

# 真菌降解木质纤维素酶系的研究进展

王晓娥<sup>1,2</sup>, 姚方杰<sup>1</sup>

(1. 吉林农业大学 食药菌教育部工程中心, 吉林 长春 130118; 2. 吉林工程技术师范学院 食品工程学院, 吉林 长春 130052)

**摘 要:**真菌是降解木质纤维素的重要来源之一,现从真菌木质纤维素降解酶系组成、木质纤维素降解酶基因工程研究以及与降解木质纤维素有关真菌基因组学等方面进行综述,以期对真菌降解木质纤维素的深入研究提供参考。

**关键词:**真菌;木质纤维素;降解酶;基因组

**中图分类号:**Q 949.32 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0176-04

木质纤维素(lignocellulose)包括木质素、纤维素和半纤维素,是地球上数量最丰富的可再生资源<sup>[1]</sup>。利用木质纤维素代替石油等化工原料是缓解资源和环境危机、促进人类社会可持续发展的重要途径<sup>[2]</sup>。木质纤维素的降解不但可以合理利用再生资源,还可以解决造纸厂和化工厂污水中残留的木质纤维素污染物等问题<sup>[3-4]</sup>。

自然界中存在着各类高效的木质纤维素降解系统,其中真菌是降解木质纤维素的重要来源之一,降解木质纤维素的真菌主要为担子菌的白腐菌、褐腐菌和子囊菌。对真菌降解木质纤维素酶系作用机理的深入研究,可加快其对生物质的综合利用,显著提高真菌的降解效率,为全面实现生物质的真正利用提供理论支撑<sup>[5]</sup>。

## 1 木质纤维素降解酶系的组成

木质纤维素是一类难于降解的复杂天然芳香族高分子聚合物,因此真菌木质纤维素降解酶系组分的种类和数量也多种多样,包括降解木质素的木质素氧化酶系(Folymes)和降解纤维素、半纤维素的碳水化合物活性酶系(Cazymes)。

### 1.1 木质素降解酶系的组成及研究

主要的木质素降解酶系包括三大类:即过氧化物酶(Peroxidase)、漆酶(Laccase)和乙二醛氧化酶(Glyoxal oxidase),单一的降解酶既可降解木质素,也可两两联合,或者3种酶一起作用对木质素进行降解。其中过氧化物酶包括木质过氧化物酶 LiP(Lignin peroxidase)、通用过氧化物酶 VP(Versatile peroxidase)和锰过氧化物酶 MnP(Manganese peroxidase)<sup>[6]</sup>。

**第一作者简介:**王晓娥(1979-),女,博士,讲师,研究方向为食用菌分子遗传育种。E-mail:16167875@qq.com。

**基金项目:**现代农业产业技术体系建设专项资金资助项目(CARS-24);吉林工程技术师范学院科研发展基金资助项目(X2014006)。

**收稿日期:**2014-09-15

黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*)是白腐真菌降解木质素的模式种,具有很强的降解木质素的能力。该真菌的木质素降解酶系由次级代谢阶段产生的过氧化物酶和乙二醛氧化酶组成,不含大部分真菌所含有的漆酶。乙二醛氧化酶是一种胞外氧化酶,它催化乙二醛、甲基乙二醛等一些简单醛类的氧化产生H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[7]</sup>。有研究发现,纯化的乙二醛氧化酶只有和过氧化物酶反应耦合时才具有活性,这可能具有非常重要的生理意义<sup>[8]</sup>。黄孢原毛平革菌降解木质素的功能是否为乙二醛氧化酶和过氧化物酶的协同作用,还有待于进一步的研究。

漆酶是一种含铜的多酚氧化酶,是研究最多的降解木质素的酶类,在真菌中含量丰富<sup>[9]</sup>。漆酶在造纸业、农作物废弃物再利用和改善环境污染等方面具有广阔的应用前景,因此真菌漆酶的研究受到越来越多的关注。丁少军等<sup>[10]</sup>研究了不同培养条件对云芝木质素降解酶产量的研究,结果表明,木质过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶的产生与培养条件关系很大。郭伟云<sup>[11]</sup>和姚朝阳<sup>[12]</sup>对云芝产漆酶条件、发酵条件及同工酶性质等进行了详细的研究。不同的培养条件和发酵条件均可直接影响木质纤维素降解酶的生成,因此摸索不同真菌的适宜培养条件和发酵条件格外重要。高芮等<sup>[13]</sup>用不同配方对金顶侧耳生育期间的胞外酶活性变化进行研究,结果表明金顶侧耳木质素、纤维素和半纤维素的降解量受培养料不同配方影响较大,因此在栽培过程中应选择合适的培养料。漆酶不仅具有降解木质素的功能,可能在某些真菌的生理代谢过程中起着重要的作用<sup>[14-16]</sup>。万善霞等<sup>[17]</sup>从多种新鲜食用菌子实体中提取漆酶,发现杏鲍菇(*Pleurotus eryngii*)的漆酶活性最高,可为今后获得高活性木质纤维素降解酶提供理论依据。

### 1.2 纤维素、半纤维素降解酶系的组成及研究

纤维素和半纤维素是天然的高分子碳水化合物,具

有复杂的分子结构,因此需要复杂的酶系对其进行降解。真菌中降解纤维素、半纤维素的主要酶类有纤维素酶、半纤维素酶、 $\beta$ -葡萄糖酶及漆酶等。Cai 等<sup>[18]</sup>分析了草菇菌丝体内半纤维素酶和纤维素酶的活性,初步摸索了草菇降解半纤维素和纤维素的发生机制,为草菇的生物物质降解酶系研究奠定了基础。Kersten 等<sup>[19]</sup>对黄孢原毛平革菌降解木质纤维素的酶系及降解机制进行了研究,最终实现了对 3 种组分的协同降解。碳水化合物结合结构域(carbohydrate binding module,CBM)是存在于纤维素和半纤维素中的一类非催化活性结构域,能够促进催化活性结构域与碳水化合物的结合,提高催化效率。因此 Black 等<sup>[20]</sup>通过发现 CBM 与连接肽结合可增强半纤维素酶降解复杂底物的能力,提出了 CBM 可显著提高对底物的降解率。

## 2 木质纤维素降解酶的基因工程研究

对木质纤维素降解酶的基因工程研究多集中在漆酶基因的结构分析、克隆以及外源表达等方面。不同真菌漆酶基因序列的同源性不高,但铜原子部分结合区域的保守性相对较高<sup>[21]</sup>。目前野生革耳菌、灵芝、平菇、金针菇和血红密孔菌等真菌的漆酶基因均已被克隆并在酵母菌中得到表达,并已显示出一定的降解木质素的功能<sup>[22-26]</sup>。高键<sup>[27]</sup>以高漆酶活性的木耳菌种为基因供体,建立漆酶基因筛选系统克隆漆酶基因,构建诱导型和组成型表达毕赤酵母载体,最终获得了有效表达漆酶基因的工程菌。目前为止,对漆酶基因的结构和克隆分析等研究较为透彻,而对其异源表达等方面的研究还处于摸索阶段,可能与表达系统的局限性和宿主遗传稳定性较低有关。

## 3 木质纤维素降解真菌的基因组学研究

基因组测序技术的迅速发展使得在全基因组水平研究真菌的重要生理过程成为可能。对于由多种酶系共同作用的木质素纤维素降解真菌来说,开展基因组层面的研究就显得更为必要。美国能源部联合基因组研究所(Joint Genome Institute,JGI)将真菌(主要为降解木质纤维素的真菌)的基因组测序研究作为独立于微生物基因组学的重点研究方向之一(<http://www.jgi.doe.gov/>)<sup>[28]</sup>。目前,通过对真菌基因组测序的研究,在真菌降解木质纤维素酶系组分和酶合成调控机制 2 个领域都取得了快速的进展。鉴于真菌的基因组不断测序成功以及对降解木质纤维素酶的重视,建立了 FOLy(Fungi Oxidative Lignin enzymes)数据库和 CAZy(Carbohydrate-Active Enzymes)数据库,通过与数据库中的数据进行对比,应用比较基因组学与现有真菌的序列进行分析与功能注释,为寻找和探索降解木质纤维素的酶系及降解机制提供强有力的工具<sup>[29]</sup>。

### 3.1 真菌的基因组研究概况

2004 年公布了黄孢原毛平革菌的基因组序列,作为降解木质纤维素的真菌模式种,对其降解木质纤维素的酶系进行了较详细的研究。通过基因组序列分析发现,黄孢原毛平革菌降解木质纤维素的酶类主要为过氧化物酶,并在其基因组上定位了 10 个过氧化物酶基因。其基因组中存在大量的反转录转座子,其中有一些似乎影响着降解木质纤维素基因的表达<sup>[30]</sup>。细胞色素 P450 作为降解木质纤维素的主要成分,主要参与降解的第一步反应,首先由其完成芳香基的转化,之后由一系列相关降解酶完成多环芳烃衍生物的降解,黄孢原毛平革菌的全基因组分析获得了 150 多个功能未知的 P450 基因,可能是迄今所知的 P450 基因最丰富的真菌,这一结果随后也得到了 Doddapaneni 等<sup>[31]</sup>的证实。黄孢原毛平革菌基因组的完成使真菌降解木质纤维素的研究进入了崭新的领域。2008 年,美国能源部联合基因研究所等机构首次报道了里氏木霉菌株的全基因组序列,该机构又陆续完成了多株高产突变株的全基因组测序,为进一步研究降解木质纤维素奠定基础<sup>[32-33]</sup>。越来越多的真菌基因组测序工作已经完成或正在进行,为木质纤维素降解机制的研究提供了清晰的遗传背景,科研工作者不必再为寻找降解酶基因序列浪费时间,相关的蛋白质组学、信号转导蛋白注释和转录组学等工作都可以开展起来。参考粗糙脉孢菌的研究,已经开始实施对里氏木霉全基因组范围的基因敲除菌株库构建工作<sup>[34-35]</sup>。

### 3.2 降解酶系的基因组学研究

随着基因组学和蛋白质组学的发展,人们对木质纤维素降解酶系的认识变得系统和明朗。在已知真菌基因组序列的基础上,将基因组的预测蛋白与相应的数据库(FOLy 和 CAZy)进行比对,可对该真菌的木质纤维素降解酶编码基因进行功能注释,通过 KEGG 和 GO 等数据库绘制相应的代谢途径,可为真菌的生物物质降解提供庞大的数据库。例如,贵甫<sup>[36]</sup>通过比较草菇和目前已经发表的 11 种真菌基因组,对它们的 CAZymes 家族及相应的纤维素酶、半纤维素酶和果胶酶子家族进行了深入的研究,为理解草菇 CAZymes 家族和生物物质降解机制奠定了理论基础。裂褶菌(*Schizophyllum commune*)作为模式食用菌之一,也是典型的白腐真菌,对其基因组的测序工作已经完成,在全基因组水平上研究了木质纤维素降解酶家族,深入探讨了裂褶菌降解酶 FOLymes 家族和 CAZymes 家族的组成及可能降解机制<sup>[37-38]</sup>。此外,研究人员还开展了一些代表性真菌降解木质素 FOLymes 的比较研究,探索了各种真菌的生物物质降解特性,并对木质纤维素降解的起源进行了初步的分析。

## 4 结语

综上所述,木质纤维素的降解效率与真菌降解酶基

因的多少、优良酶系组成、降解酶的表达和分泌能力有关。随着真菌全基因组测序的不断完成,结合已有的研究成果,对其酶系的降解途径和降解机理会更加清晰,从而从根本上解决木质纤维素降解难的问题。

