

微生物降解苯甲酸的研究进展

张晓云 盖忠辉 台萃* 许平

(上海交通大学 微生物代谢国家重点实验室 上海 200240)

摘要: 苯甲酸在工业中的广泛应用使其成为环境中的常见污染物,对微生物好氧降解苯甲酸的邻位途径、间位途径、龙胆酸途径和原儿茶酸途径及厌氧降解途径等进行总结,并对苯甲酸降解过程中发挥重要作用的苯甲酸双加氧酶的种类、不同组分及苯甲酸降解基因和调控基因的基因簇进行介绍,同时展望微生物降解污染物的发展方向。

关键词: 苯甲酸, 降解途径, 双加氧酶, 基因簇

Advances in benzoic acid degradation by microorganism

ZHANG Xiao-Yun GAI Zhong-Hui TAI Cui* XU Ping

(State Key Laboratory of Microbial Metabolism, Shanghai Jiao Tong University,
Shanghai 200240, China)

Abstract: Benzoic acid is becoming a common pollutant in the environment because of its widely use in industry. We summarized different pathways of the aerobic and anaerobic degradation of benzoic acid by microorganism. Both the two- and three-component benzoic acid dioxygenases play important roles in the process of benzoic acid degradation. Gene clusters of benzoic acid degradation and regulation were introduced, and also the direction of pollution degradation by microorganism in the future.

Keywords: Benzoic acid, Degradation pathway, Dioxygenase, Gene cluster

基金项目: 上海交通大学综合交叉研究与培育专项

*通讯作者: Tel: 86-21-34206647; 信箱: ctai@sjtu.edu.cn

收稿日期: 2012-03-05; 接受日期: 2012-05-03

苯甲酸为无色、无味的片状晶体, 又被称为苯酸或安息香酸, 属于芳香族的弱酸, 在 100 °C 时可以升华, 通常以游离酸、酯或其衍生物的形式存在于酸果蔓、梅干、肉桂、丁香等物质中^[1]。在一些植物的叶和茎皮中多以游离的形式存在, 在香精油中以甲酯或苜酯的形式存在。

苯甲酸难溶于水, 因此在工业中应用的多为苯甲酸的钠盐, 即苯甲酸钠。苯甲酸钠为白色结晶性的粉末, 易溶于水。苯甲酸及其钠盐通常可以用作乳胶、牙膏、果酱或其他食品的抑菌剂, 因为未解离的苯甲酸有较强的亲油性, 可以很容易地通过细胞膜的磷脂双分子层而进入到细胞内部, 从而干扰微生物细胞膜的通透性, 阻碍霉菌和细菌等对于氨基酸等物质的吸收。同时, 它还可以抑制多种微生物体内的呼吸酶系的活性, 阻止乙酰辅酶 A 缩合反应^[2], 从而起到良好的杀菌防腐作用。苯甲酸及其钠盐还可用作某些药物的助溶剂^[3-4], 因为药物中添加的苯甲酸钠可以增加药物的溶解度, 使得机体对药物的吸收量增多。另外还可用作染色和印色的媒染剂。

正是由于苯甲酸及苯甲酸钠在化工、食品及染料工业中的广泛应用, 导致苯甲酸及苯甲酸钠成为常见的环境污染物, 在工业废水中大量存在。有研究证明, 苯甲酸是扁桃酸、甲苯等很多种芳香族化合物生物降解的中间产物^[5-6], 同时还是苯的厌氧降解的中间产物^[6-7]。许多不同结构的芳香化合物可通过一系列反应被转化为苯甲酸或是苯甲酰-辅酶 A (CoA), 并以此作为厌氧降解过程的中间体^[8-9], 如苯甲基脂肪酸、甲苯、酚等。

因此开展苯甲酸的微生物降解途径及机理的研究, 对于阐明很多环境污染物的降解, 治理环境污染将起到很重要的指导作用。

1 苯甲酸的代谢途径

目前对苯甲酸的研究包括降解苯甲酸类化合

物的微生物筛选和对这些化合物不同代谢途径的研究以及对一些基因的改造。在自然界中, 能够降解苯甲酸类化合物的微生物有很多种, 对苯甲酸类化合物的代谢也存在几种不同的途径, 根据降解过程中对氧的需求及最终电子受体的不同, 可以将苯甲酸类化合物的降解分为好氧降解和厌氧降解。其中好氧降解是微生物利用加氧酶的催化使芳香环羟基化开始降解过程, 此过程以分子氧为其最终的电子受体; 而厌氧降解则是先发生还原反应消除芳香环的共轭, 进而使其还原降解, 此过程以硝酸盐、铁或 CO₂ 为最终的电子受体。

1.1 好氧降解

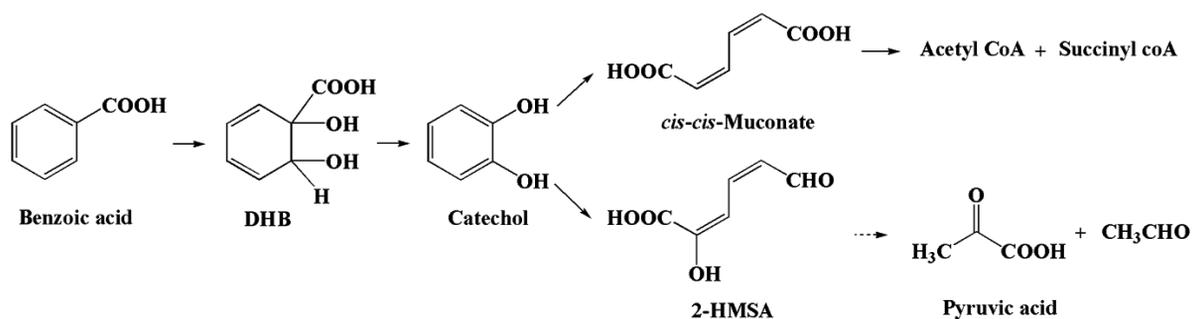
在已经分离到的微生物中发现苯甲酸类化合物的好氧降解途径主要有以下几种: 邻位途径、间位途径、龙胆酸途径和原儿茶酸途径。

1.1.1 邻位途径(The *ortho* cleavage pathway):

苯甲酸类化合物邻位降解途径的第一步都是在双加氧酶的作用下, 在分子氧的参与下, 使这类化合物发生双羟基化反应生成中间产物 DHB (2-Hydro-1,2-dihydroxybenzoate), 然后在 DHB 脱氢酶的作用下再进一步生成邻苯二酚^[10-11], 又称儿茶酚, 这也是很多芳香族化合物的代谢中间产物。儿茶酚的进一步降解也是经邻位裂解途径^[12], 即儿茶酚在儿茶酚 1,2-双加氧酶的作用下内开环生成粘康酸^[13], 进而经过一系列的反应代谢为乙酰辅酶 A 和琥珀酰辅酶 A, 进入三羧酸循环^[14], 如图 1 所示。

1.1.2 间位途径(The *meta* cleavage pathway):

在苯甲酸的间位代谢途径中, 其前两步反应同邻位途径是相同的, 即将苯甲酸氧化成儿茶酚。不同的是在间位途径中, 儿茶酚在儿茶酚 2,3-双加氧酶的作用下外开环生成 2-羟基粘康酸半醛^[13], 然后经过一系列反应代谢为丙酮酸和乙醛, 乙醛也可以进一步形成乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环^[14], 如图 1 所示。

图 1 苯甲酸的邻位和间位代谢途径^[10,13-14]Fig. 1 The *ortho* and *meta* cleavage pathway of benzoic acid metabolism^[10,13-14]

以上这两条途径并不是严格区分的,有研究发现,在 *Pseudomonas putida* P8 对苯甲酸钠降解的过程中,在底物苯甲酸钠的初始浓度为 200 mg/L 时, *Pseudomonas putida* P8 对苯甲酸盐的降解是通过邻位裂解途径进行的。然而,当菌体在苯甲酸盐浓度较高(≥ 300 mg/L)的环境中生长时,通过动力学观察发现, *Pseudomonas putida* P8 会同时进行邻位和间位裂解途径^[15],最多可以降解 200 mg/L 的苯甲酸盐。在这种情况下,就需要从分子水平来进一步阐明具体的代谢途径,比较简单的方法就是分析分解酶。研究者使用 MALDI-TOF MS 对 *Pseudomonas putida* P8 在高底物浓度时苯甲酸降解途径中的主要分解酶进行了鉴定,结果很明显地说明在苯甲酸盐浓度较高时,邻位和间位裂解途径是同时发生的^[14]。

而在运用 2-DE 电泳进行代谢途径分析的研究中发现电泳结果显示的邻位和间位裂解途径并不完整,分析其原因是这两条途径中一些酶由于 Mr/pI 值很相近或者是由于电渗作用的影响使得他们不能在凝胶中很好的溶解,从而对代谢途径完整性的判断^[16-17]。

1.1.3 龙胆酸途径: 苯甲酸降解的龙胆酸途径是由 Altenschmidt 等在 *Pseudomonas* strain KB 740 中首先发现的^[18]。在这一途径中,苯甲酸首先由苯甲酰辅酶 A 连接酶作用生成苯甲酰辅酶 A^[19],然后在单加氧酶的作用下间位单加氧形成 3-羟基苯

甲酰辅酶 A,而后又在 3-羟基苯甲酰辅酶 A-6-单加氧酶作用下生成龙胆酸,进而通过一系列的反应最后生成反丁烯二酸和丙酮酸^[18,20],如图 2 所示。

通过分析酶学数据发现,在这一过程当中,利用苯甲酸和 3-羟基苯甲酸的酶是依次按顺序诱导的,而 3-羟基苯甲酸和龙胆酸降解酶是同时被诱导的。

1.1.4 原儿茶酸途径: 现在已知的原儿茶酸途径有两条,如图 3 所示,研究者在 *Aspergillus niger* ATCC 1015 代谢苯甲酸的过程中发现,苯甲酸代谢的第一步是一个新型的加氧过程,苯甲酸在苯甲酸 4-羟化酶的作用下在对位加氧生成 4-羟基苯甲酸,又经 4-羟基苯甲酸 3-羟基化酶的作用生成原儿茶酸^[21]。原儿茶酸开环裂解生成 3-酮脂脂肪酸烯醇内酯,之后的代谢同儿茶酚途径相同,最后生成琥珀酸和乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环。

而另一种代谢方式则是,苯甲酸在 3-羟化酶的作用下先在间位单加氧生成 3-羟基苯甲酸,之后又经 3-羟基苯甲酸 4-羟化酶的作用同样生成原儿茶酸。原儿茶酸又进一步加氧、开环生成马来酰丙酮酸,后者异构为富马酰丙酮酸进入后续反应中^[22]。

除此之外,某些微生物体内还存在多条代谢途径,如在 *Burkholderia xenovorans* LB400 中,通过转录组和蛋白组学的分析发现, LB400 体内同时存在苯甲酸代谢的邻位途径和两条不同的

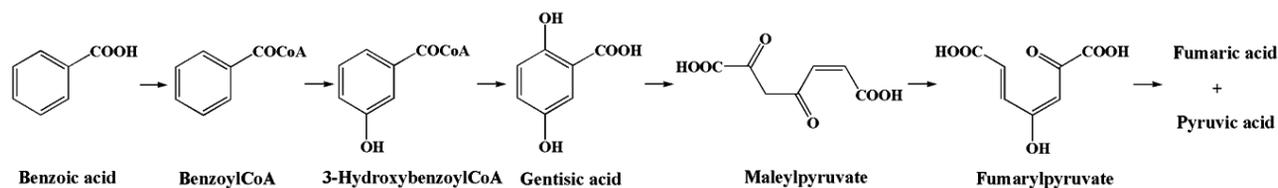


图 2 苯甲酸的龙胆酸代谢途径^[18,20]
 Fig. 2 The gentisic acid pathway of benzoic acid metabolism^[18,20]

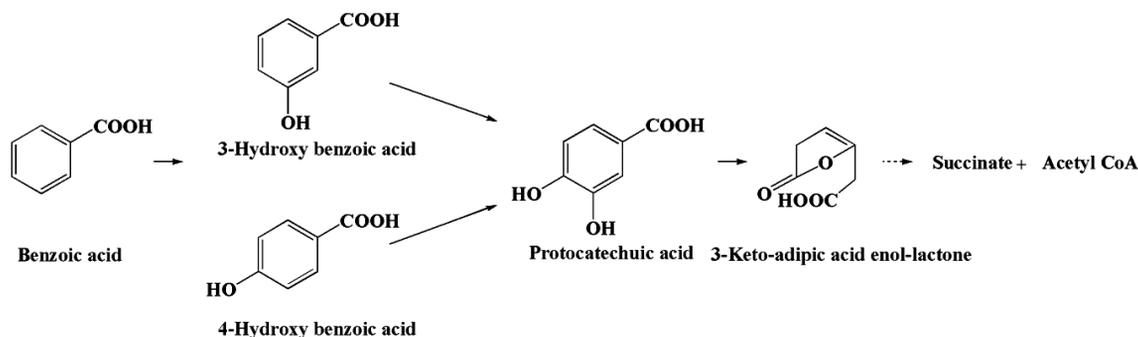


图 3 苯甲酸的原儿茶酸代谢途径^[21-22]
 Fig. 3 The protocatechuic acid pathway of benzoic acid metabolism^[21-22]

苯甲酸-CoA 途径。通过构建突变株并进行休止细胞反应也验证了这几条途径的存在^[19,23]。

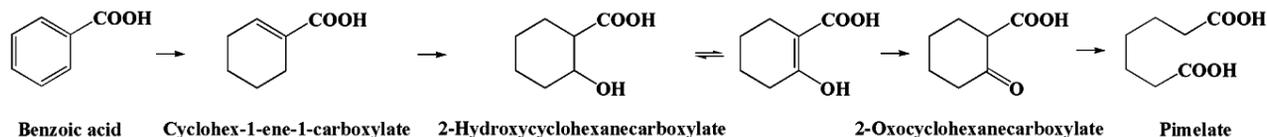
1.2 厌氧降解

除好氧降解外, 很多细菌都具有苯甲酸的厌氧降解能力, 主要包括一些光合细菌、反硝化细菌和硫铁还原细菌等, 其中比较典型的是紫色非硫光合细菌(*Rhodospseudomonas palustris*)和反硝化细菌(*Thauera aromatica*)。在这些细菌中, 主要经以下几个步骤对苯甲酸进行降解^[24]: (1) 苯甲酸在苯甲酸辅酶A连接酶的作用下形成辅酶A硫酯; (2) 苯环的还原; (3) 苯环上羟基基团的引入; (4) 苯环的开裂。

Proctor 等在研究中发现, *Rhodospseudomonas* sp. 在苯甲酸存在时可利用光合作用生长, 而在黑暗条件下, 可以经原儿茶酸、儿茶酚和 α -氧酸进行苯甲酸的有氧氧化。他们推测分子氧可以取代一种光合作用生成的氧化物参与苯甲酸的光降解^[25]。

Dutton 等通过同位素稀释实验证明了 *R. palustris* 中的苯甲酸光降解途径^[25], 这是一种全新的芳香环代谢方式, 即芳香环首先被还原生成一种环状脂肪酸, 环裂解和后续的代谢是按照类似于脂肪酸 β -氧化的顺序完成的。苯甲酸被还原为环己-1-烯-1-羧酸(I), 经水合作用产生 2-羟基环己烷羧酸(II), 后者脱氢生成 2-环己酮甲酸(III)然后经水合作用使环裂解生成庚二酸盐(IV), 如图 4 所示。

而在 *Thauera aromatica* 中, 苯甲酰辅酶A途径包括 ATP 驱动的苯环上 2 个电子的还原, 这一反应以铁氧还原蛋白为电子供体, 由苯甲酰辅酶A 还原酶催化生成环己-1,5-二烯-1-羧基辅酶A, 随后在双烯酰辅酶A 还原酶的作用下水合生成 6-羟基环己酰-1-烯-1-羧基辅酶A, 接下来经过至少两步反应生成 3-Hydroxypimelyl-CoA, 分别是羟基基团的氧化和活性辅酶A β -酮酸碳环的裂解, 最后生成乙酰辅酶A 和 CO_2 ^[24]。

图4 苯甲酸的厌氧代谢途径^[24-25]Fig. 4 The anaerobic pathway of benzoic acid metabolism^[24-25]

2 苯甲酸代谢过程中的关键酶——双加氧酶

在苯甲酸的各种不同的代谢途径中, 比较常见也比较重要的酶是苯甲酸 1,2-双加氧酶。已经有很多不同的苯甲酸 1,2-双加氧酶基因被克隆出来, 主要有两组分和三组分两种。其中两组分的苯甲酸 1,2-双加氧酶是由还原酶和氧化酶组成的, 这是一种典型的 Rieske 双加氧酶, 而三组分的苯甲酸 1,2-双加氧酶则是由还原酶、铁氧还蛋白和末端氧化酶组成^[11]。

2.1 末端氧化酶

末端氧化酶是双加氧酶的催化组分, 它是一种非血红素氧化酶, 需要还原性的分子氧、辅因子(Fe^{2+})等来参与完成芳香族底物的羟基化。除了底物结合位点外, 该酶还含有一个 Rieske 型的 $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ 簇。

末端氧化酶是分子量为 150–200 kD 大的寡聚蛋白, 是由 α 、 β 两种亚基组成的, 分子量大小分别为 50 kD 和 20 kD。苯甲酸双加氧酶的末端氧化酶是一种 $\alpha_3\beta_3$ 结构的蛋白, 每一个 α 亚基都含有一个 $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ 簇和一个单核铁离子位点, 而 β 亚基则不含有铁和硫, 但每个末端氧化酶组分都含有一个铁原子。光谱学研究发现底物的结合和氧气的活化都发生在单核铁离子中心^[26-27]。除了 N 末端的 Rieske 序列外, 末端氧化酶的基因序列的中间分别含有两个保守的组氨酸和酪氨酸序列^[11], 这可能是铁离子中心的结合域。

2.2 铁氧还蛋白还原酶

在两组分的双加氧酶中, 铁氧还蛋白还原酶 (Ferredoxin reductase) 中黄素和铁硫簇结合在同一个蛋白上。而在三组分的双加氧酶中, 电子传递链由黄素蛋白和一个单独的铁硫蛋白即铁氧还蛋白组成。黄素蛋白由一个单独的多肽组成, 其分子量大小为 42–67 kD, 它扮演着一种氧化还原酶的角色, 主要负责 NADH 的两个电子的传递^[28]。而铁硫黄素蛋白可以将电子直接从 NADH 传递到电子受体, 这种蛋白的分子量大小为 34–38 kD, 一般都含有一个 $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ 簇, 氧化型蛋白在 340–460 nm 有最大吸收峰, 还原型蛋白的顺磁共振波谱显示出植物型 $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ 簇的典型特点^[29]。

Karlsson 等已对 *Acinetobacter* sp. strain ADP1 中的苯甲酸 1,2-双加氧酶的还原酶组分 BenC 进行了结晶, 经过分析晶体结构发现, BenC 含有 3 个结构域, 分别结合辅因子铁-硫簇、FAD 和 NADH, 如图 5 所示。这一 $[2\text{Fe}-2\text{S}]$ 簇结构域同植物铁氧还蛋白中的结构域相似, 而 FAD 和 NADH 结构域则同铁氧还蛋白-NADH 还原酶超家族的成员很相似。BenC 是 I B Rieske 双加氧酶中第一个被确定结构的还原酶, 它的结构显示, 与邻苯二甲酸双加氧酶还原酶及其他有这 3 种结构域的酶系统相比, BenC 中铁氧还蛋白结构域的存在位置同其他结构域有明显不同, BenC 中铁氧还蛋白结构域同黄素和 NAD(P)H 结构域是相互作用的, 其铁硫中心同黄素之间只有 9 Å, 从而保证了电子的快速传递^[30]。

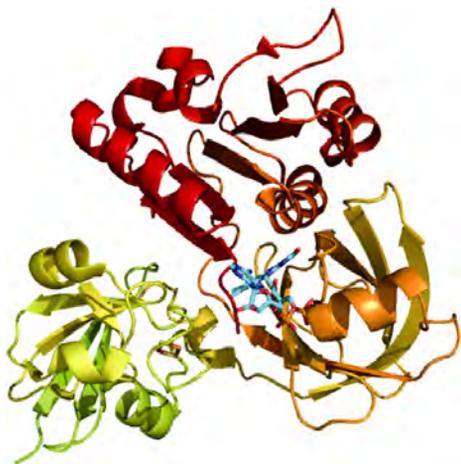


图5 BenC的晶体结构(PDB号1KRH)^[30]

Fig. 5 Crystal structure of protein BenC (PDB code 1KRH)^[30]

2.3 铁氧还蛋白

苯甲酸双加氧酶利用一种叶绿体型的铁氧还蛋白来进行电子传递, 其末端同叶绿体型的铁氧还蛋白有很高的同源性, 都含有4个半胱氨酸残基使铁氧还蛋白中的[2Fe-2S]中心进行配位。不同的双加氧酶的铁氧还蛋白是很相似的, 有研究显示, 萘双加氧酶、甲苯双加氧酶和苯甲酸双加氧酶的NADH-铁氧还蛋白还原酶都含有一个[2Fe-2S]叶绿体型的铁氧还蛋白, 这种叶绿体型铁氧还蛋白和Rieske型的铁氧还蛋白协同作用^[11]。但不同双加氧酶的铁氧还蛋白对于双加氧酶来说是有特异性的, 这种特异性反应在蛋白的初级结构上^[31]。

3 苯甲酸双加氧酶的基因簇及其调控

3.1 苯甲酸双加氧酶的基因簇

研究者已经从很多微生物中找到了苯甲酸的降解基因, 位于 *Acinetobacter* sp. strain ADP1 (即 *Acinetobacter calcoaceticus*) 染色体上的 *benABC* 基因负责编码苯甲酸 1,2-双加氧酶, 但它编码的苯甲酸 1,2-双加氧酶存在底物特异性, 对大部分取代苯甲酸都没有降解作用^[32]。位于 *Pseudomonas putida* mt-2 中 TOL 质粒 pWW0 上

的 *xylXYZ* 基因所编码的甲苯 1,2-双加氧酶, 不仅可以催化苯甲酸的羟基化反应, 更能催化 3-、4-位取代苯甲酸的羟基化^[33]。

Hadded 等在 *Rhodococcus* sp. strain 19070 中发现的 *bopXYZ* 基因簇也编码一种广底物谱的苯甲酸双加氧酶, 将 *BopXY* 末端氧化酶在 *E. coli* 中表达可以使 *E. coli* 将苯甲酸或二氨基苯甲酸转化为非芳香族的 *cis*-二醇或儿茶酚。*BopXYZ* 同上面提到的染色体编码的苯甲酸 1,2-双加氧酶和 TOL 质粒 pWW0 编码的甲苯双加氧酶具有同源性。在 *bopXYZ* 开放阅读框的下游是 *bopL* 基因和 *bopK* 基因, 它们分别编码 *cis*-二醇脱氢酶和苯甲酸运输装置。*bop* 基因簇的排列顺序同 *P. putida* PRS2000 中的 *ben* 基因簇的排列顺序是相同的^[34], 如图6所示。

同样是 *Rhodococcus* sp., Kitagawa 等在 PCB 降解菌 *Rhodococcus* sp. strain RHA1 中克隆到了苯甲酸代谢基因簇 *benABCDK*, 它也位于染色体上但是他的结构同 ADP1 中的基因簇是不同的。将此基因簇在 *E. coli* 中表达可以使 *E. coli* 将苯甲酸转化为儿茶酚, 同时还可以转化 3-氯苯甲酸, 但却不能转化 2-或 4-氯苯甲酸^[35]。

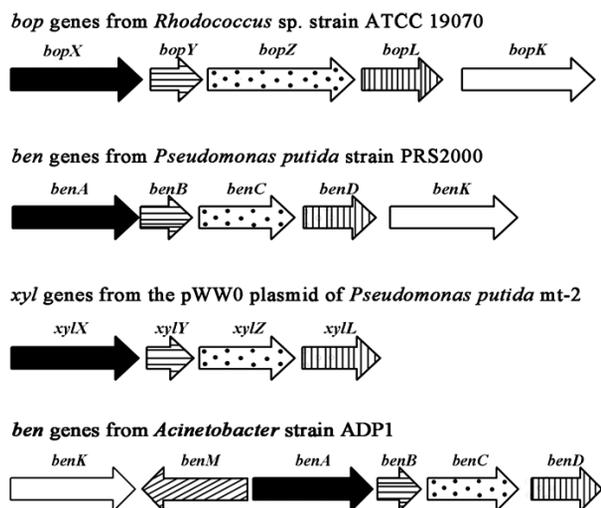


图6 *bop*、*ben* 和 *xyl* 基因簇^[34]

Fig. 6 Organization of the *bop*, *ben*, *xyl* genes^[34]

3.2 苯甲酸双加氧酶的调控基因

目前已经报道的苯甲酸代谢的调控基因有很多个, *Acinetobacter* sp. strain ADP1 中的 *benM* 基因, 它可以编码一种新型的转录激活因子, 这种蛋白同儿茶酚降解基因 *cat* 的 LysR 型转录激活因子有同源性。苯甲酸和 *cis,cis*-粘康酸都可以提高依赖于 BenM 的 *benABCDE* 操纵子的表达。*benM* 基因位于 *benA* 基因上, 是一段 912 bp 的序列且单独转录, 在两个翻译区域的中间有 BenM 的 DNA 结合位点。*benA::lacZ* 的诱导性表达式依赖于 *benM* 基因的, 说明 BenM 是 *benABCDE* 的转录激活因子, 它对于 *benABCDE* 基因的表达来说是必需的, 在苯甲酸向儿茶酚的转化中不可或缺, 如果缺失 *benM* 基因, 则微生物对芳香族化合物的降解效率就会改变^[36]。

在 *Pseudomonas* 中, 这种代谢基因转录控制是由 TOL 质粒 pWW0 编码的 XylS 调节子来调节的。不同于 BenM 的是, XylS 是一种 AraC 型的转录激活因子, 它可以调控 *xylXYZ* 基因的表达, 而 *xylXYZ* 基因可以编码宽底物特异性的 BenABCD 酶^[37]。

Pseudomonas putida 中的 *benR* 也可以编码一种类似于 XylS 的染色体 *ben* 基因的转录调节子^[38]。*benR-xylS* 基因无杂交及 BenR-和 XylS-调控的不同也说明, BenR 可能并不是 XylS 的同系物而是 BenM 的同系物^[36]。

4 苯甲酸降解的研究展望

虽然苯甲酸的微生物降解已有很多研究成果, 但是大部分都是从分子生物学水平对微生物的基因及基因簇进行了研究, 而从酶学的角度来研究蛋白各种性质的工作还较少, 但这一部分工作却是非常重要的, 因此在以后的研究工作当中, 可以多尝试对这些蛋白进行酶学性质的研究, 从而了解这些蛋白降解底物的作用机制和

作用特点, 丰富已有的微生物降解苯甲酸的研究领域。

另外, 对于降解基因簇中调控相关基因的研究也应该成为日后的一个重点, 只有了解这些调控基因的作用机制, 才能更好地利用它们来指导降解基因的表达并发挥作用。

除此以外, 微生物降解环境污染物在实际应用中还存在困难。首先, 污染物在环境中并不是集中存在的, 其分布之广使微生物降解环境污染物受到很大限制。其次, 环境中可能同时存在各种不同的污染物, 将单一污染物降解菌投放到环境中后, 环境中其他污染物及环境因子可能会影响这种降解菌的生长及降解速度和效率等, 使其不能发挥预期的降解作用。另外, 污染物本身对微生物的抑制作用使得污染地的生态环境已经有所变化, 再将外源微生物投放到环境中之后, 这些外源微生物可能会对投放地的生态环境造成一定的影响, 如可能打破投放地原有生态系统的平衡。

因此微生物降解环境污染物的后续研究工作的开展应当向实际应用方面靠拢, 使微生物降解环境污染物的研究对实际的污染治理奠定理论基础并发挥一定的指导作用。不管怎样, 随着基因工程和分子生物学技术的发展, 应用这些先进技术来优化微生物对污染物的降解已经成为一种趋势, 利用微生物进行环境污染物降解也必将在环境治理中发挥出重要作用。

参考文献

- [1] 曾正渝. 苯甲酸及其钠盐在食品和药品中的应用[J]. 中国药业, 2007, 16(6): 64.
- [2] Evans WC, Fuchs G. Anaerobic degradation of aromatic compounds[J]. Annual Review of Microbiology, 1988, 42: 289-317.
- [3] 陈德梅, 付秀娟. 苯甲酸钠对阿莫西林的助溶作

- 用[J]. 广东药学院学报, 2004, 20(6): 646.
- [4] 盛国荣. 苯甲酸钠对呋喃西林的助溶作用[J]. 中国医院药学杂志, 1996, 17(6): 264.
- [5] Harwood CS, Parales RE. The β -ketoacid pathway and the biology of self-identity[J]. Annual Review of Microbiology, 1996, 50: 553–590.
- [6] Wackett LP. *Pseudomonas putida*-a versatile biocatalyst[J]. Nature Biotechnology, 2003, 21(2): 136–138.
- [7] Caldwell ME, Suflita JM. Detection of phenol and benzoate as intermediates of anaerobic benzene biodegradation under different terminal electron-accepting conditions[J]. Environmental Science and Technology, 2000, 34(7): 1216–1220.
- [8] Gibson KJ, Gibson J. Potential early intermediates in anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1992, 58(2): 696–698.
- [9] Koch J, Eisenreich W, Bacher A, et al. Products of enzymatic reduction of benzoyl-CoA, a key reaction in anaerobic metabolism[J]. European Journal of Biochemistry, 1993, 211(3): 649–661.
- [10] Ampe F, Lindley ND. Flux limitations in the *ortho* pathway of benzoate degradation of *Alcaligenes eutrophus*: metabolite overflow and induction of the meta pathway at high substrate concentrations[J]. Microbiology, 1996, 142(7): 1807–1817.
- [11] Neidle EL, Hartnett C, Ornston LN, et al. Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus benABC* genes for benzoate 1, 2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases[J]. Journal of Bacteriology, 1991, 173(17): 5385–5395.
- [12] Williams PA, Sayers JR. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas*[J]. Biodegradation, 1994, 5(3/4): 195–217.
- [13] Reiner AM, Hegeman GD. Metabolism of benzoic acid by bacteria. Accumulation of (-)-3, 5-cyclohexadiene-1, 2-diol-1-carboxylic acid by a mutant strain of *Alcaligenes eutrophus*[J]. Biochemistry, 1971, 10(13): 2530–2536.
- [14] Cao B, Geng A, Loh KC. Induction of *ortho*- and *meta*-cleavage pathways in *Pseudomonas* in biodegradation of high benzoate concentration: MS identification of catabolic enzymes[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2008, 81(1): 99–107.
- [15] Loh KC, Chua SS. *Ortho* pathway of benzoate degradation in *Pseudomonas putida*: induction of meta pathway at high substrate concentrations[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(5): 620–626.
- [16] Kim YH, Cho K, Yun SH, et al. Analysis of aromatic catabolic pathways in *Pseudomonas putida* KT2440 using a combined proteomic approach: 2-DE/MS and cleavable isotope-coded affinity tag analysis[J]. Proteomics, 2006, 6(4): 1301–1318.
- [17] Krishnan S, Prabhu Y, Phale PS. *o*-Phthalic acid, a dead-end product in one of the two pathways of phenanthrene degradation in *Pseudomonas* sp. strain PP2[J]. Indian Journal of Biochemistry Biophysics, 2004, 41: 227–232.
- [18] Altenschmidt U, Oswald B, Steiner E, et al. New aerobic benzoate oxidation pathway via benzoyl-coenzyme A and 3-hydroxybenzoyl-coenzyme A in a denitrifying *Pseudomonas* sp.[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(15): 4851–4858.
- [19] Deneff VJ, Park J, Tsoi TV, et al. Biphenyl and benzoate metabolism in a genomic context: outlining genome-wide metabolic networks in *Burkholderia xenovorans* LB400[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(8): 4961–4970.
- [20] Niemetz R, Altenschmidt U, Brucker S, et al. Benzoyl-coenzyme-A 3-monooxygenase, a flavin-dependent hydroxylase. Purification, some properties and its role in aerobic benzoate oxidation via gentisate in a denitrifying bacterium[J]. European Journal of Biochemistry, 1995, 227(1/2): 161–168.
- [21] Boschloo JG, Pafen A, Koot T, et al. Genetic analysis of benzoate metabolism in *Aspergillus niger*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1990, 34(2): 225–228.

- [22] Fu W, Oriol P. Degradation of 3-phenylpropionic acid by *Haloferax* sp. D1227[J]. *Extremophiles*, 1999, 3(1): 45–53.
- [23] Denev VJ, Klappenbach JA, Patrauchan MA, et al. Genetic and genomic insights into the role of benzoate-catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(1): 585–595.
- [24] Breese K, Boll M, Alt-Mörbe J, et al. Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatica*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 256(1): 148–154.
- [25] Dutton PL, Evans WC. The metabolism of aromatic compounds by *Rhodopseudomonas palustris*. A new, reductive, method of aromatic ring metabolism[J]. *Biochemical Journal*, 1969, 113(3): 525–536.
- [26] Yamaguchi M, Fujisawa H. Subunit structure of oxygenase component in benzoate 1,2-dioxygenase system from *Pseudomonas arvilla* C-1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1982, 257(21): 12497–12502.
- [27] Wolfe MD, Altier DJ, Stubna A, et al. Benzoate 1, 2-dioxygenase from *Pseudomonas putida*: single turnover kinetics and regulation of a two-component Rieske dioxygenase[J]. *Biochemistry*, 2002, 41(30): 9611–9626.
- [28] Yamaguchi M, Fujisawa H. Characterization of NADH-Cytochrome *c* Reductase, a component of Benzoate 1,2-Dioxygenase system from *Pseudomonas arvilla* C-1[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1978, 253(24): 8848–8853.
- [29] Batie CJ, LaHaie E, Ballou DP. Purification and characterization of phthalate oxygenase and phthalate oxygenase reductase from *Pseudomonas cepacia*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(4): 1510–1518.
- [30] Karlsson A, Beharry ZM, Eby DM, et al. X-ray crystal structure of benzoate 1, 2-dioxygenase reductase from *Acinetobacter* sp. strain ADP1[J]. *Journal of Molecular Biology*, 2002, 318(2): 261–272.
- [31] Mason JR, Cammack R. The electron-transport proteins of hydroxylating bacterial dioxygenases[J]. *Annual Review of Microbiology*, 1992, 46: 277–305.
- [32] Neidle EL, Shapiro MK, Ornston LN. Cloning and expression in *Escherichia coli* of *Acinetobacter calcoaceticus* genes for benzoate degradation[J]. *Journal of Bacteriology*, 1987, 169(12): 5496–5503.
- [33] Zeyer J, Lehrbach PR, Timmis KN. Use of cloned genes of *Pseudomonas* TOL plasmid to effect biotransformation of benzoates to *cis*-dihydrodiols and catechols by *Escherichia coli* cells[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1985, 50(6): 1409–1413.
- [34] Haddad S, Eby DM, Neidle EL. Cloning and expression of the Benzoate Dioxygenase genes from *Rhodococcus* sp. strain 19070[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2001, 67(6): 2507–2514.
- [35] Kitagawa W, Miyauchi K, Masai E, et al. Cloning and characterization of benzoate catabolic genes in the gram-positive polychlorinated biphenyl degrader *Rhodococcus* sp. Strain RHA1[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(22): 6598–6606.
- [36] Collier LS, Gaines III GL, Neidle EL. Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. Strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator[J]. *Journal of Bacteriology*, 1998, 180(9): 2493–2501.
- [37] Harayama S, Rekik M, Bairoch A, et al. Potential DNA slippage structures acquired during evolutionary divergence of *Acinetobacter calcoaceticus* chromosomal *benABC* and *Pseudomonas putida* TOL pWWO plasmid *xyXYZ*, genes encoding benzoate dioxygenases[J]. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173(23): 7540–7548.
- [38] Jeffrey WH, Cuskey SM, Chapman PJ. Characterization of *Pseudomonas putida* mutants unable to catabolize benzoate: cloning and characterization of *Pseudomonas* genes involved in benzoate catabolism and isolation of a chromosomal DNA fragment able to substitute for *xyIS* in activation of the TOL lower-pathway promoter[J]. *Journal of Bacteriology*, 1992, 174(15): 4986–4996.