

微生物降解 4-羟基苯甲酸的研究进展

李晶晶 朱莉 张晓琰 田俊 冯昭中 彭学*

(江苏师范大学 生命科学学院 江苏 徐州 221116)

摘要: 4-羟基苯甲酸(4HBA)是在自然界中广泛存在的芳香族化合物,也是很多天然产物和人工合成化合物的中间代谢产物。4HBA 的代谢途径有原儿茶酸开环途径、脱羧酸途径和厌氧微生物的苯甲酰-CoA 还原途径,以及尚未完全阐明的龙胆酸开环途径。从 4HBA 转化为龙胆酸的过程包含 NIH 重排反应步骤,本综述重点介绍 NIH 重排反应的研究进展并初步介绍了涉及 4HBA 降解过程中的酶。在本综述中,结合我们的研究工作介绍了一个嗜热 *Bacillus* sp. B1 菌株降解 4HBA 等芳香族化合物的代谢途径,最后对 4HBA 降解过程中的 NIH 重排反应研究进行了展望。

关键词: 4-羟基苯甲酸, NIH 重排反应, 龙胆酸, 嗜热芽孢杆菌

Recent advances in microbial degradation of 4-hydroxybenzoate ——a review

LI Jing-Jing ZHU Li ZHANG Xiao-Yan TIAN Jun FENG Zhao-Zhong PENG Xue*

(College of Life Science, Jiangsu Normal University, Xuzhou, Jiangsu 221116, China)

Abstract: 4-Hydroxybenzoate (4HBA) is a naturally occurring aromatic compound, and as a key intermediate metabolite not only for natural products but also for artificial products. There are four 4HBA metabolic pathways: protocatechuate cleavage pathway; catechol cleavage pathway; anaerobic degradation pathway in anaerobes; gentisate cleavage pathway. The last pathway including a NIH shift reaction remains to be elucidated. In this review we emphasized in NIH shift reaction involved in the 4HBA degradation. The key enzymes of each 4HBA metabolic pathway also be introduced. Finally, we described thermophilic *Bacillus* sp. B1 strain which was capable of degradation of various aromatic compounds including 4HBA, and presented a direction for NIH shift reaction research.

Keywords: 4-Hydroxybenzoate, NIH shift reaction, Gentisate, Thermophilic *Bacillus*

4-羟基苯甲酸(4-Hydroxybenzoate, 4HBA)为白色结晶粉末,溶于乙醇、乙醚和丙酮等有机溶剂,在中性条件下微溶于水。4HBA 本身可做食品添加剂,用于酱油、醋、清凉饮料、果品调味剂、水果及蔬菜、腌制品等,还广泛用于化妆品、医药的防腐、防霉剂、杀菌剂、塑料和生产液晶聚合物等方

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 31240088);徐州市科技项目(No. XM12B105);江苏高校优势学科建设工程资助项目

*通讯作者: Tel: 86-516-83500033; ✉: pengxue@jsnu.edu.cn

收稿日期: 2014-01-09; 接受日期: 2014-03-10; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2014-03-18

面^[1]。4HBA 是在自然界中广泛存在的芳香族化合物之一,特别在木质素的降解过程中起到重要代谢中间产物的作用。另外,通过枯枝、落叶、根部排出物、雨水冲洗物等方式向周围环境中释放大量的有机化学物质,其中 4HBA 是被释放出来的物质中的主要成分之一。在自然界中形成和释放出来的 4HBA,会被环境微生物迅速降解,不会在自然界中积累。但是从 20 世纪中叶起,由于人类大量长期使用含有芳香环的石化产品导致环境中人工化合物的积累,4HBA 正是这些人工化合物降解的主要中间代谢产物之一。

由于人类频繁的活动,造成向环境中排放 4HBA 的速度远远超过自然净化的速度,使得 4HBA 成为一种常见的环境污染物。4HBA 在自然界中的过量积累抑制了作物和林下植物的生长,导致农林作物减产、连作障碍及自然生态环境破坏^[2-3]。4HBA 的降解研究不但可以更好的理解自然界中芳香族化合物的碳素循环,还为环境污染物质的降解研究提供理论依据,长期以来一直受到环境微生物研究工作者的广泛重视。这篇综述阐述了在各种环境中的 4HBA 降解机制,并结合我们的研究工作介绍了一个嗜热 *Bacillus* sp. B1 菌株降解 4HBA 等芳香族化合物的代谢途径。

1 4HBA 的微生物降解途径和关键酶

1.1 原儿茶酸开环途径

原儿茶酸开环途径是在好氧微生物中降解 4HBA 最常见的途径。4HBA 的降解首先由 4HBA 羟化酶(4HBA hydroxylase)在 4HBA 的 3 位引入一个羟基将其转化为原儿茶酸(Protocatechuate, PCA)^[4-6](图 1)。4HBA 羟化酶也称为 4HBA 单加氧酶(4HBA monooxygenase),属于黄素单加氧酶家族,催化反应过程中所需要的氢由供氢体 NADPH 提供,将氧分子中的一个氧原子以羟基的形式插入到 4HBA 的 3 位生成原儿茶酸。一些菌株利用细胞色素 P450 也可以催化这个反应,但这种酶一般不在降解途径中出现,而在一些有毒化合物的解毒过程中发挥作用。原儿茶酸是一个拥有邻二醇结构,可以被双加氧酶开环的化合物。原儿茶酸可以在 2,3 位间、3,4 位间和 4,5 位间开环,分别由原儿茶酸 2,3-双加氧酶(PCA 2,3-dioxygenase)^[7-8]、原儿茶酸 3,4-双加氧酶^[9-10]和原儿茶酸 4,5-双加氧酶^[11-12]催化。2,3 位间开环的产物是 5-羧基-2-羟基粘康酸-6-半醛(5-Carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde),特异吸收峰在 350 nm; 3,4 位间开环的产物是 5-羧基粘康酸(5-Carboxymuconate),特异吸收峰在 290 nm; 4,5 位间开环的产物是

