

酶-菌协同转化甲醇合成 1,3-丙二醇

郭志茹^{1#}, 李娇^{1#}, 王玉瑶¹, 王钰^{1,2}, 陈朋^{1,2}, 孙媛霞^{1,2*}, 杨建刚^{1,2*}

1 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津

2 低碳合成工程生物学全国重点实验室, 天津

郭志茹, 李娇, 王玉瑶, 王钰, 陈朋, 孙媛霞, 杨建刚. 酶-菌协同转化甲醇合成 1,3-丙二醇[J]. 微生物学报, 2026, 66(9): 4614-4625.
GUO Zhiru, LI Jiao, WANG Yuyao, WANG Yu, CHEN Peng, SUN Yuanxia, YANG Jiangang. Enzyme-bacteria synergistic conversion of methanol to 1,3-propanediol[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2026, 66(9): 4614-4625.

摘要:【目的】1,3-丙二醇(1,3-propanediol, PDO)是一种重要的化工单体, 其生物合成主要依赖甘油或葡萄糖等碳源, 存在碳原子经济性差、依赖粮食资源等问题。甲醇作为非粮可再生碳源, 具有还原度高、价格低廉的优势, 但现有甲醇生物转化合成 PDO 的效率较低, 面临甲醇利用效率差、细胞毒性等瓶颈。【方法】本研究设计了一条酶-菌协同转化甲醇合成 PDO 的新路线: 首先, 采用体外多酶级联体系将甲醇转化为甘油, 催化体系包含醇氧化酶(alcohol oxidase, AOX)、过氧化氢酶(catalase, CAT)、甲醛裂合酶(formaldehyde lyase, FLS)、甘油脱氢酶(glycerol dehydrogenase, GldA)及甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH), 反应 4 h 后甘油浓度达 63.3 mmol/L, 甲醇至甘油的碳转化率为 95.0%; 其次, 在谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)中引入甘油转运蛋白 GlpF、甘油脱水酶 DhaB123 及其激活因子 GdrAB、NADPH 依赖型醇脱氢酶 YqhD, 构建重组菌株并建立全细胞反应体系, 将生成的甘油转化为 PDO。在优化条件下, 甘油至 PDO 的碳转化率达到 96.0%。【结果】为实现甲醇直接合成 PDO, 将上述 2 个过程偶联, 最终 PDO 产量达 30.4 mmol/L, 甲醇至 PDO 的碳转化率为 90.2%。【结论】本研究实现了甲醇高效转化合成 PDO, 为甲醇基高值化学品的绿色生物制造提供了新策略。

关键词: 1,3-丙二醇; 甲醇; 谷氨酸棒杆菌; 生物转化

资助项目: 中国科学院关键核心技术攻坚先导专项(XDC0110200); 国家自然科学基金(32271545); 天津市自然科学基金青年项目(A类) (25JCJQJC00130)

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (XDC0110200), the National Natural Science Foundation of China (32271545), and the Tianjin Natural Science Foundation (Youth Project, Type A) (25JCJQJC00130).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: YANG Jiangang, yang_jgl@tib.cas.cn; SUN Yuanxia, sun_yx@tib.cas.cn

Received: 2026-04-30; Accepted: 2026-06-25; Published online: 2026-07-08

Enzyme-bacteria synergistic conversion of methanol to 1,3-propanediol

GUO Zhiru^{1#}, LI Jiao^{1#}, WANG Yuyao¹, WANG Yu^{1,2}, CHEN Peng^{1,2}, SUN Yuanxia^{1,2*}, YANG Jiangang^{1,2*}

¹ Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin, China

² State Key Laboratory of Engineering Biology for Low-Carbon Manufacturing, Tianjin, China

Abstract: [Objective] 1,3-propanediol (PDO) is an important chemical monomer. Its biosynthetic routes mainly rely on carbon sources such as glycerol or glucose, which suffer from low carbon efficiency or reliance on food-based resources. Methanol, as a non-food renewable carbon source, offers advantages of a high reduction degree and low costs. However, the existing bioconversion of methanol to PDO is limited by low methanol utilization efficiency and cytotoxicity. **[Methods]** In this study, a novel route combining enzymatic and whole-cell catalysis for the conversion of methanol to PDO was designed. First, an *in vitro* multi-enzyme cascade system was used to convert methanol to glycerol, comprising alcohol oxidase (AOX), catalase (CAT), formaldehyde lyase (FLS), glycerol dehydrogenase (GldA), and formate dehydrogenase (FDH). After 4 h of reaction, the glycerol concentration reached 63.3 mmol/L, with a carbon conversion efficiency of 95.0% from methanol to glycerol. Second, the glycerol transporter GlpF, glycerol dehydratase DhaB123 and its activator GdrAB, and the NADPH-dependent aldehyde reductase YqhD were introduced into *Corynebacterium glutamicum* to construct a recombinant strain, enabling the whole-cell conversion of glycerol to PDO. Under optimized conditions, the carbon conversion efficiency from glycerol to PDO reached 96.0%. **[Results]** To convert methanol to PDO, we coupled the two processes, which achieved a final PDO titer of 30.4 mmol/L and the overall carbon conversion efficiency of 90.2% from methanol to PDO. **[Conclusion]** This study achieves efficient conversion of methanol to PDO and provides a new strategy for the green biomanufacturing of methanol-based high-value chemicals.

Keywords: 1,3-propanediol; methanol; *Corynebacterium glutamicum*; bioconversion

1,3-丙二醇(1,3-propanediol, PDO)作为一种重要的化工原料,在聚合物及新材料制造领域具有广泛的应用前景^[1]。其最主要的用途是作为合成聚对苯二甲酸丙二醇酯(polytrimethylene terephthalate, PTT)的单体,该聚合物因优异的热稳定性和机械性能而备受关注^[2]。此外, PDO还被广泛应用于化妆品、食品、润滑剂及药品等领域^[3]。随着绿色制造与碳减排需求的日益迫切,利用微生物转化可再生碳源生产 PDO 的研究已成为生物制造领域的热点之一。

目前, PDO 的生物合成主要围绕 2 种碳源展开。第一类以甘油为底物,利用天然菌株[如肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)等]的甘油歧化代谢途径,通过甘油脱水酶和 PDO 氧化还原酶的级联催化实现转化^[4-8]。然而,该途径伴随乳酸、乙酸、2,3-丁二醇等副产物的生成,导致碳损失增加、转化率受限,提高了下游分离成本^[2]。第二类以葡萄糖为底物,在模式菌株中构建异源甘油合成模块与 PDO 合成模块,实现从葡萄糖到

