

同源过表达 *fnr*、*pncB* 和 *fdhF* 对克雷伯菌产氢代谢的影响

王姝玉, 王俊, 徐莉, 皮健, 张后今, 闫云君

华中科技大学生命科学与技术学院 分子生物物理教育部重点实验室, 湖北 武汉 430074

王姝玉, 王俊, 徐莉, 等. 同源过表达 *fnr*、*pncB* 和 *fdhF* 对克雷伯菌产氢代谢的影响. 生物工程学报, 2013, 29(9): 1278-1289.

Wang SY, Wang J, Xu L, et al. Enhanced biohydrogen production by homologous over-expression of *fnr*, *pncB*, *fdhF* in *Klebsiella* sp. HQ-3. Chin J Biotech, 2013, 29(9): 1278-1289.

摘要: 利用代谢工程手段改造克雷伯菌 *Klebsiella* sp. HQ-3 产氢途径中相关代谢调控因子及辅酶因子, 以构建高效产氢工程菌。利用简并引物, 以 *Klebsiella* sp. 总 DNA 为模板, 克隆了甲酸-氢裂解酶系统的全局转录调控因子 (FNR) *fnr* 基因、编码甲酸脱氢酶 (FDH-H) *fdhF* 基因, 以及 NADH 途径中编码烟酰胺转磷酸核糖激酶 (NAPRTase) 的 *pncB* 基因, 构建了 3 种同源过表达重组菌株 HQ-3-*fnr*、HQ-3-*fdhF* 和 HQ-3-*pncB*, 以研究同源过表达产氢代谢调控因子及辅酶因子对克雷伯菌累积产氢、细胞生长、代谢终产物的影响。结果表明, 过表达 *fnr*、*pncB* 和 *fdhF* 基因的克雷伯工程菌的产氢效率比携带空载体的克雷伯对照菌株分别提高 12.26%、11.62% 和 7.28%; 重组菌 HQ-3-*fnr*、HQ-3-*fdhF* 和 HQ-3-*pncB* 的葡萄糖利用率较克雷伯对照菌株 HQ-3-C 明显增加, 过表达 *fnr*、*fdhF* 基因使代谢合成甲酸量增多; 过表达 *pncB* 基因能促进 NADH 合成, 使更多的 NADH 流入消耗 NADH 较多的乙醇与琥珀酸代谢路径, 使得乙醇和琥珀酸含量增加, 而乳酸含量降低。

关键词: 克雷伯菌 HQ-3, 代谢调控, 同源表达, 厌氧发酵产氢, 代谢终产物

Received: February 21, 2013; **Accepted:** April 28, 2013

Supported by: Fundamental Research Funds for the Central Universities HUST (No. 2010MS029).

Corresponding author: Li Xu. Tel/Fax: +86-27-87792214; E-mail: xuli@hust.edu.cn;

Yunjun Yan. Tel/Fax: +86-27-87792213; E-mail: yanyunjun@hust.edu.cn

中央高校基本科研业务费专项资金 (No. 2010MS029) 资助。

网络出版时间: 2013-06-21

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130621.1431.001.html>

Enhanced biohydrogen production by homologous over-expression of *fnr*, *pncB*, *fdhF* in *Klebsiella* sp. HQ-3

Shuyu Wang, Jun Wang, Li Xu, Jian Pi, Houjin Zhang, and Yunjun Yan

Key Laboratory of Molecular Bio-physics, College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China

Abstract: To enhance biohydrogen production of *Klebsiella* sp. HQ-3, the global transcriptional factor (Fnr), formate dehydrogenase H (FDH_H) and the *pncB* gene encoding the nicotinic acid phosphoribosyltransferase (NAPRTase) were for the first time over-expressed in *Klebsiella* sp. HQ-3. The *fnr*, *fdhF*, *pncB* genes were cloned from the genomic DNA of *Klebsiella* sp. HQ-3 by 3 pairs of universal primers, and introduced into the corresponding sites of the modified pET28a-Pkan, resulting in the plasmids pET28a-Pkan-*fnr*, pET28a-Pkan-*fdhF* and pET28a-Pkan-*pncB*. The 4 plasmids were then electroported into wild *Klebsiella* sp. HQ-3 to create HQ-3-*fnr*, HQ-3-*fdhF*, HQ-3-*pncB* and HQ-3-C, respectively. Hydrogen production was measured using a gas chromatograph and the metabolites were analyzed with a high-performance liquid chromatograph (HPLC). The results indicate that over-expression of *fnr*, *fdhF* and *pncB* significantly enhanced hydrogen production in the three recombinant strains. Hydrogen production per mol glucose for HQ-3 *fnr*, HQ-3 *pncB*, HQ-3 *fdhF* was 1.113, 1.106 and 1.063 mol of hydrogen/mol glucose, which was respectively increased by 12.26%, 11.62% and 7.28% compared with that of the control strain HQ-3-C (0.991 mol of hydrogen/mol glucose). Moreover, the analysis of HPLC showed that the concentrations of formate and lactate were markedly decreased, but succinate remained unchanged in culture media compared with those of the control strain HQ-3-C.

