



研究报告

一株低温木质素降解菌的筛选、产酶优化及酶学性质

韩月颖¹ 张喜庆¹ 曲云鹏² 高云航^{*1}¹ 吉林农业大学动物科学技术学院 吉林 长春 130118² 吉林市船营区林业和畜牧业管理局 吉林 吉林 132000

摘要:【背景】我国北方地区秋冬两季平均气温较低,低温环境使得秸秆更难自然降解。【目的】筛选高效低温木质素降解菌,探索其酶学特性并提高其产酶性能和秸秆降解效率。【方法】通过苯胺蓝法和酶活测定对菌株进行筛选,以 Lip、Lac、Mnp 酶活力为评价指标,采用单因素和响应面法进行产酶条件优化及酶学性质研究,通过固态发酵试验研究其对秸秆的降解效率。【结果】筛选到一株高效菌 LS-1,经形态学和分子生物学鉴定其为嗜麦芽窄食单胞菌。菌株 LS-1 在木质素为碳源、蛋白胨为氮源、pH 8.0、培养温度 15 °C、培养时间 3 d 时产酶效果最佳,其中 Lip 酶活力为 23.34 U/mL、Lac 酶活力为 9.37 U/mL、Mnp 酶活力为 50.89 U/mL。Lip 和 Lac 最适作用温度为 30 °C 且热稳定性良好,Mnp 最适作用温度为 50 °C 但热稳定性较差。Lac 最适作用 pH 4.0 且耐酸性较好,Lip 和 Mnp 最适作用 pH 5.0; 0.75 mmol/L Mg²⁺和 0.5%吐温-20 对 Lip 有促进作用,1 mmol/L Cu²⁺和丁香酸对 Lac 有促进作用,0.1%–0.5%吐温-20 均对 Mnp 有促进作用。15 °C 固态发酵后,秸秆失重率达 18.85%,木质素降解率达 36.14%,比对照组提高约 6 倍以上。【结论】本研究为低温木质素高效降解提供了优质菌种资源,在秸秆降解方面具有良好的应用前景。

关键词: 低温木质素降解菌, 产酶优化, 酶学性质, 秸秆降解

Screening, enzyme-production optimization and enzymatic properties of a low-temperature lignin-degrading bacteria

HAN Yueying¹ ZHANG Xiqing¹ QU Yunpeng² GAO Yunhang^{*1}¹ College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China² Jilin Forestry and Animal Husbandry Administration of Chuanying District, Jilin, Jilin 132000, China

Abstract: [Background] In northern China, the average temperature in autumn and winter is low, which makes straw more difficult to degrade naturally. [Objective] Screening high efficiency lignin-degrading bacteria of low-temperature, explore enzymatic properties and improve enzyme-producing performance and

Foundation items: National Key Research and Development Program (2018YFD0501800, 2016YFD0501400); National Modern Agricultural Industrial Technology System Construction Special Project (CARS-37); Science and Technology Development Program of Jilin Province (20190201296JC); Education Department Project of Jilin Province (JJKH20180643KJ)

***Corresponding author:** E-mail: gaoyunhang@163.com

Received: 19-01-2021; **Accepted:** 05-03-2021; **Published online:** 30-07-2021

基金项目: 国家重点研发计划专项(2018YFD0501800, 2016YFD0501400); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-37); 吉林省科技发展计划项目(20190201296JC); 吉林省教育厅项目(JJKH20180643KJ)

