



# 人工光照条件下深红红螺菌的氢代谢途径

朱瑞艳<sup>①②③</sup>, 李季伦<sup>①\*</sup>

① 中国农业大学生物学院, 农业生物技术国家重点实验室, 北京 100193;

② 燕山大学环境与化学工程学院, 秦皇岛 066004;

③ 河北省生物新能源工程技术研究中心, 秦皇岛 066004

\* 联系人, E-mail: [lijulun@cau.edu.cn](mailto:lijulun@cau.edu.cn)

2009-03-25 收稿; 2009-07-08 接受

国家高技术研究发展计划资助项目(编号: 2006AA05Z108)

**摘要** 深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)在不同培养条件下分别有多种酶参与氢的代谢. 为研究 *R. rubrum* 在人工光照条件下氢代谢途径及各代谢途径对光合产氢的贡献, 分别构建了3个缺失突变株: Fe-固氮酶缺失单突变株、Fe-固氮酶和 Mo-固氮酶双缺失突变株以及吸氢酶和 Fe-固氮酶双缺失突变株. 比较 *R. rubrum* 野生型菌株、吸氢酶缺失单突变株及所构建3个突变株的固氮酶活性及光合氢产量. 结果表明, 在人工光照条件下, Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶是 *R. rubrum* 产氢的关键酶; 除 Fe-和 Mo-固氮酶外还有第3种途径参与氢代谢, 该代谢途径产生的氢气量较小. Mo-固氮酶、Fe-固氮酶和第3种途径对光合产氢的贡献率分别为 93.5%, 4.9% 和 1.5%; 吸氢酶消耗 13.3% 的氢气. 甲酸裂解氢酶活性测定表明, 第3种产氢途径并非由甲酸裂解氢酶介导, 而可能是一种未知酶参与人工光照条件下 *R. rubrum* 的氢代谢.

**关键词**深红红螺菌  
氢代谢途径  
Mo-固氮酶  
Fe-固氮酶  
吸氢酶

深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)是一种紫色非硫光合细菌, 广泛应用于生物固氮研究<sup>[1-3]</sup>, 同时也是首个被发现能够利用多种有机酸进行产氢的光合细菌<sup>[3-5]</sup>. 在光合细菌中有多种酶参与氢代谢<sup>[6-8]</sup>, *R. rubrum* 中的氢代谢途径更加多样<sup>[9,10]</sup>. 固氮酶是 *R. rubrum* 产氢的关键酶, 固氮酶催化将质子还原成氢气伴随着生物固氮过程. 在纯氮气分下, Mo-固氮酶只有 25% 的电子用于质子的还原, 因此 Mo-固氮酶的产氢效率比固氮效率低<sup>[11]</sup>. Mo-固氮酶催化的生物固氮反应计量式为(Mo-固氮酶或 Fe-固氮酶催化的反应都需要 ATP):  $N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16MgATP \rightarrow 2NH_3 + H_2 + 16MgADP + 16P_i$ .

在 *R. rubrum* 中存在两套固氮酶系统, 根据活性中心原子种类的差异可分为 Mo-固氮酶(由 *nifHDK* 编码)和 Fe-固氮酶(由 *anfHDGK* 编码)<sup>[12-14]</sup>. Fe-固氮酶在化学性质、物理性质和催化活性上与 Mo-固氮酶都

存在差异. Fe-固氮酶比 Mo-固氮酶具有更高的质子还原能力, 在纯氮气分下, Fe-固氮酶将 75% 的电子用于质子还原而 25% 的电子用于氮气还原. Fe-固氮酶催化质子和氮气还原的电子分配化学计量式为:  $N_2 + 24e^- + 24H^+ \rightarrow 2NH_3 + 9H_2$ . 然而, 无论是 Mo-固氮酶还是 Fe-固氮酶, 在不存在固氮酶的底物-氮气时, 供给固氮酶的所有电子都将用于质子的还原. 在培养体系中存在 CO 时, 发现了 *R. rubrum* 的另外一条氢产生途径, 其化学计量式为:  $CO + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2$ <sup>[15,16]</sup>; 此外以丙酮酸作为碳源黑暗培养 *R. rubrum* 时发现该菌也具有产氢活性, 推测此条件下的产氢是细胞释放过多还原力的一种方式<sup>[16-18]</sup>.

