

甲酸脱氢酶在 *Klebsiella pneumoniae* 中的表达和功能分析

黄志华^{1,2}, 张延平¹, 刘 铭¹, 王宝光¹, 曹竹安^{1*}

(¹ 清华大学化学工程系生物化工研究所 北京 100084)

(² 三明学院化学与生物工程系 三明 365004)

摘 要 在甘油厌氧发酵生产 1,3-丙二醇的过程中,需要消耗还原当量 NADH,NADH 的有效供给决定了 1,3-丙二醇的产量和得率。采用 PCR 方法从 *Candida boidinii* 基因组中克隆编码甲酸脱氢酶基因 *fdh*,将 *fdh* 基因片段插入载体 pMAL™-p2X 中,构建表达载体 pMAL™-p2X-*fdh*,并转入 1,3-丙二醇生产菌 *Klebsiella pneumoniae* YMU2,获得重组菌 *Klebsiella pneumoniae* F-1。研究了重组质粒的稳定性和 IPTG 诱导 *fdh* 基因过量表达的条件。结果表明,重组质粒具有良好的稳定性;*fdh* 基因表达的蛋白分子量为 40.2kDa;IPTG 诱导表达研究表明,在 IPTG 浓度为 0.5mmol/L 时,诱导 4h 后甲酸脱氢酶表达明显;发酵过程中甲酸脱氢酶比酶活达到 5.47U/mg;与出发菌株 *K. pneumoniae* YMU2 相比,重组菌 F-1 合成 1,3-丙二醇的浓度提高了 12.5%。

关键词: *Candida boidinii*; 甲酸脱氢酶; *Klebsiella pneumoniae*; NADH; 1,3-丙二醇

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2007)01-0064-05

1,3-丙二醇(1,3-propanediol,简称 1,3-PD)是一种重要的化工原料^[1]。新型聚酯材料聚对苯二甲酸丙二醇酯(Polytrimethylene Terephthalate,PTT)商业化以来,生物转化甘油合成 1,3-PD 因其环境友好越来越受重视。甘油厌氧转化为 1,3-PD 属于还原途径,甘油在以维生素 B₁₂ 为辅酶的甘油脱水酶的催化下生成 3-羟基丙醛,随后在消耗还原当量 NADH 的基础上,通过 1,3-PD 氧化还原酶的催化而生成 1,3-PD^[2,3],其中辅酶 NADH 作为还原当量起着关键的作用,其含量的高低直接影响到 1,3-PD 的产量,这些 NADH 主要是由甘油氧化途径合成再生的。因此,适当提高胞内 NADH 浓度及 NADH/NAD 比例,有望提高 1,3-PD 合成浓度。

由于辅酶 NADH 结构复杂、不稳定和价格昂贵等缺点,在工业生产中不断添加辅酶 NADH 显然是不可行的,因而辅酶 NADH 的再生就成为降低生产成本的重要环节。近年来,甲酸/甲酸脱氢酶(FDH)辅酶再生系统引起了人们的广泛关注,并成功应用于 L-叔-亮氨酸的工业生产^[4]。此外,Berrios-Rivera 等^[5,6]通过在 *E. coli* 中表达来源于 *Candida boidinii* 的甲酸脱氢酶,使 NADH 在菌体内有效再生,大大改变了 *E. coli* 好氧及厌氧代谢流及产物得率,每消耗 1mol 底物葡萄糖,NADH 再生量由 2mol 提高到

