

• 材料单体生物合成 •

刘立明 江南大学教授、博士生导师，教育部长江学者计划特聘教授。主要从事微生物发酵工程的研究与教学工作。主要研究领域为合成生物学和蛋白质工程。作为负责人先后负责国家重点研发计划、国家自然科学基金(重点、优青、面上)项目、江苏省前沿科技引领等国家或省部级项目 20 余项。在 *Nature Catalysis*、*Nature Communications*、*Chemical Reviews*、*Metabolic Engineering*、*Green Chemistry*、《微生物学报》《生物工程学报》等国内外主流学术期刊上发表学术论文 260 余篇，其中 SCI 论文 190 余篇(最高 IF=70)，授权发明专利 70 余项，出版科技著作 4 部。主要研究成果包括国家技术发明二等奖(第三)、教育部科技进步一等奖(第一)、江苏省自然科学一等奖(第三)、中国石油与化学工业技术发明一等奖(第二)等。



代谢工程改造克雷伯氏菌生产 1,3-丙二醇

张少伦，高聪，李晓敏，刘佳，陈修来，刘立明*

江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室，江苏 无锡 214122

张少伦，高聪，李晓敏，刘佳，陈修来，刘立明. 代谢工程改造克雷伯氏菌生产 1,3-丙二醇[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2386-2402.

ZHANG Shaolun, GAO Cong, LI Xiaomin, LIU Jia, CHEN Xiulai, LIU Liming. Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* for 1,3-propanediol production[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2386-2402.

摘 要: 1,3-丙二醇是生产聚对苯二甲酸丙二醇酯(polytrimethylene terephthalate, PTT)的重要单体，目前主要通过微生物发酵法生产，但这种方法生产效率低下，限制了 1,3-丙二醇的高效生物制造。为解决这一问题，本研究首先利用常压室温等离子(atmospheric room temperature plasma, ARTP)诱变技术，经过高通量筛选，成功获得了一株具有较高渗透压耐受性的菌株，其 1,3-丙二醇产量达 87 g/L。在此基础上，进一步筛选出了适合克雷伯氏菌的基因表达元件，并通过代谢工程改造，阻断冗余代谢支路(敲除 *ldhA*、*budA*、*aldA* 基因)，同时强化合成路径(过表达 *dhaB*、*yqhD* 基因)，使得改造后的工程克雷伯氏菌的 1,3-丙二醇产量提升至 107 g/L。最终，在 5 L 发酵罐中，通过优化发酵过程参数，最优工程菌株 KP-FMME-6 的 1,3-丙二醇产量达到 118 g/L，甘油转化率为 42%，生产强度达到 2.46 g/(h·L)。本研究为 1,3-丙二醇的工业化生产提供了有效的借鉴和参考。

关键词: 1,3-丙二醇；克雷伯氏菌；高通量筛选；代谢工程

资助项目：国家自然科学基金创新群体项目(32021005)

This work was supported by the Science Fund for Creative Research Groups of the National Natural Science Foundation of China (32021005).

*Corresponding author. E-mail: mingll@jiangnan.edu.cn

Received: 2024-02-21; Accepted: 2024-03-16

Metabolic engineering of *Klebsiella pneumoniae* for 1,3-propanediol production

ZHANG Shaolun, GAO Cong, LI Xiaomin, LIU Jia, CHEN Xiulai, LIU Liming*

Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: 1,3-propanediol is an important monomer for the production of polytrimethylene terephthalate (PTT). Currently, it is mainly produced by microbial fermentation, which, however, has low production efficiency. To address this problem, this study employed atmospheric room temperature plasma (ARTP) mutagenesis technology and high-throughput screening to obtain a strain with high tolerance to osmotic pressure, which achieved a 1,3-propanediol titer of 87 g/L. Furthermore, the gene expression elements suitable for *Klebsiella pneumoniae* were screened, and metabolic engineering was employed to block redundant metabolic pathways (deletion of *ldhA*, *budA*, and *aldA*) and enhance the synthesis pathway (overexpression of *dhaB* and *yqhD*). The titer of 1,3-propanediol produced by the engineered strain increased to 107 g/L. Finally, in a 5 L fermenter, the optimal strain KP-FMME-6 achieved a 1,3-propanediol titer of 118 g/L, with a glycerol conversion rate of 42% and productivity of 2.46 g/(h·L), after optimization of the fermentation parameters. This study provides a reference for the industrial production of 1,3-propanediol.

Keywords: 1,3-propanediol; *Klebsiella pneumoniae*; high-throughput screening; metabolic engineering

1,3-丙二醇(1,3-propanediol, 1,3-PDO)是一种重要的精细化工原料和医药中间体,主要用作聚酯和聚氨酯的合成单体。1,3-丙二醇的生产方法主要分为化学合成法和生物合成法。化学合成法主要包括丙烯醛水解法和环氧乙烷羰基化法。(1) 丙烯醛水解法:以丙烯醛为原料,经水合制成 3-羟基丙醛,然后催化加氢制得 1,3-丙二醇。由于丙烯醛自身的不稳定性会使其水合反应效率低,而且丙烯醛属剧毒易燃易爆品,难以储运和运输,同时反应过程中涉及贵金属催化,生产成本较高,该工艺已退出市场;(2) 环氧乙烷羰基化法:以乙烯为原料,在 280 °C 下用银催化剂氧化成环氧乙烷,随后环氧乙烷在 90 °C、10 MPa 条件下,外加催化剂作用生成 1,3-丙二醇。环氧乙烷羰基化法因为其技术难度大、设

备投资高、催化剂体系复杂也已退出市场^[1]。

利用微生物合成 1,3-丙二醇具有绿色可持续的优势,是目前主要的生产工艺,根据所使用底物的不同,可分为以葡萄糖为原料及以甘油为原料的 2 种工艺路线^[2-5]:(1) 以葡萄糖为原料。使用葡萄糖为底物生产 1,3-丙二醇使用的底盘菌株多为大肠杆菌(*Escherichia coli*),由于大肠杆菌体内不存在直接将葡萄糖转化为 1,3-丙二醇的代谢路线,所以需要将酿酒酵母的 *dar1* (编码甘油-3-磷酸脱氢酶)和 *gpp2* (编码甘油-3-磷酸酶)基因转入大肠杆菌,使葡萄糖可以在大肠杆菌内转化为甘油,同时转入克雷伯氏菌来源的 1,3-丙二醇合成路径基因 *dhaB1*、*dhaB2*、*dhaB3*、*dhaBX* 和 *orfX* 使甘油转化为 1,3-丙二醇^[6]。例如,杜邦公司在上述基础上,

通过敲除 *glpK* (编码甘油激酶)和 *gldA* (编码甘油脱氢酶),阻止甘油进入碳代谢通路,并表达 *tpi* (编码磷酸三糖异构酶)使甘油 3-磷酸到磷酸二羟基丙酮的双向反应变为单向反应,构建的工程菌株在添加辅酶 VB_{12} 条件下,1,3-丙二醇产量为 135 g/L,得率为 0.50 g/g 葡萄糖^[7];北京化工大学谭天伟团队在大肠杆菌中设计了以葡萄糖为底物、天冬氨酸为前体的 1,3-丙二醇合成新路径,其 1,3-丙二醇产量在 5 L 发酵罐中为 11 g/L,但无须添加辅酶 VB_{12} ^[8]。(2) 以甘油为原料。自然界中一些菌株,如肺炎克雷伯菌、丁酸梭菌、巴氏梭菌、弗氏柠檬酸杆菌、短乳杆菌,可以利用甘油为底物,天然合成 1,3-丙二醇。在厌氧或微需氧条件下,甘油首先通过 VB_{12} 依赖性的甘油脱水酶转换为 3-羟基丙醛(3-hydroxypropanal, 3-HPA),后者被 NADH 依赖性 1,3-PDO 氧化还原酶还原为 1,3-丙二醇。目前,以甘油为原料的 1,3-丙二醇生产工艺大多采用克雷伯氏菌为底盘^[9-12]。例如,清华大学刘德华教授团队通过对克雷伯氏菌的苹果酸酶基因进行过表达,增强了克雷伯氏菌三羧酸循环代谢通量,最终 1,3-丙二醇产量达 106 g/L,得率为 0.41 g/g 甘油^[13];华东理工大学宫衡教授团队通过在变栖克雷伯氏菌中增强基因 *tqsA* (编码转运蛋白 AI-2)的表达,工程菌株的 1,3-丙二醇产量达 85 g/L,得率为 0.50 g/g 甘油^[14]。以甘油作为底物用于生产 1,3-丙二醇比以葡萄糖为底物拥有更高的理论得率。但甘油作为生物柴油的主要副产物,在价格成本上受生物柴油产业影响波动较大,且相比于葡萄糖并无价格优势。因此如何提高甘油转化率及 1,3-丙二醇产量成为未来需要重点关注的研究方向。

本团队自无锡市蠡湖湖底淤泥中分离筛选获得了一株高产 1,3-丙二醇的克雷伯氏肺炎杆菌

KP-wt。本研究以该菌株为研究对象,通过高通量筛选辅助的常压室温等离子(atmospheric room temperature plasma, ARTP)诱变技术并借助代谢工程策略,构建了一株重组克雷伯氏菌,该菌株在 5 L 发酵罐中 1,3-丙二醇产量为 118 g/L。本研究为未来 1,3-丙二醇的工业化生产提供了技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株、质粒和引物