*R. rubrum* 中的吸氢酶为异源二聚体<sup>[1,19]</sup>, 能够将氢气催化成为质子和电子; 催化中心位于大亚基(由 *hupL* 编码), 而小亚基(由 *hupS* 编码)介导电子从活性中心转移到外源电子受体<sup>[20]</sup>. 在限氮光合培养

**引用格式:** 朱瑞艳, 李季伦. 人工光照条件下深红红螺菌的氢代谢途径. 科学通报, 2009, 54: 3320~3325Zhu R Y, Li J L. Hydrogen metabolic pathways of *Rhodospirillum rubrum* under artificial illumination. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0706-1

过程中, 吸氢酶随固氮酶一同表达<sup>[10]</sup>.

尽管在各种培养条件下多种酶参与 *R. rubrum* 的氢代谢, 但是在人工光照条件下的氢代谢途径及每条代谢途径对产氢的贡献尚未有定论. 本研究通过阻断 *R. rubrum* 主要氢代谢途径发现在人工光照条件下至少有 3 种酶参与氢气产生, 1 种酶参与氢气的吸收.

### 1 材料与方法

( ) 菌株及培养条件. 本研究所用到的菌株及质粒见表 1. 将 *R. rubrum* 接种于 SMN 培养基中, 于 30 振荡培养<sup>[21]</sup>. 固氮酶脱阻遏 MG 培养基(苹果酸-谷氨酸钠培养基)包含 7 mmol/L 谷氨酸钠和 30 mmol/L 苹果酸<sup>[13]</sup>. 4 mL SMN 对数生长期培养物接种于装有 120 mL MG 培养基的 125 mL 厌氧瓶中, 厌氧瓶由橡胶塞密闭后置于光照条件下培养, 光照强度为 2000~2500 lux (光照由超反射灯泡提供); 培养温度控制为 30~32 . 为方便收集氢气避免厌氧瓶中压力过大造成厌氧瓶破裂, 在厌氧瓶顶部预留有 1 mL 的空隙, 50 mL 气密注射器插入橡胶塞达到厌氧瓶上层空间用于气体的收集.

表 1 菌株和质粒

菌株和质粒	基因型	来源
<i>R. rubrum</i>		
UR2	野生型; Sm <sup>r</sup>	[21]
UR801	$\Delta hupL::aacC1$ , Sm <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	[23]
UR802	$\Delta anfDG::aacC1$ , Sm <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	本研究
UR206	<i>nifH::kan</i> , Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup>	[22]
UR803	<i>nifH::kan</i> $\Delta hupL::aacC1$ , Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	本研究
UR804	<i>nifH::kan</i> $\Delta anfDG::aacC1$ , Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	本研究
质粒		
pRYZ1	pSUP202 带有 2.7-kb <i>hupL::aacC1</i> 片段, Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	[23]
pRYZB	pSUP202 带有 3.3-kb $\Delta anfDG::aacC1$ 片段, Ap <sup>r</sup> Cm <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	本研究

克隆载体的宿主 *E. coli* DH5 $\alpha$  和接合转移供体 *E. coli* S17-1 于 LB 培养基中 37 振荡培养. 抗生素的使用浓度为( $\mu$ g/mL): *R. rubrum*, 硫酸链霉素(Sm), 100; 庆大霉素 (Gm), 10; 卡那霉素(Km), 12.5; 奈啶酮酸(Nx), 20; 氯霉素(Cm), 5; *E. coli*, 氨苄霉素(Ap), 100; 氯霉素, 25; 庆大霉素, 5; 卡那霉素, 50; 四环素(Tc), 12.5.

