



专论与综述

多氯联苯降解菌 *Burkholderia xenovorans* LB400 研究进展孙成成^{1,2,3} 李俊德^{1,2,3} 闵军^{1,2} 胡晓珂^{*1,2,3}

1 中国科学院烟台海岸带研究所海岸带生物学与生物资源保护实验室 山东 烟台 264003

2 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生物学与生物技术功能实验室 山东 青岛 266237

3 中国科学院大学 北京 100049

摘要: *Burkholderia xenovorans* LB400 是一株多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)降解菌, 可以氧化含有 1–6 个氯取代基的多氯联苯。近年来, 由于其广泛的底物谱和优异的降解性能, 菌株 LB400 已成为研究原核生物降解多氯联苯的生物化学和分子生物学方面的模式生物。目前关于 PCBs 的微生物降解研究已不再局限于对微生物资源的挖掘, 而是更多地聚焦在 LB400 等降解菌的 PCBs 降解基因、降解酶的酶学特性以及酶的人工分子进化等方面。同时, LB400 作为早期发现的降解菌, 其对多氯联苯的降解途径、底物范围及相关机制也被广泛探讨; 但是对于 PCBs 降解相关基因的调控研究较少。因此, 本文以 *Burkholderia xenovorans* LB400 对多氯联苯降解为核心, 通过综述其代谢途径、代谢相关基因和酶系以及降解应用等方面的研究进展, 以期为深入探讨 *Burkholderia xenovorans* LB400 的应用以及进一步在遗传、分子和生化水平研究其他多氯联苯降解菌株提供借鉴。

关键词: *Burkholderia xenovorans* LB400, 多氯联苯(PCBs), 代谢途径, 降解酶

Advances in polychlorinated biphenyls degrading bacteria of *Burkholderia xenovorans* LB400SUN Cheng-Cheng^{1,2,3} LI Jun-De^{1,2,3} MIN Jun^{1,2} HU Xiao-Ke^{*1,2,3}

1 Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003, China

2 Laboratory for Marine Biology and Biotechnology, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao, Shandong 266237, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: *Burkholderia xenovorans* LB400 is a strain of polychlorinated biphenyls degrading bacteria PCBs. This organism also cooxidizes chlorinated biphenyl (CB) congeners containing from one to six chlorine substituents. In recent years, LB400 has become a model organism to study the biochemistry and

Foundation items: Key Research Program of Frontier Sciences of Chinese Academy of Sciences (QYZDB-SSWDQC041); External Cooperation Program of Chinese Academy of Sciences (133337KYSB20180015); Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (2020218)

***Corresponding author:** Tel: 86-535-2109127; E-mail: xkhu@yic.ac.cn

Received: 02-06-2020; **Accepted:** 21-08-2020; **Published online:** 09-09-2020

基金项目: 中国科学院前沿科学重点研究计划(QYZDB-SSWDQC041); 中国科学院对外合作计划(133337KYSB20180015); 中国科学院青年创新促进会项目(2020218)

***通信作者:** Tel: 0535-2109127; E-mail: xkhu@yic.ac.cn

收稿日期: 2020-06-02; **接受日期:** 2020-08-21; **网络首发日期:** 2020-09-09

molecular biology of CB metabolism in prokaryotes, because of excellent degradability and a broad spectrum of CB congeners. At present, the research on strain LB400 is mainly focused on degradation genes, enzymes and enzymes evolution, while its degradation pathway, substrate range and related mechanism of PCBs have been widely discussed; Furthermore, there are few studies on regulatory genes related to degradation of PCBs. This paper focuses on the degradation of polychlorinated biphenyls, and describes its metabolic pathway, related genes and enzyme system and artificial evolution. We hope to provide a reference for the further study of the application of *Burkholderia xenovorans* LB400 and other polychlorinated biphenyls degradation strains.

Keywords: *Burkholderia xenovorans* LB400, Polychlorinated biphenyls (PCBs), Metabolic pathway, Degrading enzymes

进入化学合成时代后,大量人工合成的化合物进入到自然环境中。微生物具有极强的环境适应能力,随着这些人工合成化合物的引入,微生物经过长期的适应可以进化出降解这些污染物的基因和酶系。同时,复杂而又特殊的污染环境也提供了一个局部筛选功能微生物的生境。许多学者相继从被多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)污染的原位环境中发现了具有这类污染物降解能力的微生物。这些微生物的种类、遗传和生态功能的多样性,构成了 PCBs 生物修复的基础。LB400 菌株(16S rRNA 基因登录号 NR_074325.2)是从纽约州北部 PCBs 污染的土壤中分离出来,能以联苯为唯一碳源和能源生长的细菌,以好氧降解多氯联苯而著称^[1]。最初其被描述为一种假单胞菌,但当时尚未确定这种独特的多氯联苯降解菌的分类学地位。Yabuuchi 于 1992 年创建新 *Burkholderia* 属,从而与以前的假单胞菌有所区分,随后菌株 LB400 被重新鉴定为 *Burkholderia xenovorans* LB400^[2]。传统意义上,伯克霍尔德菌属的菌株被称为土壤细菌。然而,Coenye 等研究发现伯克霍尔德菌属的成员属于多功能微生物,占据了广泛的生态位,可以在土壤、水(包括海水)、植物根际等环境中生存,这类细菌常被用于生物防治、生物修复和植物生长等方面^[3]。

多氯联苯(PCBs)是一类人工合成的有机污染物,该类化合物具有高毒性、环境持久性、生物累积性、半挥发性、可以远距离迁移等特点;在 2001 年,其成为《斯德哥尔摩公约》首批公布的

12 类持久性有机污染物之一^[4-5]。由于多氯联苯的电绝缘性和不可燃性,许多多氯联苯及其衍生物在工业和商业领域被广泛应用,例如作为变压器油、塑料以及树脂、防火剂的添加剂和增塑剂等^[5]。由于自然界中缺乏有效的酶降解系统,多氯联苯及其类似物在环境中能长久滞留。因此,筛选与 PCBs 相关的降解菌、设计高效酶降解系统是控制和处理多氯联苯污染的重要手段^[6]。目前已经从环境中分离出部分多氯联苯降解菌,如 *Pseudomonas* sp. P-6-5^[7] 等。其中, *Burkholderia xenovorans* LB400 是截至目前发现的最好的好氧降解多氯联苯降解菌之一,引起广泛关注。研究表明, *Burkholderia xenovorans* LB400 的联苯代谢途径也可以引发多氯联苯的降解;同时,其具有降解 20 多种多氯联苯(如 PCB11、PCB12 等)以及某些多氯联苯结构类似物的能力,如二苯并呋喃等^[8]。考虑到对于 *Burkholderia xenovorans* LB400 的研究主要集中于多氯联苯的降解上,因此本文以其对 PCBs 的降解为核心,结合基因、酶、酶与底物相互作用的氨基酸残基、酶催化过程中酶与底物反应的化学基团 4 个层面展开论述。通过综述其代谢途径、代谢相关基因和酶系以及修复应用等方面的研究进展,以期为深入探讨 *Burkholderia xenovorans* LB400 的应用以及其他多氯联苯降解菌株的代谢途径、相关基因和酶系提供借鉴。

1 *Burkholderia xenovorans* LB400 对多氯联苯的降解途径

自 Lunt 和 Ahmed 分离出能够在联苯上生长的

菌株以来, 许多和多氯联苯降解相关的菌株相继被发现; 这些菌株当中既有革兰氏阳性菌, 也有革兰氏阴性菌, 包括 *Burkholderia*、*Comamonas*、*Cupriavidus*、*Sphingomonas*、*Acidovorax*、*Rhodooccus* 和 *Bacillus* 等菌属^[9-13]。按照好氧和厌氧条件以及降解机制的不同, 其分类如表 1 所示。在厌氧条件下, PCBs 的代谢主要通过细菌还原脱氯来完成, 生成低氯代的 PCBs, 并不能将其矿化^[11,17]。在好氧条件下, 真菌通过木质素分解机制和单加氧反应将多氯联苯氧化和矿化, 细菌则通过由双氧化反应起始的联苯代谢途径将其氧化降解^[13-14,16]。*Burkholderia xenovorans* LB400 就是在好氧条件下, 通过双氧化反应实现对 PCBs 的起始降解^[14]。值得注意的是, 已发现的好氧菌株如 *P. pseudoalcaligenes* KF707, 在双氧化反应中联苯双加氧酶大多只表现出了 2,3 位的双加氧酶活性, 而且只能对低氯代多氯联苯实现有效降解; 然而 *Burkholderia xenovorans* LB400 联苯双加氧酶不仅具有 2,3 位的双加氧酶活性, 还能实现 3,4 位的双加氧反应; 在底物降解范围上, 也可以实现对五氯、六氯等多氯代多氯联苯的代谢^[12,14]。但是, *Burkholderia xenovorans* LB400 联苯双加氧酶这种

