



专论与综述

邻苯二酚 1,2-双加氧酶的结构、功能及同工酶现象研究进展

赵化冰^{*1,2} 覃琨² 谭之磊¹ 李华英² 李德金² 郭锦² 刘芳¹

1 天津科技大学生物工程学院 天津 300457

2 中国人民武装警察部队后勤学院 天津市职业与环境危害防制重点实验室 天津 300309

摘要: 邻苯二酚是芳香族化合物多条生物降解途径中共有的一种重要的中间产物, 根据开环方式的不同, 可分为邻位降解途径和间位降解途径, 其中邻位降解途径中的关键酶是邻苯二酚 1,2-双加氧酶。本文主要综述了邻苯二酚 1,2-双加氧酶的结构、酶学性质, 以及它在芳香烃降解菌中存在的同工酶现象及其功能研究进展。

关键词: 邻苯二酚 1,2-双加氧酶, 结构, 酶学性质, 同工酶

Advances in study on structure, enzymatic property and isoenzymes of catechol 1,2-dioxygenases

ZHAO Hua-Bing^{*1,2} QIN Kun² TAN Zhi-Lei¹ LI Hua-Ying² LI De-Jin² GUO Jin²
LIU Fang¹

1 College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

2 Tianjin Key Laboratory for Prevention and Control of Occupational and Environmental Hazard, Logistic University of Chinese People's Armed Police Force, Tianjin 300309, China

Abstract: Catechol is one of the most important intermediate products in the various pathways in degrading polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). The ring cleavage can occur in two different orientations relative to the vicinal diols, and this difference in cleavage site is typically used to classify the catechol dioxygenases into two groups, the intradiol- and extradiol-cleaving enzymes. The essential process of intradiol pathway is the intradiol ring-cleavage catalyzed by catechol 1,2-dioxygenases. This paper summarized the research advances in these fields with the focus on the structure, enzymatic property and isoenzymes of the catechol 1,2-dioxygenases.

Keywords: Catechol 1,2-dioxygenase, Structure, Enzymatic property, Isoenzymes

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (21477163); Key Projects of Tianjin Applied Basic and Frontier Technology Research Program (14JCZDJC40400)

***Corresponding author:** E-mail: 13820664530@163.com

Received: 29-09-2018; **Accepted:** 26-02-2019; **Published online:** 21-03-2019

基金项目: 国家自然科学基金(21477163); 天津市应用基础与前沿技术研究计划重点项目(14JCZDJC40400)

***通信作者:** E-mail: 13820664530@163.com

收稿日期: 2018-09-29; **接受日期:** 2019-02-26; **网络首发日期:** 2019-03-21

多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)是一类含有两个及两个以上苯环的化合物,是工业生产中一种重要的工业原料及产品,由于在环境中难以自然降解而长期存留,具有潜在的“三致效应”,一直受到研究者密切关注^[1]。

微生物降解是多环芳烃降解的主要途径,目前关于微生物降解多环芳烃的相关酶类多有报道。邻苯二酚(又名儿茶酚)是芳香族化合物降解过程中一种重要的中间产物,邻苯二酚双加氧酶是一类含铁的氧化酶,是降解邻苯二酚的关键酶,它能够断裂邻苯二酚的苯环结构并在断裂的碳原子两端加上一个氧原子,使得多环芳烃类化合物转化为长碳链并最终进入三羧酸循环而降解为二氧化碳和水^[2]。这一类能够使苯环结构开环的酶类在芳香族化合物降解的过程中发挥了重要作用,在多种细菌尤其是土壤菌株中广泛存在^[3]。

邻苯二酚双加氧酶根据开环位置的不同,可以分为邻苯二酚 1,2-双加氧酶(Catechol 1,2-dioxygenases, C12O)和邻苯二酚 2,3-双加氧酶(Catechol 2,3-dioxygenases, C23O)^[4], C12O 催化邻苯二酚内开环生成顺,顺-粘康酸(*Cis,cis*-Muconic acid),是邻位裂解途径(图 1)中的关键酶,而邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化邻苯二酚外开环生成粘康酸半醛(2-Hydroxymuconic semialdehyde),是间位裂解途径中的关键酶,这两条降解途径是多环芳烃降解过程中最重要的分支。