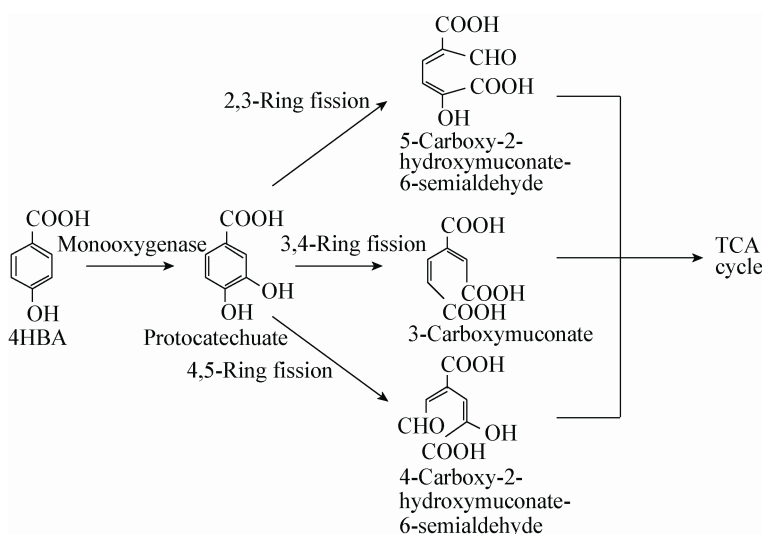


图 1 4HBA 的原儿茶酸开环代谢降解途径^[4,8,10,12]

Figure 1 The protocatechuate cleavage pathway for 4HBA catabolism^[4,8,10,12]

4-羧基-2-羟基粘康酸-6-半醛(4-Carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde), 特异吸收峰在 410 nm。这些开环产物在一系列水解酶、水合酶和醛缩酶的作用下, 最终代谢产物都进入三羧酸(Tricarboxylic acid, TCA)循环完全氧化为二氧化碳。

1.2 脱碳酸途径

部分好氧微生物或兼性厌氧微生物的 4HBA 降解是通过邻苯二酚(Catechol)开环途径(图 2)。4HBA 脱羧酶(4HBA decarboxylase)是该途径的关键酶, 其催化 4HBA 的脱羧反应生成苯酚^[13-15]。4HBA 脱羧酶是非氧化型脱羧酶(Non-oxidative decarboxylase), 也称为还原型脱羧酶(Reductive decarboxylase), 不需要分子氧和任何辅酶, 只利用水分子中的氢原子取代 1 位的羧基, 同时此酶也具有催化逆反应的羧化酶活性。4HBA 脱羧酶由 3 个亚基构成, 分别由 B、C 和 D 三个基因编码, 这些基因一般在染色体上形成一个基因簇。这个基因簇在自然界中分布非常广泛, 目前在 *Enterobacter cloacae*、*Chlamydophila pneumoniae*、*Sedimentibacter hydroxybenzoicus*、*Streptomyces* sp. D7、*Bacillus subtilis*、*Bacillus licheniformis*、*Escherichia coli* O157:H7、*Klebsiella pneumoniae*、*Shigella dysenteriae*、*Salmonella enterica*、*Salmonella paratyphi*、*Salmonella typhimurium*、*Salmonella bongori* 和 *Salmonella diarizonae* 中均被发现。由于催化产物苯酚没有特异的吸收峰, 酶活性一般利用液相色谱法检测。生成的苯酚在苯酚单加氧酶(Phenol 2-monooxygenase)的催化下转化成邻苯二酚, 此酶也称为苯酚羟化酶(Phenol hydroxylase)。 *Acinetobacter calcoaceticus*、*Comamonas testosteroni* 和 *Pseudomonas* sp. CF600 的苯酚羟化酶由 6 个亚基构成, 其编码基因形成一个基因簇, 并受上游调控基因的转录调控^[16]。

邻苯二酚可以在 1,2 位间和 2,3 位间开环, 分别由邻苯二酚 1,2-双加氧酶(Catechol 1,2-dioxygenase)和邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化。1,2 位间开环的产物是粘康酸(Muconate), 特异吸

收峰在 260 nm; 2,3 位间开环的产物是 2-羟基粘康酸-6-半醛(2-Hydroxymuconate-6-semialdehyde), 特异吸收峰在 375 nm。这些开环产物在一系列水解酶、水合酶和醛缩酶的作用下, 最终代谢产物都进入 TCA 循环完全氧化为二氧化碳^[17-18]。

1.3 苯甲酰-CoA 还原途径

在无氧条件下光合微生物 *Rhodospseudomonas palustris* 进行无氧呼吸产能, 可以降解包括 4HBA 在内的多种芳香族化合物。该途径 4HBA 作为电子受体被还原性降解, 称为苯甲酰-CoA 还原途径(图 3)。4HBA CoA 连接酶(4HBA CoA ligase)催化 4HBA 成为 4-羟基苯甲酰-CoA 是该途径的第一步反应, 需要 Mg^{2+} 、辅酶 A 作为辅助因子, 可利用催化产物 4-羟基苯甲酰-CoA 在 330 nm 处的特异

