

刘金艳, 周攀, 周小路, 李东. 子囊菌 *Sordaria tomento-alba* 的筛选及其木质素降解特性[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28 (3): 693-698

Liu JY, Zhou P, Zhou XL, Li D. Screening of ascomycete *Sordaria tomento-alba* and its lignin degradation characteristics [J]. Chin J Appl Environ Biol, 2022, 28 (3): 693-698

子囊菌 *Sordaria tomento-alba* 的筛选及其木质素降解特性

刘金艳^{1,2} 周攀¹ 周小路^{1,2} 李东^{1,2}✉

¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041

²中国科学院大学 北京 100049

摘要 木质素结构复杂、难降解, 是木质纤维素利用的限速步骤。以碱木质素为唯一碳源从玉米秸秆堆体中筛选出一株能快速降解碱木质素的菌株MSDA1, 培养1 d和5 d后对碱木质素降解率分别为48.11%和71.81%。该菌在30 °C条件下24 h之内长满直径9 cm平皿, 最适生长温度30 °C, 最适生长pH为5.0, 结合系统发育树及形态特征鉴定该菌株为子囊菌 (*Sordaria tomento-alba*), 目前尚未发现该菌降解木质素的报道。对碱木质素降解的影响因素开展研究, 发现该菌在pH 4.0-9.0范围内具有较高的碱木质素降解能力, 最佳pH为5.0, 最佳NH₄Cl浓度为2.0 g/L, 最佳Cu²⁺浓度为0.1 mmol/L, 最佳Mn²⁺浓度为0.8 mmol/L。生物质固态发酵结果表明该菌能够高选择性降解农作物秸秆, 大豆秸秆、油菜秸秆和水稻秸秆发酵10 d后, 木质素降解率分别为40.69%、37.16%和31.73%, 选择性系数分别为2.34、3.07和2.82。本研究获得了能够高效降解碱木质素和农作物秸秆的菌株MSDA1, 丰富了降解木质素的微生物菌种库。(图6表2参38)

关键词 *Sordaria tomento-alba*; 木质素降解; 选择性系数; 碱木质素; 生物质

Screening of ascomycete *Sordaria tomento-alba* and its lignin degradation characteristics

LIU Jinyan^{1,2}, ZHOU Pan¹, ZHOU Xiaolu^{1,2} & LI Dong^{1,2}✉

¹Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract This study aimed to screen for fungi that can efficiently degrade lignin and to explore its degradation characteristics in different biomass materials. Using alkali lignin as the sole carbon source, strain MSDA1, which can quickly degrade alkali lignin, was selected from a pile of corn straw. Cultured at 30 °C the strain covered culture plates of 9 cm in diameter within 24 h. The optimum conditions were a growth temperature of 30 °C and pH of 5.0. Based on morphological and molecular biological identification, the strain was identified as an ascomycete (*Sordaria tomento-alba*). No report of this fungus degrading lignin has been published to date. The strain could degrade 48.11% and 71.81% of alkaline lignin after 1 d and 5 d of culturing, respectively. The single factor test demonstrated that the strain has a high alkaline lignin degradation ability in the pH range of 4.0–9.0. The best growth conditions were pH = 5, NH₄Cl concentration = 2.0 g/L, and Mn²⁺ and Cu²⁺ concentrations of 0.8 mmol/L and 0.1 mmol/L, respectively. The results of biomass solid-state fermentation showed that the strain could degrade crop straw with high selectivity. After 10 d of fermentation of soybean, rape, and rice straws, the lignin degradation rates were 40.69%, 37.16%, and 31.73%, respectively, and the selectivity coefficients were 2.34, 3.07, and 2.82, respectively. The high-efficiency lignin-degrading strain MSDA1 obtained in this study provides microbial resources for lignin biodegradation.

Keywords *Sordaria tomento-alba*; lignin degradation; selectivity coefficient; alkali lignin; biomass

木质素、纤维素和半纤维素作为可再生生物质资源的主要成分, 具有极高利用价值。但现有的生物质资源利用的技术中, 主要集中在纤维素, 由于半纤维素相对容易降解, 因此木质素的去除是有效利用纤维素的关键^[1-2]。在木质组织中, 木质

素与半纤维素和纤维素通过共价键、非共价键以及氢键连接形成紧密的网状结构, 组成植物外层基质, 且木质素是由酚类单体交联而成的聚合物, 单体之间通过醚键和碳碳键相连, 难以水解^[3-4]。工程应用中经常使用强酸、强碱等方法从植物中

收稿日期 Received: 2021-02-05 接受日期 Accepted: 2021-03-18

四川省区域创新合作项目(2020YFQ0001)、四川省中央引导地方科技发展专项(2020ZYD022)、四川省科技成果转化示范项目(2020ZHZY0008)、山东省自然科学基金重点项目(ZR2020KE038)和中国科学院青年创新促进会项目(2017423)资助 Supported by the Sichuan Province Science and Technology Support Program (2020YFQ0001, 2020ZYD022, 2020ZHZY0008), the Natural Science Foundation of Shandong Province (ZR2020KE038), and the Youth Innovation Promotion Association of Chinese Academy of Sciences (2017423)

✉通信作者 Corresponding author (E-mail: lidong@cib.ac.cn)

