

微生物法生产 1,3-二羟基丙酮代谢工程研究进展

孙丽慧, 胡忠策, 郑裕国, 沈寅初

浙江工业大学生物工程研究所, 杭州 310032

摘要: 1,3-二羟基丙酮是一种重要的化工原料和医药中间体, 广泛应用于化妆品、医药、食品等领域。以下综述了微生物法生产 1,3-二羟基丙酮的代谢途径和关键酶, 以及微生物法生产 1,3-二羟基丙酮所涉及的代谢工程技术的研究进展。指出利用基因工程的方法对菌株进行改造, 提高甘油脱氢酶催化活性, 同时根据菌株的代谢特性, 对发酵过程进行调控, 提高 1,3-二羟基丙酮的得率, 是今后的研究方向。

关键词: 1,3-二羟基丙酮, 代谢工程, 发酵, 甘油

Progress in metabolic engineering of microbial production of 1,3-dihydroxyacetone

Lihui Sun, Zhongce Hu, Yuguo Zheng, and Yinchu Shen

Institute of Bioengineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China

Abstract: 1,3-Dihydroxyacetone is widely used in cosmetics, medicines and food products. We reviewed the recent progress in metabolic pathways, key enzymes, as well as metabolic engineering for microbial production of 1,3-dihydroxyacetone. We addressed the research trend to increase yield of 1,3-dihydroxyacetone by improving the activity of glycerol dehydrogenase with genetic engineering, and regulating of fermentation process based on metabolic characteristic of the strain.

Keywords: 1,3-dihydroxyacetone, metabolic engineering, fermentation, glycerol

1,3-二羟基丙酮 (1,3-Dihydroxyacetone, DHA) 是最简单的酮糖, 外观是白色粉末状结晶, 有甜味, 易溶于水、乙醇、丙酮和乙醚等溶剂。一般状态下是以二聚体 (1,4-Dioxane) 结晶的形式存在, 但经过溶解或加热则变成单体^[1]。由于 DHA 分子中具有 3 个官能团, 其化学性质活泼, 可参与多种反应, 因而作为重要的化学合成中间体和多功能试剂, 在化

工、医药、食品等领域有着广泛的应用^[2]。DHA 的生产方法有化学法和微生物法^[3-5]。化学法合成 DHA 需要价格较高的原料或者较昂贵的金属催化剂, 原料利用率低, 导致生产成本较高, 且对环境污染严重; 而微生物法具有对环境友好、专一性强、反应条件温和、底物利用率高等优点, 越来越受到人们的广泛重视。微生物法生产 DHA 相比化学合成法而

Received: April 22, 2010; **Accepted:** July 7, 2010

Supported by: National Basic Research and Development Program of China (973 Program) (No. 2007CB714306), Key Research and Development Project of Zhejiang Province (No. 2008C01014-2).

Corresponding author: Yuguo Zheng. Tel: +86-571-88320614; Fax: +86-571-88320630; E-mail: zhengyg@zjut.edu.cn

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2007CB714306), 浙江省重大科技专项 (No. 2008C01014-2) 资助。

言, 既符合绿色化工的要求, 又可避免化学合成的困难, 同时可以实现人类社会生产由传统的以不可再生化石资源为原料的石油炼制向以可再生生物质资源为原料的生物炼制转型。

1898 年 Bertrand 首先报道了甘油微生物法生产 DHA^[3]。自上世纪 50-60 年代起, 各国科研人员逐步展开了微生物法生产 DHA 的研究, 并不断深入, 研究内容主要涉及到菌种的诱变筛选、发酵工艺的优化、发酵底物和产物对 DHA 合成的影响、反应动力学等^[6-8]。在国内, 我们于 2001 年率先报道了微生物法转化甘油生产 DHA 的研究^[9], 并开展了发酵工艺优化、产业化放大等研究工作, 已取得了较好的研究开发成果^[5,9-13]。目前国内外学者在代谢工程技术应用于微生物产 DHA 方面的研究也取得了一定的进展, 可以预计对提高 DHA 的生产水平具有重要作用。

