



# Improved Hydrogen Production by Overexpression of *RphydC*, *RrhydA*, *CahydA* in *Rhodobacter sphaeroides* HY01

An Dan, Song Zi-lun, Su Zhen-hua, Wei Hao-wen, Xiang Ming-rui, Yin Yue

School of Environmental Science and Engineering, Shaanxi University of Science & Technology, Xi'an, China

## Email address:

andan@sust.edu.cn (An Dan), 1211914647@qq.com (Song Zi-lun), 1016489057@qq.com (Su Zhen-hua), 2746278668@qq.com (Wei Hao-wen), 944236746@qq.com (Xiang Ming-rui), 761733978@qq.com (Yin Yue)

## To cite this article:

An Dan, Song Zi-lun, Su Zhen-hua, Wei Hao-wen, Xiang Ming-rui, Yin Yue. Improved Hydrogen Production by Overexpression of *RphydC*, *RrhydA*, *CahydA* in *Rhodobacter sphaeroides* HY01. *Science Discovery*. Vol. 10, No. 3, 2022, pp. 173-180. doi: 10.11648/j.sd.20221003.25

Received: May 7, 2022; Accepted: June 6, 2022; Published: June 9, 2022

**Abstract:** Hydrogen production yield of photosynthetic bacteria is low, which limits the development of the photo-fermentation. In order to solve this problem, We're trying to over-expression [FeFe]-hydrogenase in photosynthetic bacteria to improve its hydrogen production yield. [FeFe]-hydrogenase, from *Rhodospseudomonas palustris* CGA009 (*RpHydC*), *Rhodospirillum rubrum* ATCC 11170 (*RrhydA*), *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (*CahydA*) are selected as the research object. We construct the over-expression plasmid of pCG2, pAD2 and pCA2, which containing *RphydC*, *RrhydA* and *CahydA* DNA fragment, respectively. The *hydG*, *hydE* and *hydF* are amplified and cloned in pBBR1mcs-2 to form pEFG2. The strains A036 containing pCA2 and pEFG2, A037 containing pCG2 and pEFG2, A038 containing pAD2 and pEFG2. The hydrogen yield of A036, A037 and A038 are 1.38 mol H<sub>2</sub>/mol-glucose, 1.34 mol H<sub>2</sub>/mol-glucose and 1.23 mol H<sub>2</sub>/mol-glucose, which compared with wild type strain increased by 29.71%, 25.52% and 15.07%, respectively. In this study, we successful implementation of the [FeFe]-hydrogenase heterologous expression in *Rhodobacter sphaeroides* HY01 by the test analysis of hydrogen production and RT-PCR. Otherwise, [FeFe]-hydrogenase, encoded by *RphydC*, *RrhydA* and *CahydA* are confirmed that their maturation was strictly dependent on co-expression of *hydG*, *hydE*, and *hydF*.

**Keywords:** Heterologous Expression, [FeFe]-hydrogenase, Hydrogen Yield

## 通过*Rhodobacter sphaeroides* HY01中过表达*RphydC*, *RrhydA*, *CahydA*以提高其产氢性能

安丹, 宋自伦, 苏振华, 危浩文, 向铭瑞, 殷岳

陕西科技大学环境科学与工程学院, 西安, 中国

## 邮箱

andan@sust.edu.cn (安丹), 1211914647@qq.com (宋自伦), 1016489057@qq.com (苏振华), 2746278668@qq.com (危浩文), 944236746@qq.com (向铭瑞), 761733978@qq.com (殷岳)

**摘要:** 光合细菌产氢量低, 限制了光发酵技术的发展。为了解决这一问题, 我们尝试在光合细菌中过表达[FeFe]-氢化酶, 以提高其产氢量。以*Rhodospseudomonas palustris* CGA009 (*RpHydC*), *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170 (*RrhydA*), *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (*CahydA*) 的铁氢酶为研究对象, 分别构建了含有*RphydC*、*RrhydA*和*CahydA* DNA片段的pCG2、pAD2和pCA2过表达质粒。*hydG*、*hydE*和*hydF*扩增并克隆到pBBR1mcs-2形成pEFG2。菌株A036含pCA2和pEFG2、菌株A037含pCG2和pEFG2、菌株A038含pAD2和pEFG2, 它们的产氢量分别为1.38mol H<sub>2</sub>/mol-葡萄糖, 1.34mol

$H_2$ /mol-葡萄糖和1.23mol  $H_2$ /mol-葡萄糖, 均高于野生型HY01且分别为比野生型HY01提高了29.71%、25.52%和15.07%, 通过产氢检测和RT-PCR, 成功实现了[FeFe]-氢化酶在*Rhodobacter sphaeroides* HY01中的异源表达。另外, 由*RphydC*、*RrhydA*和*CahydA*编码的[FeFe]-氢化酶被证实它们的异源表达活性严格依赖于*hydG*、*hydE*和*hydF*的共表达。

**关键词:** 异源表达, [FeFe]-氢化酶, 产氢量

## 1. 背景

氢因其可循环利用性和环境友好性被公认为是一种具有重大潜力的能源[1], 氢气主要由化石燃料、电解水和生物质制氢产生[2]。电解水制氢消耗大量电能, 化石燃料制氢会增加二氧化碳、二氧化硫和颗粒物的排放, 降低空气质量同时危害人类健康[3-6]。生物质具有丰富、清洁和可再生的特点, 具有广阔的发展前景[7, 8]。暗/光发酵被认为是将生物质转化为氢气的有效方法[9], 暗发酵的优点是产氢速率高, 限制其发展的瓶颈是底物转化率低。光发酵的主要瓶颈是产氢效率低[10]。为了解决这个问题, 研究者们做了大量的研究, 包括反应器的改进[11]、制氢条件的优化[12, 13]、产氢微生物的固定化[14, 15]、制氢工艺的改进[16, 17]、高效制氢菌种的分离[18, 19]以及不同原料的组合使用[3, 20, 21], 但改进效果并不理想, 需要从其他角度来改善光合细菌的产氢性能。

