

肺炎克雷伯氏菌利用甘油生产 1,3-PDO 发酵优化的研究进展

王世伟^{1*}, 王卿惠², 向文胜², 李婷婷¹, 赵晨晨¹, 周智强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)

摘要 发展可再生能源,尤其是生物能源,具有显著的能量收益和碳减排效益。随着石油等不可再生资源的减少,许多大宗传统石油化工产品正不断被使用可再生原料的生物制造产品替代。生物发酵法生产1,3-丙二醇(1,3-PDO)顺应了这一潮流,具有广阔的发展前景。提高微生物发酵竞争力,优化发酵法生产1,3-PDO水平,势必增加1,3-PDO的生产效益。对肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)发酵法进行1,3-PDO生产的代谢机理、菌株筛选和利用、发酵参数的选择和优化以及发酵工程策略的设计和监测等进行综述,为利用生物柴油副产物甘油生产有重要工业价值的1,3-PDO产品提供参考。

关键词 肺炎克雷伯氏菌;1,3-丙二醇;厌氧代谢机理;发酵;策略

中图分类号 Q939.97

文献标识码 A

文章编号 1005-7021(2022)04-0099-10

doi:10.3969/j.issn.1005-7021.2022.04.013

Advances in Optimizing Fermentation Conditions to Improve the Production of 1,3-Propanediol by *Klebsiella pneumoniae* Using Glycerol as Substrate

WANG Shi-wei^{1*}, WANG Qing-hui², XIANG Wen-sheng², LI Ting-ting¹,
ZHAO Chen-chen¹, ZHOU Zhi-qiang¹

(1. Key Lab. of Resist. Gene Engin. & Preserv. of Biodiver. in Cold Areas, Coll. of Life Sci. & Agric. & Forest., Qiqihar Uni., Qiqihar 161005; 2. Schl. of Life Sci., NE Agric. Uni., Harbin 150030)

Abstract The development of renewable energy, especially bioenergy, has significant energy and carbon emission reduction benefits. With the reduction of non renewable resources such as petroleum, many staple traditional petrochemical products are constantly replaced by industrial biological manufacturing products from renewable raw materials. Bio-fermentation production of 1,3-propanediol (1,3-PDO) conforms to this trend and has broad development prospects. Improving the competitiveness of microbial fermentation, optimizing the fermentation production level of 1,3-PDO and developing high-efficiency fermentation process are bound to increase the production benefits of 1,3-PDO. In this paper the metabolic mechanism, strain screening and utilization, selection and optimization of fermentation parameters, *Klebsiella pneumoniae* fermentation engineering strategy, as well as design, test and determination to produce 1,3-PDO are reviewed, so as to provide scientific references for the utilization of biodiesel byproduct production of glycerol to produce product of 1,3-PDO with significantly industrial value.

Keywords *Klebsiella pneumoniae*; 1,3-propanediol; anaerobic metabolic mechanism; fermentation; strategy

随着我国经济的高速增长,石油短缺已成为 制约经济和社会发展的瓶颈^[1]。为了解决这一难

基金项目:2021年度黑龙江省大学生创新创业训练计划资助项目(202110232101);2018年度黑龙江省省属本科高校基本科研业务费科研项目(135309482)

作者简介:王世伟 男,博士,硕士生导师。研究方向为发酵工程。E-mail:wsw888535@shou.com

* 通讯作者。

收稿日期:2022-02-07

题,生物柴油产业应运而生,然而生物柴油生产过程中又必然产生副产物甘油^[2],如何处理废弃的甘油成为目前棘手的新问题。粗甘油作为一种廉价碳源,可被微生物转化为有经济价值的化合物,如1,3-丙二醇(1,3-PDO)、乳酸、乙醇、3-羟基丙酸、2,3-丁二醇和琥珀酸。其中1,3-PDO具有开发价值,可作为生产聚酯新产品——聚对苯二甲酸1,3-丙二醇酯(PTT)的单体^[3-4]。微生物发酵法生产1,3-PDO操作简便,反应温和,副产物少,污染少,且容易处理^[5]。肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)是微生物甘油转化的重要菌株。利用肺炎克雷伯氏菌以粗甘油为底物生产1,3-PDO具有广阔的应用前景。

1 产1,3-PDO的微生物

早在1881年, August^[6]首次报导梭状芽胞杆菌(*Clostridium pasteurianum*)进行甘油发酵能产1,3-PDO,为微生物法生产1,3-PDO开辟了新途径。微生物发酵法生产1,3-PDO既可利用天然微生物转化底物甘油途径实现,又可以通过重组大肠埃希菌转化葡萄糖途径完成^[7-8]。肺炎克雷伯氏菌也是能够高效转化甘油生产1,3-PDO的菌株。

1.1 产1,3-PDO的细菌

经自然分离获得的菌株通常只能以甘油为底物发酵生产1,3-PDO。在厌氧条件下,仅少数兼

性厌氧肠细杆菌,如克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)中的肺炎克雷伯氏菌^[9]、产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)^[10];肠杆菌属(*Enterobacter*),如絮凝肠杆菌(*Enterobacter agglomean*)^[11];柠檬酸菌属(*Citrobacter*),如弗式柠檬酸菌(*Citrobacter freundii*)^[12]、乌克曼枸橼酸杆菌(*Citrobacter werkmanii*)^[13];乳酸杆菌属(*Lactobacilli*),如罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)^[14]以及完全厌氧菌梭菌属(*Clostridia*),如丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)^[15]、巴氏芽胞梭菌(*Clostridium pasteurianum*)^[16]和糖丁基梭菌(*Clostridium saccharobutylicum*)^[17]等可将甘油转化为1,3-PDO。可见,研究微生物发酵特性,阐明肺炎克雷伯氏菌代谢途径,不仅能为菌株选育和改良提供参考,也能为甘油生物转化生产1,3-PDO提供重要菌种资源和应用基础。

1.2 常用产1,3-PDO两种细菌的特点

肺炎克雷伯氏菌与梭状芽胞杆菌(*Clostridium*)是两种重要的1,3-PDO生产菌,前者对底物甘油和产物1,3-PDO具有很强的耐受性,后者的耐受性较弱。从代谢流量、细胞内酶以及生长状况上看,前者甘油脱水酶(glycerol dehydratase, GDH't)和丙酮酸激酶(PK)是两个关键酶;后者甘油脱水酶是限速酶;前者在有氧、微氧或厌氧条件下均以甘油为底物快速生长,而后者为典型严格厌氧菌,生长较慢^[18-19]。

表1 不同微生物菌株发酵产1,3-PDO

Table 1 Microbial production of 1,3-propanediol using different bacteria species

菌株	发酵类型	$C_{1,3-PDO}/$ ($g \cdot L^{-1}$)	$Q_{1,3-PDO}/$ ($g \cdot (L \cdot h)^{-1}$)	$Y_{1,3-PDO}/$ ($mol \cdot mol^{-1}$)	参考文献
肺炎克雷伯氏菌(<i>Klebsiella pneumoniae</i>) DSM 4799	FB(补料分批发酵)	80.20	1.15	0.54	[20]
肺炎克雷伯氏菌(<i>K. pneumoniae</i>) encapsulated	B(分批发酵)	-	4.46	0.65	[21]
肺炎克雷伯氏菌(<i>K. pneumoniae</i>) inactivated ADH	B(分批发酵)	-	1.07	0.70	[22]
梭状芽胞杆菌(<i>Clostridium acetobutylicum</i>) engineered	B(分批发酵)	-	3.00	0.66	[23]
梭状芽胞杆菌(<i>C. butyricum</i>) AKR102a	FB(补料分批发酵)	93.70	3.30	0.63	[24]

注: $C_{1,3-PDO}$ 表示菌株产1,3-PDO的浓度; $Q_{1,3-PDO}$ 表示菌株产1,3-PDO的生产强度; $Y_{1,3-PDO}$ 表示菌株产1,3-PDO的摩尔产率;“-”表示文章内没有提供数据

如表1所示,作为产1,3-PDO的两种重要菌株,肺炎克雷伯氏菌和梭状芽胞杆菌产1,3-PDO的摩尔产率和生产强度均较高。如果不考虑条件致病菌的前提下,肺炎克雷伯氏菌是发酵法生产1,3-PDO的最理想菌株,通过发酵条件优化提

高其1,3-PDO产量,具有十分广阔的前景。

2 肺炎克雷伯氏菌产1,3-PDO的厌氧代谢途径

肺炎克雷伯氏菌产1,3-PDO厌氧代谢途径

的阐明是对其进行应用的重要环节。由于肺炎克雷伯氏菌产 1,3-PDO 的强度、产率均较高,近年来对其厌氧代谢途径、代谢机理、关键酶等已经进行了较为详细的研究,现总结归纳如下作为参考。

2.1 产 1,3-PDO 的厌氧代谢途径

如图 1 所示,肺炎克雷伯氏菌厌氧代谢途径中甘油歧化有两条途径,一是生成 ATP 和还原当量的乙酸/乙醇途径,该途径伴随菌体细胞的生

长;二是利用前一途径生成的过量还原型辅酶 I,将甘油转化为 1,3-PDO,其产率与丙酮酸代谢途径密切相关,该途径对于调节还原当量的平衡起着重要作用。在生物转化中,甘油被转化为 1,3-PDO 的同时,还生成乙酸、2,3-丁二醇、乙醇或丁酸等副产品;主要副产物为乙酸和乙醇,次要副产物为 2,3-丁二醇、乳酸和琥珀酸^[25]。如何更有效地使甘油转化为 1,3-PDO,减少副产物的积累,是该菌株应用的关键。

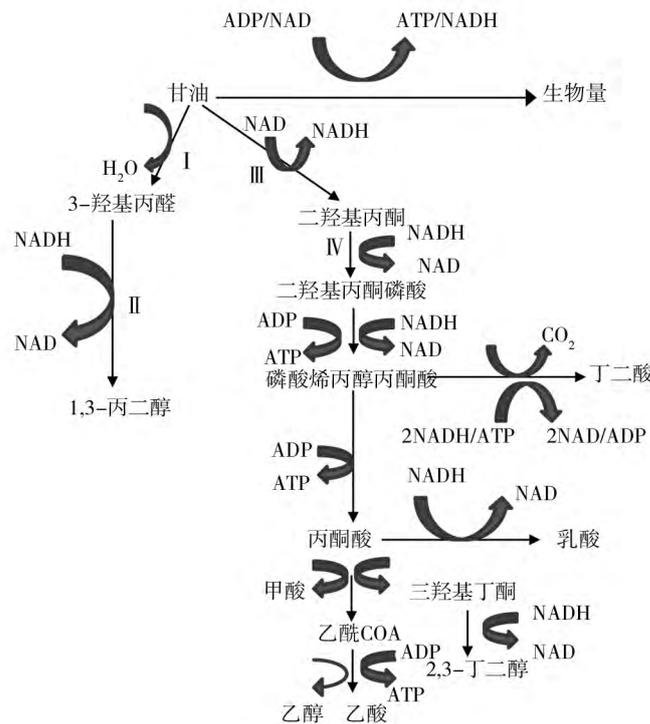


图 1 肺炎克雷伯氏菌厌氧代谢相关途径

Fig. 1 The relateel anaerobic metabolism pathways of *Klebsilla pneumoniae*

2.2 产 1,3-PDO 厌氧代谢的重要酶

在厌氧条件下,甘油脱水酶、1,3-PDO 氧化还原酶(1,3-propanediol oxidoreductase, PDOR)、甘油脱氢酶(glyceroldehydrogenase, GDH)和二羟丙酮激酶(Dihydroxyacetone kinase)四种酶起重要作用。甘油进入细胞后除了为自身生长提供能量和原料外,还经还原和氧化两个途径进行代谢^[26]。在还原支路中,甘油进入细胞,部分被甘油脱水酶催化,生成 3-羟基丙醛和水,产物 3-羟基丙醛再经 1,3-PDO 氧化还原酶作用,消耗还原力 NADH 生成终产物 1,3-PDO。在限制底物情况下,甘油脱水酶是产物生成的限速酶;当底物过量

时,1,3-PDO 氧化还原酶是限速酶,生成的 3-HPA 抑制细胞生长和代谢^[27]。在氧化途径中,另一部分甘油在甘油脱氢酶作用下,转化为二羟基丙酮,后者再经磷酸化脱氢进入丙酮酸代谢途径,生成各种副产物^[28]。因此,在 1,3-PDO 生产中,要合理利用菌株,减少副产物积累,优化工艺设计,提高 1,3-PDO 产量。