PDO 的转化^[1,9-15]。例如, 杜邦公司开发的工程菌株产量已达 135 g/L, 但葡萄糖还原度低于 PDO, 反应过程需耦合副产物生成或碳氧化以维持电子平衡, 理论转化率受到固有限制^[12]。以甘油和葡萄糖为共底物的策略虽能部分改善能量供给与碳效率^[16-17], 但仍未从根本上摆脱对粮食基碳源的依赖, 且发酵体系中底物配比与代谢调控较为复杂。

甲醇作为一种非粮可再生碳源, 来源广泛(可由合成气、生物质气化或甲烷转化获得)、价格低廉, 被视为下一代生物制造的理想碳源^[18-20]。与传统糖基碳源相比, 甲醇具有更高的还原度(每个碳原子的还原当量为 6), 理论上更有利于合成高还原度化学品^[21]。因此, 甲醇的代谢利用与转化已成为绿色生物制造领域的研究热点^[22]。近年来, 以甲醇为底物生产 PDO 的研究逐渐受到关注, 主要策略是在大肠埃希氏菌(*Escherichia coli*)等平台菌株中构建人工合成甲基营养途径。例如 Wang 等^[23]设计了基于甲醛与丙酮酸缩合生成 2-酮基-4-羟基丁酸(2-keto-4-hydroxybutyrate, KHB)的途径, 实现了甲醇到 PDO 的转化, 但产量仅 32.7 mg/L, 且需葡萄糖作为共底物提供丙酮酸。Meng 等^[24]构建了甲醛与乙醛缩合生成 3-羟基丙醛(3-hydroxypropionaldehyde, 3-HPA)的路线, 理论碳转化率可达 100%, 但因甲醇脱氢酶和脱氧核糖-5-磷酸醛缩酶活性不足, 产量仅为 79.8 mg/L。上述研究证实了甲醇转化合成 PDO 的可行性, 但现有体系普遍存在甲醇利用效率低、关键酶催化活性差、甲醇细胞毒性制约菌株的生长与生产性能等问题, 距离工业化应用仍有较大差距^[25]。

本研究设计了一条酶-菌协同转化甲醇合成 PDO 的新路线, 即构建体外酶级联催化体系将甲醇高效转化为甘油, 进一步通过异源表达甘油脱水酶与醇脱氢酶的重组菌株, 基于全细胞转化将生成的甘油转化为 PDO。该策略集合酶法转化和细胞转化的高碳得率优势, 实现高效

转化甲醇合成 PDO, 同时将高毒性的甲醇转化为低毒性的甘油, 可降低 C1 毒性对细胞的影响, 为甲醇生物转化利用提供新的研究策略。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠埃希氏菌 DH5 α 用于构建重组蛋白表达载体及质粒扩增, *E. coli* BL21(DE3)用于重组蛋白的表达。*E. coli* DH5 α 、*E. coli* BL21(DE3)、重组谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032 以及载体 pET21a、pEC-XK99E 和 pXMJ19 均由本实验室保存。

1.1.2 培养基

LB 液体培养基(g/L): 胰蛋白胨 10.0, 酵母提取物 5.0, NaCl 10.0。BHI 液体培养基(g/L): BHI 脑心浸粉 37.0。CGXII minimal 培养基(g/L): 硫酸铵 20.0, 尿素 5.0, 磷酸二氢钾 1.0, 磷酸氢二钾 1.0, 3-(*N*-吗啉基)丙磺酸[3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid, MOPS] 42.0, 二水氯化钙 0.1, 七水硫酸镁 0.25, 七水硫酸亚铁 0.1, 一水硫酸锰 0.1, 七水硫酸锌 0.001, 硫酸铜 0.000 2, 六水合氯化镍 0.000 02, 生物素 0.000 2。

1.2 载体构建

针对体外转化甲醇合成甘油体系, 从 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中搜索来源于恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的甲醛裂合酶(formaldehyde lyase, FLS)^[26]和母牛分枝菌酸小杆菌(*Mycobacterium vaccae*)的甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase, FDH) (UniProtKB 登录号为 Q93GV1)^[27], 并将其进行密码子优化和基因合成, 构建表达载体 pET21a, 获得重组表达载体 pET21a-FLS 和 pET21a-FDH; 数据库中搜索来源于 *E. coli* 的甘油脱氢酶(glycerol dehydrogenase, GldA)基因 *gldA* (b3945), 设计引物, 以 *E. coli* BL21 基因组为模板扩增 *gldA* 基因, 构建至表达载体 pET21a 中得到重组表达质

粒 pET21a-GldA。上述表达载体将转化至 *E. coli* BL21 中, 获得目标蛋白的表达菌株。

针对全细胞转化甘油合成 PDO 的系统, 数据库搜索来源于肺炎克雷伯氏菌的甘油脱水酶 DhaB123 (KPN_03487、KPN_03488、KPN_03489) 和 *K. pneumoniae* 的甘油脱水酶激活因子 GdrAB (KPN_03208、KPN_03209) 的核苷酸序列。从数据库中搜索来源于 *E. coli* 的甘油通道蛋白 GlpF (KEGG 登录号为 b3927) 和醇脱氢酶基因 *yqhD* (KEGG 登录号为 b3011)。设计引物分别从 *E. coli* BL21 基因组和 *K. pneumoniae* 基因组中 PCR 扩增 *glpF*、*DhaB123* 操纵子和 *GdrAB* 操纵子序列, 构建至表达载体 pEC-XK99E 中, 得到重组表达质粒 pEC-GDG; 以 *E. coli* BL21 基因组为模板 PCR 扩增 *yqhD* 基因, 将其构建至载体 pXMJ19 中, 得到重组表达质粒 pXMJ19-YqhD; 将 pEC-GDG 和 pXMJ19-YqhD 共转化至 *C. glutamicum* ATCC 13032 中, 得到重组 CglPDO 菌株(表 1)。

1.3 重组蛋白表达与纯化

为获取重组蛋白, 挑取重组 *E. coli* BL21 菌

株单菌落, 接种于含氨苄青霉素(100 µg/mL)的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、200 r/min 培养过夜。将培养过夜的种子液按 1% 的接种量转接至新鲜配制的含相应浓度氨苄青霉素的 LB 培养基中, 37 °C、200 r/min 培养, 待菌液 OD_{600} 值达到 0.6–0.8 时, 向培养体系中加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 随后将摇床温度调低至 16 °C, 继续振荡培养 16–20 h, 诱导目标蛋白的表达。