1 微生物代谢产 DHA 的途径及关键酶

目前研究发现, 很多微生物都能够利用甘油或甲醇为底物代谢产生 DHA, 利用微生物代谢产生 DHA 通常有两种途径。一种产生 DHA 路线是以甘油为底物, 利用微生物代谢产生的甘油脱氢酶, 将甘油分子结构中 2 位 C 上的羟基进行脱氢反应, 转化成 DHA; 另一种产生路线是以甲醇为底物, 首先将甲醇氧化生成甲醛, 然后与 5-磷酸木酮糖在二羟基丙酮合成酶的作用下生成 DHA 和 3-磷酸甘油醛。

能够产生甘油脱氢酶 (GDH) 的微生物, 如大肠杆菌 *Escherichia coli*^[14]、氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans*^[10,15]、木醋杆菌 *Acetobacter xylinum*^[16]和产气克雷伯氏菌 *Klebsiella aerogenes*^[17]等, 它们都能将甘油代谢转化生成 DHA; 能够产生二羟基丙酮合成酶 (DHAS) 的甲基营养型酵母^[18], 如多形汉逊酵母 *Hansenula polymorpha* 和博伊丁假丝酵母 *Candida boidinii* 等, 能够以甲醇作为底物, 生成 DHA; 另外还有部分甲基营养型酵母既能够产生甘油脱氢酶, 又能产生二羟基丙酮合成酶, 如 Liu 等^[13]从土壤中分离得到一株膜璞毕赤酵母 *Pichia membranifaciens*, 在初始甘油浓度为 40 g/L 的培养基中, 可获得 DHA 13.57 g/L。在上述所有产 DHA

的微生物中, 有关氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans* 的研究报道最多, 该菌种生产性能稳定, 甘油生成 DHA 的转化率高, 是目前用于工业化生产的主要菌株。

微生物中的甘油脱氢酶 (Glycerol dehydrogenase, GDH) 按照其依赖辅酶的情况可划分为 3 种类型^[19]: 第一种为依赖 NAD⁺的 GDH (EC1.1.1.6), 主要存在于细胞质中, 它将甘油转化为 DHA 后, DHA 进一步磷酸化, 进入糖酵解和三羧酸循环途径, 为微生物生长提供能量。GDH (EC1.1.1.6) 存在于多种细菌的细胞质中^[19], 如 *E. coli*、弱氧化醋杆菌 *Acetobacter suboxydans* 和克雷伯氏肺炎杆菌 *Klebsiella pneumonia* 等。第二种 GDH (EC1.1.1.72 和 EC1.1.1.156) 需要以 NADP⁺作为辅酶因子, 这类 GDH 大多存在于霉菌和动物组织中, 如构巢曲霉 *Aspergillus nidulans*、粗糙脉孢霉 *Neurospora crassa*、米曲霉 *Aspergillus oryzae*、深绿木霉 *Trichoderma aureoviride* 等^[20], 可将甘油氧化为 DHA 或甘油醛。第三种 GDH (EC1.1.99.22) 既不依赖 NAD⁺、也不依赖 NADP⁺, 主要存在于葡萄糖酸杆菌属 (氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter oxydans*、弱氧化葡萄糖酸杆菌 *Gluconobacter suboxydans* 等) 的细胞膜上^[21-22]。

在 *G. oxydans* 中, GDH (EC1.1.1.6) 和 GDH (EC1.1.99.22) 往往同时存在。*G. oxydans* 代谢甘油产生 DHA 主要有两条氧化途径 (图 1)^[22-23]。第一条代谢途径是不需要 ATP 和辅酶因子 NAD⁺, 甘油可被细胞膜上的甘油脱氢酶一步直接氧化成 DHA, 这一过程的电子传递链由泛醌、细胞色素 O 和细胞色素 O 还原性酶组成, 氧作为电子受体, 并且该电子传递链与 ADP 氧化磷酸化形成 ATP 的过程相耦合, 当细胞中糖酵解途径及三羧酸循环途径缺乏时, 这条途径可为细胞生长及其他代谢过程提供所需的能量; 第二条代谢途径是甘油进入细胞后, 在细胞质中甘油脱氢酶的作用下生成 DHA, 然后在二羟基丙酮激酶作用下转变为磷酸二羟基丙酮 (DHAP), 或者甘油在磷酸激酶作用下磷酸化成甘油-3-磷酸 (Glycerol-3-P), 然后经细胞质内甘油-3-磷酸脱氢酶作用转变成 DHAP, 再进入磷酸戊糖循环途径, 这一过程需要 ATP, 也需要辅酶因子 NAD⁺。在正常