本研究所使用的重组质粒、工程菌株及引物分别见表 1、表 2 和表 3。

1.1.2 仪器和试剂

PCR 扩增仪、凝胶成像仪、核酸胶电泳仪、电穿孔仪, Bio-Rad 公司;恒温培养箱,上海跃进医疗器械有限公司;超声波清洗机,昆山市超声仪器有限公司;紫外可见分光光度计,岛津企业管理(中国)有限公司;M-100 生物传感器,深圳市希尔曼科技有限公司;精密 pH 计, METTLER 公司;高速离心机, Eppendorf 公司; CHB-202 恒温金属浴, Bioer Technology 公司; 5 L 发酵罐, 迪必尔生物工程(上海)有限公司。

Prime Star 高保真酶、DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司; *Taq* DNA 聚合酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司;单片段一步同源重组酶、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、细菌基因组提取试剂盒购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司;PCR 引物由苏州金唯智生物科技有限公司合成;其他试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.1.3 培养基

种子培养基(g/L): 硫酸铵 1, 三水磷酸氢二钾 3.2, 磷酸二氢钾 1.4, 七水硫酸镁 0.2, 酵母粉 1, 甘油 25, 微量元素溶液 1.2 mL。

表 1 本研究所用的质粒

Table 1 Plasmids used in this study

Plasmids	Relevant characteristics	Sources
pEM- <i>mkate</i>	P _{T5} , Kan ^R , fl ori, <i>mkate</i>	Laboratory storage
pCasKP-Apr	P _{Cat} , Apr ^R , Psc101 ori	Laboratory storage
pSGKP-Kan	P _{J23119} , Kan ^R , fl ori	Laboratory storage
pEM-Tac	P _{Tac} , Kan ^R , fl ori, <i>mkate</i> , test promtor P _{Tac}	This study
pEM-Trc	P _{Trc} , Kan ^R , fl ori, <i>mkate</i> , test promtor P _{Trc}	This study
pEM-KP	P _{Kp} , Kan ^R , fl ori, <i>mkate</i> , test promtor P _{Kp}	This study
pEM-Tac-RBS30	pEM-Tac, RBS30, <i>mkate</i> , test promtor P _{Tac} and RBS30	This study
pEM-Tac-RBS34	pEM-Tac, RBS34, <i>mkate</i> , test promtor P _{Tac} and RBS34	This study
pEM-Tac-RBS64	pEM-Tac, RBS64, <i>mkate</i> , test promtor P _{Tac} and RBS64	This study
pEM-Kp-RBS30	pEM-Kp, RBS30, <i>mkate</i> , test promtor P _{Kp} and RBS30	This study
pEM-Kp-RBS34	pEM-Kp, RBS34, <i>mkate</i> , test promtor P _{Kp} and RBS34	This study
pEM-Kp-RBS64	pEM-Kp, RBS64, <i>mkate</i> , test promtor P _{Kp} and RBS64	This study
pEM-T5-RBS30	pEM-T5, RBS30, <i>mkate</i> , test promtor P _{T5} and RBS30	This study
pEM-T5-RBS34	pEM-T5, RBS34, <i>mkate</i> , test promtor P _{T5} and RBS34	This study
pEM-T5-RBS64	pEM-T5, RBS64, <i>mkate</i> , test promtor P _{T5} and RBS64	This study
pSGKP- <i>ldhA</i>	pSGKP, <i>ldhA</i> -N20, Donor	This study
pSGKP- <i>budA</i>	pSGKP, <i>budA</i> -N20, Donor	This study
pSGKP- <i>aldA</i>	pSGKP, <i>aldA</i> -N20, Donor	This study
pSGKP- <i>ackA</i>	pSGKP, <i>ackA</i> -N20, Donor	This study

表 2 本研究所用的菌株

Table 2 Strains used in this study

Strains	Relevant characteristics	Sources
KP-wt	Wild-type <i>Klebsiella pneumoniae</i> strain	Laboratory storage
KP-AR14	After ARTP mutagenesis breeding from KP-wt	This study
KP-01	KP-AR14Δ <i>ldhA</i>	This study
KP-02	KP-AR14Δ <i>budA</i>	This study
KP-03	KP-AR14Δ <i>aldA</i>	This study
KP-04	KP-AR14Δ <i>ackA</i>	This study
KP-05	KP-AR14 H- <i>dhaB</i>	This study
KP-06	KP-AR14 H- <i>yqhD</i>	This study
KP-07	KP-AR14Δ <i>ldhA</i> Δ <i>budA</i> Δ <i>aldA</i>	This study
KP-FMME-1	KP-07 H- <i>dhaB</i> -H- <i>yqhD</i>	This study
KP-FMME-2	KP-07 H- <i>dhaB</i> -M- <i>yqhD</i>	This study
KP-FMME-3	KP-07 H- <i>dhaB</i> -L- <i>yqhD</i>	This study
KP-FMME-4	KP-07 M- <i>dhaB</i> -H- <i>yqhD</i>	This study
KP-FMME-5	KP-07 M- <i>dhaB</i> -M- <i>yqhD</i>	This study
KP-FMME-6	KP-07 M- <i>dhaB</i> -L- <i>yqhD</i>	This study
KP-FMME-7	KP-07 L- <i>dhaB</i> -H- <i>yqhD</i>	This study
KP-FMME-8	KP-07 L- <i>dhaB</i> -M- <i>yqhD</i>	This study
KP-FMME-9	KP-07 L- <i>dhaB</i> -L- <i>yqhD</i>	This study

表3 本研究所用的引物

Table 3 Primers used in this study

Primers	Sequences (5'→3')	Size (bp)
Tac-pEM-F	TTGACAATTAATCATCGGCTCGTATAATGGATTCAATTGTGAGCGGATA	49
Tac-pEM-R	AGCCGATGATTAATTGTCAATTTCTAGGCTACGCCGGACGCATCG	46
Trc-pEM-F	TTGACAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGGATTCAATTGTGAGCGGATA	50
Trc-pEM-R	AGCCGATGATTAATTGTCAATTTCTAGGCTACGCCGGACGCATCG	46
KP-pEM-F	CCTGAAGCGAGAAGGTATATTGATTCAATTGTGAGCGGATA	41
KP-pEM-R	AGCCGATGATTAATTGTCAATTTCTAGGCTACGCCGGACG	41
<i>ldhA</i> -N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTTGGTCGCACTCCTCGGTATAGTTTTAGAGCTAGAAATAG	58
<i>budA</i> -N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTGCTGATCGCCTTCAGCAGTCGTTTTAGAGCTAGAAATAG	58
<i>aldA</i> -N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTCTGGGGGTGACCACCGGGATGTTTTAGAGCTAGAAATAG	58
<i>ackA</i> -N20-F	TCCTAGGTATAATACTAGTACACCGCGCTGATGGACGGCGTTTTAGAGCTAGAAATAG	58
N20-KZ-R	ACTAGTATTATACCTAGGACTGAGCTAGCTGTCA	41
UP- <i>ldhA</i> -F	CCGGTTTATTCCTTCCCAGC	20
UP- <i>ldhA</i> -R	GTACTTGAGATCTGAATCGGCAGCCTGCGAGTCA	34
Down- <i>ldhA</i> -F	ATTCAGATCTCAAGTACGAACAGCAGG	27
Down- <i>ldhA</i> -R	AAACAGTGTTTCTCCATAAACACG	25
UP- <i>budA</i> -F	TGTTGCCGATTTCTGGGGTAATTA	25
UP- <i>budA</i> -R	TCCATCTTATGCTCGCTTGAGGCAGCACAGGCCGATAG	40
Down- <i>budA</i> -F	AAGCGAGGCAATAAGATGGATTATA	25
Down- <i>budA</i> -R	CAGCCCGGGATGTACACATCGACCG	25
UP- <i>aldA</i> -F	GGCTGATAGCTGGTCATACT	20
UP- <i>aldA</i> -R	AACTTCGAAGCAGCTCCAGCAATGCTCTCCTGATAATGTT	40
Down- <i>aldA</i> -F	GCTGGAGCTGCTTCGAAGTT	20
Down- <i>aldA</i> -R	TCGCCAGCGTCAACTGGTTT	20
UP- <i>ackA</i> -F	TTTCAGCGTTCAGCGTTTTG	20
UP- <i>ackA</i> -R	TATCATAAAAAGGTACTTCTTCCACATCGCCAGCCCTGA	40
Down- <i>ackA</i> -F	GGAAGTACCTTTTTATGATA	20
Down- <i>ackA</i> -R	CAGAGTCCCTGCATCGGCAG	20
<i>Yqhd</i> -UP-F	AGATGAGTATGACCTGACCC	20
<i>Yqhd</i> -UP-R	CAGCTGTCGCGACATTATACGAGCCGATGATTAATTGTCAATACTCGTCATTTTATT CTG	63
<i>Yqhd</i> -KZ-F	GGCTCGTATAATGTCGCGACAGCTGAAAGAGGAGAACTGCAGATGAATAATTTTCGAC CTGCATACCCC	69
<i>Yqhd</i> -KZ-R	TTCGTACTTGAGATCTGAATTTACATCATGCCGCCCATAC	40
<i>Yqhd</i> -Down-F	ATAACTTCCCTGTGGGCATT	20
<i>Yqhd</i> -Down-R	AGCGAAAAGCGCTTCTTAAAC	20
<i>dhaB</i> -UP-F	CCGGTTTATTCCTTCCCAGC	20
<i>dhaB</i> -UP-R	GTACTTGAGATCTGAATCGGCAGCCTGCGAGTCA	34
<i>dhaB</i> -KZ-F	TAATGTCGCGACAGCTGAAAGAGGAGAACTGCAGATGAAGATCGTGTTAGTCCTTTA	59
<i>dhaB</i> -KZ-R	CTTCGTACTTGAGATCTGAATTTATTATTTTATCGTGTT	40
<i>dhaB</i> -Down-F	ATTCAGATCTCAAGTACGAACAGCAGG	27
<i>dhaB</i> -Down-R	AAACAGTGTTTCTCCATAAACACG	25

