

学校编码: 10384

分类号_____密级_____

学号: 21620121152319

UDC _____

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

产酸克雷伯氏菌 HP1 木糖异构酶/木酮糖激
酶过表达及耐氧氢酶的构建

Over-expression of Xylose isomerase/Xylulokinase and
Construction of O₂-tolerant hydrogenase in *Klebsiella*
oxytoca HP1

黄钢锋

指导教师姓名: 石艳 副教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2015 年 4 月 15 日

论文答辩时间: 2015 年 5 月 8 日

学位授予日期: 2015 年 月 日

答辩委员会主席: 陈清西 教授

评 阅 人: _____

2014 年 5 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈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其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(陈清西)课题(组)的研究成果,获得(陈清西)课题(组)经费或实验室的资助,在(酶学)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月

目 录

摘 要.....	1
Abstract	3
第一章 前言	5
1.1 生物制氢	6
1.1.1 光合产氢	6
1.1.2 暗发酵	9
1.1.3 暗发酵-光发酵联合发酵.....	12
1.2 氢酶.....	15
1.2.1 氢酶的类型	15
1.2.2 氢酶的结构特性及作用机制.....	16
1.2.3 氢酶的耐氧机制.....	25
1.3 本文研究目的与内容	27
第二章 产酸克雷伯氏菌 HP1 木糖异构酶/木酮糖激酶过表达工程菌株.....	29
2.1. 实验材料	30
2.1.1 菌株与质粒	30
2.1.2 引物.....	30
2.1.3 培养基	30
2.1.4 菌体培养	30
2.1.5 主要试剂及试剂配方	31
2.1.6 主要仪器	33
2.2 实验方法	34
2.2.1 全基因组测序	34
2.2.2 木糖异构酶(<i>xyIA</i>)和木酮糖激酶(<i>xyIB</i>)结构基因克隆.....	34
2.2.3 木糖异构酶(<i>xyIA</i>)和木酮糖激酶(<i>xyIB</i>)基因过表达.....	36

2.2.4 重组菌株厌氧发酵产氢.....	39
2.2.5 重组菌株木糖异构酶和木酮糖激酶活性检测	39
2.2.6 竹粉纤维素的预处理及水解	40
2.3 结果与分析	42
2.3.1 产酸克雷伯氏菌基因组分析	42
2.3.2 木糖操纵子分析.....	43
2.3.3 <i>K. oxytoca</i> HP1 中木糖产氢的代谢途径分析	45
2.3.4 表达质粒载体构建.....	46
2.3.5 蛋白表达 SDS-PAGE 检测	48
2.3.6 木糖异构酶和木酮糖激酶活性分析.....	50
2.3.7 重组菌株暗发酵产氢.....	51
2.4 讨论.....	58
2.4.1 木糖异构酶和木酮糖激酶在产酸克雷伯氏菌 HP1 中的表达	58
2.4.2 发酵产氢	58
第三章 产酸克雷伯氏菌 HP1 耐氧氢酶的构建及其耐氧机制研究..	60
3.1 实验材料	61
3.1.1 菌株与质粒	61
3.1.2 引物.....	61
3.2 实验方法	62
3.2.1 氨基酸点突变质粒构建.....	62
3.2.2 突变菌株发酵产氢及酶活检测.....	67
3.2.3 紫外光解水产氢.....	68
3.3 结果与分析	69
3.3.1 氢酶氨基酸点突变.....	69
3.3.2 突变菌株耐氧性分析.....	76
3.3.3 氢酶突变体体外催化光解水产氢分析	78
3.4 讨论	80
3.4.1 Fe-S 簇附近关键突变位点的推断	81
3.4.2 突变体在细胞内外的耐氧性	82
3.4.3 产酸克雷伯氏菌 HP1 氢酶 3 的耐氧机制	83
结论与展望	85