宽松的区域特异性及其对于多氯代多氯联苯代谢有关的结构和氨基酸残基尚不十分明确, 有待于进一步的探讨。

同 *Pandoraea pnomenusa* B356、*Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 等好氧降解菌株一样, 菌株 LB400 将联苯转化为相应的苯甲酸盐需要经历 4 个酶反应的步骤, 苯甲酸盐随后通过其他途径降解^[8,14]。联苯代谢途径的起始反应是联苯双加氧酶的催化反应, 该酶在芳香环的 2 个相邻的碳上引入 1 个氧分子, 产生二羟基的产物, 随后代谢产物如顺位的 2,3-二氢-2,3-二羟基联苯被 2,3-二氢-2,3-二羟基联苯-2,3-脱氢酶重新芳香化; 邻苯二酚代谢物被 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶裂解生成 2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-二烯酸 (2-hydroxy-6-oxo-6-phenyl-hexa-2,4-dienoic acid, HOPDA), 进而在二烯酸水解酶的催化下水解生成苯甲酸^[12]。PCBs 代谢产物的鉴定以及相关基因的分析已经阐明了由联苯代谢途径起始多氯联苯的转化, 通过联苯代谢上游途径可将其降解为氯苯甲酸。以单环氯代联苯为例, 其代谢途径如图 1 所示。目前, 与 *bph* 操纵子相关的其他基因在 PCBs 降解中的明确作用尚未阐明, 例如 *bphK* 被认为与 PCBs 脱卤有关^[15]。

表 1 降解多氯联苯的微生物
Table 1 Microorganisms for degradation of polychlorinated biphenyls

反应条件	代谢机制	相关代谢酶	菌名称	参考文献
Reaction condition	Metabolic pathway	Related metabolic enzymes	Bacteria name	References
好氧条件 Aerobic condition	联苯代谢机制	联苯双加氧酶、二氢二醇脱氢酶、二羟基双加氧酶、二烯酸水解酶	红球菌属、芽孢杆菌属、假单胞菌属、伯克霍尔德菌属	[12,14-15]
	Metabolic mechanism of biphenyl	Biphenyl dioxygenases, dihydrodiol, dehydrogenase, 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase, 2-hydroxy-6-oxo-6-phenyl-hexa-2,4-dienoic acid hydrolase	<i>Rhodooccus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Burkholderia</i>	
	木质素代谢机制和单加氧反应	木质素过氧化物酶、锰依赖型过氧化物酶、漆酶	金丝孢杆菌、白腐真菌、丝状真菌 <i>P. chrysosporium</i> ,	
厌氧条件 Anaerobic condition	Metabolic mechanism of lignin	Manganese-dependent peroxidase, lignin peroxidase, laccase	<i>Whiterot fungi</i> , <i>Cunninghamella elegans</i>	[13,16]
	还原脱氯反应	还原酶 Reductase	脱盐杆菌、脱盐球虫菌、脱盐螺菌 <i>Desulfitobacterium</i> ,	
	Reductive dechlorination reaction		<i>Dehalococcoides</i> , <i>Dehalospirillum</i>	

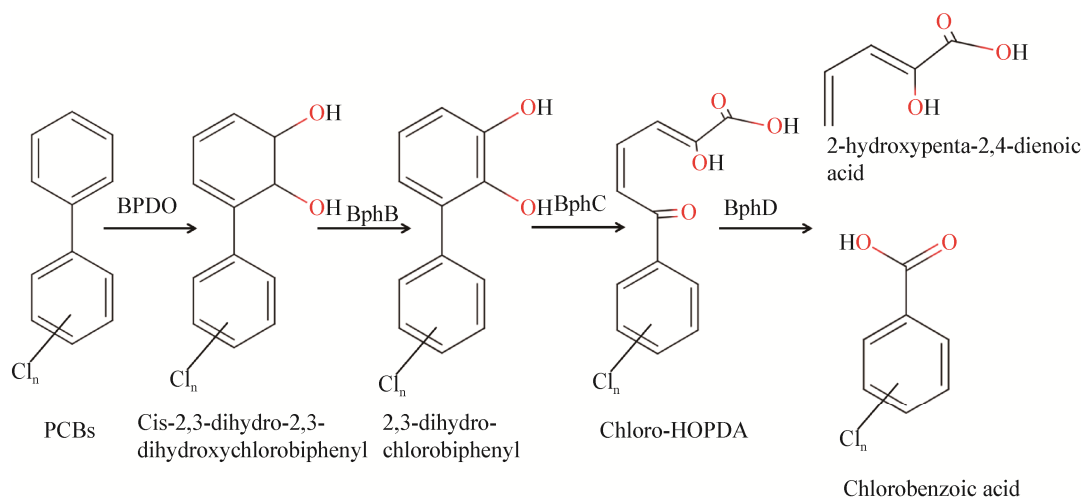


图1 多氯联苯的代谢途径

Figure 1 Metabolic pathway of PCBs

2 *Burkholderia xenovorans* LB400 的基因组和降解基因

芳香族化合物的降解是通过脱卤或氧化芳香环起始的,从而使其更易于被环裂解。质粒、转座子和整合遗传元件(通过水平基因转移产生)上大量的芳香族降解基因导致了芳香族降解途径的进化,这使得微生物能够通过典型降解途径代谢多种芳香族化合物。通过使用基因组学和蛋白质组学方法,研究者已报道了一系列多氯联苯降解菌株概况,如表2所示。其中, LB400 菌株降解 PCBs 的途径已在遗传和生化水平得到了广泛的鉴定。在分析 *Burkholderia xenovorans* LB400 的转录组时也揭示了推定的解毒机制和不同环境条件(例如碳源和生长期)对 *Burkholderia xenovorans* LB400 降解效率的影响^[28]。

LB400 基因组的大小为 9.73 Mb, 包括 2 个环形染色体(分别为 4.90 Mb 和 3.36 Mb)和环形巨大质粒(1.47 Mb)^[18]。在众多好氧降解菌株中, *Rhodococcus* sp. strain RHA1 与其基因组大小最为相近。RHA1 基因组大小为 9.70 Mb, 包括 1 条染色体(7.80 Mb)和 3 个质粒(分别为 1.12 Mb 的 pRHL1、0.44 Mb 的 pRHL2 和 0.33 Mb 的

pRHL3)^[18,24]。然而, 两个菌株中与多氯联苯代谢相关的基因分布有较大差异。在菌株 LB400 基因组中, 与多氯联苯代谢相关的基因位于巨型质粒的 *bph* 操纵子上, 如图 2 所示。操纵子包含编码联苯双加氧酶(biphenyl dioxygenase, BPDO)、顺式-2,3-二氢-2,3-二羟基联苯脱氢酶(BphB)、2,3-二氢联苯-1,2-双加氧酶(BphC)的基因和二烯酸水解酶(BphD)的基因; 其中 *bphC* 和 *bphD* 之间还有 3.5 kb 大小的序列区, 包含编码谷胱甘肽转移酶(BphK)的基因和其他与 PCBs 代谢相关的基因^[18,29]。在 *Rhodococcus* sp. RHA1 基因组中, 主要的 *bph* 基因簇位于 pRHL1 上, 由 *bphA1A2A3A4-bphC-bphB* 组成, *bphD1* 以及其他基因则位于 pRHL2 等质粒上^[29]。随着越来越多的基因组被测定, 可以发现这种基因分布上的差异并非个例, 在好氧降解菌株中广泛存在。例如 *Rhodococcus globerulus* P6 的 *bph* 操纵子的组织结构与菌株 LB400 十分相似, 但该菌株被证明存在多个 *bphC* 基因; 在红球菌 TA421 中, 7 个 *bphC* 基因中有 3 个位于同一个质粒上^[30]。从进化角度来看, 这种分布上的差异可能与外源性 *bph* 基因的插入有关。