微生物的基因工程技术的发展为解决这一问题提供了新的方法和角度。光合细菌制氢的主要酶为固氮酶, 提高或增多流向固氮酶的物质流或能量流, 预期可以提高其产氢性能。常用的思路有两种, 一种为基因敲除, 一种为过表达关键酶。对于制氢不利的代谢途径中的关键酶进行基因敲除致使其无法转录进而无活性, 有助于物质及能量流更多流向固氮酶进而提高产氢量[22]。利用敲除技术提高光合细菌产氢性能的研究相对较多, 敲除基因包括吸氢酶[23,24], Cbb3型细胞色素C氧化酶[25], HL复合物中的*PucAB* (a) 和*PucAB* (b) [26]以及卡尔文循环的*cbbL*、*cbbS*和*cbbM*基因[27], 这些基因的缺失对光合细菌产氢能力的提高程度并不理想, 因此, 我们尝试采用第二种思路, 在光合细菌中过表达产氢关键酶以期提高光合细菌的产氢性能。目前, 学者们大多过表达固氮酶本身或固氮酶正调控基因来提高光合细菌的产氢性能, 但提高的程度不是十分理想, 寻找新的高效制氢关键酶尤为重要。

[FeFe]-氢化酶是暗细菌制氢的关键酶, 如将[FeFe]-氢化酶转移到光合细菌中进行过表达, 对光合细菌的产氢性能将会有很大提高。有些学者进行了这方面的探索研究, Mona[22]和Akhtar MK[28]发现将*RrHydA*在大肠杆菌BL21 (DE3) 中过表达, 发现*RrHydA*可以在大肠杆菌中过表达但活性并不高, 对于菌株产氢性能提高有限, Mona[22]等人的研究也发现了这一现象。[FeFe]-氢化酶的异源表达是否只需要单独的[FeFe]-氢化酶基因即可还是同时还需要辅助蛋白才可以形成具有活性的[FeFe]-氢化酶。Akhtar MK等人[28]构建了一个可以同时表达编码氢

化酶和氢化酶成熟辅助基因的质粒, 一个具有*hydF-hydE-hydG-hydA*操纵子质粒, 可以表达出有活性的铁氢酶, 他们研究发现*hydA*的活性严格依赖于*hydF*、*hydE*和*hydG*的共表达。目前对于[FeFe]-氢化酶异源表达的菌株大部分为大肠杆菌, 其次为暗细菌, 在光合细菌中进行[FeFe]-氢化酶的异源表达的研究非常少。基于此, 通过在NCBI数据库对已有[FeFe]-氢化酶的检索, 我们发现几株紫色非硫光合菌株也含有基因*hydAs*[29], 对于这些不同来源的*hydAs*基因能否在光合细菌中形成具有活性的氢化酶, 以及这些氢化酶的活性是否依赖辅助基因*hydE*、*F*和*G*的共表达, 目前研究较少。

基于此, 我们选取*R.palustris* CGA009 (*RpHydC*)、*R.rubrum* ATCC 11170 (*RrhydA*) 和*C.acetobutylicum* ATCC 824 (*CahydA*) 中的[FeFe]-氢化酶为异源表达基因, 同时选取*C.acetobutylicum* ATCC 824的3个辅助基因*hydE*、*F*和*G*为共表达辅助基因。通过在*Rhodobacter sphaeroides* HY01中单独异源表达[FeFe]-氢化酶或与辅助基因共表达来探索[FeFe]-氢化酶可否单独或必须与辅助基因共表达才可以完全表达其活性。本研究结果可为光合细菌中异源表达[FeFe]-氢化酶提供一定的理论参考, 具有重要的意义。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 菌种和培养条件

野生型菌株*R.sphaeroides* HY01从福建省农田土壤中分离获得[30], 其菌落培养物及液体培养物均采用Sistrom's succinate minimal (MedA) 培养基。菌落培养物在35°C恒温培养箱中培养, 液体培养物在150r/min的35°C恒温摇床上培养。大肠杆菌采用Luria-Bertani培养基 (LB) 在37°C恒温培养箱中培养。筛选大肠杆菌重组菌的最终抗生素浓度如下所示: 庆大霉素 (Gm), 10mg/L; 卡那霉素 (Km), 12.5mg/L; 氨苄青霉素 (Ap), 100mg/L。筛选菌株*R.sphaeroides* HY01重组菌的最终抗生素浓度为氨苄青霉素100mg/L, Km, 25mg/L。

### 2.2. DNA操作

#### 2.2.1. 菌种和质粒

本研究使用的菌株和质粒如表1所示。质粒的提取纯化采用QIAGEN QIAprep Spin Miniprep, 基因的提取纯化采用QIAquick Gel Extraction。

表1 本研究所用菌种和质粒。

菌种和质粒	特性	来源
质粒		
pRK2013	Helper plasmid	
pBBR1mcs-2	Kan <sup>r</sup>	
pRK415	Tet <sup>r</sup>	
pBlu2SKP	Amp <sup>r</sup>	Stratagene
pCG1	Amp <sup>r</sup> ,携带 <i>RphycD</i> 和 <i>atp</i> 启动子4的pBS2KP	本研究
pAD1	Amp <sup>r</sup> ,携带 <i>RrhydA</i> 和 <i>atp</i> 启动子5的pBS2KP	本研究
pCA1	Amp <sup>r</sup> ,携带 <i>CahydA</i> 和 <i>atp</i> 启动子1的pBS2KP	本研究
pEFG1	Amp <sup>r</sup> ,携带 <i>CahydE</i> , <i>CahydF</i> , <i>CahydG</i> 和 <i>atp</i> 启动子的pBS2KP	本研究
pATP1	Amp <sup>r</sup> ,携带 <i>atp</i> 启动子的pBS2KP	本研究
pCG2	Tet <sup>r</sup> ,携带 <i>RphycD</i> 和 <i>atp</i> 启动子4的pRK415	本研究
pAD2	Tet <sup>r</sup> ,携带 <i>RrhydA</i> 和 <i>atp</i> 启动子5的pRK415	本研究
pCA2	Tet <sup>r</sup> ,携带 <i>CahydA</i> 和 <i>atp</i> 启动子1的pRK415	本研究
pEFG2	Kana <sup>r</sup> ,携带 <i>CahydE</i> , <i>CahydF</i> , <i>CahydG</i> 和 <i>atp</i> 启动子的pBBR1mcs-2	本研究
大肠杆菌		
XL1-blue	Spc <sup>r</sup>	Stratagene
S17-1	Tet <sup>r</sup> ,Amp <sup>r</sup> ,Kan <sup>r</sup>	
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>		
HY01	Rif-10 Rif <sup>r</sup>	[30]
A031	含质粒pCA2的HY01	本研究
A032	含质粒pCG2的HY01	本研究
A033	含质粒pAD2的HY01	本研究
A034	含质粒pEFG2的HY01	本研究
A036	含质粒pCA2和pEFG2的HY01	本研究
A037	含质粒pCG2和pEFG2的HY01	本研究
A038	含质粒pAD2和pEFG2的HY01	本研究

## 2.2.2. 构建过表达质粒所用引物

用于克隆*RphycD*、*RrhydA*、*CahydA*、*hydG*、*hydE*和*hydF*基因的正向及反向引物列于表2。

表2 克隆基因的正向及反向引物。

基因	正向引物	反向引物
<i>RphycD</i>	5'ATCCCCCGGGAGCGGCCATATGTGCACGCCCGATCAAGCCAGCC3'	5'TGTACGGATCCTCAGTACAGGATCGTGCTCATGGTG3'
<i>RrhydA</i>	5'TGAGCAAGCTTGATATGCATATGTCGATCCAAACCGACCGTAACCA3'	5'GAGGGGGATCCTTAGGGGGCGGCCGACGGTTCGGCG3'
<i>CahydA</i>	5'TACATATCGATAGGATACATATGAAAACAATAATCTTAAATGGCA3'	5'TATTTCCCGGGTTATTCATGTTTGAACATTTTAA3'
<i>hydG</i>	5'ACAAAATCGATGGGTTTCATATGTATAATGTTAAATCTAAAGTTG3'	5'GGAAACCCGGGTAGAATCTAAAATCTCTTTGTCCC3'
<i>hydE</i>	5'ATAAGGCGGCCGCGAAGAATAT ATGGATAATATAATAAGTTAATTA 3'	5'TATGACCGCGGTAAACCAATAGATTCTTTGTAGCTT3'
<i>hydF</i>	5'AGGTGGGATCCATGAATGAACCTTAACCTCAACACCCA3'	5'ATAAAGCGGCCGCTTAGTTTCTACTCGATTGATTAAAT3'
<i>atp</i> 启动子1	5'TCGCGATCGATCTCCACCAGCGTTCTGGCTCAAGA3'	5'AAGCCTCTAGAGACATATGAACCTTTTCGATATCAT3'
<i>atp</i> 启动子2	5'TCGCGCCCGGGCTCCACCAGCGTTCTGGCTCAAGA3'	5'AAGCCGGATCCGACATATGAACCTTTTCGATATCAT3'
<i>atp</i> 启动子3	5'TCGCGCGCGGCCGCTCCACCAGCGTTCTGGCTCAAGA3'	5'AAGCCTCTAGAGACATATGAACCTTTTCGATATCAT3'
<i>atp</i> 启动子4	5'TCGCGCCCGGGCTCCACCAGCGTTCTGGCTCAAGA3'	5'AAGCCTCTAGAGACATATGAACCTTTTCGATATCAT3'
<i>atp</i> 启动子5	5'TCGCGAAGCTTCTCCACCAGCGTTCTGGCTCAAGA3'	5'AAGCCTCTAGAGACATATGAACCTTTTCGATATCAT3'

设计引物所需的DNA模板序列来自NCBI数据库中的*R.palustris* CGA009, *R.rubrum* ATCC 11170 和 *C.acetobutylicum* ATCC 824菌株的基因组(位点标签: RPA0134、Rru\_A0310、CA\_C0028、CA\_C1356、CA\_C1631、CA\_C1651)。

## 2.2.3. RT-PCR检测基因转录水平

### (1) DNA提取和引物设计

细菌培养物的总RNA采用生工生物技术公司的SK8655试剂盒提取, RNA反转录为cDNA采用生工生物技术公司的SK2436试剂盒。基因转录水平由上海生工生物技术有限公司测定。

本研究采用RT-PCR对*RphycD*、*RrhydA*、*CahydA*、*hydE*、*hydF*和*hydG*基因转录mRNA进行定量检测, 所用引物列于表3。

### (2) PCR反应

PCR反应体系(25μL)含1XPCR缓冲液, 50mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM dNTP, 5μM 引物, Taq-DNA聚合酶 1U, 0.5μL DNA模板。PCR运行程序: 预变性95°C 3min, 94°C变性30s, 57°C退火30s, 72°C延伸30s, 35个循环。