2.2.1 厌氧发酵中的“振荡”现象 在肺炎克雷伯氏菌甘油厌氧连续发酵中,当底物浓度、pH 或稀释速率发生变动时,菌体生物量、比生长速率以及副产物生成呈规律性“振荡”。推测“振荡”可能归因于参与代谢的丙酮酸甲酸裂解酶(PFL)和

丙酮酸脱氢酶(PDH)作用的不同步性,以及还原当量(NAD/NADH_2)的不平衡所致^[29]。而且副产物和还原当量通量“振荡”之间存在明显关系。在振荡条件下,受影响的主要是丙酮酸代谢,所有丙酮酸代谢产物的比生成速率差异显著。相反,在振荡期间,底物摄取、ATP生成和直接来自甘油衍生的1,3-PDO或丙酮酸代谢上游衍生产物形成的特定速率几乎不受影响。在振荡和稳态条件下,除了丙酮酸甲酸裂解酶外,其他酶系统同时参与丙酮酸脱羧代谢;而在振荡条件下,这些酶活性都会发生振荡。因此,“振荡”和“滞后”可能是由于底物过量和环境剧变,触发了丙酮酸代谢中酶的调控失调所致^[30]。

2.2.2 厌氧发酵中“振荡”的酶学基础 在稳态、振荡和瞬态厌氧连续培养中,对甘油脱氢酶、甘油脱水酶和1,3-PDO氧化还原酶三种酶的体内外活性分析表明,尽管甘油浓度对上述三种酶的体外活性都有负面影响,但对体内活性却有促进作用。在甘油浓度较低的情况下,生长速率显著影响体外和体内酶活性的比率;但在甘油过量的情况下,生长速率不影响酶活性比率。甘油氧化途径流量主要由代谢水平上体内酶活性调节控制,而还原途径流量主要由酶合成控制。高甘油浓度下,甘油脱水酶是甘油消耗和1,3-PDO生成的关键酶,振荡培养中该酶的体外和体内活性都发生“振荡”。菌体生长和产物生成对底物浓度变化十分敏感,这种敏感性是遗传和代谢网络动态变化的结果^[31]。可见,阐明代谢网络动态变化与1,3-PDO产量相关性是亟需解决的问题。

2.2.3 1,3-PDO产量与代谢流量变化之间的关系 基因组尺度(Genome scale)代谢网络分析,是从基因组序列出发,结合基因、蛋白质、代谢数据库及实验数据,从系统角度定量研究代谢过程,阐明各个组分之间相互作用的有效方法^[32]。为了研究肺炎克雷伯氏菌1,3-PDO产量与代谢途径中流量变化之间的关系,Pan等^[33]将基因组尺度流量平衡分析与细胞外代谢物动力学模型相结合,构建了一种基于动态流量平衡分析的方法,扩展了三条新的代谢途径或位点,即在二羟基丙酮(DHA)节点引出的戊糖磷酸途径(PPP),提供更多还原当量;3-磷酸甘油酯(3PG)节点上的合成氨基酸分支;三羧酸(TCA)循环中的 α -酮戊二酸

位点导出的通向谷氨酸和其他氨基酸合成的代谢途径。通过代谢途径中重要节点动态流量分布与1,3-PDO产率之间的关系分析表明,DHA到PPP动态通量变化和TCA循环中流量变化与1,3-PDO产量均呈正相关。辅助因子四氢叶酸形成反馈环,对氨基酸合成代谢途径中TCA通量变化也有影响。可见,对产1,3-PDO肺炎克雷伯氏菌关键酶的深入研究,也可采用分子生物学技术对关键酶性质做更深入研究。随着代谢网络途径和节点同1,3-PDO产量相关性的阐明,以及甘油代谢途径的拓展,肺炎克雷伯氏菌发酵生产1,3-PDO将发挥更大的优势。

3 产1,3-PDO肺炎克雷伯氏菌的筛选和培养

3.1 产1,3-PDO肺炎克雷伯氏菌的筛选

在筛选产1,3-PDO肺炎克雷伯氏菌时,可采用酸碱度和温度变化的方法进行。Raghuandan等^[34]利用M9培养基,设置不同pH和温度条件,使用纯甘油底物,对12株菌进行摇瓶发酵,考察其对底物利用能力,筛选到甘油降解率 $>80\%$ 的菌株SM7,经鉴定为肺炎克雷伯氏菌,该菌最大甘油耐受质量浓度达110 g/L。可见,传统筛选法仍然可行,合理利用能获得优良的菌株。菌株的耐受性一直是人们关注的热点。赵红英^[35]通过提高培养基中甘油浓度和平板包埋培养驯化,提高了肺炎克雷伯氏菌甘油耐受力 and 厌氧生长能力,1,3-PDO发酵终浓度和甘油转化率均有所提高。Wang等^[36-37]在研究产脲水合酶红球菌底物耐受性时发现,提高底物丙烯腈浓度的驯化,能获得较高丙烯酰胺产量。通过复合诱变和双亲灭活原生质体融合,可有效改良菌株。可见,在筛选产1,3-PDO肺炎克雷伯氏菌时,为了提高菌株的底物耐受性也可以借鉴传统的筛选方式和菌种选育策略。Ma等^[38]在肺炎克雷伯氏菌2e分批发酵粗甘油转化1,3-PDO时发现,粗甘油及其主要杂质对该菌生长、关键酶活性和1,3-PDO几乎无影响。该菌含30个与甘油无氧代谢及1,3-PDO合成相关基因。实时定量PCR分析表明,与纯甘油相比,在粗甘油中编码甘油代谢和1,3-PDO生物合成关键酶的多数基因显著上调。该菌株存在一

种新甘油摄取促进蛋白,比其他肺炎克雷伯氏菌应激反应蛋白数量更多。可见,获得耐受粗甘油的肺炎克雷伯氏菌,并对甘油耐受性分子机制进行研究,不但能提高 1,3-PDO 产量,而且对基因工程菌株构建,优化代谢途径都有理论和应用价值。

