

微生物在杜仲叶胶提取中的作用研究

张 檀¹, 郑瑞杰¹, 李晓明², 杨 祥³, 李 茜¹

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 西北农林科技大学, 资环学院, 陕西 杨陵 712100;
3. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要: 研究不同真菌微生物在提胶过程中对杜仲叶纤维素的分解效果, 从而筛选出适合于杜仲叶发酵分解的菌类。结果表明, 黑曲霉 BN 易于分解杜仲叶, 且经其发酵处理后胶得率可提高 13.3%。利用酸碱处理法测定的粗纤维素含量可作为衡量微生物对杜仲叶分解能力的指标。

关键词: 杜仲胶; 发酵; 纤维素分解菌; 木质素分解菌; 粗纤维素

中图分类号: S789.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7461(2006)03-0101-04

A Study on the Function of Microorganism in Extracting Gutta-percha

ZHANG Tan¹, ZHENG Rui-jie¹, LI Xiao-ming², YANG Xiang³, LI Qian¹

(1. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. College of Resources and Environment, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

3. College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: The effect of different fungi on the decomposition of cellulose in the leaves of *Eucommia ulmoides* were studied to select suitable ones for the extraction of gutta-percha. The results showed aspergillus niger BN was the optimal fungus, and the productive rate of gutta-perch increased 13.3%. Acid-base treatment was used to measure the change of coarse cellulose, estimating decomposing degree of *E. ulmoides* leaves.

Key words: gutta-perch; fermentation; cellulolytic fungi; lignin fungi; coarse cellulose

杜仲 (*Eucommia ulmoides*) 是中国特有的名贵经济树种, 也是世界上适应范围最广的重要胶源植物^[1~5]。杜仲胶是产于杜仲树的一种天然高分子材料, 它独有的“橡—塑二重性”使其应用领域十分广阔^[5~8], 但因杜仲叶含胶量低、提胶工艺复杂、生产成本高、产胶率低、环境污染严重等特点, 严重限制了杜仲胶及高技术产品的开发利用。

杜仲叶胶细胞的分布与微管系统密切相关^[9~11]。微管束组织主要是由纤维素、半纤维素、木质素及果胶等成分组成。除了酸、碱能水解微管束使胶体从组织中萃取出来外, 从理论上讲, 纤维素酶和木质素酶应该能起到相同的作用。有关利用纤维素和木质素分解菌进行发酵, 提高叶片的分解效果方面的研究至今未见报道。本试验以杜仲叶为材料, 用纤维素与木质素分解菌等对其进行接种试验, 目的是研究不同菌种对杜仲叶分解效果及经不同菌种发

酵分解后对提胶的影响, 探讨微生物在杜仲叶胶提取中的作用及纤维素对杜仲叶分解能力的指标, 比较筛选适合于分解杜仲叶片的菌类, 以便为进一步的研究和提高目前杜仲叶胶生产中所采用的自然发酵的效果提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 试验所用杜仲叶于 2004 年 10 月采自西北农林科技大学校园内。

1.1.2 菌种 纤维素分解菌为康氏木霉 (*Trichoderma koningii*)、绿色木霉 (*T. viride*), 菌种由陕西省微生物研究所提供; 黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、绿色木霉 1 (*T. viride* 1) 菌种由西北农林科技大学微生物实验室提供; 黑曲霉 BN (*A. niger* BN) 由中国农业大学提供。木质素分解菌为葡萄白腐 (*Conio-*