情况下, 微生物细胞在以甘油作为唯一碳源培养基上生长时, 细胞质中代谢是其能量的主要来源。在没有抑制剂或去耦合试剂存在时, 甘油既在细胞膜上代谢也在细胞质中代谢。

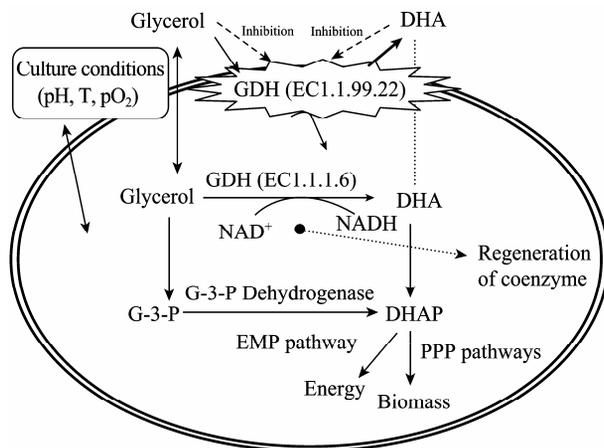


图1 氧化葡萄糖酸杆菌代谢甘油的途径

Fig. 1 Pathways of glycerol metabolism in *G. oxydans*.

以往研究发现, 高浓度基质甘油和高浓度产物 DHA 都会抑制甘油脱氢酶的活性, 进而对发酵过程产生不利的影响。Bories 等^[24]研究发现, 当初始甘油浓度从 50 g/L 提高到 100 g/L, 菌体生长和 DHA 生成能力都明显下降。Ohrem 等^[25]发现, 高浓度的 DHA 会抑制细胞膜系的甘油脱氢酶的活性, 当 DHA 浓度达到 61 g/L 时, 菌体停止生长, 当 DHA 浓度达到 108 g/L 时, 甘油停止转化。为有效消除底物的抑制作用, Bauer 等^[15]研制开发出一种新型的半连续两阶段反复补料发酵工艺, 最终可获得高达 220 g/L 的 DHA, 这是目前国内外所报道的最高产量。

微生物代谢甘油产生 DHA 的关键酶是 GDH, 因此, 除了直接发酵法或静息细胞催化法, 也可以直接利用从微生物细胞中提取获得的 GDH 作为催化剂。然而, 利用 GDH (EC1.1.1.6) 酶催化甘油生产 DHA 的反应需要以 NAD^+ 作为辅酶, 辅酶的价格昂贵, 而且生成的还原型辅酶 NADH 是 NAD^+ 的竞争性抑制剂^[26], 因此有必要对辅酶进行循环再生。近年来, 学者们开始考虑利用双酶耦联反应来解决酶催化过程中的辅酶再生问题。方柏山等将 GDH (EC1.1.1.6) 和 1,3-丙二醇氧化还原酶 (PDOR) 相耦合, 以 3-羟基丙醛和甘油为底物, 利用 GDH 将甘

油还原成 DHA 产生 NADH, 而 PDOR 氧化 3-羟基丙醛生成 1,3-丙二醇和 NAD^+ , 该方法实现了辅酶的再生, 并大大提高了产品得率, 在分批操作条件下, 该酶耦联催化反应产物得率都接近 1 mol/mol^[27]。然而, 底物 3-羟基丙醛稳定性差, 并且酶的分离提纯过程也相对繁琐。在该研究基础上, Nemeth 等^[28]提出了一个相对更为经济的微生物酶催化反应过程 (图 2), 即在膜反应器中, 利用甘油为底物, 加入超声破碎 *K. pneumoniae* 细胞和丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* 细胞获得的粗酶甘油脱水酶 (GDHt)、PDOR 和 GDH, 进行酶催化反应, 同时实现辅酶的再生。目前与辅酶再生相关的酶耦联催化技术仅在实验室中探索研究, 在大规模生产上还受到一定的限制。

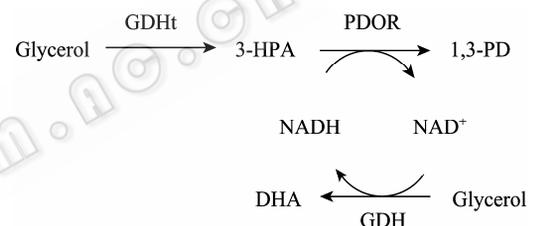


图2 酶耦合催化甘油合成 1,3-丙二醇和 1,3-二羟基丙酮
Fig. 2 Enzymatic bioconversion of glycerol to PD and DHA.

