

# 产 1,3-丙二醇新型重组大肠杆菌的构建 Construction of Novel Recombinant *Escherichia coli* Capable of Producing 1,3-propanediol

张晓梅<sup>1</sup>, 唐雪明<sup>1\*</sup>, 诸葛斌<sup>1</sup>, 沈微<sup>2</sup>, 饶志明<sup>2</sup>, 方慧英<sup>1</sup>, 诸葛健<sup>1\*</sup>  
ZHANG Xiao-Mei<sup>1</sup>, TANG Xue-Ming<sup>1\*</sup>, ZHUGE Bin<sup>1</sup>, SHEN Wei<sup>2</sup>, RAO Zhi-Ming<sup>2</sup>,  
FANG Hui-Ying<sup>1</sup> and ZHUGE Jian<sup>1\*</sup>

1. 江南大学生物工程学院工业微生物研究中心, 无锡 214036

2. 江南大学教育部工业生物技术重点实验室, 无锡 214036

1. Research Center of Industrial Microorganisms, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

2. Key Lab of Industrial Biotechnology, Education Ministry, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

**摘要** 利用 PCR 技术从大肠杆菌(*Escherichia coli*)中扩增出 1.16 kb 的编码 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的基因 *yqhD* 将其连接到表达载体 pEtac, 得到重组载体 pEtac-*yqhD*。重组载体在大肠杆菌 JM109 中得到高效表达。SDS-PAGE 分析显示融合表达产物的分子量均为 43 kD, 同核酸序列测定所推导的值相符。对含有 *yqhD* 的基因工程菌进行表达研究表明: 37 °C, 以 1.0 mmol/L IPTG 诱导 4 h, 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的酶活力达到 120 u/mg 蛋白, 而对照菌株的酶活力为 0.5 u/mg 蛋白。再将含甘油脱水酶基因 *dhaB* 和含 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因 *yqhD* 的重组质粒共转化大肠杆菌 JM109 得到重组大肠杆菌 JM109(pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD*)。该菌株在好氧条件下, 以 1.0 mmol/L IPTG 诱导可将 50 g/L 甘油转化为 38.0 g/L 1,3-丙二醇。首次发现 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶在好氧条件下表现出较高的活性。

**关键词** 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶, 重组大肠杆菌, 1,3-丙二醇

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)04-0743-05

**Abstract** The 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme encoding gene (*yqhD*) from *E. coli* was amplified by PCR. *yqhD* was inserted in pEtac to yield the recombinant expression vector pEtac-*yqhD*. Over-expression of *yqhD* in *E. coli* JM109 was achieved with pEtac-*yqhD*. SDS-PAGE analysis showed an over-expressed recombinant product at about 43 kD, consistent with the molecular weight predicted from gene sequence. Compared with *E. coli* JM109 (pEtac), the 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme activity of the recombinant *E. coli* (pEtac-*yqhD*) reached 120 u/mg protein under the induction of 1.0 mmol/L IPTG at 37 °C for 4 hours; at similar conditions, enzyme activity of *E. coli* JM109 (pEtac) was only 0.5 u/mg protein. The recombinant *E. coli* JM109 (pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD*) was constructed. After induction with 1.0 mmol/L IPTG, the recombinant strain could transform 50 g/L glycerol to 38 g/L 1,3-propanediol under aerobic conditions. This work demonstrated firstly that the 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme could show high activity under aerobic conditions.

**Key words** 1,3-propanediol oxidoreductase isoenzyme, recombinant *Escherichia coli*, 1,3-propanediol

Received: February 25, 2005; Accepted: May 11, 2005.

This work is supported by the grants from the Open Foundation of the Key Laboratory of Ministry of Education (No. 20040501) and the Special Fund for Returned Oversea Talents in Southern Yangtze University (No. 101000-21050436).

