

木质素生物降解的脱甲基机制研究进展

吴艳玲^{#1}, 薛乐^{#2}, 卢鹏², 李安东², 廖庆钊¹, 陈先锐^{1,2}, 肖宁^{*1}, 谢尚县^{*1,2}

1 广西科学院 非粮生物质能技术全国重点实验室, 广西 南宁 530007

2 华中科技大学生命科学与技术学院, 湖北 武汉 430074

吴艳玲, 薛乐, 卢鹏, 李安东, 廖庆钊, 陈先锐, 肖宁, 谢尚县. 木质素生物降解的脱甲基机制研究进展[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 1834-1853.

WU Yanling, XUE Le, LU Peng, LI Andong, LIAO Qingzhao, CHEN Xianrui, XIAO Ning, XIE Shangxian. Research progress in the demethylation mechanism of lignin biodegradation[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 1834-1853.

摘要: 木质素是由苯丙烷结构单元通过多种化学键交联组成的复杂芳香族高聚物。由于其结构的复杂性和异质性, 使得木质素的高效降解与经济转化成为了一个世界性的难题。近年来, 科学研究发现微生物特有的非特异性氧化还原体系及芳香族化合物多元代谢降解能力, 为解决木质素的资源化利用提供了新的思路 and 方向。由于大部分木质素衍生的芳香族单体在苯环不同位置上都含有甲氧基, 使得脱甲基化成为了木质素衍生芳香族化合物代谢的关键限速步骤。本综述就近年来在木质素生物降解过程中的脱甲基生物学和酶学机制研究进行了较为全面的总结, 并以利用芳香族脱甲基酶进行木质素高值转化方面的典型研究案例进行分析, 阐明了微生物脱甲基过程机制解析以及新型脱甲基酶的挖掘对于木质素降解与转化的重要意义。

关键词: 脱甲基酶; 木质素; 生物降解; 代谢工程; 生物质

资助项目: 国家自然科学基金(32170122); 广西壮族自治区创新驱动发展专项重大科技创新基地建设项目(2022-36-Z06)

[#]对本文贡献相同

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32170122), and the Funding by Guangxi Zhuang Autonomous Region Innovation-driven Development Major Science and Technology Innovation Base Construction Project (2022-36-Z06).

[#]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding authors. E-mail: XIE Shangxian, shangxian_xie@hust.edu.cn; XIAO Ning, xiaoningxas@163.com

Received: 2024-01-15; Accepted: 2024-03-19; Published online: 2024-04-02

Research progress in the demethylation mechanism of lignin biodegradation

WU Yanling^{#1}, XUE Le^{#2}, LU Peng², LI Andong², LIAO Qingzhao¹, CHEN Xianrui^{1,2}, XIAO Ning^{*1}, XIE Shangxian^{*1,2}

1 National Key Laboratory of Non-food Biomass Energy Technology, Guangxi Academy of Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China

2 College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, Hubei, China

Abstract: Lignin is a heterogeneous aromatic biopolymer composed of diverse aromatic monomers linked by various types of chemical bonds, which make the efficient degradation and cost-effective transformation of lignin a formidable global issue. Recent studies have discovered unique non-specific redox systems inherent in microorganisms and the metabolic capacity of microorganisms for degrading aromatic compounds, shedding light on lignin valorization. Given that most of lignin-derived aromatic monomers contain methoxy groups, demethylation emerges as a rate-limiting step in the metabolism of these compounds. This review offers an extensive summary of the latest studies about the biological and enzymatic mechanisms of demethylation during the biodegradation of lignin. Meanwhile, by examining exemplary studies on lignin valorization with novel aromatic demethylases, this paper highlights the pivotal role of understanding microbial demethylation mechanisms and mining new demethylases in lignin degradation and transformation.

Keywords: demethylase; lignin; biodegradation; metabolic engineering; biomass

木质素是广泛存在于植物组织中的一种甲氧基芳香族高聚物。天然木质素结构极其复杂、分子量高,具有高度支化和无定形的特点^[1]。木质素由多种芳香烃单体通过自由基偶联反应而成,按其典型特征可将单体分为3种基本类型:松柏醇、对香豆醇和芥子醇,分别对应愈创木基丙烷结构基本单元(G型)、对羟基苯基丙烷结构基本单元(H型)和紫丁香基丙烷结构基本单元(S型)^[2-4](图1)。这些木质素单元通过各种醚键和碳-碳键相连,并被包括脂肪羟基、羰基、酚羟基、甲氧基和苯甲醇基团在内的各种官能团修饰^[5]。基于这些特性,木质素进一步被分为G型木质素、S型木质素和H型木质素,其中G型木质素和S型木质素在芳香环上存在一个或两个甲

氧基,在自然界的木质素结构中占据绝大多数。木质素降解时,往往生成包括愈创木酚、阿魏酸、丁香酸、芥子酸在内的较为复杂的含甲氧基芳香烃混合物,这些甲氧基的脱甲基化是木质素衍生芳香族化合物能被微生物进一步代谢的关键步骤^[6-7]。因此,几乎所有木质素衍生的化合物都必须先O-脱甲基化生成二醇,然后才能氧化裂解生成开环化合物,最终进入中心碳代谢途径^[8]。

1 微生物对木质素的主要降解过程

在自然界降解利用木质素的漫长过程中,某些微生物进化出了解聚和转化木质素的能力和

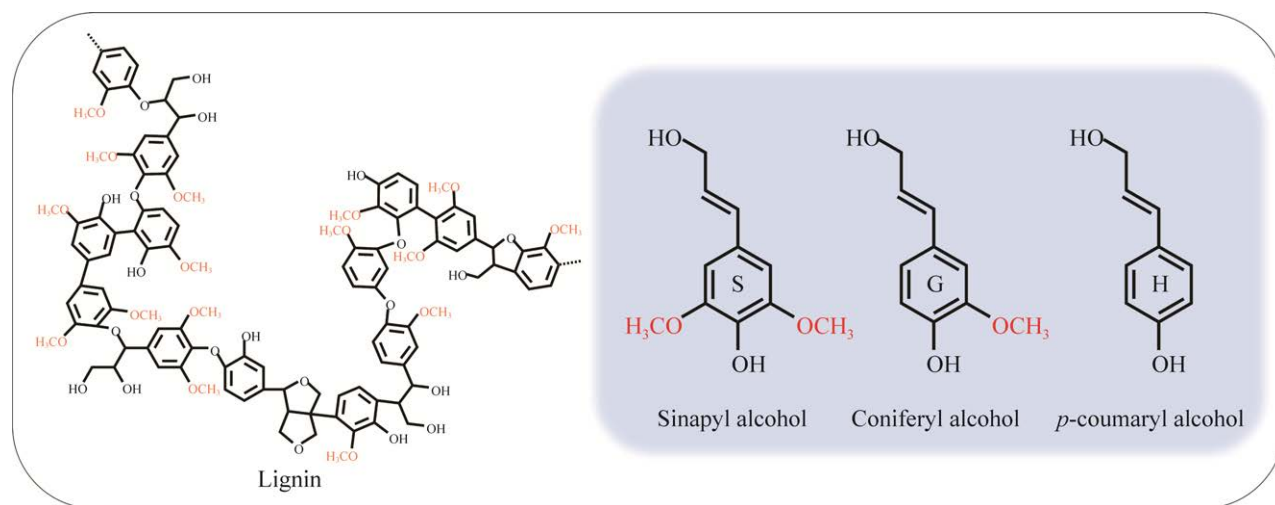


图1 木质素基本结构类型示意图(改编自参考文献[4])

Figure 1 Basic structure of lignin (adapted from reference[4]).

特性,从而使得木质纤维素中的碳得到有效释放,以维持自然界重要的碳循环。在自然环境下,木质素是通过个体或群落微生物以及环境等非生物因素之间的协同作用完全降解的^[9],其中,这些微生物具有不同的木质素降解酶和芳烃分解代谢途径。例如,木腐真菌进化出更全面和协调的木质素解聚胞外酶,而细菌进化出更多样化和高效的木质素衍生型芳香族化合物分解代谢途径^[10]。木质素解聚过程研究较多的是木腐真菌,主要通过苯基香豆满和松脂醇降解、 β -芳基-乙醚氧化两条途径和所产生的漆酶、木质素过氧化物酶等多种胞外氧化还原酶及其产生自由基的辅助酶系实现对木质素的解聚^[11-12]。然而,木质素解聚后复杂的芳香族化合物代谢研究主要集中于好氧细菌,其中研究较多的有 *Rhodococcus opacus*、*Pseudomonas putida* KT2440、*Sphingobium* sp. SYK-6 等^[13]。此外,微生物对木质素键的断裂和芳香族化合物代谢的选择性和偏好也极为多样化^[14-15]。最近的研究表明,在协同微生物的共同培养中补充细胞外酶或通过代谢工程操纵基因表达可以显著促进发酵过程

中木质素的利用^[16-17]。为了克服木质素及其复合超分子构成的生物降解抗性屏障,许多微生物进化出协同的胞外酶来有效地解聚木质素,并发展出多种代谢途径^[13]。这些途径的发现与解析,尤其是对其中功能酶的详细研究,使得越来越多的科研工作者投身于利用天然菌株或者人工合成菌株实现木质素定向转化为高值化合物的研究当中^[18-20],为微生物在木质素降解与高值化利用中打开了新局面。

微生物降解木质素可分为4个阶段:(1)通过分泌锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶、漆酶等^[21],将致密复杂的大分子结构解聚成小分子芳烃物质,如愈创木酚、阿魏酸、香草酸等,这个过程大多发生在真菌当中,只有少数细菌可以产生相关的酶^[22];(2)小分子芳烃物质通过脱甲氧基机制、脱羧机制等上游代谢途径生成固定的几种平台化合物,如儿茶酚、原儿茶酸、没食子酸、龙胆酸、羟基喹啉、邻苯三酚等,很多细菌中都发现了这类酶^[6];(3)几种平台化合物再通过开环转化成中心代谢产物,如乙酰辅酶A、丙酮酸等;(4)这些物质经中心代谢途径进入三羧

酸循环等,为生物体供能并生成其他高值化合物(图2)。微生物这种利用木质素的方式被称为“生物漏斗降解”,使得复杂异质性的木质素逐步降解并高值化利用^[5,18,21,23-24],为木质素的工业化应

用提供了新思路^[25]。虽然在微生物降解木质素方面已经有了一定的研究基础,但是木质素衍生型芳香族化合物上游代谢途径中脱甲基机制的研究仍缺乏突破性的进展。

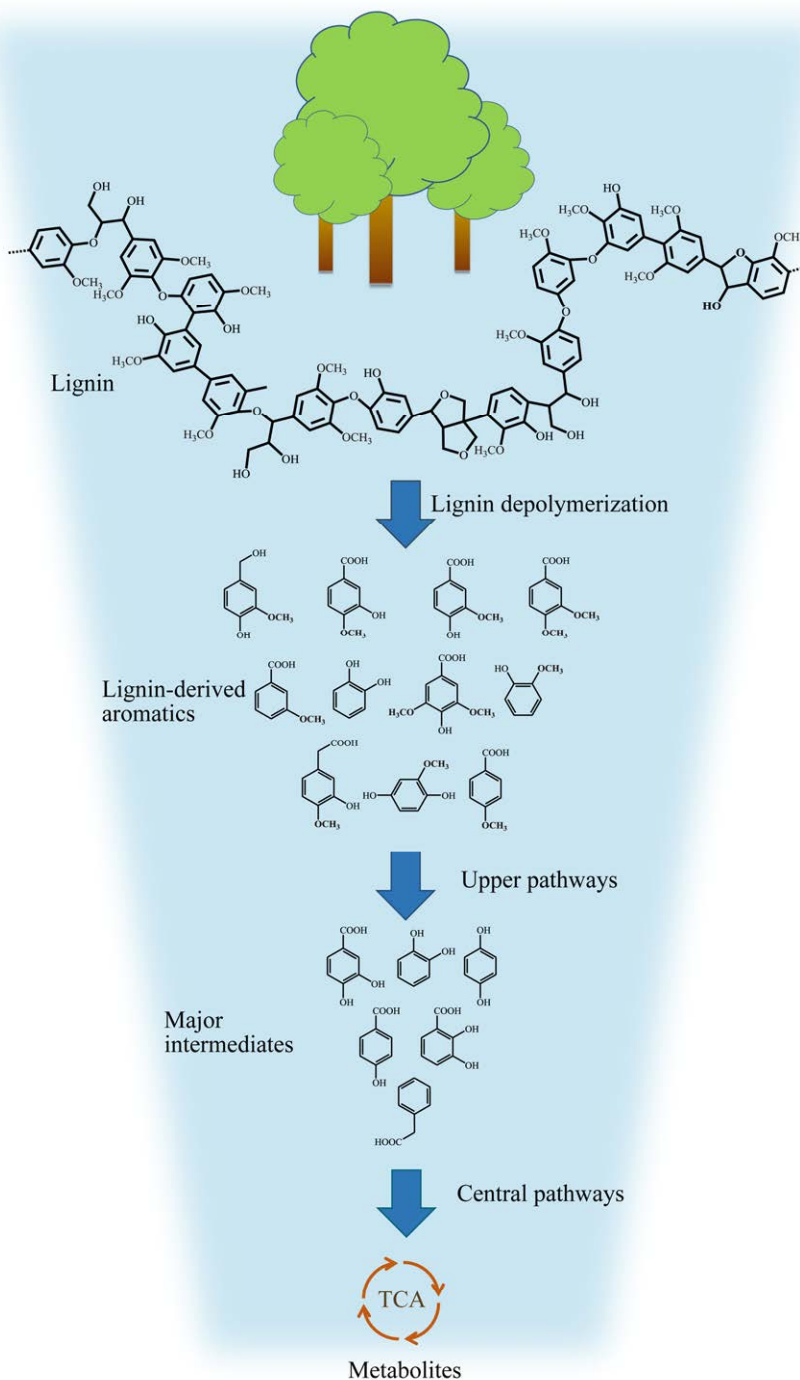


图2 微生物降解木质素过程简要概括图(改编自参考文献[5])

Figure 2 A concise overview of the microbial degradation process of lignin (adapted from reference[5]).

2 木质素衍生型芳烃物质脱甲基化的主要催化酶类

木质素,特别是那些富含 G 或 S 单元的木质素,经过常规的化学和物理处理或微生物解聚后,可以产生多种含甲氧基的化合物(即愈创木酚、丁香醇、香草酸、丁香醛、香兰素和丁香酸盐)^[26]。芳香族 *O*-脱甲基化是微生物转化木质素的关键上游通路反应^[27],微生物利用自身特有的脱甲基化酶进行 *O*-脱甲基化,可以将多种含甲氧基木质素衍生的芳香烃化合物转化为重要的中间产物,如儿茶酚或原儿茶酚酸、没食子酸等,为中心代谢途径的启动积累足够的前体物质,这是整个木质素降解过程的关键步骤,为下游进行氧化等一系列反应从而生成中心代谢产物进入三羧酸循环做准备^[28]。虽然近年来的研究证明了芳香烃苯环上甲氧基的脱甲基化是木质素降解以及高值化利用的主要限速步骤^[7,29-30],但是关于木质素解聚产物转化成上述重要中间产物的机制研究仍十分有限,对木质素衍生物脱甲基机制的研究主要还是集中在个别脱甲基酶的特征上。木质素解聚产生的低分子芳香衍生物的种类和数量取决于解聚方法和木质素的不同,包含丁香酸、香草酸、阿魏酸、原儿茶酸、愈疮木基丙酮酸、愈疮木基甘油- β -松柏醚、松柏醛、愈疮木基甘油、对羟基苯酸、对羟基苯乙酸、对香豆酸等几十种以上,而目前关于不同芳烃化合物的脱甲基化机制研究比较清晰的仅有 11 种(表 1),从表 1 中可知,不同木质素衍生芳香族化合物的脱甲基酶主要分为三类:血红素铁细胞色素 P450 酶(P450s)^[7,31-32,45-46]、Rieske 非血红素铁单加氧酶(ROs)^[47]和四氢叶酸(tetrahydrogen folic acid, THF)依赖性脱甲基化酶^[28,48-49]。其中,研究较为深入的脱甲基酶主要有 VanA/VanB、LigM 和 DesA。VanA/VanB 是一种双组分 Rieske 单加氧

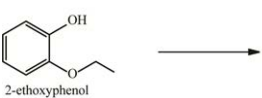

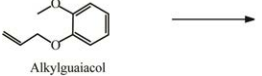
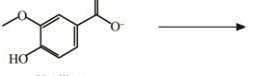
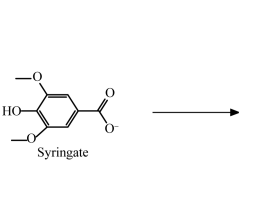
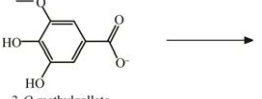

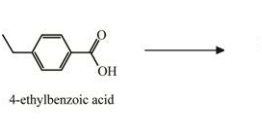
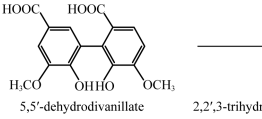
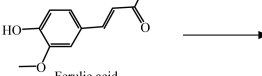
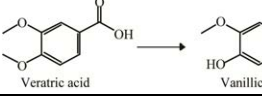
酶,最初发现于 *Acinetobacter baylyi* ADP1,主要针对香草醛及其类似物进行脱甲基化^[35]; LigM 和 DesA 是一种四氢叶酸依赖型的单加氧酶,源于 *Sphingobium* sp. SYK-6,可以对香草酸盐、3-甲基没食子酸盐和丁香酸盐进行 *O*-脱甲基化^[49-50]。然而, P450 家族的脱甲基酶对多种含甲氧基的木质素衍生型单芳烃均有脱甲基作用,近年来也受到研究者的广泛关注。ROs 和 P450 的加氧酶组分分别含有一个单核非血红素铁中心和血红素铁,它们通常需要 O₂ 的参与,随后在一个或多个额外的伴侣蛋白的配合下,在 NAD(P)H 中获得电子,甲氧基转化为羟基,生成甲醛或乙醛等醛类^[51-52]。对于 THF 依赖性脱甲基化酶不需要 O₂ 激活,主要依赖于辅酶 THF,并将木质素衍生的芳香化合物中甲氧基的甲基转移到 THF 辅助因子上而不氧化^[37,48,53]。这些酶的催化循环需要额外的成分来再生辅因子。在自然界中,ROs 和 P450 都能催化多种氧化反应,这使它们成为蛋白质工程和定向进化的有吸引力的元件,以增强木质素的微生物降解^[54-55]。

2.1 血红素铁细胞色素 P450 酶

细胞色素 P450 酶是一类血红素依赖型单加氧酶,含有典型铁卟啉环结构,在铁卟啉环的附近有一个底物结合袋,其氧化还原伴侣蛋白(redox partner protein)是类似于 ROs 的铁氧还原蛋白-NADP⁺还原酶组分(FNR_N),含有一个 N 端 [2Fe-2S]铁硫结构簇区域、黄素腺嘌呤二核苷酸(flavin adenine dinucleotide, FAD)结合位点和 NADH 结合位点^[51]。当底物附着时,伴侣蛋白从 NAD(P)H 获得电子,然后将其传递给 P450 酶进行底物催化^[52],其基本反应式如图 3 所示。脱甲基类 P450 酶广泛存在于木质素降解类细菌与真菌中,一般需要 1-2 个伴侣蛋白辅助完成电子传递,共同进行脱甲基作用^[7]。最开始,在细

表 1 木质素主要芳烃衍生物的脱甲基反应

Table 1 Demethylation reaction of main aromatic derivatives of lignin

木质素衍生化合物 Lignin-derived compounds	脱甲基反应 Demethylation reactions	代表性脱甲酶 Representative demethylases	宿主菌株 Strains
愈创木酚乙醚 2-ethoxyphenol		P450 _{RR1}	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> 116 ^[31]
愈创木酚 Guaiacol		P450 _{RR1} ; GcoA	<i>R. rhodochrous</i> 116 ^[31] ; <i>Amycolatopsis</i> sp. ATCC 39116 ^[7] ; <i>R. rhodochrous</i> EP4 ^[32]
烷基愈创木酚 Alkylguaiacol		AgcA	<i>R. rhodochrous</i> EP4 ^[32]
香草酸 Vanillate		VanAB; MtvB; LigM; DesA	<i>Pseudomonas</i> sp. HR199 ^[33] ; <i>Rhodococcus jostii</i> RHA1 ^[34] ; <i>Acinetobacter baylyi</i> ADP1 ^[35] ; <i>Moorella thermoacetica</i> ^[36] ; <i>Sphingomonas paucimobilis</i> SYK-6 ^[37] ; <i>Novosphingobium aromaticivorans</i> DSM 12444 ^[38]
丁香酸 Syringate		VanAB; DesA	<i>Pseudomonas putida</i> KT2440 ^[39] ; <i>S. paucimobilis</i> SYK-6 ^[37]
3-O-甲基没食子酸 3-O-methylgallate		VanAB; DesA; DmtS; MtvB; LigM	<i>P. putida</i> KT2440 ^[39] ; <i>N. aromaticivorans</i> DSM 12444 ^[38] ; <i>M. thermoacetica</i> ^[36] ; <i>N. aromaticivorans</i> DSM 12444 ^[38]
4-甲氧基苯甲酸乙酯 4-methoxybenzoate		P450 _{RR1}	<i>R. rhodochrous</i> ^[31]
4-乙基苯甲酸 4-ethylbenzoic acid		CYP199A2	<i>Rhodopseudomonas palustris</i> ^[40]
5,5'-脱氢二香草酸酯 5,5'-dehydrodivanillate		LigX	<i>Sphingobium</i> sp. SYK-6 ^[41]
阿魏酸 Ferulic acid		VanAB	<i>P. putida</i> WCS358 ^[42]
藜芦酸 Veratric acid		VanAB CYP199A4	<i>Streptomyces</i> sp. NL15-2K ^[43] ; <i>R. palustris</i> ^[44]

