

生物降解木质素的研究进展

刘云*

(北京市生物加工过程重点实验室, 北京化工大学生命科学与技术学院, 北京 100029)

摘要: 随着石化资源日益枯竭和我国国情实际情况, 第二代生物质能源研发十分迫切。清洁高效降解自然界中第二大丰富的木质素资源亟待解决。相比物理和化学方法, 生物降解木质素因专一性强和环境友好等特点最具发展优势。本文简单综述了真菌和细菌微生物降解木质素的几种途径, 指出多组学(如蛋白组学、转录组学和代谢组学)技术是剖析微生物降解木质素分子机制的有力手段, 为生物降解木质素及其高效利用提供借鉴和参考。

关键词: 木质素; 生物降解; 分子机制

Progress on lignin bio-degradation

LIU Yun *

(Beijing Key Laboratory of Bioprocess, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

ABSTRACT: With the dwindling supplies of oil based fuels and real situations in China, it is very urgent and crucial to develop the second generation biofuels from renewable biomass. Lignin ranks second only to cellulose filaments as the abundant and renewable source in nature. There are consideration interests in the utilization of lignin for production of bioenergy and renewable chemicals. Compared with chemical and physical methods, lignin biodegradation via microorganisms shows a promising trends with the significant characters of mild conditions, friendly environment and strong specificity. The review briefly presents lignin bio-breakdown pathway via fungi and bacterial microorganisms, and the molecular mechanism of lignin bio-degradation is elucidated from the view of multi-omics approach, such as proteomics, transcriptome and metabolomics. It provides new insights on lignin biodegradation in microorganisms as well as its applications.

KEY WORDS: lignin; bio-degradation; molecular mechanism

1 引言

随着石化资源的日益枯竭和燃烧所带来的环境污染问题, 以生物质为原料, 生产绿色化学品和燃料是我国经济持续发展和结构转型的必然要求^[1]。木质素资源相当丰富, 仅次于纤维素含量, 占生物质干重 15%-30%^[2]。据统

计, 全世界每年排出 1.5-1.8 亿吨工业木质素, 利用率却不足 1%, 其他均被排放, 既浪费资源又污染环境^[3]。因此, 高效利用丰富的木质素资源已经成为现实必然和历史趋势。近年来, 木质素化学的深入研究为其“生物炼制”奠定了良好的结构基础^[4]。理论上, 木质素完全可降解成苯基类和酚基类等小分子, 制备高附加值化学品和燃料。由于

基金项目: 国家自然科学基金项目(21476016)

Fund: Supported by the National Natural Science Foundation of China (21476016)

*通讯作者: 刘云, 教授, 主要研究方向为生物炼制和酶工程。E-mail: liuyun@mail.buct.edu.cn

*Corresponding author: LIU Yun, Professor, College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, No. 15 Beisanhuan East Road, Chaoyan District, Beijing 100029, China. Email: liuyun@mail.buct.edu.cn

木质素结构的复杂性和特殊的理化性质, 实现木质素这一巨大资源的清洁高效利用, 我们仍面临诸多挑战和困难。目前, 木质素降解方法主要有物理法、化学法、离子液体预处理、微生物降解和组合预处理技术等^[5-10]。前期我们详细地比较了蒸汽爆破和辐照预处理降解木质素效果^[11]。NMR 和 FT-IR 分析表明, 木质素结构中的吡喃型 D-葡萄糖基、醇羟基、碳基共振双键等活性基团发生了变化; HPLC 研究显示, 辐照预处理后产生“有毒”抑制物如糠醛、乙酸等明显少于蒸汽爆破预处理。然而, 上述物理化学法降解木质素存在能耗高、“二次污染”等缺陷, 不符合我国可持续发展的生态环境建设和资源利用政策。相比较而言, 微生物降解木质素具有条件温和、专一性强、无污染、成本低等特点, 最具发展优势。

2 生物降解木质素的分子机制

自从文献报道白腐真菌能降解木质素以来, 生物降解木质素越来越受到人们的关注^[12-14]。降解木质素的真菌主要分为三类: 白腐菌、褐腐菌和软腐菌, 其中白腐真菌降解木质素能力最强, 降解过程中不会产生色素, 具有较好的开发利用前景。大量研究表明, 白腐真菌可使秸秆中木质素的降解率达到 40%-60%^[15]。真菌降解木质素分子机制大致通过氧化反应和矿化作用来降解, 产物中不会出现木质素单体, 且木质素组成对真菌降解木质素效果具有一定影响^[16]。然而, 不同种类真菌, 其降解木质素机制略有差异。例如白腐菌降解木质素机制分为胞内和胞外两个过程, 触发一系列自由基链反应, 使木质素中的苯环发生单电子氧化反应形成阳离子基团, 其后发生一系列自发反应而降解^[17]。褐腐真菌降解木质素机制目前普遍的一种观点认为, 可能以一种非酶的、小分子物质参与的、涉及 HO 自由基氧化的降解机制^[18]。软腐真菌降解木质素的分子机制报道较少, 降解木质素效果并不理想^[19]。

无论哪一种真菌降解木质素, 降解过程都是多种酶参与的结果。Wong^[20]综述了白腐真菌降解木质素所需酶蛋白的理化特性、分子结构、反应机制及构效关系。

Knezevic 等^[21]研究表明, 在白腐真菌降解木质素过程中, 单一酶并不能有效地降解木质素, 需要 2 种或 2 种以上酶的协同效应, 木质素才能得到有效降解。Abbas 等^[22]采用二维电泳和 LC/MS/MS 技术, 发现真菌降解橡树木质素时至少有 40 种酶蛋白参与降解, 进一步证明微生物降解木质素酶系间存在协同效应。

至今, 白腐菌(*Phanerochaete chrysosporium*)^[23]、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)^[24]、粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)^[25]、青霉菌(*Penicillium*)^[26]等真菌的功能基因组均已报道。最近, 木质素降解细菌—红球菌(*Rhodococcus jostii* RHA1)的基因组功能测序和新型木质素降解酶也被报道, 从而开启了细菌降解木质素的研究热潮^[9, 27, 28]。目前, 已报道具有降解木质素的细菌包括: *Streptomycesviridosporus* T7A^[29, 30], *Rhodococcus jostii* RHA1^[27, 28], *Enterobacter lignolyticus* SCF1^[31], *Nocardia* and *Rhodococcus*^[32], *Sphingobium* sp. SYK-6^[33], *Pseudomonas putida* mt-2^[34]。DeAngelis 等^[33]从蛋白质组和转录组学的角度, 详细地分析了细菌降解木质素机制, 为 4-羟基-苯乙酸酯降解新途径, 区别于文献报道真菌和其他细菌降解木质素途径, 为自然界微生物降解木质素提供了很好的参考价值。可以相信, 酶蛋白质组学和基因组学技术将逐渐成为解析微生物降解木质素途径的强有力手段。

3 生物降解木质素的几种途径

据文献报道^[34-36], 真菌通过矿化作用来降解木质素, 首先在酶催化作用下, 木质素结构苯环发生单电子氧化反应形成自由基(O₂ 和 H₂O₂), 然后发生一系列非酶催化的自由基链反应而降解, 降解产物最终进入 TCA 循环形成 CO₂^[37]。具体而言, 真菌降解木质素途径有两种: 第一种途径是二芳基丙烷降解途径, 主要氧化断裂木质素结构中 C_α-C_β 化学键产生芳香醛化合物(见图 1A); 第二种途径是木质素结构中苯基氧化导致 C-O 键断裂, 生成中间产物单环酮化合物, 随后芳烷基氧化产生羧酸类化合物和相应的内酯^[37](见图 1B)。

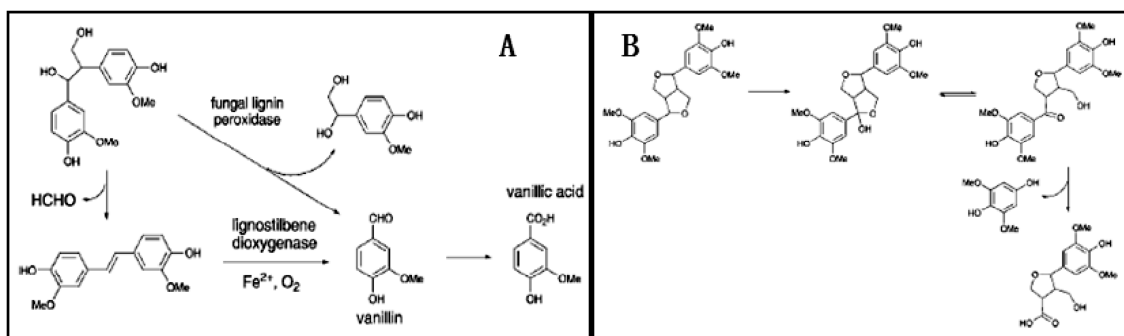


图 1 真菌降解木质素途径(A: 途径 1; B: 途径 2)^[37]

Fig. 1 Lignin degradation pathway in fungi (A: pathway 1; B: pathway 2)^[37]

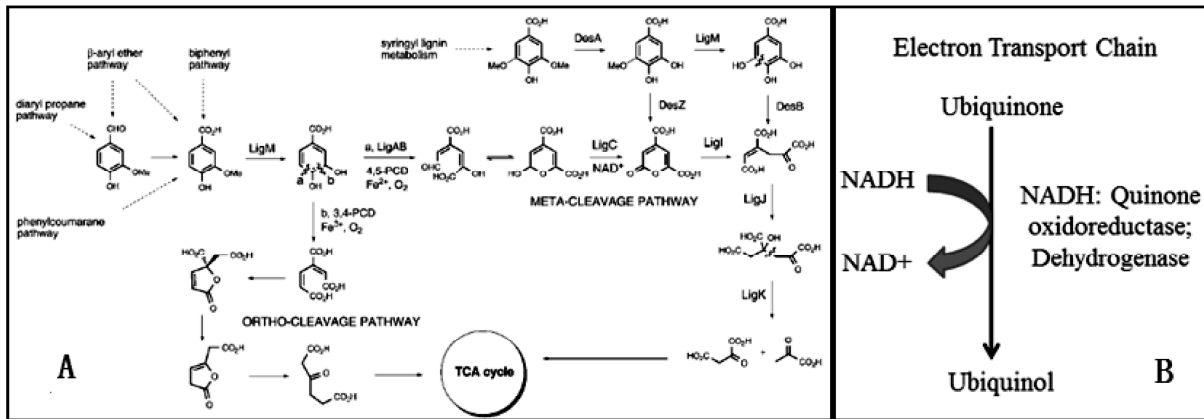


图 2 细菌降解木质素途径 A: 同化作用^[22]; B: 异化作用^[23]

Fig. 2 Lignin degradation pathway in bacteria (A: assimilation^[37]; B: dissimilation^[38])

相较真菌, 细菌具有繁殖速度快、生境要求低等特点更易培养。近年来, 细菌降解木质素已引起了人们的极大关注。Bugg 等^[37]认为, 细菌降解木质素不通过矿化作用, 而是直接在分泌酶作用下, 从断裂木质素结构中的 β -芳基醚和 2-苯基化学键开始降解。细菌降解木质素途径也分为两种: 一是糖酵解途径和戊糖磷酸途径, 是指细菌通过同化作用降解木质素, 生成小分子化合物, 最终进入 TCA 循环^[37](图 2A)。二是氧化磷酸化途径, 是指细菌通过异化作用, 以电子传递链的形式, 氧化磷酸化来降解木质素^[38](图 2B)。

最近, Sainsbury 等^[39]报道了细菌 *Rhodococcus jostii* RHA1 通过同化作用降解木质素, 生成 4-羟基-苯基乙酸小分子中间产物, 成功地从木质素中制备出香草素, 得率为 94 mg/L, 为细菌降解木质素制备化学品奠定了基础。因此, 在清楚解析生物降解木质素途径中, 微生物代谢组学技术起到了非常关键的作用。

4 生物降解木质素国内研究进展

相比国外, 国内在生物降解木质素方面的研究大都集中于真菌微生物^[40-45], 对于细菌降解木质素途径及其机制鲜见报道。优势研究单位包括中科院微生物所、山东大学、中科院过程所、中科院青岛能源所、清华大学、天津工业生物技术研究所、华南理工大学、北京化工大学、华中科技大学等。涉及内容包括真菌降解木质素机制、降解木质素的微生物种类、相关降解酶系及降解产物等等^[45]。在真菌降解木质素机制方面, 中科院微生物所田朝光和马延和^[46]指出真菌降解木质纤维素途径分为诱导和利用两个阶段。在诱导阶段, 微生物感受木质纤维素底物存在, 产生信号分子, 诱导木质纤维素酶系基因大量表达; 在利用阶段, 糖转运及随后代谢相关基因大量表达, 完成木质纤维素降解和糖代谢。真菌降解木质素分泌酶及其基因表达

方面, 杨洋等^[47]研究表明, 用于生物降解木质素的白腐真菌所分泌漆酶基因表达水平与金属离子和芳香族化合物等诱导物有关; 姜杰等^[48]对木质素过氧化酶的来源、结构与性质、基因克隆与表达等进行了综述。在真菌降解木质素产物分析方面, 邓勋等^[49]采用气质联用(GC/MS)和红外光谱(IR), 对平菇(*Pleurotus ostreatus*)降解稻草木质素产物进行分析, 结果表明, 平菇降解木质素首先发生在单体的侧链及单体间的连键上, 发生 C_{α} - C_{β} 、 β -O-4 等断裂, 形成了单体。江智婧等^[50]采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)实现了 6 种木质素降解产物 4-羟基苯甲酸、香草酸、紫丁香酸、4-羟基苯甲醛、香草醛和紫丁香醛的有效分离。

综观文献, 我国在生物降解木质素的真菌种类、酶系组成与特性、基因克隆与表达、混合菌发酵降解木质素、生物降解产物的分析等方面均有文献报道, 但是, 不同种类微生物和不同条件下生物降解木质素途径并不十分清楚。今后应大力加强这方面的研究工作, 为我国木质素的高效开发利用奠定基础。

5 结 语

木质素是自然界中第二大天然可再生资源, 结构复杂, 难于降解和利用。研究生物降解木质素对促进生物物质的高效利用、减轻环境污染有极其重要的意义。目前, 生物降解木质素研究主要集中在真菌微生物种类及其产生的相关酶类、酶系间的协同作用、漆酶基因的高效表达与调控等方面。但是, 大部分研究成果仍处于实验室水平, 技术并不成熟, 中试或工业化鲜有报道。因此, 加强开展木质素高效降解菌的筛选及其分子生物学, 细菌降解木质素机制, 采用多组学(如蛋白组学、转录组学和代谢组学)手段剖析生物降解木质素途径, 利用生化过程集成技术转化木质素制取燃料和化学品等的研究, 将是今后木质素生物降解研究的发展趋势和热点领域。

参考文献

- [1] Littlewood J, Wang L, Turnbull C, *et al.* Techno-economic potential of bioethanol from bamboo in China [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6: 173–185.
- [2] Milczarek G, Ingnas O. Renewable cathode materials from biopolymer/conjugated polymer interpenetrating networks [J]. *Science*, 2012, 336: 1468–1471.
- [3] Aura AM, Niemi P, Mattila I, *et al.* Release of small phenolic compounds from brewer's spent grain and its lignin fractions by human intestinal microbiota in vitro [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61: 9744–9753.
- [4] Chen F, Dixon RA. Lignin modification improves fermentable sugar yields for biofuels production [J]. *Nat Biotechnol*, 2007, 25: 759–761.
- [5] Belyi VA, Udoratina EV. Kinetic study of wood pyrolysis in presence of metal halides [J]. *Cent Eur J Chem*, 2014, 12: 1294–1303.
- [6] Sabarez H, Oliver CM, Mawson R, *et al.* Synergism between ultrasonic pretreatment and white rot fungal enzymes on biodegradation of wheat chaff [J]. *Ultrason Sonochem*, 2014, 21: 2084–2091.
- [7] Pan JY, Fu J, Deng SG, *et al.* Microwave-assisted degradation of lignin model compounds in imidazolium-based ionic liquids [J]. *Energ Fuel*, 2014, 28: 1380–1386.
- [8] Chang J, Cheng W, Yin QQ, *et al.* Effect of steam explosion and microbial fermentation on cellulose and lignin degradation of corn stover [J]. *Bioresour Technol*, 2014, 104: 587–592.
- [9] Brown ME, Chan MCR. Exploring bacterial lignin degradation [J]. *Curr Opin Chem Biol*, 2014, 19: 1–7.
- [10] Nguyen JD, Matsuura BS, Stephenson CRJ. A photochemical strategy for lignin degradation at room temperature [J]. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 1218–1221.
- [11] Wang K, Xiong X, Chen J, *et al.* Comparison of gamma irradiation and steam explosion pretreatment for ethanol production from agricultural residues [J]. *Biomass Bioenerg*, 2012, 46: 301–308.
- [12] Jain R, Garg V. Enzymatic degradation of monocotophos by extracellular fungal OP hydrolases [J]. *Appl Biochem Biotech*, 2013, 171: 1473–1486.
- [13] Salvachua D, Martinez AT, Tien M, *et al.* Differential proteomic analysis of the secretome of *irpex lacteus* and other white-rot fungi during wheat straw pretreatment [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2013, 6: 115–128.
- [14] Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, *et al.* Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78 [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22: 695–700.
- [15] Knežević A, Milovanović I, Stajić M, *et al.* Lignin degradation by selected fungal species [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 138: 117–123.
- [16] Skyba O, Douglas CJ, Mansfield SD. Syringyl-rich lignin renders poplars more resistant to degradation by wood decay fungi [J]. *Appl Environ Microb*, 2013, 79: 2560–2571.
- [17] Hadibarata T, Kristanti RA. Potential of a white-rot fungus *Pleurotus eryngii* F032 for degradation and transformation of fluorene [J]. *Fungal Biol-UK*, 2014, 118: 222–227.
- [18] Kaneko S, Yoshitake K, Itakura S, *et al.* Relationship between production of hydroxyl radicals and degradation of wood, crystalline cellulose, and a lignin-related compound or accumulation of oxalic acid in cultures of brown-rot fungi [J]. *J Wood Sci*, 2005, 51: 262–269.
- [19] Liers C, Amstadt T, Ullrich R, *et al.* Patterns of lignin degradation and oxidation enzyme secretion by different wood- and litter-colonizing basidiomycetes and ascomycetes grown on beech-wood [J]. *FEMS Microb Ecol*, 2011, 78: 91–102.
- [20] Wong DWS. Structure and action mechanism of ligninolytic enzymes [J]. *Appl Biochem Biotechnol*, 2009, 157: 174–209.
- [21] Knežević A, Milovanović I, Stajić M, *et al.* Lignin degradation by selected fungal species [J]. *Bioresour Technol*, 2013, 138: 117–123.
- [22] Abbas A, Koc H, Liu F, *et al.* Fungal degradation of wood: initial proteomic analysis of extracellular proteins of *Phanerochaete chrysosporium* grown on oak substrate [J]. *Curr Genet*, 2005, 47: 49–56.
- [23] Martinez D, Larrondo LF, Putnam N, *et al.* Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78 [J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22(6): 695–700.
- [24] Le Crom S, Schackwitz W, Pennacchio L, *et al.* Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 16151–16156.
- [25] Galazka JM, Tian C, Beeson WT, *et al.* Cellodextrin transport in yeast for improved biofuel production [J]. *Science*, 2010, 330: 84–86.
- [26] Cheng Y, Song X, Qin Y, *et al.* Genome shuffling improves production of cellulase by *Penicillium decumbens* JU-A10 [J]. *J Appl Microbiol*, 2009, 107: 1837–1846.
- [27] Mcleod MP, Warren RL, Hsiao WWL, *et al.* The complete genome of *Rhodococcus sp.* RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 15582–15587.
- [28] Ahmad M, Roberts JN, Hardiman EM, *et al.* Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase [J]. *Biochem*, 2011, 50: 5096–5107.
- [29] Ramachandra M, Crawford DL, Hertel G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus* [J]. *Appl Environ Microbiol* 1988, 54: 3057–3063.
- [30] Thomas L, Crawford DL. Cloning of clustered *Streptomyces viridosporus* T7A lignocellulose catabolism genes encoding peroxidase and endoglucanase and their extracellular expression in *Pichia pastoris* [J]. *Can J Microbiol*, 1998, 44: 364–372.
- [31] Zimmermann W. Degradation of lignin by bacteria [J]. *J Biotechnol*, 1990, 13: 119–130.
- [32] Masai E, Katayama Y, Fukuda M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2007, 71: 1–15.

