

高效木质素降解菌的筛选及其对玉米秸秆的降解效果

张芳芳 张桐 戴丹 张振豪 张波[✉] 李玉[✉]

吉林农业大学食药菌教育部工程研究中心 吉林 长春 130118

摘要: 本研究利用愈创木酚和苯胺蓝固体培养基对菌株进行初筛, 利用形态学和分子生物学对筛选出的菌株进行鉴定, 以黄孢原毛平革菌 *Phanerochaete chrysosporium* CGMCC 5.0776 为对照, 利用其对玉米秸秆进行预处理并测定木质素和纤维素的降解率, 测定筛选菌株在预处理玉米秸秆过程中漆酶、锰过氧化物酶 (manganese peroxidase, MnP) 和木质素过氧化物酶 (lignin peroxidase, LiP) 活性。结果表明: 利用愈创木酚和苯胺蓝固体培养基, 从 16 株白腐真菌菌株中筛选出 2 株具有较高漆酶或 MnP 活性的菌株, 鉴定其为桦栓孔菌 *Trametes betulina* (L.) Pilát (ZT-153) 和亚黑管孔菌 *Bjerkandera fumosa* (Pers.) P. Karst. (ZT-307), 测定 *T. betulina* ZT-153 和 *B. fumosa* ZT-307 对玉米秸秆酸不溶木质素降解效率分别为 13.60% 和 21.87%, 较对照 *P. chrysosporium* CGMCC 5.0776 高 1.58% 和 9.85%, 对纤维素的降解率较低, 分别为 4.10% 和 4.50%。2 株菌株在预处理玉米秸秆过程中, *T. betulina* ZT-153 表现出漆酶和 MnP 活性, *B. fumosa* ZT-307 只表现出 LiP 活性。其中 *B. fumosa* ZT-307 对玉米秸秆酸不溶木质素的降解效率最高, 在秸秆资源的综合利用方面具有较好的潜力和应用前景。

关键词: 白腐真菌, 玉米秸秆, 木质素, 纤维素

[引用本文] 张芳芳, 张桐, 戴丹, 张振豪, 张波, 李玉, 2021. 高效木质素降解菌的筛选及其对玉米秸秆的降解效果. 菌物学报, 40(7): 1869-1880

Zhang FF, Zhang T, Dai D, Zhang ZH, Zhang B, Li Y, 2021. Screening of efficient lignin-degrading fungal strains and their degradation on cornstalk. Mycosystema, 40(7): 1869-1880

基金项目: 吉林省科技发展计划 (20190201026JC); 科技部重点研发专项 (2018YFE0107800)

Supported by the Jilin Province Science and Technology Development Plan Project (20190201026JC) and the National Key R & D of Ministry of Science and Technology (2018YFE0107800).

✉ Corresponding authors. E-mail: yuli966@126.com, zhangbofungi@126.com

ORCID: ZHANG Fang-Fang (0000-0002-0965-222X)

Received: 2020-12-25, accepted: 2021-02-22

Screening of efficient lignin-degrading fungal strains and their degradation on cornstalk

ZHANG Fang-Fang ZHANG Tong DAI Dan ZHANG Zhen-Hao ZHANG Bo[✉] LI Yu[✉]

Engineering Research Center of Chinese Ministry of Education for Edible and Medicinal Fungi, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China

Abstract: Efficient lignin-degrading fungal strains were screened by using guaiacol- and aniline blue-containing solid media. Using *Phanerochaete chrysosporium* CGMCC 5.0776 as a control, cornstalk was pretreated with the selected strains. The degradation rates of lignin and cellulose, and the activities of laccase, manganese peroxidase (MnP) and lignin peroxidase (LiP) were determined. Two strains with higher activities of laccase or MnP were screened from 16 white-rot fungal strains. Based on morphology and molecular biology, they were identified as *Trametes betulina* (ZT-153) and *B. fumosa* (ZT-307). The lignin degradation efficiency on cornstalk was 13.60% by *T. betulina* ZT-153 and 21.87% by *B. fumosa* ZT-307, or respectively 1.58% and 9.85% as against *P. chrysosporium* CGMCC 5.0776, and the degradation rate of cellulose was 4.10% and 4.50% respectively. During the pretreatment of cornstalk, *T. betulina* ZT-153 showed active in degrading laccase and MnP, while *B. fumosa* ZT-307 only showed active in degrading LiP. *Bjerkandera fumosa* ZT-307 showed the highest lignin degradation ability, and it has potential and application prospects in comprehensive utilization of cornstalk resources.

Key words: white-rot fungi, cornstalk, lignin, cellulose

中国是农业大国，也是秸秆年产量最多的国家。统计数据显示，2015 年中国秸秆资源总量约 10.4 亿吨，以水稻秸秆、小麦秸秆和玉米秸秆为主，在东北地区，玉米秸秆是主要的农业副产物（张强等 2005；蒋泓峰 2016）。秸秆作为一个重要的可再生资源，“用则利，弃则害”（毕于运 2010）。秸秆的主要成分包括木质素、纤维素和半纤维素，木质素和半纤维素以共价键的形式形成一种天然的屏障，将纤维素包裹在其中，防止纤维素被酶解。木质素紧密的碳水化合物结构是影响玉米秸秆利用效率的主要屏障（Buranov & Mazza 2008；宋丽丽 2013；左飒飒 2018）。利用微生物预处理秸秆因具有耗能小、成本低、无污染的特点引起研究者的广泛关注。

其中白腐真菌对秸秆进行预处理，破坏秸秆的木质纤维素结构，对于秸秆资源的利用具有重要意义。

我国大型菌物资源丰富（李玉等 2015），其中多孔菌种类繁多，目前达 600 多种，东北地区达 300 多种，作为白腐真菌的重要类群，多孔菌为其研究提供了宝贵的资源（戴玉成 2009；Dai 2010；司静等 2011a, 2011b, 2011c；王伟等 2011；韩美玲等 2017；郑飞等 2017；吴怡等 2019, 2020）。白腐真菌对木质素具有很强的降解能力，能够在纯培养的条件下将木质素完全降解为 CO₂ 和 H₂O（Reid 1995；李慧蓉 2005）。早期 Kirk & Tien（1984）研究了白腐真菌模式菌株 *Phanerochaete chrysosporium* Burds. 对木质素的降解。此后 Wan & Li（2010）

