代谢产物的产生, 同时需保持氧化还原力的平衡, 这对提高 1,3-PD 产量也是一个挑战。在保证其氧化还原力的前提下, 研究者们主要采取以下方法来降低副产物的形成。

4.1 与 DHA 或 DHAP 相关的基因敲除

GDH 是由 *dhaD* 基因编码的, 需要辅酶 NAD⁺ 的参与, 可将甘油氧化为 DHA; DHAK 是由 *dhaK* 基因编码的, 参与催化 DHA 的磷酸化, 生成 DHAP。这是甘油氧化分支的第一步。阻断 1,3-PD 的生物生产中副产物生成的途径, 最直接的是敲除与 DHA 和 DHAP 合成相关基因。Horng 等^[47]利用同源重组将 *K. pneumoniae* 中的 *dhaD* 和 *dhaK* 基因敲除, 命名为 TC100, 采用的方法是将 *dha* 操纵子中的 *dhaD-dhaK* 基因中插入一段链霉素抗性基因, 以便后续重组子的筛选。利用重组的 TC100 在 50 mL 三角瓶进行 1,3-PD 的摇瓶发酵, 实验表明, 在 37 °C 下孵育 48 h 后, 相比于野生菌株, TC100 的产量增加了 1.06 倍; 副产物如乳酸、2,3-丁二醇、乙醇均未检出。然而, 这一突变菌株与野生菌株相比细胞的生长状况较差, 生物量少, 生产 1,3-PD 的生产强度低, 他们通过 *dhaT* 基因的过表达对其进行了优化, 并调整了培养条件来解决这个问题, 获得了较高的 1,3-PD 生产强度。

完全敲除甘油歧化的氧化分支来降低副产物形成方法使还原力 NADH 降低, 导致生物量降低,

反过来影响了甘油的还原分支,会对 1,3-PD 的生产造成一定影响。这一问题可通过割裂 1,3-PD 生成途径和生物量增长途径的方式来解决。Maervoet 等^[48]研究了 *C. werkmanii* 的 1,3-PD 生产过程,利用基因工程的手段来构建 *C. werkmanii* DSM17579 $\Delta dhaD$, 即敲除 *dhaD* 基因,同时,利用葡萄糖作为共发酵底物,保证细菌主流代谢途径的正常运作,以增加生物量。最终使 1,3-PD 产量提高了 1.5 倍。

4.2 与丙酮酸还原相关基因的敲除

乳酸是丙酮酸的还原产物之一,每生成一个单位的乳酸,需要一个单位的 NADH。它是在甘油歧化途径中从丙酮酸出发碳分流的主要产物,属于 1,3-PD 生产中的副产物。在细胞生长过程中,乳酸在指数后期累积,抑制细胞生长。因此,许多研究人员通过敲除乳酸脱氢酶 *ldhA* 基因,获得乳酸缺陷突变体以抑制乳酸的合成,对 1,3-PD 发酵具有重要意义。Durgapal 等^[1]对 *K. pneumoniae* J2B 利用甘油产 1,3-PD 的能力进行了研究,他们构建了一个 *ldhA* 基因缺失突变体,比较野生型菌株和 $\Delta ldhA$ 突变株在不同培养条件、不同培养模式下(分批或补料培养)的生长状况以及 1,3-PD 生成水平。当 *K. pneumoniae* $\Delta ldhA$ 以补料培养方式发酵甘油时,1,3-PD 的产量为 58 g/L,产率为 0.35 g/g,生产强度为 1.3 g/(L·h)。碳流分析表明, $\Delta ldhA$ 突变株产生极其微量的乳酸,2,3-丁二醇(2,3-BD)比野生株产量高,产量为 26.6 g/L,成为主要副产物。

2,3-BD 也是从丙酮酸出发生成的另一个产物,成为甘油发酵生产 1,3-PD 中的又一个主要副产品。2,3-BD 也是二醇,与 1,3-PD 有相似的沸点,且都与水互溶。因此,2,3-PD 的这一性质导致了 1,3-PD 生产与纯化中一个棘手的问题^[49],使获得纯度较高的 1,3-PD 成本大大增加^[49-50]。通过敲除合成 2,3-丁二醇的编码基因,阻断其合成途