### (3) RT-PCR

总RNA反转录成cDNA采用SK2445试剂盒(AMV)。RT-PCR反应体系(20μL)含10μL 2XSybrGreen qPCR Mix,

7.2μL ddH<sub>2</sub>O, 4μM 引物和2 μL总cDNA。运行程序: 预 变性95℃ 3min, 95℃变性7s, 57℃退火10s, 72℃延伸15s。

表3 RT-PCR所用引物。

基因	正向引物	反向引物
<i>RphydC</i>	5' CGGATTGTTGTGCGACTGC 3'	5' CGAGGCCAACTACGACTTCAT 3'
<i>RrhydA</i>	5' GCTATCCCGAGCTTTTGCAT 3'	5'GACGACCGAGACCTTGTGAAT 3'
<i>CahydA</i>	5' TTTGTTGTGGTGATTTTGCTG 3'	5' ATAATGGCCCCATTCCCTATGT 3'
<i>hydG</i>	5'CAATAGCTCTTCAAGATATGGGACA 3'	5'TAGGATTGTTTACAGGGTCTTCTCC 3'
<i>hydE</i>	5'ATGCTGATATGATAGGGGTAGGACC 3'	5'ATAAAGGGATTCCATTGCCGTAGTT3'
<i>hydF</i>	5'AGCATAACTGGTCCAAGAGGG 3'	5'GGAAAATCCAGTGAATAAATGCTC 3'
<i>16S rRNA</i>	5'CCGTAAACGATGAATGCCA3'	5'GTCAAGGGTTGGTAAGGTTCTG 3'

2.2.4. 产氢测试

野生型和重组HY01菌株均在产氢液为4mL的20mL无菌注射器中进行产氢实验。产氢装置置于光照强度为3000 lux温度为30℃的光照培养箱中培养，每隔24小时记录一次产气量。

2.2.5. 分析方法

- (1) 氢气浓度
- 采用气相色谱仪（GC,CP-3800,Varian Co.），测试条件：后检测器温度：250℃；柱箱温度：90℃；载气：Ar  
氢气浓度=样品氢气峰面积/纯氢气峰面积
- (2) 产氢量

采用以下公式进行计算[31]。

$$V = V_{ori} + \sum V_{iri}$$

式中，*V*是累计产氢量；*V*<sub>0</sub>是反应器上部空间；*V*<sub>*i*</sub>是反应器实时排出的液体体积；*r<sub>i</sub>*是实时氢气浓度

3. 结果和讨论

3.1. 过表达质粒和重组光合细菌的构建

本研究使用的质粒和菌株已列于表1中，过表达质粒的构建如图1所示。

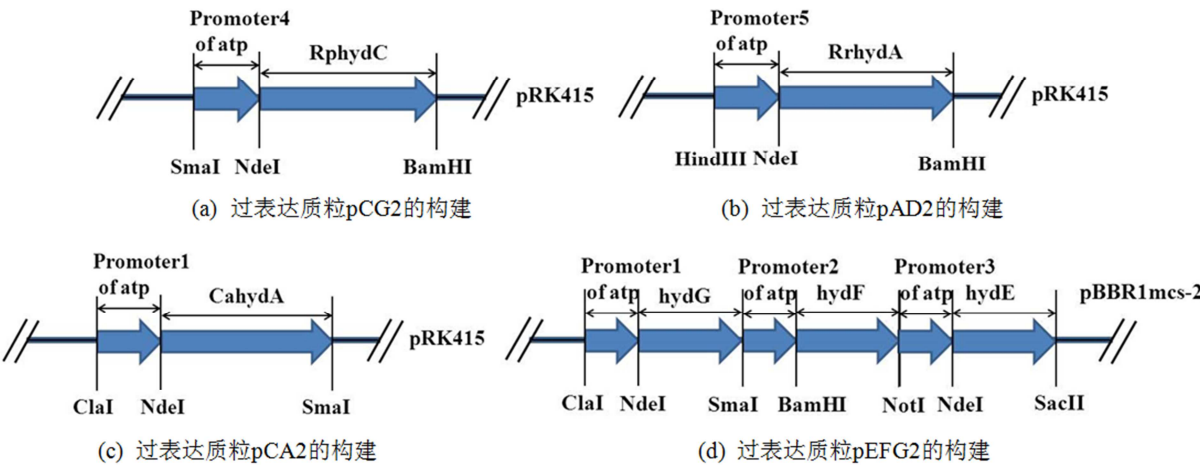


图1 过表达质粒的构建.

*RpHydC*、*RrhydA*、*CahydA*、*hydE*、*hydF*和*hydG*的核苷酸序列来源于NCBI数据库。

过表达载体pCG2、pAD2和pCA2的构建: [FeFe]-氢化酶基因在*R.sphaeroides* HY01中异源表达需要启动子驱动, 本研究选取*R.sphaeroides* HY01的ATP上游的启动子区为[FeFe]-氢化酶基因异源表达的启动子序列, 并将该启动子序列与*RphydC/RrhydA/CahydA*基因克隆并连接到pBlu2SKP上, 分别形成质粒pCG1、pAD1和pCA1。之后将pCG1、pAD1和pCA1上的*atp*启动子与[FeFe]-氢化酶基因酶切连接到质粒pRK415上形成三个过表达质粒pCG2、pAD2和pCA2。

过表达质粒pEFG2的构建: 克隆*hydE*、*hydF*和*hydG*三个基因及*atp*启动子将这些基因全部连入pBlu2KSP载体中, 形成质粒pEFG1, 之后将pEFG1上包含*hydE*、*hydF*、