Table 2 Microorganisms for degradation of polychlorinated biphenyls

菌株	分类	降解途径	降解基因	降解基因位置	底物范围	参考文献
Bacteria name	Classification	Metabolic pathway	Degradation genes	Location of degradation genes	Substrate range	References
<i>Burkholderia xenovorans</i> LB400	伯克霍尔德菌 <i>Burkholderia</i>	联苯降解途径 Metabolic mechanism of biphenyl	联苯双加氧酶基因、脱氢酶基因、二羧基联苯双加氧酶基因、二羧基联苯双加氧酶基因等 Biphenyl dioxygenase genes (<i>bphA1E</i> , <i>bphF</i> , <i>bphG</i>), dihydrodiol dehydrogenase gene (<i>bphB</i>), 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene (<i>bphC</i>), 2-hydroxy-6-phenyl-6-oxohexa-2,4-dieneoate hydrolase gene(<i>bphD</i>), etc	位于巨型质粒 Plasmid	含有 1-6 个氯取代基的多氯联苯以及二苯并呋喃等多氯联苯结构类似物 Chlorinated biphenyl congeners containing from one to six chlorine substituents and dibenzofuran	[8,12,18-19]
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> KF707	假单胞菌属 <i>Pseudomonas</i>	联苯降解途径 Metabolic mechanism of biphenyl	联苯双加氧酶基因、脱氢酶基因、二羧基联苯双加氧酶基因等 Biphenyl dioxygenase gene (<i>bphA1</i> , <i>bphA2</i> , <i>bphA3</i> , <i>bphA4</i>), dihydrodiol dehydrogenase gene (<i>bphB</i>), 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene (<i>bphC</i>), 2-hydroxy-6-phenyl-6-oxohexa-2,4-dieneoate hydrolase gene (<i>bphD</i>), etc	位于染色体 Chromosome	1-3 个氯取代基的多氯联苯 (2,4,5-CB, 2,3-CB, 2,4'-CB 等) 以及几种氯代联苯 Chlorinated biphenyl congeners containing from one to three chlorine substituents and fluorinated biphenyl	[19-20]
<i>Dehalococcoides</i> sp. strain CBDB1	脱卤球菌属 <i>Dehalococcoides</i>	还原脱氯 Reductive dechlorination reaction	氯苯还原脱氯酶基因、四氯乙炔还原脱氯酶基因等 Chlorobenzene reductive dehalogenase gene (<i>cbhA</i>), tetrachloroethylene reductive dehalogenase gene (<i>pceA</i>), etc	位于染色体 Chromosome	绝大多数高氯联苯、高氯代苯酚以及几种氯代二恶英 Chlorinated dioxins, most of PCBs and fluorophenol	[11,21-22]
<i>Rhodococcus</i> sp. strain RHA1	红球菌属 <i>Rhodococcus</i>	联苯降解途径 Metabolic mechanism of biphenyl	联苯双加氧酶基因、脱氢酶基因、二羧基联苯双加氧酶基因等 Biphenyl dioxygenase gene (<i>bphA1</i> , <i>bphA2</i> , <i>bphA3</i> , <i>bphA4</i>), dihydrodiol dehydrogenase gene (<i>bphB</i>), 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene (<i>bphC</i>), 2-hydroxy-6-phenyl-6-oxohexa-2,4-dieneoate hydrolase gene (<i>bphD</i>), etc	位于线性性质粒 Plasmid	高氯代多氯联苯如六氯联苯、七氯联苯等 PCBs, such as hexachlorobiphenyl, heptachlorobiphenyl	[10,23-24]
<i>Achromobacter</i> <i>Georgiopolitium</i> KKS102	无色杆菌属 <i>Achromobacter</i>	联苯降解途径 Metabolic mechanism of biphenyl	联苯双加氧酶基因、脱氢酶基因、二羧基联苯双加氧酶基因等 Biphenyl dioxygenase gene (<i>bphA1</i> , <i>bphA2</i> , <i>bphA3</i> , <i>bphA4</i>), dihydrodiol dehydrogenase gene (<i>bphB</i>), 2,3-dihydroxybiphenyl dioxygenase gene (<i>bphC</i>), 2-hydroxy-6-phenyl-6-oxohexa-2,4-dieneoate hydrolase gene (<i>bphD</i>), etc	主要位于性质粒 Plasmid	1-5 个氯取代基的多氯联苯 Chlorinated biphenyl congeners containing from one to five chlorine substituents	[25-26]
<i>Phanerocheate chrysosporium</i> RP78	平革菌属 <i>Phanerocheate</i>	木质素代谢机制和单加氧反应 Metabolic mechanism of lignin	木质素过氧化酶基因、锰依赖型过氧化酶基因等 Lignin peroxidase gene (<i>lip1</i>), Manganese-dependent peroxidase gene (<i>mnp5</i>), etc	位于染色体 Chromosome	木质素及相关芳香族化合物 Lignin and related aromatic compounds	[13,27]

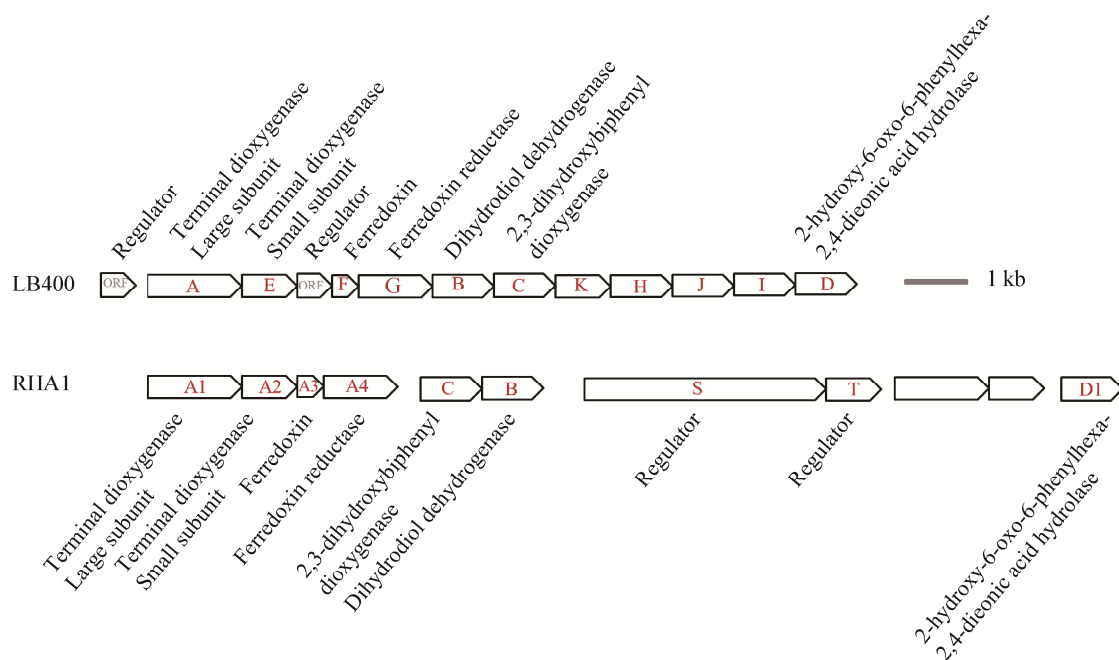


图2 菌株 LB400 和 RHA1 降解基因分布

Figure 2 Distribution of degradation genes for strain LB400 and RHA1

研究发现, *Burkholderia xenovorans* LB400 与 *Rhodococcus* sp. strain RHA1 和 *P. pseudoalcaligenes* KF707 等好氧降解菌株的 *bph* 基因簇均具有降解多种芳香族化合物的潜力, 并且基因组序列显示出异常高的代谢通用性; 同时, LB400 菌株的基因组近 20% 的基因被证明是通过水平基因转移获得^[18,24,29]。其他测序的芳香降解细菌, 如恶臭假单胞菌 KT2440, 其编码联苯降解途径中酶的基因位于移动性遗传元件中, 而恶臭假单胞菌 KF715 含有的 *bphABCD* 基因簇被认为是从 LB400 型基因簇进化而来^[31-33]。这些研究表明, *Burkholderia xenovorans* LB400 等好氧降解菌株中 *bph* 基因并非独立进化, 而是拥有共同的起源。*bph* 基因在质粒或转座子等移动遗传元件上的存在表明这些基因能够在基因组之间移动, 从而使微生物群落适应 PCBs。总体而言, 我们对涉及 PCBs 代谢的酶和基因的知识仍然不够深入, 并且细菌降解途径的多样性被大大低估。