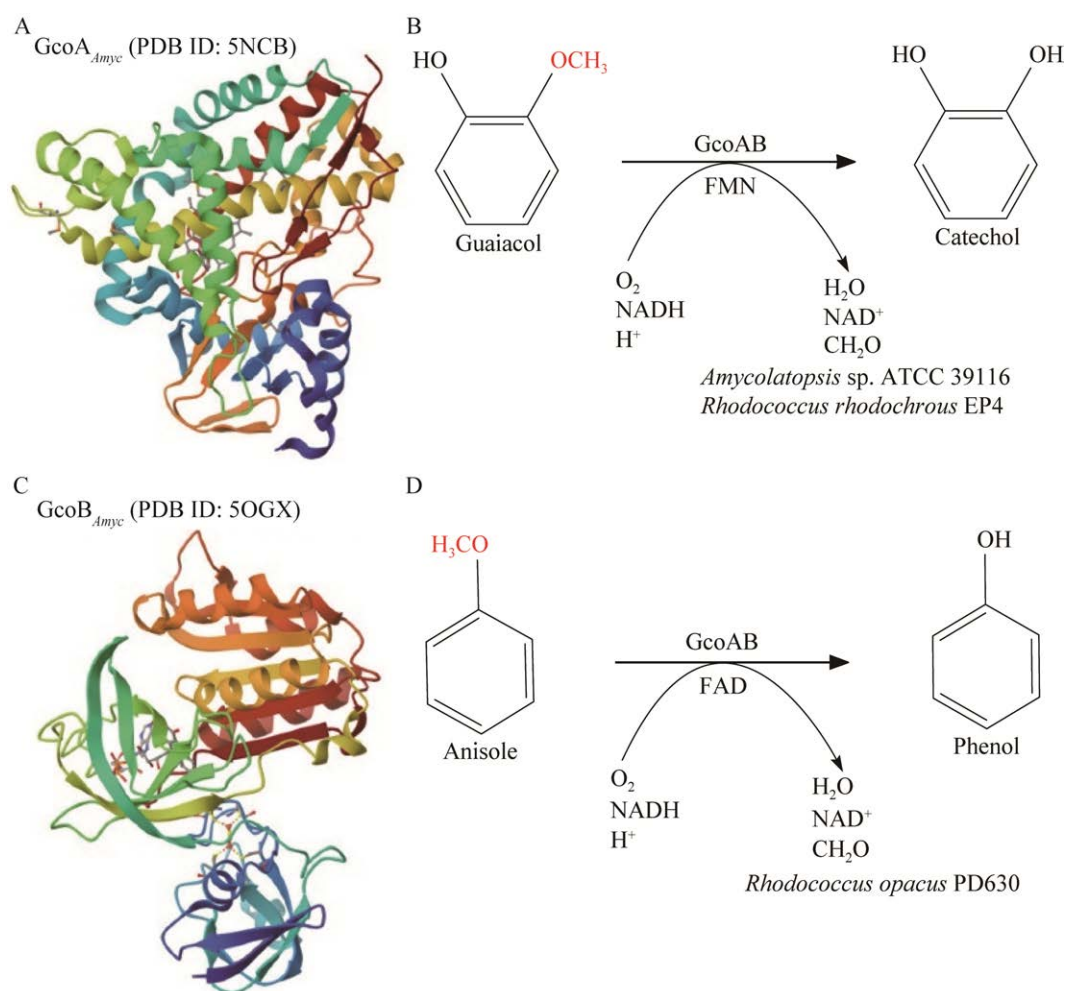


图3 脱甲基酶 GcoAB 蛋白结构及酶促反应式(PDB: 蛋白质数据库)

Figure 3 Structure and reaction of demethylase GcoAB (PDB: Protein Data Bank).

菌 *Rhodococcus rhodochrous* 116 中发现了第一个与木质素衍生型芳香族化合物 *O*-脱甲基化作用相关的细胞色素 P450 酶, 可将 2-乙氧基苯酚和 2-甲氧基苯酚进行脱甲基化^[31,56]。其他 P450 酶, 如 CYP199A2 和 CYP199A4, 随后也被证明能使 *Rhodopseudomonas palustris* 中的对甲氧基苯甲酸酯化合物脱甲基化^[40,44-45]。最近, 在 *Amycolatopsis* sp. ATCC 39116 中发现了 *O*-脱甲基化 P450 酶(GcoA 及其还原酶 GcoB), 该酶可以催化多种芳香底物的 *O*-脱甲基化, 尤其是愈创木酚^[7]。同时, 在 *R. rhodochrous* EP4 和 *Rhodococcus jostii* RHA1 中发现了另一种具有较

强木质素衍生型芳香族化合物脱甲基酶——细胞色素 P450 脱甲基酶 AgcA 及其伴侣蛋白 AgcB; 与 GcoA 不同的是, AgcAB 不是催化愈创木酚, 而是催化烷基愈创木酚的 *O*-脱甲基化, 在 4-烷基愈创木酚的分解代谢中起重要作用^[32]。此外, 我们还在 *Rhodococcus opacus* PD630 中鉴定了一对 P450 芳香脱甲基酶 GcoA_R 和 GcoB_R, 它们能有效地对愈创木酚和 4-甲氧基苯甲酸进行 *O*-脱甲基化^[57]。

根据氨基酸序列相似性, P450 酶已被划分为 2 200 多个家族^[58]。与木质素增值相关的最具特征的 P450 酶是细菌酶, 属于以下 2 个家族:

CYP255A 和 CYP199A, 这两类酶首先以其在污染物降解中的作用而闻名, 它们分别启动对愈创木酚和甲氧基苯甲酸酯的分解代谢^[56]。GcoA 属于 CYP255A 家族, 有一个广泛的疏水口袋, 愈创木酚进入底物口袋后, 底物的两个氧原子分别由残基 Val241 和 Gly245 的主碳基和酰胺氮基配位, 一系列的疏水性氨基酸负责固定愈创木酚的芳香环(图 4)。在水溶液中, GcoA 与 GcoB 形成异源二聚体。GcoA 表面有一个特征性的基本口袋, GcoB 上有相应的酸性补丁, 使 GcoAB 的结合成为可能。在整个催化过程中, GcoA 与底物结合后, GcoB 的 NAD(P)结合域与 NAD(P)H 结合, NAD(P)H 传递电子到 FAD 区域, 再传递到[2Fe-2S]铁硫结构簇区域, 最后传递给 GcoA 的血红素中心, 完成氧化还原反应^[7]。除愈创木酚外, GcoAB 还能催化多种芳香底物的 *O*-脱甲基化^[7,30]。这种混杂性, 结合对 GcoA 活性位点的全面结构研究, 使其成为具有很大改造潜力的脱甲基酶元件^[29-30]。

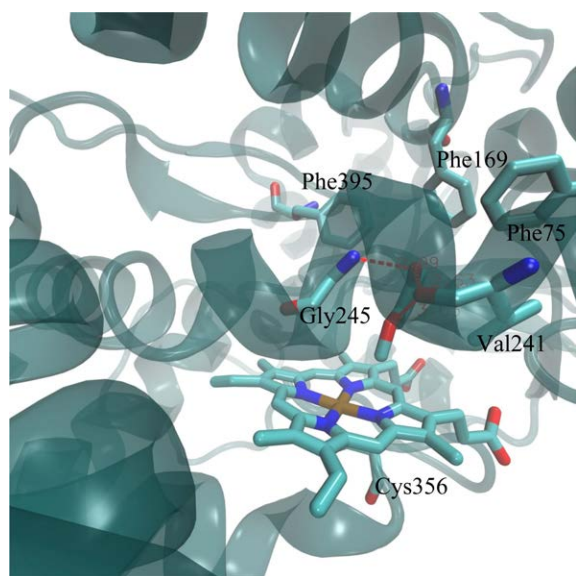


图 4 愈创木酚在 GcoA 催化中心的结构示意图 (PDB ID: 5NCB)

Figure 4 Structure diagram of guaiacol in GcoA catalytic center (PDB ID: 5NCB).

2.2 Rieske 型非血红素铁单加氧酶

Rieske 型非血红素铁单加氧酶广泛存在于多种木质素分解代谢的土壤细菌中^[33-35,39,42-43], 一般作为双组分或三组分系统发挥作用。在双组分系统中, 黄素辅酶——黄素单核苷酸(flavin mononucleotide, FMN)或 FAD 在还原酶的作用下将 NAD(P)H 的还原等效物转移到加氧酶。三组分体系有一个额外的铁氧还原蛋白, 它将电子从还原酶转移到加氧酶。加氧酶本身有一个 Rieske 型铁氧还原蛋白, 它将电子引导到单核铁上。铁离子附近的底物结合先于氧在单核铁上的结合和还原活化。随后, 高价铁离子在活性甲基基团上使底物羟基化, 进而重排生成最终产物^[59]。Rieske 结构域的特征是 2 个保守的 His 和 2 个保守的 Cys 残基, 它们协调了[2Fe-2S]簇为反应储存和提供额外的电子。

参与木质素相关化合物分解代谢甲氧基的 ROs 包括 VanAB 和 LigX, 它们分别催化香草酸和 5,5'-脱氢双苯乙烯酸的脱甲氧基(图 5)。最近, 通过随机编码转座子插入测序技术(RB-TnSeq)鉴定出的 Rieske 非血红素铁单加氧酶 GdmA 是一种愈创木酚脱甲氧酶^[48]。VanAB 是一种典型的双组分酶, 其中 VanA 是加氧酶, 而 VanB 是将电子从 NAD(P)H 转移到 VanA 进行氧化脱甲氧基的还原酶, 含有 Rieske 型[2Fe-2S]簇和单核铁^[48]。香草酸到原儿茶酸的 *O*-脱甲基化主要依赖于 VanAB 脱甲氧基酶, 该酶最早在 *Pseudomonas* sp. strain ATCC 19151 中通过测序技术和克隆技术发现^[60]。后来, 在 *Pseudomonas* sp. strain HR199 和 *P. putida* WCS358 中也发现了类似功能的 VanAB^[33,42]。接着, Segura 等从 *A. baylyi* ADP1 中鉴定的 VanAB 单加氧酶针对香草酸及其类似物进行 *O*-脱甲基化反应, 该酶含有 Rieske 非血红素铁中心, 可将阿魏酸盐或香草酸盐转化为原儿茶酸盐^[35]。产自 *Streptomyces*

sp. NL15-2K 的 *vanAB* 基因在 *Streptomyces lividans* 1326 中的表达会导致体内的藜芦酸脱甲氧基, 生成香草酸, 然后生成原儿茶酸^[43]。利用基因敲除手段和酶表征方法在 *R. jostii* RHA1 中发现了编码香兰素脱氢酶(vanillin dehydrogenase, VDH)和香兰素脱甲氧基酶(VanAB)的基因, *R. jostii* RHA046 *vanAB* 缺失型突变体不能在含有香草醛或香草酸作为唯一碳源的培养基上生长,

而能在丙酮酸上生长, 加以体外试验验证, 表明缺失型突变体失去了将香草酸进行 *O*-脱甲基化的能力^[34]。虽然已经有部分 Rieske 型非血红素铁单加氧酶结构解析的相关研究, 但目前尚无关于可以去除香草酸中甲氧基 VanAB 晶体结构的报道, 这使得我们对其更详细的作用机制了解不够全面, 为进一步开展酶的设计以拓宽底物增加了一定难度。

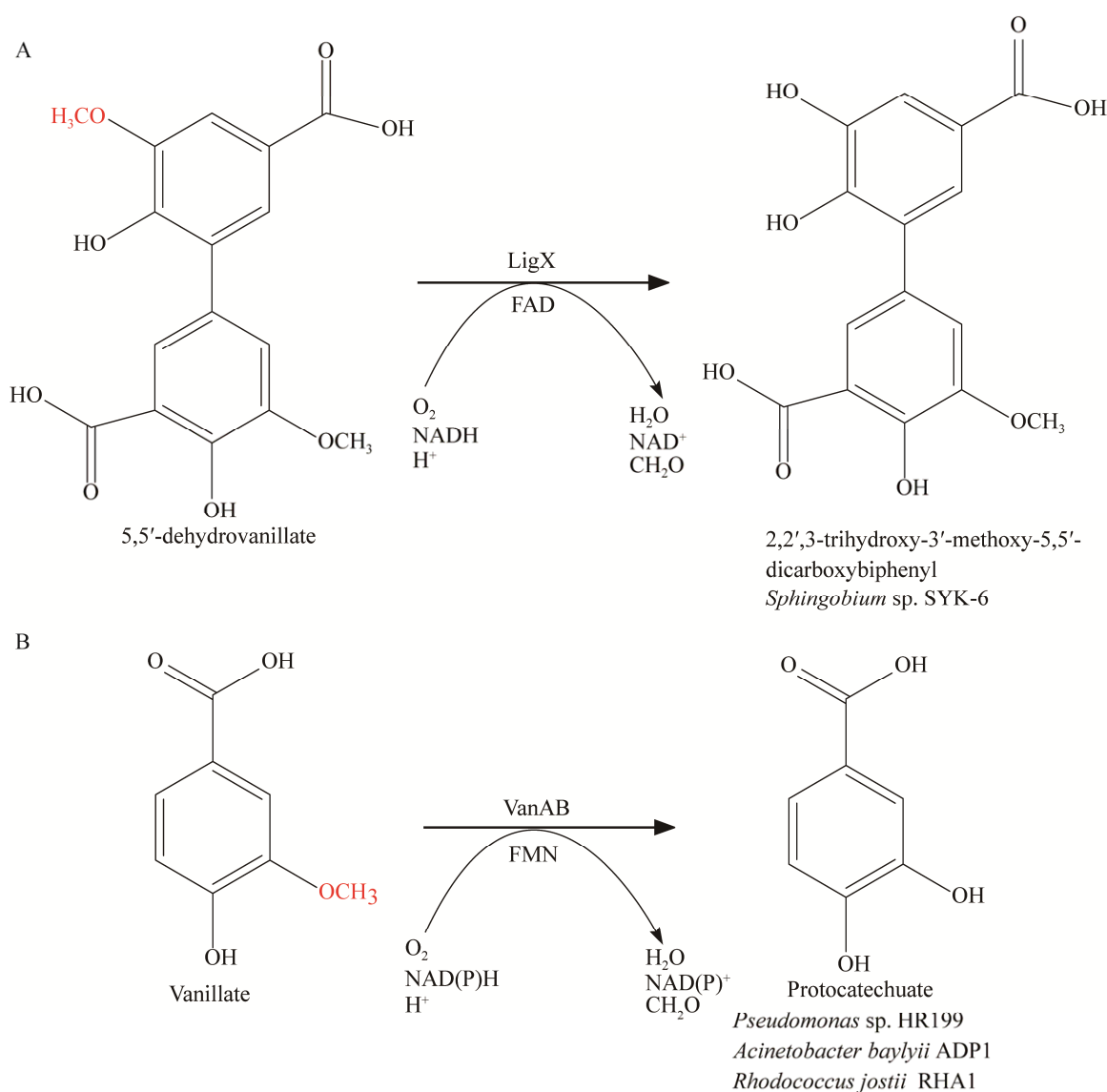


图5 脱甲基酶 LigX 及 VanAB 酶促反应式

Figure 5 Reaction of demethylase LigX and VanAB.

2.3 四氢叶酸(THF)依赖性脱甲基化酶

四氢叶酸(THF)依赖性脱甲基化酶常见于木质素衍生芳香族化合物的厌氧降解中,其中 THF 作为甲基的受体,可由 5,10-亚甲基四氢叶酸还原酶(5,10-methylene-H₄folate reductase, MetF)和甲酰四氢叶酸合成酶(10-formyl-H₄folate synthetase, LigH)再生^[37,61]。该脱甲基化酶系统的优点是可以使底物脱甲基化而不产生甲醛作为副产物,从而避免与甲醛相关的细胞毒性和酶抑制^[62-63],而其主要缺点是确保其正常工作的辅助因子 THF 或额外的 THF 再生系统具有较大的限制性^[48]。最初,研究人员发现了一个来自 *Acetobacterium woodii* ATCC 29683 菌株的依赖 THF 和 ATP 的可溶性厌氧脱甲基酶系统^[64]。随后,在 *Acetobacterium dehalogenans* 和 *Moorella thermoacetica* 中分离出的醚裂解 O-脱甲基酶系统组分中,发现其具有香草酸盐脱甲基酶^[36,65]。研究最多的 THF 依赖性脱甲基化酶——LigM 和 DesA 及其同源物已在 *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 和 *Novosphingobium aromaticivorans* DSM 12444 中被鉴定。最近,利用转座子诱变技术,在 *N. aromaticivorans* DSM 12444 中发现了一种新的脱甲基酶 DmtS,它能催化 3-O-甲基没食子酸酯生成没食子酸酯^[38]。研究发现 *S. paucimobilis* SYK-6 中编码丁香酸脱甲基酶的 *desA* 的转录受 IclR 型转录调节剂 DesX 的调控^[49]。*desA* 基因位于 *ferA* 基因下游 929 bp,编码阿魏酰辅酶 A 合成酶,由一个 1 386 bp 的开放阅读框组成,编码分子量为 50 721 Da 的多肽,*S. paucimobilis* SYK-6 中 *desA* 的破坏会导致 *S. paucimobilis* SYK-6 无法利用丁香酸,但不影响其对香草酸的利用,表明 DesA 对丁香酸的降解至关重要^[53]。LigM 通常使香草酸和 3-O-甲基没食子酸酯 O-脱甲基化为原儿茶酸酯和没食子酸,而 DesA 优先使丁香酸酯 O-脱甲基化,并

且存在互调关系。在这些反应中,甲氧基中的甲基从含甲氧基芳烃物质转移到 THF,产生 5-甲基-四氢叶酸盐,这是甲硫氨酸生物合成所需的 C1 代谢中间体^[28,37],其结构与反应如图 6 所示。

LigM 的晶体结构显示,该酶由 4 个结构域组成。结构域 I 和结构域 II 之间具有一个大的中心腔以结合 THF,此中心腔是 LigM 的活性位点^[28,50]。底物香草酸和 3-O-甲基没食子酸位于 THF 的蝶啶环和 LigM 活性位点腔的内表面之间(图 7)。香草酸甲氧基的氧原子与 His60 和 Tyr247 形成氢键,Tyr247 羟基的质子和香草酸甲氧基的孤对电子相互作用,取代甲基部分。同时 THF N5 原子的孤对电子攻击甲基部分,和 Tyr247 一起促进甲基从香草酸转运到 THF 形成原儿茶酸和 5-甲基-四氢叶酸^[50]。对 LigM 突变体的生化分析结果表明,His60Ala 和 Tyr247Phe 这 2 个突变体可以结合香草酸和 THF,但会丧失催化活性。His60 和 Tyr247 可能既参与底物结合,也参与催化反应。对 LigM 进行 Tyr31Ala 突变,突变体对香草酸的结合变弱,且突变体的酶活降低,说明 Tyr31 对于 LigM 的催化活性至关重要^[50]。

3 芳烃化合物脱甲基酶的人工设计改造

将木质素衍生型芳烃物质脱甲基酶通过基因工程技术导入到微生物,极大地促进了木质素的增值化利用。此外,该酶的理性设计与改造也为更高效地利用木质素提供了关键的元件。通过结构引导蛋白工程对 GcoA 进行理性设计,可以扩大 GcoA 的底物范围,有效地对邻香兰素、香兰素和丁香醇进行脱甲基。通过对其晶体结构的分析,发现其活性位点的打开和关闭与 75、165 和 395 位的苯丙氨酸的侧链运动和底物结合相关,296 位的苏氨酸则可以跟芳烃中的醛基形成

氢键^[7]。紧接着根据对 GcoA 这些关键位点具体作用的进一步探究,进行一系列针对性设计与改造,不仅得到可以对邻香兰素和香兰素进行脱甲基化的突变体 GcoA-Phe169Ser 和 GcoA-Thr296Ser, 还获得了可以对丁香醇进行脱甲基作用的突变体 GcoA-Phe169Ala, 并将其转入 *P. putida* KT2440 中,使菌株获得了对这些木质素衍生型芳烃物质的脱甲基能力,从而增强 *P. putida* KT2440 对木质素的降解^[29-30]。此外,野生型 GcoA 的 Thr296 与香兰素醛基之间的位阻阻碍了与香兰素的结合。对 GcoA 进行突变得到 GcoA-Thr296Ala,使其具备对香兰素的 *O*-脱甲基化,从而赋予 *P. putida* KT2440 更强的木质素降解能力^[29]。

来自 *R. palustris* 的细胞色素 P450 酶 CYP199A2,仅可对羧酸类苯环对位上的甲氧基

进行去除,通过结构解析发现,其 97 位和 247 位的丝氨酸残基的羟基侧链与底物的羧基之间的相互作用赋予了该酶底物特异性,通过蛋白质工程设计和构建 CYP199A2 突变体,将两个位点的丝氨酸分别变成具有羧基侧链的酸性氨基酸天冬氨酸和谷氨酸,成功得到了可以对羟基芳香族化合物进行识别并进行脱甲基反应的突变体^[62,66]。其中, Ser247Asp 突变体可以迅速氧化对甲酚,整个细胞在短短 1 min 内可将 30 mmol/L 对甲酚完全转化为对羟基苯甲醇^[66]。另外, *R. palustris* 中表达的细胞色素 P450 酶 CYP199A4,仅对苯基环对位(羧酸)上的甲氧基进行脱甲基化,在邻位和间位上对其他取代基具有耐受性,通过构建该酶活性位点的 Ser244Asp 突变体,消除了对羧酸盐的依赖,并将底物范围扩展到苯衍生物^[62]。

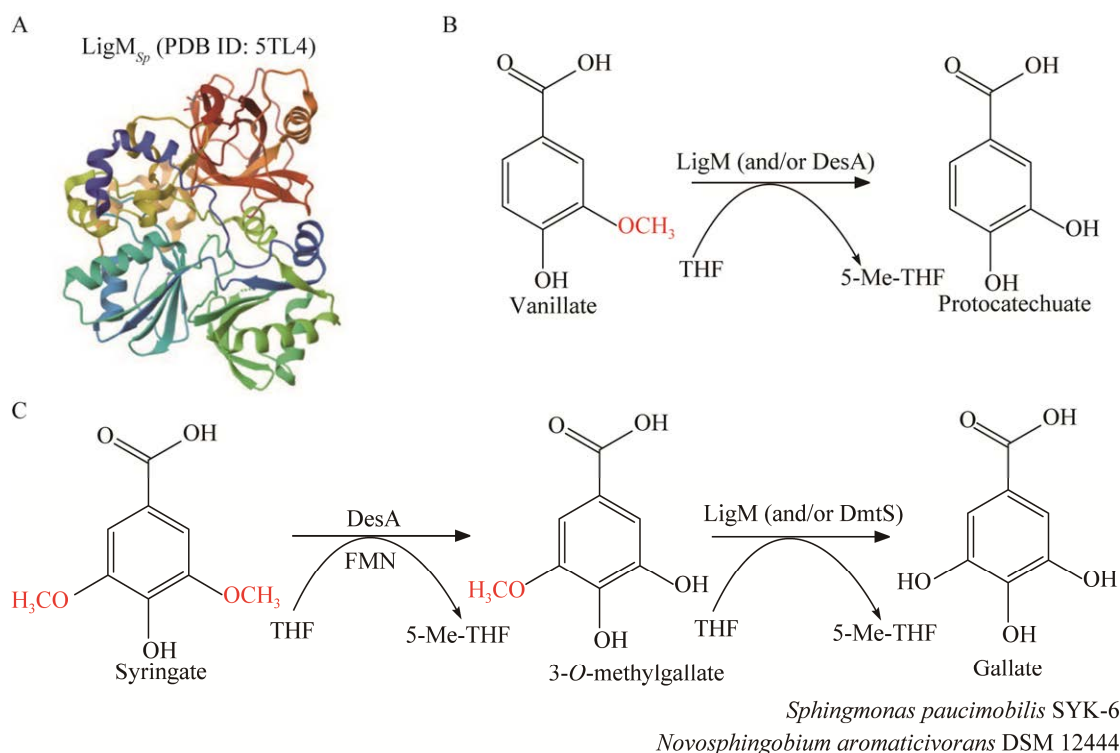


图 6 脱甲基酶 LigM 蛋白结构及酶促反应式

Figure 6 Structure and reaction of demethylase LigM.

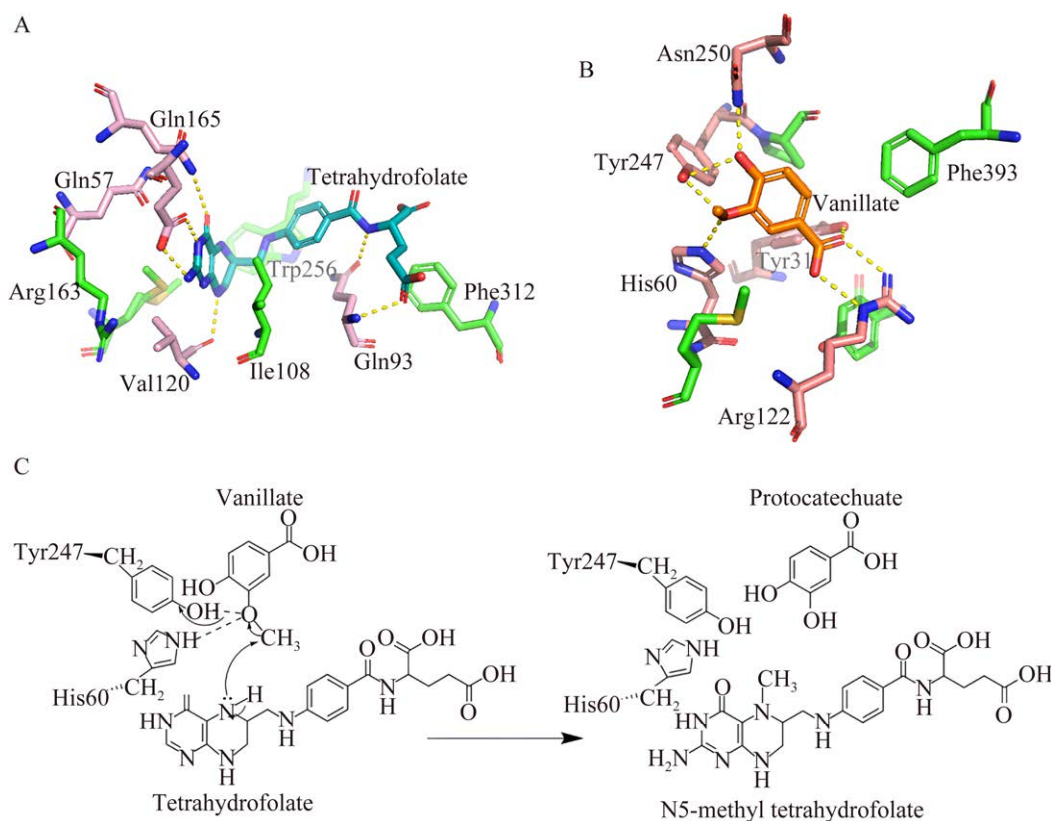


图7 脱甲基酶 LigM 活性位点及催化机理示意图(改编自参考文献[50]) A: 在 LigM-四氢叶酸复合体中与四氢叶酸结合模型. B: 在 LigM-香草酸复合体中与香草酸结合模型. C: LigM 催化机理示意图

Figure 7 Schematic diagram of the active sites and catalytic mechanism of demethylase LigM (adapted from reference [50]). A: Tetrahydrofolate binding model in LigM-tetrahydrofolate complex. B: Vanillic acid binding model in LigM-vanillic acid complex. C: Schematic diagram of LigM catalytic mechanism.

除了在已探究功能的基础上对具备脱甲基功能的 P450 酶进行设计与改造,也有研究工作者利用已有的非芳烃物质脱甲基细胞色素 P450 酶 P450BM3 进行设计与改造,成功地应用双功能小分子(dual-functional small molecules, DFSM)促进的 P450BM3 过加氧酶系统实现对各种芳香族醚的区域选择性 *O*-脱甲基化,这是使用过氧化物驱动的细菌 P450 酶进行芳烃物质 *O*-脱甲基化的首次报道,不仅扩展了 H_2O_2 依赖性 P450 过加氧酶的功能,也为木质素生物转化的关键步骤开辟一条新途径^[67]。这些实例都表明,不同功能的细胞色素 P450 酶的设计改造可为人工设计木质素高价值转化途径提供有效元件,并加速

木质素经济化利用的进程。因此,研究者们不应只倾向于依靠转录组和 RT-PCR 的结果来优化相关产物的转化途径而削弱了对这些功能酶的机制研究,对酶本身的催化机制和结构功能区域的研究可以帮助我们通过对酶的理性设计获得更高效的催化剂,这将更有助于木质素衍生芳香化合物的高值转化。

4 芳烃化合物脱甲基化在木质素高值化利用中的应用与开发

许多芳香族化合物在工业、食品和医药等领域有着广泛的应用和较大的市场份额^[68]。微生

物合成方法为天然芳香族聚合物提供了一种可持续的商业生产策略^[69]。木质素是一种可持续的可再生资源,作为最丰富的芳香族聚合物,具有生产芳香族化合物的巨大潜力^[25]。通过整合选择性解聚系统和生物芳香漏斗系统、重新设计天然木质素生物降解途径或构建新的人工途径,可促进木质素的高值化利用。木质素中的芳香单元可以用于目标芳香化合物的生产,能有效降低能耗和减少碳损失。其中,新的脱甲氧基方案也可以用于木质素衍生化合物的高值化利用^[70]。近 10 年来,木质素解聚制备精细化学品的催化策略研究取得了很大进展^[23,25,71]。其中脱甲氧基反应将产生羟基化芳烃,这些芳烃可以作为基础产物,通过各种合成策略生产增值化学品。例如,愈创木酚衍生物的脱甲氧基会产生儿茶酚,儿茶酚可以应用于许多药物、杀虫剂和香料中^[72]。此外,儿茶酚还可以氧化转化为黏康酸,黏康酸可以用来作为抗紫外线防护剂及军工特种用品^[73]。黏康酸又可以氢化成己二酸衍生物,用于聚酯树脂合成^[23,62,74]。又如可以利用木质素合成聚羟基脂肪酸酯 (polyhydroxyalkanoates, PHA), 这些高价值的化合物的生产都需要突破脱甲氧基这个限速步骤,因此脱甲基酶的作用显得至关重要。

在设计用于木质素增值的微生物细胞工厂时,可以利用野生型和工程型 P450 酶来增强宿主菌株对木质素衍生芳香族化合物的转化能力,并促进目标产物的合成。这一策略使我们能够从生物质资源中提炼出其他方法难以获取的化学物质,进一步拓宽生物质的应用领域。例如,来自 *R. rhodochrous* J3 的 GcoAB_{J3} 和 GcoAB_{Amyc} 都可以在 *P. putida* 中异源表达,从而使恶臭假单胞菌获得在愈创木酚中生长的能力,这为我们提供了新的木质素转化途径^[46,75]。此外,在 *P. putida* KT2440 中表达的 GcoA_{Amyc} 蛋白突变体可

以对丁香酚进行 *O*-脱甲基化,生成 3-甲基儿茶酚和邻苯三酚^[30]。研究表明, *Pseudomonas* sp. HR199 的 VanAB 系统在 *P. putida* KT2440 中异源表达,可以使 *P. putida* KT2440 获得以丁香酸为唯一碳源生长的能力,以补充细菌木质素衍生型芳族化合物的分解代谢能力,最终使其获得可以同时转化 S 型、G 型和 H 型 3 种木质素衍生单体的能力^[76]。此外, VanAB 被证明具有广泛的底物范围,如间茴香酸盐、间甲苯酸盐和 4-羟基-3,5-二甲基苯甲酸盐^[77],这体现出通过木质素生物漏斗整合不同功能 *O*-脱甲基酶的巨大潜力^[76]。迄今为止,在优化和设计脱甲基酶特异性和活性方面所做的工作表明, P450 酶在克服木质素活化的关键瓶颈方面具有广阔前景。显然,如何利用这些酶催化木质素衍生芳香族化合物并优化它们在微生物细胞工厂中的酶学性能是木质素增值技术的核心^[26]。

没食子酸是一种具有广泛药理特性的高价值化学品,在医药、食品和化妆品等行业有着广泛的应用^[78]。传统的 S 型木质素单体生产没食子酸的方法效率低,最近的一项研究提出了一种新的策略,以 *R. opacus* PD630 为基础,通过引入外源性生物催化途径和增强内源性生物催化系统,整合 3 种主要的生物催化反应(即羟基化、脱甲氧基和芳基侧链氧化),选择性地木质素组分转化为没食子酸盐,包括以天然 Rieske 非血红素铁单加氧酶为基础的脱甲氧基体系从 G 型木质素化合物生产没食子酸酯,及引入四氢叶酸依赖的脱甲氧基体系从 S 型木质素化合物生产没食子酸盐^[17]。引入多种内源性成分作为一个集成的微生物生物催化系统,为将木质素衍生的芳香混合物转化为目标增值产品提供了宝贵的策略。丁香醛是木质素衍生的芳香分子之一,通过在大肠杆菌中异源表达脱甲基酶 desV 或 LigV 可以生产丁香酸^[79]。此外,丁香酸可以通

过脱甲基酶(DesA 和 LigM)转化为没食子酸。

原儿茶酸(protocatechuic acid, PCA)天然存在于各种香料、水果、坚果和蔬菜中,是一种具有多种药理活性的化学品,也被认为是合成聚合物和塑料的前体。原儿茶酸作为一种商业上重要的平台化学品,在塑料、药品、食品配料和化妆品等领域具有潜在的应用前景^[80-83]。通过在大肠杆菌中表达 *Sphingobium* sp. SYK-6 中的香草酸脱甲基化酶(LigM)和植物蛋氨酸合成酶(MetE),实现了在大肠杆菌中以香草酸为底物生成 PCA,并且仅在辅因子 THF 存在的情况下,使得脱甲基酶具有相似活性。在优化条件下,双酶体系与单酶工艺相比,辅因子与底物的摩尔比降低到原来水平的五分之一,这是第一个在生物催化过程中再生 THF 的方法^[84]。通过双酶系统使用低化学量的 THF 作为辅助因子,可以有效地将香草酸转化为其他化合物,从而大大降低总成本。

黏康酸(muconic acid, MA)作为重要的精细化工中间体,是生产尼龙和聚对苯二甲酸乙二醇酯(polyethylene terephthalate, PET)聚合物中重要的组成部分,也是合成己二酸和对苯二甲酸的前体^[85]。传统的 MA 生产工艺分别以石油基、高浓度的重金属为原料和催化剂,会造成环境污染。最近的研究表明,可以模式微生物大肠杆菌为研究对象,通过引入一条人工合成途径,异源表达一条含有脱甲基酶 LigV、LigM、AroY 表达基因的合成路线,从香兰素中生产 MA^[86]。

脱甲基化作为木质素高值化利用中的关键步骤,通过选择性解聚系统和生物芳香漏斗系统的整合,以及脱甲基酶的优化和设计,可以成功地将木质素转化为高价值的芳香族化合物。这不仅拓宽了生物质的应用领域,也为医药、食品、化妆品等多个行业提供了可持续的原料来源。

5 木质素衍生芳烃化合物脱甲基机制研究的机遇与挑战

目前的研究主要聚焦于解析几种典型芳烃化合物的脱甲基机制,而对于脱甲基酶的催化机制,我们的理解也仍然停留在极少数酶的水平上。然而,针对结构复杂的木质素,这样的研究深度和广度显得捉襟见肘。木质素脱甲基酶在木质素降解及脱甲基过程中的独特性和复杂性,在很大程度上给我们的研究带来了极大的挑战,主要表现在 3 个方面。

(1) 木质素的复杂性和解聚后芳烃化合物的多样性意味着不同的微生物、生态环境在代谢过程、产物和分子机制上存在的显著差异。因此,仅凭少数几种微生物的研究来全面解析脱甲基机制是远远不够的。为了更深入地探索木质素降解菌株在不同生态环境中的脱甲基机制,需要结合多组学高通量筛选等先进技术进行深入的研究,在不同环境中筛选菌株。然而在筛选菌株的过程中,一个关键挑战是许多微生物难以在实验室条件下进行培养。为了克服这一难题,我们可以采用不依赖培养的方法,如宏基因组学技术,直接从环境样本中提取和分析微生物的遗传信息。这种方法允许我们获取那些难以培养的微生物的脱甲基酶的基因信息,从而更全面地揭示木质素降解菌株在不同生态环境中的多样性。除了宏基因组学方法外,我们还可以结合代谢组学和蛋白质组学技术^[87],对木质素降解过程中的代谢物和蛋白质进行全面分析。这些技术可以帮助我们揭示微生物在不同环境条件下的代谢途径和调控机制,从而更深入地理解脱甲基机制。

(2) 近年来,众多研究揭示了新型芳烃化合物的脱甲基酶多数属于 P450 酶家族。然而,针对 P450 酶的研究面临多重挑战。该酶家族成员种类繁多、遗传多态性显著^[88],导致功能确定

困难。传统的序列比对方法难以准确锚定和注释 P450 酶,增加了其解析的复杂性。为了深入挖掘和解析这些新型木质素衍生芳烃化合物的脱甲基酶,我们可以进一步结合菌株降解特性表征和酶的高通量筛选技术以深入挖掘新型木质素衍生芳烃化合物的脱甲基酶^[89]。首先,通过全面表征菌株在木质素降解过程中的表现,我们能够筛选出具有优异脱甲基能力的菌株。随后,利用高通量筛选技术,我们可以从众多候选酶中迅速识别出具有潜在脱甲基活性的酶。在挖掘 P450 酶的过程中,通过利用基因组学和转录组学的方法,我们可以系统分析菌株中 P450 酶基因的表达模式,进而筛选出与木质素降解和脱甲基过程相关的候选酶。为了验证这些候选酶在木质素降解中的具体功能,可以构建基因敲除或基因过表达系统,以深入探究其生物学作用。此外,为了深入解析 P450 酶的结构和功能,可以利用 X 射线晶体学和冷冻电镜技术来揭示其三维结构和催化机制^[90]。同时,基于量子化学的计算模拟方法,可以从分子水平深入理解 P450 酶与底物的相互作用过程。

(3) 脱甲基酶的复杂性还在于其多为双组份或多组分的氧化酶结构,例如 VanAB 等蛋白。这些蛋白难以通过异源表达进行纯化,这给此类脱甲基酶的结构和催化机制解析带来了巨大挑战。利用 AI 辅助的蛋白质结构解析技术,可以更有效地解析难以表达的蛋白的结构。这种技术通过机器学习和大数据分析,能够预测蛋白质的三维结构,从而帮助科学家更好地理解其功能和催化机制^[91]。除了 AI 辅助的解析方法外,还有其他一些技术可以用于解决难以表达的蛋白的结构解析问题。例如,利用化学合成的方法可以合成出与天然蛋白质具有相似结构和功能的合成蛋白质,从而进行结构和功能的研究^[92]。此外,利用分子动力学模拟和同源性建模等方法,

可以根据已知的相似蛋白结构来预测未知蛋白的结构^[93]。通过综合运用多种技术和方法,我们可以更深入地了解脱甲基酶的结构和催化机制。这不仅有助于深化我们对生物催化过程的理解,也为木质素的微生物转化和高值利用提供了重要的理论支持。

综上所述,木质素生物降解酶的脱甲基机制及其相关途径的研究将为木质素的增值提供丰富的途径,这将有助于建立木质素转化为新化学品的人工途径。近年来,尽管在微生物降解木质素方面已经取得了一定的研究进展,但是对木质素衍生型芳烃化合物上游代谢途径中的脱甲基机制的研究还不全面。本文归纳比较了来源于不同菌株的脱甲基酶的特点,并深度解析其结构与反应机制,阐述了木质素降解与高值化利用中脱甲基机制的重要性。利用结构引导蛋白工程手段,通过理性设计可以拓宽其底物,可以增强微生物对含甲氧基木质素衍生型芳烃化合物的降解与转化。将来自不同微生物的木质素解聚系统和漏斗代谢系统整合到工程系统中,重新设计天然木质素生物降解途径或构建新的人工途径,结合合成生物学和无细胞转化技术为开发木质素增值提供新途径。

REFERENCES

- [1] VIEIRA FR, MAGINA S, EVTUGUIN DV, BARROS-TIMMONS A. Lignin as a renewable building block for sustainable polyurethanes[J]. *Materials*, 2022, 15(17): 6182.
- [2] HUANG DL, LI RJ, XU P, LI T, DENG R, CHEN S, ZHANG Q. The cornerstone of realizing lignin value-addition: exploiting the native structure and properties of lignin by extraction methods[J]. *Chemical Engineering Journal*, 2020, 402: 126237.
- [3] FREUDENBERG K. Lignin: its constitution and formation from *p*-hydroxycinnamyl alcohols: lignin is duplicated by dehydrogenation of these alcohols; intermediates explain formation and structure[J]. *Science*, 1965, 148(3670): 595-600.

- [4] BOERJAN W, RALPH J, BAUCHER M. Lignin biosynthesis[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54: 519-546.
- [5] LI F, ZHAO YQ, XUE L, MA FY, DAI SY, XIE SX. Microbial lignin valorization through depolymerization to aromatics conversion[J]. Trends in Biotechnology, 2022, 40(12): 1469-1487.
- [6] LUBBERS RJM, DILOKPIOMOL A, VISSER J, MÄKELÄ MR, HILDÉN KS, de VRIES RP. A comparison between the homocyclic aromatic metabolic pathways from plant-derived compounds by bacteria and fungi[J]. Biotechnology Advances, 2019, 37(7): 107396.
- [7] MALLINSON SJB, MACHOVINA MM, SILVEIRA RL, GARCIA-BORRÀS M, GALLUP N, JOHNSON CW, ALLEN MD, SKAF MS, CROWLEY MF, NEIDLE EL, HOUK KN, BECKHAM GT, DuBOIS JL, McGEEHAN JE. A promiscuous cytochrome P450 aromatic *O*-demethylase for lignin bioconversion[J]. Nature Communications, 2018, 9: 2487.
- [8] MASAI E, KATAYAMA Y, FUKUDA M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2007, 71(1): 1-15.
- [9] 梁丛颖, 林璐. 环境微生物介导的木质素代谢及其资源化利用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(10): 3380-3392.
- LIANG CY, LIN L. Environmental microorganisms driven lignin biodegradation and their roles in lignin utilization[J]. Microbiology China, 2020, 47(10): 3380-3392 (in Chinese).
- [10] WENG CH, PENG XW, HAN YJ. Depolymerization and conversion of lignin to value-added bioproducts by microbial and enzymatic catalysis[J]. Biotechnology for Biofuels, 2021, 14(1): 84.
- [11] XIE SX, SYRENNE R, SUN S, YUAN JS. Exploration of Natural Biomass Utilization Systems (NBUS) for advanced biofuel: from systems biology to synthetic design[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2014, 27: 195-203.
- [12] 赵一全, 张慧, 张晓昱, 谢尚县. 木质素的微生物解聚与高值转化[J]. 微生物学报, 2020, 60(12): 2717-2733.
- ZHAO YQ, ZHANG H, ZHANG XY, XIE SX. Microbial depolymerization and valorization of lignin[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(12): 2717-2733 (in Chinese).
- [13] XIE SX, SUN S, LIN FR, LI MZ, PU YQ, CHENG YB, XU B, LIU ZH, da COSTA SOUSA L, DALE BE, RAGAUSKAS AJ, DAI SY, YUAN JS. Mechanism-guided design of highly efficient protein secretion and lipid conversion for biomanufacturing and biorefining[J]. Advanced Science, 2019, 6(13): 1801980.
- [14] CAJNKO MM, OBLAK J, GRILC M, LIKOZAR B. Enzymatic bioconversion process of lignin: mechanisms, reactions and kinetics[J]. Bioresource Technology, 2021, 340: 125655.
- [15] LEE S, KANG M, BAE JH, SOHN JH, SUNG BH. Bacterial valorization of lignin: strains, enzymes, conversion pathways, biosensors, and perspectives[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, 7: 209.
- [16] XIE SX, SUN QN, PU YQ, LIN FR, SUN S, WANG X, RAGAUSKAS AJ, YUAN JS. Advanced chemical design for efficient lignin bioconversion[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2017, 5(3): 2215-2223.
- [17] CAI CG, XU ZX, ZHOU HR, CHEN ST, JIN MJ. Valorization of lignin components into gallate by integrated biological hydroxylation, *O*-demethylation, and aryl side-chain oxidation[J]. Science Advances, 2021, 7(36): eabg4585.
- [18] VANHOLME R, DEMEDTS B, MORREEL K, RALPH J, BOERJAN W. Lignin biosynthesis and structure[J]. Plant Physiology, 2010, 153(3): 895-905.
- [19] KUATSAH E, ZAHN M, CHEN XY, KATO R, HINCEN DJ, KONEV MO, KATAHIRA R, ORR C, WAGNER A, ZOU YK, HAUGEN SJ, RAMIREZ KJ, MICHENER JK, PICKFORD AR, KAMIMURA N, MASAI EJ, HOUK KN, McGEEHAN JE, BECKHAM GT. Biochemical and structural characterization of a sphingomonad diarylpropane lyase for cofactorless deformylation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2023, 120(4): e2212246120.
- [20] LIAO YH, KOELEWIJN SF, van den BOSSCHE G, van AELST J, van den BOSCH S, RENDERS T, NAVARE K, NICOLAÏ T, van AELST K, MAESEN M, MATSUSHIMA H, THEVELEIN JM, van ACKER K, LAGRAIN B, VERBOEKEND D, SELS BF. A sustainable wood biorefinery for low-carbon footprint chemicals production[J]. Science, 2020, 367(6484): 1385-1390.
- [21] BUGG TDH, AHMAD M, HARDIMAN EM, RAHMANPOUR R. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi[J]. Natural Product Reports, 2011, 28(12): 1883-1896.

- [22] BUGG TDH, WILLIAMSON JJ, RASHID GMM. Bacterial enzymes for lignin depolymerisation: new biocatalysts for generation of renewable chemicals from biomass[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2020, 55: 26-33.
- [23] SUN ZH, FRIDRICH B, de SANTI A, ELANGOVAN S, BARTA K. Bright side of lignin depolymerization: toward new platform chemicals[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(2): 614-678.
- [24] ZHAO C, XIE SX, PU YQ, ZHANG R, HUANG F, RAGAUSKAS AJ, YUAN JS. Synergistic enzymatic and microbial lignin conversion[J]. *Green Chemistry*, 2016, 18(5): 1306-1312.
- [25] BECKHAM GT, JOHNSON CW, KARP EM, SALVACHÚA D, VARDON DR. Opportunities and challenges in biological lignin valorization[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2016, 42: 40-53.
- [26] WOLF ME, HINCEN DJ, DuBOIS JL, McGEEHAN JE, ELTIS LD. Cytochromes P450 in the biocatalytic valorization of lignin[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2022, 73: 43-50.
- [27] BLEEM A, KUATSJAH E, PRESLEY GN, HINCEN DJ, ZAHN M, GARCIA DC, MICHENER WE, KÖNIG G, TORNESAKIS K, ALLEMANN MN, GIANNONE RJ, McGEEHAN JE, BECKHAM GT, MICHENER JK. Discovery, characterization, and metabolic engineering of Rieske non-heme iron monooxygenases for guaiacol *O*-demethylation[J]. *Chem Catalysis*, 2022, 2(8): 1989-2011.
- [28] KOHLER AC, MILLS MJL, ADAMS PD, SIMMONS BA, SALE KL. Structure of aryl *O*-demethylase offers molecular insight into a catalytic tyrosine-dependent mechanism[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2017, 114(16): E3205-E3214.
- [29] ELLIS ES, HINCEN DJ, BLEEM A, BU LT, MALLINSON SJB, ALLEN MD, STREIT BR, MACHOVINA MM, DOOLIN QV, MICHENER WE, JOHNSON CW, KNOTT BC, BECKHAM GT, McGEEHAN JE, DuBOIS JL. Engineering a cytochrome P450 for demethylation of lignin-derived aromatic aldehydes[J]. *JACS Au*, 2021, 1(3): 252-261.
- [30] MACHOVINA MM, MALLINSON SJB, KNOTT BC, MEYERS AW, GARCIA-BORRÁS M, BU LT, GADO JE, OLIVER A, SCHMIDT GP, HINCEN DJ, CROWLEY MF, JOHNSON CW, NEIDLE EL, PAYNE CM, HOUK KN, BECKHAM GT, McGEEHAN JE, DuBOIS JL. Enabling microbial syringol conversion through structure-guided protein engineering[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(28): 13970-13976.
- [31] ELTIS LD, KARLSON U, TIMMIS KN. Purification and characterization of cytochrome P450_{RR1} from *Rhodococcus rhodochrous*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 213(1): 211-216.
- [32] FETHEROLF MM, LEVY-BOOTH DJ, NAVAS LE, LIU J, GRIGG JC, WILSON A, KATAHIRA R, BECKHAM GT, MOHN WW, ELTIS LD. Characterization of alkylguaiacol-degrading cytochromes P450 for the biocatalytic valorization of lignin[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(41): 25771-25778.
- [33] PRIEFERT H, RABENHORST J, STEINBÜCHEL A. Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate[J]. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179(8): 2595-2607.
- [34] CHEN HP, CHOW M, LIU CC, LAU A, LIU J, ELTIS LD. Vanillin catabolism in *Rhodococcus jostii* RHA1[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2012, 78(2): 586-588.
- [35] SEGURA A, BÜNZ PV, D'ARGENIO DA, ORNSTON LN. Genetic analysis of a chromosomal region containing *vanA* and *vanB*, genes required for conversion of either ferulate or vanillate to protocatechuate in *Acinetobacter*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181(11): 3494-3504.
- [36] NAIDU D, RAGSDALE SW. Characterization of a three-component vanillate *O*-demethylase from *Moorella thermoacetica*[J]. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183(11): 3276-3281.
- [37] ABE T, MASAI EJ, MIYAUCHI K, KATAYAMA Y, FUKUDA M. A tetrahydrofolate-dependent *O*-demethylase, LigM, is crucial for catabolism of vanillate and syringate in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6[J]. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187(6): 2030-2037.
- [38] PEREZ JM, KONTUR WS, GEHL C, GILLE DM, MA YJ, NILES AV, UMANA G, DONOHUE TJ, NOGUERA DR. Redundancy in aromatic *O*-demethylation and ring opening reactions in *Novosphingobium aromaticivorans* and their impact in the metabolism of plant derived phenolics[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2021, 87(8): e02794-e02720.

- [39] JOHNSON CW, ABRAHAM PE, LINGER JG, KHANNA P, HETTICH RL, BECKHAM GT. Eliminating a global regulator of carbon catabolite repression enhances the conversion of aromatic lignin monomers to muconate in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Metabolic Engineering Communications, 2017, 5: 19-25.
- [40] BELL SG, XU F, FORWARD I, BARTLAM M, RAO ZH, WONG LL. Crystal structure of CYP199A2, a para-substituted benzoic acid oxidizing cytochrome P450 from *Rhodopseudomonas palustris*[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 383(3): 561-574.
- [41] YOSHIKATA T, SUZUKI K, KAMIMURA N, NAMIKI M, HISHIYAMA S, ARAKI T, KASAI D, OTSUKA Y, NAKAMURA M, FUKUDA M, KATAYAMA Y, MASAI EJ. Three-component *O*-demethylase system essential for catabolism of a lignin-derived biphenyl compound in *Sphingobium* sp. strain SYK-6[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2014, 80(23): 7142-7153.
- [42] VENTURI V, ZENNARO F, DEGRASSI G, OKEKE BC, BRUSCHI CV. Genetics of ferulic acid bioconversion to protocatechuic acid in plant-growth-promoting *Pseudomonas putida* WCS358[J]. Microbiology, 1998, 144(4): 965-973.
- [43] NISHIMURA M, ISHIYAMA D, DAVIES J. Molecular cloning of *Streptomyces* genes encoding vanillate demethylase[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2006, 70(9): 2316-2319.
- [44] BELL SG, TAN ABH, JOHNSON EOD, WONG LL. Selective oxidative demethylation of veratric acid to vanillic acid by CYP199A4 from *Rhodopseudomonas palustris* HaA2[J]. Molecular BioSystems, 2010, 6(1): 206-214.
- [45] BELL SG, HOSKINS N, XU F, CAPROTTI D, RAO ZH, WONG LL. Cytochrome P450 enzymes from the metabolically diverse bacterium *Rhodopseudomonas palustris*[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2006, 342(1): 191-196.
- [46] GARCÍA-HIDALGO J, RAVI K, KURÉ LL, LIDÉN G, GORWA-GRAUSLUND M. Identification of the two-component guaiacol demethylase system from *Rhodococcus rhodochrous* and expression in *Pseudomonas putida* EM42 for guaiacol assimilation[J]. AMB Express, 2019, 9(1): 34.
- [47] FERRARO DJ, GAKHAR L, RAMASWAMY S. Rieske business: structure-function of Rieske non-heme oxygenases[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, 338(1): 175-190.
- [48] ERICKSON E, BLEEM A, KUATSIJAH E, WERNER AZ, DuBOIS JL, McGEEHAN JE, ELTIS LD, BECKHAM GT. Critical enzyme reactions in aromatic catabolism for microbial lignin conversion[J]. Nature Catalysis, 2022, 5: 86-98.
- [49] ARAKI T, TANATANI K, KAMIMURA N, OTSUKA Y, YAMAGUCHI M, NAKAMURA M, MASAI EJ. The syringate *O*-demethylase gene of *Sphingobium* sp. strain SYK-6 is regulated by DesX, while other vanillate and syringate catabolism genes are regulated by DesR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2020, 86(22): e01712-e01720.
- [50] HARADA A, KAMIMURA N, TAKEUCHI K, YU HY, MASAI EJ, SENDA T. The crystal structure of a new *O*-demethylase from *Sphingobium* sp. strain SYK-6[J]. The FEBS Journal, 2017, 284(12): 1855-1867.
- [51] KWEON O, KIM SJ, BAEK S, CHAE JC, ADJEI MD, BAEK DH, KIM YC, CERNIGLIA CE. A new classification system for bacterial Rieske non-heme iron aromatic ring-hydroxylating oxygenases[J]. BMC Biochemistry, 2008, 9: 11.
- [52] LI SY, DU L, BERNHARDT R. Redox partners: function modulators of bacterial P450 enzymes[J]. Trends in Microbiology, 2020, 28(6): 445-454.
- [53] MASAI EJ, SASAKI M, MINAKAWA Y, ABE T, SONOKI T, MIYAUCHI K, KATAYAMA Y, FUKUDA M. A novel tetrahydrofolate-dependent *O*-demethylase gene is essential for growth of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 with syringate[J]. Journal of Bacteriology, 2004, 186(9): 2757-2765.
- [54] JUNG ST, LAUCHLI R, ARNOLD FH. Cytochrome P450: taming a wild type enzyme[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22(6): 809-817.
- [55] McINTOSH JA, FARWELL CC, ARNOLD FH. Expanding P450 catalytic reaction space through evolution and engineering[J]. Current Opinion in Chemical Biology, 2014, 19: 126-134.
- [56] KARLSON U, DWYER DF, HOOPER SW, MOORE ER, TIMMIS KN, ELTIS LD. Two independently regulated cytochromes P-450 in a *Rhodococcus rhodochrous* strain that degrades 2-ethoxyphenol and 4-methoxybenzoate[J]. Journal of Bacteriology, 1993, 175(5): 1467-1474.
- [57] XUE L, ZHAO YQ, LI L, RAO XR, CHEN XJ, MA FY, YU HB, XIE SX. A key *O*-demethylase in the degradation of guaiacol by *Rhodococcus opacus* PD630[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 338(1): 175-190.

- 2023, 89(10): e0052223.
- [58] NELSON DR. Cytochrome P450 diversity in the tree of life[J]. *Biochimica et Biophysica Acta Proteins and Proteomics*, 2018, 1866(1): 141-154.
- [59] KOVALEVA EG, LIPSCOMB JD. Versatility of biological non-heme Fe(II) centers in oxygen activation reactions[J]. *Nature Chemical Biology*, 2008, 4: 186-193.
- [60] BRUNEL F, DAVISON J. Cloning and sequencing of *Pseudomonas* genes encoding vanillate demethylase[J]. *Journal of Bacteriology*, 1988, 170(10): 4924-4930.
- [61] KAMIMURA N, TAKAHASHI K, MORI K, ARAKI T, FUJITA M, HIGUCHI Y, MASAI EJ. Bacterial catabolism of lignin-derived aromatics: new findings in a recent decade: update on bacterial lignin catabolism[J]. *Environmental Microbiology Reports*, 2017, 9(6): 679-705.
- [62] LANFRANCHI E, TRAJKOVIĆ M, BARTA K, de VRIES JG, JANSSEN DB. Exploring the selective demethylation of aryl methyl ethers with a *Pseudomonas* rieske monooxygenase[J]. *Chembiochem: a European Journal of Chemical Biology*, 2019, 20(1): 118-125.
- [63] ZHANG ZH, WANG Y, ZHENG P, SUN JB. Promoting lignin valorization by coping with toxic C1 byproducts[J]. *Trends in Biotechnology*, 2021, 39(4): 331-335.
- [64] BERMAN MH, FRAZER AC. Importance of tetrahydrofolate and ATP in the anaerobic O-demethylation reaction for phenylmethylethers[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1992, 58(3): 925-931.
- [65] KAUFMANN F, WOHLFARTH G, DIEKERT G. O-demethylase from *Acetobacterium dehalogenans*: substrate specificity and function of the participating proteins[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1998, 253(3): 706-711.
- [66] FURUYA T, SHITASHIMA Y, KINO K. Alteration of the substrate specificity of cytochrome P450 CYP199A2 by site-directed mutagenesis[J]. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2015, 119(1): 47-51.
- [67] JIANG YH, WANG CL, MA NN, CHEN J, LIU CF, WANG F, XU JK, CONG ZQ. Regioselective aromatic O-demethylation with an artificial P450BM3 peroxygenase system[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2020, 10(5): 1219-1223.
- [68] PAULINO BN, SALES A, FELIPE L, PASTORE GM, MOLINA G, BICAS JL. Recent advances in the microbial and enzymatic production of aroma compounds[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2021, 37: 98-106.
- [69] SALES A, PAULINO BN, PASTORE GM, BICAS JL. Biogeneration of aroma compounds[J]. *Current Opinion in Food Science*, 2018, 19: 77-84.
- [70] de GONZALO G, COLPA DI, HABIB MHM, FRAAIJE MW. Bacterial enzymes involved in lignin degradation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 236: 110-119.
- [71] SCHUTYSER W, RENDERS T, van den BOSCH S, KOELEWIJN SF, BECKHAM GT, SELS BF. Chemicals from lignin: an interplay of lignocellulose fractionation, depolymerisation, and upgrading[J]. *Chemical Society Reviews*, 2018, 47(3): 852-908.
- [72] RAZAVIAMRI S, WANG K, LIU B, LEE BP. Catechol-based antimicrobial polymers[J]. *Molecules*, 2021, 26(3): 559.
- [73] XIE NZ, LIANG H, HUANG RB, XU P. Biotechnological production of muconic acid: current status and future prospects[J]. *Biotechnology Advances*, 2014, 32(3): 615-622.
- [74] SKOOG E, SHIN JH, SAEZ-JIMENEZ V, MAPELLI V, OLSSON L. Biobased adipic acid: the challenge of developing the production host[J]. *Biotechnology Advances*, 2018, 36(8): 2248-2263.
- [75] TUMEN-VELASQUEZ M, JOHNSON CW, AHMED A, DOMINICK G, FULK EM, KHANNA P, LEE SA, SCHMIDT AL, LINGER JG, EITEMAN MA, BECKHAM GT, NEIDLE EL. Accelerating pathway evolution by increasing the gene dosage of chromosomal segments[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(27): 7105-7110.
- [76] NOTONIER S, WERNER AZ, KUATSJAH E, DUMALO L, ABRAHAM PE, HATMAKER EA, HOYT CB, AMORE A, RAMIREZ KJ, WOODWORTH SP, KLINGEMAN DM, GIANNONE RJ, GUSS AM, HETTICH RL, ELTIS LD, JOHNSON CW, BECKHAM GT. Metabolism of syringyl lignin-derived compounds in *Pseudomonas putida* enables convergent production of 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 65: 111-122.
- [77] MORAWSKI B, SEGURA A, ORNSTON LN. Substrate range and genetic analysis of *Acinetobacter* vanillate demethylase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182(5): 1383-1389.
- [78] ALI KHAN B, MAHMOOD T, MENAA F, SHAHZAD Y, YOUSAF AM, HUSSAIN T, RAY SD. New

- perspectives on the efficacy of gallic acid in cosmetics & nanocosmeceuticals[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2018, 24(43): 5181-5187.
- [79] KAMIMURA N, GOTO T, TAKAHASHI K, KASAI D, OTSUKA Y, NAKAMURA M, KATAYAMA Y, FUKUDA M, MASAI E. A bacterial aromatic aldehyde dehydrogenase critical for the efficient catabolism of syringaldehyde[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 44422.
- [80] UPADHYAY P, LALI A. Protocatechuic acid production from lignin-associated phenolics[J]. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, 2021, 51(10): 979-984.
- [81] OKAI N, MASUDA T, TAKESHIMA Y, TANAKA K, YOSHIDA KI, MIYAMOTO M, OGINO C, KONDO A. Biotransformation of ferulic acid to protocatechuic acid by *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21420 engineered to express vanillate *O*-demethylase[J]. *AMB Express*, 2017, 7(1): 130.
- [82] KAKKAR S, BAIS S. A review on protocatechuic acid and its pharmacological potential[J]. *ISRN Pharmacology*, 2014, 2014: 952943.
- [83] OTSUKA Y, NAKAMURA M, SHIGEHARA K, SUGIMURA K, MASAI E, OHARA S, KATAYAMA Y. Efficient production of 2-pyrone 4, 6-dicarboxylic acid as a novel polymer-based material from protocatechuate by microbial function[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71(5): 608-614.
- [84] ROSINI E, D'ARRIGO P, POLLEGIONI L. Demethylation of vanillic acid by recombinant LigM in a one-pot cofactor regeneration system[J]. *Catalysis Science & Technology*, 2016, 6(21): 7729-7737.
- [85] PYNE ME, NARCROSS L, MELGAR M, KEVVAI K, MOOKERJEE S, LEITE GB, MARTIN VJJ. An engineered Aro1 protein degradation approach for increased *cis,cis*-muconic acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2018, 84(17): e01095-e01018.
- [86] WU WH, DUTTA T, VARMAN AM, EUDES A, MANALANSAN B, LOQUÉ D, SINGH S. Lignin valorization: two hybrid biochemical routes for the conversion of polymeric lignin into value-added chemicals[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 8420.
- [87] 李艳, 陈复生, 杨趁仙. 组学技术在木质素降解酶系挖掘中的应用进展[J]. *食品与发酵工业*, 2021, 47(16): 294-299.
- LI Y, CHEN FS, YANG CX. Application progress of omics technology on lignin degrading enzyme system mining[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2021, 47(16): 294-299 (in Chinese).
- [88] TAKEMORI S, KOMINAMI S. The role of cytochromes P-450 in adrenal steroidogenesis[J]. *Trends in Biochemical Sciences*, 1984, 9(9): 393-396.
- [89] 宋展, 高鑫, 吴冕, 路福平, 秦慧民. 细胞色素 P450 酶的结构、功能与应用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(7): 2245-2254.
- SONG Z, GAO X, WU M, LU FP, QIN HM. Structure, function, and application of cytochrome P450 enzymes[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(7): 2245-2254 (in Chinese).
- [90] GUENGERICH FP. Cytochrome P450 research and *The Journal of Biological Chemistry*[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2019, 294(5): 1671-1680.
- [91] JUMPER J, EVANS R, PRITZEL A, GREEN T, FIGURNOV M, RONNEBERGER O, TUNYASUVUNAKOOL K, BATES R, ŽÍDEK A, POTAPENKO A, BRIDGLAND A, MEYER C, KOHL SAA, BALLARD AJ, COWIE A, ROMERA-PAREDES B, NIKOLOV S, JAIN R, ADLER J, BACK T, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold[J]. *Nature*, 2021, 596: 583-589.
- [92] YANG AM, ZHAO L, WU YW. Chemical synthesis and biological function of lipidated proteins[J]. *Topics in Current Chemistry*, 2015, 362: 137-182.
- [93] ŠREJBER M, NAVRÁTILOVÁ V, PALONCÝOVÁ M, BAZGIER V, BERKA K, ANZENBACHER P, OTYEPKA M. Membrane-attached mammalian cytochromes P450: an overview of the membrane's effects on structure, drug binding, and interactions with redox partners[J]. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 2018, 183: 117-136.