1 C12O 的基本特点及分类

邻苯二酚在 C12O 的作用下,通过邻位裂解途径打开苯环,这一途径又叫 β -酮己二酸途径。C12O 是 β -酮己二酸途径中的关键酶,属于内二元醇双加氧酶家族。邻苯二酚通过 C12O 催化生成产物顺,顺-粘康酸,在下游粘康酸环异构酶 I、异构酶 I、水解酶的作用下继续分解,其代谢最终生成琥珀酸盐和乙酰辅酶 A,将有毒性的芳香族化合物通过细菌代谢为可进入三羧酸循环的化合物^[5]。C12O 催化得到的中间产物顺,顺-粘康酸也是合成新型树脂材料、药物、农药的重要原料。

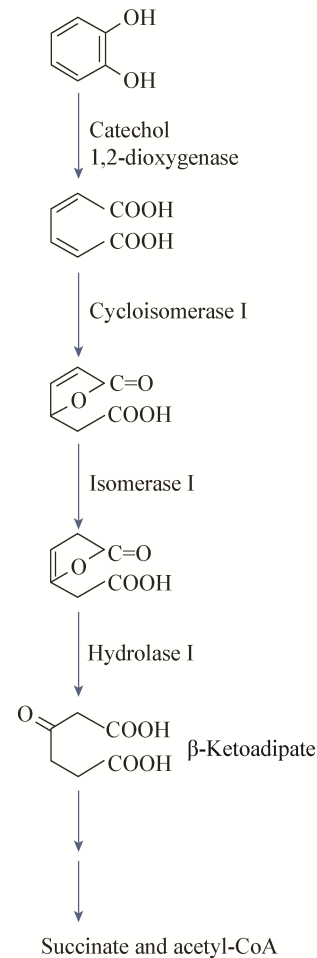


图 1 邻苯二酚的邻位降解通路

Figure 1 The intradiol-cleaving of catechol

根据底物特异性的不同,目前 C12O 可分为三类,第一类 C12O 对氯儿茶酚有很好的催化作用,在氯代芳香族化合物的降解途径中起到了重大作用;第二类 C12O 对儿茶酚、4-甲基儿茶酚具有相对高的活性;第三类 C12O 对 3-甲基儿茶酚、4-甲基儿茶酚具有较高的活性,这类酶在革兰氏阳性菌中分布最为广泛^[6]。

2 C12O 的结构特点

邻苯二酚 1,2-双加氧酶、原儿茶酸 3,4-双加氧酶(Protocatechuate 3,4-dioxygenase, 3,4-PCD)、偏苯三酚 1,2-双加氧酶(Hydroxyquinol 1,2-dioxygenase, 1,2-HQD)是 3 种能够只用非血红素铁作为辅因子催化邻位裂解途径的氧化酶类,属于非血红素铁加氧

酶大家族, 在结构上具有相似性^[7]。1988 年第一次对 3,4-PCD 的晶体衍射发现, 非血红色铁作为辅因子被 2 个组氨酸残基和 2 个酪氨酸残基所固定, 与一个水分子或羟基基团构成 3,4-PCD 的活性中心^[8], 之后通过对 *Acinetobacter* sp. ADP1 和 *Pseudomonas arvilla* C-1 中的 C12O 进行了晶体衍射, 对 C12O 的结构也有了一定的了解^[9]。

通过 X 射线衍射结构发现, 酶和底物的结合域位于 Leu73、Pro76、Ile105、Pro108、Leu109、Arg221、Phe253、Ala254 所构成的袋状结构, 其中 Ile105、Pro108、Arg221 和 Phe253 在 C12O 家族中高度保守^[10], C12O 与 3,4-PCD 的结构相似, 大多是由两个相同亚单位形成的二聚体, 每个亚单位的分子量大多在 30–34 kD, 每个亚单位包括一个三价的铁离子, 这个铁离子被两个组氨酸、两个酪氨酸和一个羟基基团固定, 共同形成一个三角双锥型结构并构成了 C12O 催化的活性中心, 与 3,4-PCD 不同的是, 每个 C12O 均包含两分子的磷脂, 同时在两个亚单位的连接部分, C12O 形成一个特殊的螺旋拉链式结构域^[11]。扫描 C12O 和底物结合的结构发现, 原本约束铁离子的酪氨酸和羟基不再与铁离子相连, 形成一个铁离子在中心的八面体空间构象, 使得底物能够与铁离子结合形成复合体^[12](图 2)。