2 代谢工程技术在微生物产 DHA 中的应用

近年来, 随着生物工程技术的迅猛发展, 代谢工程技术已经在生物医药、生物基化学品和生物能源等诸多领域展开了广泛的应用。代谢工程 (Metabolic engineering) 是利用分子生物学原理系统分析代谢途径, 设计合理的遗传修饰战略来定向改善细胞的特性, 或运用重组 DNA 技术来构建新的代谢途径^[29]。国内外学者将代谢工程技术应用于微生物生产 DHA 的研究工作主要包括两个关键方面: 1) 过量表达甘油脱氢酶基因, 改善微生物细胞已有的代谢网络; 2) 将甘油脱氢酶基因在模式宿主菌中表达, 构建新的代谢途径或拓宽菌株的底物利用范围。

基于微生物代谢途径和代谢功能的解析, 在重组 DNA 技术基础之上改善微生物细胞中已有的代谢网络和表达调控网络, 实现生物加工过程的高效率, 是代谢工程的重要内容之一^[30]。根据微生物代

谢产生 DHA 的途径, DHA 的微生物法生产无论采用直接发酵技术还是利用生物催化(整体细胞、酶)技术, 其核心问题是改善微生物细胞性状, 提高关键酶的表达。分子生物学的发展已经能够构建出 DHA 产生途径中的甘油脱氢酶 GDH 过量表达的基因工程菌, 成为 DHA 微生物法生产的重要研究方向。而过量表达目的基因, 强启动子是必不可少的^[31]。Gatgens 等分别利用强启动子 *tufB* 和 *gdh* 使 *G. oxydans* 膜系脱氢酶 *sldAB* 基因过量表达, 不但提高了菌体生长的密度, 还明显提高了 DHA 浓度和转化率。以 550 mmol/L 甘油为底物, 微生物法生产 DHA 的产量可以达到 350 mmol/L, DHA 产量比普通菌提高了 75%^[32]。为缩短克隆周期, 提高克隆效率, Schleyer 等构建了 pEXGOX 克隆和表达载体系统, 该系列载体较小, 仅为 5.7 kb, 序列结构明确, 易于操作和改造, 具有 *tufB* 强启动子, 能高效克隆和表达 *G. oxydans* 基因, 并可以直接克隆平末端 PCR 产物^[33]。

除将 *G. oxydans* 中甘油脱氢酶过量表达以外, 也有学者考虑利用基因重组技术在宿主菌中表达异源甘油脱氢酶基因来提高 DHA 的产率。大肠杆菌和酿酒酵母菌是目前最常用基因工程宿主菌, 它们的生理和遗传机制、基因组信息、代谢网络模型都研究的比较透彻^[29], 同时大肠杆菌和酿酒酵母本身都具有代谢产生 DHA 的甘油脱氢酶, 只是产 DHA 的能力很低。因此, 以它们为宿主细胞, 结合有效的遗传操作技术, 改造后的菌种产 DHA 能力能够显著提高。魏东芝等研究以沙门氏菌、克雷伯氏菌、醋酸杆菌、志贺氏菌、大肠杆菌或氧化葡萄糖杆菌基因组 DNA 为模板, PCR 扩增获得编码甘油脱氢酶基因 *gdh* 和编码 NADH 脱氢酶基因 *ndh*, 利用 PET 系列表达载体分别构建基因工程质粒 pET-*gdh* 和 pET-*ndh*, 并将其分别或共同转入大肠杆菌中。利用该重组菌代谢甘油生产 DHA, 提高了 DHA 的产率, 同时收集到的菌体经处理后可重复利用^[34]。

