

综述

生物合成对羟基苯甲酸的研究进展

朱莉, 许超艳, 李晶晶, 田俊, 冯昭中, 彭学

江苏师范大学 生命科学学院, 江苏 徐州 221116

朱莉, 许超艳, 李晶晶, 等. 生物合成对羟基苯甲酸的研究进展. 生物工程学报, 2015, 31(3): 328–337.

Zhu L, Xu CY, Li JJ, et al. Recent advances in biosynthesis of 4-hydroxybenzoate. Chin J Biotech, 2015, 31(3): 328–337.

摘要: 对羟基苯甲酸 (4-Hydroxybenzoate, 4HBA) 是用途广泛的有机原料, 现行的生产工艺是以石油成分合成而得, 在环境污染不断恶化、人类生存已经面临威胁之际, 开发利用可再生资源的生产工艺已成为全球当务之急。本综述在简要介绍从石油成分合成 4HBA 之后, 主要阐述利用植物和微生物从可再生资源合成 4HBA 的研究进展。莽草酸途径是生物合成芳香族化合物的重要途径, 从该途径的最终产物分支酸到 4HBA 有两条途径。一条是分支酸裂解酶直接催化分支酸生成 4HBA (莽草酸-分支酸路线)。另外一条途径是在植物细胞内引入荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescens* 的对羟基肉桂酸-CoA 裂解酶打通从苯丙素合成 4HBA 的通路 (植物苯丙素路线)。最后介绍了一个天然合成积累 4HBA 的微泡菌 *Microbulbifer*, 并对其深入研究进行了展望。

关键词: 对羟基苯甲酸, 合成生物学, 莽草酸途径

Recent advances in biosynthesis of 4-hydroxybenzoate

Li Zhu, Chaoyan Xu, Jingjing Li, Jun Tian, Zhaozhong Feng, and Xue Peng

School of Life Sciences, Jiangsu Normal University, Xuzhou 221116, Jiangsu, China

Abstract: 4-Hydroxybenzoate (4HBA) is an important chemical compound used for synthesis of liquid crystal. Production of 4HBA from renewable resources is an effective mean to solve problems such as environmental pollution and petroleum shortage. This review briefly introduces the chemical synthesis of 4HBA from oil compounds, and mainly describes the progress in 4HBA biosynthesis from renewable resources by plants and microorganisms. In most intriguing aspect of plant-based synthesis of 4HBA is the appeal of directly synthesizing a chemical from CO₂. However, the

Received: May 28, 2014; **Accepted:** October 15, 2014

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31240088), Science and Technology Project of Xuzhou (No. XM12B105), Jiangsu Science and Technology Agency Project (No. BK20141148).

Corresponding author: Xue Peng. Tel/Fax: +86-516-83500033; E-mail: pengxue@jsnu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31240088), 徐州市科技项目 (No. XM12B105), 江苏科技厅项目 (No. BK20141148) 资助。

网络出版时间: 2014-12-03

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13345/j.cjb.140300.html>

glucosylation system in plant cells converting 4HBA to glucose conjugates, causing the post treatment a problem. The recombinant microorganisms produce pure 4HBA, but less efficient. A new strain of *Microbulbifer* has ability to naturally accumulate 4HBA from glucose. Elucidation of the metabolic pathways and regulation systems would improve 4HBA synthesis efficiency.

Keywords: 4-hydroxybenzoate, synthetic biology, shikimate pathway

对羟基苯甲酸 (4-Hydroxybenzoate, 4HBA) 是用途广泛的有机合成原料, 主要应用于食品、化妆品、医药的防腐和防霉剂、杀菌剂的合成方面。2002 年, 我国 4HBA 的生产量为 6 000 t, 并以每年 11.4% 的速度递增, 预计 2014 年的生产量可达 20 000 t 以上^[1]。4HBA 的用途之一是 4HBA 酯类的合成, 该酯类化合物的英文名为 Paraben, 其中甲酯又称为尼泊金甲, 乙酯又称为尼泊金乙, 是目前使用最多的防腐剂^[2]。4HBA 的另外一个重要用途是合成液晶高分子^[3]。液晶是在 1959 年利用 4HBA 的乙酸酯经熔融和固相聚缩合后首次获得, 后来经过改良成具有实用价值的材料。现在市场上的液晶商品“Xydar”是 4HBA、对苯二酚和酞酸的聚合物; “X-7G”是 4HBA 和聚对苯二甲酸乙二酯在熔融状态下的聚合物; “Vectra”是 4HBA 和 2-羟基-6-萘甲酸熔融聚合物; “Tian”是 4HBA 和 2-羟基-6-萘甲酸及对苯二酚的聚合物。

随着信息化社会的不断发展, 4HBA 的市场需求量日益增加, 现行的 4HBA 生产工艺是从石油成分合成而得, 在环境污染的不断恶化、人类的生存已经面临威胁之际, 利用可再生资源代替以石油为原料的生产工艺已成为全球当务之急。4HBA 的化学结构类似于芳香族氨基酸, 在理论上利用生物的芳香族氨基酸合成途径, 即莽草酸途径 (Shikimate pathway) 可以合成 4HBA。这篇综述首先介绍现行的 4HBA

化学合成工艺, 然后着重阐述利用植物和微生物从可再生资源合成 4HBA 的实例, 为生物合成 4HBA 提供理论依据。

1 从石油成分合成 4HBA

1.1 化学合成

现行的 4HBA 生产工艺是以石油产物的苯 (Benzene) 和丙烯 (Propylene) 出发, 在催化剂氯化铝的存在下高温高压合成异丙苯 (Cumene), 然后将异丙苯在 80–130 °C 左右用氧气氧化成过氧化氢异丙苯 (Cumenehydroperoxide) (图 1A)。过氧化氢异丙苯在酸性和 60–100 °C 条件下生成苯酚 (Phenol)^[4]。从苯酚到 4HBA 的制备有多种方法。常规工艺是利用 Kolbe-Schmitt 反应, 即将苯酚加入 KOH 制备成酚钾盐, 然后与二氧化碳在高温高压下进行气固相羧基化反应生成 4HBA。整个合成工艺必须在高温高压下进行, 需要消耗大量能源导致生产效率低成本高。特别是合成途径中有环境污染物质苯酚的生成, 给工业排水的处理带来很大困难^[5]。

1.2 生物转化

白色生物技术 (White biotechnology) 是近年来提出的新概念, 即利用已知的代谢调节机理对各种微生物进行改造, 构建成一个“细胞工厂”, 使其更好地服务于人类。甲苯 (Toluene) 是石油中的一种没有得到有效利用的芳香族成分, 一些研究人员利用白色生物技术将恶臭假

单胞菌 *Pseudomonas putida* DOT-T1E 改造成一个从甲苯合成 4HBA 的细胞工厂^[6-9] (图 1B)。DOT-T1E 菌株本来是甲苯降解菌株, 且耐有机溶剂。DOT-T1E 菌株降解甲苯的第一步是由甲苯双加氧酶催化将甲苯氧化为 *cis*-甲苯 2,3-二氢二醇 (*cis*-Toluene 2,3-dihydrodiol), 该酶由 *todC1C2BA* 基因编码。*todD* 基因编码的脱氢酶将 *cis*-甲苯 2,3-二氢二醇氧化成 3-甲基苯二酚

(3-Methylcatechol), 然后开环后进入三羧酸循环。

Ramos-González 等^[6]将编码甲苯双加氧酶基因中的 *todC* 基因敲除, 同时将该菌株的 *pobA* 基因也敲除掉构建成一个甲苯营养缺陷型 (DOT- Δ *todC* Δ *pobA*), *pobA* 编码的是 4HBA-4-羟化酶, 催化氧化 4HBA 成原儿茶酸 (Protocatechuate) 的反应。DOT- Δ *todC* Δ *pobA* 成为不能降解甲苯和 4HBA 的菌株。在此遗传背景下, 负责转化甲苯

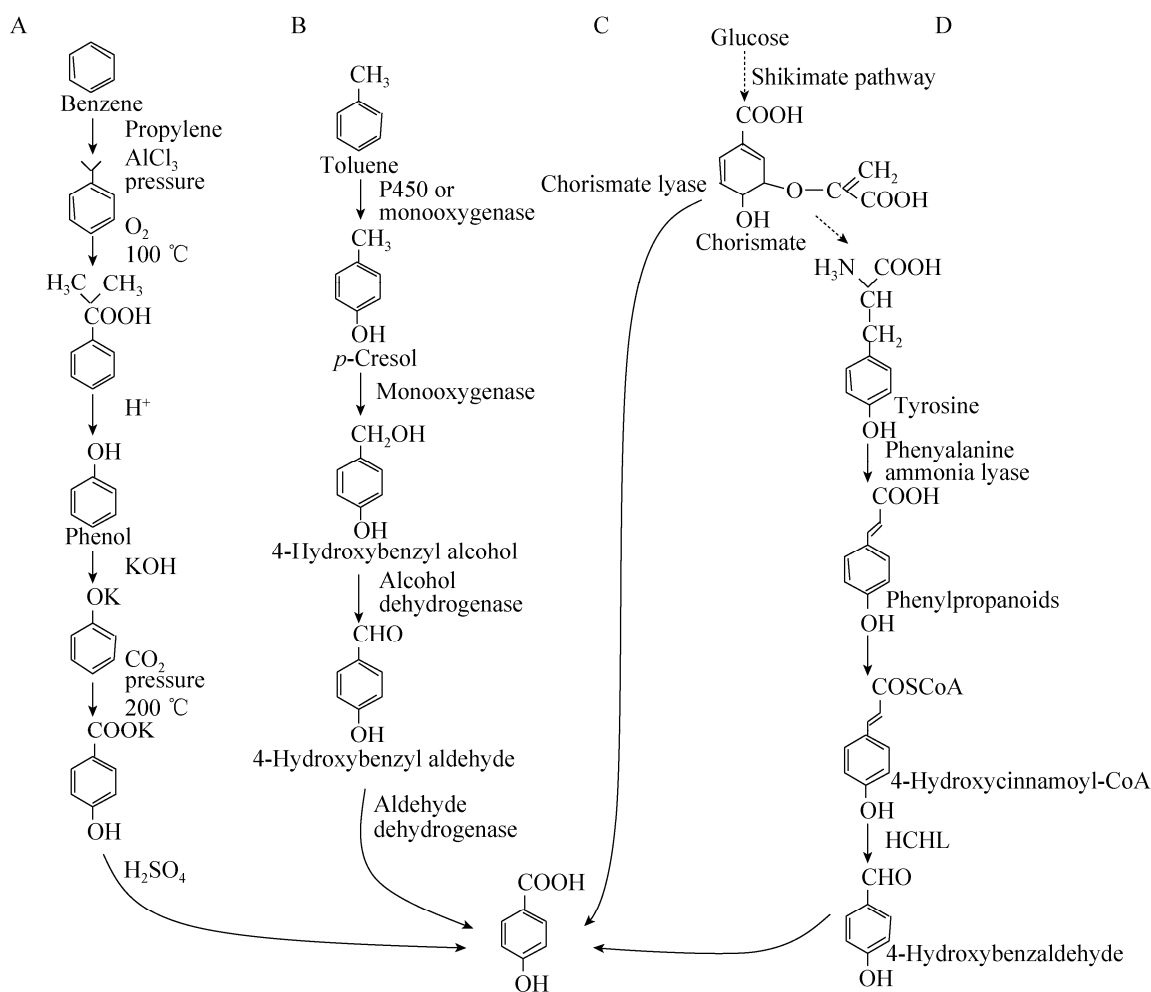


图 1 利用石油成分和可再生资源的 4 条 4HBA 合成途径

Fig. 1 Four 4HBA synthetic routes from oil compounds and renewable source. (A) Chemical synthesis route with benzene as raw material. (B) Biocatalysis synthesis route with toluene as raw material. (C) Shikimate-chorismate pathway. (D) Plant phenylpropanoids pathway.

至 4HBA 的一系列基因从门多萨假单胞菌 *Pseudomonas mendocina* KR1 菌株引入到该菌株的染色体中,构建成 DOT-T1E-24 菌株。这一系列基因包括: *tmoABCDEF*, 编码甲苯单加氧酶,催化的反应是在甲苯的 4 位引入一个羟基生成甲酚 (*p*-Cresol); *pcuBXA* 编码甲酚单加氧酶,催化将甲酚氧化为 4-羟基苯醇 (4-Hydroxybenzyl alcohol) 和进一步氧化为 4-羟基苯醛 (4-Hydroxybenzyl aldehyde) 的两步反应; *pcuC* 编码 4-羟基苯醛脱氢酶,催化生成 4HBA 的反应。在摇瓶分批培养条件下 DOT-T1E-24 菌株成功将甲苯转化成 4HBA,并得到 12 mmol/L 的积累记录。从石油成分甲苯出发,理论上一个甲苯可以合成一个 4HBA。

2 利用植物的生物合成

2.1 利用莽草酸途径的 4HBA 合成

莽草酸途径由 7 步反应合成分支酸 (Chorismate),是普遍存在于植物、真菌和细菌中的一条重要芳香族氨基酸合成代谢途径。第一步是赤藓糖-4-磷酸和磷酸烯醇式丙酮酸缩合成一个七碳酮糖开环磷酸化合物,3-脱氧- β -阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸 (DAHP)^[10]。磷酸烯醇式丙酮酸和赤藓糖 4-磷酸分别是糖酵解途径和磷酸戊糖途径上的重要中间代谢产物。分支酸是合成酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸的分支点,从分支酸到 4HBA 的合成途径有 3 条。

第一条是分支酸裂解酶 (Chorismate lyase, UbiC) 直接催化分支酸生成 4HBA (分支酸裂解酶途径)^[11-12] (图 1C)。第二条是利用合成苯丙素 (Phenylpropanoids) 的途径 (苯丙素途径) (图 1D)。苯丙氨酸解氨酶催化脱掉芳香族氨基酸上的氨

基生成相应的苯丙素,然后和 CoA 链接成对羟基肉桂酸-CoA (4-Hydroxycinnamoyl-CoA)。对羟基肉桂酸-CoA 裂解酶 (4-Hydroxycinnamoyl-CoA lyase, HCHL),催化对羟基肉桂酸-CoA 的侧链生成对羟基苯甲醛 (4-Hydroxybenzaldehyde),然后该产物被氧化成 4HBA^[13]。HCHL 基因在植物中不存在,从外源引入后能打通从苯丙素合成 4HBA 的通路。第三条在胡萝卜 *Daucus carota* 中被发现,属于对羟基肉桂酸-CoA 非依赖途径^[14-16]。苯丙氨酸在苯丙氨酸解氨酶的催化下生成肉桂酸 (Cinnamate),肉桂酸羟化酶在 4 位引入一个羟基,生成对羟基肉桂酸,再通过非氧化途径 (Non- β -oxidative route) 合成 4HBA。植物细胞是从 CO₂ 合成的,无论哪条途径,其理论得率是 4HBA/7CO₂。

2.2 重组植物

利用重组烟草作为 4HBA 的生产宿主有两个报道。一是 Mayer 等^[17]在烟草的细胞质内表达荧光假单胞菌 *Pseudomonas fluorescence* AN103 的 HCHL 基因,使酪氨酸能够生成 4HBA。获得的 4HBA 产量为烟草总量的 2.9%,但是得到的 4HBA 都是葡糖基化产物,而且重组烟草的生长受到影响。二是杜邦公司的 Viitanen 等^[18]和 Sommer 等^[19-20]把大肠杆菌的 *ubiC* 基因转化到烟草的叶绿体染色体上,并在其上游插入在叶绿体中特异转录的启动子。*ubiC* 基因在烟草的叶绿体内表达成功,并合成了 4HBA,产量为烟草总量的 13%,但得到的 4HBA 也都是葡糖基化产物。

另外利用植物作为 4HBA 生产宿主的还有 Rahman 等^[21]把 HCHL 基因重组到甜菜 *Beta vulgaris* 染色体中合成了葡糖基化和酯化 4HBA,产量为

甜菜总重的 14%。Mitra 等^[22]把荧光假单胞菌 *P. fluorescence* AN103 的 *HCHL* 基因重组到曼陀罗甜菜 *Daturastramonium* 染色体中合成了葡糖基化和酯化 4HBA, 产量为曼陀罗甜菜总重的 0.5%。McQualter 等^[23]向甘蔗 *Sugarcane* 内分别导入了 *HCHL* 基因和 *ubiC* 基因, 比较了 4HBA 的产量, 发现 *HCHL* 基因重组株的产量高于 *ubiC* 基因重组株。从 *HCHL* 基因重组株的叶子中得到葡糖基化和酯化 4HBA, 产量为叶子总重的 7.3%。利用 0.1 mol/L 的 NaCl 水解葡糖基化和酯化 4HBA 可以获得 4HBA。

利用光合作用的植物合成 4HBA 的最大优点是直接利用二氧化碳, 省去了繁琐的木质纤维素的糖化过程。但是植物细胞中含有葡糖基转移酶, 将 4HBA 葡糖基化或酯化, 给下游提纯工程带来困难。另外利用胡萝卜、甜菜和甘蔗等食物资源生产工业原料会造成粮食价格的上涨, 给社会带来不安定因素。

3 利用微生物的生物合成

3.1 大肠杆菌 *Escherichia coli*

利用微生物生产 4HBA 的研究和植物相比比较少。美国密歇根州立大学的 Frost 教授课题组^[24]对大肠杆菌进行了一系列的重组转化, 构建了一株重组菌从葡萄糖生物合成了 4HBA。在大肠杆菌中生物合成的 4HBA 没有被糖基化或酯化。该课题组利用的菌株是 *E. coli* D2704 [*pheA**tyrA**trpE*-C], 合成酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的 3 个基因 (*pheA*、*tyrA* 和 *trpE*) 均被敲除。因此培养 *E. coli* D2704 时必须在培养基中加入 3 种芳香族氨基酸。在 *E. coli* D2704 的染色体上引入了 3 个外源基因: 一个是经过诱变的 DAHP

合成酶基因 *aroF*^{FRB}, 其酶活性不受中间代谢产物的反馈抑制; 二是分支酸裂解酶 *ubiC* 基因, 负责将分支酸转化成 4HBA; 三是转酮醇酶 *tklT* 基因, 用来大量提供莽草酸途径的中间体赤藓糖 4-磷酸。最后向该重组菌中转化了一个在 *tac* 启动子下高效表达一系列莽草酸途径基因的质粒, 包括 3-磷酸莽草酸 1-羧乙烯基转移酶基因 *aroA*、莽草酸激酶基因 *aroL*、分支酸合成酶基因 *aroC* 和 3-脱氢奎尼酸基因 *aroB*。最终构建的菌株名为 *E. coli* JB161 [pJB2.274]。在实验室规模上生产了 12.0 g/L 4HBA (98.4 mmol/L), 对葡萄糖的收率为 13%。另外 Barker 等^[24]还调查了 4HBA 对大肠杆菌的毒性。实验证明 10 g/L 的 4HBA 会抑制大肠杆菌的生长繁殖, 同时抑制了莽草酸的中间体 3-脱氢莽草酸的产量。以上实验说明利用重组大肠杆菌生产的 4HBA 虽然没有被糖基化或酯化, 但是 4HBA 对大肠杆菌表现出了毒性, 提高产量比较困难。另外培养基中需要添加芳香族氨基酸, 使培养基的制备复杂化而且生产成本提高。

3.2 恶臭假单胞菌 *Pseudomonas putida*

恶臭假单胞菌 *P. putida* S12 是一个耐有机溶剂菌株, Verhoef 等^[25-26]将其 4HBA 羟化酶 (4HBA hydroxylase) 基因 *pobA* 敲除后, 转化了一个载有苯丙氨酸解氨酶 (Phenylalanine ammonia lyase, Pal) 基因的质粒, 构建成 S12palB1 菌株, 该菌株失去了降解 4HBA 的能力。S12palB1 菌株能将酪氨酸通过苯丙氨酸解氨酶转化为对羟基肉桂酸, 然后利用对羟基肉桂酸降解途径合成 4HBA。以葡萄糖为初始基质在摇瓶中培养 S12palB1 菌株得到 11% 4HBA/葡萄糖 (Cmol%)。为了提高莽草酸途径的前体

赤藓糖-4-磷酸的供应,Meijnen 等^[27]将大肠杆菌的木糖降解基因 *xyiAB* 引入到 S12palB1 菌株的染色体上构建成 S12xyiB7 菌株,使该菌株获得了利用木糖的功能。*xyiAB* 基因分别编码木糖异构酶和木酮糖激酶,催化木糖转化为木酮糖-5-磷酸的反应,构建了从木糖到赤藓糖-4-磷酸的途径。在同时提供甘油和木糖的培养基中,合成出来的 4HBA 对基质的收率为 16.3% (Cmol%)。4HBA 是从葡萄糖合成而得,如果葡萄糖的 6 个碳在发酵过程中没有生成 CO₂ 释放出去,全部用于 4HBA 的合成,那么碳的理论收率 (Cmol%) 应该为 100%,而质量的理论收率 (W/W) 为 65.6%^[28]。从这个数字来看,开发改造的潜力非常大。

3.3 酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae*

Krömer 等^[29]将酿酒酵母 *S. cerevisiae* 的编码分支酸变位酶 (Chorismate mutase) 基因 *aro7* 敲除掉构建成 *aro7* 菌株,因此该菌株是酪氨酸和苯丙氨酸的营养缺陷型。然后把载有大肠杆菌 *ubiC* 基因的质粒转化进 *aro7* 菌株中构建成 *aro7pCV3-UBIC* 菌株。该菌株从 83.3 mmol/L 葡萄糖合成了 650 μmol/L 的 4HBA,相当于 0.6% 4HBA/葡萄糖。产量不是很理想,这是由于大肠杆菌的 *ubiC* 基因的密码子偏好性和酿酒酵母的差异很大,*ubiC* 基因没有得到有效表达。迄今为止没有发现酿酒酵母的 *ubiC* 基因,今后只能通过人工改良大肠杆菌的 *ubiC* 基因来提高 4HBA 的产量。另外酿酒酵母也不存在对羟基肉桂酸降解途径,从酪氨酸合成 4HBA 的难度很大。利用酿酒酵母作为 4HBA 合成宿主的最大优点是糖利用效率高,而且高浓度的糖不抑制菌株的生长繁殖。

4 微泡菌 *Microbulbifer* 的次级代谢产物

4.1 微泡菌 *Microbulbifer*

微泡菌 *Microbulbifer* 又称溶藻细菌,属于变形菌纲,广泛分布于海洋环境中,它生产的生理活性物质以及海藻成分降解酶等越来越受到人们的重视^[30-32]。2006 年,本课题组首次发现从海洋环境中分离出的微泡菌 *Microbulbifer* 菌株有合成 4HBA 和 4HBA 酯类的功能,在我们的调查范围内 A4B-17 菌株所合成的量最多^[33]。后来 Quévrain 等^[34]在 2009 年也报道了他们分离的微泡菌 *Microbulbifer* 菌株也合成了 4HBA。合成积累 4HBA 和酯类是微泡菌 *Microbulbifer* 的一个特征。4HBA 是芳香族高分子木质素的降解产物,在土壤环境中很多微生物拥有降解 4HBA 基因,4HBA 不会在体内外积累^[35-37]。微泡菌 *Microbulbifer* 是在海洋环境中生存的微生物,表现出和土壤环境不同的面目,不但不降解而且还合成积累 4HBA。

4.2 微泡菌 *Microbulbifer* sp. A4B-17 菌株

微泡菌 *Microbulbifer* sp. A4B-17 菌株在含有葡萄糖的培养基中培养时有合成积累 4HBA 和其酯化物的功能,当细胞进入稳定期后在培养基里积累了 10 mg/L 的 4HBA 和各种酯化物,总量约 30 mg/L。虽然 4HBA 的量不是很高,但是野生菌株合成积累 4HBA 的能力是首次发现。如果适当发挥其天然潜力,对 A4B-17 菌株的 4HBA 合成基因进行改造,有望合成更多的 4HBA,以满足工业生产的需求。

4HBA 和相应醇类酯化后的产物叫 4HBA 酯类 (Parabens)。1920 年,人工合成并发现 4HBA 酯类有抑菌作用后,由于 4HBA 酯类具有价格便宜、无色、无毒、较为广泛的抑菌谱且抑

菌作用不受 pH 影响等特点, 现在作为防腐剂广泛应用于食品和化妆品的保存方面^[38-40]。以前认为 4HBA 酯类是人工化合物, 我们的发现阐明微泡菌 *Microbulbifer* 早已经把它们当作抑菌剂, 遏制周围微生物的生长繁殖扩大自己的生存空间。通过 A4B-17 菌株的次级代谢产物的研究也会使我们了解海洋环境中微生物与微生物之间的拮抗作用。研究还发现, A4B-17 菌株的次级代谢产物中含有 4HBA 丁酯、4HBA 壬酯和 4HBA 庚酯, 而且是按照梯度“4HBA 丁酯>4HBA 壬酯>4HBA 庚酯”合成出来的。而这个梯度具有生理意义, 是有效抑制微生物生长的合理梯度。是什么调控机制使 A4B-17 菌株按照这个梯度合成 4HBA 酯类, 这个梯度是否受到环境因素的影响? 这些问题将在今后的研究中阐明。

本课题组完成了 A4B-17 菌株的基因组测序和注释工作。A4B-17 菌株不含有质粒, 只有一个染色体, 全长为 5 040 512 bp, 共预测出 4 766 个基因。A4B-17 菌株有 3 条葡萄糖降解途径 (糖酵解途径、磷酸戊糖途径和 Entner-Doudoroff (ED) 途径)。而且还预测出一些酶催化连接这 3 条途径的反应, 因此从葡萄糖至烯醇式丙酮酸和赤藓糖-4-磷酸的途径非常通畅。

5 展望

利用植物合成 4HBA 的缺点是 4HBA 在植物中是以葡糖基化或酯化产物的形式存在, 给下游提纯工程带来困难, 特别是苯丙素 (Phenylpropanoids) 合成途径中的一些步骤尚不明。利用细菌作为合成 4HBA 的细胞工厂有以下优点: 1) 细菌的生长繁殖速度快, 代谢周期短; 2) 4HBA 的合成可以部分利用细菌的芳

香族氨基酸的合成途径; 3) 4HBA 对细菌的毒性较小, 可以高浓度积累生产; 4) 没有对环境和人类有害的中间产物生成; 5) 在中国, 苯、甲苯和葡萄糖的价格分别为每吨 6 200、9 800 和 2 900 元, 而 4HBA 的价格为 25 000 元/t^[41]。虽然从苯和甲苯出发理论上可以获得 100% 的 4HBA 收率, 而葡萄糖转化为 4HBA 的理论收率也为 65.6% (W/W), 葡萄糖的价格相对较低, 经过计算理论上可以获得 4 421 元/t 的 4HBA。无论从环境角度还是经济角度利用微生物从可再生资源的葡萄糖合成 4HBA, 理论上要优于其他方法。

目前虽然利用重组微生物合成 4HBA 有一定的研究进展, 但是这些微生物都是本身不合成积累 4HBA 的菌株, 通过复杂的改造代谢途径和反馈调控机制会给 4HBA 的高效生产带来局限性。本课题组拟采取以下策略研究开发 A4B-17 菌株。1) 合成基因研究。通过基因敲除、表达谱分析等手段验证 4HBA 合成途径中的关键基因功能, 如葡萄糖转运和磷酸化基因、赤藓糖-4-磷酸的合成基因、DAHP 合成酶基因和分支酸裂解酶基因。2) 阐明关键部位的调控机制。4HBA 和酯类都属于次级代谢产物, 它们的合成必将受到各种因素的影响。我们假设 3 种因素 (内在因素、物化因素和抑制对象) 对代谢途径上的 3 个作用位点 (PEP 位点、4-磷酸赤藓糖位点、分支酸位点) 有一定影响。PEP 位点包括 PEP 激酶和 DAHP 合成酶; 4-磷酸赤藓糖位点包括转酮酶和 DAHP 合成酶; 分支酸位点包括分支酸裂解酶、邻氨基苯甲酸合成酶 (Anthranilate synthase) 和分支酸变位酶。本课题组将利用天然合成积累 4HBA 的 A4B-17 菌株作为宿主, 在深入研究代谢途径和调控机制的基础上开发合成 4HBA 的工业微生物。

REFERENCES

- [1] Chem SJ. Status quo and development trends of PHBA in China. *Fine Spec Chem*, 2003, 11(12): 6-7 (in Chinese).
甲醛/甲醇信息研究室. 我国对羟基苯甲酸的现状和发展趋势. *精细与专用化学品*, 2003, 11(12): 6-7.
- [2] Abbas S, Greige-Gerges H, Karam N, et al. Metabolism of parabens (4-hydroxybenzoic acid esters) by hepatic esterases and UDP-glucuronosyltransferases in man. *Drug Metab Pharmacok*, 2010, 25(6): 568-577.
- [3] Yan B, Zhang YF, Liang ZJ, et al. Application of *p*-hydroxybenzoic acid in organic synthesis. *Fine Chem Ind R Mat Int*, 2010, 245(12): 42-44 (in Chinese).
严兵, 章亚峰, 梁子军, 等. 对羟基苯甲酸在有机合成中的应用. *精细化工原料及中间体*, 2010, 245(12): 42-44.
- [4] Li HY, Yan CH, Cai QH, et al. Progress in preparation of phenol. *Chem Eng*, 2010, 179(8): 34-37 (in Chinese).
李红艳, 闫翠红, 蔡青海, 等. 苯酚制备工艺研究进展. *化学工程师*, 2010, 179(8): 34-37.
- [5] Li GD. Synthesis of *p*-hydroxybenzoic acid. *Nat Sci J Xiangtan Univ*, 1988, 10(1): 101-107 (in Chinese).
李国淦. 对羟基苯甲酸合成的研究. *湘潭大学自然科学学报*, 1988, 10(1): 101-107.
- [6] Ramos-González MI, Ben-Bassat A, Campos MJ, et al. Genetic engineering of a highly solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strain for biotransformation of toluene to *p*-hydroxybenzoate. *Appl Environ Microbiol*, 2003, 69(9): 5120-5127.
- [7] Miller ES Jr1, Peretti SW. Toluene bioconversion to *p*-hydroxybenzoate by fed-batch cultures of recombinant *Pseudomonas putida*. *Biotechnol Bioeng*, 2002, 77(3): 340-351.
- [8] Bailey LJ, Acheson JF, McCoy JG, et al. Crystallographic analysis of active site contributions to regioselectivity in the diiron enzyme toluene 4-monooxygenase. *Biochemistry*, 2012, 51(6): 1101-1113.
- [9] Peng X, Taki H, Komukai S, et al. Characterization of four *Rhodococcus* alcohol dehydrogenase genes responsible for the oxidation of aromatic alcohols. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 71(6): 824-832.
- [10] Li PP, Li DF, Liu D, et al. Interaction between DAHP synthase and chorismate mutase endows new regulation on DAHP synthase activity in *Corynebacterium glutamicum*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2013, 97(24): 10373-10380.
- [11] Siebert M, Severin K, Heide L. Formation of 4-hydroxybenzoate in *Escherichia coli*: characterization of the *ubiC* gene and its encoded enzyme chorismate pyruvate-lyase. *Microbiology*, 1994, 140(4): 897-904.
- [12] Siebert M, Sommer S, Li SM, et al. Genetic engineering of plant secondary metabolism. Accumulation of 4-hydroxybenzoate glucosides as a result of the expression of the bacterial *ubiC* gene in tobacco. *Plant Physiol*, 1996, 112(2): 811-819.
- [13] Mitra A, Kitamura Y, Gasson MJ, et al. 4-Hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase (HCHL): an enzyme of phenylpropanoid chain cleavage from *Pseudomonas*. *Arch Biochem Biophys*, 1999, 365(1): 10-16.
- [14] Sircar D, Roychowdhury A, Mitra A. Accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucuscarota*. *J Plant Physiol*, 2007, 164(10): 1358-1366.
- [15] Sircar D, Mitra A. Evidence for *p*-hydroxybenzoate formation involving enzymatic phenylpropanoid side-chain cleavage in hairy roots of *Daucuscarota*. *J Plant Physiol*, 2008, 165(4): 407-414.
- [16] Sircar D, Mitra A. Accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid in hairy roots of *Daucuscarota* 2: confirming biosynthetic steps through feeding of inhibitors and precursors. *J Plant Physiol*, 2009, 166(13): 1370-1380.

- [17] Mayer MJ, Narbad A, Parr AJ, et al. Rerouting the plant phenylpropanoid pathway by expression of a novel bacterial enoyl-CoA hydratase/lyase enzyme function. *Plant Cell*, 2001, 13(7): 1669–1682.
- [18] Viitanen PV, Devine AL, Khan MS, et al. Metabolic engineering of the chloroplast genome using the *Escherichia coli ubiC* gene reveals that chorismate is a readily abundant plant precursor for *p*-hydroxybenzoic acid biosynthesis. *Plant Physiol*, 2004, 136(4): 4048–4060.
- [19] Sommer S, Heide L. Expression of bacterial chorismate pyruvate-lyase in tobacco: evidence for the presence of chorismate in the plant cytosol. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(11): 1240–1244.
- [20] Sommer S, Köhle A, Yazaki K, et al. Genetic engineering of shikonin biosynthesis hairy root cultures of *Lithospermum erythrorhizon* transformed with the bacterial *ubiC* gene. *Plant Mol Biol*, 1999, 39(4): 683–693.
- [21] Rahman L, Kouno H, Hashiguchi Y, et al. HCHL expression in hairy roots of *Beta vulgaris* yields a high accumulation of *p*-hydroxybenzoic acid (pHBA) glucose ester, and linkage of pHBA into cell walls. *Bioresour Technol*, 2009, 100(20): 4836–4842.
- [22] Mitra A, Mayer MJ, Mellon FA, et al. 4-Hydroxycinnamoyl-CoA hydratase/lyase, an enzyme of phenylpropanoid cleavage from *Pseudomonas*, causes formation of C6–C1 acid and alcohol glucose conjugates when expressed in hairy roots of *Daturastramonium* L. *Planta*, 2002, 215(1): 79–89.
- [23] McQualter RB, Chong BF, Meyer K, et al. Initial evaluation of sugarcane as a production platform for *p*-hydroxybenzoic acid. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3(1): 29–41.
- [24] Barker J, Frost JW. Microbial synthesis of *p*-hydroxybenzoic acid from glucose. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 76(4): 376–390.
- [25] Verhoef S, Ruijsenaars HJ, de Bont, et al. Bioproduction of *p*-hydroxybenzoate from renewable feedstock by solvent-tolerant *Pseudomonas putida* S12. *J Biotechnol*, 2007, 132(1): 49–56.
- [26] Verhoef S, Ballerstedt H, Volkers RJ, et al. Comparative transcriptomics and proteomics of *p*-hydroxybenzoate producing *Pseudomonas putida* S12: novel responses and implications for strain improvement. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 87(2): 679–690.
- [27] Meijnen JP, Verhoef S, Briedjil AA, et al. Improved *p*-hydroxybenzoate production by engineered *Pseudomonas putida* S12 by using a mixed-substrate feeding strategy. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 90(3): 885–893.
- [28] Burgard AP, Maranas CD. Probing the performance limits of the *Escherichia coli* metabolic network subject to gene additions or deletions. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 74(5): 364–375.
- [29] Krömer JO, Nunez-Bernal D, Aversch NJ, et al. Production of aromatics in *Saccharomyces cerevisiae*-a feasibility study. *J Biotechnol*, 2013, 163(2): 184–193.
- [30] Wakabayashi M, Sakatoku A, Noda F, et al. Isolation and characterization of *Microbulbifer* species 6532A degrading seaweed thalli to single cell detritus particles. *Biodegradation*, 2012, 23(1): 93–105.
- [31] Zhang DS, Huo YY, Xu XW, et al. *Microbulbifer marinus* sp. nov. and *Microbulbifer yueqingensis* sp. nov., isolated from marine sediment. *Int J Syst Evol Microbiol*, 2012, 62(3): 505–510.
- [32] Fu LJ, Li D, Wu CJ, et al. Effects of algicidal bacterium BS03 (*Microbulbifer* sp.) on the growth and antioxidant systems of *Alexandrium tamarense*. *Acta Microbiol Sin*, 2012, 52(6): 784–790 (in Chinese).
傅丽君, 李东, 吴承集, 等. 溶藻细菌 BS03 (*Microbulbifer* sp.) 对塔玛亚历山大藻生长及抗氧化系统的影响. *微生物学报*, 2012, 52(6): 784–790.
- [33] Peng X, Adachi K, Chen C, et al. Discovery of a

- marine bacterium producing 4-hydroxybenzoate and its alkyl esters, parabens. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(8): 5556–5561.
- [34] Quévrain E, Domart-Coulon I, Pernice M, et al. Novel natural parabens produced by a *Microbulbifer* bacterium in its calcareous sponge host *Leuconianivea*. *Environ Microbiol*, 2009, 11(6): 1527–1539.
- [35] Zhang XY, Peng X, Eiji M. Recent advances in *Sphingobium* sp. SYK-6 for lignin aromatic compounds degradation-A review. *Acta Microbiol Sin*, 2014, 54(8): 854–867 (in Chinese).
张晓琰, 彭学, 政井英司. 木质素芳香族化合物降解菌 *Sphingobium* sp. SYK-6 的研究进展. *微生物学报*, 2014, 54(8): 854–867.
- [36] Li JJ, Zhu L, Zhang XY, et al. Advances in 4-hydroxybenzoic acid degradation by microorganisms. *Microbiol China*, 2014, 41(10): 2134–2142 (in Chinese).
李晶晶, 朱莉, 张晓琰, 等. 微生物降解 4-羟基苯甲酸的研究进展. *微生物学通报*, 2014, 41(10): 2134–2142.
- [37] Peng X, Masai E, Kasai D, et al. A second 5-carboxyvanillate decarboxylase gene, *ligW2*, is important for lignin-related biphenyl catabolism in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(9): 5014–5021.
- [38] Cashman AL, Warshaw EM. Parabens: a review of epidemiology, structure, allergenicity, and hormonal properties. *Dermatitis*, 2005, 16(2): 57–66.
- [39] Chen JW, Li HM, Zhou RR. Utilization and detection method of *p*-hydroxybenzoate in food-stuff. *China Brewing*, 2008, 8(185): 4–5 (in Chinese).
陈建文, 厉华明, 周荣荣. 食品中对羟基苯甲酸酯类的应用现状与检测方法. *中国酿造*, 2008, 8(185): 4–5.
- [40] Shi JE, Liu JQ, Shang SX, et al. The analysis for application status of parabens preservatives in soy sauce and vinegar. *China Condiment*, 2011, 7(36): 11–12 (in Chinese).
石金娥, 刘静秋, 尚淑霞, 等. 对羟基苯甲酸酯类防腐剂在酱油、食醋中应用状况分析. *中国调味品*, 2011, 7(36): 11–12.
- [41] 阿里巴巴的原材料网页[EB/OL]. [2014-03-28]. <http://yl.1688.com/?spm=a260a.7398964.0.0>.

(本文责编 郝丽芳)