Keywords: *Klebsiella* sp. HQ-3, metabolic regulatory, homologous expression, anaerobic fermentation biohydrogen production, metabolic end-products

随着能源问题的日益突出,厌氧发酵制氢已成为当前能源领域的研究热点。研究表明,通过分析产氢微生物的代谢网络,调控其代谢途径,构建高效产氢菌^[1-4],已成为提高产氢微生物产氢能力的有效途径^[5-7]。

克雷伯菌具有较大产氢潜力,易于培养,底物适应性强,受到研究者的广泛关注^[8-10]。其厌氧发酵存在两种产氢途径:一种是甲酸裂解产氢,由甲酸氢裂解酶 (Formate hydrogen lyase, FHL) 系统催化甲酸裂解产生氢气;另一种是 NADH 途径,微生物直接利用细胞内过剩的还原力产生氢气^[3,11]。FHL 系统是由甲酸脱氢酶 (FDH-H), 氢酶 (Hyd-3) 和电子传递链组成^[12]。

fdhF 基因只有在厌氧发酵条件下才合成 FDH-H 大亚基,过量表达能促进 FDH-H 大亚基的合成,从而促进甲酸裂解生成氢气^[12]。同时,*fnr* 基因编码的产氢厌氧代谢全局转录调控因子 FNR (延胡索酸和硝酸盐还原反应调控蛋白) 是一个介导氧对基因调控的蛋白因子。FNR 蛋白是在厌氧条件下生长有关的蛋白,它不仅抑制了一些好氧条件下的基因表达,而且激活有利于厌氧生长的基因表达。在厌氧条件下,FNR 蛋白能同时正向调控丙酮酸脱羧途径和甲酸氢裂解途径产氢^[13-15]。在已有的大肠杆菌厌氧发酵产氢研究中,过表达 *fnr* 基因明显提高氢气产氢,表明丙酮酸和甲酸的厌氧代谢能正向调

控提高产氢通量^[16]。Fan 等^[16]研究了 FNR 等正向转录调控因子在大肠杆菌中的过表达, 发现过表达 *fnr* 基因的重组菌产氢量比野生菌提高 5.5 倍。

NADH/NAD⁺是重要的辅因子, 在微生物细胞内参与了 300 多个氧化还原反应^[4]。利用辅因子工程调控微生物细胞内 NADH/NAD⁺代谢, 不仅可有效调节微生物细胞的生长, 而且还会影响

微生物的代谢流^[17]。Berrios-Rivera 将博伊丁假丝酵母 *Candida boidinii* 中依赖 NAD 的甲酸脱氢酶在大肠杆菌 *Escherichia coli* 中进行了异源表达, NADH 生成效率得到了明显提高^[18]。纯厌氧条件下, 过量表达 *pncB* 基因促进 NAD(H) 总量的生成, 更多的生成 NAD; 而 NAD 的增加, 加速了葡萄糖的氧化, 从而生成 NADH^[19]。NADH 合成过程如图 1 所示。

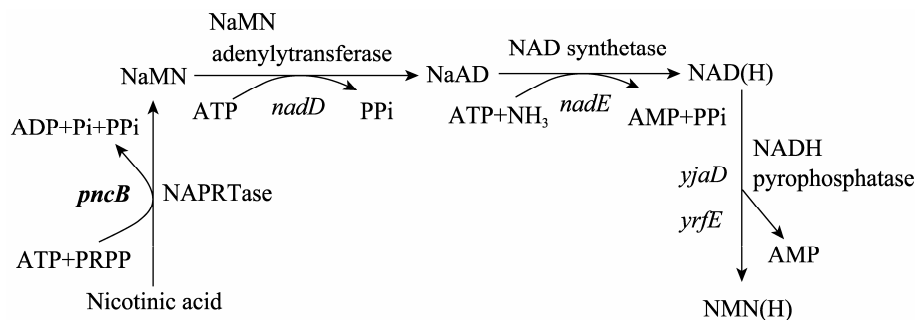


图 1 NAD(H) 合成过程^[3]

Fig. 1 Process of NAD(H) synthesis^[3].

pncB 基因所表达的烟酸转磷酸核糖激酶 (NAPRTase) 为合成 NAD(H) 过程的关键酶, 过表达能改变微生物细胞内的氧化还原水平, 并能促进依赖 NADH 的相关代谢产物的合成^[11]。Heuser 等^[3]在 *E. coli* 中同时过量表达 *pncB* 基因和 NAD 合成酶基因 *nadE*, 导致胞内 NAD(H) 总量增加 7 倍, NADP(H) 总量增加 2 倍。

但截至目前, 在克雷伯菌中未见有相关研究的报道。为此, 本研究以实验室筛选到的克雷伯菌 *Klebsiella sp. HQ-3* 为对象, 利用简并引物克隆了克雷伯菌厌氧发酵产氢代谢途径的多种转录调控因子, 并首次实现同源过表达, 以研究其对克雷伯菌厌氧发酵产氢效率、细胞生长及代谢终产物的影响。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

产氢菌克雷伯氏菌 (*Klebsiella sp. HQ-3*) 由本实验室筛选保存, *E. coli* Top10 (F⁻, Δ lacX74, Δ (ara-leu), *rpsL* (StrR)) 由本实验室保藏, 克隆载体 pMD18-T 购自 TaKaRa 公司, 质粒 pET-28a(+) 购自 Novagen 公司, 并以卡那霉素 (kanamycin, Kan) 启动子代替 pET-28a(+) 中的 T7 启动子, 构建适于克雷伯菌同源表达外源基因的载体 pET28a-Pkan。

1.2 主要试剂、培养基及仪器

Taq DNA 聚合酶和 dNTP Mixture 购自 Fermentas 公司; 限制性内切酶 *Hind* III、*Sac* I、

EcoR I, DNA Ligation Kit Ver. 2.0 均购自 TaKaRa 公司; Plasmid Mini Kit I 和 Gel Extraction Kit 购自 Omega 公司; 酸洗玻璃珠购自 Sigma 公司产品; 酵母提取物和蛋白胨为 Oxoid 公司产品; 琼脂糖为 GENE 公司产品; DNA Marker DS5000 购自广东东盛生物有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。所用引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

葡萄糖发酵产氢培养基 (L): 葡萄糖 15.0 g, 酵母提取物 2.0 g, 胰蛋白胨 5.0 g, NaCl 2.0 g, K₂HPO₄ 1.5 g, MgCl₂·6H₂O 0.6 g, FeSO₄·7H₂O 0.2 g, 微量元素液 10 mL, 115 °C 高压蒸汽灭菌 25 min。使用前加入过滤除菌的生物素溶液 10 mL。

