

木質素與牧草品質之關係

The relationships among lignin and forage quality

施意敏⁽¹⁾ 盧虎生⁽²⁾ 朱鈞⁽²⁾

Shy Yih-Min⁽¹⁾ Lur Huu-Sheng⁽²⁾ Chu Chun⁽²⁾

關鍵詞：木質素；細胞壁；牧草

Key words：lignin；cell wall；forage

前 言

牧草生產的主要目的為飼養家畜，必需考慮動物消化利用的情形，因此探討牧草成分對消化率的影響，在牧草研究工作上相當重要的一環。由於反芻動物的瘤胃微生物能有效分解植物細胞壁，因此反芻動物生長所需的能量來源，主要依賴禾本科牧草提供的纖維，其中含木質素的植物組織幾乎無法被瘤胃微生物分解^(1,2)。一旦以化學藥劑處理破壞木質素^(9,19,25)，或育成木質素含量較低的突變種^(14,24)，皆可明顯促進纖維消化率及牛隻採食量。最近的研究，紛紛討論牧草木質素的合成酵素及構成木質素的酚類化合物對消化率的影響^(4,15,25)。主要基於組成木質素的分子不同，及分子間共價結合情形相異，很難以木質素總含量上的差異，解釋不同物種間、植物組織^(15,23)或環境因子⁽¹⁸⁾對牧草品質的影響。

因此，本文主要探討木質素合成與牧草品質之關係，包括組成木質素的各個酚類化合物如香豆酸(*p-coumaric acid*)、阿魏酸(*ferulic acid*)濃度上的差異，各酚類化合物在植物組織內的分佈，及木質素合成途徑各酵素活性的變化與木質素合成之關係，期提供牧草栽培及品種品質改良之參考。

⁽¹⁾ 台灣省畜產試驗所新竹分所助理研究員

⁽²⁾ 國立台灣大學農藝學系教授

(一) 細胞壁的形成與結構

細胞壁的形成過程包含幾個階段，依序為中膠層(middle lamella)的形成、初生細胞壁(primary wall)及次生細胞壁(secondary wall)的堆積。於細胞分裂的後期(anaphase)，分裂子細胞的染色體向二極移動，於細胞中央的位置開始有物質的堆積，形成細胞板(cell plate)。當細胞分裂結束，向二側延伸的細胞板已與原先細胞壁聯結。爾後，二端的子細胞藉由泡囊(vesicle)移動，開始向細胞板釋放一些物質，進行初生細胞壁的堆積，原先細胞板的位置變成二側初生細胞壁的中間層，稱之為中膠層。初生細胞壁依一定的速率隨細胞生長而加厚，厚度僅約 0.1 ~ 1.0 μm ，當細胞表面積不再增加，初生細胞壁亦停止合成。

當細胞的生長接近停止時，次生細胞壁已開始往初生細胞壁堆積。次生細胞壁的厚度，依細胞分化的型態而定，大部分的薄壁組織(parenchyma)其次生細胞壁仍相當薄；另一方面，一些厚壁組織(sclerenchyma)或特殊細胞如韌皮部纖維束(phloem fibre)、導管(vessel)及管胞(tracheid)，即使在原生質體死亡及細胞溶解(lysis)後，次生細胞壁仍可不斷的加厚，最後將整個細胞間隙填滿。次生細胞壁具木質化的能力，是與初生細胞壁最大的不同⁽⁶⁾。

細胞壁的成分主要由多醣類(polysaccharide)構成，依結構不同，可分為長條結晶狀的微纖維(microfibril)及無特定形態的基質(matrix)。在電子顯微鏡下，微纖維呈長條狀並無分支，且以互相平行的方式排列，而微纖維的核心部分是由葡萄糖(glucose)以結晶方格(crystal lattice)形式構成，其主要成分為纖維素(cellulose)。微纖維包埋在基質裡，如同建築時，成束排列之鋼條包埋在混泥土裡。基質的成分相當複雜，依物種、植物組織及細胞形態而異，主要由半纖維素(hemicellulose)、果膠(pectin)、木質素(lignin)及少數蛋白質構成。木質素以網