( ) *anfDG* 缺失突变株的构建. *R. rubrum* 缺

失突变株的筛选策略为同源双交换. 以基因组 DNA 为模板分别克隆 1.2-kb *anfDG* 的 5'侧翼(带有引入的 *Bam*H 和 *Sac* 酶切位点)和 3'侧翼(带有引入的 *Sac* 和 *Sph* 位点). 克隆 *anfDG* 5'侧翼所用引物为 5'-CGG ATCCGCGCTTCGTACCAAACGG-3'和 5'-CGAGCTCTGGTTGCGTGCTCCTTAACG-3'; 克隆 *anfDG* 3'侧翼所用引物为 5'-CGAGCTCAATCGCCTCGTCCTC GG-3'和 5'-GGCATGCTCCATGTCGGTGAACAGGG-3'.

将克隆并测序的 5'侧翼和 3'侧翼插入到载体 pSUP202的 *Bam*H 和 *Sph* 位点, 得到载体 pRYZA, 然后将来自 pUCGM 的片段 *aacC1* (编码 Gm<sup>r</sup>)插入到 pRYZA 的 *Sac* 位点得到自杀载体 pRYZB (图 1). 将 pRYZB 转入到 *E. coli* S17-1, 并通过接合转移方式将 pRYZB 转入到 *R. rubrum* UR2 和 UR206 (*nifH*)中<sup>[22]</sup> 培养 7~10 d 后筛选 Nx<sup>r</sup>Gm<sup>r</sup>Cm<sup>s</sup> *R. rubrum* 双交换菌落 (Cm<sup>r</sup> 由 pSUP202 编码). 所有突变株通过菌落 PCR 验证, 并将  $\Delta anfDG::aacC1$  和 *nifH::kan*  $\Delta anfDG::aacC1$  突变株分别命名为 *R. rubrum* UR802 和 UR804. 将带有  $\Delta hupL::aacC1$  的载体 pRYZ1<sup>[23]</sup> 转移到 *R. rubrum* *nifH* 突变株 (UR206)中, 筛选得到 *hupL**nifH* 双突变菌株并命名为 *R. rubrum* UR803.

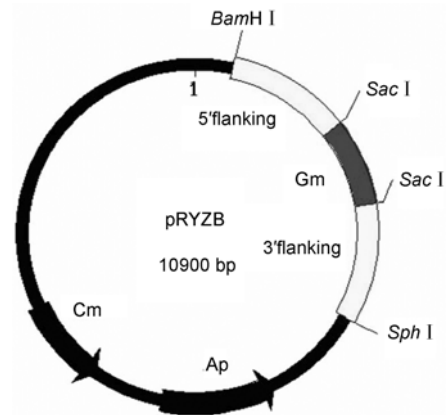


图 1 突变 Fe-固氮酶的自杀载体

( ) 固氮酶活性测定. *R. rubrum* 固氮酶活性测定采用乙炔还原法<sup>[9]</sup>. 从厌氧瓶中取 1 mL *R. rubrum* 培养液并注入到 9 mL 充满脱氧氮气的血清瓶中, 然后向血清瓶中注入 1 mL 乙炔开始反应, 整个反应过程在光照条件下进行 5 min; 0.2 mL 30% (质量体积比)的三氯乙酸终止反应. 取血清瓶中的气体混合物并用气相色谱检测: 氢离子火焰检测器; 填充柱填料为 GDX-502; 载气为氮气.

( ) 甲酸裂解氢酶活性测定. 将甲酸作为反应底物测定 *R. rubrum* 的产氢速率表示甲酸裂解氢酶活性. 反应在 10 mL 血清瓶中进行, 分别在光照或黑暗条件下反应 10 min. 在血清瓶中加入 100  $\mu$ L 反应缓冲液: 50 mmol/L pH 7.0 的磷酸钾缓冲液, 20 mmol/L 的甲酸钠, 将血清瓶用橡胶塞密闭并充入脱氧氩气后, 将 900  $\mu$ L *R. rubrum* 培养物注入到血清瓶中开始反应, 反应 10 min 后 0.2 mL 30% (质量体积比) 的三氯乙酸终止反应. 取出血清瓶气相样品注入气相色谱中进行测定, 气相色谱检测条件为: 热导检测器, 5  $\text{\AA}$  分子筛进行气体分离, 载气为氩气.