3mol,并且产物中还原性物质的比例增加。本文根据 *Klebsiella pneumoniae* 代谢网络的特点,选取 NAD⁺-依赖型的甲酸脱氢酶(Formate Dehydrogenase,FDH)为研究对象,从 *Candida boidinii* 基因组 DNA 中获取 *fdh* 基因,将其插入到表达载体,而后将重组质粒转化到生产菌 *K. pneumoniae* YMU2 中,成功构建了 *fdh* 基因表达重组菌 *K. pneumoniae* F-1,通过发酵罐培养对其合成 1,3-PD 情况进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 本试验所用菌株和质粒见表 1。
1.1.2 培养基 :YPD 培养基用于 *C. boidinii* 培养; LB 培养基用于 *E. coli* DH5 α 培养;选择性培养基: LBA⁺ 在 LB 培养基中添加 100mg/L 的氨苄青霉素; IPTG-X-gal + LBA⁺ 选择培养基[在事先制备好的 LBA⁺ 琼脂平板上加 40 μ L X-gal 贮存液(5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-半乳糖苷,以 20mg/mL 的浓度溶于二甲基酰胺中)和 4 μ L 异丙基硫代- β -D-半乳糖苷(IPTG)溶液(浓度为 200mg/mL)]用于重组菌 *E. coli* DH5 α (pMD18-T Simple-*fdh*) 和 *K. pneumoniae* F-1 的筛选。YMU2 及 F-1 的发酵培养基碳源为甘油,初始浓度 30g/L,其它组分同文献^[3]。

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973 项目)(2003CB716007)

* 通讯作者。Tel: 86-10-62794666; Fax: 86-10-62770304; E-mail: cza-dce@mail. tsinghua. edu. cn

作者简介: 黄志华(1964-),女,福建人,理学学士,副教授,主要从事生物化工方面研究。E-mail: hzh917@163.com

收稿日期: 2006-04-30; 接受日期: 2006-05-29; 修回日期: 2006-06-19

表 1 实验菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids

Strain and plasmid	Properties and genotype	Source
Plasmid		
pMD18-T Simple	Amp ^r 2692bp	Lab collection
pMAL TM -p2X	Amp ^r 6721bp	Lab collection
pMD18-T Simple- <i>fdh</i>	1.1kb DNA fragment with <i>fdh</i> gene in pMD18-T Simple 3.8kb	This work
pMAL TM -p2X- <i>fdh</i>	1.1kb DNA fragment with <i>fdh</i> gene in pMAL TM -p2X 7.8kb	This work
Strain		
<i>Candida boidinii</i>	Source of <i>fdh</i> gene	Bought from China General Microbiological Culture Collection Center
<i>K. pneumoniae</i> YMU2	Amp ^r *	Lab collection
<i>E. coli</i> DH5 α		Lab collection
<i>E. coli</i> DH5 α (pMD18-T Simple- <i>fdh</i>)	Host of pMD18-T Simple- <i>fdh</i>	This work
<i>K. pneumoniae</i> F-1	Host of pMAL TM -p2X- <i>fdh</i>	This work

* Amp^r \leq 50mg/L Amp.

1.1.3 酶和化学试剂 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Ex Taq 聚合酶、dNTPs 均购自宝生物工程有限公(TaKaRa)。核酸分子质量标准品、蛋白分子质量标准品为鼎国生物公司产品。PCR 产物纯化、酶切消化产物纯化、质粒提取纯化所用试剂盒均购自 SBS ,*C. boidinii* 基因组 DNA 提取纯化所用试剂盒购自 Promega(Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit) , 其它试剂购自北京市科海军舟生物科技发展中心。

1.2 PCR 引物设计

采用 Omega 软件,参考已经报道的 *C. boidinii* 的 *fdh* 基因(Accession No. AF004096)序列^[7],设计如下引物并由北京赛百胜基因技术有限公司(SBS)合成:上游序列:5'-TATTATAGGATCCACAAAATGAA GATCGTTTTAGTC-3'(下划线为 *Bam*H I 位点;黑体字为起始密码子);下游序列:5'-TACGAATTCCTTATTCTTATATCGTGTTCACCGTAAG-3'(下划线为 *Eco*R I 位点;黑体字为终止密码子)。