径,可以有效解决这一问题。Kumar 等^[2]在得到 *K. pneumoniae* J2B $\Delta ldhA$ 突变株后,为了改善 2,3-BD 的问题,进一步敲除了 2,3-BD 代谢相关的基因,包括整个 *bud* 操纵子上的 *budA*、*budB*、*budC* 和 *budD* 基因。结果表明,这种敲除完全阻断了 2,3-BD 的合成,不过 1,3-PD 的产量也下降了。他们认为,丙酮酸的大量积累是导致其产量下降的主要原因,细胞生长减慢。由于丙酮酸的积累,触发负反馈机制,导致上游产物如二羟基丙酮、3-磷酸甘油醛等的积累。GDHt 活力测定表明,3-磷酸甘油醛抑制了该酶活力从而降低了 1,3-PD 的产量。也有其他学者研究了其他 2,3-BD 相关基因的敲除,如 *als* 基因,该基因编码乙酰乳酸合酶,如图 1 所示, α -乙酰乳酸是 2,3-BD 的中间产物之一。Lee 等^[51]将 *K. pneumoniae* 中的 *als* 基因敲除后,将异源的 *pdc* (编码丙酮酸脱羧化酶)和 *aldB* (编码乙醛脱氢酶)基因导入,减少了 2,3-BD 的积累,1,3-PD 的产量也有一定提高。

4.3 与乙酰 CoA 还原相关的基因敲除

丙酮酸还原后,除了一部分流向生成乳酸和丙酮酸,还有大部分流入乙酰 CoA,乙酰 CoA 是丙酮酸代谢过程中的重要中间产物,由丙酮酸脱氢酶催化,之后生成了更多的次级代谢物,如乙酸、乙醇和丁酸等。这些代谢物或多或少都对细菌的生长具有抑制作用,成为 1,3-PD 生物合成工业中的副产品^[52]。目前,很多学者采取基因敲除的方法构建缺失菌株以减少这些副产物的产生,取得了较好的结果。

乙酸是抑制细胞生长的代谢产物之一。在乙酰 CoA 的代谢物中,乙酸对细菌的毒性最强^[53]。因此,乙酸合成途径的阻断是基因工程改造的最重要的目标。Lin 等^[54]敲除了 *K. pneumoniae* 中乙酸合成两条途径中相关酶的编码基因 *poxB*、*pta* 和 *ackA*,这些基因分别编码丙酮酸氧化酶、磷酸转乙酰化酶和乙酸激酶,并研究基因缺失菌株对

细胞生长和 1,3-PD 生产的影响。分批发酵生产 1,3-PD 的最终产量达到 76.8 g/L, 与相同发酵条件下野生株的产量提高了 15%。这些基因的缺失极大降低了乙酸的合成, 使更多的碳流向 TCA 等代谢途径, 不但增加了生物量, 也提高了 1,3-PD 的产量。乙醇是 1,3-PD 形成的另一种主要产物, 乙酰 CoA 在乙醛脱氢酶 (由 *aldH* 基因编码) 催化下生成乙醛; 之后在乙醇脱氢酶 (由 *adhE* 基因编码) 催化下, 乙醛还原成乙醇。这一过程需要消

耗甘油还原途径中产生的 NADH, 因此许多学者同时阻断乳酸和乙醇的合成途径来提高 1,3-PD 产量。Chen 等^[55]采用 λ Red 重组技术对 *K. pneumonia* 进行改造, 获得 *K. pneumonia* 2-1 Δ *ldhA*、*K. pneumonia* 2-1 Δ *aldH* 和 *K. pneumonia* 2-1 Δ *ldhA* Δ *aldH* 突变株。分批发酵结果表明, 以上 3 株重组菌的副产物浓度与原始菌株相比显著降低, 1,3-PD 的产量也分别提高至 85.7、82.5、87.5 g/L, 而原始菌株提高至 78.8 g/L。

表 1 不同基因工程菌株生产 1,3-PD 情况比较表

Table 1 Comparison of 1,3-PD production using various mutants by genetic engineering

