

# 木质素生物合成及其在农业中的应用

聂会忠<sup>1</sup>, 崔兴凯<sup>2</sup>, 刘长斌<sup>1</sup>, 高志芳<sup>1</sup>, 薛永常<sup>1\*</sup>

(1. 大连轻工业学院 生物学院, 辽宁省发酵工程重点实验室, 辽宁 大连 116034;

2. 河北农业大学 教务处, 河北 保定 071001)

**摘要:** 木质素是维管植物中主要组成成分之一, 由多种芳香族化合物聚合而成, 具有重要的生物学功能。木质素的生物合成分子机理及其基因调控研究引起人们极大关注。为此, 综述了木质素的生物合成及其基因调控中的新进展, 同时介绍了木质素在农业中的应用。

**关键词:** 木质素; 生物合成; 基因工程; 农业

**中图分类号:** Q946.82<sup>+</sup>6.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)04-0014-04

木质素是由3种醇单体或单木质酚(香豆醇、松柏醇、芥子醇)聚合而成的一种复杂的酚类化合物, 是陆生植物中仅次于纤维素的高分子化合物, 主要分布在木质部的导管分子、厚壁组织和韧皮部的纤维里, 一般沉积在细胞次生加厚的壁上, 赋予细胞壁坚硬的结构特征。由于木质素与工农业生产密切相关, 业已引起人们的广泛关注, 尤其是分子生物学在该领域的不断深入和研究手段的快速发展, 近年来对木质素生物合成的研究取得了很大进展, 综述如下。

## 1 木质素生物合成酶研究进展

木质素的生物合成是在一系列酶催化下由苯丙氨酸或酪氨酸逐步转化为木质素单体, 进而聚合成木质素。随着对突变体和转基因植物的深入研究, 对木质素合成酶的生物功能和催化特性有了进一步的认识, 下面仅对进展较大的几种酶进行介绍。

### 1.1 肉桂酸-3-羟基化酶(C3H)的研究进展

长期以来一直认为C3H是一种酚酶, 其生物功能是将香豆酸催化成咖啡酸, 但始终未被纯化出来, 其催化底物也不明确, 直到Schoch等使用功能基因组方法从拟南芥分离出了CYP98A3基因并推断出其编码产物可能是C3H, 随后试验证明了该酶对香豆酰奎宁酸和香豆酰莽草酸表现出很高的催化活性, 说明C3H优先催化香豆酰奎宁酸和香豆酰莽草酸而非香豆酸<sup>[1]</sup>。Franke等通过原位克隆的方法在拟南芥中鉴定了一种*ref8* (reduced epidermal

fluorescence 8)基因, 试验进一步证实其属于CYP98A3基因家族中的成员。底物特异性试验证明, C3H的最适催化底物是甲酰肉桂酯类化合物<sup>[2]</sup>, 说明C<sub>3</sub>位置的取代反应不是发生在羟基肉桂酸水平, 从而进一步证明了上述观点。

随着研究的深入, 对C3H在木质素生物合成中的作用逐步形成较一致的观点, 即香豆酸经4CL催化生成香豆酰CoA, 接着在莽草酸羟基肉桂酰转移酶(CST)、奎宁酸羟基肉桂酰转移酶(CQT)的作用下分别与莽草酸、奎宁酸生成香豆酰莽草酸和香豆酰奎宁酸, 然后在C3H作用下C<sub>3</sub>位置发生羟基化反应分别生成咖啡酰莽草酸、咖啡酰奎宁酸, 最后再由CST, CQT催化生成咖啡酸。最近从马铃薯中纯化出一种兼有CST, CQT双重活性的酶——羟基肉桂酰转移酶(HCT), 其基因已被克隆出来<sup>[3]</sup>。Nawroz等通过对拟南芥CYP98A3基因的一个T-DNA插入突变体的研究发现, 这种突变明显减缓了细胞壁的形成和植物体的发育, 并且体内木质素的含量大大降低, 其茎部木质素的组成也发生了很大变化, 主要由H木质素和痕量的G木质素和S木质素组成<sup>[4]</sup>, 证明C3H可能是H木质素和痕量的G木质素、S木质素之间的主要控制点。

### 1.2 肉桂醇脱氢酶(CAD)及芥子醇脱氢酶(SAD)底物特异性研究

CAD催化木质素单体生物合成的最后一步, 将肉桂醛类物质还原为相应的木质素单体。CAD是

收稿日期: 2006-11-12

基金项目: 辽宁省自然科学基金项目(20062146); 辽宁省教育厅科研项目(2004D091); 辽宁省高校发酵工程重点实验室开放课题(2006009)

作者简介: 聂会忠(1978-), 男, 河北保定人, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学的研究。

通讯作者: 薛永常(1966-), 男, 河北保定人, 教授, 主要从事木质素分子机理及蛋白组学的研究。

E-mail: xueych@dlili.edu.cn

典型的以家族的形式出现,具有物种和组织特异性。但 Li 等从颤杨(*populus tremuloides*)中分离出一种芥子醇脱氢酶(SAD)基因 *PtSAD*,该基因编码的氨基酸序列与颤杨 *PtCAD* 同源性较低。对 *PtSAD* 和 *PtCAD* 进行组织定位和酶动力学试验结果表明,*PtSAD* 在富含 S 木质素的韧皮纤维中显著表达,对芥子醛表现出特异的催化活性<sup>[5]</sup>;而 *PtCAD* 特异性定位于 G 木质素沉积的木质部区域,对松柏醛有很高的底物特异性。此现象是生物体多样性的一种表现,植物体因种类、组织特异性及其发展阶段不同而需要不同结构的木质素,故进化出相应的多酶体系。

最近研究发现,SAD 和 CAD 的编码序列虽有很大的相似性,但其高级结构尤其活性部位存在明显差别。Jack 等通过从颤杨中分离出的 SAD 和 CAD 的同工酶的高级结构进行拓扑学研究,发现 SAD 的第 320 位和 CAD 的同工酶相应位上的氨基酸酶活性部位的结构可能决定了其底物特异性,并且这些酶的动力学参数及其与底物的互补性的分析结果也支持上述观点。同时提出,SAD 是植物抵御外界环境侵害而产生的,是植物进化过程中适应环境的一种反应,可能是和植物的抗逆性尤其是和愈伤有关的酶,当植物体受到侵害时,会诱导 SAD 催化相应的底物合成 S 木质素补偿到整个木质素体系中,从而起到维护植物体生物功能的作用<sup>[6]</sup>。

### 1.3 4-肉桂酰 CoA 连接酶(4CL)底物特异性研究

4CL 具有催化羟基香豆酸为羟基肉桂酰 CoA 的生物活性。4CL 同工酶(4CLs)同样具有不同生化特性和底物特异性,其不同表达可调节木质素单体的相对丰度,从而聚合成不同类型的木质素<sup>[7]</sup>。近年来 4CLs 底物特异性方面的研究取得了很大进展。Katja 等用短杆菌肽 S 的苯丙氨酸作为底物模型和拟南芥的 At4CL2 进行底物特异性试验,发现其中的 12 个氨基酸残基形成的底物结合带(SBP, substrate binding pocket)与底物特异性结合,然后增大 SBP 的空间,发现 At4CL2 产生了对阿魏酸和芥子酸的催化活性;增强其疏水性时则显著增强了对肉桂酸的催化活性<sup>[8]</sup>,大大开拓了研究木质素同工酶及对底物特异性的思路。

## 2 木质素生物合成相关基因的协同调节

木质素生物合成不但受到其自身生长发育的调节,而且还受到外界环境的影响,一些协同蛋白能够接受环境信号的刺激,被激活的蛋白能够影响木质素合成的相关基因的转录,从而协同调节其表达,由

此调控相关酶的水平,从而影响木质素的合成。

木质素生物合成的调控首要是转录水平的调控,在多种木质素合成相关基因的启动子中发现了保守 AC 元件,作为一些植物 R2R3-MYB 转录因子的 DNA 结合区域,可能在木质素生物合成转录水平上起到协同调控的作用,现今研究较多的是 MYB 和 LIM 二因子。Tamagnone 等在金鱼草(*Antirrhinum majus*)中发现了 AmMYB308 和 AmMYB330。在 MYB 超量表达的转基因烟草中发现其叶片呈灰白色,而野生型的衰老的叶片由于积累酚类物质而被氧化呈现黄褐色,说明 MYB 可以抑制酚类物质的积累,进而影响苯丙氨酸途径,起到协同调节木质素生物合成的作用<sup>[9]</sup>。Kawaoka 等在转基因烟草中发现,超量表达 NtLIM1 会导致 PAL,4CL 和 CAD 的增加,反之其水平明显降低<sup>[10]</sup>,有力地支持了上述观点。

## 3 木质素基因工程研究进展

木质素的合成是极其复杂的碳循环次级代谢过程,在多个水平上受到复杂酶系的影响,因此,木质素基因工程研究相当复杂,现今的研究主要集中在苯丙烷途径、特异途径的调控上。

### 3.1 苯丙烷途径的调控及其对植物生长发育的影响

苯丙烷途径主要涉及 3 种酶:苯丙氨酸氨解酶(PAL)、肉桂酸-4-羟基化酶(C4H)和 4-肉桂酰 CoA 连接酶(4CL)。苯丙氨酸通过这 3 种酶生成 4 种羟基肉桂酰 CoA。在烟草中反义抑制 PAL 和 C4H 的表达都会不同程度地降低木质素的含量;但抑制 PAL 的活性,发现 S/G 比值升高,且严重影响植物的正常发育;反义抑制烟草中 C4H 的活性,则 S/G 比值降低,但不会对植物生长造成不良影响。产生这种现象的原因可能是:(1)G 木质素的途径可能跨越 C4H 的催化步骤;(2)C4H 可能是参与 S 木质素的生物合成的特异酶之一,因此,对 S 木质素的生物合成有着较强的调控能力<sup>[11]</sup>。

抑制 4CL 的表达会引起拟南芥、烟草和白杨等植物体内木质素含量的降低,同时引起其细胞壁内羟基肉桂酸含量的增加,但对 S/G 却因植物种类不同而异,在烟草中 S 木质素的含量明显降低,在拟南芥中仅 G 木质素的水平降低,而白杨中的情形却类似于对照,无明显变化。这种现象被认为是由 4CL 同工酶的底物特异性及其生物功能不同引起的<sup>[12,13]</sup>。

### 3.2 特异途径的调控及其对木质素组成的影响

特异途径的调控主要发生在 C3 羟基化及 C3

和 C5 甲基化水平上, 涉及 F5H, COMT 和 CC<sub>o</sub>AOMT 3 种酶。其中, COMT 和 F5H 与 S 木质素的合成密切相关, 尤其 F5H 的羟基化反应是 S 木质素合成的限速步骤。抑制 CC<sub>o</sub>AOMT 的表达主要降低 G 木质素的含量, 致使 S/G 比值升高, 多数不会影响植物的正常生长<sup>[14, 15]</sup>。说明 CC<sub>o</sub>AOMT 在木质素合成调控尤其是降低 G 木质素的调控中起着不可替代的作用。通过对转基因植物中 COMT 活性与 S 木质素含量下降幅度的比较, 发现通常只有 COMT 活性下降到 30% 以下时, S 木质素才有明显变化<sup>[16]</sup>, 表明 COMT 催化的反应可能不是芥子醇生物合成的限速步骤, 在 S 木质素的生物合成途径中可能受前馈或反馈抑制的影响, COMT 只有下降到一定水平时才会降低木质素的含量。

拟南芥 F5H 缺陷型突变体 (fah-1) 中 S 木质素的含量极少, 然而 F5H 超量表达的拟南芥、烟草和白杨中的木质素几乎是由 S 木质素组成的<sup>[17, 18]</sup>, 说明 F5H 在调控 5-羟基化中占首要地位, 对 S 木质素合成起限速作用, 是 S/G 的主要调控点之一。

### 3.3 木质素特异合成途径下游的调控及其对木质素含量的影响

木质素特异合成途径下游的调控主要涉及肉桂酰辅酶 A 还原酶 (CCR) 和 CAD/SAD, 前者作为催化木质素特异合成途径的第一步反应的酶, 被认为是调节碳素流向木质素潜在的控制点, 而越来越多的研究证明后者可能具有底物专一性。CCR 催化羟基肉桂酰 CoA 硫酸酯生成相应的醛, 而 CAD/SAD 调控单体合成的最后一步。抑制 CCR 的表达, 通常表现出木质素的含量降低, 但多数转基因植物呈现生长缓慢, 株型矮化, 导管变形, 木质部颜色变化等。同时, S 木质素和 G 木质素的含量均降低, 且幅度基本相似, 说明 CCR 对于 S 木质素和 G 木质素生物合成是必需的, 非特异地参与 S 木质素或 G 木质素的合成过程<sup>[19]</sup>。但在云杉中 CCR 特异利用阿魏酰 CoA, 而蚕豆、杨树和桉树 CCR 利用 P-肉桂酰 CoA、阿魏酰 CoA、芥子酰 CoA 作为底物, 但对阿魏酰 CoA 亲和力最高, 此现象和上述观点相矛盾。抑制 CAD 的表达, 植株生长正常, 木质素的含量变化不明显, 但发现有其他酚类物质参与了木质素的合成, 木质素组成上的这种改变通常有利于造纸中木质素的分离<sup>[20]</sup>。

## 4 木质素在农业中的应用

木质素是植物中一类重要的高分子化合物, 其含量仅次于纤维素, 约占总量的 20%, 对植物的生

长发育具有重要意义, 同时又是影响牧草消化率的主要因素之一, 通过木质素基因工程来提高饲料消化率的研究也是现今农业技术研究的热点课题之一。现今木质素主要是作为造纸制浆的废弃物, 然而木质素经回收, 可以广泛地应用到农业生产中, 对木质素的资源化研究兼有经济、环境双重意义。

### 4.1 木质素基因工程在提高饲料消化率方面的应用

木质素的存在是影响牧草消化率的主要因素之一。Srinivasa 等通过试验证明, 木质素的含量与牧草消化率存在明显的负相关。在苜蓿中利用反义 RNA 技术抑制 C3H, C4H 和 COMT 的表达可以明显降低木质素的含量, 其消化率大大提高<sup>[21]</sup>; CCR 催化木质素生物合成的氧化还原反应的第一步, 抑制其表达能非特异性地降低木质素单体的含量, 是降低木质素的遗传操作中有效控制点之一。但是 CCR 的水平调控不当, 将会影响植物的正常生长, 因此, 在调控 CCR 时应选用特异性启动子, 既能有效地降低木质素的含量又不至于影响植物的正常生长发育<sup>[22]</sup>。降低木质素含量必将成为很重要手段应用到牧草的品质改良上。

### 4.2 木质素在肥料缓释以及改良土壤方面的应用

木质素是一类含有多种活性基团的异质酚类化合物, 土壤中的微生物可以将其降解, 降解产物是一种天然的有机肥, 而且其降解产物中的腐殖酸可以增强土壤团粒结构, 保持土壤中微量元素的平衡。木质素能够显著降低土壤对磷、钾的吸附固持能力, 提高其利用率; 木质素不但对尿素有一定的增效作用, 而且可以抑制脲酶的活性。木质素具有独特的网络结构, 因此又是一种良好的包埋剂, 可以利用物理化学方法将化肥、农药掺入到木质素中, 这种包埋可以使其逐渐从制剂基体扩散到制剂表面, 起到缓解释放的作用, 从而平衡植物对化肥的吸收、减少流失, 提高其利用率<sup>[23]</sup>。

### 4.3 木质素在液体地膜方面的应用

聚乙烯塑料作为一种主要的地膜材料广泛地应用到设施农业中, 对农业生产起到了巨大的推动作用, 但同时又成为主要的“白色污染”源。将在木质素和少量短纤维中加入交联剂和表面活性剂制成的液体地膜喷洒在土壤表面, 不仅可以起到良好的保温、保墒和防止杂草生长的作用, 而且会在短期内被土壤中的微生物降解成为腐殖质, 不但可以减少“白色污染”, 同时可以起到提高肥力, 改良土壤的作用<sup>[24]</sup>。