1.3 目的基因的获取

C. boidinii 培养 20h 后提取其基因组 DNA ,PCR 扩增目的基因 *fdh*。20 μ L 反应体系含 *C. boidinii* 基因组 DNA 1.8 μ L ,dNTPs 各 4nmol ,上、下游引物各 20pmol ,Ex Taq 1U ,1 \times Ex Taq Buffer 2 μ L ,无菌水补足至 20 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 5min ;94 $^{\circ}$ C 90s ,55 $^{\circ}$ C 90s ,72 $^{\circ}$ C 90s ,8 个循环 ;94 $^{\circ}$ C 30s ,60 $^{\circ}$ C 60s ,72 $^{\circ}$ C 90s 20 个循环 ;72 $^{\circ}$ C 10min。扩增 1.1kb 的目的产物片段。

1.4 中间载体和重组质粒的构建和鉴定

根据基因序列分析,采用 *Eco*R I 和 *Bam*H I 进行酶切后连接,为了更好地酶切目的基因,采取两次连接。首先将浓缩纯化的 PCR 扩增产物与克隆质

粒 pMD18-T Simple 在 T4 DNA 连接酶的作用下 15 $^{\circ}$ C 过夜连接,将 *fdh* 基因定向克隆到质粒 pMD18-T Simple 上,得到中间载体 pMD18-T Simple-*fdh*。将中间载体转化到 *E. coli* DH5 α 中,通过蓝白斑筛选提取阳性克隆载体,用 *Eco*R I / *Bam*H I 酶切分析正确后纯化。纯化的 *fdh* 基因与同时用 *Eco*R I / *Bam*H I 双酶切的表达载体 pMALTM-p2X 在 T4 DNA 连接酶的作用下 15 $^{\circ}$ C 过夜连接,将 *fdh* 基因定向克隆到质粒 pMALTM-p2X 的多克隆位点 *Eco*R I / *Bam*H I 之间,然后将重组质粒 pMALTM-p2X-*fdh* 转化到感受态细胞 *K. pneumoniae* YMU2 感受态细胞制备方法见文献[8]中)通过蓝白斑和小规模抽提质粒鉴定筛选阳性克隆。从该阳性克隆平板上随机挑取白斑单菌落进行菌落 PCR 鉴定后,阳性菌株接种于 LB-Amp(100mg/L)液体培养基中,37 $^{\circ}$ C 培养 12~16h 后用 SBS 质粒纯化试剂盒提取重组质粒 pMALTM-p2X-*fdh*,分别对提取的质粒进行电泳和酶切(*Bam*H I / *Eco*R I)分析,正确的克隆进行下面的实验。

1.5 序列测定和分析

重组质粒 pMD18-T Simple-*fdh* 序列测定由宝生物(大连)公司完成,测序仪为 ABI PRISMTM 377 XL DNA Sequencer,测序引物为 pMD18-T Simple 两侧的通用引物:F Prime(M13-47),R Prime(RV-M)。序列分析采用 NCBI BLAST、Omega 软件。

1.6 *fdh* 基因的诱导表达

将重组菌 F-1 好氧培养至 OD₆₅₀ 约 0.4~1.0,加入 IPTG 使之终浓度为 0.5~1.0mmol/L,诱导表达 0~6h,以平行培养的 YMU2 作为对照,全菌蛋白提取物经 SDS-PAGE 检测甲酸脱氢酶蛋白表达情况。

SDS-PAGE 分离胶浓度 10%,电泳后经考马斯亮蓝

R250 染色 2~4h 并脱色 4h 以上,用 Pharmacia 凝胶成像系统进行凝胶蛋白扫描。

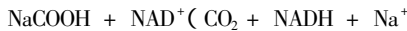
1.7 菌体生长及代谢产物测定

菌体生长用 650nm 处的吸光度 (OD_{650}) 测定,1,3-PD 的浓度用高效液相色谱 (HPLC) 进行测定。具体方法见文献 [9]。

1.8 重组菌甲酸脱氢酶酶活测定

细胞粗酶液的制备:收集发酵液经 8000r/min, 4℃ 离心 10min 后弃去上清液,将菌泥用适量预冷的 10mmol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液 (含 0.1mol/L β -巯基乙醇) 洗涤后再次离心。将菌泥用 4mL 10mmol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液 (含 0.1mol/L β -巯基乙醇)^[5] 重悬后进行超声破碎,超声功率 200W, 3s + 3s, 10min, 破碎过程菌液始终保持在冰水浴中。细胞破碎液经 13000r/min 4℃ 离心 20min, 所得上清液即可用于 FDH 酶活测定。