收稿日期: 2005-11-18 修回日期: 2005-12-22

基金项目: 杨凌示范区农业专项 (2003-16)。

作者简介: 张 檀 (1957-), 女 河南延津人, 副教授, 主要从事野生植物资源保护与利用的教学和研究。

thyrium diptodictta)、平菇(*Pleurotus ostreatus*)，菌种由西北农林科技大学微生物实验室提供。

1.2 方法

1.2.1 菌种活化 将斜面保藏的菌种移接到改良PDA 斜面培养基上进行活化，于 30℃下培养 3 d，活化 2 次，备用。

1.2.2 菌悬液制备 将活化 2 次的各菌种接入到装有 400 mL 无菌水的三角瓶中，每瓶接 1 支试管菌种。平菇菌不制菌悬液，直接接种于材料。

1.2.3 材料处理 将杜仲叶揉搓至 0.2~0.6 cm² 片状，并有絮状胶团出现，少量叶肉组织呈粉末状。称取材料 20 g 装于 500 ml 三角瓶中，加适量水使其湿润。平菇菌处理材料需按比例另加蔗糖(1%)、麸皮(25%)、CaCO₃(1%)、KH₂PO₄(1.5%)、MgSO₄·7H₂O(0.5%)，混匀加盖棉塞后于 121℃下灭菌 2 h，备用。

1.2.4 接种发酵 所制备菌悬液加入处理过的材料中，加入量以材料全部蘸有菌悬液为宜，不宜过多。无菌水处理作对照(CK₁)。平菇菌直接接种于材料，接种量为每试管菌种 3 瓶，加无菌水和等量的平菇营养配方成分作对照(CK₂)。各处理重复 3 次，置于 30℃下培养 25 d，每天观察并记录发酵情况。

1.2.5 指标测定 发酵处理过的材料挤出发酵液，过滤澄清后定容到 100 mL，备用。另称取原材料(CK₃)和按比例添加了平菇发酵配方的原材料(CK₄)。并一起置于 60℃烘箱干燥 10 h 后称重。

采用酸碱处理法测定粗纤维含量^[12]。采用 SHS 铜试剂法测定发酵液中总糖含量^[13]。

1.2.6 杜仲胶提取 将经 60℃烘箱干燥 10 h 的每瓶材料平均分成 2 份，碾成丝棉状，过筛去掉粉末状的叶肉组织。放入 100 mL 三角瓶中，加入 5% NaOH 溶液于 85、75、65℃下分别加热 2、3、12 h，冲洗干净，再加入 85% H₃PO₄ 于 65、50℃下分别加热 12、24 h，冲洗干净，最后加入 1 : 1 体积混合的 85% H₃PO₄ 和 95% 乙醇于 40℃下加热 3 h，冲洗干净，滤纸包好置于 25℃烘箱干燥 10 h，得浅黄色粗胶提取物^[14]。

2 结果与分析

2.1 接种不同菌种杜仲叶的发酵情况

不同菌种接种在杜仲叶上，于 30℃发酵培养 25 d，研究(表 1)，接种 3 d 后，除康氏木霉长势一般外，其余均长势良好；7 d 后，材料均开始发酵，体积均比对照有所减少，其中 2 种木质素分解菌处理的材料颜色发生变化；17 d 后，从直观上比较，除康氏木霉菌种已开始衰弱外，其余菌种长势良好，且经它们处理过的材料体积明显变小、材料紧凑；25 d 后，所有菌种长势均减弱，仅黑曲霉 BN 处理的材料摇晃时仍产生大量孢子，另外，葡萄白腐菌与平菇菌处理过的材料颜色发生明显变化。这可能是由于纤维素分解菌和木质素分解菌发酵机理有所不同。

表 1 不同菌种对杜仲叶发酵情况

Table 1 Fermentation state of *Eucommia ulmoides* leaves by different fungi

时间/d	菌 种						
	黑曲霉	黑曲霉(BN)	康氏木霉	绿色木霉	绿色木霉 1	葡萄白腐菌	平菇菌
3	黑色菌丝布满表面，长势良好	灰白色菌丝布满表面，长势良好	表面出现绿色菌丝，长势一般	浅绿色菌丝布满表面，长势良好	浅绿色菌丝布满表面，长势良好	白色菌丝布满表面，长势良好	出现白色团状菌丝，长势良好
7	大量黑色菌丝分布于表面，材料呈团状	黑灰色菌丝分布于表面，材料呈球型团状	材料底部边缘着生绿色菌丝，长势较好	绿色菌丝布满表面，长势良好，材料呈团状	浅绿色菌丝布满表面，长势良好	少量白色菌丝残留材料表面，长势良好，出现大量黑色子实体，材料变灰白色	白色菌丝包裹所有材料，长势良好，材料颜色变为黄白色
17	黑色菌丝分布于表面，长势良好，材料呈大球状	黑灰色菌丝包裹材料，长势良好，摇晃时产生大量黑色孢子，材料呈球型团状	绿色菌丝布满表面，长势变弱	绿色菌丝布满表面，长势良好，材料呈团状	灰绿色菌丝布满表面，长势良好	材料表面少量菌丝残留，白色菌丝存在，材料变灰白色	材料表面布满白色絮状菌丝，长势良好，材料颜色变为淡黄色
25	材料表面布满黑色菌丝，长势较弱	黑灰色菌丝包裹材料，长势较弱，摇晃时产生黑色孢子，材料软化	材料表面存在淡绿色菌丝，长势衰弱	材料表面布满浅绿色菌丝，长势衰弱	材料表面布满灰绿色菌丝，长势衰弱	材料发酵成烂泥状，颜色发褐	材料表面布满白色絮状菌丝，长势较弱，分泌金黄色液体，材料颜色变为淡黄色

