

三株丝状真菌分解樟子松凋落物酶活性

宋福强¹ 范晓旭¹ 张星星¹ 宋瑞清^{2*}

(1. 黑龙江大学生命科学学院微生物重点实验室 黑龙江 哈尔滨 150080)

(2. 东北林业大学林学院 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要: 该研究以在樟子松凋落物层中高频出现的3株丝状真菌 *Alternaria* sp.、*Penicillium* sp. 和 *Pestalotiopsis* sp. 为供试菌株, 以樟子松新鲜落叶为作用底物, 通过发酵纯培养的方法, 测定了底物有机物质质量损失及发酵过程中产生的漆酶(Laccase)、锰过氧化物酶(MnP)、羧甲基纤维素酶(CMCase)和滤纸酶(FPA)酶活性变化, 并验证了酶活性与底物降解的关系。结果表明, *Alternaria* sp. 引起底物总有机物质质量损失最大, 且产生的漆酶、羧甲基纤维素酶和滤纸酶活性都较高; *Penicillium* sp. 产生的锰过氧化物酶活性最高。3株丝状真菌同属于真菌功能群中的木质纤维素分解者。

关键词: 丝状真菌, 凋落物, 降解率, 木质纤维素酶

Activities of Enzymes During the Litter of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* Degradation by Three Strains of Mycelial Fungi

SONG Fu-Qiang¹ FAN Xiao-Xu¹ ZHANG Xing-Xing¹ SONG Rui-Qing^{2*}

(1. Microbiology Key Laboratory of Heilongjiang University, Harbin, Heilongjiang 150080, China)

(2. College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040, China)

Abstract: Three strains of mycelial fungi, *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. and *Pestalotiopsis* sp., high- frequently isolated from litter of *Pinus sylvestris* var. *mongolica* were as the research strain,, the current deciduous needles were as the active zymolyte, the method of fermentation was used to assay the mass defect of zymolyte and the activities of enzymes including laccase, manganese peroxidase (MnP), carboxymethyl cellulase (CMCase) and filter paper activity (FPA) in fermenting process, and try to confirm the relationship between the activities of enzymes and the mass defect of zymolyte. The results show that the mass defect of zymolyte caused by *Alternaria* sp. is the highest. *Alternaria* sp. can produce highest activity of Laccase, CMCase and FPA. *Penicillium* sp. can produce highest activity of MnP. The three strains of mycelial fungi are all belong to lignocellulose-decomposing fungi of the group of functional fungi.

Keywords: Mycelial fungi, Litter, Decomposing rate, Lignocellulolytic enzymes

森林生态系统的稳定依赖于植物生长和凋落物分解之间长时期的平衡^[1]。凋落物的主要成分是木

质纤维素。真菌由于能够分解其它微生物所不能分解的木质纤维素基质^[2,3], 而成为森林凋落物的主要

基金项目: 国家“十一五”支撑项目(No. 2006BAD08A11105); 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金项目(No. 2007RFXXN047); 国家自然科学基金项目(No. 30571493, 30710103); 黑龙江大学学生学术科技创新项目(No. 247)

* 通讯作者: ✉ songrq1964@163.com

收稿日期: 2008-08-03; 接受日期: 2008-11-26

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

分解者,并在森林生态系统养分循环中起着重要的作用^[4]。目前,国内外关于分解菌在凋落物降解过程中释放出起关键作用的木质纤维素酶的报道很少。

樟子松 (*Pinus sylvestris* var. *mongolica*) 具有耐瘠薄、抗寒、速生、树干通直等特性,已经成为东北重要针叶造林树种之一。通常东北地区樟子松林内凋落层都比较厚,且蕴含着丰富的真菌资源^[5],而关于这些分解真菌对樟子松凋落物降解过程的研究还未见报道。