对细胞粗酶液测定 FDH 酶活可利用其反应,通过测定吸收峰在 340nm 处 NADH 的增量按照下列公式进行换算^[5]。



在 10mmol/L pH 7.5 的磷酸盐缓冲液 (含 0.1mol/L β -巯基乙醇) 中加入 1.67mmol/L NAD^+ , 167mmol/L 甲酸钠, 30℃ 反应 10min, 测定 340nm 吸光度, 根据吸光度增量计算反应初速率。NADH 的摩尔吸光度为^[10] $\epsilon_{340} = 6220\text{L}/\text{mol}\cdot\text{cm}$ 。每分钟产生 1nmol NADH 的蛋白量定义为 1U。蛋白浓度测定用考马斯亮蓝法^[11]。

1.9 重组菌 F-1 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至 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 2mL 不含抗生素的 LB 中, 37℃ 培养 24h, 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 平板上,从中挑选 100 个单菌落分别点在不添加氨苄青霉素、添加氨苄青霉素和 IPTG-X-gal + LBA⁺ 平板上,通过计数即可测得该代数的质粒稳定性^[12]。

2 结果

2.1 *C. boidinii* 甲酸脱氢酶 (FDH) 基因的获取及表达载体的构建

2.1.1 *fdh* 基因的获取:以 *C. boidinii* 基因组为模

板 PCR 扩增 *fdh* 基因。琼脂糖电泳得到约 1.1kb 的特异条带,经酶切电泳分析初步鉴定该条带为 *fdh* 基因。

2.1.2 中间载体 pMD18-T Simple-*fdh* 的构建和鉴定:用 *EcoR* I / *Bam*H I 对构建的载体 pMD18-T Simple-*fdh* 进行酶切,结果表明,该质粒被消化为 2.7kb 和 1.1kb 片段,与预期一致。

2.1.3 表达载体 pMALTM-p2X-*fdh* 的构建和鉴定:如 1.4 小节所述,构建了质粒 pMALTM-p2X-*fdh*, 用 *EcoR* I / *Bam*H I 酶切分析,结果表明,除具有与质粒 pMALTM-p2X 酶切结果一致的 6.7kb 片段外,还具有 1.1kb 条带,与预期结果相符。

2.1.4 *fdh* 基因的序列分析:取克隆于 pMD18-T Simple 中含 *fdh* 基因的重组质粒 pMD18-T Simple-*fdh* 利用 pMD18-T Simple 上下游通用引物测定重组质粒中外源片段的序列,双向测序后拼接得到 1095bp 核苷酸序列。该序列与已报导的 *C. boidinii* *fdh* (AF004096) 核苷酸序列的相似性为 92%, 氨基酸序列的同源性为 96%, 已提交 GenBank, 序列号为 DQ458777。

2.2 FDH 表达重组菌的构建及鉴定

2.2.1 重组菌的菌落 PCR 鉴定:从蓝白斑平板上随机挑取 4 个白斑单菌落、1 个蓝斑单菌落进行菌落 PCR 鉴定结果,与对照相比,所选取的 4 个单菌落的 PCR 均扩增出 1.1kb 目的片段,即这些菌株均呈现阳性,而蓝斑菌株呈现阴性。重组菌命名为 *K. pneumoniae* F-1。

