

## 产气肠杆菌 *fhla* 基因克隆、表达及重组菌株产氢量

赵锦芳<sup>1,3</sup>, 宋文路<sup>2</sup>, 程军<sup>2</sup>, 张传溪<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学, 农业部作物病虫分子生物学重点开放实验室, 杭州 310029)

(<sup>2</sup> 浙江大学, 能源清洁利用国家重点实验室, 杭州 310027)

(<sup>3</sup> 湖北工业大学, 湖北省工业微生物重点实验室, 武汉 430068)

**摘要:**【目的】本研究以产氢细菌产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes* ATCC13408 为研究对象, 克隆甲酸-氢裂解酶 (formate hydrogen lyase, FHL) 系统的转录激活蛋白 FHL activator (*fhla*) 基因, 构建过表达重组菌株, 以提高菌株产氢效率。【方法】利用简并引物和 Genome walking 技术, 克隆 *fhla* 的全长基因, 将该基因连接到改造质粒 pGEX-4T-2-Cat 中, 电击转化得到重组菌株, 用厌氧发酵方法测定重组细菌的产氢量。【结果】*E. aerogenes* ATCC13408 *fhla* ORF 全长 2073 bp, 编码一个含 690 个氨基酸残基的蛋白 (GenBank accession GU188474)。SDS-PAGE 和 Western blot 分析证明 *fhla* 基因在重组菌中得到了融合表达。对重组后菌株的产氢量进行了测定, 结果表明: 底物产氢潜力由原来的  $1.23 \pm 0.08$  mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖提高到了  $1.48 \pm 0.04$  mol H<sub>2</sub>/mol 葡萄糖, 提高了 20.36%。【结论】本研究首次克隆了 *E. aerogenes* ATCC13408 的 *fhla* 基因, 并将该基因在原菌中过量表达。重组后菌株的产氢量得到显著提高, 为进一步研究和开发利用 *E. aerogenes* ATCC13408 的 *fhla* 基因提供了基础。

**关键词:** 产气肠杆菌; *fhla*; 克隆; 过量表达; 发酵产氢

中图分类号: Q7, TQ116.29 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2010) 06-0736-07

氢气是一种高效、无污染的能源。目前生物制氢作为可持续发展的工业技术已经引起世界各国的重视<sup>[1]</sup>。生物制氢有两种途径: 光合成和暗发酵, 而发酵微生物产氢不需要光照、产氢稳定, 具有更广阔的前景<sup>[2]</sup>。发酵产氢菌种主要包括肠杆菌属 (*Enterobacter*), 梭菌属 (*Clostridium*), 埃希氏肠杆菌属 (*Escherichia*) 和杆菌属 (*Bacillus*) 这四类, 其中尤以肠杆菌属和梭菌属研究得较多<sup>[3-6]</sup>。目前, 传统的产氢菌种和单纯的条件优化手段已经不能满足生物制氢应用发展的需求, 需要运用分子生物学的手段对菌株进行改造, 以达到高效产氢的目的。

Fhla 是甲酸-氢裂解酶 FHL 系统的转录激活蛋白, 研究发现大肠杆菌 *fhla* 过量表达会提高重组菌株的产氢量<sup>[7]</sup>。但目前为止其他厌氧发酵细菌 *fhla*

基因过量表达的研究还未见报道。*E. aerogenes* 是一种重要的厌氧发酵产氢菌种, 研究其 *fhla* 基因结构和功能, 对基因改造以提高该细菌发酵产氢能力有重要意义。本文以 *E. aerogenes* ATCC13408 菌株为研究对象, 利用简并引物和 Genome walking 技术, 获得了完整的产气肠杆菌 *fhla* 基因, 并在该细菌中过量表达, 提高了重组菌株的产氢量。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *E. aerogenes* ATCC13408 购买于中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC), 载体 pGEX-4T-2 为 Amersham Pharmacia Biotech 产品, 由于该菌有氨苄抗性, pGEX-4T-2 载体难以直接使

基金项目: 国家“863 计划” (2006AA05Z122)