去除木质素,不仅容易污染环境,还会降低纤维素和半纤维素的质量^[5-6]。利用微生物降解木质素,不仅可解决环境问题,而且能够合理利用木质素资源。

研究表明,真菌比细菌和放线菌的木质素降解能力更强^[7]。现有关真菌降解木质素的研究中白腐菌最多,它可将木质素彻底分解为CO₂和H₂O,有效和有选择性地降解木质素^[8]。但白腐菌生长速度慢,且生长和降解木质素的能力受pH的影响大,以粗毛栓菌^[9]和云芝^[10]为例,二者均只在偏酸条件下保持生长和降解能力。其实不止白腐菌,许多半知菌门和子囊菌门的菌也能降解木质素,王地等分离了长白山地区存在的木质素分解菌,结果表明该地区的木质素分解菌主要是曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)及毛霉属(*Mucor*)的菌^[11]。Ferraz等筛选到一株降解木质素的子囊菌*Chrysonilia sitophila*,可使软木失重20%,木质素降解率达25%^[12]。

本研究筛选到能够以碱木质素为唯一碳源生长的真菌68株,经液体发酵筛选出一株生长速度快、降解碱木质素能力强的菌株MSDA1。采用形态和分子生物学方法对菌株MSDA1进行鉴定,测定其产木质素降解酶的能力,探究pH、NH₄Cl浓度以及金属离子对其降解碱木质素的影响,并选取8种生物质原料进行固态发酵,研究其对不同生物质木质纤维素的降解特性,为后续的研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 样品 所用样品为山东潍坊诸城某秸秆沼气工程中已堆积半年的玉米秸秆。

1.1.2 培养基 改良PDA培养基:去皮马铃薯200 g,葡萄糖20.0 g, KH₂PO₄ 3.0 g, MgSO₄·7H₂O 1.5 g, 蒸馏水1 000 mL, pH 6.5, 115 ℃灭菌30 min。

碱木质素降解培养基:碱木质素1.0 g, NH₄Cl 2.0 g, K₂HPO₄ 1.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, CaCl₂ 0.1 g, FeSO₄·7H₂O 0.05 g, MnSO₄·7H₂O 0.02 g, 琼脂15.0 g, 补水至1000 mL。121 ℃灭菌20 min。对应的液体培养基不加琼脂即可。

产酶培养基:葡萄糖 20.0 g, 酒石酸铵0.2 g, MgSO₄·7H₂O 1.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, Na₂HPO₄ 0.2 g, MnSO₄ 0.035 g, CuSO₄ 0.007 g, 蒸馏水1 L, pH 6.5, 115 ℃灭菌30 min。

固态发酵:准确称取生物质材料(木屑、黄竹、大豆秸秆、油菜秸秆、水稻秸秆、玉米秸秆、花生秸秆、小麦秸秆,均破碎过40目筛)5.00 g,装入250 mL的三角瓶,再加入营养液10 mL,蒸馏水5 mL, 121 ℃灭菌20 min。

营养液:去皮马铃薯50 g切块煮软过滤, K₂HPO₄ 1.0 g, KH₂PO₄ 1.0 g, 微量元素液70 mL, 加蒸馏水至1 L。

微量元素液: MgSO₄·7H₂O 3.00 g, MnSO₄·H₂O 0.50 g, NaCl 1.00 g, FeSO₄·7H₂O 0.10 g, CoCl₂ 0.10 g, CuSO₄ 0.10 g, H₃BO₃ 0.01 g, ZnSO₄·7H₂O 0.1 g, KAl(SO₄)₂·12H₂O 0.01 g, Na₂MoO₄·2H₂O 0.01 g, 蒸馏水1 L。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离和鉴定 将样品接种至碱木质素固体培养基, 30 ℃恒温培养, 间隔24 h观察并挑取菌丝体, 反复接种纯化直至获得纯菌株, 4 ℃保存于对应的改良PDA培养基斜面中待用。取斜面活化24 h的菌种, 按5% (V/V) 接种量接种于150 mL三角瓶中, 30 ℃、150 r/min培养24 h后制备成种子液。以10% (V/V) 的比例^[13]接种到50 mL碱木质素培养基中分别培

养5 d和10 d, 样品于12 000 r/min离心10 min, 取上清, 测定OD₂₈₀值, 将OD₂₈₀值代入回归方程计算碱性木质素浓度, 以碱木质素降解率高的菌株作为目标菌株。

采用真菌基因组DNA提取试剂盒(北京索莱宝科技有限公司)提取目标菌株的全基因组, 样品送公司进行ITS序列扩增和测序。测序结果用BLAST程序在NCBI GenBank数据库进行同源性分析。

1.2.2 木质素降解酶活测定 用直径为1 cm的灭菌牛津杯取3块平板培养2 d的菌落, 接种到100 mL产酶培养基中, 30 ℃、150 r/min培养7 d, 每隔24 h取样。菌液于4 ℃、10 000 r/min离心15 min, 上清液即为粗制酶液, 分别通过ABTS法^[14]、藜芦醇法^[15]和Mn²⁺法^[16]测定漆酶(laccase/Lac)、木质素过氧化物酶(lignin peroxidases/LiP)及锰过氧化物酶(manganese peroxidases/MnP)活性。

1.2.3 降解碱木质素的影响因素 (1)时间:按照10%的接种比将种子液接种到碱木质素培养基中, 30 ℃、150 r/min培养5 d, 测定每天碱木质素降解率。(2)初始pH:按照10%的接种比将种子液接种到不同初始pH(3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0)的碱木质素液体培养基中, 30 ℃、150 r/min培养1 d, 测定碱木质素降解率。(3)NH₄Cl浓度:分别配制NH₄Cl浓度为0.5、1.0、1.5、2.0 g/L的碱木质素培养基, 按照10%的体积比接种, 30 ℃、150 r/min培养1 d, 测定碱木质素降解率。

(4)Cu²⁺浓度:按照10%的接种比将种子液接种到Cu²⁺浓度为0、0.05、0.1、0.25、0.5、1.0 mmol/L的碱木质素培养基中, 30 ℃、150 r/min培养1 d, 测定碱木质素降解率。(5)Mn²⁺浓度:按照10%的接种比将种子液接种到Mn²⁺浓度为0、0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L的碱木质素培养基中, 30 ℃、150 r/min培养1 d, 测定碱木质素降解率。