发酵培养基(g/L): 硫酸铵 2, 三水磷酸氢二钾 0.85, 磷酸二氢钾 0.56, 七水硫酸镁 0.2, 酵母粉 1.5, 甘油 25, 微量元素溶液 2 mL。

微量元素溶液(g/L): 四水硫酸锰 0.08, 氯化锌 0.08, 二水钼酸钠 0.03, 六水氯化钴 0.35, 硼酸 0.06, 五水硫酸铜 0.03, 六水氯化镍 0.03, 硫酸亚铁 5, 浓度为 37% 的盐酸 4 mL。

以上培养基均在 121 °C 条件下灭菌 20 min, 微量元素溶液过滤除菌。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒的构建

所有表达载体均通过一步同源重组法构建, 根据目的片段与表达载体之间具有的同源臂序列相连接。以载体 pEM 为模板, 用引物对 Tac-pEM-F/Tac-pEM-R 扩增 P_{Tac} 启动子片段。扩增产物均经琼脂糖凝胶回收后经过同源重组法连接, 转化至大肠杆菌 JM109 中获得重组质粒 pEM-Tac。其余重组质粒的构建方法均与此相同。

1.2.2 基因组整合菌株的构建

基因组整合基因采用 CRISPR-Cas9 系统, 具体方法参照文献[15-17]。以 *ldhA*-N20-F/N20-KZ-R 为引物对, pSGKP-Kan 为模板, 进行全质粒 PCR 并胶回收, 再经过同源重组连接并转化至 *E. coli* JM109 中获得重组质粒 pSGKP-*ldhA*。以 KP-wt 为模板, 用引物对 UP-*ldhA*-F/UP-*ldhA*-R 和 Down-*ldhA*-F/Down-*ldhA*-R 扩增基因 *ldhA* 的上下游 600 bp 同源臂; 以扩增出的 *ldhA* 上下游同源臂胶回收产物为模板, 用 UP-*ldhA*-F/Down-*ldhA*-R 引物对扩增 *ldhA* 表达框。通过制备重组菌株 KP-wt 的电转感受态, 将片段 *ldhA* 与质粒 pSGKP-*ldhA* 按 4:1 的比例添加并电击转化导入菌株内, 于 30 °C 下培养 24 h 并对长出的单菌落进行验证。验证敲除成功后, 通过在培养基中添加 15% 的蔗糖去除 pSGKP 质粒, 37 °C 下培养 18 h 去除 pCasKP 质

粒。其余整合菌株的构建方法均与此相同。

1.2.3 ARTP 诱变

将菌体在 250 mL 三角瓶中培养至 OD_{650} 为 0.8 时收集 1 mL 菌体, 使用无菌 PBS 重悬离心 2 次后将菌体重悬于 100 μ L 无菌 PBS 中, 吸取 5 μ L 菌悬液滴在无菌金属载片中心后, 置于 ARTP 育种机, 使用 He 载气、100 W 功率、2 mm 辐照距离、10 standard liter per minute (SLM) 气体流量分别辐照 40、80、120 和 150 s。诱变结束后将载片置于装有 1 mL 种子培养基的 1.5 mL 离心管中, 于超声波清洗机超声 2 min 洗脱菌体, 将金属载片取出后离心收集菌体涂于 100 g/L 1,3-丙二醇浓度的无抗 LB 平板上, 30 °C 培养 24 h 后进行筛选。

1.2.4 诱变菌株筛选方法

以 R 值为指标[R 值=诱变菌落直径(mm)/野生型菌落直径(mm) \times 菌落培养时间(h)], 从含有 100 g/L 1,3-丙二醇的高渗固体筛选平板上, 挑选具有较高 R 值的单菌落, 置于无菌 24 孔板中扩大培养, 然后转接 400 μ L 至装有 80 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中, 37 °C、200 r/min 发酵培养 24 h。1,3-丙二醇产量较出发菌株高的突变菌株被重复验证 3 次。

1.3 菌体培养

1.3.1 种子培养

取甘油管, 将菌液三区划线接种至平板培养基上, 在 30 °C 培养箱中培养 10–12 h。

一级种子液: 使用接种环刮取半环三区划线后的菌体, 然后接至装有 50 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中, 30 °C、120 r/min 培养 5 h。

二级种子液: 取 400 μ L 一级种子液接入装有 80 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中, 30 °C、220 r/min 培养 8–10 h。

1.3.2 摇瓶发酵

移取 400 μ L 种子液至装有 80 mL 发酵培养

基的 500 mL 摇瓶中, 37 °C、200 r/min 发酵 24 h。每 8 h 测定甘油浓度进行补料, 控制甘油浓度在 40 g/L 内。

1.3.3 5 L 罐补料分批发酵

发酵罐的装液量为 3.5 L。按 5% 总体积的接种量将种子液接种至发酵罐。将发酵初始条件控制为: pH 6.3, 转速 300 r/min, 通气量 0.8 vvm, 温度控制在 37 °C。当菌种开始产酸时流加 30% 氢氧化钠控制 pH 值为 6.3。当初始甘油即将消耗完毕时, 开始持续流加甘油至发酵结束, 控制甘油浓度在 40 g/L 内。

1.4 分析方法

细胞密度测定方法: 采用比浊法, 取 0.1–3.0 mL 发酵液, 稀释 0–20 倍后振荡均匀, 用紫外分光光度计于 650 nm 处测定吸光度(*OD*), 发酵液的 *OD* 值为吸光度读数再乘以稀释倍数。

甘油测定方法: 使用深圳希尔曼生物技术有限公司 M-100 生物传感器分析仪进行测定, 取 1.5 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 2 min, 取上清液稀释 10–100 倍进行测定。

产物的测定: 色谱柱为 Bio-Rad Aminex HPX-87H 柱, 柱温 65 °C, 流动相为 0.005 mol/L H₂SO₄, 流速为 0.8 mL/min, 检测器为 Waters e2965 型折光示差检测器, 进样量为 20 µL, 取 1.5 mL 发酵液, 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液稀释 100 倍进行测定。

标准曲线的绘制: 将分析纯的 1,3-丙二醇、乳酸(lactic acid, LAC)、乙酸(acetic acid, ACE)、乙醇(ethanol, EtOH)配制为 0.3、0.6、0.9、1.2、1.5 g/L 的稀释液, 进行液相分析。根据得到的峰面积和相应的浓度作出标准曲线。

2 结果与分析

2.1 耐高渗底盘菌株的筛选

为了研究出发菌株 KP-wt 的 1,3-丙二醇生产

性能, 在 5 L 发酵罐中对其进行了发酵试验, 最终 1,3-丙二醇产量为 75 g/L, 得率为 0.35 g/g 甘油, 生产强度为 1.56 g/(h·L) (图 1A)。发酵过程中检测了发酵液渗透压, 发现发酵液渗透压与产物浓度的积累呈正相关, 最终达到 1 550 mOsmol/L (图 1B)。为了确定高渗透压对菌株生长和生产性能的影响, 在不同 1,3-丙二醇浓度下测试了培养基渗透压与细胞生长的关系。结果表明, 在发酵培养基中添加不同浓度的 1,3-丙二醇后, 培养基渗透压随 1,3-丙二醇添加浓度呈正相关趋势(图 1C), 添加 60 g/L 以上 1,3-丙二醇即可导致细胞生长受到明显抑制(图 1D)。综上所述, 高产物浓度引起的高渗透压胁迫会抑制菌株 KP-wt 的生长和 1,3-丙二醇的合成, 因此, 提高菌株 KP-wt 对渗透压的耐受性, 可能会提高菌株的 1,3-丙二醇产量。