3.2 产 1,3-PDO 肺炎克雷伯氏菌的培养优化

对培养基和培养条件进行优化是提高 1,3-PDO 产量的常用方法。Supaporn 等^[39]采用统计学方法,推导出甘油、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、微量元素、pH 值和培养时间等因子对 1,3-PDO 浓度、产量、选择性和生产力等单一效应和交互效应的统计学模型,确定了产 1,3-PDO 的最佳条件。Hiremath 等^[40]对肺炎克雷伯氏菌 ATCC15380 利用麻疯树生物柴油产生的粗甘油为底物生产 1,3-PDO 反应条件进行优化,优化后的 1,3-PDO 产量高达 56 g/L,甘油转化率达 0.85 mol/mol。Rosarin 等^[41]采用常规方法,研究了表达融合蛋白的新型重组大肠埃希菌 BP41Y3,优化了生产 1,3-PDO 的环境和营养条件。在 10 个营养变量中,选择富马酸盐、 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 和蛋白胨,研究它们之间的交互作用,获得最佳培养基。通过厌氧培养 24 h 后,“振荡”最大质量浓度为 11.92 g/L。可见,利用统计学、采用响应面等方法对培养基成分和条件进行优化,仍然是常规有效的方法。

4 影响肺炎克雷伯氏菌产 1,3-PDO 的因素

4.1 氧气对肺炎克雷伯氏菌产 1,3-PDO 的影响

肺炎克雷伯氏菌属于兼性厌氧菌。作为重要发酵参数的氧气,对菌株发酵生产 1,3-PDO 具有重要影响。在低、中、高甘油浓度下,Wang 等^[42]在厌氧和有氧条件下,研究了肺炎克雷伯氏菌连续发酵生产 1,3-PDO。在有氧高甘油浓度发酵条件下(通气量为 0.04 vvm),1,3-PDO 随甘油浓度增加而增加,最高可达 266 mmol/L(此时甘油浓度达 760 mmol/L)。然而,在厌氧条件下,随着甘油浓度增加,1,3-PDO 产率却逐渐降低;在较低甘油浓度条件下(270 mmol/L),1,3-PDO 最高产率为 520 mmol/L。在高甘油浓度条件下进行有氧发酵,甘油脱水酶比活性最高为 0.04 U/mg。在

实验设置的所有甘油浓度和有氧条件下,甘油脱水酶和 1,3-PDO 氧化还原酶的比活性都有所提高,这意味着在微需氧条件下 *dha* 操纵子不会受到抑制。随着甘油浓度增加,更多碳通量转移到氧化途径,导致 1,3-PDO 生成通量降低,该途径氧化分支中碳通量增加并不均匀分布。Chen 等^[43]研究了肺炎克雷伯氏菌在微需氧条件下分批发酵,发酵结束时,产生的乙醇比厌氧条件下少,间歇微需氧发酵时间明显短于厌氧发酵,导致 1,3-PDO 产率增加。Liu 等^[44]在微需氧条件下,利用肺炎克雷伯氏菌,以甘油为原料生产 1,3-PDO,补料分批发酵工艺的发酵罐体积已成功扩大到 1 m³。在微需氧条件下,1,3-PDO 的最终浓度和产率(72 g/L ~ 2.1 g/(L·h))与厌氧条件下相近。可见,研究不同氧气环境对发酵的影响,应该有针对性地设计 1,3-PDO 生产发酵工艺。Ma 等^[45]在不同曝气方式下,研究了肺炎克雷伯氏菌 XJPD-Li 分批发酵甘油转化,发现 1,3-PDO 产量和产率分别呈“厌氧条件 > 无曝气条件 > 好氧条件”的规律减少。在好氧条件下,甘油对 1,3-PDO 产率最低,但生物量最高。在补料分批发酵中,就 1,3-PDO 产量而言,好氧条件 > 厌氧条件 > 无曝气条件;就产率而言,厌氧条件 > 好氧条件 > 无曝气条件。三种条件下,在最初 12 h 内,1,3-PDO 产量均较好。可见,发酵形式不同,获得的 1,3-PDO 最终浓度和产率也不同。因此应根据不同需要,采取不同的氧气控制的发酵形式。

4.2 pH 对肺炎克雷伯氏菌产 1,3-PDO 的影响

Ji 等^[46]在不同分批发酵条件下进行 pH 静态补料分批发酵研究,发现副产物 2,3-丁二醇和乳酸产量与 pH 值密切相关,发酵结束时副产物和残余甘油浓度较高,不利于 1,3-PDO 产生。pH 值为 5.0 ~ 6.5 时,主要副产物为 2,3-丁二醇,而在 pH 值 7.1 ~ 8.0 时,主要副产物为乳酸,说明菌体产生了自我保护机制,在环境 pH 值变化时,菌体细胞会对代谢途径进行更改。采用周期性 pH 值波动(6.3 ~ 7.3)投喂策略,在 pH 周期性低或高胁迫下,2,3-丁二醇和乳酸代谢途径处于亚活跃状态,采用该种分批补料策略,实现了 1,3-PDO 高效生产(质量浓度达 70 g/L,每摩尔甘油获得 0.700 毫摩尔 1,3-PDO,产率达 0.97

g/(L·h),两个主要副产物和残甘油浓度均较低。pH 是影响发酵的一个重要参数,对 pH 的合理调控就可达到增加生成量,减少副积累的目的。Petrov 等^[47]研究发现,采用“强制 pH 波动”分批发酵,以一定 ΔpH (振幅范围 1.0~2.0)连续升高 pH 值,不仅可提高肺炎克雷伯氏菌的 1,3-PDO 产量,而且产生副产品较少。方法是按照 $\Delta\text{pH}=1.0$ 的增加量,每隔 3 h 增加一次 pH。与相应进料批次(恒定 pH=7.0)发酵相比,1,3-PDO 最高增加 10%;副产物显著减少。可见,掌握周期性变化规律,遵循 pH 的周期性规律,能提高 1,3-PDO 产量。

4.3 底物和产物对肺炎克雷伯氏菌产 1,3-PDO 的影响

4.3.1 底物甘油对产 1,3-PDO 的影响 为了使发酵过程稳定、重复性好,可精确控制底物甘油的投料来提高 1,3-PDO 产量。Huang 等^[48]设计了一种基于发酵动力学的甘油自动进料策略,采用转基因肺炎克雷伯氏菌 LDH526,以甘油为唯一碳源,使 1,3-PDO 生产质量浓度 > 90 g/L。将底物投料速率与 pH、发酵时间等变量耦合,进行甘油自启动投料和甘油浓度动态控制,72 h 后 1,3-PDO 最终质量浓度 > 95 g/L。可见,利用自动化技术准确地进行底物的投放,可有效提高 1,3-PDO 产量。

4.3.2 辅助底物对产 1,3-PDO 的影响 除了甘油底物,添加辅助底物进行共底物生产 1,3-PDO 是一种改良的新方法。添加半纤维素水解物,能使菌株获得更多的生物量和还原力,从而提高 1,3-PDO 产量。Jin 等^[49]发现,木糖和甘露糖能促进 1,3-PDO 产生和细胞生长;低浓度糠醛和醋酸钠能促进菌体生长和 1,3-PDO、乙酸盐生成。以半纤维素水解物为共底物的补料分批发酵,最终 1,3-PDO 产量、甘油转化率和生产率比单一底物甘油发酵均有所提高。NADH 消耗量是调节还原当量平衡的关键,甘油和木糖共发酵可提高 1,3-PDO 还原当量。Jin 等^[50]添加木糖作为共底物,发现可产生更多还原当量,提高细胞生长速度。在微需氧分批发酵中,共发酵相关的 1,3-PDO 浓度、甘油转化率和生物量都有提高。陈琳等^[51]研究表明,肺炎克雷伯氏肺炎杆菌经过磷酸戊糖途径可利用 D-木糖为菌体代谢提供大量还原力,促进

1,3-PDO 的合成。在以木糖作为辅助底物的微氧批次补料发酵中,1,3-PDO 质量浓度、甘油转化率及产量均明显提高。吴家鑫等^[52]研究了辅助碳源蔗糖与葡萄糖对重组肺炎克雷伯氏菌批式发酵生产 1,3-PDO 的影响。对发酵工艺进行放大,并优化流加策略,发现葡萄糖作为辅助碳源优于蔗糖。以葡萄糖为辅助碳源,采用指数流加策略,30 L 发酵罐中 1,3-PDO 的产量显著提高。可见,共底物发酵比甘油单一底物发酵能显著提高 1,3-PDO 产量。

4.3.3 产物对 1,3-PDO 生成的影响 不同代谢产物对 1,3-PDO 生产影响不同。Barbirato 等^[53]发现,无论初始甘油含量如何,聚团肠杆菌甘油发酵在消耗大约 430 mmol/L 甘油后会产生 3-羟基丙醛,阻止了菌体生长和产物 1,3-PDO 生成。经质子核磁共振证实 3-羟基丙醛对菌体生长具有抑制作用。Lin 等^[54]发现,在肺炎克雷伯氏菌培养液中添加 5 mmol/L 延胡索酸,甘油消耗率和 1,3-PDO 生成均有提高;同时, NAD^+ 与 NADH 比值下降。Zhong 等^[55]研究了乳酸和 3-羟基丙醛对肺炎克雷伯氏菌发酵产 1,3-PDO 的影响,发现它们对正常和乳酸途径缺陷菌株生产 1,3-PDO 均有影响。直接抑制 1,3-PDO 产生的原因是 3-羟基丙醛的早期积累,而非发酵后期产生的乳酸。通过减少发酵初期 3-羟基丙醛的积累,1,3-PDO 浓度和产率分别比初始实验水平提高了 18% 和 16%。可见,正是由于 3-羟基丙醛的早期积累,而非发酵后期乳酸积累,才导致了 1,3-PDO 最终浓度的降低。刘龙飞等^[56]分析了产乳酸和 2,3-丁二醇途径基因敲除菌的乳酸代谢特性,结果发现,前期添加乳酸能使 1,3-PDO 产量迅速降低;而发酵 10 h 后添加乳酸,几乎对 1,3-PDO 的生产无抑制作用。乳酸敲除菌株发酵后期能够消耗培养基中的乳酸,对乳酸具有耐受性。副产物 2,3-丁二醇基因工程敲除菌前期乳酸过早积累被解除后,1,3-PDO 的产量大幅度提高。可见,分析代谢途径中导致 1,3-PDO 产量下降的真正原因,然后适当删除或过表达副产物产生的关键酶基因,构建基因工程菌株有望提高 1,3-PDO 产量;了解乳酸在发酵过程中的变化规律,不但有利于工艺的合理设计,而且也有利于对基因工程菌株的构建提供

科学指导。

4.4 盐对菌体产 1,3-PDO 的影响

无机盐是培养基的重要成分。Xu 等^[57]发现在低盐浓度下,细胞生长和产物形成率较高;高盐浓度下细胞生长缓慢,1,3-PDO 最终浓度、甘油的 1,3-PDO 转化率以及 1,3-PDO 氧化还原酶活性均有所降低。李莉莉等^[58]发现在肺炎克雷伯氏菌(HSL4)发酵生产 1,3-PDO 的培养基中,磷酸盐对发酵过程影响较大。利用 5 L 发酵罐进行补料发酵,在培养基中高、低初始磷酸根浓度条件下,1,3-PDO 终质量浓度均在 75 g/L 左右。在低磷条件下,底物甘油消耗量较少,1,3-PDO 转化率较高;除 2,3-丁二醇外,其他副产物积累均比高磷条件下少。高磷促进乙酸、乙醇、乳酸等副产物生成,且改变中、后期发酵环境,增加下游分离提取 1,3-PDO 压力。Zheng 等^[59]采用含有过量甘油的铵和磷酸盐限制的恒化培养基,研究了肺炎克雷伯氏菌 1,3-PDO 生产。结果发现,在限氮和限磷酸盐培养基中,大约 50% 分解代谢通量直接作用于 1,3-PDO 合成。在 36 h 内,限氮分批培养产生的 1,3-PDO 明显高于有机酸产量。但是,限磷酸盐分批培养产生 1,3-PDO 小于乳酸产量。可见,在肺炎克雷伯氏菌甘油发酵生产 1,3-PDO 过程中,要控制培养基中无机盐的种类和含量。

5 肺炎克雷伯氏菌产 1,3-PDO 的工程技术策略

5.1 单一辅因子工程和多模块工程策略

单一辅因子策略能提高 1,3-PDO 和 2,3-丙二醇的产量。Wang 等^[60]采用辅因子工程策略,构建糖酵解中具有较高 NAD(P)H 再生率的 ED 途径和转氢化酶为基础的 NADH 再生体系,通过调节细胞内 NADH/NAD⁺ 比值,利用葡萄糖和甘油混合物提高 1,3-PDO 和 2,3-丙二醇浓度。NADH/NAD⁺ 比值提高能影响中枢碳途径基因转录水平和细胞生长。构建后菌体 NADH/NAD⁺ 比值比原始菌丙二醇质量浓度增加到 110.8 g/L,增加了 92.8%;摩尔产率和生产强度分别增加到 0.78 mol/mol 和 3.46 g/(L·h)。联合使用若干策略,形成叠加效应能更好地提高 1,3-PDO 的产量。Wang 等^[61]利用多模块工程技术,提高了肺

炎克雷伯氏菌 1,3-PDO 产量和耐受性。首先采用集中在甘油途径进化,使 1,3-PDO 产量增加 25%,副产物显著降低,1,3-PDO 耐受性提高到 150 g/L;接着对共底物转运体系进行调控,突变体 1,3-PDO 浓度、产量和产率进一步提高(分别达到 76.4 g/L、0.53 mol/mol、2.55 g/(L·h));最后引入 NADH 再生体系,重组菌株获得了最高的 1,3-PDO 产量、摩尔产率和生产强度(86 g/L、0.59 mol/mol、2.69 g/(L·h))。可见,不同模块组合不断升级,可一步步增加 1,3-PDO 产量,比单一模块工程更有潜力。

5.2 采用集成建模预测和优化策略

动力学模型固有的不确定性限制了其产物的预测能力。利用数学模型和计算机模拟优化是目标产物形成的优化策略。Pan 等^[62]以甘油为底物,对肺炎克雷伯氏菌产 1,3-PDO 产量提高进行了优化,采用集成建模技术降低了模型对发酵过程的不确定性,提高了其预测性能。①通过灵敏度分析,确定了对模型有显著影响的参数作为集成建模可调参数。②确定合适模型误差阈值系数,并采用抽样方法生成尽可能多的等效参数集。③每一组参数分别应用于模拟,并将所有预测值整合为加权平均值,得到预测期望值。与传统单参数模拟相比,集成建模预测值与实验值相对误差小,模型预测性能显著提高,获得了 1,3-PDO 最佳产率和收率。集成建模补偿了模型不确定性,预测更准确。

5.3 采用肺炎克雷伯氏菌产 1,3-PDO 的生产监测策略

5.3.1 化学计量学模型和荧光光谱技术优化产 1,3-PDO 的监测 Rossi 等^[63]应用化学计量学模型和荧光光谱技术,监测了肺炎克雷伯氏菌在不同通气条件下的代谢过程。在需氧和厌氧条件下,将多波长荧光技术应用于培养过程参数在线监测,观察到光谱差异可反映细胞代谢不同的状态。为了预测生物量、甘油和 1,3-PDO 等工艺变量,根据连续测量荧光光谱建立了化学计量模型。虽然甘油和 1,3-PDO 不是荧光化合物,但可作为变量应用于在线监测代谢过程以提高 1,3-PDO 产量。

5.3.2 ORP 监测优化 1,3-PDO 生产 细胞外氧化还原电位(ORP)可作为科学监测指标。Du

等^[64]在分批发酵过程中,利用 ORP 监测肺炎克雷伯氏菌 1,3-PDO 生产。研究发现 -190 mV 的 ORP 水平下,细胞生长快,1,3-PDO 浓度较高。测定了不同 ORP 水平下 NAD^+/NADH 比值,确定 NAD^+/NADH 比值关键点为 4,将大于这一关键点的发酵环境设为相对氧化环境,反之为相对还原环境。在氧化环境中 1,3-PDO 产率和比生长速率均高。Du 等^[65]也提出了基于 ORP 的突变体筛选新方法。具体步骤:①确定野生型菌株生长和生产 1,3-PDO 的首选 ORP 范围;②将化学诱变培养物置于对野生型菌株有害的低 ORP 水平内;③选择在有害 ORP 水平下表现出高比生长率的菌落,并研究其产生 1,3-PDO 能力。当 ORP 控制在 -280 mV,从 11 个分离菌株中筛选出 4 个阳性突变株。补料分批发酵中,突变体首选 ORP 水平(-280 mV)显著低于其亲本(-190 mV)。突变体细胞内还原通量增强,促进了 1,3-PDO 的生成。可见,充分利用 ORP 监测特点和规律或通过 ORP 筛选突变菌可有效获得高产突变菌株,有效提高 1,3-PDO 产量。

6 展 望

生物柴油在全球大规模生产,给其副产物甘油的利用带来了挑战。与化学合成法相比,微生物法可有效利用剩余的甘油副产物生产 1,3-PDO,具有明显的优势,微生物法也有助于解决甘油过剩带来的环境污染问题,并有利于生物柴油行业的可持续发展。随着发酵工艺研究的进展,对甘油生物转化过程的代谢途径、动力学特征和动态行为的认识逐渐深入,今后一方面要通过控制培养条件改变代谢途径,在保持高转化率的情况下提高 1,3-PDO 浓度和生产强度;进一步优化甘油或辅助底物代谢中还原当量的分布和平衡,减少副产物的积累和抑制作用,提高 1,3-PDO 产率和浓度;另一方面要重视通过基因工程、蛋白质工程和代谢网络工程等方法构建优良工程菌株,阐明更多的代谢途径和相关机理,为 1,3-PDO 的产生开辟新途径。相信微生物发酵法在生物技术领域生产 1,3-PDO 将成为新范例。

参考文献:

[1] 王志成. 浅论石油资源短缺对我国经济的影响及对策[J].

科技信息, 2012(32):1.

- [2] Kumar V, Park S. Potential and limitations of *Klebsiella pneumoniae* as a microbial cell factory utilizing glycerol as the carbon source[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(1):150-167.
- [3] Saxena RK, Anand P, Saran S, et al. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities[J]. *Biotechnology Advances*, 2009, 27(6):895-913.
- [4] Kaur J, Sarma AK, Jha MK, et al. Valorisation of crude glycerol to value-added products: Perspectives of process technology, economics and environmental issues [J]. *Biotechnology Reports*, 2020, 27(10):1-52.
- [5] Kalia VC, Prakash J, Koul S. Biorefinery for glycerol rich biodiesel industry waste [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2016, 56(2):113-125.
- [6] August F. Ueber die bildung und darstellung von trimethylalkohol aus glycerin [J]. *Monatshefte Fur Chemie*, 1881(2):636-641.
- [7] Liang Q, Zhang H, Li S, et al. Construction of stress-induced metabolic pathway from glucose to 1, 3-propanediol in *Escherichia coli* [J]. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2011, 89(1):57-62.
- [8] 杨苗苗. 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[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(7):1069-1080.
- [9] 唐浩. 利用克雷伯氏肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)发酵产 1,3-丙二醇研究[D]. 上海:华东理工大学, 2011.
- [10] Metsoviti M, Paraskevaidi K, Koutinas A, et al. Production of 1,3-propanediol, 2,3-butanediol and ethanol by a newly isolated *Klebsiella oxytoca* strain growing on biodiesel-derived glycerol based media [J]. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12):1872-1882.
- [11] 韩克星. 1,3-丙二醇生产工艺的对比及选择[J]. *化工设计通讯*, 2019, 45(8):64-65, 90.
- [12] Metsoviti M, Zeng AP, Koutinas AA, et al. Enhanced 1,3-propanediol production by a newly isolated *Citrobacter freundii* strain cultivated on biodiesel-derived waste glycerol through sterile and non-sterile bioprocesses [J]. *Journal Biotechnology*, 2013, 163(4):408-418.
- [13] Maervoet VET, Beauprez J, Maeseineire SLD, et al. *Citrobacter werkmanii*, a new candidate for the production of 1,3-propanediol: strain selection and carbon source optimization [J]. *Green Chemistry*, 2012, 14(8):2168-2178.
- [14] Jolly J, Hitzmann B, Ramalingam S, et al. Biosynthesis of 1,3-propanediol from glycerol with *Lactobacillus reuteri*: effect of operating variables [J]. *Journal Bioscience Bioengineering*, 2014, 118(2):188-194.
- [15] Moon C, Lee CH, Sang BI, et al. Optimization of medium compositions favoring butanol and 1,3-propanediol production from glycerol by *Clostridium pasteurianum* [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(22):10561-10568.

- [16] Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Dietz D, et al. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation Process [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2011, 91 (1): 101-112.
- [17] Gungormusler M, Gungormusler M, Gonen C, et al. 1,3-Propanediol production potential of *Clostridium saccharobutylicum* NRRLB-643 [J]. Nature Biotechnology, 2010, 27 (6): 782-788.
- [18] Jiang W, Wang S, Wang Y, et al. Key enzymes catalyzing glycerol to 1,3-propanediol [J]. Biotechnology for Biofuels, 2016, 57(9):1-19.
- [19] Jiang, LiLi, Liu, et al. High tolerance to glycerol and high production of 1,3-propanediol in batch fermentations by microbial consortium from marine sludge [J]. Engineering in Life Sciences, 2017, 17(6):635-644.
- [20] Jun SA, Moon C, Kang CH, et al. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol using raw glycerol with suspended and immobilized *Klebsiella pneumoniae* [J]. Applied Biochemistry Biotechnology, 2010, 161(161): 491-501.
- [21] Zhao YN, Chen G, Yao SJ. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae* [J]. Biochemistry Engineering Journal, 2006, 32(2): 93-99.
- [22] Zhang Y, Li Y, Du C, et al. Inactivation of aldehyde dehydrogenase: A key factor for engineering 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Metabolic Engineering, 2006, 8(6):578-586.
- [23] Mendes FS, González-Pajuelo M, Cordier H, et al. 1,3-Propanediol production in a two-step process fermentation from renewable feedstock [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2011, 92(3):519-527.
- [24] Chatzifragkou A, Papanikolaou S, Dietz D, et al. Production of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum* growing on biodiesel-derived crude glycerol through a non-sterilized fermentation process [J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2011, 91 (1): 101-112.
- [25] Chilakamarry CR, Sakinah A, Zularisam AW, et al. Glycerol waste to value added products and its potential applications [J]. Systems Microbiology & Biomanufacturing, 2021 (1): 378-396.
- [26] Yang Q, Chen Q, Niu T, et al. Robustness analysis and identification for an enzyme-catalytic complex metabolic network in batch culture [J]. Bioprocess & Biosystems Engineering, 2021, 44(3):1511-1524.
- [27] Sun Y, Ye J, Mu X, et al. Nonlinear mathematical simulation and analysis of dha regulon for glycerol metabolism in *Klebsiella pneumoniae* [J]. Chinese Journal Chemical Engineering, 2012, 20(5):958-970.
- [28] Xiu ZL, Zeng AP. Present state and perspective of downstream processing of biologically produced 1,3-propanediol and 2,3-butanediol [J]. Applied Microbiology & Biotechnology, 2008, 78(6):917-996.
- [29] Menzel K, Zeng A, Biebl H, et al. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: I. The phenomena and characterization of oscillation and hysteresis [J]. Biotechnology & Bioengineering, 1996(52):516-571.
- [30] An-Ping Zeng, Kirsten Menzel, Wolf-Dieter Deckwer. 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 [J]. Biotechnology & Bioengineering, 1996, 52(5):561-571.
- [31] Ahrens K, Menzel K, A-Zeng, et al. Kinetic, dynamic, and pathway studies of glycerol metabolism by *Klebsiella pneumoniae* in anaerobic continuous culture: III. Enzymes and fluxes of glycerol dissimilation and 1,3-propanediol formation [J]. Biotechnology & Bioengineering, 1998, 59(5): 544-552.
- [32] 王晖, 马红武, 赵学明. 基因组尺度代谢网络研究进展 [J]. 生物工程学报, 2010(10):23-31.
- [33] Pan DT, Wang XD, Shi HY, et al. Dynamic flux balance analysis for microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Bioprocess & Biosystems Engineering, <https://doi.org/10.1007/s00449-018-2002-4>
- [34] Raghunandan K, Mchunu S, Kumar A, et al. Biodegradation of glycerol using bacterial isolates from soil under aerobic conditions [J]. Journal of Environmental & Health Part A Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering, 2014, 49 (1):85-92.
- [35] 赵红英. 发酵法生产 1,3-丙二醇培养条件优化与工艺改进 [D]. 北京:清华大学, 2002.
- [36] Wang SW, Wang QH, Zhai LP, et al. Genetic diversity among the microorganisms in daqu used for beidacang liquor as revealed by RAPD analyses [J]. Advances in Applied Biotechnology, 2015(333):99-108.
- [37] Wang SW, Wang M, Wang QH. Breeding of NHase hyper-producing *Rhodococcus ruber* strain LUV30-06 and verification of mutants by RAPD [J]. American Journal of Molecular Biology, 2013, 3(2):108-114.
- [38] Ma J, Jiang H, Hector SB, et al. Adaptability of *Klebsiella pneumoniae* 2e, a newly isolated 1,3-propanediol-producing strain, to crude glycerol as revealed by genomic profiling [J]. Applied & Environmental Microbiology, 2019, 85 (10): e00254-219.
- [39] Supaporn P, Yeom SH. Statistical optimization of 1,3-propanediol (1,3-PD) production from crude glycerol by considering four objectives: 1,3-PD concentration, yield, selectivity, and productivity [J]. Applied Biochemistry Biotechnology, 2018, 186(3):644-661.
- [40] Hiremath A, Kannabiran M, Rangaswamy V. 1,3-Propanediol