参考文献	87
英文缩略语表	100
攻读硕士期间发表论文及所获荣誉	102
致 谢	103

厦门大学博硕士论文摘要库

Contents

Abstract in Chinese	1
Abstract in English	3
1 Introduction	5
1.1 Biohydrogen	6
1.1.1 Photosynthetic biohydrogen	6
1.1.2 Dark fermentation	9
1.1.3 Dark-photo fermentation	12
1.2 Hydrogenase	15
1.2.1 Classification	15
1.2.2 Stucture and action mechnism	16
1.2.3 O ₂ -tolerant mechnism.....	25
1.3 Purposes and contents	27
2 Improving the hydrogen production by over-expression of Xylose isomerase/Xylulokinase in <i>K. oxytoca</i> HP1	29
2.1. Meterials	30
2.1.1 Strains and plasmids.....	30
2.1.2 Primers.....	30
2.1.3 Mediums	30
2.1.4 Strain incubation	30
2.1.5 Reagents	31
2.1.6 Instruments	34
2.2 Methods	35
2.2.1 Genome Sequencing.....	35
2.2.2 Gene cloning of Xylose isomerase (<i>xyIA</i>) and xylulokinase (<i>xyIB</i>)	35
2.2.3 Over-expression of Xylose isomerase (<i>xyIA</i>) and xylulokinase (<i>xyIB</i>)	37

2.2.4 Hydrogen production by anaerobic fermentation	39
2.2.5 Xylose isomerase and xylulokinase activity assay	39
2.2.6 Pretreatment and hydrolysis of bamboo powder	41
2.3 Results and Analysis.....	42
2.3.1 Genome sequence of <i>K. oxytoca</i> HP1	42
2.3.2 Xylose operon analysis.....	43
2.3.3 The analysis of xylose metabolic pathway for hydrogen production in <i>K. oxytoca</i> HP1	45
2.3.4 Construction of expression plasmid.....	46
2.3.5 Protein expression detection by SDS-PAGE.....	49
2.3.6 Xylose isomerase and xylulokinase activity assay	50
2.3.7 Dark fermentation by recombinant strains	51
2.4 Discussion	58
2.4.1 Expression of xylose isomerase and xylulokinase in <i>K. oxytoca</i> HP1.....	58
2.4.2 Fermentative hydrogen production	58
3 Construction O₂-tolerant hydrogenase variants and O₂-tolerant mechanism study.....	60
3.1 materials	61
3.1.1 Strains and plasmids.....	61
3.1.2 Primers.....	61
3.2 Methods	62
3.2.1 Construction of site-directed mutation plasmids	62
3.2.2 Dark fermentation and enzyme activity assay	67
3.2.3 UV light-driven H ₂ production from water	68
3.3 Results and analysis.....	69
3.3.1 Site-directed mutation	69
3.3.2 O ₂ -tolerant assay for variants.....	76
3.3.3 Activity analysis of variants in UV light-driven H ₂ production from water	78
3.4 Discussion	80
3.4.1 Inferencing key Cys sites near Fe-S clusters.....	81
3.4.2 O ₂ -tolerance of variants in vivo and in vitro levels	82

3.4.3 The O ₂ -tolerant mechanism of <i>K. oxytoca</i> HP1 Hydrogenase 3	83
Conclusion and Outlook	85
References.....	87
Abbreviations	100
Publications and honors during Master study	102
Acknowledgements	103

厦门大学博硕士论文摘要库

摘要

在石化燃料枯竭和全球气候变暖的双重危机下，氢气作为一种可再生、零排放和高热值的清洁能源载体而备受关注。关于氢能的研究主要围绕氢的制取和氢的利用两个方面展开。在众多制氢方式中，生物制氢因其生产成本低、原料来源丰富和环境污染小，从而成为制氢研究的热点。在氢的利用中，燃料电池技术一直以来都是研究的重点。氢酶是一种含金属的氧化还原酶，其广泛存在于微生物中，能够可逆地催化 H^+ 的还原和 H_2 的氧化($2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$)。无论是在氢的制取还是氢的利用中，氢酶都是氢能技术的核心之一。