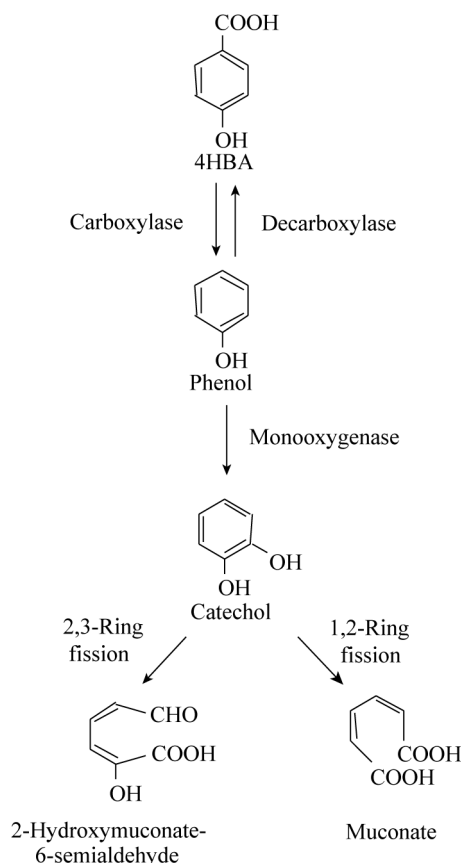
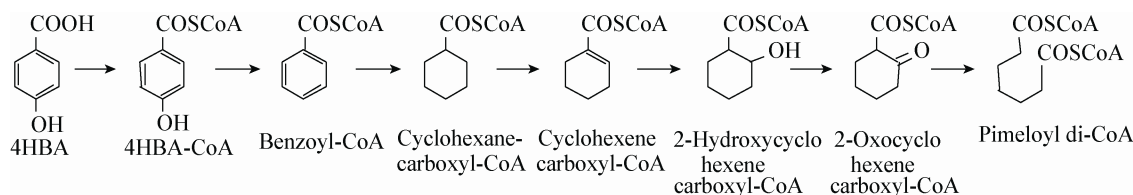


图 2 4HBA 的脱羧途径^[13-15]

Figure 2 The decarboxylation pathway for 4HBA catabolism^[13-15]

图 3 4HBA 的苯甲酰-CoA 还原途径^[19-21]Figure 3 The benzoyl-CoA pathway for anaerobic 4HBA catabolism^[19-21]

吸收来检测酶活。然后, 4-羟基苯甲酰-CoA 在 4-羟基苯甲酰-CoA 还原酶(4-Hydroxybenzoyl-CoA reductase)的作用下脱羟基得到苯甲酰-CoA (Benzoyl-CoA)。苯甲酰-CoA 的降解是逐步还原苯环的双键生成环己甲酰-CoA (Cyclohexanecarboxyl-CoA), 然后经过脱氢、水解和脱氢三步反应生成 2-氧环己甲酰-CoA (2-Oxocyclohexanecarboxyl-CoA)。2-氧环己甲酰-CoA 通过 CoA 的连接反应开环生成庚二酰-CoA (Pimeloyl di-CoA), 最终进入 TCA 循环^[19-21]。

2 龙胆酸降解途径

芳香族化合物的降解过程中, 芳香环的开环是一个重要步骤。自然界中的芳香族化合物主要来自木材中的木质素(Lignin), 木质素在降解过程中会释放出低分子木质素化合物, 如香草酸(Vanillate)、阿魏酸(Ferulate)、对羟基肉桂酸(4-Coumarate)等。这些低分子芳香族化合物的最大特点是在苯环上含有羟基、羧基和甲氧基等取代基, 因此一般通过原儿茶酸开环^[22]。而人工合成的或石油成分中的芳香族化合物一般不含有羟基和羧基等取代基, 通常经过儿茶酚开环^[23-24]。龙胆酸(Gentisate)是一个非常重要的芳香族化合物的中间代谢产物, 也是一个含有二醇构造可以开环的化合物之一。除了自然界中的芳香族化合物外^[25-27], 一些人工合成的芳香族化合物, 如萘(Naphthalene)^[28-29]、甲酚(*p*-Cresol)^[30]、氧芴(Dibenzofuran)^[31]等也可以经过龙胆酸开环降解, 所以龙胆酸是自然芳香族化合物和人工芳香族化合物降解的一个连接点(图 4)。人工合成的芳香族化合物在自然界中本来不存在, 微生物在短期内进化获得了降解能力。相关降解基因显然不是垂直进化而来, 而是通过自然界中已有的

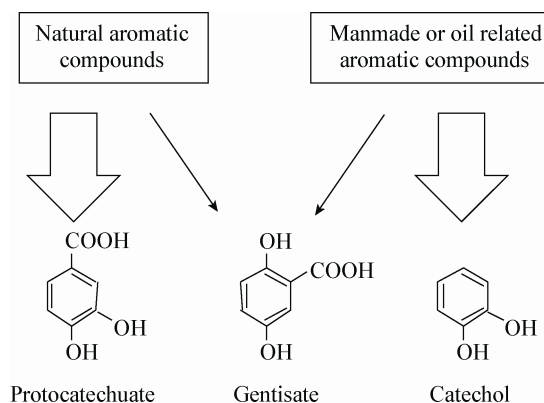


图 4 龙胆酸在芳香族化合物降解过程中的连接作用

Figure 4 Gentisate as a connection point in aromatic compounds catabolism

芳香族化合物的降解基因的水平传播和演变而来。所以研究自然芳香族化合物和人工芳香族化合物降解的连接点, 即龙胆酸开环, 是阐明微生物在接触人工化合物后的迅速进化机制的关键。