- [33] DeAngelis KM, Sharma D, Vamey R, *et al.* Evidence supporting dissimilatory and assimilatory lignin degradation in *Enterobacter linolyticus* SCF1 [J]. *FrontMicrobiol*, 2013, 4: 1–14.
- [34] Ahmad M, Taylor CR, Pink D, *et al.* Development of novel assays for lignin degradation: comparative analysis of bacterial and fungal lignin degraders [J]. *Mol Biosys*, 2010, 6: 815–821.
- [35] Fujii K, Uemura M, Hayakawa C, *et al.* Environmental control of lignin peroxidase, manganese peroxidase, and laccase activities in forest floor layers in humid Asia [J]. *Soil Biol Biochem*, 2013, 57: 109–115.
- [36] Wan C, Li Y. Fungal pretreatment of lignocellulosic biomass [J]. *Biotechnol Adv*, 2012, 6: 1447–1457.
- [37] Bugg TDH, Ahmad M, Hardiman EM, *et al.* Pathway for degradation of lignin in bacterial and fungi [J]. *Nat Prod Rep*, 2011, 28: 1883–1896.
- [38] Newman DK, Kolter R. A role for excreted quinones in extracellular electron transfer [J]. *Nature*, 2000, 405: 94–97.
- [39] Sainsbury PD, Hardiman EM, Ahmad M, *et al.* Breaking down lignin to high-value chemicals: The conversion of lignocellulose to vanillin in a gene deletion mutant of *Rhodococcus jostii* RHA 1 [J]. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 2151–2156.
- [40] 李海涛, 姚开, 何强, 等. 木质素的生物降解及其应用[J]. *皮革科学与工程*, 2010, 6: 27–31.
Li HT, Yao K, He Q, *et al.* Biodegradation and application of lignin [J]. *Leather Sci Eng*, 2010, 20: 27–31.
- [41] 吴坤, 张世敏, 朱显峰. 木质素生物降解研究进展 [J]. *河南农业大学学报*, 2000, 34: 349–354.
Wu K, Zhang SM, Zhu XF. Recent research advances on the lignin degradation [J]. *J Henan Agr Univ*, 2000, 34: 349–354.
- [42] 潘明凤, 姜曼, 周祚万. 木质素生物降解的最新研究进展 [J]. *材料导报: 纳米与新材料专辑*, 2011, 2: 372–378
Pan MF, Jiang M, Zhou ZW. Latest research advances in biodegradation of lignin [J]. *Mater Rev: Nano New Materials*, 2011, 2: 372–378.
- [43] 池玉杰, 鲍甫成. 木质素生物降解与生物制浆的研究现状分析 [J]. *林业科学*, 2004, 40: 168–173.
Chi YJ, Bao FC. Research situations of lignin biodegradation and biopulping [J]. *Scientia Silvae Sci*, 2004, 40: 168–173.
- [44] 付春霞, 付云霞, 邱忠平, 等. 木质素生物降解的研究进展[J]. *浙江农业学报*, 2014, 26: 1139–1143.
Fu CX, Fu YX, Qiu Z, *et al.* Research progresses of lignin biodegradation [J]. *Acta Agr Zhejiangensis*, 2014, 26: 1139–1143.
- [45] 王继坤, 赵力超. 木质素生物降解研究新进展 [EB/OL]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201405-215>.
Wang JK, Zhao LC. New research advances on the lignin biodegradation [EB/OL]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201405-215>.
- [46] 田朝光, 马延和. 真菌降解木质纤维素的功能基因组学研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2010, 26: 1333–1339.
Tian CG, Ma YH. Progress in lignocellulose deconstruction by fungi [J]. *Chin J Biotech*, 2010, 26: 1333–1339.
- [47] Yang Y, Wei F, Zhuo R, *et al.* Enhancing the laccase production and laccase gene expression in the white-rot fungus *Trametes velutina* 5930 with great potential for biotechnological applications by different metal ions and aromatic compounds [J]. *Plos One*, 2013, 8(11): e79307.
- [48] 姜杰, 杨暖, 丁梦旋, 等. 木素过氧化物酶的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2009, 11: 30–33.
Jiang J, Yang N, DingMX, *et al.* Research advance in Lign in Peroxidase [J]. *Biotechnol Bull*, 2009, 11: 30–33.
- [49] 邓勋, 宋瑞清, 宋小双. 平菇(*Pleurotus ostreatus*)对稻草中木质素的生物降解及降解产物分析 [J]. *菌物研究*, 2007, 2: 93–97.
Deng X, Song RQ, Song XS. Biodegradation of lignin by *Pleurotus ostreatus* in the straw and analysis of degradation outcome [J]. *J Fungal Res*, 2007, 2: 93–97.
- [50] 江智婧, 朱均均, 李鑫, 等. 反相高效液相色谱法定量分析木质素的主要降解产物 [J]. *色谱*, 2011, 29: 59–62.
Jiang ZJ, Zhu JJ, Li X, *et al.* Determination of main degradation products of lignin using reversed-phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromat*, 2011, 29: 59–62.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



刘 云, 教授, 主要研究方向为生物炼制和酶工程。

E-mail: liuyun@mail.buct.edu.cn