

## 异源表达木糖异构酶基因对克雷伯氏菌 合成 1,3-丙二醇的影响

付晓萌<sup>1,2</sup> 诸葛斌<sup>1,2\*</sup> 陆信曜<sup>1,2</sup> 宗红<sup>1,2</sup> 方慧英<sup>1,2</sup> 宋健<sup>3</sup>

(1. 江南大学 糖化学与生物技术教育部重点实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 工业微生物研究中心 江苏 无锡 214122)

(3. 江南大学 化学与材料工程学院 江苏 无锡 214122)

**摘要:** 【目的】提高克雷伯氏菌胞内还原力以强化 1,3-丙二醇合成。【方法】将来源于大肠杆菌的木糖异构酶基因在克雷伯氏菌中异源表达, 构建重组菌。研究重组菌添加不同浓度木糖为辅底物与甘油共发酵过程中代谢产物和 NADH 的变化规律。【结果】与对照菌相比, 重组菌细胞内还原力 NADH 提高了 0.1–0.3 倍, 1,3-丙二醇产量达到 23.31 g/L, 提高 20%, 1,3-丙二醇转化率从 0.60 mol/mol 提高到 0.73 mol/mol。【结论】木糖异构酶基因的表达强化了木糖代谢途径, 经磷酸戊糖途径积累大量还原力, 促进了 1,3-丙二醇的生成。

**关键词:** 克雷伯氏菌, 1,3-丙二醇, 木糖, 木糖异构酶, NADH

## Impact of the heterologous expression of xylose isomerase gene on the biosynthesis of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*

FU Xiao-Meng<sup>1,2</sup> ZHUGE Bin<sup>1,2\*</sup> LU Xin-Yao<sup>1,2</sup> ZONG Hong<sup>1,2</sup>  
FANG Hui-Ying<sup>1,2</sup> SONG Jian<sup>3</sup>

(1. Carbohydrate Chemistry and Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Research Centre of Industrial Microbiology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(3. School of Chemistry and Material, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

**Abstract:** [Objective] In order to enhance the production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*, the regeneration of reducing power was strengthened. [Methods] The xylose isomerase gene (*xylA*) from *Escherichia coli* was cloned and expressed in *Klebsiella pneumoniae*. The relevant metabolites and NADH concentrations of the recombinant strain were analyzed when it was cultured with xylose and glycerol as co-substrates. [Results] The intracellular reducing equivalent of the recombinant *Klebsiella pneumoniae* was increased by 0.1–0.3 fold. The titer of 1,3-propanediol of the recombinant strain reached 23.31 g/L, which was 20% higher than that of the parent strain. The conversion rate of 1,3-propanediol of the genetic engineered *Klebsiella pneumoniae* was improved

基金项目: 国家 863 计划项目(No. 2012AA021201)

\*通讯作者: Tel: 86-510-85918106; ✉: bzhuge@163.com

收稿日期: 2015-01-13; 接受日期: 2015-04-13; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2015-04-24

from 0.60 mol/mol to 0.73 mol/mol. **[Conclusion]** The xylose metabolic pathway and intracellular reducing power is enhanced with the expression of *xylA* gene, resulted in the improved 1,3-propanediol concentration.

**Keywords:** *Klebsiella pneumoniae*, 1,3-Propanediol, Xylose, Xylose isomerase, NADH

1,3-丙二醇(1,3-Propanediol)是一种重要的化工原料,其主要用途是作为新型聚酯(如 PTT)、聚醚和聚亚氨酯的单体以及溶剂、抗冻剂或保护剂等<sup>[1]</sup>。随着聚酯 PTT 的开发,1,3-丙二醇的市场需求量大大增加<sup>[2]</sup>。其微生物生产方法在近年来受到重视,研究不断深入。但生物法生产 1,3-丙二醇仍然存在得率低、生产成本高等问题,制约了其工业化生产<sup>[3]</sup>。

1,3-丙二醇生物合成过程是典型的生物还原反应,克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)转化甘油生产 1,3-丙二醇的过程需要消耗还原型辅酶 NADH<sup>[4]</sup>(图 1),NADH 供应量不仅直接影响 1,3-丙二醇的产量,而且 NADH 不足会导致中间代谢产物 3-羟基丙醛累积,对细胞生长产生毒害作用。因此适当提高胞内 NADH 供应量,有望提高 1,3-丙二醇合成效率<sup>[5]</sup>。吴立新<sup>[6]</sup>和 Lü 等<sup>[7]</sup>通过添加木糖累积胞内还

