

兼性厌氧芽胞杆菌 TSH1 丁醇代谢途径中关键酶的检测

段晓瑞^{1,2}, 王根宇², 刘宏娟², 薛建伟¹, 张建安²

1 太原理工大学精细化工研究所, 山西 太原 030024

2 清华大学核能与新能源技术研究院, 北京 100084

段晓瑞, 王根宇, 刘宏娟, 等. 兼性厌氧芽胞杆菌 TSH1 丁醇代谢途径中关键酶的检测. 生物工程学报, 2013, 29(5): 620-629.

Duan XR, Wang GY, Liu HJ, et al. Key enzymes in butanol fermentation by a facultative anaerobe *Bacillus* sp. TSH1. Chin J Biotech, 2013, 29(5): 620-629.

摘 要: 传统的丁醇生产菌均严格厌氧, 本实验室分离了一株兼性厌氧的芽胞杆菌 TSH1 (*Bacillus* sp. TSH1), 丁醇梭菌具有相似的丁醇代谢通路及产物。通过研究乙醇和丁醇生成途径中关键酶的活性, 分析乙醇脱氢酶、丁醇脱氢酶及丁醛脱氢酶的活性变化与产物生成的关系。结果表明, 在发酵初期, 3 种酶的活性均迅速升高并在 21 h 前达到最大值, 丁醇、乙醇浓度也逐渐增加, 乙醇脱氢酶在 12 h 酶活达到最大值 0.054 U/mg, 丁醛脱氢酶在 21 h 酶活达到最大值 0.035 U/mg, 丁醇脱氢酶则在 15 h 酶活达到最大值 0.055 U/mg。24 h 后, 3 种酶活均开始下降, 并维持在较低水平, 而这段时间内产物浓度仍持续增长直至发酵结束。研究结果深化了对微生物丁醇代谢机理的认识, 并为进一步研究芽胞杆菌丁醇代谢途径提供参考。

关键词: 芽胞杆菌 TSH1, 丁醇发酵, 乙醇脱氢酶, 丁醇脱氢酶, 丁醛脱氢酶

Received: September 25, 2012; **Accepted:** March 11, 2013

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21176141), Tsinghua University Initiative Scientific Research Program (No. 2012THZ02289).

Corresponding author: Jian'an Zhang. Tel/Fax: +86-10-89796086; E-mail: zhangja@tsinghua.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21176141), 清华大学自主科研计划 (No. 2012THZ02289) 资助。

Key enzymes in butanol fermentation by a facultative anaerobe *Bacillus* sp. TSH1

Xiaorui Duan^{1,2}, Genyu Wang², Hongjuan Liu², Jianwei Xue¹, and Jian'an Zhang²

¹ Institute of Fine Chemical, Taiyuan University of Technology, Taiyuan 030024, Shanxi, China

² Institute of Nuclear and New Energy Technology, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: *Bacillus* sp. TSH1 is a butanol-producing microorganism newly isolated in our laboratory; it can grow and ferment under facultative anaerobic conditions, while sharing similar fermentation pathways and products with *Clostridium acetobutylicum*. To illustrate the relationships between the products and the enzyme activities in *Bacillus* sp. TSH1, key butanol- and ethanol-forming enzymes were studied, including butyraldehyde dehydrogenase, butanol dehydrogenase and alcohol dehydrogenase. The activities of the three enzymes increased rapidly after the initiation of fermentation. Activities of three enzymes peaked before 21 h, and simultaneously, product concentrations also began to increase gradually. The maximum activity of alcohol dehydrogenase was 0.054 U/mg at 12 h, butyraldehyde dehydrogenase 0.035 U/mg at 21 h and butanol dehydrogenase 0.055 U/mg at 15 h. The enzyme activities then decreased, but remained constant at a low level after 24 h, while the concentrations of butanol, acetone, and ethanol continued increasing until the end of the fermentation. The results will attribute to the understanding of the butanol metabolic mechanism, and provide a reference for further study of a facultative *Bacillus* metabolic pathway.