\* 通信作者。Tel/Fax: +86-571-86971697; E-mail: chxzhang@zju.edu.cn

作者简介: 赵锦芳 (1980-), 女, 山东省威海市人, 讲师, 博士研究生, 主要从事产氢细菌基因工程研究。E-mail: jinfangzhao@126.com

收稿日期: 2009-11-13; 修回日期: 2010-02-04

用,我们在 pGEX-4T-2 抗氨苄基因序列的 *Pst* I 位点中插入了氯霉素基因表达盒,称为 pGEX-4T-2-Cat,保存在本实验室。细菌基因重组和发酵用培养基参考其他文献<sup>[8]</sup>。

**1.1.2 主要试剂:**引物合成、UNIQ-10 柱式细菌基因组 DNA 抽提试剂盒、氨苄青霉素、氯霉素均来源于上海生工生物工程技术有限公司,抗生素使用浓度分别为氨苄青霉素 ( $\text{Amp}^r$ ) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和氯霉素 ( $\text{Cm}^r$ ) 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。PCR 扩增相关试剂、限制性内切酶、 $T_4$  DNA ligase、DNA Marker 和 Genome Walking Kit 均购自宝生物工程(大连)有限公司。DNA 片段快速纯化回收试剂盒购于上海鼎国生物技术有限公司。PVDF 膜为 Millipore Corporation 产品,多克隆抗体购于 Amersham Pharmacia Biotech。

**1.1.3 主要仪器:**Bio-Rad Trans-Blot Cell 半干转印仪、Gene Pulser Xcell 电穿孔系统均购买于 Bio-Rad Laboratories, Inc.; 气相色谱仪采用 SP 3400 GC, 购买于北京北分天普仪器技术有限公司。

## 1.2 *fhIA* 基因克隆

**1.2.1 保守区扩增:**用肺炎克雷伯菌 *Klebsiella pneumoniae* 342 (ACII0067) 的 *fhIA* 序列通过 Blast 从 GenBank 中搜索出肠菌科另 8 属 9 种细菌 *fhIA* 的核苷酸序列:生癌欧文氏菌 *Enterobacter cancerogenus* ATCC 35316 (EAA12517); 产气肠杆菌 *Enterobacter aerogenes* 548 (AAF70633); 坂崎肠杆菌 *Enterobacter sakazakii* ATCC BAA-894 (ABU77325); 肠杆菌属 *Enterobacter* sp. 638 (ABP61868); 柯氏柠檬酸杆菌 *Citrobacter koseri* ATCC BAA-895 (ABV15153); 大肠杆菌 *Escherichia coli* W3110 (BAE76808); 鲍氏志贺菌 *Shigella boydii* Sb227 (ABB67315); 鼠伤寒沙氏杆菌 *Salmonella typhimurium* LT2 (AAL21739); 变形斑沙雷氏菌 *Serratia proteamaculans* 568 (ABV41541), 序列的多重联配用 Clustal X<sup>[9]</sup> 进行分析,并用 GeneDoc 软件编辑<sup>[10]</sup>。根据联配的保守序列设计 3 对简并引物(表 1), UNIQ-10 Kit 提取培养 10 小时的 *E. aerogenes* ATCC13408 总 DNA 为模

表 1 *fhIA* 基因扩增的简并引物

Table 1 Universal primers used for amplifying the *fhIA*

Universal primers	Length/ bp	Sequence (5'→3')
F1	17	CGGGAYAACTTYCGCAT
F2	20	TATTRCAGCAGCCCGATCTG
F3	14	ATGTCRTATACACC
R1	20	GGCATCGSCGCCAGTTCAT
R2	18	CTGATATTCATCTTCGCC
R3	20	CAGCAGTCTGTAATCCACAT

板,扩增 *fhIA* 基因保守区域。

**1.2.2 3' Genome walking:**根据已获得的 *fhIA* 基因的部分序列,设计嵌套基因特异性引物用于 3' Genome walking (表 2)。以 SP1 为上游引物,以 AP (AP1 或 AP2) 作为下游引物,进行第一轮 PCR; 将 PCR 产物稀释 10 倍后取 1  $\mu\text{L}$  为模板,以 SP2 为上游引物,以 AP Primer (使用同种 AP 引物) 作为下游引物,进行第二轮的嵌套 PCR; 将 PCR 产物稀释 10 倍后取 1  $\mu\text{L}$  为模板,以 SP3 为上游引物,以 R3 为下游引物,进行第三轮鉴定 PCR; 以 SP3 为测序引物,将鉴定正确的第三轮 PCR 产物送测序。

表 2 *fhIA* 基因 Genome Walking 的扩增引物

Table 2 Special primers used for Genome Walking

Genome Walking primers	Length/ bp	Sequence (5'→3')
SP1	25	ATCGCCTGAACGTGTTCGCCGATTTG
SP2	25	ATGGGACGCAACATCGACAGCATTC
SP3	25	GCGAGCTGGAAAACGTCATTGAGCG
AP1	21	CGTTGTAAAACGACGGCCAGT
AP2	22	CCATGATTACGAATTCGAGCTC

**1.2.3 PCR 扩增全长基因:**根据保守序列和 3' 端序列设计引物,分别引入 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切位点(表 3),扩增 *fhIA* 全长基因,PCR 产物与 pMD-18-T 载体连接得到质粒 pMD-18-T-*fhIA* 并进行测序。

表 3 *fhIA* 全长基因扩增引物

Table 3 Primers used for amplifying the full-length of *fhIA*

Special primers	Length/ bp	Sequence (5'→3')
<i>fhIA</i> F	27	GGATCCATGTCGTATACACCAATGAGC
<i>fhIA</i> R	25	CTCGAGTGCCTTAAATCAGGCTC

## 1.3 *fhIA* 基因与谷胱甘肽转移酶(GST)基因融合表达的载体构建

将质粒 pMD-18-T-*fhIA* 双酶切后,与同样酶切过的表达载体 pGEX-4T-2-Cat 连接,连接产物转化 *E. coli* TG1 感受态细胞,接种含 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  氯霉素的 LB 固体平板培养过夜,挑取单斑经鉴定得到 *fhIA* 基因与 GST 融合表达的载体质粒 pGEX-4T-2-Cat-*fhIA* (图 1)。

## 1.4 *fhIA* 基因在 *E. aerogenes* ATCC13408 中表达和 Western blot 分析<sup>[8]</sup>

将表达质粒 pGEX-4T-2-Cat-*fhIA* 电击转化 *E. aerogenes* ATCC13408 感受态细胞,用含氯霉素的平板筛选阳性重组子,挑取单斑培养,并进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blot 分析,以原菌处理样品为对照。

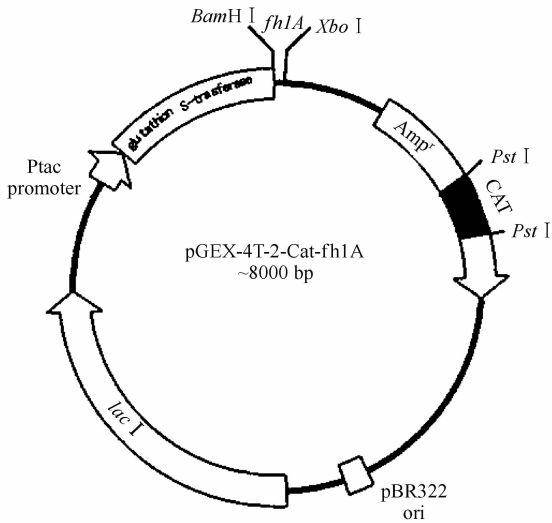


图1 谷胱甘肽转移酶(GST)与 FHLA 融合表达的载体 pGEX-4T-2-Cat-fhlA

Fig. 1 Construction of the fusion protein GST-FHLA expression vector pGEX-4T-2-Cat-fhlA

### 1.5 重组产气肠杆菌产氢量测定

按照周俊虎等<sup>[11]</sup>的方法设计发酵装置,在浙江大学能源清洁利用国家重点实验室测定。采用 350 mL 容积的发酵瓶,在高压灭菌的 300 mL 发酵培养基中按照 3:1 (v/v) 比例接种重组产气肠杆菌的诱导菌液,并补充 1% (g/v) 的葡萄糖,持续通入氮气 10 min,密封保证厌氧条件,置于 37°C 水浴中恒温培养。在反应过程中,通过添加 1 mol/L 的 NaOH 溶液来调整发酵液的 pH 值,维持在 6.0 左右。每次取样后,重新通入氮气 10 min,密封继续厌氧发酵,直到产气完全终止。采用容积为 1 L 的带有精确刻度的集气装置,每隔 12 h 收集气体一次,检测 H<sub>2</sub> 体积。每处理设 3 次重复。

### 1.6 气相成分分析

检测色谱柱为 5A,  $\phi$ 3 mm  $\times$  3 m。参数设置为:柱温 50°C,注样器温度 50°C, TCD 温度 100°C,桥电流温度 160°C,载气为 He,流速 30 mL/min。

## 2 结果

### 2.1 fhlA 基因克隆

通过简并引物和 Genome walking 技术,成功克隆到 *E. aerogenes* ATCC13408 FHL 系统转录激活蛋白 FhlA 全长基因,序列测定表明该基因完整 ORF 全长 2073 bp,可编码一个含 690 个氨基酸残基的蛋白。本研究克隆的 ATCC13408 株系的 *fhlA* 基因编码区与已经报道的 *E. aerogenes* 德国株系 (GenBank 登录号为:AF232732) 核苷酸序列相同性只有 79%,

氨基酸序列相同性为 82%。本基因序列已经在 GenBank 注册,登录号为 accession no. GU188474。

### 2.2 FhlA 结构分析

FhlA 蛋白属于 GAF 家族成员,作为甲酸-氢裂解酶系统的转录激活因子,正向调控 FHL 系统的转录<sup>[12]</sup>。*E. aerogenes* ATCC13408 FhlA 的 N 端区域比较大,范围在 1-378 AA,不同菌种之间保守性较低;C 端区域范围在 379-690 AA,在 C 末端有一个 helix-turn-helix motif,形成一个 DNA 结合区域。将克隆得到的 *fhlA* 基因的氨基酸序列与 GenBank 中肠菌科的另外 11 种细菌 *fhlA* 基因的氨基酸序列联配比对后发现,同源性均在 50% 以上。结果所示 (见下页图 2),黑色表示 100% 相似性,灰色表示 80% 相似性。

### 2.3 fhlA 基因在产气肠杆菌中表达

将 *fhlA* 与 GST 融合表达的载体质粒 pGEX-4T-2-Cat-fhlA 电击转化到 *E. aerogenes* ATCC13408 感受态细胞中,在 IPTG 诱导下表达。从 SDS-PAGE 电泳图上可以看到,该融合基因表达后大小约 96 kDa,与预计的分子量相符 (图 3)。用抗 GST 多克隆抗体对表达产物 GST-fhlA 融合蛋白进行了 Western blot 检测,结果显示在 96 kDa 处出现一条特异性杂交带,确定 *fhlA* 基因在产气肠杆菌中得到了正确的融合表达。

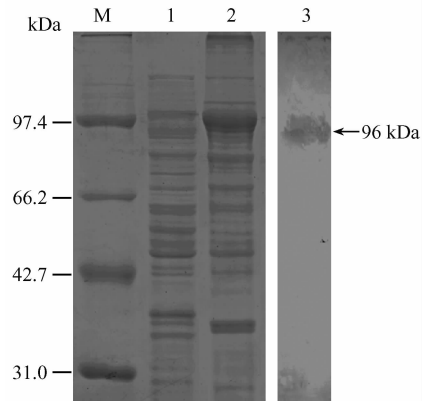


图3 GST-FhlA 融合蛋白在 *E. aerogenes* ATCC13408 中的表达及 Western blot 检测

Fig. 3 Expression of GST-FhlA fusion protein in *E. aerogenes* ATCC13408. M, Protein Marker; 1, *E. aerogenes* ATCC13408; 2, *E. aerogenes* ATCC13408/*fhlA*; 3, Western blot using a polyclonal antibody against GST.

### 2.4 重组产气肠杆菌产氢量测定

发酵后氢气的色谱图如图 4 所示。*E. aerogenes* ATCC13408 的 *fhlA* 重组前后细菌的最大单位产氢速率分别为  $24.75 \pm 1.16$  mL/(L · h) 和  $25.03 \pm$

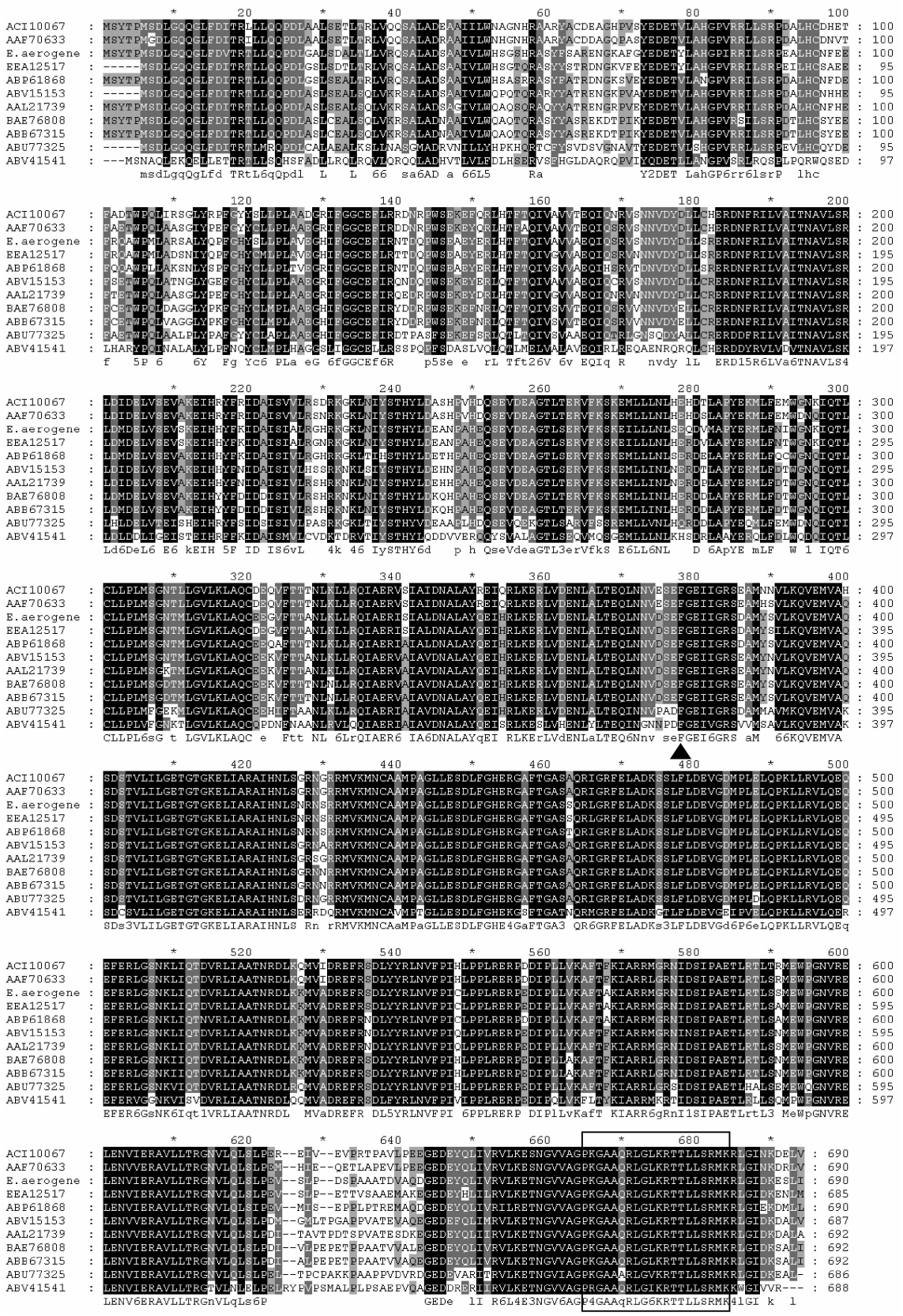


图2 不同细菌的 FhIA 蛋白质氨基酸序列多重联配

Fig. 2 Alignment of bacterial FhIA amino acid sequences. The partition of N terminal and C terminal is indicated with an arrow; the helix-turn-helix motif is boxed indicated with an arrow.