2.2 不同菌种发酵对杜仲叶干重的影响

为了研究真菌微生物对杜仲叶片的分解作用,本试验设置了原材料对照(CK_{0t})和原材料水浸对照(CK_i)。根据预备试验结果可知,单纯的杜仲叶不能满足平菇菌自身正常生长的要求,故在其该菌发酵处理中和对照(CK_p)中加入了等量的营养配方成分,以消除添加成分对分解效果的干扰。

从表 2 可看出,经发酵处理后,干重均比原材料处理(CK_{0t})减少了 20% 以上。其中,平菇菌发酵处理后杜仲叶干重(CK_{0p})减少率明显高于其他,其原因可能是平菇菌在发酵过程中消耗了大量发酵配方成分,接种平菇菌与不接种平菇菌 CK_p 相比,干重

减少极显著($t=13.210>t_{0.01(5)}$),也能说明这种情况。经接种黑曲霉、黑曲霉 BN、康氏木霉、绿色木霉、绿色木霉 1、葡萄白腐菌发酵处理的杜仲叶干重与水浸原材料(CK_i)的叶干重相比,干重减少不明显,甚至出现负值的现象(表 2),原因可能是各真菌在分解杜仲叶的同时,自身不同程度地又吸收利用了解产物和水浸泡出的原材料营养成分而生长发育,并将分解产物和水浸出的营养成分以菌丝、孢子等形式保存下来(表 1)。经发酵处理的杜仲叶干重极显著低于原材料(CK_{0t})的杜仲叶干重($t=19.235>t_{0.01(22)}$),经平菇菌、CK_p 发酵处理的杜仲叶干重极显著低于 CK_{0p} 的干重($t=5.167>t_{0.01(7)}$)。

表 2 不同处理后杜仲叶干重^①
Table 2 Dry weight of *Eucommia ulmoides* leaves under different treatments

指标	黑曲霉	黑曲霉 BN	康氏木霉	绿色木霉	绿色木霉 1	葡萄白腐菌	CK _i	CK _{0t}	平菇菌	CK _p	CK _{0p}
不同处理后的干重/g	13.068	13.476	12.807	12.651	13.392	13.309	13.452	17.998	14.898	18.700	23.398
与 CK _{0t} 比较的减少率/%	27.625	26.975	28.842	29.709	25.592	26.053	25.258	—	—	20.079	—
与 CK _{0p} 比较的减少率/%	—	—	—	—	—	—	—	—	36.328	—	—
与 CK _i 比较的减少率/%	2.855	-0.178	4.795	5.955	0.446	1.063	—	—	—	—	—
与 CK _p 比较的减少率/%	—	—	—	—	—	—	—	—	20.332	—	—

①表中数据为 3 次重复的平均值。

2.3 不同菌种发酵对杜仲叶粗纤维素量的影响

从表 3 可知,除 CK_i、CK_p 与康氏木霉处理后粗纤维分解率低以外,其余菌种发酵处理后粗纤维含量明显减少,黑曲霉 BN 减少率为 65.460%。可见,经合适菌种发酵处理可以大量降解杜仲叶内粗纤维素量,进而破坏其微管束结构,便于杜仲胶提取。供试菌种对粗纤维素分解能力高低依次为黑曲霉 BN、平菇菌、葡萄白腐菌、绿色木霉、黑曲霉、绿色木霉 1、康氏木霉,其中前 4 种菌种对杜仲叶粗纤维素分解率均达到 50% 以上。