*hydG*基因和*atp*启动子的完整基因序列酶切连接到质粒pBBR1mcs-2上, 获得质粒pEFG2[32,33]。

重组菌株A031、A032和A033的构建: 将上述构建的三个过表达质粒pCA2、pCG2和pAD2, 通过接合转移操作导入*R.sphaeroides* HY01中, 获得重组菌株A031、A032和A033。

重组菌株A034、A036、A037和A038的构建: 将质粒pEFG2接合转移到*R.sphaeroides* HY01、A031、A032和A033中, 获得重组菌株A034、A036、A037和A038。

3.2. [FeFe]-氢化酶蛋白质序列的多序列分析

本研究中对三株细菌的[FeFe]-氢化酶的氨基酸序列进行比对分析, 来分析不同来源的[FeFe]-氢化酶的组成及结构的相似性。*C.acetobutylicum* ATCC 824 (HydA)、



*R. palustris* CGA009 (HydC) 和 *R. rubrum* ATCC 11170 (HydA) 三种[FeFe]-氢化酶所包含的氨基酸数分别为582, 619和462aa。三株菌的[FeFe]-氢化酶所包含的氨基酸序列分析结果如图2所示。*C. acetobutylicum* ATCC 824:*R. palustris* CGA009 序列比对得分为38.32分,

*C. acetobutylicum* ATCC 824:*R. rubrum* ATCC 11170序列比对得分为27.49分, *R. palustris* CGA009:*R. rubrum* ATCC 11170序列比对得分为27.92分。从上可以发现, 三株菌的[FeFe]-氢化酶所包含的氨基酸序列相似度很低, 说明所选的三株菌的[FeFe]-氢化酶具有代表性, 没有较高的重复性。

<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	-----MKTIILNGNEVHTDKDITILELARENNVDIPTL 33
<i>R. palustris</i> CGA009	MCTPDQASLSARDPAEATITLSINGVACAGFANETILSCARRYDVYIPTL 50
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	-----
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	CFLIDCGN-FGKCGVCMVEVEGKG----FRAACVAKVEDGMVINTESDE 77
<i>R. palustris</i> CGA009	CELEDIDHTPGACRVCLVEILQAGKDPQIVTACNTFVRDGMVEVQTRSKK 100
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	-----
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	VKERIKKRVSMLLDKHEFKCGQCSRENCFLKLVKTKAKASKPFLPED 127
<i>R. palustris</i> CGA009	ARDMQRLQVELLMADHLQDCATCIRHGSCLEQLDAQFVGLQQRFFDER 150
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	---MSIQPTVTIDPELCTGCGRCVET--CPVQAIAG----- 31
	. : . . * . . . .
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	KDA-LVNDNRSKAIVIDRSKCVLCGRCAACKQHTSTCSIQFIKKGQRAV 176
<i>R. palustris</i> CGA009	TEARFVDHSSPSMVRDMRRCVRCQRCVAICRYHQKIDALAEIGSGLERMV 200
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	-----SRGKAHEIEAAACVSCGRCAATCAAFDSIFDAPPTPRPVRLKR 74
	. : . : * * * * * . . . .
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	GTVDVCLDDSTCLLCGQCVIACPVAALKEKSHIEKVQEALENDPKKHVIV 226
<i>R. palustris</i> CGA009	ALRDADGYPNVSCVSCGQCVLVCPTGALGERDETDRALDYICDPNVVTVV 250
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	RGLFG-----SLKEPLFAAHDFSRIEAVRKAFATPKRMIVM 110
	. : * * . . . . . : * : . .
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	AMAPSVRTAMGELFKMGYKDVTKLYTALRMLGFDKVFDFINFGADMTIM 276
<i>R. palustris</i> CGA009	QFAPAVRVAFGEFGLPAGTNVEGQIIAACRKLGVVDVLDTNFAADVIM 300
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	QVDTMACVALAEDFGLPPGSLPKIASAARQLGFDVRYRTSFPAGLAVL 160
	. . . . * . * * . : * . : : * * * * * . * . : . .
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	EEATELLGRVKNNGPFFMFTSCCPAWVRLAQNYHPELLDNLSSAKSPQQI 326
<i>R. palustris</i> CGA009	EEGAELLARLKQ-GRRTFTSCCPAWINFAEIHYPDLPLSSTKSPQV 349
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	ETAHEMAARLANGGNLPVINSSCPAVVAFLEIRYPELLHYLSTVKSHPQI 210
	* . * : * : * * : * * * * : : : * : * * * : * * * :
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	FGTASKTYYPISIGIAPEDVYTVTIMPCNDKKYEADIPFMETNSLRDIDA 376
<i>R. palustris</i> CGA009	LSTIAKSYLPAQLGVPAERIRVISIMPCIAKQDEAVRPQMVHDGQPETDL 399
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	AGALYNSYLADAANLAPANIHKVSVVACLSHKAERPEMMTCGCPDIDT 260
	. : : * . . . . : : : : * * * * . . : *
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	SLTTRELAEMIKDAKIKFADLEDGEVD-FAMGTYSAGAGIFGATGGVMEA 425
<i>R. palustris</i> CGA009	VLTTREFARLLRREGIDLDLPSSQFDRPFLSAYSGAGIFGTTGGVMEA 449
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	VLTARELAAILIKDAGIDVPLLGDGEFD-NDFFEIEGLDILYCAPGDVSR 309
	* * * * : : * . . * . . : : . * . : : * . * .
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	AIRSAKDFAENKELENDVYTEVRGFKGIKEAVEIAG--NKLNVAVINGA 473
<i>R. palustris</i> CGA009	AVRTIYALVNGRELERIELTLQRGFEGLREATVDLGAPVGEVKVAMVHGL 499
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	VLGAGRWFLLGQGEVGAAGETVEVLDEATRLRLAYPGGTLLQALTAVAG 359
	. : : . : * . : . . . . . : : . : : *
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	SNFFEFMKSGKMNEKQYHFIEVMACPGGCGINGGGQPHVNALDRENDYRK 523
<i>R. palustris</i> CGA009	GDTRKLVESVLSGEANYDFIEVMACPGGCVDDGGSLRS---KKAYLPLAL 546
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	DKAVPYLEAIKAGRNAPFLEIASCPGCGASGAGLPKVLLETKPARYRA 409
	. . : : . . : * : : * * * * . * . : .
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	LRASVLYNQDKNVLKSKSHDNPAIIRMYDSYFGKPGEGLAHKLLHVKYT 573
<i>R. palustris</i> CGA009	KRRETIYNVDR-AAKVRQSHNNPQVQALYRELLQAPNSEIAHRLHNTYA 595
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	RLENLPAAFEAWSRLPG---HPSIVALYGGYFGKAIGDKSNRRLHTQYA 456
	. . . . : * : * . . . : : * * : *
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC824	KDKNVSKHE----- 582
<i>R. palustris</i> CGA009	SRKRELQHTVKEIWDLLTMSTILY 619
<i>R. rubrum</i> ATCC11170	EPAAAP----- 462

