

嗜吡啉红球菌 R04 的联苯降解途径的研究

孙 艳 钞亚鹏 钱世钧*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 通过 GC-MS 测定出嗜吡啉红球菌 R04 菌降解联苯的中间代谢物 2,3-二氢二羟基联苯、2,3-二羟基联苯和苯甲酸,并测定了该菌的 2,3-二羟基联苯双加氧酶、2-羟基-6-酮基-6-苯基-2,4-己二烯酸(HOPDA)水解酶和苯甲酸双加氧酶活性。最终确定了 R04 菌降解联苯的途径为 2,3-二羟基联苯双加氧酶途径。

关键词 联苯 嗜吡啉红球菌 2,3-二羟基联苯 降解途径

中图分类号 Q936 **文献标识码** A **文章编号** 1001-6209(2003)05-0653-06

联苯及其衍生物的生物降解研究始于 70 年代。Catelani 等^[1]对假单胞菌属(*Pseudomonas* sp.)和 Gibson 等^[2]对拜叶林克氏菌属(*Beijerinckia* sp.)的降解联苯中间代谢产物分析表明,联苯降解最初由双加氧酶进攻苯环形成二醇,再脱氢生成 2,3-二羟基联苯,2,3-二羟基联苯通过间位断裂生成黄色开环化合物 2-羟基-6-酮基-6-苯基-2,4-己二烯酸(HOPDA),这个开环物被水解成苯甲酸,苯甲酸再进一步降解为中心代谢物。联苯降解主要通过上述途径,但是一些联苯降解菌中也有不同的途径和产物。Bedard 等^[3]发现真氧产碱菌(*Alcaligenes eutrophus*)H850 中存在 3,4-位的进攻;*P. sp.* NCIB10643 降解联苯的最终产物为苯甲酸;降解基因位于质粒上的联苯降解菌 *P. putida*^[4]的代谢产物中存在 3-羟基苯甲酸和肉桂酸,以及某些放线菌将联苯转为单羟基联苯和 2,2-二羟基联苯^[5]。

据报道,红球菌属中的某些菌株降解联苯及多氯联苯的最初产物为苯甲酸和氯苯甲酸,少数菌株的相关基因簇也已被描述。我们从华北油田污染土壤中筛选出的嗜吡啉红球菌(*Rhodococcus pyridinovorans*)是一株新的联苯高效降解菌株,该菌还可以降解苯甲酸钠、邻苯二酚、间苯二酚、对苯二酚和多氯联苯 Aroclor1221、Aroclor1242 等多种芳香族化合物。在此基础上,本文研究了该菌降解联苯的途径,并对实验过程中的一些特殊现象和色谱结果作了进一步讨论。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和培养基 本研究所用菌种嗜吡啉红球菌(*Rhodococcus pyridinovorans*)R04,由本实验室筛选、鉴定和保存。培养基为基础盐培养基:2.93g KH₂PO₄,5.87g K₂HPO₄,0.3g MgSO₄,0.01g FeSO₄,2g NaCl,5g (NH₄)₂SO₄,微量盐溶液 2mL,加水定容至 1000mL,pH

基金项目:国家 863 计划(2002AA601170)

* 通讯作者。Tel 86-10-62651598;Fax 86-10-62651598;E-mail:qiansj@sun.im.ac.cn

作者简介:孙 艳(1974-),女,内蒙古呼和浩特市人,博士。主要从事芳香族化合物的生物降解方面的研究。E-mail:sunyan3@sina.com

收稿日期:2002-11-20,修回日期:2003-06-19

至 7.0。固体培养基中加入 1.6% 琼脂。微量盐溶液: 4mg MoO_3 , 28mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4mg H_3BO_3 , 4mg $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 4mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 加水定容至 1000mL。

1.1.2 试剂: 2,3-二羟基联苯和 3,4-二羟基联苯由美国依阿华大学 Dr. David T. Gibson 馈赠, 硅烷化试剂 BSTFA [Bis(Trimethylsilyl)-trifluoroacetamide] 购自 Sigma 公司, 其余药品或溶剂皆为分析纯或色谱纯。

