

木质素降解菌的筛选及对秸秆的降解研究

梁军锋, 张洪生, 张克强, 张金凤, 李 野, 赵 润

(农业部环境保护科研监测所 资源再生研究室, 天津 300191)

摘要:为筛选木质素高效降解菌,对筛选的方法体系进行了研究。结果表明,利用三种定性筛选平板结合定量的木质素磺酸钙降解的方法,能明显提高筛选效率,从16个菌株中筛选到3株对木质素有较强降解能力的菌株Tp1、Tf1与Ls21。为进一步验证所筛菌株的降解效果,选取其中综合性能较好的Tf1菌株(凤尾菇, *Pleurotus sajor caju*),对小麦秸秆与玉米秸秆进行固态发酵试验,并以黄孢原毛平革菌(*Phanerochaete chrysosporium*) BKM-1767作参照,结果表明,Tf1对小麦秸秆与玉米秸秆木质素的降解率分别为38.4%与47.7%,均高于参照菌株(分别为32.2%和34.6%)。

关键词: 秸秆;木质素;筛选;降解;白腐菌

中图分类号: S182 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2009)05-0206-04

Study on the Screening of the Lignin-degrading Fungus and the Degradation of Straws

LIANG Jun-feng, ZHANG Hong-sheng, ZHANG Ke-qiang, ZHANG Jin-feng, LI Ye, ZHAO Run

(Agro-environmental Protection Institute, Ministry of Agriculture of China, Tianjin 300191, China)

Abstract: To use three kinds of screening plate, and to combine with quantitative degradation test of calcium ligno-sulphonate, three lignin-degradation strains, TP1, Tf1 and Ls21 were obtained. In order to confirm the degradation effect of the strains, the strain Tf1 (*Pleurotus sajor caju*), was selected to do solid substrate fermentation test about the wheat straw and corn straw. And *Phanerochaete chrysosporium* (BKM-1767) was made as a reference. The result showed that the degradation rate of Tf1 to the wheat straw and corn was 38.4% and 47.7% respectively, and it was higher than the reference strain (32.2% and 34.6%). This research improves the screening method system of lignin-degrading fungus. There is an important significance to expand the resource of lignin-degrading fungus and exploit the straw resource.

Key words: Straw; Lignin; Screening; Degradation; White rot fungi

中国是农业大国,也是秸秆资源最丰富的国家之一。据报道,我国农作物秸秆年产量为6~7亿t,约占世界秸秆总产量的1/3,秸秆资源化利用的空间巨大^[1-3]。但是,由于秸秆细胞壁中含有丰富的木质素,其结构复杂稳定、降解困难,作为一种物理屏障,嵌合在纤维素等可被生物直接利用的营养物质中,赋予了纤维较高的机械强度以及保护纤维免遭微生物及酶攻击的作用,严重阻碍了秸秆的生物降解与利用。木质素的有效降解越来越受到国内外学者的关注。

白腐菌是已知的唯一在纯培养条件下可将木质素彻底分解为CO₂和H₂O的微生物,因而,利用白腐菌进行木质素的降解已成为研究热点。虽然,国内外已有许多关于白腐菌筛选和降解性能的研究,

但受筛选方法的局限,往往会造成优良菌株漏筛甚至错筛,筛选效率不高,不利于扩大木质素降解菌株筛选的范围,寻找新的木质素高效降解菌株。

常用的木质素降解菌筛选主要有定性与定量两种方法。定性方法是利用染料或类似木质素底物在平板里通过特殊的颜色反应检测木质素降解酶的产生,蔡磊^[4]综述了几种简便的定性筛选方法。定量方法是利用木质素或木质素结构物作为底物,通过微生物发酵后检测木质素或木质素结构物含量的变化,或是利用¹⁴C标示的木质素作为底物,检测微生物降解产生¹⁴CO₂的能力^[5,6]。本研究利用三种定性筛选平板结合定量的木质素磺酸钙降解试验,筛选木质素降解能力较强的菌株,并经秸秆固态发酵,验证菌株对秸秆木质素的降解能力,以期探索简单

收稿日期: 2009-03-13

基金项目: 农业部农业结构调整重大技术研究专项(D-07-02B); 中央公益性科研院所基本科研业务费专项(2009-DLI-04)

作者简介: 梁军锋(1979-),男,陕西韩城人,助理研究员,硕士,主要从事环境微生物方面的研究工作。

易行、准确高效的木质素降解菌筛选方法体系。

1 材料和方法

1.1 供试菌株

1.1.1 商品化菌株 黑平菇 (*Pleurotus Ostreatus*)、香菇 (*Lentinus edodes sing*)、凤尾菇 (*Pleurotus sajor-ca-ju*), 分别记为 Tp1、Tx1、Tf1 购自天津师范大学化学与生命科学学院; 黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) B KMF-1767, 记为 BK, 购自中国典型培养物保藏中心 (CCTCC); 香菇, 记为 XF2, 为本试验室保藏。

1.1.2 分离纯化菌株 由天津蓟县九龙山国家森林公园采集的样品中分离纯化菌株 4 株, 分别记为 Jm15、Jt51、Jt23 和 Jt12; 由四川温江林地采集的样品中分离纯化菌株 7 株, 分别记为 Ls21、Ls11、Ls31、Ls41、Ls42、Ls43、Ls51 和 Ls52。均为本实验室分离纯化并保存。

1.2 培养基

1.2.1 PDA 培养基 马铃薯 200 g, 葡萄糖 20 g, KH_2PO_4 3 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 g, VB_1 100 mg, 琼脂 18 g, 自来水 1 000 mL。

1.2.2 BM 培养基 酵母膏 10 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 18 g, 自来水 1 000 mL。

1.2.3 定性筛选培养基 苯胺蓝筛选平板: 酵母膏 10 g, 葡萄糖 10 g, 苯胺蓝 0.1 g, 琼脂 18 g, 自来水 1 000 mL; 氯化锰筛选平板: $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.15 g, 琼脂 18 g, 自来水 1 000 mL; -萘酚筛选平板: 同 PDA 培养基, 待冷却至 50 ℃, 添加单独灭菌的 -萘酚 (最终浓度为 0.005 %)。

1.2.4 定量筛选液体培养基 参考 Kirk 经典培养基^[7], 葡萄糖浓度改为 2 g/L, 同时添加 2 g/L 木质素磺酸钙。

1.2.5 固态发酵培养基 取粉碎后过 0.45 mm 筛的小麦秸秆或玉米秸秆 5 g 装入三角烧瓶中, 以 1:4 的料液比加入营养液 (参考 Kirk 经典培养基, 葡萄糖浓度改为 2 g/L), 拌匀。

各培养基均经 121 ℃ 湿热灭菌 30 min。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株定性筛选 将各菌株接种在 BM 培养基上, 28 ℃ 培养 7 d。用打孔器制取直径为 7 mm 的菌饼, 分别接种于苯胺蓝、氯化锰与 -萘酚三种筛选平板上, 28 ℃ 培养 5 d。根据菌饼周围培养基颜色的变化分别判定菌株产酶特性。苯胺蓝筛选平板: 显蓝色的平板褪色, 同时检测木质素过氧化物酶 (Lip) 与锰过氧化物酶 (MnP); 氯化锰筛选平板: 菌饼周围

产生棕红色圈, 检测 MnP; -萘酚筛选平板: 菌饼周围产生紫色反应圈, 检测漆酶 (Lac)。

1.3.2 木质素磺酸钙降解定量筛选 取 PDA 平板上培养 5 d 的菌饼 (直径 7 mm) 3 片, 接种于装有 100 mL 定量筛选液体培养基的 300 mL 三角瓶中, 28 ℃, 110 r/min 摇床恒温培养。分别在第 0, 2, 4, 6, 8, 10 天后用无菌吸管吸取 2 mL 培养液, 用粗滤纸过滤后, 于 3 500 r/min 离心 10 min, 取上清液经适当稀释后, 于 280 nm 下比色, 测定木质素磺酸钙含量^[8]。另配置系列木质素磺酸钙标准溶液, 测定不同浓度下的吸光度, 绘制标准曲线。木质素磺酸钙含量与吸光值间的线性回归方程为 $y = 2.711 \cdot 3x + 0.007 \cdot 4$, 相关系数 $R^2 = 0.998$ 。

木质素磺酸钙降解率 (%) = (初始含量 - 发酵后的含量) / 初始含量 $\times 100\%$ 。

1.3.3 秸秆固态发酵试验 取在 PDA 平板培养 5 d 直径 7 mm 的菌饼 3 片接种于固态发酵培养基, 28 ℃ 下恒温保湿培养 30 d。65 ℃ 烘干至恒重, 计算发酵前后的干物质失重, 参考杜甫佑等^[9]的方法测定样品的木质素含量。

样品失重 (%) = (发酵前样品的质量 - 发酵后样品质量) / 发酵前样品质量 $\times 100\%$;

木质素降解率 (%) = $100 - [(100 - \text{发酵后失重率}) \times \text{发酵后木质素含量}] / \text{发酵初始木质素含量}^{[10]}$ 。

2 结果与分析

2.1 菌株定性筛选

从表 1 可见, 将供筛选的 16 株菌分别接种至三种鉴定平板上, 经 5 d 培养后发现可使苯胺蓝平板上产生脱色圈的有 13 株, 其中脱色圈直径大于 30 mm 的有 7 株, 分别为 Ls21、Ls11、Ls31、Ls41、Ls42、Ls51 与 Ls52; 在氯化锰鉴定平板上产生棕色圈有 3 株, 其中显色圈较明显的有 2 株, 分别为 Tf1 与 Tp1; 在 -萘酚鉴定平板上产生紫色圈的有 8 株, 其中显色圈明显的有 6 株, 分别为 Tp1、Tf1、Ls21、XF2、Tx1 与 Jm15。菌株 Tf1 与 Tp1 在三种鉴定平板、菌株 Ls21 在苯胺蓝平板与 -萘酚中均有明显的颜色反应, 表明这 3 株菌均可能有产多种木质素降解酶的特性。

2.2 木质素磺酸钙降解的定量筛选

选取经定性筛选的 3 株菌 Tf1、Tp1 及 Ls21 分别接种到木质素磺酸钙降解定量筛选液体培养基中, 以木质素降解模式菌黄孢原毛平革菌株 B KMF-1767 作参照, 比较 4 菌株的降解效果。从图 1 可见, 平板

定性筛选出的 3 株菌在 10 d 内对木质素磺酸钙均有较好的降解作用,降解率均在 30 % 以上,其中,菌株 TP1 对木质素磺酸钙降解率最高,为 50.6 %;TF1 略低于 TP1,为 44.8 %;Ls21 的降解率为 30.6 %,均高于黄孢原毛平革菌 BK 的 29.6 %。对照定性平板试验,变色圈种类及大小与木质素磺酸钙降解效果基本符合。

表 1 菌株产木质素降解酶能力的定性筛选结果

Tab.1 The screening result of the strains producing lignin-degradation enzyme			
编号 No.	脱色圈直径/ mm Diameter		
	苯胺蓝 Aniline blue	氯化锰 Manganese chloride	-萘酚 -Naphthol
Tp1	+ 23.8	+ 14.4	+ 11.1
TF1	+ 21.4	+ 16.3	+ 25.0
Ls21	+ + +	-	+ 13.0
Xf2	-	-	+ 24.0
Tx1	-	-	+ 33.8
Ls11	+ + +	±	-
Ls31	+ + +	-	±
Ls41	+ 30.6	-	-
Ls42	+ 31.9	-	-
Ls43	+ 22.4	-	-
Ls51	+ + +	-	-
Ls52	+ + +	-	±
Jm15	±	-	+ 9.4
Jt51	+ 4.0	-	-
Jt23	+ 10.6	-	-
Jt12	+ 4.3	-	-

注: + + +. 整个苯胺蓝平板颜色褪去; +. 表示鉴定平板有颜色反应,后面数字表示反应圈的直径; ±. 不确定; - . 未见颜色反应。
Note: + + +. Means that the blue of the whole plate was disappear; +. Means that there are faded cycle ,and the number means diameter of the cycles; ±. Means uncertainty; - . Means no color changing.

表 2 菌株 TF1 对玉米和小麦秸秆木质素的降解效果

Tab.2 The lignin-degradation of TF1 to wheat and corn straws %						
编号 No.	玉米秸秆 Corn straw			小麦秸秆 Wheat straw		
	失重率 DM loss	木质素含量 Lignin content	降解率 Degradation rate	失重率 DM loss	木质素含量 Lignin content	降解率 Degradation rate
CK	-	16.32 ±0.11aA	-	-	19.61 ±0.29aA	-
TF1	12.2	9.72 ±0.50dC	47.7	6.4	12.90 ±0.44cC	38.4
BK	22.4	13.75 ±0.20bB	34.6	3.9	13.83 ±0.20cC	32.2

注:小写字母表示 $P < 0.05$,大写字母 $P < 0.01$ 。
Note :Small letter means $P < 0.05$,and capital letter means $P < 0.01$.

3 讨论

大量的研究表明,白腐真菌降解木质素主要是依赖一系列酶的共同作用,这些酶主要包括 Lip、MnP 与漆酶 Lac,快速定性检测这些酶产生与否则是目前木质素降解菌筛选最广泛应用的方法。但一种方法,仅能对一种或两种酶进行检测,如氯化锰筛选平板只能检测 MnP 的产生,但不反映 LiP 和 Lac。研究表明,微生物对木质素的降解往往不是仅靠一

