

一株产酶真菌 *Phaeophlebiopsis* sp. 转录组分析

程敏^{1,2,3}, 郭鑫瑶^{1,2,3}, 李启瑞^{1,2,3}, 王迪^{1,2,3}, 李小兵⁴, 康颖倩^{1,2,3,5*}

1 贵州医科大学基础医学院微生物学教研室, 贵州 贵阳 550025

2 贵州省微生物与人类健康关系研究人才基地 贵州省普通高校病原生物学特色重点实验室, 贵州 贵阳 550025

3 贵州医科大学环境污染与疾病监控教育部重点实验室, 贵州 贵阳 550025

4 贵州省赤水河畔酱酒研究中心, 贵州 贵阳 550003

5 贵州省烟草科学研究院, 贵州 贵阳 550009

摘要: 对从药渣中分离的真菌 ZYJHYZ254 进行鉴定及产酶活性研究, 从转录组分析菌株不同生长时期差异表达基因对其生长发育及产酶调控的影响, 以筛选高产木质纤维素水解酶真菌, 寻找调控关键基因。鉴定 ZYJHYZ254 为拟暗射脉菌 *Phaeophlebiopsis* sp., 产酶在第 5–7 天最高。从生长 3 d 与 7 d 的菌丝中共检测到 1 232 个差异基因, 以 3 d 的菌丝为对照, 显著上调、下调基因分别有 826 及 406 个, 基因注释和 GO、KEGG 功能富集分析结果表明差异表达基因主要与蛋白质合成、代谢及酶合成相关。此外, 共有 387 个 CAZymes 基因表达, GH 数量最多, 约占 49.61%, 其次为 AA (97) 与 GT (62), 约占 25.06% 与 16.02%。GH16 (24 个) 占 GH 的 12.50%, 含量最多, 主要编码葡萄糖苷酶、木聚糖酶等, AA 中 AA3 (37 个) 占比 38.14%, 编码氧化酶、脱氢酶等。结果表明 ZYJHYZ254 中生长 3 d 与 7 d 的菌丝经功能富集分析发现差异表达基因主要与蛋白质合成、代谢, 以及酶合成相关。进一步研究发现在两个生长时期中 CAZymes 基因表达最多的是 GH16 与 AA3, 预示了该菌葡萄糖苷酶、木聚糖酶、 β -半乳糖苷酶、氧化酶与脱氢酶含量最丰富, 对降解特殊生物物质中的木质纤维素具有重要意义。

关键词: 特殊环境; 丝状真菌; 转录组学; 木质纤维素; 碳水化合物活性酶

[引用本文] 程敏, 郭鑫瑶, 李启瑞, 王迪, 李小兵, 康颖倩, 2022. 一株产酶真菌 *Phaeophlebiopsis* sp. 转录组分析. 菌物学报, 41(10): 1634-1646

Cheng M, Guo XY, Li QR, Wang D, Li XB, Kang YQ, 2022. Transcriptomic analysis at different growth stages of an enzyme-producing fungus *Phaeophlebiopsis* sp. Mycosystema, 41(10): 1634-1646

基金项目: 国家自然科学基金(32060034); 国家科技部及教育部高等学校学科创新引智计划(D20009); 贵州省科技厅社会发展攻关支撑项目[黔科合支撑(2019)2873]; 贵州省科学技术厅国际科技合作基地[黔科合平台人才(2020)4101]; 贵州省科技计划项目[黔科合支撑(2020)4Y220]; 贵州省微生物与健康院士工作站[(2020)4004]; 贵阳市科技计划项目(筑科合同[2020]-16-24)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (32060034), Discipline Innovation Program of China (111 Project) (D20009), Guizhou Scientific Plan Project [(2019)2873], International Science and Technology Cooperation Base of Guizhou Province [(2020)4101], Guizhou Scientific Plan Project [(2020)4Y220], Guizhou Provincial Academician Workstation of Microbiology and Health [(2020)4004], and Guiyang Science and Technology Project [(2020)-16-24].

*Corresponding author. E-mail: kangyingqian@gmc.edu.cn

ORCID: CHENG Min (0000-0001-9474-2176)

Received: 2022-01-18, accepted: 2022-03-02

Transcriptomic analysis at different growth stages of an enzyme-producing fungus *Phaeophlebiopsis* sp.

CHENG Min^{1,2,3}, GUO Xinyao^{1,2,3}, LI Qirui^{1,2,3}, WANG Di^{1,2,3}, LI Xiaobing⁴, KANG Yingqian^{1,2,3,5*}

1 Department of Microbiology, School of Basic Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 Research Talent Base for the Relationship between Microbiology and Human Health in Guizhou Province, Key Laboratory of Pathogen Biology in Universities in Guizhou Province, Guiyang 550025, Guizhou, China

3 Key Laboratory of Environmental Pollution Monitoring and Disease Control, Ministry of Education, Guiyang 550025, Guizhou, China

4 Guizhou Chishui Riverside Maotai-flavor Liquor Research Center, Guiyang 550003, Guizhou, China

5 Guizhou Academy of Tobacco Science, Guiyang 550009, Guizhou, China

Abstract: A fungal strain ZYJHYZ254 isolated from medicine residues was identified as *Phaeophlebiopsis* sp. and its enzyme production activity was studied. The effects of differentially expressed genes on the growth and development of ZYJHYZ254 at different growth stages were analyzed on the basis of transcriptome to obtain high yield strain producing lignocellulosic hydrolase and search for related key regulation genes. It showed that cellulase production of ZYJHYZ254 peaked on the 5th day, and xylanase and lignin peroxidase production peaked on the 7th day of fermentation. A total of 1 232 differentially expressed genes was detected in mycelia aged 3 and 7 d. Taking 3 d-old mycelia as the control, 826 and 406 genes were significantly up-regulated and down-regulated, respectively. Gene annotation and GO and KEGG functional enrichment analysis showed that differentially expressed genes were mainly related to protein synthesis, metabolism and enzyme synthesis. In addition, a total of 387 CAZymes genes was expressed, and GH genes were the most abundant, accounting for 49.61%, and AA (97) and GT (62) ranked second and third, accounting for 25.06% and 16.02%, respectively. GH16 (24), accounting for 12.50% of GH, is the most abundant in GH, mainly encoding glucosidase, xylanase, etc. AA3 (37) is the most abundant in AA, accounting for 38.14%, encoding oxidase, dehydrogenase, etc. Further study found that GH16 and AA3 were most expressed in CAZymes in 3 d-old and 7 d-old mycelia, indicating that this strain was rich in glucosidase, xylanase, β -galactosidase, oxidase and dehydrogenase, which was of great significance for the degradation of lignocellulose in special biomass.

