

一步法产 1,3-丙二醇酿酒酵母基因工程菌的构建

马 正, 饶志明*, 沈 微, 方慧英, 诸葛健*

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

摘 要: 1,3-丙二醇(1,3-PD)是一种重要的化工原料,发酵法生产 1,3-PD 是一条新颖且具有潜在竞争力的生产途径。本研究在前期工作的基础上,将分别来源于大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌的基因片段 *yqhD* 和 *dhaB* 串联表达,构建重组表达载体 pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB*;并得到重组酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)W303-1A/pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB*。该重组菌和对照 *S. cerevisiae* 分别以葡萄糖为底物摇瓶发酵 72h 后,重组酿酒酵母发酵液中 1,3-PD 含量约为 1.5g/L,而对照菌株不产 1,3-PD。以上结果表明本研究在国内首次成功构建了直接以葡萄糖为底物发酵生产 1,3-PD 的酿酒酵母基因工程菌。为进一步将 *dhaB*、*yqhD* 基因导入其他以葡萄糖为底物高产甘油的酵母宿主中表达,获得以葡萄糖为底物一步法发酵高产 1,3-丙二醇工程菌打下了坚实的基础。

关键词: 一步法发酵;1,3-丙二醇;酿酒酵母工程菌

中图分类号:Q78;Q93 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2007)04-0596-06

1,3-丙二醇(1,3-Propanediol, 1,3-PD)是一种重要的化工原料,作为医药和有机合成的中间体用于食品、化妆品和制药等行业,1,3-丙二醇最重要的用途就是作为合成新型聚酯如聚对苯二甲酸-1,3-丙二醇酯(PTT)的单体^[1]。1,3-丙二醇生产方法主要有化学合成法和微生物转化法^[2-5]。目前只有化学合成法实现了工业化,但化学法合成 1,3-丙二醇设备投资大,技术难度高,产品分离纯化困难;微生物转化法生产 1,3-丙二醇尚处于实验室以及中试研究阶段,但微生物转化法对环境友好,反应条件温和,原料易得,因而更具意义。

目前发现的能产 1,3-丙二醇的自然菌株均只能以甘油为底物,经过以下两步反应,即甘油在甘油脱水酶的作用下生成中间产物 3-羟基丙醛,3-羟基丙醛在 1,3-丙二醇氧化还原酶的催化下生成 1,3-PD^[6-8]。应用自然菌株将甘油转化为 1,3-丙二醇的研究得到了广泛的关注,例如清华大学、大连理工大学、天津大学、南京工业大学等在生物化工、遗传学、酶学等领域已进行了大量的研究工作^[9-12]。针对利用自然菌株直接生产 1,3-PD 存在生产周期长、甘油转化率低等问题,本研究室张晓梅等^[13]构建了以甘油为底物生产 1,3-PD 的基因工程菌,但是仍无法解决原料成本过高的问题。因此构建以廉价的葡萄糖

为底物直接生产 1,3-PD 的基因工程菌成为研究的热点。

美国 Dupont 公司和 Genencor 公司以大肠杆菌(*Escherichia coli*)为宿主,成功构建了一株直接以葡萄糖为底物高产 1,3-丙二醇的基因工程菌^[14]。从 Dupont 公司所做的工作可以看出,应用代谢途径的方法开发以糖为原料的生物催化剂在未来更加具有竞争力,不仅可以降低原料成本,产量也可以得到大幅度的提高。

本研究室在国内首次克隆了来自大肠杆菌的 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶 *yqhD* 基因,并将其与来源于肺炎克雷伯氏菌的甘油脱水酶编码基因 *dhaB* 进行串联,构建了以甘油为底物产 1,3-丙二醇的重组大肠杆菌^[13]。在此基础上,本文构建了重组表达载体 pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB*,然后通过 LiAc 高效转化法将重组表达载体导入能以葡萄糖为底物产甘油的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)W303-1A 中;以期得到能以葡萄糖为底物直接生产 1,3-丙二醇的酿酒酵母基因工程菌。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒及基因片段:酿酒酵母