图 2 C12O 与邻苯二酚结合时的活性中心结构示意图^[12]
Figure 2 The active centre structure of the catechol combined with C12O^[12]

注: 图中球形部分为 Fe^{3+} , 绿色部分为与 C12O 结合时的邻苯二酚。

Note: The spherical part simulated Fe^{3+} and the green part simulated the catechol combined with C12O.

3 C12O 的酶学特性

3.1 C12O 的酶活测定

邻苯二酚经过 C12O 催化后生成的裂解产物顺,顺-粘康酸在 260 nm 处有特异性吸收峰, 因此可通过测定 260 nm 处反应溶液的光吸收值, 来测定 C12O 的酶活, 其吸光系数 $\epsilon[\text{L}/(\text{mol}\cdot\text{cm})]=16\ 800$ ^[13]。

3.2 C12O 的酶学性质

3.2.1 C12O 的基本酶学性质

C12O 最适反应 pH 多在 7.0–8.0 之间, 当 pH 大于 9.0 或小于 6.0 时, 酶活即迅速下降。当 C12O 在 25 °C 以邻苯二酚作为底物进行反应时, K_m 值大多在 1–10 mmol/L 之间, 不同菌属间无明显差异。大多数 C12O 的最佳反应温度为 45 °C, 研究者发现也有喜温性的 C12O, 嗜热土芽孢杆菌分泌的耐热 C12O 最适反应温度高达 60 °C^[14], 甚至当温度达到 90 °C 时依然能保持一定的活性。大多数 C12O 耐热性较差, 超过 40 °C 10 min 即迅速失活。

C12O 的底物特异性与其菌种来源有一定的关系^[15], 一般而言, 革兰氏阳性菌中 C12O 通常对邻苯二酚和甲基邻苯二酚具有较高的催化效率, 对邻位和间位的甲基邻苯二酚催化效率没有差异性, 而革兰氏阴性菌中 C12O 则仅对 4-甲基邻苯二酚具有较高的催化效率, 对邻苯二酚及甲基邻苯二酚的催化效率较低, 其中的结构差异还需要进一步的研究^[16]。

3.2.2 C12O 在不同介质下的酶活

为了解 C12O 在不同环境下酶学特性的差异, 一些学者尝试在不同介质中测定 C12O 的酶学特性。Sanakis 等为了解天然状态下 C12O 的性质, 从 *Pseudomonas putida* DSM437 分离得到 C12O, 并在完全无水的有机环境中测定了 C12O 的酶学性质, 并对水环境和有机环境中酶学性质的差异作了理论上的分析, 结果发现在有机环境中酶依然具有催化活性但酶活力已大大减小^[17], 而 Di Nardo 等则尝试把纳米材料应用到酶学研究中, 他们将 C12O 固定化到一种新型材料纳米海绵上, 使得 C12O 的 K_m 值从 2.0 ± 0.3 mmol/L, 提高到 16.6 ± 4.8 mmol/L, 最适反应温度从 30 °C 提高到 50 °C, 同时对环境的耐

受性更好^[18]。Guzik 等则通过海藻酸钙凝胶将 C12O 进行固化,从而增加其稳定性和降解效率,结果发现通过海藻酸钙凝胶固化后的 C12O 具有更低的最适反应温度,更大的底物降解范围及对外界环境更强的抵抗力^[19]。

4 C12O 同工酶及表达调控

4.1 C12O 的编码基因

自 1950 年 Hayaishi 首次报道 C12O 以来^[20],邻苯二酚 1,2-双加氧酶得到了广泛研究,已在不动杆菌属、红球菌属、鞘氨醇单胞菌属、假单胞菌属等多种菌属中克隆得到多个 C12O 基因^[21-23]。

当前报道的大多数 C12O 编码基因都命名为 *catA*,由 936 个核苷酸组成,多位于 *catBCA* 基因簇上,受调控基因 *catR* 调节。大部分 *catA* 都位于细菌的基因组上,也有少数位于质粒上。例如,*Pseudomonas putida* ND6 菌株中的质粒 pND6-1 上存在一个单独的 C12O 编码基因 *catA*,序列分析发现其周围有转座基因,因此很有可能是基因水平转移的结果^[24]。

4.2 C12O 的同工酶

除了多个种属中克隆到 C12O 编码基因外,在多个芳香烃降解菌株中报道了 C12O 同工酶的存在^[25-26],例如 *Frateuria species* ANA-18^[27] 和 *Acinetobacter lwoffii* K24^[28] 中都发现有 2 种不同的 C12O (*CatA₁* 和 *CatA₂*),*Arthrobacter* BA-5-17 中有 4 种不同的 C12O^[29]。我们课题组前期在天津市南排污河废水中分离得到一株可以高效降解萘的 *Pseudomonas putida* ND6^[30]。通过全基因组测序发现 ND6 中也存在 4 个不同的 C12O 编码基因^[31],其中 3 个位于 ND6 基因组上,一个位于 ND6 特有的质粒 pND6-1 上,这 4 个 C12O 编码基因分属不同的基因簇,一致性约 70%,在系统发育树上属于不同的分支。

长期进化使得微生物具有非常经济的基因组,而芳香烃降解细菌中 C12O 同工酶现象因何存在,是否有助于其提升降解芳香烃的能力,值得思考和

研究。回顾文献可发现,同工酶往往出现在降解途径的限速步骤,例如芳香烃降解过程中编码芳环羟基化双加氧酶和芳环断裂双加氧酶的基因。邻苯二酚是多种芳香烃降解过程的共同中间产物,其开环过程是芳香烃代谢共有的限速步骤,因此邻苯二酚间位(*meta*-)和邻位(*ortho*-)两种降解途径共存在芳香烃降解菌中十分常见,例如苯甲酸降解菌 *Pseudomonas putida* P8、萘降解菌 *Pseudomonas putida* G7 和 *Pseudomonas putida* NCIB 9816 等^[32-34]。由于芳香族物质代谢过程中多有毒性产物积累,即便是能够以芳香烃为唯一碳源和能源生长的降解菌,芳香烃降解的中间代谢产物也会对其造成细胞毒性。因此,这些针对中间产物的催化步骤也往往存在同工酶,以增加酶的剂量,减轻这些中间产物对细胞的毒害。我们的研究^[35]也佐证这一推论,当采用较高的萘浓度(4 g/L)胁迫萘降解菌 ND6 菌株后,检测其蛋白表达谱变化,发现与萘降解相关的上调的蛋白一共有 4 个,分别是两个 C12O 蛋白及其下游的粘糠酸环异构酶。其次,由于儿茶酚开环步骤的重要性,C12O 的同工酶现象也可以增强微生物对于该基因突变的适应性。我们研究发现,ND6 菌株中所有的 C12O 编码基因在萘降解过程中均发挥生物学活性,敲除其中任意一个编码基因,萘降解能力虽然略有下降,但是不会丧失(结果正在整理中)。*Pseudomonas putida* mt-2 菌中既有儿茶酚的邻位开环途径,也有儿茶酚间位开环途径,其含有 2 个 C12O 基因(*catA₁*, *catA₂*),*catA₂* 对于维持 mt-2 菌株中 TOL 质粒 pWW0 的稳定存在具有十分重要的意义^[36]。再次,我们发现 ND6 菌株中有 4 个 C12O 同工酶,这 4 个 C12O 在最适反应 pH 及底物特异性方面比较相似,但是,在最适反应温度、米氏常数等方面又有所不同,这些差异有利于 ND6 菌株适应不同的环境条件^[37]。C12O 同工酶酶学性质差异的现象在 *Frateuria species* ANA-18^[38] 和 *Acinetobacter radioresistens* S13^[39] 等菌株中也存在。

4.3 C12O 同工酶编码基因的表达调控

C12O 同工酶编码基因的表达一种是菌体内组

成型表达,另一种则与特定的芳香族化合物诱导有关。C12O 能够被苯胺苯甲酰胺、甲苯、苯甲醇、苯甲酸盐和苯酚等多种化合物诱导产生,细菌内多个编码 C12O 的基因根据诱导物的不同而具有不同的调控模式。例如在 *Acinetobacter radioresistens* S13 中,如果以苯酚作为碳源培养时,菌体内只能合成一种 C12O,而以甲苯作为碳源培养在同样条件下培养时,菌体内则可以产生 2 种不同的 C12O 同工酶^[39]。*Burkholderia* sp. TH2^[25]在甲苯中培养时可产生两种不同的 C12O (CatA₁ 和 CatA₂),但在氯苯甲酸中却只能合成一种 C12O (CatA₂),通过基因敲除去掉 *catA₂* 后发现 *catA₂* 对细菌生长并不是必需的,但可以提高在氯苯甲酸中的生长状态,在嗜盐单胞菌属 G-16.1 中,以苯酚作为碳源培养产生的 C12O 比以苯甲酸作为碳源培养产生的 C12O 活性高了接近一倍^[40]。而我们的研究还发现,ND6 菌株中染色体上的 2 个编码儿茶酚邻位开环的基因簇 (*catR_IB_IC_IA_I* 和 *catR_{II}B_{II}C_{II}A_{II}*) 可以交互调控,敲除任意一个调控基因 (*catR_I* 或 *catR_{II}*),另一个基因簇仍然可以表达(结果正在整理中)。

综上所述,对降解菌株中 C12O 同工酶存在的生态学意义提出以下推断:

(1) C12O 催化的儿茶酚开环是芳烃降解的限速步骤,因而同工酶的存在可以增加酶的剂量,减少儿茶酚积累对菌体细胞的危害。

(2) 由于儿茶酚开环步骤的重要性,C12O 同工酶的存在降低了基因突变带来的风险,提高了细菌的适应性。

(3) C12O 同工酶的氨基酸序列往往存在差异,因此其酶学性质也不尽相同,对增强细菌对芳烃的利用及环境适应性都是有利的。

(4) C12O 同工酶的表达调控模式也往往不一样,并存在同工酶所在操纵子的交互调控现象。

因此,多种芳香烃降解菌中存在 C12O 同工酶不是偶然现象,而是作为细菌适应环境的一种进化优势被选择并保留了下来。

5 C12O 的应用

5.1 用于污染物检测及 PAHs 生物降解

芳香族化合物具有难以降解的特点,易在环境长期存留,对土壤微生物、植物和动物造成持续毒害,进而损害土壤功能,并可通过食物链最终富集到人体中,成为潜在的致癌物质。检测环境中 PAHs 具有十分重要的意义,而 C12O 可作为检测环境中 PAHs 的一种有效方式,Zucolotto 等将氯儿茶酚 1,2-双加氧酶与纳米材料联用,可检测到环境中低至 10^{-10} mol/L 的邻苯二酚^[41]。同时,尽管 C12O 对芳香烃类化合物具有催化降解能力,但由于芳香烃性质稳定,降解效率不高,限制了其工业化应用的进程,因此,研究人员试图利用计算机模拟设计、定向进化、新型材料等先进技术,对 C12O 编码基因进行改造,以提高 C12O 对芳香烃类化合物的降解能力并扩大其底物选择范围。Han 等将 *Acinetobacter* sp. ADP1 中 C12O 的 76 位氨基酸由脯氨酸定向突变为丙氨酸,相当于人工扩大了结构域的范围,使得 C12O 的催化能力提高了十倍^[11],而 Nardo 等将 C12O 固定到纳米材料中,发现其催化效率、酶学特性均有大幅度提高,为降解环境中 PAHs 污染提供了一种好的选择^[18]。

