



## 白腐菌对秸秆中木质素生物降解的研究

戴永鑫, 王海宽, 刘逸寒, 路福平

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 研究了白腐菌及其产生的木质素降解酶系对秸秆的木质素生物降解方法, 探讨了黄孢原毛平革菌和杂色云芝单一菌株生物降解及双菌株联合降解木质纤维素的规律, 白腐菌双菌联合固态培养可使木质素降解率达到 47.64%, 脱木素选择性为 4.74。采用模拟大规模白腐菌堆积培养 (厚度 30 cm) 的方法降解秸秆木质素, 培养 30 d, 木素降解率为 32.54%, 表明此方法是一种可行的大规模生物预处理方法。

**关键词:** 白腐菌; 秸秆; 生物降解; 木质素

中图分类号: TQ353.4<sup>2</sup>

文献标识码: A

文章编号: 1672-6510 (2007) 04-0024-03

### Study on Lignin Biological Degradation of Straw with White-rot Fungi

DAI Yong-xin, WANG Hai-kuan, LIU Yi-han, LU Fu-ping

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The biological degradation of lignin in corn straw with white rot fungi and lignin degradation enzyme secreted by white rot fungi was studied. The rule of lignocellulose degradation was discussed in single strain fermentation and two strains co-fermentation. The results showed that the rate of lignin degradation could reach 47.64% and the selection of lignin degradation was 4.74 in two-strains solid state co-fermentation. The degradation test was scaled up to 30cm height with white rot fungi. After 30 days, the rate of degradation could reach 32.54%. The results show that this method of large-scale biological pretreatment is feasible.

**Keywords:** white-rot fungi; straw; biological degradation; lignin

白腐菌是对木质素具有最强降解能力的一类真菌, 它们通过分泌木质素降解酶系的主要成分木素过氧化物酶 (Lignin Peroxidase/LiP)、锰过氧化物酶 (Manganases Peroxidase/MnP) 和漆酶 (Laccase/Lac) 等胞外氧化酶来降解木质素<sup>[2]</sup>。秸秆是一种丰富的纤维素资源, 在我国农作物秸秆年产量达 6 亿多吨, 除了少量被用于造纸、纺织等行业或用作粗饲料、薪柴外, 大部分以堆积、荒烧等形式直接倾入环境, 造成极大污染和浪费<sup>[3]</sup>。如果将它们转化成气体或液体燃料 (酒精、氢气、柴油等), 不但可以缓解人类所面临的资源危机、食物短缺、环境污染等一系列问题, 也为人类的可持续发展提供了保证。

国外有研究显示<sup>[3]</sup>, 利用白腐菌对秸秆等草类原料进行固体发酵处理, 可以对木质素进行选择性的降

解, 直接攻击胞间层中的木质素, 导致纤维的分离。目前, 国内利用白腐菌的生物降解研究大都处于实验室阶段<sup>[4]</sup>, 如果能解决好原料的大规模生物处理问题, 这一技术将具有较好的工业化前景。本研究以玉米秸秆为原料, 采用模拟工厂大规模堆积培养的方法, 用白腐菌对木质素进行生物降解, 并研究了降解木质纤维素的选择性降解规律, 以期能为秸秆的生物预处理工艺提供有益的借鉴。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

玉米秸秆: 产自天津军粮城农场, 当年生, 粉碎至 20 目, 烘干恒重备用。

菌种:黄孢原毛平革菌 (*Phanerochaete chrysosporium*) TCCC41015;  
杂色云芝 (*Coriolus versicolor*) TCCC 51001 (以上均为本实验室保藏菌种)。

## 1.2 固态培养木质素降解

将斜面保藏的菌种活化,黄孢原毛平革菌斜面孢子洗下,制成菌悬液备用,杂色云芝平板菌种用无菌打孔器制成直径 12 mm、厚 2 mm 的菌块,备用。每 300 mL 三角瓶中准确称取玉米秸秆粉 20 g,加入一定量的葡萄糖和硫酸铵,60 mL 蒸馏水,即得固态培养基,121 °C 灭菌 30 min。

接种黄孢原毛平革菌到秸秆固体培养基中,接种量为  $1.0 \times 10^6$  个/mL,34 °C 静止培养。杂色云芝按每瓶 3 个菌块的接种量接种,30 °C 静止培养。每隔 5 d 从固态发酵基质中取样,过滤澄清,定容后进行酶活力测定,将剩余固态基质 105 °C 烘干至恒重,测定木质纤维素含量。