狀連結的方式，滲入基質之中，類似於在混泥土中加入層層的鋼網，使細胞壁的結構更堅固，同時保護微纖維免於被微生物分解或化學物質的傷害。水分子也是基質中重要成分，但水分子並不能滲入至微纖維，當基質的水分減少，逐漸由木質素取代水分子所佔的空間，稱之為細胞壁木質化⁽⁵⁾。

(二)木質素的合成途徑

木質素主要由苯丙烯酸(cinnamic acid)衍生的酚類化合物聚合而成，其合成途徑如圖 1 所示。L-phenylalanine(苯丙氨酸)藉由苯丙氨酸解氨 每(phenylalanine ammonia lyase ; PAL)的作用，將苯丙氨酸的氨基解離產生苯丙烯酸。苯丙烯酸經苯丙氨酸 羟化 每(cinnamic acid 4-hydroxylase)的作用，產生對位- 羟基苯丙烯酸(*p*-coumaric acid)俗稱香豆酸。另一方面，酪氨酸(L-tyrosine)經酪氨酸解氨 每(tyrosine-ammonia lyase ; TAL)的作用亦可生成對位- 羟基苯丙烯酸。對位- 羟基苯丙烯酸經輔 每 A 連接 每(4-coumarate:CoA ligase ;4CL)的作用，其乙醯基可與輔 每 A 相結合，然後還原為醛(-CHO)，最後經苯丙醇脫氫 每 (cinnamyl alcohol dehydrogenase; CAD)的作用，產生對位- 羟基苯丙醇(*p*-coumaryl alcohol)。

對位- 羟基苯丙烯酸除可形成對位- 羟基苯丙醇之外，對位- 羟基苯丙酸的苯環上尚可加入氫氧基形成咖啡酸(caffeic acid)，然後將加入的氫氧基甲基化形成 4- 羟基-3-甲氧基苯丙烯酸(ferulic acid)俗稱阿魏酸，阿魏酸經輔 每 A 連接 每及 CAD 等酵素作用形成 4- 羟基-3-甲氧基苯丙醇(coniferyl alcohol)。另一方面，4- 羟基-3-甲氧基苯丙酸的苯環上亦可再加入氫氧基，然後甲基化形成 4- 羟基-3,5 - 二甲氧基苯丙烯酸(sinapic acid)又名介子酸，再經相同的酵素反應可形成 4- 羟基-3,5-二甲氧基苯丙醇(sinapyl alcohol)⁽⁶⁾。

苯丙烯酸除可轉換成對位- 羟基苯丙醇、4- 羟基-3-甲

氧基苯丙烯醇及 4- 羟基-3,5-二甲氧基苯丙烯醇等三種醇類進行木質素的合成，苯丙烯酸尚可進入苯丙酸類(phenylpropanoid)的代謝途徑，生產二次代謝產物如類黃酮(flavonoid)、苯基苯乙烯酮(chalcone)、花青素(anthocyanin)、植物抗毒素(phytoalexin)、苯醌(quinone)與單寧(tannin)等⁽¹²⁾。

苯丙烯酸的苯環上一旦含 羟基及甲氧基等取帶基並形成醇類，即可經過氧化 每(oxidase)的作用，形成帶電子的自由基，使各個分子互相聯結形成木質素，其連結方式並無規則性，只要原先由水分子佔據的空間皆可能被取代，形成沒有彈性且疏水性強的大型聚合物⁽¹⁶⁾。

木質素依共價鍵(covalent linkage)結合的程度，可分為核心木質素(core lignin)及非核心木質素(non-core lignin)。核心木質素通常由酚類化合物以二個以上的共價鍵互相結合，少數的對位- 羟基苯丙烯酸可與半纖維素以酯鍵(ester-linkage)鍵結，但大多數對位- 羟基苯丙烯酸以酯鍵鍵結的方式與核心木質素相連結⁽¹⁷⁾，形成相當緊密且不易酸解的大分子。一般以酸洗液分解，再加 72 % 濃硫酸水解後的酸洗木質素(acid detergent lignin, ADL)，可視為核心木質素⁽¹⁶⁾。

非核心木質素則為單體(monomer)結構，通常以單一共價鍵的方式與半纖維素或核心木質素結合。如 4- 羟基-3-甲氧基苯丙烯酸除可形成醇類進行木質素合成，尚可與半纖維素結合或與果膠分子中的阿拉伯糖(arabinose) 或半乳糖(galactose) 結合，形成果膠分子間結合的橋，二個 4- 羟基-3-甲氧基苯丙烯酸經過氧化 每作用，脫去二分子水，形成雙阿魏鹽(diferulate)，同時使二果膠分子相結合⁽⁵⁾。

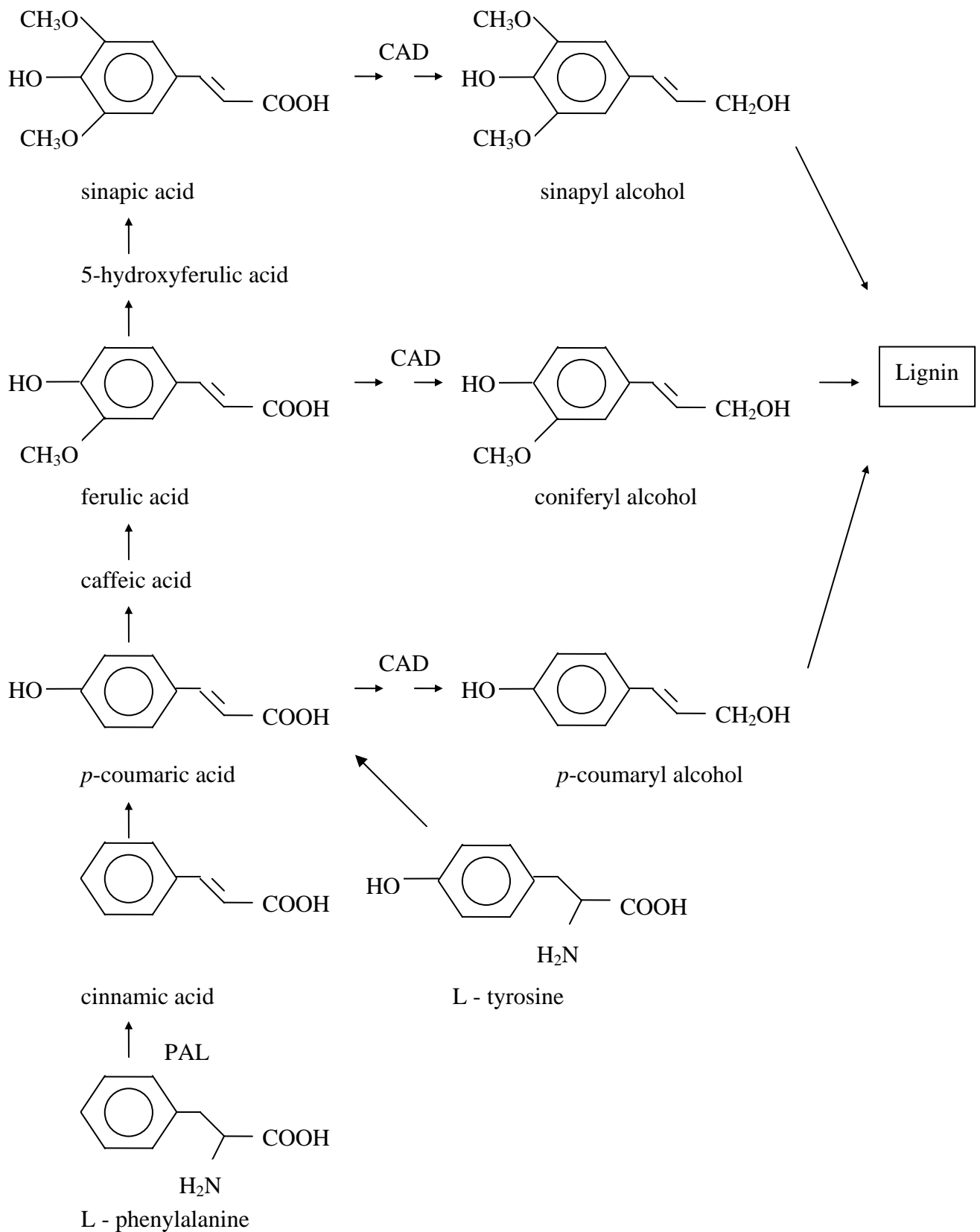


圖 1. 木質素合成途徑 (仿自 Whetten and Sederoff, 1995)

PAL：苯丙氨酸解氨 每(phenylalanine-ammonia lyase)

CAD：苯丙烯醇脫氫 每(cinnamyl alcohol dehydrogenase)

木質素因組成的酚類化合物不同，及分子間共價結合的情

形相異，為相當複雜的大型聚合物，尤其合成途徑中參與的酵素相當多，其與木質素合成之關係則有待釐清。

(三)木質素合成酵素與木質素之關係

雖然一般認為苯丙氨酸是木質素合成的前趨物，而PAL是細胞木質化的重要酵素⁽³⁾，一旦以PAL的抑制劑L- α -氧氨基- β -苯丙酸(L- α -aminooxy- β -phenylpropionic acid ; AOPP)及 2-氨基苯并環丙烯-2-磷酸(2-aminoindan-2-phosphonic acid ; AIP)處理，能有效抑制細胞木質化⁽²¹⁾。但PAL酵素活性出現的高峰期並不一定與木質素合成相符，Morrison and Buxton⁽²²⁾甚至認為PAL活性與木質素的變化並無直接的相關性，CAD活性的變化反而與木質素合成相符。以CAD的抑制劑N(O-aminophenyl) sulfenamoyl-tertiobutyl acetate處理，比用PAL酵素活性抑制劑更能有效抑制細胞的木質化⁽²¹⁾。很可能因PAL活性變化與木質素合成之間尚有許多酵素參與，包括必需先形成對位- 羥基苯丙烯酸醇等醇類，而CAD可促進對位- 羥基苯丙烯酸醇等醇類的形成。就酵素活性出現的時序而言，CAD活性變化與木質素合成的關係較密切。PAL可視為提供合成苯丙烯酸的重要酵素，一旦有合成木質素的原料，尚需CAD等酵素作用，將苯丙烯酸轉換為可鍵結的形態如對位- 羥基苯丙烯酸醇等，二者缺一不可。

(四)香豆酸、阿魏酸與牧草品質之關係

以組織染色法可以觀察細胞組織木質素存在的位置，甚至以顯微光譜儀(microspectrophotometry)可測得各組織的吸收波長，進而判定各項酚類化合物的組成是否一致^(1,2)。用間位- 苯三酚(phloroglucinol)溶於鹽酸後，可與木質素中含 4- 羥基- 3 - 甲氧基苯的功能基(guaiacyl units)形成深紅到淺紅色反應，但與 4- 羥基- 3,5 -二甲氧基苯的功能基(syringyl units)

並無反應，而氯化亞硫酸鹽(chlorine-sulfite)可與 4- 莖基 - 3,5 -二甲氧基苯的功能基形成紅色反應，因此將二種試劑交互使用，可知組織細胞木質化的性質及位置。由表一的結果得知，溫帶禾草的葉片部位，只有木質部對酸性間位-苯三酚有強烈反應，厚壁組織及維管束鞘的薄壁組織反應較弱或無，但葉片厚壁組織對氯化亞硫酸鹽有強烈反應，推測葉片木質部可能是含有 4- 莖基 -3-甲氧基苯主要分佈區域，如 4- 莖基 -3-甲氧基苯丙烯酸即屬於此類的酚類化合物，而葉片厚壁組織則以帶有 4- 莖基 - 3,5 -二甲氧基苯的功能基為主，如 4- 莖基 -3,5-二甲氧基苯丙烯酸即帶有此功能基。溫帶禾草莖的部位，除未成熟的薄壁組織對酸性間位-苯三酚無反應，其餘厚壁組織、表皮、木質部對酸性間位-苯三酚皆有明顯反應，但厚壁組織、表皮、木質部及未成熟薄壁組織對氯化亞硫酸鹽幾乎沒有反應，表示莖部木質化組織的苯環上大多含有 4- 莖基 -3-甲氧基而苯環上帶 4- 莖基 -3,5-二甲氧基的功能基較少，尤其葉片與莖的厚壁組織對氯化亞硫酸鹽反應不同，表示二者的木質素成分可能不同⁽¹⁾。

隨植株成熟，細胞壁木質化的位置會逐漸擴張，特別在莖部的薄壁組織，而葉片維管束鞘周圍的薄壁組織也會漸漸木質化，但不若莖有明顯的變化。當葉片與瘤胃液一起培養，觀察微生物分解的情形，不論成熟或未成熟葉片，其葉肉組織及韌皮部皆能快速分解，而木質部及維管束鞘內側組織通常不易分解，莖部的薄壁組織在未成熟組織能快速分解，在成熟組織僅能緩慢的分解，可能與其木質素成分有關⁽²⁾。

一般而言，豆科牧草的香豆酸(對位- 莖基苯丙烯酸)及阿魏酸(4- 莖基 -3-甲氧基苯丙烯酸)濃度較禾本科牧草低⁽⁸⁾。如果園草(Orchardgrass)莖部的阿魏酸約佔乾物質的 0.39%，與葉片中所含濃度相接近，但莖部香豆酸 (0.54%) 則為葉片的 2 倍，而果園草莖部阿魏酸濃度則將近苜蓿莖部濃度的 10 倍，苜蓿莖部的阿魏酸及香豆酸濃度明顯較果園草及小麥稈為低

(4)。另一方面，成熟組織的香豆酸較未成熟組織濃度高，而阿魏酸則以未成熟組織的含量較高⁽⁸⁾，隨成熟期增加香豆酸對阿魏酸的比例逐漸增加^(7,14,15)。由於香豆酸的消化速率較阿魏酸低，僅約 2.0 ~ 1.3 %/h，且不消化的比率佔 50% 以上⁽⁴⁾，可能因香豆酸與木質素相連，而阿魏酸與半纖維素結合，因此香豆酸的消化率較差，且與木質素含量有很高的相關性。

表 1. 溫帶禾草木質素對組織化學的反應

植物組織	組織化學反應	
	酸性間位-苯三酚	氯化亞硫酸鹽
溫帶禾草的葉片		
木質部	強	強至弱
厚壁組織	弱至無	強
維管束鞘薄壁組織	無	強至無(依生長情形而異)
溫帶禾草的莖		
厚壁環	強	無
表皮	強	無
木質部	強	無至弱
未成熟莖的薄壁組織	無	無
成熟莖的薄壁組織	強至無(依物種而異)	強

資料來源(Akin, 1989)

自然界中的高粱、蘇丹草若帶有棕色中脈的突變基因 (brown midrib ; *bmr*)，其品質較佳⁽¹³⁾。主要因木質素含量低，其中構成木質素的香豆酸含量較正常種低約 1/2，而阿魏酸含量並無明顯改變，阿魏酸對香豆酸比值由正常種的 0.34 增加至 0.75⁽¹¹⁾。而香豆酸含量的減少，可能是影響消化率改善的重要因子⁽¹⁴⁾。另一方面，高粱種子以二乙基硫酸鹽 (diethyl sulfate) 處理也能誘導 *bmr* 突變種的產生⁽²⁴⁾，將帶此突變基因的

高粱與正常種雜交後仍能表現高消化率的特性⁽¹³⁾。表示此突變基因可藉由傳統育種方式保留，並傳衍至後代。

雖然由 *bmr* 突變種與正常種比較，得知消化率的改善可能與香豆酸及阿魏酸濃度上的變化有關，其合成木質素的相關酵素在 *bmr* 突變種的表現是否與正常種相同？關於此點目前仍不是很清楚。

(五)結語

由於盤固草 (*Digitaria decumbens*) 可無性繁殖，其細胞懸浮培養的植株再生率相當高⁽¹⁰⁾，有利於進行基因轉殖的工作；再則 PAL 的基因已被純化，其表現的機制已有深入的探討⁽²⁰⁾。若藉由改變木質素合成途徑酵素的表現，確能改善牧草品質且不影響抗病性，則將來以生物科技方式改善本省盤固草品質指日可待。PAL 酵素表現的調控，不僅與木質素的合成及抗病性有關，尚影響其它二次代謝產物如類黃酮、花青素、植物抗毒素及單寧的合成。若對 PAL 基因表現與木質素合成深入探討，不僅可改善動物對牧草的利用率，尚可應用在生產二次代謝產物及造紙工業方面，其應用性將相當廣泛。

參考文獻：

1. Akin, D. E. 1989. Histological and physical factors affecting digestibility of forages. *Agron. J.* 81:17-25.
2. Akin, D. E., N. Ames-Gottfred, R. D. Hartley, R. G. Fulcher, and L. L. Rigsby. 1990. Microspectrophotometry of phenolic compounds in bermudagrass cell walls in relation to rumen microbial digestion. *Crop Sci.* 30:396-401.
3. Bidlack, J. E., D. R. Buxton, R. M. Shibles, and I. C. Anderson. 1995. Phenylalanine ammonia lyase as a precursory enzyme of legume stem lignification. *Can. J. Plant Sci.* 135-140.
4. Bourquin, L. D., and G. C. Fahey, Jr. 1994. Ruminal digestion and glycosyl linkage patterns of cell wall components from leaf and stem fractions of alfalfa, orchardgrass, and wheat straw. *J. Anim. Sci.* 72:1362-1374.
5. Brett, C., and K. Waldron. 1990. Cell-wall structure and the skeletal functions of the wall. In "Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls." p.4-57. Brett, C. and K. Waldron eds. Unwin Hyman Inc., USA.
6. Brett, C., and K. Waldron. 1996. Cell wall formation. In "Physiology and Biochemistry of Plant Cell Walls." p.75-111. Brett, C., and K. Waldron 2th eds. Chapman and Hall, London, UK.
7. Burritt, E. A., A. S. Bittner, J. C. Street, and M. J. Anderson. 1984. Correlations of phenolic acids and xylose content of cell wall with in vitro dry matter digestibility of three maturing grasses. *J. Dairy Sci.* 67:1209-1213.
8. Buxton, D. R. and J. R. Russell. 1988. Lignin constituents and cell-wall digestibility of grass and legume stems. *Crop Sci.* 28:553-558.
9. Cameron, M. G., J. D. Cremin, Jr., G. C. Fahey, Jr., J. H. Clark, L. L. Berger, and N. R. Merchen. 1991. Chemically treated oat hulls in diets for dairy heifers and wethers: effects on intake and digestion. *J. Dairy Sci.* 74:190-201.
10. Cheng, Y. K. 1993. Somatic embryogenesis and plant regeneration from long term suspension cultures of *Digitaria decumbens*. *Taiwan Livestock Res.* 26:259-269.
11. Cherney, J. H., K. J. Moore, J. J. Volenec, and J. D. Axtell. 1986. Rate and extent of digestion of cell wall components of brown-midrib sorghum species. *Crop Sci.* 26:1055-1059.