电转仪 617BR1-06510 购于 Bio-Rad pulse Xcel; 气相色谱仪 GC-9750 购买于温岭福立分析

仪器有限公司; 高效液相色谱仪采用 SSI 2300-525, 购买于美国 SSI 公司。

1.3 克雷伯野生菌 HQ-3 的 *fnr*、*pncB*、*fdhF* 基因扩增

在 GenBank 中检索肺炎克雷伯菌 *K. pneumoniae* 342、大肠杆菌 *E. coli* k-12、产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes* KCTC2190、阴沟肠杆菌 *E. cloacae*、鼠类柠檬酸杆菌 *Citrobacter rodentium* 的产氢厌氧代谢的全局转录调控因子 FNR 编码基因 *fnr*, 设计简并引物 *fnr1*/*fnr2*。同样, 根据 GenBank 中的烟酸转磷酸核糖激酶 (NAPRTase) 编码基因 *pncB* 序列、甲酸脱氢酶 FDH-H 编码基因 *fdhF* 序列分别设计简并引物 *pncB1*/*pncB2* 和 *fdhF1*/*fdhF2*。引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成, 序列见表 1。

表 1 本实验所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')	Size (bp)
<i>fnr1</i>	ATGATCCCKGARAAGCGAATTAT	23
<i>fnr2</i>	TTARGCRACGTTTRCGSG	17
<i>pncB1</i>	ATGACACWATTTCRCTTCYCCKGT	23
<i>pncB2</i>	TTARCTSGCYTTTTTMMAYC	19
<i>fdhF1</i>	ATGATGAATGCCATYA	16
<i>fdhF2</i>	TYAHCCYAWYGCGCTTTC	18
<i>fnr</i> -F	GGCGAGCTCATGATCCCTGAGAAGCGAAT	29
<i>fnr</i> -R	CCCAAGCTTTTAAGCGACGTTGCGGGCC	28
<i>pncB</i> -F	GGCGAGCTCATGACACAATTCACCTTCTCCTG	31
<i>pncB</i> -R	CCCAAGCTTTTAGCTGGCCTTTTAAATCGG	30
<i>fdhF</i> -F	CCGGAATTCATGAGTAATGCCATCACAGAG	30
<i>fdhF</i> -R	CCCAAGCTTTTAACCCATCGCGCTTTCG	28

The introduced restriction sites are underlined.

以 *Klebsiella* sp. 总 DNA 为模板, PCR 扩增基因 *fnr*、*pncB*、*fdhF*。产物回收后连接 pMD18-T 载体, 转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 以 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 平板筛选阳性克隆子。酶切验证, 送上海生工测序, 重组质粒分别命名为 pMD-*fnr*、pMD-*pncB* 和 pMD-*fdhF*。

1.4 重组质粒的构建

pMD-*fnr*、pMD-*pncB* 和 pMD-*fdhF* 经双酶切, 与同样酶切的表达载体 pET28a-Pkan 连接, 产物转化 *E. coli* Top10 感受态细胞, 涂布于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的 LB 平板培养过夜, 菌落 PCR 及 DNA 序列测序验证, 得到重组质粒 pET28a-Pkan-*fnr*、pET28a-Pkan-*pncB*、pET28a-Pkan-*fdhF*。表达载体构建流程如图 2。将表达质

粒 pET28a-Pkan-*fnr*、pET28a-Pkan-*pncB*、pET28a-Pkan-*fdhF* 及空载质粒 pET28a-Pkan 分别电转化 *Klebsiella* sp. HQ-3 感受态细胞, 以卡那霉素平板筛选阳性重组子, 菌落 PCR 及双酶切验证, 获得相应的基因工程菌。

1.5 重组克雷伯菌批次发酵

将 3 种重组菌株和对照菌株分别接种于 LB 培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养 12 h 后, 按 20% (V/V) 的比例接种于含 70 mL 产氢培养基的 150 mL 锥形瓶中, 用盐水塞封口后, 持续通纯氮气 10 min, 以排尽氧气。将加有同种型号转子的锥形瓶放入恒温水浴磁力搅拌器中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养, 采用带有精确刻度的集气装置, 利用排水法每隔 2 h 收集一次气体, 直至产氢完全终止。每组设置 3 个平行, 每样重复 3 次。

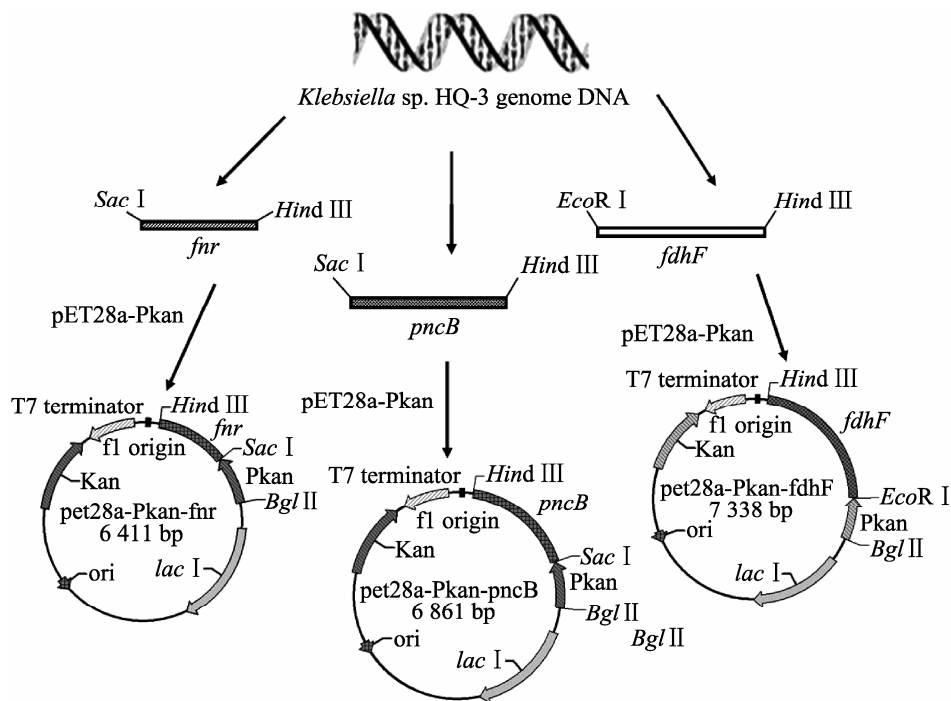


图 2 表达载体构建图谱

Fig. 2 Schematic illustration of pET28a-Pkan expression vector construction.