龙胆酸降解途径在自然界中分布广泛, 在 *Burkholderia*^[32]、*Rhodococcus*^[33]、*Klebsiella*^[34]、*Corynebacterium*^[35-39]、*Pseudomonas*^[40-42]、*Escherichia*^[43]、*Streptomyces*^[44]、嗜盐古菌^[45]、*Polaromonas*^[46-47]、*Silicibacter*^[48]等许多菌属中均有发现, 国内学者中国科学院武汉病毒研究所的周宁一和微生物研究所的刘双江对该途径进行了深入的研究^[49-50]。龙胆酸降解途径中的关键酶是催化第一步反应的龙胆酸双加氧酶(Gentisate 1,2-dioxygenase), 其催化龙胆酸的 1 位羧基和 2 位羟基之间添加一个氧分子并把环打开, 生成顺丁烯二酸单酰丙酮酸(Maleylpyruvate), 这个开环化合物在 330 nm 处有特异吸收, 被用作酶活的测定(图 5)。从顺丁烯二酸单酰丙酮酸到三羧酸循环的后续降解有 3 条途

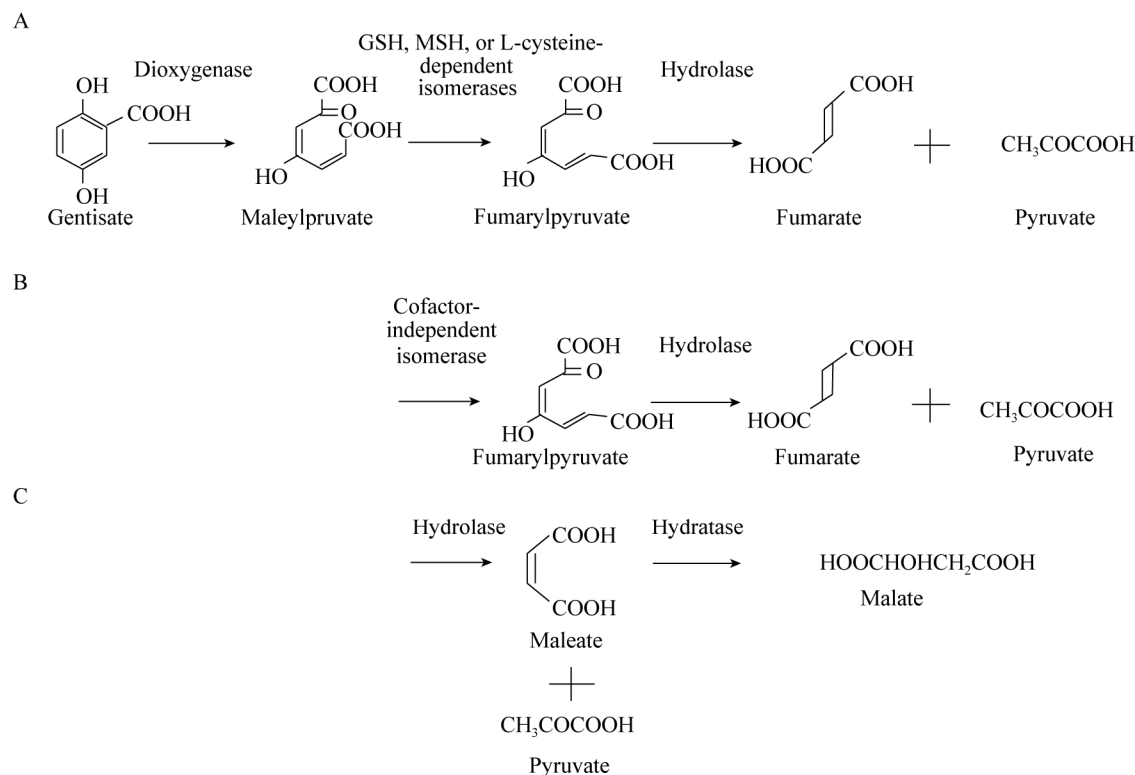


图 5 三条龙胆酸降解途径^[38,50-51]
Figure 5 Three gentisate degradation pathways^[38,50-51]

径:(A) 顺丁烯二酸单酰丙酮酸异构酶在辅酶如还原型谷胱甘肽(GSH)、Mycothiols (MSH)、或 L-丝氨酸(L-Cysteine)存在下将顺丁烯二酸单酰丙酮酸转化为反丁烯二酸单酰丙酮酸(Fumarylpyruvate), 然后通过水解酶(Hydrolase)将其水解成丙酮酸和延胡索酸^[34,37,50-51]; (B) 第二条途径基本和第一条相同, 但顺丁烯二酸单酰丙酮酸异构酶属于 GSH 等辅助因子非依赖型^[38,52]。(C) 水解酶直接将顺丁烯二酸单酰丙酮酸水解成顺丁烯二酸(Maleate)和丙酮酸, 顺丁烯二酸在水合酶的作用下转化成苹果酸进入三羧酸循环^[51]。

3 4HBA 降解过程中的 NIH 重排反应

芳香环在羟基化过程中, 在发生羟基化部位的氢原子发生分子内迁移, 从 1 位迁移到 2 位, 这种反应叫作 NIH 重排反应(NIH shift reaction)。这个现象首先由美国国立卫生研究院(National Institutes

of Health, NIH)的研究者发现, 因此命名^[53]。1976 年, Clark 和 Buswell^[54]发现在利用 4HBA 作为唯一碳源培养嗜热芽孢杆菌(*Thermophilic Bacillus* sp.)时, 龙胆酸作为中间代谢产物被检测出来, 推测可能是 NIH 重排反应发生在 4HBA 的降解过程中。一直到 2002 年, Fairley 等^[55]利用 2,5 位用氘(D)标记的 4HBA 培养古菌 *Haloferax* sp. D1227 时, 发现中间代谢产物龙胆酸的 2 位氘被羧基取代, 而 5 位氘不变, 才实验验证了 4HBA 转化为龙胆酸的反应属于 NIH 重排反应, 即在 4HBA 的 1 位羟基化的同时, 1 位的羧基移动到 2 位。但是详细的反应机制, 以及相关酶和基因至今没有任何报道。后来, 4HBA 转化为龙胆酸的 NIH 重排反应相继在其他嗜热芽孢杆菌^[54]和嗜盐古菌^[55-56]中发现, NIH 重排反应成为在高盐 and 高温等极端环境中 4HBA 降解的一个不可忽视的代谢途径, 因此其反应机制亟待阐明。