3 *Burkholderia xenovorans* LB400 中的酶系统

正确理解多氯联苯降解的生物化学过程是成功构建和优化多氯联苯降解菌的关键。下面将阐明联苯分解代谢途径中每一种酶在 PCBs 降解中的作用, 并对这些酶的生物催化特性和人工进化的现有研究进行总结。

3.1 联苯双加氧酶

联苯双加氧酶(BPDO)对于 PCBs 的代谢至关重要。一方面, 它们的双氧化区域专一性决定了随后代谢途径的攻击位点; 另一方面, 它们的底物特异性决定了生物体可以转化的多氯联苯的范围^[34]。菌株 LB400 的联苯双加氧酶包含 3 个组分: (1) 末端氧化酶(BphAE), 其是一个六聚体, 如图 3 所示, 由 3 个 α 亚基($M_r=51\ 000$)和 3 个 β 亚基($M_r=22\ 000$)组成; (2) 铁氧还原蛋白(BphF, $M_r=12\ 000$); (3) 铁氧还原蛋白还原酶(BphG, $M_r=43\ 000$), BphAE 直接与底物相互作用, 实现联苯

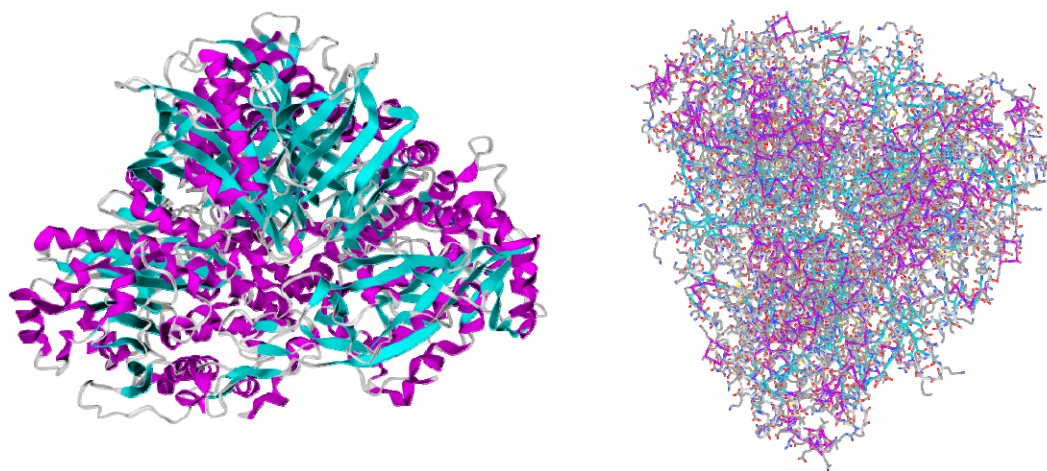


图3 联苯双加氧酶模型

Figure 3 The model of biphenyl dioxygenase

的二羟基化催化反应^[35]。应该注意的是, 同类降解菌中的 BphAE, 即末端氧化酶可分为两类, 一类末端双加氧酶为同源多聚体, 而另一类则是由大亚基(α)和小亚基(β)组成的异源多聚体。在酶与底物反应过程中, 电子由辅酶因子 NAD(P)H 经还原酶链转移至末端氧化酶^[35]。

通过序列分析可以发现, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707 与菌株 LB400 的 BPDO 基因核苷酸序列几乎完全相同(仅在 α 亚基上存在 20 个氨基酸的不同); 然而, 这两种菌株对 PCBs 的降解能力存在较大差异, 菌株 LB400 氧化 PCBs 同系物的范围比 KF707 氧化范围宽得多, 而 KF707 联苯双加氧酶对几种双对位取代的多氯联苯有更大的活性^[12,34,36]。这 2 个菌株在 PCBs 降解过程中所表现出的差异说明 α 亚基可能与底物特异性有关。菌株 LB400 的 BphAE 的 α 亚基被认为在反应中起关键作用, 共分为 4 个区域。在 LB400 联苯双加氧酶与底物结合过程中, I、II 区域中某些氨基酸会发生移动, 其移动距离随着底物不同而不同, 如 283 位的丝氨酸; III、IV 区域的某些氨基酸被证明具有底物识别的作用, 比如 III 区域氨基酸顺序为 Thr³³⁵Phe³³⁶Asn³³⁷Asn³³⁸Ile³³⁹Arg³⁴⁰Ile³⁴¹ 的片段; 同时 BphAE_{LB400} 的氨基酸 Asn³⁷⁷Phe³⁷⁸、Phe³⁸⁴、Gln²⁵⁵Ile²⁵⁸ 和 Ala²⁶⁸ 也被证明对双加氧酶的

催化性能有影响^[12,36-37]。

研究表明, 联苯分子的 2 个苯环在反应时并不是平行的, 而是在某些好氧菌株如 *Rhodococcus jostii* RHA1 和 *Pandorae pnomenusa* 双加氧酶的催化口袋内发生了倾斜^[38]。这一结果引起关注, 因为已知毒性最强的邻-对位取代同系物是共面构象的。BphAE_{LB400} 对二苯并呋喃(共面构象分子)的氧化效率不高, 然而, 将 BphAE_{LB400} 的 2 个氨基酸残基 Thr³³⁵Phe³³⁶ 突变为 Ala³³⁵Met³³⁶ 即得到突变体 BphAE_{p4}。相比于 BphAE_{LB400}, BphAE_{p4} 的底物谱范围扩大, 能够代谢更多的持久性污染物, 如 2,6-二氯联苯; 其中, Ala 取代 Thr³³⁵ 是 BphAE_{p4} 获得新特性的关键^[38-39]。LB400 中 BphAE 的 Thr³³⁵ 并不与底物直接接触, 但通过极性作用限制催化腔里的 Val³²⁰Gly³²¹Gln³²² 段的移动; Thr³³⁵ 突变为 Ala 可以缓解分子段内的约束, 允许在底物结合过程中这些残基段的显著移动, 从而增加了可用空间, 以容纳体积较大的底物, 如 2,6-二氯联苯、二苯并呋喃等^[38]。因此, 联苯双加氧酶的底物范围可以通过突变催化腔内的氨基酸残基调节催化腔的可塑性来改变, 从而创造出容纳结构上具有不同构象底物所需的空间。随后, 将 BphAE_{p4} 的 Asn³³⁸Ile³⁴¹Leu⁴⁰⁹ 转化为 Gln³³⁸Val³⁴¹Phe⁴⁰⁹ 得到突变体 BphAE_{RR41}, 后者比前者能够更有效地氧化二苯

并咪喃^[38,40]。结构和生化分析表明位于邻近亚基 Rieske 结构域界面催化域的几个蛋白结构参与亚基组装和催化反应(电子转移和质子化)^[38]。研究发现 BphAE_{RR41} 对二苯并咪喃的代谢能力优于 BphAE_{p4}, 这是由 Gln 取代 Asn³³⁸ 及 Phe 取代 Leu⁴⁰⁹ 的双重取代所导致;从晶体结构来看,这 2 个残基离基体很远,但它们一起影响亚基组装和底物诱导构象,从而影响催化反应^[38,41-42]。

综上所述,催化腔内的 III、IV 区氨基酸残基在固定非反应联苯环的过程中起着至关重要的作用,改变这一区域是增强联苯双加氧酶对共平面的二苯并咪喃及其类似物降解活性的一条有效途径。然而,与以上 2 个区域相比,人们对 I、II 区域氨基酸残基的功能知之甚少。