### 参考文献

- [1] Rubin E. Genomics of cellulosic biofuels[J]. Nature, 2008, 454(7206): 841-845.
- [2] Ragauskas A, Williams C, Davison B, et al. The path forward for biofuels and biomaterials[J]. Science, 2006, 311(5760): 484-489.
- [3] Lynd L, Weimer P, van Zyl W, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506-577.
- [4] 李燕荣, 周国英, 胡清秀, 等. 食用菌生物降解木质素的研究现状[J]. 中国食用菌, 2009, 28(5): 3-6.
- [5] 田朝光, 马延和. 真菌降解木质纤维素的功能基因组学研究进展[J]. 生物工程学报, 2010, 26(10): 1333-1339.
- [6] 唐菊, 段传人, 黄友莹, 等. 白腐菌木质素降解酶及其在木质素降解过程中的相互作用[J]. 生物技术通报, 2011(10): 32-36.
- [7] Philip J. Glyoxal oxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: its characterization and activation by lignin peroxidase[J]. Proceedings of the National Academy of Science, 1990, 87: 2936-2940.
- [8] Kersten P, Kirk T. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidase in extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production by *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Journal of Bacteriology, 1987, 169: 2195-2202.
- [9] Hakulinen N, Kiiskinen L, Kruus K, et al. Crystal structure of a laccase from *Melanocarpus albomyces* with an intact trinuclear copper site[J]. Nature Structural Biology, 2002, 9: 601-609.
- [10] 丁少军, 王传槐. 不同培养条件对云芝木质素降解产酶影响的研究[J]. 纤维素科学与技术, 1994(2): 38-45.
- [11] 郭伟云. 云芝(*Trametes versicolor*)1126 产漆酶条件及漆酶同工酶性质研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2005.
- [12] 姚朝阳. 云芝产漆酶的发酵条件、分离纯化及特性研究[D]. 新乡: 河南师范大学, 2005.
- [13] 高芮, 姚方杰, 王晓娥, 等. 不同栽培料配方对金顶侧耳营养利用及胞外酶活性影响的研究[C]. 杭州: 第二届全国食用菌中青年专家学术交流会议论文集, 2008: 262-268.
- [14] Bonnamy P, Jeffries T. Mn (II) Regulation of lignin peroxidases and manganese-dependent peroxidases from lignin-degrading white rot fungi[J]. Applied Environmental Microbiology, 1990, 56(1): 210-217.
- [15] McCue P, Shetty K. A model for the involvement of lignin degradation enzymes in phenolic antioxidant mobilization from whole soybean during solid-state bioprocessing by *Lentinus edodes* [J]. Process Biochemistry, 2005, 40: 1143-1150.
- [16] McCue P, Horii A, Shetty K. Mobilization of phenolic antioxidants from defatted soybean powders by *Lentinus edodes* during solid-state bioprocessing is associated with enhanced production of laccase[J]. Innovative Food Science and Emerging Technologies, 2004, 5: 385-392.
- [17] 万善霞, 滑静, 王文平, 等. 杏鲍菇漆酶部分酶学性质的研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(21): 107-109.
- [18] Cai Y, Buswell J, Chang S. Production of cellulases and hemicellulases by the straw mushroom, *Volvariella volvacea* [J]. Mycological Research, 1994, 98(9): 1019-1024.
- [19] Kersten P, Cullen D. Extracellular oxidative systems of the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Fungal Genetics and Biology, 2007, 44(2): 77-87.
- [20] Black G, Rixon J, Clarke J, et al. Evidence that linker sequences and cellulose-binding domains enhance the activity of hemicellulases against complex substrates[J]. Biochemical Journal, 1996, 319: 515-520.
- [21] 司静, 李伟, 崔宝凯, 等. 真菌漆酶性质、分子生物学及其应用研究进展[J]. 生物技术通报, 2011(2): 48-55.
- [22] 张敏, 肖亚中, 余聪, 等. 野生革耳菌漆酶 cDNA 在巴斯德毕赤酵母中的表达[J]. 中国科学技术大学学报, 2004, 34(6): 757-762.
- [23] 张银波, 江木兰, 胡小加, 等. 灵芝(*Ganoderma lucidum*)漆酶基因的克隆及其序列分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2005, 21(5): 700-704.
- [24] 张银波, 江木兰, 胡小加, 等. 平菇漆酶基因在毕赤酵母中的分泌表达及酶学性质研究[J]. 微生物学报, 2005, 45(4): 625-629.
- [25] 张银波, 姜琼, 江木兰, 等. 金针菇漆酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达研究[J]. 微生物学报, 2004, 44(6): 775-779.
- [26] 赵敏, 宋小双, 杨谦, 等. 血红密孔菌(*Pycnoporus sanguineus*)漆酶基因的克隆与序列分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2004, 20(6): 815-820.
- [27] 高键. 黑木耳漆酶基因克隆及其在毕赤酵母中的表达[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- [28] 刘国栋. 木质纤维素降解真菌斜卧青霉的比较基因组学与功能基因组学研究[D]. 济南: 山东大学, 2012.
- [29] Anthony L, Francois P, Pedro M, et al. FOLy: An integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds [J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45: 638-645.
- [30] Diego M, Luis F, Nik P, et al. Genome sequence of the lignocellulose degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* strain RP78[J]. Nature Biotechnology, 2004, 22(6): 695-700.
- [31] Doddapaneni H, Chakraborty R, Yadav J. Genome-wide structural and evolutionary analysis of the P450 monooxygenase genes (P450ome) in the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: Evidence for gene duplications and extensive gene clustering[J]. BMC Genomics, 2005, 6: 92.
- [32] Martinez D, Berka R, Henrissat B, et al. Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*) [J]. Nature Biotechnology, 2008, 26(5): 553-560.
- [33] Le C, Schackwitz W, Pennacchio L, et al. Tracking the roots of cellulase hyperproduction by the fungus *Trichoderma reesei* using massively parallel DNA sequencing[J]. Proceedings of the National Academy of Science, 2009, 106(38): 16151-16156.
- [34] Park Q, Colot H, Colopy P, et al. High-throughput production of gene replacement mutants in *Neurospora crassa* [J]. Methods in Molecular Biology, 2011, 722: 179-189.
- [35] Schuster A, Bruno K, Collett J, et al. A versatile toolkit for high throughput functional genomics with *Trichoderma reesei* [J]. Biotechnology for Biofuels, 2012, 5(1): 1.
- [36] 贵甫. 草菇数字基因表达谱揭示同核体与异核体 CAZymes 差异表达[D]. 福州: 福建农林大学, 2012.
- [37] Levasseur A, Piumi F, Coutinho P, et al. FOLy: an integrated database for the classification and functional annotation of fungal oxidoreductases potentially involved in the degradation of lignin and related aromatic compounds [J]. Fungal Genetics and Biology, 2008, 45(5): 638-645.
- [38] Dimitrios F, Manfred B, Robert R, et al. The paleozoic origin of enzymatic lignin decomposition reconstructed from 31 fungal genomes[J]. Science, 2012, 336(29): 1715-1719.



# 真菌感染性果树流胶病研究进展

李树江, 孙爱群, 杨友联

(六盘水师范学院 生命科学系, 贵州 水城 553004)

**摘要:**流胶病是蔷薇科、芸香科等果树普遍发生的严重病害之一。流胶病影响到植物的输导组织,使树势逐渐衰落,直接影响果树的产量。流胶病分非感染性流胶与真菌感染性流胶。该研究对真菌感染性流胶病的病原菌种类及其防治进行了分析总结,旨在为流胶病的病原菌识别及其防治工作提供参考。

**关键词:**流胶病;果树;葡萄座腔菌科;疫霉属

**中图分类号:**S 436.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)03-0179-05

流胶病是果树常见病害之一,主要发生在蔷薇科桃、樱桃、杏、李、苹果以及芸香科柑橘、柠檬、甜橙等果树的主干、主枝或果上,其中以主干发病最为突出。3年以上植株感染率为30%,高者可超过90%,如桃树、李树<sup>[1-2]</sup>,特别严重的感染率可达100%<sup>[3]</sup>。流胶病影响到植物的输导组织,造成流胶、枯枝,使树势逐渐衰落,甚至死亡,严重的可摧毁整个果园,直接影响到果树的稳产、高产<sup>[4]</sup>。

导致果树流胶病的原因,国内外过去主要认为是一种非传染性病害,由机械损伤、昆虫叮咬、冰雹袭击以及生理状态等引起。近年来,国内外对桃树、李树、杏树等

果树流胶病病原菌的分离和基于科赫原则的致病性测试表明,果树既有非感染性流胶,又有真菌感染而引起的流胶<sup>[2,4-5]</sup>,而机械损伤对病原菌的侵入提供了更为有利的条件。非创伤接种的致病性测试表明,在无创伤处接种分离的病原菌同样可引起流胶症状,与创伤接种相比,出现明显症状所需时间要长一些,首先是病原菌侵入韧皮部,然后感染至木质部,除引起流胶症状外,常伴随着溃疡病,严重时引起木质部坏死,导致整株树木死亡,甚至摧毁整个果园。

## 1 流胶病病原菌分离及鉴定

### 1.1 病原菌分离及其科赫法则验证

自20世纪90年代以来,我国江苏、浙江、广州、重庆、山东、湖北等地区先后开展了桃树流胶病的发生、流行及病原菌等方面的研究<sup>[2,4,6]</sup>。从病原菌分离方法来看,主要采用组织分离法<sup>[6-8]</sup>进行分离。

采用组织分离法常可从同一染病组织块分离出一种以上真菌。原因有下列几种:一是由于多种真菌复合感染引起植物病变;二是植物被某一病原真菌感染后,引起植物局部坏死,从而为腐生性真菌生长繁殖创造条

**第一作者简介:**李树江(1983-),男,贵州水城人,本科,助理实验员,现主要从事真菌学等研究工作。E-mail:596918894@qq.com.

**责任作者:**杨友联(1975-),男,博士,副教授,现主要从事真菌学研究和微生物学教学等工作。E-mail:yangyoulianl@163.com.

**基金项目:**贵州省教育厅青年英才资助项目(黔教专字[2012]147);贵州省科技厅自然科学基金资助项目(黔科合J字[2012]2304);六盘水市科技人才与创新团队建设计划资助项目(52020-2012-04-01-01)。

**收稿日期:**2014-09-11

## Research Progress on Lignocellulose Degradation Enzyme System of Fungi

WANG Xiao-e<sup>1,2</sup>, YAO Fang-jie<sup>1</sup>

(1. Engineering Research Center of the Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. College of Food Engineering, Jilin Teacher's Institute of Engineering and Technology, Changchun, Jilin 130052)

**Abstract:** Macrofungi is the main source of degrading lignocellulose in nature. Degradation enzyme system component, genetic engineering and genomics of lignocellulose degradation enzymes were summarized in this paper, to providing reference to degrading lignocellulose for macrofungi.

**Keywords:** fungi; lignocellulose; degradation enzyme; genome