

竹笋壳降解过程的微观表征

张亚强, 张萍, 牛春* (宁夏泰瑞制药股份有限公司, 宁夏银川 750101)

摘要 [目的]验证混合菌对竹笋壳的降解效果。[方法]运用红外光谱分析(IR)、气质联用(GC-MS)和扫描电子显微镜技术(SEM)对降解前后竹笋壳的成分和表面结构变化进行了分析。[结果]混合菌分泌的水解酶先降解竹笋壳表面的蜡质、半纤维素和纤维素,甲基化和氧化竹笋壳木质素侧链,随后破坏木质素苯环。[结论]竹笋壳表面硅结构的裸露程度可以作为竹笋壳降解程度的评价指标。

关键词 竹笋壳;混合菌;降解;微观表征

中图分类号 TS209 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2017)04-0006-02

Microstructure Characterization of Degradation Process of Bamboo Shoot Shell

ZHANG Ya-qiang, ZHANG Ping, NIU Chun* (Ningxia Tairui Pharmaceutical Co., Ltd., Yinchuan, Ningxia 750101)

Abstract [Objective] The aim was to verify degradation process of bamboo shoot shell by mixed bacteria. [Method] We analyzed the composition and surface structure of bamboo shoot shell before and after degradation by IR, GC-MS and SEM. [Result] The hydrolytic enzymes secreted by mixed bacteria firstly degraded the wax, hemicellulose and cellulose of bamboo shoot shell surface, and methylated and oxidized the lignin side chain of bamboo shoot shell, and then destroyed the lignin benzene. [Conclusion] The bare degree of silicon structure of bamboo shoot shell surface could be taken as the evaluation index of bamboo shoot shell degradation degree.

Key words Bamboo shoot shell; Mixed bacteria; Degradation; Microstructure characterization

国内外关于真菌降解秸秆的研究较多,但研究重点还停留在筛选高效降解菌或通过研究真菌培养条件等来实现产酶的最优化^[1-3],而对降解过程和机理的研究则比较少见。有研究指出,真菌对秸秆的降解作用是通过其产生的2种胞外酶系:纤维素、半纤维素水解酶系;木质素降解酶系(锰过氧化物酶、木质素过氧化物酶和漆酶)来实现^[4]。但这些酶作用后秸秆结构的变化还需进一步研究。为深入了解降解过程与机理以及降解前后秸秆结构和成分的变化,笔者运用红外光谱分析(IR)、气质联用(GC-MS)和扫描电子显微镜技术(SEM)对降解前后竹笋壳的成分和表面结构变化进行了分析。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验材料与试剂。竹笋壳购自安徽宁国茂盛源食品有限公司;平菇、黑曲霉保藏于宁夏泰瑞制药股份有限公司;试剂均为分析纯,购自国药集团。

1.1.2 培养基。竹笋壳固态发酵营养液:酒石酸铵22.00 g, KH_2PO_4 20.00 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 13.80 g, CaCl_2 1.00 g, NaCl 0.60 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.35 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mg, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 110 mg, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mg, $\text{AlK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 6 mg, H_3BO_3 6 mg, VB_1 100 mg, 麸皮0.03 g, 吐温-80 1.10 g, 愈创木酚0.50 mmol, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, 定容到1 L。

1.1.3 仪器。SCION SQ 单四级杆气质联用仪为布鲁克·道尔顿公司产品;Nicolet 67 傅里叶红外光谱仪为美国 Thermo Nicolet 公司产品;JSM-6490LV 扫描电子显微镜为日本电子制造。

1.2 方法

1.2.1 竹笋壳固态混合发酵。竹笋壳洗净,风干,粉碎至60

目,称5.00 g置于250 mL锥形瓶中;加入初始pH为5.5的营养液12 mL,调节培养基含水量为60%;先接种活化的平菇菌丝悬液培养176 h,再接种活化的黑曲霉孢子悬液共同培养11 d;平菇和黑曲霉总接种量为20%,接种比例为3:2;培养温度为28℃。

