

石油烃降解酶及其基因的结构、功能和表达调控*

于寒颖** 杨 慧

(东北石油大学石油工程学院提高油气采收率教育部重点实验室 大庆 163318)

摘 要 研究烃降解酶及其基因是进行石油微生物分子检测和工程菌构建的重要基础. 本文对目前烃降解酶及其基因的结构、功能和调控机制的最新研究进展进行了总结. 催化烷烃好氧降解的起始酶有几类加氧酶, 膜整合甲烷单加氧酶、萘-1,2-双加氧酶和异丙苯双加氧酶的晶体结构已经被解析. 烷基或芳基琥珀酸合酶催化烃厌氧代谢的主要起始反应, 而 *Azoarcus* sp. 乙苯厌氧代谢起始反应由乙苯脱氢酶催化. 在细菌中, 烃代谢相关基因主要通过形成操纵子进行表达调控, 基因转录受烃或类似物诱导, 并受细胞全局调控. 一些微生物由于存在多种烃代谢途径而可能具有复杂的基因调控机制. 此外, 生态学研究表明, 环境中烃降解基因的诱导动态与实验室内纯培养分析不同. 在分析石油降解工程菌构建解决问题的基础上, 提出了烃代谢综合调控和环境中相关酶及基因诱导研究的重要性, 并对未来烃降解酶及其基因在有毒物降解理论研究和生物修复上的应用进行了展望. 图3 参50

关键词 石油微生物; 烃; 加氧酶; 苯酰琥珀酸合酶; 乙苯脱氢酶; 基因表达调控

CLC Q939.97 : Q78

Structure, Function and Expression Regulation of Hydrocarbon-degrading Enzymes and Their Encoding Genes*

YU Hanying** & YANG Hui

(Enhanced Oil and Gas Recovery Key Laboratory of Ministry of Education, Department of Petroleum Engineering, Northeast Petroleum University, Daqing 163318, Heilongjiang, China)

Abstract The research on the enzymes and genes involving in hydrocarbon biodegradation is the important basis of molecular assay of petroleum microbes and construction of the engineering strains. In this review, the recent advances of structures, functions and regulations of hydrocarbon-degrading enzymes and the corresponding genes were summarized. The first enzymes in the aerobic metabolism pathways of hydrocarbon included several types of oxydases. Among them, the crystal structures of particulate methane monooxygenase protomer, the terminal oxygenase component of cumene dioxygenase and naphthalene dioxygenase were reported. The aryl-succinate or alkyl-succinate synthase were the first basic enzymes in the anaerobic transformation of hydrocarbon while ethylbenzene dehydrogenase catalyzed the initial reaction of anaerobic degradation of ethylbenzene in *Azoarcus* sp. For bacteria, the hydrocarbon-degrading genes consisting of operons and their transcriptions were induced by hydrocarbon or analogues and limited by global cell control. Some microorganisms possessed the complicated hydrocarbon-degrading regulations which were consistent with their various hydrocarbon metabolism pathways. In addition, the related study on ecology indicated that the induction process of genes involving in the hydrocarbon degradation in the environment were different from that of the culture in the laboratory. Based on the analysis of the unsolved questions of construction the hydrocarbon-degrading engineering bacteria, the significance of research on the comprehensive regulation of hydrocarbon metabolism in the cells and the induction of the related enzymes and genes in the environment was proposed. The application of the enzymes and genes, involving in hydrocarbon biodegradation, for the theoretic research on toxicant degradation and bioremediation in the future was prospected. Fig 3, Ref 50

Keywords petroleum microorganism; hydrocarbon; oxydase; benzoylsuccinate sythase; ethylbenzene dehydrogenase; gene regulation

CLC Q939.97 : Q78

收稿日期: 2011-10-17 接受日期: 2011-12-12

*国家自然科学基金项目 (No. 51104031) 资助 Supported by the National Natural Science Foudation of China (No. 51104031)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: yuhy@nepu.edu.cn)

烃是由碳、氢组成的化合物,根据 π -键和环状结构分为烷烃、烯烃、炔烃和脂环及芳香烃。这些化合物具有非极性的C—C键和C—H键,这种结构特征使其化学反应性和水溶解度均比较低(含三键的烃除外)^[1]。一些烃类,如多环芳香烃,对生物体还具有毒性。因此,在自然环境中烃的降解是相对缓慢的。鉴于烃降解在石油污染生物修复技术开发上的重要应用。长期以来,烃降解微生物分离、烃代谢途径、相关酶的催化机理及烃降解基因的克隆和分析均是石油微生物学研究的热点。烃好氧降解研究起始于20世纪初。在20世纪中后期,烃好氧代谢获得了广泛而深入的研究。烃类化合物种类繁多,在不同的微生物中,甚至是相同的细胞内,同种烃可能又存在不同的代谢途径^[2],其中涉及的酶难以尽述。但是,烃的好氧降解以分子氧作为共底物,在烃好氧代谢途径中催化第一个反应步骤的酶均是加氧酶。烃厌氧代谢从20世纪90年代成为了烃降解研究的一个新热点。酶结构和功能研究是酶定向改造的基础,烃降解基因及其表达调控研究则是在基因水平上构建烃高效降解菌或酶的途径。本文就烃降解起始酶、代表性烃降解基因结构、功能及其表达调控的最新研究进展进行概述和分析。

1 烃好氧降解酶

烷烃好氧降解的起始酶统称为烷烃羟化酶,该类酶是烃代谢途径的关键酶之一。目前鉴定的羟化酶包括了几类加氧酶:整合膜的单加氧酶、细菌细胞色素P450(I型)、真核生物细胞色素P450(II型)、类似于膜整合甲烷单加氧酶的丁烷单加氧酶、类似于可溶性甲烷单加氧酶的丁烷单加氧酶、双加氧酶和未知蛋白^[3]。整合膜的单加氧酶由含双核铁的膜羟化酶、含铁的红素氧还原蛋白和含FAD的红素氧还原蛋白还原酶组成,辅因子为NADH。细菌细胞色素P450(I型)由含P450血红素的P450加氧酶、含[2Fe-2S]的铁氧还蛋白和含FAD的铁氧还蛋白还原酶组成,辅因子为NADH。真核生物细胞色素P450(II型)由含P450血红素的微粒体加氧酶和含FAD

的铁氧还蛋白组成,辅因子为FMN、NADPH。类似于膜整合甲烷单加氧酶的丁烷单加氧酶由含铜、铁的两个多肽和含FAD的苯醌氧化还原酶组成,辅因子为NADH。类似于可溶性甲烷单加氧酶的丁烷颗粒性单加氧酶由含双核铁的 $\alpha_2\beta_2\gamma_2$ 羟化酶和含[2Fe-2S]的还原酶组成,辅因子为FAD、NADH调节亚基。双加氧酶由含铜的同型二聚体组成,辅因子是FAD。未知蛋白是指在丁烷氧化过程中必不可少的54kDa蛋白。根据催化底物的链长,烷烃羟化酶则可以被分为能够作用于 C_1 - C_4 的甲烷单加氧酶、催化 C_5 - C_{16} 降解的膜整合非血红素铁蛋白和细胞色素P450,以及催化 C_{17} 以上的*Geobacillus thermodenitrificans* NG80-2 *ladA*基因产物、*Acinetobacter* sp. DSM 17874 *almA*基因产物和*Acinetobacter* sp. M-1中的未知蛋白^[4]。加氧酶对烃的催化氧化是将电子从辅因子和酶传递到分子氧的过程,但是不生成ATP^[5]。在芳香烃降解途径中,除了催化起始反应步骤的加氧酶,还包括开环的内二元醇双加氧酶和外二元醇双加氧酶,它们分别在间位和邻位氧化开环。多组分Rieske非亚铁血红素铁氧化酶家族的甲苯双加氧酶、苯双加氧酶、萘双加氧酶是催化芳香烃降解的典型酶系。章俭和夏春谷对以邻苯二酚双加氧酶、萘双加氧酶、联苯双加氧酶及栎精双加氧酶为代表的一系列能够催化氧化芳香烃类化合物的双加氧酶的组成和反应动力学特征等进行了综述^[6],本文不再重复。值得关注的是,膜整合甲烷单加氧酶、萘-1,2-双加氧酶和异丙苯双加氧酶的晶体结构已经被报道^[7-9]。图1-A显示了膜整合甲烷加氧酶的结构。对*Pseudomonas putida* GPo1和*Alcanivorax borkumensis* AP1烷烃羟化酶研究的结果显示,位于膜整合羟化酶跨膜螺旋中间的色氨酸决定可催化的反应底物链长。如果该氨基酸被丝氨酸或半胱氨酸替代,则该酶将能够催化比 C_{13} 长的烷烃^[10]。图1 B显示了萘双加氧酶的高级结构和催化过程。Ferraro等通过定点突变和结构分析显示了该酶催化的立体特异性和区域选择性(Regioselectivity)。

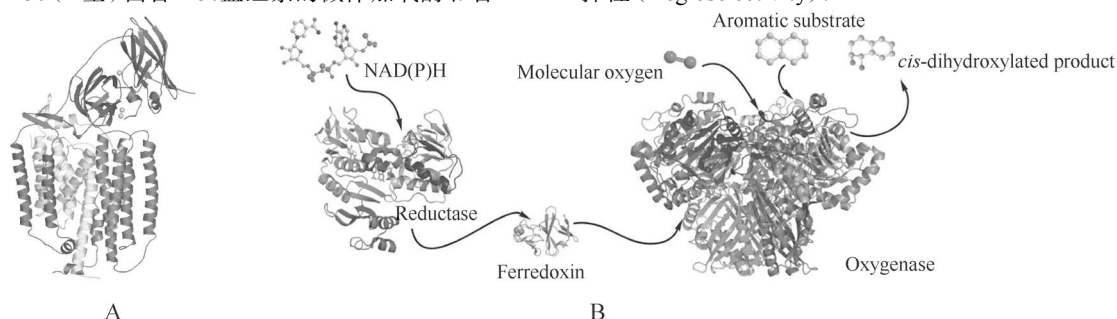


图1 烃加氧酶晶体结构^[7-8]

Fig. 1 Crystal structures of oxygenase of hydrocarbon^[7-8]

A. 膜结合的甲烷单加氧酶前体; B. 萘双加氧酶

A. Particulate methane monooxygenase protomer; B. Naphthalene dioxygenase

2 烃厌氧降解酶

迄今为止,已经分别从硝酸盐还原菌、铁还原菌、硫酸盐还原菌、锰还原菌、光合自养菌和合营生活微生物类群中分离了烃厌氧降解微生物^[11]。报道能够被厌氧代谢的烃则包括了C₆₋₂₀脂肪族烯烃和烷烃、单环的烷基苯(甲苯、苯乙烷、对羟基苯甲酸丙酯、对异丙基甲苯、二甲苯和乙基甲苯的同分异构体),以及苯和萘^[12]。在各种细菌中,依赖延胡索酸形成芳基琥珀酸和烷基琥珀酸与反硝化细菌中的乙苯脱氢作用是目下了解得最清楚的烃厌氧降解起始反应。其他的起始活化机制还包括脱氢作用、萘和菲的羧化(硫酸盐还原菌富集培养物)、苯的甲基化(*Dechloromonas aromatica* RGB)、乙炔水合酶催化的水合作用(*Pelobacter acetylenicus*)和甲基辅酶M还原酶可能参与的甲烷厌氧活化反应。

目前,甲苯和乙苯的厌氧代谢是烃类厌氧降解中研究得最为完善的^[13]。甲苯厌氧代谢起始反应由苯基琥珀酸合酶(BSS)催化。该酶具有一个甘氨酸基团,与丙酮酸甲酸裂解酶(PFL)和厌氧菌中催化DNA合成的III型核苷酸还原酶催化性亚基NrdD组成含甘氨酸基团酶家族。含甘氨酸基团蛋白家族的酶在合成后并不含有活性基团,是非活性蛋白,激活反应由特异的激活酶催化。激活酶从多肽链的甘氨酸残基上去掉一个氢原子,催化过程需要还原性黄素氧还蛋白和S-腺苷甲硫氨酸,形成中间产物5'-脱氧腺苷基团^[14]。苯基琥珀酸合酶催化的甲苯与延胡索酸的结合不是一个完全的氧化还原反应,这与所有已知的转化甲苯的加氧酶不同。该过程是唯一一个形成C—C键的生物化学反应,也不同于羧化、醛缩酶和羧基酸裂解酶的反应。尽管PFL和NrdD具有与苯基琥珀酸合酶类似的依赖甘氨酸的催化机制,但是它们的底物与烃相比却是相当简单的化合物,可见苯基琥珀酸合酶催化反应的特殊性^[14-15]。苯基琥珀酸合酶对甲苯厌氧氧化的催化首先是从甲苯上吸收一个氢原子,产生一个带有苯基基团的中间产物,然后延胡索酸可以被整合到该中间化合物上,形成苯酰琥珀酸基团,随后苯酰琥珀酸基团通过从酶上转移一个氢原子而被转化为苯酰琥珀酸。苯基琥珀酸合酶受底物类似物苯甲醇、苯甲醛或苯肼可逆抑制。苯基基团产生是苯基琥珀酸形成的限速步骤。该酶对空气极其敏感,很易失活,在氧气存在条件下发生多肽链断裂,半衰期仅有20~30 s。Leuthner等对该酶遇氧断裂的机制及与其他两个蛋白家族成员的不同进行了分析^[15]。对*Thauera aromatica*的研究表明,苯基琥珀酸合酶含有一个具有氧化还原活性的黄素辅助因子,但是没有铁-硫簇,天然分子量(M_r)为220×10³,假设的亚基组成为 $\alpha_2\beta\gamma_2$ 。*Azoarcus* T的BSS和*T. aromatica* K172的BSS具有不同的活性,反应底物范围也不同。在*Azoarcus* T的苯酰琥珀酸合酶中,具有催化活性的甘氨酸残基被推测为甘氨酸

828^[14]。

在反硝化细菌*Azoarcus* EbN1中,乙苯厌氧代谢起始反应由乙苯脱氢酶催化。乙苯在脱氢作用下转化为(S)-1-苯基乙醇,其中的羟基基团来源于水^[16]。*Azoarcus* EbN1乙苯脱氢酶可溶,位于周质空间。该酶是一种钼/铁硫/正铁血红蛋白,序列分析和生物化学分析结果都显示乙苯脱氢酶是含钼辅因子酶类二甲亚砷还原酶家族的一个新成员^[17],分子量155×10³,对乙苯的表观 K_m <2 μmol/L,由 α 、 β 、 γ 3种亚基组成,形成 $\alpha\beta\gamma$ 结构,亚基分子量分别为69×10³、43×10³和23×10³,其中 α 亚基(EbdA) N-末端氨基酸序列与*T. selenatis* 硒酸盐还原酶等其它钼蛋白类似,含有两个精氨酸模体,是引导EbdABC经Tat转位途径穿越细胞膜的功能位点。在分离纯化过程中,如果血红素b辅因子处于还原态,则氧不影响乙苯脱氢酶活性,但是纯化的酶会受氧失活。*Azoarcus* EB1乙苯脱氢酶异三聚体各亚基的分子量分别为100×10³(α)、35×10³(β)和25×10³(γ)。每摩尔纯化的乙苯脱氢酶全酶大约含有0.5 mol钼、16 mol铁和15 mol易酸分解的硫,以及一个钼辅因子。除了乙苯,纯化的酶还能够氧化4-氟-乙苯和非芳香烃化合物3-甲基-2-戊烯和亚乙基环己烷。体外实验证明,*Azoarcus* EB1乙苯脱氢酶位于膜上,将乙苯氧化和对苯醌还原反应相偶联,催化的脱氢反应具有高度立体特异性,仅形成(S)-(2)-1-苯乙醇^[17]。在*Azoarcus* PbN1中,还可以检测到具有催化同系物*n*-丙苯活性的乙苯脱氢酶变体。

3 烃降解基因及其表达调控

3.1 烃好氧代谢基因及其表达调控

烃好氧降解基因定位于染色体可转移元件和/或质粒上。在不同微生物细胞内,烃降解性质粒可以相互转移。在转移过程中,这些质粒的结构可能发生改变,调节机制亦有差异。但是,也存在一些质粒,如TOL、NAH7或NAH90,在各种微生物内广泛分布,且结构保守^[18]。烷烃降解基因可能具有单或多拷贝,以相同或不同方向转录。Beilen等分析了不同微生物细胞内烷烃降解基因组织结构的多样性^[19]。*P. putida* GPo1 OCT质粒中烷烃降解基因包括了分别由*alkB*(烷烃羟化酶基因)、*alkF*和*alkG*(红素蛋白基因)、*alkJ*(醇脱氢酶基因)、*alkH*(醛脱氢酶基因)、*alkK*(乙酰-CoA合酶基因)、*alkL*(可能具有烷烃增溶作用或转运作用的未知蛋白编码基因)、*alkN*(接受甲基的转导蛋白,AlkN可能参与*P. putida*对烃的化学趋向性)与*alkT*(红素氧还蛋白还原酶基因)、*alkS*(调节蛋白)组成的两个操纵子^[19-21]。*P. putida* *alkS*在细胞指数生长期低水平表达,而在稳定期表达量显著增加。该基因的转录受两个启动子控制。AlkS属于LuxR家族,C-末端具有一个螺旋-转角-螺旋(HTH)结构域,N-末端附近含有一个ATP/GTP结合序列^[22]。AlkS对其自身表达具有正调控和负调控

子。起始于**bssC**的mRNA可能通过核酸剪切产生。含**bssD**基因的mRNA半衰期很短,而仅含有**bssCAB**基因的mRNA相对稳定,与基因表达产物量相一致^[25],说明了微生物基因编码的简约性和蛋白合成的高效性。

编码乙苯脱氢酶的基因**ebdABC**首先在*Azoarcus* Eb1中发现^[17]。随后,在*Azoarcus* EbN1全基因组测序中获得了一个56 kb DNA序列,该片段含有乙苯厌氧氧化为苯酰-CoA所需要的全部基因,包括调控因子编码基因^[28]。反硝化菌*Azoarcus* Eb1乙苯脱氢酶编码基因的序列分析显示,**ebdA**编码 α 亚基,该亚基含有974个氨基酸,具有一个钼辅因子结合结构域。**ebdB**基因编码 β 亚基,含352个氨基酸,具有几个4Fe-4S结合结构域。**ebdC**基因编码 γ 亚基,一个含有214个氨基酸的多肽,可能是膜结合亚基。对*Azoarcus* EbN1基因的分析结果显示,毗邻**ebdABC**基因的**ebdD**基因可能编码EbdA成熟的分子伴侣。(S)-1-苯乙醇脱氢酶编码基因**ped**与**ebdABCD**形成一个操纵子。另一含有5个基因的操纵子**apc1-5**编码苯乙酮羧化酶。**bal**基因位于**apc**基因上游,该基因可能编码苯酰乙酸CoA-连接酶(催化形成苯酰-CoA),并与**apc**基因共转录。在上述两个操纵子之间,存在两个不同的二元调节系统编码基因:**Tcs2/Tcr2**和**Tcs1/Tcr1**,两者分别是乙苯和苯乙酮代谢调控基因(图3)。虽然**Tcs2/Tcr2**和**TdiSR**体系高度相似,但是它们的感应元件在PAS结构域显著不同^[29]。此外,在*Azoarcus* EbN1中还检测到了一个含有脂肪酸 β -氧化所需的几乎所有基因的操纵子以及调控系统基因,两个LysR同源物和一个TetR同源物,这些蛋白可能参与乙苯依赖的基因表达^[28]。

3.3 细胞内不同代谢途径的综合调控

3.3.1 不同底物代谢途径的调控 烃降解基因包括组成型

和诱导型两种,编码的酶可能具有底物非特异性,使石油不同的烃组分能够同时被降解。例如,羟化酶的底物谱通常包括一定链长范围的烷烃。*Burkholderia* sp. RP007和腐臭假单胞菌OUS82菲双加氧酶不仅能够氧化菲,还能够氧化萘。*P. putida* OUS82的菲双加氧酶还可以将蒽、联苯、硫蒽、苯并蒽、芴、苯甲酸苯酯、二苯甲烷等多种芳香烃氧化为酚类^[30]。*Burkholderia* sp. RP007用相同的酶复合物还能够氧化蒽。*Burkholderia* sp. RP007 **phn**基因在大肠杆菌中表达的重组蛋白也证明了该基因编码的酶同时具有氧化萘和菲的功能^[31-32]。在烃厌氧代谢中,*Azoarcus* T的苯酰琥珀酸合酶除了甲苯还能厌氧代谢*m*-二甲苯^[27]。所有已知的烷烃厌氧降解细菌使用有限的、明确链长范围的烃,烃底物范围在各种微生物间不同^[12]。在细胞中存在多种羟化酶有利于微生物通过具有不同底物亲和常数的烷烃羟化酶实现在不同条件下的最优生长。

在铜绿假单胞杆菌中,烷烃的氧化作用是受底物诱导的。烷烃同系物、1,2-二甲氧基乙烷、二乙氧基甲烷、单环和二环烷烃、环丙烷、环丁烷等化合物也能够诱导代谢烷烃的酶。腐臭假单胞杆菌PpG6能够以C₆-C₁₀烷烃为生长底物,这些烷烃及其伯醇和仲醇与醛可以诱导烷烃氧化^[18]。对NAH7质粒的研究结果显示,萘、水杨酸酯和间-苯甲酸酯是萘降解基因的诱导物,而苯甲酸酯不能诱导该基因簇表达,在没有诱导物的条件下基因不转录。在假单胞菌中,编码萘邻位降解途径的基因位于质粒上,编码萘邻位降解途径的基因位于染色体上。在不同假单胞菌内,两种代谢途径发挥作用的程度不同,各种诱导物对于这些代谢途径的诱导作用也各有差异^[18]。

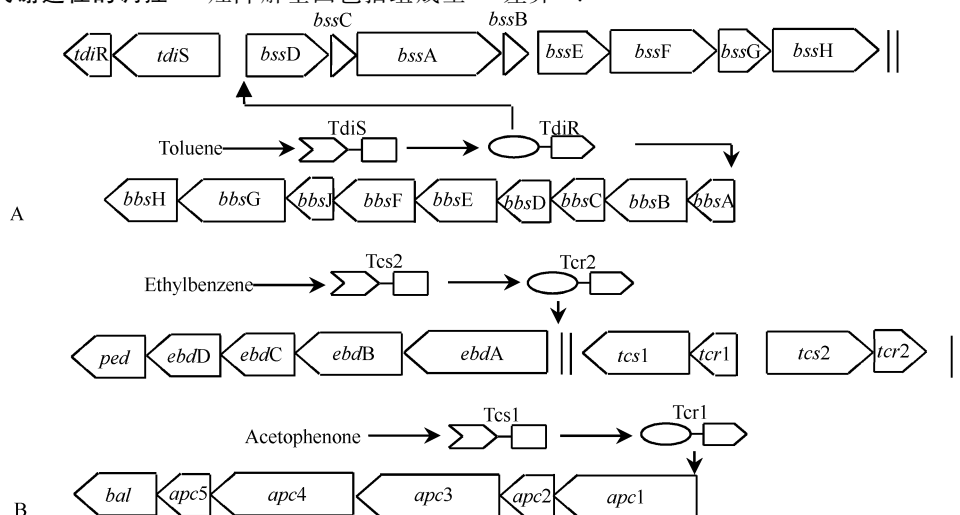


图3 反硝化菌EbN1烷基苯厌氧降解基因调控^[3]

Fig. 3 Regulation of anaerobic alkylbenzene degradation in denitrifying strain EbN1^[3]

A. TdiSR二元调节系统识别甲苯,介导**bss**和**bbs**协同转录; B. **Tcs2/Tcr2**和**Tcs1/Tcr1**二元调节系统分别识别乙苯和苯乙酮,分别介导**ebd-ped**和**apc-bal**顺序调控
A. The TdiSR two-component system recognizes toluene and mediates coordinative regulation of **bss** and **bbs**; B. The **Tcs2/Tcr2** and **Tcs1/Tcr1** two-component systems recognize ethylbenzene and acetophenone, respectively, mediate sequential regulation of **ebd-ped** and **apc-bal**, respectively

Acinetobacter sp. M-1能够降解长链烷烃。在*Acinetobacter* sp. M-1中,长链烷烃由含有 $alkMb$ 基因产物的烷烃羟化酶复合体起始降解,而链长更长的烷烃(C_{20} - C_{44})由含有 $alkMa$ 基因产物的烷烃羟化酶复合体起始降解。两种酶复合体具有相同的红素氧还蛋白亚基。红素氧还蛋白编码基因 $rubA$ 和 $rubB$ 组成表达,而 $alkMa$ 和 $alkMb$ 分别受各自底物诱导,两种烷降解基因在含不同底物的条件下启动转录,Tani等解释了这两种底物加氧酶基因调控机制的差异^[33]。

在已知的烷基苯厌氧降解菌中,反硝化菌EbN1比较特殊,该菌能够通过完全不同的途径降解甲苯和乙苯。两种途径受底物诱导,具有相同的中间代谢产物苯酰-CoA。在适应甲苯的细胞内,甲苯代谢的两个操纵子 bss 和 bbs 的表达被特异诱导,而参与乙苯厌氧降解的基因在适应乙苯和甲苯的细胞内均被诱导,说明甲苯可以作为乙苯代谢的替代诱导物^[29]。

葡萄糖、酵母粉、醋酸和甘油等阻遏烷烃代谢。Hugouvieux-Cotte-Pattat等发现,当微生物在LB培养基中生长时甲基苯乙醇对TOL途径的诱导长时间延迟,此影响被认为是由于培养基中具有较高含量的氨基酸产生的。葡萄糖具有类似的但是抑制程度较弱的效应。Duetz等研究了含有TOL质粒pWW0的*P. putida* mt-2中琥珀酸浓度对芳香烃化合物(甲苯、 m -和 p -二甲苯、三甲基苯和 m -乙基甲苯)代谢的影响,结果表明当*P. putida* (pWW0)在葡萄糖或琥珀酸上以最大速率生长时,即使存在诱导物,它的甲苯、间二甲苯和对二甲苯降解途径仍受抑制。当细胞生长在含有10~15 mmol/L琥珀酸的培养基中,在磷酸盐或硫酸盐限制的条件下,苯乙醇脱氢酶活性(BADH)低于生长在琥珀酸限制条件下的细胞相应活性的2%。当铵或氧限制时,琥珀酸对诱导剂诱导的抑制程度有限。BADH表达水平似乎与启动子Pu控制的转录水平密切相关,说明抑制发生在转录水平。甲苯代谢的下游途径对代谢抑制相对不敏感。该结果显示,代谢产物抑制与细胞高能状态而不是细胞高生长速率或饱和浓度的碳源和能源有关^[34]。

Pseudomonas M1 phc 基因簇的启动子Pa和Pk依赖 σ^{54} ,苯酚和苯都能诱导该基因簇转录^[35]。*Pseudomonas* sp. CF600 pVI150的 dmp 介导甲基苯酚到丙酮酸和乙酰辅酶A的转化。 Dmp 编码的调控因子DmpR和 xyl 编码的调控因子XylR结构相似,作用相关,并都依赖 σ^{54} ,导致两者可以在芳香烃效应物存在的条件下交互诱导。然而,比较介导全局调控的调控因子在两代谢途径的作用中发现,尽管两调节体系具有一定的相似性,细胞的全局调控仍然能够通过不同代谢途径各自的特性和代谢途径相互的关联对各种代谢途径进行精细调控^[36],显示了微生物细胞内烷降解基因调控的复杂性。

3.3.2 好氧和厌氧代谢途径的调控 *Thauera* sp. DNT-1在厌氧条件下和在好氧条件下都能够降解甲苯。该菌好氧降解甲

苯的双加氧酶基因 tod 已经克隆测序。该基因在好氧条件下由甲苯诱导转录。在非诱导条件下,*Thauera* sp. DNT-1的 tod 和参与 β -氧化的 bss 也具有本底水平的转录。保持本底水平的酶有助于细胞针对环境转换更快速的作出反应。 bss 基因在好氧和厌氧条件下均受甲苯诱导。如前所述,厌氧降解甲苯的起始酶苯酰琥珀酸合酶对氧气高度敏感。然而在好氧条件下,该菌保持低水平转录和翻译苯酰琥珀酸合酶。目前,该菌甲苯好氧代谢受氧气和甲苯双调控的机制还有待于研究^[37]。

T. aromatica T1甲苯代谢基因的组织结构与*T. aromatica* K172不同。在*T. aromatica* T1中, $tdiSR$ 同源基因 $tutC1B1$ 与 $bssDCAB$ 同源基因 $tutE$ 和 $tutFDG$ 之间有另一传导/反应调节蛋白对编码基因 $tutCB$ 。在*T. aromatica* K172中,未发现 $tutCB$ 同源基因。 $tutCB$ 独立转录,产物与甲苯好氧代谢调控蛋白TodST等高度同源性,与 $tdiSR$ 差异相对较大。传导/反应调节蛋白对 $tutC1B1$ 可能负责调控甲苯厌氧代谢,而 $tutCB$ 调控甲苯好氧代谢^[27]。

4 环境中烷降解基因的诱导

环境中存在的原油往往经受了不同程度的降解^[38]。烃的降解受多种因素影响^[39]。在通常情况下, C_{10} - C_{22} 的正烷烃、烷基芳烃和芳香族化合物易被生物降解。取代基的位置和数目影响烃可被生物降解的程度。气态的和较高分子量的正烷烃、环烷烃和取代烷烃、芳香族化合物和有取代基的芳香族化合物,以及联苯的转化可能依赖于共代谢^[18]。然而,也存在一些微生物能够特异的降解高分子量烃及其化合物。东北石油大学石油工程学院筛选的一株*Pseudomonas* sp.能够在井下显示出增加轻质烃的特点,具有降粘防蜡的作用。Chang等研究发现厌氧条件下菲、蒽、蒾、苊、芴的降解效率排列顺序为菲>蒽>蒾>苊>芴,说明在厌氧条件下多环芳烃的降解难易程度与在好氧条件下一致^[2]。微生物对石油烃降解利用的能力使其可能被应用于石油污染生物修复^[40-41]。

随着微生物分子生态学的发展,石油微生物在自然环境中实际发生的基因表达和酶催化降解过程引起了人们的关注。Piskonen等证明,烃的厌氧降解动力学分析结果在实地和实验室之间具有一定的相似性,也存在明显的差异^[42]。对在生物修复过程中甲苯和萘降解动态的研究表明,甲苯先于萘被微生物利用。伴随甲苯降解,可检测到大量的甲苯降解基因。甲苯被降解后,萘才开始被生物利用,萘降解基因的可检测量也随之增加,而甲苯降解基因量降低^[43]。

能够利用正烷烃进行生长的微生物不仅存在于好氧和厌氧条件下,而且活跃于从好氧到严格厌氧的各种环境中,如海水或淡水、土壤、沉积物或蓄水层等。目前,关于氧气浓度对细菌烷降解的影响还知之甚少,在亚含氧或拟厌氧条件下细菌如何降解烷烃有待于研究。Berthe-Corti和Fetzner

对亚含氧到拟厌氧生境中烷烃、氨和甲烷氧化细菌与其他聚集生活在一起的有机营养微生物研究的结果显示,各种微生物在对正烷烃氧化的过程中可能存在协同效应^[44]。

此外,在自然环境中各种微生物可能形成生物膜。生物膜的形成改变了微生物的生存能力,甲苯降解兼性厌氧菌 *Ralstonia pickettii* PKO1不能存活于氧气浓度过高的大量流体中;而当形成生物膜时,该菌将能够定殖在生物膜内部,与好氧菌竞争降解甲苯^[45],说明了环境中烃的降解速度可能快于微生物纯培养研究。

5 结论与展望

在石油污染生物修复过程中,微生物对烃的降解速度是生物修复能否有效应用的重要影响因素。烃降解酶及其基因研究是构建高效石油烃降解工程菌的基础。此外,烃类代谢与油藏内石油降解和酸化相关。在微生物提高采收率中,可以利用微生物以烃为碳源产生次级代谢产物开采石油。相应技术的开发和应用也依赖于对烃降解酶和基因调控的了解。

本文对羟化酶、苯酰琥珀酸合酶和乙苯脱氢酶结构和催化机理与代表性烃降解基因操纵子结构和调控的研究进展进行了总结:(1)目前羟化酶的结构和功能基本清楚。苯酰琥珀酸合酶是目前被研究较多的烃厌氧代谢起始酶,该酶催化的反应具有特殊性。在 *Azoarcus* sp.中发现了另一催化烃厌氧代谢起始反应的乙苯脱氢酶,该酶的结构和功能已经被报道。(2)目前烃降解研究不仅包括了起始降解酶和烃降解基因,而且涉及了代谢途径中其他关键酶及其相关DNA序列^[21, 46~48]。烃下游代谢途径中酶的研究增加了烃代谢的可调控位点,其编码基因可能与烃降解基因组成基因簇。(3)烃降解基因表达调控研究集中于酶活测定、诱导物研究和操纵子结构分析。代表性烃好氧降解质粒的基因组织结构基本已知,其中烷烃和甲苯好氧降解及甲苯和乙苯厌氧降解的基因调控机制被提出。(4)在翻译和酶活调节水平烃降解基因表达调控的研究较少。细胞内,各种烃的利用与在细胞全局调控下的精细调节,以及在好氧条件到厌氧条件下的表达调控还有待于进一步研究。细胞内不同烃代谢途径调控机制的差异研究则将可能为烃超级降解菌构建提供思路和途径。

(5)环境中烃降解菌共代谢作用和各种烃生物降解难易程度已经为人们所了解。随着微生物生态学的发展,烃降解相关基因和酶的诱导将可能采用分子生态学技术分析。代表性微生物烃降解基因调控机制理论研究与共生微生物烃代谢分析相结合将为烃降解工程菌及其应用技术开发奠定坚实基础。

由于烃降解反应和相关酶的特殊性,目前还没有有效的在体外测定羟化酶活的方法。许多羟化酶的底物不可溶、整合于膜的羟化酶难以在体外进行操作,导致了该酶研

究受到限制。烃厌氧降解酶遇氧易失活则给厌氧降解酶的研究带来了困难。石油微生物分子生态学研究结果发现,有些烃降解微生物不能被目前的培养技术培养,某些可能在环境中发挥了重要代谢作用的群落成员不能被分离,限制了烃高效降解微生物的研究,进而使其基因与酶的研究受到了影响。周蕾等论述了烃代谢产物在环境污染分析中的应用^[49]。而烃降解关键酶和基因,如xyIE作为分子探针也开始被用于烃降解检测和重要化合物的合成研究^[3, 50]。烃降解基因结构和加氧酶晶体结构的分析结果将促进酶定向改造研究的开展,使烃降解酶及其基因在未来有毒产物降解理论研究中将发挥越来越重要的作用。

References

- Widdel F, Boetius A, Rabus R. Anaerobic biodegradation of hydrocarbons including methane. *Prokaryotes*, 2006, 2: 1028~1049
- Zhao Y (赵渝). The proteomic research of aromatic hydrocarbon biodegradation pathway: [Doctor Degree Dissertation]. Shanghai: Eastchina Normal University (上海: 华东师范大学), 2007
- Ollivier B, Magot M. Petroleum Microbiology. Washington, D C: ASM Press, 2005
- Lu J (陆健). Isolation and characterizations of a high-efficiency alkane-degrading bacterium XCZ and functional analysis of its monooxygenase genes *alkB*: [Master Degree Dissertation]. Nanjing: Nanjing Agricultural University (南京: 南京农业大学), 2007
- Mason JR, Cammack R. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases. *Annu Rev Microbiol*, 1992, 46: 277~305
- Zhang J (章俭), Xia CG (夏春谷). Studies of structure and function of aromatic hydrocarbon dioxygenases. *Prog Chem* (化学进展), 2004, 16 (1): 116~122
- Lieberman RL, Rosenzweig AC. Crystal structure of particulate methane monooxygenase [M/OL]. www.umich.edu/~icbic/Abstracts/371805-1.pdf
- Ferraro DJ, Okerlund AL, Mowers JC, Ramaswamy S. Structural basis for regioselectivity and stereoselectivity of product formation by naphthalene 1,2-dioxygenase. *J Bacteriol*, 2006, 188 (19): 6986~6994
- Dong XS, Fushinobu S, Fukuda E, Terada T, Nakamura S, Shimizu K, Nojiri H, Omori T, Shoun H, Wakagi T. Crystal structure of the terminal oxygenase component of cumene dioxygenase from *Pseudomonas fluorescens* IP01. *J Bacteriol*, 2005, 187 (7): 2483~2490
- van Beilen JB, Smits THM, Roos FF, Brunner T, Balada SB, Röthlisberger M, Witholt B. Identification of an amino acid position that determines the substrate range of integral membrane alkane hydroxylases. *J Bacteriol*, 2005, 187 (1): 85~91
- Li X (黎霞), Cheng L (承磊), Deng Y (邓宇), Zhang H (张辉). Advances in anaerobic of biodegradation of hydrocarbon. *Chin J Appl*

- Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (2): 283~289
- 12 Heider J, Spormann AM, Beller HR, Widdel F. Anaerobic bacterial metabolism of hydrocarbons. *FEMS Microbiol Rev*, 1999, **22**: 459~473
 - 13 Boll M, Fuchs G, Heider J. Anaerobic oxidation of aromatic compounds and hydrocarbons. *Curr Opin Chem Biol*, 2002, **6**: 604~611
 - 14 Leuthner B, Leutwein C, Schulz H, Hörth P, Haehnel W, Schiltz E, Schägger H, Heider J. Biochemical and genetic characterization of benzylsuccinate synthase from *Thauera aromatica*: a new glycyl radical enzyme catalyzing the first step in anaerobic toluene metabolism. *Mol Microbiol*, 1998, **28** (3): 615~628
 - 15 Krieger CJ, Roseboom W, Albracht SPJ, Spormann AM. A Stable organic free radical in anaerobic benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T. *J Biol Chem*, 2001, **276** (16): 12924~12927
 - 16 Knienmeyer O, Heider J. Ethylbenzene dehydrogenase, a novel hydrocarbon-oxidizing molybdenum/iron-sulfur/heme enzyme. *J Biol Chem*, 2001, **276** (24): 21381~21386
 - 17 Johnson HA, Pelletier DA, Spormann AM. Isolation and characterization of anaerobic ethylbenzene dehydrogenase, a novel Mo-Fe-S enzyme. *J Bacteriol*, 2001, **183** (15): 4536~4542
 - 18 Atlas RM ed; Huang DF (黄第藩), Tan S (谭实), Yang WK (杨文宽), et al. trans. 石油微生物学. Beijing: Petroleum Industry Press (北京: 石油工业出版社), 1991. 4, 266, 268, 338, 369
 - 19 van Beilen JB, Li Z, Duetz WA, Smits THM, Witholt B. Diversity of alkane hydroxylase systems in the environment. *Oil & Gas Sci & Technol-Rev IFP*, 2003, **58** (4): 427~440
 - 20 Panke S, Meyer A, Huber CM, Witholt B, Wubbolts MG. An alkane-responsive expression system for the production of fine chemicals. *Appl & Environ Microbiol*, 1999, **65** (6): 2324~2332
 - 21 van Beilen JB, Panke S, Lucchini S, Franchini AG, Röthlisberger M, Witholt B. Analysis of *Pseudomonas putida* alkane-degradation gene clusters and flanking insertion sequences: evolution and regulation of the *alk* genes. *Microbiology*, 2001, **147**: 1621~1630
 - 22 van Beilen JB, Wubbolts MG, Witholt B. Genetics of alkane oxidation by *Pseudomonas oleovorans*. *Biodegradation*, 1994, **5**: 161~174
 - 23 Wentzel A, Ellingsen TE, Kotlar HK, Zotchev SB, Throne-Holst M. Bacterial metabolism of long-chain n-alkanes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, **76**: 1209~1221
 - 24 Ramos JL, Marqués S. Transcriptional control of the *Pseudomonas* Tol plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Annu Rev Microbiol*, 1997, **51**: 341~373
 - 25 Hermuth K, Leuthner B, Heider J. Operon structure and expression of the genes for benzylsuccinate synthase in *Thauera aromatica* strain K172. *Arch Microbiol*, 2002, **177**: 132~138
 - 26 Kube M, Heider J, Amann J, Hufnagel P, Kuhner S, Beck A, Reinhardt R, Rabus R. Genes involved in the anaerobic degradation of toluene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol*, 2004, **181**: 182~194
 - 27 Achong GR, Rodriguez AM, Spormann AM. Benzylsuccinate synthase of *Azoarcus* sp. strain T: cloning, sequencing, transcriptional organization, and its role in anaerobic toluene and *m*-xylene mineralization. *J Bacteriol*, 2001, **183** (23): 6763~6770
 - 28 Rabus R, Kube M, Beck A, Friedrich W, Richard R. Genes involved in the anaerobic degradation of ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *Arch Microbiol*, 2002, **178** (6): 506~516
 - 29 Kühner S, Wöhlbrand L, Fritz I, Wruck W, Hultschig C, Hufnagel P, Kube M, Reinhardt R, Rabus R. Substrate-dependent regulation of anaerobic degradation pathways for toluene and ethylbenzene in a denitrifying bacterium, strain EbN1. *J Bacteriol*, 2005, **187** (4): 1493~1503
 - 30 Wu FX (武凤霞). Isolation of phenanthrene degrading bacteria from oil-contaminated soil and their effects on phenanthrene degradation: [Master Degree Dissertation]. Xi'an: Northwest University (西安: 西北大学), 2006
 - 31 Laurie AD, Lloyd-Jones G. The *phn* genes of *Burkholderia* sp. strain RP007 constitute a divergent gene cluster for polycyclic aromatic hydrocarbon catabolism. *J Bacteriol*, 1999, **181** (2): 531~540
 - 32 Kiyohara H, Torigoe S, Kaida N, Asaki T, Lida T, Hayashi H, Takizawa N. Cloning and characterization of a chromosomal gene cluster, *pah*, that encodes the upper pathway for phenanthrene and naphthalene utilization by *Pseudomonas putida* OUS82. *J Bacteriol*, 1994, **176**: 2439~2443
 - 33 Tani A, Ishige T, Sakai Y, Kato N. Gene structures and regulation of the alkane hydroxylase complex in *Acinetobacter* sp. M-1. *J Bacteriol*, 2001, **183** (5): 1819~1823
 - 34 Duetz WA, Marqués S, Wind B, Ramos JL, van An del JG. Catabolite repression of the toluene degradation pathway in *Pseudomonas putida* harboring pWW0 under various conditions of nutrient limitation in chemostat culture. *Appl & Environ Microbiol*, 1996: 601~606
 - 35 Santos PM, Sá-Correia I. Characterization of the unique organization and co-regulation of a gene cluster required for phenol and benzene catabolism in *Pseudomonas* sp. M1. *J Biotechnol*, 2007, **131** (4): 371~378
 - 36 Sze CC, Bernardo LMD, Shingler V. Integration of global regulation of two aromatic-responsive σ^{54} -dependent systems: a common phenotype by different mechanisms. *J Bacteriol*, 2002, **184** (3): 760~770
 - 37 Shinoda Y, Sakai Y, Uenishi H, Uchihashi Y, Hiraishi A, Yukawa H, Yurimoto H, Kato N. Aerobic and anaerobic toluene degradation by a newly isolated denitrifying bacterium, *Thauera* sp. strain DNT-1. *Appl*

- & *Environ Microbiol*, 2004, **70** (3): 1385~1392
- 38 Aitken CM, Jones DM, Larter SR. Anaerobic hydrocarbon biodegradation in deep subsurface oil reservoirs. *Nature*, 2004, **431** (16): 291~294
- 39 Sun HB (孙海波). Isolation, identification and characteristics of PAHs-degrading bacteria and preliminary study on catechol 2,3-dioxygenase: [Master Degree Dissertation]. Jinan: Shandong University (济南: 山东大学), 2009
- 40 Xie DP (谢丹平), Yin H (尹华), Peng H (彭辉), Ye JS (叶锦韶), Zhang N (张娜). Degradation of crude oil by mixed culture. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2004, **10** (2): 210~214
- 41 Guo N (郭娜), Li ZM (李志敏), Ye Q (叶勤). Screen and identification of alkane degrading bacteria and characteristics of a predominant strain. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2011, **17** (4): 572~576
- 42 Parisi VA, Brubaker GR, Zenker MJ, Zenker MJ, Prince RC, Gieg LM, da Silva MLB, Alvarez PJJ, Suflita JM. Field metabolomics and laboratory assessments of anaerobic intrinsic bioremediation of hydrocarbons at a petroleum-contaminated site. *Microb Biotechnol*, 2009, **2** (2): 202~212
- 43 Piskonen R, Nyssönen M, Itävaara M. Evaluating the biodegradation of aromatic hydrocarbons by monitoring of several functional genes. *Biodegradation*, 2008, **19**: 883~895
- 44 Berthe-Corti L, Fetzner S. Bacterial metabolism of *n*-alkanes and ammonia under oxic, suboxic and anoxic conditions. *Acta Biotechnol*, 2002, **22** (3~4): 299~336
- 45 Kim H, Jaffe PR. Degradation of toluene by a mixed population of archetypal aerobes, microaerophiles, and denitrifiers: laboratory sand column experiment and multispecies biofilm model formulation. *Biotechnol & Bioengin*, 2008, **99** (2): 290~301
- 46 Leutwein C, Heider J. Succinyl-CoA: (*R*)-benzylsuccinate CoA-transferase: an enzyme of the anaerobic toluene catabolic pathway in denitrifying bacteria. *J Bacteriol*, 2001, **183** (14): 4288~4295
- 47 Kniermeyer O, Heider J. (*S*)-1-phenylethanol dehydrogenase of *Azoarcus* sp. strain EbN1, an enzyme of anaerobic ethylbenzene catabolism. *Arch Microbiol*, 2001, **176**: 129~135
- 48 Sota M, Yano H, Ono A, Miyazaki R, Ishii H, Genka H, Top EM, Tsuda M. Genomic and functional analysis of the IncP-9 naphthalene-catabolic plasmid NAH7 and its transposon Tn4655 suggests catabolic gene spread by a tyrosine recombinase. *J Bacteriol*, 2006, **188** (11): 4057~4067
- 49 Zhou L (周蕾), Mbadinga SM, Wang LY (王立影), Liu JF (刘金峰), Yang SZ (杨世忠), Mu BZ (牟伯中). Recent progress in metabolites formed during anaerobic biodegradation of petroleum hydrocarbons. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2011, **17** (4): 607~613
- 50 Zhou DP (周德平). Isolation, identification, degradation characteristics of and cloning, expression of catechol 2,3-dioxygenase gene of phenanthrene-degrading bacteria: [Master Degree Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University (杭州: 浙江大学), 2003