Strains	Fermentation titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity g/(L·h)	Reference	
1. Gene knockout					
<i>K. pneumoniae</i> J2B Δ <i>ldhA</i>	Batch	58.0	0.35	1.30	[1]
<i>K. pneumoniae</i> KG5 Δ <i>poxB</i> Δ <i>pta</i> Δ <i>ackA</i>	Fed-batch	76.8	0.54	2.56	[54]
<i>K. pneumoniae</i> 2-1 Δ <i>ldhA</i> Δ <i>ald</i>	Fed-batch	87.5	0.70	3.60	[55]
<i>C. werkmanii</i> DSM17579 Δ <i>dhaD</i>	Batch	97.6	0.50	4.07	[48]
2. Gene overexpression					
<i>K. pneumoniae</i> KG1 <i>dhaT</i> overexpressed	Fed-batch	55.8	0.50	2.23	[12]
<i>K. pneumoniae</i> ME-308 <i>yqhD</i> from <i>E. coli</i> overexpressed	Fed-batch	67.6	0.513	1.69	[41]
<i>K. pneumoniae</i> DSM 2026 <i>puuC</i> overexpressed	Fed-batch	16.8	0.42	–	[44]
3. Coenzyme regeneration					
<i>K. pneumoniae</i> <i>fdh</i> overexpressed	Batch	78.6	–	1.33	[42]

表 2 不同方法改造 *K. pneumoniae* 来源关键酶的酶学数据

Table 2 Comparison of properties of engineered key enzymes from *K. pneumoniae* in 1,3-PD production

Enzyme	Methods	Activity (U/mg)	K_m (mmol/L)	V_{max} (U/mg)	Enhanced fold	Reference
GDHt KpG525	Rational design	125.00	0.60	270.00	1.45	[32]
GDHt KpG60	Rational design	90.00	0.70	140.00	1.05	[32]
GDHt Q42F	Error-prone PCR and saturation-mutagenesis	2 500.00	2.61	–	8.30	[31]
1,3-PDOR-D41G	Rational design	277.35	0.48	303.03	1.56	[56]
1,3-PDOR'-24	Error-prone PCR	48.00	–	–	4.90	[57]

5 展望

利用生物柴油的副产物粗甘油进行 1,3-PD 的生物合成符合可持续发展的趋势。基因工程和生物技术的发展可有效解决 1,3-PD 生产中的局限,但是基因工程菌的潜力还有待发掘,具有较广阔的研究应用前景。首先,利用宏基因组中获得的新型相关基因构建高效基因工程菌,可进一步解决相关抑制问题。其次,上述提到的方法联合使用可以达到综合改善微生物特征的目的。此外,结合一些化学诱变、ARTP 诱变、genome shuffling 等育种技术,也可以最大限度地提高菌株耐受性从而提高 1,3-PD 的产量。再次采用更多理性、非理性或半理性的方法将 1,3-PD 发酵途径中的关键酶进行改造优化,可提高酶的催化活性,从而提高产量。另外,还可从发酵工艺入手,通过连续发酵或半连续发酵降低底物和产物对生产菌株的抑制作用,提高 1,3-丙二醇的产量。