1.2.4 8种生物质木质素降解 用直径为1 cm的灭菌牛津杯分别取3块平板培养2 d的菌落, 接种到固态发酵培养基中, 混匀静置培养10 d, 取样使用ANKOM A200i纤维分析仪测定半纤维素、纤维素及木质素含量, 扫描电镜观察菌丝生长和生物质材料表面结构的变化。

2 结果与讨论

2.1 菌株的筛选

以碱木质素为唯一碳源, 筛选到真菌68株。根据菌株在PDA及碱木质素固体培养基上的生长速度, 进一步选择10株进行碱木质素液体培养, 以量化菌株对木质素降解能力。结果如表1所示, 相同条件下, MSDA1降解碱木质素能力最强, 5 d降解率为68.79%, 降解效率远高于已经报道的木质素降解菌。郁红艳等筛选的*Penicillium simplicissimum* H5在第13天可降解Kraft木质素40.26%^[17]; 梁军锋等测定黄孢原毛平革菌在第10天木质素磺酸钙降解率为29.6%^[18]; 蒋荣清等培育获得的细菌复合菌剂MC1在第14天碱木质素降解率为36.25%^[19]; An等筛选到一株细菌*Serratia* sp. AXJ-M对造纸废液中木质素降解率57%^[20]; Kumar等筛选的细菌*Bacillus flexus* RMWW II, 其对50 mg/L的碱木质素降解率为100%, 当碱木质素浓度为400 mg/L时降解率仅为20%^[21]。

2.2 菌株的鉴定

菌株MSDA1在PDA平板上生长速度快, 30 ℃、24 h之内长满直径9 cm平皿, 菌落起初为白色, 匍匐生长(图1a), 菌丝透明、较细、有分枝和分隔(图1b), 继续培养菌落变为绒毛状并逐渐变为黑色, 产红色色素(图1c); 显微镜下观察绒毛状菌丝, 能见球形或近球形子囊壳, 外表不光滑有刚毛(图

表1 菌株降解碱木质素能力定量筛选结果

Table 1 Quantitative screening results of the ability of strains to degrade alkali lignin

菌株 Strain	5 d降解率 5 d Degradation rate (r/%)	10 d降解率 10 d Degradation rate (r/%)	菌株 Strain	5 d降解率 5 d Degradation rate (r/%)	10 d降解率 10 d Degradation rate (r/%)
MSDA1	68.79 ± 2.09	70.13 ± 2.69	Z1	11.07 ± 2.13	11.07 ± 0.17
M15	42.23 ± 1.59	44.12 ± 1.58	MDG4	9.10 ± 1.24	10.08 ± 0.38
MX	30.22 ± 0.46	31.40 ± 2.17	Z2	8.83 ± 0.47	10.35 ± 1.81
M12	30.07 ± 1.74	31.08 ± 1.95	M16	6.26 ± 1.41	22.30 ± 1.57
AoB	26.31 ± 0.95	30.18 ± 0.54	MTA3	2.68 ± 3.50	1.41 ± 0.44

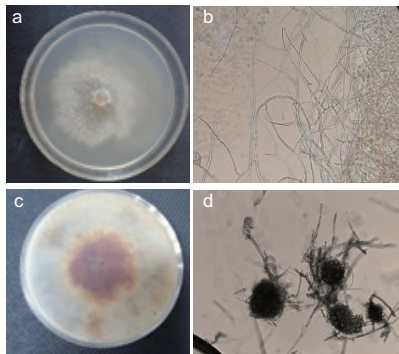


图1 菌株MSDA1在PDA培养基情况。A: 生长12 h菌落正面; b: 菌丝生长形态(10 × 20); c: 生长24 h菌落背面; d: 子囊壳(10 × 40)。
Fig. 1 The growth of strain MSDA1 in PDA medium. a: Front of colony grown for 12 h; b: Mycelial growth form (10 × 20); c: Back of colony growing for 24 h; d: Ascus shell (10 × 40).

1d)。菌株MSDA1在25-45℃均能生长,最适生长温度30℃; pH在3.0-9.0均能生长,最适生长pH为5.0。

将菌株MSDA1的ITS序列与美国国立生物技术信息中心(NCBI)中的BLAST数据库进行同源性分析,利用Mega X软件使用Neighbor-Joining法构建系统发育树^[22],发现菌株MSDA1与*Sordaria tomento-alba* CBS 260.78亲缘关系最近(图2),结合形态学初步鉴定菌株MSDA1为*Sordaria tomento-alba*,属于子囊菌,目前尚未发现该菌降解木质素的报道。

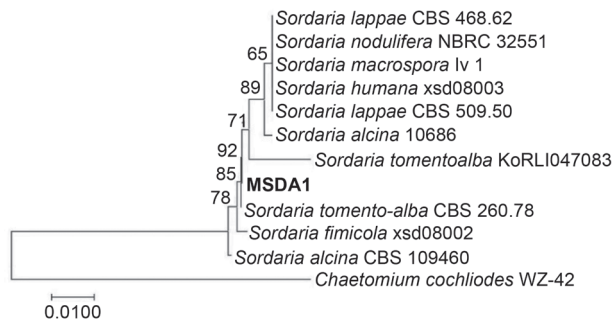


图2 菌株MSDA1系统发育树。
Fig. 2 Phylogenetic tree of strain MSDA1.