为了提高菌株对发酵液高渗透压的耐受性, 本研究基于野生型 KP-wt 菌株进行了叠加 ARTP 诱变, 将第一轮诱变获取的突变菌株以 $R>48$ 为评价标准进行筛选并进行下一轮诱变, 最终经过 3 轮叠加诱变, 挑取了其中 $R>96$ 的 26 株菌株进行摇瓶发酵测试(图 2A)。突变菌株 KP-AR14 在摇瓶中可生产 5.6 g/L 的 1,3-丙二醇, 较出发菌株 KP-wt 提高了 75%。最后, 在摇瓶中对菌株 KP-AR14 进行了 20 代遗传稳定性测试, 结果显示, 菌株 KP-AR14 的 1,3-丙二醇产量较 KP-wt 稳定提升且不同代数之间变化幅度小, 证明了菌株 KP-AR14 具有良好的遗传稳定性(表 4)。最终, 选取了 KP-AR14 菌株进行 5 L 发酵罐测试, 从细胞死亡率、细胞形态、菌体生长和生产性能 4 个方面与野生型菌株进行了比较。结果显示: 菌株 KP-AR14 在发酵终点的死亡率(48%)较出发菌株 KP-wt (68%)下降了 29.4% (图 2B); 在发酵过程中菌株 KP-AR14 的细胞表面破损较出发菌株 KP-wt 明显减少(图 2C); 菌株 KP-AR14

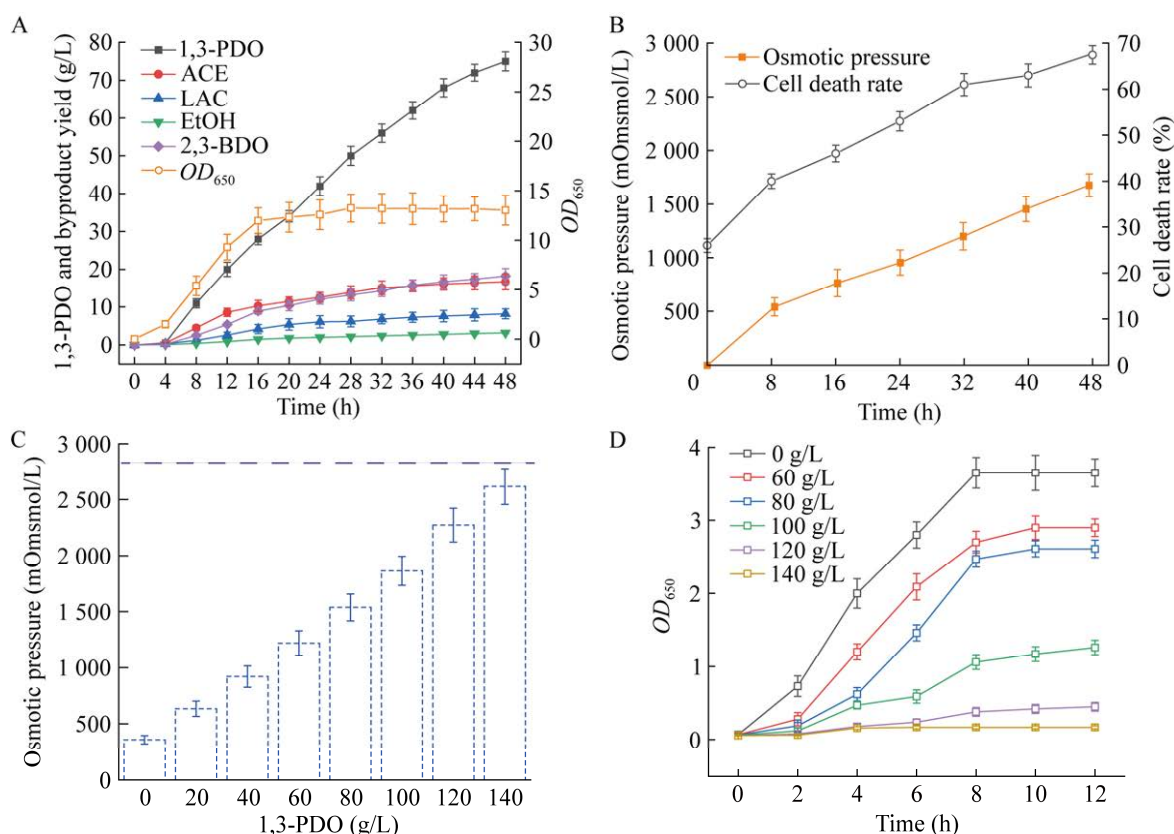


图1 菌株 KP-wt 在 5 L 发酵罐中的发酵曲线变化 A: 1,3-PDO、2,3-丁二醇、乳酸、乙酸、乙醇和菌体生长曲线. B: 渗透压和死亡率变化. C: 发酵培养基中添加不同浓度 1,3-PDO 渗透压变化曲线. D: 不同浓度的 1,3-PDO 对菌株生长的影响

Figure 1 Fermentation curve changes of strain KP-wt in a 5 L fermenter. A: 1,3-PDO, 2,3-butanediol (2,3-BDO), LAC, ACE, EtOH and bacterial growth curves. B: Changes in osmotic pressure and cell death rate. C: Osmotic pressure changes with the addition of different concentrations of 1,3-PDO in the fermentation medium. D: Effect of different concentrations of 1,3-PDO on strain growth.

的最大细胞生物量(dry cell weight, DCW) (5.92 g/L) 较出发菌株 KP-wt (5.45 g/L)提升了 8.6%; 菌株 KP-AR14 的 1,3-丙二醇产量、得率和生产强度分别为 87 g/L、0.39 g/g 甘油和 1.81 g/(h·L), 较 KP-wt 菌株分别提升了 16.0%、11.4%和 16.0% (图 2D)。上述结果表明, KP-AR14 的渗透压耐受性与生长性能均得到提高, 适合作为后续研究的底盘菌株。

2.2 克雷伯氏菌表达元件筛选

克雷伯氏菌属于非模式菌株, 缺乏表证明确的基因表达元件, 如启动子和核糖体结合位点(ribosome binding site, RBS)序列。在进行分

子改造前筛选出适宜其体内表达的不同强度的启动子及 RBS, 有助于理性调控基因的表达量。为了筛选出有效的启动子, 根据大肠杆菌中的启动子表达强度分别选取了 P_{Tac} 、 P_{Trc} 和 P_{T5} 启动子, 并在克雷伯氏菌基因组中筛选出了关键合成酶 *dhaT* 基因前 300 bp 序列作为潜在的启动子 P_{Kp} 进行扩增, 将扩增片段连接至带有红色荧光蛋白的 pEM 表达载体中替换原有的启动子序列。分别将上述改造后的质粒转至 KP-AR14 菌中得到 4 株工程菌株, 在摇瓶中用 LB 培养基培养至 OD_{650} 约为 0.6 时添加 IPTG 诱导, 分

别在诱导 3、6、9、12 h 时取样测定荧光强度, 结果如图 3A 所示, P_{Tac} 启动子在克雷伯氏菌中表达强度最高, 分别是 P_{Kp} 和 P_{T5} 启动子的 1.4 倍和 4.4 倍, 而 P_{Ttrc} 启动子在克雷伯氏菌中不表达。类似地, 根据大肠杆菌中的 RBS 表达强度, 选

取了 RBS64、RBS34 和 RBS30 与 P_{Tac} 启动子进行组合表达, 测试不同 RBS 的表达强度, 实验操作和条件同上所述, 结果如图 3B 所示, RBS30 在克雷伯氏菌中表达强度最高, 分别是 RBS34、RBS64 的 1.05 倍和 1.13 倍。