诱导培养结束后, 将菌液于 6 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液收集菌体。向菌体中加入适量预冷的 50 mmol/L TEA 缓冲液(pH 7.0)吹打洗涤, 重复洗涤 2 次以去除残留培养基成分。最后用相同缓冲液重悬菌体, 置于冰上备用。将重悬后的菌液置于冰浴中, 使用超声破碎仪进行细胞裂解, 具体条件为破碎功率 200 W、超声 5 s, 间隔 2 s, 总时间 10 min。裂解完成后, 将裂解液转移至预冷离心管中, 于 4 °C、14 000 r/min 离心 30 min, 小心收集上清液转移至新离心管中。

取适量磁珠于 5 mL 离心管中, 置于磁性分离器上吸附后弃去储存液。用双蒸水重复处理

表1 本研究中构建的质粒与菌株

Table 1 Plasmids and strains constructed in this study

Strains or plasmids	Description	Sources
Strains		
<i>E. coli</i> DH5α	General cloning host	Invitrogen
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Expression host	Invitrogen
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032	Expression host	This study
CglPDO	<i>C. glutamicum</i> ATCC 13032 harboring pEC-GDG and pXMJ19-YqhD	This study
Plasmids		
pET21a	T7 promoter Amp ^R expression vector	Stored in the laboratory
pEC-XK99E	Trc-promoter Kan ^R <i>E. coli</i> - <i>C. glutamicum</i> shuttle expression vector	Stored in the laboratory
pXMJ19	Tac-promoter Cm ^R <i>C. glutamicum</i> - <i>E. coli</i> shuttle expression vector	Stored in the laboratory
pET21a-FLS	pET21a carrying FLS from <i>Pseudomonas putida</i>	This study
pET21a-GldA	pET21a carrying GldA from <i>E. coli</i>	This study
pET21a-FDH	pET21a carrying FDH from <i>Mycobacterium vaccae</i>	This study
pEC-GDG	pEC-XK99E carrying GlpF from <i>E. coli</i> and DhaB123-GdrAB from <i>Klebsiella pneumoniae</i>	This study
pXMJ19-YqhD	pXMJ19 carrying YqhD from <i>E. coli</i>	This study

2 次, 加入结合缓冲液(50 mmol/L 三乙醇胺、100 mmol/L 氯化钠、20 mmol/L 咪唑, pH 7.5) 重悬磁珠, 再次磁性分离并弃上清, 重复洗涤 2 次。将预处理后的磁珠与粗酶液混合, 置于冰上旋转孵育 1 h。孵育结束后, 加入结合缓冲液冲洗杂蛋白, 重复该步骤至上清液中无明显泡沫出现。加入洗脱缓冲液(50 mmol/L 三乙醇胺、100 mmol/L 氯化钠、1 mol/L 咪唑, pH 7.5), 收集洗脱液, 即为初步纯化的酶液。将洗脱液转移至 10 kDa 截留分子量的超滤管中, 在 4 °C、6 000 r/min 离心 20 min 进行浓缩与脱盐, 最终获得脱盐后的纯酶液。分别取适量全菌液、离心后上清液和纯化样品, 加入蛋白上样缓冲液制备样品, 用于 SDS-PAGE 分析目标蛋白的表达情况。

1.4 酶活性测定

1.4.1 FLS 酶活性测定

反应体系(100 μ L)含有 200 mmol/L 甲醛、1 mmol/L 焦磷酸硫胺素(thiamine pyrophosphate, TPP)、5 mmol/L MgSO_4 、1 mg/mL FLS 纯酶和 50 mmol/L TEA 缓冲液(pH 7.0)。在 30 °C、800 r/min 振荡反应 30 min 后, 加入 2 μ L 质量分数为 10% 硫酸溶液终止反应, 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min 后取上清, 通过 HPLC 检测二羟基丙酮(dihydroxyacetone, DHA)的生成量。酶活性定义: 每分钟每毫克蛋白生成 DHA 的量(μ mol)。

1.4.2 GldA 酶活性测定

反应体系(100 μ L)含有 20 mmol/L DHA、5 mmol/L NADH、0.1 mg/mL GldA 纯酶、5 mmol/L MgSO_4 、50 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.0)。在 30 °C、800 r/min 振荡反应 10 min 后, 加入 2 μ L 质量分数为 10% 硫酸溶液终止反应, 离心取上清, 通过 HPLC 检测甘油的生成量。酶活性定义: 每分钟每毫克蛋白生成甘油的量(μ mol)。

1.4.3 YqhD 酶活性测定

反应体系(100 μ L)含有 20 mmol/L 3-羟基丙

醛, 5 mmol/L NADPH, 0.1 mg/mL YqhD 纯酶, 5 mmol/L MgSO_4 , 50 mmol/L PBS 缓冲液(pH 7.0)。在 30 °C、800 r/min 振荡反应 10 min 后, 加入 2 μ L 质量分数为 10% 硫酸溶液终止反应, 离心取上清, 通过 HPLC 检测 PDO 的生成量。酶活性定义: 每分钟每毫克蛋白生成 PDO 的量(μ mol)。

1.5 体外转化反应

1.5.1 甲醛到甘油反应体系

采用两阶段反应过程, 首先, 在反应体系中添加 200 mmol/L 甲醛、10 mg/mL FLS、1 mmol/L TPP、5 mmol/L MgCl_2 、50 mmol/L HEPES 缓冲液(pH 7.0), 用 ddH₂O 补齐至 200 μ L, 30 °C 反应 2 h。随后向反应体系中加入终浓度为 1 mg/mL GldA、1 mg/mL FDH、80 mmol/L 甲酸钠和 2 mmol/L NADH, 相同温度条件下继续反应 2 h。

1.5.2 甲醇到甘油反应体系

采用两阶段反应过程, 首先, 在反应体系中添加 200 mmol/L 甲醇、0.75 mg/mL 醇氧化酶(alcohol oxidase, AOX)、0.42 mg/mL 过氧化氢酶(catalase, CAT)、10 mg/mL FLS、1 mmol/L TPP、5 mmol/L MgCl_2 、10 μ mol/L ZnCl_2 、50 mmol/L HEPES 缓冲液(pH 7.0), 用 ddH₂O 补齐至 200 μ L, 30 °C 反应 3 h。随后向反应体系中加入终浓度为 1 mg/mL GldA、1 mg/mL FDH、80 mmol/L 甲酸钠和 2 mmol/L NADH, 继续反应 2 h。

为排除非酶促反应对合成体系的干扰, 设置了对照实验组: (1)热失活酶对照组(将所有酶于 95 °C 加热 10 min 后加入反应体系); (2)单酶对照组(分别只添加级联反应中的单一酶, 其余用缓冲液补足)。