3.2 2,3-二氢-2,3-二羟基联苯脱氢酶

联苯分解代谢途径的第二步是由脱氢酶催化生成二羟基代谢物。2,3-二氢-2,3-二羟基联苯脱氢酶(BphB)由四聚体组成,如图 4 所示。氨基酸序列分析显示 *Pseudomonas putida* OU83、*B. xenovorans* LB400 和 *P. pseudoalcaligenes* KF707 的 *bphB* 基因表现出高度同源性;作为短链还原酶家族的一员,BphB 与其他短链还原酶在催化三联体的折叠和定位方面非常相似,仅在辅因子结合位点上有微小的差异^[43]。*B. xenovorans* LB400 中 BphB 的结

构已经被确定,其 X 射线结构表明,142 位的丝氨酸、159 位的赖氨酸、去质子化的 155 位的酪氨酸和辅酶 NAD⁺ (烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)形成 BphB 的活性位点;同时,通过氢键等结合底物多卤代联苯来实现底物和酶构象的改变,从而降低反应的活化能^[43]。Zhang 等^[44]通过量子力学和分子力学的方法解释了 BphB 催化反应的过程,BphB 对底物的催化属于碱催化,由去质子化的 155 位的酪氨酸引起催化反应,酪氨酸的 O 原子可以与底物羟基上的 H 原子形成氢键(键长为 1.64 Å),而氢键形成的同时也伴随着底物羟基 O-H 键的断裂;同时,离开的 H 原子与充当催化碱的酪氨酸的 O 原子共价结合,底物上与羟基成键的 C 原子上的 H 原子被辅酶 NAD⁺ 的 C 原子接受形成 σ 键,这与实验数据也相吻合。量子力学和分子力学法在酶学方面的应用,提供了研究催化机制的一种思路,将生理生化数据与微观力学分析相结合,对于明确关键氨基酸残基在催化过程中的作用具有重要意义。

值得注意的是,BphB 具有广泛的底物特异性,参与各种芳香化合物降解,包括 3,4-二氢-3,4-二羟基联苯和其他由芳族和杂芳族化合物如二苯并咪喃、类黄酮双氧合制得的二氢二羟基产物;除了 2,6 位取代的化合物外,*B. xenovorans* LB400 的 BphB 基本可将所有在非氧化环带有氯原子的联

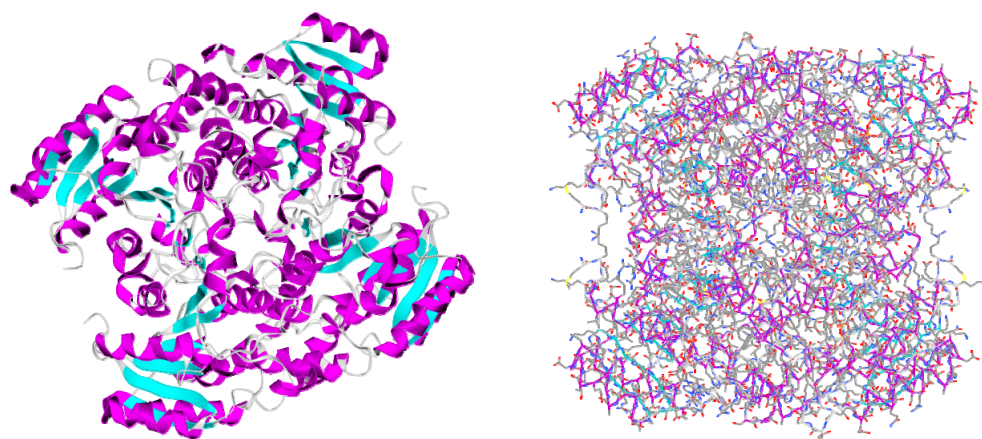


图 4 2,3-二氢-2,3-二羟基联苯脱氢酶模型

Figure 4 The model of BphB

苯 2,3-二氢二醇进行有效脱氢^[43,45]。因此, 2,3-二氢-2,3-二羟基联苯脱氢酶并不是降解途径中的瓶颈, 人工进化方面的研究较少。

3.3 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶

联苯分解代谢途径的第3个反应是由二羟基双加氧酶(BphC)将 2,3-二羟基联苯转化为 2-羟基-6-氧-6-苯基二烯酸(HOPDA), BphC 是一种二羟基儿茶酚环裂解双加氧酶, 如图5所示, 通过催化2个氧原子加入底物的邻苯二酚环, 导致其裂解^[12]。外源性双加氧酶的活性位点通常含有1个 Fe(II), Fe(II)和酶之间可能以配位键相互结合^[46]。Hatta 等从萘降解菌 *Bacillus* sp. JF8 中分离纯化出一种耐热的 Mn(II)依赖型 BphC_{JF8}, 该酶在 80 °C 和 75 °C 时的半衰期分别为 30 min 和 81 min; 尽管 BphC_{JF8} 的一级结构与 *Rhodococcus globerulus* P6 和 *Burkholderia* sp. LB400 的 BphC 的序列相似性不到 25%, 但 BphC_{JF8} 中活性位点残基极具保守性^[46]。

从 *Burkholderia* sp. LB400 和 *Pseudomonas* sp. KKS102 中分离得到的 BphC 极易被氧化, 在厌氧条件下测定其结构, 需要进行厌氧纯化; BphC 由八聚体组成, 每个单体包含2个域; 每个域有2个拷贝, 由4个 β 链和1个 α 螺旋形成, 顺序为

β - α - β - β ^[47]。因此, 每个单体在2个区域内包含该单元的4个拷贝, 这表明该酶在进化过程中存在遗传复制。由于 BphC 对 3-氯邻苯二酚的高敏感性, 容易由邻氯二羟基联苯代谢物引起底物抑制, 以及它们不能裂解间对羟基二羟基联苯代谢物, 使其成为多氯联苯降解途径中的瓶颈^[46-47]。随着 Denome 发现 *Pseudomonas* sp. C18 的同源酶 1,2-二羟基萘双加氧酶比 BphC 更有效地催化间对羟基化代谢产物的环裂解^[48], 使得其他联芳基化合物降解菌株成为了 PCBs 降解酶的重要来源。因此, 考虑到二羟基双加氧酶的同源性, 定向进化 BphC 或将成为克服由 BphC 局限性引起的瓶颈的有效手段。

3.4 2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-二烯酸水解酶

联苯代谢通路的最后一步由二烯酸水解酶 (BphD)催化, 将 2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-二烯酸 (HOPDA)水解生成 2-羟基-2,4-二烯酸酯和苯甲酸^[49]。来自 *Burkholderia* sp. LB400 的 HOPDA 水解酶是一种同型四聚体酶, 如图6所示, 其亚基可以分为核心域和限制域, 同所属水解酶家族其他成员相同的是其催化过程需利用 Ser-His-Asp 三联体^[50]。李延伟的研究提供了 BphD 的底物辅助酰化过程的更多细节, BphD 的催化过程属于共价催化, 酶活性

