



農業廢棄物生產木質分解酵素之研究

撰文/劉秀美·蔡馥寧

前言

台灣地區每年產出許多木材及農業廢棄物，其中很多富含木質素、纖維素和半纖維素。若能將這些木質纖維素轉化為有用的資材，如作為生質酒精、便宜的糖化原料或是動物飼料添加物，則除了可以有效地解決農業廢棄物，減少農業廢棄物對環境造成的污染外又可將農業廢棄物轉化成為珍貴的有機資材，是經營永續農業的理想目標。不過木質纖維素中的木質素是一種不規則且不溶於水的聚合物，通常以共價鍵的方式與半纖維素結合，包覆在纖維素的外圍形成非常堅固的結構，讓木質纖維素不容易被破壞或是利用 (Kirk, 1985)。

白腐真菌可以分泌木質素分解酵素及纖維素分解酵素，是唯一被證明可分解木材成分的微生物群。白腐真菌所分泌的木質素分解酵素包含三種非專一性酵素：錳過氧化酵素 (manganese peroxidase, MnP)，木質素過氧化酵素 (lignin peroxidase, LiP) 以及漆化酵素 (laccase)。這些酵素除了可分解木質素亦能分解許多複雜的化合物，目前已知 MnP 與 laccase 可以應用在紙漿漂白、紙漿化工程、木材糖化工程以及染料廢水之脫色處理、環境污染物的降解。此外，MnP 與 laccase 也已應用在口香糖添加物，洗衣粉添加物及染髮美白產品及抗菌劑等，用途非常廣泛。至於白腐真菌培養的方式由文獻資料收集可知白腐真菌在固態基質上生長時較接近自然

生長狀態，可以生產較多的胞外酵素。而工業界生產酵素則需要便宜的原料以降低成本，因此本實驗室從事將含有木質纖維素的農業廢棄物以半固態培養的方式來誘導白腐真菌生產大量木質素分解酵素的研究，並測試所生產的木質素分解酵素的工業應用潛力。

農業廢棄物

在農業或林業生產過程中，會伴隨產生許多不適用或不易利用之廢棄物 (或副產品)。各國因作物種類不同和耕作管理方式不同，因而其所產生之農業作物殘體之種類和數量亦異。如美國主要之作物為玉米、小麥、大豆和高粱等，而台灣主要之作物則為水稻、玉米、甘蔗和甘藷等。作物種類不同，其殘體占整個植株之比例亦有所差異，例如每生產 1 公噸之稻穀，將伴隨產生 1 公噸之稻草和 166 公斤之稻殼 (楊等人, 2003)，而生產 1 公噸玉米會產生 175 公斤玉米耳和玉米鬚、1 公噸玉米桿和 410 公斤玉米穗軸。根據聯合國糧農組織 (FAO) 統計，全世界前十大作物殘體產出量的種類依序為玉米桿、小麥桿、稻桿、大麥桿、玉米穗軸、甘蔗渣、大豆桿、稻殼、甘蔗梢和棉花桿。台灣一年產生之作物殘體估計約有二百餘萬公噸 (楊等人, 2003)。

農林作物殘體之成分視其種類和成熟度而有不同，一般作物殘體以纖維素、半纖維素和木質素為主，另外也含有水可溶性物質、醣類、蛋白質等。



如稻草含纖維素 38.70%、半纖維素 18.30%、木質素 15.00%、粗蛋白質 4.10% 和灰分 12.20%；稻殼含纖維素 35.16%、半纖維素 21.05%、木質素 25.41% 和灰分 20.23%；玉米穗軸含碳水化合物 48.9%、粗纖維素 32.5%、粗蛋白質 2.2% 和灰分 3.5%。

木質素

木質素之構造非常複雜，主要由 p- 香醇 (p-coumaryl alcohol)、針葉醇 (coniferyl alcohol) 及白芥子醇 (sinapyl alcohol) 等三種苯基丙烷單元體 (phenyl propane unit)，經脫氫聚合酵素 (dehydrogenation polymerase) 作用後產生不同成分之木質素化合物 (Alén, 2000)。一個木質素分子通常含有一萬個以上苯基丙烷單元體，不過它在自然界中的聚合度不易測量，因為在萃取過程中某些鍵結會被破壞，不同的萃取方法會分離出不同的木質素。在不同植物的木質組織之中，這三種單元體的相對比例也不相同，軟木中的木質素主要是針葉醇聚合物，而硬木中的木質素主要是針葉醇及白芥子醇聚合物 (Fengel and Wegener, 1989)。另外此三個單元體在聚合時，常常受到不同程度的氧化作用而轉變成各種苯基丙烷 (phenyl propane) 衍生物，而這種結構的差異性，對於木質素之生物分解性亦具有相當之影響 (Arora *et al.*, 2002)，這樣的結構使得木質素難以被破壞，但也因此保護植物組織不易被微生物分解 (Anastasi *et al.*, 2009)。

白腐真菌

木材腐朽真菌根據其分解木材基質不同可分為三種：軟腐真菌 (soft rot fungi)、褐腐真菌 (brown rot fungi) 與白腐真菌 (white rot fungi)。其中白腐真菌由於可以分泌纖維素分解酵素及木質素分解酵素使木材變成白色或淡色而得名。至於褐腐真菌只能分泌纖維分解酵素，卻無法利用木質素，因此經其腐朽後之木材仍留存褐色。而軟腐真菌可於潮溼狀態下分泌纖維素和半纖維素分解酵素，破壞木材組織表面並導致木材組織表面的軟化。

白腐真菌是利用初級新陳代謝過程 (primary metabolic process) 機制將纖維素 (cellulose)、半纖維素 (hemicellulose)，以及多醣類分解，而木質素 (lignin) 因非常不易被分解，只有在有氧狀態下以二次代謝 (secondary metabolic process) 方式將大部分的木質素氧化分解 (Keyser *et al.*, 1978)。

近二十年來有不少人研究白腐真菌的木質素分解酵素系統，像是 Hatakka (1994; 2001) 有很詳實的整理報告，特別是集中在代表菌株 *Phanerochaete chrysosporium*。通常白腐真菌分泌一種或多種胞外酵素，這些酵素協同其他代謝過程，影響整體木質素的分解。這些胞外酵素通稱為木質素修飾酵素 (lignin-modifying enzymes)。主要的三種胞外酵素中有兩種是含糖 (glycosylated) 與含血紅素 (heme) 的過氧化酵素 (peroxidase) 其一是木質素過氧化酵素 (lignin peroxidase, LiP; E.C.1.11.1.14)，另一是錳過氧化酵素 (Mn-dependent peroxidase, MnP; E.C.1.11.1.13)(Orth and Tien, 1995)，其他的則是含銅的漆氧化酵素或稱為酚氧化酵素 (laccase; E.C.1.10.3.2)(Evans, 1991; Orth and Tien, 1995; Thurston, 1994)。

過去也已有不少有關白腐真菌的木質素分解酵素的生理機制的研究被發表 (Buswell *et al.*, 1984; Hatakka, 1994; Thurston, 1994; Orth and Tien, 1995)。Bonnarme 和 Jeffries (1990) 將 *P. chrysosporium* 在不同條件下培養，研究調控 LiP 和 MnP 生產之機制。他們發現 LiP 與 MnP 之生產量受 Mn^{2+} 濃度影響，當 Mn^{2+} 濃度低時 LiP 產量較多，反之當 Mn^{2+} 濃度高時 MnP 產量較多。當分別以葡萄子、麥桿與木屑培養 *P. chrysosporium* 時 LiP 最高活性分別為 1620 ± 123 U/L、 364 ± 35 U/L 與 571 ± 42 U/L；可是 MnP 活性很低，尤其是用葡萄子培養時 (Rodríguez Couto *et al.*, 2001)。因此培養基組成尤其是木質素的含量也會影響白腐真菌生產木質素分解酵素的種類與產量。一些白腐真菌例如 *Basidiomycete PMI*、*P. cinnabarinus*、*Pycnoporus*



sanguineus、*Corioloropsis gallica* 及 *Corioloropsis rigida*，只生產 laccase。而當培養液內加入麥桿時許多白腐真菌如 *Nematoloma forwardii*、*Panus tigrinus* 產生的主要木質素酵素則為 MnP。Gill 與 Arora(2003) 在培養 *Coriolus versicolor* 以及 *Irpex flavus* 時，發現於培養液內加入農業廢棄物如麥桿、稻桿及蔗渣，會增加 MnP 的產量，Swamy 和 Ramsay(1999) 也發現在培養 *T. versicolor* 時，加入麥桿，或是山毛櫸木屑片 (beechwood chips) 可以誘導 MnP 的產生。麥桿也可以誘導 *Pleurotus* spp. 產生 MnP(Burlat *et al.*, 1997)。也有報告指出一些農業廢棄物可以誘導 laccase 的產生 (Arora and Gill, 2000 ; Burlat *et al.*, 1997)。

Laccase

Laccase 的許多特性，讓它們容易應用於工業上，例如它的合成或是活性中心不需有輔因子 (cofactor)，只要有氧氣存在就可以作用於許多物質，加上 laccase 大都是胞外酵素，容易純化，在外在環境中的穩定性高等 (Toca-Herrera *et al.*, 2007)。1990 年以後，不論在專利或是應用研究面，laccase 的研究快速增加且深入探討。另外在廢棄物處理、生物工業化學、木材產品、食物與飼料、化妝品工業、紡織品與纖維、電化學能源技能，及其他技術面或非技術面的應用，在 2000 年後也逐年增加很多 (Barrasa *et al.*, 2009; Toca-Herrera *et al.*, 2007)。

Laccase 屬於多銅氧化酶類，能從化學物質（無機及芳香環類化學物）中提取電子並產生自由基，過程中會把氧氣還原，產生水分子。laccase 的氧化還原電位，相對於過氧化酶而言，並不是很高，但在適合的氧化還原媒介下（如 2, 2'-azino-bis(3-ethylthiazoline-6-sulfonate, ABTS)，它的有效氧化電位會大大提升，能氧化非酚基類化學物 (D' Souza-Ticlo *et al.* 2009)。laccase 含有四個銅原子，根據電子順磁共振光譜的特性可將它們分成三類：第一類 (T1) 為順磁性，主要的吸收波長為 610 nm，使酵素

透出藍色；第二類 (T2) 亦為順磁性，在可見光譜中不具有吸收波長；第三類 (T3) 在位置上跟第二類很接近，主要吸收波長為 325 nm。一般認為氧化還原物質的催化作用是被提取的電子先與 laccase 的第一類銅反應，再被傳遞至第二或第三類銅反應中心，最後與氧作用將其還原成水 (Manole *et al.*, 2008)。

白腐真菌的培養方式

至於白腐真菌培養的方式由文獻資料收集可知有液態培養 (liquid culture)(Hatakka, 1994)、半固態培養 (semi-solid state culture)、固態培養 (solid state fermentation)(Burlat *et al.*, 1997 ; Lang *et al.*, 1996 ; Lobos *et al.*, 1994) 等。由於白腐真菌在固態基質上生長時較接近自然生長狀態，可以生產較多的胞外酵素，有時可能會產生一些無法從液體發酵中所獲得的物質 (Jecu, 2000)。而工業界生產酵素則需要便宜的原料以降低成本，因此利用含有木質纖維素的農業廢棄物來誘導白腐真菌生產木質素分解酵素具有很大的潛力。

本研究方法與結果

(一) 菌株之篩選與最適培養條件之選擇

我們從林業試驗所張東柱主任提供的將近 30 株白腐真菌中，找出可分解染劑的六株菌，包括：*Bjerkandera adusta*、*Irpex lacteus*、*Trametes versicolor*、*T. hirsutus*、TFRI 707、*Rigidoporus microporus*，進一步在 30°C 下於含染劑 (congo red) 之培養基 (agar plate) 與含有稻桿之半固態發酵基中培養，發現 TFRI 707 在上述兩種狀態下皆有最高的染劑分解能力與最高的 laccase 生產產量。之後本實驗室針對 TFRI 707 菌株進行最適培養條件之測試。

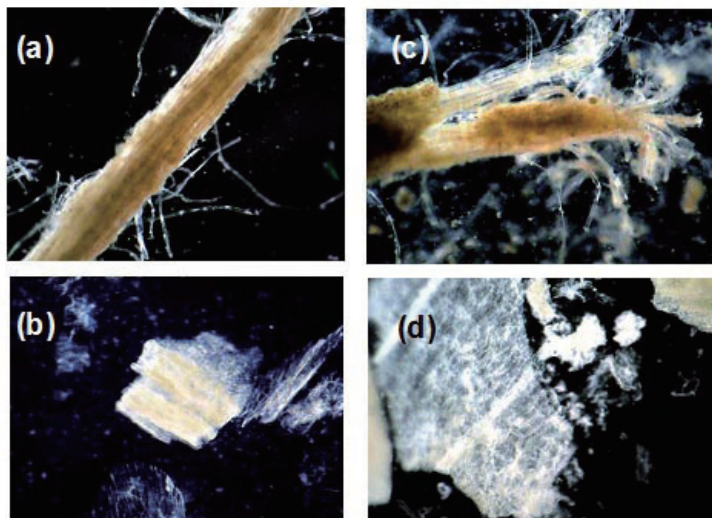
測試不同的氮源 (soytone、yeast extract、peptone、ammonium tartrate、NH₄Cl、KNO₃、NH₄NO₃) 與添加濃度 (0-10 mM)、培養之溫度



(30°C、35°C)、不同培養基質之 pH 值 (pH3、4、5、6、7、8)、與添加不同 $MnSO_4$ 濃度 (0.5-10 mM) 等變因影響。同時，也針對不同種類之誘導物，如 Tween 20 及 80(0.5%)、不同藜蘆醇 (veratryl alcohol) 濃度 (0-4 mM)，不同農業廢棄物 (稻桿、玉米軸屑、高粱渣、構樹樹皮、構樹內木、毛豆莢)，與添加量 (0-7 g/35 ml)，不同的緩衝溶液 (phosphate buffer 與 sodium tartrate buffer) 及其不同濃度 (20-100 mM) 等，尋找生產 laccase 之最適培養條件。研究發現在最佳的 (半固態發酵培養) laccase 生產條件下，第 15-17 天最高產量約可達 3,000 U/mL。比起過去已發表或已專利之菌株或是遺傳工程菌體生產的 laccase 活性高出 4-10,000 倍 (Rodríguez Couto and Toca-Herrera, 2007)，且其溫度穩定性高。另外由解剖顯微鏡可觀察到農業廢棄物經白腐真菌處理後，其中大部分的木質素會被去除 (圖一)，因此經培養過後的農業廢棄物較易被用來生產酒精或是做為動物飼料。

(二) Laccase 之特性

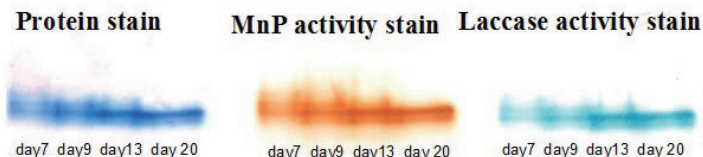
TFRI 707 分泌的胞外液中的 laccase，在 pH3 時有最大的酵素活性，隨著 pH 值越接近中性，酵



圖一 未經TFRI707處理的構樹樹皮(a)與玉米軸心(c)，與經TFRI707處理13天後的構樹樹皮(b)與玉米軸心(d)

素活性越低；此酵素的溫度穩定性高，在 50°C 下水浴 3 小時後，測試酵素活性還保有 78%。由 Native page 膠體電泳後進行酵素活性染色及蛋白質染色，結果發現，蛋白質、MnP 活性染和 laccase 活性染的結果分布 (pattern) 非常相似，主要有二個條帶 (band)；而進一步以 SDS(sodium dodecyl sulfate) 電泳分析發現也形成二個條帶，分子量分別為 67 kDa 及 65 kDa，此意味著胞外液所含的蛋白質主要是 MnP 或 laccase，此二蛋白質也似乎同時具有此二酵素功能，不過因 laccase 活性遠高於 MnP 活性，此二酵素被認定為 laccase (圖二)。將精製的 laccase 進行染劑 (100 ppm congo red) 分解實驗，發現所生產之酵素有很強的能力去除各種染劑 (偶氮、三苯甲烷與蔥醌染劑) (100 ppm) 與污染物 (環境荷爾蒙鄰苯二甲酸 (2-乙基己基) 酯類) (100 ppm) (圖三)。

過去有報告提出當存在有可被 laccase 氧化的介質，漆氧化酵素就能夠催化非酚類受質的氧化反應，laccase - 介質系統具有被應用在其他生物技術方面的潛力。因此我們選擇了多種自然與人工化合物 (如 acetosyringone、ABTS、violuric acid) 作為介質，利用白腐真菌 TFRI 707 生產之漆氧化酵素與不同的染劑 (偶氮、三苯甲烷與蔥醌染劑) (100 ppm) 進行脫色測試。結果發現，laccase 單獨 (43 U/mL) 存在下就可將這些染劑脫色；若添加介質 (0.5 mM)，如 violuric acid 或 syringaldehyde，將只是些微地提高漆氧化酵素對染劑 (例如甲基橙、結晶紫與分散藍 3) 的脫色率。我們亦透過電化學方法，了解染劑、介質和漆氧化酵素在單獨與混合



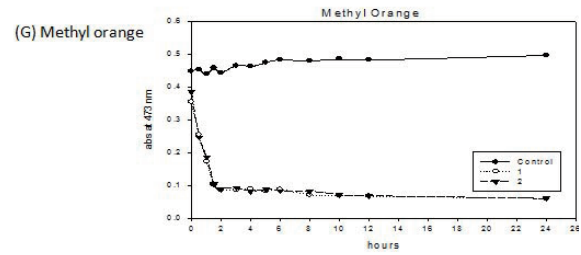
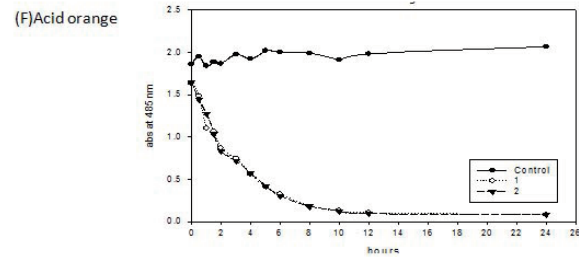
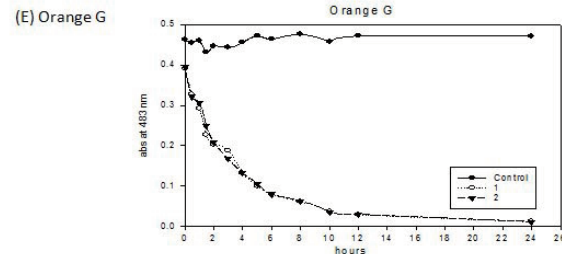
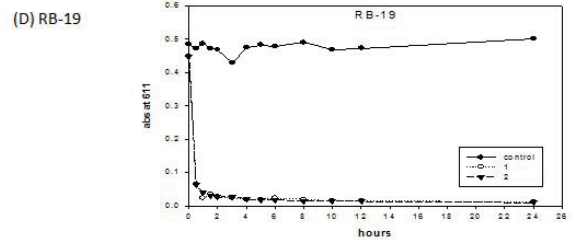
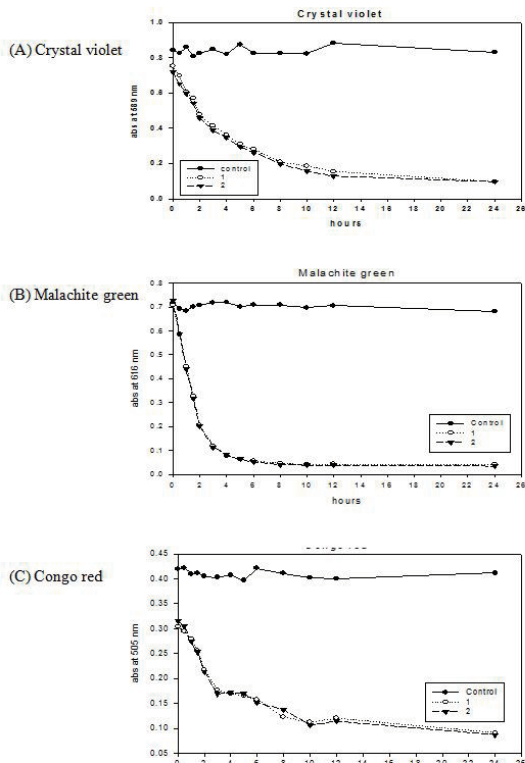
圖二 用構樹樹皮以半固態發酵方式培養TFRI707經 7、9、13、20天後的胞外液進行測試，由Native page 電泳後將膠體(gel)進行酵素 (laccase 與MnP) 活性染色及蛋白質染色



時氧化還原電位的關係。藉由循環伏安法 (cyclic voltammetry, CV) 測試結果，我們推測白腐真菌 TFRI 707 生產的漆氧化酵素的氧化電位超過 1002 mV vs. Ag/AgCl，推測可能是該漆氧化酵素的氧化電位較高，故不需要介質即可與染劑作用。使得白腐真菌 TFRI 707 生產的漆氧化酵素在工業應用具有很高的潛力。

AgBIO

劉秀美 國立台灣海洋大學 海洋生物研究所 教授
蔡韻喲 國立台灣海洋大學 海洋生物研究所



註1：(A)Crystal violet；(B)Malachite green；(C)Congo red；(D)RB-19；(E)Orange G.；(F)Acid Orange 7；(G)Methyl Orange。

註2：於50 mM Tartarate buffer, pH 4.0 下進行脫色。Control為不添加酵素液之對照組，1及2為二重覆之實驗組，每瓶50 mL，七種染劑之處理濃度皆為100 ppm。使用laccase之活性約為1200 U/mL。

圖三 利用含laccase之反應液進行七種染劑褪色結果

參考文獻

- 楊盛行、林正芳、王繼國 (2003) 農廢棄物處理與再利用。國立空中大學，頁501。
- Al n, R. (2000) *Structure and chemical composition of wood*. In: *Glulichsen J and Paulapuro H (eds.)*. Forest Products Chemistry. Jyväskylä, Finland: Fapet Oy.
- Anastasi, A., Vizzini, A., Prigione, V. and Varse, G. C. (2009) *Wood degrading fungi: morphology, metabolism and environmental applications*. In: Chauhan AK and Varma A (eds.) A Textbook of Molecular Biotechnology. I. K. International, New Delhi, pp. 957-993.