利用虫拟蜡孔菌 *Ceriporiopsis subvermispora* (Pilát) Gilb. & Ryvarden 降解玉米秸秆,在接种 42d 时,其对木质素的降解效果达到 39.2%,对纤维素的降解效果不足 5%。Sun *et al.* (2011) 利用毛栓孔菌 *Trametes hirsuta* (Wulfen) Lloyd 对玉米秸秆进行降解,在预处理 42d 时,对木质素降解率达到 71.91%。宋丽丽等 (2017) 利用硬毛粗盖孔菌 *Funalia trogii* (Berk.) Bondartsev & Singer 预处理玉米秸秆,木质素降解率为 33.99%,纤维素降解率为 8.77%。甄静等 (2017) 对 *T. hirsuta* XYG422 漆酶发酵条件进行优化,预处理玉米秸秆,木质素降解率达到 83.54%。白腐真菌对木质纤维素的降解能力因属、种而异,比较理想的白腐真菌菌株对木质素具有特异性降解效果,微量降解纤维素 (Blanchette *et al.* 1988)。

本研究从 16 株白腐真菌菌株中筛选得到有较强漆酶或过氧化物酶活性的 2 株菌,利用其对玉米秸秆进行预处理,发现它们对玉米秸秆中的酸不溶木质素具有较强的降解作用。研究结果为白腐真菌资源的开发利用以及对玉米秸秆木质素降解机制研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试菌株: 本试验所用 *Phanerochaete chrysosporium* CGMCC 5.0776 购自中国科学院菌种保藏中心,其他 16 株菌株由作者采集、分离、纯化,现保藏于吉林农业大学菌种保藏中心 (CCMJ)。

1.1.2 试验原料: 玉米秸秆取自吉林农业大学试验田。

1.1.3 培养基: 愈创木酚-PDA 固体培养基: 200g 马铃薯提取液,琼脂 20g,葡萄糖 20g,愈创木酚 0.4mL 加水定容到 1L, 121℃灭菌 3min,用于定性测定菌株的产漆酶能力 (芦

光新等 2014)。苯胺蓝-PDA 固体培养基: 200g 马铃薯提取液,琼脂 20g,葡萄糖 20g,苯胺蓝 0.1g,加水定容到 1L, 121℃灭菌 30min,用于定性测定菌株的产过氧化物酶能力 (蔡磊等 2002)。菌株活化培养基: 葡萄糖 20g,琼脂 20g,酵母浸粉 5.0g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05g,加水定容到 1L, pH 自然, 121℃灭菌 30min (司静 2014)。液体培养基: 葡萄糖 20g,酵母浸粉 5g, KH_2PO_4 1g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 50mg,加水定容到 1L, pH 自然,分装至 250mL 锥形瓶中,每瓶倒入液体培养基 100mL, 121℃灭菌 30min 后,加入维生素 B_1 40 μL 。玉米秸秆固体培养基: 将玉米秸秆于 60℃烘干至恒重后粉碎,过 40 目筛,按照玉米秸秆:水=1:2.5 的比例加入到培养皿中, 121℃灭菌 30min。

1.2 方法

1.2.1 菌株活化: 将于 4℃低温保藏的白腐真菌菌株取出,置于室温过夜,接种至菌株活化培养基中, 25℃恒温培养至菌丝铺满平板。

1.2.2 菌株筛选: 取直径为 1cm 的菌块分别接种到愈创木酚-PDA 固体培养基中 25℃培养 6d,以及苯胺蓝-PDA 固体培养基中 25℃培养 5d,利用十字划线法,测量培养皿中的菌丝直径、显色圈/褪色圈直径、显色圈/褪色圈直径与菌丝直径的比值,每个菌株设置 3 个重复。选择菌丝生长较快且漆酶/过氧化物酶活性较高的菌株用于后续试验。

1.2.3 菌株鉴定: (1) 形态学鉴定: 采用传统分类学方法,观察菌株的宏观特征和微观特征,参照李玉等 (2015) 和赵继鼎等 (1998) 的研究进行鉴定。

(2) 分子生物学鉴定: 取一定量的新鲜菌丝体和子实体,采用基因组 DNA 提取试剂盒 (康为世纪) 提取总 DNA。PCR 扩增引物为 ITS5 和 ITS4 (White *et al.* 1990), PCR 反应

体系: 10×PCR buffer 2.5μL, dNTP (10mmol/L) 2μL, 引物 ITS4 和 ITS5 (10μmol/L) 1μL, *Taq* DNA 聚合酶 (5U/μL), 模板 DNA 2μL, 补加去离子水至 25μL。PCR 反应条件: 95℃预变性 3min; 94℃变性 40s, 54℃退火 45s, 72℃延伸 1min, 共 35 个循环; 72℃延伸 10min, 4℃终止反应。产物送到生工生物工程(上海)股份有限公司测序, 结合 GenBank 的一些已知序列并利用最大似然法和贝叶斯法分析构建系统发育树, 选用 *Boletopsis leucomelaena* (Pers.) Fayod 和 *Hydnellum geogenium* (Fr.) Banker 作为外群, 利用 MAFFT 进行序列的比对 (Kazutaka *et al.* 2005), Gblocks 获取序列的保守区域 (Talavera & Castresana 2007), ModelFinder 选择最佳模型和参数 (Kalyaanamoorthy *et al.* 2017), 利用 IQtree 和 MrBayes 分别构建系统发育树 (Ronquist *et al.* 2012; Nguyen *et al.* 2015)。