基金项目:国家自然科学基金(20676053);国家“863 计划”(2006AA020103);江苏省青年科技创新人才(学术带头人)基金(BK2006504);长江学者和创新团队发展计划资助(IRT0532)

* 通讯作者。Tel: 86-510-85918106; E-mail: raozm@yahoo.com.cn

作者简介:马 正(1982-),男,江苏镇江人,分子生物学硕士研究生。E-mail: mazheng520@163.com

收稿日期:2006-12-28;接受日期:2007-04-02;修回日期:2007-04-02

(*Saccharomyces cerevisiae*) W303-1A, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109, 质粒 pYX212 由本实验室保藏; 质粒 pGAPZB 购自 Invitrogen 公司; zeocin 抗性基因由本研究室工作人员从质粒 pGAPZB 上克隆得到; *yqhD* 和 *dhaB* 基因由本实验室工作人员分别从大肠杆菌和肺炎克雷伯氏菌中克隆得到^[13]。

1.1.2 主要试剂: 质粒小量抽提试剂盒、胶回收试剂盒(北京博大泰克生物基因技术有限公司); 工具酶、抗生素(华美生物工程公司上海分公司); 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺(American Promega Corporation); 广范围蛋白质分子量标准(American Promega Corporation)。

1.1.3 PCR 引物(上海赛百盛基因技术有限公司合成): 根据质粒 pGAPZB 公布的序列, 设计片段 pGAP-*dhaB*-AOX1TT 合成 PCR 所需引物: P1: 5'-CGCAGATCTTTTTTGTAGAAATG-3'; P2: 5'-CGCAGATCTGCACAAACGAAGGTCTCAC-3'。引物两端均引入 *Bgl* II 酶切位点。

1.2 菌体的培养

含有重组质粒的 *E. coli* JM109 在含有 50mg/L Amp 的 LB 固体或液体培养基中, 250r/min 37℃ 培养过夜。

1.2.1 种子培养条件: 将基因工程菌 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB* 接种于含 150mg/L zeocin 的 50mL YEPD 培养基中, 保持一定的选择压力, 以防质粒丢失, 30℃, 250r/min, 培养过夜。

1.2.2 发酵培养条件: 按 10% 的接种量将种子液接种于 50mL 含 10% 葡萄糖的 YEPD 培养基, 30℃, 250r/min 摇瓶发酵, 发酵 90h, 定时取样。发酵液在 5000r/min 离心 5min, 菌体和上清液用于后续试验。基因工程菌 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB* 的发酵实验以 *S. cerevisiae* W303-1A 为对照。

1.3 PCR 扩增

采用 50 μ L 反应体系, 反应条件: 94℃ 5min, 94℃ 90s, 52℃ 4min, 72℃ 6min, 循环 35 次, 72℃ 10min。

1.4 酿酒酵母 *S. cerevisiae* 基因工程菌的构建

首先将来源于大肠杆菌的基因片段 *yqhD*^[13] 连入载体 pGAPZB, 得到重组质粒 pGAPZB-*yqhD*, 经酶切, 得到片段 pGAP-*yqhD*-AOX1TT; 将来源于肺炎克雷伯氏菌的基因片段 *dhaB*^[13] 连入载体 pGAPZB, 以得到的重组质粒 pGAPZB-*dhaB* 为模板扩增得到基

因片段 pGAP-*dhaB*-AOX1TT。将片段 *zeocin*、pGAP-*yqhD*-AOX1TT、pGAP-*dhaB*-AOX1TT 依次连入表达载体 pYX212, 得到重组表达载体 pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB*。将重组表达载体通过醋酸锂高效转化方法导入酵母 *S. cerevisiae* W303-1A^[15], 得到重组酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB*。