5.2 用于工业原料顺,顺-粘康酸的生产

顺,顺-粘康酸是工业生产中一种重要的原材料,它不仅能够通过氢化作用形成脂肪酸以合成杀虫剂、杀菌剂、聚氨酯、尼龙等材料,同时也是一些新型树脂、药物的合成原料,目前通过生物合成是最有效、经济且安全的方式。

通过对 C12O 编码基因或表达环境进行调控,可经过多种方式提高 C12O 的产量或催化效能:(1) 通过基因改造使得菌体内能够定向进行蛋白合成;(2) 通过提高菌体内 C12O 产量达到提高转化效率的目的^[42];(3) 通过定点突变改变 C12O 空间构象;(4) 通过加入特殊介质材料,最终达到提高 C12O 酶促效率,提高顺,顺-粘康酸产量的目的,顺,顺-粘康酸不仅具有较好的经济价值,同时对环境友

好, 不会有其他有毒副产物^[43]。

6 总结与展望

邻苯二酚双加氧酶是芳香烃降解过程中非常重要的一类酶, 在芳香族化合物降解过程中起着重要的作用。C12O 是邻苯二酚在 β -酮己二酸降解途径中的关键酶, 目前对 C12O 的性质和结构已做了深入的研究, 对底物与酶相互作用过程也有了一定的了解, 不同基因表达的 C12O 对不同底物具有不同的降解特性, 其酶学性质也表现出不同的特点, 进一步探索 C12O 的多样性, 是目前研究 C12O 酶学性质的一个重要方面。

C12O 在微生物体内多存在同工酶现象, 它们往往出现在降解过程中的限速步骤和毒性中间产物的催化步骤, 因此对同工酶的协同作用方式及分子生态学意义的研究具有十分重要的意义, 不断发展的基因组学、蛋白质组学和宏基因组学等现代分子生物学技术, 为研究人员开发新颖的 C12O 资源, 寻找、发现其同工酶编码基因存在意义提供了更多更有效的手段, 使 C12O 有了更广阔的应用前景。