Keywords: *Bacillus* sp. TSH1, butanol fermentation, alcohol dehydrogenase, butanol dehydrogenase, butyraldehyde dehydrogenase

丁醇是一种极具潜力的新型生物燃料,与乙醇相比较,具有与汽油更为接近的辛烷值和热值。同时,丁醇具有抗爆性能好、不腐蚀管道、安全性高、和汽油的混合比高等优点,可以用于制取酯类、塑料增塑剂,还可用于医药、喷漆以及用作溶剂。在能源和环境问题日益严峻的背景下,由于以上诸多优点,一度兴盛并衰退的生物丁醇产业重新引起了各国研究学者和企业的兴趣。

目前,丙酮丁醇梭菌 *Clostridium acetobutylicum* 菌种选育和发酵工艺的改进已经取得较大的进步^[1]。但目前大部分丁醇发酵菌株均为严格厌氧型,对仪器设备有很严格的要求。本实验室利用梭菌强化培养基,从玉米粉中筛选出一株产丁醇的芽胞杆菌,该菌株可在微氧条件

下,以葡萄糖或淀粉为碳源发酵生成丁醇,代谢过程与丙酮丁醇梭菌的代谢过程基本一致。气相色谱-质谱联用仪 (GC-MS) 分析结果表明,TSH1 菌株发酵液中主要产物为丁醇、乙醇和丙酮,此外,还有少量的乙酸和丁酸。将其原生质体进行辐照诱变后,利用梭菌强化培养基筛选出一株丁醇产量较高且遗传性状稳定的兼性厌氧菌株^[2]。

为了对芽胞杆菌 *Bacillus* sp. TSH1 继续进行改进以进一步提高其产量和得率,需要对该菌株丁醇代谢通路中关键酶的种类、活性及其变化有清晰的了解。酶是细胞内生物化学反应的催化剂,其存在与否及活性的高低影响发酵产物的形成和产量^[3]。丁醇发酵主要分为产酸期和产溶剂期,在溶剂生成的阶段,丁醛脱氢酶是由丁酰辅

酶 A 转化为丁醛的关键酶, 为 NADH 依赖型。丁醇脱氢酶是由丁醛转化为丁醇的关键酶, 为 NADPH 依赖型。乙醇脱氢酶是由乙酰辅酶 A 生成乙醛再进而生成乙醇的关键酶^[1]。在丙酮丁醇梭菌中, 醛脱氢酶和醇脱氢酶并不是单一的酶, 而是由多个同工酶组成, 这些酶都具有醇脱氢酶活性, 共同催化乙醇、丁醇的生成^[4-7]。基因组方面的研究表明, 共有 6 个基因编码醇脱氢酶, 这些编码产物包括 2 个具有双功能的醛、醇脱氢酶和 4 个单一功能的醇脱氢酶^[8]。随着分子生物学技术发展, 从核酸水平和蛋白水平对单个基因及蛋白的研究更加便利。但是酶是细胞功能的最终执行者, 正是这些同工酶的共同作用, 决定了乙醇、丁醇的合成速度和效率, 而这是单个基因和蛋白表达难以阐释的。因此, 研究细胞的整体酶活性水平对于研究丁醇发酵的进程具有重要的意义。

Bacillus sp. TSH1 与丙酮丁醇梭菌有相同的发酵产物, 推测由相似的酶进行催化, 因此, 本文借鉴丙酮丁醇梭菌的研究, 对 *Bacillus* sp. TSH1 丁醇发酵过程中丁醛、丁醇、乙醇合成的关键酶的活性进行了研究, 分析了产丁醇和其他溶剂代谢途径中乙醇脱氢酶, 丁醛脱氢酶, 丁醇脱氢酶这 3 种酶在发酵过程中的变化规律, 对进一步解析 *Bacillus* sp. TSH1 丁醇和乙醇合成代谢途径及调控机制奠定了基础, 也对该菌株在蛋白水平的表达分析提供了参考。

1 材料与方法

1.1 材料

菌种 *Bacillus* sp. TSH1 为清华大学核能与新能源技术研究院新能源研究所保藏; 玉米粉购

自北京市昌平区虎峪村; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、考马斯亮蓝 G250 购自北京鼎国生物技术有限责任公司; 牛血清蛋白 (BSA)、二硫苏糖醇 (DTT)、NADH 钠盐、NADPH 钠盐、丁酰辅酶 A 均购自 Sigma 公司; 盐酸氨基脲购自国药集团化学试剂有限公司; 丁醛为化学纯; 葡萄糖、乙醛、盐酸、磷酸等均为分析纯。

1.2 设备

759S 紫外分光光度计为上海菁华科技仪器有限公司生产; 电热恒温培养箱为北京中兴伟业仪器有限公司生产的 DH-500AB (303-3AB); 5 L 发酵罐为德国 Sartorius 的 BiostatRBpuls; 气相色谱和液相色谱分别为日本岛津公司的 GC 2010 和 LC 20AD; 超声波细胞粉碎机为宁波新芝生物科技股份有限公司的 JY 92-II; 冷冻离心机为 Sigma 公司的 2-16PK 和 Himac 公司的 CR22G。

1.3 培养基和缓冲液

P₂ 半合成培养基 (g/L): 葡萄糖 36.3, 酵母浸粉 1.0。

缓冲液配方 (g/L): K₂HPO₄ 50.0, KH₂PO₄ 50.0, CH₃COONH₄ 220.0, 过滤灭菌。

微量元素液配方 (g/L): MgSO₄·7H₂O 20.0, MnSO₄·H₂O 1.0, NaCl 1.0, FeSO₄·7H₂O 1.0, 对氨基苯甲酸 0.1, 维生素 B1 0.1, 生物素 0.001, 过滤灭菌。

接种前以 1% 的比例将缓冲液和微量元素液加入 P₂ 半合成培养基中^[9-11]。

1.4 方法

1.4.1 菌种培养

菌种活化培养: 将 1 mL 冻存的菌种 *Bacillus*

sp. TSH1 在超净台中接入 15 mL 5% 的玉米培养基中, 电热恒温培养箱中 37 °C 静置培养 24 h。

摇瓶扩大培养: 将充分活化的菌种以体积比 7% 的接种量接种于 200 mL P₂ 培养基中, 电热恒温培养箱中 37 °C 静置培养 24 h。

发酵罐培养: 将扩大培养后的菌种接入发酵罐中 (5 L 发酵罐装 3 L P₂ 半合成培养基), 接种量为 7%, 37 °C 静置发酵, 自然 pH, 从发酵 9 h 起, 每隔 3 h 取一次样至发酵结束。

1.4.2 样品处理

将样品 4 °C、10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清; 5 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5) 清洗, 上述条件离心后, 重悬于 1 mL 缓冲液 (含 1 mmol/L DTT), 于冰浴中进行细胞的循环破碎, 超声功率 200 W, 每次工作 30 s, 间隔 10 s, 6 次循环。破碎后 4 °C、10 000 r/min 离心 15 min, 上清液即为酶粗提液^[12]。蛋白含量的测定采用 Bradford 法^[13]。

1.4.3 酶活检测

乙醇脱氢酶的反应体系为 1 mL, 含 50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.5), 1 mmol/L DTT, 0.2 mmol/L NADH, 5.1 mmol/L 乙醛, 测定波长为 340 nm^[14]。

丁醛脱氢酶的反应体系为 0.87 mL, 含 67 mmol/L Tris-HCl (pH 6.0), 1 mmol/L DTT, 0.27 mmol/L NADH, 72 mmol/L 盐酸氨基脲, 0.2 mmol/L 丁酰辅酶 A, 测定波长为 365 nm。

丁醇脱氢酶的反应体系为 0.86 mL, 含 77 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.8), 0.23 mmol/L NADPH, 11 mmol/L 丁醛, 测定波长为 365 nm^[15]。

三种反应体系中均含有细胞提取物 (含

0.5 mg 蛋白质)。30 °C, 每 30 s 测定一次吸光度的变化, 测 12 min, 测定均在空气中进行。脱氢酶与底物的反应在 2 mm 光程的石英比色杯中进行, 从加入底物开始, 测定紫外分光光度计在相应波长下吸收值的变化^[16-18]。依据 NAD(P)H 的摩尔消光系数计算酶的比活。

$$\text{酶的比活力 (U / mg 蛋白)} = \frac{\Delta OD \times V}{\varepsilon \times 0.2 \times C} \times 10^6$$

式中, ΔOD : 吸收值每分钟降低的平均值 (min^{-1}); V : 反应体系的体积 (L); ε : 摩尔消光系数; $\varepsilon_{\text{NADH}} (365 \text{ nm}) = 1760 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; $\varepsilon_{\text{NADPH}} (365 \text{ nm}) = 1753 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$; C : 测定中所加入酶蛋白的量 (mg); 0.2: 比色杯的光程 (cm); 10^6 : 摩尔转化为微摩尔的系数。

1.4.4 溶剂产量的测定

溶剂产量的测定以异丁醇为内标物, 发酵液 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液, 按发酵液: 异丁醇: $\text{H}_2\text{O} = 1 : 1 : 2$ ($V/V/V$) 混合后采用气相色谱仪进样检测。色谱柱为 KB-5MS, 25 m \times 0.53 mm \times 1.00 μm ; 检测器 FID; 进样温度 240 °C; 检测温度 260 °C; 柱温 80 °C (保温 5 min) \sim 120 °C (保温 3 min); 载气为 N_2 , 流速 2.5 mL/min, 进样量 1 μL 。根据气相色谱保留时间和峰面积信息对溶剂进行定性和定量。根据标准曲线和进样量计算发酵液中溶剂含量^[19]。

2 结果与分析

2.1 *Bacillus* sp. TSH1 发酵结果

Bacillus sp. TSH1 是兼性厌氧的芽胞杆菌, 可有氧生长、微氧发酵, 这一发现不同于传统的梭状芽胞杆菌必须在严格厌氧条件下的丁醇发酵 (即传统 ABE 发酵)。由于操作不需要专门的

厌氧设备,使操作大大简化,而且节约了设备成本。接种过程在超净台(有氧环境)进行,发酵过程在5 L的发酵罐中进行,恒温37℃下,监控不同发酵阶段的pH值并间隔取样,测定OD值以及底物和产物的浓度。菌体生长曲线,pH值与底物和产物的浓度变化如图1所示。在36.33 g/L的初糖浓度下,溶剂在12 h开始产生,同时伴随pH的下降,进入产酸期。24 h后,溶剂产量迅速增加,进入产溶剂期。葡萄糖在33 h全部消耗,同时pH达到最低点,OD达到最大值。发酵在36 h终止,此时,菌种的OD值降低到最大值的一半,丁醇、丙酮和乙醇的比例约为7:2:1。丁醇的得率为19.6%,终产量为7.13 g/L,占ABE总量的70%。该结果与Danie等对*C. acetobutylicum* ATCC 824的研究结果相似^[20]。

2.2 乙醇脱氢酶活性变化

乙醇脱氢酶是由乙酰辅酶A生成乙醛再进

而生成乙醇的关键酶。如图2所示,发酵初期的9 h到12 h,菌体内存在的乙醇脱氢酶活性迅速升高,并在12 h时达到最大值0.054 U/mg,乙醇产量没有明显增长。随着发酵时间的进行,在12 h到24 h,乙醇脱氢酶活性迅速下降到0.01 U/mg,相比最大值丧失了81%的活性。24 h后直到发酵结束时,菌体内乙醇脱氢酶活性维持在0.006~0.01 U/mg。这段时间内尽管酶活性不高,但乙醇产量迅速增加,在发酵结束时,乙醇产量为1.09 g/L。

2.3 丁醛/醇脱氢酶活性变化

丁醛脱氢酶是由丁酰辅酶A转化为丁醛的关键酶,为NADH依赖型。丁醇脱氢酶是由丁醛转化为丁醇的关键酶,为NADPH依赖型。如图3所示,在发酵的初始阶段,两种酶的酶活均随发酵时间延长逐渐增大,丁醇脱氢酶活性的变化要明显大于丁醛脱氢酶,在发酵进行到15 h时,丁醛脱氢酶的活性基本没有发生改变,但丁

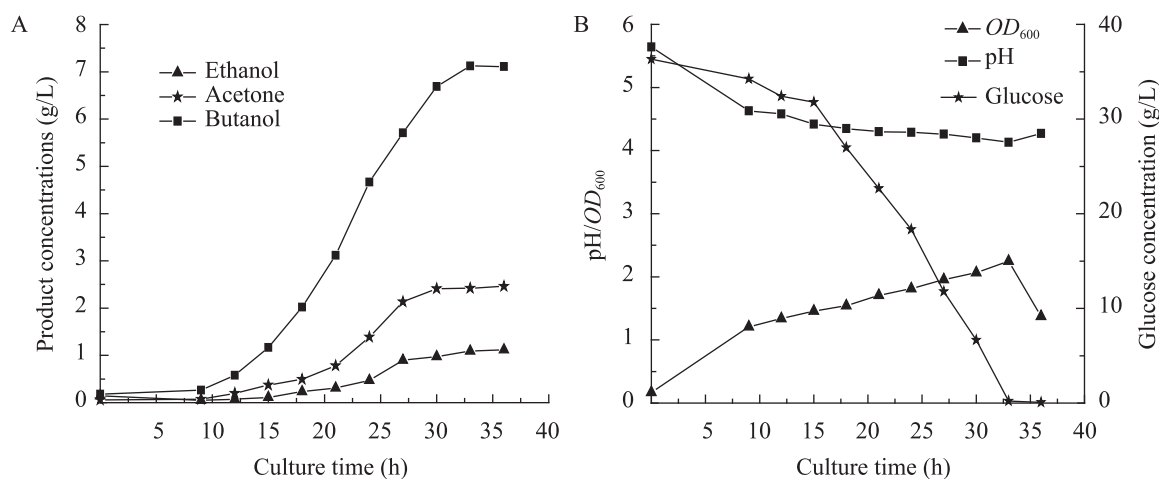


图1 *Bacillus* sp. TSH1 发酵结果 (A: 丁醇、丙酮和乙醇的合成; B: 细胞生长、葡萄糖消耗和pH的变化)

Fig. 1 Fermentation results of *Bacillus* sp. TSH1. (A) Syntheses of butanol, acetone and ethanol. (B) Variations of OD₆₀₀, pH and glucose concentration.

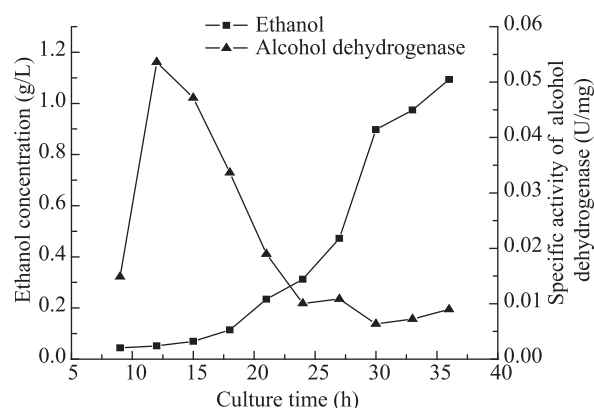


图2 乙醇脱氢酶活性与乙醇产量的变化
Fig. 2 Changes about specific activity of alcohol dehydrogenase and concentration of ethanol.

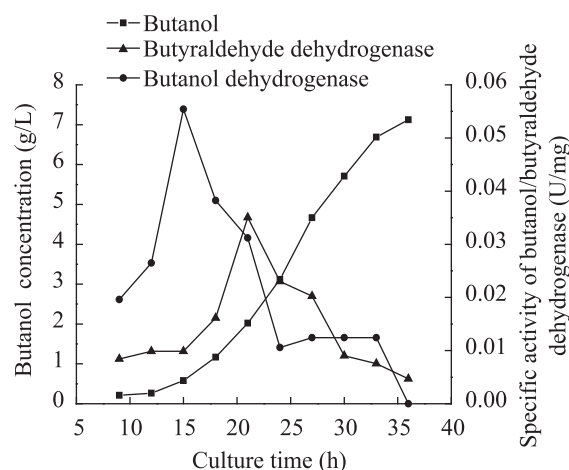


图3 丁醛/丁醇脱氢酶和丁醇产量的关系
Fig. 3 Relationships among specific activities of butanol dehydrogenase, butyraldehyde dehydrogenase and butanol concentration.

醇脱氢酶的活性已经达到最大值 0.055 U/mg, 此时, 丁醇产率也从发酵初期的缓慢增长变为迅速上升。15 h 后, 丁醛脱氢酶的活性开始增加并在 21 h 达到最大值 0.035 U/mg, 此时丁醇脱氢酶的活性只有最大值的 44%, 21 h 后, 两种酶的活性均逐渐迅速下降且在发酵结束时基本失活。这段时间内, 尽管丁醇的产量在增加, 但是产率逐渐

减慢, 发酵终止时丁醇的产量为 7.13 g/L。Peter Diirre 等对 *C. acetobutylicum* DSM 1732 进行了研究, 丁醛脱氢酶的活性在丁醇产量开始增加时达到最大值, 而丁醇脱氢酶则在发酵完全进入产溶剂期后才达到最大值^[12]。

3 讨论

国内外一些学者从不同的产丁醇菌株出发对其进行改造后, 丁醇产量或得率等有所提高^[21], 但均为严格厌氧菌, 对设备要求严格。王风芹等从种植怀地黄的土壤中通过富集培养和分离纯化等得到一株产丁醇的兼性厌氧菌 *Bacillus* sp. C2, 以 7% 玉米醪液为原料, 丁醇产量可达 11.2 g/L^[22]。本实验室自行分离得到的 *Bacillus* sp. TSH1 以 5% 玉米醪液为原料, 丁醇产量可达 11.39 g/L。不同的丁醇发酵菌株的特性对比如表 1 所示。

Qureshi 等曾对 *C. beijerinckii* BA 101 发酵生产丁醇的经济性进行评估。当每吨玉米的价格为 79.23 美元时, 在 ABE 生产能力为 153 000 t 的工厂中, 生产设备成本和总成本分别为 33.47×10^6 和 110.46×10^6 美元。当 ABE 得率为 0.42 (gABE/g 葡萄糖) 时, 丁醇的价格预计为 0.34 美元/kg^[27]。

筛选得到的 TSH1 菌株是兼性厌氧菌, 对形态学、生理生化特性研究及 16S rRNA 测序, 表明该菌株为芽胞杆菌。*Bacillus* sp. TSH1 与丙酮丁醇梭菌 ATCC824 等严格厌氧菌的发酵过程和代谢产物类似, 故推测溶剂产生也由类似的关键酶催化完成。从本研究结果可以看出, *Bacillus* sp. TSH1 具有乙醇脱氢酶、丁醛脱氢酶以及丁醇脱氢酶, 可以实现由乙醛到乙醇, 以及丁酰辅酶 A 到丁醛再到丁醇的转化, 从而证明了该菌株产溶剂

表 1 不同丁醇发酵菌株的对比

Table 1 Comparisons of different butanol-forming strains

Butanol-forming strain	Culture conditions	Culture	Butanol production (g/L)	Proportion of butanol in ABE (%)	Yield (g butano/g glucose)	Reference
<i>Bacillus</i> sp. TSH1	Acultative anaerobic	Corn mash P2	11.4 13.7	70	0.25	This work
<i>Bacillus</i> sp. C2	Acultative anaerobic	Corn mash Corn straw hydrolysate	11.2 2.63	65	0.11	[22]
<i>C. acetobutylicum</i> ATCC 824	Strictly anaerobic	Corn mash P2	12.6 14.2	59	0.20	[23] [24]
<i>C. acetobutylicum</i> EA 2018	Strictly anaerobic	Corn mash P2	13.0 13.6	70	0.23	[25] [26]
<i>C. beijerinckii</i> BA 101	Strictly anaerobic	MP2	20.9	79	0.26	[27] [28]

代谢途径的存在, 在菌株 *Bacillus* sp. TSH1 的发酵工艺已经得到优化且代谢通路已经明确的情况下, 分析这 3 种酶在发酵过程中的酶活变化规律, 对进一步解析 *Bacillus* sp. TSH1 丁醇和乙醇合成代谢途径及调控机制奠定了基础, 也对 *Bacillus* sp. TSH1 在蛋白水平的表达分析提供了参考。

本文检测乙醇脱氢酶所用辅酶为 NADH, 在乙醇刚开始生成时, 比活即达到最高, 相对 9 h 增加了 2.6 倍。丁醛脱氢酶所用辅酶也是 NADH, 在发酵进行到产溶剂期后比活达到最大值, 相比 9 h 增加了 3.16 倍, 而丁醇脱氢酶辅酶则使用 NADPH, 在产酸期比活就已经达到最大值, 较其他两种酶而言增加最少, 相对 9 h 增加了 1.82 倍。其他研究者对不同菌种的丁醛脱氢酶和丁醇脱氢酶也做过检测, 分别使用不同的细胞破碎方法, 离心条件以及不同的底物和辅酶进行反应^[12]。具体结果比较如表 2 所示。

从 *Bacillus* sp. TSH1 与其他菌株脱氢酶活的比较结果可以看出, 在底物及辅酶类型相同时, *Bacillus* sp. TSH1 中丁醇脱氢酶及丁醛脱氢酶的最大酶活结果与其他菌株相似, 与预期结果一

致, 即尽管菌株对氧的耐受性不同, 相同的反应由相似的酶进行催化。

从 *Bacillus* sp. TSH1 中脱氢酶的比活与溶剂产生的关系上看, 3 种酶在发酵开始即迅速升高, 但是溶剂在缓慢生成。在酶活下降之后, 溶剂的产量仍在增加, 这是因为检测的酶活性是瞬时的, 而乙醇产量是累积的, 因此即使在后期酶活较低的情况下, 产物的浓度也在不断升高。另外, 本文所检测的为酶的比活力, 而从 OD 值可以看出 (图 1B), 在发酵开始至结束之前的 33 h, OD 值一直在持续升高, 表明发酵液中细胞浓度在不断增大, 因而, 发酵后期单位体积的蛋白浓度也较高, 单位发酵液中总的酶活性可能保持恒定水平。所以, 在发酵后期, 总体的酶活水平仍可以维持溶剂产量的持续增长。

另外, 由于丁醇对细胞的毒性, 当发酵液中丁醇的质量浓度增大到 11 g/L 时, 细胞因受到丁醇的抑制而不能生长^[33], 因此, 高丁醇耐受性菌种的选育以及诱变菌株的丁醇代谢途径中关键酶的测定也是该课题未来进行研究的重要内容^[34-35]。

表 2 不同文献报道的丁醛脱氢酶和丁醇脱氢酶的比活及测定条件比较

Table 2 Comparisons of specific activity and measurement conditions of butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase as reported in the literatures

Butanol dehydrogenase			Butyraldehyde dehydrogenase			Cell lysis procedure	Centrifugation conditions	Reference
Coenzyme	Substrate	Specific activity (U/mg) ^a	Coenzyme	Substrate	Specific activity (U/mg) ^a			
NAD ⁺	Butanol	0.0096	NAD ⁺	Butyraldehyde	0.018	Ultrasonication	20 000×g, 20 min	[29]
NADP ⁺	Butanol	0.014	NADP ⁺	Butyraldehyde	0.0017			
NADH	Butyraldehyde	0.02	NADH	Butyryl-CoA	0.006	French press	8 000×g, 25 min	[30]
NAD ⁺	Butanol	0.06	NADH	Butyryl-CoA	0.04	Ultrasonication	10 000×g, 30 min	[31]
NADP ⁺	Butanol	0.007	NADPH	Butyryl-CoA	0.0048			
NADPH	Butyraldehyde	0.14	NADH	Butyryl-CoA	0.038	French press	95 000×g, 60 min	[12]
NADP ⁺	Butanol	0.012	n.d.	n.d.	n.d.	Lysozyme	37 000×g, 30 min	[32]
NADPH	Butyraldehyde	0.048	NADH	Butyryl-CoA	0.18	Ultrasonication	10 000×g, 10 min	[11]
NADPH	Butyraldehyde	0.055	NADH	Butyryl-CoA	0.035	Ultrasonication	10 000×g, 10 min	This work

^a: maximal values reported; n.d.: not determined.

REFERENCES

[1] Jin XQ, Wang GL, He BF, et al. Research progress and high yield strategy of acetone-butanol fermentation. Chem Ind Eng Prog, 2007, 26(12): 1727–1732 (in Chinese).
靳孝庆, 王桂兰, 何冰芳, 等. 丙酮丁醇发酵的研究进展及其高产策略. 化工进展, 2007, 26(12): 1727–1732.

[2] Liu Y, Liu HJ, Zhang JA, et al. Mutation of *Cl. beijerinckii* protoplasts by ⁶⁰Co- γ irradiation. J Chem Eng, 2009, 10(60): 2549–2554 (in Chinese).
刘娅, 刘宏娟, 张建安, 等. ⁶⁰Co- γ 对 *Cl. beijerinckii* 原生质体的辐照诱变. 化工学报, 2009, 10(60): 2549–2554.

[3] Gao XF, Zhao H, Zhang GH, et al. Genome shuffling of *Clostridium acetobutylicum* CICC 8012 for improved production of acetone-butanol-ethanol (ABE). Curr Microbiol, 2012, 65(2): 128–132.

[4] Walter KA, Bennett GN, Papoutsakis ET. Molecular characterization of two *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 butanol dehydrogenase isozyme genes. J Bacteriol, 1992, 174(22): 7149–7158.

[5] Petersen DJ, Welch RW, Rudolph FB, et al. Molecular cloning of an alcohol (butanol) dehydrogenase gene cluster from *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. J Bacteriol, 1991, 173(5): 1831–1834.

[6] Welch RW, Rudolph FB, Papoutsakis ET. Purification and characterization of the NADH-dependent butanol dehydrogenase from *Clostridium acetobutylicum* (ATCC 824). Arch Biochem Biophys, 1989, 273(2): 309–318.

[7] Fontaine L, Meynial SI, Girbal L, et al. Molecular characterization and transcriptional analysis of adhE2, the gene encoding the NADH-dependent aldehyde/alcohol dehydrogenase responsible for butanol production in alcohologenic cultures of

- Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. J Bacteriol, 2002, 184(3): 821–830.
- [8] Nölling J, Breton G, Omelchenko MV, et al. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. J Bacteriol, 2001, 183(16): 4823–4838.
- [9] Lee J, Blaschek HP. Glucose uptake in *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 and the solvent-hyper producing mutant BA101. Appl Environ Microbiol, 2001, 11: 5025–5031.
- [10] Chen CK, Blaschek HP. Examination of physiological and molecular factors involved in enhanced solvent production by *Clostridium beijerinckii* BA101. Appl Environ Microbiol, 1999, 5: 2269–2271.
- [11] Thaddeus E, Qureshi N, Blaschek HP. Production of acetone-butanol-ethanol(ABE) in a continuous flow bioreactor using degermed corn and *Clostridium beijerinckii*. Process Biochem, 2007, 42(1): 34–39.
- [12] Diirre P, Kuhn A, Gottwald M. Enzymatic investigations on butanol dehydrogenase and butyraldehyde dehydrogenase in extracts of *Clostridium acetobutylicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 1987, 26: 268–272.
- [13] Wang XP, Xing SL. Determination of protein quantitation using the method of coomassie brilliant blue. Tianjin Chem Ind, 2009, 23(3): 40–41 (in Chinese).
王孝平, 邢树礼. 考马斯亮蓝法测定蛋白含量的研究. 天津化工, 2009, 23(3): 40–41.
- [14] Stephen FH, Zhu CX. Butanol-ethanol dehydrogenase and butanol-ethanol-isopropanol dehydrogenase: different alcohol dehydrogenases in two strains of *Clostridium beijerinckii* (*Clostridium butylicum*). Appl Environ Microbiol, 1987, 53(4): 697–703.
- [15] Diirre P, Kuhn A, Gottschalk G. Treatment with allyl alcohol selects specifically for mutants of *Clostridium acetobutylicum* defective in butanol synthesis. FEMS Microbiol Lett, 1986, 36: 77–81.
- [16] Yao WB. Introduction of Biotechnology Pharmaceutical. Beijing: China Medical Science Press, 2003, 125–127 (in Chinese).
姚文兵. 生物技术制药概论. 北京: 中国医药科技出版社, 2003, 125–127.
- [17] Girbal L, Soucaille P. Regulation of solvent production in *Clostridium acetobutylicum*. Trends Biotechnol, 1998, 16 (1): 11–16.
- [18] Yan RT, Zhu CX, Golemboski C. Expressing solvent-forming enzymes and onset of solvent production in batch cultures of *Clostridium beijerinckii* (*Clostridium butylicum*). Appl Environ Microbiol, 1988, 54: 642–648.
- [19] Parekh M, Formanek J, Blaschek HP. Development of a cost-effective glucose-corn steep medium for production of butanol by *Clostridium beijerinckii*. J Ind Microbiol Biotechnol, 1998, 21: 187–191.
- [20] Petersen DJ, Bennett GN. Enzymatic characterization of a nonmotile, nonsolventogenic *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 mutant. Curr microbiol, 1991, 23(11): 253–258.
- [21] Annous BA, Blaschek HP. Isolation and characterization of *Clostridium acetobutylicum* mutants with enhanced amylolytic activity. Appl Environ Microbiol, 1991, 57(9): 2544–2548.
- [22] Wang FQ, Xie H, Chu LR, et al. Screening and identification of a *Bacillus* strain producing butanol. Microbiol China, 2010, 37(1): 7–11 (in Chinese).
王风芹, 谢慧, 楚乐然, 等. 产丁醇芽孢杆菌的分离, 筛选与鉴定. 微生物学通报, 2010, 37(1): 7–11.
- [23] Lin YL, Blaschek HP. Butanol production by a butanol-tolerant strain of *Clostridium acetobutylicum* in extruded corn broth. Appl Environ Microbiol, 1983, 3(3): 966–973.
- [24] Lee J, Jang YS, Choi SJ, et al. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 for Isopropanol-Butanol-Ethanol fermentation. Appl Environ Microbiol, 2012, 78(5): 1416–1423.
- [25] Gu Y, Hu SY, Chen J, et al. Ammonium acetate enhances solvent production by *Clostridium*

- acetobutylicum* EA 2018 using cassava as a fermentation medium. J Ind Microbiol Biotechnol, 2009(36): 1225–1232.
- [26] Jiang Y, Xu C, Dong F, et al. Disruption of the acetoacetate decarboxylase gene in solvent-producing *Clostridium acetobutylicum* increases the butanol ratio. Metab Eng, 2009, 11(4/5): 284–191.
- [27] Qureshi N, Blaschek HP. ABE production from corn: a recent economic evaluation. J Ind Microbiol Biotechnol, 2001, 27: 292–297.
- [28] Chen CK, Blaschek HP. Acetate enhances solvent production and prevents degeneration in *Clostridium beijerinckii* BA101. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52(2): 170–173.
- [29] Petitdemange H, Cherrier C, Bengone JM, et al. Study of the NADH and NADPH-ferredoxin oxidoreductase activities in *Clostridium acetobutylicum*. Can J Microbiol, 1977, 23(2): 152–160.
- [30] Gerckens B. Studies on the growth and solvent production of *Clostridium acetobutylicum*[D]. Germany: University of Gottingen, 1980.
- [31] Andersch W, Bahl H, Gottschalk G. Level of enzymes involved in acetate, butyrate, acetone and butanol formation by *Clostridium acetobutylicum*. Appl Microbiol Biotechnol, 1983, 18: 327–332.
- [32] George HA, Chen JS. Acidic conditions are not obligatory for onset of butanol formation by *Clostridium beijerinckii* (Synonym, *C. butylicum*). Appl Environ Microbiol, 1983, 46(2): 321–327.
- [33] Linden JC, Moreira AR, Lenz TG. Comprehensive Biotechnology. Oxford: Pergamon Press, 1985.
- [34] Zhou X, Traxler RW. Enhanced butanol production and reduced autolysin activity after chloramphenicol treatment of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. Appl Microbiol Biotechnol, 1992, 37(3): 293–297.
- [35] Westhuizen A, Jones DT, Woods DR. Autolytic activity and butanol tolerance of *Clostridium acetobutylicum*. Appl Environ Microbiol, 1982, 44: 1277–1281.

(本文责编 郝丽芳)