## 5 小结

今后我国木质素生物合成机理的研究应注重新

基因的发现和同工酶及其特异性的研究上。另外,木质素协同调控的研究也应尽早开展。实际生产中主要集中在改良木材的材性和木质素综合利用方面,通过调节木质素合成中关键酶基因的表达,改变木质素的含量或单体组成,从而满足工农业生产的需要,同时为解决我国的环境污染问题发挥重要作用。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Schoch G, Goepfert S, Morant M, *et al.* CYP98A3 from *Arabidopsis thaliana* is a 3-hydroxylase of phenolic esters, a missing link in the phenylpropanoid pathway[ J ]. *Biological Chemistry*, 2001, 276: 36566—36574.
- [ 2 ] Franke R, Humphreys J M, Hemm M R, *et al.* The *Arabidopsis* REF8 gene encodes the 3-hydroxylase of phenylpropanoid metabolism[ J ]. *Plant*, 2002, 30: 33—45.
- [ 3 ] Hoffmann L, Maury S, Martz F, *et al.* Purification, cloning and properties of an acyltransferase controlling shikimate and quinate ester intermediates in phenylpropanoid metabolism[ J ]. *Biological Chemistry*, 2002, 278: 95—103.
- [ 4 ] Abdulrazzak N, Pollet B, Ehrling J, *et al.* A coumaroyl-ester-3-hydroxylase insertion mutant reveals the existence of nonredundant meta-hydroxylation pathways and essential roles for phenolic precursors in cell expansion and plant growth[ J ]. *Plant Physiology*, 2006, 140: 30—48.
- [ 5 ] Li L, Cheng X F, Leshkevich J, *et al.* The last step of syringyl monolignol biosynthesis in angiosperms is regulated by a novel gene encoding sinapyl alcohol dehydrogenase[ J ]. *Plant Cell*, 2001, 13: 1567—1586.
- [ 6 ] Erin K, Bomati, Joseph P, *et al.* Structural and kinetic basis for substrate selectivity in populus tremuloides sinapyl alcohol dehydrogenase[ J ]. *Plant Cell*, 2005, 17: 1598—1611.
- [ 7 ] 薛永常, 李金花, 卢孟柱, 等. 木质素单体生物合成途径及其修订[ J ]. *林业科学*, 2003, 39(9): 146—153.
- [ 8 ] Katja S, Klaus H, Kilian W, *et al.* The substrate specificity-determining amino acid code of 4-coumarate: CoA ligase[ J ]. *PNAS*, 2003, 100: 8601—8606.
- [ 9 ] Tamagnone L, Merida A, Parr A, *et al.* The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from *antirrhinum* regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco[ J ]. *Plant Cell*, 1998, 10: 135—154.
- [ 10 ] Kawaoka A, Kaothien P, Yoshida K, *et al.* Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis[ J ]. *Plant Journal*, 2000, 22: 289—301.
- [ 11 ] Boerjan W, Ralph J, Baucher M. Lignin biosynthesis [ J ]. *Plant Biology*, 2003, 54: 519—546.
- [ 12 ] Hu W J, Harding S A, Lung J, *et al.* Repression of lignin biosynthesis promotes cellulose accumulation and growth in transgenic trees[ J ]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17: 808—812.
- [ 13 ] Katja S, Hishiyama S, Tomimura Y, *et al.* Structural characterization of modified lignin in transgenic tobacco plants in which the activity of 4-coumarate: coenzyme A ligase is depressed[ J ]. *Plant Physiology*, 1997, 114: 871—879.
- [ 14 ] Meyermans H, Morreel K, Lapierre C, *et al.* Modification in lignin and accumulation of phenolic glucosides in poplar xylem upon down-regulation of caffeoyl-coenzyme A O-methyltransferase, an enzyme involved in lignin biosynthesis[ J ]. *Biological Chemistry*, 2000, 275: 36899—36909.
- [ 15 ] Pincon G, Maury S, Hoffmann L, *et al.* Repression of O-methyltransferase genes in transgenic tobacco affects lignin synthesis and plant growth[ J ]. *Phytochemistry*, 2001, 57: 1167—1176.
- [ 16 ] Guo D, Chen F, Inoue K, *et al.* Downregulation of caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl CoA 3-O-methyltransferase in transgenic alfalfa: impacts on lignin structure and implications for the biosynthesis of G and S lignin[ J ]. *Plant Cell*, 2001, 13: 73—88.
- [ 17 ] Chapple C C S, Vogt T, Ellis B E, *et al.* An *Arabidopsis* mutant defective in the general phenylpropanoid pathway[ J ]. *Plant Cell*, 1992, 4: 1413—1424.
- [ 18 ] Franke R, McMichael C M, Meyer K S, *et al.* Modified lignin in tobacco and poplar plants over-expressing the *Arabidopsis* gene encoding ferulate 5-hydroxylase[ J ]. *Plant*, 2000, 22: 223—34.
- [ 19 ] 赵华燕, 魏建华, 宋艳茹. 木质素生物合成及其基因工程研究进展[ J ]. *植物生理与分子生物学学报*, 2004, 30(4): 361—370.
- [ 20 ] Gofner D, Jofroy I, Grima-Pettenati J, *et al.* Purification and characterization of isoforms of cinnamyl alcohol dehydrogenase from *Eucalyptus* xylem [ J ]. *Planta*, 1992, 198: 48—53.
- [ 21 ] Srinivasa Reddy M S, Chen F, Shadl G, *et al.* Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa[ J ]. *PANS*, 2005, 102(46): 16573—16578.
- [ 22 ] Douglas C J. Phenylpropanoid metabolism and lignin biosynthesis: from weeds to trees[ J ]. *Trends in Plant Sci*, 1996, (1): 171—178.
- [ 23 ] 陈倩, 穆环珍, 黄衍初. 木质素复合肥的研制及其对肥料氮磷有效性的影响[ J ]. *农业环境科学学报*, 2003, 22(1): 41—43.
- [ 24 ] Saito D. Development of new lignin derivatives as soil-conditioning [ J ]. *Jap Wood Res Soc*, 1997, 43(8): 669—677.