1.5 SDS-PAGE

采用 5% 浓缩胶及 12% 分离胶的不连续垂直平板电泳进行蛋白分离, 考马斯亮蓝 R-250 染色^[16]。以酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A 作为对照。

1.6 甘油脱水酶的酶活力测定

按文献[17]所述的方法测定甘油脱水酶的酶活。酶活单位定义为: 在标准反应条件下, 1min 催化生成 1 μ mol 丙醛的酶量为 1 国际单位(1U)。

1.7 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的酶活力测定

按文献[13]所述的方法测定 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的酶活。酶活测定根据 25℃ 条件下 NADP⁺ 还原成 NADPH 的速率来定量。酶活单位定义为 1 国际单位(1U) 等于每分钟还原 1 μ mol 底物 NADP 或生成 1 μ mol 产物 NADPH 的酶量。

1.8 蛋白质含量测定

粗酶液蛋白质含量采用 Bradford 法^[18]测定, 以 BSA 为标准蛋白。

1.9 1,3-丙二醇含量的测定

发酵液中 1,3-丙二醇及甘油的含量采用气相色谱测定^[19]。安捷伦 1490 型气相色谱仪, 2m 不锈钢柱(ϕ 3mm), 国产高分子微球 GDX-401(110 目) 为固定相。柱温: 250℃, 进样温度: 260℃, 检测温度: 260℃, 氮气作为载气, 使用氢火焰检测器, 进样 5 μ L, 1,3-丙二醇的保留时间为 2.6min, 用外标法计算发酵液中 1,3-丙二醇的含量。

1.10 生物量的测定

生物量测定采用细胞干重法。

1.11 稳定转化子的筛选

转化子通过在选择培养基 SM(YPD + 150 mg/L zeocin) 平板筛选, 将能在 SM 平板上长出的转化子再次在 SM 平板上划线分离, 生长良好的转化子即认为是阳性转化子; 将得到的阳性转化子在没有选择压力的平板上连续传代培养, 每十代用 SM 平板筛选一次, 删除不能生长的菌种, 经过 30 代后仍然能在 SM 平板上生长的菌种即认为是稳定遗传的菌种。

2 结果和分析

2.1 酿酒酵母表达载体的构建

将基因片段 *yqhD*^[13] 在 *EcoR* I 位点插入质粒 pGAPZB(图 1), 质粒 pGAPZB-*yqhD* 的 *EcoR* I 酶切见图 2。用 *Bgl* I 酶切验证其正反接。重组质粒 pGAPZB-*yqhD* 经 *Bgl* II 和 *Bam*H I 双酶切, 得到基因片段 pGAP-*yqhD*-AOX1TT。将基因片段 *dhaB*^[13] 在 *Xba* I 位点插入质粒 pGAPZB, 质粒 pGAPZB-*dhaB* 的 *Xba* I 酶切见图 2。用 *Bam*H I 酶切验证其正反接。以重组质粒 pGAPZB-*dhaB* 为模板, PCR 扩增获得基因片段 pGAP-*dhaB*-AOX1TT。将片段 *zeocin* 在 *EcoR* I 位点插入载体 pYX212, 构建过程如图 1 所示。重组质粒命名为 pYX212-*zeocin*。将片段 pGAP-*yqhD*-AOX1TT 在 *Bam*H I 位点插入载体 pYX212-*zeocin*, 质粒构建如图 1 所示。重组质粒经 *Xba* I 酶切释放出

大小为 5.9kb、4.0kb、1.5kb 的基因片段(图 2)。重组质粒命名为 pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*。将 PCR 扩增得到的片段 pGAP-*dhaB*-AOX1TT 经 *Bgl* II 酶切后在质粒 pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD* 的 *Bam*H I 位点插入, 构建如图 1 所示。重组质粒经 *Xba* I 酶切释放出大小为 5.8kb、4.0kb、2.7kb、1.5kb、1.0kb 的基因片段, 其中释放出 2.7kb 大小的基因片段与 *dhaB* 的大小一致, 如图 2 所示。证明重组质粒构建成功。重组质粒命名为 YX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB*。