2.3 菌株MSDA1的木质素降解酶活

关于真菌木质素降解酶的研究主要有3种,分别是LiP、MnP和Lac。现有的研究表明,大部分木质素降解微生物只产生其中1种或2种酶,如污叉丝孔菌(*Dichomitus squalens*)和香菇(*Lentinula edodes*)只产MnP和Lac,只有部分微生物如射脉菌(*Phlebia radiata*)^[23]、变色栓菌(*Trametes versicolor*)^[24-25]能够同时产3种酶。如图3所示,菌株MSDA1的MnP酶活最高,第3天达到746.30 U/L,然后急速下降; Lac在培养过程中活性逐渐增强,活性高峰出现在第5天,为103.63 U/L,而后逐渐下降; LiP在整个培养过程中活性不高,

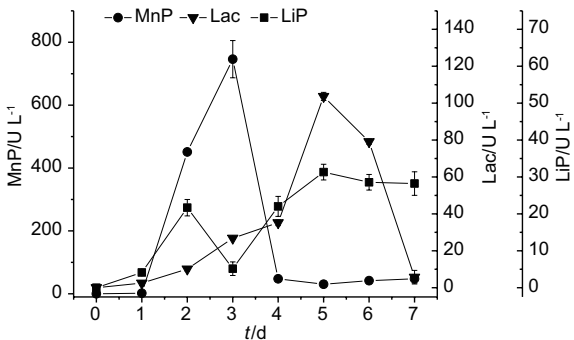


图3 菌株MSDA1液体培养产酶变化。
Fig. 3 Enzyme production curve of strain MSDA1 in liquid culture.

活性高峰31.32 U/L出现在第5天,而后保持平稳。郁红艳等测得一株筒青霉能够分泌LiP与Lac,但不产MnP^[17];而王仁佑等研究发现,通过改变培养基成分筒青霉能够产MnP^[26]。这说明,培养基成分与菌株产酶和酶活有很大关系,不能只通过酶活高低考察菌株的木质素降解能力,以木质素模型化合物、化学提纯木质素或天然木质素为底物的木质素降解率作为评判标准更为合理。

2.4 菌株MSDA1降解碱木质素的影响因素

2.4.1 时间对菌株MSDA1降解碱木质素的影响 MSDA1的碱木质素降解曲线如图4所示。MSDA1降解碱木质素速度随时间逐渐变慢,第1天降解速度最快,降解率为48.11%,第5天降解率为71.81%。Chang等筛选的芽孢杆菌,培养1 d的碱木质素降解率为40%^[27];李玲玲等筛选的粗毛栓菌BYL-7,培养7 d对碱木质素降解率36.5%^[27];马英辉等对伯克霍尔德菌BNS碱木质素降解条件进行优化,得到最高降解率53.88%^[28]。可见,菌株MSDA1降解碱木质素速度更快,最高降解率更高。结果显示,菌株MSDA1第1天降解碱木质素的速度最快,因此后续试验选择测量第1天碱木质素降解率,以反映其最大速度。

2.4.2 初始pH对菌株MSDA1降解碱木质素的影响 初始pH对菌株MSDA1降解碱木质素的影响如图5a所示。pH在4.0-9.0范围内时,菌株MSDA1均能保持较高的碱木质素降解率,其中pH在5.0时降解率最高,达62.14%。这与前人的研究低pH有利于真菌产木质素降解酶^[29-30]相符。相较于粗毛栓菌仅在pH 6.0-7.0条件下能够保持较高降解能力^[9],菌株MSDA1能够降解碱木质素的pH范围更广,能适应更多的环境。

2.4.3 NH₄Cl浓度对MSDA1降解碱木质素的影响 NH₄Cl浓度对MSDA1降解碱木质素的影响如图5b所示。最佳NH₄Cl浓度为2.0 g/L,第1天降解率最高达47.56%。结果表明,培养基NH₄Cl浓度低时,菌株MSDA1没有足够的氮源进行生长,不利于碱木质素降解,过高的NH₄Cl浓度也会抑制其降解碱木质素。董旭杰等研究了3种白腐菌的产酶情况,发现培养基的C/N对菌株产木质素降解酶有很大影响,低C/N有利于变色栓菌产Lac,不利于其产Mnp,而对木质层孔菌的作用相反,黄孢原

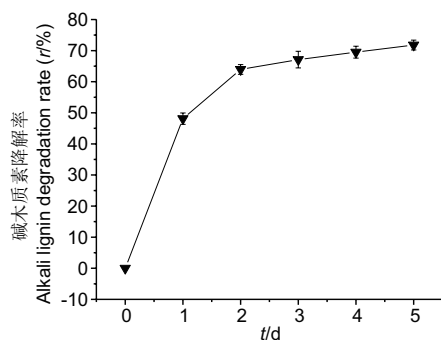


图4 菌株MSDA1的碱木质素降解曲线。

Fig. 4 Degradation curve of alkaline lignin by strain MSDA1.

毛平草菌产酶受C/N比影响不大^[31]。在本研究中, NH_4Cl 浓度过高可能抑制了菌株MSDA1产木质素降解酶, 从而降低碱木质素降解率。

2.4.4 铜和锰浓度对菌株MSDA1降解碱木质素的影响 Lac和MnP是微生物降解木质素的两种重要的酶, Lac是一种多铜氧化酶, 结构中包含4个铜离子, 而 Mn^{2+} 是MnP的电子供体, 因此本研究考察了 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 金属离子对MSDA1降解碱木质素的影响, 结果如图5c和d所示。一定浓度的 Cu^{2+} 对菌株MSDA1降解碱木质素有促进作用, 最佳 Cu^{2+} 浓度为0.1 mmol/L, 第1天降解率为58.50%, 但随着 Cu^{2+} 浓度进一步增大, 降解率降低。这是由于铜离子通过影响漆酶分子的电荷分布及电子传递来影响漆酶活性, 当铜离子浓度高于离子交换平衡的临界点时, 就会抑制漆酶酶活^[32], 从而降低碱木质素降解率。 Mn^{2+} 浓度0.2–1.0 mmol/L均能促进碱木质素降解, 最佳 Mn^{2+} 浓度为0.8 mmol/L, 降解率为58.58%, 较未添加 Mn^{2+} 提高了45.91%, 当 Mn^{2+} 浓度高于0.8 mmol/L, 促进作用减弱。这与张庆芳等的研究结果^[33]相同, 一定浓度的 Mn^{2+} 会提高Mnp的活力, 当 Mn^{2+} 浓度过高促进作用减弱。