原力,提高了  $\omega$ -羟基脂肪酸和(S)-苯基乙二醇的产量;Zhang 等<sup>[8]</sup>和 Xu 等<sup>[9]</sup>通过分子改造技术分别阻断克雷伯氏菌中乙醇和乳酸合成途径,以减少对 NADH 的竞争,提高 1,3-丙二醇的产量;黄志华等<sup>[10]</sup>在克雷伯氏菌中引入来自博伊丁氏假丝酵母的甲酸脱氢酶基因,强化 NADH 再生能力,1,3-丙二醇的产量和产率分别提高了 12.5%和 41.2%。上述研究表明,提高还原力水平是强化 1,3-丙二醇合成的有效手段。

木质纤维素主要来源于农业废弃物,是世界上最丰富的生物质资源,木糖是木质纤维原料水解产物中含量仅次于葡萄糖的一种单糖<sup>[11]</sup>。木糖经磷酸戊糖途径代谢使 NADPH 辅酶再生,经机体内吡啶核苷酸转氢酶 UdhA 转化成 NADH<sup>[12]</sup>,促进 1,3-丙二醇的合成。因此可利用甘油和木糖共发酵合成

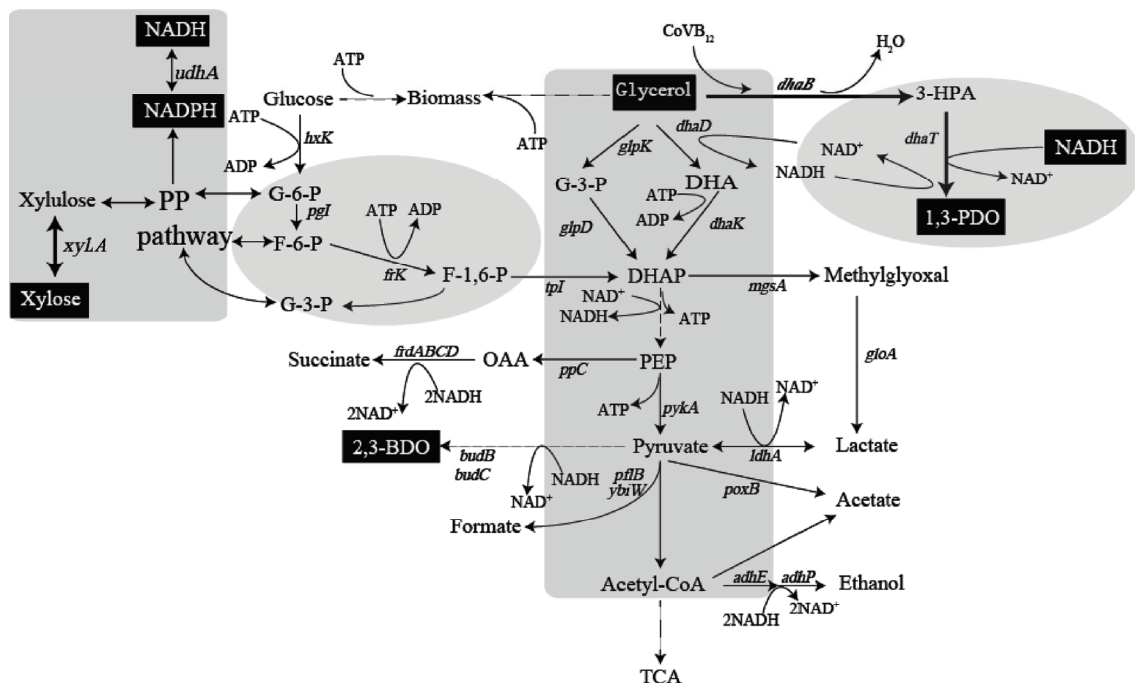


图 1 重组克雷伯氏菌甘油代谢途径

Figure 1 Glycerol metabolic pathway of the recombinant *Klebsiella pneumoniae*

1,3-丙二醇,使整个生产过程更为经济<sup>[13]</sup>。虽然已有利用木糖提高 1,3-丙二醇产量的研究,但在克雷伯氏菌代谢改造强化木糖途径的策略尚未见报道。本研究在克雷伯氏菌中强化表达木糖异构酶基因 *xyIA*,提高木糖代谢速率和利用率,增加胞内还原力水平,考察甘油和木糖共发酵对 1,3-丙二醇合成的影响。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 菌株和质粒