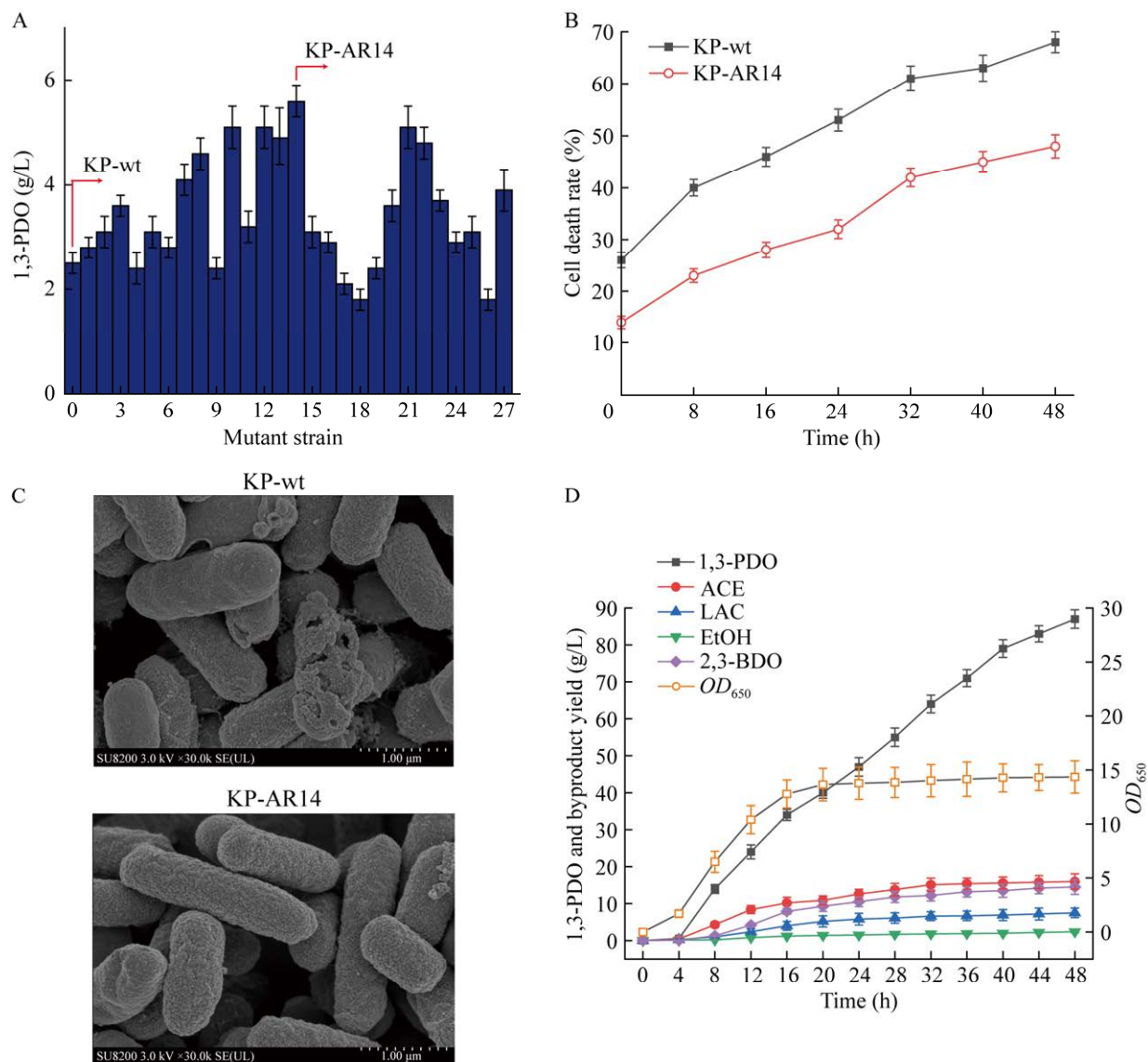


图2 耐高渗 1,3-PDO 生产菌株的筛选与表征 A: 诱变菌株 1,3-PDO 的生产情况. B: 发酵过程死亡率变化. C: 发酵 48 h 菌体形态变化情况. D: 菌株 KP-AR14 在 5 L 发酵罐中的发酵曲线

Figure 2 Screening and characterization of high-osmolarity-tolerant 1,3-PDO-producing strains. A: Production of 1,3-PDO by mutant strains. B: Changes in mortality rate during fermentation. C: Morphological changes of bacterial cells after 48 h of fermentation. D: Fermentation curve of strain KP-AR14 in a 5 L fermenter.

表 4 菌株 KP-AR14 遗传稳定性测试

Table 4 Genetic stability test of strain KP-AR14

Strains	Titer of 1,3-PDO (g/L)				
	4th generation	8th generation	12th generation	16th generation	20th generation
KP-wt	3.2±0.1	2.8±0.4	3.3±0.3	3.5±0.2	2.9±0.3
KP-AR14	5.6±0.2	5.4±0.3	5.8±0.4	5.5±0.1	5.3±0.3

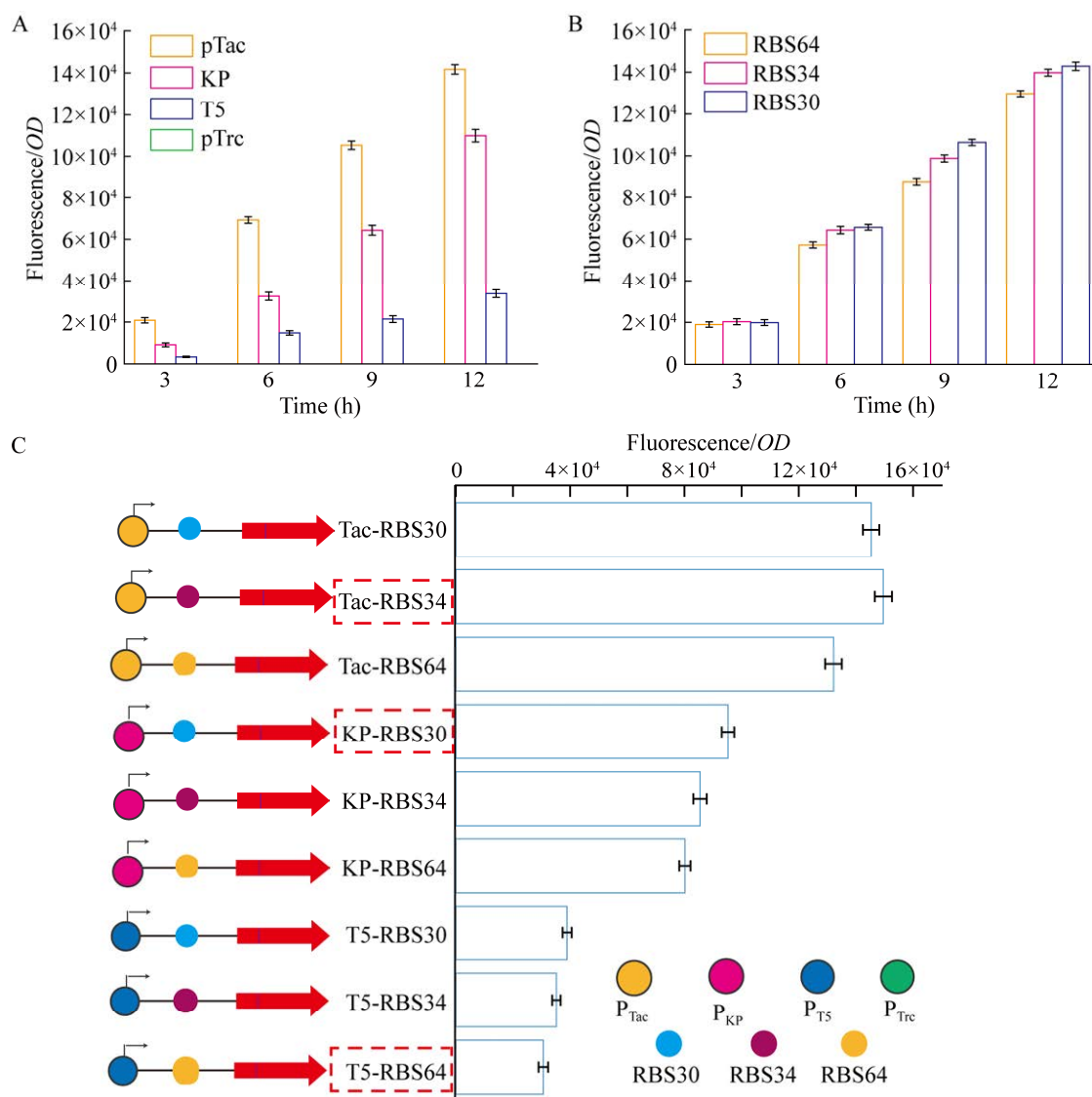


图 3 表达元件的筛选与评估 A: 不同启动子表达强度表征结果. B: 不同 RBS 表达强度表征结果. C: 表达元件筛选结果

Figure 3 Screening and evaluation of expression elements. A: Characterization of expression strength of different promoters. B: Characterization of expression strength of different ribosome binding sites (RBS). C: Screening results of expression elements.

为了筛选出不同表达强度的启动子及 RBS 序列,将 P_{Tac} 、 P_{Kp} 和 P_{T5} 启动子与 RBS64、RBS34 和 RBS30 进行了交叉组合表达,实验操作和条件同上所述,结果如图 3C 所示, P_{Tac} 与 RBS34 组合(H)在克雷伯氏菌中的表达强度最高,是 P_{Kp} 与 RBS30 组合(M)和 P_{T5} 与 RBS64 组合(L)的 1.6 倍和 4.1 倍。上述结果表明,在克雷伯氏菌中将不同表达的启动子及 RBS 组合能够有效地将基因表达量调控在高、中和低 3 个水平。

2.3 阻断冗余代谢支路提高 1,3-丙二醇产量

尽管通过诱变筛选后得到的最优底盘菌株与出发菌株相比,菌株生产性能及耐受性均大幅提高,但是发酵过程中仍会产生 18.2 g/L 2,3-丁二醇(2,3-butanediol, 2,3-BDO)、6.4 g/L 乳酸、15.3 g/L 乙酸和 1.8 g/L 乙醇,这使得 1,3-丙二醇实际得率严重降低。通过分析代谢通路(图 4A)发现,可能是由于副产物 2,3-丁二醇、乳酸、乙酸及乙醇的合成路径与 1,3-丙二醇的合成路径都需要 NADH 作为辅因子,从而导致胞内 NADH 缺乏,严重影响了 1,3-丙二醇得率^[18]。

为了有效降低副产物积累,选择通过阻断冗余代谢支路将更多还原力用于 1,3-丙二醇生产。以 KP-AR14 菌株为底盘,在基因组中分别敲除了编码 D-乳酸脱氢酶的 *ldhA* 基因、编码 α -乙酰乳酸脱羧酶的 *budA* 基因、编码乙醛脱氢酶的 *aldA* 基因和编码乙酸激酶的 *ackA* 基因,构建菌株 KP-02、KP-03 和 KP-04。

