

## 苯甲酸降解途径及转化生产粘康酸的研究进展\*

# Research Progress in Benzoate Degradation Pathways and Transformation for *cis,cis*-Muconic Acid

谢能中, 黄艳燕, 李检秀, 郭 铃, 李 亿, 王青艳, 陈 东, 杜奇石, 黄日波\*\*

XIE Neng-zhong, HUANG Yan-yan, LI Jian-xiu, GUO Ling, LI Yi, WANG Qing-yan, CHEN Dong, DU Qi-shi, HUANG Ri-bo

(广西科学院, 非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物质产业化工程院, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(Guangxi Academy of Sciences, State Key Laboratory of Non-food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-food Biorefinery, Guangxi Biomass Industrialization Engineering Institute, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China)

**摘要:** 苯甲酸是多种芳香化合物生物代谢的重要中间物, 对微生物降解苯甲酸的生物化学和遗传学研究, 有利于阐明芳香化合物的生物降解机制, 分离和培育出降解谱广和降解性能高的菌株应用于废水处理、环境修复和生物转化。苯甲酸的儿茶酚邻位裂解 (*ortho*-cleavage) 途径会产生粘康酸, 后者是一种潜在的平台化合物, 用于生产新型功能树脂、生物塑料、食品添加剂等产品。本文综述了微生物降解苯甲酸和转化生产粘康酸的研究和进展, 并提出该领域研究今后的发展方向, 为后续研究提供有价值的参考。

**关键词:** 苯甲酸 粘康酸 降解途径 微生物转化

**中图分类号:** Q936 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-7378(2014)02-0074-08

**Abstract:** Benzoate is a model aromatic compound, which is also an important intermediate of a variety of aromatic compounds. Studying microbial degradation of benzoate provides knowledge on the metabolic mechanism of other aromatic compounds, facilitates the screen of efficient bacteria for wastewater treatment, environmental remediation and biotransformation. Benzoate can be metabolized *via* catechol by means of the *ortho*-cleavage pathway to

yield *cis,cis*-muconic acid, which is suggested to be an interesting platform chemical for the production of new functional resins, bio-plastics and food additives. In this paper, various benzoate degradation pathways and *cis,cis*-muconic acid production by biotransformation of benzoate are reviewed, and guidelines for developing high performance microbial cell factory for *cis,cis*-muconic acid production are also proposed.

**Key words:** benzoate, *cis,cis*-muconic acid, degradation pathways, microbial transformation

收稿日期: 2013-11-29

修回日期: 2013-12-20

**作者简介:** 谢能中(1981-), 男, 博士, 主要从事利用系统生物学、合成生物学和代谢工程等理念和手段, 开发先进的微生物技术路线生产生物基化学品和生物能源方面的研究。

\* 国家自然科学基金项目(31160023、31360207), 广西自然科学基金项目(2012GXNSFBA053063、2013GXNSFDA-019007), 广西科学研究与技术开发计划项目(12237022、13-051-08、13-051-50), 广西科学院基本科研业务费项目(12YJ25SW01、12YJ25SW02)资助。

\*\* 通讯作者: 黄日波(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事分子酶工程研究。E-mail: rbhuang@gxas.ac.cn.

经过将近 200 多年的发展, 化学工业深刻影响

着人类的生活,在改善人类物质生活的同时,也对环境与人们的健康造成了危害<sup>[1]</sup>。随着工业的迅猛发展,有毒有害物质在环境中的积累和污染日趋严重,特别是芳香族污染物在土壤和水体中含量的上升而引起的生态系统污染,对人和生态系统中其他生物构成危害。此外,自然界中芳香族化合物作为木质素的主要成分,约占全球生物质总量的四分之一,是仅次于碳水化合物的第二大类广泛分布的有机化合物<sup>[2]</sup>。许多微生物进化出复杂的机制来降解芳香族化合物,在生物地化循环和生物圈可持续发展中扮演着重要角色<sup>[2]</sup>。

利用化学方法来处理高浓度芳香族化合物废水时,往往存在着处理不完全,易带来二次污染等问题,例如产生非降解性苯甲酸和苯胺<sup>[3]</sup>。因此,需要寻找合适的方法来降解这些有毒化合物,而微生物降解是芳香族污染物脱毒的有效手段。苯甲酸是许多芳香族化合物生物代谢的重要中间物<sup>[4]</sup>,其在自然条件下的降解、变化及归宿,一直受到人们的关注。此外,苯甲酸类废水是一类常见的有机废水,许多苯甲酸类化合物被直接用于化工、食品、染料和医药工业,使其在一些工厂的排放废水中达到可观的浓度<sup>[5~9]</sup>。未经处理的苯甲酸废水对生态环境存在一定的危害。Tsay 等<sup>[6]</sup>发现苯甲酸钠对斑马鱼幼体具有神经毒性和肾毒性,这使得斑马鱼幼体在发育过程中出现肾畸形等发育不良情形。当苯甲酸钠浓度超过 2 g/L 时,没有斑马鱼幼体能够存活下来。由于苯甲酸是 D-氨基酸氧化酶的竞争性抑制剂,研究者推测这种幼体发育不良的现象是 D-氨基酸氧化酶被苯甲酸抑制所导致的。除了鱼类之外,D-氨基酸氧化酶也存在于许多动物的体内,因此苯甲酸毒性也有可能影响其相关器官的功能,从而导致其幼体发育不良。粘康酸是苯甲酸有氧生物降解的代谢中间物之一,由于具有两个羧基和成对的共轭双键,其被认为是新一代精细化工原料,可用于合成新型功能树脂、生物塑料、食品添加剂、农用化学品和医药等产品,或者用于生产大宗化学品如对苯二甲酸二甲酯、己二酸和偏苯三酸<sup>[10~18]</sup>。

## 1 苯甲酸的有氧生物降解

苯甲酸的微生物降解过程中,根据对氧的需求可分为有氧降解和厌氧降解。有氧降解以分子氧作为最终电子受体,而厌氧降解则以硝酸盐、硫酸盐、二氧化碳或铁等作为最终电子受体。在有氧情况下,目前推测微生物有多种代谢途径来降解苯甲酸,

根据其中心代谢物的不同,可将其分为儿茶酚、原儿茶酸和龙胆酸途径<sup>[19]</sup>(图 1)。

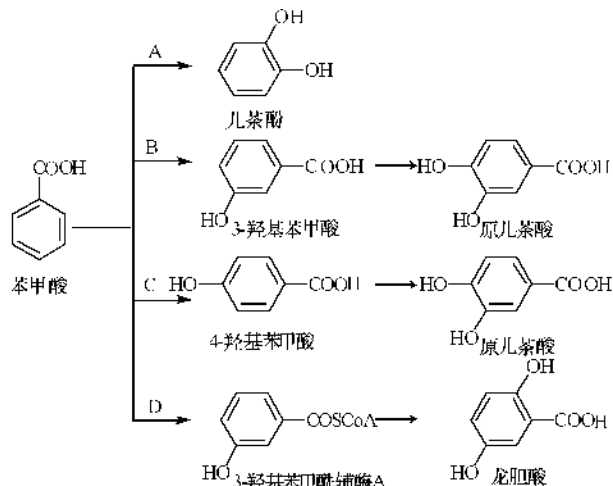


图 1 苯甲酸有氧降解的各种代谢途径<sup>[19]</sup>

### 1.1 儿茶酚途径

儿茶酚途径的第一步是苯甲酸在苯甲酸双加氧酶系的催化下生成儿茶酚,目前已有多个苯甲酸双加氧酶基因簇被克隆出来,主要有两组分和三组分两种<sup>[20]</sup>, (1) 在 *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1<sup>[21,22]</sup>, *Burkholderia xenovorans* LB400<sup>[23,24]</sup> 和 *Pseudomonas putida* PRS2000<sup>[25]</sup> 克隆到苯甲酸双加氧酶基因簇 *ben* 基因簇; (2) 在 *P. putida* (arvilla) mt-2<sup>[26]</sup> 上克隆到苯甲酸双加氧酶基因簇 *xyl* 基因簇; (3) 在 *Rhodococcus* sp. 19070 上克隆到苯甲酸双加氧酶基因簇 *bop* 基因簇<sup>[27]</sup>。

*ben* 基因簇位于染色体上,其在细菌中较为常见。而位于质粒上的 *xyl* 和 *bop* 基因簇编码的苯甲酸 1,2-双加氧酶具有很广的底物特异性<sup>[27,28]</sup>。在 *Acinetobacter* sp. strain ADP1 中, *benABC* 编码的苯甲酸 1,2-双加氧酶属于两组分双加氧酶, *benD* 编码苯甲酸二醇脱氢酶。 *benA* 的上游有一个与其转录方向相反的基因,这个基因被命名为 *benM*, 其编码的 LysR 型转录调控因子 BenM 在粘康酸或苯甲酸的诱导下激活整个 *ben* 基因簇,从而使苯甲酸转化为儿茶酚<sup>[29]</sup>。 Collier 等还发现相对于底物苯甲酸而言,粘康酸是一个更为有效的 *ben* 表达诱导物,更有利于促进苯甲酸的快速降解。当苯甲酸转化为儿茶酚后,菌体可以通过邻位裂解 (*ortho*-cleavage) 或者间位裂解 (*meta*-cleavage) 两种方式降解儿茶酚(图 2)。儿茶酚 1,2-双加氧酶 (catechol 1,2-dioxygenase) 是典型的邻位氧化裂解酶,又称为内二元醇双加氧酶,它催化的是儿茶酚的邻位裂解产生粘康酸;儿茶酚 2,3-双加氧酶 (catechol 2,3-

dioxygenase)是典型的间位氧化裂解酶,也称作外二元醇双加氧酶,它催化儿茶酚的间位裂解产生 2-羟基粘康酸半醛。

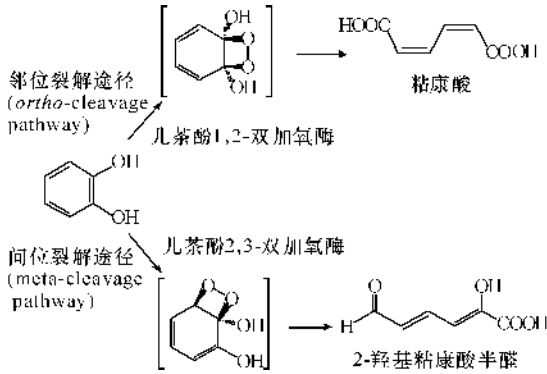


图2 儿茶酚的两条有氧降解途径<sup>[30,31]</sup>

某些菌株同时具有两种类型的儿茶酚 1,2-双加氧酶——I型(*CatA1*, *catA1* 基因编码)和II型(*CatA2*, *catA2* 基因编码)。Burkholderia sp. TH2 是一株能够降解 2-氯苯甲酸并经过儿茶酚代谢途径的菌株,SDS-PAGE 和 Western blot 分析表明,当其只利用苯甲酸作为碳源时,可以同时检测到 *CatA1* 和 *CatA2* 的酶活;当菌株只利用 2-氯苯甲酸为唯一碳源时,则只能检测到 *CatA2* 而不能检测到 *CatA1* 的活性;但是,当失活 *CatA2* 时,就可以检测到 *CatA1* 的活性。研究者认为尽管 *catA2* 基因簇对于在 2-氯苯甲酸生长的 TH2 菌株不是必需的,但是可以确定,两种类型的儿茶酚双加氧酶基因簇对于菌株的生长及化合物分解代谢都是有利的<sup>[32]</sup>。最终通过一系列降解,产生琥珀酰辅酶 A 和乙酰辅酶 A 进入三羧酸循环。

儿茶酚 2,3-双加氧酶属于金属蛋白,在金属离子参与的情况下才具有活性。目前发现 3 种不同类别的儿茶酚 2,3-双加氧酶,他们分别含有  $Fe^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  活性中心<sup>[33]</sup>。在苯胺降解菌株 AD9 中,儿茶酚降解为 2-羟粘康酸半醛后,可以通过两条途径生成 2-酮-4-烯戊酸。一条是由 2-羟粘康酸半醛脱氢酶催化的脱氢分支,另一条则是由 2-羟粘康酸半醛水解酶催化的水解分支。2-酮-4-烯戊酸进一步被 2-酮-4-烯戊酸水解酶、4-羟基-2-酮戊酸醛缩酶和乙醛脱氢酶催化降解为丙酮酸和乙酰辅酶 A,从而进入三羧酸循环<sup>[34]</sup>。

## 1.2 原儿茶酸途径

除了常见的儿茶酚途径之外,微生物还能够通过原儿茶酸途径降解苯甲酸。目前发现有两种原儿茶酸途径,分别产生代谢中间物 3-羟基苯甲酸和 4-羟基苯甲酸。在 *Pseudomonas testosteroni* 菌株中

(图 3),苯甲酸首先在苯甲酸 3-单加氧酶的作用下转化为 3-羟基苯甲酸,后者在 3-羟基苯甲酸 4-单加氧酶的作用下得到原儿茶酸。原儿茶酸在原儿茶酸 4,5-双加氧酶的作用下,发生间位裂解生成 4-羧基-2-羟基粘康酸半醛,然后再经过一系列酶催化反应生成 2 分子的丙酮酸和 1 分子的甲酸。尽管全细胞反应中苯甲酸能够被 *P. testosteroni* 转化为 3-羟基苯甲酸,然而研究者并没能能在粗酶液中检测到苯甲酸 3-单加氧酶的活性<sup>[35]</sup>。因此,该途径的具体情况到目前还没有定论。

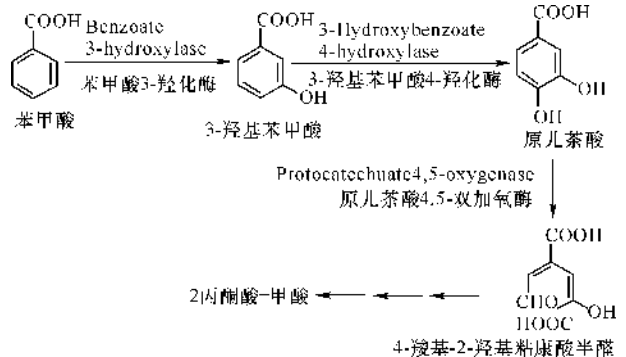


图3 苯甲酸的有氧降解的 3-羟基苯甲酸途径<sup>[19,35]</sup>

另外一种原儿茶酸途径能够产生 4-羟基苯甲酸代谢中间物(图 4)。在 *Aspergillus niger* 菌株中,苯甲酸首先在苯甲酸 4-羟化酶的作用下,苯环的羧基对位羟基化成为 4-羟基苯甲酸。4-羟基苯甲酸在 4-羟基苯甲酸 3-羟化酶的催化下,在苯环的羧基的间位发生单加氧反应产生原儿茶酸。原儿茶酸经过多步酶促反应开环裂解,产生 3-酮己二酸烯醇内酯,最后被进一步被降解成为琥珀酸和乙酰辅酶 A。但是该途径的原儿茶酸开环裂解途径是推测的,目前尚没有人提供其相关信息<sup>[19,36]</sup>。

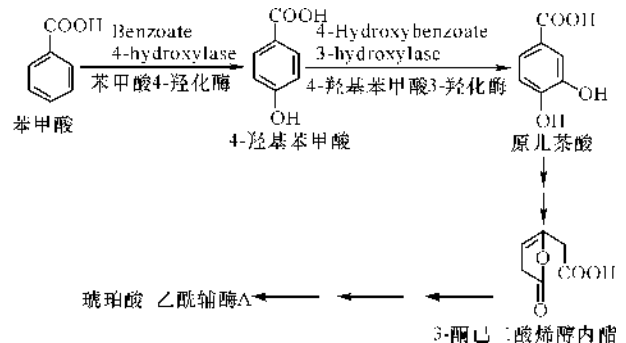


图4 苯甲酸有氧降解的 4-羟基苯甲酸途径<sup>[19,36]</sup>

## 1.3 龙胆酸途径

苯甲酸降解的龙胆酸途径与苯甲酸厌氧降解有一个相同之处,也就是苯甲酸首先在连接酶的作用下生成苯甲酰辅酶 A。龙胆酸途径是近年在

*Pseudomonas* sp. KB 740 菌株中发现的。第一个酶是苯甲酰辅酶 A 连接酶, 其具有两个异构酶, 其中一个在好氧条件下诱导产生, 而另一个则在厌氧条件下诱导产生。此外, 这两个异构酶虽然功能相同, 但是其分子量、抗体反应特性都不相同, 所以研究者认为其相关性不大。第二步反应是苯甲酰辅酶 A 在苯甲酰辅酶 A-3-单加氧酶作用下, 间位单加氧产生 3-羟基苯甲酰辅酶 A, 后者在 3-羟基苯甲酰辅酶 A-6-单加氧酶作用下得到龙胆酸。与儿茶酚和原儿茶酸不同的是, 龙胆酸只有一种苯环裂解的方式, 即在龙胆酸 1,2-双加氧酶作用下产生顺丁烯二酸-单酰丙酮酸。后者经过多步酶促反应产生丙酮酸和反丁烯二酸<sup>[19,37~39]</sup> (图 5)。

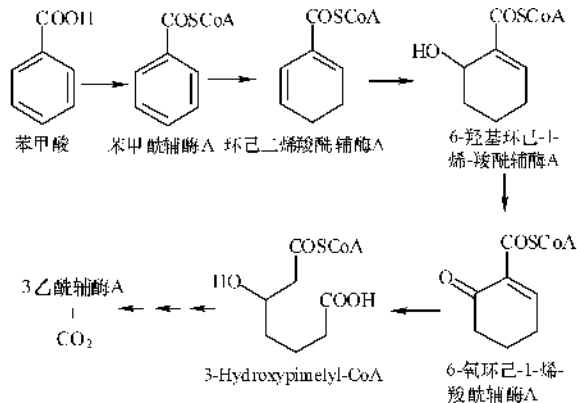


图 6 厌氧条件下苯甲酸的降解途径<sup>[40,41]</sup>

### 3 生物转化苯甲酸钠生产粘康酸

有些微生物能够转化苯、甲苯、苯甲酸、儿茶酚等芳香化合物成为粘康酸<sup>[31]</sup>。在这些底物中, 苯和甲苯是具有毒性的易燃有机溶剂, 对人体具有致癌作用, 同时水溶性太低、挥发性太强导致生产过程难以控制、生产效率太低。对于儿茶酚而言, 过高的市场价格限制了其应用于粘康酸的生产。苯甲酸钠则不存在上述的问题, 其具有非挥发性和性质稳定的特点, 且常温下易溶于水, 所以特别适合生物法合成所需要的水相环境。此外, 苯甲酸钠是石化产品中的副产物, 来源充足, 价格低廉。因此, 利用苯甲酸钠作为底物来生产粘康酸就更具有实际应用价值。到目前为止, 人们发现 *Pseudomonas*、*Arthrobacter*、*Sphingobacterium*、*Corynebacterium*、*Brevibacterium*、*Microbacterium* 等属的一些菌株能够降解苯甲酸钠并积累一定量的粘康酸 (表 1)。

如图 7 所示, 粘康酸高产菌株需要具备以下条件: (1) 邻位裂解是菌株唯一的儿茶酚开环方式; (2) 利用诱变或基因敲除的方法失活粘康酸环化异构酶, 防止粘康酸产物被进一步降解; (3) 胞内具有高活力的苯甲酸 1,2-双加氧酶和儿茶酚 1,2-双加氧酶; (4) 菌株能够耐受苯甲酸钠毒性。Wu 等<sup>[42]</sup>报道从富含芳香化合物的污水中筛选到一株能利用苯甲酸钠合成粘康酸的 *Sphingobacterium* sp. GCG。鉴于非血红素三价铁离子是所有儿茶酚 1,2-双加氧酶的辅因子<sup>[43]</sup>, 当在培养基中加入 EDTA-FeCl<sub>3</sub> 混合液时, 儿茶酚 1,2-双加氧酶活力的提高导致粘康酸的产量提高了 75%~100%<sup>[42]</sup>。为了进一步提高产量, 他们对该菌株进行反复诱变, 最终筛选到一株粘康酸摇瓶产量达 0.560 g/L 的突变株, 转化率为 28% (mol/mol)<sup>[44]</sup>。据 Xie 等<sup>[45]</sup>报道, 一株能够

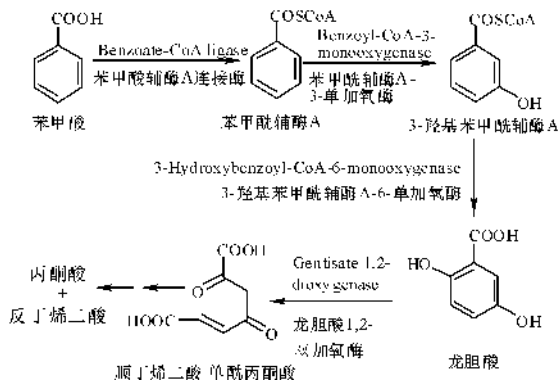


图 5 苯甲酸有氧降解的龙胆酸途径<sup>[19,37~39]</sup>

### 2 苯甲酸的厌氧生物降解

苯甲酸厌氧条件下的还原裂解机制存在于某些细菌中。如图 6 所示, 在 *T. aromatica* 中苯甲酸厌氧降解途径分为以下几个阶段: (1) 辅酶 A 硫酯的形成; (2) 苯环的还原过程; (3) 环的裂解过程; (4) 最后经过  $\beta$ -氧化反应, 产生主要代谢产物乙酰辅酶 A<sup>[40,41]</sup>。其中苯甲酸-CoA 连接酶催化形成苯甲酰辅酶 A 是苯甲酸厌氧代谢的第一步。苯甲酰辅酶 A 形成以后的反应是苯环的还原过程, 由于苯环本身就是一个很高的共扼键, 从而使苯环异常稳定, 该步催化反应较为困难。在 *Thauera aromatica* 中, 苯甲酰辅酶 A 的还原是一双电子还原过程, 在苯甲酰辅酶 A 还原酶催化下, 消耗两分子 ATP, 由电子供体提供两个电子使苯环还原为环己二烯。环己二烯-羧酰辅酶 A 形成以后, 下一步是苯环的水合反应得到 6-羟基环己-1-烯-羧酰辅酶 A。后者脱氢后产生 6-氧环己-1-烯-羧酰辅酶 A。环己-1-烯酰辅酶 A 再经历水合等一系列反应, 最终降解为乙酰辅酶 A 和二氧化碳 (图 6)。



时具有很强的抑菌作用,这使含有这类化合物的工业废水的处理具有较大的难度。因此,从环境中筛选能够耐受并高效降解苯甲酸的微生物,是处理这类污水的关键,并研究其降解途径及关键酶和基因的性质与特点,将其应用到这些问题中去,具有重要的理论与实际意义。

目前研究表明,微生物可通过有氧和厌氧两种方式降解苯甲酸,厌氧降解仅发现苯甲酰辅酶 A 途径,而有氧降解可细分为儿茶酚、原儿茶酸和龙胆酸途径,其中儿茶酚途径的邻位裂解途径可产生粘康酸。粘康酸分子含有两个羧基,可以通过化学反应产生一系列有价值的产品,是一种潜在的平台化合物。利用常规的诱变育种技术失活催化粘康酸转化为粘康酸内酯的粘康酸环化异构酶,可阻断苯甲酸降解途径来积累粘康酸。通过研究者的努力,目前利用突变株以苯甲酸钠为底物,粘康酸产量可达到 44 g/L,转化率接近 100%<sup>[53]</sup>。为了进一步提高粘康酸的产量、转化率以及生产率,今后的研究应该集中在利用后基因组时代的基因组学等各种组学信息,使用系统生物学和合成生物学手段构建能高效生产粘康酸的细胞工厂上。通过商业化高通量测序方法和生物信息学方法,可获得生产菌株降解苯甲酸的相关基因,从而能够对相关代谢途径进行设计、构建和优化以获得更加简单和高效的细胞工厂。例如利用基因过量表达技术对上游关键的功能基因(包括苯甲酸 1,2-双加氧酶和儿茶酚 1,2-双加氧酶的编码基因)和调控基因进行过量表达,并利用基因打靶技术对抑制因子及催化粘康酸降解的关键酶的编码基因进行敲除,提高粘康酸的产量和转化率。

代谢中间物儿茶酚对微生物及胞内的生物大分子具有较强的毒性,因此需要通过选择不同的启动子以及基因拷贝数来控制好各个关键酶的表达量,防止出现胞内儿茶酚的积累而导致细胞死亡和酶失活。此外,鉴于不同微生物中的苯甲酸 1,2-双加氧酶和儿茶酚 1,2-双加氧酶的比酶活、稳定性差异很大,研究者可通过酶性质分析来选择比酶活和稳定性高的关键酶进行过量表达来提高粘康酸的产量和生产率。同时,利用快速发展的蛋白质工程技术对这些关键酶进行定向进化也是一种有效的手段。

#### 参考文献:

[1] Li C J, Trost B M. Green chemistry for chemical synthesis[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 13197-13202.

[2] Valderrama J A, Durante-Rodríguez G, Blázquez B, et al. Bacterial degradation of benzoate: cross-regulation between aerobic and anaerobic pathways [J]. J Biol Chem, 2012, 287: 10494-10508.

[3] 方艳芬, 黄应平, 苏静, 等. 苯甲酸和苯胺的微生物降解研究[J]. 环境科学与技术, 2008, 31: 68-71.

[4] Dennison S G, O'Brien P, Gopalkrishnan S, et al. Enhancement of aerobic degradation of benzoate and 2-chlorobenzoate by adapted activated sludge[J]. Microbiol Res, 2010, 165: 687-694.

[5] Oie C S, Albaugh C E, Peyton B M. Benzoate and salicylate degradation by *Halomonas campisalis*, an alkaliophilic and moderately halophilic microorganism [J]. Water Res, 2007, 41: 1235-1242.

[6] Tsay H J, Wang Y H, Chen W L, et al. Treatment with sodium benzoate leads to malformation of zebrafish larvae[J]. Neurotoxicol Teratol, 2007, 29: 562-569.

[7] 苗艳芳, 王忠彦, 胡承, 等. 防腐剂——苯甲酸的微生物降解研究[J]. 酿酒, 2003, 30: 21-23.

[8] 岳晓寒, 蔡宝立, 潘继伦, 等. 固定化细菌去除苯甲酸类化合物的研究[J]. 离子交换与吸附, 1999, 15: 54-58.

[9] 赵丽辉, 匡欣, 贾智萍, 等. 苯甲酸类化合物好氧生物降解性研究[J]. 环境化学, 1993, 12: 173-178.

[10] Bui V, Coudray L, Frost J W. Process for preparing hexamethylenediamine and polyamides therefrom; WO, 2012141993 A1[P]. 2012-12-18.

[11] Bui V, Lau M K, MacRae D, et al. Methods for producing isomers of muconic acid and muconate salts; US, 20130030215 A1[P]. 2013-01-31.

[12] Burk M J, Osterhout R E, Sun J. Semi-synthetic terephthalic acid *via* microorganisms that produce muconic acid; US, 20110124911 A1[P]. 2011-05-26.

[13] Coudray L, Bui V, Frost J W, et al. Process for preparing caprolactam and polyamides therefrom; US, 20130085255 A1[P]. 2013-04-04.

[14] Fink J K. Reactive polymers fundamentals and applications: a concise guide to industrial polymers [M]. Norwich, William Andrew, 2005: 573.

[15] Frost J W, Miermont A, Schweitzer D, et al. Biobased polyesters; US, 8415496 B2[P]. 2013-04-09.

[16] Frost J W, Miermont A, Schweitzer D, et al. Cyclohexane 1,4-carboxylates; US, 8367859 B2[P]. 2013-02-05.

[17] Frost J W, Miermont A, Schweitzer D, et al. Novel terephthalic and trimellitic based acids and carboxylate derivatives thereof; US, 8367858 B2[P]. 2013-02-05.

[18] Schweitzer D. Continuous dehydrogenation of 1,4-carboxylate substituted cyclohexenes; WO, 2012082725

- A1[P]. 2012-06-21.
- [19] Çınarö. Factors influencing biodegradation of benzoate by denitrifying bacterial enrichment cultures [D]. Clemson, SC: Clemson University, 2002.
- [20] 张晓云, 盖忠辉, 台萃, 等. 微生物降解苯甲酸的研究进展[J]. 微生物学通报, 2012, 39: 1808-1816.
- [21] Neidle E L, Hartnett C, Ornston L N, et al. Nucleotide sequences of the *Acinetobacter calcoaceticus* *benABC* genes for benzoate 1, 2-dioxygenase reveal evolutionary relationships among multicomponent oxygenases[J]. J Bacteriol, 1991, 173: 5385-5395.
- [22] Williams P A, Shaw L E. *mucK*, a gene in *Acinetobacter calcoaceticus* ADP1 (BD413), encodes the ability to grow on exogenous *cis, cis*-muconate as the sole carbon source[J]. J Bacteriol, 1997, 179: 5935-5942.
- [23] Denev V J, Patrauchan M A, Florizone C, et al. Growth substrate- and phase-specific expression of biphenyl, benzoate, and C1 metabolic pathways in *Burkholderia xenovorans* LB400 [J]. J Bacteriol, 2005, 187: 7996-8005.
- [24] Denev V J, Klappenbach J A, Patrauchan M A, et al. Genetic and genomic insights into the role of benzoate catabolic pathway redundancy in *Burkholderia xenovorans* LB400 [J]. Appl Environ Microbiol, 2006, 72: 585-595.
- [25] Cowles C E, Nichols N N, Harwood C S. BenR, a XylS homologue, regulates three different pathways of aromatic acid degradation in *Pseudomonas putida* [J]. J Bacteriol, 2000, 182: 6339-6346.
- [26] Zeyer J, Lehrbach P R, Timmis K N. Use of cloned genes of *Pseudomonas* TOL plasmid to effect biotransformation of benzoates to *cis*-dihydrodiols and catechols by *Escherichia coli* cells[J]. Appl Environ Microbiol, 1985, 50: 1409-1413.
- [27] Haddad S, Eby D M, Neidle E L. Cloning and expression of the benzoate dioxygenase genes from *Rhodococcus* sp. strain 19070[J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 2507-2514.
- [28] 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 pWW0 plasmid *xyWXYZ*, genes encoding benzoate dioxygenases[J]. J Bacteriol, 1991, 173: 7540-7548.
- [29] Collier L S, Gaines III G L, Neidle E L. Regulation of benzoate degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 by BenM, a LysR-type transcriptional activator[J]. J Bacteriol, 1998, 180: 2493-2501.
- [30] Harwood C S, Parales R E. The  $\beta$ -ketoacid pathway and the biology of self-identity[J]. Annu Rev Microbiol, 1996, 50: 553-590.
- [31] Williams P A, Sayers J R. The evolution of pathways for aromatic hydrocarbon oxidation in *Pseudomonas* [J]. Biodegradation, 1994, 5: 195-217.
- [32] Suzuki K, Ichimura A, Ogawa N, et al. Differential Expression of Two Catechol 1, 2-Dioxygenases in *Burkholderia* sp. Strain TH2 [J]. J Bacteriol, 2002, 184: 5714-5722.
- [33] 季朝能, 姜涛, 殷长传. 甲硒氨酸耐热邻苯二酚 2, 3-双加氧酶的高表达和分离纯化[J]. 复旦学报, 2000, 39: 273-276.
- [34] 梁泉峰, 陈明, 徐玉泉, 等. 转座元件介导的苯胺代谢基因簇的筛选和鉴定[J]. 科学通报, 2005, 50: 1720-1724.
- [35] Wheelis M L, Palleroni N J, Stanier R Y. The metabolism of aromatic acids by *Pseudomonas testosteroni* and *P. acidovorans* [J]. Arch Mikrobiol, 1967, 59: 302-314.
- [36] Boschloo J G, Paffen A, Koot T, et al. Genetic analysis of benzoate metabolism in *Aspergillus niger* [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1990, 34: 225-228.
- [37] Altenschmidt U, Oswald B, Fuchs G. Purification and characterization of benzoate-coenzyme A ligase and 2-aminobenzoate-coenzyme A ligases from a denitrifying *Pseudomonas* sp. [J]. J Bacteriol, 1991, 173: 5494-5501.
- [38] 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]. J Bacteriol, 1993, 175: 4851-4858.
- [39] 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]. Eur J Biochem, 1995, 227: 161-168.
- [40] Breese K, Boll M, Alt-Morbe J, et al. Genes coding for the benzoyl-CoA pathway of anaerobic aromatic metabolism in the bacterium *Thauera aromatic* [J]. Eur J Biochem, 1998, 256: 148-154.
- [41] Wischgoll S, Heintz D, Peters F, et al. Gene clusters involved in anaerobic benzoate degradation of *Geobacter metallireducens* [J]. Mol Microbiol, 2005, 58: 1238-1252.
- [42] Wu C M, Lee T H, Lee S N, et al. Microbial synthesis

- of *cis,cis*-muconic acid by *Sphingobacterium* sp. GCG generated from effluent of a styrene monomer (SM) production plant[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2004, 35:598-604.
- [43] Vaillancourt F H, Bolin J T, Eltis L D. The ins and outs of ring-cleaving dioxygenases[J]. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 2006, 41:241-267.
- [44] Wu C M, Wu C C, Su C C, et al. Microbial synthesis of *cis,cis*-muconic acid from benzoate by *Sphingobacterium* sp. mutants[J]. *Biochem Eng J*, 2006, 29:35-40.
- [45] Xie N Z, Wang Q Y, Zhu Q X, et al. Optimization of medium composition for *cis,cis*-muconic acid production by a *Pseudomonas* sp. mutant using statistical methods[J]. *Prep Biochem Biotech*, 2014, 44: 342-354.
- [46] van Duuren J B, Wijte D, Karge B, et al. pH-stat fed-batch process to enhance the production of *cis,cis*-muconate from benzoate by *Pseudomonas putida* KT2440-JD1[J]. *Biotechnol Prog*, 2012, 28:85-92.
- [47] Imada Y, Yoshikawa N, Mizuno S, et al. Process for preparing muconic acid; US, 4871667[P]. 1989-10-03.
- [48] Liu W H, Li R M, Kung K H, et al. Bioconversion of benzoic acid to *cis,cis*-muconic acid by *Corynebacterium pseudodiphtheriticum* [J]. *Food Sci Agric Chem*, 2003, 5:7-12.
- [49] Bang S G, Choi C Y. DO-stat fed-batch production of *cis,cis*-muconic acid from benzoic acid by *Pseudomonas putida* BM014[J]. *J Ferment Bioeng*, 1995, 79:381-383.
- [50] van Duuren J B, Wijte D, Leprince A, et al. Generation of a *catR* deficient mutant of *P. putida* KT2440 that produces *cis,cis*-muconate from benzoate at high rate and yield[J]. *J Biotechnol*, 2011, 156:163-172.
- [51] 陈健辉, 陈润坚, 谢鸿. 含苯甲酸钠保鲜剂对切花的保鲜效果研究[J]. *广西科学*, 2006, 13(1):65-70.
- [52] Schmidt E, Knackmuss H J. Production of *cis,cis*-muconate from benzoate and 2-fluoro-*cis,cis*-muconate from 3-fluorobenzoate by 3-chlorobenzoate degrading bacteria[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1984, 20:351-355.
- [53] Choi W J, Lee E Y, Cho M H, et al. Enhanced production of *cis,cis*-muconate in a cell-recycle bioreactor [J]. *J Ferment Bioeng*, 1997, 84:70-76.
- [54] Mizuno S, Yoshikawa N, Seki M, et al. Microbial production of *cis,cis*-muconic acid from benzoic acid[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1988, 28:20-25.
- [55] Bang S G, Choi W J, Choi C Y, et al. Production of *cis,cis*-muconic acid from benzoic acid *via* microbial transformation[J]. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 1996, 1:36-40.
- [56] 蔡宝立, 张富国, 张心平, 等. 苯甲酸类化合物的微生物降解研究[J]. *应用与环境生物学报*, 1998, 4:286-289.
- [57] 叶淑红, 丁鸣, 何连芳, 等. 辽东湾北岸滨海湿地降解苯甲酸类化合物的微生物研究[J]. *海洋环境科学*, 2005, 24:47-49.
- [58] 张富国, 王玉香, 韩宇宁, 等. 假单胞菌 SH1 菌株对苯甲酸类化合物的生物降解[J]. *南开大学学报:自然科学版*, 1999, 32:42-46.

(责任编辑:陆雁)