2.5 菌株MSDA1对8种生物木质素的降解特性

自然界中, 木质素会与纤维素或半纤维素中的多聚糖通

过醚键、酯键以及非共价键的作用形成木质素-碳水化合物复合体(lignin-carbohydrate complexes, LCCs)^[34]。因此, 微生物降解木质素时常伴有纤维素和半纤维素的降解, 通过计算选择性系数(木质素降解率/纤维素降解率)能够更准确地描述菌株降解不同生物木质素的特性。选取6种常见农作物秸秆以及木屑和黄竹进行固态发酵, 结果如表2所示。菌株MSDA1对大豆秸秆的降解率最高, 达到了40.69%, 选择性系数为2.34; 对油菜秸秆具有最高选择性系数为3.07, 降解率为37.16%; 对木屑和黄竹的降解效果不如秸秆, 木质素降解率分别为20.43%和6.31%, 选择性系数分别为0.98和1.94。研究表明, 同种菌种作用于不同生物质材料木质素的降解率和选择性系数都有差异, 王丽婷等利用降解大豆秸秆, 培养10 d后木质素降解率及选择性系数分别为47.77%和0.99^[35]; 朱洪龙等使用白腐菌对油菜秸秆进行降解, 培养40 d后木质素降解率及选择性系数分别为35.27%和0.93^[34]; 霍春晓等使用白腐菌处理甘草渣, 培养18 d后木质素及选择性系数分别为31.23%和0.79^[36]; Mustafa等对两株真菌降解稻草的条件进行优化, 结果表明培养20 d后, *Pleurotus ostreatus*的木质素降解率和选择性系数分别为33.4%和4.2, *Trichoderma reesei*的木质素降解率和选择性系数分别为23.6%和2.88^[37]。综上, 菌株MSDA1对常见的农作物有较强的木质素选择降解能力, 具有良好的应用前景。

菌株MSDA1在不同原料上的附着和木质纤维素降解情况见图6。菌丝生长和附着与木质纤维素降解情况相符合, 木质纤维素降解率高的原料, 在扫描电镜下能够看到更多的菌体, 原料破碎更明显。发酵前木质纤维素排列规整, 结合紧密, 空隙小; 发酵后木质纤维素结构受到不同程度的损伤, 形态结构破碎, 空隙明显变大, 空洞增多, 表面及空洞内布满菌丝。菌株MSDA1对大豆秸秆、油菜秸秆和水稻秸秆等结构疏松的材料木质素降解效率高, 而对小麦秸秆和黄竹类木质纤维结合紧密的材料, 木质素降解速度较慢, 这可能是由于其结构导致菌丝与原料接触面积减少, 限制了木质素降解酶发挥作用。

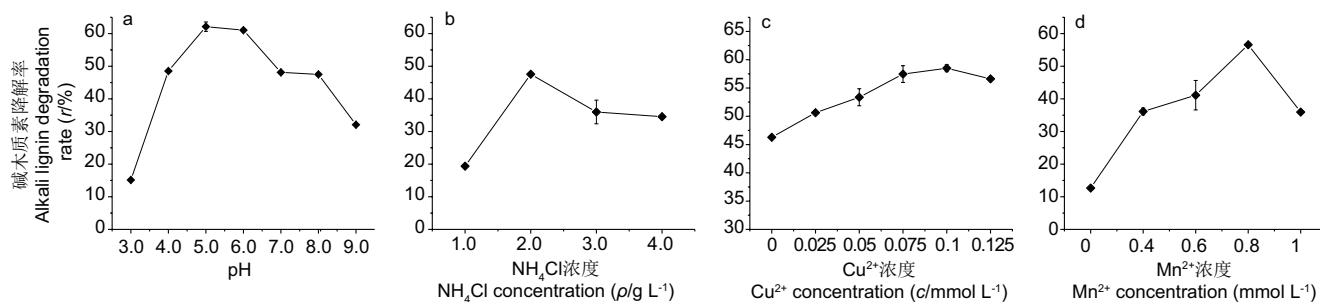


图5 影响菌株MSDA1降解碱木质素的因素。

Fig. 5 The single influence factor of strain MSDA1 to degrade alkali lignin.

表2 菌株MSDA1对不同原料木质素、纤维素及半纤维素的降解情况

Table 2 Degradation of lignin, cellulose, and hemicellulose in different raw materials by strain MSDA1

原料 Raw material	木质素降解率 Lignin degradation rate (r/%)	纤维素降解率 Cellulose degradation rate (r/%)	半纤维素降解率 Hemicellulose degradation rate (r/%)	选择性系数 Selectivity coefficient
木屑 Sawdust	20.43 ± 0.65	20.93 ± 0.65	18.07 ± 0.67	0.98 ± 0.10
黄竹 Yellow bamboo	6.31 ± 0.41	3.28 ± 0.42	4.64 ± 0.42	1.94 ± 0.14
大豆秸秆 Soybean straw	40.69 ± 0.57	17.39 ± 0.80	14.33 ± 0.82	2.34 ± 0.08
油菜秸秆 Rape straw	37.16 ± 0.07	12.09 ± 0.09	23.82 ± 0.08	3.07 ± 0.02
水稻秸秆 Rice straw	31.73 ± 0.20	11.25 ± 0.26	10.18 ± 0.27	2.82 ± 0.05
玉米秸秆 Corn stover	27.89 ± 0.35	20.01 ± 0.39	15.43 ± 0.41	1.39 ± 0.01
花生秸秆 Peanut straw	21.96 ± 0.83	11.15 ± 0.95	8.97 ± 0.97	1.98 ± 0.10
小麦秸秆 Wheat straw	13.45 ± 0.18	10.96 ± 0.18	7.05 ± 0.19	1.23 ± 0