參考文獻

4. Arora, D. S., Chander, M. and Gill, P. K. (2002) *Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in the degradation and selective ligninolysis of wheat straw*. Int. Biotechnol. Biodegrad. 50:115-120.
5. Barrasa, J. M., Martín, A. T. and Martínez, M. J. (2009) *Isolation and selection of novel basidiomycetes for decolorization of recalcitrant dyes*. Folia Microbiol. 54:59-66.
6. Bonnamy, P. and Jeffries, W. (1990) *Mn(II) regulation of lignin peroxidase and manganese-dependent peroxidase from lignin-degrading white rot fungi*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 210 - 217.
7. Burlat, V., Ambert, K., Ruel, K. and Joseleau, J. P. (1997) *Relationship between the nature of lignin and the morphology of degradation performed by white-rot fungi*. Plant Physiol. Biochem. 35:645-654.
8. Buswell, J. A., Mollet, B. and Odier, E. (1984) *Ligninolytic enzyme production by Phanerochaete chrysosporium under conditions of nitrogen sufficiency*. FEMS Microbiol. Lett. 25:295-299.
9. D'Souza-Ticlo, D., Sharma, D. and Raghukumar, C. (2009) *A thermostable metal-tolerant laccase with bioremediation potential from marine-derived fungus*. Mar. Biotechnol. 11:725-737.
10. Evans, C. S. (1991) *Enzymes of lignin degradation*. In: Betts WE (ed.) Biodegradation: natural and synthetic compounds. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp.175-184.
11. Gill, P. K. and Arora, D. S. (2003) *Effect of culture conditions on manganese peroxidase production and activity by some white rot fungi*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30:28-33.
12. Fengel, D. and Wegener, G. (1989) *Chemistry, Ultrastructure, Reactions*. New York, Walter de Gruyter.
13. Hatakka, A. (1994) *Lignin-modifying enzymes from selected white rot fungi: production and role in lignin degradation*. FEMS Microbiol. Rev. 13:125-135.
14. Hatakka, A. (2001) *Biodegradation of lignin*, In: Steinbüchel A and Hofrichter M. (eds.) Biopolymers, vol. 1. Lignin, Humic Substances, and Coal. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, pp.129-180.
15. Jecu, L. (2000) *Solid state fermentation of agricultural wastes for endoglucanase production*. Ind. Crop. Prod. 11:1-5.
16. Keyser, P., Kirk, T. K. and Zeikus, J. G. (1978) *Ligninolytic enzyme system of Phanerochaete chrysosporium: synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation*. J. Bacteriol. 135:790-797.
17. Lang, C. H., Cooney, R. and Vary, T. C. (1996) *Central interleukin-1 partially mediates endotoxin-induced changes in glucose metabolism*. Am. J. Physiol. 271: 309-316.
18. Lobos, S., Larram, J., Salas, L., Cullen, D. and Vicuña, R. (1994) *Isozymes of manganese dependent peroxidase and laccase produced by the lignin degrading basidiomycete Ceriporiopsis subvermiformis*. Microbiol. 14:2691-2698.
19. Manole, A., Herea, D., Chiriac, H. and Melnic, V. (2008) *Laccase activity determination*. Analele Științifice Ale Universității "Al. I. Cuza" Iași. 4:17-24.
20. Orth, A. B. and Tien, M. (1995) *Biotechnology of lignin degradation*. In: Kück U (ed.) The Mycota. II. Genetics and Biotechnology. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 287-302.
21. Rodríguez Couto, S., López, E. and Sanromán, Á. (2006) *Utilisation of grape seeds for laccase production in solid-state fermentors*. J. Food Eng. 74:263-267
22. Rodríguez Couto, S. and Toca-Herrera, J. L. (2007) *Laccase production at reactor scale by filamentous fungi*. Biotechnol. Adv. 25:558-569.
23. Swamy, J. and Ramsay, J. A. (1999) *The evaluation of white rot fungi in the decoloration of textile dyes*. Enzyme. Microb. Technol. 24:130-137.
24. Toca-Herrera, J. L., Osma, J. F. and Rodríguez Couto, S. (2007) *Potential of solid-state fermentation for laccase production*. In: Méndez-Vilas A (ed.) Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. Formatex.
25. Thurston, C. F. (1994) *The structure and function of fungal laccase*. Microbiology 140:19-26.

