

微生物法降解木质素的研究进展

刘瑞¹, 张丽², 孙鹏², 徐刚¹, 曹颖¹, 胡尚连^{*1}, 赵博^{*1}

1 西南科技大学生命科学与工程学院竹类研究所, 四川 绵阳 621010

2 四川省林业科学研究院, 四川 成都 610081

刘瑞, 张丽, 孙鹏, 徐刚, 曹颖, 胡尚连, 赵博. 微生物法降解木质素的研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7): 3232-3244.

LIU Rui, ZHANG Li, SUN Peng, XU Gang, CAO Ying, HU Shanglian, ZHAO Bo. Microbial degradation of lignin: a review[J]. Microbiology China, 2023, 50(7): 3232-3244.

摘要: 生物质是代替石化资源生产能源和化学品的关键资源, 木质素作为植物细胞壁的主要成分已经在很多行业中得到了广泛的应用。然而, 由于木质素结构复杂且难以降解, 成为生物质资源利用的最大障碍, 因此, 去除或者降解木质素是利用细胞壁中其他成分的关键步骤。许多行业使用有害化学物质降解木质素, 严重危害了生态环境, 自然界中木质素经常被包括真菌和细菌在内的微生物降解, 因此, 研究微生物降解木质素的机制为解决这一问题提供了可能性。本文讨论了木质素的化学组成成分, 重点讨论了自然界降解木质素的微生物种类及其降解机制, 包括各种真菌和细菌的木质素降解活性, 描述了由各种微生物特别是白腐真菌、褐腐真菌和细菌产生的木质素降解酶, 并展望了今后木质素生物降解的研究和应用的可能方向。

关键词: 生物质; 木质素; 微生物; 生物降解; 木质素降解酶

Microbial degradation of lignin: a review

LIU Rui¹, ZHANG Li², SUN Peng², XU Gang¹, CAO Ying¹, HU Shanglian^{*1}, ZHAO Bo^{*1}

1 Bamboo Research Institute, School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan, China

2 Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, Sichuan, China

Abstract: Lignocellulosic biomass represents a crucial resource for sustainable development by replacing petroleum-based production systems. Lignin, a major component of plant cell walls, has been widely used in many industries. However, it poses a challenge to the utilization of lignocellulosic biomass due to the recalcitrance and complex structure. Therefore, decomposition

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD2200500); 四川省“十四五”农作物及畜禽育种攻关计划(2021YFYZ0006)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD2200500) and the Key Projects of Crop and Livestock Breeding of Sichuan Province During the Fourteenth Five-Year Plan Period (2021YFYZ0006).

*Corresponding authors. E-mail: HU Shanglian, hushanglian@swust.edu.cn; ZHAO Bo, bozhao@swust.edu.cn

Received: 2022-10-08; Accepted: 2022-12-13; Published online: 2023-02-01

or removal of lignin is the key to the utilization of other cell wall components. Lignin is naturally degraded by many different species of microorganisms, including fungi and bacteria, and the mechanisms underlying the degradation of lignin by microorganisms provide a host of possibilities to overcome the challenges of using harmful chemicals to degrade lignin biowaste in many industries. This review discussed the chemical constituents of lignin, the lignin-degrading microbial species, such as fungi and bacteria, and the mechanisms, and the lignin-degrading enzymes produced by a variety of microorganisms, especially the white-rot fungi, brown-rot fungi, and bacteria. Finally, the possible trends of research and applications of lignin biodegradation were prospected.

Keywords: biomass; lignin; microorganism; biodegradation; ligninolytic enzyme

木质素是一种芳香族聚合物, 广泛存在于植物的维管组织中, 其与纤维素和半纤维素共同构成细胞壁的主要成分, 为植物细胞壁提供刚性, 从而增强植物的机械强度^[1]。木质素的抗菌性可保护植物免受病原菌侵害^[1-2], 木质素还能保护植物中的结构多糖免受微生物酶的水解^[3]。此外, 木质素还能使植物维管组织具有疏水性, 有利于水分在植物中运输^[1-2]。

不同植物中的木质素含量不同, 其中草本植物中木质素的含量约为 15%–25%, 硬木中木质素含量约为 19%–28%^[2,4], 一般来说软木中木质素含量最高, 约为 24%–33%^[2,4]。除了我们熟知的造纸工业, 在生物质基乳酸和生物乙醇等其他利用生物质作为原料的工业生产中, 也都需要预处理过程将原料中的木质素部分或完全降解^[4-9]。特别是生物乙醇的生产需要通过预处理尽可能地去掉原料中的木质素, 否则残留的木质素会严重影响后续纤维素的酶解过程^[10], 但彻底去除木质素是一种理想状态, 实际很难完全达到。目前以生物质为原料且能产生经济效益的工业应用较少的主要原因之一就是木质素难以被处理, 阻碍了纤维素、半纤维素等物质的利用。

传统的脱除木质素的方法有有机溶剂法、酸解法、碱液处理法等, 这些方法不但能耗

高, 而且严重污染环境。利用真菌、细菌等微生物来降解木质素已经成为当前研究的热点, 这种生物处理的方法经济环保, 具有良好的应用前景^[11-15]。然而, 目前大多数的研究都集中于木质素降解菌的筛选及产酶条件的优化上, 缺乏微生物降解木质素的工业应用、木质素降解菌的物种间差异及木质素降解的非酶途径等其他方面的研究。因此, 本综述重点关注微生物降解木质素的机制、微生物降解木质素能力的种间差异, 以及微生物降解木质素的工业应用。

1 木质素的组成

木质素是由对香豆醇、松柏醇和芥子醇通过酶促脱氢聚合反应形成的一种复杂酚类聚合物, 根据单体不同, 可将木质素分为紫丁香基木质素、愈创木基木质素和对-羟基苯基木质素(图 1)^[16]。不同类型的植物中 3 种木质素单体含量也不同^[2-3]。

每个单体单元的结构可以进一步分为芳香族部分和 C3 链, 它们通过 C–O 键或 C–C 键相互连接, 其中 C–O 键比 C–C 键更容易断裂^[17]。木质素中苯丙烷单体之间最常见的连接键是 β -O-4 键, 约占 30%–60%^[17-18]。研究表明, 微生物会优先降解木质素中的 β -O-4 键, 其次约

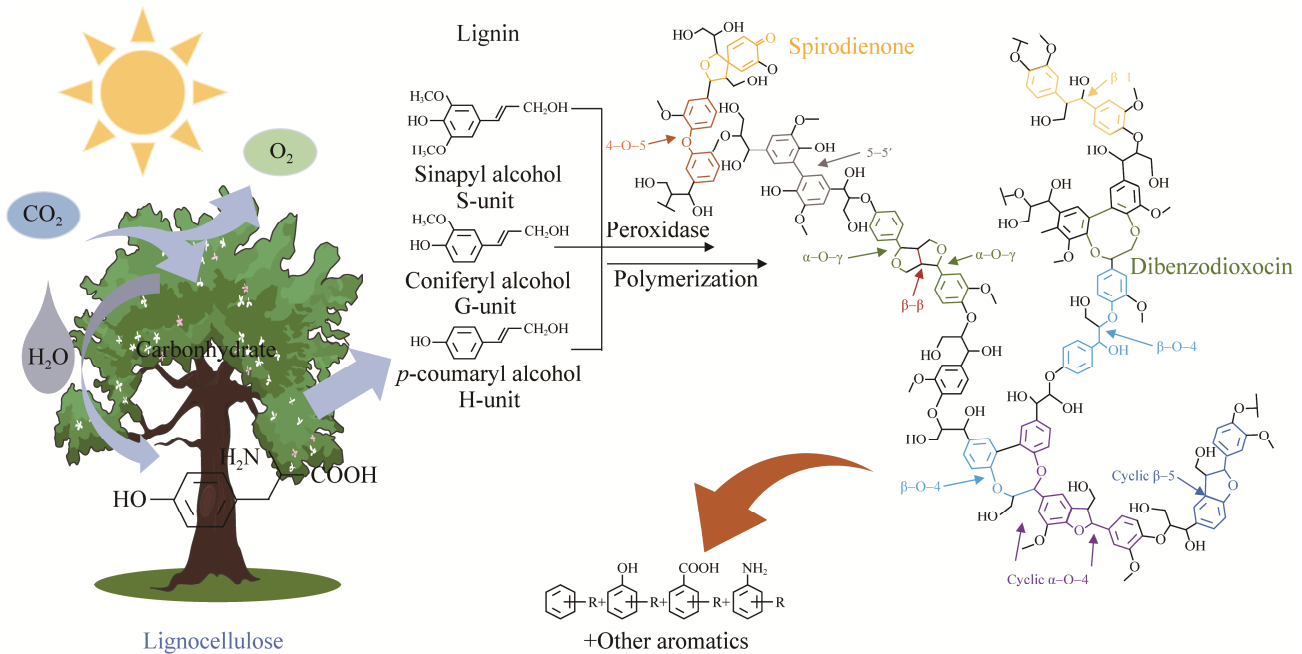


图 1 木质素的 3 种单体结构以及其中的各类化学键(改编自参考文献[16])

Figure 1 The three monomer structures of lignin and various chemical bonds in them (adapted from reference [16]).

有 20%–25%是以联苯键(5–5'键)连接^[18-19], 而这些化学键是微生物降解的主要目标。此外, 木质素中常见的其他连接键为 β -5 键、4–O–5 键、 β -1 键和 β - β 键(图 1)^[16]。

2 木质素的生物降解

木质素是一种高分子芳香族聚合物, 因结构复杂使其难以被降解^[3]。然而, 包括细菌和真菌在内的很多微生物能够有效降解木质素, 这种微生物降解作用在自然界中很重要, 能够将死亡的植物降解使土壤去木质化, 并提高土壤肥力和作物产量^[20]。微生物降解木质素从 20 世纪 70 年代起逐渐成为研究热点, 近几十年来木质素降解酶类的逐步发现, 以及人类对能源物质需求的不断增加使得有关研究一直延续至今。

2.1 真菌降解木质素的研究进展

能够降解木材的真菌主要是白腐菌, 它们

大量存在于各类森林中^[21-22]。在木材腐烂时, 它们会使木材表面变白、变亮, 所以命名为白腐菌; 白腐菌既能降解木材中的纤维素和半纤维素等聚糖类物质, 也能降解木质素, 是最主要的木质素降解微生物^[22]。例如, 白腐菌在降解小麦秸秆的时候, 在适宜的条件下, 白腐菌菌丝首先生长进入秸秆内部, 产生纤维素酶、半纤维素酶等, 降解秸秆中的半纤维素和纤维素, 使秸秆更容易被降解, 与木质素降解相关酶类多是在次级代谢阶段产生^[23]。白腐菌会产生木质素过氧化物酶、漆酶和锰过氧化物酶, 这 3 种酶是最主要的木质素降解酶^[21,24]。这些酶具有非特异性, 它们能够降解结构上与木质素相似的其他化合物, 如杀虫剂、染料和含氮苯酚等^[21,24-25]。此外, 这些酶都属于胞外酶, 使得这些微生物能够更有效地降解木质素和其他化合物^[21,24-25]。不同的白腐菌分泌这 3 种酶

的能力各不相同, 一些白腐菌不产生漆酶但产生其他两种酶, 而另一些则不产生木质素过氧化物酶但产生漆酶和锰过氧化物酶^[24]。

木质素过氧化物酶是含血红素辅基的过氧化氢酶^[25-26], 这一类酶主要针对木质素中的非酚类单元, 如图 2 所示^[18,27]。Cameron 等^[25]已从 *P. chrysosporium* 中分离到 6 种木质素过氧化物酶同工酶(H1、H2、H6、H7、H8 和 H10)。木质素过氧化物酶序列中保守的 Trp171 残基对其催化活性至关重要, 木质素过氧化物酶利用过氧化氢和藜芦醇作为电子供体和辅因子氧化酚类和非酚类化合物; 通常, 木质素过氧化物酶降解木质素的酶促反应包括 1 个氧化和 2 个还原步骤, 氧代铁卟啉自由基阳离子 $[\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}^+]$ 是由三价铁 $[\text{Fe}(\text{III})]$ 的氧化以及过氧化氢还原为水而形成的^[28]。然后, $[\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}^+]$ 通过 2 个连续的单电子还原步骤转化为 2 个 $[\text{Fe}(\text{IV})=\text{O}]$ 并完成催化循环^[29-30]。

锰过氧化物酶由 4 种含血红素的同工酶

(H3、H4、H5 和 H9)组成, 它们的活性主要取决于 Mn^{2+} ^[25-26], Mn^{2+} 被氧化成 Mn^{3+} , 然后通过底物扩散并通过脂质过氧化作用于木质素中的酚类和非酚类单元^[18,26,31], 生成的 Mn^{3+} 与体系中存在的乙醇酸和草酸形成络合, 从而以稳定的状态存在。这些螯合的 Mn^{3+} 可以作为一种小分子介质渗透到木质素的结构中, 非特异性地氧化木质素分子中的苯酚结构^[32]。因此, 含有苯酚结构的木质素形成的酚氧基是不稳定的, 容易通过非酶反应分解^[33]。这 2 种类型的过氧化物酶都参与了自由基介导的木质素和其他化合物的氧化, 如图 3 所示^[25,34]。

漆酶是含有 Cu^{2+} 的酚氧化酶, 催化氧介导的木质素和其他含酚化合物的氧化, 其机理如图 4 所示^[24-25,35]。

漆酶在有氧的情况下氧化木质素, 它从木质素中获得 1 个电子, 导致底物分子产生自由基, 造成木质素降解; 整个催化反应是电子转移氧化, 包括 4 个连续的单电子氧化反应^[33]。

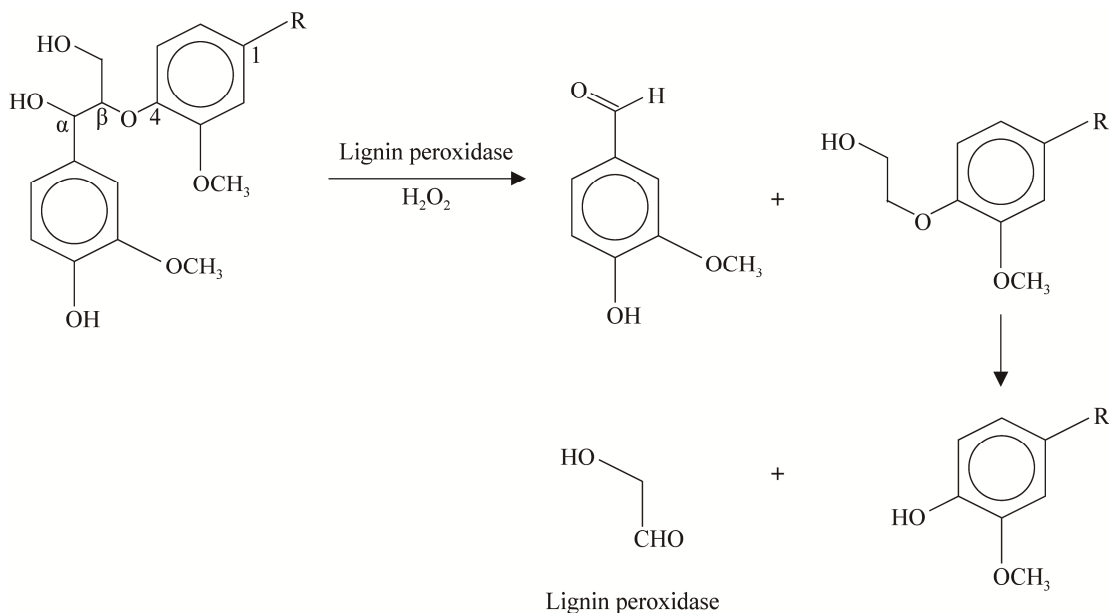


图 2 木质素过氧化物酶降解木质素反应机理(改编自参考文献[27])

Figure 2 Lignin degradation reaction mechanism by lignin peroxidase (adapted from reference [27]).

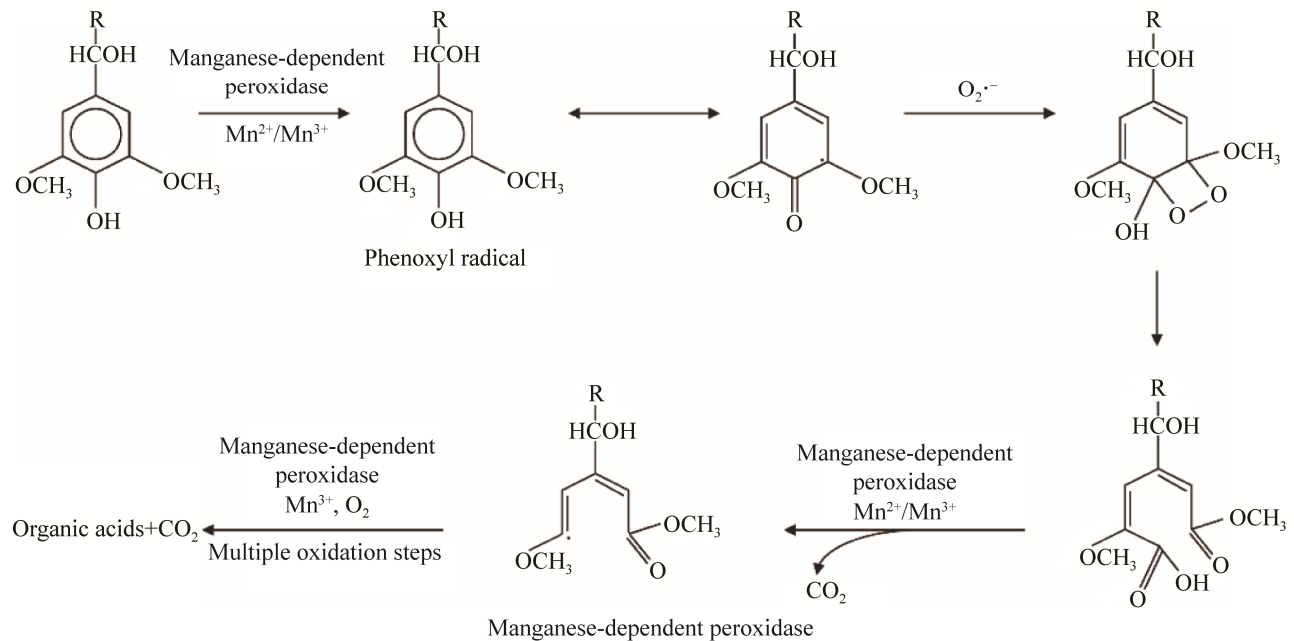


图3 锰过氧化物酶降解木质素反应机理(改编自参考文献[34])

Figure 3 Manganese degradation reaction mechanism by manganese-dependent peroxidase (adapted from reference [34]).

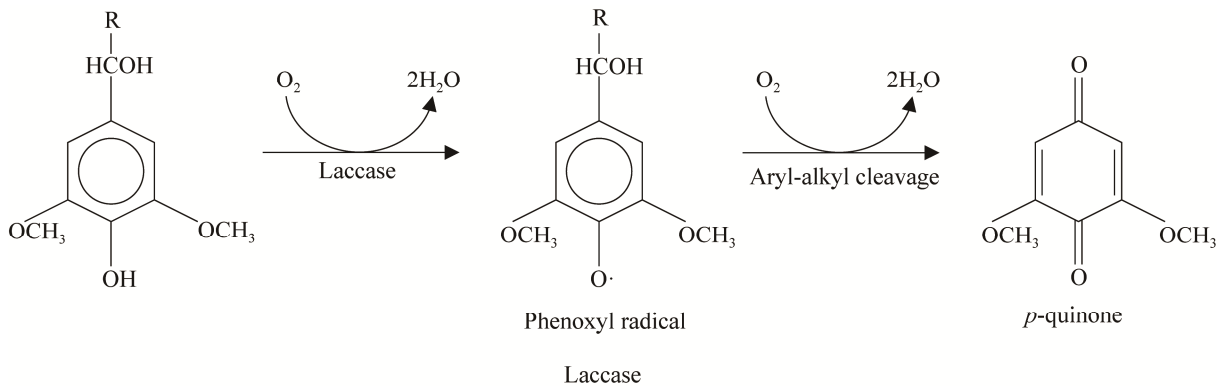


图4 漆酶降解木质素反应机理(改编自参考文献[35])

Figure 4 Lignin degradation reaction mechanism by laccase (adapted from reference [35]).

其中还原的底物与I型 Cu²⁺结合, 通过 Cys-His 途径转移到II型 Cu²⁺, 该位点进一步把电子传递给结合到活性中心的 O₂, 将 O₂ 还原为水; 在整个反应过程中, 需要连续 4 次单电子氧化才能完全还原漆酶^[36]。因此, 4 种底物分子被氧化产生 4 种底物自由基^[37]。这些自由基通过去甲氧基、脱羧基和 C-C 链断裂等方式, 最终

使得木质素大分子解聚成单体, 这一过程中产生的大量芳烃可以作为底物进一步被漆酶降解; 由于漆酶不需要强氧化剂参与酶促反应, 所以一般认为漆酶的酶促降解是木质素降解的起始步骤^[33]。

研究者在 20 世纪 90 年代末还发现了一类研究较少的木质素降解酶, 称为多功能过氧化物

酶^[18]。这些多功能过氧化物酶可以同时表现出木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶的特性^[18], 所以该酶具有降解木质素中非酚类和酚类位点的能力^[38]。通常情况下, 真菌酶降解木质素的最终产物是二氧化碳^[24]。

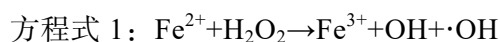
不同种类木质素降解酶的降解能力因真菌种类不同而不同^[39]。Sunardi 等^[39]发现白腐菌对云杉木质素的降解主要依靠锰过氧化物酶及木质素过氧化物酶的高活性, 该研究发现, 经过 120 d 真菌处理后, 木材中总木质素含量从 27% 下降到 18%, 到第 120 天的时候, 锰过氧化物酶的平均活性为 0.126 U/mL, 木质素过氧化物酶的平均活性为 0.022 U/mL, 但漆酶对云杉木质素的降解作用并不明显, 第 120 天的酶活仅为 0.000 1 U/mL。此外, 根据 Sethuraman 等^[40]报道, 在富含氮和葡萄糖的培养基中, 白腐菌的漆酶和锰过氧化物酶活性增加, 在 1 mmol/L 酒石酸铵和 0.1% 葡萄糖条件下漆酶和锰过氧化物酶活性微乎其微, 增加到 10 mmol/L 酒石酸铵和 1% 葡萄糖时, 漆酶的活性上升到 4 U/mL, 锰过氧化物酶活性接近 0.9 U/mL; 然而, 在该研究的实验条件下未产生木质素过氧化物酶。Martinez 等^[31]发现杏鲍菇还能分泌漆酶和锰过氧化物酶, 这 2 种酶都能够高效降解木质素, 但是使用酒石酸铵作为培养基氮源时并不能产生大量的锰过氧化物酶, 可使用葡萄糖、蛋白胨和酵母膏的混合物培养杏鲍菇时锰过氧化物酶活性最高达到 1 U/mL。

属于担子菌门的各种褐腐菌也被发现具有木质素降解能力, 但降解能力不如白腐菌^[18,41], 这是因为褐腐菌主要针对纤维素进行降解, 但同时它们也通过脱甲基化来改变木质素的化学结构^[42]。

一些软腐真菌, 如 *Aspergillus flavus*、*Aspergillus fumigatus* 和 *Aspergillus* sp. LPB5 等

也能够产生木质素降解酶^[43-47], 但软腐菌降解木质素的能力通常较差, 并且比其他真菌降解木质素花费的时间更长^[44], 有一些甚至根本不产生木质素降解酶, 只产生纤维素降解酶^[48]。但在一项研究中发现, 软腐真菌 *Aspergillus fumigatus* 的木质素降解能力几乎是白腐菌 *Coriolus versicolor* 的 5 倍^[47]。

白腐菌和褐腐菌都能分泌非酶类的小分子化合物, 这些化合物在木质素降解中发挥着重要的作用, 由于木质素降解酶分子量较大而不能透过植物细胞壁与木质素接触^[49], 所以需要一些小分子化合物在电子受体、电子传递体等参与下优先降解木质素, Fenton 反应是其常见的机制之一, 木质素大分子部分氧化降解后穿过植物细胞壁与酶接触而被进一步氧化降解^[49-50]。常见的小分子化合物有酚盐、特异肽、藜芦醇、亚油酸、草酸、3-羟基邻氨基苯甲酸等。在这些化合物中, Fe^{3+} 还原化合物受到特别关注^[51-54]。 Fe^{3+} 还原化合物可以将天然存在于木材、土壤和水体系中的 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} , 之后通过 Fenton 反应生成 OH 自由基(方程式 1)^[49,51,55], 然后, OH 自由基解聚包括木质素在内的多糖^[50,56-57]。



2.2 细菌降解木质素的研究进展

除了真菌, 很多种类的细菌也能够降解木质素。例如, α -变形菌、 γ -变形菌和放线菌这 3 类, 它们主要来自于土壤和一些食木昆虫^[18,58]。研究发现 *Streptomyces viridosporus* 能产生胞外木质素过氧化物酶^[59], 这种过氧化物酶的活性与过氧化氢相关^[18]。*Sphingomonas paucimobilis* 也能产生木质素过氧化物酶, 其酶活性主要针对于木质素中的 β -O-4 键^[18,60]。此外, 在某些细菌和真菌中还发现一种染料脱色过氧化物酶 (dye-decolorizing peroxidase, DyP) 也能够降解木质素。Ahmad 等^[61]从红球菌属 RHA1 中鉴定

出木质素过氧化物酶, 他们发现 RHA1 能够产生一种锰过氧化物酶, 并称其为 DyPB。在另一项研究中, Kosa 等^[62]发现 *Rhodococcus opacus* 通过 β -酮己二酸途径将木质素模型化合物水杨酸和香草酸转化为三酰甘油。同样地, Rahmanpour 等^[63]也发现一种转基因大肠杆菌中合成的 DyP 型过氧化物酶能够氧化硫酸盐木质素和 β -O-4 木质素模型化合物。另一方面, 土壤细菌 *Pseudomonas putida* 在无过氧化氢的情况下表现出不依赖于 Mn^{2+} 的木质素降解活性^[18,61,64]。Lin 等^[64]研究了恶臭假单胞菌中的 2 种 DyPB 酶在木质素解聚过程中的作用。该菌可通过 β -酮己二酸途径进一步代谢香草醛、香草酸盐、4-羟基苯甲酸甲酯、对香豆酸、苯甲酸盐和阿魏酸盐等木质素模型化合物; 代谢反应过程有阿魏酰辅酶 A 合成酶、烯酰辅酶 A 水合/裂解酶、香草醛脱氢酶、对羟基苯甲酸羟化酶、香草酸脱甲基酶及苯甲酸双加氧酶等多种酶参与^[64-65]。

在另一项研究中, Huang 等^[58]从秘鲁热带雨林土壤中分离到 140 株细菌, 其中 *Bacillus pumilus* 和 *Bacillus atrophaeus* 的漆酶活性较高, 在 pH 值为 3.0 时分别接近 0.14 U/mL 和 0.055 U/mL; 不像真菌与大多数其他木质素降解细菌, 这些雨林细菌具有胞内和胞外的漆酶活性, 并作用于木质素中的 β -O-4 键。

Zhang 等^[66]在 2019 年首次报道了耻垢分枝杆菌的木质降解能力, 他们发现耻垢分枝杆菌降解木质素的能力与其他菌株相当, 并且原料中的木质素比纤维素优先降解, 在第 8 天时, 木质素的降解率为 50%, 漆酶、木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶的最大活性分别为 0.18、0.12 和 0.52 U/mL, 其降解木质素的机制与真菌相似, 涉及芬顿反应^[66]。

最近的一项研究表明, *Pseudomonas putida*、*Rhodococcus jostii* 和 *Amycolatopsis* 等木质素降

解菌中的分解代谢酶会被分选到外膜囊泡 (outer-membrane vesicles, OMV), 并分泌到细胞外环境中; 之后外膜囊泡会被靶细胞内吞或者在细胞外环境中溶解, 被释放的分解代谢酶直接接触它们的底物^[67]。

3 微生物降解木质素的工业应用

在造纸工业中, 为了生产高质量的纸张, 需要利用机械或化学的方法将纤维素和木质素进行分离^[21]。通常利用对环境有害的化学药品来溶解木质素, 然后用亚硫酸盐、氧气或过氧化氢去除木质素残留物^[21,68]。近年来兴起的生物制浆法是利用白腐菌预先处理用于生产纸张的木材^[21,68-69], 在补充营养的条件下让白腐菌在木质纤维原料上生长^[69]。使用白腐菌进行生物制浆是一种更节能、更环保且更具有成本效益的方法, 可以在木材进行机械或化学处理之前去除木材中的木质素^[21,69]。然而, 由于真菌预处理所需的时间较长, 其商业应用仍处于探索阶段。目前, 大多数研究指出白腐菌生物制浆的预处理时间从 2-12 周不等, 这是由于使用的真菌种类、用于制浆的原料和环境条件, 如 pH、温度、湿度、氧气含量不同造成的^[69]。与生物制浆类似, 在近年来高速发展的生物乙醇工业中, 利用白腐菌预处理木质纤维素, 从而富集生物质中的可发酵碳水化合物^[21]。此外在畜牧业中, 人们利用专一性降解木质素的白腐菌处理饲料, 以便在去除木质素的同时保持纤维素含量不变^[21]。

微生物降解木质素也是利用纤维素生产生物柴油的重要预处理步骤, 木质素的降解可以直接产生棕榈酸、油酸、二十四烷酸等脂肪酸, 这些脂肪酸可以作为生产生物柴油的原料^[62,66,70]。微生物在降解木质素时还可以产生其他各种有用的代谢物^[71]。例如, 当 *Pseudomonas putida*

A514 通过 β -酮己二酸途径生物转化木质素和木质素衍生物(香草酸)时产生生物塑料聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoate, PHA)^[72]。同样地, Sonoki 等^[73]使用木质素模型化合物香草酸、4-羟基苯甲酸和丁香酸的混合物作为底物, 利用转基因菌株 *Pseudomonas putida* KT2440 和 *Sphingobium* sp. SYK6 降解木质素及其衍生物时会产生顺,顺-粘康酸等各种工业聚合物的前体。

这些工业应用通常需要大量的木质素降解酶, 因此, 最近的各种研究都集中于优化真菌生长条件, 从而提高真菌产生木质素降解酶的能力。Ghosh^[43]发现, 在含有木质纤维素的液体培养基中添加氯化钠可以提高黄曲霉的漆酶产量; 此外, 添加可溶性淀粉时的漆酶产量比添加葡萄糖时增加了 1.8 倍, 不同种类的木质纤维作为培养基底物也会影响黄曲霉的漆酶产量, 其中丝瓜皮的漆酶产量最高。

此外, Wu 等^[74]最近报道了一种有助于扩大木质素工业应用的方法, 他们对大肠杆菌进行了基因工程改造, 将香兰素等木质素降解产物转化为儿茶酚等更具有工业用途的产品, 这些产品可用作合成其他聚合物的前体。事实证明, 这些方法对于提高现有木质素工业应用的效率和开发新的潜在应用具有效果。

4 真菌与细菌降解木质素的比较

在工业去除木质素的应用中, 人们发现真菌特别是白腐菌对木质素的降解效果更好^[21,75-76]。白腐菌能够耐受甚至降解各种对细菌有毒的外来物质^[21,77-80], 这主要是因为白腐菌可以在各种环境条件下生存, 并且具有一套胞外降解木质素的机制^[21-22,81]。此外, 这些真菌可以利用木质纤维素获得营养, 它们的生长节约了许多昂贵的营养培养基^[21,70]。与此同时, 人们已经发现真菌酶对于商业生产来说在经济上不太可

行^[58], 这些酶在极端温度和 pH 条件下比细菌更容易降解^[58]。此外, 在白腐菌培养过程中保持稳定的 pH 也非常困难^[40], 因此, 利用真菌降解木质素的商业化应用很少^[58]。

目前, 人们已经知道细菌降解木质素比真菌更具有特异性, 因为木质素会被特定种类的细菌所裂解^[80]。另外, 细菌具有更高的重组效率和更容易适应所需的基因表达, 因此细菌提供了基因修饰的可能性, 从而提高木质素降解酶的产量^[71]。此外, 在缺氧时真菌降解木质素过程会受到抑制, 但厌氧细菌在低氧条件下仍然能够继续降解木质素^[82], 值得注意的是, 木质素模型化合物或木质素衍生芳香化合物在厌氧条件下具有 90%以上的生物转化率, 与之相比, 天然木质素在厌氧条件下由细菌降解的效率仍然很低^[83]。当细菌单独作用时需要更长的时间, 所以通常会选择使用混合菌株同时降解木质素代替单一菌株^[84]。

5 未来发展方向

木质素降解在碳循环中起着至关重要的作用, 它是木质纤维素利用的关键步骤。在自然界中, 木质素的降解是一个多酶催化过程, 由于木质素解聚过程非常困难, 所以其商业用途很少。目前生产上常用的化学法或热学法处理木质素往往会造成环境问题, 利用微生物产酶催化降解木质素是一种十分具有前景的方法。然而, 这种方法在过去几十年中发展得十分缓慢, 主要存在一些问题导致其商业应用很困难。

(1) 现有的真菌和细菌的产酶量太低导致降解速度缓慢, 以及多酶协同作用的相容性是微生物降解木质素的主要瓶颈之一

(2) 缺乏对木质素降解代谢途径的详细了解, 导致人们不能找到降解木质素的有效调控位点。

(3) 虽然通过转基因技术可以改造木质素降解细菌,但以木质素作为碳源的转基因细菌在降解木质素方面效率不高,而真菌很难通过基因工程来改变木质素降解的代谢途径,这也是微生物降解木质素代谢途径中的主要瓶颈。

(4) 对于木质素降解酶和介质之间的相互作用了解得还远远不够,特别是对酶促反应中溶剂效应的研究不够深入。

正如本文所讨论的,对微生物降解木质素的研究表明,不同物种的菌株降解木质素能力存在显著差异,最常见的原因是木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、多功能过氧化物酶和漆酶等各种同工酶的表达或活性存在差异。此外,微生物的生长条件也会影响它们产生木质素降解酶的能力。随着合成生物学的发展和真菌表达系统的完善,木质素降解酶的表达可能会得到增强,从而进一步提高木质素降解酶的稳定性并实现更高的反应速度。利用先进的合成生物学工具,如基因组水平的 CRISPR/Cas9 和转座子文库等,可能会阐明在一些真核生物中发现的木质素降解代谢途径背后的遗传学信息,从而解锁真菌分泌系统的独特功能,使得高活性木质素降解酶在非真菌系统中得以表达。此外,如何在不同的生物系统中设计具有高特异性、高活性和高表达效率的胞外或胞内木质素降解酶,如何提高宿主菌株对高浓度底物和产物的稳定性和耐受性,也是未来我们需要解决的重要问题。

同时,也可以利用基因工程的手段对植物中木质素的组成和特性进行改造,使之更有利于微生物的降解。全面了解降解酶和各种介质之间的相互作用,阐明酶对大分子木质素的具体作用有助于认识酶选择性降解木质素的过程,并且是将副反应降至最低的关键。了解酶催化反应过程中的溶剂效应也有助于我们掌握

酶降解木质素时的溶解情况和反应过程。

未来对以上问题进行综合研究,可能会进一步加深人们对自然界中的木质素降解机制的认识,并有助于推广微生物降解木质素的进一步商业应用。

REFERENCES

- [1] LIU QQ, LUO L, ZHENG LQ. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 335.
- [2] LOURENÇO A, PEREIRA H. Compositional Variability of Lignin in Biomass[M]//POLETTO M. *Lignin-trends and Applications*. London: IntechOpen, 2018: 65-98.
- [3] SCHOENHERR S, EBRAHIMI M, CZERMAK P. Lignin Degradation Processes and the Purification of Valuable Products[M]//POLETTO M. *Lignin-trends and Applications*. London: IntechOpen, 2018: 30-63.
- [4] LU Y, LU YC, HU HQ, XIE FJ, WEI XY, FAN X. Structural characterization of lignin and its degradation products with spectroscopic methods[J]. *Journal of Spectroscopy*, 2017, 2017: 1-15.
- [5] HATAKEYAMA H, HATAKEYAMA T. Lignin Structure, Properties, and Applications[M]. *Biopolymers*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2009: 1-63.
- [6] LI H, LIANG Y, LI PC, HE CB. Conversion of biomass lignin to high-value polyurethane: a review[J]. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 2020, 5(3): 163-179.
- [7] ALINEJAD M, HENRY C, NIKAFSHAR S, GONDALIYA A, BAGHERI S, CHEN NS, SINGH S, HODGE D, NEJAD M. Lignin-based polyurethanes: opportunities for bio-based foams, elastomers, coatings and adhesives[J]. *Polymers*, 2019, 11(7): 1202.
- [8] SUN ZH, FRIDRICH B, de SANTI A, ELANGOVA S, BARTA K. Bright side of lignin depolymerization: toward new platform chemicals[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(2): 614-678.
- [9] WANG YY, WYMAN CE, CAI CM, RAGAUSKAS AJ. Lignin-based polyurethanes from unmodified kraft lignin fractionated by sequential precipitation[J]. *ACS Applied Polymer Materials*, 2019, 1(7): 1672-1679.
- [10] ZHAO B, HU SL. Promotional effects of water-soluble extractives on bamboo cellulose enzymolysis[J]. *Bioresources*, 2019, 14: 5109-5120.
- [11] KAMIMURA N, SAKAMOTO S, MITSUDA N, MASAI EJ, KAJITA S. *Advances in microbial lignin*

- degradation and its applications[J]. *Current Opinion in Biotechnology*, 2019, 56: 179-186.
- [12] BRINK DP, RAVI K, LIDÉN G, GORWA-GRAUSLUND MF. Mapping the diversity of microbial lignin catabolism: experiences from the eLignin database[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2019, 103(10): 3979-4002.
- [13] LI X, ZHENG Y. Biotransformation of lignin: mechanisms, applications and future work[J]. *Biotechnology Progress*, 2020, 36(1): e2922.
- [14] SINGH R, UPADHYAY SK, RANI A, KUMAR P, KUMAR A, SINGH C. Lignin biodegradation in nature and significance[J]. *Vegetos-an International Journal of Plant Research*, 2018, 31(4): 39.
- [15] AYERONFE F, KASSIM A, ISHAK N, ARIPI A, HUNG P, ABDULKAREEM M. A review on microbial degradation of lignin[J]. *Advanced Science Letters*, 2018, 24(6): 4407-4413.
- [16] ZHANG CF, WANG F. Catalytic lignin depolymerization to aromatic chemicals[J]. *Accounts of Chemical Research*, 2020, 53(2): 470-484.
- [17] PARTHASARATHI R, ROMERO RA, REDONDO A, GNANAKARAN S. Theoretical study of the remarkably diverse linkages in lignin[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 2011, 2(20): 2660-2666.
- [18] 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.
- [19] CHANG HM, JIANG X. Biphenyl structure and its impact on the macromolecular structure of lignin: a critical review[J]. *Journal of Wood Chemistry and Technology*, 2020, 40(2): 81-90.
- [20] ATIWESH G, PARRISH CC, BANOUB J, LE TA T. Lignin degradation by microorganisms: a review[J]. *Biotechnology Progress*, 2022, 38(2): e3226.
- [21] RODRÍGUEZ-COUTO S. Industrial and environmental applications of white-rot fungi[J]. *Mycosphere*, 2017, 8(3): 456-466.
- [22] MARTÍNEZ AT, SPERANZA M, RUIZ-DUEÑAS FJ, FERREIRA P, CAMARERO S, GUILLÉN F, MARTÍNEZ MJ, GUTIÉRREZ A, del RÍO JC. Biodegradation of lignocelluloses: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin[J]. *International Microbiology*, 2005, 8(3): 195-204.
- [23] TIAN SQ, ZHAO RY, CHEN ZC. Review of the pretreatment and bioconversion of lignocellulosic biomass from wheat straw materials[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 91: 483-489.
- [24] SALEH HED M, RAHMAN ROA. Management of Hazardous Wastes[M]. S.l.: IntechOpen, 2016.
- [25] CAMERON MD, TIMOFEEVSKI S, AUST SD. Enzymology of *Phanerochaete chrysosporium* with respect to the degradation of recalcitrant compounds and xenobiotics[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2000, 54(6): 751-758.
- [26] RUIZ-DUEÑAS FJ, MARTÍNEZ MJ, MARTÍNEZ AT. Molecular characterization of a novel peroxidase isolated from the ligninolytic fungus *Pleurotus eryngii*[J]. *Molecular Microbiology*, 1999, 31(1): 223-235.
- [27] CHEN YR, SARKANEN S, WANG YY. Lignin-degrading enzyme activities[J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N J)*, 2012, 908: 251-268.
- [28] HAMMEL KE, CULLEN D. Role of fungal peroxidases in biological ligninolysis[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2008, 11(3): 349-355.
- [29] BACIOCCHI E, GERINI MF, LANZALUNGA O, LAPI A, LO PIPARO MG, MANCINELLI S. Isotope-effect profiles in the oxidative N-demethylation of N,N-dimethylanilines catalysed by lignin peroxidase and a chemical model[J]. *European Journal of Organic Chemistry*, 2001, 2001(12): 2305-2310.
- [30] DATTA R, KELKAR A, BARANIYA D, MOLAEI A, MOULICK A, MEENA R, FORMANEK P. Enzymatic degradation of lignin in soil: a review[J]. *Sustainability*, 2017, 9(7): 1163.
- [31] MARTÍNEZ MJ, RUIZ-DUEÑAS FJ, GUILLÉN F, MARTÍNEZ AT. Purification and catalytic properties of two manganese peroxidase isoenzymes from *Pleurotus eryngii*[J]. *European Journal of Biochemistry*, 1996, 237(2): 424-432.
- [32] BUGG TDH, RAHMANPOUR R. Enzymatic conversion of lignin into renewable chemicals[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2015, 29: 10-17.
- [33] ZHANG ST, XIAO JL, WANG G, CHEN G. Enzymatic hydrolysis of lignin by ligninolytic enzymes and analysis of the hydrolyzed lignin products[J]. *Bioresource Technology*, 2020, 304: 122975.
- [34] HOFRICHTER M. Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP)[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2002, 30(4): 454-466.
- [35] SHANKAR S, SINGH S, Shikha, MISHRA A, RAM S. Strategic Role of Fungal Laccases in Biodegradation of Lignin[M]. *Mycodegradation of Lignocelluloses*. Springer, Cham, 2019: 119-135.

- [36] BALDRIAN P. Fungal laccases-occurrence and properties[J]. FEMS Microbiology Reviews, 2006, 30(2): 215-242.
- [37] SU J, FU JJ, WANG Q, SILVA C, CAVACO-PAULO A. Laccase: a green catalyst for the biosynthesis of poly-phenols[J]. Critical Reviews in Biotechnology, 2018, 38(2): 294-307.
- [38] FISHER AB, FONG SS. Lignin biodegradation and industrial implications[J]. AIMS Bioengineering, 2014, 1(2): 92-112.
- [39] SUNARDI TJ, ISHIGURI F, OHSHIMA J, IIZUKA K, YOKOTA S. Changes in lignocellulolytic enzyme activity during the degradation of *Picea jezoensis* wood by the white-rot fungus *Porodaedalea pini*[J]. International Biodeterioration & Biodegradation, 2016, 110: 108-112.
- [40] SETHURAMAN A, AKIN DE, ERIKSSON KEL. Production of ligninolytic enzymes and synthetic lignin mineralization by the bird's nest fungus *Cyathus stercoreus*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 1999, 52(5): 689-697.
- [41] YANG CX, WANG T, GAO LN, YIN HJ, LÜ X. Isolation, identification and characterization of lignin-degrading bacteria from Qinling, China[J]. Journal of Applied Microbiology, 2017, 123(6): 1447-1460.
- [42] FILLEY TR, CODY GD, GOODELL B, JELLISON J, NOSER C, OSTROFSKY A. Lignin demethylation and polysaccharide decomposition in spruce sapwood degraded by brown rot fungi[J]. Organic Geochemistry, 2002, 33(2): 111-124.
- [43] GHOSH P, GHOSH U. Statistical optimization of laccase production by *Aspergillus flavus* PUF5 through submerged fermentation using agro-waste as cheap substrate[J]. Acta Biologica Szegediensis, 2017, 61(1): 25-33.
- [44] BETTS WB, DART RK. The degradation of lignin-related compounds by *Aspergillus flavus*[J]. Microbiology, 1988, 134(9): 2413-2420.
- [45] OROZCO COLONIA BS, WOICIECHOWSKI AL, MALANSKI R, LETTI JUNIOR LA, SOCCOL CR. Pulp improvement of oil palm empty fruit bunches associated to solid-state biopulping and biobleaching with xylanase and lignin peroxidase cocktail produced by *Aspergillus* sp. LPB-5[J]. Bioresource Technology, 2019, 285: 121361.
- [46] HASANIN MS, DARWESH OM, MATTER IA, EI-SAIED H. Isolation and characterization of non-cellulolytic *Aspergillus flavus* EGYPTA5 exhibiting selective ligninolytic potential[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2019, 17: 160-167.
- [47] KADAM KL, DREW SW. Study of lignin biotransformation by *Aspergillus fumigatus* and white-rot fungi using (14)C-labeled and unlabeled kraft lignins[J]. Biotechnology and Bioengineering, 1986, 28(3): 394-404.
- [48] ZHAO B, AL RASHEED H, ALI I, HU SL. Efficient enzymatic saccharification of alkaline and ionic liquid-pretreated bamboo by highly active extremozymes produced by the co-culture of two halophilic fungi[J]. Bioresource Technology, 2021, 319: 124115.
- [49] HERNÁNDEZ-ORTEGA A, FERREIRA P, MARTÍNEZ AT. Fungal aryl-alcohol oxidase: a peroxide-producing flavoenzyme involved in lignin degradation[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(4): 1395-1410.
- [50] ENOKI A, ITAKURA S, TANAKA H. The involvement of extracellular substances for reducing molecular oxygen to hydroxyl radical and ferric iron to ferrous iron in wood degradation by wood decay fungi[J]. Journal of Biotechnology, 1997, 53(2/3): 265-272.
- [51] ARANTES V, MILAGRES AMF, FILLEY TR, GOODELL B. Lignocellulosic polysaccharides and lignin degradation by wood decay fungi: the relevance of nonenzymatic Fenton-based reactions[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2011, 38(4): 541-555.
- [52] GOODELL B, JELLISON J, LIU J, DANIEL G, PASZCZYNSKI A, FEKETE F, KRISHNAMURTHY S, JUN L, XU G. Low molecular weight chelators and phenolic compounds isolated from wood decay fungi and their role in the fungal biodegradation of wood[J]. Journal of Biotechnology, 1997, 53(2/3): 133-162.
- [53] HOU LP, JI DD, DONG WF, YUAN L, ZHANG FS, LI Y, ZANG LH. The synergistic action of electro-Fenton and white-rot fungi in the degradation of lignin[J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2020, 8: 99.
- [54] GOODELL B, ZHU Y, KIM S, KAFLE K, EASTWOOD D, DANIEL G, JELLISON J, YOSHIDA M, GROOM L, PINGALI SV, O'NEILL H. Modification of the nanostructure of lignocellulose cell walls via a non-enzymatic lignocellulose deconstruction system in brown rot wood-decay fungi[J].

- Biotechnology for Biofuels, 2017, 10: 179.
- [55] LEONOWICZ A, MATUSZEWSKA A, LUTEREK J, ZIEGENHAGEN D, WOJTAŚ-WASILEWSKA M, CHO NS, HOFRIECHTER M, ROGALSKI J. Biodegradation of lignin by white rot fungi[J]. Fungal Genetics and Biology, 1999, 27(2/3): 175-185.
- [56] EVANS CS, DUTTOM MV, GUILLÉN F, VENESS RG. Enzymes and small molecular mass agents involved with lignocellulose degradation[J]. FEMS Microbiology Reviews, 1994, 13(2/3): 235-239.
- [57] WAGGONER DC, CHEN HM, WILLOUGHBY AS, HATCHER PG. Formation of black carbon-like and alicyclic aliphatic compounds by hydroxyl radical initiated degradation of lignin[J]. Organic Geochemistry, 2015, 82: 69-76.
- [58] HUANG XF, SANTHANAM N, BADRI DV, HUNTER WJ, MANTER DK, DECKER SR, VIVANCO JM, REARDON KF. Isolation and characterization of lignin-degrading bacteria from rainforest soils[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2013, 110(6): 1616-1626.
- [59] RAMACHANDRA M, CRAWFORD DL, HERTEL G. Characterization of an extracellular lignin peroxidase of the lignocellulolytic actinomycete *Streptomyces viridosporus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1988, 54(12): 3057-3063.
- [60] MASAI EJ, 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.
- [61] AHMAD M, ROBERTS JN, HARDIMAN EM, SINGH R, ELTIS LD, BUGG TDH. Identification of DypB from *Rhodococcus jostii* RHA1 as a lignin peroxidase[J]. Biochemistry, 2011, 50(23): 5096-5107.
- [62] KOSA M, RAGAUSKAS AJ. Bioconversion of lignin model compounds with oleaginous *Rhodococci*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2012, 93(2): 891-900.
- [63] RAHMANPOUR REA D, JAMSHIDI S, FÜLÖP V, BUGG TDH. Structure of *Thermobifida fusca* DyP-type peroxidase and activity towards Kraft lignin and lignin model compounds[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2016, 594: 54-60.
- [64] LIN L, WANG XP, CAO LF, XU MY. Lignin catabolic pathways reveal unique characteristics of dye-decolorizing peroxidases in *Pseudomonas putida*[J]. Environmental Microbiology, 2019, 21(5): 1847-1863.
- [65] RAVI K, GARCÍA-HIDALGO J, GORWA-GRAUSLUND MF, LIDÉN G. Conversion of lignin model compounds by *Pseudomonas putida* KT2440 and isolates from compost[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(12): 5059-5070.
- [66] ZHANG K, XU R, ABOMOHR AEF, XIE SX, YU ZS, GUO Q, LIU P, PENG L, LI XK. A sustainable approach for efficient conversion of lignin into biodiesel accompanied by biological pretreatment of corn straw[J]. Energy Conversion and Management, 2019, 199: 111928.
- [67] SALVACHÚA D, WERNER AZ, PARDO I, MICHALSKA M, BLACK BA, DONOHOE BS, HAUGEN SJ, KATAHIRA R, NOTONIER S, RAMIREZ KJ, AMORE A, PURVINE SO, ZINK EM, ABRAHAM PE, GIANNONE RJ, POUDEL S, LAIBLE PD, HETTICH RL, BECKHAM GT. Outer membrane vesicles catabolize lignin-derived aromatic compounds in *Pseudomonas putida* KT2440[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(17): 9302-9310.
- [68] BAJPAI P. Brief Description of the Pulp and Papermaking Process[M]. Biotechnology for Pulp and Paper Processing. Singapore: Springer Singapore, 2018: 9-26.
- [69] KUMAR A, GAUTAM A, DUTT D. Bio-pulping: an energy saving and environment-friendly approach[J]. Physical Sciences Reviews, 2020, 5(10).
- [70] WANG ZN, LI N, PAN XJ. Transformation of ammonia fiber expansion (AFEX) corn stover lignin into microbial lipids by *Rhodococcus opacus*[J]. Fuel, 2019, 240: 119-125.
- [71] KUMAR M, YOU SM, BEIYUAN JZ, LUO G, GUPTA J, KUMAR S, SINGH L, ZHANG SC, TSANG DCW. Lignin valorization by bacterial genus *Pseudomonas*: state-of-the-art review and prospects[J]. Bioresource Technology, 2021, 320(Pt B): 124412.
- [72] WANG XP, LIN L, DONG JD, LING J, WANG WP, WANG HL, ZHANG ZC, YU XW. Simultaneous improvements of *Pseudomonas* cell growth and polyhydroxyalkanoate production from a lignin derivative for lignin-consolidated bioprocessing[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2018, 84(18): e01469-e01418.
- [73] SONOKI T, TAKAHASHI K, SUGITA H, HATAMURA M, AZUMA Y, SATO T, SUZUKI S, KAMIMURA N, MASAI E. Glucose-free *cis*,

- cis*-muconic acid production via new metabolic designs corresponding to the heterogeneity of lignin[J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2018, 6(1): 1256-1264.
- [74] WU WH, LIU F, SINGH S. Toward engineering *E. coli* with an autoregulatory system for lignin valorization[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2018, 115(12): 2970-2975.
- [75] BUGG TD, AHMAD M, HARDIMAN EM, SINGH R. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2011, 22(3): 394-400.
- [76] XIE SX, RAGAUSKAS AJ, YUAN JS. Lignin conversion: opportunities and challenges for the integrated biorefinery[J]. Industrial Biotechnology, 2016, 12(3): 161-167.
- [77] GRELSKA A, NOSZCZYŃSKA M. White rot fungi can be a promising tool for removal of bisphenol A, bisphenol S, and nonylphenol from wastewater[J]. Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27(32): 39958-39976.
- [78] KHAN F, FAROOQI A, ZAFAR MI. Biodegradation of Xenobiotics in Soil by Fungi[M]//Soil Biology. Cham: Springer International Publishing, 2017: 235-242.
- [79] CHRISTIAN V, SHRIVASTAVA R, SHUKLA D, MODI HA, VYAS BRM. Degradation of xenobiotic compounds by lignin-degrading white-rot fungi: enzymology and mechanisms involved[J]. Indian Journal of Experimental Biology, 2005, 43(4): 301-312.
- [80] WANG XL, YAO B, SU XY. Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics detoxification[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(11): 3373.
- [81] LEATHAM GF. Extracellular enzymes produced by the cultivated mushroom *Lentinus edodes* during degradation of a lignocellulosic medium[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1985, 50(4): 859-867.
- [82] XU R, ZHANG K, LIU P, HAN HW, ZHAO S, KAKADE A, KHAN A, DU DL, LI XK. Lignin depolymerization and utilization by bacteria[J]. Bioresource Technology, 2018, 269: 557-566.
- [83] KHAN MU, AHRING BK. Lignin degradation under anaerobic digestion: influence of lignin modifications-a review[J]. Biomass and Bioenergy, 2019, 128: 105325.
- [84] AARTI C, ARASU M, AGASTIAN P. Lignin degradation: a microbial approach[J]. South Indian Journal of Biological Sciences, 2015, 1: 119-127.