图2 *Rhodopseudomonas palustris* CGA009 (HydC), *Rhodospirillum rubrum* ATCC11170 (HydA), *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824(HydA)的[FeFe]-氢化酶所包含的氨基酸序列分析, 三株菌相同的氨基酸标记(\*)。

3.3. 野生型HY01和重组HY01菌株的产氢特性

野生型HY01和重组HY01菌株以葡萄糖为底物的产氢性能如图3所示。

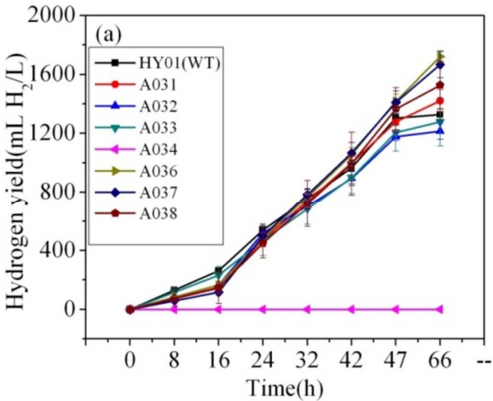


图3 野生型HY01和重组HY01菌株的产氢量。

从图3中发现重组菌株A032和A033的产氢量均低于野生型HY01的产氢量。RT-PCR检测结果表明, *RphydC*和*RrhydA*均能在菌株HY01中转录, 但产氢量降低, 基于此, 我们推测*RphydC*和*RrhydA*在菌株HY01中无法翻译或翻译后酶无活性。重组菌株A032和A033的产氢量降低我们推测是由于[FeFe]-氢化酶的转录和翻译需要消耗较多的核酸、氨基酸及还原力等物质, 导致固氮酶系统的物质流和能量流减少, 进而导致产氢量下降。菌株A031产氢量高于野生型HY01, 同时RT-PCR结果显示*CahydA*在HY01中可以转录, 我们推测质粒pCA2所包含[FeFe]-氢化酶基因在菌株HY01可以转录并翻译为有部分活性的[FeFe]-氢化酶。综上所述, 来自不同种属细菌的[FeFe]-氢化酶在菌株HY01中单独存在时均可以转录, 但只有来自*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824的[FeFe]-氢化酶在无辅助蛋白共表达的情况下可以表现出[FeFe]-氢化酶的部分活性, 但活性并不高, 说明来自*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824的[FeFe]-氢化酶活性没有达到最大, 我们推测这可能是由于该[FeFe]-氢化酶的成熟需要其他基因的辅助。菌株A034 (pEFG2) 的产氢量在所有菌株中最低, 我们认为这可能是菌体内转录与翻译的三个辅助蛋白无法参与制氢且还需消耗比只转录和翻译一种[FeFe]-氢化酶更多的核酸、氨基酸及还原力等, 使流入固氮酶体系的物质流和能量流减少最多, 因此导致产氢量的下降在所有菌株中是最大的。

A031、A032和A033中转入含有辅助蛋白*hydE*、*hydF*和*hydG*过表达载体pEFG2, 形成菌株A036、A037和A038, 图3中可获知菌株A036、A037和A038的产氢量分别为1.38 mol H<sub>2</sub>/mol-葡萄糖, 1.34mol H<sub>2</sub>/mol-葡萄糖和1.23mol H<sub>2</sub>/mol-葡萄糖, 均高于野生型HY01的产气量且分别为比野生型HY01提高了29.71%、25.52%和15.07%, 基于此, 我们发现*R.palustris* CGA009 (*RpHydC*), *R.rubrum* ATCC 11170 (*RrhydA*)和*C.acetobutylicum* ATCC 824(*CahydA*)的[FeFe]-氢化酶均可以在菌株HY01中转录并翻译成具有活性的[FeFe]-氢化酶。

无辅助蛋白共表达的重组菌株A031、A032和A033的产氢量均低于含有[FeFe]-氢化酶及辅助蛋白*hydE*、*hydF*和*hydG*共表达的重组菌株A036、A037和A038, 这说明辅助蛋白*hydE*、*hydF*和*hydG*的共表达能促进[FeFe]-氢化酶的折叠和成熟, 进而使得铁氢酶活性正常, 产氢量提高。Posewitz MC[34]也发现了类似的现象, 他们研究中发现*C.acetobutylicum hydA*的异源表达出有活性的铁氢酶需要严格依赖于多种成熟因子*hydF*、*hydE*和*hydG*的共表达, Akhtar MK等人[28]构建了一个可以同时表达编码氢化酶和氢化酶成熟辅助基因的质粒, 一个具有*hydF-hydE-hydG-hydA*操纵子质粒, 此外, 他们研究也发现*hydA*的活性严格依赖于*hydF*、*hydE*和*hydG*的共表达。

