

综 述

木材白腐机理研究进展

董 龙 费 本 华 刘 盛 全

摘要 白腐菌是木材的主要腐朽菌之一。白腐菌菌丝在细胞内形成多种降解酶主要是木素降解酶,次则是纤维素降解酶及半纤维素降解酶,以降解细胞壁物质中的木素、半纤维素及纤维素,作为木腐菌的营养。由于这些木材组成的降解,必然改变木材的化学及物理性质。近年来,在白腐菌的营养需求、降解酶传递途径、对木材主要组成酶降解机理及对材性的影响、产酶的分子遗传学等领域的研究均取得一定进展,可望不久将来能利用生物工程改变白腐菌基因,防止白腐发生。

关键词 白腐菌;腐朽;木素;基因

Review on Research Progress of Wood White-rot Decay

Ding Zuolong

Fei Benhua

Liu Shengquan

(Forest Prod. Inst, Anhui Agriculture University, Hefei 230036) (School of Forest Utilization, Anhui Agriculture University, Hefei 230036)

Abstract White-rot fungi is one kind of main wood decay fungi. It secretes many kinds of enzymes, such as lignin degrading enzymes, cellulose degrading enzymes and hemicellulose degrading enzymes. The enzymes depolymerize wood cell substances including lignin, cellulose and hemicellulose, which are nutrients for the enzymes. Because of the depolymerization, chemical and physical properties of wood could be changed quite a lot by white-rot fungi. In recent years, tremendous progress has been obtained in research field about fungi nutritions, transmitting way of enzymes, mechanism of enzyme degradation, effect on wood properties and molecular genetics of decay fungi. In the near future, it is hoped to restrict white-rot decay through changing fungi gene with gene engineering.

Keywords White-rot fungi; Decay; Lignin; Gene

腐朽是木材最严重的生物破坏,这是因为它能引起木材结构损坏,造成经济上的巨大损失。传统上,有毒金属化合物常被用作木材防腐剂,就效果而言,若使用得当效果是好的。但它们对环境有污染,现在人们正致力于寻找替代防腐剂。因此,研究腐朽的机理尤其是生理、生化机理,发展生物防腐技术,是非常重要的。真菌是木材腐朽的主要生物,相对而言细菌则是很不重要的。白腐菌是这类真菌中的一个重要组成部分,它能分解木素、纤维素及半纤维素,而以分解木素的速度相对较快。近十多年来,白腐的研究在原来基础上有了进一步的进展。

1 营养

碳源 虽然白腐菌最理想的营养需求是不确定

的,但木材中的糖类碳水化合物及补充适量外部物质可以满足其基本需要。在无木材碳水化合物存在时,木素不能发生降解,并且木素自身不能作为白腐菌重要的碳源^[1]。白腐菌能否在木材上生长,主要取决于它们有无利用非结构性糖类碳水化合物而迅速生长蔓延的能力。因此,无论菌丝生长还是对木材的降解,木材腐朽时自身碳水化合物作为碳源是至关重要的。

氮源 氮在木材中是一个主要非结构性营养成分,它在木材腐朽中起重要作用^[2]。氮在木材中含量很低,约0.03%~0.10%,暗示白腐菌具有氮的新陈代谢及再利用的有效机制^[2]。这被认为是菌丝通过细胞的自溶作用及对菌丝自身氮的再利用而实现的,或腐朽期间其它真菌的细胞溶解,加之代谢过程中非常节约地使用氮而实现的。多数白腐菌均可由人工合成的培养基培养,说明多数真菌不一定非得需要有机氮,但就生长效果来说有机氮比氨盐效果更好^[3]。硝

收稿日期:1997-04-08
丁佐龙:安徽农业大学林产工业研究所,讲师;费本华、刘盛全:安徽农业大学森林利用系讲师、副教授,合肥市 230036

酸盐不能作为白腐菌氮源。

维生素 维生素 B₆是多数白腐菌必需的也是唯一的一种维生素^[3],木材中含有这种维生素。

2 白腐降解中的菌丝作用

菌丝是木材腐朽过程中的重要因素,只有在菌丝完全弥漫于木材所有细胞中后,(白)腐朽才真正地开始。菌丝穿入木材的细胞管腔中,分泌降解酶降解细胞壁物质。近年来,人们普遍注意到菌丝在细胞腔内由一层凝胶状层包围并使它们能粘附于木材细胞壁内表面^[4]。Ericksson发现此包围层厚约3~4nm,与半纤维素的天然性质相似。现在此包围层被确认是一多聚糖层,且覆盖了整个木材细胞腔内表面^[5]。可能正是这种多聚糖层扮演了一种酶传递系统角色,将降解酶传递到腐朽发生的位置——细胞壁,从而使细胞壁组成如纤维素及木素等降解。Ericksson等人及 Highley等人^[6]用TEM研究发现远离菌丝的木素能被酶从形态上改变,且木素的层状结构破坏产生粒状物质。另外,电镜观察中常发现夹杂于多聚糖包围层中的丝状物。这些现象都是多聚糖层作用的例证。陈敏忠及王传槐^[7]等人于电镜下观察到云芝菌丝外包围着一层粘液状覆盖物,还观察到很多微小颗粒,这些发现又一次验证了上述的观察及论点。

关于白腐菌对胞间层的降解途径,陈、王引述并从电镜观察支持了 Morohoshin等人的观点,即以下述两种途径:一是通过穿透胞间层的菌丝降解;二是木材细胞腔内菌丝的胞外降解酶扩散到胞间层所致^[7]。另外,Ruel用透射电镜研究云芝白腐,认为由胞腔向胞间层或由胞间层向胞腔的两种途径都是可能的,实际上都是降解酶的作用,不必分成由菌丝降解和胞外酶降解两种途径。至于途径方向问题还有待于进一步研究,才能判断 Ruel等人的观点准确与否。

一般认为菌丝是在其顶端分泌胞外酶^[8],若菌丝仅穿过某部位如胞间层则只能引起这个位置的少量降解(仅为达到穿孔或扩大原纹孔的目的),真正的大范围降解只有在菌丝完成穿透阶段后才开始。因此要判断降解途径究竟是由胞间层向细胞腔方向进行,或反之,可用电镜观察菌丝顶端在木材中的分布位置判断。若它们多位于胞间层内,则可以说降解是由胞间层向细胞腔方向进行;若顶端主要位于胞腔内,则方向正好相反;若顶端在细胞腔、胞间层都均匀分布,则说明两种途径都会发生。

3 纤维素降解

Ericksson曾对白腐菌粉刺侧孢霉(*Phanerochaete chrysosporium*)降解纤维素进行了广泛研究。结果发现,内切 β -葡聚糖酶在暴露的纤维素纤维表面自由作用,剩下未经作用的则被外切 β -葡萄糖苷酶分解形成葡萄糖。也可以理解为,外切葡聚糖酶和一些内切葡聚糖酶共同进行作用,即它们可能以一松散的复合物而进行作用。值得注意的是高浓度单糖一般会抑制葡聚糖降解能力。

氧化性酶也参与了白腐菌对纤维素的降解作用。一种纤维素二糖氧化酶,以 O_2 充当电子受体,使纤维素二糖氧化分解。另外,纤维素二糖—醌氧化分解酶,以醌充当电子受体,也氧化纤维素二糖,而且其氧化产物与氧化性酶降解纤维素二糖的产物一样。此外,一种葡萄糖氧化酶可以氧化葡萄糖。以上几种氧化作用可能共同作用,调控葡萄糖及纤维素二糖的浓度,而且最终控制纤维素水解速度及最终产物的代谢。另一种纤维素白腐降解机理(Ericksson)则认为纤维素降解反应是由氧化过程配合进行的。氧化性酶产生的超氧化阴离子(O_2^-),单分子氧(O_2^1)或具更强氧化性的羟基离子(OH $\cdot$),介入晶体纤维素最初的破坏反应。这些氧化性试剂由于直径很小而能进入纤维素的超微结构中,首先预处理木素,然后使内切葡聚糖酶及外切葡聚糖酶顺利地起降解作用。此外,白腐菌也产生阳离子对纤维素进行降解反应^[9]。这一机理的提出,说明纤维素的降解可首先由一些氧化性离子与纤维素及木素进行反应,继而引起酶对纤维素的大范围降解。这样,由于这些氧化性离子很小,能较顺利地进入到纤维素晶体结构中,减少了纤维素晶体结构紧密状况对降解的阻碍作用。

4 半纤维素降解

半纤维素降解与纤维素降解大致相似,但对其反应机理的细节则研究得较少。

半纤维素大分子链首先被内切酶(葡甘聚糖酶、木聚糖酶)分解而产生过渡性短链,再被糖苷酶水解为单糖。外切酶是否参与对半纤维素的降解,目前尚不清楚。分离半纤维素主链及其支链的酶还未被研究。

白腐菌在腐朽过程中,明显是以纤维素为唯一碳源产生半纤维素降解酶。与纤维素酶一样,白腐菌产生的半纤维素酶受到单糖的抑制,而且产酶理想酸度也是偏酸的。半纤维素理想降解酸度也是偏酸的(pH 4~5)。

5 木素的降解

近年来白腐菌降解木素的研究进展比较大。

木素降解酶是在白腐菌第二代代谢阶段产生的,即某些营养(如氮、碳源)的短缺启动了第二代代谢阶段^[10]。第二代代谢阶段包括木素降解,且与谷氨酸盐(酯)的代谢有关^[11]。白腐菌明显地能应付低氮情形,从而使木素降解能够发生。白腐菌侵入木材后,氮含量变低,接着第二新陈代谢包括木素降解就开始了。

木素降解酶对木素的降解比对纤维素及半纤维素的降解机理简单。木素降解酶包括木素过氧化酶(LiP)、赖锰酶(MnP^{*})及漆酶(Laccase)其中木素过氧化酶是Tien M及Kirk T K等人于1983年首次发现,并引起了广泛的注意,随后多年来对木素过氧化酶的研究日渐深入。木素过氧化酶的降解理想酸度一般略高于pH 4.5,且能引起白腐菌所能引起的大多数木素变化,氧化能力很强。木素(简单)模型物的降解启动反应属于单电子氧化,在木素高聚物中产生较稳定的芳环正离子^[11],充当单电子氧化剂,使得氧化反应能在远离酶的位置发生。

藜芦基醇和过氧化氢对木素过氧化酶降解木素的反应起重要作用。木素酶使藜芦基醇氧化为正离子,而这正电离子则把氧化反应扩散开来。在这里藜芦基醇充当了单电子氧化的中间媒介物^[11]。过氧化氢是伴随着木素酶系的产生而由白腐菌受激发产生的,即碳、氮源的短缺激发葡萄糖氧化酶的形成(也在第二代代谢阶段),而葡萄糖氧化酶是产生过氧化氢的主要因素^[12,13]。由于过氧化氢的形成,木素过氧化酶降解木素的反应才能进行。

低pH值,一般为pH 4.5是木素过氧化酶引起木素模型物单电子氧化很关键的条件^[14]。如何维持低pH值,则主要靠木素降解之前纤维素降解形成的单糖酸。

赖锰酶在H₂O₂存在时能氧化酚型木素及木素模型物,即由Mn(II)及一种螯合物催化木素发生降解^[15]。漆酶则是在O₂而不是H₂O₂存在下催化木素降解。

总之,木素的降解由以上几种酶为主进行氧化反应而降解的,同时还有其它活性氧及芳香醛酸还原酶和醌还原酶等催化的氧化反应和还原反应^[15]。

由于木素在木材超显微结构中,对纤维有包被作用,阻碍了纤维素的降解,而在木材腐朽过程中,木素降解酶类的形成则首先需要纤维素等被水解提供碳源。这种特殊复杂的结构及其与菌体生理的关系,导致木素降解成为木材白腐的一个重要限速因素。

应该注意的是,对木素降解机制研究都是以木素模型物进行的,很难反映木素在天然情况下白腐过程中降解的全貌,也就很难证明其研究结论的准确性。

6 真菌腐朽的分子遗传学

近年来真菌腐朽的分子遗传学领域研究已经有较大进展。美国的Dan Cullen研究小组已成功地分离了木腐菌染色体,并宣称译制木素降解酶密码的基因分布于一个染色体上^[14]。Reddy^[16]的染色质组型研究则发现木素过氧化酶基因至少分布于两个染色体上。另外Dan Cullen小组又宣称LiP及MnP这些过氧化酶是由一族结构相关的基因转译的^[17]。相似地,*Polyporus pinsitus*分泌漆酶也是由一族(5个)基因^[18]进行无性繁殖的。总之,每一类腐朽酶都是由一组相互差别较小基因译码的,今后应做的探索就是确定究竟哪些基因在产生各类酶过程中起主要作用。这样,我们可为防止木素、纤维素等的降解,使用基因工程去抑制这类基因的作用,而达到木材防腐的目的。这个研究方向正是最有希望在不远的将来,为发展木材生物防腐技术提供理论依据。

7 对木材化学及物理性质的影响

白腐菌降解紫丁香基木素较快,但难以降解愈疮木基木素,可能这就是白腐菌难以腐朽针叶树材的原因。阔叶树材则同时含有紫丁香基木素和愈疮木基木素,因而能被白腐菌迅速地降解。这显示木材中木素结构对木材受白腐菌腐朽的速度影响很明显。

白腐菌能成功地将细胞壁物质降解至它们代谢能够利用的程度。整个腐朽过程,白腐菌使细胞壁物质平均聚合度逐渐下降,并导致木材溶解性轻微变化^[4]。最近发现,白腐菌酶类作用于纤维素表面,将一些纤维碎片化,剩下的纤维保持完整。腐朽后纤维素分子大小分布范围较宽广,这与褐腐菌恰恰相反,褐腐使整纤维素分子束切断,产生大小相近的纤维碎片^[15]。

白腐菌比褐腐菌降低木材强度的速度慢,这是因为白腐菌只能逐渐降解纤维素。褐腐菌对纤维素的快速降解会导致发生褐腐的木材硬度下降。然而,白腐菌却也能引起木材硬度下降,这可能是由于纤维素快速降解之外的其它因素引起的^[4]。

8 参考文献

* 注: MnP是英文 Manganese-dependent peroxidase的简称

- 1 Kirk T K and Fenn P. Formation and Action of the Ligninolytic System in Basidiomycetes, In Frankland, Hedger, and Swift (eds), 'Decomposer Basidiomycetes', British Mycological Soc. Symposium 4, Cambridge Univ. Press, 1982, 67~ 90
- 2 Levi M P et al. Role of Nitrogen in Wood Deterioration, VI. Mycelial Fractions and Model Nitrogen Compounds as Substrates for Growth of *Polyporus versicolor* and Other Wood-destroying and Wood-inhabiting Fungi, Phytopathol. 1968, 58(5): 626~ 634
- 3 Jennison M W. Physiology of the Wood-rotting Fungi, Report No. 8 for the Office of Naval Research, Microbiology Branch, Syracuse University, 1952
- 4 Highley T L. Biochemical Aspects of White-rot and Brown-rot Decay, The Inter. Res. Group on Wood Preserv. 1987, Document No. IRG/WP/1319
- 5 Kirk T K. Basic Research on Wood Decay: What Have We Learned in the Past Ten Years? American Wood-preservation Association, 1991, 115~ 118
- 6 Highley T L et al. Micromorphology of Degradation in Western Hemlock and Sweetgum by the White-rot Fungus *Coridus versicolor*, Holzforschung (In press) 1987
- 7 陈敏忠, 王传槐等. 白腐菌云芝腐朽杨木的超微结构研究. 南京林业大学学报, 1996, (1): 48~ 52
- 8 Christine S E. Enzyme Secretion by Wood-rotting Basidiomycetes, Genetics and Cellular Biology of Basidiomycetes III, June 1995 (London)
- 9 Ericksson K E. Microbial Degradation of Cellulose and Lignin, Proc. Internat. Symp. on Wood and Pulping Chemistry [Stockholm] June 1981, 3, 60~ 65
- 10 Jefferies T W et al. Nutritional Regulation of Lignin Degradation by *Phanerochaete chrysosporium*. Appl. and Environ. Microbiol., 1981, 42, 290~ 296
- 11 Harvey, P J et al. Lignin Degradation by Wood Degradation Fungi. The Inter. Res. Group on Wood Preserv. 1986, Document No. IRG/WP/1310
- 12 Ericksson K E et al. Formation and Partial Characterization of Glucose-2-oxidase, a H₂O₂ Producing Enzyme in *Phanerochaete chrysosporium* Appl. Microbial. Biotechnol. 1996, 23, 257~ 262
- 13 Kelly R C and Reddy C A., Identification of Glucose Oxidase Activity as the Primary Source of Hydrogen Peroxide Production in Ligninolytic Cultures of *Phanerochaete chrysosporium*, Arch. of Microb. 1986, 144(3): 248~ 253
- 14 Kirk T K et al. Influence of Culture Parameters on Lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium* Arch. Microbial. 1978, 117, 277~ 285
- 15 卢雪梅等. 木质素生物降解的化学反应机制. 林产化学与工业, June 1996, 75~ 82
- 16 Reddy C A. An Overview of the Recent Advances on the Physiology and Molecular Biology of Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, J. Biotech., 1993, 30, 91~ 107
- 17 Dan Cullum et al. Genomic Organization and Expression of *Phanerochaete chrysosporium* Genes Involved in Lignin Degradation, Genetics and Cellular Biology of Basidiomycetes III, June 1995 (London)
- 18 Deblie S Y et al. The Molecular Cloning and Expression of Laccases from the White-rot Basidiomycete *Polyporus pinsitus*, Genetics and Cellular Biology of Basidiomycetes III, June 1995 (London)