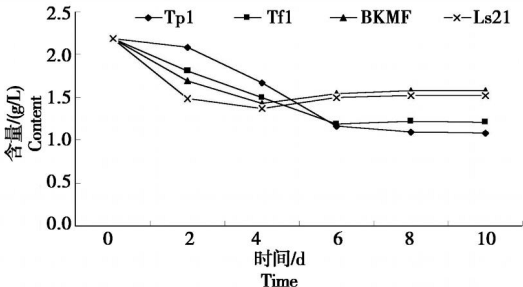


图 1 木质素磺酸钙浓度随时间的变化

Fig.1 The change of content and degradation rate of the calcium lignosulphonate with the time

2.3 固态发酵验证试验

从筛选出的 3 株木质素降解菌株中,选取降解率高且降解启动相对较快的凤尾菇菌株 TF1,同时选用已被广泛研究的木质素降解模式菌黄孢原毛平革菌株 BKMf-1767 作参照,分别以小麦秸秆和玉米秸秆为培养基质,固态发酵 30 d,以验证所选菌株对秸秆木质素的降解效果。以未经发酵的秸秆为对照,发酵前后木质素含量的变化及降解率见表 2。结果表明,经菌株 TF1 发酵后的小麦和玉米秸秆木质素含量分别为 12.90 % 和 9.72 %,比发酵前(对照)分别降低了 6.71 和 6.6 个百分点,差异均达到了极显著水平;以发酵前(对照)秸秆干物质重为基础计算的降解率分别为 38.4 % 和 47.7 %,表明菌株 TF1 对小麦和玉米秸秆均有较好的降解效果。经菌株 BKMf 发酵后的小麦和玉米秸秆木质素降解率分别为 32.2 % 和 34.6 %,表明本试验筛选的菌株 TF1 对秸秆的降解效果优于黄孢原毛平革菌株 BKMf-1767。

三种定性筛选平板的颜色反应都不是绝对的,这些方法仅能简单的判断产木质素酶情况,同时变色圈的大小与酶活性并没有必然的正相关关系,筛选平板的颜色反应仅能初步反映菌株的产木质素酶能力^[11]。因而,要确切了解菌株对木质素的降解能力,还需要结合定量木质素降解试验。郁红艳等^[5]用 Kraft 木质素溶液作为定量的筛选体系,筛选到具有较强木质素降解能力的筒青霉 *Penicillium simplicissimum* H5。本试验采用价格低廉、易得且水溶性较好的木质素磺酸钙溶液作为定量筛选基质,研究了由定性筛选平板筛选到 3 株菌的木质素降解能力,结果表明,菌株 Tf1、Tp1 对木质素均有较强的降解能力,菌株 Ls21 的降解能力则相对较弱。

利用三种定性筛选平板结合定量的木质素磺酸钙降解试验筛选到的凤尾菇菌株 Tf1 对小麦和玉米秸秆进行固态发酵,验证了菌株 Tf1 对小麦和玉米秸秆木质素有较好的降解效果,降解率分别达 38.4%和 47.7%,均优于黄孢原毛平革菌株 BK,值得在秸秆资源的开发利用中开展更深入的研究。

致谢:本研究得到了天津农业科学院生物技术中心陈秀为研究员的指导,在此表示感谢。

参考文献:

[1] 陈小华,朱洪光.农作物秸秆产沼气研究进展与展望

[J].农业工程学报,2007,23(3):279-283.

- [2] 韩鲁佳,闫巧娟,刘向阳,等.中国农作物秸秆资源及其利用现状[J].农业工程学报,2003,19(3):87-91.
- [3] 中华人民共和国统计局.2005 年中国国家统计局年鉴[M].北京:中国统计出版社,2006.
- [4] 蔡磊,尹峻峰,杨丽萍,等.几种简便的木质素降解真菌定性筛选方法[J].微生物学通报,2002,29(1):67-69.
- [5] 郁红艳,曾光明,黄国和,等.木质素降解真菌的筛选及产酶特性[J].应用与环境生物学报,2004,10(5):639-642.
- [6] Temp U, Eggert C, Eriksson K L. A small-scale method for screening of lignin-degrading microorganisms[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1998, 64(4):1548-1549.
- [7] 李惠荣.白腐真菌生物学和生物技术[M].北京:化学工业出版社,2005.
- [8] 蒋挺大.木质素[M].北京:化学工业出版社,2001.
- [9] 杜甫佑,张晓昱,王宏勋.木质纤维素的定量测定及降解规律的初步研究[J].生物技术,2004(14):46-47.
- [10] Tsang L J, Reid I D, Coxworth E C. Delignification of wheat straw by *Pleurotus* spp. under mushroom growing conditions[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1987, 53: 1304-1306.
- [11] 杜海萍,宋瑞清,王钰祺.几种真菌产木质素降解酶的比较研究[J].林业科技,2006,31(4):20-24.