Keywords: special environment; filamentous fungi; transcriptomics; lignocellulose; carbohydrate-activated enzymes

木质纤维素(lignocellulose)是一种生物质,其降解产物如葡萄糖等在天然气类新能源生产中具有极高利用价值(Li *et al.* 2019; Carpita & Mccann 2020; 解先利等 2021)。与化石燃料相比,该生物质在全球范围内分布广泛,年产量在10–50 Gt (Taha *et al.* 2016), 约占全球生物产量

的一半,但其组分由复杂的碳水化合物聚合物与芳香杂环聚合物构成,并相互缠绕,为植物提供了极高的支撑强度,这也造成了高效降解和使用木质纤维素材料的最大障碍(de-Oliveira *et al.* 2009; 曹熙等 2019; Ming *et al.* 2019; Bhatia *et al.* 2020), 是阻碍其大规模利用的一大难点。

近年来采取微生物预处理方式降解生物废料中的木质纤维素,实现天然气等新能源生产成为研究热点(Usmani *et al.* 2020; 丁冉 2021)。

研究表明,丝状真菌能通过产特定胞外酶将纤维素、半纤维素分解为小分子单糖,部分酶能破坏木质素的结构,使其疏松易降解。此类方法对环境友好,能实现绿色可循环经济发展(Abraham *et al.* 2020)。目前已发现自然界中有诸多丝状真菌能将木质纤维素降解为单糖,例如,里氏木霉 *Trichoderma reesei* 具有强大的纤维素酶系(Silva *et al.* 2020; Zou & Zhou 2021);此外,白腐真菌在预处理木质纤维素方面也表现出了巨大潜能(Deepak & Chen 2008)。

但除普通生物质外,还有一类特殊生物质,如某些医疗废弃物、极端酸碱度生物质等,它们往往具有抑制微生物生长的作用,因此并不能用以往研究过的菌株来实现降解(Hassan *et al.* 2018),这类特殊生物质因其本身的极端环境常常抑制了大多数微生物的生长,对环境污染危害极大,其中药渣是典型的特殊生物质。中医药在我国影响深远,随着人口增长与对中草药需求的增加,中草药加工后产生的药渣对环境造成了诸多不利的影响,如土壤退化和侵蚀、农业用地的化学污染,这类药渣不仅难以用传统方法降解,且因其本身化学性质难以循环利用,但若能从筛选到耐药渣环境的功能菌株,对于环境保护及生物质清洁能源的开发都有着重要意义,且目前国内外尚未有过相关研究,因此我们认为从特殊生物质本身分离筛选具有降解木质纤维素功能的丝状真菌是值得尝试的切入点。

近年来转录组的发展使得研究不再局限在性状表达上,还可探知不同样本或不同功能状态下功能基因的差异表达(Chambers *et al.* 2019; Voshall & Moriyama 2020)。在此背景下,本研究以从高酸度抗生物降解药渣中分离筛选到的白腐

真菌 ZYJHYZ254 为研究对象,进行了生物学鉴定与产木质纤维素相关酶的时间规律探索,同时利用转录组学研究该菌株生长 3 d 与 7 d 时的基因表达差异,挖掘产碳水化合物活性酶(carbohydrate-activated enzymes, CAZymes)能力,为工业利用产酶真菌提供更多选择,也为实现环境中特殊生物质的循环利用打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株来源

菌株 ZYJHYZ254 来源于堆放 2 年的抗生物降解药渣,保存于中国普通微生物菌种保藏管理中心,保藏号为 CGMCC 3.20830。

1.1.2 培养基

种子培养基:葡萄糖 4.00 g、蛋白胨 10.00 g 和 ddH₂O 1 000 mL。木质素发酵液体培养基参考陈建军等(2018)的配方。纤维素/半纤维素发酵液体培养基:羧甲基纤维素钠/桦木木聚糖 3.00 g、蛋白胨 0.50 g、酵母粉 0.25 g、NaCl 0.25 g、KH₂PO₄ 0.05 g、MgSO₄ 0.025 g、(NH₄)₂SO₄ 0.25 g 和 CuSO₄ 0.000 3 g 于锥形瓶,加入 ddH₂O 50 mL。

1.1.3 主要试剂和仪器

H₂O₂、NaCl、MgSO₄ 和 KH₂PO₄ 等(贵州宏达尔生物科技有限公司),britton-Robinson 1buffer pH 4.5 (上海源叶生物科技有限公司),碱木质素、琼脂、苯胺蓝、蛋白胨和葡萄糖(北京索莱宝科技有限公司),PDA、PDB 培养基(BD),微晶纤维素、桦木木聚糖、甘氨酸和 ABTS (Sigma-Aldrich),真菌 DNA 提取试剂盒[生工生物工程(上海)股份有限公司];微量可调加样器(Gilson),ThermoFisher Legend Micro 21R 冷冻高速离心机(Thermo),生物安全柜(青岛海尔股份有限公司),BIO-RAD T100 Thermal Cycler 聚合酶链式反应仪(BIO-RAD),超低温冰箱(SANYO),epoch2 超微量微孔板分光光度计(BioTek)。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离和鉴定

称取抗生物降解药渣样品 2 g 于 100 mL 锥形瓶中,加入 50 mL 无菌 ddH₂O, 28 °C、180 r/min 孵育 12 h 后取出,静置 1 h,吸取 2 mL 上清液于 PDA 中,用封口膜封板避免污染,28 °C 恒温孵育 3–7 d,待长出菌后连续分离培养直至获得单一菌株,进行形态学及分子学鉴定。采用平皿培养(朱红梅等 2010),将菌株菌丝接种于 PDA 培养基中,28 °C 培养 5 d,观察菌落形态;再利用棉蓝染色法(沈萍和陈向东 2007)制片观察 1 000× 镜下菌丝及孢子形态;分子鉴定按 DNA 抽提试剂盒进行,对 ITS 及 LSU 产物扩增后测序,比对 NCBI 库中已有序列,并结合菌株的形态,鉴定种属后将序列提交至 NCBI 中获登录号。

1.2.2 产酶活力检测

将菌株 ZYJHYZ254 接种于种子培养基中,28 °C、150 r/min 培养出足量菌丝,称取用 ddH₂O 洗净后的菌丝球 2 g (湿重)转接于 100 mL 3 种发酵液体培养基中,同条件振荡培养 11 d,分别在第 3、5、7、9 和 11 天取 2 mL 培养液低温离心 10 min 后存于 -80 °C 待测酶活。纤维素酶活 (cellulase) 及木聚糖酶活 (xylanase) 用 DNS 法测定 (Miller 1959; Peciulyte *et al.* 2017),木质素过氧化物酶酶活 (lignin peroxidase) 用 ABTS 法测定 (Childs & Bardsley 1975)。

1.2.3 总 RNA 提取和转录组测序

将培养 3–7 d 的 ZYJHYZ254 直径 8 mm 菌饼接种到 PDB 培养基中,28 °C 恒温振荡培养,分别于第 3 天和第 7 天过滤菌液收集菌丝,取一定量的菌丝液氮冷冻后提取 RNA 分别标记为 L02 与 L01。RNA 的提取及文库构建由百迈克生物公司完成,进行 3 次生物学重复。

1.2.4 差异表达基因的筛选和功能富集分析

采用第 2 代测序技术,基于 Illumina NovaSeq 测序平台经过处理后得到 Unigene 序列。将 Unigene 序列与 NR、KEGG 等数据库比对