1.2.4 种子发酵: 取直径为 1cm 的菌块 5 个, 接种至液体培养基中, 25℃、150r/min 振荡培养 6d。

1.2.5 玉米秸秆预处理: 以种子发酵液体积: 玉米秸秆质量=1:1 的比例将种子发酵液接种到玉米秸秆固体培养基中, 25℃培养 33d 后, 将样品取出, 于 60℃烘干至恒重, 装入自封袋中备用。测定预处理秸秆酸不溶木质素、纤维素含量, 参照王玉万和徐文玉 (1987) 采用的方法, 本方法主要测定酸不溶木质素的含量。

1.2.6 粗酶液提取: 以种子发酵液体积: 玉米秸秆质量=1:1 的比例将种子发酵液接种到玉米秸秆固体培养基中, 25℃培养 30d, 每 5d 取出 3 份预处理的玉米秸秆样品, 样品取出后迅速放于液氮中冷冻, 后置于 -80℃冰箱保存。称取 1g 上述样品于离心管中, 加蒸馏水 3mL, 25℃、150r/min 振荡 4h, 4 层纱布过滤, 滤液于 4℃下 3 000r/min 离心 10min, 取

上清液, 所得液体即为胞外粗酶液, 于 4℃冰箱保存 (丛珊 2014; 叶建强等 2018)。

1.2.7 酶活性测定: 采用试剂盒 (苏州科铭生物技术有限公司) 对预处理的玉米秸秆样品中漆酶、锰过氧化物酶 (manganese peroxidase, MnP) 和木质素过氧化物酶 (lignin peroxidase, LiP) 活性进行测定。漆酶活力单位的定义 (U): 在波长 420nm 下, 每分钟将 1μmol 2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]底物氧化所需的酶量。MnP 活力单位的定义 (U): 在波长 465nm 下, 每分钟将 1μmol 愈创木酚氧化所需的酶量。LiP 活力单位的定义 (U): 在波长 651nm 下, 每 1mL 反应体系中每分钟吸光度值变化 0.01 为一个酶活单位。

1.2.8 数据分析: 采用软件 SPSS 22.0 计算平均值和标准差, 使用 Duncan's 分析各个处理之间的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 菌株筛选

将 16 株菌接种于愈创木酚-PDA 固体培养基和苯胺蓝-PDA 固体培养基上, 测量显色圈和变色圈直径 (表 1)。在愈创木酚-PDA 固体培养基上生长第 6 天时, 除 ZT-002、ZT-299 外, 均产生红褐色的显色圈。其中 ZT-153 菌落直径与显色圈直径的比值最大, 为 1.40, 除 ZT-070、ZT-079 外, 菌落直径与显色圈直径的比值显著高于其他菌株, 因此判断 ZT-153 具有较高的漆酶活性, 用于后续实验。在苯胺蓝-PDA 固体培养基上, ZT-070 接种第 5 天, 菌丝铺满培养基, 菌落直径为 84.33mm, 未出现褪色圈。其他菌株均产生褪色圈, 其中 ZT-307 的菌落直径为 61.36mm; 褪色圈直径最大, 为 59.39mm; 变色圈直径与显色圈直径比值为 0.97。ZT-218 的变色圈直径与显色圈直径比值最大为 0.98, 与 ZT-307 无显著性差异,

表 1 愈创木酚平板显色和苯胺蓝平板褪色结果

Table 1 Results of guaiacol-containing plate coloration and aniline blue-containing plate decolorization of white-rot fungal strains tested

菌株 Strain	愈创木酚平板显色 Guaiacol-containing plate coloration			苯胺蓝平板褪色 Aniline blue-containing plate decolorization		
	菌落直径 Colony diameter (mm)	显色圈直径 Coloration circle diameter (mm)	显色圈直径/ 菌落直径 Coloration circle diameter/ Colony diameter	菌落直径 Colony diameter (mm)	褪色圈直径 Decolorization circle diameter (mm)	褪色圈直径/ 菌落直径 Decolorization circle diameter/ Colony diameter
ZT-002	51.33±3.35 cd	0.00	0	57.93±1.39 fg	51.05±3.50 b	0.88±0.04 b
ZT-003	49.12±2.78 cd	53.61±3.03 de	1.09±0.02 cd	58.91±4.11 f	26.88±2.67 fg	0.46±0.04 g
ZT-014	63.27±3.25 b	65.15±3.85 b	1.03±0.05 cde	76.08±1.98 bc	50.88±2.59 b	0.67±0.05 d
ZT-018	52.64±3.74 c	54.01±4.63 de	1.03±0.03 cde	68.26±1.07 e	24.36±8.02 g	0.36±0.11 h
ZT-021	43.89±0.31 de	51.63±1.24 e	1.18±0.03 bc	66.51±4.84 e	36.94±7.44 de	0.55±0.07 ef
ZT-070	47.95±10.91 cd	59.97±1.17 c	1.30±0.32 ab	84.33±0.66 a	0.00	0
ZT-079	32.52±3.87 f	44.02±2.13 f	1.36±0.16 a	36.16±1.27 g	9.68±0.27 h	0.27±0.00 h
ZT-123	53.74±3.51 c	46.89±1.76 f	0.87±0.08 e	66.90±3.97 e	32.50±0.27 ef	0.49±0.03 fg
ZT-153	33.30±5.13 f	46.45±5.54 f	1.40±0.05 a	54.79±1.52 gh	15.76±4.36 h	0.29±0.07 h
ZT-156	51.50±2.48 cd	56.92±2.19 cd	1.10±0.02 cd	69.45±1.59 de	40.42±2.92 d	0.58±0.04 de
ZT-157	50.21±2.10 cd	55.21±1.75 cde	1.10±0.02 cd	54.86±0.82 gh	42.15±0.28 cd	0.77±0.01 c
ZT-178	71.24±1.05 a	68.35±1.75 b	0.96±0.03 de	77.23±1.16 b	12.33±0.16 h	0.16±0.00 i
ZT-197	72.54±1.57 a	76.18±0.68 a	1.05±0.03 cde	72.64±0.84 cd	48.13±1.74 bc	0.66±0.02 d
ZT-218	40.66±1.28 e	45.10±0.40 f	1.11±0.04 cd	47.53±0.43 i	46.70±0.67 bc	0.98±0.01 a
ZT-299	10±0 g	0.00	0	52.97±2.49 h	14.19±3.53 h	0.27±0.08 h
ZT-307	33.35±4.32 f	31.54±0.95 g	0.95±0.10 de	61.36±1.12 f	59.39±1.37 a	0.97±0.01 ab

注：同列数值后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著

Note: Different lowercase letters after the same column indicate significant differences at $P<0.05$ level.