## 2 结果

### 2.1 野生型 *R. rubrum* 及其突变株的固氮酶活性

为确定吸氢酶或 Fe-固氮酶的缺失是否会影响 *R. rubrum* 固氮酶活性, 测定了 *R. rubrum* 野生型菌株及其突变株所催化的乙炔还原活性随培养时间的变化规律. 野生型 *R. rubrum* 的固氮酶活性在培养 18~20 h 出现, 并在 40~60 h 固氮酶活性达到最大(760  $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot A_{600}^{-1}$ ). 吸氢酶缺失单突变株和 *anfDghupL* 双突变菌株的固氮酶活性变化规律与野生型相似, 最高固氮酶活性可分别达到 790 和 760  $\text{nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot A_{600}^{-1}$  (图 2). 结果表明, *hupL* 或 *anfDG* 的缺失不会显著影响 *R. rubrum* 的固氮酶活性; 然而, Mo-固氮酶缺失突变株 (包括 *nifH* 和 *nifHhupL* 突变株) 在发酵过程中的固氮酶活性都显著下降, 最高固氮酶活性分别降低为野生型 *R. rubrum* 固氮酶活性的 5.8% 和 5.5%, Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶双缺失 *R. rubrum* 的固氮酶活性已低于检测线 (<10). 比较野生型 *R. rubrum* 及其突变株的固氮酶活性和氢产量, 结果表明 *R. rubrum* 氢

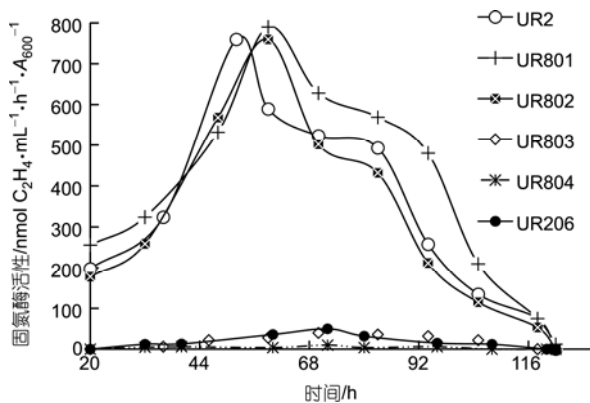


图 2 *R. rubrum* 野生型及其突变株的固氮酶活性随培养时间变化曲线

产量与固氮酶活性密切相关(图 2 和 3).

### 2.2 Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶双缺失 *R. rubrum* 的产氢

为进一步确定除 Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶外, 是否还有其他代谢途径参与人工光照条件下 *R. rubrum* 的氢代谢, 本研究构建了 *R. rubrum* Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶双缺失突变株, 并在同一培养条件下研究了野生型菌株及其突变株的产氢 (图 3).