代谢工程技术在 DHA 生产中应用的另一个重要方向是根据微生物代谢甘油产 DHA 的途径和关键酶, 从降低 DHA 的生产成本角度考虑, 利用基因工程技术改造菌种, 改变微生物的代谢性能, 使其

将底物食谱扩展到诸如葡萄糖和淀粉之类廉价而丰富的可再生原料, 这也是 DHA 规模化生产使其在同类产品中更具竞争力的一个研究方向, 值得我们予以特别关注。Nguyen 等提出了利用能够代谢葡萄糖产生甘油的酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 为出发菌株, 并导入能够表达甘油脱氢酶的外源基因, 以实现利用葡萄糖为底物来发酵生成 DHA (图 3)。作者分别将来源于 *H. polymorpha* 和 *E. coli* 中的甘油脱氢酶基因在 *S. cerevisiae* 中进行表达, 构建转化甘油生成 DHA 的途径, 结果表明来源于 *H. polymorpha* 依赖 NAD⁺ 的甘油脱氢酶基因在酵母中表达后, 其催化活力相对较高, 在葡萄糖浓度为 20 g/L 的摇瓶中发酵培养, DHA 浓度可达 100 mg/L, 是野生株产量的 5 倍; 此外, 为阻断 DHA 进一步被二羟丙酮激酶转化生成 DHAP, 作者还研究了将编码二羟丙酮激酶的基因 *DAK1/DAK2* 敲除 (图 3), 同时过量表达 *H. polymorpha* 甘油脱氢酶基因, 在同样发酵条件下, DHA 产量可提高到 700 mg/L^[35]。与国内文献所报道的 DHA 发酵最好水平相比, 虽然当前利用工程菌生产 DHA 的发酵水平还相对较低, 但这些研究反过来对代谢工程方法应用于 DHA 生产产生了有力的推动作用, 为该领域研究提出了一个很好的发展方向。

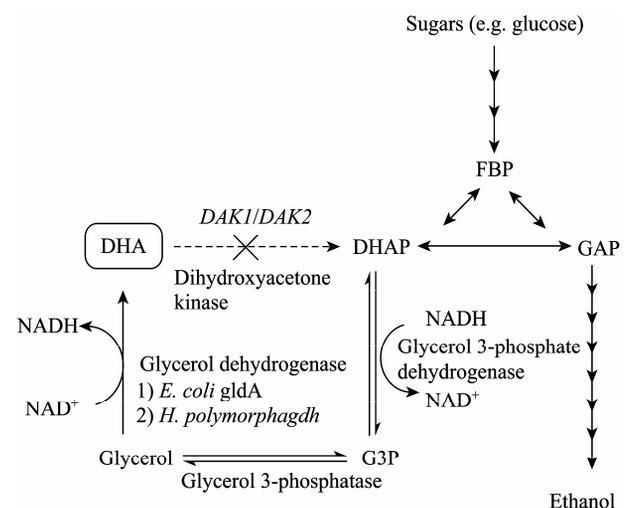


图 3 *Saccharomyces cerevisiae* 利用葡萄糖产 1,3-二羟基丙酮的代谢途径和工程育种策略

Fig. 3 Metabolic pathways and engineering strategy for the production of DHA from glucose in *Saccharomyces cerevisiae*. FBP: 1,6-fructose biphosphate; GAP: glyceraldehydes 3-phosphate; DHAP: dihydroxyacetone phosphate; G3P: glycerol 3-phosphate.

3 总结与展望

甘油作为生物柴油的主要副产物,其下游产品有 DHA、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、丙烯醛、乙二醇、3-羟基丙酸、3-羟基丙醛、环氧氯丙烷等,其中 DHA 作为一种重要的化工原料和医药中间体,其后续衍生产品种类很多,且衍生产品市场容量大,因而 DHA 的市场潜力很大。