1.2.2 降解前后竹笋壳结构和成分的变化。

1.2.2.1 IR 分析。培养完成后,取适量发酵培养基,用pH 4.8的HAc-NaHAc缓冲液50 mL浸泡3 h,过滤,滤渣置于105℃烘箱中烘干备用。称适量样品,添加基质量100倍的KBr粉末制盐片,傅里叶红外光谱仪扫描。

1.2.2.2 GC-MS 分析。添加200 mL蒸馏水到样品中,200 r/min振荡1 h,用8层纱布过滤,用 CH_2Cl_2 萃取滤液3次,蒸发浓缩,0.45 μm有机膜过滤。气质联用条件:色谱柱为DB-5MS(0.25 mm×60 m,0.25 μm);载气为高纯氮;载气流量为1.00 mL/min;程序:50℃保持2 min,5℃/min升温到280℃保持3 min。

1.2.2.3 SEM 分析。先用蒸馏水清洗样品,再用乙醇和丙酮清洗,冷冻干燥后得样品,喷金,扫描电子显微镜观察。

2 结果与分析

2.1 IR 分析结果 由图1可知,经混合菌降解后,竹笋壳的结构发生了明显改变。综合有关学者对秸秆类物质的IR分析结果可以得出^[5],竹笋壳在降解前后,主要是蜡质的剥落和木质纤维素类物质发生了较大变化。蜡质的剥落和纤维素、半纤维素的降解引起了一 CH_3 、一 CH_2 和C—H键的减少,导致3 380和2 920 cm^{-1} 处的红外吸收发生了变化。而木质素先是支链甲基化、侧链氧化,之后是苯环解环,所以1 550 cm^{-1} 处的红外吸收也发生了明显变化。上述过程进行到一定程度后,竹笋壳中的硅结构便随着包裹它的成分的剥离而裸露出来,这从1 050 cm^{-1} 处聚合态硅发生转化也得到了充分证明。

作者简介 张亚强(1988—),男,甘肃平凉人,从事微生物发酵研究。

* 通讯作者,从事微生物选育及优化研究。

收稿日期 2016-12-07

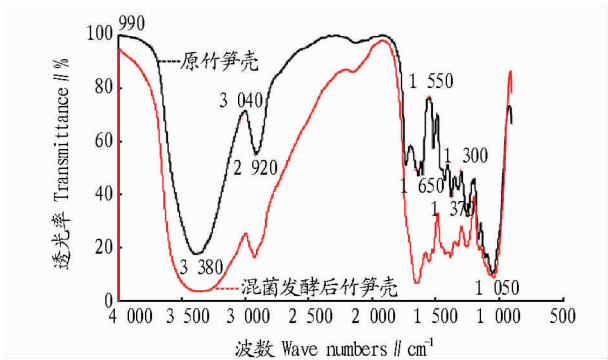


图1 降解前后竹笋壳 IR 图谱

Fig.1 IR map of bamboo shoot shell before and after degradation

2.2 降解前后竹笋壳洗脱液的 GC-MS 分析结果 竹笋壳表面被角质蜡状膜包裹着,一般由醛类、脂溶性的脂肪酸、脂类、烷烃、酮类和脂肪醇组成^[6]。细胞壁填充物中还含有硅类化合物。而原始竹笋壳洗脱液中的硅类物质、长链脂肪酸和长链脂肪烃正好印证了这些结构(图2),说明竹笋壳有部分表面结构在振荡提取时可能被洗脱下来溶于水中,从而被萃取出来。

和原始竹笋壳相比,降解后竹笋壳洗脱液中出现了硅类化合物这一新物质(图3)。随着木质纤维素类物质从竹笋壳表面脱落,硅结构便裸露出来,有少量在机械振荡作用下被洗脱下来萃取到水中。硅氧化物这一物质出现在洗脱液中,从一定程度上证明了竹笋壳的纤维结构已被混合菌有效降解。