## 1.3 大规模堆积培养模拟

称取粗粉碎后的秸秆粉 200 g,用蒸汽灭菌 15 min 后,放入 3 000 mL 大三角瓶中,冷却至常温后,接入 50 mL 用土豆汁前培养的菌种悬液。搅拌均匀后放入培养箱中,以堆积状态(厚度 30 cm)进行培养。堆积放置过程中,为防止秸秆因发酵生热、温度升高,定时通入无菌的冷空气,控制温度 27~32 °C。

## 1.4 测定方法

### 1.4.1 酶活力测定

木质素过氧化物酶活力测定方法参考文献[5]进行,以每分钟形成 1  $\mu\text{mol}$  的藜芦醛所需的酶量为一个酶活力单位。锰过氧化物酶与漆酶活力测定按照 Galliano 的测定方法[6]进行,一个酶活单位定义为在 25 °C 下每分钟使 1  $\mu\text{mol}$  的底物转化所需的酶量。

### 1.4.2 木质纤维素含量的测定

采用 72% 硫酸法测定木质素含量;硝酸-乙醇法测定纤维素含量;蒽酮比色法测定半纤维素含量[9]。木质纤维素的相对降解率及降解选择性的计算见文献[7]。

$$\text{相对降解率} = (A/B) \times 100\%$$

$$\text{降解选择性} = a/C$$

式中: A 为纤维素(半纤维素或木质素)的降解总量;  
B 为原样品中纤维素(半纤维素或木质素)的总量;  
a 为纤维素(半纤维素或木质素)的降解率;  
C 为综纤维素的降解率。

## 2 结果与讨论

### 2.1 单一菌株固态培养降解木质素过程分析

实验采用产 LiP 和 MnP 的黄孢原毛平革菌和产漆酶的杂色云芝两种菌株,对秸秆分别进行固态发酵处理,在培养的 32 d 过程中,木质素降解酶类产生情况及木质素降解情况如图 1、图 2 所示。

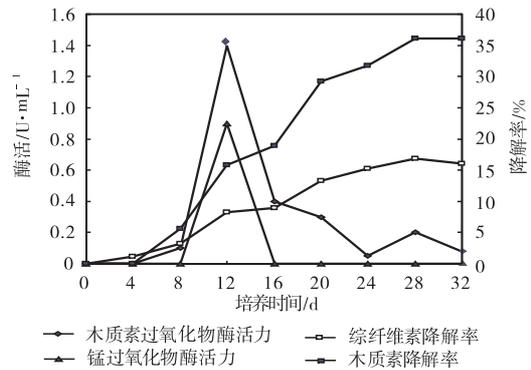


图 1 黄孢原毛平革菌对秸秆木质素的降解

Fig. 1 Degredation on lignin of straw by *P.chrysosporium*

由图 1 可以看出:黄孢原毛平革菌具有很强的产 LiP 和 MnP 的能力,在培养至第 12 天时酶活达到最高,之后活力开始降低。伴随着酶活的升高木质素与综纤维素的降解率开始迅速增大。在酶活力下降之后,降解率还保持平缓的升高趋势,在第 30 天左右降解率基本保持不变,此时木质素降解率为 36.05%,综纤维素降解率为 16.04%。

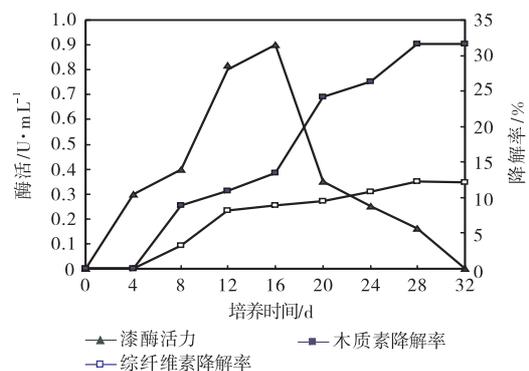


图 2 杂色云芝对秸秆木质素的降解

Fig. 2 Degradation on lignin of sftraw by *Coriolus versicolor*

由图 2 可以看出:杂色云芝具有很强的产漆酶能力,在培养至第 16 天时酶活达到最高,随后酶活慢慢下降。木质素降解率与综纤维素降解率逐渐增大,最终达到木质素降解率为 31.67%,综纤维素降解率为 12.10%。与黄孢原毛平革菌相比,二者降解木质纤维素的条件与效率不尽相同。杂色云芝对于木质素的降

解率低于黄孢原毛平革菌,并且对纤维素与半纤维素的降解率也均低于黄孢原毛平革菌,但对于木质素的降解选择性要高于黄孢原毛平革菌,分别为3.6和3.09.