本研究采用发酵纯培养方法^[6-15],测定了樟子松凋落物中出现频率较高的3株丝状真菌 *Alternaria* sp.、*Penicillium* sp.和 *Pestalotiopsis* sp.在对樟子松新鲜落叶分解过程中羧甲基纤维素酶(Carboxymethyl cellulase, CMCase)、滤纸酶(Filter paper activity, FPA)、漆酶(Laccase)、锰过氧化物酶(Manganese peroxidase, MnP)活性变化趋势曲线和有机物质质量损失的变化,探讨了3株丝状真菌在该生物降解过程中,所产生木质纤维素酶机制以及与底物降解速率的相互关系,试图从酶学水平上进一步了解森林生态系统中凋落物的分解机制;同时,也希望筛选出分泌木质纤维素酶较高的菌株应用于生产。

1 材料与方法

1.1 供试菌株与凋落物来源

在黑龙江省帽儿山林场樟子松人工林(林龄10~12年)设立标准地,按照“之”字形路线多点采集凋落物。采用剖面取样法,根据凋落物的颜色、结构、分解程度等自上而下逐层采样,装入聚乙烯袋中并编号,放置在4℃冰箱中保存。采用稀释平板方法分离真菌,选取在凋落物未分解层(Litter layer)和发酵层(Fermentative layer)出现频率较高的3株丝状真菌 *Alternaria* sp.、*Penicillium* sp.和 *Pestalotiopsis* sp.作为研究菌株。各菌株在PDA斜面培养基扩繁,4℃冰箱保存。使用前制成菌悬液。

采集新鲜的樟子松落叶作为丝状真菌的分解底物。落叶在40℃烘箱中烘干7d,然后置于聚乙烯袋保存^[16]。

1.2 针叶分解试验

将烘干的针叶用机械捣碎器捣碎。称取0.5g针叶碎屑置于60℃环氧乙烷气中灭菌3h后^[17],加到

装有无菌的8.0mL、0.5%麦芽浸汁培养基的锥形瓶(50mL)中,并接种2.0mL菌悬液,在湿度90%、温度28℃黑暗条件下培养,以接种2.0mL无菌水作为对照处理,每个处理接种36个锥形瓶。自接种后的第2天开始取样,每次取3个锥形瓶,每隔2d取1次样直至第30天,第45天取最后一次^[18]。

1.3 质量损失计算及酶活力测定

往取样的锥形瓶中加入10mL提前预冷的醋酸钠缓冲溶液(50mmol, pH 6.0),置于25℃旋转摇床、180r/min振荡20min。将混合液经烘干至恒重的定性滤纸过滤,滤液置于4℃冷冻离心机10000g离心10min。取上清液作为粗酶液测定酶活性,离心管底的沉淀物与第一次的过滤残渣一同烘干至恒重(72℃)。

样品质量损失率(%)=[(样品的初始干重-样品处理后的干重)/样品初始的干重]×100%

平均降解速率(%)=[总有机质质量损失率/培养天数]×100%

MnP(EC 1.11.1.13)酶的测定采用酚红法^[19],一个单位的酶活性定义每分钟每毫升反应液的吸光度值上升0.1个单位。漆酶(EC 1.10.3.2)的测定采用愈创木酚为底物^[20],定义每分钟氧化1μmol愈创木酚所需的酶量为1个酶活力单位。

CMCase(EC 3.2.1.4)和FPA(EC 3.2.1.91)的测定依据Rodriguez的方法^[21],测定羧甲基纤维素钠和滤纸条(Whatman No.1)释放的还原糖。还原糖的测定采用3,5-二硝基水杨酸的方法^[22],然后根据绘制的葡萄糖溶液的标准曲线计算还原糖量。酶活力计为:酶活力(U/mL)=葡萄糖含量(mg)×酶液总体积(mL)×5.56/反应液中酶液加入量(mL)×时间(h)

2 结果与分析

2.1 总有机质(total organic material, TOM)的质量损失

在整个发酵过程中,TOM质量损失率随着时间延长而不断增加(图1)。在开始11d内,3株丝状真菌都表现出较高的日平均降解率,而在11d至45d间,各菌株的日平均降解率显示出差异,因此,将发酵过程人为的分为前期(第1天~第11天)和后期(第11天~第45天)两个阶段,以便对研究结果进行分析讨论。