1.6 SDS-PAGE 电泳检测

将发酵液以 8 000 r/min 离心 2 min, 收集菌体, 加入 5 mL PBS 缓冲液, 振荡重悬并置于冰浴中, 超声破碎, 4 °C、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液与同体积的 2×SDS 凝胶上样缓冲液混匀, 沸水水浴 5 min, 用于 SDS-PAGE 电泳分析。

1.7 发酵及代谢产物分析

细胞生长以 OD_{600} 吸光值表示。对数期的种子以 1% (V/V) 浓度接种于 LB 液体培养基中, 37 °C 恒温培养, 每隔 2 h 取出菌液测定 OD_{600} , 延续 14 h, 绘制生长曲线, 比较对照菌株与工程菌株的生长特性。产氢发酵液中的还原糖含量以 3,5-二硝基水杨酸法 (DNS) 测定^[20]; 发酵液 pH 以 pH 计测定。

利用 GC-9750 型气相色谱仪测定发酵气体中氢气含量。氮气作载气, 流速为 55 mL/min, 色谱柱填料为 carboxen-1004, 80~100 目, 担子为 13 X 分子筛, 柱长 2 m, TCD 检测器, 进样器、柱温和检测器分别为 70 °C、50 °C、80 °C, 六通阀为 1 mL 定量管。外标法测定氢气含量。

将发酵液 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液, 0.45 μm 的滤膜过滤, 以 SSI2300-525 高效液相色谱法 (HPLC) 检测发酵液中代谢产物甲酸、乙酸、乳酸、琥珀酸、2,3-丁二醇等的含量。分析条件为: 色谱柱为阿波罗 C18 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 20 mmol/L KH_2PO_4 , pH 2.3, 流速 0.5 mL/min, 紫外检测波长为 210 nm, 进样量为 5 μL 。

2 结果与分析

2.1 基因的 PCR 扩增及序列测定

以 *Klebsiella* sp. HQ-3 基因组 DNA 为模板,

扩增得到的目的基因片段大小分别约 750 bp、1 700 bp 和 1 200 bp, 与预期相符。DNA 测序分析表明, 成功克隆到 *Klebsiella* sp. HQ-3 中 *fnr*、*fdhF*、*pncB* 全长基因, 其开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF) 全长分别为 753 bp、1 680 bp 和 1 203 bp。3 条基因序列在 GenBank 上注册的登录号分别为 Accession No. KC183718, Accession No. KC183719 和 Accession No. KC183717。

2.2 重组质粒的构建与验证

以重组菌中的表达质粒为模板, 进行 PCR 验证, 扩增产物大小与预期值相符 (图 3A)。以 *Sac* I / *Hind* III 双酶切验证, pET28a-Pkan-*fnr* 和 pET28a-Pkan-*pncB* 构建成功。*Eco*R I / *Hind* III 双酶切表明 pET28a-Pkan-*fdhF* 构建成功 (图 3B)。重组菌株分别命名为 HQ-3-*fnr*, HQ-3-*pncB*, HQ-3-*fdhF* 及对照菌株 HQ-3-C。

2.3 *fnr*、*pncB* 和 *fdhF* 基因在克雷伯菌中过表达

重组菌株经细胞破碎、离心, 取等量上清进行 SDS-PAGE 电泳分析, 以克雷伯菌 HQ-3-C 作对照 (图 4)。*fnr*、*pncB* 和 *fdhF* 基因所表达的蛋白量较对照有增加, 大小一致, 表明 *fnr*、*pncB* 和 *fdhF* 基因均在 *Klebsiella* sp. HQ-3 中实现了过表达。

2.4 重组菌批次发酵性能分析

在 14 h 批次厌氧产氢发酵中, 培养基 pH 值随发酵时间逐渐降低, 如图 5 所示。由于在产氢过程中同时伴有代谢产物有机酸的生成, 但重组菌培养基 pH 值降低较对照菌株慢。发酵终止后, 发酵液的最初 pH 维持在 4.7 左右。