目前,微生物发酵法工业化生产 DHA 主要分布在美国、日本、德国。我国虽然起步相对较晚,但近年来也取得了喜人的研究成果。魏东芝教授课题组在微生物细胞固定化产 DHA 和基因重组工程菌方面做了很多研究工作^[8,34]。我们所在团队的浙江工业大学生物工程研究所近十余年来对微生物法生产 DHA 也做了大量的工作,包括建立了产 DHA 菌株的快速筛选模型^[5];对筛选得到高产 DHA 的微生物菌株 *G. oxydans* 在发酵过程中的代谢特性进行研究,通过分阶段培养来控制代谢流的分配,提高了目标产物浓度和转化率;同时对产物后续分离工艺也进行了研究,能够得到高纯度的 DHA 产品,符合化妆品添加剂、医药中间体等质量指标。现已在浙江海正药业股份有限公司完成 10 t 发酵罐规模的生产性试验,构建了年产 1 000 t 的 DHA 生产线,在生产规模下产物浓度达到 250 g/L 以上,并且还有进一步提升的潜力和空间,发酵水平明显高于目前国内外报道的最好水平(采用半连续两阶段反复补料发酵工艺,最终可获得高达 220 g/L 的 DHA)^[15]。我们将这些研究成果已经成功地进行了产业化,生产菌种和生产工艺拥有自主知识产权^[36-39],技术指标达到国际领先水平,产品已经在浙江海正药业股份有限公司开始生产和销售。

综观国内外的研究现状,尽管对微生物法生产 DHA 的研究取得了一定的进展,DHA 的发酵技术已经推上了产业化,但代谢工程技术应用在微生物生产 DHA 的研究报道还不多见,仍有许多研究和开发工作有待进行。一方面,可以利用基因工程的方法对菌株进行改造,提高甘油脱氢酶催化活性,并使其耐受高浓度底物和产物;另一方面,根据微生物的代谢特性,对发酵过程进行代谢调控,合理地

设计发酵工艺,增加 DHA 途径的代谢流分配,使底物甘油最大程度地转化为 DHA,减少代谢过程中的副产物,这样既可以提高产物浓度,又降低了分离成本。同时,还要充分开发 DHA 下游产品,拓宽 DHA 的应用范围。

REFERENCES

- [1] Zelikin AN, Putnam D. Poly (carbonate-acetal)s from the dimer form of dihydroxyacetone. *Macromolecules*, 2005, **38**(13): 5532-5537.
- [2] Mishra R, Jain SR, Kumar A. Microbial production of dihydroxyacetone. *Biotechnol Adv*, 2008, **26**(4): 293-303.
- [3] Xu XJ, Chen X, Jin MF, *et al.* Advance in dihydroxyacetone production by microbial fermentation. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(6): 903-908.
许晓菁, 陈询, 晋明芬, 等. 微生物法生产二羟基丙酮的研究进展. *生物工程学报*, 2009, **25**(6): 903-908.
- [4] Dimitratos N, Francesca P, Prati L. Au, Pd (mono and bimetallic) catalysts supported on graphite using the immobilisation method synthesis and catalytic testing for liquid phase oxidation of glycerol. *Appl Catal A Gen*, 2005, **291**(1/2): 210-214.
- [5] Hu ZC, Zheng YG. A high throughput screening method for 1,3-dihydroxyacetone producing bacterium by cultivation in a 96-well microtiter plate. *J Rapid Meth Aut Microbiol*, 2009, **17**(2): 233-241.
- [6] Ma LJ, Lu WY, Xia ZD, *et al.* Enhancement of dihydroxyacetone production by a mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Biochem Eng J*, 2010, **49**(1): 61-67.
- [7] Hekmat D, Bauer R, Fricke J. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioproc Biosyst Eng*, 2003, **26**(2): 109-116.
- [8] Wei SH, Song QX, Wei DZ. Repeated use of immobilized *Gluconobacter oxydans* cells for conversion of glycerol to dihydroxyacetone. *Prep Biochem Biotechnol*, 2007, **37**(1): 67-76.
- [9] Zheng YG, Zhang X, Shen YC. Screening of 1,3-dihydroxyacetone-producing strain using glycerol as bioconversion substrate. *J Zhejiang Univ Tech*, 2001, **29**(2): 124-127.
郑裕国, 张霞, 沈寅初. 微生物转化甘油生产 1,3-二羟基丙酮的菌株筛选. *浙江工业大学学报*, 2001, **29**(2): 124-127.
- [10] Hu ZC, Liu ZQ, Zheng YG, *et al.* Production of 1,3-dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter*