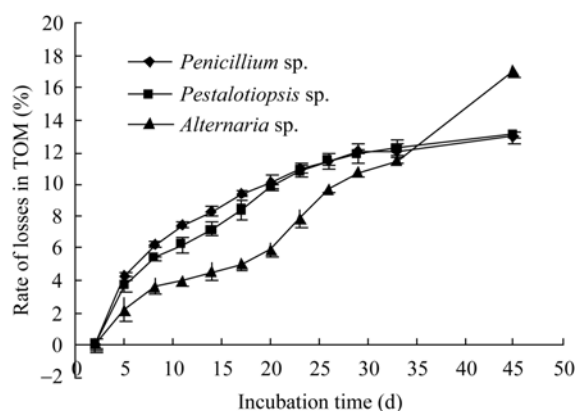


图1 三株丝状真菌引起的 TOM 质量损失率的变化
Fig. 1 Loss of TOM during the degradation by three filamentous fungi

从图1可知,在前期 *Penicillium* sp. 引起凋落物 TOM 质量损失率最高,为 7.48%; 其次是 *Pestalotia* sp. 引起凋落物 TOM 质量损失率为 6.20%, *Alternaria* sp. 引起 TOM 质量损失相对较低,为 3.96%。但是到后期, *Alternaria* sp. 引起 TOM 质量损失率却最高,为 17.03%。 *Alternaria* sp. 在整个分解过程中后期分解速率要比其前期明显快得多。由于森林凋落物的降解与微生物产生的木质素酶和纤维素酶有密切的关系,因此可以从 CMCase、FPA、Laccase 和 MnP 这 4 种酶的酶活性来揭示不同真菌对樟子松凋落物具有不同的分解速率。

2.2 木质素酶的变化

在整个发酵过程中漆酶的活性整体一直保持在较低的水平内。在第 8 天时,3 株真菌的漆酶活性都达到最高峰值: *Alternaria* sp. 产生漆酶的最高活性为 0.086 U/mL, 而 *Penicillium* sp. 和 *Pestalotia* sp. 的酶活性最高分别为 0.047 U/mL 和 0.045 U/mL。 *Alternaria* sp. 在分解过程中分泌的漆酶活性总体上显著高于其它两株真菌(如图 2)。

三株真菌分泌的 MnP 酶活性在第 14 天都达到最大值, *Pestalotia* sp. 和 *Alternaria* sp. 的 MnP 酶活性分别为 0.046 U/mL 和 0.036 U/mL。 *Penicillium* sp. 的酶活性较其它两株菌高,为 0.064 U/mL。在整个发酵过程中,3 株真菌分泌的 MnP 酶都有比较明显的两次峰值,第 1 个峰值同时出现在第 14 天,第 2 个峰值出现在第 25 d 与第 30 d 之间(如图 3)。

2.3 纤维素酶的变化

三株丝状真菌分泌的 CMCase 和 FPA 的酶活性变化趋势相似。从图 4 和图 5 可知, *Pestalotia* sp. 和

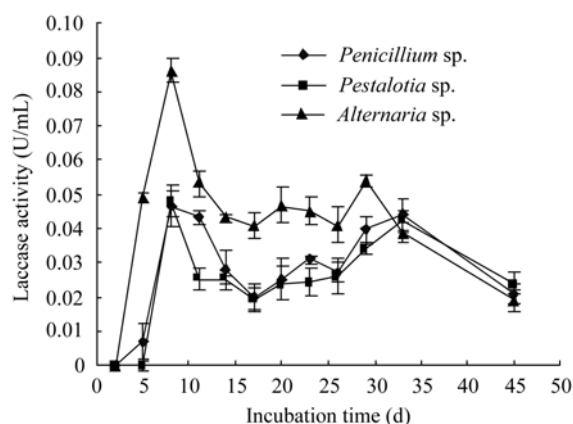


图2 三株真菌在降解过程中分泌漆酶活性的变化
Fig. 2 The changes of laccase activities during the degradation