(Kanehisa *et al.* 2004; Deng *et al.* 2006; Buchfink *et al.* 2015),得到富集结果,使用 HMMER (Eddy 1998) 软件与 Pfam (El-Gbali *et al.* 2019) 库比对,获得注释信息。采用 DESeq2 (Love *et al.* 2014) 进行样品组间 Unigene 差异表达分析,将表达量差异 2 倍以上 FC (Fold Change) 且校正后 FDR < 0.01 的基因作为具有显著差异的基因,利用 clusterProfiler (Yu *et al.* 2012) 软件对注释到 GO 数据库的样品组间差异表达基因进行富集分析,利用 KOBAS (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/kobas3>) 检测 KEGG 通路中差异表达基因的统计学富集情况。

1.2.5 CAZymes 基因预测

将 Unigene 序列转换为 FASTA 格式后输入到 dbCAN 网页 (<https://ccb.unl.edu/dbCAN2/index.php>) 中的 Annotate 栏中[工具选择 HMMER (Eddy 1998),参数选择 E-Value < 1e-15, coverage > 0.35]得到碳水化合物活性酶基因表达结果,结合 CAZymes 数据库 (<http://www.cazy.org/>) 进行分析。

2 结果与分析

2.1 菌株鉴定

菌株 ZYJHYZ254 生长缓慢,在 28 °C 培养 3 d 时才能观察到明显的生长,培养至 10 d 左右长满平皿,菌株在 PDA 培养基中的形态见图 1A。生长初期菌落呈透明至乳白色,后期变成灰棕色,菌体较薄,表面光滑,质地坚硬,菌丝与培养基不易分离。分子鉴定结果显示该菌株与拟暗射脉菌属 *Phaeophlebiopsis* 的相似度为 99.70%,亲缘关系相近,因此命名该菌为 *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254,在 NCBI 中的登录号为 MW659157。利用乳酸酚棉蓝染液制作玻片,可在显微镜下观察到菌丝偶有分枝,内部包裹着许多折射的颗粒状物质,未见孢子(图 1B)。

2.2 产酶曲线测定

ZYJHYZ254 产酶结果见表 1,发现菌株大多在发酵第 3 天时逐渐产酶,5–7 d 时酶活达

到旺盛期, 9 d 后逐渐降低。其中在第 3 天时产少量 lignin peroxidase (44.15 U/L), 在第 7 天达到 209.96 U/L 的高峰, 之后随发酵时间的延长而降低, xylanase 也是在第 7 天达到峰值 (158.80 U/L), 之后慢慢稳定, cellulase 则在发酵第 5 天达到最高值, 为 149.80 U/L。进行 3 次生物学重复。以发酵时间为横坐标, 酶活为纵坐标绘制线性图, 以便更直观地发现该菌产酶周期规律(图 2)。

2.3 菌株 ZYJHYZ254 的转录组学分析

2.3.1 数据质控评估和 Unigene 功能注释分析

根据发酵产酶实验结果, 分别在开始产酶期 (3 d) 及产酶高峰期 (7 d) 对应的菌丝生长期取样进行转录组测序, 以分析菌株生长发育过程中的关键基因及差异变化。共获得 17.68 Gb Clean Data, 各样品 Clean Data 均达到 5.72 Gb, GC 含量在 55.93% 以上, Q30 碱基百分比均在 94.08% 以上。以上结果表明数据质量合格, 数据可用于后续功能分析。通过对 Unigene 组装后共获得 17 883 个 Unigene, 其中长度在 1kb 以上的 Unigene 有 9 008 个, N50 为 2 572, 组装完整性较高。经功能注释共获得 11 436 个结果, 在 Nr 数据库中被注释到 10 664 个, 占比最高, 为 93.25%, 在 COG 中被注释到的最少 (3 717 个), 仅占 32.50%。基因组数据已上传至国家微生物

科学数据中心 (NMDC) 中, 基因组编号为: NMDC60 033 605。

2.3.2 差异表达基因筛选

ZYJHYZ254 的 2 个不同生长时期共有显著差异表达基因 1 232 个, 其中被注释到的有 1 092 个, 注释到 Nr 和 TrEMBL 数据库的最多, 均为 1 087 个, 注释到 COG 的最少, 为 458 个。以发酵 3 d 的菌丝转录组为对照, 发现生长 7 d 的菌丝转录组中有 826 个基因表达量显著上调, 406 个基因表达量显著下调(图 3)。

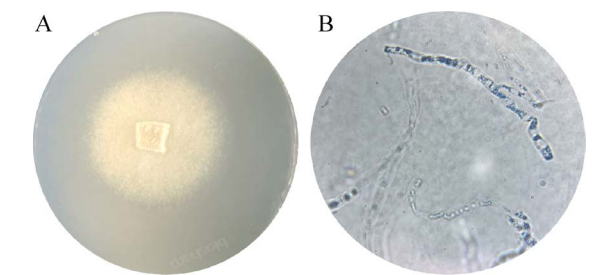


图 1 菌株 *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 在 PDA 培养基上的菌落形态和显微形态 A: 在 PDA 上培养 5 d 时的菌丝形态; B: 乳酸酚棉蓝染色, 显微镜放大倍数为 1 000×

Fig. 1 Colony and microscopic morphology of fungal strain *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 on PDA medium. A: Colony morphology cultured on PDA for 5 days; B: Microscopic image (1 000×) of the fungus stained with lactophenol cotton blue.

表 1 菌株 *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 在发酵第 3、5、7、9 和 11 天时的产酶结果

Table 1 Enzyme production results of *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 on days 3, 5, 7, 9 and 11 of fermentation

酶 Enzyme	发酵第 3 天 Fermentation on 3 th day	发酵第 5 天 Fermentation on 5 th day	发酵第 7 天 Fermentation on 7 th day	发酵第 9 天 Fermentation on 9 th day	发酵第 11 天 Fermentation on 11 th day
纤维素酶 Cellulase	27.34±3.17	149.80±5.78	112.08±3.51	90.47±1.82	72.82±4.12
木聚糖酶 Xylanase	39.94±8.31	108.15±2.17	158.80±2.95	137.89±5.53	122.87±5.36
木质素过氧化物酶 Lignin peroxidase	44.15±4.30	114.82±0.73	209.96±7.63	192.14±7.49	137.89±5.64

注: 表中数据为平均值±标准差(n=3)

Note: Values are $\bar{x} \pm SD$ (n=3).

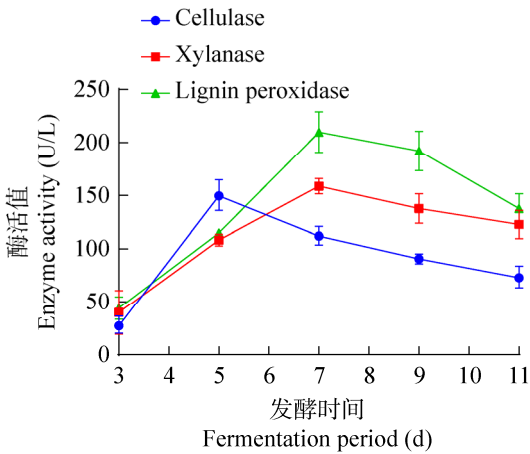


图 2 菌株 *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 产酶曲线图 蓝色：纤维素酶；红色：木聚糖酶；绿色：木质素过氧化物酶
 Fig. 2 Enzyme production curve of strain *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 during fermentation period. Blue: Cellulase; Red: Xylanase; Green: Lignin peroxidase.