2.2.2 FDH 蛋白诱导表达:经 SDS-PAGE 分析, 0.5 ~ 1.0mmol/L IPTG 都能诱导 FDH 蛋白表达。图 1 为 YMU2 和 F-1 的总蛋白 SDS-PAGE 凝胶成像结果。

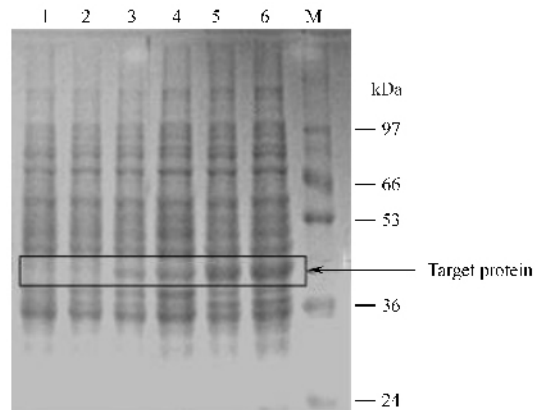


图 1 IPTG 诱导 F-1 基因表达

Fig. 1 *K. pneumoniae* F-1 gene expression induced by IPTG. 1 and 2. Control sample of YMU2 at 4h 3 and 4. Non-induced *K. pneumoniae*

由图可见, 重组菌 F-1 经 IPTG 诱导后, 在 40.2kDa 处 FDH 表达明显增多; 未经 IPTG 诱导的重组菌, FDH 亦有一定量表达; 而出发菌株 YMU2 未出现 40.2kDa 的特异性条带。通过分析软件 ImageMaster TotalLab 1.0 对图像 FDH 蛋白表达情况进行半定量分析, 在 0.5mmol/L IPTG 诱导 4h 后, 重组菌的 FDH 表达量是未经诱导的 2~3 倍。

2.2.3 FDH 酶活测定: 发酵实验是在德国 B. Braun 公司 Biostat 生产的 5L 发酵罐中进行。装液量 3.0L, 接种量 5%, 培养温度 35°C, 转速 400r/min, pH7.0。厌氧培养阶段通入普通氮气(纯度 99.9%) 维持厌氧, 通气量 0.5~1VVM。上罐发酵时, F-1 在 3h 加入 0.5mmol/L IPTG, 而后在 12h 加入 50mmol/L 甲酸钠, 45h、52.25h 分别加入 25mmol/L 甲酸钠。出发菌株 YMU2 作为对照, 培养过程不添加 IPTG 和甲酸钠, 其他培养条件与重组菌 F-1 相同。

在 YMU2 和 F-1 的培养实验中, 测定了不同培养时间的菌体破碎液中总蛋白的 FDH 酶活(图 2)。出发菌株 YMU2 中测得比酶活很低, 而甲酸脱氢酶表达的重组菌 F-1 中比酶活明显提高, 达到 5.47U/mg protein, 说明 FDH 的确在重组菌中得到了表达。

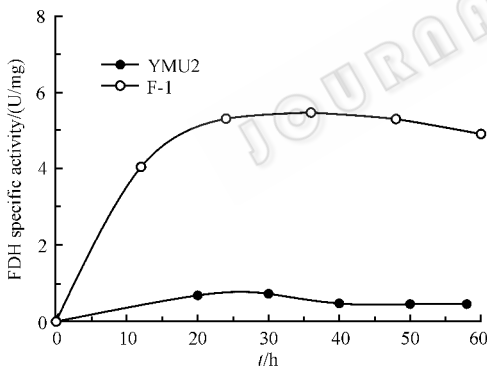


图 2 重组菌 F-1 的 FDH 比酶活

Fig.2 FDH specific activity of recombinant F-1.

2.2.4 重组菌 F-1 质粒稳定性研究: 重组菌 F-1 在 LB 培养基和添加氨苄青霉素选择压力的条件下, 以

表 2 重组菌 F-1 的 pMAL™-p2X-fdh 质粒稳定性

Table 2 The pMAL™-p2X-fdh plasmid stability of *K. pneumoniae* F-1

Generations	LB	LBA ⁺	IPTG-X-gal + LBA ⁺ *
20	100	100	100
40	100	100	100
60	100	100	100
80	100	100	94
100	100	100	97

* The number of white colonies counted on the IPTG-X-gal + LBA⁺ plate, i. e. the number of positive colonies whose plasmid were not lost.