将得到的重组质粒 pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB* 通过醋酸锂高效转化方法导入酵母 *S. cerevisiae* W303-1A, 利用选择培养基 SM 平板(YPD + 150mg/L *zeocin*) 筛选稳定阳性转化子。重组酿酒酵母记为 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB*。

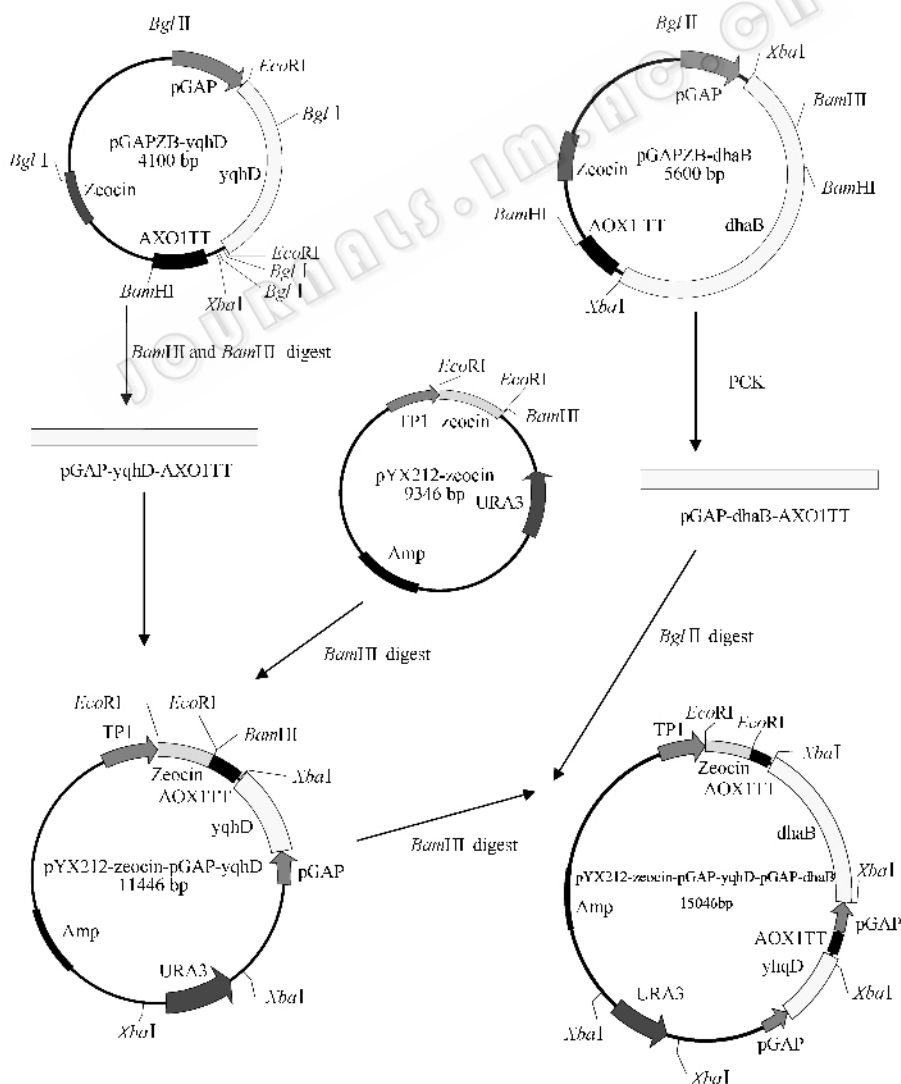


图 1 重组质粒 pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB* 的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmid pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB*.

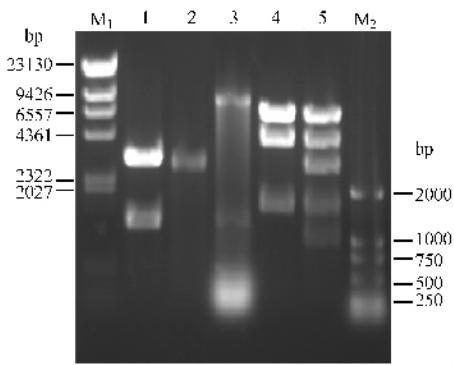


图 2 质粒 pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB 的 Xba I 酶切验证

Fig.2 Analysis of pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB by Xba I digestion. M₁. λDNA/Hind III markers; 1. pGAPZB-yqhD/EcoR I; 2. pGAPZB-dhaB/Xba I; 3. pYX212-zeocin/EcoR I; 4. pYX212-zeocin-pGAP-yqhD/Xba I; 5. pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB/Xba I; M₂. DL2000 markers.

2.2 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

将重组酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB 离心收集菌体, 超声波破壁, 进行 SDS-PAGE 全细胞蛋白电泳分析(图 3)。甘油脱水酶由 3 个亚基组成, 分子量分别为 61、21、16kDa^[20]。而 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的分子量为 43kDa^[21]。由图 3 可见, 以酿酒酵母 *S. cerevisiae* W303-1A 为对照, 发现重组酵母在 61、43、21、16kDa 处出现蛋白质特征带, 与文献报道的目的蛋白大小相符。

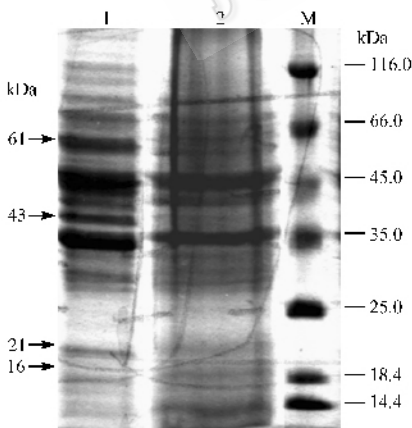


图 3 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells. 1. *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB; 2. *S. cerevisiae* W303-1A (control); M. Protein markers (kDa).

2.3 酶活力分析

结果测得重组酿酒酵母的甘油脱水酶活力为 24U/mg 总蛋白, 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶活力为 15U/mg 总蛋白, 而在对照菌株中检测不到这两种

酶的酶活。

2.4 对 1,3-丙二醇累积及生物量的影响

以葡萄糖为底物, 进行对照发酵实验。含 pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB 的重组菌能促使酵母产生的甘油部分转化为 1,3-丙二醇, 而对照并不能生产 1,3-丙二醇。

如图 4 所示, *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB 发酵 72h 后, 发酵液中甘油含量 3.5g/L 左右, 1,3-丙二醇含量为 1.5g/L 左右。而对照 *S. cerevisiae* W303-1A 发酵液中甘油含量为 6.0g/L 左右, 但不产 1,3-丙二醇。同时发现 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB 的生物量与对照基本一致(图 5)。

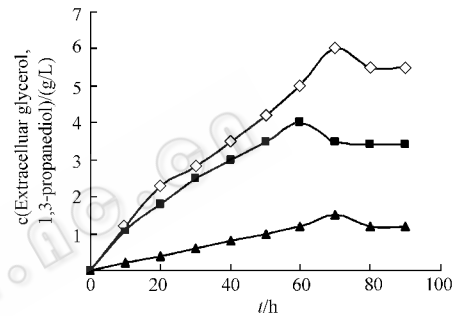


图 4 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB 发酵液中 1,3-丙二醇(▲)和甘油(■)的累积; *S. cerevisiae* W303-1A(◇)发酵液中甘油的累积

Fig.4 1,3-Propanediol (▲) and Glycerol accumulation (■) of *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB and *S. cerevisiae* W303-1A (◇).