- oxydans* ZJB09112. *J Microbiol Biotech*, 2010, **20**(2): 340–345.
- [11] Ma J, Hu ZC, Zheng YG. Development and application of bio-based 1,3-dihydroxy acetone as new lean-type feed additive. *Mod Agri Tech*, 2009, **10**(20): 332–333.
马骏, 胡忠策, 郑裕国. 新型瘦肉型饲料添加剂生物基 1,3-二羟基丙酮的开发与应用. *现代农业科技*, 2009, **10**(20): 332–333.
- [12] Wang LL, Qian J, Hu ZC, *et al.* Determination of dihydroxyacetone and glycerol in fermentation broth by pyrolytic methylation/gas chromatography. *Anal Chim Acta*, 2006, **557**(1/2): 262–265.
- [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. *Biochem Eng J*, 2008, **38**(3): 285–291.
- [14] Asnis RE, Brodie AF. A glycerol dehydrogenase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1953, **203**(1): 153–159.
- [15] 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. *Bioproc Biosyst Eng*, 2005, **28**(1): 37–43.
- [16] Nabe K, Izuo N, Yamada S, *et al.* Conversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized whole cells of *Acetobacter xylinum*. *Appl Environ Microbiol*, 1979, **38**(6): 1056–1060.
- [17] Streekstra H, Teixeira de Mattos MJ, Neijssel OM, *et al.* Overflow metabolism during anaerobic growth of *Klebsiella aerogenes* NCTC 418 on glycerol and dihydroxyacetone in chemostat culture. *Arch Microbiol*, 1987, **147**(3): 268–275.
- [18] Kato N, Shima H, Sakazawa C. Dihydroxyacetone production from methanol by a dihydroxyacetone kinase deficient mutant of *Hansenula polymorpha*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1986, **23**(3/4): 180–186.
- [19] Ameyama M, Shinagawa E, Matsushita K, *et al.* Solubilization, purification and properties of membrane-bound glycerol dehydrogenase from *Gluconobacter industrius*. *Agric Biol Chem*, 1985, **49**(4): 1001–1010.
- [20] Yamada H, Nagao A, Nishise H, *et al.* Formation of glycerol dehydrogenase by microorganisms. *Agric Biol Chem*, 1982, **46**(9): 2325–2331.
- [21] Claret C, Bories A, Soucaille P. Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. *Curr Microbiol*, 1992, **25**(3): 149–155.
- [22] Claret C, Salmon JM, Romieu C, *et al.* Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **41**(3): 359–365.
- [23] Deppenmeier U, Ehrenreich A. Physiology of acetic acid bacteria in light of the genome sequence of *Gluconobacter oxydans*. *J Mol Microb Biotech*, 2009, **16**(1/2): 69–80.
- [24] Bories A, Claret C, Soucaille P. Kinetic study and optimisation of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem*, 1991, **26**(4): 243–248.
- [25] Ohrem HL, Voß H. Process model of the oxidation of glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochem*, 1996, **31**(3): 295–301.
- [26] Nishise H, Nagao A, Tani Y, *et al.* Further characterization of glycerol dehydrogenase from *Cellulomonas* sp. NT 3060. *Biol Chem*, 1984, **6**(48): 1603–1609.
- [27] Fang BS, Chen HW. Process for preparing 1,3-propylene glycol and dihydroxy acetone by bio-catalytic conversion of glycerol: CN, 1840668 A. 2006-01-27.
方柏山, 陈宏文. 一种由生物催化转化甘油制备 1,3-丙二醇和二羟基丙酮的方法: CN, 1840668 A. 2006-01-27.
- [28] Nemeth A, Balassy A, Sevelia B. Difficulties and solutions for the assays of the key enzymes of a new enzymatic glycerol bioconversion. *Period Polytech Chem Eng*, 2008, **52**(1): 17–22.
- [29] Zhang XL. Twenty years development of metabolic engineering—a review. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(9): 1285–1295.
张学礼. 代谢工程发展 20 年. *生物工程学报*, 2009, **25**(9): 1285–1295.
- [30] Li Y. Metabolic engineering: an evolving technology for strain improvement. *Chin J Biotech*, 2009, **25**(9): 1281–1294.
李寅. 代谢工程: 一项不断发展的菌株改造技术. *生物工程学报*, 2009, **25**(9): 1281–1294.
- [31] Li Y, Cao ZA. Microbial metabolic engineering: gateway to development for cell factories. *J Chem Ind Eng*, 2004, **55**(10): 1573–1580.
李寅, 曹竹安. 微生物代谢工程: 绘制细胞工厂的蓝图. *化工学报*, 2004, **55**(10): 1573–1580.
- [32] Gatgens C, Degner U, Bringer-Meyer S, *et al.* Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**(3): 553–559.
- [33] Schleyer U, Bringer-Meyer S, Sahm H. An easy cloning and expression vector system for *Gluconobacter oxydans*. *Int J Food Microbiol*, 2008, **125**(1): 91–95.
- [34] Wei DZ, Ma XY, Zheng Y, *et al.* Gene engineering bacteria for producing dihydroxy acetone, constructing