2.3 SEM 分析 由图4可知,原始竹笋壳表面结构规整紧密,其上突出的大圆点和小圆点是竹笋壳中的硅结构^[7],硅

结构表面还有一层包裹竹笋壳的致密蜡质结构^[8];降解后竹笋壳表观结构被破坏,出现了很多空洞和裂缝,硅结构也越来越明显裸露。

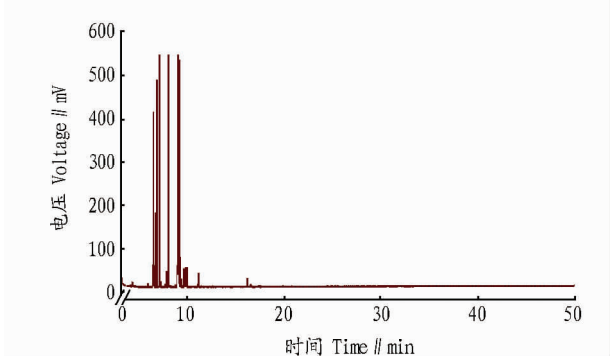


图2 原始竹笋壳洗脱液的 GC-MS 分析图谱

Fig.2 GC-MS results of original bamboo shoot shell eluent

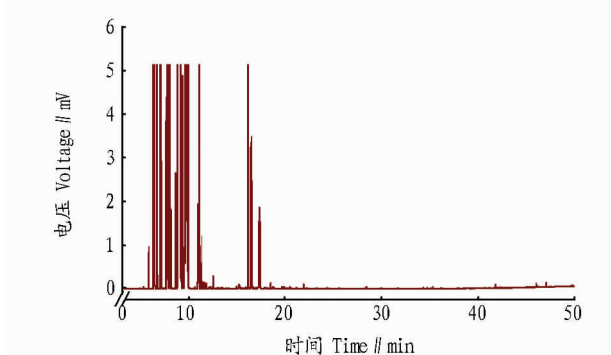
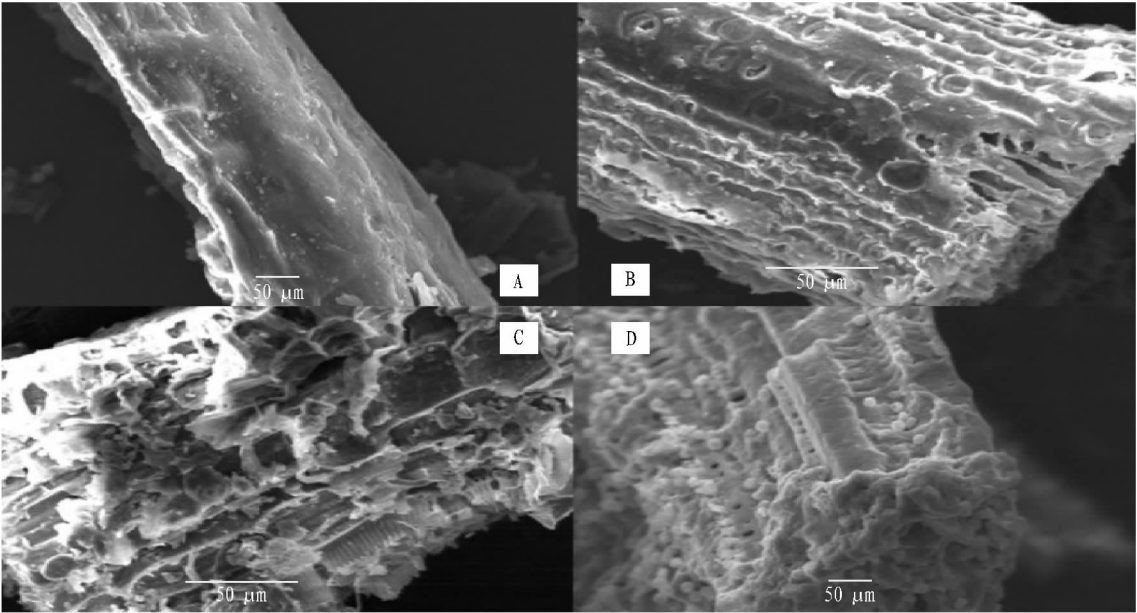