4 *Bacillus* sp. B1 菌株降解芳香族化合物的研究

本课题组成功从堆肥中分离出 *Bacillus* sp. B1 菌株, 该菌株是一种以香草酸为唯一碳源和能源的嗜热芽孢杆菌。它生长的温度范围在 50–70 °C, 最适生长温度为 60 °C, 除了香草酸外还可以把阿魏酸(Ferulate)、3-苯丙酸(3-Phenylpropionate)、对羟基苯丙酸[3-(4-Hydroxyphenyl)-propionate]、苯甲酸(Benzoate)、4HBA 等天然芳香族化合物作为唯一碳源和能源利用生长。通过对这些化合物的中间代

谢产物的分析和与其他菌株相关代谢途径的对比研究, 我们预测了 B1 菌株的降解途径(图 6)^[57]。阿魏酸首先和辅酶 A 连接生成阿魏酰 CoA, 然后侧链断裂生成香草醛(Vanillin), 香草醛氧化成香草酸然后脱甲基生成原儿茶酸。目前 B1 菌株的原儿茶酸开环途径还不清楚。3-苯丙酸首先其侧链脱氢生成肉桂酸(Cinnamate), 后续的反应与阿魏酸的降解途径相似, 即与辅酶 A 连接成肉桂酰 CoA, 侧链断裂后成苯甲酸。在 B1 菌株中苯甲酸的代谢是经过儿茶酚开环降解。对羟基苯丙酸的降解和

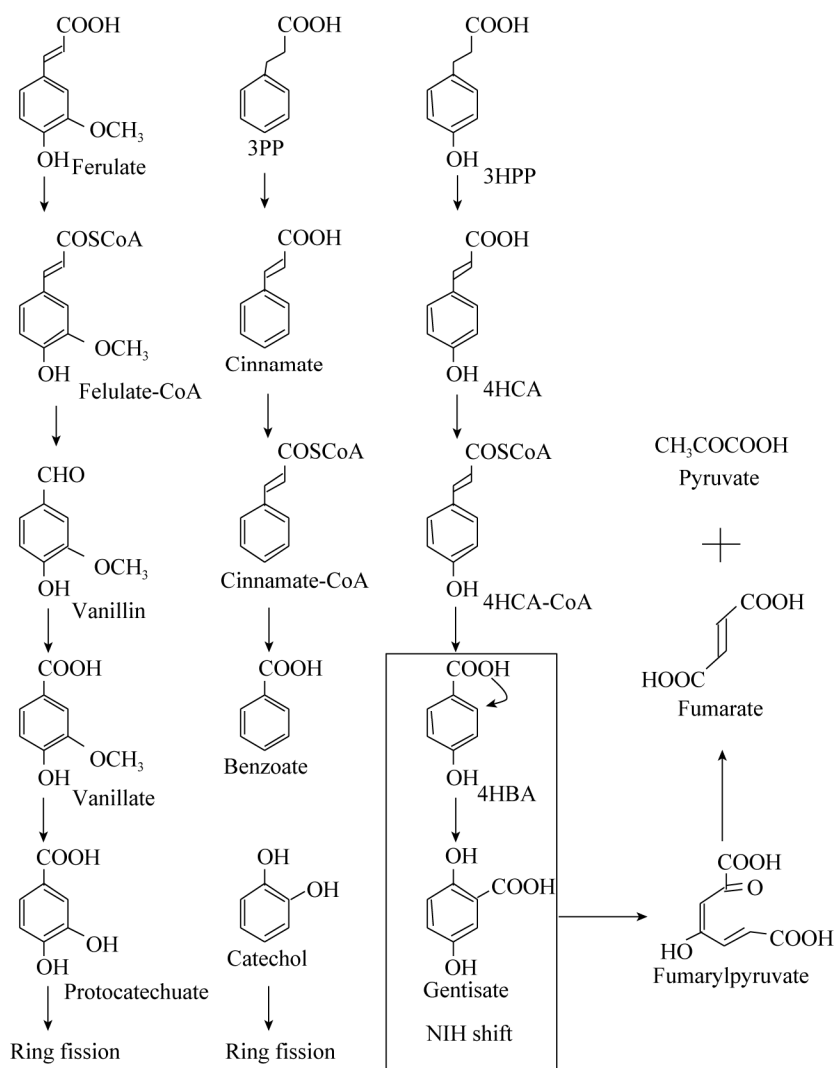


图 6 *Bacillus* sp. B1 菌株降解各种芳香族化合物的代谢途径

Figure 6 Thermophilic degradation pathways for various aromatic compounds in *Bacillus* sp. B1. 3PP, 3-phenylpropionate; 3HPP, 3-(4-hydroxyphenyl)-propionate; 4HCA, 4-hydroxycinnamate

3-苯丙酸的降解在前半部分非常类似,中间代谢产物是 4-羟基肉桂酸(4-Coumarate)、4-羟基肉桂酰 CoA 和 4HBA。4HBA 的降解途径与 Clark 和 Buswell^[54]报道的途径一样是经过龙胆酸开环。在我们后续的研究中发现,在以龙胆酸作为唯一碳源培养 B1 菌株时延胡索酸作为中间代谢产物被检测出来,说明其降解途径是上述龙胆酸降解的 A 途径或 B 途径。

5 4HBA 降解过程中的 NIH 重排反应研究展望

龙胆酸是 B1 菌株降解 4HBA 的中间代谢产物,因此可以推测 4HBA 降解过程中存在 NIH 重排反应。本课题组提出了以下 3 点研究方案,旨在彻底阐明 B1 菌株的 4HBA 降解机制。(1) NIH 重排反应的验证。利用 2,5 位用氘(D)标记的 4HBA 培养 B1 菌株,分析所生成的龙胆酸的氘被取代状况,以此验证 4HBA 转化为龙胆酸的反应是否属于 NIH 重排反应。(2) 全基因组测序。完成 B1 菌株的全基因组测序和注释,按照注释信息首先探索以下可能参与 NIH 重排反应的基因:根据前期工作,在 4HBA 降解过程中检测到了 4HBA CoA 连接酶活性,该反应很可能是 NIH 重排反应的第一步;另外根据 NIH 重排反应的底物和产物的构造推测,单加氧酶(Monooxygenase)或羟化酶(Hydroxylase)、CoA 裂解酶都可能参与该反应;龙胆酸是 NIH 重排反应之后的中间代谢产物,参与其降解基因可能和参与 NIH 重排反应的基因形成一个基因簇,排查编码龙胆酸双加氧酶前后的基因,推测参与 NIH 重排反应的基因。(3) 酶热动力学研究。在大肠杆菌高效表达各个 NIH 重排反应相关基因,提纯相关酶,进行代谢产物的构造分析和各个酶的热动力学研究,以此阐明 4HBA 降解过程中的 NIH 重排反应机制。

另外本课题组还计划调查 4HBA 降解过程中的 NIH 重排反应相关基因是否参与其他化合物的代谢以及在自然界中的分布状况。一方面检索 NIH 重排反应相关基因在基因组信息库中的分布;另一

方面从人工化合物污染区和没有被污染的森林等地取样提取 DNA,利用关键基因设计的引物进行 PCR 扩增。

6 结束语

芳香族化合物最大的特点是有一个芳香环。芳香环拥有共轭的平面环体系,原子间成键不是单双键交替,而是被离域 π 电子云覆盖,形成非常稳定的构造。芳香族化合物的降解要寻找一个可以打破芳香环的“出口”,这个出口通常是拥有邻二醇结构的化合物。在 4HBA 的各种降解途径中,原儿茶酸开环途径经过原儿茶酸开环,脱碳酸途径经过儿茶酚开环,龙胆酸开环途径经过龙胆酸开环,只有苯甲酰-CoA 还原途径是在厌氧条件下通过还原苯环成环己烷然后开环。除了龙胆酸开环途径,其他途径的降解基因、相关酶、以及调控机制等都被阐明。4HBA 经过龙胆酸开环的途径虽然在 20 世纪 70 年代就被发现,而且这个途径包含一个非常有趣的 NIH 重排反应,但是降解菌都生活在高温或高盐等极端环境中,给研究带来极大的不便,这也阻碍了 NIH 重排反应机制的阐明。我们在本综述中提出了一些解决问题的方案,希望从代谢产物、酶以及基因水平上彻底阐明 4HBA 转化为龙胆酸的 NIH 重排反应机制,填补 4HBA 降解途径上的空白。这些研究将为今后的环境污染处理领域以及利用相关酶合成有用物质的合成微生物学领域提供重要理论基础。

参考文献

- [1] 严兵,章亚峰,梁子军,等.对羟基苯甲酸在有机合成中的应用[J].精细化工原料及中间体,2010(12):42-44.
- [2] Bais HP, Vepachedu R, Gilroy S, et al. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions[J]. Science, 2003, 301(5638): 1377-1380.
- [3] Li HH, Nishimura H, Hasegawa K, et al. Allelopathy of *Sasa cernua*[J]. Journal of Chemical Ecology, 1992, 18(10): 1785-1796.
- [4] Huang Y, Zhao KX, Shen XH, et al. Genetic and biochemical characterization of a 4-hydroxybenzoate hydroxylase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 78(1): 75-83.

- [5] Karanth NGK, Reber H. Regulation of the utilization of 4-hydroxybenzoate and 4-hydroxycinnamate in batch and continuous cultures of *Pseudomonas testosteroni*[J]. Archives of Microbiology, 1979, 120(2): 97-103.
- [6] Suemori A, Nakajima K, Kurane R, et al. *o*-, *m*- and *p*-Hydroxybenzoate degradative pathways in *Rhodococcus erythropolis*[J]. FEMS Microbiology Letters, 1995, 125(1): 31-35.
- [7] Wolgel SA, Dege JE, Perkins-Olson PE, et al. Purification and characterization of protocatechuate 2,3-dioxygenase from *Bacillus macerans*: a new extradiol catecholic dioxygenase[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(14): 4414-4426.
- [8] Kasai D, Fujinami T, Abe T, et al. Uncovering the protocatechuate 2,3-cleavage pathway genes[J]. Journal of Bacteriology, 2009, 191(21): 6758-6768.
- [9] Overhage J, Kresse AU, Priefert H, et al. Molecular characterization of the genes *pcaG* and *pcaH*, encoding protocatechuate 3,4-dioxygenase, which are essential for vanillin catabolism in *Pseudomonas* sp. strain HR199[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(3): 951-960.
- [10] Zhao KX, Huang Y, Chen X, et al. PcaO positively regulates *pcaHG* of the *beta*-ketoadipate pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(6): 1565-1572.
- [11] Kasai D, Masai E, Katayama Y, et al. Degradation of 3-*O*-methylgallate in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 by pathways involving protocatechuate 4,5-dioxygenase[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 274(2): 323-328.
- [12] Kamimura N, Aoyama T, Yoshida R, et al. Characterization of the protocatechuate 4,5-cleavage pathway operon in *Comamonas* sp. strain E6 and discovery of a novel pathway gene[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2010, 76(24): 8093-8101.
- [13] Matsui T, Yoshida T, Hayashi T, et al. Purification, characterization, and gene cloning of 4-hydroxybenzoate decarboxylase of *Enterobacter cloacae* P240[J]. Archives of Microbiology, 2006, 186(1): 21-29.
- [14] Liu J, Zhang X, Zhou S, et al. Purification and characterization of a 4-hydroxybenzoate decarboxylase from *Chlamydophila pneumoniae* AR39[J]. Current Microbiology, 2007, 54(2): 102-107.
- [15] Lupa B, Lyon D, Gibbs MD, et al. Distribution of genes encoding the microbial non-oxidative reversible hydroxyarylic acid decarboxylases/phenol carboxylases[J]. Genomics, 2005, 86(3): 342-351.
- [16] Yu H, Peng Z, Zhan Y, et al. Novel regulator MphX represses activation of phenol hydroxylase genes caused by a XylR/DmpR-type regulator MphR in *Acinetobacter calcoaceticus*[J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17350.
- [17] Hupert-Kocurek K, Saczyńska A, Piotrowska-Seget Z. Cadmium increases catechol 2,3-dioxygenase activity in *Variovorax* sp. 12S, a metal-tolerant and phenol-degrading strain[J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2013, 104(5): 845-853.
- [18] 沈锡辉, 刘志培, 王保军, 等. 苯酚降解菌红球菌 PNAN5 菌株(*Rhodococcus* sp. strain PNAN5)的分离鉴定、降解特性及其开环双加氧酶性质研究[J]. 环境科学学报, 2004, 24(3): 482-486.
- [19] Geissler JF, Harwood CS, Gibson J. Purification and properties of benzoate-coenzyme A ligase, a *Rhodopseudomonas palustris* enzyme involved in the anaerobic degradation of benzoate[J]. Journal of Bacteriology, 1988, 170(4): 1709-1714.
- [20] Gibson J, Dispensa M, Harwood CS. 4-Hydroxybenzoyl coenzyme A reductase (dehydroxylating) is required for anaerobic degradation of 4-hydroxybenzoate by *Rhodopseudomonas palustris* and shares features with molybdenum-containing hydroxylases[J]. Journal of Bacteriology, 1997, 179(3): 634-642.
- [21] Evans WC, Fuchs G. Anaerobic degradation of aromatic compounds[J]. Annual Reviews of Microbiology, 1988, 42: 289-317.
- [22] Masai E, Kamimura N, Kasai D, et al. Complete genome sequence of *Sphingobium* sp. strain SYK-6, a degrader of lignin-derived biaryls and monoaryls[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(2): 534-535.
- [23] Zhao HP, Liang SH, Yang X. Isolation and characterization of catechol 2,3-dioxygenase genes from phenanthrene degraders *Sphingomonas* sp. ZP1 and *Pseudomonas* sp. ZP2[J]. Environmental Technology, 2011, 33(15/16): 1895-1901.
- [24] Harayama S, Rekik M. The *meta* cleavage operon of TOL degradative plasmid pWW0 comprises 13 genes[J]. Molecular and General Genetics, 1990, 221(1): 113-120.
- [25] 肖长生, 刘虹, 王淑君, 等. *Pseudomonas putida* ZWL73 经龙胆酸途径分解代谢3-羟基苯甲酸[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2006, 32(3): 245-250.
- [26] Lin LX, Liu H, Zhou NY. MhbR, a LysR-type regulator involved in 3-hydroxybenzoate catabolism via gentisate in *Klebsiella pneumoniae* M5a1[J]. Microbiological Research, 2010, 165(1): 66-74.
- [27] Deveryshetty J, Suvekbala V, Varadamshetty G, et al. Metabolism of 2-, 3- and 4-hydroxybenzoates by soil isolates *Alcaligenes* sp. strain PPH and *Pseudomonas* sp. strain PPD[J]. FEMS Microbiology Letters, 2007, 268(1): 59-66.
- [28] Lee HJ, Kim JM, Lee SH, et al. Gentisate 1,2-dioxygenase, in the third naphthalene catabolic gene cluster of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, has a role in naphthalene degradation[J]. Microbiology, 2011, 157(Pt 10): 2891-2903.
- [29] Chatterjee S, Dutta TK. Complete degradation of butyl benzyl phthalate by a defined bacterial consortium: role of individual isolates in the assimilation pathway[J]. Chemosphere, 2008, 70(5): 933-941.
- [30] Tallur PN, Megadi VB, Kamanavalli CM, et al. Biodegradation of *p*-cresol by *Bacillus* sp. strain PHN 1[J]. Current Microbiology, 2006, 53(6): 529-533.
- [31] Jin S, Zhu T, Xu X, et al. Biodegradation of dibenzofuran by *Janibacter terrae* strain XJ-1[J]. Current Microbiology, 2006, 53(1): 30-36.
- [32] Romero-Silva MJ, Méndez V, Agulló L, et al. Genomic and functional analyses of the gentisate and protocatechuate