Klesiella oxytoca HP1 具有高效产氢的特性，且生长迅速，可用于大规模发酵产氢。纤维素是世界上最丰富的生物质资源，也是微生物发酵制氢的理想底物。虽然，*Klesiella oxytoca* HP1 单独发酵纤维素水解液中的葡萄糖或木糖的效率较高，但无法高效地直接利用纤维素水解物混合液，这增加了发酵工艺的复杂度、降低了发酵过程的转化率。为此，本文构建了 *Klesiella oxytoca* HP1 木糖异构酶和木酮糖激酶的过表达菌株，来提高 *Klesiella oxytoca* HP1 直接利用纤维素水解物混合液发酵产氢的效率，并消除或降低葡萄糖抑制效应对水解物混合液中木糖利用的阻遏。结果表明，过表达菌株 HP1/*xyIA* 和 HP1/*xyIB* 单独发酵木糖的产氢效率分别达到了 $2.46 \pm 0.05 \text{ mol-H}_2/\text{mol-Xylose}$ 和 $1.93 \pm 0.05 \text{ mol-H}_2/\text{mol-Xylose}$ ，发酵竹粉水解液的产氢效率也分别提高了 41.31% 和 33.04%。这说明过表达木糖异构酶和木酮糖激酶有效提高了暗发酵的产氢效率，并在很大程度上削弱了葡萄糖抑制效应。

Klesiella oxytoca HP1 氢酶 3 具有一定的耐氧能力，本文对氢酶 3 的耐氧性进行了探究。通过同源比对和定点突变分析，我们发现在氢酶 3 小亚基近端 Fe-S 簇附近增加额外的 Cys 可以提高其耐氧能力。结果表明，Gly47、Gly50、Gly113 和 Gly120 是关键 Cys 突变位点。突变菌株 Gly47Cys, Gly50Cys, Gly113Cys, Gly120Cys 和 Gly50Cys-Gly120Cys 的耐氧产氢能力分别提高了 46.99%, 42.15%, 59.19%, 44.74% 和 78.72%。另外，突变型氢酶 3(Gly47Cys, Gly50Cys, Gly113Cys, Gly120Cys 和 Gly50Cys-Gly120Cys) 在光解水产氢试验中的活性也得到了大幅的

提升。这表明 *Klesiella oxytoca* HP1 氢酶 3 小亚基近端 Fe-S 簇附近额外的 Cys 对其耐氧能力有重要影响,为进一步开发高耐氧氢酶突变体和探究氢酶耐氧机制提供了理论基础。

关键词: 产酸克雷伯氏菌 HP1; 木糖异构酶; 木酮糖激酶; 过表达; 耐氧氢酶。

厦门大学博硕士论文摘要库

Abstract

Facing energy crisis and global warming, the clean energy carrier H₂ has been a hot spot with characters of renewability, zero-emission and high energy yield. Research on hydrogen energy mainly focuses on hydrogen production and hydrogen application. Among all hydrogen production modes, biohydrogen production has become a promising method because of its low cost, abundant source of raw materials and less environmental pollution. Hydrogenase is a kind of metal-containing oxidoreductase, which widely exists in microorganisms, catalyzing the reversible reaction of H⁺ reduction and H₂ oxidation ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \leftrightarrow \text{H}_2$). Hydrogenase is one of key factors in both biohydrogen production and hydrogen application.

With characters of high hydrogen production efficiency and rapid growth, *Klebsiella oxytoca* HP1 can be easily applied to large-scale fermentation hydrogen production. Cellulose is the most abundant biomass resources, and it is also ideal for hydrogen production by microbial fermentation as substrate. Although *Klebsiella oxytoca* HP1 has high efficiency in fermentation of separate glucose or xylose, it can not efficiently use cellulose hydrolyzate mixture, which increases the complexity of the fermentation process and reduces the conversion rate of substrate during the fermentation process. Therefore, recombinant strains with overexpression of xylose isomerase and xylulokinase were constructed to improve hydrogen production efficiency of cellulose hydrolyzate mixture fermentation and to eliminate or reduce glucose inhibitory effect on repressing xylose utilization in cellulose hydrolyzate mixture. Results showed that separate xylose fermentation rates of overexpression strains HP1/xy/A and HP1/xy/B reached 2.46 ± 0.05 mol-H₂/mol-Xylose and 1.93 ± 0.05 mol-H₂/mol-Xylose respectively, and that of bamboo powder hydrolyzate mixture were also increased by 41.31% and 33.04% respectively. This meant that overexpression of xylose isomerase and xylulokinase could effectively improve the efficiency of dark fermentation, and largely weaken glucose inhibitory effect.

Klesiella oxytoca HP1 hydrogenase 3 has a certain capacity of resisting to oxygen, and O₂-tolerance of hydrogenase 3 has been studied in this work. With homologous alignment and site-directed mutagenesis analysis, we found that adding extra Cys next to proximal Fe-S clusters in hydrogenase 3's small subunit could improve its O₂-tolerance. Results showed that Gly47, Gly50, Gly113 and Gly120 were critical Cys mutation sites, and O₂-tolerant abilities of mutant strains Gly47Cys, Gly50Cys, Gly113Cys, Gly120Cys and Gly50Cys-Gly120Cys were increased by 46.99%, 42.15%, 59.19%, 44.74% and 78.72% respectively. In addition, variants (Gly47Cys, Gly50Cys, Gly113Cys, Gly120Cys and Gly50Cys-Gly120Cys) displayed higher activity in UV light-driven H₂ production from water. This indicated that the extra Cys near proximal Fe-S clusters in small subunit had significant impact on its O₂-tolerance, which provided a theoretical foundation for further development of highly O₂-tolerant variants and exploration of O₂-tolerant mechanisms.

Keywords: *Klesiella oxytoca* HP1; xylose isomerase; xylulokinase; overexpression; O₂-tolerant hydrogenase.

第一章 前言

自工业革命以来,化石能源一直是人类文明迅速发展的基石,所取得的巨大成就很大程度上建立在石油、煤炭等化石燃料的急剧消耗上^[1,2]。进入 21 世纪以来,随着全球经济的不断发展,各国对能源的需求更是倍增。目前,石油、天然气和煤炭仍是主要的三大能源,但这些化石燃料不可再生且数量有限,按现在的开采速度,这三大能源仅能为人类供能 200 年左右^[1]。这种局面已严重威胁着各国经济的可持续发展和国家安全,各国对化石燃料资源的争夺愈演愈烈,甚至引起战争,是和平与发展的重要隐患。另一方面,这些年来化石燃料的过度使用对气候、环境和健康等方面的影响日益严重,人类的生存与发展正面临全球变暖、环境恶化、生态破坏和地质灾害的巨大挑战^[3-6]。在全球性的能源短缺及气候变化背景下,节能减排固然重要,但开发可再生的清洁能源以替代不断枯竭的传统能源才是解决能源危机的根本所在,也是维系人类社会可持续发展的迫切需求。

当前的可再生能源(新能源)主要有太阳能、风能、水能、生物能、矿物能、地热能、潮汐能、核能、和氢能^[7-11]。其中,对太阳能的开发和利用最早最广泛,且已形成相当的产业规模,资源丰富、分布广泛、清洁环保等优势使其成为新能源家族中的重要一员,然而其能量转换率低、设备成本高、稳定性差等劣势也十分突出。风能和水电同样作为可再生能源,但其利用往往依赖于特定的地理和气候条件,这就大大地制约了它们的广泛应用。近年来,矿物能、地热能和潮汐能等新能源得到了较大的开发,但目前的能源技术仍未成熟,转化率低、开发成本高等问题亟待解决。核能的利用潜力十分广阔,且能效高,技术也日渐完善,但核反应堆的安全问题和核废料的处理问题仍是其最大的制约因素。相对而言,生物质能(利用酶或微生物发酵等将生物质材料转化成能源,如生物乙醇、生物柴油、生物沼气和生物氢等)是一个极佳的选择,其低成本、低污染、高热值、易生产、来源丰富等特点使其受到广泛的关注和研究^[12-18]。