文中所用的菌株和质粒请见表 1。

### 1.2 工具酶及试剂

基因工程工具酶购自宝生物工程(大连)有限公司;NADH、NAD<sup>+</sup>购自生物工程(上海)股份有限公司;1,3-丙二醇标准品购自西格玛奥德里奇公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.3 培养基与培养方法

种子培养基(g/L):酵母提取物 5,胰蛋白胨 10,NaCl 10。

发酵培养基(g/L):甘油 40.000,葡萄糖 6.000,酵母膏 7.000,KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7.500,MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.000,(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.000,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005,VB<sub>12</sub> 0.015,微量元素溶液 0.100 mL/L,KOH 调 pH 至 8.0。微量元素溶液(g/100 mL):ZnCl<sub>2</sub> 0.070,MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O

0.100,H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 0.060,CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.200,CuCl<sub>2</sub> 0.020,NiCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.025,Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.035。需要时加入 Kan (100 mg/L)、IPTG (0.5–1.0 mmol/L)。

种子培养:1%接种量(体积比),37 °C、150 r/min 培养 6–7 h。

发酵培养:250 mL 三角瓶 60 mL 装液量,4% 接种量(体积比),pH 8.0。37 °C、150 r/min 振荡培养 6 h,将转速调节为 100 r/min。所有培养基在 1×10<sup>5</sup> Pa 灭菌 30 min。

### 1.4 引物设计及 PCR 扩增

引物设计:采用 Primer 软件,根据 NCBI 已报道的 *Escherichia coli* BL21(DE3)中 *xyIA* 基因序列(GenBank 登录号:NC\_012971.2)设计引物(表 2)。扩增体系(50 μL):TaKaRa ExTaq (5 U/μL) 0.25 μL,10×ExTaq buffer 5 μL,dNTP mixture (2.5 mmol/L) 4 μL,引物 P<sub>1</sub> (20 μmol/L) 1 μL,引物 P<sub>2</sub> (20 μmol/L) 1 μL,模板 DNA (10 mg/L) 0.25 μL,灭菌蒸馏水 38.5 μL。PCR 扩增条件:94 °C 5 min;94 °C 1 min,60 °C 30 s,72 °C 90 s,共 30 个循环;72 °C 10 min。扩增产物用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.5 测定方法

1.5.1 生物量的测定:发酵液中的生物量采用比浊法测定(OD<sub>600</sub>),以发酵培养基为空白对照,然后将

表 1 文中所涉及的菌株和质粒  
Table 1 The strains and plasmids used in this paper

菌株和质粒 Strains and plasmids	相关特性/用途 Characters/Applications	来源 Sources
pE <sub>tac</sub>	表达载体; <i>tac</i> 启动子; Kan <sup>r</sup>	本研究中心保藏
pE <sub>tac-xyIA</sub>	<i>tac</i> 启动子; Kan <sup>r</sup>	本研究构建
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	用于克隆 <i>xyIA</i> 基因	本研究中心保藏
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ZG25	野生菌	本研究中心筛选
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (pE <sub>tac</sub> )	带有空质粒的对照菌	本研究构建
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (pE <sub>tac-xyIA</sub> )	带有 <i>xyIA</i> 基因的重组菌	本研究构建

注: Kan<sup>r</sup>: 卡那霉素抗性。

Note: Kan<sup>r</sup>: Kanamycin resistance.

表 2 文中所用到的引物  
Table 2 Primers used in this paper

引物名称 Primers name	引物序列 Primers sequences (5'→3')	酶切位点 Restriction enzyme cutting sites
P <sub>1</sub>	GGCGGAATTCATGCAAGCCTATTTGACCAGC	<i>EcoR</i> I
P <sub>2</sub>	TATAAGCTTCGGGCCAACGGACTGCACAG	<i>Hind</i> III

注：下划线部分为酶切位点。

Note: The underlined are restriction enzyme cutting sites.

