

长白山地区真菌降解木质素的研究

王 地 刘 期 松

(中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳)

采用 Bavendamm 氏反应, 漆酶 (Laccase) 和 α -酪氨酸酶反应 (α -tyrosinase reaction) 呼吸率, 紫外分光光度法和扫描电镜等方法, 对来自长白山地区的五株真菌进行了定性、定量测定。结果表明, 长白山地区存在木质素分解菌, 它们分属于曲霉属 (*Aspergillus*)、木霉属 (*Trichoderma*) 及毛霉属 (*Mucor*)。它们均能不同程度地降解小叶杨 (*Populus simonii*)、龙爪柳 (*Salix matsudana* f. *fortuosa*)、家榆 (*Ulmus pumila*)、山毛桃 (*Persica davidiana*) 的碱性水溶木质素, 游离木质素及细胞回复木质素。降解主要发生在第 8 天以后, 在第 12—14 天时趋于稳定, 其木质素的剩余量在 44—74%, 它们参与木质素降解的酶不同于已报道过的白腐菌的酶。

关键词 真菌; 木质素; 降解

木质素是一种广泛存在于维管植物中的有机物, 在地球上的含量仅次于纤维素而居第二位。随着工农业的飞速发展, 某些以木纤维为原料的行业都产生大量的木纤维废物。而该木纤维废物往往不得其用, 不仅浪费了大量可用资源, 还污染了环境, 因而研究木质素转化的工作具有重要意义。

从外国的报道来看, 目前研究的主要焦点在高等真菌, 如担子菌类, 仅有少数针对丝状真菌^[1-3]。环境中存在大量能降解木质素的真菌, 而对其木质素降解能力的研究甚少。作者通过定性定量的研究, 初步确定了不同真菌对不同树种的不同木质素的降解性。

材料与方法

(一) 供试样品

采自中国科学院长白山地区环境监测站, 1—3 号标准实验林地, 主要为腐朽的红松、云冷杉。

菌种系采用直接切取法、水琼脂法、钻

孔法等, 在马铃薯培养基中分离得到^[4,5]。

(二) 供试木材

选自成活的小叶杨 (*Populus simonii*)、龙爪柳 (*Salix matsudana* f. *fortuosa*)、家榆 (*Ulmus pumila*)、山毛桃 (*Persica davidiana*)。

(三) 木质素的选择

按 Janshaker 等人^[6-8]的方法, 只有碱性木质素在 280nm 处有吸收峰, 故本文一律采用碱性木质素。

(四) 碱性木质素的制备及处理

取成活的小叶杨、龙爪柳、家榆、山毛桃四种树木的枝干去皮, 粉碎至能通过 24 孔筛, 取 12g 木屑, 加 300ml 1% NaOH 在 121℃ 下加热 1h, 用 HCl 中和, 过滤, 将滤液按下列程序处理:

滤液 35ml → pH = 3 → 静置过夜 → 离心 (2000 r/min, 30min) → 沉淀物 I 和上清液 I。蒸馏水 (pH = 3) 洗沉淀 I, 离心 (同上) → 上清液并入上清液 I

本文于 1989 年 4 月 3 日收到。

此研究项目得到国家环保局的资助。

→浓缩物(水溶性木质素, UV 吸收值 280 nm)。

沉淀 I (溶于二氧六环:水 = 7:3, 共 10ml) → 超声处理 → 静置过夜 → 离心(5000r/min, 10min)分离得沉淀 II 和上清液 II (游离木质素 UV 吸收值 280nm)。

沉淀 II → 加 3ml 1mol/L NaOH → 超声处理 → 加热(70℃, 30min) →

冷却离心(5000r/min, 10min) → 沉淀 III
弃去 → 上清液

液 III (pH = 3) → 静置过夜 → 离心(20000r/min, 30min) → 上清液 VI 弃去 → 蒸馏水

(pH = 3) 洗沉淀 VI → 弃去洗液 → 沉淀 VI → 溶于二氧六环:水 = 7:3, 10ml → 超声处理, 静置过夜 → 离心(5000r/min, 10min) → 上清液 V (细胞回复木质素, UV 吸收值 280nm)。