- method, and application: CN, 101092604 A. 2007-05-17.
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: CN, 101092604 A. 2007-05-17.
- [35] Nguyen HTT, Nevoigt E. Engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the production of dihydroxyacetone (DHA) from sugars: a proof of concept. *Met Eng*, 2009, **11**(6): 335-346.
- [36] Zheng YG, Hu ZC, Liu ZQ, *et al.* Producing dihydroxy acetone by microbe method: CN, 1821418 A. 2005-12-13.
郑裕国, 胡忠策, 柳志强, 等. 微生物法生产二羟基丙酮: CN, 1821418 A. 2005-12-13.
- [37] Zheng YG, Hu ZC, Liu ZQ, *et al.* *Bacillus licheniformis* B-05571 and application in preparation of dihydroxy acetone: CN, 101037659 A. 2006-09-22.
郑裕国, 胡忠策, 柳志强, 等. 地衣芽胞杆菌 B-05571 及其在制备 1,3-二羟基丙酮中的应用: CN, 101037659 A. 2006-09-22.
- [38] Zheng YG, Hu ZC. Method for producing dihydroxyacetone through microbial transformation: CN, 101591681 A. 2009-04-13.
郑裕国, 胡忠策. 一种微生物转化生产二羟基丙酮的方法: CN, 101591681 A. 2009-04-13.
- [39] Zheng YG, Wang YJ, Hu ZC. Lean-type feed additive and application thereof: CN, 101524119 A. 2009-04-16.
郑裕国, 王亚军, 胡忠策. 一种瘦肉型饲料添加剂及其应用: CN, 101524119 A. 2009-04-16.

《生物工程学报》对摘要的写作要求

1. 研究报告摘要: 基本要素包括研究目的、方法、结果和结论 (不用单列标题书写)。目的 (Purpose): 主要说明作者写此文章的目的, 或说明本文主要要解决的问题; 方法 (Methods): 重点说明作者的主要工作过程及使用的方法。应用性文章如需要, 可注明条件、使用的主要设备和仪器。结果 (Results): 本文最后得出的结果 (实验数据部分)。结论 (Conclusions): 如系基础研究, 应写明本文的创新之处, 及文章在讨论部分表述的观点; 如系应用性研究, 应尽可能提及本文结果和结论的应用范围和应用情况或应用前景。

2. 综述摘要: 包括论述内容的发展水平、自己的评论及展望, 尤其要注意结合自己的研究工作。

3. 英文摘要的撰写要点: 英文摘要的内容应与中文摘要一致, 但比中文摘要更详尽。英文摘要完成后, 务必请英文较好、且专业知识强的专家审阅定稿后再返回编辑部。凡不符合要求的, 即使学术上可以达到刊出的水平, 本刊也将推迟发表。

(1) 建议使用第一人称, 尽量不使用第三人称和被动语态。

(2) 建议用主动语态, 被动语态表达拖拉模糊尽量不用, 这样可以免好多长句, 以求简单清晰。

(3) 尽量使用清晰简练的短句, 避免很长的句子。注意正确使用英文写作习惯和语法。

(4) 摘要应当使用过去时态, 语法正确, 句子通顺。

(5) 摘要中避免使用缩写语, 除非是那些人人皆知的 (如DNA、ATP等), 或者确实是非常长, 而且出现多次的短语才允许用缩写语, 并且在第一次出现时要写出全称。

(6) 在英语摘要中, 不要使用任何汉字字符, 包括标点、括号、温度、希腊字母等。

(7) 句子的开头处最好不要使用数字。