根据褪色圈的大小判断 ZT-218 和 ZT-307 具有较强的产过氧化物酶能力，因 ZT-307 的菌丝直径和褪色圈直径显著高于 ZT-218，因此选择 ZT-307 用于后续试验。

2.2 菌株鉴定

ZT-153、ZT-307 的形态特征分别与 *T. betulina* 和 *B. fumosa* 在李玉等（2015）和赵继鼎等（1998）研究中的描述相似。

分子生物学鉴定：基于 ITS 序列利用最大似然法和贝叶斯法构建系统发育树（图 1）。

ZT153a（子实体）和 ZT153b（菌丝体）与来自中国、美国和尼泊尔的 6 株 *T. betulina* 菌株聚在了一个分支，支持率 BP（bootstrap value）为 96%，PP（posterior probability）为 1。ZT307a（子实体）和 ZT307b（菌丝体）以较好的支持率（BP=91%，PP=0.993）与来自加拿大、日本和拉脱维亚等国家的 6 株 *B. fumosa* 菌株聚为一支。结合传统形态学和分子生物学对 ZT-153、ZT-307 进行鉴定，鉴定结果见表 2。

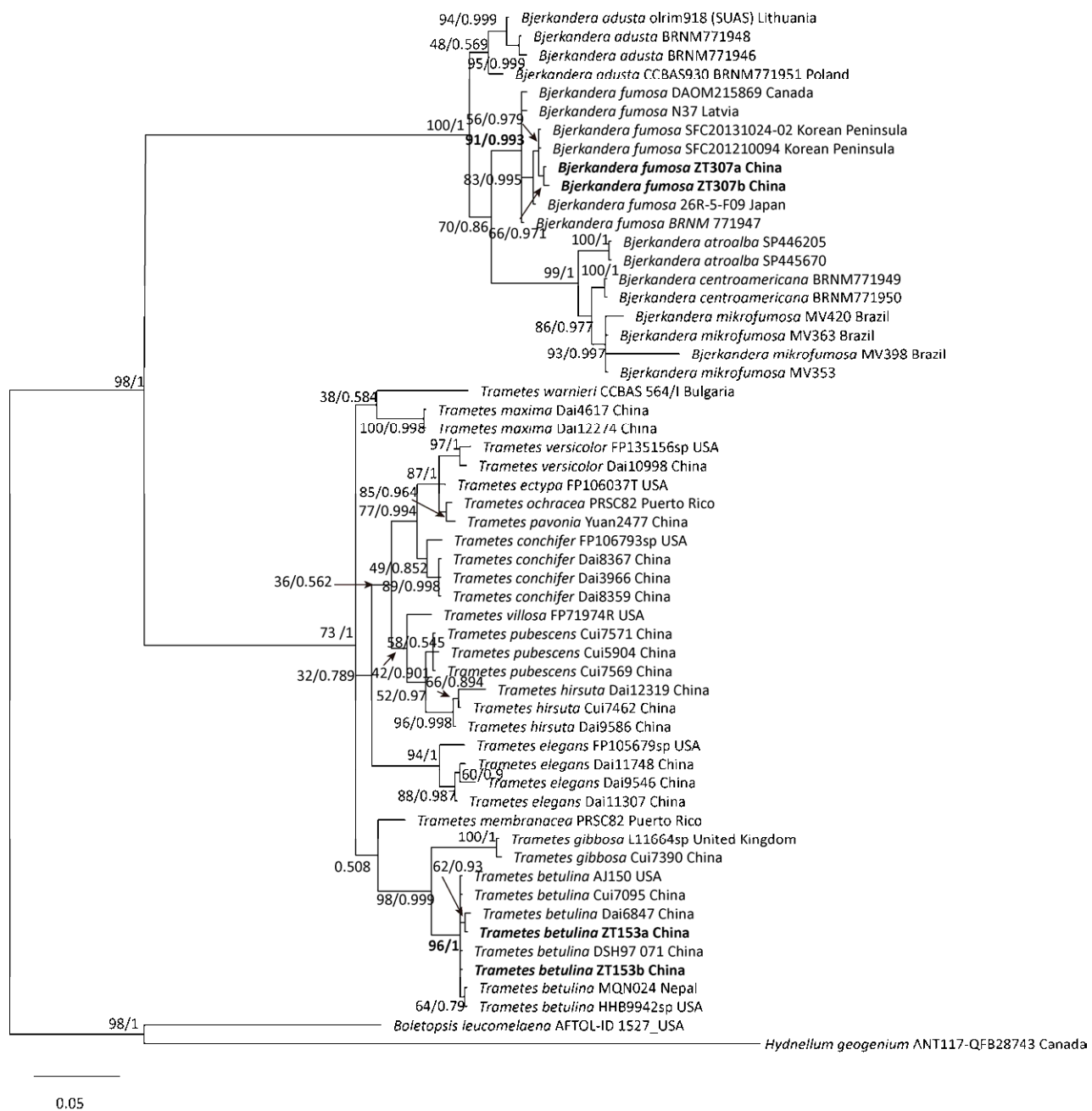


图 1 基于 ITS 序列构建 ZT-153、ZT-307 及其相关种的系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of ZT-153 and ZT-307 tested strains and their related species based on ITS sequences.