及 LB 培养基中同时添加氨苄青霉素和 IPTG-X-gal 的条件下, 连续转种 5 次, 统计重组菌 F-1 的菌落数(表 2)。F-1 的质粒稳定性良好, 在前 80 代保持了 100% 的稳定性, 从 80 代开始 IPTG-X-gal + LBA⁺ 平板结果显示质粒稳定性略微下降, 但是仍然保持在较高的水平。可以证明, 重组菌 F-1 具有良好的质粒稳定性。

2.3 重组菌和出发菌株产 1,3-PD 的比较

上罐发酵实验如图 3 所示, 发酵罐和发酵条件同 2.2.3 小节。发酵前期, YMU2 的 1,3-PD 合成略高于 F-1, 但发酵 30h 后, 原始菌株 YMU2 的 1,3-PD 合成速率下降, 而重组菌 F-1 仍能较快速的合成 1,3-PD, 50h 后合成 1,3-PD 的速率减缓。经过 59h 的厌氧发酵, 重组菌 F-1 的 1,3-PD 合成浓度达到了 78.6g/L, 比 YMU2 的最高浓度(69.8g/L)提高了 12.5%。以上结果表明, 甲酸脱氢酶在 *K. pneumoniae* 中的表达显著地促进了菌体合成 1,3-PD 的产量。

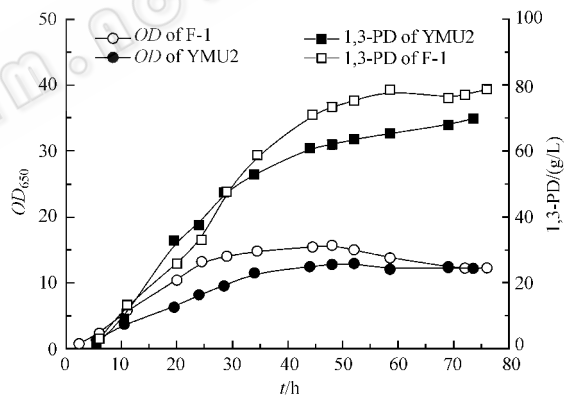


图 3 重组菌 F-1 与 YMU2 的菌体生长及 1,3-PD 合成曲线

Fig.3 Cell growth and 1,3-PD concentration of F-1 and YMU2.

3 结论

本文从 *K. pneumoniae* 厌氧代谢网络的特点出发, 以提高还原型辅酶 NADH 的有效供给为研究目标, 首次在 1,3-PD 生产菌株 *K. pneumoniae* 中构建了 NADH 再生系统, 以实现 NADH 的胞内再生, 从而对甘油厌氧代谢过程进行调控。从 *C. bovidii* 基因组中获取了具有 NADH 再生功能的甲酸脱氢酶基因 *fdh*, 利用分子生物学方法构建了中间载体 pMD18-T Simple-*fdh* 和表达载体 pMAL™-p2X-*fdh*, 分别经 DNA 测序、酶切电泳分析, 及菌落 PCR 鉴定、蛋白诱导表达、FDH 酶活测定, 从 FDH 的基因水平和酶活水平上都证实了甲酸脱氢酶在 *K. pneumoniae* 的表达是成功的。同时, 对重组质粒 pMAL™-p2X-*fdh* 的

稳定性在 LBA⁺、IPTG-X-gal + LBA⁺ 平板上同时进行验证,结果表明重组质粒具有良好的稳定性。通过上罐发酵实验,菌株 F-1 在提高 1,3-PD 合成浓度方面显示出明显的优势,F-1 菌株的 1,3-PD 合成浓度达到 78.6g/L,比出发菌株 YMU2 提高了 12.5%。