图3 降解后竹笋壳洗脱液 GC-MS 分析图谱

Fig.3 GC-MS results of bamboo shoot shell eluent after degradation

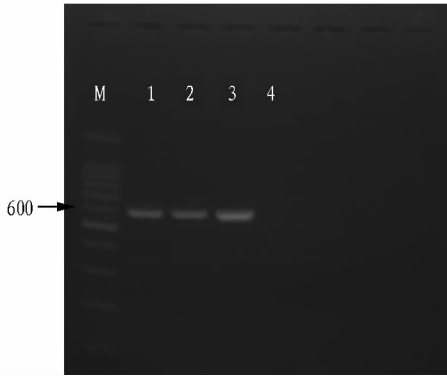


注:A. 降解前竹笋壳;B、C、D. 降解后竹笋壳

Note:A. The bamboo shoot shell before degradation;B,C,D. The bamboo shoot shell after degradation

图4 降解前后竹笋壳表面的扫描电镜结果

Fig.4 Scanning electron microscopy of bamboo shoot shell surface before and after degradation



注: M. Mark; 1~3. 分离物 bh-1; 4. ddH₂O

Note: M. Mark; 1~3. Isolate bh-1; 4. ddH₂O

图6 分离物 bh-1 PCR 扩增产物

Fig. 6 The PCR products of strain bh-1

镰刀菌属是进境水果、种苗等植物产品中经常截获的有害生物,而长期以来该属病原菌的命名较混乱,加之其病原菌种类较多,传统的形态学鉴定方法为真菌分类研究提供了必要前提,但存在外界因素和人为因素的局限性,尤其分离培养物的培养性状不典型或者不产孢时,为该菌的口岸检疫鉴定工作增加了一定困难。

镰刀菌属真菌可侵染农作物、观赏植物等 100 余种,引起植物根腐、茎腐、穗腐等多种病害,导致植物萎蔫死亡^[3]。层出镰刀菌又称层生镰刀菌或再育镰刀菌,该菌寄主广泛,可侵染玉米、向日葵、大蒜、瓜类等多种作物及观赏植物^[4-7]。国内对百合病害的研究中少有报道该菌,前人报道了云南百合、龙牙百合、甘肃百合、江西百合枯萎病的主要致病菌均为尖孢镰刀菌^[1,8-10];李诚等^[11]报道兰州百合枯萎病病原为尖孢镰刀菌、串珠镰刀菌(*F. moniliforme*)和茄腐皮镰刀菌(*F. solani*)。在国外研究中,Prados-ligero 等^[12]报道了

Fusarium proliferatum 引起西班牙百合枯萎病。该研究采用真菌利用 ITS 通用引物,扩增百合种球中分离物 bh-1 的 DNA,扩增产物进行测序,所得序列与 GenBank 中的核酸序列进行比对,初步确定病原菌种类,结合菌落、分生孢子、培养性状等形态学特征,查阅相关文献资料,确定分离物 bh-1 为层出镰刀菌(*F. proliferatum*),这与 Prados-ligero 等^[12]的研究结论一致。该研究将传统的形态学鉴定和分子生物学技术相结合,可以快速地对层出镰刀菌进行鉴定,兼顾鉴定检疫的效率和质量,为层出镰刀菌的鉴定和进境口岸检疫提供理论依据。