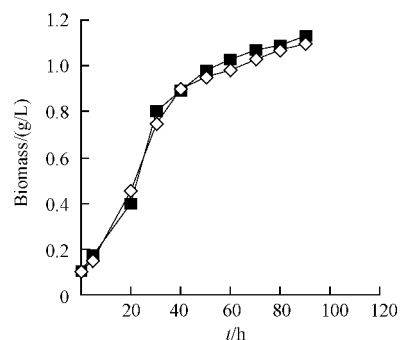


图 5 *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB(◇)和 *S. cerevisiae* W303-1A(■)的生长曲线

Fig.5 Cell growth curves of *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-zeocin-pGAP-yqhD-pGAP-dhaB (◇) and *S. cerevisiae* W303-1A (■).

3 讨论

由于发酵法生产 1,3-丙二醇具有对环境友好, 反应条件温和, 原料易得等优点, 因而受到国内外学者的高度重视。而目前发现的能产 1,3-丙二醇的自

然菌株均只能以甘油为底物,存在原料成本过高的问题。因此,构建以更加廉价的葡萄糖为底物直接生产 1,3-PD 的基因工程菌已经成为研究的热点之一。在这方面,美国 Dupont 公司和 Genercor 公司开展了大量的工作,他们将来自酿酒酵母中由葡萄糖合成甘油的关键酶胞浆 3-磷酸甘油脱氢酶基因 GPD1 和 3-磷酸甘油磷酸酶基因 GPP2,以及来自大肠杆菌的 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因 *yqhD* 和来自克氏肺炎杆菌中的甘油脱水酶基因 *dhaB*,在 *E. coli* K12(仅产少量甘油但不产 1,3-PD)中成功地进行了表达。所获得的工程菌能以葡萄糖为底物生产 1,3-PD,产量高达 135g/L^[14]。Nagarajan V^[22]等则将肺炎克雷伯氏菌编码甘油歧化所需酶的基因(*dhaB*、*dhaT*)转入了产甘油的酿酒酵母中,构建了以酵母为宿主,直接以葡萄糖为底物生产 1,3-丙二醇的重组菌株,1,3-丙二醇产量为 0.47g/L。

本实验室前期在国内首次克隆了来自大肠杆菌的 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶 *yqhD* 基因,并将 *yqhD* 基因与甘油脱水酶编码基因 *dhaB* 进行串联,成功构建了以甘油为底物产 1,3-丙二醇的重组大肠杆菌^[13]。本文在此基础上,将 *yqhD* 基因和 *dhaB* 基因分别置于来源于酵母的 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(GAP)的启动子下游后进行串联,构建了重组质粒 pYX212-zeocin-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB*,并转入了酿酒酵母 W303-1A 中。实验结果表明,甘油转化 1,3-丙二醇的两个关键酶基因(*dhaB*、*yqhD*)在酿酒酵母中的异源表达,可以将酵母中积累的甘油部分转化为 1,3-丙二醇,发酵 72h 后,1,3-丙二醇产量为 1.5g/L,并且发现 *dhaB*、*yqhD* 在酿酒酵母中的表达对酿酒酵母生物量基本没有影响。全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳分析表明,重组菌在 61、43、21、16kDa 处出现蛋白质特征带,与文献报道的目的蛋白大小相符。甘油脱水酶(DHAB)和 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶(YQHD)酶活检测结果表明,重组酿酒酵母 DHAB 酶活力为 24U/mg 总蛋白,YQHD 酶活力为 15U/mg 总蛋白,而对照菌株检测不到 DHAB 和 YQHD 两种酶的酶活。以上结果表明本研究在国内首次成功构建了直接以葡萄糖为底物发酵生产 1,3-PD 的酿酒酵母基因工程菌。据我们所知,这也是国内外将来源于大肠杆菌的 *yqhD* 基因和来源于肺炎克雷伯氏菌的 *dhaB* 基因串联后在酿酒酵母表达的第一例报道。当然,由于酿酒酵母仅属于模式微生物,该菌株本身的产甘油能力很弱,在葡萄糖浓度为 10% 的发酵培养基中甘油产量仅为 5~6g/L。因此,

本研究尽管成功的将甘油合成 1,3-丙二醇的两个关键酶基因转到了酿酒酵母中,但 1,3-丙二醇的产量仍然很低,只有 1.5g/L。该产量与国内外所报道的采用肺炎克雷伯氏菌或大肠杆菌工程菌等发酵生产 1,3-丙二醇的产量有较大距离,但是实现了酵母直接利用廉价的葡萄糖为底物生产 1,3-丙二醇的设想。为将 *dhaB*、*yqhD* 基因进一步在其他以葡萄糖为底物高产甘油的酵母(如本研究室已经成功实现发酵法生产甘油产业化的耐高渗透压产甘油假丝酵母)宿主中表达,直接以葡萄糖为底物一步法高产 1,3-丙二醇奠定了基础,目前,相关研究工作正在进行之中。

参 考 文 献

- [1] Biebl H, Menzel K, Zeng AP, et al. Microbial production of 1,3-propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**: 289–297.
- [2] Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, et al. Metabolic engineering of propanediol pathways. *Biotechnol Prog*, 1998, **14**: 116–125.
- [3] Chotani G, Dodge T, Hsu A, et al. The commercial production of chemicals using pathway engineering. *Biochim Biophys Acta*, 2000, **1531**: 434–455.
- [4] 黄志华, 杜晨宇, 张延平, 等. 1,3-丙二醇合成工艺的研究进展. *三明学院学报*, 2006, **23**(2): 177–181.
- [5] 冯靖微, 张洪林, 蒋林时, 等. 1,3-丙二醇合成方法研究. *化工科技*, 2002, **10**(6): 43–47.
- [6] Abbad-Andaoui S, Manginot-Dun C, Raval G, et al. Carbon and electron flow in *Clostridium butyricum* grown in chemostat culture on glycerol and on glucose. *Microbiology*, 1996, **142**: 1149–1158.
- [7] Huang H, Gong C S, Tsao GT. Production of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, **98**: 687–698.
- [8] Boenigk R, Bowien S, Gottschalk G. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol in continuous cultures of *Citrobacter freundii*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, **38**: 453–457.
- [9] 刘德华, 刘宏娟, 程可可. 微生物发酵法生产 1,3-丙二醇研究进展. *合成纤维*, 2005, **9**: 11–15.
- [10] 修志龙. 微生物发酵生产 1,3-丙二醇的研究进展. *微生物学通报*, 2000, **27**(4): 300–302.
- [11] 陈宏文, 王蔚, 方柏山, 等. 克雷伯杆菌生产 1,3-丙二醇关键酶发酵条件研究. *高校化学工程学报*, 2004, **18**(5): 621–626.
- [12] 吴斌, 何冰芳, 孙志浩, 等. 丁酸梭杆菌发酵甘油制备 1,3-丙二醇的研究. *工业微生物*, 2004, **34**(1): 21–25.
- [13] 张晓梅, 唐雪明, 诸葛斌, 等. 产 1,3-丙二醇新型重组大肠杆菌的构建. *生物工程学报*, 2005, **21**(5): 743–747.
- [14] Nakamura CE, Whited GM. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion Biotechnology*, 2003, **14**: 454–459.
- [15] Adams A, Gottschling DE, Kaiser CA, et al. 酵母遗传学方法实验指南. 刘子铎译. 第二版. 北京: 科学出版社, 2000.

- [16] Joseph S, David WR. *Molecular Cloning*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [17] Ahrens K, Menzel K, Zeng AP, 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. *Biotechnology and Bioengineering*, 1998, **59**(5): 544–552.
- [18] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248–254.
- [19] 王剑峰. 气相色谱测定 1,3-丙二醇发酵液中的主要成分. 大连民族学院学报, 2002, **4**(2): 19–21.
- [20] Seifert C, Bowien S, Gottschalk G. Identification and expression of the genes and purification and characterization of the gene products involved in reactivation of coenzyme B12-dependent glycerol dehydratase of *Citrobacter freundii*. *European Journal of Biochemistry*, 2001, **268**: 2369–2378.
- [21] Emptage M, Haynie SL, Laffend LA. Process for biological of 1,3-propanediol with high titer. US. Pat. No. 6514733. 2003.
- [22] Nagarajan V, Nakamura CE. Production of 1,3-propanediol from glycerol by recombinant bacteria expressing diol dehydratase. US. Pat. No. 5821092. 1998.

Construction of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* producing 1,3-propanediol by one step method

MA Zheng, RAO Zhi-ming*, SHEN Wei, FANG Hui-ying, ZHUGE Jian*

⁽¹⁾ Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education,

⁽²⁾ Research Center of Industrial Microorganisms, Southern Yangtze University, Wuxi 214122, China)

Abstract: 1,3-Propanediol is one of the most important industrial chemicals for its highly desired properties and its wide applications as a key component of an emerging polymer business. Biological production of 1,3-propanediol has been a novel and competitive way. In our previous job, the gene *dahB* encoding for glycerol dehydratase from *Klebsiella* and the gene *yqhD* encoding for 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme from *E. coli* were cloned respectively. The two genes were then tandemly ligated and expressed successfully in *E. coli*. The recombinant *E. coli* strain could produce 1,3-propanediol from D-glycerol. In the current research, the expression vectors including pGAPZB-*yqhD*, pGAPZB-*dhaB* and pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB* were furtherly constructed on the basis of our previous job. Then the vector pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB* was introduced into *Saccharomyces cerevisiae* W303-1A using LiAc transformation method successfully. D-glucose is used as substrate to produce 1,3-propanediol with the recombinant strain after fermentation for 72h. SDS-PAGE analysis showed recombinant products at about 61kD, 43kD, 21kD, 15kD, consistent with the molecular weight from the report. The specific enzymatic activity of the glycerol dehydratase and 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme of the recombinant yeast strain *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB* were 24U/mg protein and 15U/mg protein, respectively, while those of the control were undetectable. In contrast to the wild strain without 1,3-propanediol output, 1,3-propanediol concentration of the recombinant yeast strain *S. cerevisiae* W303-1A/pYX212-*zeocin*-pGAP-*yqhD*-pGAP-*dhaB* reaches about 1.5g/L. The above results showed that the engineered *S. cerevisiae* strain which can convert the D-glucose as substrate to produce 1,3-propanediol by one-step fermentation was constructed successfully. This accomplishment bodes well for future construction of recombinant yeast strain which could overproduce 1,3-propanediol with the lower cost feedstock D-glucose by introducing the two genes *yqhD* and *dhaB* into the yeast strain overproducing glycerol with D-glucose (e.g. *Candida glycerinogenes* WL2002-5, which is capable of producing glycerol more than 120g/L with D-glucose as substrate and has been used for the commercial production of glycerol).

Keywords: one-step fermentation; 1,3-Propanediol; engineered yeast strain

Foundation item: National Natural Science Foundation of China (20676053); National Programs for High Technology Research and Development of China (2006AA020103); Jiangsu Provincial Youth Scientific and Technological Innovation Foundation (BK2006504) (Academic Leader); Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT0532)

* Corresponding author. Tel: 86-510-85918106; E-mail: raozm@yahoo.com.cn

Received: 28 December 2006 / Accepted: 2 April 2007 / Revised: 2 April 2007 © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>