

学校编码: 10384

分类号 \_\_\_\_\_ 密级 \_\_\_\_\_

学号: 200433012

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) HP1

高效产氢工程菌的构建

Construction of *Klebsiella oxytoca* HP1 Mutants by Homologous

Recombination to Enhance Hydrogen Evolution

朱俊波

指导教师姓名: 徐方成 副教授

专业名称: 生物化工

论文提交日期: 2007年 月 日

论文答辩时间: 2007年 月 日

学位授予日期: 2007年 月 日

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2007年 月

# 厦门大学学位论文原创性声明

兹提交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在          年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期：      年    月    日

导师签名：

日期：      年    月    日

## 摘 要

产氢细菌的产氢能力不高是限制生物制氢技术发展的重要因素。运用分子生物学的手段对菌种进行改造,是提高生物产氢效率的重要方法。乙醇和乳酸是产酸克雷伯氏菌 *Klebsiella oxytoca* HP1 厌氧发酵产 H<sub>2</sub> 的主要副产物,切断无益副产物能提高 H<sub>2</sub> 产量和底物转化率。

本研究以 *K. oxytoca* HP1 作为受体,构建了同源双臂整合载体 pTA-Str 和 pLDH-Tr。利用内源平台双交换原理,将质粒 pMHE6 上携带的氨基葡萄糖苷腺苷转移酶基因 (Aminoglycoside-3'-adenyltransferase, *aadA*) 外源表达盒序列 (含 T7 启动子, *aadA* 编码框, T4 终止子) 定点插入到受体菌细胞染色体乙醇脱氢酶系 (含乙醛脱氢酶和乙醇脱氢酶活性) 基因 *adhE* +868~+869 区 (*adhE* 起始编码框为+1)位点上。并在此基础上以质粒 pTA-Str 介导 *K. oxytoca* HP1 *adhE* 的插入失活,获得了具有链霉素抗性的 *adhE*<sup>-</sup>突变株。运用类似方法将 pBR322 上携带的四环素抗性蛋白基因 (tetracycline resistance protein, *tet*) 外源表达盒序列 (含 P1、P2 启动子, *tet* 编码框) 定点插入到受体菌细胞染色体乳酸脱氢酶基因 *LDHa* +518~+519 区 (*LDHa* 起始编码框为+1)位点上。在此基础上以质粒 pLDH-Tr 介导 *K. oxytoca* HP1 *LDHa* 的插入失活,获得了具有四环素抗性的 *LDHa*<sup>-</sup>突变株。

葡萄糖发酵实验结果表明,相同发酵条件下, *adhE*<sup>-</sup>突变菌比野生菌的产氢量提高了 16.07%,乙醇产量下降了 70.47%; *LDHa*<sup>-</sup>突变株比野生菌的产氢量提高了 20.35%。

本研究构建的 *Klebsiella oxytoca* HP1 突变株 *adhE*<sup>-</sup> 和 *LDHa*<sup>-</sup>, 将为进一步研究高效产氢系统奠定基础。

**关键词:** *Klebsiella oxytoca* HP1; *adhE* 基因; *LDHa* 基因; 生物制氢; 基因插入失活

## ABSTRACT

The low bacterial H<sub>2</sub>-production ability would be the choke point on the development of bio-hydrogen technology. It is a potential method for enhancing H<sub>2</sub>-production by using molecular biological technology. Ethanol and lactic acid are the main byproduct of anaerobic H<sub>2</sub>-producing fermentation in *Klebsiella oxytoca* HP1. This can be effectively solved by blocking the pathways leading to the byproducts that are of no benefit to H<sub>2</sub>-production.

In this study, the homologous integration plasmid vector pTA-Str and pLDH-Tr were constructed using *K. oxytoca* HP1 as host cell. The *adhE* genes, which encoded for acetaldehyde dehydrogenase and alcohol dehydrogenase, were cloned into plasmid pMD18-T to generate plasmid pTA. By inserting Aminoglycoside-3'-adenyltransferase (*aadA*) cassette into the coding region of *adhE* +868~+869 into plasmid pTA, the homologous integration plasmid vector pTA-Str was constructed. The amplified DNA fragment 5' -*adhE*-*aadA*-*adhE*-3' from pTA-Str was transformed into *K. oxytoca* HP1 and the mutant strain *adhE*<sup>-</sup> was screened.

Using the similar strategy, The *LDHa* genes, which encoded for lactic acid dehydrogenase, were cloned into plasmid pUC19 to generate plasmid pLDH. By inserting tetracycline resistance protein (*tet*) cassette into the coding region of *LDHa* +518~+519 into plasmid pLDH, the homologous integration plasmid vector pLDH-Tr was constructed. Mutant strain *LDHa*<sup>-</sup> was screened after pLDH-Tr was transformed into *K. oxytoca* HP1.