- production from crude glycerol from Jatropha biodiesel process [J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 28(1):19-23.
- [41] Rosarin Rujananon, Poonsuk Prasertsan, Amornrat Phongdara. Biosynthesis of 1,3-propanediol from recombinant *E. coli* by optimization process using pure and crude glycerol as a sole carbon source under two-phase fermentation system [J]. *World Journal Microbiology & Biotechnology*, 2014, 30(4):1359-1368.
- [42] Wang YH, Hu T, Xiu ZL. Effect of aeration strategy on the metabolic flux of *Klebsiella pneumoniae* producing 1,3-propanediol in continuous cultures at different glycerol concentrations [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2011(38):705-715.
- [43] Chen X, Zhang DJ, Qi WT, et al. Microbial fed-batch production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2003, 63(2):143-146.
- [44] Liu HJ, Zhang DJ, Xu YH, et al. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* under micro-aerobic conditions up to a pilot scale [J]. *Biotechnology Letters*, 2007, 29(8):1281-1285.
- [45] Ma BB, Xu XL, Zhang GL, et al. Microbial production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li under different aeration strategies [J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2009, 52(1):127-134.
- [46] Ji XJ, Huang H, Zhu JG, et al. Efficient 1,3-propanediol production by fed-batch culture of *Klebsiella pneumoniae*: The role of pH fluctuation [J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2009, 159(3):60-65.
- [47] Petrov K, Stoyanov A. Accelerated production of 1,3-propanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* using the method of forced pH fluctuations [J]. *Bioprocess & Biosystems Engineering*, 2012, 35(3):317-321.
- [48] Huang J, Chen Z, Sun Y, et al. Automatically feeding strategy for 1,3-propanediol fermentation of *Klebsiella pneumoniae* LDH526 [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2015, 31(10):1520-1527.
- [49] Jin P, Li S, Lu SG, et al. Improved 1,3-propanediol production with hemicellulosic hydrolysates (corn straw) as cosubstrate: Impact of degradation products on *Klebsiella pneumoniae* growth and 1,3-propanediol fermentation [J]. *Bioresource Technology*, 2011, 102(2):1815-1821.
- [50] 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* [J]. *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 2011, 165(7-8):1532.
- [51] 陈琳,王领民,金平,等. 甘油和木糖共发酵生产1,3-丙二醇的研究 [J]. *化学工程*, 2013, 41(7):5-8.
- [52] 吴家鑫,王凤寰,王峥,等. 蔗糖与葡萄糖作辅助碳源对重组 *Klebsiella pneumoniae* 发酵生产1,3-丙二醇的影响 [J]. *过程工程学报*, 2014, 14(4):660-663.
- [53] Barbirato F, Grivet JP, Soucaille P, et al. 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by enterobacterial species [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1996, 62(4):1448-1451.
- [54] Lin R, Liu H, Hao J, et al. Enhancement of 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* with fumarate addition [J]. *Biotechnology Letters*, 2005, 27(22):1755-1759.
- [55] Zhong Z, Liu L, Zhou J, et al. Influences of 3-hydroxypropionaldehyde and lactate on the production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Bioresources & Bioprocessing*, 2014, 1(1):2.
- [56] 刘龙飞,周佳佳,崔毅力,等. 1,3-丙二醇发酵过程中乳酸抑制的研究 [J]. *生物技术*, 2014, 24(1):92-96.
- [57] Xu J, Liu P, Tao C, et al. 1,3-propanediol production under salt stress [J]. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2008, 24(6):1098-1102.
- [58] 李莉莉,周胜,高品,等. 磷酸根对海洋克雷伯氏菌合成1,3-丙二醇代谢的影响 [J]. *热带海洋学报*, 2015, 34(5):27-35.
- [59] Zheng ZM, Xu YZ, Wang TP, et al. Ammonium and phosphate limitation in 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(2):289.
- [60] 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):11-15.
- [61] Wang M, Wang GQ, Zhang T, et al. Multi-modular engineering of 1,3-propanediol biosynthesis system in *Klebsiella pneumoniae* from co-substrate [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2016, 101(2):1-11.
- [62] Pan DT, Wang XD, Shi HY, et al. Ensemble optimization of microbial conversion of glycerol into 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Journal Biotechnology*, 2019(301):68-78.
- [63] Rossi DM, Solle D, Hitzmann B, et al. Chemometric modeling and two-dimensional fluorescence analysis of bioprocess with a new strain of *Klebsiella pneumoniae* to convert residual glycerol into 1,3-propanediol [J]. *Journal Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(5):701-708.
- [64] Du C, Yan H, Zhang Y, et al. Use of oxidoreduction potential as an indicator to regulate 1,3-propanediol fermentation by *Klebsiella pneumoniae* [J]. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 2006, 69(5):554-563.
- [65] Du C, Zhang Y, Li Y, et al. Novel redox potential-based screening strategy for rapid isolation of *Klebsiella pneumoniae* mutants with enhanced 1,3-propanediol-producing capability [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 2007, 73(14):4515-4521.