### 2.2 双菌株联合降解秸秆木质素研究

以 2.1 中的研究结果表明,黄孢原毛平革菌和杂色云芝均能有效的降解木质素,但降解的效果不同,降解率与木质素降解选择性较低.为了提高木质素的降解率,使两个菌株之间彼此弥补不足,发挥各自优势,达到降解酶系完全,将两菌株联合起来进行固态培养降解.

将两种菌分别以接种孢子悬液和接种菌块的方法同时进行接种,将菌种接入秸秆固态培养基中,30℃下静止培养,定时取样测定酶活及木质纤维素等指标,结果如图3所示.

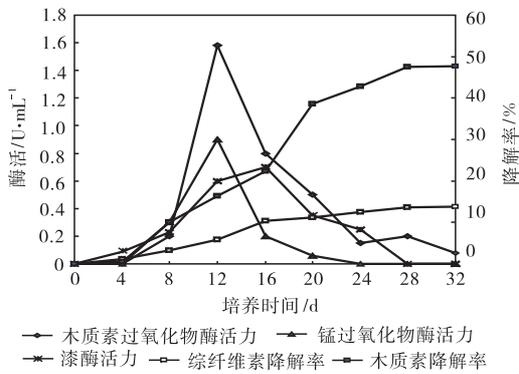


图 3 两菌联合发酵对木质素的降解

Fig. 3 Degradation on lignin of straw by two strains co-fermentation

从图 3 可以看出,在双菌株联合降解试验中,培养过程中有漆酶产生,但活力没有杂色云芝单独发酵所产酶活力高. LiP 和 MnP 的活力均高于单一菌株所产酶活力,但提高幅度不大.木质素降解率有明显的提高,达到 47.64%.对纤维素和半纤维素的降解率介于两菌株单独处理的降解率之间,没有显著的变化.对木质素的降解选择性明显高于单一菌株处理效果,达到 4.74.以上结果说明,双菌联合培养的降解效果要优于单一菌株固态培养的降解效果,是一种可行的生物预处理方法.

### 2.3 大规模堆积培养模拟实验降解秸秆木质素

由前面的实验结果可以看到,采用固态培养的方式可以有效的对木质素进行降解,但白腐菌生长缓慢,扩大培养较困难,使得生产过程难以工业化.大规模进行白腐菌处理时,为了减少杂菌的污染而进行灭菌成为关键.实验采用将蒸汽在木屑上喷射 15 s 进行表面灭菌.故采取蒸汽灭菌的方法,通过模拟工厂大规模堆积培养的实验条件,采取黄孢原毛平革菌和杂色云芝联合培养的方式,对秸秆进行生物降解,培养时间为 30 d.

由表 1 可知,木素降解率、纤维素降解率和半纤维素降解率都随着培养时间的增加而逐渐升高,尤其在 15~20 d 内,增幅显著,但脱木素选择性随着时间的变化不大.到第 30 天时,木素降解率为 32.54%,脱木素选择性为 2.58,表明能起到良好的降解木质素的作用.与前述摇瓶固态培养相比,虽然降解率与脱木素选择性均低于摇瓶条件,可能是由于缺少了固态培养基中加入的碳氮源,培养条件不如摇瓶发酵.

表 1 堆积培养后秸秆的木质纤维素降解率

Tab. 1 Degradation of lignin with cumulate incubation

处理时间/d	木素含量/%	纤维素含量/%	半纤维素含量/%	木素降解率/%	纤维素降解率/%	半纤维素降解率/%	脱木素选择性
0	15.17	40.83	30.81				
15	12.16	38.49	27.83	19.85	5.72	9.68	2.68
20	11.18	37.42	27.07	26.31	8.36	12.16	2.63
25	10.49	36.85	26.53	30.82	9.74	13.87	2.69
30	10.23	36.49	26.11	32.54	10.61	15.26	2.58

## 3 结 语

通过黄孢原毛平革菌和杂色云芝对秸秆固态培养 30 d 发现,黄孢原毛平革菌的木质素降解率达到 36.05%,脱木素选择性为 3.09;杂色云芝的木质素降解率为 31.67%,低于黄孢原毛平革菌,但脱木素选择

性略高,为 3.6.采取双菌联合固态培养的方法使木质素降解率有了显著的提高,达到 47.64%,对木质素的降解选择性明显高于单一菌种处理效果,达到 4.74.采用模拟大规模白腐菌堆积培养(厚度 30 cm)的方法降解秸秆木质素,培养 30 d,木质素降解率为 32.54%,脱木素选择性为 2.58.

(下转第 51 页)