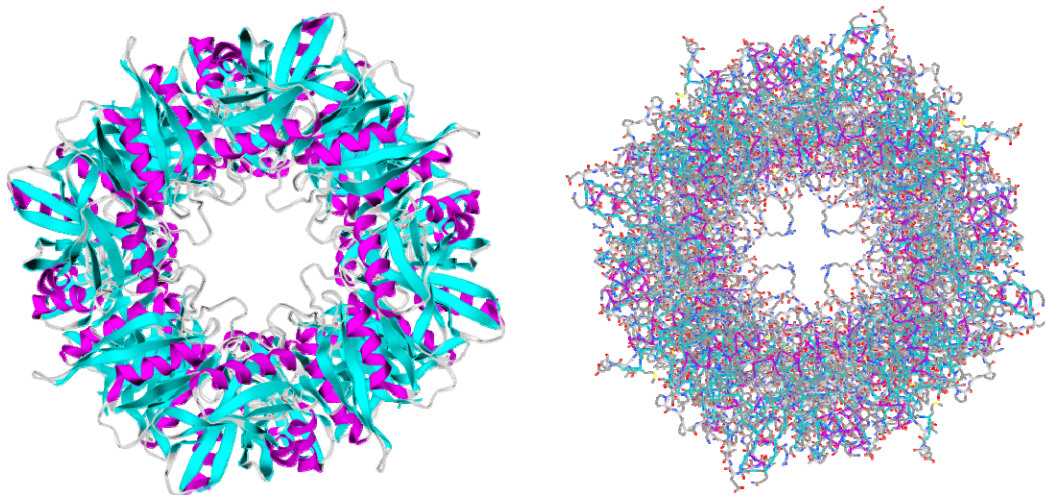


图5 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶模型

Figure 5 The model of BphC

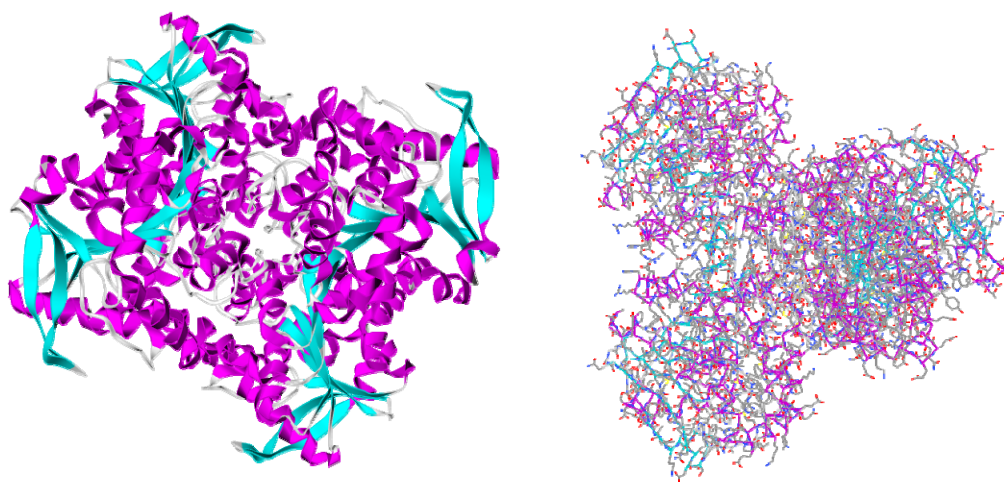


图 6 2-羟基-6-氧-6-苯基-2,4-二烯酸水解酶模型

Figure 6 The model of BphD

中心具有一个非极性和一个极性亚位点, 分别用于容纳其天然底物 HOPDA 的苯基和二烯酸部分; 酰化过程的产物(2-羟基-2,4-二烯酸)被 3 个水分子代替, 其中 1 个参与脱酰过程; 同时, 他们发现了可能加速 BphD 降解速率的突变靶标(如 Phe²³⁹)^[50]。

Seah 等则比较了 *B. xenovorans* LB400 和 *R. globerulus* P6 HOPDA 水解酶的催化性能异同, 分离自菌株 LB400 的 HOPDA 水解酶对苯环上带有氯原子的 HOPDA 具有较强的降解活性; 同时, 3-Cl-HOPDA 和 4-Cl-HOPDA 对酶抑制作用较弱^[49,51]。然而, 与 LB400 中的 BphD 不同, *Rhodococcus globerulus* P6 中的 BphD 对 3-Cl-HOPDA 和 4-Cl-HOPDA 较为敏感^[49-51]。这意味着 HOPDA 水解酶的底物特异性随酶结构的不同变化很大。通过对同源酶的比较研究, 可以发现关键氨基酸残基的具体功能, 帮助设计新的 BphD 工程酶, 使其能够更有效地降解在 2 个环上都带有氯原子的同类物质。

4 *Burkholderia xenovorans* LB400 对 PCBs 的降解应用

环境中多氯联苯的迁移转化是由物理、化学

和生物过程的相互作用所控制。物理过程是多氯联苯从土壤、地下、水体和大气等离开其来源的过程, 而化学和生物过程决定了其转化的程度。同样地, 多氯联苯污染的修复也对应着物理修复、化学修复和生物修复。物理和化学修复主要包括高温、高压、强碱性环境、光催化、金属催化、电化学催化等过程。然而在生物修复过程中, 原位的土壤细菌是参与 PCBs 降解的主要贡献者; 有学者对 *B. xenovorans* LB400 降解多氯联苯的底物谱和降解率做了研究, 发现 *B. xenovorans* LB400 在 1–1.7 mg/L 的底物浓度下, 能降解 15 种多氯联苯如表 3 所示, 而且对低氯代的联苯降解率高于多氯代的联苯^[52]。同时, 与另一株模式菌株 *Rhodococcus* sp. strain RHA1 相比, *B. xenovorans* LB400 对 PCBs 代谢物的毒性表现出更高的耐受性^[53]。鉴于商用 PCBs 多为三氯到六氯的多氯联苯, *B. xenovorans* LB400 菌株在生物修复方面极具潜力。当前的研究表明, 利用工程酶和细菌对持久性污染物及其类似物所造成的污染进行修复是可行的。联苯降解菌可以降解间位、对位取代、共平面、双邻位取代的持久性污染物以及通过厌氧降解来代谢高氯代联苯^[53-54]。

表 3 *B. xenovorans* LB400 对多氯联苯的降解参数表
Table 3 Degradation parameters of polychlorinated biphenyls by *B. xenovorans* LB400

PCBs	OD_{600}	t (h)	Depl (%)	C_0 (mg/L)
1	0.400	24.0	100±0	0.94
3	0.400	22.7	100±0	0.94
5	0.395	20.8	99±0	1.12
16	0.395	20.2	91±1	1.29
17	0.386	22.2	97±1	1.29
18	0.395	19.8	92±2	1.29
20	0.397	21.6	89±7	1.29
25	0.400	23.4	42±1	1.29
31	0.395	20.8	92±2	1.29
34	0.400	22.2	80±2	1.29
41	0.404	22.5	39±5	1.46
52	0.397	22.5	87±3	1.46
69	0.404	23.0	26±2	1.46
70	0.397	22.1	57±3	1.46
101	0.397	21.9	47±1	1.63

注: PCBs 为多氯联苯; C_0 为多氯联苯起始浓度; t (h) 为降解时间; Depl (%) 为降解率。

Note: PCBs indicates polychlorinated biphenyls; C_0 indicates initial concentration of polychlorinated biphenyls; t (h) indicates degradation time; Depl (%) indicates degradation rate.

另外, 植物对多氯联苯污染的修复做出了积极的贡献。植物本身可以积累和代谢 PCBs, 但其代谢速率较慢并产生有毒代谢物^[55-56]。然而, 植物可以与根际细菌联合作用有效降解 PCBs。有学者提出可以利用转基因植物表达降解 PCBs 的基因, 诱导 PCBs 降解并将部分 PCBs 代谢物进行解毒代谢^[57-58]。Mohammadi 等的研究表明, 在烟草植株短暂表达 *B. xenovorans* LB400 编码 BPDO 的基因实验中, 每个组分(BphAE、BphF、BphG)都可以作为活性蛋白单独在植物中产生, 这意味着利用转基因植物降解 PCBs 似乎是可行的^[59-60]。未来或将通过转基因植物和根际细菌开发出一种高效绿色的修复多氯联苯污染的方法。

5 结论与展望

作为研究多氯联苯降解的模式菌株, *B. xenovorans* LB400 降解 PCBs 的途径已在遗传和生化水平得到了广泛的鉴定。参与起始代谢的联苯

双加氧酶通常被认为是该途径的关键酶, 其决定了底物范围和 PCBs 降解程度。然而由 *bphC* 编码的二羟基双加氧酶和 *bphD* 编码的水解酶被认为是 PCBs 降解中的瓶颈, 需要不断优化。设计修饰酶以增强其对底物和底物类似物的活性, 需要了解酶催化腔的氨基酸与底物相互作用中用以结合和定位的机制。通过比较不同的蛋白质进化策略, 关于这些酶的作用机理已经取得了重大进展, 其中还包括对谷胱甘肽转移酶(BphK)功能的阐述。