发酵液于 8 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 生理盐水洗涤 3 次, 将收集的菌体置于 105 °C 烘箱中干燥至恒重后称重, 根据实验计算得出细胞干重公式:  $1 OD_{600}=0.36 \text{ g/L}$ 。

**1.5.2 代谢产物的测定:** 发酵液中发酵产物采用 Dionex 高效液相色谱仪测定, 色谱柱为 Amines HPX-87H (Bio-Rad), 有机酸离子交换柱, 规格为 300 mm×7.8 mm×9 μm, 填充材料为聚苯乙烯二乙烯苯树脂, 柱温为 60 °C, 流动相为 5 mmol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 流速为 0.6 mL/min, 进样量为 10 μL。使用示差折光及紫外检测器, 外标定量法定量<sup>[14]</sup>。

**1.5.3 还原力 NADH、NAD<sup>+</sup>的提取及测定:**

NADH、NAD<sup>+</sup>的提取见参考文献[15], 测定见参考文献[16]。

**1.5.4 SDS-PAGE 电泳:** SDS-PAGE 采用 5%浓缩胶和 12%分离胶的不连续垂直平板电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色。

## 2 结果与分析

### 2.1 木糖异构酶基因的克隆及表达

以 *Escherichia coli* BL21(DE3)基因组为模板, 用相应的引物扩增基因 *xylA* (图 2A), 并连接至表达载体 p*Etac*, 得重组载体 p*Etac-xylA* (图 2B), 酶切验证后(图 2A)电转化至克雷伯氏野生菌中得重组菌 *Klebsiella pneumoniae* (p*Etac-xylA*); 同时将质

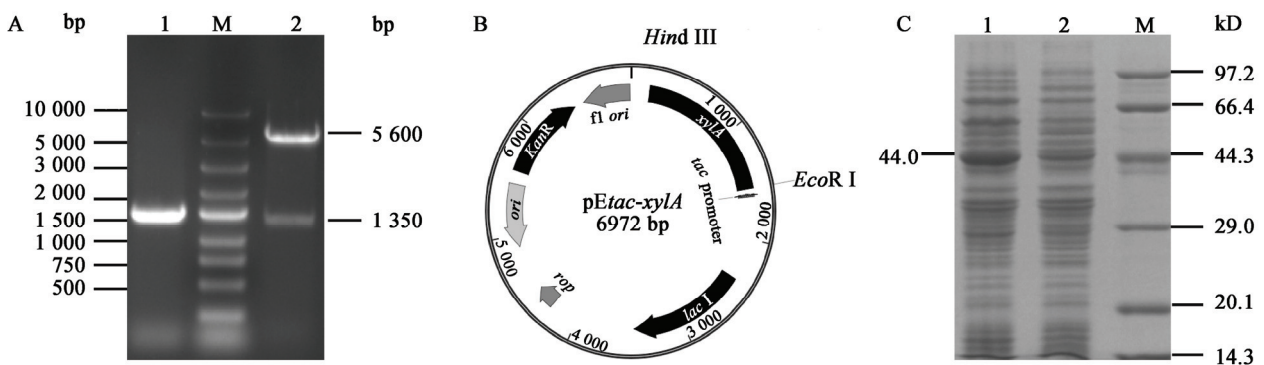


图 2 *xylA* 基因的琼脂糖凝胶电泳分析及 p*Etac-xylA* 的酶切验证(A)、重组质粒 p*Etac-xylA* 的构建(B)及 XYLA 表达情况的 SDS-PAGE 电泳分析(C)

Figure 2 Agarose gel electrophoresis of *xylA* gene (A) and the enzymatic digestion of p*Etac-xylA* (A), p*Etac-xylA* plasmid map (B) and the SDS-PAGE analysis of XYLA (C)

注: A: M: 2503 DNA marker; 1: PCR 产物; 2: *EcoR* I 和 *Hind* III 的双酶切。C: M: 标准蛋白 Marker; 1: 重组菌破壁上清; 2: 对照菌破壁上清。

Note: A: M: 2503 DNA marker; 1: *xylA* gene PCR product; 2: The enzymatic digestion products by *EcoR* I and *Hind* III. C: M: Molecular mass marker; 1: Intracellular soluble protein of the *Klebsiella pneumoniae* (p*Etac-xylA*); 2: Intracellular soluble protein of the *Klebsiella pneumoniae* (p*Etac*).