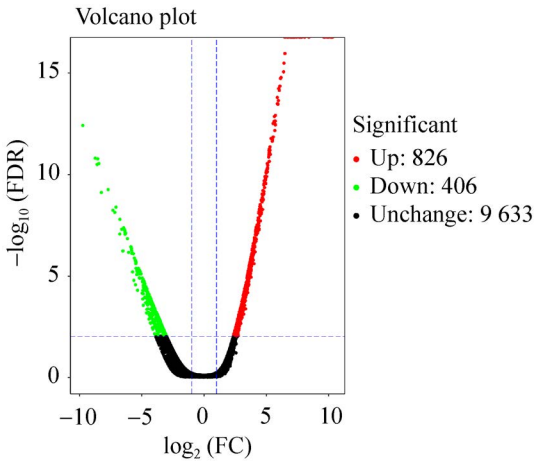


图 3 菌株 *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 不同生长时期菌丝差异表达分析火山图 Down：显著下调的基因；Unchange：无显著性差异的基因；Up：显著上调的基因；FC：两样品(组)间表达量的比值；FDR：校正后的 P 值
 Fig. 3 Volcano plot analysis of differentially expressed genes of strain *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 in different growth stages. Down: Down-regulated genes with significant differences; Unchange: Genes with no significant difference; Up: Up-regulated genes with significant differences; FC: Ratio of expression levels between two samples (groups); FDR: P value after correction.

2.3.3 GO 富集分析

将 ZYJHYZ254 的两个生长时期(3 d 与 7 d) 菌丝转录组中上下调差异表达基因进行 GO 富集分析，按图 4 归类为生物学过程、细胞组成和分子功能 3 大类，其中上调差异基因分别为 1 022、627 和 954 个，下调差异基因分别为 274、272 和 300 个。对显著差异基因进行注释发现，生物学过程中差异表达基因数目最多的途径是以三羧酸循环和对蛋白质的折叠为代表的代谢进程 (metabolic process) 与细胞过程 (cellular process)，细胞组成中膜(membrane)和膜部分 (membrane part)差异显著，分子功能中催化活性(catalytic activity)差异显著，其中氧化还原酶最突出，这暗示着在第 7 天时大量具有功能性的蛋白质开始合成，且代谢增加，利于某些酶的生成。

2.3.4 KEGG 通路分析

分别对上下调差异表达基因进行 KEGG 通路分析，结果表明，共有 358 个差异基因富集在 106 条通路上，差异表达通路多分布在代谢方面，此外还有部分遗传信息处理、细胞过程与环境信息处理方面(图 5)，在所有差异表达的基因中，上调的有 261 个，参与了 99 条信号通路的调控，调控显著的通路有碳代谢(carbon metabolism)、维生素 B6 代谢(vitamin B6 metabolism)、甲烷代谢(methane metabolism)、酪氨酸代谢在内的各类代谢与蛋白酶(proteasome)、内质网中蛋白加工 (protein processing in endoplasmic reticulum)和过氧化物酶(peroxisome)等的生成(图 6A)，表明菌株在该时期代谢旺盛，且产酶多；97 个下调差异基因富集到 99 条信号通路中，二萜生物合成(diterpenoid biosynthesis)、叶酸生物合成(folate biosynthesis)、色氨酸代谢(tryptophan metabolism)、减数分裂-酵母(meiosis-yeast)以及 DNA 复制(DNA replication)等(图 6B)，说明遗传信息处理过程的相关基因下调，影响了菌株生长速度。

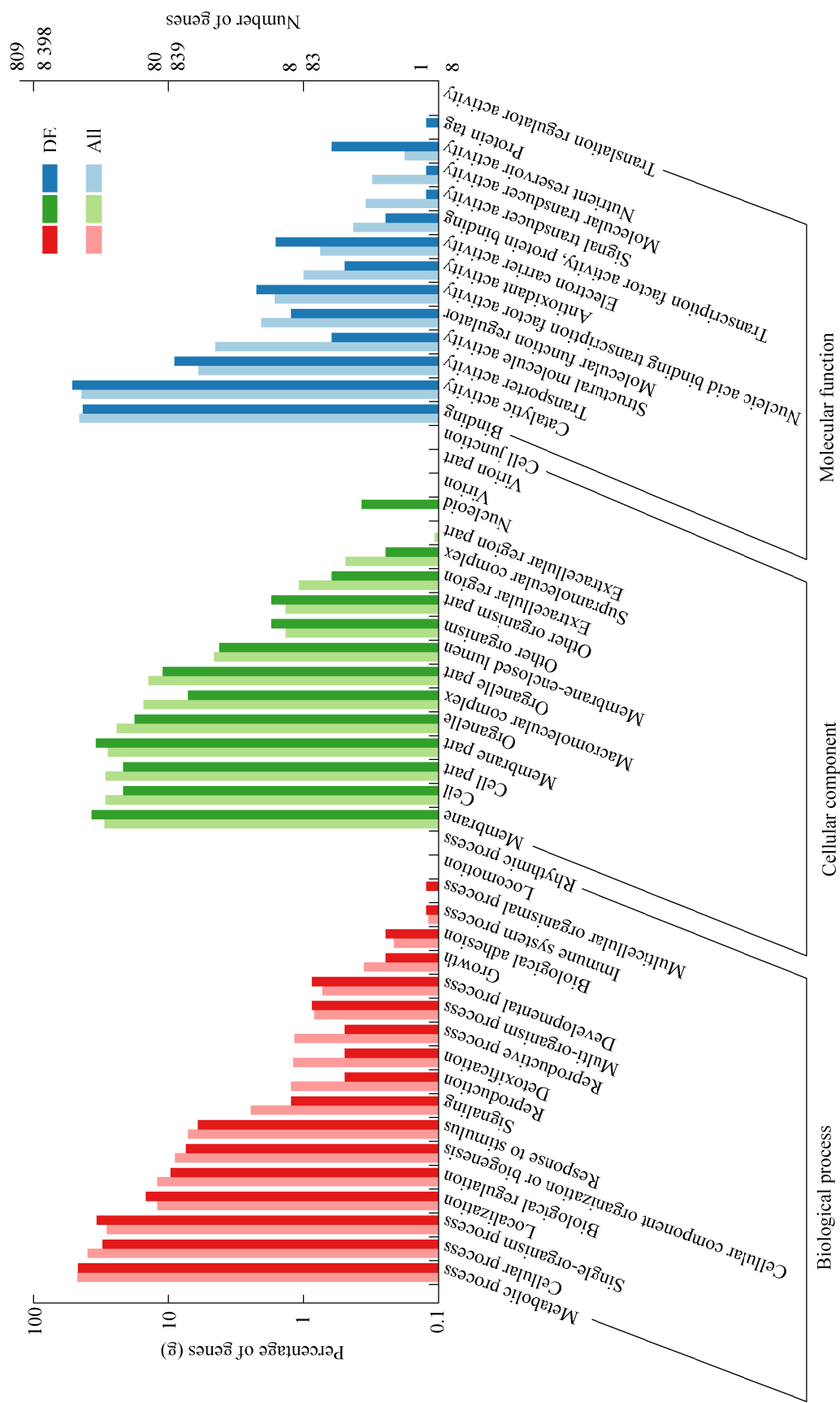


图 4 菌株 *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 不同生长时期差异表达基因 GO 功能分类 横坐标表示 GO 的 3 个基本分类及具体功能；纵坐标左边为基因数目所占百分比，右边为基因数目；DE：组间差异基因；All：所有表达基因