表 2 试验菌株

Table 2 Experimental strains used

菌株	名称	采集地
Strain	Name	Collecting site
ZT-153	桦栓孔菌 <i>Trametes betulina</i> (L.) Pilát	黑龙江漠河 Mohe, Heilongjiang
ZT-307	亚黑管孔菌 <i>Bjerkanera fumosa</i> (Pers.) P. Karst.	辽宁本溪 Benxi, Liaoning

2.3 菌株对玉米秸秆的预处理效果

以 *P. chrysosporium* CGMCC 5.0776 为对照菌株，使用上述试验筛选的 *T. betulina* ZT-153 和 *B. fumosa* ZT-307 对玉米秸秆进行预处理(图 2)。利用王玉万和徐文玉(1987)所采用的方法，测定在玉米秸秆预处理 33d 时，3 株菌对玉米秸秆中酸不溶木质素和纤维素降解效率。结果显示，3 株菌均可对玉米秸秆中的木质素和纤维素产生降解作用，*P. chrysosporium* CGMCC 5.0776 对玉米秸秆木质素的降解率为 12.02%，对纤维素的降解率为 29.63%；*B. fumosa* ZT-307 对木质素的降解率最高，为 21.87%，对纤维素的降解率为 4.50%；*T. betulina* ZT-153 对木质素的降解率

达到 13.60%，对纤维素的降解率为 4.10%；其中 *T. betulina* ZT-153 和 *B. fumosa* ZT-307 对木质素的降解率较对照 *P. chrysosporium* CGMCC 5.0776 高 1.58%和 9.85%，但 3 株菌对木质素的降解率差异不显著；*T. betulina* ZT-153 和 *B. fumosa* ZT-307 对纤维素的降解率均小于 5%，显著低于 *P. chrysosporium* CGMCC 5.0776 (表 3)。

2.4 菌株预处理玉米秸秆过程中酶活性的测定

利用 *T. betulina* ZT-153 和 *B. fumosa* ZT-307 预处理玉米秸秆，每 5d 取一次样，提取样品粗酶液，测定其漆酶、MnP 和 LiP 活性(图 3)。测定 *T. betulina* ZT-153 在预处

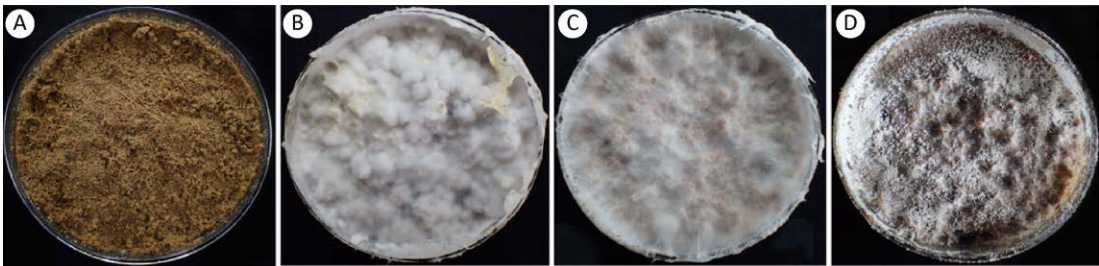


图 2 三株菌株预处理玉米秸秆 33d 时的菌丝长势 A: 空白玉米秸秆；B: *Trametes betulina* ZT-153；C: *Bjerkandera fumosa* ZT-307；D: *Phanerochaete chrysosporium* CGMCC 5.0776
Fig. 2 Mycelial growth of three tested strains after cornstalk pretreatment for 33d. A: CK; B: *T. betulina* ZT-153; C: *B. fumosa* ZT-307; D: *P. chrysosporium* CGMCC 5.0776.

表 3 三株菌对玉米秸秆的降解效果

Table 3 Degradation of cornstalk by three tested strains

菌株	纤维素含量	纤维素降解率	酸不溶木质素含量	酸不溶木质素降解率
Strain	Cellulose content (%)	Degradation rate of cellulose (%)	Acid-insoluble lignin content (%)	Degradation rate of acid-insoluble lignin (%)
<i>Phanerochaete chrysosporium</i> CGMCC 5.0776	12.56±0.42 a	29.63±2.35 a	5.61±0.42 a	12.02±6.52 a
<i>Trametes betulina</i> ZT-153	17.12±0.54 b	4.10±3.06 b	5.51±0.20 a	13.60±3.19 a
<i>Bjerkandera fumosa</i> ZT-307	17.05±2.33 b	4.50±1.57 b	4.98±0.26 a	21.87±4.18 a

注：同列数值后不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平上差异显著
Note: Different lowercase letters after the same column indicate significant differences at $P<0.05$ level.

理玉米秸秆过程中表现出漆酶和 MnP 活性, *B. fumosa* ZT-307 仅检测到 LiP 活性。*T. betulina* ZT-153 在预处理玉米秸秆过程中, 在第 20 天时漆酶活力急剧下降, 之后迅速上升, 在第 30 天时漆酶活性达到最高值, 为 21.36U/g; 检测到较低的 MnP 活性, 呈现先增高后降低的趋势, 在预处理玉米秸秆 20 天时, 达到峰值, 为 0.32U/g。 *B. fumosa* ZT-307 在预处理玉米秸秆过程中, 在第 10 天和第 20 天时木质素过氧化物酶均达到峰值, 为 15U/g, 测定结果显示在第 10 在时, 其 LiP 活性比较稳定。

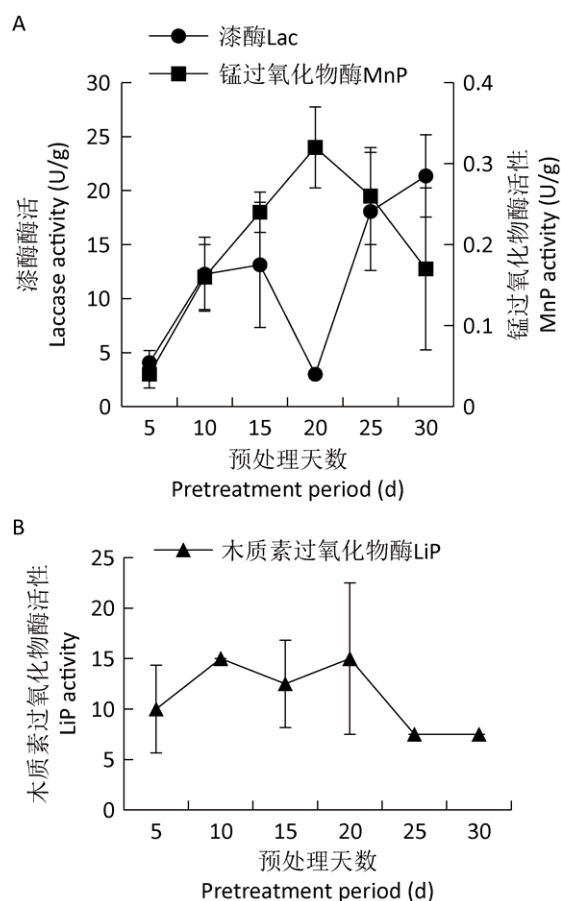


图 3 两株菌预处理玉米秸秆过程中酶活性的变化
A: *Trametes betulina* ZT-153; B: *Bjerkandera fumosa* ZT-307

Fig. 3 Variations of the enzyme activities during the course of cornstalk pretreatment by two fungal strains. A: *T. betulina* ZT-153; B: *B. fumosa* ZT-307.

3 讨论

本研究从 16 株白腐真菌菌株中, 通过王玉万和徐文玉 (1987) 所采用的方法测定筛选的 2 株菌株对玉米秸秆酸不溶木质素的降解效果, 其中 *T. betulina* ZT-153 和 *B. fumosa* ZT-307 对玉米秸秆的木质素降解率高于模式菌株 *P. chrysosporium* CGMCC 5.0776。

研究者利用 *T. betulina* 处理山毛榉 (Fukasawa *et al.* 2005)、毛白杨 (Wang *et al.* 2014)、小麦秸秆 (Knežević *et al.* 2013) 等基质时, 取得了较好的降解木质素的效果, 而利用其降解玉米秸秆基质的研究鲜见报道。本研究中, *T. betulina* ZT-153 对玉米秸秆酸不溶木质素的降解率为 13.60%, 与该菌株对其他基质的降解效果相比, 其对玉米秸秆酸不溶木质素的降解优势低于其对其他基质的降解作用, 推断一方面是由于同一菌株在不同的培养体系和培养条件下, 其降解能力和产酶能力不同 (Singh & Chen 2008); 同一菌株对不同基质的木质素降解能力不同 (Adejoye & Fasidi 2009); 同种不同菌株的产酶能力也存在差异 (张桐等 2018)。另一方面由于本研究利用 72% 浓硫酸对秸秆进行处理, 过滤后所剩余的残渣即为木质素含量, 一些木质素可能因溶解在硫酸中而流失, 所测定的木质素含量仅是酸不溶木质素含量 (王玉万和徐文玉 1987)。*B. fumosa* ZT-307 是本研究中对玉米秸秆木质素降解率最高的菌株, 而利用 *B. fumosa* 对不同基质木质素降解的研究未见报道。根据现有的文献调查, 较其他白腐真菌菌株相比, *B. fumosa* 对玉米秸秆酸不溶木质素的降解效率较高。吴雪君 (2017) 利用绒毛栓孔菌 *T. pubescens* Cui 7571 预处理玉米秸秆 42d, 玉米秸秆酸不溶木质素含量由原来的 21.65% 转变为 17.20%, 计算后可知

其对玉米秸秆酸不溶木质素的降解率为 20.55%，而 *B. fumosa* ZT-307 在对玉米秸秆预处理 33d 时酸不溶木质素的降解率已达到 21.87%。

在白腐真菌预处理玉米秸秆的过程中，测定 *T. betulina* ZT-153 分泌漆酶和 MnP，*B. fumosa* ZT-307 仅分泌 LiP。木质素的生物降解是一个复杂的反应过程，其酶活性的分泌依赖于菌株、底物和环境条件等因素。在木质素降解过程中，漆酶可能在一个菌株或培养物中起中心作用，而一些菌株在木质素降解过程中，仅表现出 MnP 或 LiP 活性或同时表现出漆酶与 MnP 活性，并在木质素降解过程中发挥关键作用 (Sun *et al.* 2011)。*T. betulina* ZT-153 在预处理玉米秸秆 30d 时，漆酶仍具有较高活性，且达到其 30d 内的最大值，可能是由于真菌自溶导致细胞内的酶释放到培养基中所致 (Arora *et al.* 2002)。

本研究筛选出的 2 株菌均对玉米秸秆中的木质素具有降解作用，其中 *B. fumosa* ZT-307 对玉米秸秆酸不溶木质素的降解率较模式菌株 *P. chrysosporium* CGMCC 5.0776 高 9.85%，可见该菌株在玉米秸秆预处理方面具有较大的开发利用前景，后续还可以对其预处理条件进行优化，或利用此菌株与其他菌株或物理化学方法相结合预处理玉米秸秆，增加其对木质素的降解效果。

致谢: 感谢吉林农业大学饶固和汪阳在系统发育树构建方面提供的技术支持。

[REFERENCES]

- Adejoye OD, Fasidi IO, 2009. Biodegradation of agro-wastes by some Nigerian white-rot fungi. *BioResources*, 4(2): 816-824
- Arora DS, Chander M, Gill PK, 2002. Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 50(2): 115-120
- Bi YY, 2010. Study on straw resources evaluation and utilization in China. PhD Dissertation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing. 1-229 (in Chinese)
- Blanchette RA, Burnes TA, Leatham GF, Effland MJ, 1988. Selection of white-rot fungi for biopulping. *Biomass*, 15(2): 93-101
- Buranov AU, Mazza G, 2008. Lignin in straw of herbaceous crops. *Industrial Crops and Products*, 28(3): 237-259
- Cai L, Yin JF, Yang LP, Zhang KQ, 2002. Several qualitative methods for the screening of fungi to decompose lignin. *Microbiology China*, 29(1): 67-69 (in Chinese)
- Cong S, 2014. The suitable varieties of *Auricularia auricular* complex substrate screening and nutritional physiology research. Master Thesis, Jilin Agricultural University, Changchun. 1-40 (in Chinese)
- Dai YC, 2009. A checklist of polypores in China. *Mycosystema*, 28(3): 315-327 (in Chinese)
- Dai YC, 2010. Species diversity of wood-decaying fungi in Northeast China. *Mycosystema*, 29(6): 801-818
- Fukasawa Y, Osono T, Takeda H, 2005. Decomposition of Japanese beech wood by diverse fungi isolated from a cool temperate deciduous forest. *Mycoscience*, 46: 97-101
- Han ML, An Q, Wu XJ, Zheng F, Si J, 2017. Effects of different lignocellulose as inducers on laccase activities of *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Mycosystema*, 36(3): 349-357 (in Chinese)
- Jiang HF, 2016. Blue book of China straw industry. China Agriculture Press, Beijing. 1-476 (in Chinese)
- Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermini LS, 2017. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nature Methods*, 14: 587-589

- Kazutaka K, Kuma KI, Toh H, Miyata T, 2005. MAFFT version 5: improvement in accuracy of multiple sequence alignment. *Nucleic Acids Research*, 33(2): 511-518
- Kirk TK, Tien M, 1984. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 9: 317-318
- Knežević A, Milovanović I, Stajić M, Lončar N, Brčeski I, Vukojević J, Čilerdžić J, 2013. Lignin degradation by selected fungal species. *Bioresource Technology*, 138: 117-123
- Li HR, 2005. Biology and biotechnology of white rot fungi. Chemical Industry Press, Beijing. 1-317 (in Chinese)
- Li Y, Li TH, Yang ZL, Bau T, Dai YC, 2015. Atlas of Chinese macrofungal resources. Central China Farmers Press, Zhengzhou. 1-1351 (in Chinese)
- Lu GX, Wang JB, Chen XR, Yang CD, Xue L, 2014. Study on a laccase-producing fungus from alpine grassland soil in eastern Qilian Mountains: screening, identification, and activity analyses. *Acta Prataculturae Sinica*, 23(2): 243-252 (in Chinese)
- Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ, 2015. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 32(1): 268-274
- Reid ID, 1995. Biodegradation of lignin. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1): 1011-1018
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP, 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3): 539-542
- Si J, 2014. Decolorization of azo dye Congo Red by white rot fungus *Trametes pubescens*. PhD Dissertation, Beijing Forestry University, Beijing. 1-199 (in Chinese)
- Si J, Cui BK, Dai YC, 2011a. Primary screening of effective *Trametes* strains with high laccase-productivity and optimization of conditions on laccase production. *Microbiology China*, 38(3): 405-416 (in Chinese)
- Si J, Cui BK, He S, Dai YC, 2011b. Optimization of conditions for laccase production by *Perenniporia subacida* and its application in dye decolorization. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 17(5): 736-741 (in Chinese)
- Si J, Li W, Cui BK, Dai YC, 2011c. Advances of research on characteristic, molecular biology and applications of laccase from fungi. *Biotechnology Bulletin*, 2: 48-55 (in Chinese)
- Singh D, Chen SL, 2008. The white-rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*: conditions for the production of lignin-degrading enzymes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81: 399-417
- Song LL, 2013. Mechanism study on improvement of enzymatic hydrolysis of corn stover by efficient lignin modification with white-rot fungus. PhD Dissertation, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan. 1-119 (in Chinese)
- Song LL, Wei T, Zhang JT, Sun H, Zhang NL, 2017. Effect of biological pretreatment with *Funalia trogii* on enzymatic hydrolysis and chemical components of corn stover. *China Brewing*, 36(2): 106-110 (in Chinese)
- Sun FH, Li J, Yuan YX, Yan ZY, Liu XF, 2011. Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(7): 931-938
- Talavera G, Castresana J, 2007. Improvement of phylogenies after removing divergent and ambiguously aligned blocks from protein sequence alignments. *Systematic Biology*, 56(4): 564-577
- Wan CX, Li YB, 2010. Microbial delignification of corn stover by *Ceriporiopsis subvermispora* for improving cellulose digestibility. *Enzyme and Microbial Technology*, 47(1-2): 31-36

- Wang W, Cui BK, Dai YC, 2011. Screening of white rot fungi and preliminary mechanism in their biodegradation on *Populus nigra* during short-time fermentation. Journal of Beijing Forestry University, 33(5): 91-96 (in Chinese)
- Wang W, Yuan TQ, Cui BK, 2014. Biological pretreatment with white rot fungi and their co-culture to overcome lignocellulosic recalcitrance for improved enzymatic digestion. BioResources, 9(3): 3968-3976
- Wang YW, Xu WY, 1987. Quantitative analysis program of hemicellulose, cellulose and lignin in lignocellulose solid substrate fermentation. Microbiology China, 14(2): 81-84 (in Chinese)
- White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor JW, 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds.) PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, New York. 315-322
- Wu XJ, 2017. A study on the mechanism of degradation and utilization of lignocellulose by *Pleurotus ostreatus*. PhD Dissertation, Beijing Forestry University, Beijing. 1-120 (in Chinese)
- Wu Y, Ma HF, Cao YJ, Si J, Cui BK, 2019. Advances on properties, production, purification and immobilization of fungal laccase. Biotechnology Bulletin, 35(9): 1-10 (in Chinese)
- Wu Y, Ma HF, Cao YJ, Si J, Cui BK, 2020. Medium optimization for the laccase production by white rot fungus *Porodaedalea laricis* and its dye decolorizing capacity. Biotechnology Bulletin, 36(1): 45-59 (in Chinese)
- Ye JQ, Song B, Li Y, Fu YP, Li D, Li CT, Wang F, Xu AR, Meng LS, 2018. Preliminary study on physiological and biochemical characteristics of *Grifola frondosa* during physiological maturity and fruiting stage. Jiangsu Agricultural Sciences, 46(19): 133-136 (in Chinese)
- Zhang Q, Lu J, Hou L, Jin H, Piao JH, 2005. Research progress of alcoholic fermentation of corn stover. Feed Industry, 26(9): 20-23 (in Chinese)
- Zhang T, Zhang B, Li Y, 2018. Decolorization of thiazine dye methylene blue by three white-rot fungi. Mycosystema, 37(9): 1243-1250 (in Chinese)
- Zhao JD, Zhang XQ, Xu LW, 1998. Flora fungorum sinicorum (Vol. 3) Polyporaceae. Science Press, Beijing. 208-209 (in Chinese)
- Zhen J, Li GJ, Li W, Du ZM, Wang JW, Yin WB, Chen GC, 2017. Fermentation condition optimization of laccase producing strain *Trametes hirsuta* XYG422 and its activity on corn straw degradation. Mycosystema, 36(6): 718-729 (in Chinese)
- Zheng F, Meng G, An Q, Wu XJ, Si J, Liu HX, 2017. Physiological studies on laccase-producing process of white rot fungus *Trametes orientalis* incubated with two kinds of liquid media. Mycosystema, 36(5): 582-597 (in Chinese)
- Zuo SS, 2018. Mechanism of corn stover degradation by white rot fungal treatment and application in production. PhD Dissertation, China Agricultural University, Beijing. 1-101 (in Chinese)
- [附中文参考文献]
- 毕于运, 2010. 秸秆资源评价与利用研究. 中国农业科学院博士论文, 北京. 1-229
- 蔡磊, 尹峻峰, 杨丽萍, 张克勤, 2002. 几种简便的木质素降解真菌定性筛选方法. 微生物学通报, 29(1): 67-69
- 丛姗, 2014. 黑木耳复合基质的适宜品种筛选及营养生理的研究. 吉林农业大学硕士论文, 长春. 1-40
- 戴玉成, 2009. 中国多孔菌名录. 菌物学报, 28(3): 315-327
- 韩美玲, 安琪, 吴雪君, 郑飞, 司静, 2017. 不同木质纤维素诱导对糙皮侧耳液体发酵产漆酶活性的影响. 菌物学报, 36(3): 349-357
- 蒋泓峰, 2016. 中国秸秆产业蓝皮书. 北京: 中国农业出版社. 1-476
- 李慧蓉, 2005. 白腐真菌生物学和生物技术. 北京: 化学工业出版社. 1-317
- 李玉, 李泰辉, 杨祝良, 图力古尔, 戴玉成, 2015. 中国大型菌物资源图鉴. 郑州: 中原农民出版社. 1-1351

- 芦光新, 王军邦, 陈秀蓉, 杨成德, 薛莉, 2014. 东祁连山高寒草地土壤产漆酶真菌的筛选、鉴定及产酶条件的初步研究. 草业学报, 23(2): 243-252
- 司静, 2014. 白腐真菌绒毛栓孔菌对偶氮染料刚果红脱色的研究. 北京林业大学博士论文, 北京. 1-199
- 司静, 崔宝凯, 戴玉成, 2011a. 栓孔菌属漆酶高产菌株的初步筛选及其产酶条件的优化. 微生物学通报, 38(3): 405-416
- 司静, 崔宝凯, 贺帅, 戴玉成, 2011b. 微酸多年卧孔菌产漆酶条件优化及其在染料脱色中的应用. 应用与环境生物学报, 17(5): 736-741
- 司静, 李伟, 崔宝凯, 戴玉成, 2011c. 真菌漆酶性质、分子生物学及其应用研究进展. 生物技术通报, 2: 48-55
- 宋丽丽, 2013. 白腐菌高效改性木质素促进秸秆酶解反应机制研究. 华中科技大学博士论文, 武汉. 1-119
- 宋丽丽, 魏涛, 张静涛, 孙浩, 张宁亮, 2017. 硬毛粗盖孔菌预处理对玉米秸秆酶水解及组分变化的影响. 中国酿造, 36(2): 106-110
- 王伟, 崔宝凯, 戴玉成, 2011. 白腐菌的筛选及其短期降解黑杨的初步机制. 北京林业大学学报, 33(5): 91-96
- 王玉万, 徐文玉, 1987. 木质纤维素固体基质发酵物中半纤维素、纤维素和木素的定量分析程序. 微生物学通报, 14(2): 81-84
- 吴雪君, 2017. 糙皮侧耳降解利用木质纤维素的机理研究. 北京林业大学博士论文, 北京. 1-120
- 吴怡, 马鸿飞, 曹永佳, 司静, 崔宝凯, 2019. 真菌漆酶的性质、生产、纯化及固定化研究进展. 生物技术通报, 35(9): 1-10
- 吴怡, 马鸿飞, 曹永佳, 司静, 崔宝凯, 2020. 白腐真菌落叶松锈迷孔菌产漆酶液体培养基的优化及其对染料的脱色作用. 生物技术通报, 36(1): 45-59
- 叶建强, 宋冰, 李玉, 付永平, 李丹, 李长田, 王菲, 徐安然, 孟灵思, 2018. 灰树花生理成熟期到出菇期生理生化初探. 江苏农业科学, 46(19): 133-136
- 张强, 陆军, 侯霖, 金花, 朴敬惠, 2005. 玉米秸秆发酵法生产燃料酒精的研究进展. 饲料工业, 26(9): 20-23
- 张桐, 张波, 李玉, 2018. 三种白腐真菌脱色噻嗪染料亚甲基蓝. 菌物学报, 37(9): 1243-1250
- 赵继鼎, 张小青, 徐连旺, 1998. 中国真菌志(第三卷)多孔菌科. 北京: 科学出版社. 208-209
- 甄静, 李冠杰, 李伟, 杜志敏, 王继雯, 尹文兵, 陈国参, 2017. 毛栓孔菌 XYG422 菌株产漆酶发酵条件优化及对玉米秸秆生物降解的研究. 菌物学报, 36(6): 718-729
- 郑飞, 孟歌, 安琪, 吴雪君, 司静, 刘红霞, 2017. 白腐真菌东方栓孔菌在两种液体培养基中产漆酶过程的生理学研究. 菌物学报, 36(5): 582-597
- 左飒飒, 2018. 白腐真菌降解玉米秸秆机理及其应用研究. 中国农业大学博士论文, 北京. 1-101

(本文责编: 韩丽)