粒 pEtac 转入克雷伯氏野生菌中得对照菌 *Klebsiella pneumoniae* (pEtac)。诱导表达后进行 SDS-PAGE 电泳分析。与对照菌相比, 重组菌胞内可溶蛋白在 44.0 kD 处有明显的重组蛋白条带(图 2C), 与理论值相符, 表明木糖异构酶基因成功诱导表达。

## 2.2 重组菌摇瓶发酵性能分析

**2.2.1 不同浓度木糖对细胞生长的影响:** 在接种量相同的条件下, 37 °C、150 r/min 摇瓶培养 6–7 h, 然后 100 r/min 培养至 72 h。如图 3 所示, 添加木糖后, 重组菌生物量均高于对照菌。原因可能是重组菌对木糖的代谢能力比对照菌高, 使木糖在代谢过程中有更多的代谢通量流经糖酵解途径和甘油氧化途径, 从而为机体提供更多的碳源和能量(图 1), 促进了细胞的生长。但不加木糖时, 二者生物量没有明显区别。

**2.2.2 不同浓度木糖下的代谢产物分析:** 如图 4 所示, 所有菌株 1,3-丙二醇产量随时间逐渐积累(图 4A), 但除添加 8 g/L 木糖的重组菌产量提高约 20% 外, 其他条件下 1,3-丙二醇产量变化不大。2,3-丁二醇(图 4B)在发酵前期迅速累积, 但发酵后期除添加木糖的对照菌株外均呈下降趋势; 琥珀酸(图 4C)在发酵前期累积, 后期下降; 乙酸(图 4D)随发酵的进

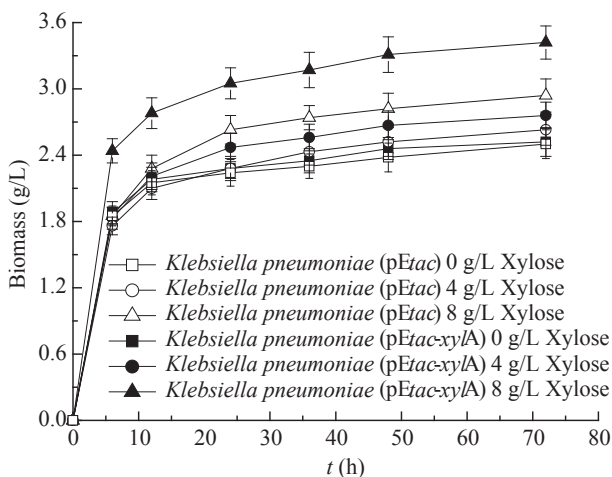


图 3 摇瓶发酵中不同浓度木糖的菌体生长曲线  
Figure 3 The growth curves of the *Klebsiella pneumoniae* (pEtac-xyIA) and *Klebsiella pneumoniae* (pEtac) under different xylose concentrations in flask fermentation

行一直增加; 乳酸(图 4E)在发酵前期增加, 中期下降, 后期呈缓慢上升趋势, 最终积累量未见明显差异; 乙醇(图 4F)在发酵前期积累, 后期呈迅速下降趋势; 甘油消耗速率及消耗量(图 4G)无明显差别; 重组菌对木糖消耗速率(图 4H)和利用率明显高于对照菌。

对照菌加木糖时, 1,3-丙二醇产量与不加木糖时相比并未提高, 而 2,3-丁二醇及其他副产物产量增加。原因可能是在克雷伯氏菌中木糖可直接代谢生成 2,3-丁二醇<sup>[17]</sup>, 使还原力和碳流主要流向 2,3-丁二醇合成途径; 同时对照菌的木糖代谢能力有限, 大量木糖剩余(图 4H), 无法为 1,3-丙二醇途径提供足够的还原力, 导致 1,3-丙二醇产量难以提高。与此类似, 重组菌在添加 4 g/L 木糖条件下, 细胞代谢木糖产生的还原力仍然无法同时满足主产物 1,3-丙二醇和 2,3-丁二醇等副产物合成途径的需求, 导致发酵液中副产物积累而 1,3-丙二醇未见提高。重组菌加 8 g/L 木糖时, 木糖消耗量达到最大(图 4H), 使得胞内还原力在促进副产物合成后仍能满足 1,3-丙二醇合成的需要, 从而表现为主、副产物产量同时提高, 且因还原力的提高使得 2,3-丁二醇和琥珀酸在前期大量累积。在发酵后期, 因底物(甘油和木糖)的不足导致细胞代谢能力减弱, 胞内还原力降低, 使得 2,3-丁二醇途径向分解代谢倾斜<sup>[18]</sup>, 2,3-丁二醇积累量降低, 由此产生的还原力促进了发酵后期 1,3-丙二醇的持续积累, 使其终产量达到 23.31 g/L, 与对照菌株相比提高了约 20%, 1,3-丙二醇转化率达到 0.73 mol/mol, 而对照菌 1,3-丙二醇最高转化率仅为 0.60 mol/mol, 见表 3。相比之下, Jin 等<sup>[13]</sup>同样在克雷伯氏菌发酵过程中添加木糖增加胞内 NADH 含量, 但 1,3-丙二醇浓度仅提高了 9.4%。