REFERENCES

- [1] Durgapal M, Kumar V, Yang TH, et al. Production of 1,3-propanediol from glycerol using the newly isolated *Klebsiella pneumoniae* J2B. *Bioresour Technol*, 2014, 159: 223–231.
- [2] Kumar V, Durgapal M, Sankaranarayanan M, et al. Effects of mutation of 2,3-butanediol formation pathway on glycerol metabolism and 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* J2B. *Bioresour Technol*, 2016, 214: 432–440.
- [3] Otte B, Grunwaldt E, Mahmoud O, et al. Genome shuffling in *Clostridium diolis* DSM 15410 for improved 1,3-propanediol production. *Appl Environ Microbiol*, 2009, 75(24): 7610–7616.
- [4] Kaur G, Srivastava AK, Chand S. Bioconversion of glycerol to 1,3-propanediol: A mathematical model-based nutrient feeding approach for high production using *Clostridium diolis*. *Bioresour Technol*, 2013, 142: 82–87.
- [5] Guo Q, An YF, Yun JM, et al. Enhanced D-tagatose production by spore surface-displayed L-arabinose isomerase from isolated *Lactobacillus brevis* PC16 and biotransformation. *Biores Technol*, 2017, 247: 940–946.
- [6] Li XS, Zhang L, Gao DC, et al. Progress on the production of 1,3-propanediol by fermentation. *Chem Ind Eng Prog*, 2014, 36(4): 1395–1403 (in Chinese). 李晓姝, 张霖, 高大成, 等. 发酵法生产 1,3-丙二醇的研究进展. *化工进展*, 2014, 36(4): 1395–1403.
- [7] Oh BR, Hong WK, Heo SY, et al. The production of 1,3-propanediol from mixtures of glycerol and glucose by a *Klebsiella pneumoniae* mutant deficient in carbon catabolite repression. *Bioresour Technol*, 2013, 130: 719–724.
- [8] Wang BG, Liu M, Du CY, et al. Screening of *Klebsiella pneumoniae* mutation for the production of 1,3-propanediol. *China Biotechnol*, 2006, 26(6): 59–65 (in Chinese). 王宝光, 刘铭, 杜晨宇, 等. 产 1,3-丙二醇菌株的诱变和筛选. *中国生物工程杂志*, 2006, 26(6): 59–65.
- [9] Dishisha T, Pereyra LP, Pyo SH, et al. Flux analysis of the *Lactobacillus reuteri* propanediol-utilization pathway for production of 3-hydroxypropionaldehyde, 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Microb Cell Fact*, 2014, 13: 76.
- [10] Wang YP, Sun T, Gao XY, et al. Biosynthesis of platform chemical 3-hydroxypropionic acid (3-HP) directly from CO₂ in cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Metab Eng*, 2016, 34: 60–70.
- [11] Dong XY, Xiu ZL, Li S, et al. Dielectric barrier discharge plasma as a novel approach for improving 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(9): 1245–1250.
- [12] Cui YL, Zhou JJ, Gao LR, et al. Utilization of excess NADH in 2,3-butanediol-deficient *Klebsiella pneumoniae* for 1,3-propanediol production. *J Appl Microbiol*, 2014, 117(3): 690–698.
- [13] Tsuruno K, Honjo H, Hanai T. Enhancement of 3-hydroxypropionic acid production from glycerol by using a metabolic toggle switch. *Microb Cell Fact*, 2015, 14(1):155.
- [14] Pyne ME, Sokolenko S, Liu XJ, et al. Disruption of the reductive 1,3-propanediol pathway triggers production of 1,2-propanediol for sustained glycerol

- fermentation by *Clostridium pasteurianum*. Appl Environ Microbiol, 2016, 82(17): 5375–5388.
- [15] Przystałowska H, Zeyland J, Szymanowska-Powałowska D, et al. 1,3-Propanediol production by new recombinant *Escherichia coli* containing genes from pathogenic bacteria. Microbiol Res, 2015, 171: 1–7.
- [16] Drożdżyńska A, Pawlicka J, Kubiak P, et al. Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei*—newly isolated strains from the enterobacteriaceae. Nat Biotechnol, 2014, 31(5): 402–410.
- [17] Maervoet VET, de Mey M, Beauprez J, et al. Enhancing the microbial conversion of glycerol to 1,3-propanediol using metabolic engineering. Org Process Res Dev, 2011, 15(1): 189–202.
- [18] Zhu CJ, Fang BS, Wang SZ. Bioresource Technology Effects of culture conditions on the kinetic behavior of 1,3-propanediol fermentation by *Clostridium butyricum* with a kinetic model. Bioresour Technol, 2016, 212: 130–137.
- [19] Dong XY, Xiu ZL, Hou YM, et al. Enhanced production of 1,3-propanediol in *Klebsiella pneumoniae* induced by dielectric barrier discharge plasma in atmospheric air. IEEE Trans Plasma Sci, 2009, 37(6): 920–926.
- [20] Gungormusler-Yilmaz M, Cicek N, Levin DB, et al. Cell immobilization for microbial production of 1,3-propanediol. Crit Rev Biotechnol, 2015, 36(3): 482–484.
- [21] Celińska E, Drożdżyńska A, Jankowska M, et al. Genetic engineering to improve 1,3-propanediol production in an isolated *Citrobacter freundii* strain. Process Biochem, 2015, 50(1): 48–60.
- [22] Saxena RK, Anand P, Saran S, et al. Microbial production of 1,3-propanediol: recent developments and emerging opportunities. Biotechnol Adv, 2009, 27(6): 895–913.
- [23] Tan PF, Tan TW. Progress in metabolism and crucial enzymes of glycerol conversion to 1,3-propanediol. Chin J Biotech, 2007, 23(2): 201–205 (in Chinese).
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. 生物工程学报, 2007, 23(2): 201–205.
- [24] Jiang W, Wang SZ, Wang YP, et al. Key enzymes catalyzing glycerol to 1,3-propanediol. Biotechnol Biofuels, 2016, 9(1): 57.
- [25] Kaur G, Srivastava AK, Chand S. Advances in biotechnological production of 1,3-propanediol. Biochem Eng J, 2012, 64: 106–118.
- [26] Qi XH, Qi YL, Yun JH, et al. Research progress on the microbial fermentation of 1,3-propanediol from crude glycerol. J Food Saf Qual, 2015, 6(10): 3923–3927 (in Chinese).
齐向辉, 齐一琳, 员君华, 等. 微生物发酵粗甘油生成 1,3-丙二醇的研究进展. 食品安全质量检测学报, 2015, 6(10): 3923–3927.
- [27] Colin T, Bories A, Moulin G. Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. Appl Microbiol Biotechnol, 2000, 54(2): 201–205.
- [28] Daria SP, Piotr K. Effect of 1,3-propanediol, organic acids, and ethanol on growth and metabolism of *Clostridium butyricum* DSP1. Appl Microbiol Biotechnol, 2015, 99(7): 3179–3189.
- [29] Zeng AP, Menzel K, Deckwer WD. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: II. Analysis of metabolic rates and pathways under oscillation and steady-state conditions. Biotechnol Bioeng, 1996, 52(5): 561–571.
- [30] Oh BR, Seo JW, Heo SY, et al. 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. Bioprocess Biosyst Eng, 2013, 36(6): 757–763.
- [31] Qi XH, Chen YL, Jiang K, et al. Saturation-mutagenesis in two positions distant from active site of a *Klebsiella pneumoniae* glycerol dehydratase identifies some highly active mutants. J Biotechnol, 2009, 144(1): 43–50.
- [32] Qi XH, Guo Q, Wei YT, et al. Enhancement of pH stability and activity of glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae* by rational design. Biotechnol Lett, 2012, 34(2): 339–346.
- [33] Papanikolaou S, Fick M, Aggelis G. The effect of raw glycerol concentration on the production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. J Technol Biotechnol, 2004, 79(11): 1189–1196.

- [34] Kumar V, Ashok S, Park S. Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnol Adv*, 2013, 31(6): 945–961.
- [35] Guo NN, Zheng ZM, Mai YL, et al. Consequences of cps mutation of *Klebsiella pneumoniae* on 1,3-propanediol fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(2): 701–707.
- [36] Stevens MJA, Vollenweider S, Meile L, et al. 1,3-Propanediol dehydrogenases in *Lactobacillus reuteri*: impact on central metabolism and 3-hydroxypropionaldehyde production. *Microb Cell Fact*, 2011, 10: 61.
- [37] Qi XH, Deng WY, Wang F, et al. Molecular Cloning, co-expression, and characterization of glycerol dehydratase and 1,3-propanediol dehydrogenase from *Citrobacter freundii*. *Mol Biotechnol*, 2013, 54(2): 469–474.
- [38] Qi XH, Yun JH, Qi YL, et al. Expression and characterization of a novel 1,3-propanediol dehydrogenase from *Lactobacillus brevis*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2016, 179(6): 959–972.
- [39] Wang BG, Liu M, Du CY, et al. Recent developments in microbial metabolic engineering for the production of 1,3-propanediol. *Chin J Proc Eng*, 2006, 6(1): 144–149 (in Chinese).
王宝光, 刘铭, 杜晨宇. 微生物法生产 1,3-丙二醇过程的代谢工程研究进展. *过程工程学报*, 2006, 6(1): 144–149.
- [40] Yun JH, Yang MM, Magocha TA, et al. Production of 1,3-propanediol using a novel 1,3-propanediol dehydrogenase from isolated *Clostridium butyricum* and co-biotransformation of whole cells. *Bioresour Technol*, 2018, 247: 838–843.
- [41] Zhu JG, Li S, Ji XJ, et al. Enhanced 1,3-propanediol production in recombinant *Klebsiella pneumoniae* carrying the gene *yqhD* encoding 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme. *World J Microbiol Biotechnol*, 2009, 25(7): 1217–1223.
- [42] Huang ZH, Liu M, Zhang YP, et al. Improvement of 1,3-propanediol production by recombinant formate dehydrogenase in *Klebsiella pneumoniae*. *J Chem Ind Eng*, 2007, 58(4): 919–924 (in Chinese).
黄志华, 刘铭, 张延平, 等. 重组甲酸脱氢酶对合成 1,3-丙二醇的促进作用. *化工学报*, 2007, 58(4): 919–924.
- [43] Huang ZH, Zhang YP, Liu M, et al. Expression and characterization of formate dehydrogenase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Acta Microb Sin*, 2007, 47(1): 64–68 (in Chinese).
黄志华, 张延平, 刘铭, 等. 甲酸脱氢酶在 *Klebsiella pneumoniae* 中的表达和功能分析. *微生物学报*, 2007, 47(1): 64–68.
- [44] Ashok S, Raj SM, Rathnasingh C, et al. Development of recombinant *Klebsiella pneumoniae* Δ *dhaT* strain for the co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol from glycerol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(4): 1253–1265.
- [45] Seo MY, Seo JW, Heo SY, et al. Elimination of by-product formation during production of 1,3-propanediol in *Klebsiella pneumoniae* by inactivation of glycerol oxidative pathway. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2009, 84(3): 527–534.
- [46] Abbad-Andaloussi S, Manginot-Durr C, Amine J, et al. Isolation and characterization of *Clostridium butyricum* DSM 5431 mutants with increased resistance to 1,3-propanediol and altered production of acids. *Appl Environ Microb*, 1995, 61(12): 4413–4417.
- [47] Horng YT, Chang KC, Chou TC, et al. Inactivation of *dhaD* and *dhaK* abolishes by-product accumulation during 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2010, 37(7): 707–716.
- [48] Maervoet VET, De Maeseneire SL, Avci FG, et al. 1,3-propanediol production with *Citrobacter werkmanii* DSM17579: effect of a *dhaD* knock-out. *Microb Cell Fact*, 2014, 13(1): 70.
- [49] Guo XK, Fang HY, Zhuge B, et al. Effects of knockout of 2,3-butanediol synthesis key enzyme genes on 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*. *Chin J Biotech*, 2013, 29(9): 1290–1300 (in Chinese).
郭欣坤, 方慧英, 诸葛斌, 等. 2,3-丁二醇代谢途径关键酶基因敲除对克雷伯氏菌发酵产 1,3-丙二醇的影响. *生物工程学报*, 2013, 29(9): 1290–1300.
- [50] Qi XH, Zhang HH, Magocha TA, et al. Improved xylitol production by expressing a novel D-arabitol dehydrogenase from isolated *Gluconobacter* sp. JX-05 and co-biotransformation of whole cells. *Bioresour Technol*, 2017, 235: 50–58.