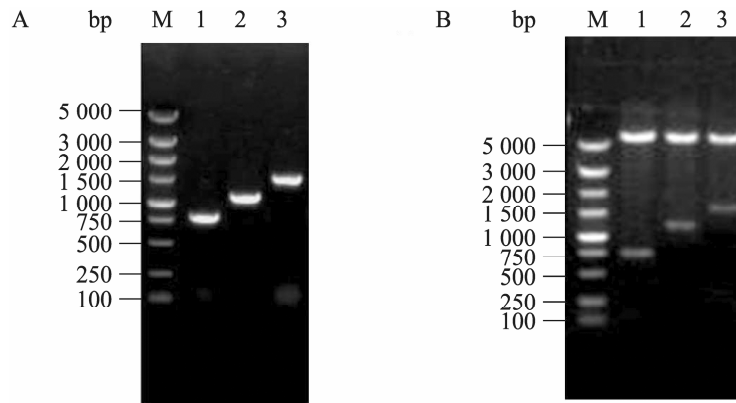


图3 重组质粒的验证

Fig. 3 Confirmation of recombinant plasmids. (A) PCR amplification verification. M: DNA marker (DS 5 000); 1: PCR product of pET28-pkan-*fnr* from HQ-3-*fnr*; 2: PCR product of pET28-pkan-*pncB* from HQ-3-*pncB*; 3: PCR product of pET28-pkan-*fdhF* from HQ-3-*fdhF*. (B) Restriction analysis of recombinant plasmids. M: DNA marker (DS 5 000); 1: *Sac* I /*Hind* III digestion verification of pET28-pkan-*fnr* vector from HQ-3-*fnr*; 2: *Sac* I /*Hind* III digestion verification of pET28-pkan-*pncB* vector from HQ-3-*pncB*; 3: *Eco*R I /*Hind* III digestion verification of pET28-pkan-*fdhF* vector from HQ-3-*fdhF*.

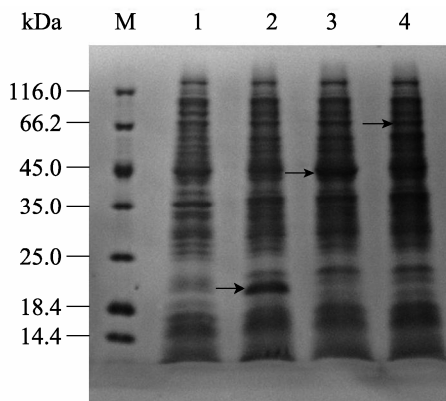


图4 *fnr*、*pncB*、*fdhF* 基因在克雷伯氏菌中表达的 SDS-PAGE 电泳分析

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of the expression of *fnr*, *pncB*, *fdhF* gene in *Klebsiella* sp. HQ-3. M: protein marker; 1: supernatant fluid of cell lysate from HQ-3-C; 2: supernatant fluid of cell lysate from HQ-3-*fnr*; 3: supernatant fluid of cell lysate from HQ-3-*pncB*; 4: supernatant fluid of cell lysate from HQ-3-*fdhF*.

各菌株的生长曲线见图6。重组菌株的生长比对照菌株略有减慢，但整体差别并不显著。可

能是由于尽管因代谢因子的过表达导致菌株代谢网络发生了一些改变，但该代谢支路在菌体生长代谢中并非起主导作用，因此对重组菌的生长影响有限。

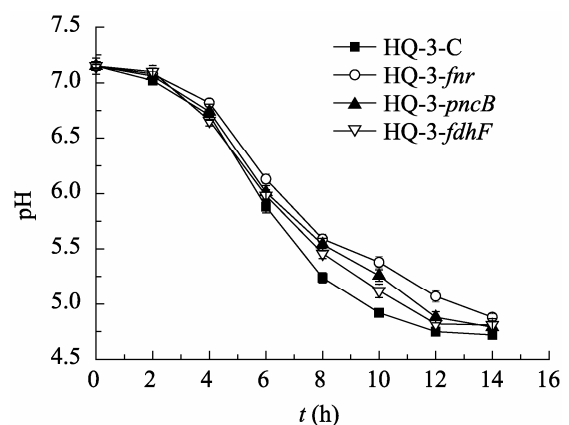


图5 对照菌株与重组菌株随时间的 pH 变化比较
Fig. 5 Comparison of time course of pH between HQ-3-C and the recombinants.

在厌氧批次发酵中,菌株随发酵时间的累积产氢量如图 7 所示。可以看出,随着发酵时间的延长,累积产氢量也在不断增加。在发酵初期的 6 h 内,工程菌的产氢量与对照菌株无显著差别。对照菌株在 8 h 后累积产氢量趋于稳定,而工程菌在后期仍有较高的发酵产氢能力,12 h 后累积产氢量才开始趋于稳定。3 株工程菌的产氢量较对照菌株 HQ-3-C 相比均有不同幅度的提高。其

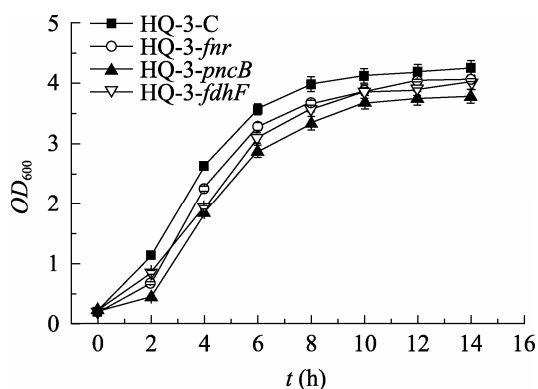


图 6 对照菌株与重组菌株随时间的细胞生长过程比较

Fig. 6 Comparison of time course of cell growth (in term of OD_{600}) between HQ-3-C and the recombinants.

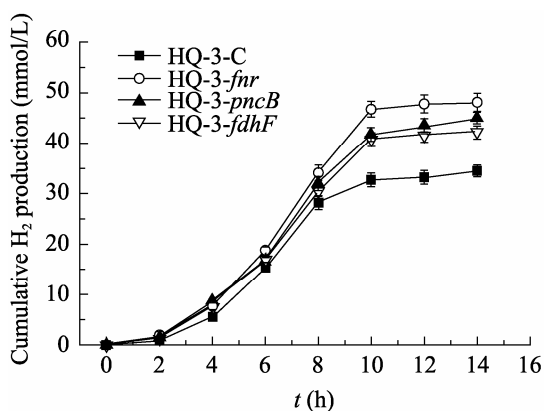


图 7 对照菌株与重组菌株随时间的累积产氢量比较

Fig. 7 Comparison of time course of cumulative H_2 production between HQ-3-C and the recombinants.