## 2.3 摇瓶发酵还原力水平分析

重组菌和对照菌中不加木糖及添加 8 g/L 木糖时, 细胞内还原力变化趋势如图 5 所示。NADH (图 5A)和 NAD<sup>+</sup> (图 5B)在发酵前期一直呈下降趋势, 加木糖的重组菌和对照菌下降趋势比不加木糖的



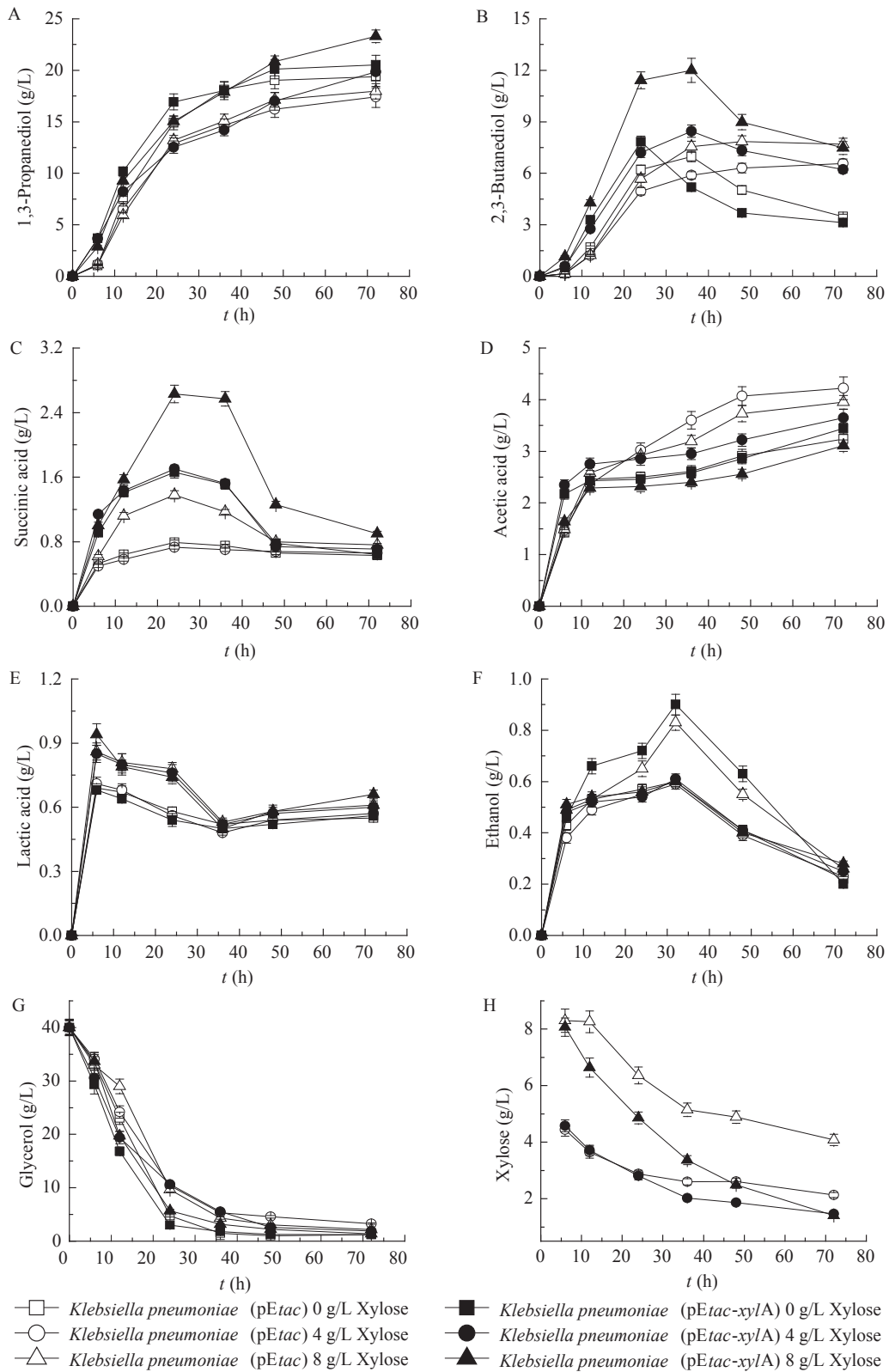


图4 摇瓶发酵中不同浓度木糖的代谢产物分析

Figure 4 Analysis of metabolites under different xylose concentrations in flask fermentation