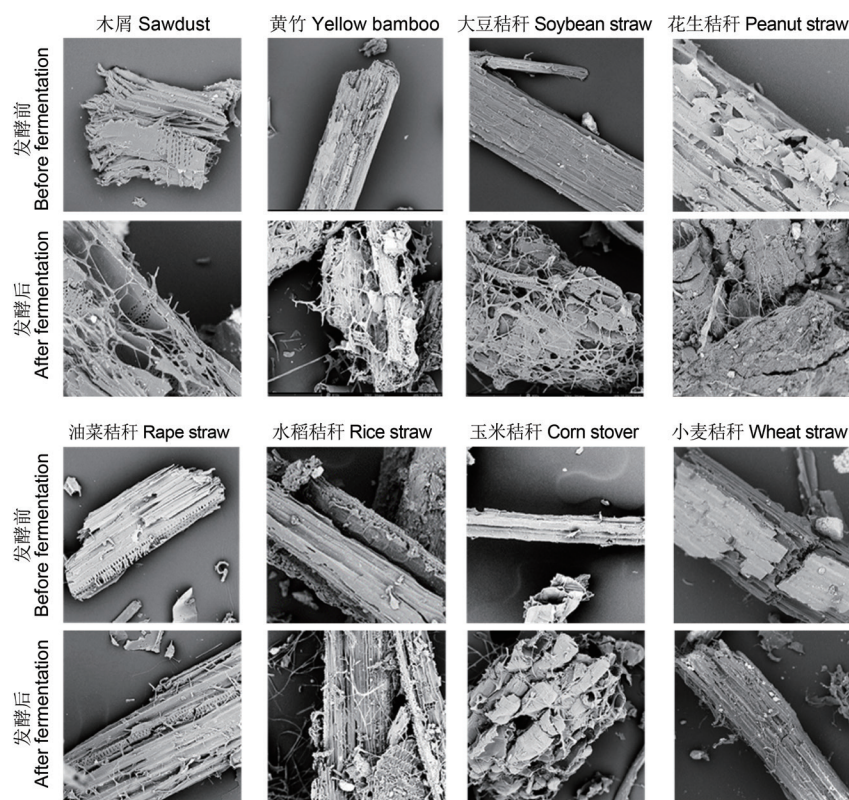


图6 扫描电镜观察不同生物质材料发酵真菌生长情况。

Fig. 6 Observing the growth of fungi in different materials using a scanning electron microscope.

3 结论

本研究筛选得到一株木质素降解真菌MSDA1, 经形态和分子生物学鉴定, 确定该菌为子囊菌 (*Sordaria tomento-alba*), 目前尚未发现该菌降解木质素的报道, 丰富了降解木质素的微生物菌种库。

该菌能够高效降解碱木质素, 且具有较广的pH适用范围, 在pH为4.0-9.0的范围内均能够较快降解碱木质素, 在pH

5.0时培养1 d降解率高达62.14%, 在环境保护领域具有很大的潜力, 如造纸黑液的生物降解。

该菌能够高选择性降解农作物秸秆, 其中大豆秸秆、油菜秸秆及水稻秸秆发酵10 d后, 木质素降解率分别为40.69%、37.16%和31.73%, 选择性系数分别为2.34、3.07和2.82, 其在秸秆资源化利用方面有很好的应用前景。后续将开展秸秆木质素降解产物分析和降解机理研究, 为秸秆木质素资源化利用提供参考。

参考文献 [References]

- Pérez J, Muñoz-Dorado J, Rubia TDL, Martínez J. Biodegradation and biological treatments of cellulose, hemicellulose and lignin: an overview [J]. *Int Microbiol*, 2002, **5** (2): 53-63
- Naofumi K, Shingo S, Nobutaka M, Eiji M, Shinya K. Advances in microbial lignin degradation and its applications [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2018, **56**: 179-186
- Mathews SL, Grunden AM, Pawlak J. Degradation of lignocellulose and lignin by *Paenibacillus glucanolyticus* [J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2016, **110**: 79-86
- 王仁佑, 曾光明, 郁红艳, 黄国和, 黄红丽, 陈芙蓉. 木质素的微生物降解机制[J]. 微生物学杂志, 2008, **28** (3): 59-63 [Wang RY, Zen GM, Yu HY, Huang GH, Huang HL, Chen FR. Lignin degradation mechanism by microbes [J]. *J Microbiol*, 2008, **28** (3): 59-63]
- Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adney WS, Nimlos MR, Brady JW, Foust TD. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science*, 2007, **315** (5813): 804-807
- Phutela UG, Dar RA. Role of lignocellulolytic thermophilic fungus *Thermoascus aurantiacus* MTCC 375 in paddy straw digestibility and its implication in biogas production [J]. *Afr J Microbiol Res*, 2014, **8** (17): 1798-1802
- 焦有宙, 高赞, 李刚, 李鹏飞, 李攀攀. 不同土著菌及其复合菌对玉米秸秆降解的影响[J]. 农业工程学报, 2015, **31** (23): 201-207 [Jiao YZ, Gao Zan, Li Gang, Li PF, Li PP. Effect of different indigenous microorganisms and its composite microbes on degradation of corn straw [J]. *Trans Chin Soc Agric Eng*, 2015, **31** (23): 201-207]
- 林云琴, 周少奇. 白腐菌降解纤维素和木质素的研究进展[J]. 环境技术, 2003 (4): 29-33 [Lin YQ, Zhou SQ. Advances of investigation on degradation of the lignin and cellulose by white rot fungi [J]. *Chin Environ Technol*, 2003 (4): 29-33]
- Chang AJ, Fan J, Wen X. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw [J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2012, **72**(0): 26-30
- 金剑, 康文丽, 张焱鑫, 张国鹏, 高严, 程凡升, 生吉萍, 申琳. 不同Cu离子浓度和pH值对云芝降解秸秆中木质素和纤维素的影响[J]. 食品科学, 2009, **30** (20): 173-177 [Jin Jian, Kang WL, Zhang YX, Zhang GP, Gao Yan, Cheng FS, Sheng JP, Shen Lin. Effects of different Cu ion concentrations and pH values on the degradation of lignin and cellulose in Yunzhi straw [J]. *Chin Food Sci*, 2009, **30** (20): 173-177]