中工程菌 HQ-3-*fnr* 的累积产氢量最大,达 58.1 mmol/L。

2.5 代谢产物分析

克雷伯菌葡萄糖厌氧发酵代谢见图 8。以高效液相色谱分别检测了对照菌株及重组菌株摇瓶培养的发酵液组分,以 DNS 法测定还原糖消耗量。表 2 显示了发酵 14 h 后工程菌株和对照菌株培养基中剩余葡萄糖量及各代谢终产物的浓度。从中可以看出,3 种工程菌株的葡萄糖消耗能力均高于对照菌株, HQ-3-*fnr* 具有最高的葡萄糖利用效率,较对照菌株高出 21.7%。

同样,细胞外代谢终产物也有较大变化。葡萄糖厌氧发酵过程中,产生的甲酸量等于乙酸生成量与乙醇生成量之和。通过表 2 中代谢产物的分析可知,工程菌 HQ-3-*fnr* 与 HQ-3-*fdhF* 在代谢过程中产生的甲酸量明显高于对照菌株,这是因为 *fnr*、*fdhF* 基因过表达促进了甲酸裂解产生氢气,与此同时,也促进了上游丙酮酸向甲酸的转化,从而表观上甲酸量增加。而工程菌发酵液中甲酸的最终含量减少,说明工程菌消耗了较多甲酸生成氢气,这也与实验中工程菌氢气产量增多相一致。

同时可以看出, HQ-3-*pncB* 发酵液中乙醇和琥珀酸含量有增加,而乳酸的含量减少。*pncB* 基因过表达使 NAD(H) 总量明显增加,而 NADH/NAD⁺ 比例下降,进而使细胞代谢流重新分配^[3,22-23]。在整个发酵过程中,代谢流向着消耗 NADH 较多的途径,乙醇和琥珀酸的合成均需要消耗 2 mol NADH,而乳酸合成仅消耗 1 mol NADH。因此,本研究所使用的策略,在促进了产氢的同时,使代谢更偏于合成乙醇和琥珀酸方向。

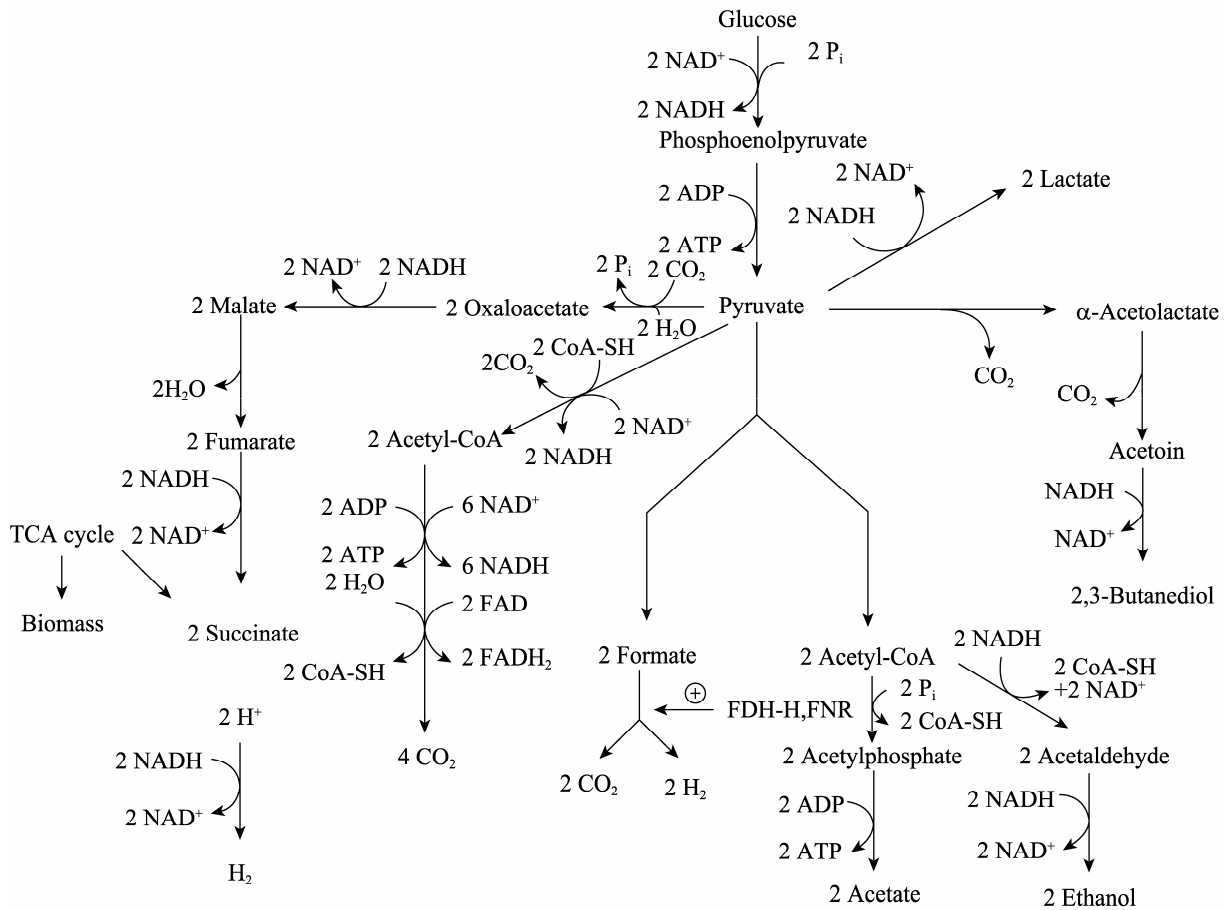


图 8 克雷伯菌葡萄糖厌氧发酵代谢过程^[21]

Fig. 8 Anaerobic fermentation metabolic process of glucose in *Klebsiella* sp. HQ-3^[21].