- ring-cleavage pathways and related 3-hydroxybenzoate and 4-hydroxybenzoate peripheral pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400[J]. PLoS One, 2013, 8(2): e56038.
- [33] Liu TT, Xu Y, Liu H, et al. Functional characterization of a gene cluster involved in gentisate catabolism in *Rhodococcus* sp. strain NCIMB 12038[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(2): 671-678.
- [34] Luo S, Liu DQ, Liu H, et al. Site-directed mutagenesis of gentisate 1,2-dioxygenases from *Klebsiella pneumoniae* M5a1 and *Ralstonia* sp. strain U2[J]. Microbiological Research, 2006, 161(2): 138-144.
- [35] Xu Y, Yan DZ, Zhou NY. Heterologous expression and localization of gentisate transporter Ncg12922 from *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 346(2): 555-561.
- [36] Feng J, Che Y, Milse J, et al. The gene *ncg12918* encodes a novel maleylpyruvate isomerase that needs mycothiol as cofactor and links mycothiol biosynthesis and gentisate assimilation in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Biological Chemistry, 2006, 281(16): 10778-10785.
- [37] Shen XH, Jiang CY, Huang Y, et al. Functional identification of novel genes involved in the glutathione-independent gentisate pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(7): 3442-3452.
- [38] Shen XH, Liu ZP, Liu SJ. Functional identification of the gene locus (*ncg12319*) and characterization of catechol 1,2-dioxygenase in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Biotechnology Letters, 2004, 26(7): 575-580.
- [39] Zhao KX, Huang Y, Chen X, et al. PcaO positively regulates *pcaHG* of the *beta*-ketoadipate pathway in *Corynebacterium glutamicum*[J]. Journal of Bacteriology, 2010, 192(6): 1565-1572.
- [40] Yeo CC, Wong MV, Feng Y, et al. Molecular characterization of an inducible gentisate 1,2-dioxygenase gene, *xlnE*, from *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867[J]. Gene, 2003, 312: 239-248.
- [41] Yeo CC, Tan CL, Gao X, et al. Characterization of *hbzE*-encoded gentisate 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867[J]. Research in Microbiology, 2007, 158(7): 608-616.
- [42] Gao X, Tan CL, Yeo CC, et al. Molecular and biochemical characterization of the *xlnD*-encoded 3-hydroxybenzoate 6-hydroxylase involved in the degradation of 2,5-xyleneol via the gentisate pathway in *Pseudomonas alcaligenes* NCIMB 9867[J]. Journal of Bacteriology, 2005, 187(22): 7696-7702.
- [43] Adams MA, Singh VK, Keller BO, et al. Structural and biochemical characterization of gentisate 1,2-dioxygenase from *Escherichia coli* O157:H7[J]. Molecular Microbiology, 2006, 61(6): 1469-1484.
- [44] Ishiyama D, Vujaklija D, Davies J. Novel pathway of salicylate degradation by *Streptomyces* sp. strain WA46[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(3): 1297-1306.
- [45] Fairley DJ, Wang G, Rensing C, et al. Expression of gentisate 1,2-dioxygenase (*gdoA*) genes involved in aromatic degradation in two haloarchaeal genera[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 73(3): 691-695.
- [46] Lee HJ, Kim JM, Lee SH, et al. Gentisate 1,2-dioxygenase, in the third naphthalene catabolic gene cluster of *Polaromonas naphthalenivorans* CJ2, has a role in naphthalene degradation[J]. Microbiology, 2011, 157(Pt10): 2891-2903.
- [47] Swetha VP, Phale PS. Metabolism of carbaryl via 1,2-dihydroxynaphthalene by soil isolates *Pseudomonas* sp. strains C4, C5, and C6[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(10): 5951-5956.
- [48] Liu D, Zhu T, Fan L, et al. Identification of a novel gentisate 1,2-dioxygenase from *Silicibacter pomeroyi*[J]. Biotechnology Letters, 2007, 29(10): 1529-1535.
- [49] Zhou NY, Fuenmayor SL, Williams PA. *nag* genes of *Ralstonia* (formerly *Pseudomonas*) sp. strain U2 encoding enzymes for gentisate catabolism[J]. Journal of Bacteriology, 2001, 183(2): 700-708.
- [50] Liu TT, Zhou NY. Novel L-cysteine-dependent maleylpyruvate isomerase in the gentisate pathway of *Paenibacillus* sp. strain NyZ101[J]. Journal of Bacteriology, 2012, 194(15): 3987-3994.
- [51] Bayly RC, Chapman PJ, Dagley S, et al. Purification and some properties of maleylpyruvate hydrolase and fumarylpyruvate hydrolase from *Pseudomonas alcaligenes*[J]. Journal of Bacteriology, 1980, 143(1): 70-77.
- [52] Hagedorn SR, Bradley G, Chapman PJ. Glutathione-independent isomerization of maleylpyruvate by *Bacillus megaterium* and other gram-positive bacteria[J]. Journal of Bacteriology, 1985, 163(2): 640-647.
- [53] Guroff G, Daly JW, Jerina DW, et al. Hydroxylation-induced migration: the NIH shift. Recent experiments reveal an unexpected and general result of enzymatic hydroxylation of aromatic compounds[J]. Science, 1967, 157(3796): 1524-1530.
- [54] Buswell JA, Clark JS. Oxidation of aromatic acids by a facultative thermophilic *Bacillus* sp.[J]. Journal of General Microbiology, 1976, 96(1): 209-213.
- [55] Fairley DJ, Boyd DR, Sharma ND, et al. Aerobic metabolism of 4-hydroxybenzoic acid in Archaea via an unusual pathway involving an intramolecular migration (NIH shift)[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2002, 68(12): 6246-6255.
- [56] Le Borgne S, Paniagua D, Vazquez-Duhalt R. Biodegradation of organic pollutants by halophilic bacteria and archaea[J]. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 2008, 15(2/3): 74-92.
- [57] Peng X, Misawa N, Harayama S. Isolation and characterization of thermophilic bacilli degrading cinnamic, 4-coumaric, and ferulic acids[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2003, 69(3): 1417-1427.