然而, 总体来看, 对于 *B. xenovorans* LB400 等多氯联苯降解菌株的研究仍存在很多值得探讨的地方, 具体包括以下几个方面: (1) 从基因层面来看, 与 PCBs 相关降解基因的功能较为明确, 但在调控基因方面仍有空白, 如在菌株 LB400 的 *bph* 操纵子上 *bphB* 和 *bphC* 间的序列 ORF 调控作用仍不明确, 有待分子生物学层面进一步的探究。(2) 在降解酶方面, 设计修饰酶以增强其对底物的活性, 需要对酶的结构以及关键氨基酸残基的作用有详细的了解。但是, 在催化腔中排列的氨基酸残基或那些影响底物定位以及影响催化中心构象的氨基酸残基的确切作用有的仍不清楚, 如在菌株 LB400 联苯双加氧酶催化底物反应时, BphAE 催化腔 283 位的丝氨酸发生明显的移动, 但目前对于其作用知之甚少。因此, 需要对能够与底物反应的野生型和进化型酶的晶体结构结合分子力学进行分析, 以帮助探究这些酶扩大其底物特异性的机制。(3) 在降解途径方面, *B. xenovorans* LB400 等多氯联苯降解菌株对很多多氯联苯及其结构类似物的代谢过程都存在中心代谢途径。然而, 转化转座等产生的新基因和基因转移、重组过程导致的遗传进化往往导致围绕中心代谢途径的旁支代谢途径的变化, 这种旁支途径的变化仍需探究。(4) 微生物并不是生物降解过程的唯一驱动因素, 植物对 PCBs 污染的修复也有重要贡献。植物和微生物联合应用的根际修复成为近年来研究的热点。未来设计优化 *B. xenovorans* LB400 工程菌以及与植物联合作用或将成为控制多氯联苯污染的重要手段。

REFERENCES

- [1] O'Sullivan LA, Mahenthiralingam E. Biotechnological potential within the genus *Burkholderia*[J]. Letters in Applied Microbiology, 2005, 41(1): 8-11
- [2] Achouak W, Christen R, Barakat M, et al. *Burkholderia caribensis* sp. nov., an exopolysaccharide-producing bacterium isolated from vertisol microaggregates in Martinique[J]. International Journal of Systematic Bacteriology, 1999, 49(2): 787-794
- [3] Coenye T, Vandamme P. Diversity and significance of *Burkholderia* species occupying diverse ecological niches[J]. Environmental Microbiology, 2003, 5(9): 719-729
- [4] Li FH, Xu L, Zhang TH, et al. Degradation characteristics and fermentation conditions optimization of a PCBs-degrading strain[J]. Microbiology China, 2014, 41(7): 1299-1307 (in Chinese)
李方卉, 徐莉, 张腾昊, 等. 一株 PCBs 降解菌的降解特性及发酵条件优化[J]. 微生物学通报, 2014, 41(7): 1299-1307
- [5] Lu YT, Liu ML, Liu YZ, et al. Characteristics and health risk assessment of polychlorinated biphenyls in surface soil of the Yangtze River[J]. China Environmental Science, 2018, 38(12): 4617-4624 (in Chinese)
鲁垠涛, 刘明丽, 刘殷佐, 等. 长江表层土壤多氯联苯污染特征及风险评价[J]. 中国环境科学, 2018, 38(12): 4617-4624
- [6] L'Abbée JB, Tu YB, Barriault D, et al. Insight into the metabolism of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(4-chlorophenyl)ethane (DDT) by biphenyl dioxygenases[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2011, 516(1): 35-44
- [7] Sun GT, Chen HY, Zhao LC, et al. Isolation, identification and characterization of a PCBs-degrading bacterium[J]. Biotechnology Bulletin, 2018, 34(6): 141-148 (in Chinese)
孙桂婷, 陈红云, 赵玲超, 等. 多氯联苯降解菌的筛选、鉴定及其降解特性研究[J]. 生物技术通报, 2018, 34(6): 141-148
- [8] Pham TTM, Sondossi M, Sylvestre M, et al. Metabolism of doubly *para*-substituted hydroxychlorobiphenyls by bacterial biphenyl dioxygenases[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2015, 81(14): 4860-4872
- [9] Qiao C, Ren L, Fan SH, et al. Characterization of 2,3-dihydroxybiphenyl-1,2-dioxygenase BphC from biphenyl degrader *Arthrobacter* sp. YC-RL1[J]. Microbiology China, 2017, 44(7): 1639-1648 (in Chinese)
乔铖, 任磊, 樊双虎, 等. 联苯利用节杆菌 YC-RL1 中 2,3-二羟基联苯-1,2-双加氧酶 BphC 功能验证[J]. 微生物学通报, 2017, 44(7): 1639-1648
- [10] Yang XQ, Yang L. Physiological function of regulatory protein RHOG007659 involved in metabolism biphenyl/polychlorinated biphenyl in *Rhodococcus* sp. R04[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2018, 58(5): 915-925 (in Chinese)
杨秀清, 杨琳. 红球菌 R04 联苯/多氯联苯代谢相关调控蛋白 RHOG007659 的生理功能[J]. 微生物学报, 2018, 58(5): 915-925
- [11] Smidt H, de Vos WM. Anaerobic microbial dehalogenation[J]. Annual Review of Microbiology, 2004, 58(1): 43-73
- [12] Barriault D, Sylvestre M. Evolution of the biphenyl dioxygenase BphA from *Burkholderia xenovorans* LB400 by random mutagenesis of multiple sites in region III[J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(46): 47480-47488
- [13] Stella T, Covino S, Čvančarová M, et al. Bioremediation of long-term PCB-contaminated soil by white-rot fungi[J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 324: 701-710
- [14] Kumar P, Gómez-Gil L, Mohammadi M, et al. Anaerobic crystallization and initial X-ray diffraction data of biphenyl 2,3-dioxygenase from *Burkholderia xenovorans* LB400: addition of agarose improved the quality of the crystals[J]. Acta Crystallographica Section F, 2011, 67(1): 59-63
- [15] Tocheva EI, Fortin PD, Eltis LD, et al. Structures of ternary complexes of BphK, a bacterial glutathione *S*-transferase that reductively dechlorinates polychlorinated biphenyl metabolites[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(41): 30933-30940
- [16] Périgon S, Massier M, Germain J, et al. Metabolic adaptation of fungal strains in response to contamination by polychlorinated biphenyls[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2019, 26(15): 14943-14950
- [17] Xu Y, Fu DF. A review on microbial-catalyzed reductive dechlorination of polychlorinated biphenyls[J]. Environmental Chemistry, 2014, 33(6): 908-914 (in Chinese)
许妍, 傅大放. 多氯联苯微生物厌氧脱氯研究进展[J]. 环境化学, 2014, 33(6): 908-914
- [18] Chain PSG, Deneff VJ, Konstantinidis KT, et al. *Burkholderia xenovorans* LB400 harbors a multi-replicon, 9.73-Mbp genome shaped for versatility[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(42): 15280-15287
- [19] Gibson DT, Cruden DL, Haddock JD, et al. Oxidation of polychlorinated biphenyls by *Pseudomonas* sp. strain LB400 and *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(14): 4561-4564
- [20] Murphy CD, Quirke S, Balogun O. Degradation of fluorobiphenyl by *Pseudomonas pseudoalcaligenes* KF707[J]. FEMS Microbiology Letters, 2008, 286(1): 45-49
- [21] Adrian L, Dudková V, Demnerová K, et al. "*Dehalococcoides*" sp. strain CBDB1 extensively dechlorinates the commercial polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1260[J]. Applied and Environmental

