

芳香化合物羟基化酶研究进展*

张强 曲媛媛** 周集体 苟敏 皮文清

(大连理工大学环境与生命学院工业生态与环境工程教育部重点实验室 大连 116024)

摘要 芳香族化合物的选择性羟基化是合成化学中最具挑战性的化学反应之一,特别是由于近年来羟基芳香族化合物在医学上作为前驱体使用,使其越来越受到重视.通过单一酶或者整个微生物细胞进行的生物催化氧传递,是完成芳香化合物选择性羟基化反应的一种有效方式,不仅在受污染环境的生物修复中作用重大,而且还可以替代并拓宽传统的化工合成工艺,广泛用于化工中间体的生产,这使得芳香化合物羟基化酶成为重要的工业用酶之一.本文综述了芳香化合物羟基化酶的种类、作用机理及工业应用等方面的最新研究进展.图5 表1 参42

关键词 加氧酶; 过氧化物酶; P450; 非血红素铁加氧酶; 羟基化

CLC Q554.1 : X172

Advances in Hydroxylation of Aromatic Compounds with Oxygenase*

ZHANG Qiang, QU Yuanyuan**, ZHOU Jiti, GOU Min & PI Wenqing

(Key Laboratory of Industrial Ecology and Environmental Engineering of Ministry of Education of China, School of Environmental and Biological Science and Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning, China)

Abstract Aromatic oxygenases are able to catalyze the selective hydroxylation of aromatic compounds, and the hydroxylation products could be used as the major chemical intermediates. Therefore, these oxygenases are becoming the main objects in the fields of biotechnology and chemistry. Selective hydroxylation of aromatic compounds is among the most challenging chemical reactions in synthetic chemistry and has gained steadily increasing attention during recent years, particularly because of the use of hydroxylated aromatics as precursors for pharmaceuticals. Biocatalytic oxygen transfer by isolated enzymes or whole microbial cells is an elegant and efficient way to achieve selective hydroxylation. It plays an important role not only in the bioremediation of the polluted environment, but also in chemical synthesis. Those enzymes are one of the important industrial enzymes, and they can be applied in the production of oxidative materials directly or indirectly and can overcome many problems of chemical synthesis. The recent advances in the studies on the aromatic hydroxylation oxygenases, and their mechanism and application in industry are summarized in this paper. Fig 5, Tab 1, Ref 42

Keywords oxygenase; peroxidase; P450; non-heme iron dioxygenase; hydroxylation

CLC Q554.1 : X172

芳香化合物是一类难降解的有机污染物,随着工业化社会的快速发展,正以每年数百万吨的数量向环境中排放,对人类健康及生态环境具有很大的危害性.有关芳香化合物的生物降解已有很多报道^[1-3],研究表明,芳香化合物生物降解主要包括两个过程:初始的羟化反应及芳香环的断裂反应.羟基化过程,即把羟基加到芳烃分子上的氧传递过程.芳香化合物加氧酶可直接利用O₂或者H₂O₂作为氧供体,或者通过自由基中间体等间接方式把氧原子加到芳烃分子上.由于不同芳香化合物羟基化的产物不同,而这些羟基化产物又是化工及有机合成过程的重要中间体,因此,近年来羟基化酶成为生物及化学领域的研究热点^[4,5].本文综述了芳香化合物羟基化酶的种类、作用机理及工业应用等方面的最新研究进展.

1 芳香化合物羟基化过程简介

1.1 芳香族化合物羟基化酶及其类型

真正意义上的关于芳香化合物加氧酶的研究开始于

1955年, Hayaishi和Mason等证明,在加氧酶的作用下,氧分子中的一个或两个氧原子能直接加到芳香化合物的苯环上^[6,7].随后, Hayaishi又证明了从古菌到哺乳动物,所有的生物都能进行这种酶反应,并把这种酶定义为加氧酶^[8],即羟基化酶.

多数加氧酶利用分子氧进行催化反应,少量植物和真菌中的酶可以利用过氧化物中的氧,并且大多数加氧酶的反应都是在细胞内发生的,只有酪氨酸酶和过氧化物酶的反应在细胞外进行.表1列出了几种典型的芳香化合物加氧酶.

1.2 芳香化合物羟基化的基本途径

芳香化合物在双加氧酶、单加氧酶、过氧化物酶及酪氨酸酶的催化作用下,分别转化成顺式二氢二醇类化合物、环氧中间体、环氧中间体及邻苯二酚类化合物,这些化合物再经脱氢、重排等反应转化成最终的终产物:邻苯二酚类化合物、酚类产物、醌类产物及苯醌类产物.其基本反应路径如图1所示.

2 芳香族化合物羟基化酶

基于不同的催化反应过程,芳香化合物羟基化酶可分为单加氧酶(有时也被命名为羟化酶或混合型氧化酶^[9])和双加

收稿日期: 2008-06-05 接受日期: 2008-11-05

*国家自然科学基金项目(No. 50608011)资助 Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 50608011)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: qyy007@126.com)

表1 几种芳香化合物加氧酶
Table 1 Several oxygenases of aromatic compounds

类型 Type	举例 Example	微生物 Microorganism	芳烃底物 Aromatic substrate	主要产物 Major product
单加氧酶 Monooxygenase (MO)	甲苯单加氧酶 Toluene monooxygenase (ToMO)	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	甲苯, 甲酚, 苯, 苯乙烯, 萘 Toluene, cresols, benzene, styrene, naphthalene	对甲酚 <i>p</i> -cresol
	苯基丙氨酸羟化酶 Phenylalanine hydroxylase (PAH)	<i>Chromobacterium violaceum</i>	苯丙氨酸 Phenylalanine	酪氨酸 Tyrosine
双加氧酶 Dioxygenase (DO)	萘双加氧酶 Naphthalene dioxygenase (NDO)	<i>Pseudomonas putida</i>	萘, 甲苯, 苯 Naphthalene, toluene, benzene	顺式-1,2-二氢二萘基萘 Cis-1,2-dihydro-naphthalene
	Fe ²⁺ /α-酮酸双加氧酶 Fe ²⁺ /α-keto acid dioxygenase (Fe ²⁺ /α-KG DO)	Aerobic organisms	类黄酮 Flavonoids	羟基类黄酮 Hydroxyflavonoids

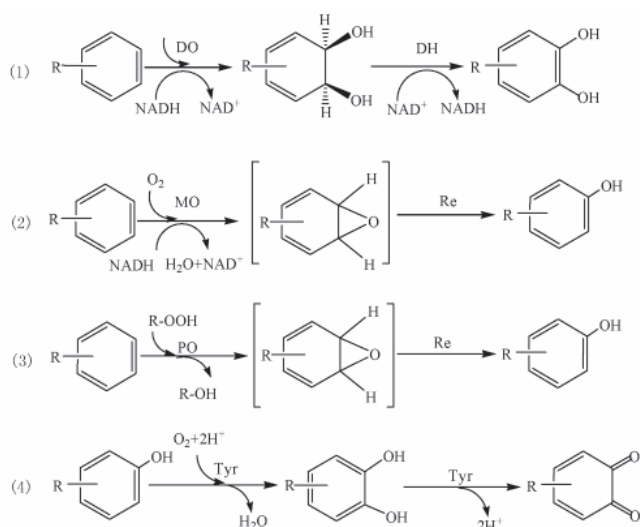


图1 芳香族化合物羟基化酶的基本反应路径

Fig. 1 Basic routes of enzymatic hydroxylation of aromatic compounds
(1) 双加氧酶(DO)的催化过程; (2) 单加氧酶(MO)的催化过程及其重排反应; (3) 过氧化物酶(PO)的催化过程及其重排反应; (4) 酪氨酸酶的催化过程 (1) Catalyzation of dioxygenase; (2) Catalyzation and rearrangement of monooxygenase; (3) Catalyzation and rearrangement for peroxidase; (4) Catalyzation of tyrosinase

氧酶, 单加氧酶在催化过程中将一个氧原子加到芳烃分子上, 最终将芳烃转化成酚类化合物; 双加氧酶在催化氧化过程中将两个氧原子加到芳烃分子上, 最终将其转化成邻苯二酚类化合物^[10].

2.1 单加氧酶

单加氧酶能把分子氧的其中一个氧原子加到底物分子上, 另一个氧原子还原成水. 芳烃单加氧酶根据辅基的不同可分为4种: 细胞色素P450酶(Heme-containing cytochrome P450 enzymes, P450s)、双铁羟化酶(Di-iron hydroxylases)、喋呤依赖型单加氧酶(Pterin-dependent monooxygenases)、黄素单加氧酶(Flavin monooxygenases, FMO)^[11], 除P450为血红素单加氧酶外, 其它3种酶都是非血红素单加氧酶.

2.1.1 非血红素单加氧酶 芳烃双铁单加氧酶是一种多功能的羟化酶, 能够催化烷烃的羟基化、烯烃的环氧化和卤代烃及芳烃的降解反应, 具有高效、条件温和、无污染的特点, 在工业应用、医药和环境治理上有着广泛的应用前景. 双铁

羟化酶是一类含有双核铁活性中心的非血红素蛋白, 也是自然界中为数不多的能够同时利用分子氧和小分子烃的酶系^[12].

喋呤依赖型羟化酶能催化氧化芳香族氨基酸中的苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸, 相应的产物为酪氨酸、3,4-二羟基苯丙氨酸和5-羟基色氨酸. 这类酶存在于人类的肝脏和中枢神经系统中, 少数存在于细菌中(如*Chromobacterium violaceum*, *Pseudomonas* sp.). 它们在活性位点上的Fe²⁺连有两个组氨酸和一个谷氨酸, 可利用四氢喋呤作为共底物, 将其转化成4α-羟基喋呤^[13], 羟化氨基酸和喋呤产物上的氧原子均来源于分子氧. 最新研究表明, 喋呤依赖型羟化酶不仅能催化氧化芳烃, 而且能使氨基酸发生芳型羟化反应. 苯丙氨酸羟化酶(Phenylalanine hydroxylase, PAH)是最重要的喋呤依赖型单加氧酶^[14, 15], 能够催化形成人体必需的酪氨酸, 人体内如果缺乏这种酶, 将会导致一种遗传性氨基酸代谢障碍性疾病——苯丙酮尿症(PKU).

FMO能催化的氧化反应包括羟基化反应、环氧化反应、Baeyer-Villiger氧化反应及磺化氧化反应, 并且具有很强的区域选择性、对映选择性. 对羟基苯甲酸羟化酶(*p*-hydroxybenzoate hydroxylase, PHBH)是研究较多的FMO酶, 存在于原核生物和真核生物及人体肝脏中. 其对芳香化合物进行羟基化反应时能把第二个羟基加到第一个羟基的邻位上(图2), 促进芳香化合物的后续断裂. 在此催化反应过程中, 黄素组分发生了变化^[16-18], 先被NAD(P)H还原, 被还原的黄素再和O₂反应生成氧化物R-(FAD)-O-OH^[11, 19]. FMO工程上应用的例子有2-羟基联苯-3-单加氧酶, Held等使用重组*E. coli*表达羟基联苯-3-单加氧酶, 该基因工程菌可将2-叔丁基

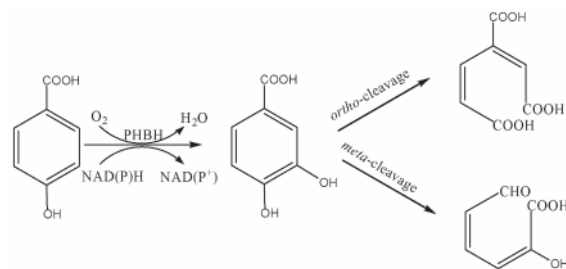
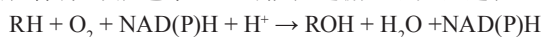


图2 对羟基苯甲酸酶PHBH在对羟基苯甲酸的间位进行羟基化作用
Fig. 2 Hydroxylation of *p*-hydroxybenzoate in meta-position by PHBH (*p*-hydroxybenzoate hydroxylase)

酚作底物转化为一种应用于药物与染料显色剂的昂贵的中间体——3-叔丁基邻苯二酚^[20]。

2.1.2 血红素单加氧酶(P450) 几乎各类生物中都含有血红素单加氧酶(古菌、真菌、真核生物), 据报道目前已有5 000多种不同的P450基因被克隆。P450酶催化各种反应, 不仅能催化单加氧反应, 还能催化脱烷基化、S氧化、N氧化、醇和醛氧化, 具有脱卤和脱硝基等作用^[21]。

1962年, 有人发现了CO络合物的特征红色素索雷吸收峰发生变化, 由此命名了P450, P是pigment的首字母大写, 450表示CO络合物在索雷吸收峰450 nm处有最大吸收峰^[22]。所有的P450都是血红素硫蛋白。P450包括两类酶, 第一类是细菌、线粒体和真菌的酶, 这类酶含铁氧化还原蛋白和FAD还原酶双电子还原系统。第二类P450是微粒体单加氧酶, 它们从与膜结合的FAD或FMN还原酶上获得电子^[23]。根据EC分类法, P450单加氧酶属于次亚纲EC1.14.13.-、EC1.14.14.-、EC1.14.15.-、EC1.14.19.-。前3种次亚纲中的P450能催化羟化芳香族化合物。细胞色素P450的催化遵循以下反应过程:



细胞色素P450的基本反应过程的研究开始于19世纪80年代, 但是直到1990年氧的激活才得以解释, 对于P450的大部分反应机制才得以证实^[24]。通常, 公认的P450反应机制为: P450与底物相结合, 形成P450三价铁酶底物混合物[(R-H)...血红素Fe³⁺], [(R-H)...血红素Fe³⁺]接受第一个电子形成酶的二价铁状态[(R-H)...血红素Fe²⁺], 此电子是NAD(P)H上分离出来, 由黄素铁氧化还原蛋白或亚黄素还原酶传递的^[25]。二价铁混合物能够加氧, [(R-H)...血红素Fe²⁺-O₂]能够接受第2个电子形成[(R-H)...血红素Fe³⁺-O₂], 再质子化生成[(R-H)...血红素Fe³⁺-O-OH], 这个电子是从NAD(P)H中获得, 经电子传递系统传递的。[(R-H)...血红素Fe³⁺-O-OH]再经两个氧之间的化学键断裂形成[(R-H)...血红素(Fe⁴⁺=O₂)⁺]^[26], 然后解离, 循环又重新开始^[25, 27]。

P450催化过程中会发生一些副反应, 在副反应中, 底物直接被H₂O₂或有机过氧化物氧化成[(R-H)...血红素(Fe⁴⁺=O₂)⁺], 不需要分子氧和电子。在自然条件下, 这种副反应不易发生, 但它为形成自身P450过氧化物酶提供了可能, 使其不再依赖于NAD(P)H和辅酶。事实上, 对P450研究的一种可行方法就是体外定向进化, P450cam经突变后, 与原来的酶相比, 萘双加氧酶的催化活性提高了20倍^[28]。提高P450性能的其它分子生物学方法包括在宿主细胞内的异源表达, 用定点突变技术构建基因工程菌等。

P450对芳香环的氧化包括氧化其中的一个π键, 而不是直接将氧原子引入苯环中的C-H键上。结果, 形成不稳定的苯氧化物和芳烃氧化物, 迅速异裂环氧化物中的一个C-O

键, 这个过程伴随着氢离子的迁移, 从C-O键中的C到毗邻的(-C⁺-), 并形成不稳定的酮中间体的形成, 最后这种酮互变异构生成了酚。整个序列的反应, 就是所谓的“NIH迁移”^[29]。除了这种能普遍接受的途径外, 还有实验和计算证据证明了氧化芳香环包括苯的机制中不涉及环氧化物中间体的形成。“非环氧化物”机制包括一个卟啉质子运送, 有助于形成酮和酚类化合物。

由于P450催化能力很强, 目前这类酶已得到广泛的研究, 但由于脱离细胞的P450制备具有不稳定性及复杂性, 因此P450在工业生产过程中仍限制在全细胞氧化方面, 有弯孢属霉菌类对固醇荷尔蒙的生物转化, 酵母属啤酒菌株的重组, 由酵母菌属中的念珠菌属和*Yarrowina lipolytica*通过烷烃生产二元酸, 以及由昆虫真菌属中白僵菌孢白僵菌合成农药中的芳香族前体物等。

2.2 双加氧酶

芳烃双加氧酶是由微生物在细胞内产生的生物催化剂, 催化氧化简单的芳香族化合物转化成邻苯二酚类化合物, 还能催化复杂的芳香族化合物降解^[9]。邻苯二酚的环裂解是由内二元醇双加氧酶和外二元醇双加氧酶中的一种作用完的。内二元醇双加氧酶是在两个羟基之间将芳香环打开(亦被称为*ortho*途径, 如图2所示); 而外二元醇是在羟基的邻位作用将芳香环打开(被称为*meta*途径, 如图2所示)^[30]。这类酶属于Rieske型非血红素加氧酶, 在活性位点上有一个[2Fe-2S]簇, 在加氧酶的最终组分上加一两个电子转运蛋白。比如说, 研究最多的萘双加氧酶(Naphtbalene dioxygenase, NDO)包含3个组分, 其中铁硫黄素蛋白还原酶和铁硫铁氧化还原蛋白这两种蛋白是电子传递蛋白, 能够把从NAD(P)H上失去的电子通过单核铁位点传递到催化加氧酶上^[31]。

NDO双羟化酶能使萘、苯、甲苯、取代酚的邻位或对位羟化。另外, NDO还能催化单羟化、硫氧化、脱双键、脱氢以及N-脱烷基化反应, 这和血红素P450单加氧酶相似。1998年, Kauppi B等首次利用X射线确定了Rieske双加氧酶系——萘双加氧酶的晶体结构^[32]。每个α亚基由两部分组成, 一个Rieske区和一个催化区, 从晶体结构可以看出, NDO以α₃β₃六聚体的形式存在, 氧化酶组分含有Rieske型[Fe-S]中心和活性位点的单核铁, 两个氧化还原中心都位于氧化酶的亚基上。Rieske区域包含一个Rieske型[Fe-S]中心并与Cys₈₁、Cys₁₀₁、His₈₃、His₁₀₄配位结合, 见图3。

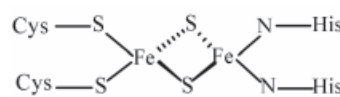


图3 NDO活性位点的Rieske型[2Fe-2S]电子簇
Fig. 3 Rieske-type [2Fe-2S] cluster in the active site of NDO

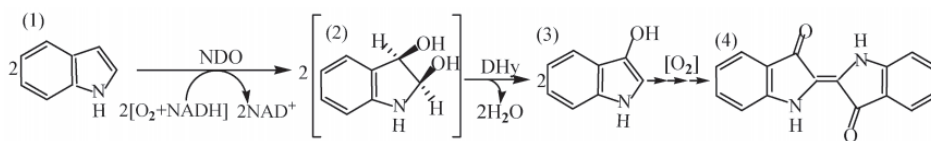


图4 吲哚转化成靛蓝的过程

Fig. 4 Transformation of indole to indigo

(1) 吲哚; (2) 顺式吲哚-2,3-二氢二醇; (3) 吲哚酚; (4) 靛蓝 (1) Indole; (2) Cis-indole-2,3-dihydrodiol; (3) Indoxyl; (4) Indigo

Fe^{2+}/α -酮酸(α -KG)双加氧酶能把 O_2 两个单原子加到两种不同的底物上(一个加到实际底物上,另一个加到 α -KG上作为共底物)。这类生物催化酶中的一些酶能使一些特殊的芳香环发生单羟化反应。植物能利用依赖 Fe^{2+}/α -KG的双加氧酶合成许多化合物,如一些类黄酮和生物碱。这些生物催化酶活性位点上含有 Fe^{2+} 和 Fe^{4+} -羰基。 Fe^{4+} -羰基形成于复杂的生物催化过程中,极有可能是羟化反应中的关键中间体。

芳烃双加氧酶广泛应用于生物催化等方面,但是由于反应过程复杂并且需要 NAD(P)H ,所以研究的重点仍然集中在完整细胞的生物转化方面。最广泛的应用就是靛蓝的合成。*E. coli*工程菌中的假单胞菌属含NDO编码基因能够使顺式吡啶-2,3-二氢二醇脱水形成吡啶酚,吡啶酚在空气中迅速被氧化生成靛蓝^[33],其催化转化过程如图4所示。由芳烃双加氧酶形成的顺式二氢二醇的其它特殊应用在药物手性前体物的合成上也有所报道。

2.3 酪氨酸酶

酪氨酸酶(Tyrosinase)广泛分布于微生物、动植物及人体中,是一种含铜的金属酶,在活性中心带有两个铜原子:Cu(A)和Cu(B),它们通过3种组氨酸残基相互协调。根据铜的氧化状态不同,活性部位存在3种不同的形态:脱氧态(Cu^+-Cu^+)、氧化态($\text{Cu}^{2+}-\text{O}_2-\text{Cu}^{2+}$)和还原态($\text{Cu}^{2+}-\text{OH}-\text{Cu}^{2+}$)^[34]。脱氧态可以经可逆反应加一个氧分子生成含氧态,使氧结合氢在铜原子之间形成一个过氧化氢。在还原态下,两个铜原子通过氢氧根离子连接,它是有氧态束缚一个一元酚形成的。还原态可以通过不同的元中间体减少两个电子转换成脱氧态,在这个过程中释放出邻苯二酚。

酪氨酸酶的反应机制目前仍不是很清楚^[35],但已有研究证明,其转化氧化邻苯二酚过程遵循Michaelis-Menten动力学。酪氨酸酶主要参与两个反应过程:催化L-酪氨酸羟基化转变为L-多巴和氧化L-多巴形成多巴醌,多巴醌经一系列反应后,形成黑色素。同时,酪氨酸酶也与人体雀斑、褐斑等黑色素过度沉积等疾病的发生有关,并与昆虫的蜕皮和果蔬的褐化有很大关系。

Hern D等在植物病原细菌青枯雷尔氏菌中发现了一种甲酚酶活性比邻苯二酚酶活性更高的酪氨酸酶^[36]。另外,酪氨酸酶纯化结果表明,该酶可以作为过氧化酶把氧气从过氧化氢转入到酚醛底物中^[37]。用酪氨酸酶催化羟基化的应用之一是生产抗氧化剂邻苯二酚,可作为食品添加剂或医药原料。

2.4 过氧化物酶

过氧化物酶是一种广泛存在于动物、植物和微生物中的氧化酶,催化由 H_2O_2 参与的各种还原剂的氧化反应,现在已发现其催化反应的底物有200多种^[38]。动物过氧化物酶主要有乳过氧化物酶、髓过氧化物酶;植物过氧化物酶有辣根过氧化物酶、细胞色素C过氧化物酶等;微生物过氧化物酶主要有微过氧化物酶;其中研究最多的是辣根过氧化物酶和Mn过氧化物酶。

过氧化物酶一般含有铜或铁等金属离子,以铁血红素IX作为辅基,其中多数连着一个组氨酸(第五配体)。这种结构的特例是氯化物过氧化物酶和杨树菇过氧化物酶,它们的第五配位是半胱氨酸(血红素硫蛋白),如P450s。血红素过氧化物酶

一般进行单电子氧化而不是双电子氧化,大多数微生物过氧化物酶都是胞外酶,并能降解难分解的芳香族聚合物(如木质素、腐殖酸材料等)。过氧化物酶的典型底物是酚类化合物、高甲氧基芳香烃(如藜芦醇)以及二价锰离子。植物过氧化物酶参与细胞壁合成(木质化作用,形成木栓质)、激素代谢以及对外界感染应激。动物和人的过氧化物酶对微生物感染起到防御作用,甲状腺过氧化物酶在合成荷尔蒙甲状腺素方面是必不可少的。

下面以酚类底物的氧化说明血红素过氧化物酶的催化过程^[39],见图5。它与P450的催化过程相似,都产生以下中间体:连接过氧化氢的铁过氧化物酶[血红素($\text{Fe}^{3+}-\text{H}_2\text{O}$)],形成一个不稳定的铁(-III)-过氧化物酶复合物[血红素($\text{Fe}^{3+}-\text{O}-\text{OH}$)],即从血红素转移的两个电子将血红素($\text{Fe}^{3+}-\text{H}_2\text{O}$)中的氧原子分开。结果,一个水分子被去除,并复合成血红素基阳离子复合物I[血红素($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$)],它可以与一个酚醛分子反应生成苯氧自由基和复合物II。复合物II是[血红素($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$)],它能与第二个底物分子反应生成第二个苯氧自由基与三价铁血红素酶。总之,在典型的血红素过氧化物酶循环中,两个底物分子被单电子氧化(但无氧转移)而其中的一个过氧化氢分子被消耗并生成两个水分子。我们假定化合物I是过氧化物酶氧转移反

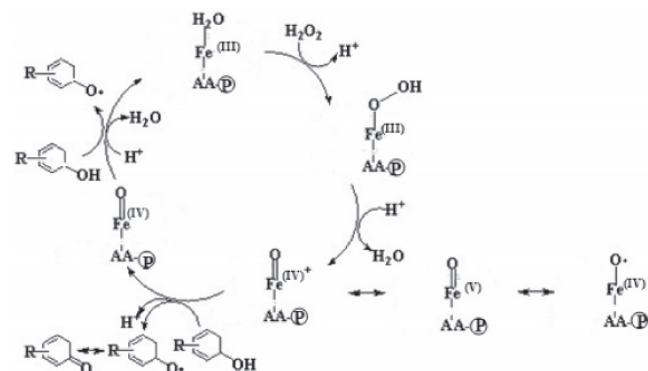


图5 用一种酚类底物的氧化来说明血红素过氧化物酶的催化循环过程
Fig. 5 Catalytic cycle of heme peroxidases illustrated by the oxidation of a phenolic substrate

应中的活性中间体,并且对于p450也有同样假定。

对过氧化物酶的研究也早已进入分子水平,其分子结构、空间构象、底物作用位点的研究都已比较透彻。从20世纪80年代得到第一个过氧化物酶的晶体结构以后,人们得到了越来越多的过氧化物酶晶体结构。随着过氧化物酶研究的深入,目前广泛应用的辣根过氧化物酶制作成本高,对天然过氧化物酶的人工模拟也引起了研究者的极大兴趣。主要是以金属卟啉为催化中心,模拟过氧化物酶催化反应微环境^[40];用诱变剂苯甲基磺酰氟(PMSF)活化兔抗体IgM片段上特殊活性部位的丝氨酸(Ser)残基,经硒化氢(H_2Se)处理诱变后的抗体具有谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性^[41];咪唑衍生物铜配合物 $\text{Cu}(\text{biap})\cdot\text{Cl}_2$ 及其与胶束形成的金属胶束模拟过氧化物酶,成功地用于催化 H_2O_2 氧化苯酚反应,反应遵循酶催化的动力学规律^[42]。

虽然过氧化物酶模拟酶还存在很大的问题,但目前所得到的模拟酶已能应用于分析化学。过氧化物酶在分析化学、

临床、环境、食品工业中发挥着越来越重要的作用,但过氧化物酶应用在硝化领域还只处于实验摸索阶段。

3 结论与展望

芳环羟基化过程不仅是细菌代谢芳环的主要途径,同时也是获得重要合成中间体的途径之一。对编码芳香化合物羟化过程的酶进行深入研究能够为生物修复技术及绿色合成化学的发展提供必要的科学依据。羟化酶是环境中有机物代谢或循环的重要酶系,具有巨大的生物催化潜力。目前,该酶的研究仍处于实验室阶段,随着体外重组、定向进化等分子生物学技术的飞速发展,该酶将有着广阔的应用前景。

References

- 1 Qu YY (曲媛媛), Tong J (童健), Zhou JT (周集体), Wang J (王竞). Advance in genetics and aerobic biodegradation of monocyclic nitroaromatic compounds. *Technol & Equip Environ Poll Control* (环境污染治理技术与设备), 2004, **5** (8): 14~18
- 2 Tani M, Sakamoto T, Mita S. Hydroxylation of benzene to phenol under air and carbon monoxide catalyzed by molybdovanadophosphoric acid. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2005, **44**: 2586~588
- 3 Lucke B, Narayana KV, Martin A. Oxidation and ammoxidation of aromatics. *Adv Synth Catal*, 2004, **346**: 1407~1424
- 4 Peterson DH, Murray HC, Eppstein SH. Microbiological transformations of steroids. I. Introduction of oxygen at carbon-11 of progesterone. *J Am Chem Soc*, 1952, **74**: 5933~5936
- 5 Qu YY (曲媛媛), Zhou JT (周集体), Wang J (王竞). Research advances of bacterial Rieske non-heme iron dioxygenase. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2005, **11** (2): 260~263
- 6 Mason HS, Fowls WL, Peterson E. Oxygen transfer and electron transport by the phenolase complex. *J Am Chem Soc*, 1955, **77**: 2914~2915
- 7 Hayaishi O, Katagiri M, Rothberg S. Mechanism of the pyrocatechase reaction. *J Am Chem Soc*, 1955, **77**: 5450~5451
- 8 Estabrook RW. A passion for P450s (Remembrances of the early history of research on cytochrome P450). *Drug Metab Dispos*, 2003, **31**: 1461~1473
- 9 Phale PS, Basu A, Majhi PD, Deveryshetty J, Vamsee-Krishna C, Shrivastava R. Metabolic diversity in bacterial degradation of aromatic compounds. *Omics*, 2007, **11** (3): 252~79
- 10 Kulkarni M, Chaudhari A. Microbial remediation of nitro-aromatic compounds: An overview. *J Environ Manage*, 2007, **85**: 496~512
- 11 Mitchell KH, Rogge CE, Gierahn T, Fox BG. Insight into the mechanism of aromatic hydroxylation by toluene 4-monooxygenase by use of specifically deuterated toluene and p-xylene. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, **100**: 3784~3789
- 12 Merckx M, Kopp DA, Sazinsky MH, Blazyk JL, Muller J, Lippard SJ. Dioxygen activation and methane hydroxylation by soluble methane monooxygenase: A tale of two irons and three proteins. *J Angew Chem Int Edit*, 2001, **40** (15): 2782~2807
- 13 Fitzpatrick PF. Mechanism of aromatic amino acid hydroxylation. *Biochemistry*, 2003, **42**: 14083~14091
- 14 Kim W, Erlandsen H, Surendran S, Stevens RC, Gamez A, Michos-Matalon K, Tying SK, Matalon R. Trends in enzyme therapy for phenylketonuria. *Mol Ther*, 2004, **10**: 220~224
- 15 Alexander SP, Mathie A, Peters JA. Guide to Receptors and Channels, 3rd ed. *Br J Pharmacol*, 2008, **153** (Suppl): 1~209
- 16 Jadan AP, van Berkel WJ, Golovleva LA, Golovlev EL. Purification and properties of p-hydroxybenzoate hydroxylases from *Rhodococcus* strains. *Biochemistry*, 2001, **66**: 898~903
- 17 Entsch B, Cole LJ, Ballou DP. Protein dynamics and electrostatics in the function of p-hydroxybenzoate hydroxylase. *Arch Biochem Biophys*, 2005, **433**: 297~311
- 18 Fritsche W, Hofrichter M. Aerobic degradation of recalcitrant organic compounds by microorganisms. In: Rittman, Bruce/McCarty, Perry L. Environmental Biotechnology. America: McGraw-Hill College, 2005. 203~227
- 19 Cole LJ, Entsch B, Ortiz-Maldonado M, Ballou DP. Properties of p-hydroxybenzoate hydroxylase when stabilized in its open conformation. *Biochemistry*, 2005, **44**: 14807~14817
- 20 Meyer A, Held M, Schmid A, Kohler HP, Witholt B. Synthesis of 3-tert-butylcatechol by an engineered monooxygenase. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **81**: 518~524
- 21 Peterson JA, Lu JY, Geisselsoder J, Graham-Lorences, Carmona C, Witney F, Lorence MC. Cytochrome P-450terp isolation and purification of the protein and cloning and sequencing of its operon. *J Biol Chem*, 1992, **267** (20): 14193~14203
- 22 Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. Part I. Evidence for its hemoprotein nature. *J Biol Chem*, 1964, **239**: 2370~2378
- 23 Schenkman JB, Jansson I. Interactions between cytochrome P450 and cytochrome b5. *Drug Metab Rev*, 1999, **31**: 51~64
- 24 Schlichting I, Berendzen J, Chu K, Stock AM, Maves SA, Benson DE, Sweet BM, Ringe D, Petsko GA, Sligar SG. The catalytic pathway of cytochrome p450cam at atomic resolution. *Science*, 2000, **287**: 1615~1622
- 25 Groves JT. High-valent iron in chemical and biological oxidations. *J Inorg Biochem*, 2006, **100**: 434~447
- 26 Green MT, Dawson JH, Gray HB. Oxo-ACHTUNG TRENNUNG iron (IV) in chloroperoxidase Compound II is basic: Implications for P450 chemistry. *Science*, 2004, **304**: 1653~1656
- 27 Stone KL, Hoffart LM, Behan RK, Krebs C, Green MT. Evidence for two ferryl species in chloroperoxidase compound II. *J Am Chem Soc*, 2006, **128**: 6147~6153
- 28 Denisov LG, Makris TM, Sligar SG, Schlichting I. Structure and chemistry of cytochrome P450. *Chem Rev*, 2005, **105**: 2253~2277
- 29 Schmidt HL, Werner RA, Eisenreich W, Fuganti C, Fronza G, Remaud G, Robins RJ. The prediction of isotopic patterns in phenylpropanoids from their precursors and the mechanism of the NIH-shift: Basis of the isotopic characteristics of natural aromatic compounds. *Phytochemistry*, 2006, **67**: 1094~1103
- 30 Gibson DT, Parales RE. Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11**: 236~243

- 31 Karlsson A, Parales JV, Parales RE, Gibson DT, Eklund H, Ramaswamy S. Crystal structure of naphthalene dioxygenase: Side on binding of dioxygen to iron. *Science*, 2003, **299**: 1039~1042
- 32 Kauppi B, Kyoung L, Carredano E, Parales RE, Gibson DT, Eklund H, Ramaswamy S. Structure of an aromatic ring-hydroxylating dioxygenase naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure*, 1998, **6**: 571~586
- 33 Kim JY, Lee K, Kim Y, Kim CK, Lee K. Production of dyestuffs from indole derivatives by naphthalene dioxygenase and toluene dioxygenase. *Lett Appl Microbiol*, 2003, **36**: 343~348
- 34 Sanchez-Ferrer A, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Canovas F, Garcia-Carmona F. Tyrosinase: A comprehensive review of its mechanism. *Biochim Biophys Acta*, 1995, **1247**: 1~11
- 35 Fenoll LG, Penalver MJ, Rodriguez-Lopez JN, Garcia-Ruiz PA, Garcia-Canovas F, Tudela J. Deuterium isotope effect on the oxidation of monophenols and o-diphenols by tyrosinase. *Biochem J*, 2004, **380**: 643~650
- 36 Hern D, Sanchez A, Solano F. A tyrosinase with an abnormally high tyrosine hydroxylase/dopa oxidase ratio. *J Febs*, 2006, **273**: 257~270
- 37 Yamazaki S, Morioka C, Itoh S. Kinetic valuation of catalase and peroxygenase activities of tyrosinase. *Biochemistry*, 2004, **43**: 11546~11553
- 38 Leng Y, Ge HQ, Zhou CJ, Wang J. Direct hydroxylation of benzene with hydrogen peroxide over pyridine-heteropoly compounds. *Chem Engin J*, 2008, **145**: 335~339
- 39 Ullrich R, Hofrichter M. Enzymatic hydroxylation of aromatic compounds. *Cell Mol Life Sci*, 2007, **64** (3): 271~93
- 40 Yang XF (杨雪峰), Chen YY (陈永耀). Lactoperoxidase system in milk and its application. *J Henan Vocation-tech Teachers Coll* (河南职业技术学院学报), 2004, **32** (1): 153~156
- 41 Ding L (丁兰), Zhu ZQ (朱振齐), Luo GM (罗贵民), Sun QA (孙启安), Yang TS (杨同书), Shen JC (沈家骢). Artificial imitation of glutathione peroxidase by using chemical mutation method. *Chin J Biochem & Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 1994, **10** (3): 124~128
- 42 Feng FM (冯发美), Huang Z (黄忠), Chen Y (陈勇), Xie JQ (谢家庆), Jiang BY (蒋炳英), Meng XG (孟祥光), Hu CW (胡常伟), Zeng XC (曾宪诚). The study on the metallomicelle made of the complexes of imidazole groups as mimetic peroxidase. *Chem Res & Appl* (化学研究与应用), 2003, **15** (6): 149~153