1.6 全细胞催化

在 50 mL BHI 培养基中按 1% 的接种量, 接种重组菌株 CglPDO, 添加终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 诱导相关蛋白的表达, 在 30 °C、200 r/min 条件下培养 24 h; 其次, 离心收集培养后的 CglPDO, 用 2 mL CGXII 培养基重悬菌

液; 建立如下转化体系(0.5 mL): 重组细胞 CglPDO 菌体终浓度 OD_{600} 为 10、20、30、40、50, 甘油浓度为 100 mmol/L, 乙酸钠浓度为 20 g/L, 维生素 B_{12} 浓度为 8 μ mol/L, 用 CGXII 培养基补齐至 0.5 mL, 在 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下转化 36 h。反应过程中取样, 离心后通过 HPLC 检测甘油及 PDO 的浓度。

为测试以甲醇转化得到的甘油合成 PDO 的效率, 建立如下转化体系(0.2 mL): 重组细胞 GglPDO 菌体终浓度 $OD_{600}=20$, 甲醇来源的甘油(100 μ L, 约 32 mmol/L), 乙酸钠为 10 g/L, 维生素 B_{12} 浓度为 8 μ mol/L, 用 CGXII 培养基补齐至 0.2 mL, 在 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下转化 36 h。反应过程中取样, 离心后通过 HPLC 检测甘油及 PDO 的浓度。

1.7 产物检测

采用高效液相色谱法对甲醇、甲醛、DHA、甘油和 PDO 进行定量分析。其中, 甲醇和 PDO 的测定选用 Bio-Rad Aminex HPX-87H 色谱柱(300 mm $\times$ 7.8 mm, 9 μ m), 以 5 mmol/L H_2SO_4 为流动相进行等度洗脱, 流速设定为 0.5 mL/min, 进样量为 10 μ L, 柱温维持在 55 $^{\circ}$ C, 采用示差折光检测器(differential refractive index detector, RID)进行检测。甲醛、DHA 和甘油的定量分析则采用 Sugar-Pak 分析柱(6.5 mm $\times$ 300 mm, 10 μ m), 流动相为超纯水, 流速为 0.4 mL/min。该检测系统柱温设定为 80 $^{\circ}$ C, 进样量同为 10 μ L, 检测器为示差折光检测器, 检测池温度控制在 35 $^{\circ}$ C。甲醛-甘油的碳摩尔转化率、甲醇-甘油的碳摩尔转化率、甲醇-PDO 的碳摩尔转化率、甲醇-PDO 的质量转化率计算如公式(1)–(4)所示。

甲醛-甘油的碳摩尔转化率(%)=

$$\text{甘油产物}(\text{mmol/L}) \times 3 / \text{初始甲醛浓度}(\text{mmol/L}) \quad (1)$$

甲醇-甘油的碳摩尔转化率(%)=

$$\text{甘油产物}(\text{mmol/L}) \times 3 / \text{初始甲醇浓度}(\text{mmol/L}) \quad (2)$$

甲醇-PDO的碳摩尔转化率(%)=

$$\text{PDO产物}(\text{mmol/L}) \times 3 / \text{初始甲醇浓度}(\text{mmol/L}) \quad (3)$$

甲醇-PDO的质量转化率(g/g)=

$$\text{PDO产物}(\text{mmol/L}) \times 76 / [\text{初始甲醇浓度}(\text{mmol/L}) \times 32] \quad (4)$$

2 结果与分析

2.1 甲醇合成 1,3-丙二醇路线设计

为实现甲醇到 PDO 的高效生物转化, 本研究设计了一条酶-菌协同催化路线(图 1A)。该路线分为 2 个阶段: 体外酶法催化甲醇合成甘油和全细胞转化甘油合成 PDO。在体外酶法转化阶段, 甲醇首先在 AOX 催化下氧化为甲醛, 同时消耗氧气并生成过氧化氢; 生成的过氧化氢被 CAT 分解为水和氧气, 解除 H_2O_2 的毒性作用, 同时实现氧气循环利用。甲醛在 FLS 催化下自身缩合生成 DHA。随后, DHA 在 GldA 催化下, 以 NADH 为还原力还原为甘油。同时, 反应过程中还将引入甲酸脱氢酶, 以甲酸为底物还原 NAD^+ 为 NADH, 为 DHA-甘油催化反应提供充足的还原当量。在全细胞转化过程中, 甘油通过甘油通道蛋白 GlpF 进入 *C. glutamicum* 细胞内, 在甘油脱水酶(DhaB123)催化下转化为 3-羟基丙醛, 该过程需辅酶 B_{12} 参与; 生成的 3-HPA 进一步在 NADPH 依赖的醇脱氢酶(YqhD)催化下还原为 PDO。与甲基营养微生物相比, 该路线中甲醇到甲醛的氧化反应在胞外由酶催化完成, 生成的甲醛被迅速缩合为 DHA, 避免了甲醛在胞内积累对微生物造成的损伤。

为评估该路线的热力学可行性, 本研究计算了各步反应及总反应的标准吉布斯自由能变化(ΔG°), 结果如图 1B 所示。以 3 分子甲醇为起始底物经过上述反应生成 PDO, 总反应 ΔG° 为 -449.4 kJ/mol。上述结果表明, 整体反应在热力学上高度有利。

2.2 体外酶法转化甲醇合成甘油

将构建成功的重组表达载体 pET21a-FLS、pET21a-GldA 和 pET21a-FDH 分别转化至 *E. coli* BL21(DE3)中进行异源表达, 获得目标重组蛋白(表 2)。SDS-PAGE 分析结果(图 2A、2B)显