REFERENCES

- [1] Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 169(1/3): 1-15
- [2] Broderick JB. Catechol dioxygenases[J]. *Essays in Biochemistry*, 1999, 34: 173-189
- [3] Wilcke W. SYNOPSIS polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil—a review[J]. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 2000, 163(3): 229-248
- [4] Murakami S, Kodama N, Shinke R, et al. Classification of catechol 1,2-dioxygenase family: sequence analysis of a gene for the catechol 1,2-dioxygenase showing high specificity for methylcatechols from Gram⁺ aniline-assimilating *Rhodococcus erythropolis* AN-13[J]. *Gene*, 1997, 185(1): 49-54
- [5] Harayama S, Reik M. Bacterial aromatic ring-cleavage enzymes are classified into two different gene families[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1989, 264(26): 15328-15333
- [6] Xu B, Xiong CY, Deng M, et al. Genetic diversity of catechol 1,2-dioxygenase in the fecal microbial metagenome[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2017, 57(10): 883-895
- [7] Matera I, Ferraroni M, Kolomytseva M, et al. Catechol 1,2-dioxygenase from the Gram-positive *Rhodococcus opacus* 1CP: Quantitative structure/activity relationship and the crystal structures of native enzyme and catechols adducts[J]. *Journal of Structural Biology*, 2010, 170(3): 548-564
- [8] Micalella C, Martignon S, Bruno S, et al. X-ray crystallography, mass spectrometry and single crystal microspectrophotometry: a multidisciplinary characterization of catechol 1,2-dioxygenase[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 2011, 1814(6): 817-823
- [9] Earhart CA, Vetting MW, Gosu R, et al. Structure of catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas arvilla*[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, 338(1): 198-205
- [10] Di Nardo G, Tilli S, Pessione E, et al. Structural roles of the active site iron(III) ions in catechol 1,2-dioxygenases and differential secondary structure changes in isoenzymes A and B from *Acinetobacter radioresistens* S13[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2004, 431(1): 79-87
- [11] Han L, Liu P, Sun JX, et al. Engineering catechol 1,2-dioxygenase by design for improving the performance of the *cis*, *cis*-muconic acid synthetic pathway in *Escherichia coli*[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13435
- [12] Váradi T, Pap JS, Giorgi M, et al. Iron(III) complexes with meridional ligands as functional models of intradiol-cleaving catechol dioxygenases[J]. *Inorganic Chemistry*, 2013, 52(3): 1559-1569
- [13] Dorn E, Knackmuss HJ. Chemical structure and biodegradability of halogenated aromatic compounds. Substituent effects on 1,2-dioxygenation of catechol[J]. *Biochemical Journal*, 1978, 174(1): 85-94
- [14] Giedraityte G, Kalėdienė L. Catechol 1,2-dioxygenase from α -naphthol degrading thermophilic *Geobacillus* sp. strain: purification and properties[J]. *Central European Journal of Biology*, 2009, 4(1): 68-73
- [15] Broderick JB, O'Halloran TV. Overproduction, purification, and characterization of chlorocatechol dioxygenase, a non-heme iron dioxygenase with broad substrate tolerance[J]. *Biochemistry*, 1991, 30(29): 7349-7358
- [16] Vaillancourt FH, Bolin JT, Eltis LD. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases[J]. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 41(4): 241-267
- [17] Sanakis Y, Mamma D, Christakopoulos P, et al. Catechol 1,2-dioxygenase from *Pseudomonas putida* in organic media—an electron paramagnetic resonance study[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2003, 33(1/3): 101-106
- [18] Di Nardo G, Roggero C, Campolongo S, et al. Catalytic properties of catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter radioresistens* S13 immobilized on nanosponges[J]. *Dalton Transactions*, 2009(33): 6507-6512
- [19] Guzik U, Hupert-Kocurek K, Marchlewicz A, et al. Enhancement of biodegradation potential of catechol 1,2-dioxygenase through its immobilization in calcium alginate gel[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2014, 17(2): 83-88
- [20] Hayaishi O, Stanier RY. The bacterial oxidation of tryptophan. III. Enzymatic activities of cell-free extracts from bacteria employing the aromatic pathway[J]. *Journal of Bacteriology*, 1951, 62(6): 691-709
- [21] Pandeeti EVP, Siddavattam D. Purification and characterization of catechol 1,2-dioxygenase from *Acinetobacter* sp. DS002 and cloning, sequencing of partial *catA* gene[J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2011, 51(3): 312-318
- [22] Sun JQ, Huang X, Chen QL, et al. Isolation and characterization of three *Sphingobium* sp. strains capable of degrading