3.4. 重组HY01菌株中铁氢酶转录情况检测

采用RT-PCR对*RphydC*、*RrhydA*、*CahydA*、*hydG*、*hydE*和*hydF*基因转录的mRNA情况进行检测, RT-PCR引物检测的六个基因的片段长度分别为169, 131, 114、72, 164和125bp, 电泳图如图4所示。

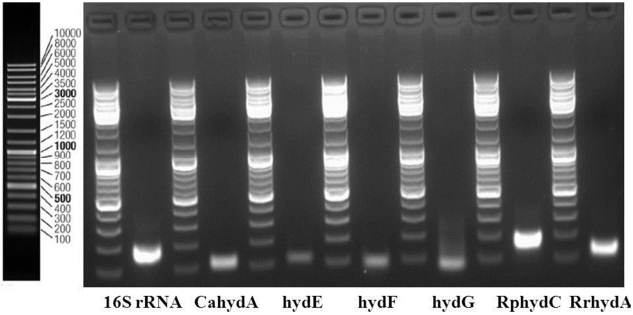


图4 RT-PCR电泳图。

通过RT-PCR电泳图, 可以看出*RphydC*、*RrhydA*、*CahydA*、*hydG*、*hydE*和*hydF*基因在*R.sphaeroides* HY01中均可转录, 说明本研究中构建的过表达质粒均可正常启动并转录。

4. 总结

- 1) 本研究表明, 在强*atp*启动子的调控下, *R.palustris* CGA009(*RpHydC*), *R.rubrum* ATCC 11170(*RrhydA*) 和 *C.acetobutylicum* ATCC 824(*CahydA*) 的 [FeFe]- 氢化酶基因均能在 *R.sphaeroides* HY01中转录。
- 2) *R.sphaeroides* HY01 中过表达的 *R.palustris* CGA009 (*RpHydC*), *R.rubrum* ATCC 11170 (*RrhydA*)和*C.acetobutylicum* ATCC 824(*CahydA*)的 [FeFe]-氢化酶活性需严格依赖*hydF*、*hydE*和*hydG*的共表达。
- 3) 菌株A036、A037和A038的产氢量分别为1.38mol H<sub>2</sub>/mol-葡萄糖, 1.34mol H<sub>2</sub>/mol-葡萄糖和1.23mol H<sub>2</sub>/mol-葡萄糖, 均高于野生型HY01的产氢量且分别为比野生型HY01提高了29.71%、25.52%和15.07%, 说明[FeFe]-氢化酶在光合细

菌中异源表达对光合细菌产氢性能提高显著, 是一种非常有潜力的改善光合细菌产氢性能的方法。

本文研究的三株细菌的[FeFe]-氢化酶基因的表达均在光合细菌*R.sphaeroides* HY01中进行。后续研究可在目前已发现的其他产氢性能优良的光合细菌中尝试氢化酶基因的过表达研究, 探索宿主菌种属差异对[FeFe]-氢化酶基因过表达的影响, 这可为光合细菌产气性能提高提供一定研究基础及理论基础。