***通信作者:** E-mail: gaoyunhang@163.com

收稿日期: 2021-01-19; **接受日期:** 2021-03-05; **网络首发日期:** 2021-07-30

straw degradation efficiency. **[Methods]** High efficiency lignin degradation strains were screened by aniline blue method and enzyme activity determination, and the enzymatic production conditions were optimized by single-factor screening and response surface experiment, and the degradation efficiency of straw was determined through solid-state fermentation experiments. **[Results]** An efficient lignin-degradation strain LS-1 was screened and identified as *Stenotrophomonas maltophilia*. When the carbon and nitrogen sources of LS-1 were lignin and peptone, pH 8.0, temperature 15 °C, time 3 days, the activities of Lip, Lac and Mnp were 23.34 U/mL, 9.37 U/mL and 50.89 U/mL, respectively. The optimal temperature of Lip and Lac was 30 °C and the thermal stability was well, while the optimal temperature of Mnp was 50 °C and the thermal stability was poor, the optimum action environment of the three enzymes was acidic. 0.75 mmol/L Mg^{2+} and 0.5% Tween-20 can promote Lip activity, 1 mmol/L Cu^{2+} and syringic acid can promote Lac activity, and 0.1%–0.5% Tween-20 can promote Mnp activity. After low-temperature solid-state fermentation, the weight loss rate of straw was 18.85%, and the lignin degradation rate was 36.14%, which was about 6 times higher than that of the control group. **[Conclusion]** This experimental provides high-quality bacterial resources for the efficient degradation of low-temperature lignin and has a well application prospect in straw degradation.

Keywords: low-temperature lignin-degrading bacteria, enzyme production optimization, enzymology properties, straw degradation

我国作为农业生产大国, 秸秆所造成的资源浪费和环境污染已经成为全球亟待解决的问题^[1-2], 而造成秸秆难自然降解的主要原因是作为植物细胞壁主要组成成分的木质素难以自然高效降解^[3]。木质素资源丰富, 是打造生态经济的一种可持续性资源^[4-5]。

我国北方地区由于秋冬两季平均气温较低, 低温条件下酶活性容易降低或失活, 极大地限制了常温菌对秸秆的降解效率。康志超^[6]在森林表层土壤中筛选出低温木质纤维素降解菌群, 木质素降解率最高达 35.8%。张洪源等^[7]发现, 当土壤温度低于 16 °C 时微生物对秸秆的降解效果很差。由此可见, 低温菌的筛选具有良好的应用前景。

目前, 关于低温纤维素降解菌已有大量研究, 而低温木质素降解微生物的研究则较少^[8]。关于微生物降解木质素, 主要是在木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶的协同作用下完成^[9]。早在 1983 年, Tien 等^[10]首次从真菌胞外液中发现了参与木质素降解的木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶。此后国内外学者开展了微生物分泌木质素降解酶的相关研究^[11-12]。为提高微生物产酶性能, 研究人员进行了大量关于木质素降解菌的筛选及产酶条件优化研究, 然而关于低温木质素降解菌的研究却相对较少。影响酶活力因素主要有碳源、氮源、温度、时

间、pH 值及诱导剂等^[13]。尚洁等^[14]对一株白腐真菌所产锰过氧化物酶的条件进行优化, 酶活力提高约 3.59 倍。Nayana 等^[15]对一株优化后的木质素降解功能菌添加了 0.5 g/L Mn^{2+} 和 1.5% 吐温-80, 结果 Lip 酶活力高达 345.26 U/mL。由此可见, 产酶条件优化对于提高木质素降解酶活性具有重要意义^[16]。此外, 由于酶结构的复杂性及特异性, 使得酶学性质的研究对于酶的生产应用具有重要意义。

本实验分离获得一株具有木质素降解能力的菌株 LS-1, 通过单因素和响应面法对其进行产酶条件优化及酶学性质研究, 通过固态发酵试验研究其秸秆降解功能, 以期为木质素高效降解及秸秆资源利用提供优质微生物菌种资源和理论依据。

1 材料

1.1 样品来源

冻土土壤样品采自长白山南坡麓下阔叶林中腐烂树叶下(采样深度 10–20 cm)。

1.2 培养基

LB 液体培养基: 蛋白胨 2.0 g, NaCl 2.0 g, 酵母浸粉 1.0 g, 蒸馏水 200 mL, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

