

六種菇菌纖維素分解酵素與木聚糖分解酵素活性之分析

李澤宏¹、王均琄²

摘 要

能源和糧食不足是人類希望能徹底解決的問題，地球上具有可再生性且蘊藏量龐大的碳源-纖維素可能是極佳的能源來源之一，但是纖維素的分子結構複雜緊密，如何將其分解成小分子糖類，再加以轉換成生質酒精是重要的課題。本研究採取六種具有纖維分解能力的菇菌，白精靈菇(*Agrocybe aegerita*)、秀珍菇(*Pleurotus ostreatus*)、黃金菇(*Pleurotus citrinopileatus* Sing)、玫瑰鮑魚菇(*Russula rosacea*)、靈芝(*Ganoderma lucidum*)和雞腿菇(*Coprinus comatus*)，分別探討其纖維分解酵素以及木聚糖分解酵素活性。結果顯示此六種菇菌中以秀珍菇(*Pleurotus ostreatus*)具有較佳的內切型纖維酵素活性(9701 mIU)、外切型纖維酵素活性(6368 mIU)、纖維雙糖分解酵素(7977 mIU)、木聚糖分解酵素(5871 mIU)，靈芝於培養第十天時具有較佳的漆酶活性(2750 mIU)。

關鍵語：內切型纖維酵素、外切型纖維酵素活性、纖維雙糖分解酵素、木聚糖分解酵素、生質酒精

前 言

近年來由於國際原油價格從2003年每桶20餘元美金，大幅飆漲到最高每桶146元美金，原油蘊藏量只能供給未來40-70年使用，再加上地球環境氣候的變遷，世界各國為了自身能源供應的安全及永續性，以及對維護地球環境清潔的責任，紛紛投入各項資源研究，尋找清潔安全又能永續使用的石油替代能源，因此生質能源的開發應用備受重視⁽³⁾。

生質能源為一種極具開發潛力之再生能源，泛指由生物所產生之有機物質，包括：沼氣、稻殼、有機污泥等農業、畜牧業、工業、都市廢棄物以及能源作物等，經過焚化、氣化、裂解、發酵等技術轉換成燃油、燃氣及電力等可用之能源。由於其兼具能源與環保雙重貢獻，是國際公認最廣泛使用的再生能源，約佔世界所有再生能源應用的三分之二。估計未來台灣地區之應

¹高雄區農業改良場研究助理

²國立屏東科技大學農園生產系教授

用潛力可達33億公升(3.3百萬公秉)油當量,佔再生能源總潛力的45-52%⁽⁴⁾。

生質酒精是將生質物料經由一系列化學及生物方法水解醱酵而獲得的酒精,全世界酒精的總產量約為1590萬公秉,其中60%是經由含醣類的農產品醱酵製成,33%是以澱粉類農產品醱酵所製,僅有7%是人工合成方法製造,因此醱酵製成的產量占酒精總產量的93%以上,根據國際能源協會(IEA)預估,生質酒精將占全球生質燃料使用量的90%以上,主要用途就是作為汽油的替代燃料⁽⁵⁾。

據國際能源協會預估,發展至2020年,生質燃料的年產量將可達1億2000萬公秉,約為現在產量的3倍。生質酒精的開發,長久以來研究材料著重在可提供為食物之資源,像是蔗糖與玉米(澱粉質),因其組成單純且醱化醱酵較為容易,然而以澱粉為生質酒精的原料時,勢必會造成糧食競爭的問題。為了避免糧食成為生產原料,以及降低生產成本的考量,纖維素將是未來生質酒精的主要原料,如此一來不但能夠降低原料的成本,同時也解決了處理廢棄物的環保問題,因此各國無不積極研發纖維轉化酒精的技術⁽²⁾。

纖維素存在於植物細胞壁,它是地球上存量最多的多糖有機質,植物利用光能進行光合作用,將光能與二氧化碳轉換為植物資源,其中細胞壁的組成,以纖維素、半纖維素、木質素為主,比例依序38-50%,23-32%,15-25%,其中纖維素是葡萄糖線性聚合物,因其具有結晶性,又有氫鍵結構存在,使得聚合物分子之間結構緊密,不易打散,因此需要較劇烈的反應條件將其碎裂,這個碎裂的反應就稱為水解或醱化作用,要將纖維素從細胞壁中釋放出來首先需要將材料經過前處理,包括粉碎、真空裂解、高壓蒸煮與酸鹼處理,前處理不僅耗費大量能源,也產生廢液造成環境汙染(酸鹼處理後的中和產物),增加成本。最好的解決方法是利用生物性前處理,將這些聚合分子分解或去除以提高轉化效率⁽³⁾,因此,纖維素一旦碎裂成單體,即是六碳糖的葡萄糖分子,我們就能以熟知的酵母菌或麴菌的醱酵作用將其轉化成酒精。

纖維素分解酵素可分為三類,分別為內切纖維素分解酵素(endocellulase)、外切纖維素分解酵素(exocellulase)以及纖維雙醱分解酵素(cellobiase)等,經由這三類酵素彼此間的協同作用機制(synergy mechanism),可將不溶性的纖維素完全水解⁽⁸⁾。

自然界中存在有許多能分泌纖維素分解酵素的微生物,他們可水解纖維素以當作本身生理所需之碳源,包括有:細菌(bacteria)、真菌(fungi)以及放線菌(actinomycetes)目前的研究結果顯示在所有具分解木質素的能力的微生物中,引起木材白色腐朽的真菌被證明能夠徹底的分解木質素,並能把複雜的木質素高分子直接降解為二氧化碳和水⁽¹⁰⁾,其代表菌種有 *Ceriporiopsis*

subvermispora, *Phanerochaete chrysosporium*及 *Pleurotus ostreatus*等，而褐腐真菌、細菌以及放線菌對木質素的分解較不徹底，一般只能部分的改變木質素的分子結構，造成木質素分子中的酚及非酚結構脫去甲氧基⁽⁷⁾。在木質素分解及修飾酵素中，漆酶、過氧化氫酶以及木質素分解酵素等可針對芳香族化合物進行分解，同時是木質素分解的關鍵酵素⁽¹²⁾。以其中一種主要的酵素-漆酶為例，其為一種包含四個銅的多酚氧化酵素，並且能夠使用氧分子當作電子受體氧化基質，其基質則包括正鏈多酚或是側鏈的多酚化合物⁽¹¹⁾，在生物性製紙工業、染劑漂白的紡織工業、酚類化合物的移除和廢水的去毒化等相關應用上則具有重要性⁽⁹⁾。

纖維素分解酵素在分解纖維素物質時，並非很單純的不受產物抑制其酵素活性，而是過多的產物產生時，反而會造成酵素活性下降，欲提高纖維素分解酵素之活性時，同時也必須考慮到產物之回饋抑制酵素活性之作用。當葡萄糖的蓄積會抑制CMCase、Avicelase 及 β -glucosidase 三個酵素的活性，同樣地，纖維雙糖的蓄積亦會抑制CMCase、Avicelase 及 β -glucosidase 三個酵素的活性，纖維分解酵素的工業生產菌以真菌和放線菌較為適合，主要是因為真菌放線菌能夠在簡單的培養基中生長，且能分泌出大量的酵素，真菌在培養之後其菌絲易離心去除，酵素回收容易較符合經濟效益，來供應大量生產以符合商業化之需求⁽¹⁾。

材料與方法

一、試驗用菌種：

白精靈菇(*Agrocybe aegerita*)、秀珍菇 (*Pleurotus ostreatus*)、黃金菇 (*Pleurotus citrinopileatus*)、玫瑰鮑魚菇 (*Russula rosacea*)、靈芝 (*Ganoderma lucidum*)及雞腿菇(*Coprinus comatus*)。

二、試驗方法：

- (一) 粗酵素液之製備：以 0.8 cm 直徑的打孔器，將培養 9 天的真菌平板培養基打孔，將之菌絲體圓盤塊接種於 100 mL PS 液態培養基中，分別於 0-14 天的培養菌液，每隔兩天取一瓶做實驗，每次取三重覆處理，以 8000 g 離心 10 分鐘，取 0.5 mL 上清液作纖維素分解酵素活性的測定。
- (二) 剛果紅測定纖維素分解酵素之活性：剛果紅對不同鏈長的多糖類呈色上會有所不同，利用此特性，當 CMC 被逐漸分解成較短鏈的醣類時，剛果紅和 CMC 的結合能力隨之變弱，呈現的顏色較淡，可將此特性用於篩菌及初步鑑定菌種的纖維素分解能力。以 0.8 cm 直徑的打孔器，將培養 9 天的真菌平板培養基打孔，將之菌絲體圓盤塊接種於 PSA 平版

培養基，於 28 °C 恆溫培養箱中培養，三天後取 0.1 % 剛果紅溶液約 10 ml，淹沒培養基表面，靜置 30 分鐘後，將培養基上的剛果紅溶液倒掉，以 1 M NaCl 清洗，若菌株具有纖維素分解能力，將可在菌落周圍觀察到透明環。以 1 M NaCl 清洗可以讓透明環更明顯。

- (三) 內切纖維分解酵素(endoglucanase, CMCase)測定：取 0.5 mL 粗酵素液，加入 0.5 mL 的反應溶液(1 % CMC 溶於 0.1 M, pH 7.0 之 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$ 磷酸鹽緩衝溶液)於 50 °C 下水浴反應 1 小時後，以DNS法測定還原糖的含量。
- (四) 外切纖維分解酵素(exoglucanase)測定：取 0.5 mL 粗酵素液，加入 0.5mL的反應溶液，取 1% avicel (microcrystalline cellulose)，溶於 0.1M pH 7.0 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 之磷酸鹽緩衝溶液，以DNS 法測定還原糖的含量。
- (五) β -葡萄糖苷酵素(β -glucosidase)測定：取 0.5mL粗酵素液，加入 0.5mL 的反應溶液，將 1% salcin (2-[hydroxymethyl]phenyl- β -D-glucopyranoside)，溶於 0.1 M pH 7.0, $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-K}_2\text{HPO}_4$ 之磷酸鹽緩衝溶液。以DNS 法測定還原糖的含量。
- (六) 木聚糖分解酵素(xylanase)活性測定：取 0.5 mL 粗酵素液，加入 0.5 mL 的反應溶液，將 1 % xylan，溶於 0.1 M pH 7.0 之磷酸鹽緩衝溶液。以 DNS 法測定還原糖的含量。
- (七) 以上各酵素的活性單位以 U 表示，每分鐘釋放出 1 μmol 還原糖的酵素量， $U = 1 \mu\text{mol}/\text{min}$ 。
- (八) 3,5-二硝基水楊酸(DNS)還原糖測定法：採用 DNS 法測定，乃利用還原糖與 dinitrosalicylic acid 反應，產生可用分光光度計測得其吸收值的產物，藉此獲得還原糖的濃度。若有還原糖存在，顏色會由黃色變紅棕色。
- (九) DNS 試劑(dinitrosalicylic acid 1 % Phenol 0.2 % sodium sulfite 0.05 % sodium hydroxide 1 %)，取 1 ml DNS 試劑與 1 ml 待測樣品混和均勻，之後進行沸水水浴 10 min，冷卻後以分光光度計測量在波長 540 nm 下的吸收值，根據檢量線換算還原糖濃度。
- (十) 漆酶活性(laccase)測定方法：以直徑 0.8 cm 打孔器取出平板培養 7 天的真菌菌絲體，取出圓盤塊菌絲體一塊。培養於內含PS培養基 100 mL 之 250 ml三角瓶，於 28 °C 150 rpm轉速，恆溫液態培養，分別在其培養第 2 天至第 14 天作漆酶活性測定。培養液經過六層紗布過濾後以 10000 rpm，4 °C 冷凍離心 15 分鐘，取上清液即為粗酶萃取液。於 25 °C 下，以ABTS為基質，在 2.96 mL pH值為 3 的 0.1 M K_2HPO_4 檸檬酸鈉

緩衝溶液中，加入 20 μ L ABTS (6 mg/ml)，用分光光度計監測 420 nm 處吸光度隨時間的變化。

結果與討論

六種菇菌菌絲體以 28 $^{\circ}$ C 培養於含甲基纖維素粉末的培養基培養五天後其內切型纖維分解酵素(CMCase)在平板培養基當中分解甲基纖維素並以剛果紅染色，其活性纖維分解酵素活性高者，其呈現澄清環越明顯(圖 1)。

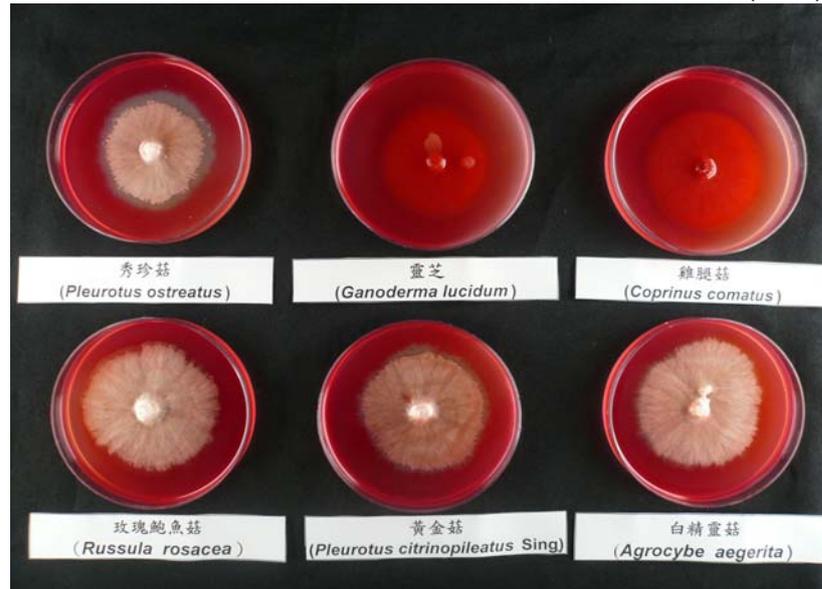


圖 1. 菌絲生長於含甲基纖維素生長培養基以剛果紅染色結果
Fig 1. Mecylium Grown on CMC medium dyed by Congo red.

六種菇菌菌絲體以液態培養 2~14 天時，多數的菌種於培養第 10 天有較高內切型纖維分解酵素(endo- β -1,4-glucanase)的表現，其中秀珍菇的活性(9701 mIU)最高，其次為玫瑰鮑魚菇，酵素活性(7658mIU)。外切型纖維分解酵素(exo- β -1,4-glucanase)以秀珍菇於培養第 12 天表現最高酵素活性(6368 mIU)，其次為白精靈菇酵素活性 5861 mIU)。纖維雙糖分解酵素(β -1,4-glucosidase)，多數菌種於培養第 8 天時達到酵素活性的最大值，其中以秀珍菇酵素活性(7977 mIU)最高，其次為黃金菇酵素活性(6513 mIU)。木聚糖分解酵素(xylanase)以秀珍菇，於培養第 8 天時達到酵素最高活性(5871 mIU)，其次為培養第 12 天的靈芝，酵素活性(4958 mIU)。這六種木材分解真菌當中，以秀珍菇的纖維素分解酵素活性最強，可作為木質素之降解過程與生理機制之研究材料，並可以作為農業廢棄物資源開發與再利用之參考依據。

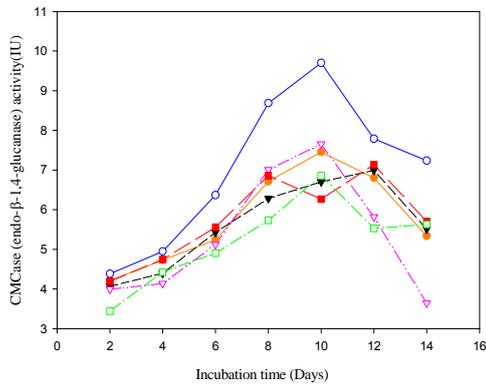


圖 2. 液態培養 2-14 天內切型纖維酵素活性
Fig 2. Endo-β-1,4-glucanase activities (IU/ml) in submerged culture from 2 through 14 days.

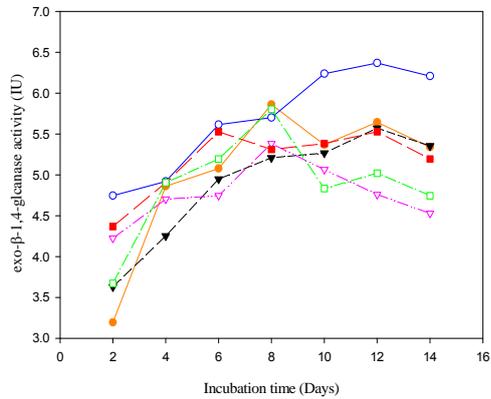


圖 3. 液態培養 2-14 天外切型纖維酵素活性
Fig 3. Exo-β-1,4-glucanase activities (IU/ml) in submerged culture from 2 through 14 days.

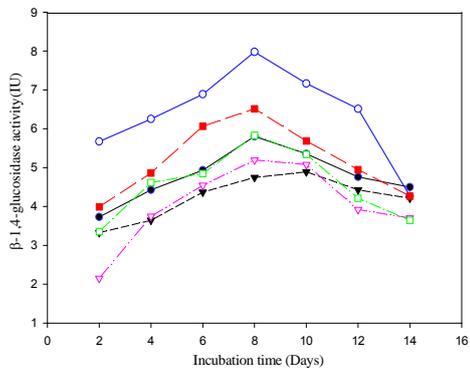


圖 4. 液態培養 2-14 天纖維雙糖酵素活性
Fig 4. β-1,4-glucosidase activities (IU/ml) in submerged culture from 2 through 14 days.

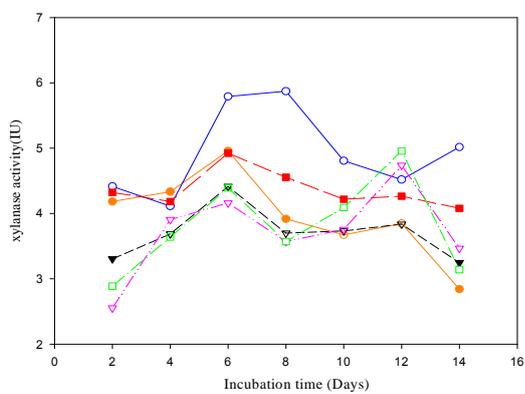
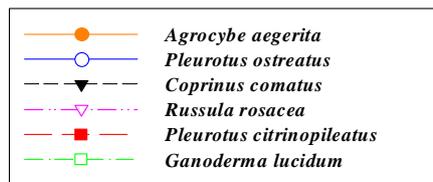


圖 5. 液態培養 2-14 天木聚糖分解酵素活性
Fig 5. Xylanase activities (IU/ml) in submerged culture from 2 through 14 days.



綜合以上試驗結果，六種菇菌當中以秀珍菇 (*Pleurotus ostreatus*) 具有較佳的內切型纖維酵素活性(9,701 mIU)、外切型纖維酵素活性(6,368 mIU)、纖維雙糖分解酵素(7,977 mIU)、木聚糖分解酵素(5,871 mIU)，漆酶則以靈芝於培養第十天時具有較佳的漆酶活性(2,750 mIU)，六種菌菇真菌的酵素的研究，證實了可食用的菇類確實具有能夠分解纖維素的酵素機制與能力，而當前生產纖維酒精最重要的成本問題在於纖維素分解酵素的價格居高不下，台灣每年廢棄的太空包數量約兩億包，若是能善加的利用廢棄的太空包，將其