(五) Bavendamn 氏反应^[4,5]

把分离的菌接种在含有 0.05—0.5%, 没食子酸的麦芽汁琼脂培养基上, 培养 10d 左右, 若菌落周围形成褐色氧化带则为 Bavendamn 阳性反应。

(六) 虫漆酶及 α -酪氨酸酶反应

参与上述 Bavendamn 反应的酶为酚氧化酶, 它除含有虫漆酶外, 还含有少量 α -酪氨酸酶, 区分二者的方法是, 在马铃薯培养基中分别加入 0.0005mol/L 的 α -萘酚和 0.1% 的对甲酚, 接种培养 5—10d。若加 α -萘酚的培养基呈紫色, 说明有虫漆酶分泌, 若加对甲酚的培养基呈褐色, 说明有 α -酪氨酸酶分泌。

(七) 碱性木质素的定量测定

培养基: K_2HPO_4 1.6g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g; KH_2PO_4 0.5g; NaOH 0.25g; NH_4NO_3 1.0g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 2.5 μ g; $(NH_4)_2SO_4$ 1.25g; $CaCl_2$ 10mg; 蒸馏水 1000ml; 酵母膏 0.1g。

取 200ml 三角瓶, 加 50ml 上述培养

基。将上述 5 种菌分别制成菌悬液, 使其浓度在 260nm 时的光密度为 1。然后将此菌液 1ml 加入三角瓶中, 分别加入小叶杨、龙爪柳、家榆、山毛桃碱性木质素滤液。28℃ 培养, 2、4、6、8、10、12、14d 取样处理。碱性木质素经处理后, 在 280nm 处有特征紫外吸收峰。H. Jansheker^[3] 认为, 280nm 处是由苯环中的不可取代的 m-位置引起的, 此吸收值遵从朗伯-比耳定律, 其浓度与紫外吸收的关系见图 1。

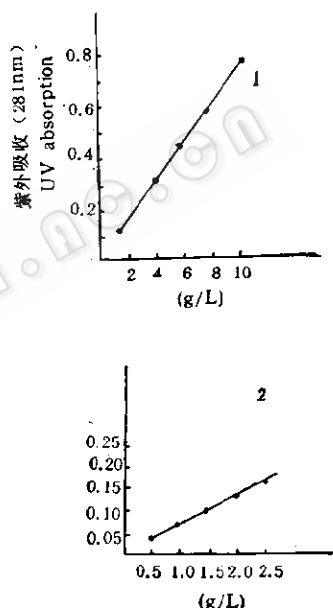


图 1 碱性木质素浓度与紫外吸收的关系

Fig. 1 Relationship between the concentration of alkaline lignin and UV absorption

1. H. Jansheker 的结果 2. 著者的结果
1. H. Jansheker's result 2. Author's result

(八) 菌体利用木质素时的呼吸率测定

用瓦氏呼吸计测定比较在有木质素存在时对 O_2 的呼吸率。按表 1 组成加样, 测定菌体利用木质素的呼吸率。

(九) 回接试验

将小叶杨、龙爪柳、家榆、山毛桃四种木材去皮, 选相同年轮间的材料, 制成长 ×

表 1 按表加样,测定真菌降解木质素的呼吸

Table 1 Added sample followed the constitute in the table, determine respiration of fungi degraded lignin

加样 Added sample		菌株 Strain	瓶号 No. of flask	反应瓶主室 Main compartment of reaction flask		侧室 Side arm		中央小杯 Center well	
项目 Item				缓冲液 Buffer solu'	菌液 Organism suspension	木质素 Lignin	葡萄糖 Glucose		
温压计 Thermobara meter			1	4.2					
			2	4.2					
内源呼吸 Endo-respi-ratory		CB ₁	3	3.0	1.0			0.2	
			4	3.0	1.0			0.2	
耗氧量 Demand oxygen quantity		CB ₁	5	1.0	1.0	小叶杨	1.0	1.0	0.2
			6	1.0	1.0	(1)	1.0	1.0	0.2
		CB ₁	7	1.0	1.0	龙爪柳	1.0	1.0	0.2
			8	1.0	1.0	(2)	1.0	1.0	0.2
		CB ₁	9	1.0	1.0	家榆	1.0	1.0	0.2
			10	1.0	1.0	(3)	1.0	1.0	0.2
		CB ₁	11	1.0	1.0	小毛桃	1.0	1.0	0.2
			12	1.0	1.0	(4)	1.0	1.0	0.2

注: 菌株可分别使用 CB₁, CB₂, CB₃, CB₁₂, CB₁₃ (单位 ml)。(1) *Populus simonii*; (2) *Salix matsudana* f. *fortuneana*;(3) *Ulmus pumila*; (4) *Persica davidiana*。

宽×高=10×10×10mm 大小,在与木纤维平行的四个面上用硫酸纸包裹,高压灭菌后插入马铃薯平板中,在横断面上接种,15d 后,取出做电镜扫描样品^[9,10]。

(十) 最适 pH 和温度

马铃薯平板, pH 分别为 4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.4、9.0, 加缓冲液,接种培养,观察,记录。最适温度试验,马铃薯平板接种后,不同温度 (20、25、28、35、39℃) 培养,观察记录。

结果与讨论

(一) 菌株的初选及定性试验

共分纯真菌 17 株,选出其中 5 株,编号

号为 CB₁, CB₂, CB₃, CB₁₂, CB₁₃。CB₁ 属毛霉属 (*Mucor*), CB₂, CB₃, CB₁₃ 属曲霉属 (*Aspergillus*), CB₁₂ 属木霉属 (*Trichoderma*)。

用 Bavendamn 氏反应测定虫漆酶, α-酪氨酸酶 (28℃, 10d)。结果表明 CB₁—CB₁₃ 的 Bavendamn 反应均呈阴性,只有 CB₁₃ 有轻微的虫漆酶反应, CB₃ 有轻微的 α-酪氨酸反应,说明上述真菌不同于已报道的白腐菌的酶。

(二) 真菌降解木质素的定量分析

采用紫外分光光度法分别测定了菌株 CB₁, CB₂, CB₃, CB₁₂, CB₁₃ 对小叶杨、龙爪柳、家榆、山毛桃的碱性游离木质素、细胞

表 2 真菌降解四个树种中水溶木质素残留的紫外吸收百分比 (280nm)

Table 2 The residual percentage of water-soluble lignin of four kinds of trees in culture after degradation by fungi

菌株 Strain		小叶杨 <i>Populus simonii</i>							龙爪柳 <i>Salix matsudana f. fortunea</i>						
		2	4	6	8	10	12	14	2	4	6	8	10	12	14
对照 Control		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
CB ₁		91.67	75.83	66.95	59.66	52.85	52.07	50.41	96.43	86.67	91.91	84.40	73.33	82.96	77.30
CB ₂		83.33	74.17	57.63	57.14	50.41	47.93	46.28	96.43	85.33	80.88	74.47	63.33	66.07	56.74
CB ₄		82.50	75.00	73.73	55.46	49.97	45.45	46.28	101.43	87.33	89.71	84.40	66.67	59.26	54.61
CB ₁₂		82.50	70.83	68.64	58.82	49.59	46.28	44.63	100.71	94.00	84.56	64.54	53.33	62.96	58.16
CB ₁₃		82.50	75.00	63.56	52.10	44.72	34.71	33.88	98.57	82.00	91.91	87.94	80.00	81.48	78.72
平均 Means								44.29							65.10

菌株 Strain		家 榆 <i>Ulmus pumila</i>							山 毛 桃 <i>Persica davidiana</i>						
		2	4	6	8	10	12	14	2	4	6	8	10	12	14
对照 Control		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
CB ₁		84.62	75.40	71.43	66.41	67.50	59.02	58.12	91.67	89.41	78.48	73.33	83.97	63.31	58.52
CB ₂		84.62	75.40	65.08	58.02	52.50	45.90	47.01	86.67	79.41	67.72	61.82	62.60	49.11	44.89
CB ₄		75.38	65.08	56.35	49.62	49.17	46.72	45.30	94.44	90.00	84.81	60.61	59.54	38.46	33.52
CB ₁₂		76.15	66.67	60.32	45.80	47.50	49.18	46.15	100.56	89.41	91.77	59.39	64.89	37.87	36.93
CB ₁₃		70.39	63.49	50.00	41.98	40.00	34.43	36.15	100.11	83.53	82.28	73.33	91.60	69.82	64.20
平均 Means								46.54							47.61

表 3 真菌降解四个树种中游离木质素残留物的紫外吸收百分比 (280nm)
Table 3 The residual percentage of free lignin of four kinds of trees in culture degraded by fungi

		小 叶 杨 <i>Populus simonii</i>							龙 爪 柳 <i>Salix matsudana f. fortuosa</i>						
菌株 Strain	d	2	4	6	8	10	12	14	2	4	6	8	10	12	14
		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
对照 Control		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
CB ₁		99.50	99.25	97.20	70.71	55.67	54.55	52.76	99.72	99.50	99.50	91.58	91.25	60.30	58.35
CB ₂		99.25	97.99	95.49	74.24	59.33	55.56	55.38	96.76	97.25	94.29	92.82	87.50	75.63	74.31
CB ₃		97.01	95.98	93.98	68.43	55.92	53.28	54.07	98.50	97.00	96.53	91.58	91.25	66.08	64.34
CB ₄		98.25	96.98	95.74	76.01	59.95	55.81	55.91	100.49	98.50	96.77	96.04	90.25	76.13	71.82
CB ₅		97.51	97.49	70.43	70.96	56.93	55.30	55.12	99.25	99.99	98.01	97.53	87.61	70.60	68.83
平 均 Means								54.64							67.53

		家 榆 <i>Ulmus pumila</i>							山 毛 桃 <i>Persica davidiana</i>						
菌株 Strain	d	2	4	6	8	10	12	14	2	4	6	8	10	12	14
		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
对照 Control		100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
CB ₁		100.25	99.45	97.73	85.43	70.43	62.84	63.04	100.15	98.73	98.72	96.19	83.97	83.80	83.25
CB ₂		97.99	98.99	97.49	94.97	75.43	68.33	67.34	98.48	97.97	96.93	91.37	76.34	75.15	70.81
CB ₃		97.24	96.21	93.72	88.19	70.68	66.08	64.81	101.02	100.00	97.70	95.94	75.35	72.91	71.57
CB ₄		99.75	98.23	96.93	95.23	80.45	70.32	68.10	98.98	98.99	96.16	92.64	74.81	73.16	72.59
CB ₅		99.75	97.98	95.23	88.94	79.45	69.83	69.87	100.51	99.75	96.42	91.62	81.68	75.95	74.11
平 均 Means								66.63							74.46

表 4 真菌降解四个树种中细胞回收木质素残留物的紫外吸收百分比 (280nm)

Table 4 The residual percentage of cell-recovered lignin of four kinds of trees in culture after degradation by fungi

菌株 Strain		小叶杨 <i>Populus simonii</i>							龙爪柳 <i>Salix matsudana f. fortiusa</i>						
		2	4	6	8	10	12	14	2	4	6	8	10	12	14
d 菌株 Strain	对照 Control	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	CB ₁	97.92	91.76	83.52	66.52	67.87	62.44	61.20	100.00	91.13	89.72	78.10	74.70	77.02	75.30
	CB ₂	86.28	87.08	81.32	68.74	70.11	66.89	65.41	98.81	92.57	79.19	77.38	77.11	75.80	73.86
	CB ₄	81.64	84.63	81.18	66.96	65.62	62.44	62.53	96.43	95.92	88.28	78.25	74.61	76.04	74.34
	CB ₁₂	85.18	83.52	83.52	69.84	63.37	61.56	59.65	96.90	94.72	91.87	81.43	81.93	77.02	73.86
	CB ₁₃	88.50	86.64	85.71	68.96	62.92	60.89	59.72	95.71	92.81	94.74	78.57	77.35	77.26	74.82
平 均 Means								61.70							74.43
菌株 Strain		家 榆 <i>Ulmus pumila</i>							山毛桃 <i>Persica davidiana</i>						
		2	4	6	8	10	12	14	2	4	6	8	10	12	14
d 菌株 Strain	对照 Control	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
	CB ₁	100.00	98.06	95.00	92.18	81.06	69.06	70.11	98.65	96.14	90.82	82.52	73.89	70.71	69.22
	CB ₂	98.03	90.03	82.78	75.14	68.25	66.57	66.76	99.04	98.46	92.35	84.47	70.06	68.98	68.07
	CB ₄	98.59	95.57	94.72	85.47	70.19	69.08	69.27	99.62	95.56	92.54	82.91	71.40	70.91	69.02
	CB ₁₂	99.15	96.12	93.89	81.84	73.82	69.34	68.27	100.00	99.42	97.13	94.56	77.16	69.17	68.83
	CB ₁₃	95.49	91.97	91.11	83.80	77.16	73.20	72.07	95.77	94.02	91.01	84.47	73.89	71.48	70.17
平 均 Means								69.38							69.03

表 5 真菌利用四个树种木质素的耗氧量 (mg O₂/g)
Table 4 The Oxygen-demand of fungi using four kinds of lignin

CB _I 的耗氧量 O ₂ demand of CB _I				CB _J 的耗氧量 O ₂ demand of CB _J				CB _K 的耗氧量 O ₂ demand of CB _K				CB _L 的耗氧量 O ₂ demand of CB _L				CB _{IS} 的耗氧量 O ₂ demand of CB _{IS}			
0.5	1.00	1.50	2.00	0.5	1.00	1.50	2.00	0.5	1.00	1.50	2.00	0.5	1.00	1.50	2.00	0.5	1.00	1.50	2.00
h 木质素 Lignin																			
内源呼吸 Endoraspiratory																			
小叶杨 <i>Populus simonii</i>																			
龙爪柳 <i>Salix matsudana f. fortuosa</i>																			
家榆 <i>Ulmus pumila</i>																			
山毛桃 <i>Pericea davidiana</i>																			

回复木质素、水溶性木质素的降解, 结果如表 1—3。

表 1—3 的结果表明:

1. 各菌株对各种水溶性木质素、游离木质素、细胞回复木质素都有不同程度的降解, 但同一菌株对不同树种的同类木质素的降解性也不相同, 如 CB_1 对小叶杨游离木质素的降解就不同于其他 3 个树种游离木质素的降解, 以 10d 的木质素剩余量为例, CB_1 对小叶杨的游离木质素剩余量为 55.6%, 而龙爪柳为 91.25%, 家榆为 70.43%, 小毛桃为 83.97%。

2. 不同菌株对同一树种的同类木质素的最终降解程度有的相似。以小叶杨游离木质素为例, 第 4 天的木质素剩余量 CB_1 为 52.7%、 CB_3 为 55.30%、 CB_4 为 54.1%、 CB_{12} 为 55.9%、 CB_{13} 为 55.1%。有的差别较大, 如龙爪柳等。

3. 上述各菌对各类木质素的降解主要发生在 8—10d, 在第 14 天时结果趋于稳定, 木质素剩余量在 44—74%, 说明它们均不能将木质素全部降解。

(三) 菌体在有无木质素时的呼吸率

采用压力计方法^[6], 结果见表 5。

表 5 结果指出: 各种菌的内源呼吸各不相同, 但差别不大。但它们的生化呼吸率大于内源呼吸率, 说明它们可降解四个树种的木质素。各菌对木质素的降解随时间增长逐渐减弱。