Compared with the H<sub>2</sub>-production of wild type *K. oxytoca* HP1, the hydrogen yield of the mutant strain *adhE*<sup>-</sup> increased by 16.07% and ethanol concentration decreased by 77.47%, and the hydrogen yield of the mutant strain *LDHa*<sup>-</sup> increased by 20.35%.

In this study, we obtained *Klebsiella oxytoca* HP1 *adhE*<sup>-</sup> and *LDHa*<sup>-</sup> mutant strains. They offered platform for future research on high

bacterial hydrogen production.

**Key words:** *Klebsiella oxytoca* HP1; *adhE*; *LDHa*; anaerobic H<sub>2</sub>-producing fermentation; insertional inactivation

厦门大学博硕士学位论文摘要库

# 1 前言

## 1.1 概述

能源是经济发展的坚强后盾。20 世纪中后期，全球性的经济发展使得能供与能耗间的缺口进一步加大，以石油、煤、天然气为主的传统能源的有限性<sup>[1]</sup>及其利用过程所引发的后续环境污染和温室效应<sup>[2,3]</sup>等问题更加突出了传统能源结构的局限性。因此，人类在未来的发展道路上，必须寻求新的更为有效的可利用能源，以满足逐渐工业化的经济发展需求。

### 1.1.1 氢能

氢气具有广泛的用途。作为一种重要的化工原料，氢气可用于合成氨工业、制造盐酸以及合成甲醇、人造石油等。目前，全世界生产的氢气约有 2/3 用于合成氨工业。石油工业上的许多工艺过程，如加氢裂化，加氢精制、加氢脱硫、催化加氢等，均需用氢气作为还原剂。氢氧焰能产生 3000℃ 的高温，可用于熔融和切割金属。在食品和冶金工业上，氢气也有广泛的用途。

随着科学技术的发展，氢气的利用越加广泛。自氢气用作 A—2 火箭发动机的液体推进剂开始，1960 年液氢被首次用作航天动力燃料。之后氢成为火箭领域的常用燃料。1976 年 5 月，美国研制出一种以氢气作燃料的汽车，氢第一次作为气体燃料，被应用在汽车上。后来，日本也研制成功一种以液态氢为动力的汽车。70 年代末期，前联邦德国的奔驰汽车公司对氢气汽车进行试验。他们仅用了 5 kg 氢气，就使汽车行驶了 110 km，并确定了以氢气作为汽车燃料的种种优势，如：清洁，在低温下容易发动，对发动机的腐蚀作用小，以及氢能量利用率高，可简化现有汽车的构造等等。自此，氢气作为传统化石燃料的重要替代能源，对其开发利用的研究在许多发达国家逐步启动。目前，科学界普遍认为，氢能量密度高、燃烧后的残余能量少、产物不具有污染性，并具有可储存性，氢能作为一种绿色的可再生能源，将是 21 世纪能源结构体系中的重要支柱之一。

### 1.1.2 氢的制备

氢是自然界中储量最丰富的元素之一。在水、天然气、石油、生物质及其他富氢有机物中，都储存大量的化合态氢，它们都是氢的重要来源。目前氢的制备主要包括化石燃料制氢、电解水制氢和生物制氢等途径。

(1) 煤气化：煤在高温高压下与气化剂转化成气体产物。气体产物中含有

占气体总体积的30~39%的氢气组分。

(2) 天然气 / 烃类物质的氧化：该法是在催化剂存在下与水蒸气反应制得氢气。

(3) 重油部分氧化：由重油与水蒸气及氧气反应制得含氢的气体产物。气体产物中氢气体积占46%。

(4) 水电解制氢：水电解制氢是氢与氧燃烧反应生成水的逆过程。提供电能使水分解制得氢气效率一般为75~80%。

传统的化石燃料制氢、电解水制氢过程都存在高能耗低产率问题，使得氢的生产成本较高，而且化石燃料制氢过程所排放的终产物易造成二次污染，从根本上看不适于氢制备的产业化。而生物制氢被认为是氢产业化生产最有前景的途径。

## 1.2 生物制氢

1931年,Stephenson等<sup>[4]</sup>首次报道了在细菌中含有氢酶(Hydrogenase),这种酶可催化氢的氧化和质子的还原反应。之后, Gaffron<sup>[5]</sup>提出以水光解产氢为基础的生物制氢方法,并首先开展了相关研究; Gest等<sup>[6]</sup>证实了光合细菌(*Rhodospirillum rubrum*)能在光照厌氧条件下分解有机物产生氢气的特性。20世纪70年代和90年代能源危机的出现<sup>[7]</sup>以及全球气候与环境的恶化,引发了生物制氢研究的热潮,并取得了丰硕的成果。

目前用于生物制氢研究的微生物主要有两个类群:1、光合生物,包括藻类和光合细菌;2、不需光的兼性厌氧和专性厌氧的发酵产氢细菌。根据产氢微生物类群的不同,目前生物制氢技术也发展为两个主要的研究方向,即光合法生物制氢技术和发酵法生物制氢技术。纵观生物制氢技术研究的各个阶段,比较而言,对光合法生物制氢的研究要远远多于对发酵法生物制氢的研究。

### 1.2.1 光合法生物制氢技术

自 Gaffron 等<sup>[8]</sup>发现一株栅列藻属绿藻 (*Scenedesmas sp*) 可以通过光合作用产生氢气以来,研究者发现能够进行光合作用产氢的微生物分为两大类:光合细菌和藻类。

光合细菌通常只含有一个光合系统,即光色素系统 I,不含光色素系统 II,因此不能进行水的光解。在厌氧条件下,利用简单的有机物或无机物如醋酸、硫



化氢等作为电子供体。电子经由一系列的电子载体进行传递，同时也形成了质子的跨膜梯度。在 ATP 酶系统的催化下，质子跨膜运输产生了 ATP 形式的能量。通过利用这些能量，电子最后被传递到电子受体 Fd。在有  $N_2$  的环境中，固氮酶利用 ATP 形式的能量以及 Fd 传递来的电子将  $N_2$  还原为氨。而在不含  $N_2$  的条件下，固氮酶则利用电子和 ATP 还原质子形成氢（图 1）<sup>[9]</sup>。研究表明，正是以这条途径，有机物最终分解转化为  $H_2$  和  $CO_2$ 。虽然固氮酶对  $O_2$  敏感，但这种途径产氢并不形成  $O_2$ 。

光发酵产氢的效率不高（10~20%）。此外，存在着一些不足：(1)光发酵产氢利用的是固氮酶系统，其产氢反应过程需要消耗能量。(2)从设备要求上，厌氧光反应器设计复杂而且体积较大。

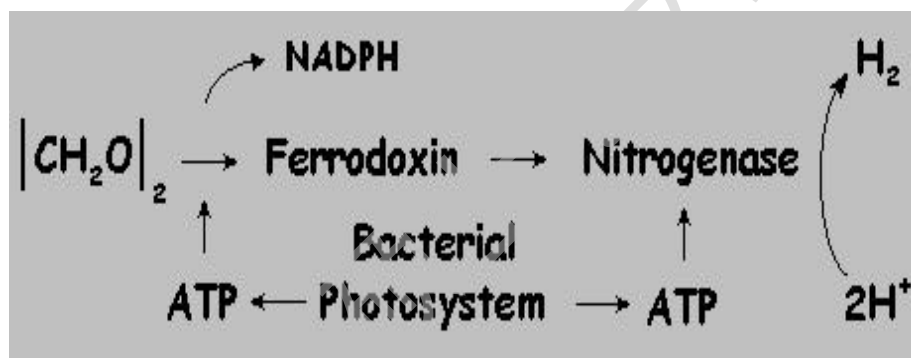


图 1. 光合细菌光合产氢示意图

Fig.1 Process of photo-hydrogen production by photosynthetic bacteria

许多蓝藻和真核藻类体内具有能进行光合作用的完整光合色素系统（PS I，PS II），同时又具有能还原质子而产氢的氢酶，能进行产氢代谢。

在蓝藻中，产氢主要通过两种方式即耦联于光反应的固氮酶催化的光放氢和厌氧条件下氢酶催化的暗放氢<sup>[10]</sup>。蓝藻营养细胞含有完整的 PS I 和 II，能进行  $H_2O$  的光解和  $CO_2$  的还原，产生  $O_2$  和还原性物质。对于某些蓝藻，当培养基中可直接利用的氮化合物受限时，部分营养细胞分化为异形胞。营养细胞产生的还原性物质可通过厚壁孔道运输到异型胞作为氢供体用于异型胞的固氮和产氢。异型胞只含有 PS I 和较厚细胞壁，为异形胞提供一个局部厌氧或低氧分压环境，从而使固氮产氢过程顺利进行（图 2）。由氢酶催化的产氢反应其能量转换效率比较高，但要求在厌氧条件下<sup>[10]</sup>。固氮酶催化的反应虽然是一个高度的能量消

耗和氧敏感的过程<sup>[11]</sup>，但是具有异形胞的蓝藻由于异形胞的特殊防氧结构使得在简单的营养和有氧条件下能够持续产氢，蓝藻的光产氢主要是依赖于固氮酶的活性<sup>[12]</sup>。

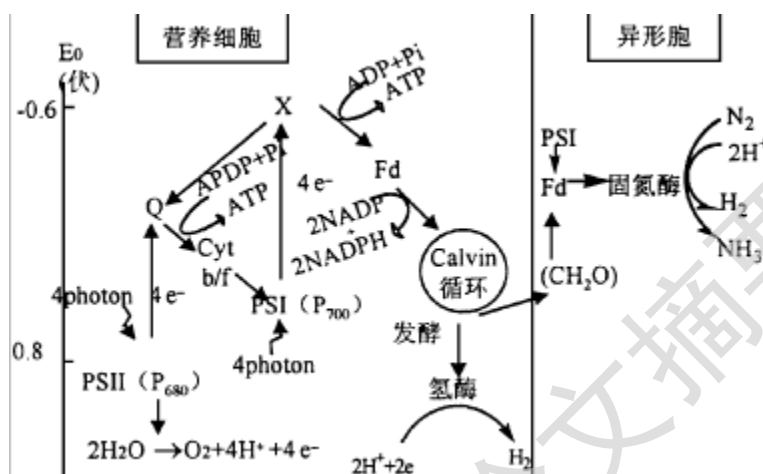


图 2. 蓝细菌的固氮产氢与氢酶产氢  
Fig.2 Process of hydrogen production by cyanobacteria

利用藻类光合制氢研究较多的是绿藻。这些藻类属真核生物,含光合系统 PS I 和 PS II,不含固氮酶,产氢代谢由体内的氢酶<sup>[13]</sup>调节。放氢反应主要从两条途径进行。一条途径是葡萄糖等底物经分解代谢产生还原剂作为电子供体,电子传递途径是:电子供体→PS I →Fd→氢酶→H<sub>2</sub>，同时伴随有 CO<sub>2</sub> 产生。另一条途径是光解水产氢,电子传递途径是: H<sub>2</sub>O→PS II →PS I →Fd→氢酶→H<sub>2</sub>,同时伴随着 O<sub>2</sub> 的生成(如图3)。光水解产氢途径是藻体直接利用太阳能,以水为底物的产氢。产氢过程所用的原料为水,其来源十分丰富,是一种理想的制氢方法。但是,水分解产生的 O<sub>2</sub> 会抑制氢酶的活性<sup>[14]</sup>,因此利用藻类等进行直接光解水 (direct biophotolysis process) 产氢尚有很大的难度。

目前主要采用间接生物光解水 (indirect biophotolysis process) 产氢方式,在时间上或是空间上将产 H<sub>2</sub> 和产 O<sub>2</sub> 过程分离开,以解决氢酶对氧敏感的问题。一步法间接生物光解水 (one-stage indirect biophotolysis process) 产氢:采用脱硫的培养基抑制 PS II 的作用,进而抑制了氧的产生,解除氧对产氢酶的抑制,从而实现持续产氢。两步法间接生物光解水 (two-stage indirect biophotolysis process) 产氢:将微生物体的培养过程和微生物的产氢隔离开来.在第一阶段进行普通的光

合作用,微生物体不断增殖,并积累大量有机物质.第二阶段是光驱动产氢,该过程处在无氧条件下,首先在暗处诱导氢酶的合成,然后辅以适当的光照,以提供产氢所需的能量。总之微藻光水解制氢的研究近来有较大进展,但与实用运用还有较大的距离。特别是在微藻的光能利用率<sup>[15, 16]</sup>、O<sub>2</sub> 对氢酶的抑制<sup>[14]</sup>, 光生物反应器构建等问题上还需要更进一步的深入研究<sup>[14]</sup>。

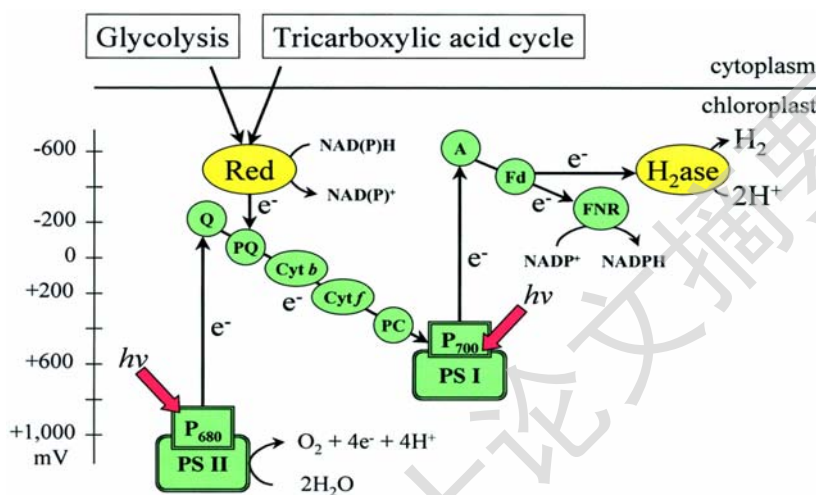


图 3. 绿藻的光解水制氢电子传递途径

Fig.3 Electron transfer pathway of biophotolysis hydrogen production in algae

60 多年来,人们对光合法生物制氢技术开展了大量的研究工作,如 Miyake<sup>[17]</sup>采用类球红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 8703 以乳酸为底物得到了非常高的产氢效率 (10.4 mmol/g drycell·h) ; Sasikala<sup>[18]</sup>用海藻酸钙固定类球红细菌 *Rhodobacter sphaeroides* 以酿酒废水为底物进行连续培养方式光合制氢, 得到 3094 mL H<sub>2</sub>/L-废水的转化率; Kumar<sup>[19]</sup>对几株蓝细菌进行产氢比较研究,发现在间歇培养时鱼腥蓝细菌属 *Anabaena sp. CA* 的产氢速率较高 (1.4 mmol/g drycell·h) 。目前光合法生物制氢技术尚未得到理想的结果, 光合细菌和藻类的产氢能力及其对光能的转化效率都偏低, 产氢代谢过程的稳定性差而且光合法制取氢气需要充足的光能, 这些问题都限制了光合法生物制氢技术的发展。因此要使光合法生物制氢技术达到大规模的工业化生产水平, 很多问题仍有待于进一步研究解决。

## 1.2.2 发酵法生物制氢技术

人们利用发酵技术进行生产生活已经有上千年的历史，而利用发酵技术进行氢能的制备，只是近几十年的事情。与光合法生物制氢技术相比，发酵法生物制氢有许多优点：①发酵法制氢无需光源，不但可实现持续稳定制氢，而且反应装置的设计、操作、管理简单方便。②发酵产氢菌种的产氢能力要高于光合产氢菌种，而且发酵产氢菌种的生长速率通常也比光合产氢菌种快。③可生物降解的工农业有机废料都可能成为发酵法制氢的原料，来源广泛，成本低廉。④兼性的发酵产氢菌种更容易保存和运输。所以，发酵法生物制氢技术具有直接应用前景，是目前产业化制氢的首选方式。但纯菌种发酵、产氢活性低以及细胞固定化技术一直是工业化生产的主要制约因素。我国在细菌发酵制氢方面的研究发展较快，特别是哈尔滨工业大学采用的非固定化菌种制氢技术，突破了以往生物制氢技术必须采用纯菌种和固定技术的局限，首次实现中试规模连续流持续产氢，在产业化制氢研究道路上迈出坚实的一步。

### 1.2.2.1 发酵产氢细菌

目前，国际上对生物制氢技术的研究还停留在实验室阶段，寻找理想的产氢微生物是制约生物制氢技术工业化的核心因素。为了解决这个问题，国内外的研究者们围绕着①更高的氢气转化率和②更宽的底物利用范围的目标进行了大量的分离、筛选产氢细菌的工作，获得了数量众多的产氢微生物(表 1)<sup>[20]</sup>。

表1. 常见产氢细菌底物及转化率

Tab.1 Substrates and hydrogen yield of common hydrogen-producing bacteria

菌种	底物	转化率
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	葡萄糖、淀粉、 纤维二糖、蔗糖	2.2 mL/mL 葡萄糖 ;6 mL/mL 蔗糖 5.4 mL/mL 纤维二糖
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO39	糖蜜、葡萄糖	1.58 mL/mL 葡萄糖
<i>Enterobacter aerogenes</i> E. 82005		
<i>Clostridium sp strain no 2</i>	纤维素、半纤维素、 木聚糖、木糖	2.06 mL/mL 木糖 ; 2.36 mL/mL 葡萄糖
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	几丁质、虾壳	1.9 mL/mL GcNAc
<i>Clostridium butyricum</i>	葡萄糖、淀粉	2.3 mL/mL 葡萄糖

多年来的研究发现,产氢能力较为理想的主要是肠杆菌属和梭菌属，拟杆菌属和克雷伯氏菌属也有较高的产氢潜力，其纯培养发酵葡萄糖产氢的比产氢速率

大约在  $2\text{molH}_2/\text{mol}$  葡萄糖<sup>[21]</sup>。从产氢能力来看, Kumar 从树叶榨出物中分离得到一株阴沟肠杆菌 *Enterobacter cloacae* IIT-BT08, 在  $36^\circ\text{C}$  和  $\text{pH}6.0$  条件下, 得到的最大产氢速率为  $29.63\text{mmol H}_2/\text{g drycell}\cdot\text{h}$ <sup>[22]</sup>, 用椰子壳固定化后得到最大单位产氢速率为  $62\text{mmol H}_2/\text{L-culture}\cdot\text{h}$ <sup>[23]</sup>; Rachman<sup>[24,25]</sup> 将从厌氧产甲烷污泥中分离得到的产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes* HU101 及其突变体 AY-2, 在  $37^\circ\text{C}$  和  $\text{pH}7.0$  的条件下, 产氢  $58\text{mmol H}_2/\text{L-culture}\cdot\text{h}$  和  $101.5\text{mmol H}_2/\text{L-culture}\cdot\text{h}$ ; 上述结果均为目前世界同类指标中的最高值。此外, 任南琪<sup>[26]</sup> 等从生物制氢反应器的厌氧活性污泥中分离到了一株高效产氢细菌 B49, 其产氢能力为  $25.0\text{mmol H}_2/\text{g drycell}\cdot\text{h}$ , 是目前国内发现的具有最高产氢能力的发酵性细菌之一。

### 1.2.2.2 微生物发酵产氢的代谢途径

生物产氢的本质都是通过某种催化方式, 利用能量促使质子和电子发生反应, 将质子还原成分子氢。对于发酵产氢来说, 就是发酵产氢微生物 (HPFB) 利用一系列生理生化反应中生成的能量, 通过体内的氢酶体系进行催化, 实现  $2\text{H}^+ + 2\text{e} \xrightarrow{\text{H}_2\text{ase}} \text{H}_2$  的反应, 生成分子氢。

不同的 HPFB 产氢, 区别在于采取不同的能量获得方式、不同的能量传递方式和不同的催化体系。

复杂碳水化合物经水解后生成单糖, 通过糖酵解途径生成丙酮酸。在厌氧微生物中, 将单糖酵解为丙酮酸的过程是无氧参与的。至今发现在微生物中的糖酵解为丙酮酸的途径主要有 EMP (Embden-Meyerhof-Parnas) 途径、HMP (hexose monophosphate) 途径、ED (Entner-Doudoroff) 途径和 PK (phosphoketolase) 途径 4 种。丙酮酸经发酵后转化为乙酸、丙酸、丁酸或乳酸等。在无氧条件下, HPFB 的产能代谢过程仅依赖于底物水平磷酸化, 在有机物氧化过程中, 辅酶  $\text{NAD}^+$  或  $\text{NADP}^+$  接受氢质子 (同时接受电子) 后, 形成的  $\text{NADH}$  或  $\text{NADPH}$  不能通过电子传递系统得以氧化。然而, 在微生物体内, 辅酶  $\text{NAD}^+$  (或  $\text{NADP}^+$ ) 的量是有限的, 所以, 若要使代谢过程不断进行下去,  $\text{NADH}$  (或  $\text{NADPH}$ ) 必须得以再生。发酵细菌的这一再生作用, 必须借助于包括丙酮酸或由丙酮酸而产生的其他有机化合物的氧化还原 (发酵作用) 机制来完成。由于细菌种类和多种特征性的末端代谢产物, 就形成了生物化学中不同的发酵类型, 具备不同的代谢途径来实现  $\text{NADH}$  (或  $\text{NADPH}$ ) 的再生。

厌氧发酵生物制氢过程有三种基本途径<sup>[27]</sup>：丁酸型发酵、混合酸型发酵、NADH（二核苷酸腺嘌呤尼克酰胺）途径，如图 4 所示。葡萄糖在厌氧条件下发酵，生成丙酮酸，同时产生大量的 NADH 和  $H^+$ ，当微生物体内的 NADH 和  $H^+$  积累过多时，NADH 会通过氢化酶的作用将电子转移给  $H^+$  释放分子氢。而丁酸型发酵和混合酸型发酵途径均发生于丙酮酸脱羧作用中，它们是微生物为解决这一过程中所产生的“多余”电子而采取的一种调控机制。

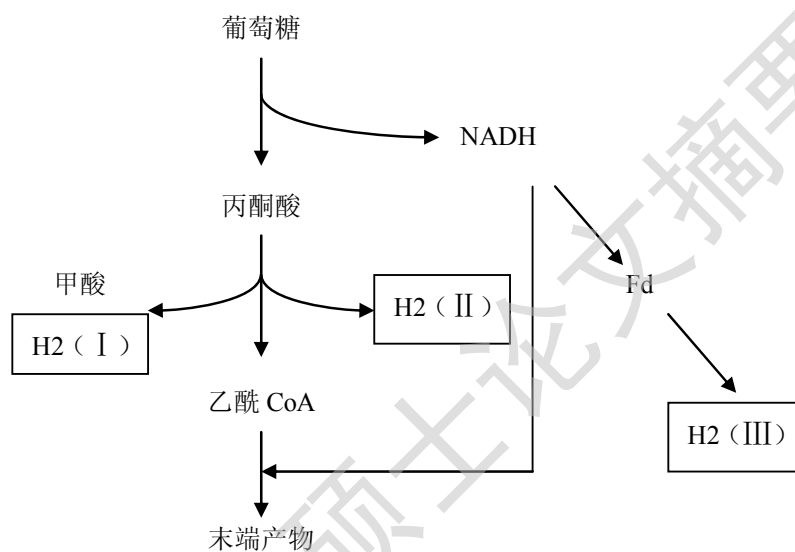


图 4. 厌氧发酵产氢的三种基本途径

I -混合酸型发酵途径； II-丁酸型发酵途径； III- NADH 途径  
 Fig.4 The metabolic pathway of H<sub>2</sub>-production fermentation route

①混合酸型发酵产氢途径。以混合酸发酵途径产氢的典型微生物主要有埃希氏菌属(*Escherichia*) 和志贺氏菌属(*Shigella*) 等,主要末端产物有乳酸、乙酸、琥珀酸、甲酸等多种有机酸以及  $H_2$ 、 $CO_2$  和乙醇等 (图 5)<sup>[29]</sup>。混合酸型发酵通过 EMP 途径酵解六碳糖。除了琥珀酸是在磷酸烯醇式丙酮酸处分支路形成外,其余产物都是以丙酮酸为基质形成的。其中有三个主要的酶系: 乳酸脱氢酶、丙酮酸-甲酸裂解酶和  $\alpha$ -乙酰乳酸酶作用于丙酮酸, 各种产物的数量决定于相应酶系在微生物体内的酶活。其中形成的乳酸大部分是在混合酸发酵中乳酸脱氢酶催化形成的。任南琪等<sup>[28]</sup>提出的细菌乙醇型发酵类似于混合酸发酵的一个分支。其区别在于, 细菌乙醇发酵时产生的乙醇、乙酸和  $CO_2$  等的量相对高于混合酸发酵; 混合酸型发酵时有标志性的琥珀酸产生。

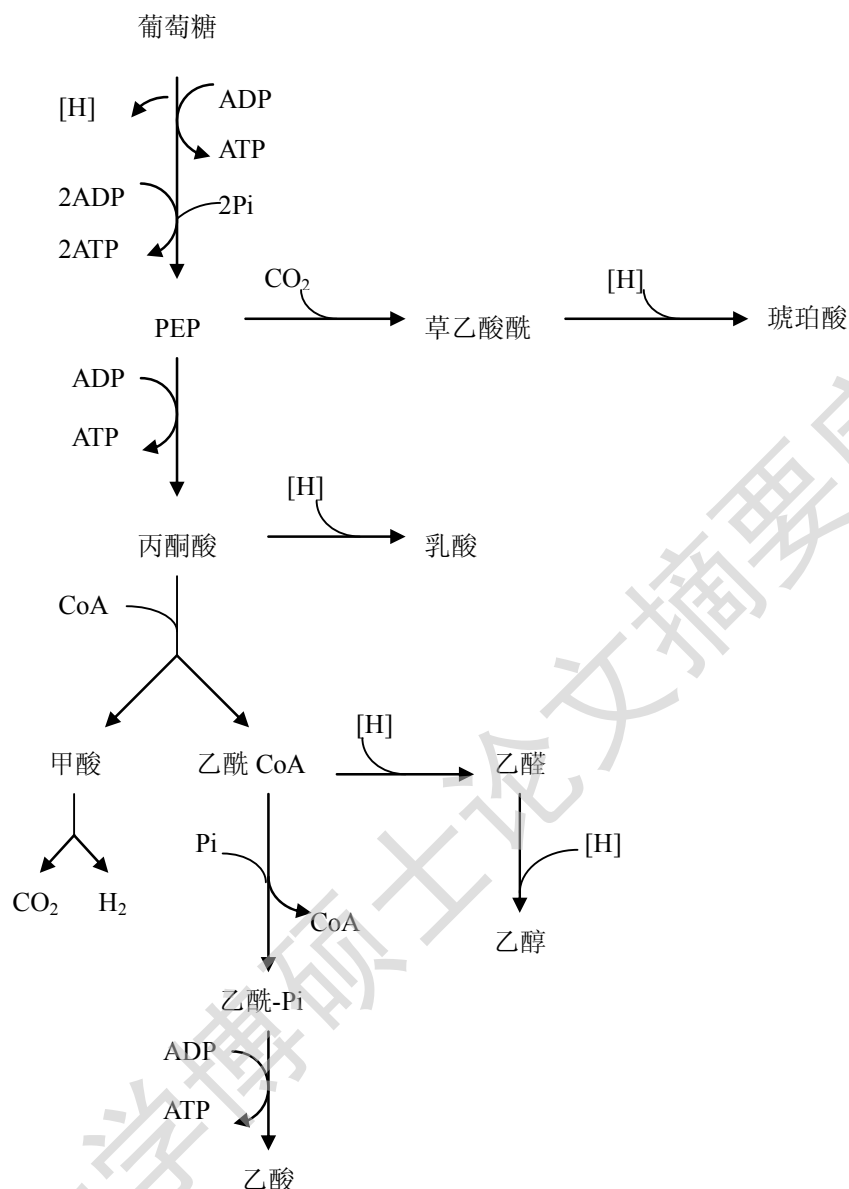


图 5. 混合酸型发酵产氢途径

Fig.5 Mix acid fermentation route

②丁酸型发酵产氢途径。目前已知进行丁酸型发酵的微生物都是专性厌氧细菌，典型微生物主要有:梭状芽孢杆菌属(*Clostridium*)、丁酸弧菌属(*Butyrivibrio*)等。如图 6 所示，它们也是通过 EMP 途径酵解六碳糖生成丙酮酸，在丙酮酸-铁氧还蛋白还原酶和丁酸激酶作用下生成丁酸、乙酸、CO<sub>2</sub> 和 H<sub>2</sub> 等<sup>[29]</sup>。而多数的丁酸发酵细菌如梭状芽孢杆菌、丙酮丁醇梭菌和拜氏梭菌等在环境条件改变（如 pH 降低）时，发酵产物往往从丁酸转变为正丁醇、丙酮或异丙醇等。Babl 等<sup>[30]</sup>证明在增加反应器中的丁酸浓度下，丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutyli-*