中的纖維素分解酵素純化並濃縮提高其活性，相信對於生質酒精成本的降低有莫大的助益，也替太空包農業廢棄物開拓另一項商機。

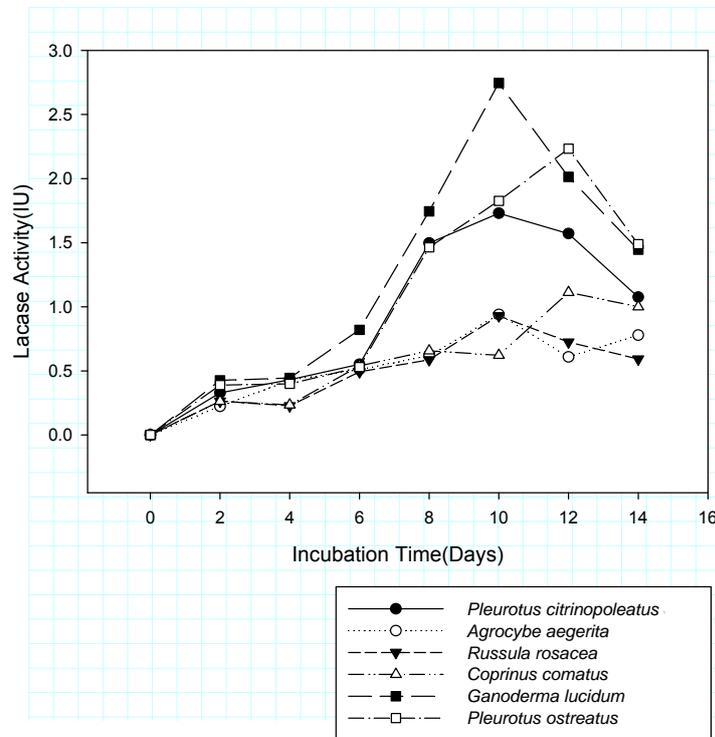


圖 6. 液態培養 2-14 天漆酶分解酵素活性

Fig 6. Lacase activities (IU/ml) in submerged culture from 2 through 14 days.

參考文獻

1. 王三郎、梁瑞麟、蔡育達.1995.氫氧化鈉前處理對酵素糖化農業廢棄物之影響.中國環境工程學.5:309-316.
2. 王茹涵. 2006. 以生技產製生物燃料. 科學發展.407:53-57.
3. 古森本. 2008. 生質能源作物之開發與潛力. 農業生技產業季刊.13:46-52.
4. 林俊義. 2007. 國際推動生質能源作物之展望. 林業研究專訊.14:35-40.
5. 吳耿東、李宏台.2007.全球生質能源應用現況與未來展望. 林業研究專訊.14:5-9.
6. 陳文恆、郭家倫、黃文松、王嘉寶.2007.纖維酒精技術之發展.農業生技產業季刊. 9:62-69.

7. Kirk, T.K., E. Schultz, and W.J. Connors. 1978. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. Arch Microbial, 117:277-285.
8. Lynd, L.R., T.E. Elander, and C.E. Wyman. 2002. Likely features and costs of mature biomass ethanol technology. Application. Biochemistry. Biotechnology.:741-761.
9. Nyanhongo, G., J. Gomes, G. Gubitz, R. Zvauya, J. Read, and W. Steiner. 2002. Production of laccase by a newly isolated strain of *Trametes modesta*. Bioresources. Technology. 84:259-263.
10. Paterson, A., and K. Lundquist. 1985. Radical breakdown of lignin. Nature 361:575-576.
11. Thurston, C.F. 1994. The structure and function of fungal laccase. Microbiology. 140:19-26.
12. Xiao, Y., X. Tu, J. Wang, M. Zhang, Q. Cheng, W. Zeng, and Y. Shi. 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from *basidiomycete Trametes* sp. strain AH28-2. Application. Microbiology. Biotechnology. 60:700-707.