- isoproturon and cloning of the catechol 1,2-dioxygenase gene from these strains[J]. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2009, 25(2): 259-268
- [23] Guzik U, Greń I, Hupert-Kocurek K, et al. Catechol 1,2-dioxygenase from the new aromatic compounds-degrading *Pseudomonas putida* strain N6[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(3): 504-512
- [24] Zhao HB, Chen W, Cai BL. Cloning and expression of *catA* gene from *Pseudomonas putida* ND6 and study on the catechol cleavage pathway[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2007, 47(3): 387-391 (in Chinese)
赵化冰, 陈威, 蔡宝立. 恶臭假单胞菌 ND6 菌株 *catA* 基因的克隆和表达及其儿茶酚裂解途径探讨[J]. *微生物学报*, 2007, 47(3): 387-391
- [25] Suzuki K, Ichimura A, Ogawa N, et al. Differential expression of two catechol 1,2-dioxygenases in *Burkholderia* sp. strain TH2[J]. *Journal of Bacteriology*, 2002, 184(20): 5714-5722
- [26] Briganti F, Pessione E, Giunta C, et al. Purification and catalytic properties of two catechol 1,2-dioxygenase isozymes from benzoate-grown cells of *Acinetobacter radioresistens*[J]. *Journal of Protein Chemistry*, 2000, 19(8): 709-716
- [27] Murakami S, Takashima A, Takemoto J, et al. Cloning and sequence analysis of two catechol-degrading gene clusters from the aniline-assimilating bacterium *Frateuria* species ANA-18[J]. *Gene*, 1999, 226(2): 189-198
- [28] Kim SI, Leem SH, Choi JS, et al. Cloning and characterization of two *catA* genes in *Acinetobacter lwoffii* K24[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(16): 5226-5231
- [29] Muakami S, Wang LC, Naito A, et al. Purification and characterization of four catechol 1,2-dioxygenase isozymes from the benzamide-assimilating bacterium *Arthrobacter* species BA-5-17[J]. *Microbiological Research*, 1998, 153(2): 163-171
- [30] Zhang XP, Yue XH, Huang JY, et al. Isolation and identification of naphthalene-degrading plasmid pND6[J]. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2000, 6(2): 187-190 (in Chinese)
张心平, 岳晓含, 黄今勇, 等. 萘降解质粒 pND6 的分离和鉴定[J]. *应用与环境生物学报*, 2000, 6(2): 187-190
- [31] Li SS, Zhao HB, Li YX, et al. Complete genome sequence of the naphthalene-degrading *Pseudomonas putida* strain ND6[J]. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194(18): 5154-5155
- [32] Cao B, Loh KC. Catabolic pathways and cellular responses of *Pseudomonas putida* P8 during growth on benzoate with a proteomics approach[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2008, 101(6): 1297-1312
- [33] Barnsley EA. Role and regulation of the *ortho* and *meta* pathways of catechol metabolism in pseudomonads metabolizing naphthalene and salicylate[J]. *Journal of Bacteriology*, 1976, 125(2): 404-408
- [34] Williams PA, Catterall FA, Murray K. Metabolism of naphthalene, 2-methylnaphthalene, salicylate, and benzoate by *Pseudomonas* PG: regulation of tangential pathways[J]. *Journal of Bacteriology*, 1975, 124(2): 679-685
- [35] Li SS, Hu X, Zhao H, et al. Quantitative analysis of cellular proteome alterations of *Pseudomonas putida* to naphthalene-induced stress[J]. *Biotechnology Letters*, 2015, 37(8): 1645-1654
- [36] Jiménez JI, Pérez-Pantoja D, Chavarría M, et al. A second chromosomal copy of the *catA* gene endows *Pseudomonas putida* mt-2 with an enzymatic safety valve for excess of catechol[J]. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(6): 1767-1778
- [37] Li SS, Qin K, Li HY, et al. Cloning and characterisation of four *catA* genes located on the chromosome and large plasmid of *Pseudomonas putida* ND6[J]. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2018, 34: 83-90
- [38] Aoki K, Konohana T, Shinke R, et al. Two catechol 1,2-dioxygenases from an aniline-assimilating bacterium, *Frateuria* species ANA-18[J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1984, 48(8): 2097-2104
- [39] Caposio P, Pessione E, Giuffrida G, et al. Cloning and characterization of two catechol 1,2-dioxygenase genes from *Acinetobacter radioresistens* S13[J]. *Research in Microbiology*, 2002, 153(2): 69-74
- [40] de Lourdes MM, Sánchez-PC, Piubeli F, et al. Cloning, characterization and analysis of *cat* and *ben* genes from the phenol degrading halophilic bacterium *Halomonas organivorans*[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6): 21049
- [41] Zucolotto V, Pinto APA, Tumolo T, et al. Catechol biosensing using a nanostructured layer-by-layer film containing Cl-catechol 1,2-dioxygenase[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2006, 21(7): 1320-1326
- [42] Aya K, Yoshitaka I, Kohtaro K. High-yield production of *cis*, *cis*-muconic acid from catechol in aqueous solution by Biocatalyst[J]. *Chemistry Letters*, 2011, 40(4): 381-383
- [43] Guzik U, Hupert-Kocurek K, Sitnik M, et al. High activity catechol 1,2-dioxygenase from *Stenotrophomonas maltophilia* strain KB2 as a useful tool in *cis*, *cis*-muconic acid production[J]. *Antonie van Leeuwenhoek*, 2013, 103(6): 1297-1307