参 考 文 献

- [1] Biebl H, Menzel K, Zeng AP, et al. Microbial production of 1,3-Propanediol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **52**(3): 289–297.
- [2] Zeng AP, Biebl H. Bulk Chemicals from Biotechnology: The Case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 2002, **74**: 239–259.
- [3] 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. *Biotechnol Bioeng*, 1998, **59**(5): 544–552.
- [4] Andreas L, Murillo VF. Production of fine chemicals using biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**(6): 595–603.
- [5] Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. Metabolic engineering of

Escherichia coli: Increase of NADH availability by overexpressing an NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. *Metabolic Engineering*, 2002, **4**(3): 217–229.

- [6] Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. The effect of increasing NADH availability on the redistribution of metabolic fluxes in *Escherichia coli* chemostat cultures. *Metabolic Engineering*, 2002, **4**(3): 230–237.
- [7] Sakai Y, Murdanoto AP, Konishi T, et al. Regulation of the formate dehydrogenase gene, *FDH1*, in the methylotrophic yeast *Candida boidinii* and growth characteristics of an *FDH1*-disrupted strain on methanol, methylamine, and choline. *J Bacteriol*, 1997, **179**(14): 4480–4485.
- [8] Sambrook J, Russell DW. 分子克隆实验指南. 黄培堂等译. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [9] 张延平, 杜晨宇, 饶治, 等. 维生素 C 和 E 对 *Klebsiella pneumoniae* 合成 1,3-丙二醇的调控. *过程工程学报*, 2005, **5**(2): 197–200.
- [10] Schutte H, Flossdorf J, Sahn H, et al. Purification and properties of formaldehyde dehydrogenase and formate dehydrogenase from *Candida boidinii*. *Eur J Biochem*, 1976, **62**(1): 151–160.
- [11] 余冰宾. 生物化学实验指南. 北京: 清华大学出版社, 2004.
- [12] 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.

Expression and characterization of formate dehydrogenase gene in *Klebsiella pneumoniae*

HUANG Zhi-hua^{1,2}, ZHANG Yan-ping¹, LIU Ming¹, WANG Bao-guang¹, CAO Zhu-an^{1*}

(¹ Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

(² Department of Chemistry and Biology Engineering, Sanming College, Sanming 365004, China)

Abstract: Glycerol can be converted to 1,3-propanediol by the anaerobic fermentation of *Klebsiella pneumoniae*, during which reducing equivalent NADH was consumed. Therefore, the availability of NADH would be critical for the yield of 1,3-propanediol. In this paper, formate/formate dehydrogenase system was used for the regeneration of *in vivo* NADH and the improvement of 1,3-propanediol production. Formate Dehydrogenase gene (*fdh*) was amplified from *Candida boidinii* genome by PCR and the purified PCR product was inserted into the vector pMD18-T Simple to construct plasmid pMD18-T Simple-*fdh*, which was transformed into *Escherichia coli* DH5 α and recombinants were selected by blue-white selection. From the transformant the *fdh* gene was separated and inserted into pMALTM-p2X to construct expression vector pMALTM-p2X-*fdh*, which was transformed into *Klebsiella pneumoniae* YMU2 and a recombinant strain *Klebsiella pneumoniae* F-1 was obtained. The plasmid stability of strain F-1 and the conditions of *fdh* expression induced by IPTG were studied. It was demonstrated that the plasmid had good stability, and 0.5mmol/L IPTG would induce the expression of protein encoded by *fdh* gene with the molecular weight of 40.2kDa. The enzyme activity reached 5.47U/mg crude protein when *K. pneumoniae* F-1 was induced for 4h by 0.5mmol/L IPTG. Compared with that of the parent strain *K. pneumoniae* YMU2, the yield of 1,3-propanediol of recombinant strain F-1 increased by 12.5% in the anaerobic bioreactor.

Keywords: *Candida boidinii*; Formate dehydrogenase; *Klebsiella pneumoniae*; NADH; 1,3-Propanediol