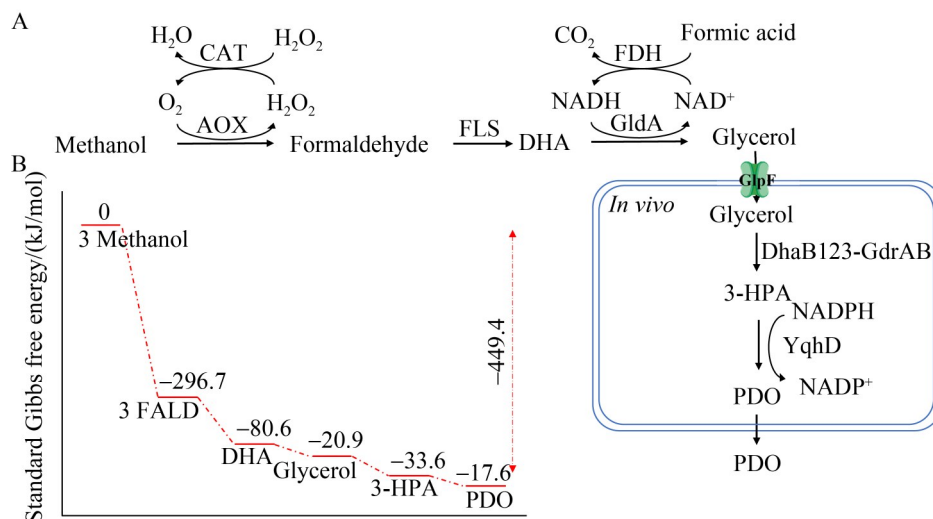


图1 酶菌协同转化甲醇合成1,3-丙二醇

Figure 1 Bioconversion of methanol to 1,3-propanediol by enzymes and engineered *Corynebacterium glutamicum*. A: Design of the route for the synergistic conversion of methanol to 1,3-propanediol; B: Standard Gibbs free energy change of each and overall reaction. AOX: Alcohol oxidase; CAT: Catalase; FLS: Formaldehyde lyase; DHA: Dihydroxyacetone; GldA: Glycerol dehydrogenase; FDH: Formate dehydrogenase; DhaB123: Glycerol dehydratase; GdrAB: Glycerol dehydratase reactivating factor; 3-HPA: 3-hydroxypropanal; YqhD: Aldehyde reductase; PDO: 1,3-propanediol.

表2 本研究中涉及的酶元件

Table 2 The enzymes used in this study

Enzyme	Source	Database	Activity/ (U/mg)
AOX	<i>Pichia pastoris</i>	–	10.00–40.00
CAT	<i>Bovine liver</i>	P00432	37 000.00
FLS	<i>Pseudomonas putida</i>	–	0.49
GldA	<i>Escherichia coli</i>	P0A9S5	5.78
FDH	<i>Mycobacterium vaccae</i>	Q93GV1	3.24
YqhD	<i>Escherichia coli</i>	Q46856	80.00

示, FLS、FDH 和 GldA 重组蛋白的分子量分别在 61.0、44.0 和 38.7 kDa 处呈现清晰条带, 与理论预期值一致, 表明 3 种重组蛋白均可通过纯化获得目标蛋白。

为验证纯化所得 FLS 和 GldA 的催化功能, 分别以甲醛和 DHA 为底物进行体外酶促反应。如图 2C 所示, 在 FLS 催化下, 反应 1 h 后甲醛转化为 DHA 的碳摩尔转化率可达 90% 以上。

如图 2D 所示, 在 GldA 催化下, 反应 1 h 后 DHA 转化为甘油的碳摩尔转化率可达 95% 以上, 表明 2 种重组酶均具有良好的催化活性。

所设计的合成路线中, 甲醛是甲醇的氧化产物, 也是进一步缩合生成 C3 的关键中间体, 为了验证甲醇-甘油合成模块的有效性, 本研究首先测试以甲醛为底物合成甘油的可行性。本研究构建了由 FLS 和 GldA 组成的双酶级联反应体系, 为降低甲醛对体系中酶蛋白活性的影响, 采用两步法进行转化。首先通过 FLS 催化甲醛合成 DHA, 反应 2 h 后, 向体系中添加 GldA、FDH、NADH 和甲酸钠, 将生成的 DHA 转化为甘油, 最终甲醛-甘油的碳摩尔转化率达到 95.6% (图 2E)。

进一步测试了多酶体系以甲醇为原料合成甘油的效率, 为降低 CAT 对 NADH 的氧化作用, 同样采用两步法进行转化。首先由 AOX、CAT 和 FLS 协同作用催化甲醇合成 DHA, 后续

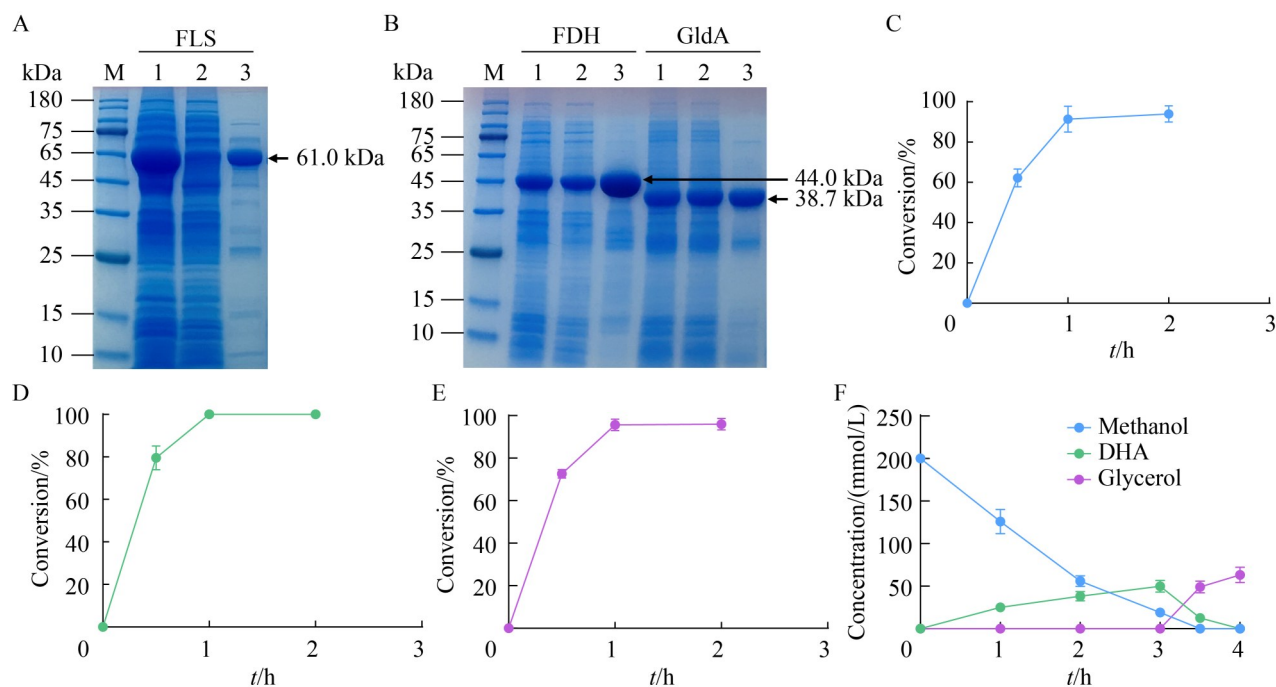


图2 甲醇-甘油体外酶合成体系构建

Figure 2 *In vitro* enzymatic assays for the conversion of methanol to glycerol. A: SDS-PAGE of recombinant protein FLS (Lanes 1–3 indicate whole-cell lysate, centrifugal supernatant, and purified protein, respectively); B: SDS-PAGE of recombinant proteins FDH and GldA (Lanes are the same as in A); C: Time course of FLS-catalyzed conversion of formaldehyde to DHA; D: Time course of GldA-catalyzed conversion of DHA to glycerol; E: Time course of one-pot enzymatic conversion of formaldehyde to glycerol; F: Time course of one-pot enzymatic conversion of methanol to glycerol.

向体系中添加 GldA、FDH、NADH 和甲酸钠，将生成的 DHA 转化为甘油，最终甲醇-甘油的碳摩尔转化率达到 95%，甘油浓度为 63.3 mmol/L (图 2F)。对照组热失活酶和单酶实验均未检测到目标产物的合成，证明产物完全来源于多酶协同催化作用。

2.3 重组谷氨酸棒杆菌全细胞催化甘油合成 1,3-丙二醇

甘油脱水酶(DhaB)是催化甘油合成 PDO 的关键酶，该酶由 3 个亚基组成，发挥催化功能高度依赖维生素 B₁₂，同时还需要甘油脱水酶激活因子 GdrAB。本研究曾尝试将来源于 *K. pneumoniae* 的 DhaB123 (KPN_03487、KPN_03488、KPN_03489) 和 GdrAB (KPN_03208、

KPN_03209)在 *E. coli* BL21 中进行表达，并体外测试酶活性，但是始终未测到活性，可能因为甘油脱水酶是对氧敏感的酶^[28]。目前，微生物发酵甘油合成 PDO 研究较多^[29]，证实甘油脱水酶在细胞内可以很好地发挥功能，基于此，本研究拟采用全细胞转化策略合成 PDO。考虑到甘油是多个微生物的发酵原料，可被生物体代谢利用，降低产物碳转化效率。为解决这个问题，本研究选择天然无法代谢利用甘油同时遗传操作较为成熟的 *C. glutamicum* 作为底盘^[30]，构建重组菌株。

C. glutamicum 中天然不存在甘油脱水酶和甘油代谢途径，为了在 *C. glutamicum* 中实现甘油到 1,3-丙二醇(PDO)的转化(图 3A)，分别扩增

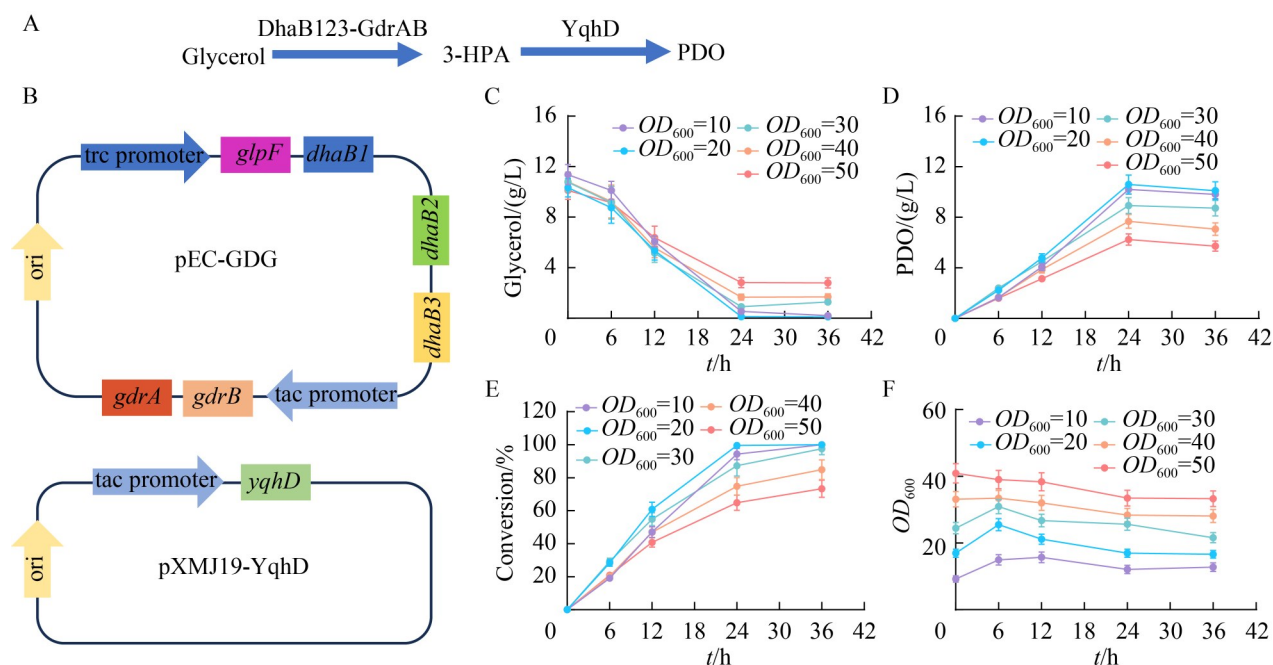


图3 重组菌株CgIPDO全细胞转化甘油合成PDO

Figure 3 Engineering *Corynebacterium glutamicum* for PDO production from glycerol. A: The pathway for PDO synthesis from glycerol; B: Schematic diagram of plasmids pEC-GDG and pXMJ19-YqhD; C: Effect of cell concentration on substrate glycerol consumption; D: Effect of cell concentration on PDO yield; E: Effect of cell concentration on PDO conversion rate; F: Changes in cell concentration during whole-cell conversion.

来源于 *E. coli* 的甘油通道蛋白基因 *GlpF*, 来源于 *K. pneumoniae* 的甘油脱水酶操纵子 *DhaB123* 和甘油脱水酶再激活因子 *GdrAB*, 构建至表达载体 pEC-XK99E 上, 得到重组表达载体 pEC-GDG。进一步, 扩增来源于 *E. coli* 的醇脱氢酶基因 *yqhD*, 构建至载体 pXMJ19 上, 得到重组表达载体 pXMJ19-YqhD (图 3B)。将获得的 pEC-GDG 和 pXMJ19-YqhD 共转化至 *C. glutamicum* ATCC 13032 细胞中, 得到重组菌株 CgIPDO。

重组菌株 CgIPDO 首先使用 BHI 进行培养, 添加 IPTG 诱导外源蛋白 *GlpF*、*DhaB123*、*GdrAB* 和 *YqhD* 的表达, 随后用 CGXII 培养基重悬, 获得静息细胞, 并建立全细胞转化体系。菌体浓度是影响甘油-PDO 合成速率和效率的关键, 因此优化了反应体系中菌体浓度 ($OD_{600}=10$ 、20、30、40、50), 研究结果显示当 $OD_{600}=20$ 时

转化率最高, 达到 96.0%, 当反应溶液中菌体浓度 OD_{600} 超过 20 后 ($OD_{600}=30-50$), 转化率和产量均下降。因此, 选择 $OD_{600}=20$ 作为后续反应条件(图 3C-3F)。

2.4 酶-菌协同转化甲醇合成 1,3-丙二醇

为实现从甲醇到 PDO 的合成, 本研究采用一锅两步法: 首先采用体外多酶法将甲醇转化为甘油, 随后加入工程化的重组菌株 CgIPDO, 转化生成的甘油合成 PDO。在体外多酶反应中, 经 3 h 将甲醇合成甘油, 通过 HPLC 分析碳转化率达到 95.0%。随后, 取甲醇来源的甘油 100 μ L, 加入全细胞转化体系中, 初始菌体浓度 OD_{600} 为 20, 甲醇来源的甘油浓度约 32 mmol/L。如图 4 所示, 随着反应时间的延长, 体外酶促反应生成的甘油不断被消耗, PDO 逐渐积累。反应 36 h 后, 由甘油至 PDO 的转化率达到 94.8%, PDO 产量达到 30.4 mmol/L。经换算得出甲醇-

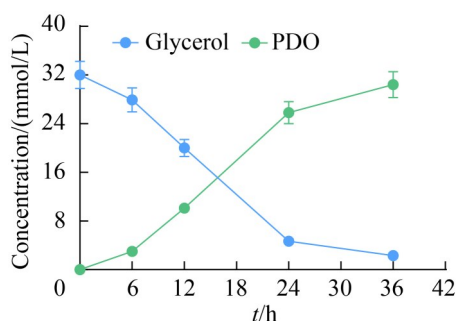


图4 全细胞转化甲醇来源甘油合成PDO

Figure 4 Whole-cell transformation of methanol-derived glycerol to PDO.

PDO 的碳转化率为 90.2%，折合质量比为 0.71 g PDO/g 甲醇。

3 讨论与结论

甲醇、甲醛、乙醇等低碳原料的生物转化利用是构建非粮原料生物合成 PDO 技术的有效途径。目前已有公开报道生物转化上述原料合成 PDO 的案例，例如西湖大学曾安平团队提出采用丙酮酸依赖的醛缩酶催化丙酮酸和甲醛生成 2-酮基-4-羟基丁酸，进一步经脱羧反应生成 3-羟基丙醛，经还原酶生成 1,3-丙二醇，基于上述反应路线，以 *E. coli* 为底盘菌株构建了重组菌株，实现以甲醛和葡萄糖为原料合成 PDO，产物浓度为 508 mg/L，证实了该路线的可行性；在此基础上将原料延伸至甲醇和葡萄糖，全细胞转化 25 h，PDO 产物浓度达到 32.7 mg/L^[23]。该团队还提出基于脱氧核糖-5-磷酸醛缩酶催化甲醛和乙醛缩合生成 3-羟基丙醛，进一步经氧化还原反应生成 1,3-丙二醇的研究思路：通过以 *E. coli* 为底盘菌株构建 PDO 合成途径，成功实现以甲醛和乙醇(提供乙醛原料)为原料合成 PDO，全细胞转化 30 h，产物浓度达到 17.35 mmol/L，摩尔转化率为 0.057 mol/mol；然而当将反应体系中甲醛替换为甲醇时产物浓度仅为 1.05 mmol/L (80 mg/L)，可能原因是采用的甲醇脱氢酶催化活性低^[24]。采用该策略进一步实现了以电催化

二氧化碳来源的甲醛和乙醇为原料合成 PDO，产物浓度达到 55.2 mmol/L (4.2 g/L)，合成速率达到 1.8 g/(L·h)^[31]。综上所述，已报道的研究工作采用乙醇和甲醛合成 PDO 取得了较好的效果，但是当以甲醇为原料时产物浓度仅维持在毫克级别。本研究设计并构建了一种酶-菌协同转化甲醇合成 PDO 的新策略，通过耦合体外多酶转化和全细胞转化技术，实现高效转化甲醇合成 PDO，碳摩尔转化率达到 90.2%，产物浓度达到 30.4 mmol/L (2.31 g/L)，高于已报道的甲醇-PDO 路线(<100 mg/L)。本研究同时提出了一种针对 C1 甲醇和甲醛的生物转化利用策略，即通过多酶催化将高毒性的甲醇或甲醛转化为低毒性的 C3 DHA 或甘油，后者可作为关键原料用于发酵合成其他化学品，可绕过甲基营养菌等底物耐受机制，提供了一条有潜力的 C1 原料生物转化利用路线。

尽管本研究提供了一条碳转化效率较高的甲醇-PDO 合成途径，但是目前仅完成概念验证，未来工业应用需要解决多重挑战。(1)甲醇-甘油合成体系中关键酶如甲醛裂合酶 FLS 催化活性低，导致酶用量较大。未来将通过人工智能辅助的酶挖掘和分子改造策略获得催化活性和稳定性显著提升的新酶元件，进一步结合酶固定化技术提高酶的循环利用次数，从而降低酶用量和成本。(2)在甘油-PDO 微生物合成体系中，甘油透过酶、甘油脱水酶及其激活因子和醇脱氢酶的胞内表达水平有待进一步优化，从而降低细胞用量，提升合成速率。(3)目前合成路线采用分段式即甲醇-甘油和甘油-PDO 两步反应，未来可通过细胞表面展示技术，将多酶催化体系展示于细胞表面，真正实现菌株一步转化和发酵，完成甲醇-PDO 的高效合成。综上所述，本研究所采用的酶-菌协同转化方法为 C1 原料的生物转化利用提供了一种新的方案。

作者贡献声明

郭志茹：实验和数据收集；李娇：数据分析和论

文撰写; 王玉瑶: 体外转化实验; 王钰: 概念提出和数据分析; 陈朋: 全细胞转化实验; 孙媛霞、杨建刚: 路线设计、数据分析和论文修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明不存在任何可能会影响本文所报告工作的已知经济利益或个人关系。