1.2 联苯降解途径中间代谢物的提取和衍生化

0.05g 联苯溶于 200 μL 丙酮, 加入 50mL 基础盐培养基中, 接种嗜吡啉红球菌 R04, 30 $^\circ\text{C}$ 250r/min 振荡培养, 每隔 12h 取一定体积的发酵液, 用等体积乙酸乙酯萃取、浓缩后, 用 GC-MS 分析代谢物结构。10 μL 样品加入毛细管中, 室温下蒸发后加入 10 μL 衍生化试剂 BSTFA 80 $^\circ\text{C}$ 反应 1h。

1.3 嗜吡啉红球菌 R04 对 2,3-二羟基联苯降解的产物分析

收集在联苯培养基中培养 36h 的菌体, 用 0.02mol/L 的磷酸缓冲液(pH7.0)洗涤。10mg 2,3-二羟基联苯、0.5g 菌体和 60mL 0.02mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)混合后, 27 $^\circ\text{C}$ 振荡培养。当反应液在 435nm 吸光值最大时, 加盐酸调 pH 值到 3。用乙醚萃取后浓缩, 进行 GC-MS 分析。

1.4 降解途径中相关酶的活力测定

1.4.1 联苯双加氧酶酶活的测定: 离心收集菌体, 50mol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)洗涤菌体, 相同缓冲液重悬到 $OD_{600} = 2.0$; 100mL 上述菌液中加入 1.28mg 联苯(联苯浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$), 30 $^\circ\text{C}$ 振荡培养 2h; 乙酸乙酯抽提反应液, 有机相浓缩后, 进行 GC-MS 分析。

1.4.2 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶和 2-羟基-6-酮基-6-苯基-2,4-己二烯酸水解酶活力的测定: 见文献 [6]。

1.4.3 苯甲酸双加氧酶的酶活力测定: 见文献 [7]。

1.5 气质联用(Gas chromatography-mass spectrometry, GC-MS)条件

1.5.1 GC: Trace2000 型气相色谱, Voyager 型质谱仪。OV-1 柱(15m $\times$ 0.25 μm $\times$ 0.25 μm), 柱温以 20 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度从 60 $^\circ\text{C}$ 升温到 160 $^\circ\text{C}$, 再以 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ 的速度升至 290 $^\circ\text{C}$, 保持 5min。进样口温度 250 $^\circ\text{C}$, 分离比 20:1, 载气恒流 1mL/min。

1.5.2 MS: 扫描时间 0.6s, m/e 范围 30 ~ 650, 接口温度 250 $^\circ\text{C}$, 离子源 200 $^\circ\text{C}$, 发射电流 200 μA 。

2 结果和讨论

2.1 嗜吡啉红球菌 R04 在联苯培养基中不同培养时间的中间代谢产物

本文研究的联苯降解途径为联苯分子中第一个苯环被打开并进一步降解的途径。由薄层层析对嗜吡啉红球菌 R04 降解联苯产物的初步分析结果表明, 在培养 12h 和 24h 时, 降解产物种类最多且浓度最大, 因此, 用 GC-MS 对这两个时间点的降解产物进行进一步的分析。分析结果表明, 12h 发酵液中主要有 3 个产物(图 1), 分子量分别是 122($R_t = 4.50$), 188($R_t = 10.97$) 和 186($R_t = 10.64$) 的苯甲酸、二氢二羟基联苯和二羟基联苯, 24h 发酵液中没有检测到苯甲酸和二氢二羟基联苯, 只检测到二羟基联苯, 36h 发酵液中以上所有产物都不再出现, 不同时间的代谢物比较见表 1。由此结果可以推测, 在降解过程中联

表 1 GC-MS 测定的不同时间发酵液代谢物

Table 1 The metabolites detected by GC-MS at different time

Incubation time/h	Benzoic acid	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl	2,3-dihydroxybiphenyl
12	+	++	+
24	-	-	++
36	-	-	-

++ .Large quantity ; + . Small quantity ; - .Not detected.