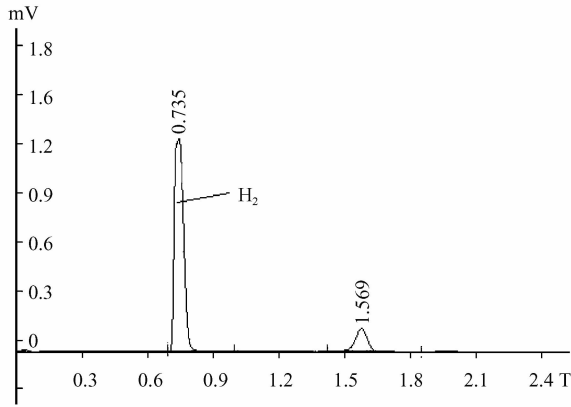


图4  $H_2$ 、 $O_2$  气体的色谱峰图

Fig. 4 Chromatograph chart for standard gas of hydrogen

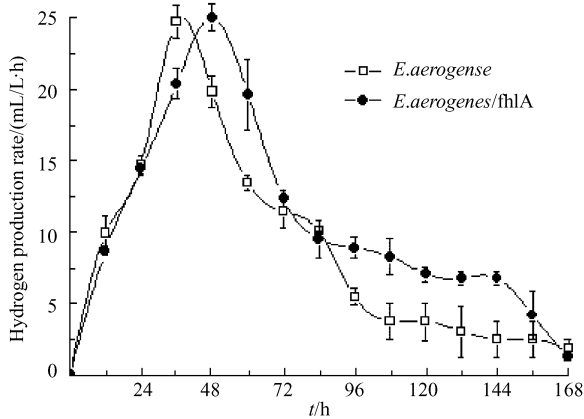


图5 *E. aerogenes* ATCC13408 原菌株和重组后菌株的产氢速率比较

Fig. 5 Hydrogen production rate of parental strain and recombinant strain

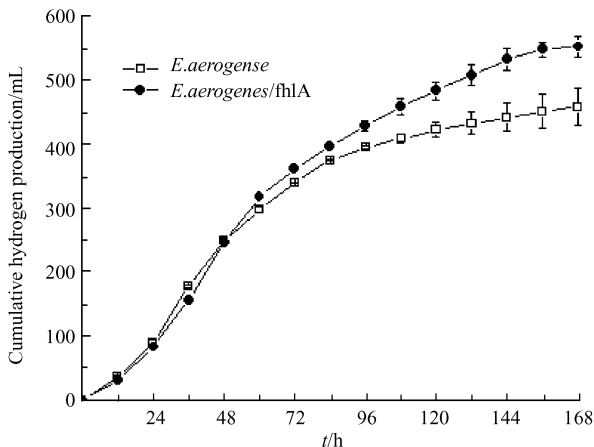


图6 *E. aerogenes* ATCC13408 原菌株和重组后菌株的累积产氢量比较

Fig. 6 Cumulative hydrogen production of parental strain and recombinant strain

0.97 mL/(L·h) (图5)。氢气的累积产量由原菌的  $457.83 \pm 29.02$  mL 提高到了  $552.05 \pm 15.72$  mL (图

6), 统计显示差异达极显著水平(两组均数  $t$  检验得  $t = 4.9442, df = 4, P = 0.0078 < 0.01$ )。也就是说, 底物产氢潜力由原菌株的  $1.23 \pm 0.08$  mol  $H_2$ /mol 葡萄糖提高到重组后的  $1.48 \pm 0.04$  mol  $H_2$ /mol 葡萄糖, 提高了 20.36%。这表明, 外源 *fhlA* 基因在 *E. aerogenes* ATCC13408 中不仅获得重组表达, 并提高了该细菌的产氢能力。

### 3 讨论

2005年, Yoshida等<sup>[7]</sup>通过过量表达*fhlA*, 使*E. coli* W3110重组菌株的产氢量比野生株提高1.7倍, 而过量表达*fhlA*和敲除*hycA*的双突变株, 使产氢速度提高了2.8倍, 同时使甲酸脱氢酶*fdhF*基因表达量提高了6.5倍, 氢酶Hyd3大亚基*hycE*基因表达提高7倍。2006年, 他们获得的*ldhA*、*frdBC*、*hycA*和*fhlA*四突变株最大产氢量达到1.87 mol  $H_2$ /mol 葡萄糖<sup>[13]</sup>。同年, Bisailon通过过量表达*fhlA*, 使大肠杆菌重组菌株的产氢量比原菌提高了11%, *ldhA*和*fhlA*双突变株的产氢量则提高了47%。*hyd-1*、*hyd-2*、*ldhA*、*fhlA*四基因突变株发酵葡萄糖得到的产氢量接近2 mol  $H_2$ /mol 葡萄糖<sup>[14]</sup>。2007年Maeda等得到了*hyaB*、*hybC*、*hycA*和*fdoG*共敲除、*fhlA*过表达的五基因突变株, 该菌株以甲酸为发酵底物, 产氢量比野生株提高141倍<sup>[15]</sup>。2009年, Sanchez-Torres等利用蛋白质工程研究了大肠杆菌FHLA编码的基因与细菌产氢量之间的关系<sup>[16]</sup>。

本研究利用简并性引物和Genome walking技术, 第一次成功地克隆了*E. aerogenes* ATCC13408 *fhlA*基因, 为进一步研究和开发利用*fhlA*基因提供了基础。将*fhlA*基因克隆入改造后的表达载体pGEX-4T-2-Cat中, 并成功的融合表达。重组后细菌的产氢量得到显著提高。FHLA的过量表达可能促进了产氢途径中相关因子和酶的活性, 从而提高了细菌的产氢能力。*fhlA*基因功能的开发和与其它产氢相关基因在产氢细菌基因改造中的组合使用需要进一步的研究。Zhao等<sup>[17]</sup>年通过敲除*E. aerogenes* IAM1183的*hycA*和*hybO*基因, 提高了重组细菌的产氢量。我们也通过在*E. aerogenes* ATCC13408中表达氢酶使之产氢水平提高了95%<sup>[8]</sup>。我们期望通过下一步过量表达*fhlA*基因和氢酶, 结合共敲除重组筛选出产氢效率更高的产气肠杆菌。

## 参考文献

- [ 1 ] Das D, Veziroglu TN. Hydrogen production by biological process: a survey of literature. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2001, 26: 13-28.
- [ 2 ] Toshinari M, Viviana S, Thomas K. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. *Microbial Biotechnology*, 2008, 1: 30-39.
- [ 3 ] 邢新会, 张翀. 发酵生物制氢研究进展. 生物加工过程 (*Chinese Journal of Bioprocess Engineering*), 2005, 3 (1): 1-8.
- [ 4 ] Kumar N, Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry*, 2000, 35: 589-593.
- [ 5 ] Tanisho S, Ishiwata Y. Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 1994, 19 (10): 807-812.
- [ 6 ] Yokoi H, Maeda Y, Hirose J. H<sub>2</sub> production by immobilized cells of *Clostridium butyricum* on porous glass beads. *Biotechnology Techniques*, 1997, 11: 431-433.
- [ 7 ] Yoshida A, Nishimura T, Kawaguchi H, Inui M, Yukawa H. Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71: 6762-6768.
- [ 8 ] Zhao JF, Song WL, Cheng J, Zhang CX. Heterologous expression of a hydrogenase gene in *Enterobacter aerogenes* to enhance hydrogen gas production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2010, 26: 177 - 181.
- [ 9 ] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The Clustal\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876-4882.
- [ 10 ] Nicholas K, Nicholas HJ, Deerfield D. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *EMBNEW News*, 1997, 4: 14.
- [ 11 ] 周俊虎, 戚峰, 程军. 秸秆发酵产氢的碱性预处理方法研究. 太阳能学报 (*Acta Energiæ Solaris Sinica*), 2007, 28(3): 329-333.
- [ 12 ] Leonhartsberger S, Ehrenreich A, Beck A. Analysis of the domain structure and the DNA binding site of the transcriptional activator FhIA. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(12): 3672-3684.
- [ 13 ] Yoshida A, Nishimura T, Kawaguchi H, Inui M, Yukawa H. Enhanced hydrogen production from glucose using *ldh-* and *frd-*inactivated *Escherichia coli* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 73: 67-72.
- [ 14 ] Bisailon A, Turcot J, Hallenbeck PC. The effect of nutrient limitation on hydrogen production by batch cultures of *Escherichia coli*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2006, 31: 1504-1508.
- [ 15 ] Maeda T, Vardar G, Self WT, Wood TK. Inhibition of hydrogen uptake in *Escherichia coli* by expressing the hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *BMC Biotechnology*, 2007, 7: 25.
- [ 16 ] Sanchez-Torres V, Maeda T, Wood TK. Protein engineering of the transcriptional activator FhIA to enhance hydrogen production in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009, 75(17): 5639-5646.
- [ 17 ] Zhao HX, Ma K, Lu Y, Zhang ZN, Zhang, Xing XH. Cloning and knockout of formate hydrogen lyase and H<sub>2</sub>-uptake hydrogenase genes in *Enterobacter aerogenes* for enhanced hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2009, 34: 186-194.

# Cloning of *Enterobacter aerogenes* *fhla* gene and overexpression of hydrogen production

Jinfang Zhao<sup>1,3</sup>, Wenlu Song<sup>2</sup>, Jun Cheng<sup>2</sup>, Chuanxi Zhang<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Molecular Biology of Crop Pathogens and Insects, Ministry of Agriculture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

(<sup>2</sup> State Key Laboratory of Clean Energy Utilization, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

(<sup>3</sup> Hubei Provincial Key Laboratory of Industrial Microbiology, Hubei University of Technology, Wuhan 430068, China)

**Abstract:** [ **Objective** ] We amplified and overexpressed the FHL activator (*fhla*) in *E. aerogenes* ATCC13408 to enhance hydrogen production. [ **Methods** ] By using universal primers and genome walking, we cloned the full open reading frame (ORF) of *fhla* gene. We inserted it into the glutathion S-transferase (GST) fusion expression vector pGEX-4T-2-Cat, and transformed the recombinant plasmid into *E. aerogenes* ATCC13408 via electroporation for expression. Then we measured the hydrogen production of the recombinant strain in a batch culture. [ **Results** ] We found that the ORF of *fhla* was 2073 base pair in length, potential to encode a 690 amino acid peptide ( GenBank accession GU188474 ). The Fhla protein from *E. aerogenes* ATCC13408 shared high amino acid identities with those from other bacterial species. By using SDS-PAGE and Western blot analysis, we confirmed that the *fhla* gene had successfully expressed in the strain. The hydrogen yield of the recombinant strain was increased from 1.23 to 1.48 mol H<sub>2</sub>/mol glucose. [ **Conclusion** ] Enhancement of hydrogen productivity was attained under anaerobic conditions with the recombinant strain.

**Keywords:** *Enterobacter aerogenes* ATCC13408; *fhla*; fermentative hydrogen production

( 本文责编:王晋芳 )

Supported by the National Program of High-tech Research and Development(2006AA05Z122)

\* Corresponding author. Tel/Fax: + 86-571-86971697; E-mail: chxzhang@zju.edu.cn

Received:13 November 2009/Revised: 4 February 2010

## 《微生物学报》关于署名

经过本刊审查通过后即将发表的稿件,作者在修改时,如果对“作者或单位的署名”进行变更,与最初的投稿不同,本刊要求:作者必须再提供有关证明,否则不能生效! 此项规定早已公布在本刊的网页上、并且在本刊的纸质出版物中也多次公布。请作者登陆本刊网页(<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>),在首页内、“常见问题”中有显示,点开左侧的“署名”,其中有详细的说明和办理方法。

- (1) 如变单位署名顺序,需要原研究内容所属单位(通常是第一署名单位)的证明信,证明内容:原署名顺序→现署名顺序→盖章。
- (2) 如变更作者署名顺序,需要通讯作者和第一作者同意的签字证明。证明内容:原作者姓名及顺序→修改之后的作者姓名及顺序。
- (3) 将此证明信返回编辑部(邮寄原件或扫描后 E-mail 发来),新的变更即可生效。