## 基金项目

国家自然科学基金委员会资助面上项目(52074177); 陕西科技大学大学生创新创业训练计划项目(S202010708017)资助。

## 参考文献

- [1] Balat H, Kirtay E. Hydrogen from biomass - Present scenario and future prospects [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2010, 35 (14): 7416-26.
- [2] Shimura K, Yoshida H. Heterogeneous photocatalytic hydrogen production from water and biomass derivatives [J]. *Energ Environ Sci*, 2011, 4 (7): 2467-81.
- [3] Zhao X, Xing DF, Zhang L, Ren NQ. Characterization and overexpression of a [FeFe]-hydrogenase gene of a novel hydrogen-producing bacterium *Ethanoligenens harbinense* [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2010, 35 (18): 9598-602.
- [4] Demirbas A. Progress and recent trends in biofuels [J]. *Prog Energ Combust*, 2007, 33 (1): 1-18.
- [5] John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A. Micro and macroalgal biomass: A renewable source for bioethanol [J]. *Bioresource Technol*, 2011, 102 (1): 186-93.
- [6] Holladay JD, Hu J, King DL, Wang Y. An overview of hydrogen production technologies [J]. *Catal Today*, 2009, 139 (4): 244-60.
- [7] Xia A, Cheng J, Ding LK, Lin RC, Huang R, Zhou JH, et al. Improvement of the energy conversion efficiency of *Chlorella pyrenoidosa* biomass by a three-stage process comprising dark fermentation, photofermentation, and methanogenesis [J]. *Bioresource Technol*, 2013, 146: 436-43.
- [8] Akutsu Y, Li YY, Harada H, Yu HQ. Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2009, 34 (6): 2558-66.
- [9] van Veen JAR, Sie ST. Fuel processing technology special issue: Deep hydrodesulfurization of diesel fuel [J]. *Fuel Process Technol*, 1999, 61 (1-2): 1-4.
- [10] Chandrasekhar K, Lee YJ, Lee DW. Biohydrogen Production: Strategies to Improve Process Efficiency through Microbial Routes [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16 (4): 8266-93.
- [11] Ren HY, Liu BF, Xie GJ, Zhao L, Ren NQ. Carrier modification and its application in continuous photo-hydrogen production using anaerobic fluidized bed photo-reactor [J]. *Gcb Bioenergy*, 2014, 6 (5): 599-605.
- [12] Burrows EH, Wong WK, Fern X, Chaplen FWR, Ely RL. Optimization of pH and Nitrogen for Enhanced Hydrogen Production by *Synechocystis* sp PCC 6803 via Statistical and Machine Learning Methods [J]. *Biotechnol Progr*, 2009, 25 (4): 1009-17.
- [13] Fan YT, Li CL, Lay JJ, Hou HW, Zhang GS. Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost [J]. *Bioresource Technol*, 2004, 91 (2): 189-93.
- [14] Hilgsmann S, Beckers L, Masset J, Hamilton C, Thonart P. Improvement of fermentative biohydrogen production by *Clostridium butyricum* CWB11009 in sequenced-batch, horizontal fixed bed and biodisc-like anaerobic reactors with biomass retention [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2014, 39 (13): 6899-911.
- [15] Chang JS, Lee KS, Lin PJ. Biohydrogen production with fixed-bed bioreactors [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2002, 27 (11-12): 1167-74.
- [16] Gomez X, Fernandez C, Fierro J, Sanchez ME, Escapa A, Moran A. Hydrogen production: Two stage processes for waste degradation [J]. *Bioresource Technol*, 2011, 102 (18): 8621-27.
- [17] Eroglu E, Eroglu I, Gunduz U, Turker L, Yucel M. Biological hydrogen production from olive mill wastewater with two-stage processes [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2006, 31 (11): 1527-35.
- [18] Rajhi H, Conthe M, Puyol D, Diaz E, Sanz JL. Dark fermentation: isolation and characterization of hydrogen-producing strains from sludges [J]. *Int Microbiol*, 2013, 16 (1): 53-62.
- [19] Laocharoen S, Reungsang A. Isolation, characterization and optimization of photo-hydrogen production conditions by newly isolated *Rhodobacter sphaeroides* KCU-PS5 [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2014, 39 (21): 10870-82.
- [20] Das D, Veziroglu TN. Advances in biological hydrogen production processes [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2008, 33 (21): 6046-57.
- [21] Ren NQ, Wang AJ, Cao GL, Xu JF, Gao LF. Bioconversion of lignocellulosic biomass to hydrogen: Potential and challenges [J]. *Biotechnol Adv*, 2009, 27 (6): 1051-60.
- [22] Abo-Hashesh M, Sabourin-Prouost G, Hallenbeck PC. RrHydA is inactive when overexpressed in *Rhodospirillum rubrum* but can be matured in *Escherichia coli* [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2013, 38 (26): 11233-40.
- [23] Liu T, Li XF, Zhou ZH. Improvement of hydrogen yield by hupR gene knock-out and nifA gene overexpression in *Rhodobacter sphaeroides* 6016 [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2010, 35 (18): 9603-10.
- [24] Kars G, Gunduz U, Rakhely G, Yucel M, Eroglu I, Kovacs KL. Improved hydrogen production by uptake hydrogenase deficient mutant strain of *Rhodobacter sphaeroides* OU001 [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2008, 33 (12): 3056-60.

- [25] Wang JL, Gray KA, Daldal F, Rousseau DL. The Cbb3-Type Cytochrome-C-Oxidase from *Rhodobacter-Capsulatus* Contains a Unique Active-Site [J]. *J Am Chem Soc*, 1995, 117 (36): 9363-64.
- [26] Brotsudarmo THP, Collins AM, Gall A, Roszak AW, Gardiner AT, Blankenship RE, et al. The light intensity under which cells are grown controls the type of peripheral light-harvesting complexes that are assembled in a purple photosynthetic bacterium [J]. *Biochem J*, 2011, 440: 51-61.
- [27] Paoli GC, Morgan NS, Tabita FR, Shively JM. Expression of the cbbLcbbS and cbbM genes and distinct organization of the cbb Calvin cycle structural genes of *Rhodobacter capsulatus* [J]. *Arch Microbiol*, 1995, 164 (6): 396-405.
- [28] Akhtar MK, Jones PR. Engineering of a synthetic hydF-hydE-hydG-hydA operon for biohydrogen production [J]. *Anal Biochem*, 2008, 373 (1): 170-72.
- [29] Kim EJ, Lee MK, Kim MS, Lee JK. Molecular hydrogen production by nitrogenase of *Rhodobacter sphaeroides* and by Fe-only hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum* [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2008, 33 (5): 1516-21.
- [30] Yang HH, Zhang J, Wang XQ, Feng JT, Yan W, Guo LJ. A newly isolated *Rhodobacter sphaeroides* HY01 with high hydrogen production performance [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2014, 39 (19): 10051-60.
- [31] An D, Li Q, Wang XQ, Yang HH, Guo LJ. Characterization on hydrogen production performance of a newly isolated *Clostridium beijerinckii* YA001 using xylose [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2014, 39 (35): 19928-36.
- [32] Ma C, Guo L, Yang H. Improved photo – Hydrogen production by transposon mutant of *Rhodobacter capsulatus* with reduced pigment [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2012, 37 (17): 12229-33.
- [33] Ma C, Yang H, Zhang Y, Guo L. Disruption of multidrug resistance protein gene of *Rhodobacter capsulatus* results in improved photoheterotrophic hydrogen production [J]. *Int J Hydrogen Energ*, 2013, 38 (29): 13031-37.
- [34] Posewitz MC, King PW, Smolinski SL, Zhang LP, Seibert M, Ghirardi ML. Discovery of two novel radical S-adenosylmethionine proteins required for the assembly of an active [Fe] hydrogenase[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279 (24): 25711-20.