表 3 不同木糖浓度下的 1,3-丙二醇转化率  
Table 3 The conversion rate of 1,3-propanediol under different xylose concentrations

木糖浓度 Xylose concentrations (g/L)	菌株 Strains	1,3-丙二醇转化率 The conversion rate of 1,3-propanediol (mol/mol)
0	对照菌	0.60
	重组菌	0.63
4	对照菌	0.64
	重组菌	0.56
8	对照菌	0.57
	重组菌	0.73

要缓慢,原因是甘油单独发酵时,胞内 NADH 主要来源于糖酵解、甘油的氧化途径及 NAD<sup>+</sup>的还原,而木糖的加入为细胞提供了额外的 NADH。

NADH/NAD<sup>+</sup>(图 5C)水平并没有因木糖的加入而有太大波动,且重组菌和对照菌 NADH/NAD<sup>+</sup>变化趋势基本保持一致。添加木糖后,重组菌胞内 NADH 水平提高了 0.2–0.4 倍,而对照菌仅提高 0.1–0.2 倍,相比于对照菌,重组菌细胞内还原力 NADH 提高了 0.1–0.3 倍。

### 3 结论

研究在克雷伯氏野生菌中强化表达木糖途径关键酶基因 *xyIA*,在此基础上考察添加不同浓度木糖为辅底物与甘油共发酵过程中对相关代谢产物和 NADH 变化规律的影响。结果表明 *xyIA* 基因的表达能够提高木糖的消耗速率和利用率,重组菌在高浓度木糖下能够累积足够的还原力从而促进 1,3-丙二醇的合成,为发酵生产 1,3-丙二醇提供了新的方法和思路。

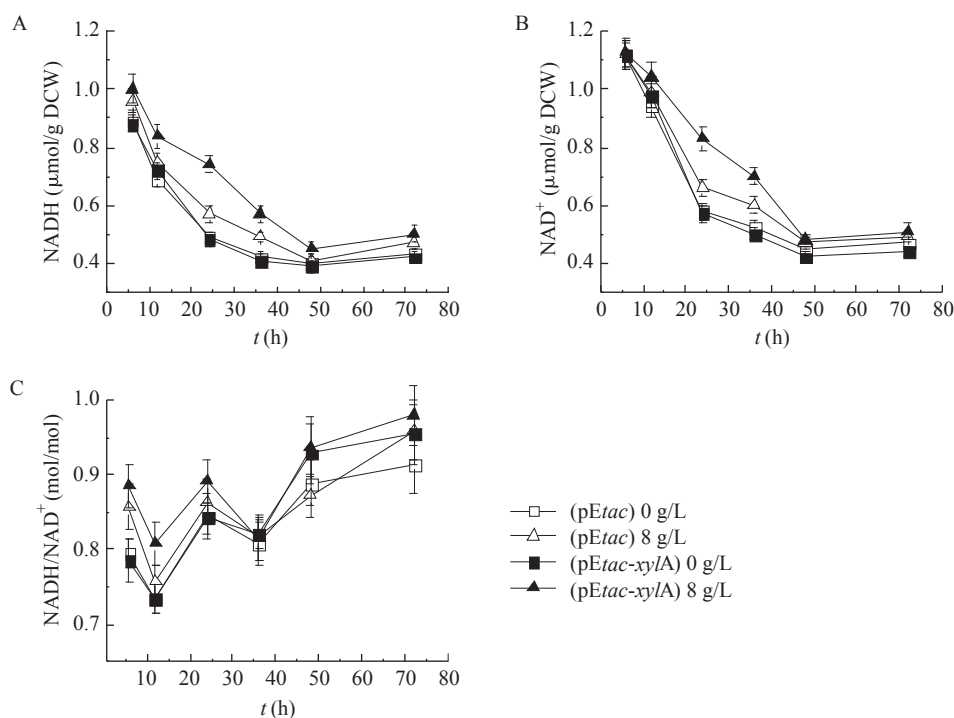


图 5 摇瓶发酵中木糖对细胞内还原力的影响

Figure 5 Effects of xylose on the internal reducing equivalent in flask fermentation