2.6 重组克雷伯氏菌产氢特性的测定

厌氧代谢产氢过程中,总产氢量由所消耗的葡萄糖转化而来。表 2 表明同源表达 *fur*、*fdhF* 与 *pncB* 基因的工程菌葡萄糖消耗量比对照菌株均有明显增加。研究认为,总产氢量是由甲酸裂解途径产氢与 NADH 途径产氢的总和^[24]。图 9 显示出对照菌株与重组工程菌株厌氧发酵总产氢量,甲酸裂解途径产氢量及 NADH 途径产氢量之间的关系。从中可以看出,工程菌株 HQ-3-*fur*、HQ-3-*pncB* 和 HQ-3-*fdhF* 总产氢量较对照菌株

均有所提高,每 mol 葡萄糖中累积产氢量由 0.991 mol 分别提高到 1.113 mol、1.106 mol、1.063 mol,分别提高了 12.26%、11.62% 和 7.28%。

同样,工程菌株中由甲酸裂解途径产生的氢气量较对照菌株也有明显增加,因为 *fur* 基因正向调控甲酸裂解产氢,而 *fdhF* 基因编码的甲酸脱氢酶则是作为甲酸氢裂解酶系统 FHL 的重要组分影响着甲酸裂解产氢代谢过程。*pncB* 基因编码烟酸转磷酸核糖激酶能促进 NADH 途径中

表 2 对照菌株与工程菌株葡萄糖消耗及代谢产物分析

Table 2 Analysis of consumed substrate and anaerobic metabolic after 14 h cultivation of HQ-3-C and various mutants

	HQ-3-C	HQ-3- <i>fnr</i>	HQ-3- <i>fdhF</i>	HQ-3- <i>pncB</i>
Glucose consumed (mmol/L)	42.92±0.83	52.23±1.12	49.82±0.61	50.75±1.33
H ₂ (mmol/L)	42.50±1.72	58.18±0.90	52.90±1.62	56.15±1.41
CO ₂ (mmol/L)	41.55±1.56	72.28±3.42	64.38±2.28	52.18±2.62
Formate (mmol/L)	4.88±0.06	3.25±0.02	3.64±0.03	3.44±0.04
Lactate (mmol/L)	31.66±3.37	25.72±1.92	26.56±2.71	28.83±2.45
Acetate (mmol/L)	19.58±0.92	31.32±1.35	28.45±2.03	30.66±1.42
2,3-Butanediol (mmol/L)	7.74±0.05	8.94±0.07	9.26±0.13	8.48±0.04
Ethanol (mmol/L)	15.12±1.24	17.88±2.60	18.22±1.81	19.85±1.54
Succinate (mmol/L)	4.47±0.06	5.82±0.03	5.34±0.08	6.38±0.06
Biomass (mmol/L)	2.32±0.05	2.29±0.06	2.20±0.07	2.14±0.07
H ₂ yield (mol H ₂ /mol glucose)	0.991±0.004	1.113±0.008	1.063±0.007	1.106±0.008

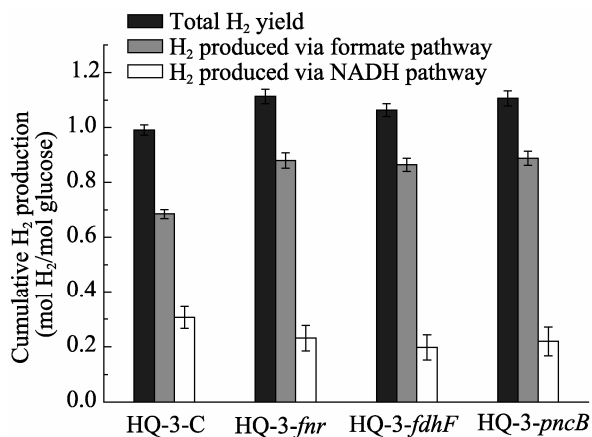


图 9 表达菌株和对照菌株的产氢特性比较

Fig. 9 Comparison of hydrogen production in wild type and recombinant strains.

NAD⁺与 NADH 合成, 当细胞内还原力过剩时, 细菌一般会利用多余的还原力生成氢气, 以维持细胞内平衡的氧化还原态^[16,25]。但本研究发现, *pncB* 基因的过量表达并未提高 NADH 途径中氢

气的产量, 而是使甲酸裂解途径的产氢量升高, 可能的原因是 NADH 的增加促进了乙醇含量的升高, 而使细胞中产生的甲酸量增加, 从而促进了甲酸裂解产氢^[26]。

3 结论

本文首次通过同源过表达雷伯菌代谢正调控因子 *fnr*、*pncB* 和 *fdhF* 基因, 构建高效产氢基因工程菌。厌氧发酵结果表明, 相较含空质粒的对照菌株, 工程菌产氢量均有提高, 底物产氢效率分别由原来每 mol 葡萄糖产的 0.991 mol 提高到 1.113 mol、1.106 mol 和 1.063 mol。进一步对发酵后葡萄糖的消耗量、菌株生物量, 以及厌氧发酵代谢产物的分析显示, 基因过表达工程菌中代谢产物的变化几乎一致, 菌株 HQ-3-*fnr* 与 HQ-3-*fdhF* 发酵液中乙酸和乙醇的总和 (即甲酸量) 较对照菌株 HQ-3-C 有明显增加, 而在发酵

过程中工程菌的甲酸利用率更高,导致最终发酵液中甲酸含量较 HQ-3-C 减少,甲酸裂解途径中的产氢量增加。工程菌 HQ-3-*pncB* 中,产生较多的 NADH 使代谢向着消耗还原力的方向,因此乳酸含量降低,乙醇与琥珀酸含量增高。本研究提示,在厌氧发酵过程中,过表达代谢调控因子可促进产氢途径中相关酶的活性,进而提高细菌的产氢能力,是一种提高厌氧发酵产氢的潜在技术手段。