2.4 不同菌种发酵后发酵液的含糖量

由表 4 可以看出,平菇菌与 CK_p 发酵液中糖含

量较高,原因是发酵配方中添加有蔗糖。其余菌种处理后发酵液含糖量除黑曲霉 BN 比 CK_i 高以外,其他均低于 CK_i,可见黑曲霉、康氏木霉、绿色木霉、绿色木霉 1、葡萄白腐菌几种菌种在发酵过程中维持自身生长发育消耗掉的糖量大于其分解粗纤维素而产生的糖量。含糖量多少次序依次为黑曲霉 BN、康氏木霉、葡萄白腐菌、绿色木霉、黑曲霉、绿色木霉 1,这与其对纤维素分解能力高低次序不尽相同。说明由于各自自身发育特性的干扰,发酵液中的含糖量不能准确地反映各真菌的分解能力。

2.5 不同菌种发酵后对杜仲胶得率的影响

表 3 不同处理后杜仲叶粗纤维素分解情况

Table 3 Decompose state of coarse cellulose of *Eucommia ulmoides* leaves under different treatments

指标	黑曲霉	黑曲霉 BN	康氏木霉	绿色木霉	绿色木霉 1	葡萄白腐菌	CK _i	CK _{0t}	平菇菌	CK _p	CK _{0p}
粗纤维量 ^① /g	2.378	1.355	3.630	1.187	2.398	1.676	3.844	3.932	1.746	3.977	4.292
与 CK _{0t} 比较的减少率/%	39.387	65.460	7.487	53.686	38.899	57.287	2.039	—	—	7.339	—
与 CK _{0p} 比较的减少率/%	—	—	—	—	—	—	—	—	59.319	—	—
与 CK _i 比较的减少率/%	38.132	64.745	5.572	52.727	37.627	56.403	—	—	—	—	—
与 CK _p 比较的减少率/%	—	—	—	—	—	—	—	—	56.098	—	—

①粗纤维量指 20g 杜仲叶经不同处理后所测得粗纤维素质量。

从表 5 可见,平菇菌处理后胶含量极低,仅为 0.03%,可能是由于平菇菌在发酵过程中能分解杜仲胶所致,此结论有待进一步研究。CK₀ 处理后胶得率虽为 1.57%,但实际纯胶得率并不高。由于发酵培养配方中所添加麸皮在提胶过程中不易除掉,导致所提胶体内包裹有大量麸皮,采用铬酸氧化法^[15]测定可知,胶纯度仅为 50%,其他处理后所得胶含量均在

1%左右,且胶纯度为 84%~86%,此结论与马柏林等^[16]所研究结果一致。与未经发酵处理杜仲叶胶得率 0.98%相比,除康氏木霉(0.94%)和平菇菌外,其余均等于或高于对照,黑曲霉 BN 发酵处理后胶得率可提高 13.3%。因此经适宜的菌种发酵处理后,不但不会分解杜仲叶胶,反而能提高其得胶率。

表 4 不同处理后发酵液含糖量

Table 4 Sugar content of fermented liquor under different treatments

指标	黑曲霉	黑曲霉 BN	康氏木霉	绿色木霉	绿色木霉 1	葡萄白腐菌	平菇菌	CK _i	CK ₀
发酵液总含糖量/g	0.495	0.888	0.660	0.537	0.425	0.563	0.975	0.758	1.095

表 5 不同处理后杜仲胶得率

Table 5 Productive rate of gutta-percha under different treatments

指标	黑曲霉	黑曲霉 BN	康氏木霉	绿色木霉	绿色木霉 1	葡萄白腐菌	平菇菌	CK _i	CK ₀
得胶量/g	0.103	0.111	0.094	0.102	0.098	0.101	0.003	0.098	0.157
得胶率/%	1.03	1.11	0.94	1.02	0.98	1.01	0.03	0.98	1.57