- 11 王地, 刘期松. 长白山地区真菌降解木质素的研究[J]. 微生物学报, 1990, **4**: 66-74 [Wang D, Liu QS. Study on degradation of lignin by fungi in Changbai Mountains [J]. *Acta Microbiol Sin*, 1990, **4**: 66-74]
- 12 Ferraz A, Durán N. Lignin degradation during softwood decaying by the ascomycete *Chrysosporium sitophilum* [J]. *Biodegradation*, 1995, **6** (4): 265-274
- 13 李灵灵, 王敬红, 赵铎, 刘嘉乐, 申贵男, 袁媛, 高亚梅, 晏磊, 魏丹, 王伟东. 木质素降解菌BYL-7的筛选及降解条件优化[J]. 微生物学通报, 2020, **47** (12): 4059-4071 [Li LL, Wang JH, Zhao Duo, Liu JL, Shen GN, Yuan Yuan, Gao YM, Yan Lei, Wei Dan, Wang WD. Screening of lignin degrading strain BYL-7 and optimization of degradation conditions [J]. *Chin Microbiol*, 2020, **47** (12): 4059-4071]
- 14 林俊芳, 刘志明, 陈晓阳, 郭丽琼, 王杰. 真菌漆酶的酶活测定方法评价[J]. 生物加工过程, 2009, **7** (4): 1-8 [Lin JF, Liu ZM, Chen XY, Guo LQ, Wang Jie. Evaluation of assay methods for determining fungal laccase activity [J]. *Chin J Bioproc Eng*, 2009, **7** (4): 1-8]
- 15 Ming T, Kirk TK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Methods Enzymol*, 1988, **161** (C): 238-249
- 16 周金燕, 张发群, 桑原正章. 真菌产生的锰过氧化物酶和漆酶的研究—I. 富氮培养基筛选产酶的真菌[J]. 微生物学报, 1993, **33** (5): 387-391 [Zhou JY, Zhang FQ, Masaaki Kuwahara. Study on manganese peroxidase and laccase produced by fungi I. Screening fungi producing enzyme in nitrogen-rich medium [J]. *Acta Microbiol Sin*, 1993, **33** (5): 387-391]
- 17 郁红艳, 曾光明, 黄国和, 胡天觉, 陈耀宁. 木质素降解真菌的筛选及产酶特性[J]. 应用与环境生物学报, 2004, **10** (5): 639-642 [Yu HY, Zeng GM, Huang GH, Hu TJ, Chen YN. Screening of lignin-degrading fungi and their enzyme production [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2004, **10** (5): 639-642]
- 18 梁军锋, 张洪生, 张克强, 张金凤, 李野, 赵润. 木质素降解菌的筛选及对秸秆的降解研究[J]. 华北农学报, 2009, **24** (5): 206-209 [Liang JF, Zhang HS, Zhang KQ, Zhang JF, Li Ye, Zhao Run. Study on the screening of the lignin-degrading fungus and the degradation of straws [J]. *Acta Agric Bor-Sin*, 2009, **24** (5): 206-209]
- 19 蒋荣清, 袁兴中, 曾光明, 黄红丽, 喻曼, 梁运珊, 张嘉超. 一组高效木质素降解复合菌的筛选[J]. 应用与环境生物学报, 2010, **16** (2): 247-251 [Jiang RQ, Yuan XZ, Zeng GM, Huang HL, Yu Man, Liang YS, Zhang JC. Screening of an efficient lignin-degrading composite microorganisms [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2010, **16** (2): 247-251]
- 20 An XJ, Zhong Bin, Chen GT, An WJ, Xia Xiang, Li HG, Lai FJ, Zhang QH. Evaluation of bioremediation and detoxification potentiality for papermaking black liquor by a new isolated thermophilic and alkali-tolerant *Serratia* sp. AXJ-M [J]. *J Hazard Mater*, 2021, **406**: 124285
- 21 Kumar A, Priyadarshinee R, Singha S, Sengupta B, Roy A, Dasgupta D, Mandal T. Biodegradation of alkali lignin by *Bacillus flexus* RMWW II: analyzing performance for abatement of rice mill wastewater [J]. *Water Sci Technol*, **80** (9): 1623-1632
- 22 龙梅, 郭放, 郭莉娟, 何雪梅, 刘小艳, 李蓓, 罗燕, 邹立扣. 鸡枞菌ITS区克隆、测序及其系统发育关系[J]. 食品科学, 2014, **17**: 186-191 [Long Mei, Guo Fang, Guo LJ, He XM, Liu XY, Li Bei, Luo Yan, Zou LK. Cloning, sequencing and phylogenetic relationships of ITS region of rDNA from *Termitomyces* [J]. *Food Sci*, 2014, **17**: 186-191]
- 23 Vares T, Kalsi M, Hatakka A. Lignin peroxidases, manganese peroxidases, and other ligninolytic enzymes produced by *Phlebia radiata* during solid-state fermentation of wheat straw [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61** (10): 3515-3520
- 24 Jönsson LJ, Palmqvist E, Nilvebrant NO, Hahn-Hägerdal B. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **49**: 691-697