- Microbiology, 2009, 75(13): 4516-4524
- [22] Kube M, Beck A, Zinder SH, et al. Genome sequence of the chlorinated compound-respiring bacterium *Dehalococcoides* species strain CBDB1[J]. Nature Biotechnology, 2005, 23(10): 1269-1273
- [23] Seto M, Kimbara K, Shimura M, et al. A novel transformation of polychlorinated biphenyls by *Rhodococcus* sp. strain RHA1[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1995, 61(9): 3353-3358
- [24] Masai E, Sugiyama K, Iwashita N, et al. The *bphDEF* meta-cleavage pathway genes involved in biphenyl/polychlorinated biphenyl degradation are located on a linear plasmid and separated from the initial *bphACB* genes in *Rhodococcus* sp. strain RHA1[J]. Gene, 1997, 187(1): 141-149
- [25] Fukuda M, Yasukochi Y, Kikuchi Y, et al. Identification of the *bphA* and *bphB* genes of *Pseudomonas* sp. strain KKS102 involved in degradation of biphenyl and polychlorinated biphenyls[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1994, 202(2): 850-856
- [26] Kimbara K, Hashimoto T, Fukuda M, et al. Isolation and characterization of a mixed culture that degrades polychlorinated biphenyls[J]. Agricultural and Biological Chemistry, 1988, 52(11): 2885-2891
- [27] Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(6): 695-700
- [28] Parnell JJ, Denef VJ, Park J, et al. Environmentally relevant parameters affecting PCB degradation: carbon source- and growth phase-mitigated effects of the expression of the biphenyl pathway and associated genes in *Burkholderia xenovorans* LB400[J]. Biodegradation, 2010, 21(1): 147-156
- [29] McLeod MP, Warren RL, Hsiao WWL, et al. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(42): 15582-15587
- [30] Kosono S, Maeda M, Fuji F, et al. Three of the seven *bphC* genes of *Rhodococcus erythropolis* TA421, isolated from a termite ecosystem, are located on an indigenous plasmid associated with biphenyl degradation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3283-3285
- [31] Hayase N, Taira K, Furukawa K. *Pseudomonas putida* KF715 *bphABCD* operon encoding biphenyl and polychlorinated biphenyl degradation: cloning, analysis, and expression in soil bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(2): 1160-1164
- [32] Ohtsubo Y, Delawary M, Kimbara K, et al. BphS, a key transcriptional regulator of *bph* genes involved in polychlorinated biphenyl/biphenyl degradation in *Pseudomonas* sp. KKS102[J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276(39): 36146-36154
- [33] Jimenez JJ, Miñambres B, Garcia JL, et al. Genomic analysis of the aromatic catabolic pathways from *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Environmental Microbiology, 2002, 4(12): 824-841
- [34] Vézina J, Barriault D, Sylvestre M. Diversity of the C-terminal portion of the biphenyl dioxygenase large subunit[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2008, 15(2/3): 139-151
- [35] Dhindwal S, Gomez-Gil L, Neau DB, et al. Structural basis of the enhanced pollutant-degrading capabilities of an engineered biphenyl dioxygenase[J]. Journal of Bacteriology, 2016, 198(10): 1499-1512
- [36] Arnett CM, Paraless JV, Haddock JD. Influence of chlorine substituents on rates of oxidation of chlorinated biphenyls by the biphenyl dioxygenase of *Burkholderia* sp. strain LB400[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(7): 2928-2933
- [37] Barriault D, Simard C, Chatel H, et al. Characterization of hybrid biphenyl dioxygenases obtained by recombining *Burkholderia* sp. strain LB400 *bphA* with the homologous gene of *Comamonas testosteroni* B-356 [J]. Canadian Journal of Microbiology, 2001, 47(11): 1025-1032
- [38] Mohammadi M, Viger JF, Kumar P, et al. Retuning rieske-type oxygenases to expand substrate range[J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(31): 27612-27621
- [39] Pham TTM, Tu YB, Sylvestre M. Remarkable ability of *Pandoraea pnomenusa* B356 biphenyl dioxygenase to metabolize simple flavonoids[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2012, 78(10): 3560-3570
- [40] Mohammadi M, Sylvestre M. Resolving the profile of metabolites generated during oxidation of dibenzofuran and chlorodibenzofurans by the biphenyl catabolic pathway enzymes[J]. Chemistry & Biology, 2005, 12(7): 835-846
- [41] Mondello FJ, Turcich MP, Lobos JH, et al. Identification and modification of biphenyl dioxygenase sequences that determine the specificity of polychlorinated biphenyl degradation[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(8): 3096-3103
- [42] Kumar P, Mohammadi M, Viger JF, et al. Structural insight into the expanded PCB-degrading abilities of a biphenyl dioxygenase obtained by directed evolution[J]. Journal of Molecular Biology, 2011, 405(2): 531-547
- [43] Hülsmeier M, Hecht HJ, Niefind K, et al. Crystal structure of cis-biphenyl-2,3-dihydrodiol-2,3-dehydrogenase from a PCB degrader at 2.0 Å resolution[J]. Protein Science, 1998, 7(6): 1286-1293
- [44] Zhang RM, Zhuang T, Zhang QZ, et al. Effect of F, Cl, Br and I substitution on the BphB enzyme for the degradation of halogenated biphenyls, revealed by quantum and molecular mechanics[J]. Environmental Chemistry Letters, 2019, 17(2): 1167-1173
- [45] Jouanneau Y, Meyer C. Purification and characterization of an arene cis-dihydrodiol dehydrogenase endowed with

- broad substrate specificity toward polycyclic aromatic hydrocarbon dihydrodiols[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(7): 4726-4734
- [46] Hatta T, Mukerjee-Dhar G, Damborsky J, et al. Characterization of a novel thermostable Mn(II)-dependent 2,3-dihydroxybiphenyl 1,2-dioxygenase from a polychlorinated biphenyl- and naphthalene-degrading *Bacillus* sp. JF8[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2003, 278(24): 21483-21492
- [47] Fortin PD, Lo ATF, Haro MA, et al. Evolutionarily divergent extradiol dioxygenases possess higher specificities for polychlorinated biphenyl metabolites[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(2): 415-421
- [48] Denome SA, Stanley DC, Olson ES, et al. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway[J]. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175(21): 6890-6901
- [49] Seah SYK, Labbé G, Nerdinger S, et al. Identification of a serine hydrolase as a key determinant in the microbial degradation of polychlorinated biphenyls[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(21): 15701-15708
- [50] Li YW. Theoretical study on the catalytic mechanisms of typical environment related enzyme systems[D]. Ji'nan: Doctoral Dissertation of Shandong University, 2014 (in Chinese)
李延伟. 环境相关典型生物酶体系的催化反应机理研究[D]. 济南: 山东大学博士学位论文, 2014
- [51] Seah SYK, Labbé G, Kaschabek SR, et al. Comparative specificities of two evolutionarily divergent hydrolases involved in microbial degradation of polychlorinated biphenyls[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(5): 1511-1516
- [52] Rein A, Fernqvist MM, Mayer P, et al. Degradation of PCB congeners by bacterial strains[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(2): 469-481
- [53] Parnell JJ, Park J, Denev V, et al. Coping with polychlorinated biphenyl (PCB) toxicity: physiological and genome-wide responses of *Burkholderia xenovorans* LB400 to PCB-mediated stress[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(10): 6607-6614
- [54] Focht DD. Strategies for the improvement of aerobic metabolism of polychlorinated biphenyls[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, 6(3): 341-346
- [55] Lovecká P, Macková M, Demnerová K, et al. Metabolic Products of PCBs in Bacteria and Plants—Comparison of Their Toxicity and Genotoxicity[M]. London, UK: Taylor and Francis Group, 2004: 134-145
- [56] Passatore L, Rossetti S, Juwarkar AA, et al. Phytoremediation and bioremediation of polychlorinated biphenyls (PCBs): State of knowledge and research perspectives[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 278: 189-202
- [57] Macek T, Kotrba P, Svatos A, et al. Novel roles for genetically modified plants in environmental protection[J]. *Trends in Biotechnology*, 2008, 26(3): 146-152
- [58] Campanella BF, Bock C, Schröder P. Phytoremediation to increase the degradation of PCBs and PCDD/Fs[J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2002, 9(1): 73-85
- [59] Mohammadi M, Chalavi V, Novakova-Sura M, et al. Expression of bacterial biphenyl-chlorobiphenyl dioxygenase genes in tobacco plants[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2007, 97(3): 496-505
- [60] Xu L, Teng Y, Li ZG, et al. Enhanced removal of polychlorinated biphenyls from alfalfa rhizosphere soil in a field study: The impact of a rhizobial inoculum[J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(5): 1007-1013