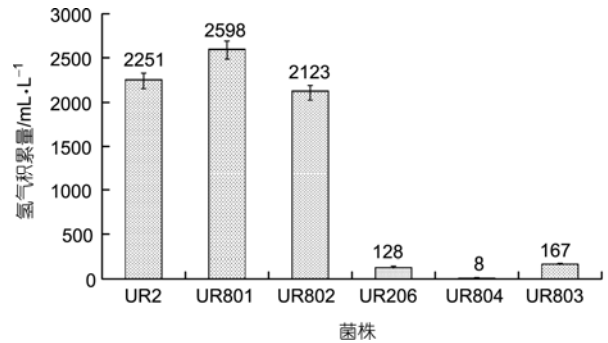


图 3 *R. rubrum* 野生型及其突变株在人工光照条件下的氢产量

Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶双缺失 *R. rubrum* 在人工光照条件下能够产生 9 mL/L 气体. 气相色谱检测该气体混合物, 结果表明, 在 *R. rubrum nifHanfDG* 突变株产生的气相混合物中除能检测到氧气和氮气外, 还能检测到氢气. 由于 *R. rubrum* UR804 培养体系留有 1 mL 的上层空间, 因此该双突变菌株的氢产量为 8 mL/L (9 mL 气相混合物减去 1 mL 空气). 在气相混合物中能够检测到氧气和氮气, 是由于 *R. rubrum nifHanfDG* 产生氢气量较小, 不能将空气完全置换 (在 *R. rubrum* 野生型菌株所产生的气体中只能检测到氢气, 由于野生型菌株氢产量较高, 1 mL 空气被大量氢气所置换). 该结果表明在 *R. rubrum* 中除 Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶外, 还存在第 3 种途径参与氢气的产生. 尽管 *R. rubrum nifHanfDG* 突变株能够产生氢气, 但是该菌株的氢产量比 *R. rubrum* 野生型及 Fe-固氮酶缺失单突变株的氢产量要小得多. 拥有完整吸氢酶活性的 *R. rubrum* Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶双缺失突变株能够产生氢气, 表明缺失吸氢酶、Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶的三缺失突变株可能产生较大体积的氢气. 因此, 我们试图构建吸氢酶、Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶三缺失突变株, 然而可能由于 3 个基因同时缺失导致菌株致死而没有筛选得到.

### 2.3 人工光照条件下 *R. rubrum* 的氢代谢途径

*R. rubrum* UR2 和 UR801 在光照强度为 2000~2500 lux 的人工光照条件下的氢产量分别为(2251±80)和(2598±92) mL/L, 表明在该条件下吸氢酶可吸收总氢产量的 13.3%。此前研究结果表明, 当光照强度为 40000~60000 lux 时, *R. rubrum* 吸氢酶缺失突变株的氢产量为野生型菌株的 1.56 倍<sup>[23]</sup>, 表明此光照条件下吸氢酶的吸氢量高于较低光照强度下的吸氢酶吸氢量; 由于低于饱和光照强度时, 吸氢酶缺失突变株的氢产量随光照强度的增加而增加, 而野生型的氢产量不随光照强度增加而增加, 因此 UR801 在光照强度为 2000~2500 lux 条件下的氢产量比 40000~60000 lux 条件下的氢产量低。*R. rubrum* UR206 (*nifH*) 和 UR803 (*nifHhupL*) 在含钼的 MG 培养基中的氢产量分别可达到(128±17)和(167±9) mL/L, 表明在 *R. rubrum* 中 Fe-固氮酶的合成不受钼元素的抑制。根据野生型菌株及其突变株的氢产量可计算得到 *R. rubrum* 中参与氢代谢的各途径对氢产量的贡献(表 2)。Mo-固氮酶、Fe-固氮酶和第 3 种途径在实验条件下对产氢的贡献分别为 93.5%、4.9%和 1.5%; 吸氢酶对氢产量的贡献为-13.3%。

### 2.4 *R. rubrum* 中甲酸裂解氢酶活性

除固氮酶系统外, 在 *R. rubrum* 中还存在第 3 种途径参与氢气的产生, 但是还需要更多的实验数据确证第 3 种途径中产氢关键酶的类型。在 *R. rubrum* 中存在 3 种氢酶活性, 且 3 种氢酶活性相互独立<sup>[16]</sup>。CO-诱导氢酶在 CO 存在时才具有活性, 在本研究培养体系中不存在 CO, 因此参与产氢的第 3 种途径非 CO-诱导氢酶介导, 推测参与 *R. rubrum* *nifHanfDG* 双缺失突变株产氢的酶可能为甲酸裂解氢酶, 因此, 在黑暗/光照和存在/缺乏甲酸钠条件下分别测定 *R. rubrum* UR2 及 UR804 的甲酸裂解氢酶活性(图 4(a))。无论甲酸钠存在与否, 在 *R. rubrum* UR804 中都检测不到甲酸裂解氢酶活性, 表明 *R. rubrum* UR804 在 MG 培养基中的产氢并非由甲酸裂解氢酶催化。但是,

*R. rubrum* UR2 在相同条件下的甲酸裂解氢酶活性与 *R. rubrum* UR804 不同, 甲酸的添加对光照条件下的 *R. rubrum* UR2 的甲酸裂解氢酶活性无显著影响, 但是对黑暗条件下的甲酸裂解氢酶活性却影响显著。黑暗条件下存在甲酸时 *R. rubrum* UR2 的甲酸裂解氢酶活性为不存在甲酸时活性的 6.4 倍。由于 *R. rubrum* 的产氢与固氮酶活性密切相关, 因此测定了甲酸存在与否、光照/黑暗条件下的 *R. rubrum* UR2 与 UR804 的固氮酶活性(图 4(b))。