在摇瓶条件下:(1) 分别单独敲除 *ldhA*、*budA* 和 *aldA* 后,工程菌株的 1,3-丙二醇产量分别提高了 14.3%、21.4%和 10.7%,副产物乳酸、2,3-丁二醇和乙醇在摇瓶中未检出;(2) 单独敲除 *ackA* 基因的菌株 1,3-丙二醇产量降低了 32.1%,可能是因为敲除乙酸激酶后菌株生长受到影响,导致 1,3-丙二醇产量降低;(3) 同时敲

除 *ldhA*、*budA* 和 *aldA* 的菌株 KP-07 的 1,3-丙二醇产量提高了 46.4%,副产物乳酸、2,3-丁二醇和乙酸在摇瓶中未检测到(图 4B)。上述结果表明,阻断冗余代谢支路关键基因能够有效地提高 1,3-丙二醇产量。

2.4 强化合成路径提高 1,3-丙二醇生产强度

为了提高 1,3-丙二醇的合成效率,针对合成路径^[19-20],以菌株 KP-AR14 为底盘,分别以 P_{Tac} 启动子和 RBS34 的组合过表达了本源的甘油脱水酶 *dhaB* 基因,并异源表达了来自大肠杆菌的 1,3-PDO 氧化还原酶 *yqhD* 基因,构建工程菌株 KP-05 和 KP-06。经摇瓶发酵测试,菌株 KP-05 和 KP-06 的 1,3-丙二醇产量分别提高了 27.4%和 13.9% (图 4B)。

为进一步提高 1,3-丙二醇的产量和得率,对阻断冗余代谢支路和强化合成路径中有效的基因靶点进行了启动子与 RBS 的组合优化,探究不同的表达强度对菌株生产的影响,从而构建了 9 株基因工程菌,分别命名为菌株 KP-FMME-1 至 KP-FMME-9。在摇瓶条件下,菌株 KP-FMME-6 的 1,3-丙二醇生产能力最优,1,3-丙二醇产量达到了 12.6 g/L,较 KP-AR14 提升 125.4%,菌株生长较 KP-AR14 提高 18.5% (图 4C)。为了检测菌株 KP-FMME-6 的生产潜力,在 5 L 发酵罐上进行了补料分批发酵,发酵周期为 48 h,其 1,3-丙二醇产量、得率及生产强度分别为 107 g/L、0.41 g/g 甘油和 2.22 g/(h·L),与菌株 KP-AR14 相比分别提高了 23.5%、7.6% 和 22.7%,菌株生长较 KP-AR14 相比提高 13.2%。另外,菌株 KP-FMME-6 的 2,3-丁二醇(11.8 g/L)、乙酸(15.3 g/L)、乳酸(6.4 g/L)和乙醇(1.8 g/L)产量,分别较菌株 KP-AR14 降低了 18.6%、4.3%、14.7%和 25.0% (图 4D)。上述结果表明,阻断副产物代谢路径及强化 1,3-丙二醇合成路径能有效地提升菌体的生产能力。

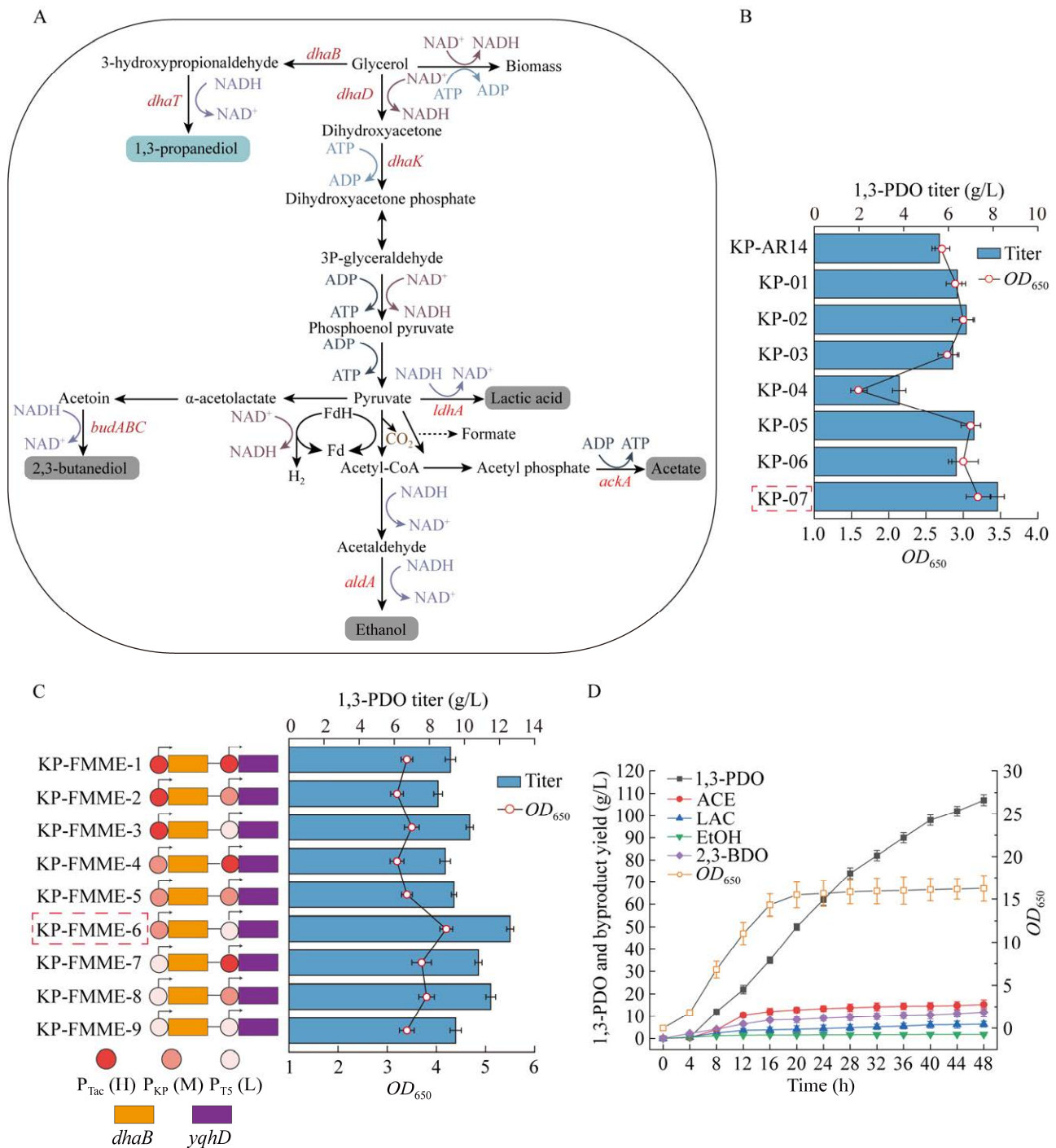


图 4 工程菌株构建与评估 A: 克雷伯氏菌 1,3-PDO 合成路径. B: 工程菌株的 1,3-PDO 生产情况. C: 启动子 RBS 组合后高产菌株生长及生产情况. D: 菌株 KP-FMME-6 在 5 L 发酵罐中的发酵曲线

Figure 4 Construction and evaluation of engineered strains. A: 1,3-PDO synthesis pathway in *Klebsiella pneumoniae*. B: Production of 1,3-PDO by engineered strains. C: Cell growth and 1,3-propanediol production of different strains with combination of promoters and RBS. D: Fermentation curve of strain KP-FMME-6 in a 5 L fermenter.

2.5 优化发酵过程参数强化 1,3-丙二醇合成

为了进一步提高菌株 KP-FMME-6 的 1,3-丙二醇生产潜力,分别对发酵过程中的 pH、溶氧和补料速率进行了优化。

对于 pH 值优化,基于文献报道^[21],设计了 2 种条件,即每间隔 8 h 分别将发酵体系的 pH 值在 6.3 和 6.8 之间切换和在 6.8 和 7.3 之间切换。发酵结果表明,每隔 8 h 在 pH 值 6.3 和 6.8 之间切换为最优条件,菌株的 1,3-丙二醇产量、得率及生产强度分别为 112 g/L、0.42 g/g 甘油和 2.34 g/(h·L),副产物积累分别为 2,3-丁二醇(9.6 g/L)、乙酸(9.25 g/L)、乳酸(4.3 g/L)和乙醇(0.8 g/L)(图 5A、5B)。

对于溶氧条件优化,设计了 3 个条件:即分别在发酵 0–4 h、0–8 h 和 0–16 h 控制溶氧不低于 20%。发酵结果表明,在发酵前 4 h 内将溶氧控制在 20%,后续将转速通气降为与初始发酵条件一致时,菌株的生长及产能最优,1,3-丙二醇产量、得率及生产强度分别为 115 g/L、0.43 g/g 甘油和 2.4 g/(h·L)(图 5C)。

对于补料速率优化,设计了 3 个条件,即分别在菌体生长阶段(发酵 0–16 h)控制发酵液甘油含量在 10 g/L、20 g/L 和 30 g/L,菌体达到最大细胞密度(16 h)后控制甘油含量在 30 g/L 以内。发酵结果表明,在菌体生长阶段将甘油含量控制在 10 g/L,菌体达到最大细胞密度后将甘油含量控制在 30 g/L 时,菌株的生长及产能最优,1,3-丙二醇产量、得率及生产强度分别为 111 g/L、0.44 g/g 甘油和 2.31 g/(h·L)(图 5D)。