参考文献

- [1] 杨秀梅,王继华,王丽花,等. 百合枯萎病病原鉴定与 ITS 序列分析[J]. 西南农业学报,2010,23(6):1914-1916.
- [2] 丁丁,吕长平,刘飞,等. 百合枯萎病研究进展[J]. 江苏农业科学,2009(3):128-130.
- [3] 陈剑山. 来自海南岛的镰刀菌的种类鉴定[D]. 海口:华南热带农业大学,2007.
- [4] 卢维宏,黄思良,陶爱丽,等. 玉米穗腐病样品中层出镰刀菌的分离与鉴定[J]. 植物保护学报,2011,38(3):233-239.
- [5] 高婧,张园园,王凯,等. 向日葵枯萎病菌的分离鉴定及其生物学特性[J]. 中国油料作物学报,2016,38(2):214-222.
- [6] 李旭双,陈典,梁誉,等. 大蒜干腐病病原菌的分离鉴定[J]. 中国蔬菜,2012,1(20):88-93.
- [7] 袁微微,李新凤,高俊明,等. 山西省瓜类作物根茎部镰刀菌的分离与鉴定[J]. 山西农业科学,2013,41(3):246-250,258.
- [8] 潘其云,朱明德,邓建玲,等. 百合镰刀菌枯萎病的发生与防治[J]. 上海农业科技,2004(3):103-239.
- [9] 邹一平,周蓉,杨士杰,等. 镰刀菌与根螨在食用百合鳞茎上的协同侵染及防治[J]. 江苏农业科学,2006(6):135-138.
- [10] 梁巧兰,徐秉良,刘艳梅,等. 观赏百合根腐病病原鉴定及药剂筛选[J]. 甘肃农业大学学报,2004,39(1):25-28.
- [11] 李诚,李俊杰. 百合枯萎病病原菌鉴定[J]. 植物病理学报,1996,26(2):192-193.
- [12] PRADOS-LIGERO A M, BASALLOTE-UREBA M J, MELERO-VARA J M. First report of *Fusarium oxysporum* f. sp. lili and *F. proliferatum* affecting *Lilium* crops in Spain [J]. Tropical plant pathology, 2008, 33(3):9.

(上接第7页)

3 结论

混合菌降解竹笋壳的微观过程基本如下:混合菌分泌的水解酶先将竹笋壳表面的蜡质、半纤维素和纤维素进行降解,对木质素进行侧链甲基化和氧化,使竹笋壳表面出现裂痕,内部结构裸露,随后破坏木质素苯环,菌丝进入竹笋壳内部,释放木质纤维素降解酶系^[9]。

参考文献

- [1] 黄丹莲,曾光明,黄国和,等. 白腐菌固态发酵条件最优化及其降解植物生物质的研究[J]. 环境科学学报,2005,25(2):232-237.
- [2] 王洪媛,范丙全. 三株高效秸秆纤维素降解真菌的筛选及其降解效果[J]. 微生物学报,2010,50(7):870-875.
- [3] XIONG X P, WEN X H, BAI Y N, et al. Effects of culture conditions on ligninolytic enzymes and protease production by *Phanerochaete chrysosporium* in air[J]. Journal of environmental sciences, 2008, 20(1):94-100.

- [4] SÁNCHEZ C. Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi[J]. Biotechnology advances, 2009, 27(2):185-194.
- [5] 白洪志,杨谦,张鲁进. 纤维素降解菌筒青霉 H-11 的筛选及酶学特性的研究[J]. 华北农学报,2007,22(3):160-162.
- [6] 王仁佑,刘剑潇,黄红丽,等. 鼠李糖脂对两株木质素降解菌产酶能力的影响[J]. 湖南大学学报(自然科学版),2008,35(10):70-74.
- [7] ZENG G M, YU M, CHEN Y N, et al. Effects of inoculation with *Phanerochaete chrysosporium* at various time points on enzyme activities during agricultural waste composting [J]. Bioresource technology, 2010, 101(1):222-227.
- [8] RODRÍGUEZ GOUTO S, MDEDES D, SANROMÁN M A. Optimum stability conditions of pH and temperature for ligninase and manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. Application to *in vitro* decolorization of Poly R-478 by MnP[J]. World journal of microbiology and biotechnology, 2006, 22(6):607-612.
- [9] 高大文,文湘华,钱易. 白腐真菌培养条件对其分泌木质素降解酶的影响[J]. 中国环境科学,2005,25(5):572-575.