- 25 Paice MG, Reid ID, Bourbonnais R, Archibald FS, Jurasek L. Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1993, **59** (1): 260-265
- 26 王仁佑, 刘剑潇, 黄红丽, 余震, 徐祥民, 曾光明. 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, **10**: 70-74 [Wang RY, Liu JX, Huang HL, Yu Zhen, Xu XM, Zeng GM. Effect of rhamnolipid on the enzyme production of two species of lignin-degrading fungi [J]. *J Hunan Univ (Nat Sci)*, 2008, **10**: 70-74]
- 27 Chang AJ, Fan J, Wen X. Screening of fungi capable of highly selective degradation of lignin in rice straw [J]. *Int Biodeterior Biodegrad*, 2012, **72**: 26-30
- 28 马英辉, 李利军, 卢美欢, 仝泽方, 吴文朋. 一株伯克霍尔德菌的鉴定及其对木质素的降解特性研究[J]. 环境污染与防治, 2021, **43** (1): 25-29+41 [Ma YH, Li LJ, Lu MH, Tong ZF, Wu WP. Identification and lignin degradation characteristics of a *Burkholderia* sp. [J]. *Environ Poll Control*, 2021, **43** (1): 25-29+41]
- 29 黄慧艳, 张晓昱. 白腐菌对培养环境pH的调节及其产漆酶的相关性[J]. 微生物学杂志, 2006, **26** (2): 37-40 [Huang HY, Zhang XY. Regulation of environment pH by white rot fungi and its reciprocity in laccase production [J]. *Chin J Microbiol*, 2006, **26** (2): 37-40]
- 30 Yoshihara K, Aframutsu I, Kamishinuz H, Fujii T. Screening of a white-rot fungus with strong lignin degrading activity [J]. *Jpn Technol Assoc Pulp Pap Ind*, 2009, **39** (7): 681-690
- 31 董旭杰, 曹福祥, 陈静, 吕聪. 3种白腐菌木质素降解酶的比较[J]. 中南林业科技大学学报自然科学版, 2007, **27** (3): 131-135 [Dong XJ, Cao FX, Chen Jing, Lu Cong. Comparison of lignin degradation enzymes produced by three white-rot fungi [J]. *J Central South Univ For Technol Nat Sci*, 2007, **27** (3): 131-135]
- 32 王习文, 詹怀宇, 何为. 铜(II)对漆酶活性的影响[J]. 纸和造纸, 2003, **4**: 43-44 [Wang XW, Zhan HY, He Wei. The effect of copper(II) on laccase activity [J]. *Pap Papermaking*, 2003, **4**: 43-44]
- 33 张庆芳, 于宗莲. 一株高效木质素降解细菌的筛选及产酶条件的优化[J]. 中国农业科技导报, 2014, **16** (2): 143-148 [Zhang QF, Yu ZL. A strain of lignin-degrading bacteria's screening and optimization of enzyme-producing condition [J]. *Chin J Agric Sci Technol*, 2014, **16** (2): 143-148]
- 34 路瑶, 魏贤勇, 宗志敏, 陆永超, 赵炜, 曹景沛. 木质素的结构研究与应用[J]. 化学进展, 2013, **25** (5): 838-858 [Lu Yao, Wei XY, Zong ZM, Lu YC, Zhao Wei, Cao JP. Structural investigation and application of lignins [J]. *Prog Chem*, 2013, **25** (5): 838-858]
- 35 王丽婷, 徐伟, 张玉强. 黄孢原毛平革菌对大豆秸秆木质素降解的FTIR表征[J]. 食品科学, 2011, **32** (19): 137-140 [Wang LT, Xu Wei, Zhang YQ. FTIR characterization of lignin degradation products from soybean straw fermented by *Phanerochaete chrysosporium* Burdsall [J]. *Food Sci*, 2011, **32** (19): 137-140]
- 36 朱洪龙, 王力生, 蔡海莹, 解宜林, 邹松阳, 杨海. 两种白腐菌降解油菜秸秆效果的研究[J]. 安徽农学通报, 2007, **8**: 33-35 [Zhu HL, Wang LS, Cai HY, Xie YL, Zou SY, Yang Hai. Effects of two kinds of white-rot fungi on degradation of rape straw [J]. *Anhui Agric Sci Bull*, 2007, **8**: 33-35]
- 37 霍春晓, 李鑫, 成真锐, 黎露平, 郭羊桃, 杨子越, 胡坤. 白腐菌降解甘草渣木质素及综纤维素工艺研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2020, **4**: 87-90 [Huo CX, Li Xin, Cheng ZR, Li LP, Guo YT, Yang ZY, Hu Kun. Study on degradation of liquorice residue lignin and synthetic cellulose by white rot fungi [J]. *Heilongjiang Anim Husband Vet*, 2020, **4**: 87-90]
- 38 Mustafa AM, Poulsen TG, Sheng K. Fungal pretreatment of rice straw with *Pleurotus ostreatus* and *Trichoderma reesei* to enhance methane production under solid-state anaerobic digestion [J]. *Appl Energy*, 2016, **180**: 661-671