Fig. 4 GO classification of differentially expressed genes of *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 in different growth stages. Abscissa indicates three basic categories and specific functions of GO; Ordinate: The left is the percentage of the number of genes, the right is the number of genes; DE: Differentially expressed genes between groups; All: All expressed genes.

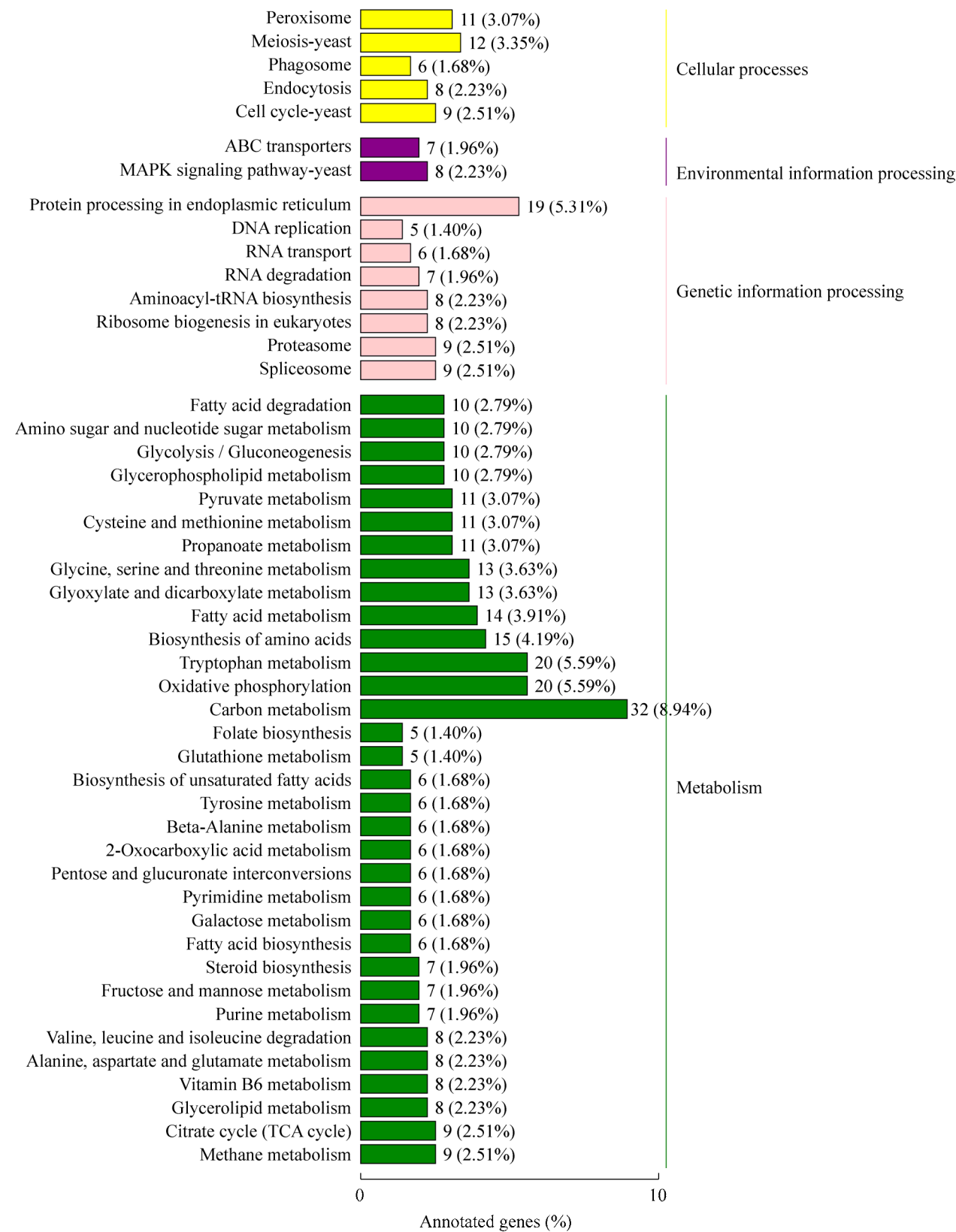


图 5 菌株 *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 不同生长时期差异表达基因 KEGG 分类图

Fig. 5 KEGG classification map of differentially expressed genes at different growth stages of *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254.