木质素选择培养基: 蛋白胨 0.2 g, 碱性木质素 0.6 g, NaCl 1.0 g, 琼脂粉 3.0 g, 蒸馏水 200 mL,

pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

苯胺蓝培养基: 将 1% 的苯胺蓝母液按 1% 的体积分数加入 LB 培养基中, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

发酵培养基: 碱性木质素 1.0 g, 牛肉膏 1.0 g, NaCl 1.0 g, 蛋白胨 2.0 g, 蒸馏水 200 mL, pH 自然, 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。

1.3 主要试剂和仪器

碱性木质素、葡萄糖、蔗糖、麸皮、淀粉、蛋白胨、酵母粉、酒石酸钠、尿素、硫酸铵、藜芦醇(VA)、丁香酸、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐(ABTS), 索莱宝生物技术有限公司; 细菌基因组提取试剂盒, 生工生物工程(上海)股份有限公司; CuSO_4 、 FeSO_4 、 MnSO_4 、 ZnSO_4 、 MgSO_4 、吐温-20 等其他试剂均为国产或进口分析纯。振荡培养箱, 上海博讯实业有限公司医疗设备厂; 紫外-可见分光光度计, 岛津公司; 恒温水浴锅, 上海精宏实验设备有限公司; 高速冷冻离心机, Sigma 公司。

2 方法

2.1 菌株筛选

将 5.0 g 土壤样品加入 200 mL 生理盐水中, 15°C 、120 r/min 振荡混匀 3 h。静置 1 h 后取上清液稀释到 10^{-1} – 10^{-9} , 分别在木质素选择培养基上进行涂布。挑取不同形态菌落进行划线分离。采用苯胺蓝脱色法^[17], 根据脱色圈直径初步筛选出具有产木质素降解酶能力的菌株, 将脱色圈直径较大的菌株保存备用。

2.2 菌株鉴定

将筛选出的菌株 LS-1 进行菌株形态学观察和革兰氏染色, 并进行分子学鉴定。细菌 DNA 的提取按照细菌基因组提取试剂盒进行。以菌株 DNA 为模板, 使用 16S rRNA 基因通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系: 模板 1 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , Master Mix 12.5 μL , ddH₂O 9.5 μL 。PCR 反应条件: 94°C 5 min; 94°C 2 min, 55°C 50 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 10 min。扩增产物在进行琼脂糖凝胶电泳检测之后送至生工生物工

程(上海)股份有限公司进行测序分析, 测序结果在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对分析, 利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树。

2.3 菌株生长情况测定

菌株用木质素选择培养基 15°C 活化后接种至 LB 液体培养基, 15°C 、120 r/min 培养 48 h。按 1% (体积分数) 接种至 LB 液体培养基中, 同样条件培养。每隔 12 h 取菌液 3 mL, 12 000 r/min 离心 3 min, 弃上清, 将菌体沉淀用生理盐水悬浮。用紫外-可见分光光度计在波长 600 nm 处测定菌悬液的吸光度值, 以生理盐水调零。

2.4 粗酶液的制备

将培养至第 72 h 的菌液作为种子液接种至液体发酵培养基中, 15°C 、120 r/min 培养 3 d。 4°C 、8 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。

2.5 酶活力测定

木质素过氧化物酶(Lip)酶活力测定参照 Tien 等^[10]方法, 锰过氧化物酶(Mnp)酶活力测定参照 Wariishi 等^[18]方法, 漆酶(Lac)酶活力测定参照 Wolfenden 等^[19]方法。

2.6 产酶条件优化

2.6.1 碳氮源优化

分别选取木质素、葡萄糖、蔗糖、麸皮和淀粉作为碳源, 选取蛋白胨、酵母粉、酒石酸钠、尿素和硫酸铵作为氮源。将种子液按 1% 接种量接种至不同碳氮源的发酵培养基中, 15°C 、120 r/min 培养 3 d。 4°C 、8 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 分别测定 Lip、Lac 和 Mnp 酶活力。

2.6.2 培养条件优化

采用最优碳氮源, pH 分别选取 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0, 发酵温度分别选取 5、10、15、20、 25°C , 发酵时间选取 1、2、3、4、5、6 d, 进行单因素优化。

2.6.3 培养条件响应面优化设计

以单因素试验结果为基础, 对发酵培养基 pH 值(A)、温度(B)、时间(C)这 3 个因素进行 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 设计, 试验因素水平及编码如表 1 所示。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平及编码
Table 1 Box-Behnken test factor level and coding

水平 Level	A pH 值 pH	B 温度 Temperature (°C)	C 时间 Time (d)
-1	7.0	10	2
0	8.0	15	3
1	9.0	20	4

2.7 酶学性质的研究

2.7.1 温度对酶活力的影响

利用优化后的培养条件制备粗酶液，分别在 10、20、30、40、50、60 °C 测定 Lip、Lac、Mnp 酶活力，以最高酶活力为 100%计算相对酶活力，确定 3 种酶最适反应温度。在最适反应温度下分别将粗酶液保温 20、40、60、80、100 min 测定酶活力，以未保温粗酶液酶活力为 100%计算相对酶活力，确定 3 种酶的热稳定性。

2.7.2 pH 值对酶活力的影响

最适反应温度下，将粗酶液分别在 pH 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0 的反应条件下测定 Lip、Lac、Mnp 酶活力，以最高酶活力为 100%计算相对酶活力，确定 3 种酶的最适 pH 值。将粗酶液与最适 pH 值的缓冲液共同作用 20、40、60、80、100 min 测定酶活力，以未作用的粗酶液酶活力为 100%计算相对酶活力，确定 3 种酶的 pH 值稳定性。

2.7.3 诱导剂对酶活力的影响

选择 1 mmol/L 的 Cu²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺、Mg²⁺、丁香酸和 3%吐温-20 这 7 种诱导剂添加至发酵培养基中。以不添加诱导剂的发酵培养基作为对照，酶活力记为 100%。计算添加诱导剂后的相对酶活力。

筛选出对酶活力有促进作用的诱导剂，测定不同浓度诱导剂对酶活力的影响。Cu²⁺、Fe²⁺、Mn²⁺、丁香酸浓度分别为 0.75、1.00、1.25、1.50、1.75 mmol/L，吐温-20 分别为 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%。以未添加诱导剂的对照组酶活力为 100%计算相对酶活力。

2.8 秸秆降解试验研究

玉米秸秆粉碎后过 60 目筛，1×10⁵ Pa 灭菌

20 min，105 °C 烘干。试验组将 3.0 g 秸秆与 1 mL 菌液接种至 100 mL 产酶培养基中，15 °C、120 r/min 培养，对照组接种生理盐水，每组设置 3 个平行样。固态发酵 20 d 后取发酵秸秆烘干至恒重，测定秸秆失重率；采用 Van Soest 酸性洗涤法^[20]测定木质素含量，计算木质素降解率。分别取对照组和试验组秸秆干燥后进行扫描电镜观察。

失重率(%)=(发酵前秸秆干重-发酵后秸秆干重)/发酵前秸秆干重×100；

木质素降解率(%)=100-100(1-失重率)×空白组木质素含量/降解后木质素含量。

3 结果与分析

3.1 菌株筛选

经苯胺蓝初筛后发现一株产脱色圈直径较大的菌株 LS-1，结果如图 1 所示。对 LS-1 进行酶活力测定，Lip 酶活力为 20.01 U/mL，Lac 酶活力为 9.78 U/mL，Mnp 酶活力为 31.29 U/mL。

3.2 菌株鉴定

菌株 LS-1 的形态学鉴定结果如图 2 所示。菌株在 LB 培养基上呈现较小的圆形菌落，乳白色，表面边缘光滑。染色镜检可见菌体呈短杆状，革兰氏阴性菌。

菌株 LS-1 的 PCR 扩增产物长度为 1 442 bp，将该产物序列在 GenBank 数据库中进行 BLAST 比对，利用 MEGA 7.0 软件构建系统发育树，如

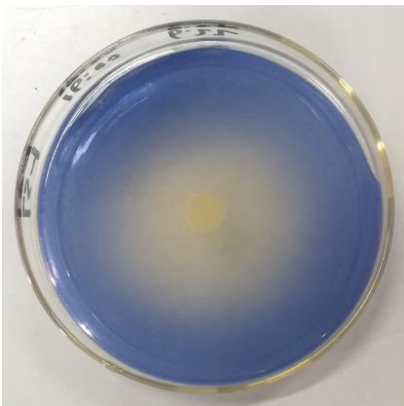


图 1 菌株 LS-1 所产脱色圈
Figure 1 Decolorization ring produced by strain LS-1

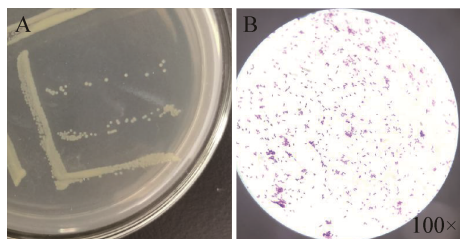


图2 菌株 LS-1 菌落形态(A)和革兰氏染色结果(B)
Figure 2 Colony morphology (A) and Gram staining (B) of strain LS-1

图3所示。结果显示菌株 LS-1 与嗜麦芽窄食单胞菌在同一个分支上,综合形态学特征及《常见细菌系统鉴定手册》^[21]描述,确定 LS-1 为嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)。

3.3 菌株生长情况的测定

如图4所示,菌株在72 h内呈现对数生长,第72 h 菌液 OD_{600} 值达到最高,随后进入稳定期,并在108 h后呈缓慢的下降趋势。

3.4 产酶条件优化

3.4.1 最佳碳氮源确定

如图5A所示,以木质素为碳源时 Lip 和 Lac

酶活力均最高,分别为 20.11 U/mL 和 9.78 U/mL;以葡萄糖为碳源时 Mnp 酶活力最高,木质素与其相比略低;结合碳源来源及性能,最终确定木质素为最优碳源。

如图5B所示,以蛋白胨为氮源时 Lip 和 Lac 酶活力均最高,分别为 20.11 U/mL 和 9.86 U/mL,最终确定蛋白胨为最优氮源。

3.4.2 最佳培养条件确定

如图6A所示, Lip、Lac、Mnp 酶活力均随着 pH 值增加而呈现上升趋势, pH 8.0 时达到最大值,随后呈下降趋势,因此确定发酵最佳 pH 值为 8.0。如图6B所示,培养温度为 15 °C 时 Lip 和 Lac 酶活力最高,而 Mnp 在 20 °C 时酶活力最高,15 °C 其次。结合试验要求,选择 15 °C 作为最佳培养温度。如图6C所示,第3天时3种酶的酶活力达到最高,随后呈下降趋势,其中 Lac 和 Mnp 酶活力下降较为缓慢,而 Lip 酶活力急剧下降。因此,确定3 d 为最佳培养时间。