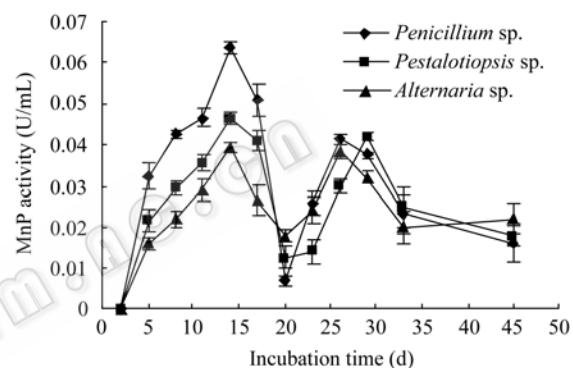


图3 三株真菌在降解过程中分泌 MnP 酶活性的变化
Fig. 3 The changes of MnP activities during the degradation

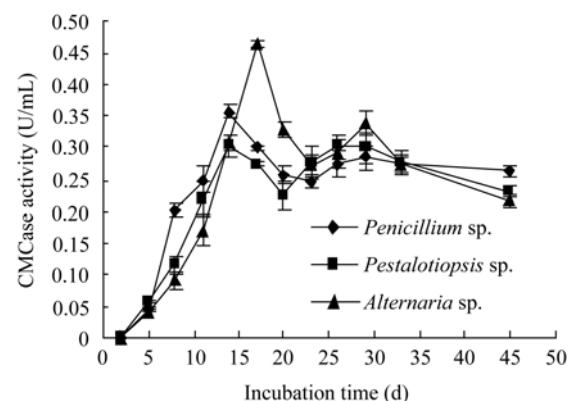


图4 三株真菌在降解过程中分泌 CMCase 活性的变化
Fig. 4 The changes of CMCase activities during the degradation

Penicillium sp. 在开始 14 d 内分泌的 CMCase 和 FPA 酶活性比 *Alternaria* sp. 高。在凋落物分解前期,真菌主要消耗利用针叶中已经存在的非木质化的纤维素和可直接利用的可溶性碳水化合物等物质,所以纤

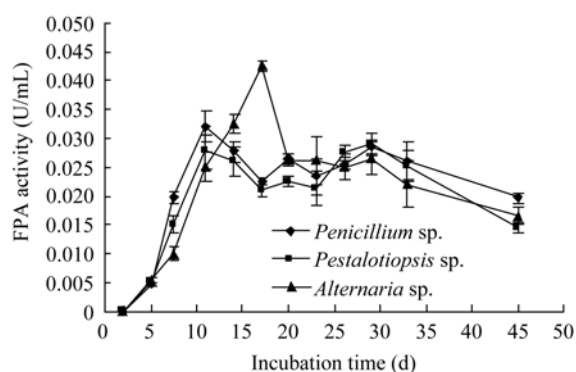


图5 三株真菌在降解过程中分泌 FPA 活性的变化

Fig. 5 The changes of FPA activities during the degradation

纤维素酶活性的高低决定了前期的分解速率。这可能是 *Pestalotia* sp. 和 *Penicillium* sp. 前期平均分解速率较高的原因。*Alternaria* sp. 在第 17 天出现峰值, 为 0.46 U/mL。

三株真菌产生的 FPA 的酶活性均较 CMCase 的酶活性低。*Alternaria* sp. 在第 17 天分泌的 FPA 酶活性最高, 为 0.042 U/mL; *Pestalotia* sp. 和 *Penicillium* sp. 产生的酶活性最大值较前者低, 都分别在第 11 天和第 29 天出现 2 次峰值。