综合上述最优发酵工艺条件,菌株 KP-FMME-6 在发酵 48 h 后,最大 DCW 为 7.27 g/L,1,3-丙二醇的产量、得率和生产强度分别达到了 118 g/L、0.45 g/g 甘油和 2.46 g/(h·L),较菌株 KP-wt 分别提高了 57.3%、20%和 57.7%。菌株 KP-FMME-6 在发酵过程中仅积累了少量

的副产物,如 9.6 g/L 2,3-丁二醇、9.25 g/L 乙酸、0.8 g/L 乙醇和 4.3 g/L 乳酸,较 KP-wt 分别降低了 47.3%、39.5%、55.6%和 32.8%(图 5E)。上述结果表明,通过优化发酵过程参数,可以提高菌株 1,3-丙二醇生产能力,同时减少副产物的积累。

3 讨论与结论

本研究以实验室保藏的 KP-wt 作为底盘菌株,通过 ARTP 诱变、冗余代谢支路阻断以及合成路径强化,成功构建了一株工程菌株 KP-FMME-6。该菌株在摇瓶中发酵 1,3-丙二醇产量可达到 12.6 g/L,在 5 L 发酵罐体系中经分批补料发酵,1,3-丙二醇的产量、得率和生产强度分别达到了 118 g/L、45 g/g 甘油和 2.46 g/(h·L),具有良好的工业化潜力。

在 1,3-丙二醇发酵过程中,产物积累所造成的高渗透压会严重抑制菌体生长及产物合成。为了提高菌株 1,3-丙二醇合成效率,本研究通过 ARTP 叠加诱变筛选出一株能耐受 100 g/L 浓度 1,3-丙二醇的克雷伯氏菌 KP-AR34,通过增强菌株的耐受性,有效减少了菌株在发酵过程中受到的产物抑制情况。此外,本研究首次在克雷伯氏菌中通过启动子和 RBS 筛选,得到了能够在克雷伯氏菌中将目标基因的表达量调控在高(H)、中(M)和低(L) 3 个水平的表达元件。最后,本研究采用了阻断冗余代谢支路及强化合成通路的代谢工程策略,所构建的最优工程菌株 KP-FMME-6 的 1,3-丙二醇产量、得率和生产强度分别较野生型菌株分别提高了 57.3%、20.2%和 57.7%。

虽然本研究所构建的工程菌株 1,3-丙二醇产量已是目前文献报道中通过甘油生产 1,3-丙二醇的最高产量,但是现阶段的菌株的 1,3-丙

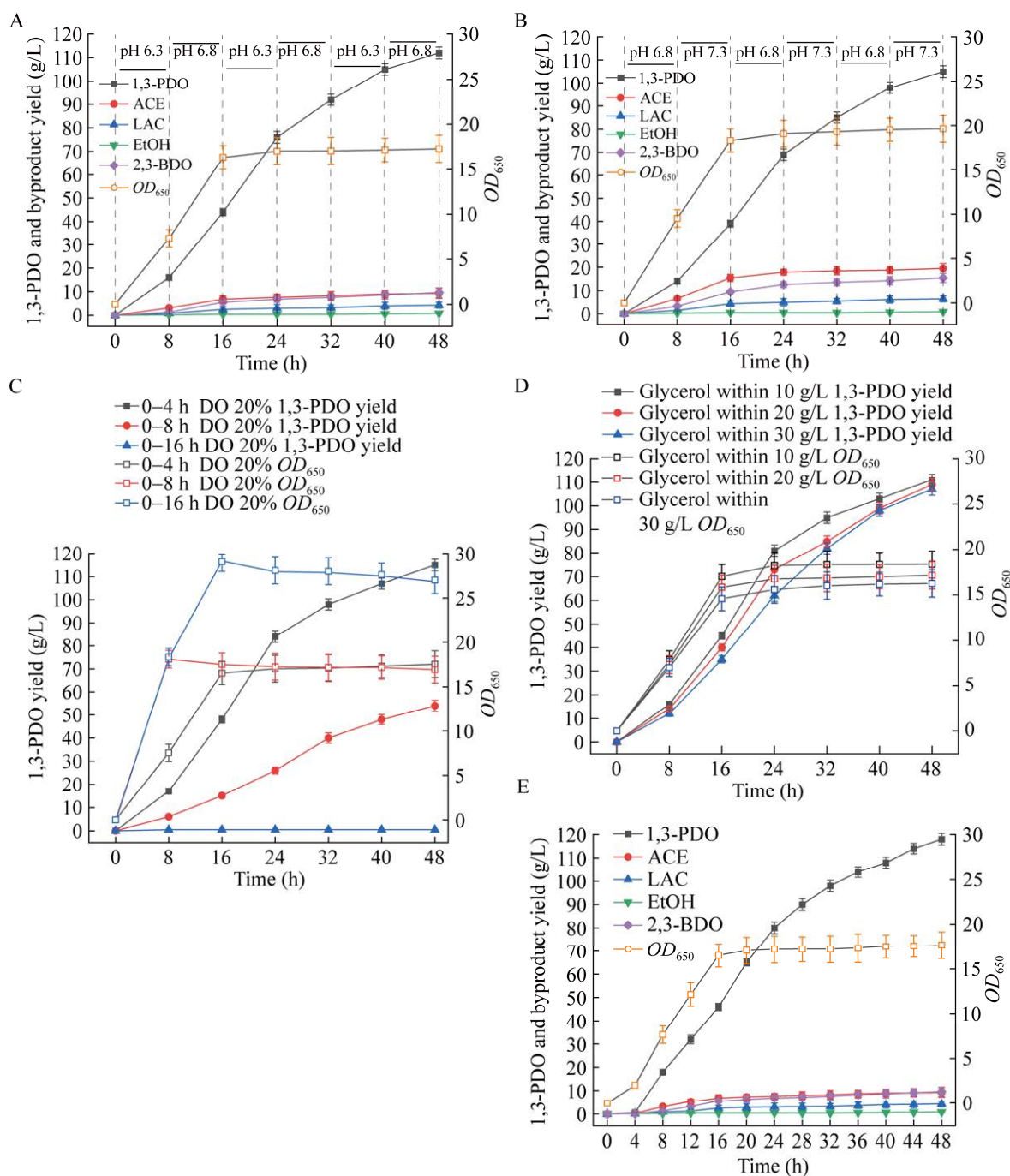


图5 菌株 KP-FMME-6 的发酵工艺优化结果 A: pH 在 6.3 和 6.8 之间切换的发酵曲线. B: pH 在 6.8 和 7.3 之间切换的发酵曲线. C: 优化溶氧条件的菌株发酵曲线. D: 优化补料速率的菌株发酵曲线. E: 最优发酵工艺下菌株在 5 L 发酵罐中的发酵曲线

Figure 5 Fermentation process optimization results of strain KP-FMME-6. A: Fermentation curve with pH switching between 6.3 and 6.8. B: Fermentation curve with pH switching between 6.8 and 7.3. C: Fermentation curve of strain with optimized dissolved oxygen conditions. D: Fermentation curve of strain with optimized feeding rate. E: Fermentation curve of strain under optimal fermentation conditions in a 5 L fermenter.

二醇产量及转化率距离杜邦公司的生产指标还有一定差距。导致这一结果可能的原因有 3 个：(1) 1,3-丙二醇氧化还原酶的酶活催化活性不足。本研究目前仅对合成路径进行了强化,尚未对合成酶进行酶工程改造^[22-23]；(2) 1,3-丙二醇氧化还原酶是氧气敏感性,为保证酶活只能进行微需氧发酵,在微需氧环境中菌体生长受限^[24]；(3) 克雷伯氏菌中的冗余代谢支路较多,且较多代谢支路影响细胞生长,无法进行完全阻断,导致仍有较多代谢流进入副产物代谢路径中^[25-26]。

为了进一步提高 1,3-丙二醇的产量及甘油转化率,后续的研究可以从以下 3 个方面进行探索：(1) 提高 1,3-丙二醇氧化还原酶的活性及

特性。通过酶工程改造对关键合成酶进行蛋白质改造,从而提高酶的催化活性及氧敏感性,以提高 1,3-丙二醇的产量；(2) 强化胞内 1,3-丙二醇的外排能力。醇类产物在发酵过程中会因自身的特性,使发酵液中的渗透压随着产物浓度的积累而升高,导致菌体活力下降甚至死亡。1,3-丙二醇的外排能力不足也是抑制产物高效合成的重要因素之一^[27]；(3) 反向代谢工程挖掘新靶点。通过组学分析可对诱变菌株进行全基因组分析,找到能使菌株耐受性增强的关键靶点,从而对工程菌株进行深度改造,将有助于进一步提升菌株的整体生产性能^[28-33] (表 5)。

表 5 不同 1,3-丙二醇合成菌株产量与得率对比

Table 5 Comparison of titer and yield of different 1,3-propanediol synthesis strains