## 参考文献

- [1] Wang XT, Chen MH. The production methods and applications of 1,3-propanediol[J]. Coal Chemical Industry, 2000(4): 38-40 (in Chinese)  
王熙庭, 陈曼华. 1,3-丙二醇生产方法及用途[J]. 煤化工, 2000(4): 38-40
- [2] 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
- [3] 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[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(12): 4413-4417
- [4] Zhang YP. Cofactor engineering in the process of 1,3-propanediol production by *Klebsiella pneumoniae*[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Tsinghua University, 2006 (in Chinese)  
张延平. 1,3-丙二醇生物合成过程中的辅因子代谢调控[D]. 北京: 清华大学博士学位论文, 2006
- [5] Fang HY, Zhang C, Zhuge B, et al. Construction of novel recombinant strains capable of producing 1,3-propanediol[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2009, 15(5): 708-712 (in Chinese)  
方慧英, 张成, 诸葛斌, 等. 产1,3-丙二醇新型基因工程菌的构建[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(5): 708-712
- [6] Wu LX. Study on intracellular NADPH regeneration with *Bacillus pumilus* and optimization fermentation of hydroxy fatty acids[D]. Ningbo: Master's Thesis of Ningbo University, 2011 (in Chinese)  
吴立新. 短小芽孢杆菌胞内 NADPH 的再生及羟基脂肪酸发酵优化的研究[D]. 宁波: 宁波大学硕士学位论文, 2011
- [7] Lü TF, Xu Yan, Mu XQ, et al. Promotion effect of xylose co-substrate on stability of catalytic system for asymmetric redox of (*R*, *S*)-1-phenyl-1,2-ethanediol to its (*S*)-enantiomer by *Candida parapsilosis*[J]. Chinese Journal of Catalysis, 2007, 28(5): 446-450
- [8] Zhang YP, Li Y, Du CY, 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
- [9] 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*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2009, 104(5): 965-972
- [10] Huang ZH, Liu M, Zhang YP, et al. Improvement of 1,3-propanediol production by recombinant formate dehydrogenase in *Klebsiella pneumoniae*[J]. Journal of Chemical Industry and Engineering (China), 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[J]. 化工学报, 2007, 58(4): 919-924
- [11] Chandrakant P, Bisaria VS. Simultaneous bioconversion of glucose and xylose to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of xylose isomerase[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2000, 53(3): 301-309
- [12] Sauer U, Canonaco F, Heri S, et al. The soluble and membrane-bound transhydrogenases *udhA* and *pntAB* have divergent functions in NADPH metabolism of *Escherichia coli*[J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(8): 6613-6619
- [13] 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 and Biotechnology, 2011, 165(7/8): 1532-1542
- [14] Guo XK, Fang HY, Zhuge B, et al. *BudC* knockout in *Klebsiella pneumoniae* for bioconversion from glycerol to 1,3-propanediol[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2013, 60(6): 557-563
- [15] Zhang YP, Huang ZH, Du CY, et al. Introduction of an NADH regeneration system into *Klebsiella oxytoca* leads to an enhanced oxidative and reductive metabolism of glycerol[J]. Metabolic Engineering, 2009, 11(2): 101-106
- [16] Chen DQ, Zhan XB, Zheng ZY, et al. Determination of intracellular nucleotides in *Alcaligenes faecalis* by RP-HPLC method[J]. Science and Technology of Food Industry, 2010(1): 391-394 (in Chinese)  
陈定强, 詹晓北, 郑志永, 等. 粪产碱杆菌胞内核苷酸的反相高效色谱法测定[J]. 食品工业科技, 2010(1): 391-394
- [17] Jansen NB, Tsao GT. Bioconversion of pentoses to 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*[A]//Pentoses and Lignin. Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology[M]. Berlin Heidelberg: Springer, 1983, 27: 85-99
- [18] Yang TH, Rathnasingh C, Lee HJ, et al. Identification of acetoin reductases involved in 2,3-butanediol pathway in *Klebsiella oxytoca*[J]. Journal of Biotechnology, 2014, 172: 59-66