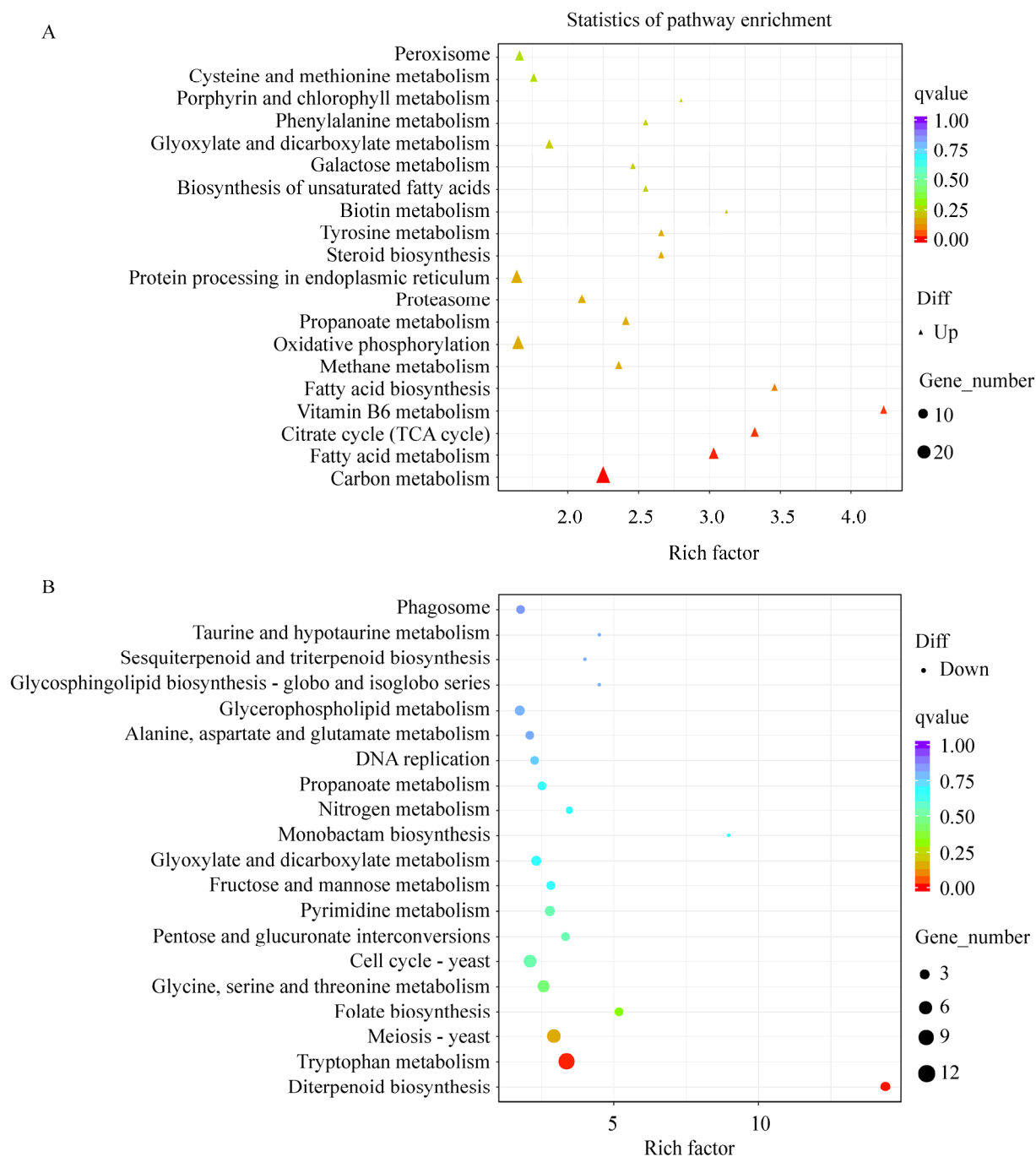


图 6 差异表达基因 KEGG 通路富集散点图 A: 上调基因; B: 下调基因; 纵坐标: 通路名称; Rich factor: 富集因子, 表示差异基因中注释到某通路的基因比例与所有基因中注释到该通路的基因比例的比值; qvalue: 图标颜色, 为校正后的 P 值, 越接近 0 表示显著性越可靠, 图标大小与基因数量成正比; Diff: 图标形状, 三角形代表上调, 圆形代表下调

Fig. 6 Rich hub map of KEGG pathway of differentially expressed genes. A: Up-regulated genes; B: Down-regulated genes; Ordinate: Path name; Rich factor: Refers to the ratio of the proportion of genes annotated to a pathway in different genes to the proportion of genes annotated to that pathway in all genes; qvalue: Icon color, which is the corrected P value. The closer it is to 0, the more reliable the significance; the size of the icon is proportional to the number of genes; Diff: Icon shape; triangle represents up, circle represents down.

2.3.5 CAZymes 基因表达预测

CAZymes 包括 6 大类，即辅助氧化还原酶 (AAs)、碳水化合物酯酶 (CEs)、多糖裂解酶 (PLs)、糖苷水解酶 (GHs)、糖苷转移酶 (GTs) 与碳水化合物结合模块 (CBMs) (Garron & Henrissat 2019)。ZYJHYZ254 在不同生长时期发现共有 387 个 CAZymes 基因表达，在上述 6 类酶基因中分别表达了 97、17、10、192、62 和 9 个 (图 7)，其中 GH 表达最丰富，约占表达总数的 49.61%，含量多的基因是 GH16 (24 个)，占 GH

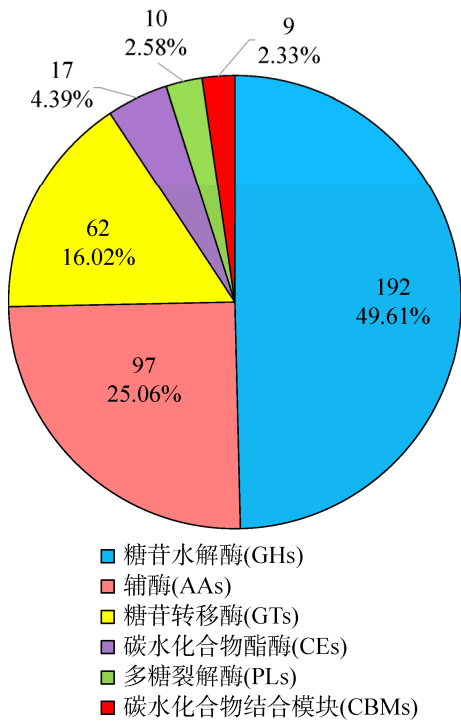


图 7 菌株 *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254 碳水化合物活性酶基因表达分布 百分比表示在所有 CAZymes 中某一类酶的占比; CEs: 碳水化合物酯酶; GHs: 糖苷水解酶; GTs: 糖基转移酶; PLs: 多糖裂解酶; AAs: 辅助氧化还原酶; CBMs: 非催化模块即碳水化合物结合模块

Fig. 7 Distribution of CAZymes gene expression in *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254. Percent sign represents the percentage of a particular enzyme in all CAZymes. CEs: Carbohydrate esterases; GHs: Glycoside hydrolases; GTs: Glycosyl transferases; PLs: Polysaccharide lyases; AAs: Auxiliary activities; CBMs: Carbohydrate-binding modules.

的 12.50%，编码葡萄糖苷酶、葡聚糖酶、木聚糖酶和 β -半乳糖苷酶等；其次为 AA (97 个) 与 GT (62 个)，分别约占总数的 25.06% 与 16.02%，AA 表达数量最多的是 AA3 (37 个)，占比 38.14%，编码氧化酶、脱氢酶等，其次是 AA1 (15 个)，是编码漆酶、铁氧化酶等的基因家族；GT 最丰富的为 GT2 (17 个)，占比 27.42%，主要编码一些合成酶与转移酶类，包括纤维素合成酶、木糖转移酶等。此结果表明 ZYJHYZ254 中酶系非常丰富，能产种类繁多的 CAZymes，其中 GH16 和 AA3 丰度最高，GH16 编码的酶是降解纤维素与半纤维素的主要酶类，而 AA3 编码的氧化脱氢酶系能有效阻止木质素的再聚合，从而为木质素的降解奠定基础。

3 讨论

近年来对于石油等燃料的转型使得大众将目光聚焦在了生物清洁能源的生产上，从木质纤维素生物质中强化乙醇燃料的生产更是研究的热点，其中酶促反应因营养需求低，不受抑制剂和其他微生物代谢的影响 (Wei 2016)，而成为了解决难转化问题的主要手段，目前已有数十种酶被测试，其中纤维素酶是最常用的酶，其次是 β -葡萄糖苷酶和木聚糖酶。木质纤维素生物质的酶促预处理涉及使用氧化和水解酶，这些酶大多由丝状真菌产生。然而，由于特殊生物质本身的抗生物降解性使得普通丝状真菌难以生存与产酶。

Phaeophlebiopsis sp. 是位于担子菌门多孔菌目下的一个种，属于白腐真菌，目前有 5 个种已被鉴定，但对于该属的文献报道较少，且基本上都作为内生真菌出现 (郭明天 2016; Santos *et al.* 2020)，而对于该菌在其他方面的功能尚未探索。*Phaeophlebiopsis* 与平革菌属 *Phanerochaete* 及大伏革菌属 *Phlebiopsis* 同科，平革菌与大伏革菌都因为具有强效的木质纤维素降解酶系而被广泛研究 (Deepak & Chen 2008; Sánchez-Corzo

et al. 2021), 故本研究从抗生物降解作用的药渣中分离鉴定出一株丝状真菌 *Phaeophlebiopsis* sp. ZYJHYZ254, 并通过前期的筛选培养发现其具有降解木质纤维素的能力(此部分结果未列出), 继而对其发酵培养, 记录了产纤维素酶、木聚糖酶以及木质素过氧化物酶的活力并从转录组学层面探究了菌丝在不同生长时间下差异基因的表达与 GO 富集分析、KEGG 通路分析及菌株的 CAZymes 基因表达预测。结果发现 ZYJHYZ254 具有较好的产酶能力, 且产酶全面, 基本上在发酵第 3 天有少许酶生成, 随后的 4d 内是快速产酶期, 而 3 种酶活基本上在第 9 天开始逐渐减少。

从转录组质控评估中发现测序数据的碱基识别精度>99.9%的可能在 94.08%以上, 表明数据质量较高, 且根据 Unigene 长度与数据饱和度检验发现有效测序数据量充足, 可用于进一步分析。差异表达基因筛选时发现发酵 7 d 的菌丝转录组中的上调基因比下调基因多一倍左右, 对显著上调的基因进行 GO 功能富集分析得知参与蛋白质合成、加工等细胞过程的基因与细胞的代谢活动如三羧酸循环相关基因都有显著富集, 表明蛋白质在菌丝生长第 7 天时快速合成与组装, 能量代谢加快。此外, 分子功能中的氧化还原酶也有显著的富集, 且基因上调数目增多, 而酶大多属于蛋白质, 这也预示着某些酶的合成。木质素过氧化物酶是氧化还原酶的一种, 氧化还原酶基因的上调也验证了酶活第 7 天时最高的结果。分别对上调和下调基因进行 KEGG 通路分析发现上调基因主要富集在代谢与酶、蛋白质的合成相关通路中, 这与 GO 结果一致。值得注意的是, 在第 7 天的下调基因中发现二萜生物合成最明显, 推测菌株 ZYJHYZ254 在生长第 7 天较第 3 天产某些次级代谢产物的速度减缓。

近几年利用转录组学筛选高产酶菌株已成为分离筛选优良产酶菌株新依据(谈苏慧等 2021)。本研究通过对菌株中 CAZymes 的基因检

索发现共有 387 个相关基因表达, 比许多已被发表过的纤维素酶系高产菌株的基因还要多。其中表达量由多到少依次是 GHs、AAs、GTs、CEs、PLs 和 CBMs, 所有相关酶调控基因中 GHs 约占一半, GHs 中数量最多的是 GH16, 该基因家族因具有切断糖苷键等功能而被重点研究, 本研究发现其编码葡萄糖苷酶、木聚糖酶和 β -半乳糖苷酶等, 葡萄糖苷酶是降解纤维素的主要酶之一, 半乳糖苷酶及木聚糖酶是降解半纤维素的主要酶成员, 这一结果也与酶活测试结果一致。此外, AAs 家族与木质素的降解存在关联已在许多研究中有过报道(艾士齐 2018), 本研究发现 AA3 具有 37 个, 是 ZYJHYZ254 的 CAZymes 数量最多的家族, AA3 能编码纤维二糖氧化还原酶, 此酶在木质纤维素的降解中起重要调节作用, 例如纤维二糖氧化还原酶中包括脱氢酶与醌还原酶, 这两种酶对于木质素的彻底降解起到很大帮助, 在许多模式物种如黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* 中均被发现, AA3 家族的存在也印证了 ZYJHYZ254 的木质素降解功能, 此外还有能编码漆酶的 AA1 家族在该菌中发现了 15 个, 表明其具有产漆酶能力。

综上所述, 本研究从高酸度抗生物降解的药渣中分离出一株丝状真菌 ZYJHYZ254, 经鉴定为 *Phaeophlebiopsis* sp., 发现其具有产纤维素酶、木聚糖酶及木质素过氧化物酶的能力, 通过对其菌丝生长第 3 天与第 7 天的转录组学检测, 以 3 d 为对照, 发现在第 7 天时各类能量代谢加快, 过氧化物酶产酶增多, 而二萜类次级代谢产物合成基因下调最明显, 对菌株中两种生长时期的 CAZymes 基因检索发现 AA3 的数量最多, 其编码的纤维二糖氧化还原酶对于木质素的降解起到重要作用, 其次是 GH16, 编码的酶能切断 β -1,4 糖苷键, 对纤维素与半纤维素的降解有重要意义, 充分表明了该菌具有降解木质纤维素的能力, 对于高酸度、抗生物降解的耐受性也较好, 研发与工业化利用潜力巨大。

致谢: 感谢贵州医科大学王梅竹、赵亮、黄劲、李启瑞老师在转录组分析软件方面的指导。

[REFERENCES]

- Abraham A, Mathew AK, Park H, Choi O, Sindhu R, Parameswaran B, Pandey A, Park JH, Sang BI, 2020. Pretreatment strategies for enhanced biogas production from lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 301: 122725
- Ai SQ, 2018. Bacterial diversity of the consortium with capacity of lignocellulose degradation and bacterial synergy analysis based on macrotranscriptomics. Master Thesis, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing. 1-104 (in Chinese)
- Bhatia SK, Jagtap SS, Bedekar AA, Bhatia RK, Patel AK, Pant D, Rajesh BJ, Rao CV, Kim YG, Yang YH, 2020. Recent developments in pretreatment technologies on lignocellulosic biomass: effect of key parameters, technological improvements, and challenges. *Bioresource Technology*, 300: 122724
- Buchfink B, Xie C, Huson DH, 2015. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, 12(1): 59-60
- Cao X, Liu H, Zhao H, 2019. Biodegradation of lignin by microbiome. *Agriculture Economic Research*, 50(3): 88 (in Chinese)
- Carpita NC, McCann MC, 2020. Redesigning plant cell walls for the biomass-based bioeconomy. *Journal of Biological Chemistry*, 295(44): 15144-15157
- Chambers DC, Carew AM, Lukowski SW, Powell JE, 2019. Transcriptomics and single-cell RNA-sequencing. *Respirology*, 24(1): 29-36
- Chen JJ, Liu LT, Cao XL, 2018. Study on screening of efficient lignin degrading bacteria and the conditions for laccase production. *Journal of Gansu Agricultural University*, 4: 130-136 (in Chinese)
- Childs RE, Bardsley WG, 1975. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochemical Journal*, 145(1): 93-103
- Deepak S, Chen SL, 2008. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(3): 399-417
- de-Oliveira PL, Duarte MC, Ponezi AN, Durrant LR, 2009. Purification and partial characterization of manganese peroxidase from *Bacillus pumilus* and *Paenibacillus* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(4): 818-826
- Deng YY, Li JQ, Wu SF, Zhu Y, Chen Y, He FC, 2006. Integrated nr database in protein annotation system and its localization. *Computer Engineering* Italic, 32(5): 71-74
- Ding R, 2021. Study on enhanced enzymatic hydrolysis and green separation process of lignocellulosic pretreatment. Master Thesis, Dalian University of Technology, Dalian. 1-114 (in Chinese)
- Eddy SR, 1998. Profile hidden markov models. *Bioinformatics* Italic, 14(9): 755-763
- El-Gebali S, Mistry J, Bateman A, Eddy SR, Luciani A, Potter SC, Qureshi M, Richardson LJ, Salazar GA, Smart A, Sonnhammer E, Hirsh L, Paladin L, Piovesan D, Tosatto S, Finn RD, 2019. The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, 47(D1): D427-D432
- Garron ML, Henrissat B, 2019. The continuing expansion of CAZymes and their families. *Current Opinion Chemical Biology*, 53: 82-87
- Guo MT, 2016. The preliminary research of aquatic plant endophytes in southwest China. Master thesis, Yunnan University, Kunming. 1-71 (in Chinese)
- Hassan SS, Williams GA, Jaiswal AK, 2018. Emerging technologies for the pretreatment of lignocellulosic biomass. *Bioresource Technology*, 262: 310-318
- Kanehisa M, Goto S, Kawashima S, Okuno Y, Hattori M, 2004. The KEGG resource for deciphering the genome. *Nucleic Acids Research*, 32 (Suppl.1): D277-D280
- Li X, Chen Y, Nielsen J, 2019. Harnessing xylose pathways for biofuels production. *Current Opinion in Biotechnology*, 57: 56-65
- Love MI, Huber W, Anders S, 2014. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12): 550
- Miller GL, 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31: 426-428
- Ming CY, Adiphold, Zou CG, Liao WQ, Zhao L, Wang MZ, Ronald PV, Kang YQ, 2019. The quest for fungal strains and their co-culture potential to improve enzymatic degradation of Chinese distillers' grain and other agricultural wastes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 144: 104765
- Peculyte A, Pisano M, de Vries RP, Olsson L, 2017. Hydrolytic potential of five fungal supernatants to enhance a commercial enzyme cocktail. *Biotechnology Letters*, 39(9): 1403-1411
- Sánchez-Corzo LD, Álvarez-Gutiérrez PE, Meza-Gordillo R, Villalobos-Maldonado JJ, Enciso-Pinto S, Enciso-Sáenz S, 2021. Lignocellulolytic enzyme production from wood rot fungi collected in Chiapas, Mexico, and their growth on lignocellulosic material. *Journal of Fungi*, 7(6): 450

- Santos T, dos Santos Carvalho C, de-Almeida MA, Delforno TP, Duarte I, 2020. Endophytic fungi isolated from Brazilian medicinal plants as potential producers of antioxidants and their relations with anti-inflammatory activity. 3 Biotech, 10(5): 223
- Shen P, Chen XD, 2007. Experimental microbiology. Higher Education Press, Beijing. 74-78 (in Chinese)
- Silva J, Salgado J, Vici AC, Ward RJ, Polizeli M, Guimarães L, Furriel R, Jorge JA, 2020. A novel *Trichoderma reesei* mutant RP698 with enhanced cellulase production. Brazilian Journal of Microbiology, 51(2): 537-545
- Taha M, Foda M, Shahsavari E, Aburto-Medina A, Adetutu E, Ball A, 2016. Commercial feasibility of lignocellulose biodegradation: possibilities and challenges. Current Opinion in Biotechnology, 38: 190-197
- Tan SH, Lu HQ, Chen W, Zhang LJ, Tian HT, Gu XX, 2021. Identification, enzymatic characterization and transcriptomic analysis of a mannanase-producing thermophilic fungus. Journal of Food Science, 42(18): 65-72 (in Chinese)
- Usmani Z, Sharma M, Gupta P, Karpichev Y, Gathergood N, Bhat R, Gupta VK, 2020. Ionic liquid based pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced bioconversion. Bioresource Technology, 304: 123003
- Voshall A, Moriyama EN, 2020. Next-generation transcriptome assembly and analysis: impact of ploidy. Methods, 176: 14-24
- Wei S, 2016. The application of biotechnology on the enhancing of biogas production from lignocellulosic waste. Applied Microbiology Biotechnology, 100(23): 9821-9836
- Xie XL, Liu YY, Cao YQ, Zhao YY, Chen SX, 2021. Research progress on fractal dynamics of enzymatic hydrolysis of lignocellulose. Advances in New and Renewable Energy, 9(5): 426-433 (in Chinese)
- Yu G, Wang LG, Han Y, He QY, 2012. ClusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. Omics: A Journal of Integrative Biology, 16(5): 284-287
- Zhu HM, Xu H, Wen H, 2010. Preparation and application of common media for medical fungi. Chinese Journal of Mycology, 5(5): 296-306 (in Chinese)
- Zou G, Zhou Z, 2021. CRISPR/Cas9-mediated genome editing of *Trichoderma reesei*. Methods in Molecular Biology, 2234: 87-98
- [附中文参考文献]
- 艾士奇, 2018. 木质纤维素降解复合菌系的细菌多样性及其协同作用的宏转录组学解析. 黑龙江八一农垦大学硕士论文, 大庆. 1-104
- 曹熙, 刘慧, 赵欢, 2019. 微生物降解木质素的研究. 南方农机, 50(3): 88
- 陈建军, 刘梁涛, 曹香林, 2018. 高效木质素降解菌的筛选及产漆酶条件的研究. 甘肃农业大学学报, 4: 130-136
- 丁冉, 2021. 木质纤维素预处理强化酶水解及绿色分离工艺研究. 大连理工大学硕士论文, 大连. 1-114
- 郭明天, 2016. 中国西南部分地区水生植物内生真菌多样性初步研究. 云南大学硕士论文, 昆明. 1-71
- 沈萍, 陈向东, 2007. 微生物学实验. 北京: 高等教育出版社. 74-78
- 谈苏慧, 卢海强, 陈伟, 张莉娟, 田洪涛, 谷新晰, 2021. 一株产甘露聚糖酶嗜热真菌的鉴定、酶学性质表征及转录组学分析. 食品科学, 42(18): 65-72
- 解先利, 刘云云, 曹运齐, 赵元元, 陈世贤, 2021. 木质纤维素酶水解分形动力学的研究进展. 新能源进展, 9(5): 426-433
- 朱红梅, 徐红, 温海, 2010. 医学真菌常用培养基的制备和应用. 中国真菌学杂志, 5(5): 296-306