3 结果与讨论

在凋落物降解过程中, 真菌对针叶中可直接利用的成分(如一些简单的碳水化合物)是有限的, 这些可直接利用的成分随着真菌菌丝的生长而逐渐地被消耗掉。所以在降解后期, 针叶中坚韧的木质素以及木质化的纤维素由于很难被降解而不断地积累。由于 *Alternaria* sp. 分泌的漆酶活性最高, 所以该菌株能够更有效地进行脱木质化作用后, 纤维素才能被纤维素酶降解, 转化为可被微生物直接吸收利用的成分, 从而降解作用才能继续进行下去。所以 *Alternaria* sp. 在后期的降解速率明显地高于其它两个菌株。同时根据试验结果, *Alternaria* sp. 的 CMCase 和 FPA 在第 17 天才达到最高, 而且高于 *Pestalotia* sp. 和 *Penicillium* sp.。从而推测, 由于木质素酶和纤维素酶的协同作用, 致使 *Alternaria* sp. 后期对针叶的分解速率显著高于前期, 且高于其它两个菌株的后期分解速率。*Pestalotia* sp. 和 *Penicillium* sp. 两个菌株后期的降解速率下降可能是因为它们分泌的漆酶活性低, 使得积累下来的较难降

解的木质素物质限制了菌丝的生长, 这可能也成为在后期致使 FPA 酶活性下降的原因。

第 2 次峰值的出现可能是因为菌丝自溶而致使原来束缚在细胞膜上相应的胞内酶被释放出来的缘故。这 3 株丝状真菌引起樟子松落叶的 TOM 质量损失都在第 45 天达到最大值, 而它们的 MnP、Laccase、CMCase 和 FPA 酶活性的最高值都出现在此之前, 表明落叶的降解是多种酶相互协同作用的过程。*Alternaria* sp. 产生漆酶的酶活性最高, 而且试验中并未添加一些诸如土温 80、阿魏酸、 Cu^{2+} 或者二甲代苯胺等诱导因子^[23]。这表明 *Alternaria* sp. 是一株比较有效的生产漆酶的丝状真菌。

Takashi Osono 等^[17]根据对底物的选择利用, 将真菌分为 3 个功能群: 木质纤维素分解者, 其同时降解不同比例的木质素和糖类而使凋落物质量显著损失; 纤维素分解者, 其优先分解糖类而使木质素的质量损失较少以至可以忽略; 只能依靠可溶性糖生长的真菌, 其不能分解高分子结构。据图 4、图 5 数据显示, CMCase 和 FPA 尤其是 CMCase 明显高于木质素酶活性, 因此 TOM 质量损失大部分可能为糖类损失, 同时, 推断 *Alternaria* sp.、*Penicillium* sp. 及 *Pestalotiopsis* sp. 同属于木质纤维素分解者。本试验中应用森林针叶作为发酵底物, 为工业上利用廉价的营养底物生产漆酶以及将木质纤维素底物转化为有用的产物提供理论依据, 同时也希望为我国森林凋落物分解动态的研究提供一些新的思路。

参考文献

- [1] Satchell JE. Litter-interface of animate/inanimate matter//Dickinson CH, Pugh GJ F. Biology of Plant Litter Decomposition. London: Academic Press, 1974.
- [2] Kjeller A, Struwe S. Microfungi in ecosystems: fungal occurrence and activity in litter and soil. *Oikos*, 1982, **39**: 389-422.
- [3] Cooke RC, Rayner ADM. Ecology of saprotrophic fungi. London, UK: Longman, 1984, p.415.
- [4] Swift MJ, Heal OW, Anderson JM. Decomposition in terrestrial ecosystems. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 1979, p.372.
- [5] 周秀华, 宋瑞清. 樟子松树栖真菌生物相的研究. 东北林业大学硕士论文, 2004.
- [6] Lindeberg G. Über die Physiologie ligninabbauender Bodenhymenomyeten. *Symb Bot Ups*, 1944, **8**: 1-183.
- [7] Lindeberg G. On the decomposition of lignin and cellulose in litter caused by soil inhabiting Hymenomyetes.

- Ark Bot, 2006, **33**: 1–16.
- [8] Hering TF. Fungal decomposition of oak leaf litter. *Trans Br Mycol Soc*, 1967, **50**: 267–273.
- [9] De-Boois HM. Fungal development on oak leaf litter and decomposition potentialities of some fungal species. *Rev Ecol Biol Sol*, 1976, **13**: 437–448.
- [10] Dix NJ, Simpson AP. Decay of leaf litter by *Collybia peronata*. *Trans Br Mycol Soc*, 1984, **83**: 37–41.
- [11] Kuiper TW, Bokeloh DJ. Ligninolysis and nitrification in vitro by a nitrotolerant and a nitrophobic decomposer basidiomycete. *Oikos*, 1994, **70**: 417–420.
- [12] Miyamoto T, Igarashi T, Takahashi K. Lignin-degrading ability of litter-decomposing basidiomycetes from *Picea* forests of Hokkaido. *Mycoscience*, 2000, **41**: 105–110.
- [13] Takashi Osono, Hiroshi Takeda. Comparison of litter decomposing ability among diverse fungi in a cool temperate deciduous forest in Japan. *Mycologia*, 2002, **94**: 421–427.
- [14] Koide K, Osono T, Takeda H. Fungal succession and decomposition of *Camellia japonica* leaf litter. *Ecol Res*, 2005, **20**: 599–609.
- [15] Koide K, Osono T, Takeda H. Colonization and lignin decomposition of *Camellia japonica* leaf litter by endophytic fungi. *Mycoscience*, 2005, **46**: 280–286.
- [16] Takashi Osono, Hiroshi Takeda. Fungal decomposition of *Abies* needle and *Betula* leaf litter. *Mycologia*, 2006, **98**(2): 172–179.
- [17] Takashi Osono, Yu Fukasawa, Hiroshi Takeda. Roles of diverse fungi in larch needle-litter decomposition. *Mycologia*, 2003, **95**(5): 820–826.
- [18] 郝杰杰, 宋福强, 田兴军, 等. 几株半知菌对马尾松落叶的分解. *林业科学*, 2006, **42**(11): 69–75.
- [19] Orth AB, Royse DJ, Tien M. Ubiquity of lignin degrading peroxidases among various wood degrading fungi. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59**: 4017–4023.
- [20] Reddy GV, Babu P Ravindra, Komaraiah P. Utilization of banana waste for the production of lignolytic and cellulolytic enzymes by solid substrate fermentation using two *Pleurotus* species. (*P. ostreatus* and *P. sajor-caju*). *Process Biochem*, 2003, **38**(10): 1457–1462.
- [21] Rodriguez H, Volfova O. Formation and location of cellulases in a cellulomonas culture on bagasse. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1984, **19**: 134–138.
- [22] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. *Anal Chem*, 1959, **31**: 426–428.
- [23] 董旭杰, 曹福祥, 陈 静, 等. 3 种白腐菌木质素降解酶的比较. *中南林业科技大学报*, 2007, **6**(3): 131–136.

稿件书写规范

专论与综述论文的撰写要点

专论与综述是本刊重要栏目之一, 主要反映国内外微生物学及相关领域学科研究最新成果和进展, 其内容要求新颖丰富, 观点明确, 论述恰当, 应包含作者自己的工作内容和见解。因此, 作者在动笔之前必须明确选题, 一般原则上应选择在理论和实践中具有重要意义的学科专题进行论述。围绕专题所涉及的各个方面, 在综合分析和评价已有资料基础上提出其演变规律和趋势, 即掌握其内在的精髓, 深入到专题研究的本质, 论述其发展前景。作者通过回顾、观察和展望, 提出合乎逻辑并具有启迪性的看法和建议。另外, 作者也可以采用以汇集文献资料为主的写作方法, 辅以注释, 客观而有少量评述, 使读者对该专题的过去、现在和将来有一个全面、足够的认识。

需要特别说明的是: 在专论与综述中引用的文献应该主要是近 5 年国内外正式发表的研究论文, 引用文献数量不限。