甲酸存在与否对光照条件下 *R. rubrum* UR2 的固氮酶活性无显著影响。黑暗条件下甲酸不存在时 *R. rubrum* UR2 的固氮酶活性可以达到  $35 \pm 5 \text{ nmol C}_2\text{H}_4 \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{h}^{-1} \cdot A_{600}^{-1}$  (光照条件下固氮酶活性的 7%~8%), 然而, 甲酸存在时黑暗条件下的固氮酶活性降低为 0, 表明甲酸的存在可显著影响黑暗条件下的固氮酶活性。比较黑暗条件下野生型 *R. rubrum* 的固氮酶活性及氢产量, 可发现甲酸存在时黑暗条件下 *R. rubrum* UR2 的产氢并非由固氮酶催化, 可能是由甲酸裂解氢酶催化; 然而在 *R. rubrum* UR804 中的结果与野生型中不同, 可能的原因是固氮酶的失活影响了甲酸裂解氢酶活性。因此, 第 3 种产氢途径的关键酶需要更多的实验数据证实。

## 3 讨论

本研究结果表明, 在人工光照条件下至少有 3 种酶参与 *R. rubrum* 的氢产生过程: Mo-固氮酶、Fe-固氮酶和第 3 种酶, 每种酶对产氢的贡献不尽相同。Mo-固氮酶是人工光照条件下参与产氢的关键酶, 提高 Mo-固氮酶的活性有益于光合氢产量的提高。Fe-固氮酶作为产氢的关键酶已有报道<sup>[14,24]</sup>。 *Rhodobacter capsulatus* *nifHDKhupL* 双突变株的氢产量比野生型显著提高<sup>[24]</sup>, 然而 *R. rubrum* *nifHhupL* 产生的氢气分别只有野生型菌株和 *hupL* 突变株的 7.4%和 6.4%。*R. rubrum* Fe-固氮酶缺失突变株较低的氢产量可能是由于其较低的表达量所致。尽管 Fe-固氮酶产生的氢产量较小, 但是 Fe-固氮酶在产氢过程中同样起重

表 2 人工光照条件下 *R. rubrum* 的氢代谢途径及各代谢途径的产氢比例<sup>a)</sup>

	氢气产生或消耗			其余途径	总氢产量
	吸氢酶	Mo-固氮酶	Fe-固氮酶		
公式	$Y_{UR2} - Y_{UR801}$	$Y_{UR801} - Y_{UR803}$	$Y_{UR2} - Y_{UR802}$	$Y_{UR801} - Y_{Mo-N_2ase} - Y_{Fe-N_2ase}$	$Y_{UR801}$
氢产量(mL/L)	-347	+2430	+128	+40	2598
比例	-13.3%	+93.5%	+4.9%	+1.5%	100%

a)  $Y$ , 氢产量; +, 产生氢气; -, 消耗氢气

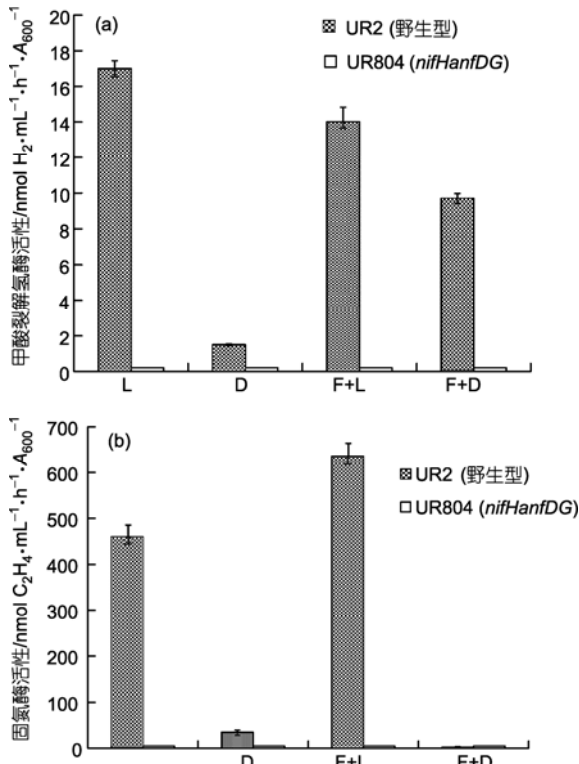


图4 *R. rubrum* 野生型与 *nifHanfDG* 突变株在甲酸存在/缺乏、光照/黑暗条件下的甲酸裂解氢酶活性(a)和固氮酶活性(b)