12. Strack, D. 1997. Phenolic metabolism. In "Plant Biochemistry ". p387-416. Dey, P. M., and J. B. Harborne eds., Academic Press Inc.,USA.
13. Fritz, J. O., K. J. Moore, and E. H. Jaster. 1990. Digestion kinetics and cell wall composition of brown midrib sorghum × sudangrass morphological components. *Crop Sci.* 30:213-219.
14. Fritz, J. O., R. P. Cantrell, V. L. Lechtenberg, J. D. Axtell, and J. M. Hertel. 1981. Brown midrib mutants in sudangrass and grain sorghum. 1981. *Crop Sci.* 21: 706-709.
15. Grabber, J. H., G. A. Jung, and R. R. Hill, Jr. 1991. Chemical composition of parenchyma and sclerenchyma cell walls isolated from orchardgrass and switchgrass. *Crop Sci.* 31:1058-1065.
16. Jung, H. G. 1989. Forage lignins and their effects on fiber digestibility. *Agron. J.* 81:33-38.
17. Jung, H. G., and M. S. Allen. 1995. Characteristics of plant cell walls affecting intake and digestibility of forages by ruminants. *J. Anim. Sci.* 73:2774-2790.
18. Jung, H. G., and M. P. Russelle. 1991. Light source and nutrient regime effects on fiber composition and digestibility of forages. *Crop Sci.* 31:1065-1070.
19. Kerley, M. S., K. A. Garleb, G. C. Fahey, Jr., L. L. Berger, K. J. Moore, G. N. Phillips, and J. M. Gould. 1988. Effects of alkaline hydrogen peroxide treatment of cotton and wheat straw on cellulose crystallinity and on composition and site and extent of disappearance of wheat straw cell wall phenolics and monosaccharides by sheep. *J. Anim. Sci.* 66:3235-3244.
20. Leyva, A., X. Liang, J. A. Pintor-Toro, R. A. Dixon, and C. L. Lamb. 1992. *cis*-Element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *The Plant Cell.* 4:263-271.
21. Moerschbacher, B. M., U. Noll., L. Gorrichon, and H. J. Reisener. 1990. Specific inhibition of lignification breaks hypersensitive resistance of wheat to stem rust. *Plant Physiol.* 93:465-470.
22. Morrison, T. A., and D. R. Buxton. 1993. Activity of phenylalanine ammonia lyase, Tyrosine ammonia lyase, and cinnamyl alcohol dehydrogenase in the maize stalk. *Crop Sci.* 33:1264-1268.
23. Piwonka, E. J., J. W. MacAdam, M. S. Kerley and J. A. Paterson. 1991. Composition and susceptibility to rumen microbial degradation of nonmesophyll cell walls isolated from caucasian bluestem [*Bothriochloa*

caucasica (Trin)] leaf tissue. J. Agric. Food Chem. 39:473-477.

24. Porter, K. S., J. D. Axtell, V. L. Lechtenberg, and V. F. Colenbrander. 1978. Phenotype, fiber composition, and *in vitro* dry matter disappearance of chemically induced brown midrib (*bmr*) mutants of sorghum. Crop Sci. 18:205-208.
25. Titgemeyer, E. C., M. G. Cameron, L. D. Bourquin, and G. C. Fahey, Jr., 1991. Digestion of cell wall components by dairy heifers fed diets based on alfalfa and chemically treated oat hulls. J. Dairy Sci. 74:1026-1037.
26. Whetten, R., and R. Sederoff. 1995. Lignin biosynthesis. Plant Cell 7:1001-1013.