3 结论与讨论

参试的 7 种真菌对杜仲叶均有不同程度的分解能力,高低依次为黑曲霉 BN、平菇菌、葡萄白腐菌、绿色木霉、黑曲霉、绿色木霉 1、康氏木霉。对其结果的进一步分析比较得出,纤维素分解菌—黑曲霉 BN 对杜仲叶的分解作用最强,经其发酵分解可使杜仲叶干重降低 26.975%,使叶中粗纤维素含量减少 65.460%,杜仲胶得率提高 13.3%,是杜仲叶胶提取发酵的适宜菌种;平菇菌和康氏木霉对叶纤维素分解能力差,且降低胶得率,故不适宜作提胶发酵的菌类。

在各参试真菌处理的杜仲叶胶得率中,平菇菌处理后胶得率极低,分析原因可能是由于平菇菌在发酵过程中能一定程度分解杜仲胶,或因胶丝附着于添加物上发酵后冲洗时易被冲掉所致,此结论有待进一步研究。经黑曲霉 BN 发酵处理过的杜仲叶片,提胶时经碾碎过筛所剩丝棉状物质明显减少,提胶工艺中酸碱使用量明显减少,说明在杜仲叶胶提取过程中,不同菌类对胶丝提取的效率影响不同。通过加入适宜的纤维素、木质素分解菌来提高发酵效率,减少酸碱用量的方法是可行的。此结论为优化杜仲胶提取工艺提供了实验依据。有关黑曲霉 BN 的最佳发酵条件还需进一步研究。

酸减处理法测定的发酵后叶片粗纤维素含量可以作为衡量真菌分解叶片纤维素能力和效果的指标。发酵后叶干重减少率和发酵液中的含糖量虽然简单易测,但因受微生物自身特性的影响,不能准确

地反映真菌对叶片纤维素分解的能力,故不适宜作为衡量指标。

参考文献:

- [1] 张康健. 中国杜仲研究[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1992, 1-6.
- [2] 张康健,王蓝,马柏林,等. 中国杜仲次生代谢物[M]. 北京:科学出版社,2002. 3-19.
- [3] 杜红岩. 杜仲优质高产栽培[M]. 北京:中国林业出版社,1996. 3-217.
- [4] 李芳东,杜红岩. 杜仲[M]. 北京:中国中医药出版社,2001. 182-280.
- [5] 杜红岩,谢碧霞,邵松梅. 杜仲胶的研究进展与发展前景[J]. 中南林学院学报,2003,23(4):95-99.
- [6] 严瑞芳. 杜仲胶研究进展及发展前景[J]. 化学进展,1995,7(1):65-71.
- [7] 严瑞芳,胡汉杰. 杜仲胶的研究与开发[J]. 中国科学基金,1994(1):51-55.
- [8] 张乔. 杜仲橡胶的开发与利用[J]. 橡胶工业,1996,43(11):690-693.
- [9] 周莉英,黎斌,苏印泉. 杜仲含胶细胞形态特征的研究[J]. 西北植物学报,2001,21(3):566-569.
- [10] 崔跃华,汪矛,孙克莲. 杜仲含胶细胞的形态学研究[J]. 植物学通报,1999,16(4):439-443.
- [11] 田兰馨,卢敏,胡正海. 杜仲含胶细胞发生和发育的研究[J]. 植物学报,1990,32(1):1-6.
- [12] 邓毓芳. 经济林产品利用及分析[M]. 北京:中国林业出版社,1986. 251-253.
- [13] 北京大学生物系生物化学教研室. 生物化学实验指导[M]. 北京:人民教育出版社出版,1979. 31-36.
- [14] 马柏林,王蓝,张康健,等. 杜仲胶实验室提取方法的研究[J]. 西北林学院学报,1994,9(4):67-69.
- [15] 橡胶工业手册编写小组. 橡胶工业手册. 第六分册. 上册[M]. 北京:化学工业出版社,1979. 33-35.
- [16] 马柏林,梁淑芳,张康健,等. 杜仲无性系叶中含胶量及水溶物含量的比较[J]. 西北林学院学报,1996,11(2):50-53.