-
- [51] Lee SM, Hong WK, Heo SY, et al. 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 Ind Microbiol Biotechnol*, 2014, 41(8): 1259–1266.
- [52] Jin P, Lu SG, Huang H, et al. Enhanced reducing equivalent generation for 1,3-propanediol production through cofermentation of glycerol and xylose by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2011, 165(7/8): 1532–1542.
- [53] Xu YZ, Guo NN, Zheng ZM, et al. Metabolism in 1,3-propanediol fed-batch fermentation by a D-lactate deficient mutant of *Klebsiella pneumoniae*. *Biotechnol Bioeng*, 2009, 104(5): 965–972.
- [54] Lin J, Zhang YQ, Xu DF, et al. Deletion of *poxB*, *pta*, and *ackA* improves 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2016, 100(6): 2775–2784.
- [55] Chen LF, Ma CL, Wang RM, et al. Deletion of *ldhA* and *aldH* genes in *Klebsiella pneumoniae* to enhance 1,3-propanediol production. *Biotechnol Lett*, 2016, 38(10): 1769–1774.
- [56] Ma CW, Zhang L, Dai JY, et al. Relaxing the coenzyme specificity of 1,3-propanediol oxidoreductase from *Klebsiella pneumoniae*, by rational design. *J Biotechnol*, 2010, 146(4): 173–178.
- [57] Wei J, Yuan Z, Wang SZ, et al. Directed evolution and resolution mechanism of 1,3-propanediol oxidoreductase from *Klebsiella pneumoniae* toward higher activity by error-prone PCR and bioinformatics. *PLoS ONE*, 2015, 10(11): e0141837.

(本文责编 郝丽芳)