*cum* 发酵产生的丙酮和丁醇的浓度有所提高,但是这种作用只发生在 pH5.0 以上。这表明丁酸梭菌 *Clostridium butyricum* 进行的丁酸发酵只发生在 pH5.5 以上,此时丁酸才对丁酸梭菌的发酵进行抑制。

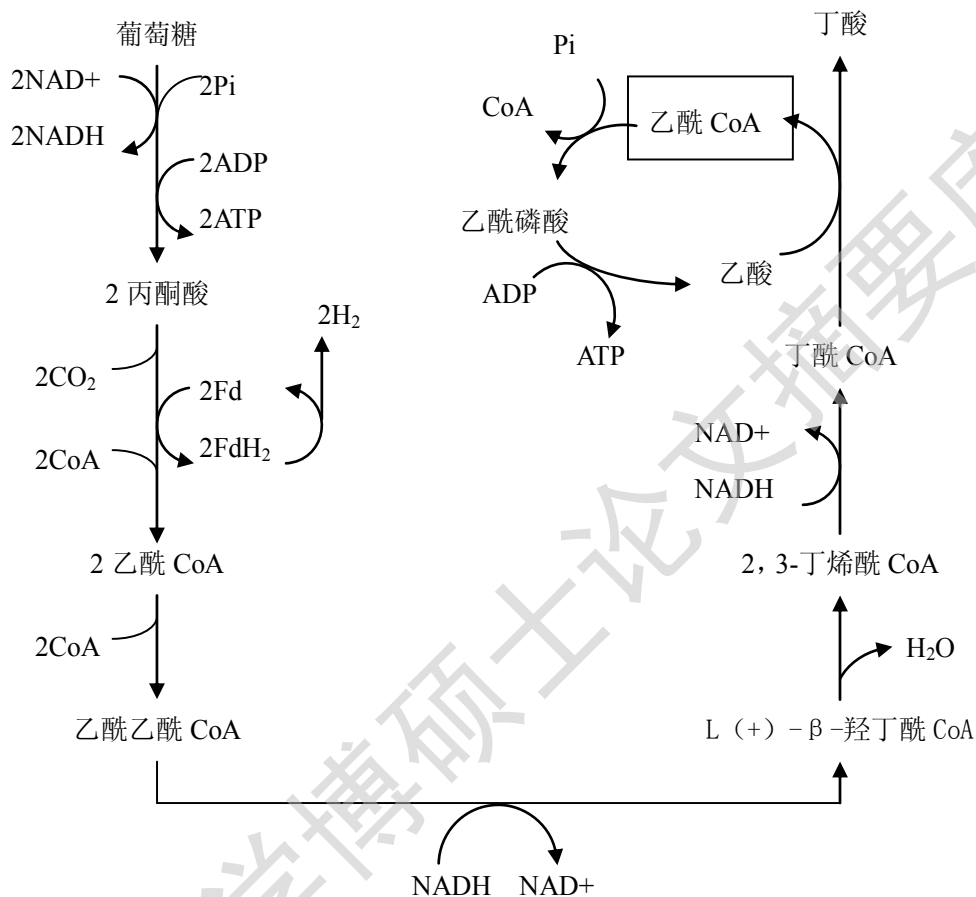


图 6. 丁酸型发酵产氢途径

Fig.6 Butyric acid fermentation route

③ NADH(二核苷酸腺嘌呤尼克酰胺) 途径。前两条途径通过发酵过程产生分子氢,是某些微生物为解决氧化还原过程中产生的“过剩”电子所采取的一种调节机制;而 NADH 途径则通过  $\text{NADH} + \text{H}^+ \rightarrow \text{H}_2 + \text{NAD}^+$  的反应来直接产生分子氢。在微生物的新陈代谢过程中,经 EMP 途径产生的 NADH 和  $\text{H}^+$  一般均可通过与丙酸、丁酸、乙醇或乳酸等发酵相耦联而得以再生,从而保证 NADH/ NAD<sup>+</sup> 平衡。但当 NADH 和  $\text{H}^+$  的再生相对于其形成较慢时,必然要产生 NADH 与  $\text{H}^+$  的积累。对此,生物有机体必须采取其他调控机制,如在氢化酶的作用下,通过释放分子氢以使 NADH 与  $\text{H}^+$  再生。



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库