\* Corresponding author. Tel: 86-510-5874341; Email: xueming70@yahoo.com.cn, jianzhuge@hotmail.com

教育部重点实验室开放基金 (No. 20040501) 及江南大学海外人才引进专项基金 (No. 101000-21050436) 编辑部 http://journals.im.ac.cn

1,3-丙二醇是一种重要的化工原料,不仅可用作良好的溶剂、抗冻剂和保护剂,而且还是极具发展前途的新型聚酯高分子材料聚酯聚对苯二甲酸丙二醇酯(PPT)的单体<sup>[1]</sup>,在合成纤维材料、聚酯膜、工程塑料和纺织服装材料领域应用前景非常广泛,是目前国际上公认的六大石化新产品之一。1,3-丙二醇的生产方法有化学合成法和微生物转化法<sup>[2]</sup>,目前仅有化学合成法应用于工业生产。但是化学法存在许多不足,生产成本高是目前1,3-丙二醇价格居高不下的主要原因,也是限制PPT产业化的最主要因素。微生物转化法有着明显的优点,已成为国内外研究的热点。目前由于利用自然筛选的微生物直接进行1,3-丙二醇的发酵法生产还存在产物浓度低、生产周期长和甘油转化率低等问题,导致缺乏市场竞争力而无法大规模应用,因此,利用基因工程技术构建高产菌株备受国内外研究者青睐,被认为是今后的发展方向。

通常情况下微生物转化法生产1,3-丙二醇都是以甘油为底物,经过以下两步反应,即甘油在甘油脱水酶作用下转化为中间产物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-丙二醇<sup>[3]</sup>。1,3-丙二醇氧化还原酶和甘油脱水酶是甘油转化为1,3-丙二醇代谢途径中的关键酶,将编码这两个关键酶的基因 *dhaT* 及 *dhaB* 进行克隆与表达是构建产1,3-丙二醇基因工程菌的基本途径,但是目前以此为基础构建的1,3-丙二醇基因工程菌,以甘油为底物,1,3-丙二醇的产量仅为6.3 g/L<sup>[4]</sup>。最近研究发现,来自大肠杆菌的非特异性氧化还原酶是1,3-丙二醇氧化还原酶的同工酶,它在微生物体内可代替1,3-丙二醇氧化还原酶催化3-羟基丙醛生成1,3-丙二醇,成为微生物转化甘油生成1,3-丙二醇的另一重要用酶<sup>[5]</sup>。研究还发现,非特异性氧化还原酶比1,3-丙二醇氧化还原酶催化底物3-羟基丙醛的效率明显提高,目前杜邦公司正在利用1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的编码基因 *yqhD* 构建相关的工程菌,其应用水平尚未见文献报道,*yqhD* 的克隆与表达在国内亦未见报道。此外,好氧条件下发酵甘油生成1,3-丙二醇在国内外亦未见文献报道。本研究将 *yqhD* 基因引入表达载体 pEtac 中,并在大肠杆菌 JM109 实现了表达;同时构建了重组大肠杆菌 JM109(pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD*),并对重组菌进行了好氧条件下转化甘油的研究,探索利用微生物发酵法生产1,3-丙二醇的新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109, 大肠杆菌, 质粒载体 pUCtac-*dhaB*<sup>[6]</sup>, pEtac<sup>[7]</sup>, 由本实验室先期构建和保藏。重组大肠杆菌 JM109(pEtac-*yqhD*), 重组大肠杆菌 JM109(pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD*), 为本研究中构建。

### 1.2 培养基和培养条件

1.2.1 培养基 (1) LB 培养基 (g/L): 蛋白胨 10, 酵母膏 5, 氯化钠 10, 固体培养基添加 1.5% 的琼脂, 固体和液体培养基在需要时加入硫酸卡那霉素至 50 μg/mL 或氨苄青霉素至 100 μg/mL。(2) 种子培养基 LB 培养基。(3) 发酵培养基<sup>[8]</sup> (g/L): 甘油 50, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3.4, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.3, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.005, CaCl<sub>2</sub> 0.1, 维生素 B<sub>12</sub> 0.015。用 2 mol/L KOH 调 pH 值 7.0。121℃ 灭菌 15 min, 接种前加入硫酸卡那霉素至 50 μg/mL 或氨苄青霉素至 100 μg/mL。

1.2.2 培养条件 (1) 种子培养: 50 mL 三角瓶, 装液量 15 mL, 培养温度 37℃, 摇床转速 200 r/min, 培养 24 h。(2) 发酵条件: 250 mL 三角瓶, 装液量 25 mL, 接种量为 10%, 发酵温度 37℃, 摇床转速 200 r/min。对数后期加 1 mmol/L IPTG 诱导培养过夜, 以未加入 IPTG 诱导的发酵液为对照。

### 1.3 工具酶和试剂

实验用各种限制酶 *EcoR* I, *Bgl* I, 碱性磷酸酶 CIAP 购自 TaKaRa 公司; T4 DNA 连接酶及 *Taq* DNA 聚合酶购自上海华美生物工程公司; Gel Extraction Mini Kit, PCR Purification Mini Kit 购自上海华舜生物工程公司。丙烯酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, 广范围蛋白质分子量标准为 Promega 公司产品。除特别说明外, 实验用各种试剂均为国产分析纯。

### 1.4 分子克隆技术

基因组 DNA 的提取, 纯化质粒 DNA 的提取, DNA 酶切, 连接和转化均参考文献 [9]。根据 NCBI 公布的大肠杆菌 ATCC 菌株 *yqhD* 基因序列设计合成 PCR 所需的引物:

上游 5'-ACCGGAATTCATGAACAACCTTAATCTGC-3'

下游 5'-ACCGGAATTCCTTAGCGGGCGGCTTC-3'

引物两端都引入 *EcoR* I 位点。以大肠杆菌相关基因组 DNA 为模板完成 PCR 反应: 95℃ 变性 10 min, 加入 TaKaRa *Taq* DNA 聚合酶, 经 35 个循环, 获得的 PCR 产物经电泳分析确认, 经 PCR 产物纯化

试剂盒纯化后, *EcoR*I 酶切, 回收其中 1.16 kb 的片段, 连接载体 pEtac。

### 1.5 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的酶活力测定

**1.5.1** 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶粗酶液的制备: 以大肠杆菌 JM109( pEtac )为对照, 接种重组大肠杆菌 JM109( pEtac-*yqhD* )单菌落于 LB 培养基(含硫酸卡那霉素 50 $\mu$ g/mL), 37 $^{\circ}$ C 培养 24h, 取 500 $\mu$ L 菌液接种于 50mL 含有 50 $\mu$ g/mL 硫酸卡那霉素的 LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 培养至对数后期, 1mmol/L IPTG 诱导培养 4h, 离心, 将菌体重悬于 3mL 0.035mol/L 磷酸钾缓冲液( pH8.0 )中, 超声波破碎细胞, 离心除去碎片, 上清液即为粗酶。

**1.5.2** 酶活力测定: 按文献[10]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 $^{\circ}$ C 下 NADP $^{+}$  还原成 NADPH 的速率定量。总反应体积 2 mL, 含 0.6 mmol/L NADP, 30 mmol/L (NH $_4$ ) $_2$ SO $_4$ , 100 mmol/L 1,3-丙二醇, K $_2$ CO $_3$ -KHCO $_3$  缓冲液( pH 9.0 ), 加入粗酶液起始反应, 340 nm 下测定 3 min 吸光值的变化。酶活单位定义为 1 国际单位( 1 u )等于每分钟还原 1  $\mu$ mol 底物或生成 1  $\mu$ mol 产物的酶量。

### 1.6 SDS-PAGE

采用 5% 浓缩胶及 12% 分离胶的不连续垂直平板电泳, 考马斯亮蓝 R-250 染色[11]。以大肠杆菌 JM109( pEtac )做对照。

### 1.7 重组大肠杆菌 JM109( pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD* )的构建

**1.7.1** 甘油脱水酶基因 *dhaB* 和 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因 *yqhD* 的重组质粒共转化大肠杆菌 JM109: 取纯化质粒 pUCtac-*dhaB* 和 pEtac-*yqhD* 各 1  $\mu$ L 混合后共转化大肠杆菌 JM109, 涂布含氨苄青霉素及硫酸卡那霉素双抗平板。挑取阳性转化子, 在双抗平板上划线分离保存后得到重组大肠杆菌 JM109( pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD* )。

**1.7.2** 重组大肠杆菌 JM109( pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD* )质粒稳定性分析: 单细胞生物的生长, 细胞呈几何级数  $2^n$  增长, 当  $n = 20$  时,  $2^{20} = 1.05 \times 10^6$ , 将静止期的菌液稀释  $10^{-6}$ , 再将其培养到静止期, 即可认为细胞已连续传代 20 次。具体方法如下: 从新鲜转化平板上挑取单菌落, 接种至 2 mL 不含抗生素的 LB 中, 37 $^{\circ}$ C 培养 24 h, 即得 20 代的菌液, 以此类推, 直至连续传代至 100 代。其中每隔 20 代统计 1 次质粒丢失情况, 将上述菌液涂布于不含抗生素的 LB 板上, 从中挑选 100 个单菌落分别点在添加和不

添加抗生素的平板上, 通过计数即可测得该代数的质粒稳定性。

### 1.8 重组菌发酵试验

**1.8.1** 发酵: 50 g/L 甘油底物, 37 $^{\circ}$ C, 250 mL 三角瓶中好氧发酵培养。对数生长后期加入 1 mmol/L IPTG 诱导过夜。同时以未加入 IPTG 诱导的发酵液为对照。

**1.8.2** 发酵液中 1,3-丙二醇含量的检测方法[12]: 发酵液中 1,3-丙二醇及甘油的含量用气相色谱测定。安捷伦 1490 型气相色谱仪, 2 m 不锈钢柱(内径 3 mm), 国产高分子微球 GDX-401(110 目)为固定相。柱温 250 $^{\circ}$ C, 进样温度 260 $^{\circ}$ C, 检测温度 260 $^{\circ}$ C, 氮气作为载气, 使用氢火焰检测器, 进样量 5  $\mu$ L, 1,3-丙二醇的保留时间为 2.6 min, 用外标法计算发酵液中 1,3-丙二醇的含量。

## 2 结果

### 2.1 含 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因 *yqhD* 的重组质粒 pEtac-*yqhD* 的构建

以大肠杆菌基因组 DNA 为模板, 利用合成引物进行 PCR 扩增, 琼脂糖电泳检测扩增片段, 扩增的 DNA 片段 1.16 kb, 片段插入载体 pEtac 转化大肠杆菌 JM109 转化子涂布含 50  $\mu$ g/mL 硫酸卡那霉素的 LB 平板, 提取阳性转化子质粒。重组质粒酶切电泳鉴定(图 1), 重组质粒命名为 pEtac-*yqhD*(图 2)。

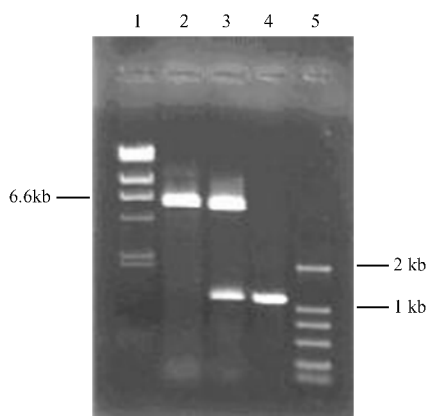


图 1 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因( *yqhD* )的 PCR 扩增片段及重组质粒酶切鉴定

Fig.1 PCR amplification of *yqhD* and enzymatic digests of recombinant plasmids

1:  $\lambda$  DNA/*Hind*III markers ( bp ); 2: pEtac/*Eco*R I ; 3: pEtac-*yqhD*/*Eco*R I ; 4: *yqhD*/PCR ; 5: DL-2000 DNA markers ( bp ).

### 2.2 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶基因 *yqhD* 的核苷酸序列分析

将 pEtac-*yqhD* 重组质粒进行测序, 得到全长 1164

个碱基的 *yqhD* 基因, 测序结果在 NCBI 进行 BLAST 序列分析, 表明本研究克隆到的 *yqhD* 基因与公布的大肠杆菌的同源性为 99%, 而由所测序列推导出的蛋白氨基酸序列与公开的 YQHD 氨基酸序列完全一致。

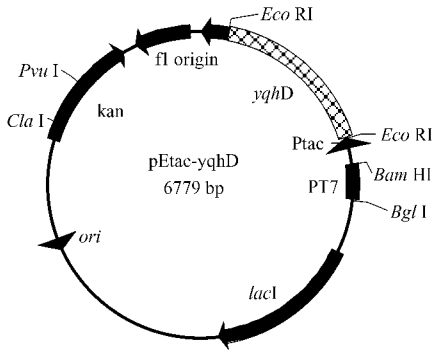


图 2 重组表达质粒 pEtac-*yqhD* 结构示意图

Fig.2 Construction of recombinant expression plasmid pEtac-*yqhD*

### 2.3 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

挑取 3 个重组子大肠杆菌 JM109(pEtac-*yqhD*) 分别接种于含有硫酸卡那霉素 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 LB 培养基中, 37  $^{\circ}\text{C}$  培养至对数后期, 1 mmol/L IPTG 诱导培养 4 h, 离心收集菌体, 超声波破壁, 加入 1 倍的 SDS-PAGE 电泳加样缓冲液中悬浮, 100  $^{\circ}\text{C}$  水浴 5 min, 进样量为 10  $\mu\text{L}$ , SDS-PAGE 全细胞电泳分析如图 3 所示, 以空载体产物为对照, 发现在 43 kD 处出现蛋白质特征带, 与目的蛋白大小相符, 应用 BandScan 软件分析表明三个重组子的酶蛋白表达量均占全细胞蛋白的 35.8%。

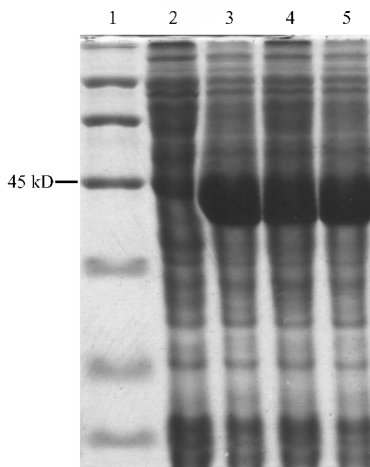


图 3 重组菌全细胞蛋白 SDS-PAGE 电泳分析

Fig.3 SDS-PAGE analysis of proteins in whole cells

1: protein markers (kD); 2: *E. coli* JM109(pEtac) (control); 3~5: *E. coli* JM109(pEtac-*yqhD*) after IPTG induction for 4 h.

### 2.4 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶的酶活测定

取一株重组大肠杆菌 JM109(pEtac-*yqhD*) 接种

于含硫酸卡那霉素的 LB 培养基中, 经 IPTG 诱导表达, 采用超声波破碎细胞。按文献 [10] 所述方法测定酶活, 并以大肠杆菌 JM109(pEtac) 作对照, 结果测得重组大肠杆菌 JM109(pEtac-*yqhD*) 的酶活力为 120 u/mg 蛋白, 而对照菌株的酶活力为 0.5 u/mg 蛋白, 是对照菌株酶活力的 240 倍。

### 2.5 重组菌质粒稳定性研究

重组大肠杆菌 JM109(pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD*) 在添加氨苄青霉素, 不添加硫酸卡那霉素, 无硫酸卡那霉素选择压力的条件下, 以及添加硫酸卡那霉素, 不添加氨苄青霉素, 无氨苄青霉素选择压力的条件下, 连续转种 5 次, 统计重组大肠杆菌 JM109(pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD*) 的菌落数, 结果表明, 传 100 代后重组大肠杆菌 JM109(pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD*) 的质粒保持率分别为 91% 和 87%。

表 1 重组菌大肠杆菌 JM109(pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD*) 连续转种后在不同抗生素平板上的菌落数

Table 1 The stability of *E. coli* JM109(pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD*) plasmid

Generations	pUCtac- <i>dhaB</i>		pEtac- <i>yqhD</i>	
	Amp (+)	Kan (-)	Amp (-)	Kan (+)
20	100		100	
40	100		98	
60	98		95	
80	95		92	
100	91		87	

### 2.6 重组菌初步发酵试验

以 50 g/L 甘油为唯一碳源的发酵培养基, 大肠杆菌 JM109(pEtac), 重组大肠杆菌 JM109(pEtac-*yqhD*) 及重组大肠杆菌 JM109(pUCtac-*dhaB*) 以 1 mmol/L IPTG 诱导前后均不产 1,3-丙二醇; 重组大肠杆菌 JM109(pUCtac-*dhaB*, pEtac-*yqhD*) 以 1 mmol/L IPTG 诱导前后 1,3-丙二醇产量分别为 10.0 g/L 和 38.0 g/L; 重组菌传 100 代后发酵水平未见显著变化。

## 3 讨论

甘油在产 1,3-丙二醇微生物体内合成途径是由甘油脱水酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶所构成催化链的还原途径来实现的。3-羟基丙醛是该还原途径的唯一中间产物。研究显示, 3-羟基丙醛能够抑制菌体的生长和甘油的代谢, 其主要原因是当 3-羟基丙醛累积浓度达到 30 mmol/L 时, NAD<sup>+</sup> 浓度增大, 抑制了 1,3-丙二醇氧化还原酶的活性, 进一步引起 3-

羟基丙醛的累积,而 3-羟基丙醛又反馈抑制了甘油脱水酶的活性<sup>[13,15]</sup>。这可能是目前文献报道的利用这两个酶构建以甘油为底物的 1,3-丙二醇基因工程菌不能实现高产的主要限制因素之一。值得一提的是,1,3-丙二醇氧化还原酶对氧极其敏感,所以发酵通常是在厌氧条件下进行。而与编码 1,3-丙二醇氧化还原酶不同的是,来自大肠杆菌的由 *yqhD* 编码的 1,3-丙二醇氧化还原酶的同工酶的活性对氧并不敏感,二者所倚赖的辅因子也并不相同,1,3-丙二醇氧化还原酶的同工酶利用 NADPH 而不是 NADH,解除了中间产物积累从而抑制甘油代谢的因素,这也很可能就是导致二者对底物催化效率不同的原因<sup>[14]</sup>。本研究的发酵结果表明,在有氧条件下,甘油脱水酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶的同工酶仍保持较高的活性,因此好氧发酵得以实现。

本文研究了在大肠杆菌 JM109 中分别只引入甘油脱水酶 *dhaB* 基因或 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶 *yqhD* 基因 1,3-丙二醇发酵情况,结果显示:重组大肠杆菌 JM109(pE<sub>tac</sub>-*yqhD*)及重组大肠杆菌 JM109(pU<sub>tac</sub>-*dhaB*)均不利用甘油产 1,3-丙二醇,只有在大肠杆菌 JM109 中同时引入 *dhaB* 基因和 *yqhD* 基因时才能利用甘油发酵产 1,3-丙二醇,这也进一步证实了 1,3-丙二醇氧化还原酶的同工酶可在微生物体内代替 1,3-丙二醇氧化还原酶催化 3-羟基丙醛生成 1,3-丙二醇。

本研究中所用的载体 pE<sub>tac</sub> 是将 *tac* 启动子插入 pET28a 的 *Bam*H I 及 *Eco*R I 之间而获得,pE<sub>tac</sub> 本身含有 pET28a 的 *lac* I 基因,能高产 *lac* 阻遏蛋白降低 *tac* 启动子的本底表达。虽然载体 pE<sub>tac</sub> 含有 pET28a 的 T7 启动子,但这种启动子的转录完全依赖于 T7 RNA 聚合酶,必须在噬菌体 DE3 溶原酶中才能表达,在非溶原酶的宿主中只有 *tac* 启动子才能起作用。在本底转录水平得到控制的情况下,*tac* 强启动子的作用使得 1,3-丙二醇氧化还原酶同工酶 *yqhD* 基因在大肠杆菌中得到高效表达。我们利用 pE<sub>tac</sub> 载体已经成功地使多种生物酶得到高效表达<sup>[7,16]</sup>。

本研究中,重组大肠杆菌 JM109(pU<sub>tac</sub>-*dhaB*, pE<sub>tac</sub>-*yqhD*)的初步发酵实验所产 1,3-丙二醇的水平已经远高于目前文献报道的 6.3 g/L 的发酵水平,如利用成熟的大肠杆菌高密度发酵技术将使其生产水平成倍增高。目前,研究小组正在进行重组菌的高密度发酵研究。另外,我们试图将甘油生产菌株的关键酶的编码基因 GPD1 和 GPP2 克隆到大肠杆

菌重组菌中,从而获得能直接利用葡萄糖实现一步发酵法转化 1,3-丙二醇的工程菌,并进一步降低 1,3-丙二醇和 PPT 的生产成本。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Biehl 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**: 1116 - 125
- [3] Skraly FA, Lytle BL, Cameron DC. Construction and characterization of 1,3-propanediol operon. *Appl Environ Microbiol*, 1998, **1**: 98 - 105
- [4] Laffend LA, Nagarajan V, Nakamura CE *et al.* Bioconversion of a fermentable carbon source to 1,3-propanediol by a single microorganism. US. Pat. No. 6025184, 2000
- [5] Nakamura CE, Whited GM. Metabolic engineering for the microbial production of 1,3-propanediol. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, **14**: 454 - 459
- [6] Li C (李琛). Construction of 1,3-propanediol Recombinants. Wuxi: M D Dissertation of Southern Yangtze University (江南大学硕士学位论文), 2003
- [7] Shen W (沈微), Wang ZX (王正祥), Tang XM (唐雪明) *et al.* Secretory expression of high thermophilic  $\alpha$ -amylase gene of *Pyrococcus furiosus*, A kind of Earchaic bacterium. *China Brewing* (中国酿造), 2003, **1**: 12 - 14
- [8] Nagarajan CE, Gatenhy AA, Hsu AK *et al.* Method for the production of 1,3-propanediol by recombinant microorganism. US. Pat. No. 6013494, 2000
- [9] Joseph S, David WR. *Molecular Cloning (Third Edition)* Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- [10] Johnson EA, Lin EC. *Klebsiella pneumoniae* 1,3-propanediol: NAD<sup>+</sup> oxidoreductase. *J Bacteriol*, 1987, **169**: 2050 - 2054
- [11] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE *et al.* Short protocols in molecular biology (精编分子生物学实验指南). Beijing: Science Press, 1998
- [12] Quan YL (权龙云), Wang RH (王润华), Lu A (陆安) *et al.* Study on the determination for propanediol and impurity by gas chromatography. *Journal of Science of Teachers College and University* (高师理科学刊), 1998, **18**(2): 39 - 40
- [13] Zeng AP, Biehl H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trend. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, **74**: 239 - 259
- [14] Emptage M, Haynie SL, Laffend LA *et al.* Process for the biological production with high titer. US. Pat. No. 6514733, 2003
- [15] Zeng AP, Biehl H. Multiple product inhibition and growth modeling of *Clostridium butyricum* and *Klebsiella pneumoniae* in glycerol fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**: 902 - 911
- [16] Sun JF (孙金凤), Xu M (徐敏), Wang ZX (王正祥) *et al.* Novel recombinant *Escherichia coli* producing ethanol from glucose and xylose. *Acta Microbiologica Sinica* (微生物学报), 2004, **44**: