

专论与综述

细菌脱有机硫的遗传学研究进展*

许 平 李福利 马翠卿 郑 平**

(山东大学微生物技术国家重点实验室 济南 250100)

关键词: 二苯并噻吩, 脱有机硫, 红串红球菌

中图分类号: Q93 文献标识码: A 文章编号: 0253-2654(2000)05-0368-03

化石燃料的燃烧, 产生大量的有毒气体 SO_2 进入大气, 造成严重的空气污染, 同时也是产生酸雨的最主要的原因^[1,9]。为了保护环境, 要求使用低硫含量的化石燃料, 但目前世界上低硫含量的化石燃料储备正在急剧减少。因此需要对含硫高的化石燃料进行脱硫处理。化学脱硫方法-加氢脱硫 (Hydrodesulfurization) 难以脱去化石燃料中的有机硫。而生物催化法脱硫便宜, 在常温下即可进行, 并且具有高专一性, 因此发展一种化石燃料的生物脱硫方法已是十分必要^[1]。

化石燃料中的有机硫主要是二苯并噻吩 (Dibenzothiophene, DBT), 于是生物脱有机硫的研究也就以 DBT 为模式化合物进行。现在已经发现许多微生物, 沿着烃降解途径 (Hydrocarbon degradative pathway) 降解 DBT, 在脱去有机硫的同时, 往往也破坏碳-碳键, 从而导致燃料热值减少而不可取^[1,9]。也发现一些微生物如红球菌属 (*Rhodococcus*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、棒杆菌属 (*Corynebacterium*) 和节杆菌属 (*Arthrobacte*) 等, 能够沿着硫专一途径 (Sulfur-specific pathway) 降解 DBT, 它们不打开环, 从而保留了燃料的热值, 成为近年来研究的热点。

最近, 人们以红串红球菌 (*Rhodococcus erythropolis*) IGTS8 (通常称 *R. rhodochrous* IGTS8, ATCC53698)^[2] 为材料, 研究了生物脱硫的分子机理。结果表明, 在 IGTS8 菌株中, 存在一个 120-kb 的线状质粒, 其中的三个基因, *dszA*, *-B*, 和 *-C* (一般称 Sulfur oxidation, *sox*), 负责 DBT 的脱硫催化。这些基因已被克隆并测序, 而且它们的表达产物也已经被纯化出来^[3,10]。如图 1 所示, 酶 *DszC* 催化两步连续的单加氧反应, 将 DBT 转变成成为 DBT-砒 (Sulfone)^[4]。随后,

DszA, 第二个黄素单加氧酶, 和 *DszB*, 脱亚磺酸酶, 催化该途径的限速步骤, 将 DBT-砒转化成 2-羟基联苯 (2-Hydroxybiphenyl, 2-HBP) 和亚硫酸盐^[5]。*DszC* 和 *DszA*, 均是末端加氧酶, 需要 NAD(P)H-FMN 氧化还原酶作为 H^+ 的来源^[5]。通过 *DszC* 活性的生理学方面的研究, 发现 *dsz* 基因簇的表达被硫酸盐和含硫氨基酸强烈抑制, 并且其启动子和相应的调节区域也已被研

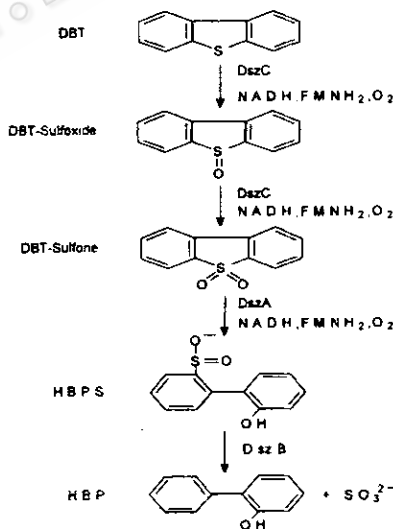


图1 *R.rhodochrous* IGTS8菌株的脱硫途径

DszC DBT单加氧酶, *DszA* DBT-砒单加氧酶,
DszB HBPS脱亚磺酸酶

* 国家自然科学基金资助项目 (No.29977011)

Project Granted by National Natural Science Foundation of China (No.29977011)

** 现工作单位: 山东轻工业学院

收稿日期: 1999-05-14, 修回日期: 1999-10-13

究清楚^[6]。最近,通过构建重组假单胞菌(*Pseudomonas*)菌株,来提高脱硫的效率。据报道,*dsz* 基因簇已经被成功地克隆到多株假单胞菌中。重组菌株比原始菌株能更有效地脱硫。而且,构建的工程菌具有广阔的工业应用和环境保护前景^[7]。

1 *dsz* 基因的分离与确认

革兰氏阳性细菌 *Rhodococcus* sp. IGTS8 能够将 DBT 转化成 2-HBP,从而脱去其中的硫。以粘性质粒 pLAER5 为载体,构建了 IGTS8 菌株的基因文库。IGTS8 菌株通过进一步诱变,得到了一突变株 UV1,该菌株已失去脱硫能力。这时将基因文库中带有 IGTS8 染色体片断的重组质粒转入 UV1,发现有脱硫能力的重组菌落,但是在菌落中却找不到游离的重组质粒。已经分离到这些外源 DNA 片断,并以这些片断为探针来检测在 *E.coli* 中的原始的基因文库。通过一系列的实验发现,某些带有外源 DNA 片断的粘性重组质粒经电穿孔转入 UV1 菌株,可使 UV1 恢复脱硫能力。当把来自 *Rhodococcus* 质粒的复制起点也转入时,这些克隆的转化效率随之提高 20~50 倍,并且可以分离到游离质粒。限制性酶切图谱和亚克隆表明 *dsz* 基因存在于一个 4kb DNA 的片段上。最后,通过转化将表现型转移给了一株不利用硫的藤黄红球菌(*R.fascians*)DI88-5 和突变株 UV1,从而说明已经成功地将 IGTS8 菌株的脱硫基因分离出来^[8]。

2 *dsz* 基因的鉴定及产物分析

IGTS8 菌株 *dsz* 基因是一段 4kb 的 *Bst*BI-*Bst*WI DNA 片段。移码和缺失突变证实了 3 个开放阅读框架是脱硫必需的,分别命名为 *soxA*, E, C。在含有一个 λ CI 核糖体结合位点的引导型 λ pL 启动子的控制下,将每个 *sox* 基因分别在 *E.coli* MZ1 中克隆和表达。结果表明 SoxC 是一个约 45kD 的蛋白质,氧化 DBT 成为 DBTO₂; SoxA 是一个约 50kD 的蛋白质,负责 DBTO₂ 向一未知中间体的转化; SoxB 是一个约 40kD 的蛋白质,同 SoxA 一起,完成 DBTO₂ 向 2-HBP 的转化。蛋白质序列分析表明 SoxC 和乙酰辅酶 A 脱氢酶具有同源性,SoxA 和 SoxB 未找到类似的蛋白质^[3]。

3 DszC 确认为硫化物/亚砷单加氧酶

B.Lei 等将 *dszC* 基因在 *E.coli* 中高表达,并且发展了一套表达产物的分离纯化步骤,他们将酶的特性和催化反应机制也研究清楚。他们认为该酶是一个分子

量为 90, 200D 的同型二聚体,连接一个 FMN(Kd, 7 μ mol / L) 或者 FMNH₂(Kd < 10⁻⁸ mol / L), 其中 FMNH₂ 是必需的共底物,利用不同有效量的 FMNH₂ 为底物进行试验发现,该酶催化一个分阶段的 DBT 转化过程,即由 DBT 到 DBT-亚砷,然后再到 DBT-砷。利用同位素标记底物 H₂¹⁸O 和 ¹⁸O₂, 发现 DBT-亚砷和 DBT-砷中的氧来自分子氧。进一步的实验发现该酶也利用苯甲基硫化物和苯甲基亚砷,因此作者把它确定为硫化物/亚砷单加氧酶。这个单加氧酶类似于微粒体黄素单加氧酶,但是它不同于其它微生物黄素单加氧酶,因为该酶催化两步连续的单加氧反应^[4]。

4 *Rhodococcus* sp. IGTS8 菌株 *dsz* 启动子和相应调节区的遗传学分析

Dsz 酶活力受甲硫氨酸,半胱氨酸,酪蛋白水解物和硫酸盐的抑制^[10,11],而不被 DBT 或者二甲基亚砷抑制。作者克隆了紧靠 5' 端的位于 *E.coli* LacZ 报告基因前面的 *dszA* DNA 片段,该片段长度为 385 个碱基对。通过实验,发现该区域包括一个 *dsz* 启动子和至少 3 个 *dsz* 调节区。将该 DNA 片段进行腈诱变后,在酪蛋白水解物存在的情况下,筛选到一些能够产生 β -半乳糖苷酸酶的克隆。对这个突变株的 DNA 序列分析表明可能存在两个调节区:一个在 -263 到 -244, 另一个在 -93 到 -38 (-1 是指位于 *dszA* 起始密码子 ATG 的碱基 A 之前的碱基)。另外, S1 核酸酶水解保护试验说明: *dsz* 启动子的起点是位于 -46 的碱基 G, 并且转化受体被硫酸盐和半胱氨酸抑制而不被二甲基亚砷抑制。该启动子包括一个可能的反向对称序列和一个操作子。与启动子相连的 -146 到 -121 上游序列是一个蛋白质结合区域,该区域的缺失不影响阻遏,但是启动子活性却减少 3 倍。因此该区域可能是一个活性结合中心或者增强子区域^[6]。

5 增强脱硫活力的假单胞菌重组体的构建

直到目前,仅有革兰氏阳性微生物,主要是 *R. rhodochrous* IGTS8 用于发展商业的生物脱硫^[5]。M.E. Gallardo 等^[7]则试图将经遗传工程改造的 *dsz* 基因簇在不同的假单胞菌中表达。

R. rhodochrous IGTS8 菌株的 *dsz* 基因能够在 *E. coli* 中稳定地表达,其蛋白质产物具有活性^[3,10]。于是以 *E.coli* 为宿主来构建能够重组的 *dsz* 基因盒,使它在异源的启动子控制下进行表达,从而减少硫的抑制。

个来自 pSAD225-32^[3] 的 3.8kb 的 *DraI*-*SnaBI* DNA 片段, 它包含 *dszA*, B, C 而缺少启动子和相应的调节区域。在 *E. coli* lac 启动子的控制下, 通过基因融合将该片段亚克隆到用 *HincII* 消化过的 pUC18 载体中, 形成质粒 pESOX1。然后将它转化到 *E. coli* JM109 中进行表达。结果表明含有 pESOX1 的细胞能够以 DBT 为唯一硫源和碳源生长, 同时也检测到 2-HBP 的产生。从而说明 *dsz* 基因簇经过改造, 能够在异源的调节因子的控制下, 高效表达。

假单胞菌是一种革兰氏阴性菌, 广泛存在于原油中, 而且它们具有许多作为生物催化工业应用菌株的优良特性^[12]。如红球菌属耐有机溶剂的能力很差, 而假单胞菌耐有机溶剂的能力却是目前已知最高的^[13], 另外, 已经发现有几株假单胞菌能抗化石燃料中的重金属。作者以假单胞菌为受体菌, 将改造的 *dsz* 基因在其中进行表达。一系列实验表明, 当 *dsz* 基因以单拷贝插入不同的假单胞菌中时, 都能够有效的表达^[7]。

如, 以一株能够产生生物表面活性剂鼠李糖脂的铜绿假单胞菌 (*P. aeruginosa*) 为受体菌, 构建了重组体 *P. aeruginosa* PG201, 它不但具有脱硫活力, 而且还能够分泌胞外生物表面活性剂。

另外构建的重组体恶臭假单胞菌 (*P. putida*) EGSOX 和 *P. aeruginosa* EGSOX 能够在 48h 后将 0.2mmol/L DBT 完全转化为 2-HBP, 而原始菌株 *R. rhodochrous* IGTS8 不能将 DBT 完全转化^[7]。在 24h, *P. aeruginosa* EGSOX 能够转化 95% 的 DBT, 而 *R. rhodochrous* IGTS8 仅为 18%。有趣的是, *P. putida* EGSOX 在培养 24h 后, 虽然菌体浓度不高, 却能够转化 40% 的 DBT。从以上数据看, 重组的假单胞菌能够有效地脱硫。

6 研究展望

M. E. Gallardo 等构建的假单胞菌重组体, 具有脱

硫和分泌生物表面活性剂两种特性, 从而能够增加疏水化合物在水相中的浓度, 也就提高了双液相生物反应的物质传递速率^[14]。然而由于重组体 *P. aeruginosa* PG201 的生物表面活性剂随着一定限制浓度的氮和铁在对数生长期和稳定期分泌, 因此今后有关生物表面活性剂的产生对菌体脱硫的影响的研究要继续进行。设计合适的具有脱硫活性的重组体, 将会推动生物脱硫的商业化进程。

参 考 文 献

- [1] Kilbane J J. Trends Biotechnol, 1989, 7:97~101.
- [2] Kilbane J J, Jackowski K. Biotechnol Bioeng, 1992, 40:1107~1114.
- [3] Denome S A, Oldfield C, Nash L J et al. J Bacteriol, 1994, 176:6707~6716.
- [4] Lei B, Tu S C. J Bacteriol, 1996, 178:5699~5705.
- [5] Gray K A, Pogrebinsky O S, Mrachko G T et al. Nature Biotechnol, 1996, 14:1705~1709.
- [6] Li M Z, Squires C H, Monticello D et al. J Bacteriol, 1996, 178:6409~6418.
- [7] Gallardo M E, Ferrarez A, Eduardo D et al. J Bacteriol, 1997, 179:7156~7160.
- [8] Denome S A, Olson E S, Young K D et al. Appl Environ Microbiol, 1993, 59:2837~2843.
- [9] Monticello D J. Ann Rev Microbiol, 1985, 39:371~389.
- [10] Piddington C S, Kovacevich B R, Rambosek J et al. Appl Environ Microbiol, 1995, 61:468~475.
- [11] Wang P, Humphrey A E, Krawiec S et al. Appl Environ Microbiol, 1996, 62:3066~3068.
- [12] Leahy J G, Colwell R R. Microbiol Rev, 1990, 54:305~313.
- [13] Inoue A, Honkoshi K. J Ferment Bioeng, 1991, 71:194~196.
- [14] Ochsner U A, Reiser J, Fiechter A et al. Appl Environ Microbiol, 1995, 61:3503~3506.