苯首先被转化为二氢二羟基联苯,二氢二羟基联苯又接着被转化为二羟基联苯,二羟基联苯进一步被转化为一种生成量少或者不稳定的中间代谢物,而苯甲酸可能是这个物质被继续降解的产物。

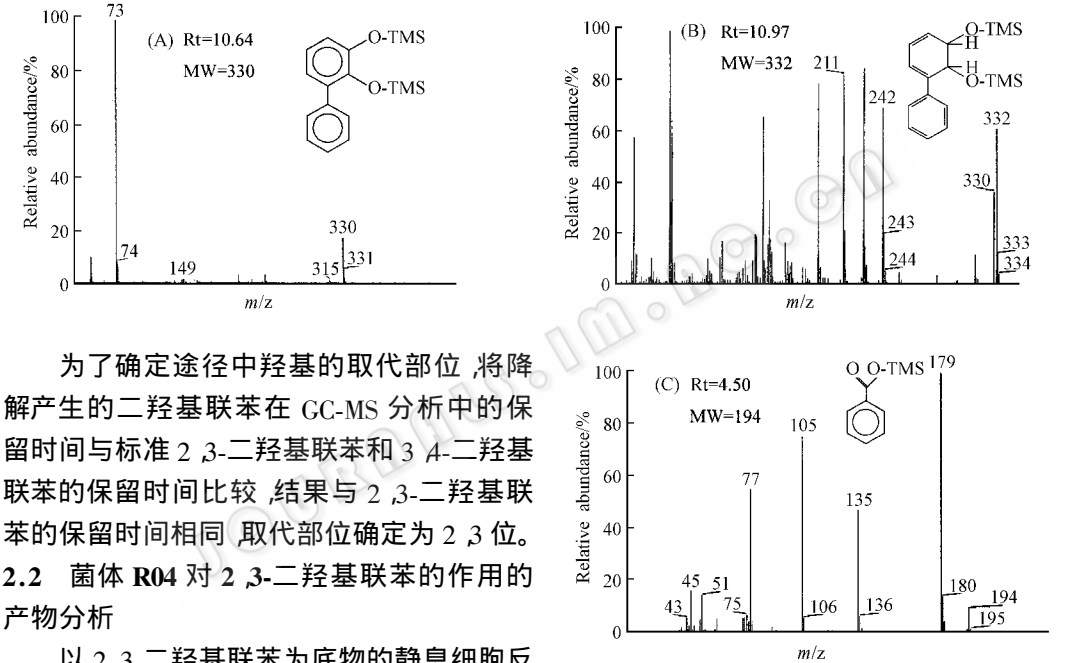


图 1 联苯降解中间代谢物 2,3-二氢二羟基联苯、2,3-二羟基联苯和苯甲酸的质谱图

Fig.1 Mass spectrogram of the metabolites of biphenyl degradation

A. 2,3-dihydroxybiphenyl ;B. 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl ; C. Benzoic acid.

为了确定途径中羟基的取代部位,将降解产生的二羟基联苯在 GC-MS 分析中的保留时间与标准 2,3-二羟基联苯和 3,4-二羟基联苯的保留时间比较,结果与 2,3-二羟基联苯的保留时间相同,取代部位确定为 2,3 位。

2.2 菌体 R04 对 2,3-二羟基联苯的作用的产物分析

以 2,3-二羟基联苯为底物的静息细胞反应得到了黄色开环物,对其特征吸收值的测定的结果是:pH2.5 时最大吸收为 341 ~ 343nm,pH12 时最大吸收为 435 ~ 437nm,表明这一物质具有烯醇和酮的互变异构变化。其现象与文献描述的开环化合物 2-羟基-6-酮基-6-苯基-2,4-己二烯酸相同^[8]。但是由于该黄色开环化合物不稳定而极易降解,这些年来一直没有人分离到该化合物(David T. Gibson,个人通讯,2000/9/5)。

对 2,3-二羟基联苯为底物的静息细胞反应产物进行 GC-MS 检测,结果没有测定到上文推测的 2,3-二羟基联苯的直接开环产物——2-羟基-6-酮基-6-苯基-2,4-己二烯酸,证明此代谢物确实不稳定。测定中检测到了苯甲酸,因此推测 2-羟基-6-酮基-6-苯基-2,4-己二烯酸的进一步降解产物是苯甲酸。另外,在测定中还得到了大量分子量为 192 的和分子量为 120 的产物(图 2)。1986 年 Omori 等^[9]发现了 3 个可以将 HOPDA 双键还原的还原

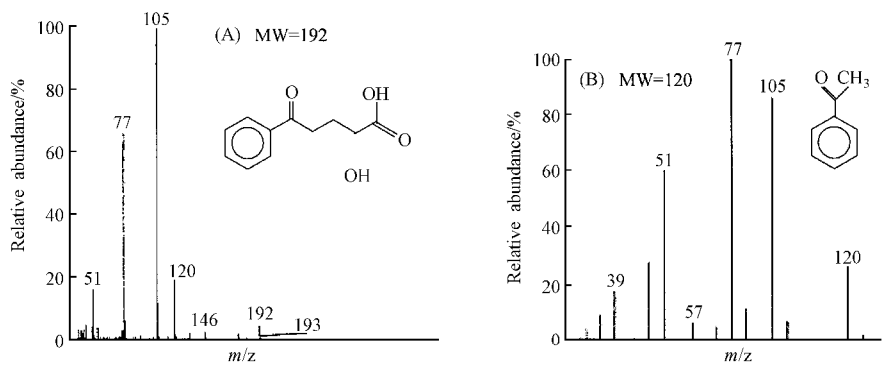


图 2 2,3-二羟基联苯细胞反应产物
Fig.2 Mass spectrogram of the production of resting-cell reaction
A. 4-Benzoylbutyric acid B. 1-Phenylethanone.

酶。还原反应在第 4 和第 5 两个碳之间的双键上发生 ,形成的醛基最后被氧化为羧酸。本实验中发现的分子量为 192 的物质推测为 4-苯甲酰基丁酸 ,可能是开环产物 2-羟基-6-酮基-6-苯基-2,4-己二烯酸被还原形成的。分子量为 120 的物质的质谱图与苯乙酮的标准谱图相同 ,苯乙酮在以往的研究中没有报道 ,这一物质在 3 次实验中都有重复性 ,并且它具有的苯甲酰基的结构也说明它是联苯代谢过程中产生的一个物质 ,但是它究竟怎样形成 ,由哪一个酶催化 ,还需要进一步的实验来证明。

2.3 联苯双加氧酶的定性测定

联苯双加氧酶活性的测定原理是 ,联苯与菌体或细胞抽提物在室温下反应后形成双加氧酶的产物二氢二羟基联苯 ,用 GC-MS 对该产物进行测定。图 3 是菌种 R04 完整细胞与联苯混合物在室温下反应 2h 的产物分析。图中有未反应完的联苯和生成的二氢二羟基联苯 ,证明该菌中有联苯双加氧酶的存在。

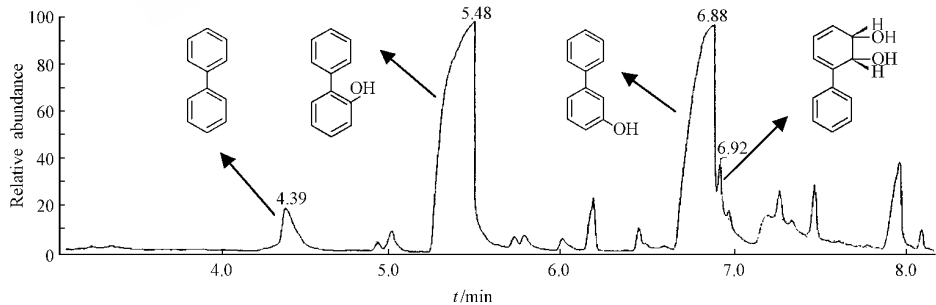


图 3 菌 R04 细胞与联苯反应产物的 GC-MS 分析
Fig.3 GC-MS analysis of the products of strain R04 incubated with biphenyl

2.4 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶和 HOPDA 水解酶的酶活测定

取培养 24h 的菌体与底物 2,3-二羟基联苯反应 ,测定反应液 435nm 的吸光度(表 2) ,435nm 吸光度的增加表明菌体具有 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶活性 ,将底物 2,3-二羟基联苯作用生成黄色开环产物 HOPDA ,随后 435nm 吸光度的降低又表明形成的黄色开环产物 HOPDA 在水解酶作用下消失 ,在 2.2 节中静息细胞反应中测到的苯甲酸即是水解酶