氢能源除了可再生、零排放、高化学活性、低运输损耗、高储量外,还具有极高的能量质量比,可达 122 kJ/g,平均是其他碳氢燃料的 2.75 倍^[19]。同时,氢能源可向其他形式的能源转化(如电能、热能等),特别是氢燃料电池可以为汽

车、火车、飞机及其他移动设备提供能量，且比电能有更长的储存周期，它的无毒性和安全性也更好。现阶段的氢气 48% 来源于天然气，30% 来源于石油，18% 来源于煤炭，4% 来源于电解水。催化性的石化燃料蒸汽法、非催化性的石化燃料部分氧化法和煤气化法是目前主要的氢气制备方法^[20]。然而，这些化学制备方法需要高压、高温，不仅能耗大，还排放大量的污染物。这既消耗了化石燃料，也对环境造成了一定污染，有些得不偿失。电解水制氢是最清洁的氢气制备方式，但是耗电成本占了氢气实际生产费用的 80%，在高电价地区的氢气制备电成本过高。相对而言，生物制氢主要通过微生物发酵产生，发酵底物来源广泛（如纤维素类物质、工农业废水、食品加工废料等），既无需依赖煤、石油、天然气等初级燃料，也不需高温、高压等条件，更能减少能耗和环境污染。因此，在诸多生物质能中，生物氢以其独特的优点成为生物质能研究和开发的一个重要方向。

1.1 生物制氢

生物制氢主要依赖于氢酶的催化功能，其可逆地催化 H_2 的氧化和 H^+ 的还原，反应如下： $2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$ ^[21]。目前，生物制氢方式主要有以下 3 种^[22]：（1）光合产氢；（2）暗发酵；（3）暗-光联合发酵。每种制备方法都有各自的优势和劣势^[23]。生物光解的底物来源丰富（水），产物简单（ H_2 和 CO_2 ），但光能转化率低、氢酶对氧敏感性率高、非透水性反应装置昂贵。光发酵可以完全将有机酸废料转化为 H_2 和 CO_2 ，可以作为一种潜在的废水处理方式，但光能转化率低、固氮酶对能量需求高、非透水性反应装置昂贵。暗发酵无需光能输入，多种能源作物和有机废水都可以作为发酵底物，反应装置简单，发酵速率较高，但发酵效率较低，副产物多。虽然暗-光联合发酵可以充分利用发酵底物，提高了发酵效率，但整个工艺流程复杂，发酵过程易被染菌而影响整个发酵进程。

1.1.1 光合产氢

光合微生物可以将光能转化为化学能，并以 H_2 的形式储存。光合微生物的光合产氢途径有两种：（1）产氧光合产氢途径，电子来源于水；（2）非产氧光合产氢途径，电子来源于除水以外的有机或无机基质。前者存在于蓝细菌和藻类中，光合系统 II(PSII)裂解 H_2O 产生 O_2 和 e^- ，所产生的 e^- 通过质体醌(plastoquinone)

转移至光合系统 I(PSI)。PSI 再转移 e^- 至铁氧还蛋白(Fd)中, Fd 将 e^- 传递给固氮酶(蓝细菌)或[FeFe]-Hydrogenase(藻类)。Fd 电子也可以通过 Fd 氧化还原酶转移到 $NAD(P)^+$ 形成 $NAD(P)H$, 再由 $NAD(P)H$ 将 e^- 传递给[NiFe]-Hydrogenase(蓝藻)。最终, 固氮酶($N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP$)和氢酶($2H^+ + 2e^- \leftrightarrow H_2$)催化 H^+ 和 e^- 产生 H_2 。蓝细菌和藻类的产氧光合产氢途径如图 1 所示:

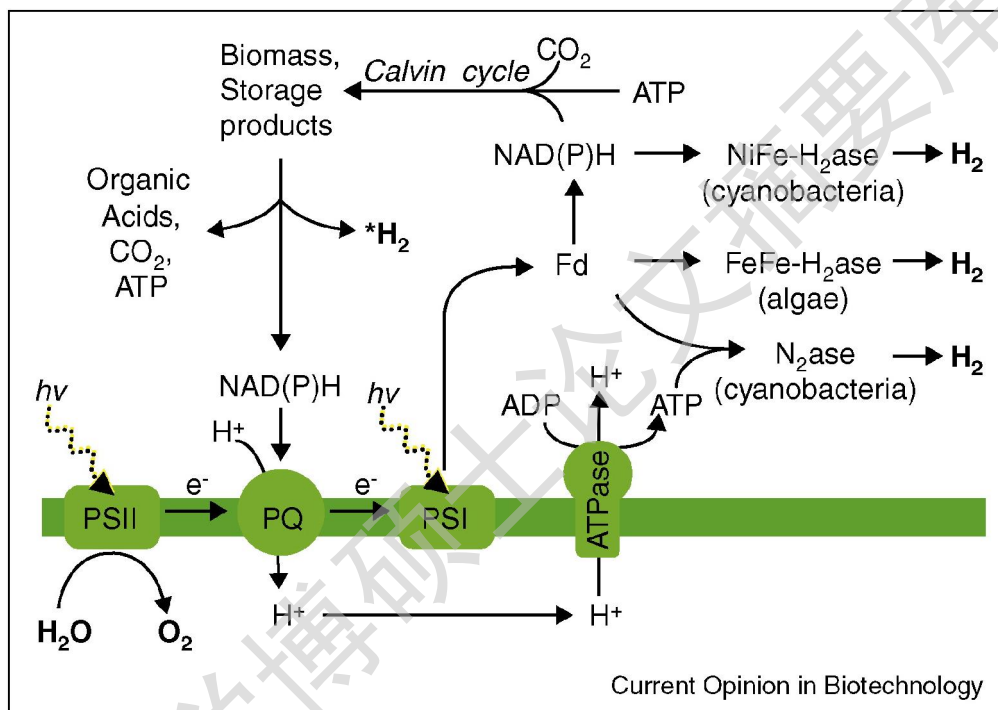


图 1 蓝细菌和藻类的产氧光合产氢途径^[24]

Fig. 1 The pathway of oxygenic photo- H_2 production in cyanobacteria and algae^[24]

产氧光合产氢途径的优势在于: (1) 所需电子来自 H_2O , 整个过程无碳排放; (2) 水资源相对丰富, 易获取, 成本低; (3) 产氢过程中 CO_2 被消耗。然而, 产氧光合产氢中最大的问题在于氢酶和固氮酶都对 O_2 极其敏感, 易遇氧失活。解决这一问题主要从两个方面着手, 一是降低氢酶和固氮酶的氧敏感性, 二是将光合作用与 H_2 的合成进行空间或时间上的分离。空间上的分离指固氮酶催化 H_2 的合成过程在蓝细菌的异形胞中进行, 而时间上的分离是指将光合作用积累的化合物经厌氧发酵产生 H_2 (例如充氩气形成无氧环境) 或在光照条件下使用 PSII 受损的菌株^[24]。目前, 大部分的研究着力于第二方面。非产氧光合产氢途径存在于紫色非硫细菌(PNSB)中, 合成 H_2 所需的 e^- 来自除水以外的底物, 不伴随 O_2 的释放,

Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts 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 for delivery details.