(四) 木材回接试验

电镜观察结果表明: 这些木材经真菌作用后都有不同程度的纤维细胞脱落现象(图 2—5)。

图 2—5 表明: CB_1 、 CB_3 、 CB_4 可利用小毛桃、小叶杨及龙爪柳的木纤维为营养物生长, 从而说明上述菌株有很强的回接性。

(五) 菌体生长的最适 pH 和最适温度

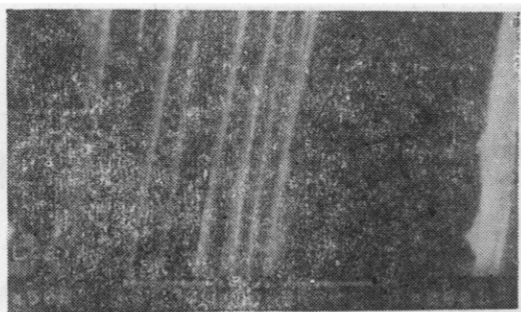


图 2 龙爪柳的正常纵切(无菌)

Fig. 2 Normal vertical section of *Salix matsudana* f. *fortunei* (sterilized)



图 3 CB_4 作用后的龙爪柳纵切(可见其结构极不规则, 有明显的降解及剩余物)

Fig. 3 The vertical section of *Salix matsudana* f. *fortunei* shows its irregular structure and residual mass after degraded by CB_4

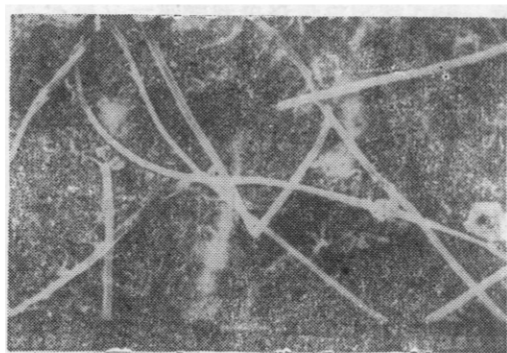


图 4 CB_3 在小叶杨表面的生长(横切)

Fig. 4 The growth of CB_3 on the surface of *Populus simonii* (horizontal section)



图 5 CB_1 在山毛桃(横切)的生长形状

Fig. 5 The growth of CB_1 on the surface of *Persica davidiana* (horizontal section)

试验结果表明,五株菌的生长最适 pH 为 7.5, CB_1 、 CB_4 在酸性条件下仍可生长。五株菌的最适生长温度为 28℃。

参 考 文 献

- [1] Borgmeyer, T. R. et al.: *Appl. E. M.*, 2: 273—279, 1985.
- [2] Pettey, T. M. et al.: *ibid.*, 3: 439—440, 1984.
- [3] Sorensen, H.: *J. Gen. Microbiol.*, 27: 21—34, 1962.
- [4] 逸见武雄等: 木材腐朽学(4版)第一册, 朝倉書店, 东京都, 116 页 1947。
- [5] 斋藤纪: 土壤微生物实验法(日本土壤微生物研究会编), 養賢堂, 东京, 393 页, 1977。
- [6] Jansheker, H. et al.: *J. Appl. Microbiol. Bio-techn.*, 14: 174—181, 1982.
- [7] Jansheker, H. et al.: *Arch. Microbiol.*, 132: 14—21, 1982.
- [8] Jansheker, H. et al.: *Ana. Che. Acta*, 130: 81—91, 1981.
- [9] Haider, K. et al.: *Arch. M.*, 29: 103—106, 1979.
- [10] Crawford, D. L. and R. L. Crawford: *Appl. E. M.*, 5: 714—717, 1976.

THE STUDY OF LIGNIN DEGRADATED FUNGI THAT ISOLATED FROM CHANGBI MOUNTAIN

Wang Di Liu Qisong

(Institute of Applied Ecology Academia Sinica, Shenyang)

In this paper, the lignin degradation abilities of five fungi that isolated from Changbi Mountain were studied. Using Barendamn reaction method, laccase-tyrosinase method, Warburg method and using characteristic absorption band of lignin in ultra-violet range of the specter for determination of residual lignin of 4 kinds of trees (Aspen, Willow, Elm, Peach) in culture in 2 to 14 days.

The result shows that lignin degradation

of fungi occurs after 8 days and stops about 12 to 14 days. After 14 days, there are about 60% lignin left in culture. Their enzymes related with lignin degradation are also different from that of the white-rot fungus (*Phanerochaete chrysosporium*) that reported earlier.

Key words

Fungi; Lignin; Degradation