的产物。

表 2 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶和 HOPDA 水解酶的酶活测定结果

Table 2	Detection of 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase and HOPDA hydrolase					
t/min	0	4	6	8	10	12
A ₄₃₅	0.95	1.44	1.49	1.88	1.91	1.64
ΔA ₄₃₅	0	0.49	0.55	0.93	0.96	0.69

2.5 苯甲酸双加氧酶的酶活测定

取培养 24h 的菌体测定酶活,结果见表 3。随着反应时间的延长,样品在 340nm 吸光度降低值不断增大,说明反应体系中的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(Nicotinamide adenine dinucleotide-reduced, NADH)不断被苯甲酸双加氧酶氧化,因此该菌株中,苯甲酸双加氧酶参与联苯的进一步代谢。

表 3 苯甲酸双加氧酶活力测定结果

Table 3	Detection of Benzoic acid dioxygenase		
t/min	0	3	8
A ₃₄₀	0.927	0.765	0.654
ΔA ₃₄₀	-	0.162	0.273

2.6 联苯代谢途径的最后确定

通过对菌 R04 降解联苯途径中的各代谢物的分析和对几个主要酶的活力测定,推论了该菌对联苯降解的途径(图 4)。联苯首先被联苯双加氧酶氧化为 2,3-二氢二羟基联苯,该产物在 2,3-二氢二羟基联苯脱氢酶作用下形成 2,3-二羟基联苯,2,3-二羟基联苯在第二个双加氧酶作用下产生黄色的开环产物 2-羟基-6-酮基-6-苯基-2,4-己二烯酸,该产物被水解为苯甲酸,苯甲酸通过粘糠酸途径被最终降解掉。

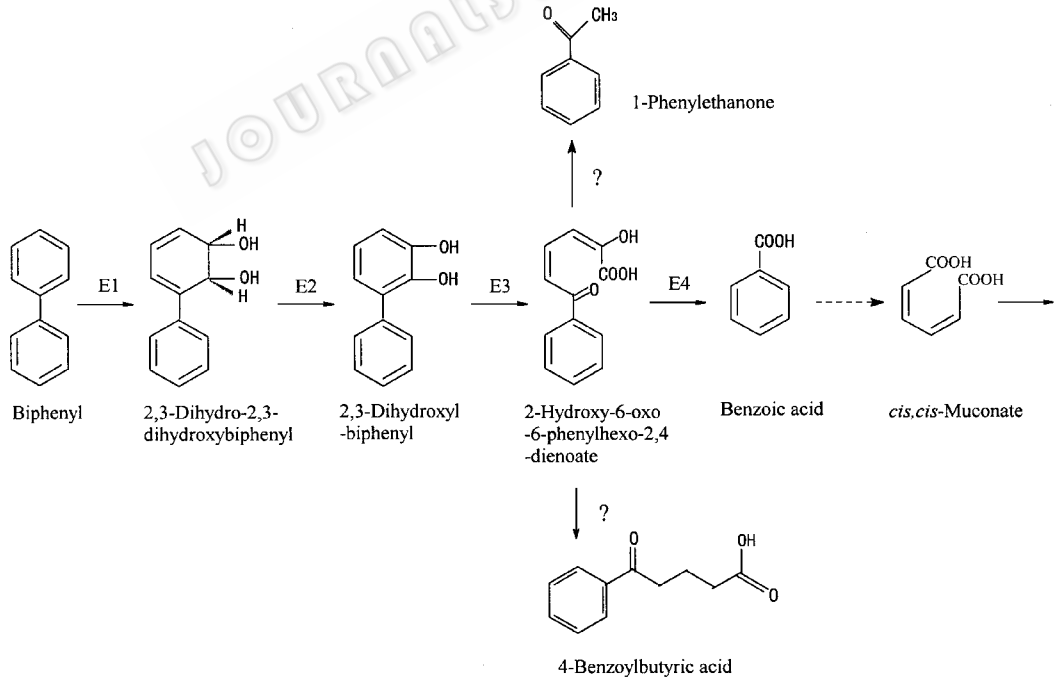


图 4 *Rhodococcus pyridinovorans* R04 降解联苯的途径

Fig.4 Deduced degradation pathway of biphenyl by *Rhodococcus pyridinovorans* R04