REFERENCES

- [1] Show KY, Lee DJ, Tay JH, et al. Biohydrogen production: Current perspectives and the way forward. *Int J Hydrogen Energy*, 2012, 37(20):15616–15631.
- [2] Fan Z, Yuan L, Chatterjee R. Increased hydrogen production by genetic engineering of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 2009, 4(2): e4432.
- [3] Heuser F, Schroer K, Lütz S, et al. Enhancement of the NAD(P)(H) pool in *Escherichia coli* for biotransformation. *Eng Life Sci*, 2007, 7(4): 343–353.
- [4] Ying W. NAD⁺ and NADH in cellular functions and cell death. *Front Biosci*, 2006, 11(9): 3129–3148.
- [5] Zhang C, Lv FX, Xing XH. Bioengineering of the *Enterobacter aerogenes* strain for biohydrogen production. *Bioresour Technol*, 2011, 102(18): 8344–8349.
- [6] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochem*, 2000, 35(6): 589–593.
- [7] Tanisho S, Ishiwata Y. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. *Int J Hydrogen Energy*, 1994, 19(10): 807–812.
- [8] Bai LP, Wua XB, Jiang LJ, et al. Hydrogen production by over-expression of hydrogenase subunit in oxygen-tolerant *Klebsiella oxytoca* HP1. *Int J Hydrogen Energy*, 2012, 37(17): 13227–13233.
- [9] Xu FC, Hong HS. Effects of *adhE* Gene knock-out on hydrogen evolution of *Klebsiella oxytoca* HP1. *Acta Sci Nat Uni Sunyatseni*, 2007, 46(1): 327–328 (in Chinese).
徐方成, 洪华生. *Klebsiella oxytoca* HP1 乙醇脱氢酶基因敲除对产氢的影响. *中山大学学报*, 2007, 46(1): 327–328.
- [10] Zhu JB. Construction of *Klebsiella oxytoca* HP1 mutants by homologous recombination to enhance hydrogen evolution [D]. Xiamen: Xiamen University, 2007 (in Chinese).
朱俊波. 产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) HP1 高效产氢工程菌的构建[D]. 厦门: 厦门大学, 2007.
- [11] Berríos-Rivera SJ, San KY, Bennett GN. The effect of NAPRTase overexpression on the total levels of NAD, the NADH/NAD⁺ ratio, and the distribution of metabolites in *Escherichia coli*. *Metab Eng*, 2002, 4(3): 238–247.
- [12] Self WT, Hasona A, Shanmugam KT. Expression and regulation of a silent operon, *hyf*, coding for hydrogenase 4 isoenzyme in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2004, 186(2): 580–587.
- [13] Salmon K, Hung SP, Mekjian K, et al. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of oxygen availability and FNR. *J Biol Chem* 2003, 278(32): 29837–29855.
- [14] Perrenoud A, Sauer U. Impact of global transcriptional regulation by ArcA, ArcB, Cra, Crp, Cya, Fnr, and Mlc on glucose catabolism in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2005, 187(9): 3171–3179.
- [15] Constantinidou C, Hobman JL, Griffiths L, et al. A reassessment of the FNR regulon and transcriptomic analysis of the effects of nitrate, nitrite, NarXL, and NarQP as *Escherichia coli* K12 adapts from aerobic to anaerobic growth. *J Biol Chem*, 2006, 281(8): 4802–4815.
- [16] Fan Z, Yuan L, Chatterjee R. Increased hydrogen

- production by genetic engineering of *Escherichia coli*. PLoS ONE, 2009, 4(2): e4432.
- [17] San K, Bennett GN, Berrios-Rivera SJ, et al. Metabolic engineering through cofactor manipulation and its effects on metabolic flux redistribution in *Escherichia coli*. Metab Eng, 2002, 4(2): 182–192.
- [18] Berrios-Rivera SJ, Bennett GN, San KY. Metabolic engineering of *Escherichia coli*: Increase of NADH availability by overexpressing an NAD⁺-dependent formate dehydrogenase. Metab Eng, 2002, 4(3): 217–229.
- [19] Liang LY, Liu RM, Wang GM, et al. Regulation of NAD(H) pool and NADH/NAD⁺ ratio by overexpression of nicotinic acid phosphoribosyltransferase for succinic acid production in *Escherichia coli* NZN111. Enzyme Microb Technol, 2012, 51(5): 286–293.
- [20] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem, 1959, 31(3): 426–428.
- [21] Converti A, Perego P. Use of carbon and energy balances in the study of the anaerobic metabolism of *Enterobacter aerogenes* at variable starting glucose concentrations. Appl Microbiol Biotechnol, 2002, 59(2–3): 303–309.
- [22] Vemuri GN, Eiteman MA, Altman E. Effects of growth mode and pyruvate carboxylase on succinic acid production by metabolically engineered strains of *Escherichia coli*. Appl Environ Microb, 2002, 68(4): 1715–1727.
- [23] Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN. The effect of NAPRTase overexpression on the total levels of NAD, the NADH/NAD⁺ ratio, and the distribution of metabolites in *Escherichia coli*. Metab Eng, 2002, 4(3): 238–247.
- [24] Lu Y, Zhao HX, Zhang C. Expression of NAD⁺-dependent formate dehydrogenase in *Enterobacter aerogenes* and its involvement in anaerobic metabolism and H₂ production. Biotechnol Lett, 2009, 31(10): 1525–1530.
- [25] Niu K, Zhang X, Tan W, et al. Effect of culture conditions on producing and uptake hydrogen flux of biohydrogen fermentation by metabolic flux analysis method. Bioresour Technol, 2011, 102(15): 7294–7300.
- [26] Zhang C, Ma K, Xing XH. Regulation of hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* by external NADH and NAD⁺. Int J Hydrogen Energy, 2009, 34(1/3): 1226–1232.

(本文责编 陈宏宇)