L 指光照条件, D 指黑暗条件, F 指存在甲酸

要作用. *R. rubrum nifH* 和 *nifHanfDG* 的固氮酶活性和氢产量的研究进一步支持 Fe-固氮酶是产氢的关键酶之一(图2和3). 与 *nifHanfDG* 突变株相比, *R. rubrum nifH* 突变株具有较高的固氮酶活性和产氢活性, 表明 Fe-固氮酶参与氢代谢及其对产氢的贡献.

*R. rubrum nifHanfDG* 突变株能够产氢, 表明除

Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶外还存在另外一种途径参与氢气的产生. 人工光照条件下多种酶参与氢代谢途径使第3种酶的证实变得更加复杂. 在 *R. rubrum* 中存在3种氢酶活性, 分别为 CO 诱导氢酶、甲酸裂解氢酶和 Fe-氢酶[8,16,25]. *R. rubrum* Mo-固氮酶和 Fe-固氮酶双缺失突变株的产氢并非由 CO-诱导氢酶和 Fe-氢酶介导, 由于 CO-诱导氢酶和 Fe-氢酶的活性必须分别由 CO 和丙酮酸诱导[25]. 尽管, 我们推测第3种参与产氢的酶是甲酸裂解氢酶, 但是结果不支持此观点. *R. rubrum nifHanfDG* 突变株氢产量较低增加了研究该途径关键酶的困难, 我们试图构建缺失 Mo-固氮酶、Fe-固氮酶和吸氢酶的三缺失突变株以期提高该菌株氢产量, 可能由于三基因同时缺失导致致死, 无法筛选得到三缺失突变株. 因此, 需要更多的实验证实参与氢代谢的第3种途径关键酶. 一旦参与氢代谢的第3种途径的关键酶被证实, 该酶活性的加强即意味着 *R. rubrum* 氢产量的提高.

此外, 吸氢酶能够消耗固氮酶或其他途径产生的氢气, 吸氢酶的失活能够提高依赖固氮酶的光合氢产量[10,23]. Kern 报道 *R. rubrum hup<sup>-</sup>* 突变株在 28 d 发酵周期内可将氢产量提高 3 倍[10], 而 *R. rubrum UR801* 只提高了 1.15 倍. 由于饱和光照强度内 *R. rubrum hupL* 突变株的氢产量随光照强度的增加而增加, 而野生型不随光照强度增加而增加(未发表结果), 因此, 低光照强度下 *R. rubrum hupL* 的氢产量比饱和光照强度下低.

总之, 至少有三种酶参与人工光照条件下 *R. rubrum* 的产氢过程, Mo-固氮酶、Fe-固氮酶和第三种未知酶; 吸氢酶参与氢的消耗过程.

## 参考文献

- Adams M W, Hall D O. Isolation of the membrane-bound hydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1977, 77: 730—737[doi]
- Najafpour G, Ismail K S K, Younesi H, et al. Hydrogen as clean fuel via continuous fermentation by anaerobic photosynthetic bacteria, *Rhodospirillum rubrum*. *African J Biotechnol*, 2004, 3: 503—507
- Zurrer H, Bachofen R. Hydrogen production by the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol*, 1979, 37: 789—793
- Gest H, Kaman M D. Photoproduction of molecular hydrogen by *Rhodospirillum rubrum*. *Science*, 1949, 109: 558[doi]
- Gest H, Kamen M D, Brecoff H M. Study on the metabolism of photosynthetic bacteria V. photoproduction of hydrogen and nitrogen fixation by *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Chem*, 1950, 182: 153—170
- Adams M W, Mortenson L E, Chen J S. Hydrogenase. *Biochim Biophys Acta*, 1980, 594: 105—176
- Gogotov I N. Hydrogenases of phototrophic microorganisms. *Biochimie*, 1986, 68: 181—187

- 8 Van Praag E, Degli Agosti R, Bachofen R. Rhythmic activity of uptake hydrogenase in the prokaryote *Rhodospirillum rubrum*. *J Biol Rhythms*, 2000, 15: 218—224[[doi](#)]
- 9 Burris R H. Nitrogenases. *J Biol Chem*, 1991, 266: 9339—9342
- 10 Kern M, Klipp W, Klemme J H. Increased nitrogenase-dependent H<sub>2</sub> photoproduction by *hup* mutants of *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60: 1768—1774
- 11 Simpson F B, Burris R H. A nitrogen pressure of 50 atmospheres does not prevent evolution of hydrogen by nitrogenase. *Science*, 1984, 224: 1095—1097[[doi](#)]
- 12 Lehman L J, Fitzmaurice W P, Roberts G P. The cloning and functional characterization of the *nifH* gene of *Rhodospirillum rubrum*. *Gene*, 1990, 95: 143—147[[doi](#)]
- 13 Lehman L J, Roberts G P. Identification of an alternative nitrogenase system in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol*, 1991, 173: 5705—5711
- 14 Davis R, Lehman L, Peterovich P, et al. Purification and characterization of the alternative nitrogenase from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol*, 1996, 178: 1445—1450
- 15 Bonam D, Murrell S A, Ludden P W. Carbon monoxide dehydrogenase from *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol*, 1984, 159: 693—699
- 16 Maness P C, Weaver P F. Evidence for three distinct hydrogenase activities in *Rhodospirillum rubrum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001, 57: 751—756[[doi](#)]
- 17 Gorrell T E, Uffen R L. Fermentative metabolism of pyruvate by *Rhodospirillum rubrum* after anaerobic growth in darkness. *J Bacteriol*, 1977, 131: 533—543
- 18 Schultz J E, Weaver P F. Fermentation and anaerobic respiration by *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas capsulata*. *J Bacteriol*, 1982, 149: 181—190
- 19 Ormerod J G, Gest H. Symposium on metabolism of inorganic compounds. IV. Hydrogen photosynthesis and alternative metabolic pathways in photosynthetic bacteria. *Bacteriol Rev*, 1962, 26: 51—66
- 20 Koch H-G, Kern M, Klemme J-H. Reinvestigation of regulation of biosynthesis and subunit composition of nickel-dependent Hup-hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*. *FEMS Microbiol Lett*, 1992, 91:193—198[[doi](#)]
- 21 Fitzmaurice W P, Saari L L, Lowery R G, et al. Genes coding for the reversible ADP-ribosylation system of dinitrogenase reductase from *Rhodospirillum rubrum*. *Mol Gen Genet*, 1989, 218: 340—347[[doi](#)]
- 22 Liang J H, Nielsen G M, Lies D P, et al. Mutations in the *draT* and *draG* genes of *Rhodospirillum rubrum* result in loss of regulation of nitrogenase by reversible ADP-ribosylation. *J Bacteriol*, 1991, 173: 6903—6909
- 23 朱瑞艳, 王迪, Zhang Y P, 等. 深红螺菌 *draTGB hupL* 双突变株在不同光照条件下的放氢. *科学通报*, 2006, 51: 2045—2051
- 24 Krahn E, Schneider K, Muller A. Comparative characterization of H<sub>2</sub> production by the conventional Mo nitrogenase and the alternative iron-only nitrogenase of *Rhodobacter capsulatus hup*-mutant. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1996, 46: 285—290[[doi](#)]
- 25 Kim E-J, Lee M-K, Kim M-S, et al. Molecular hydrogen production by nitrogenase of *Rhodobacter sphaeroides* and by Fe-only hydrogenase of *Rhodospirillum rubrum*. *Int J Hydrogen Energy*, 2008, 33: 1516—1521[[doi](#)]