E1. biphenyl-dioxygenase ; E2. 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl-dihydrogenase ; E3. 2,3-dihydroxybiphenyl-dioxygenase ; E4. 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexo-2,4-dienoate

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

开环产物 2-羟基-6-酮基-6-苯基-2,4-己二烯酸的进一步代谢产物还有 4-苯甲酰基丁酸和苯乙酮两个产物,它们与开环产物都有苯甲酰基的结构。前者推测为开环产物脱氢后形成,后者在以往的研究中没有报道,为首次发现,它的形成机制还有待于进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Catelani D, Colombi A, Sorlini C, *et al.* Metabolism of biphenyl 1,2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoate :the meta-cleavage product from 2,3-dihydroxybiphenyl by *Pseudomonas putida*. *Biochem J*, 1974, **143** :431 ~ 434.
- [2] Gibson D T, Gschwendt B, Yeh W K, *et al.* Initial reaction in the oxidation of ethylbenzene by *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, 1973, **12** :1520 ~ 1528.
- [3] Bedard D L, Harberl M L, May R J, *et al.* Evidence for novel mechanisms of polychlorinated biphenyl metabolism in *Alcaligenes eutrophus* H850. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987, **53** (5) :1103 ~ 1112.
- [4] Starovoito I I, Selfionov S A, Nefedova M Y, *et al.* Catabolism of biphenyl by *Pseudomonas putida* strain BS893 containing biodegradation plasmid pBS241. *Microbiology*(Engl. Transl.), 1986, **54** :726 ~ 727.
- [5] Schwarts R D. A novel reaction : meta hydroxylation of biphenyl by an anctinomycete. *Enzyme Microbial Technol*, 1981, **3** :158 ~ 159.
- [6] Asturias J A, Timmis K N. Three different 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase genes in the gram positive polychlorobiphenyl-degrading bacterium *Rhodococcus globerulus* P6. *Journal of Bacteriology*, 1993, **175** (15) :4631 ~ 4641.
- [7] Yamaguchi M, Fujisawa H. Purification and characterization of an oxygenase component in benzoate 1,2-dioxygenase system from *Pseudomonas arvilla* C-1. *Biol Chem*, 1990, **255** (11) :5058 ~ 5063.
- [8] Catelani D, Colombi A, Sorlini C, *et al.* Metabolism of quaternary carbon compounds 2',2'-dimethylheptaneand tertbutylbenzene. *Applied and Environmental Microbiology*, 1977, **34** :351 ~ 354.
- [9] Omori T, Ishigook H, Minoda Y. Purification and somen properties of 2-hydroxy-6-oxo-6-phenylhexa-2,4-dienoic acid(HOP-DA) reducing enzyme from *Pseudomonas cruciviae* S93B1 involved in the degradation of biphenyl. *Agric Biol Chem*, 1986, **50** :1513 ~ 1518.

Study on the Degradation Pathway of Biphenyl by *Rhodococcus pyridinovorans* R04

Sun Yan Chao Yapeng Qian Shijun*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract : Metabolites of *Rhodococcus pyridinovorans* R04 from biphenyl were analyzed by GC-MS. The results demonstrated that biphenyl was degraded via a route of 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybiphenyl and 2,3-dihydroxybiphenyl. 4-Benzoylbutyric acid and 1-phenylethanone were also found in the GC-MS analysis, which indicated there were other pathways beside the main route.

Key words :Biphenyl, *Rhodococcus pyridinovorans*, Degradation pathway, 2,3-dihydroxybiphenyl

Foundation item : Chinese National Programs for High Technology Research and Development(2002AA601170)

* Corresponding author. Tel 86-10-62651598 ; Fax 86-10-62651598 ; E-mail : qiansj@sun.im.ac.cn

Received date :11-20-2002

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn