

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*
54 (8) :854 - 867; 4 August 2014
ISSN 0001 - 6209; CN 11 - 1995/Q
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.002

木质素芳香族化合物降解菌 *Sphingobium* sp. SYK-6 的研究进展

张晓琰¹, 彭学^{1*}, 政井英司²

¹江苏师范大学生命科学院, 江苏 徐州 221116

²长冈技术科学大学生物系, 日本 9402188

摘要:木质素是木质的主要成分之一, 在自然界中, 高分子木质素被真菌的胞外酶分解成低分子芳香族化合物, 然后土壤细菌将其完全降解为二氧化碳。由此可见, 木质素的完全降解过程是真菌和细菌的共同作用。研究细菌的降解机制, 一方面可以理解芳香族化合物在生态系中的碳素循环, 另一方面可以为木质素的有效利用提供基因和酶工具, 将可再生资源的木质素转化成高附加价值的工业产品。*Sphingobium* sp. SYK-6 是 1987 年从造纸厂废水中以木质素中的联苯化合物(5,5'-脱氢联香草酸)作为唯一碳源分离出的木质素化合物降解菌。在长达 25 年以上的研究中我们阐明了一系列芳香族化合物的代谢途径, 克隆了相关基因, 2012 年随着基因组测序的完成, 整个降解功能的全貌展现出来。介绍内容:(1) 基因组信息;(2) 芳醚化合物代谢;(3) 联苯化合物代谢;(4) 阿魏酸代谢;(5) 木质素化合物降解过程中四氢叶酸依赖型机制;(6) 原儿茶酸 4,5 开环途径;(7) 3-甲氧基没食子酸代谢的多样性;(8) 应用研究。我们希望 SYK-6 菌株成为一个让人们理解木质素化合物降解的模式菌株。最后结合课题组现在的研究课题展望了木质素化合物的降解研究的发展方向。

关键词:木质素, 芳香族化合物, 生物降解

中图分类号:X172 **文章编号:**0001-6209(2014)08-0854-14

木质的主要成分有纤维素、半纤维素和木质素。木质素(Lignin)与前二者不同是高分子芳香族化合物, 由对香豆醇(*p*-Coumaryl alcohol)、松柏醇(Coniferyl alcohol)、芥子醇(Sinapyl alcohol), 3 种 C6-C3 化合物之间以 C-C 键和 C-O-C 键的方式连接形成的 1 种复杂酚类聚合物, 具有使细胞相连, 增强细胞壁抵抗风雨, 黏合纤维抵抗微生物腐蚀的作用。在自然界中, 真菌是木质素降解的先锋者, 它们向细

胞外分泌胞外酶, 漆酶(Laccase)、木质素过氧化物酶(Lignin peroxidase)和锰过氧化物酶(Manganese peroxidase), 这些酶在细胞外催化生成自由基化合物将高分子木质素内的链接键无秩序地分解, 最终形成低分子芳香族化合物^[1]。低分子芳香族化合物降解为二氧化碳的过程主要依赖于土壤细菌, 由此可见, 木质素的完全降解过程是真菌和细菌的共同作用。木质素中芳香醇单体之间的连接键被真菌

基金项目:国家自然科学基金项目(31240088);徐州市科技项目(XM12B105);江苏高校优势学科建设工程资助项目

* 通信作者。Tel: +86-516-83500033;E-mail: pengxue@jnsu.edu.cn

作者简介:张晓琰(1990-), 女, 江苏苏州人, 硕士, 主要从事海洋微生物降解木质素成分的研究。E-mail: ZXY2594685@163.com

收稿日期:2013-11-08; **修回日期:**2014-03-06

的胞外酶裂解后会释放出一些低分子木质素芳香族化合物,如苯环之间用 C-C 键连接的联苯化合物、C-O-C 键连接的芳醚和二芳基丙烷、及一些单体芳香族化合物,如香草酸、阿魏酸、丁香酸等。

关于低分子木质素芳香族化合物降解菌的报道来自土壤微生物的比较,其中包括降解联苯化合物的 *Pseudomonas fluorescens*^[2]、*Streptomyces viridosporus*^[3],降解二芳基丙烷的 *P. fluorescens*^[4],降解芳醚的 *Sphingomonas paucimobilis*^[5] 和 *Delftia acidovorans*^[6],降解对羟基苯甲酸的 *Corynebacterium glutamicum*^[7],但是关于这些菌株的研究只局限于代谢产物的分析鉴定和降解途径的预测,或者局部基因的研究上,缺乏对整个降解面貌的系统研究。研究微生物降解低分子木质素芳香族化合物,一方面可以理解芳香族化合物在生态系统中的碳素循环,另一方面可以为木质素的有效利用提供基因和酶工具,将可再生资源的木质素转化成高附加价值的工业产品。

Sphingobium sp. SYK-6 是 1987 年从造纸厂废水中以木质素中的联苯化合物,5,5'-脱氧联香草酸 (5,5'-Dehydrodivanillate, DDVA) 作为唯一碳源分离出的木质素化合物降解菌^[8-10]。起初分类为 *Pseudomonas paucimobilis*, 后来改为 *Sphingomonas paucimobilis*, 2012 年基因组测序后重新分类为 *Sphingobium* sp.。SYK-6 菌株除了 DDVA 以外还可以降解其他双苯环化合物,如联芳基化合物、芳醚等,和芳基化合物,如阿魏酸、香草醛、香草酸、丁香酸、丁香醛等。利用 SYK-6 菌株进行这些化合物的降解途径、相关基因和酶的研究已经有 25 年以上的历程,一系列代谢途径的总结见图 1-A。从图中可以看出原儿茶酸 (Protocatechuate) 4,5 开环途径是 SYK-6 菌株的“主干道”,原儿茶酸在 4,5 位开环后最终降解为丙酮酸和草酰乙酸,分别进入糖酵解途径和三羧酸循环。其他化合物如联苯化合物、芳醚等联芳基化合物和阿魏酸等的降解经过香草酸进入原儿茶酸 4,5 开环途径,而丁香酸经过 3-甲氧基没食子酸 (3MGA) 或没食子酸开环后进入原儿茶酸 4,5 开环途径^[11-12]。

本综述引用主要文献介绍以下关于 SYK-6 菌株的研究内容:(1) 基因组信息;(2) 芳醚化合物代

谢;(3) 联苯化合物代谢;(4) 阿魏酸代谢;(5) 木质素化合物降解过程中四氢叶酸依赖型机制;(6) 原儿茶酸 4,5 开环途径;(7) 3-甲氧基没食子酸代谢的多样性;(8) 利用 SYK-6 基因的应用研究。

1 基因组信息

Sphingobium sp. SYK-6 菌株呈杆状,在分类上属于变形菌门 (Proteobacteria)、 α -变形菌纲 (Alphaproteobacteria)、鞘脂单胞菌目 (Sphingomonadales)、鞘脂单胞菌科 (Sphingomonadaceae)、鞘脂菌属 (*Sphingobium*)。2012 年 SYK-6 菌株的基因组被测序出来,由一个环状染色体和一个环状质粒构成 (表 1)^[13]。降解芳香族化合物的相关基因分布在染色体上的大约 10 个基因簇中 (图 2)。SYK-6 菌株和 *Sphingobium japonicum* UT26S 的基因组比较后发现 56% 的基因有同源性,而且 SYK-6 菌株质粒上的 120 个 ORF 存在于 UT26S 的染色体上。UT26S 菌株和 SYK-6 菌属一样,是在日本 1980 年代分离出的六六六降解菌^[14],以上的基因组对比说明鞘脂菌属内基因频繁通过质粒水平传播。

2 芳醚 (β -aryl ether) 代谢

芳醚 (β -O-4) 在木质素结构中含量最多,占 50% - 70%,它的降解是木质素降解的关键步骤之一。政井等人利用 Guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether (GGE) 作为芳醚的模式化合物研究了 SYK-6 菌株的降解途径和相关基因。GGE 脱氢后成为 α -(2-Methoxyphenoxy)- β -hydroxypropiovanillone (MPHPV), 然后裂解成 β -Hydroxypropiovanillone (HPV) 和愈创木醇。HPV 经过香草醛和香草酸进入原儿茶酸 4,5 开环途径 (图 1-A)。为了克隆芳醚降解相关基因 Masai 等人利用广域宿主载体构建了 SYK-6 菌株的基因文库,然后转化进宿主 *Sphingomonas paucimobilis* IAM12578 中,以芳醚酶活性为指标获得一个阳性克隆质粒。这个质粒的插入片段中有一个芳醚降解操纵子 *ligDFEG* (图 2)^[15-16]。

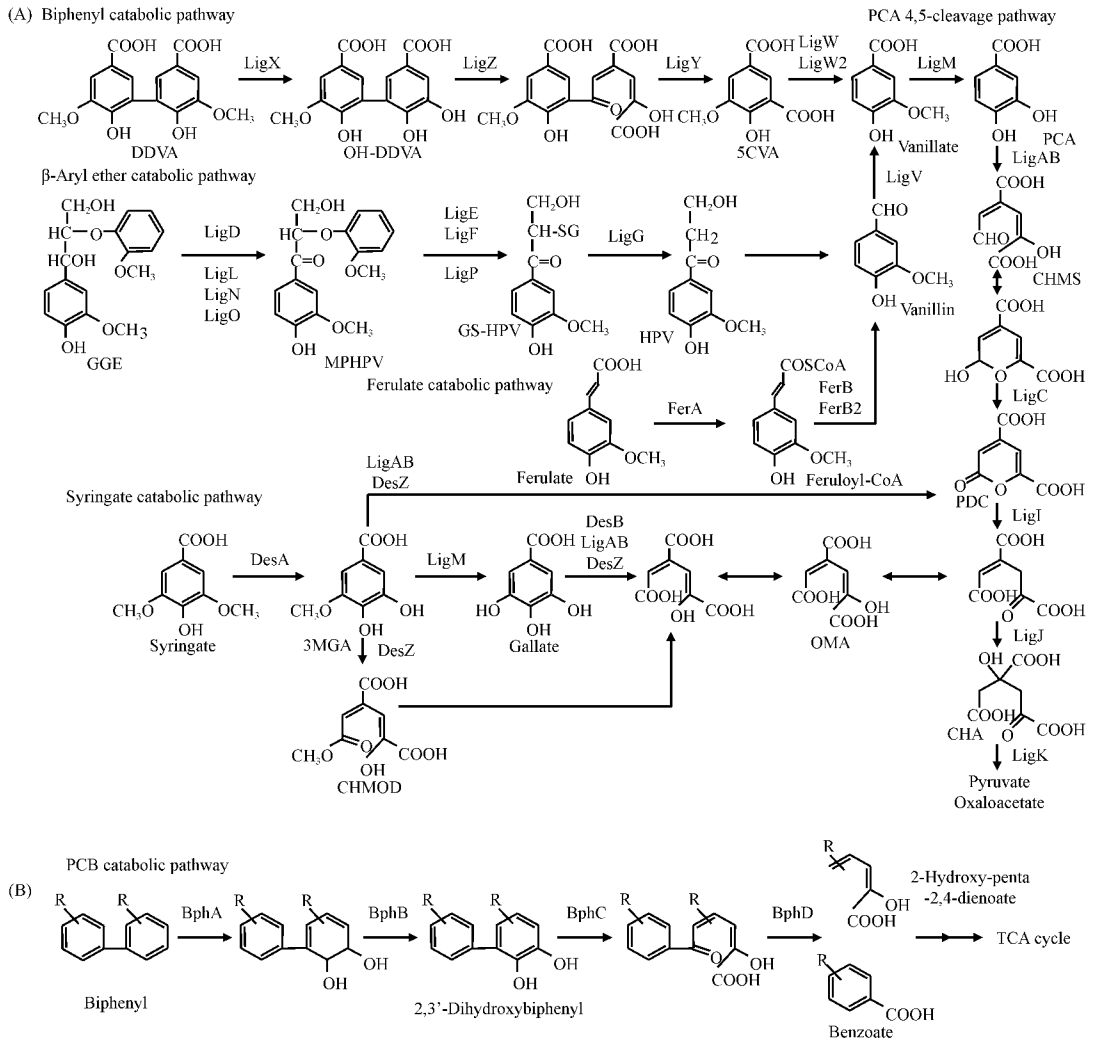


图 1. *Sphingobium* sp. SYK-6 的木质素化合物 (A) 和多氯乙烯的降解途径 (B) [12]

Figure 1. A: Degradation pathways for lignin aromatic compounds in *Sphingobium* sp. SYK-6. B: Degradation pathway for Polychlorinatedbiphenyl. Compounds: CHMOD, 4-carboxy-2-hydroxy-6-methoxy-6-oxohexa-2, 4-dienoate; CHMS, 4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde; CHA, 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate; 5CVA, 5-carboxyvanillate; DDVA, 5, 5'-dehydrodivanillate; GS-HPV, α -glutathionyl- β -hydroxypropiovanillone; GGE, guaiacylglycerol- β -guaniacyl ether; HPV, β -hydroxypropiovanillone; 3MGA, 3-methoxygallate; MPHPV, α -(2-methoxyphenoxy)- β -hydroxypropiovanillone; OMA, 4-oxalomesaconate; PCA, protocatechuate; PDC, 2-pyrone-4, 6-dicarboxylate; DDPA, 2, 2', 3, 3'-tetrahydroxy-5, 5'-dicarboxybiphenyl; OH-DDVA, 2,2',3-trihydroxy-3'-methoxy-5,5'-dicarboxybiphenyl; PCB, polychlorinatedbiphenyl

表 1. SYK-6 菌株的基因组信息

Table 1. Genome information of strain SYK-6

genome	genomic size /bp	(G + C) content/%	number of ORFs assigned	percentage of the coding regions	number of rRNA genes	number of tRNA genes
chromosome	4348133	65.53	4063	89.29	6	50
plasmid (pSLGP)	148801	64.4	150	-	-	-

ligD 编码的是 C α -脱氢酶 (LigD), 催化氧化 GGE 至 MPHPV 的反应, 属于短链醇脱氢酶家

族 [17]。最近课题组又克隆出 3 个 C α -脱氢酶基因 (*ligL*, *ligN*, *ligO*), 分散在染色体的不同位置上, 和

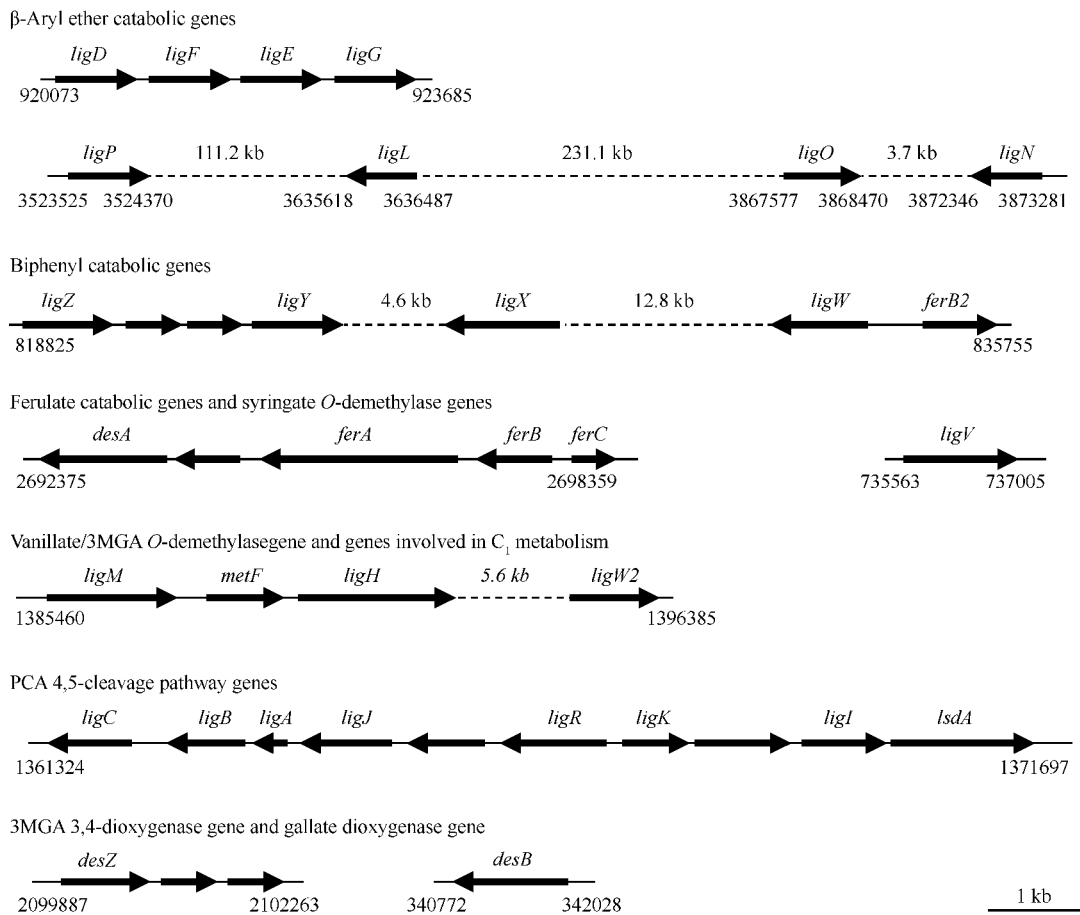


图 2. 木质素化合物降解途径上的基因图谱

Figure 2. Gene maps related in lignin aromatic compounds metabolism.

ligD 的相似性在氨基酸序列水平上有 32% - 39%。这 4 个 C α -脱氢酶识别不同或相同的光学异构体 GGE。*ligE* 和 *ligF* 两个基因在 *ligD* 的下游, 它们之间有 30% 的相似性, 都编码芳醚酶 (LigE 和 LigF) 催化 MHPV 的裂解反应, 反应产物是 α -Glutathionyl-HPV (GS-HPV) 和愈创木醇。在这个裂解反应中有一个谷胱甘肽 (GSH) 分子插入反应产物中。最近课题组又克隆出基因 *ligP*, 和 *ligE* 有 59% 的相似性, 有芳醚酶活性, 也是一个芳醚酶 (LigP)^[18]。LigE, LigF 和 LigP 识别的底物之间是光学异构体的关系^[16-20]。*ligG* 编码的是谷胱甘肽 S-转移酶 (LigG), 将 GS-HPV 分子上的谷胱甘肽除去生成 HPV^[19]。最近 LigG 的立体结构利用 X 射线解析出来^[21]。

芳醚降解操纵子 *ligDEF* 上的结构基因编码的酶催化一系列芳醚降解反应, 但是编码前 2 个酶的基因在染色体上分别有 2, 3 个相似基因。*ligD*、

ligL、*ligN* 和 *ligO* 之间, *ligE*、*ligF* 和 *ligP* 之间、有一定的相似性但是不高。*ligE* 和 *ligF* 可能是同源物, 祖先基因通过基因重复生成 2 个, 在进化过程中获得了催化不同光学异构体的功能。*ligL*、*ligN*、*ligO* 和 *ligP* 分散在染色体上, 周围也没有相关代谢基因, 通过水平传播进入 SYK-6 的可能性比较大。

3 联苯 (Biphenyl) 代谢

木质素中联苯结构仅次于芳醚, 在木质素结构中含量占 10% - 15% 左右。本实验室将 5,5'-脱氢联香草酸 (DDVA) 作为联苯的模式化合物, 研究了 SYK-6 菌株的降解途径和相关基因。DDVA 的一个甲基去除后变成 2,2',3-三羟基-3'-甲氧基-5,5'-联苯二甲酸 (OH-DDVA)。OH-DDVA 开环后转化为 5-羧基香草酸 (5CVA), 脱羧成香草酸, 最后进入原儿茶酸降解途径 (图 1-A)。

为了克隆 DDVA 降解相关基因,本实验室首先利用诱变剂构建了 SYK-6 菌株的突变基因文库,然后从中筛选了 DDVA 降解缺陷突变株。最后将在大肠杆菌中构建的 SYK-6 菌株的基因文库导入到缺陷突变株内,获得了原养型重组体。从这个重组体中克隆了 DDVA 降解相关基因簇 (*ligXZY*)。*ligX* 编码的是 DDVA 脱甲基酶 (LigX),将 DDVA 转化为 OH-DDVA^[22-23]。*LigX* 的氨基酸序列和 *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310 的 *PobA* 之间有 26% 的相似性,*PobA* 是苯氧基苯甲酸双加氧酶的 α 亚基^[24]。苯氧基苯甲酸双加氧酶的 β 亚基 (*PobB*) 是一个铁氧蛋白和铁氧蛋白还原酶。我们还没有在 SYK-6 菌株中找到和 *PobB* 对应的基因。

ligZ 编码的是 OH-DDVA 双加氧酶 (*LigZ*),属于外二醇双加氧酶 (Extradiol dioxygenase) 家族,将 OH-DDVA 的一个苯环打开。间位开环酶分为 I 型, II 型和 III 型。I 型包括 *Burkholderia xenovorans* LB400 的 2,3-二羟基联苯 1,2 双加氧酶、*Pseudomonas* sp. KKS102 的儿茶酚 2,3-双加氧酶和 *P. putida* mt-2 的儿茶酚 1,2-双加氧酶等。II 型包括 *E. coli* 的 2,3-二羟基-3-苯基丙酸 1,2 双加氧酶和同型原儿茶酸 2,3-双加氧酶、*Sphingomonas*, *Comamonas* 和 *Pseudomonas* 的原儿茶酸 4,5 双加氧酶以及 *Comamonas* 和 *Pseudomonas* 的 2-氨基苯酚 1,6-双加氧酶。III 型包括 *C. testosteroni* 的 1,2-dioxygenase、*Nocardioidea* sp. KP7 的 1-羟基-2-萘甲酸双加氧酶。根据相似性和一些活性部位氨基酸的保存方式 *LigZ* 被分类为 II 型外二醇双加氧酶^[25]。*LigZ* 的底物特异性比较高,目前只发现 OH-DDVA 和 2,2',3,3'-四羟基-5,5'-联苯二甲酸 (DDPA) 是它的底物。

ligY 编码的是水解酶 (*LigY*),催化 OH-DDVA 开环产物水解成 5CVA 的反应^[26]。彭学等利用重水 ($H_2^{18}O$) 的实验结果表明,反应产物 5CVA 的 5 位羧基中的 ^{18}OH 是从 $H_2^{18}O$ 而来。有趣的是 *LigY* 单独没有酶活性,必须和 *LigZ* 才能显示活性。另外, Sonoki 等^[23] 报道 *LigX-LigZ-LigY* 三个酶结合在一起形成一个聚合物,催化从 DDVA 到 5CVA 一连的反应。这种催化同一系列的酶结合在一起形成聚合物的现象在脂肪酸和莽草酸等合成途径上比较常见,但是在降解途径上还没有出现第二例。同时也说明,*ligX*、*ligZ* 和 *ligY* 三个基因在进化过程中始终保

持着密切关系 (图 3)。

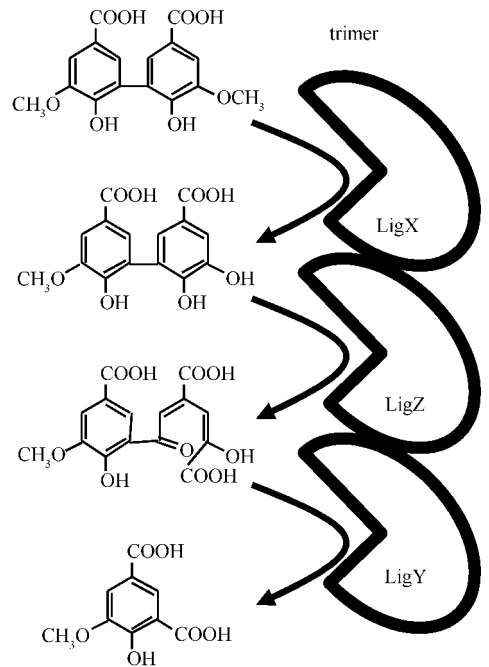


图 3. *LigX-LigZ-LigY* 三聚体^[23]

Figure 3. *LigX-LigZ-LigY* hetero-trimer.

从 5CVA 到香草酸的反应由脱羧酶催化,为了克隆这个基因,课题组用广宿主载体构建了 SYK-6 菌株的基因文库,然后将其转化进没有 5CVA 脱羧活性的 *Pseudomonas putida* PpY101 内。以 5CVA 脱羧活性为指标对重组体进行筛选,成功克隆了 *ligW* 基因。*ligW* 编码的是 5CVA 脱羧酶 (*LigW*),将 5CVA 的 5 位的羧基去除生成香草酸^[27]。利用染色体步移法阐明了 *ligW* 位于 *ligX* 的上游 12.8 kb 处。由于 *LigW* 和其他已知序列的相似性非常低,为了正确验证其催化机制,利用重水 (D_2O) 取代普通的水做了实验。实验结果表明,反应产物香草酸的 5 位被从 D_2O 而来的 D 取代,证明了 *LigW* 是还原性脱羧酶。在构建 *ligW* 基因缺陷型菌株时发现,此菌株没有丧失 5CVA 脱羧酶活性,说明还有其他酶参与这个反应。用和克隆 *ligW* 同样的办法,从 SYK-6 菌株的基因文库中又克隆出一个基因 *ligW2*,*ligW2* 同样编码 5CVA 脱羧酶 (*LigW2*),*LigW* 和 *LigW2* 之间的相似性有 53%,在染色体上 *ligW2* 的位置远离 *ligW*。*ligW* 和 *ligW2* 的双重缺陷型才完全失去了 5CVA 脱羧酶活性,同时也失去了以 5CVA 为唯一碳源生长的能力^[28]。

苯环之间直接相连的联苯结构化合物非常稳定,

最难被微生物降解,是木质素降解的限速步骤。SYK-6 菌株以 DDVA 为唯一碳源的生长速率比其他化合物快,进化出了适应降解联苯结构化合物的能力。

4 木质素联苯和多氯联苯代谢的比较

多氯联苯 (Polychlorinatedbiphenyls, PCB) 在工业上广泛使用,已造成全球性环境污染问题。目前从世界各地的多氯联苯污染地区已经分离出许多多氯联苯降解微生物,其降解机制已经阐明(图 1-B)^[29]。多氯联苯的构造和木质素中的联苯构造相似,起初人们怀疑降解木质素联苯化合物的基因可能是参与降解多氯联苯的祖先。从图 1-B 可以看出多氯联苯的降解途径和 DDVA 的非常相似,其中 BphC 是整个降解途径的关键酶,担任催化苯环的裂解反应。其催化机制和 LigZ 相同都是外二醇双加氧酶,但是在氨基酸序列水平上两个酶相差甚远, BphC 属于 I 型,而 LigZ 属于 II 型间位双加氧酶。BphC 和 LigZ 互相也不能开环对方的底物,从我们的研究可以推测出,虽然在降解途径上多氯联苯和木质中联苯化合物有相似性,但是它们始于同一祖先的可能性很小。

5 阿魏酸 (Ferulate) 代谢

阿魏酸是 C6-C3 化合物、木质素合成的中间体,在分子木质素中起到连接苯环的桥梁作用,约占细胞壁总量的 1.5%。阿魏酸的降解从侧链开始有两种途径。一个是非氧化脱羧酶参与的途径,这个酶催化去除一个碳生成 4-羟基-3-甲氧苄乙烯 (4-Hydroxy-3-methoxystyrene)^[30] 的反应。另外一个 β -氧化途径(图 1-A),有两个酶参与去除侧链上的两个碳:阿魏酰-CoA 合成酶 (Feruloyl-CoA synthase) 将阿魏酸和 CoA 连接生成阿魏酰-CoA;阿魏酰-CoA 裂解酶催化生成香草醛的反应。编码这些酶的基因在 *Pseudomonas fluorescens* AN103^[31] 和 *Pseudomonas* sp. HR199^[32] 等中都有报道。

为了克隆阿魏酸降解基因,本实验室利用交替培养法分离出一个阿魏酸营养突变株,然后克隆出一个阿魏酸降解基因簇 (*ferABC*)^[33]。*ferA* 和 *ferB* 分别编码阿魏酰-CoA 合成酶 (FerA) 和阿魏酰-CoA 裂解酶 (FerB)。FerA 和其他的阿魏酰-CoA 合成酶

没有有意义的相似性,而 FerB 和其他阿魏酰-CoA 裂解酶之间有 40% - 48% 的相似性。*ferA* 缺陷型菌株完全失去降解阿魏酸的能力,但是 *ferB* 缺陷型菌株仍然可以降解阿魏酸,说明 SYK-6 菌株的染色体上还有其他阿魏酰-CoA 裂解酶基因。在 *ligW* 的上游发现一个在氨基酸序列水平上和 *ferB* 相似性有 49% 的基因 (*ferB2*)。*ferB* 和 *ferB2* 的双重突变株失去了降解阿魏酸的能力,说明它们都参与阿魏酸的降解。催化香草醛转化成香草酸是香草醛脱氢酶,课题组从 SYK-6 菌株的基因文库中克隆出编码这个酶的基因 (*ligV*),它单独存在于染色体上,没有和其他降解基因形成基因簇^[34]。

在 *ferB* 的上游有一个调控基因 (*ferC*),编码的 FerC 蛋白质属于 MarR 型调控蛋白^[35]。*ferC* 和 *Pseudomonas fluorescens* BF13 的 *ferB*^[36]、*Rhodopseudomonas palustris* 的 *badR*^[37]、*Comamonas testosteroni* KH122-3a 的 *mobR*^[38] 之间有 20% - 27% 的相似性。这些基因产物分别是阿魏酸、苯甲酸、和 3-羟基苯甲酸代谢的调控蛋白质。SYK-6 菌株的 FerC 结合在 *ferAB* 操纵子的启动子附近,负调控该操纵子的转录。当有诱导物时,诱导物和 FerC 蛋白质结合后从启动子部位脱离下来解除阻遏。诱导物是中间代谢产物的阿魏酰-CoA (Feruloyl-CoA),还有结构类似物对香豆酰-CoA (*p*-Coumaroyl-CoA) 和芥子酰-CoA (Sinapoyl-CoA) 也可以作为诱导物,而结构类似物咖啡酰 CoA (Caffeoyl-CoA) 不可以。这和前面讲述的芳醚和联苯代谢不同,阿魏酸代谢操纵子除了结构基因外,还具备非常完整的调控基因。阿魏酸本身在木质素中的含量较少,当其浓度低时 SYK-6 菌株可以通过调节基因的功能有效地阻遏结构基因的转录。

6 木质素化合物降解过程中四氢叶酸依赖型机制

木质素芳香族化合物有一个特点是甲基含量高,如 DDVA、香草酸、丁香酸以及代谢产物 3-甲氧基没食子酸 (3MGA) 的分子中都有一个或多个甲基。这些化合物的代谢首先是去除甲基,剩下的苯环化合物进入原儿茶酸 4,5 开环途径。而被去除掉的甲基,SYK-6 菌株并没有把它扔掉。SYK-6 菌株非常巧妙的利用四氢叶酸途径将这些脱落下来的甲

基作为碳源使用(图4)。

DDVA的一个甲基被 LigX 催化脱落下来后,和四氢叶酸反应生成 5-甲基四氢叶酸,这个甲基最终被作为碳源利用^[39-41]。丁香酸的一个甲基去除后被转化为 3-甲氧基没食子酸^[42]。desA 位于 ferA 的上游,编码丁香酸脱甲基酶(DesA)。DesA 和氨基转移酶(Aminomethyl transferase)^[43]、二甲基甘氨酸脱氢酶(Dimethylglycine dehydrogenase)^[44]之间有大约 20% 的相似性。这些酶催化将底物的氨基或甲基转移给四氢叶酸生成 5-甲基四氢叶酸。ligM 位于 ligW2 的上游约 8 kb 处,编码香草酸/3-甲氧基没食子酸(3MGA)脱甲基酶(LigM),和 DesA 之间在氨基酸序列水平上有 49% 的相似性^[45]。LigM 将香草酸和 3MGA 分别脱甲基转化为原儿茶酸和没食子酸。从图 1-A 可以看出 ligM 缺陷型突变株完全失去香草酸和丁香酸的代谢能力。metF 和 ligH 2 个参与四氢叶酸途径的基因位于 ligM 和 ligW2 之间,其他四氢叶酸途径上的相关基因正在探索中。

SYK-6 菌株无法利用没有甲基的芳香族化合物(原儿茶酸和没食子酸)作为唯一碳源生长。在培养基里加入适当含有甲基的蛋氨酸,虽然可以维持生长,但是速度缓慢。四氢叶酸途径是微生物维持代谢的重要途径,SYK-6 菌株优先利用木质素中的甲基作为四氢叶酸途径的甲基供体,这一点可以说 SYK-6 菌株是一个与木质素共生,一个名符其实的木质素化合物降解菌。

7 原儿茶酸 4,5 开环途径

原儿茶酸在芳香族化合物的降解过程中扮演着非常重要的中间代谢产物的角色。原儿茶酸的苯环可以在 3,4 位、4,5 位或 2,3 位间被打开,分别由原儿茶酸 3,4 双加氧酶^[46]、原儿茶酸 4,5 双加氧酶^[47]、原儿茶酸 2,3 双加氧酶^[48]催化。关于原儿茶酸 3,4 双加氧酶的研究比较深入,原儿茶酸在 3,4 之间开环后变成 β -羧基-*cis*, *cis*-粘康酸(β -Carboxy-*cis*, *cis*-muconate),然后进入 β -酮己二酸(β -Keto adipate)途径。 β -酮己二酸在 *Acinetobacter calcoaceticus*、*P. putida* 和 *Agrobacterium tumefaciens* 中有详细报道^[49]。SYK-6 菌株的芳香族化合物的降解途径都收缩于原儿茶酸 4,5 开环途径。从原儿茶酸降解到中心代谢途径的丙酮酸和草酰乙酸,共

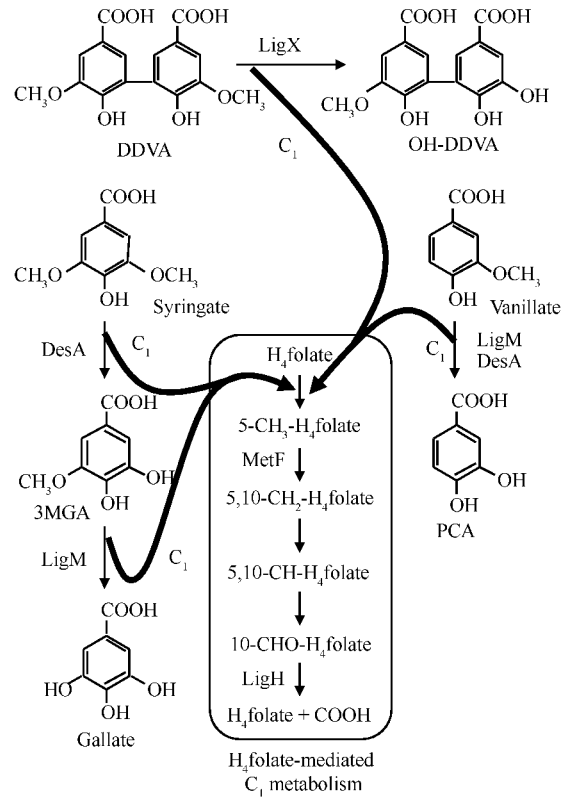


图 4. DDVA、香草酸、丁香酸和 3MGA 的脱甲基机制依赖于四氢叶酸的 C₁ 代谢

Figure 4. *O*-Demethylation system of DDVA, vanillate, syringate and 3MGA linked with H₄ folate-mediated C₁ metabolism.

有六步,分别由五个酶催化(图 1-A)。课题组纯化了 SYK-6 菌株的原儿茶酸 4,5 开环途径上的所有酶,对其进行了详细的酶动力学研究,以下将酶特性等逐一介绍。

7.1 原儿茶酸 4,5 双加氧酶(LigAB)

原儿茶酸 4,5 双加氧酶催化原儿茶酸在 4,5 位的裂解生成 4-羧基-2-羟基粘康酸-6-半醛(CHMS)的反应。SYK-6 的 ligAB 编码原儿茶酸 4,5 双加氧酶(LigAB): LigA 是 α 亚基; LigB 是 β 亚基^[50]。ligAB 是第一个从 SYK-6 菌株的缺陷型菌株中利用互补法克隆出来的基因。根据相似性和一些活性部位氨基酸的保存方式 LigAB 和 LigZ 一样属于 II 型外二醇双加氧酶, LigB 和 LigZ 之间有 21% 的相似性。Sugimoto 等人^[51-52]利用 X 射线将其立体结构构造解析出来,是 $\alpha 2\beta 2$ 四聚体,活性部位有一个 Fe²⁺。当原儿茶酸作为底物时, V_{max} 为 30.6 U/mg, Km 为 75.0 mmol/L。除了原儿茶酸外, LigAB 还对没食子酸(V_{max}, 15.0 U/mg; Km, 381 mmol/L)和

3MGA (V_{\max} , 0.925 U/mg; K_m , 937 mmol/L) 显示出一些活性^[53]。

7.2 CHMS 脱氢酶 (LigC)

编码 CHMS 脱氢酶 (LigC) 由位于 *ligAB* 下游的 *ligC* 编码, 将 CHMA 转化为 2-吡喃酮-4, 6-二酸 (PDC)。LigC 是 NADP⁺ 依赖, 同型二聚体, 对 NADP⁺ 的 K_m 是 24.6 mmol/L, 大约比 NAD⁺ 低 10 倍^[54]。LigC 与 CbaC 家族的蛋白质之间的相似性是 45% - 64%。CbaC 家族参与 *P. putida* 和 *Burkholderia cepacia* 的 3-氯苯降解。CbaC 家族的脱氢酶不同于长链锌依赖脱氢酶 (Group I)、短链锌依赖脱氢酶 (Group II) 和铁离子活化脱氢酶 (Group III), 在分类上是一个新的分支。

7.3 PDC 水解酶 (LigI)

编码 PDC 水解酶 (LigI) 由位于 *ligAB* 上游的 *ligI* 编码, 将一个水分子加入 PDC 中生成 4-草酰中康酸 (OMA)^[11]。OMA 有酮体和醇体的 3 种异构体, 在水溶液中会达到 1 个平衡状态。LigI 对底物 PDC 和产物 OMA 的 K_m 分别是 74.49 mmol/L。而 LigI 对 PDC 和 OMA 的 V_{\max} 分别是 506、283 U/mg。这种 PDC 水解酶对 PDC 的亲水性低, 但 PDC 水解速度高的现象是 PDC 水解酶的共同特征, 在 *Pseudomonas ochraceae* 等中也有报道^[55], 这在代谢途径的意义尚不明确。SYK-6 菌株的 PDC 和其他二菌株, *P. ochraceae*、*C. testosteroni* 的 PDC 一样, 其活性被硫醇 (Thiol) 抑制, 说明活性中心有丝氨酸。在 LigI 序列中我们找到了一个序列 “Ala74-Ser75-Cys76-His77-Gly78”, 其中的 Cys76 在所有的 PDC 中是保守的。

7.4 OMA 水合酶 (LigJ)

编码 OMA 水合酶 (LigJ) 由位于 *ligAB* 上游的 *ligJ* 编码, 催化 OMA 至 4-羧基-4-羟基-2-氧代己二酸 (CHA) 的反应^[56]。LigJ 对 OMA 的 K_m 和 V_{\max} 分别是 138 mmol/L 和 440 U/mg。LigJ 的活性受到硫醇的抑制, 说明其活性中心也 LigI 一样有丝氨酸的参与。LigJ 和 SYK-6 菌株的联苯化合物降解途径上的 LigY 之间有 35% 的相似性, 它们都是将 H₂O 作为底物的酶, 说明编码这些酶的基因在进化上有相应关系。水合酶和水解酶都是将一个水分子合并到底物分子中去, 区别在于水合酶催化的是使双键消失的反应, 而水解酶催化的是裂解一个共价键。

7.5 CHA 醛缩酶 (LigK)

编码 CHA 醛缩酶 (LigK) 由位于 *ligI* 上游的 *ligK* 编码, 催化原儿茶酸 4, 5 开环途径的最后一步, CHA 至丙酮酸和草酰乙酸的反应^[57]。LigK 是同型六聚体, 对 CHA 和草酰乙酸的 K_m 分别是 11.2、136 mmol/L。对 CHA 的 V_{\max} 是 265 U/mg, 是草酰乙酸的 20 倍。LigK 的活性是 Mg²⁺ 依赖性, 说明它属于醛缩酶 II 家族^[58]。醛缩酶属于裂解酶的一种, 没有任何辅助分子参与它催化的反应, 所以在反应产物中必须有双键的形成。

7.6 原儿茶酸 4, 5 开环途径的调控机制

原儿茶酸 4, 5 开环途径的基因簇共有 4 个转录单位: *ligK-orf1-ligI-lsdA*; *ligJAB*; *ligR*; *ligC*^[57]。*ligR* 位于基因簇的中间位置, 编码一个 LysR 型转录因子 (LigR), 是一个正调控蛋白质。LigR 虽然始终结合在 *ligK* 和 *ligJ* 的上游部位, 但诱导物不存在时不能激活诱导转录。当诱导物存在时, 诱导物和 LigR 形成的复合体促进 LigR 结合部位的 DNA 弯曲, 这种弯曲激活了 RNA 聚合酶和启动子的结合从而启动 *ligK-orf1-ligI-lsdA* 和 *ligJAB* 转录单位的转录^[59]。诱导物是香草酸和丁香酸代谢途径中的中间产物, 原儿茶酸和没食子酸。这两个中间产物是 SYK-6 菌株降解所有木质素化合物的必经之路, 它们的积累会激活原儿茶酸 4, 5 开环途径, 使所有降解途径圆滑运转。

8 3MGA 代谢的多样性

SYK-6 菌株的木质素芳香族化合物降解相关基因之间有很多具有相似性, 这些基因编码的酶的底物结构以及所催化的反应机理也有一定的相似性。一个降解途径上的酶也会催化其他途径类似底物的反应。这种多功能酶的基因即使发生突变, 也会得到互相弥补不至于影响在芳香族化合物上的生存。以下是 3-甲基没食子酸 (3MGA) 代谢途径上的多功能酶的介绍。

8.1 3MGA 3, 4 双加氧酶 (DesZ) 和原儿茶酸 4, 5 双加氧酶 (LigAB)

丁香酸的一个甲基被 DesA 脱掉后转化为 3MGA, 3MGA 可以直接开环, 也可以进一步脱甲基转化为没食子酸, 通过没食子酸开环 (图 1-A)。*desZ* 编码 3MGA 3, 4 双加氧酶 (DesZ)^[60], 在染色体

上没有和其他降解基因形成基因簇。在 SYK-6 菌株中 3MGA 开环酶有 2 个,一个是 DesZ,将 3MGA 氧化为 4-Carboxy-2-hydroxy-6-methoxy-6-oxohexa-2,4-dienoate (CHMOD)。CHMOD 可以自然转化为 OMA 进入原儿茶酸 4,5 开环途径。DesZ 还有一个意外的催化功能,将 3MGA 氧化为 PDC,但是这个催化活性比生成 CHMOD 的活性低 10 倍。DesZ 和外二醇双加氧酶 II 型之间有 20% - 40% 的相似性。另外一个 3MGA 开环酶是 LigAB,将 3MGA 开环为 PDC。*desZ* 缺陷型菌株还保持 3MGA 双加氧酶活性,只有 *desZ-ligB* 双重缺陷型菌株才完全丧失了 3MGA 双加氧酶活性^[61]。但是 *desZ-ligB* 双重缺陷菌株还保持利用丁香酸生长的能力,从图 1-A 中可以看出丁香酸脱甲基后生成的 3MGA 有不走开环的途径,进一步脱甲基生成没食子酸,然后经过没食子酸开环进入原儿茶酸 4,5 开环途径。

8.2 没食子酸双加氧酶 (DesB)

3MGA 除了被双加氧酶开环外,还可以走进一步脱甲基的途径生成没食子酸,这步反应由 LigM 催化。*desB* 编码没食子酸 3,4 双加氧酶 (DesB),在染色体上也没有和其他降解基因形成基因簇,催化没食子酸开环生成 OMA^[62-63] 的反应。*desB* 分别与原儿茶酸 4,5 双加氧酶基因的 *ligA* 和 *ligB* 有相似性,但 *desB* 只有一个链。*desB* 也属于外二醇双加氧酶 II 型。DesB 对没食子酸的 K_m 和 V_{max} 分别是 67 mmol/L 和 43 U/mg。有趣的是 DesZ 和 LigAB 也对没食子酸有一些活性,但它们的 V_{max}/K_m 分别是 DesB 的 1.2% 和 6.1%,这说明 DesB 在没食子酸开环上起到主导作用。

desB 缺陷菌株在丁香酸上的生长能力非常低,而且有没食子酸的积累。*desB-desZ-ligB* 三重缺陷型菌株完全丧失了丁香酸上的生长能力,但是 *desB-ligB* 双重缺陷型菌株还可以生长。这些实验说明:(1) 从 3MGA 到 OMA 的途径由 LigM、DesB 或 LigAB 催化;(2) 将 3MGA 经过 CHMOD 转化为 OMA 的反应由 DesZ 催化;(3) 从 3MGA 到 PDC 的反应由 LigAB 和 DesZ 催化(图 1-A)。

9 SYK-6 菌株基因的应用研究

在基础研究的同时,本课题组还做了一些应用

研究,以下举两例介绍。在造纸工业,木质素的去除是最繁杂、耗时和费力的环节。而且从造纸厂出来的废水称为“黑水”,给污水处理和环境带来巨大的负担。如果能开发出木质素含量低的木材,将会大大降低成本,缓解造纸厂废水的排放。木质素中的基本骨架是 C6-C3 构造,*ferB* 编码的阿魏酰-CoA 裂解酶可以破坏其侧链,从而阻止木质素的高分子化。将 *ferB* 转化到山杨树中,构建了一系列重组山杨树。Northern blot 实验表明 *ferB* 成功在这些重组体内转录,而且重组体的生长没有受到影响。但是木质素的成分没有明显的变化,我们计划进一步优化条件构建木质素含量低的山杨树^[64]。

另外一个例子是生产生物基材料 PDC。如上所述 PDC 是原儿茶酸 4,5 开环途径上的稳定中间代谢产物,全名为 2-吡喃酮-4,6-二酸 (2-Pyrone-4,6-dicarboxylate),其分子中有 2 个羧基,可以成为聚合物的单体。课题组首先将 SYK-6 菌株的 *ligI* 敲除掉,构建了 1 个 *ligI* 缺陷型菌株,利用这个菌株从原儿茶酸生物合成了 10 g/L 的 PDC。为了从其他可再生碳源,如葡萄糖生物合成 PDC,我们将 *ligABC* 三个基因转化到 *E. coli* 中,同时在 *E. coli* 中共表达了 *aroF^{obr}* 基因(芳香族氨基酸的反馈调控被解除)、*aroB*、*pobA* 和 *gutC*。这个重组大肠杆菌从葡萄糖成功合成了 0.35 mg/L 的 PDC^[65-66]。

10 结束语

SYK-6 菌株拥有各种各样的芳香族化合物代谢途径,课题组对它进行了长达 25 年以上的研究。20 世纪 80 年代主要研究内容是菌株的分离、代谢中间产物的鉴定、代谢途径的预测等。20 世纪 90 年代,研究集中于代谢基因的克隆上。克隆策略有两种:(1) 利用诱变剂和转座子等手段构建 SYK-6 菌株的突变株,然后导入基因文库,筛选恢复重组体;(2) 将 SYK-6 菌株的基因文库导入到没有降解性能的宿主(如 *P. putida*)中,筛选获得降解活性的重组体。2000 年以后,课题组的研究集中在基因转录调控上,研究了 FerC 和 LigR 两个调控因子。2012 年完成了全基因组序列测序工作,使我们可以对以前的工作进行验证,同时使我们对新基因的探索更加容易。随着研究逐渐深入,代谢途径和功能基因的不断阐明,SYK-6 菌株将成为一个让人们理解木质

素降解的模式菌株。

木质素赋予陆地植物坚韧性承受巨大的重力和风力,而海洋中的植物由于不受重力和风力的影响,不存在木质素。但是,陆地植物合成的木质素沿着河川会源源不断的流入大海,这些木质素和其衍生物在海洋中没有积累,而是被海洋微生物降解成二氧化碳。然而关于在海洋环境中木质素和木质素衍生芳香族化合物是怎样降解的,没有任何研究报道。本课题组利用木质素衍生物、香草酸作为唯一碳源和能源从海洋环境中分离出一些香草酸降解海洋细菌,通过研究它们的代谢途径、相关酶和基因,以此揭示海洋环境中芳香族化合物的降解面貌。

木质素是结构复杂的芳香族化合物,将其降解并转化为高附加价值工业产品可以降低人类对石化资源的高度依赖。真菌分泌的胞外酶虽然可以有效地把高分子木质素低分子化,但是所催化的反应是自由基反应,难以控制反应的方向和速度。有效利用木质素的第一步应该是使用真菌或者化学的方法,首先将高分子木质素降解为细菌可利用的低分子化合物,然后利用像 SYK-6 菌株这样的“多才者”把低分子化合物进行加工修饰成目的产物。细菌的木质素化合物降解酶的种类繁多,包括脱甲基酶、双加氧开环酶,水解酶、水合酶、醛缩酶等。这些酶对底物的专一性强,人为的改造酶的活性及通过敲出和引入外源基因,改造代谢途径,可以加工成任意构造的生物基材料。

参考文献

- [1] Martinez AT, Speranza M, Ruiz-Duenas FJ, Ferreira P, Camarero S, Guillen F, Martinez MJ, Gutierrez A, del Rio JC. Biodegradation of lignocellulosics: microbial, chemical, and enzymatic aspects of the fungal attack of lignin. *International Microbiology*, 2005, 8: 195-204.
- [2] Kawakami H. Isolation and identification of the aquatic bacteria, utilizing biphenyl type lignin models. *Mokuzai Gakkaishi*, 1976, 22: 537-538.
- [3] Crawford RL, Crawford DL, Dizikes GJ. Catabolism of the lignin substructure model compound dehydrodivanillin by a lignin-degrading *Streptomyces*. *Archives of Microbiology*, 1981, 129: 204-209.
- [4] Gonzalez B, Merino A, Almeida M, Vicña R. Comparative growth of natural bacterial isolates on various lignin-related compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52: 1428-1432.
- [5] Samejima M, Saburi Y, Yoshimoto T, Fukuzumi T, Nakazawa T. Catabolic pathway of guaiacyl-glycerol- β -guaiacyl ether by *Pseudomonas* sp. TMY1009. *Mokuzai Gakkaishi*, 1985, 31: 956-31958.
- [6] Vicuna R, Gonzalez B, Mozuch MD, Kirk TK. Metabolism of lignin model compounds of the arylglycerol- β -aryl ether type by *Pseudomonas acidovorans* D₃. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53: 2605-2609.
- [7] Shen XH, Zhou NY, Liu SJ. Degradation and assimilation of aromatic compounds by *Corynebacterium glutamicum*: another potential for applications for this bacterium? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 95 (1): 77-89.
- [8] Katayama Y, Nishikawa S, Nakamura M, Yano K, Yamasaki M, Morohoshi N, Haraguchi T. Cloning and expression of *Pseudomonas paucimobilis* SYK-6 genes involved in the degradation of vanillate and protocatechuate in *P. putida*. *Mokuzai Gakkaishi*, 1987, 33: 77-79.
- [9] Katayama Y, Nishikawa S, Murayama A, Yamasaki M, Morohoshi N, Haraguchi T. The metabolism of biphenyl structures in lignin by the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). *FEBS Letters*, 1988, 233: 129-133.
- [10] Katayama Y, Nishikawa S, Yamasaki M, Morohoshi N, Haraguchi T. Construction of the genomic libraries of lignin model compounds degradable *Pseudomonas paucimobilis* SYK-6 with *Escherichia coli*-*Pseudomonas* shuttle vectors. *Mokuzai Gakkaishi*, 1988, 34: 423-427.
- [11] Masai E, Shinohara S, Hara H, Nishikawa S, Katayama Y, Fukuda M. Genetic and biochemical characterization of a 2-pyrone 4,6-dicarboxylic acid hydrolase involved in the protocatechuate 4,5-cleavage pathway of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181 (1): 55-62.
- [12] Masai E, Katayama Y, Fukuda M. Genetic and biochemical investigations on bacterial catabolic pathways for lignin-derived aromatic compounds. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2007, 71 (1): 1-15.
- [13] Masai E, Kamimura N, Kasai D, Oguchi A, Ankai A, Fukui S, Takahashi M, Yashiro I, Sasaki H, Harada T, Nakamura S, Katano Y, Narita-Yamada S, Nakazawa H, Hara H, Katayama Y, Fukuda M, Yamazaki S, Fujita N. Complete genome sequence of *Sphingobium* sp. strain SYK-6, a degrader of lignin-derived biaryls and

- monoaryls*. *Journal of Bacteriology*, 2012, 194 (2) : 534–535.
- [14] Nagata Y, Ohtsubo Y, Endo R, Ichikawa N, Ankai A, Oguchi A, Fukui S, Fujita N, Tsuda M. Complete genome sequence of the representative γ -hexachlorocyclohexane-degrading bacterium *Sphingobium japonicum* UT26. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (21) : 5852–5853.
- [15] Masai E, Katayama Y, Nishikawa Y, Yamasaki M, Morohoshi N, Haraguchi T. Detection and localization of a new enzyme catalyzing the β -aryl ether cleavage in the soil bacterium (*Pseudomonas paucimobilis* SYK-6). *FEBS Letters*, 1989, 249 (2) : 348–352.
- [16] Masai E, Katayama Y, Kawai S, Nishikawa S, Yamasaki M, Morohoshi N. Cloning and sequencing of the gene for a *Pseudomonas paucimobilis* enzyme that cleaves β -aryl ether. *Journal of Bacteriology*, 1991, 173 (24) : 7950–7955.
- [17] Masai E, Katayama Y, Kubota S, Kawai S, Yamasaki M, Morohoshi N. A bacterial enzyme degrading the model lignin compound β -etherase is a member of the glutathione-S-transferase superfamily. *FEBS Letters*, 1993, 323 (1,2) : 135–140.
- [18] Tanamura K, Abe T, Kamimura N, Kasai D, Hishiyama S, Otsuka Y, Nakamura M, Kajita S, Katayama Y, Fukuda M, Masai E. Characterization of the third glutathione S-transferase gene involved in the enantioselective cleavage of β -aryl ether by *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2011, 75 (1) : 2404–2407.
- [19] Masai E, Ichimura A, Sato Y, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M. Roles of the enantioselective glutathione S-transferases in cleavage of β -aryl ether. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (6) : 1768–1775.
- [20] Hishiyama S, Otsuka Y, Nakamura M, Ohara S, Kajita S, Masai E, Katayama Y. Convenient synthesis of chiral lignin model compounds via optical resolution: four stereoisomers of guaiacylglycerol- β -guaiacyl ether and both enantiomers of 3-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-(2-methoxyphenoxy)propan-1-one (erone). *Tetrahedron Letters*, 2012, 53 (7) : 842–845.
- [21] Meux E, Prosper P, Masai E, Mulliert G, Dumaçray S, Morel M, Didierjean C, Gelhaye E, Favier F. *Sphingobium* sp. SYK-6 LigG involved in lignin degradation is structurally and biochemically related to the glutathione transferase omega class. *FEBS Letters*, 2012, 586 (22) : 3944–3950.
- [22] Sonoki T, Obi T, Kubota S, Higashi M, Masai E, Katayama Y. Coexistence of two different *O* demethylation systems in lignin metabolism by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6: Cloning and sequencing of the lignin biphenyl-specific *O*-demethylase (LigX) gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66 (5) : 2125–2132.
- [23] Sonoki T, Otsuka Y, Ikeda S, Masai E, Kajita S, Katayama Y. Close association between the enzymes involved in the lignin metabolic pathway of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6: interaction of *O*-demethylase (LigX) and ring fission dioxygenase (LigZ). *Journal of Wood Science*, 2002, 48 : 250–252.
- [24] Dehmel U, Engesser KH, Timmis KN, Dwyer DF. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding a novel dioxygenase involved in metabolism of carboxydiphenyl ethers in *Pseudomonas pseudoalcaligenes* POB310. *Archives of Microbiology*, 1995, 163 : 35–41.
- [25] Peng X, Egashira T, Hanashiro K, Masai E, Nishikawa S, Katayama Y, Kimbara K, Fukuda M. Cloning of a *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 gene encoding a novel oxygenase that cleaves lignin-related biphenyl and characterization of the enzyme. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (7) : 2520–2527.
- [26] Peng X, Masai E, Katayama Y, Fukuda M. Characterization of the *meta*-cleavage compound hydrolase gene involved in degradation of the lignin-related biphenyl structure by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65 (6) : 2789–2793.
- [27] Peng X, Masai E, Kitayama H, Harada K, Katayama Y, Fukuda M. Characterization of the 5-carboxyvanillate decarboxylase gene and its role in lignin-related biphenyl catabolism in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (9) : 4407–4415.
- [28] Peng X, Masai E, Kasai D, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M. A second 5-carboxyvanillate decarboxylase gene, *ligW2*, is important for lignin-related biphenyl catabolism in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71 (9) : 5014–5021.
- [29] McLeod MP, Warren RL, Hsiao WW, Araki N, Myhre M, Fernandes C, Miyazawa D, Wong W, Lillquist AL, Wang D, Dosanjh M, Hara H, Petrescu A, Morin RD,

- Yang G, Stott JM, Schein JE, Shin H, Smailus D, Siddiqui AS, Marra MA, Jones SJ, Holt R, Brinkman FS, Miyauchi K, Fukuda M, Davies JE, Mohn WW, Eltis LD. The complete genome of *Rhodococcus* sp. RHA1 provides insights into a catabolic powerhouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, 103 (42): 15582-15587.
- [30] Middelhoven WJ, Gelpke MDS. Partial conversion of cinnamic acid into styrene by growing cultures and cell-free extracts of the yeast *Cryptococcus elinovii*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 1995, 67: 217-219.
- [31] Board PG, Coggan M, Chelvanayagam G, Eastea S, Jermini LS, Schulte GK, Danley DE, Hoth LR, Griffior MC, Kamath AV, Rosner MH, Chrnyk BA, Perregaux DE, Gabel CA, Geoghegan KF, Pandit J. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275: 24798-24806.
- [32] Priefert H, Rabenhorst J, Steinbuchel A. Molecular characterization of genes of *Pseudomonas* sp. strain HR199 involved in bioconversion of vanillin to protocatechuate. *Journal of Bacteriology*, 1997, 179: 2595-2607.
- [33] Masai E, Harada K, Peng X, Kitayama H, Katayama Y, Fukuda M. Cloning and characterization of the ferulic acid catabolic genes of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68 (9): 4416-4424.
- [34] Masai E, Yamamoto Y, Inoue T, Takamura K, Hara H, Kasai D, Katayama Y, Fukuda M. Characterization of *ligV* essential for catabolism of vanillin by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 2007, 71 (10): 2487-2492.
- [35] Kasai D, Kamimura N, Tani K, Umeda S, Abe T, Fukuda M, Masai E. Characterization of FerC, a MarR-type transcriptional regulator, involved in transcriptional regulation of the ferulate catabolic operon in *Sphingobium* sp. strain SYK-6. *FEMS Microbiology Letters*, 2012, 332 (1): 68-75.
- [36] Calisti C, Ficca AG, Barghini P, Ruzzi M. Regulation of ferulic catabolic genes in *Pseudomonas fluorescens* BF13: involvement of a MarR family regulator. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 80: 475-483.
- [37] Eglund PG, Harwood CS. BadR, a new MarR family member, regulates anaerobic benzoate degradation by *Rhodopseudomonas palustris* in concert with AadR, an Fnr family member. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181: 2102-2109.
- [38] Yoshida M, Hiromoto T, Hosokawa K, Yamaguchi H, Fujiwara S. Ligand specificity of MobR, a transcriptional regulator for the 3-hydroxybenzoate hydroxylase gene of *Comamonas testosteroni* KH122-3s. *Biochemical Biophysical and Research Communications*, 2007, 362: 275-280.
- [39] Sonoki T, Otsuka Y, Ikeda S, Masai E, Kajita S, Katayama Y. Tetrahydrofolate dependent vanillate and syringate *O*-demethylation tightly links to one-carbon metabolic pathway associated with amino acid synthesis and DNA methylation in the lignin metabolism of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Wood Science*, 2002, 48: 434-439.
- [40] Sonoki T, Masai E, Sato K, Kajita S, Katayama Y. Methoxyl groups of lignin are essential carbon donors in C1 metabolism of *Sphingobium* sp. SYK-6. *Journal of Basic Microbiology*, 2009, 49 (S1): S98-S102.
- [41] Nishikawa S, Sonoki T, Kasahara T, Obi T, Kubota S, Kawai S, Morohoshi N, Katayama Y. Cloning and sequencing of the *Sphingomonas* (*Pseudomonas*) *paucimobilis* gene essential for the *O* demethylation of vanillate and syringate. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64 (3): 836-842.
- [42] Masai E, Sasaki M, Minakawa Y, Abe T, Sonoki T, Miyauchi K, Fukuda M. A Novel tetrahydrofolate-dependent *O*-demethylase gene is essential for growth of *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 with syringate. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (9): 2757-2765.
- [43] Okamura-Ikeda K, Ohmura Y, Fujiwara K, Motokawa Y. Cloning and nucleotide sequence of the *gcv* operon encoding the *Escherichia coli* glycine-cleavage system. *European Journal of Biochemistry*, 1993, 216: 539-548.
- [44] Binzak BA, Wevers RA, Moolenaar SH, Lee YM, Hwu WL, Poggi-Bach J, Engelke UF, Hoard HM, Vockley JG, and Vockley J. Cloning of dimethylglycine dehydrogenase and a new human inborn error of metabolism, dimethylglycine dehydrogenase deficiency. *The American Journal of Human Genetics*, 2001, 68: 839-847.
- [45] Abe T, Masai E, 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. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (6): 2030-2037.

- [46] Vetting MW, D' Argenio DA, Ornston LN, Ohlendorf DH. Structure of *Acinetobacter* strain ADP1 protocatechuate 3, 4-dioxygenase at 2.2 Å resolution: implications for the mechanism of an intradiol dioxygenase. *Biochemistry*, 2000, 39: 7943-7955.
- [47] Arciero DM, Orville AM, Lipscomb JD. Protocatechuate 4, 5-dioxygenase from *Pseudomonas testosteroni*. *Methods in Enzymology*, 1990, 188: 89-95.
- [48] Kasai D, Fujinami T, Abe T, Mase K, Katayama Y, Fukuda M, Masai E. Uncovering the protocatechuate 2, 3-cleavage pathway genes. *Journal of Bacteriology*, 2009, 191 (21): 6758-6768.
- [49] Harwood CS, Parales RE. The β -ketoacid pathway and the biology of self-identity. *Annual Review of Microbiology*, 1996, 50: 553-590.
- [50] Noda Y, Nishikawa S, Shiozuka K, Kadokura H, Nakajima H, Yoda K, Katayama Y, Morohoshi N, Haraguchi T, Yamasaki M. Molecular cloning of the protocatechuate 4, 5-dioxygenase genes of *Pseudomonas paucimobilis*. *Journal of Bacteriology*, 1990, 172: 2704-2709.
- [51] Sugimoto K, Aoshima H, Senda T, Masai E, Fukuda M, Mitsui Y. Purification and crystallization of a protocatechuate 4, 5-dioxygenase LigAB from *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Protein and Peptide Letters*, 1999, 6 (1): 55-58.
- [52] Sugimoto K, Senda T, Aoshima H, Masai E, Fukuda M, Mitsui Y. Crystal structure of an aromatic ring opening dioxygenase LigAB, a protocatechuate 4, 5-dioxygenase, under aerobic conditions. *Structure*, 1999, 7 (8): 953-965.
- [53] Kasai D, Masai E, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M. Characterization of the gallate dioxygenase gene: three distinct ring cleavage dioxygenases are involved in syringate degradation by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (15): 5067-5074.
- [54] Masai E, Momose K, Hara H, Nishikawa S, Katayama Y, Fukuda M. Genetic and biochemical characterization of 4-carboxy-2-hydroxy-6-oxoheptanoate-3-semialdehyde dehydrogenase and its role in the protocatechuate 4, 5-cleavage pathway in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (23): 6651-6658.
- [55] Maruyama K. Purification and properties of 2-pyrone-4, 6-dicarboxylate hydrolase. *Journal of Biochemistry*, 1983, 93 (2): 557-565.
- [56] Hara H, Masai E, Katayama Y, Fukuda M. The 4-oxalomesaconate hydratase gene, involved in the protocatechuate 4, 5-cleavage pathway, is essential to vanillate and syringate degradation in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Bacteriology*, 2000, 182 (24): 6950-6957.
- [57] Hara H, Masai E, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M. Characterization of the 4-carboxy-4-hydroxy-2-oxoadipate aldolase gene and operon structure of the protocatechuate 4, 5-cleavage pathway genes in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Bacteriology*, 2003, 185 (1): 41-50.
- [58] Richards OC, Rutter WJ. Preparation and properties of yeast aldolase. *Journal of Biological Chemistry*, 1961, 236: 3177-3184.
- [59] Kamimura N, Takamura K, Hara H, Kasai D, Natsume R, Senda T, Katayama Y, Fukuda M, Masai E. Regulatory system of the protocatechuate 4, 5-cleavage pathway genes essential for lignin downstream catabolism. *Journal of Bacteriology*, 2010, 192 (13): 3394-3405.
- [60] Kasai D, Masai E, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M. Characterization of the 3-O-methylgallate dioxygenase gene and evidence of multiple 3-O-methylgallate catabolic pathways in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Bacteriology*, 2004, 186 (15): 4951-4959.
- [61] Kasai D, Masai E, Katayama Y, Fukuda M. Degradation of 3-O-methylgallate in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6 by pathways involving protocatechuate 4, 5-dioxygenase. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 274 (2): 323-328.
- [62] Kasai D, Masai E, Miyauchi K, Katayama Y, Fukuda M. Characterization of the gallate dioxygenase gene: three distinct ring cleavage dioxygenases are involved in syringate degradation by *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Bacteriology*, 2005, 187 (15): 5067-5074.
- [63] Sugimoto K, Yamamoto Y, Antoni S, Senda M, Kasai D, Masai E, Fukuda M, Senda T. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of gallate dioxygenase DesB from *Sphingobium* sp. SYK-6. *Acta Crystallographica*, 2009, 65 (11): 1171-1174.
- [64] Kajita S, Honaga F, Uesugi M, Iimura Y, Masai E, Kawai S, Fukuda M, Morohoshi N, Katayama Y. Generation of transgenic hybrid aspen that express a bacterial gene for feruloyl-CoA hydratase/lyase (FerB), which is involved in lignin degradation in *Sphingomonas paucimobilis* SYK-6. *Journal of Wood Science*, 2004, 50 (3): 275-280.
- [65] 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2006, 71 (5): 608-614.

Otsuka Y, Nakamura M, Sato K, Fukuda M, Shigehara K, Ohara S, Katayama Y, Kajita S. Microbial conversion of glucose to a novel chemical building block, 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid. *Metabolic Engineering*, 2009, 11 (4-5): 213-220.

[66] Nakajima M, Nishino Y, Tamura M, Mase K, Masai E,

Recent advances in *Sphingobium* sp. SYK-6 for lignin aromatic compounds degradation – A review

Xiaoyan Zhang¹, Xue Peng^{1*}, Eiji Masai²

¹Jiangsu Normal University, School of Life Science, Xuzhou 221116, Jiangsu Province, China

²Department of Bioengineering, Nagaoka University of Technology, 9402188, Japan

Abstract: Lignin is complex heteropolymer produced from hydroxycinnamyl alcohols through radical coupling. In nature, white-rot fungi are assumed initially to attack native lignin and release lignin-derived-low-molecular-weight compounds, and soil bacteria play an important role for completely degradation of these compounds. Study on the soil bacteria degrading lignin-derived-low-molecular-weight compounds will give way to understand how aromatic compounds recycle in nature, and to utilize lignin compounds as the renewable materials for valuable materials production. *Sphingobium* sp. SYK-6 that grows on lignin biphenyl (5,5'-dehydrodivanillate) had been isolated from pulp effluent in 1987. We have researched this bacterium more than 25 years, a serious aromatic metabolic pathway has been determined, and related genes have been isolated. As the complete genome sequence of SYK-6 has been opened to the public in 2012, the entire aromatic compounds degradation mechanisms become more clear. Main contents in our review cover: (1) genome information; (2) aryl metabolism; (3) biphenyl metabolism; (4) ferulate metabolism; (5) tetrahydrofolate-dependent O-demethylation system for lignin compound degradation; (6) protocatechuate 4,5-cleavage pathway; (7) multiple pathways for 3-O-methylgallate metabolism.

Keywords: lignin, aromatic compounds, biodegradation

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (31240088), by the Science and Technology Project of Xuzhou (XM12B105) and by the Program of Natural Science Foundation of the Jiangsu Higher Education Institutions of China

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

Received: 8 November 2013 / Revised: 6 March 2014