参考文献

- [1] Wang LR, Diao DY, Zhu ST, Liao ZH, Nie ZK, Ye C, Shi TQ. Microbial 1,3-propanediol production: a state-of-the-art review[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2025, 14(11): 4236-4254.
- [2] Li BR, Gao WY, Pan YY, Yao YP, Liu G. Progress in 1,3-propanediol biosynthesis[J]. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2024, 12: 1507680.
- [3] Gungormusler-Yilmaz M, Cicek N, Levin DB, Azbar N. Cell immobilization for microbial production of 1,3-propanediol[J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2016, 36(3): 482-494.
- [4] Dong XY, Xiu ZL, Li S, Hou YM, Zhang DJ, Ren CS. Dielectric barrier discharge plasma as a novel approach for improving 1,3-propanediol production in *Klebsiella pneumoniae*[J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(9): 1245-1250.
- [5] Cui YL, Zhou JJ, Gao LR, Zhu CQ, Jiang X, Fu SL, Gong H. Utilization of excess NADH in 2,3-butanediol-deficient *Klebsiella pneumoniae* for 1,3-propanediol production[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2014, 117(3): 690-698.
- [6] Pyne ME, Sokolenko S, Liu XJ, Srirangan K, Bruder MR, Aucoin MG, Moo-Young M, Chung DA, Chou CP. Disruption of the reductive 1,3-propanediol pathway triggers production of 1,2-propanediol for sustained glycerol fermentation by *Clostridium pasteurianum*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(17): 5375-5388.
- [7] Przysławowska H, Zeyland J, Szymanowska-Powalowska D, Szalata M, Słomski R, Lipiński D. 1,3-propanediol production by new recombinant *Escherichia coli* containing genes from pathogenic bacteria[J]. *Microbiological Research*, 2015, 171: 1-7.
- [8] Drożdżyńska A, Pawlicka J, Kubiak P, Kośmider A, Pranke D, Olejnik-Schmidt A, Czaczyk K. Conversion of glycerol to 1,3-propanediol by *Citrobacter freundii* and *Hafnia alvei*: newly isolated strains from the *Enterobacteriaceae*[J]. *New Biotechnology*, 2014, 31(5): 402-410.
- [9] Frazão CJR, Trichez D, Serrano-Bataille H, Dagkesamanskaia A, Topham CM, Walther T, François JM. Construction of a synthetic pathway for the production of 1,3-propanediol from glucose[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9: 11576.
- [10] Zhang YJ, Ma CW, Dischert W, Soucaille P, Zeng AP. Engineering of phosphoserine aminotransferase increases the conversion of L-homoserine to 4-hydroxy-2-ketobutyrate in a glycerol-independent pathway of 1,3-propanediol production from glucose[J]. *Biotechnology Journal*, 2019, 14(9): 1900003.
- [11] Lama S, 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] Nimbalkar PR, Dharne MS. A review on microbial 1,3-propanediol production: emerging strategies, key hurdles and attainable solutions to re-establish its commercial interest[J]. *Industrial Crops and Products*, 2024, 209: 117961.
- [16] Oh BR, Hong WK, Heo SY, Luo LH, Kondo A, Seo JW, Kim CH. The production of 1, 3-propanediol from mixtures of glycerol and glucose by a *Klebsiella pneumoniae* mutant deficient in carbon catabolite repression[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 130: 719-724.
- [17] Lee J, Islam T, Cho S, Arumugam N, Gaur VK, Park S. Energy metabolism coordination for the byproduct-free biosynthesis of 1,3-propanediol in *Escherichia coli*[J]. *Bioresource Technology*, 2025, 421: 132147.
- [18] Bertau M, Offermanns H, Plass L, Schmidt F, Wernicke HJ. Methanol: The Basic Chemical and Energy Feedstock of the Future: Asinger's Vision Today[M]. Berlin, Heidelberg: Springer, 2014.
- [19] Du XL, Jiang Z, Su DS, Wang JQ. Research progress on the indirect hydrogenation of carbon dioxide to methanol[J]. *ChemSusChem*, 2016, 9(4): 322-332.
- [20] Schrader J, Schilling M, Holtmann D, Sell D, Filho MV, Marx A, Vorholt JA. Methanol-based industrial biotechnology: current status and future perspectives of methylotrophic bacteria[J]. *Trends in Biotechnology*, 2009, 27(2): 107-115.
- [21] Villadsen J, Nielsen J, Lidén G. *Bioreaction Engineering Principles*[M]. Boston, MA: Springer US, 2011.
- [22] Wang Y, Fan LW, Tuyishime P, Zheng P, Sun JB. Synthetic methylotrophy: a practical solution for methanol-based biomanufacturing[J]. *Trends in Biotechnology*, 2020, 38(6): 650-666.
- [23] Wang C, Ren J, Zhou LB, Li ZD, Chen L, Zeng AP. An aldolase-catalyzed new metabolic pathway for the assimilation of formaldehyde and methanol to synthesize 2-keto-4-hydroxybutyrate and 1,3-propanediol in *Escherichia coli*[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2019, 8(11): 2483-2493.
- [24] Meng H, Wang C, Yuan QP, Ren J, Zeng AP. An aldolase-

- based new pathway for bioconversion of formaldehyde and ethanol into 1,3-propanediol in *Escherichia coli*[J]. ACS Synthetic Biology, 2021, 10(4): 799-809.
- [25] 果士婷, 刘盼, 王钰. 1,3-丙二醇的微生物合成: C6-C3-C1 原料体系的转变[J]. 生物工程学报, 2024, 40(8): 2371-2385.
- Guo ST, Liu P, Wang Y. Microbial production of 1,3-propanediol: a transition of feedstocks from C6 to C3 and C1 carbon sources[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(8): 2371-2385 (in Chinese).
- [26] Tan ZJ, Tang ZJ, Wei HL, Zhang RK, Sun L, Liu WD, Liu HF, Zhu LL, Ma YH. Helix zipper regulating formolase activity[J]. ACS Catalysis, 2025, 15(3): 1586-1595.
- [27] Qi XH, Guo Q, Wei YT, Xu H, Huang RB. Construction of a novel recombinant *Escherichia coli* strain capable of producing 1,3-propanediol[J]. Advanced Materials Research, 2011, 396/397/398: 2499-2502.
- [28] Xu XL, Zhang GL, Wang LW, Ma BB, Li C. Quantitative analysis on inactivation and reactivation of recombinant glycerol dehydratase from *Klebsiella pneumoniae* XJPD-Li[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2009, 56(2/3): 108-114.
- [29] Pérez-Bernal MF, Moscoviz R, Wang XL, Bernet N, Trably E. Microbial conversion of glycerol into 1, 3-propanediol by fermentation: review of fundamentals and operational strategies[J]. Microbial Biotechnology, 2025, 18(11): e70265.
- [30] Rittmann D, Lindner SN, Wendisch VF. Engineering of a glycerol utilization pathway for amino acid production by *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(20): 6216-6222.
- [31] Li YL, Zhang B, Wu YZ, Tang T, Guan AC, Xu QQ, Wang LQ, Liu JM, Sun LC, Zeng AP. Ultrafast conversion of CO₂ into C₃-C₄ diols in a synergistic electrochemical and AI-assisted biosynthesis system[J]. Journal of the American Chemical Society, 2025, 147(43): 39827-39837.