Strains	Substrates	Titer (g/L)	Yield (g/g)	Productivity (g/(L·h))	References
<i>E. coli</i>	Glucose	135.0	0.50	3.50	[7]
<i>E. coli</i>	Glucose	11.2	0.22	0.10	[8]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Glucose, xylose	110.0	0.42	2.30	[5]
<i>C. butyricum</i>	Glycerol	73.0	0.58	2.48	[31]
<i>C. butyricum</i>	Glycerol	60.2	0.51	1.72	[12]
<i>Vibrio natriegens</i>	Glycerol	56.2	0.50	2.36	[3]
<i>Lactobacillus reuteri</i>	Glucose, glycerol	93.2	0.81 (glycerol)	1.29	[32]
<i>Clostridium</i> sp.	Glycerol	81.2	0.49	4.27	[33]
<i>K. pneumoniae</i>	Glycerol	106.0	0.43	2.15	[13]
<i>K. pneumoniae</i>	Glucose	62.0	0.54	0.94	[6]
<i>K. pneumoniae</i>	Glycerol	118.0	0.45	2.46	This study

REFERENCES

- [1] CELIŃSKA E. Debottlenecking the 1,3-propanediol pathway by metabolic engineering[J]. *Biotechnology Advances*, 2010, 28(4): 519-530.
- [2] ZHU FH, LIU DH, CHEN Z. Recent advances in biological production of 1,3-propanediol: new routes and engineering strategies[J]. *Green Chemistry*, 2022, 24(4): 1390-1403.
- [3] ZHANG Y, LI ZH, LIU Y, CEN XC, LIU DH, CHEN

Z. Systems metabolic engineering of *Vibrio natriegens* for the production of 1,3-propanediol[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 65: 52-65.

- [4] LI ZH, WU ZY, CEN XC, LIU Y, ZHANG Y, LIU DH, CHEN Z. Efficient production of 1,3-propanediol from diverse carbohydrates via a non-natural pathway using 3-hydroxypropionic acid as an intermediate[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2021, 10(3): 478-486.
- [5] LI ZH, DONG YF, LIU Y, CEN XC, LIU DH, CHEN Z. Systems metabolic engineering of *Corynebacterium*

- glutamicum* for high-level production of 1,3-propanediol from glucose and xylose[J]. *Metabolic Engineering*, 2022, 70: 79-88.
- [6] LAMA SM, SEOL E, PARK S. Development of *Klebsiella pneumoniae* J2B as microbial cell factory for the production of 1,3-propanediol from glucose[J]. *Metabolic Engineering*, 2020, 62: 116-125.
- [7] NAKAMURA CE, WHITED GM. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(5): 454-459.
- [8] LI MD, ZHANG Y, LI JC, TAN TW. Biosynthesis of 1,3-propanediol via a new pathway from glucose in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2023, 12(7): 2083-2093.
- [9] CHEN Z, LIU HJ, LIU DH. Metabolic pathway analysis of 1,3-propanediol production with a genetically modified *Klebsiella pneumoniae* by overexpressing an endogenous NADPH-dependent alcohol dehydrogenase[J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2011, 54(3): 151-157.
- [10] ZHU YT, WANG YX, GAO H, WANG HX, WAN ZJ, JIANG YJ, XIN FX, ZHANG WM, JIANG M. Current advances in microbial production of 1,3-propanediol[J]. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 2021, 15(5): 1566-1583.
- [11] CHEN ZF, LIU JQ, HAN X, MA LN, XU P, TAO F. Developing a thermophilic cell factory for high-temperature production of 1,3-propanediol via host-mining and metabolic engineering[J]. *Chem Catalysis*, 2023, 3(8): 100704.
- [12] YUN JH, ZABED HM, ZHANG YF, ZHANG GY, ZHAO M, QI XH. Improving tolerance and 1,3-propanediol production of *Clostridium butyricum* using physical mutagenesis, adaptive evolution and genome shuffling[J]. *Bioresource Technology*, 2022, 363: 127967.
- [13] 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.
- [14] ZHONG ZH, LIU LF, ZHOU JJ, GAO LR, XU JJ, FU SL, GONG H. Influences of 3-hydroxypropionaldehyde and lactate on the production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Bioresources & Bioprocessing*, 2014. DOI: 10.1186/s40643-014-0002-z.
- [15] WANG Y, WANG SS, CHEN WZ, SONG LQ, ZHANG YF, SHEN Z, YU FY, LI M, JI QJ. CRISPR-Cas9 and CRISPR-assisted cytidine deaminase enable precise and efficient genome editing in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(23): e01834-18.
- [16] WU ZW, ZHANG YF, YU HP, PAN D, WANG YJ, WANG YN, LI F, LIU C, NAN H, CHEN WZ, JI QJ. Programmed genome editing by a miniature CRISPR-Cas12f nuclease[J]. *Nature Chemical Biology*, 2021, 17: 1132-1138.
- [17] ZHANG YW, SUN XM, WANG QZ, XU JQ, DONG F, YANG SQ, YANG JW, ZHANG ZX, QIAN Y, CHEN J, ZHANG J, LIU YM, TAO RS, JIANG Y, YANG JJ, YANG S. Multicopy chromosomal integration using CRISPR-associated transposases[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2020, 9(8): 1998-2008.
- [18] 王学明, 潘静宇, 吴静, 陈修来, 高聪, 宋伟, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 调控大肠杆菌胞内 ATP 和 NADH 水平促进琥珀酸生产[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(8): 3236-3252.
- WANG XM, PAN JY, WU J, CHEN XL, GAO C, SONG W, WEI WQ, LIU J, LIU LM. Regulation of intracellular level of ATP and NADH in *Escherichia coli* to promote succinic acid production[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(8): 3236-3252 (in Chinese).
- [19] 丁爽, 陈修来, 高聪, 宋伟, 吴静, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 模块化工程改造大肠杆菌生产 L-色氨酸[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(6): 2359-2374.
- DING S, CHEN XL, GAO C, SONG W, WU J, WEI WQ, LIU J, LIU LM. Modular engineering of *Escherichia coli* for high-level production of L-tryptophan[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(6): 2359-2374 (in Chinese).
- [20] 刘洁, 高聪, 陈修来, 郭亮, 宋伟, 吴静, 魏婉清, 刘佳, 刘立明. 代谢工程改造大肠杆菌合成己二酸[J]. *生物工程学报*, 2023, 39(6): 2375-2389.
- LIU J, GAO C, CHEN XL, GUO L, SONG W, WU J, WEI WQ, LIU J, LIU LM. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for adipic acid production[J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2023, 39(6): 2375-2389 (in Chinese).
- [21] YANG XG, CHOI HS, LEE JH, LEE SK, HAN SO, PARK C, KIM SW. Improved production of 1,3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol by *Klebsiella pneumoniae* in fed-batch fermentation[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2018, 349: 25-36.

- [22] WANG WJ, YU X, WEI YJ, LEDESMA-AMARO R, JI XJ. Reprogramming the metabolism of *Klebsiella pneumoniae* for efficient 1,3-propanediol production[J]. Chemical Engineering Science, 2021, 236: 116539.
- [23] JIANG W, WANG SZ, WANG YP, FANG BS. Key enzymes catalyzing glycerol to 1,3-propanediol[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 57.
- [24] CHEN Z, LIU DH. Toward glycerol biorefinery: metabolic engineering for the production of biofuels and chemicals from glycerol[J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 9: 205.
- [25] ZHANG YP, LI Y, DU CY, LIU M, CAO ZA. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: a key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Metabolic Engineering, 2006, 8(6): 578-586.
- [26] ZHANG YQ, JIA ZX, LIN J, XU DF, FU SL, GONG H. Deleting *pck* improves growth and suppresses by-product formation during 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(3): 678-687.
- [27] TENG Y, GUO C, XIE MM, FENG A, LU XY, ZONG H, ZHUGE B. Modification of substrate and product transport systems in *Klebsiella pneumoniae* to improve 1,3-propanediol production[J]. FEMS Microbiology Letters, 2022, 369(1): fnac056.
- [28] LEE JH, JUNG HM, JUNG MY, OH MK. Effects of *gltA* and *arcA* mutations on biomass and 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2019, 24(1): 95-102.
- [29] FOKUM E, ZABED 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.
- [30] WANG M, TIAN YJ, XU L, ZHANG FS, LU HG, LI MR, LI B. High osmotic stress increases OmpK36 expression through the regulation of KbvR to decrease the antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae*[J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(3): e0050722.
- [31] MARTINS FF, Da S S LIBERATO V, RIBEIRO CMS, COELHO MAZ, FERREIRA TF. Low-cost medium for 1,3-propanediol production from crude glycerol by *Clostridium butyricum*[J]. Biofuels, Bioproducts and Biorefining, 2020, 14(5): 1125-1134.
- [32] JU JH, HEO SY, CHOI SW, KIM YM, KIM MS, KIM CH, OH BR. Effective bioconversion of 1,3-propanediol from biodiesel-derived crude glycerol using organic acid resistance-enhanced *Lactobacillus reuteri* JH83[J]. Bioresource Technology, 2021, 337: 125361.
- [33] ZHANG CJ, SHARMA S, MA CW, ZENG AP. Strain evolution and novel downstream processing with integrated catalysis enable highly efficient coproduction of 1,3-propanediol and organic acid esters from crude glycerol[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2022, 119(6): 1450-1466.

(本文责编 陈宏宇)