3.4.3 培养条件的响应面优化

根据 Box-Behnken 中心复合设计原理,以 pH

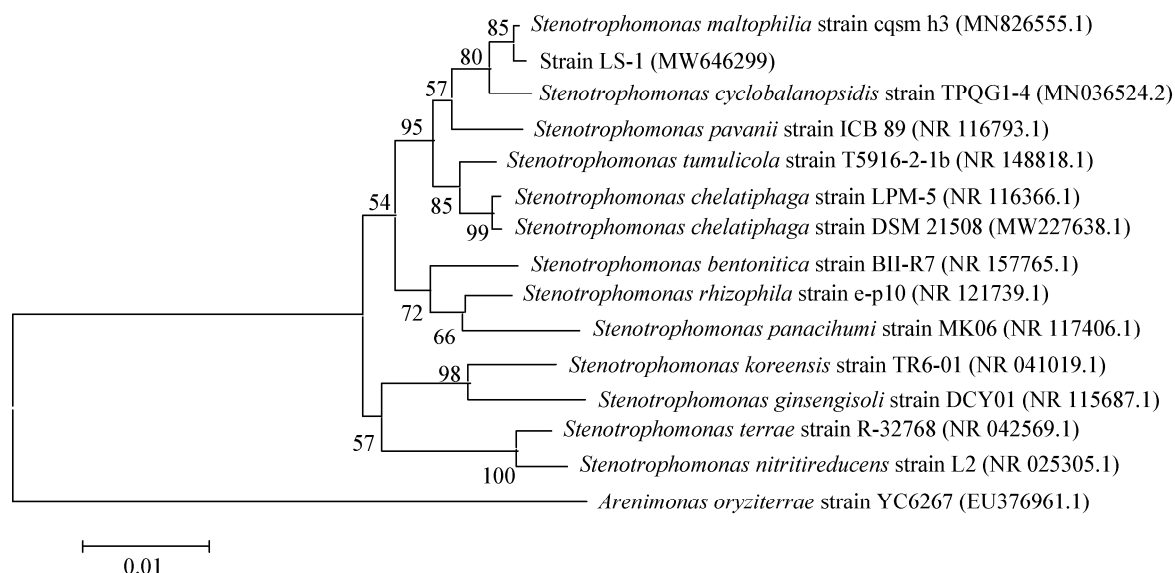


图3 菌株 LS-1 基于 16S rRNA 基因序列的系统发育树

Figure 3 Phylogenetic of strain LS-1 based on 16S rRNA gene sequence

注: 括号中序号为相关菌株的登录号; 分支处数字为 Bootstrap 支持率; 标尺刻度为序列差异的分支长度

Note: The numbers in parentheses are accession numbers of related strains; The numbers in each branch points are percentages supported by bootstrap; Bar is nucleotide divergence

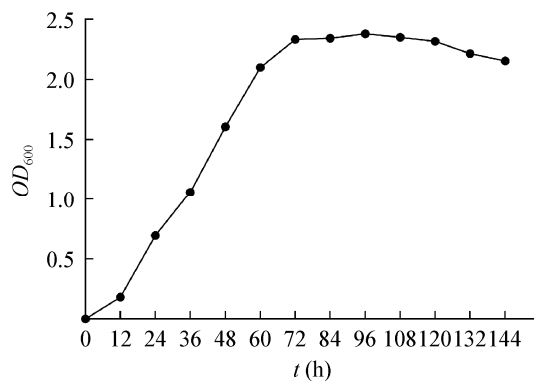


图4 培养时间对菌株 LS-1 生长情况的影响

Figure 4 Effect of culture time on the growth of strain LS-1

值(A)、温度(B)和时间(C)为3个自变量,以Lip酶活力(Y_1)、Lac酶活力(Y_2)和Mnp酶活力(Y_3)为因变量设计了3因素3水平的响应面分析试验,具体结

果如表2所示。

(1) 模型建立及方差分析

采用Design Expert软件分别对Lip(Y_1)、Lac(Y_2)和Mnp(Y_3)酶活力优化试验结果进行多元回归拟合分析,得到回归模型:

$$Y_1 = 22.95 + 1.79A - 2.92B + 0.76C - 0.50AB + 0.40AC + 0.51BC - 6.36A^2 - 4.13B^2 - 4.03C^2;$$

$$Y_2 = 9.22 + 1.56A + 0.68B + 0.69C + 0.21AB - 0.15AC - 0.24BC - 2.70A^2 - 2.32B^2 - 2.06C^2;$$

$$Y_3 = 50.60 + 3.34A + 3.77B + 0.88C + 0.48AB + 0.30AC + 0.85BC - 8.55A^2 - 13.18B^2 - 7.74C^2.$$

对二次模型进行方差和显著性分析,结果分别见表3-5。由表3-5可知,3种酶试验结果所选模型 P 值均小于0.001,说明显著性极高。失拟检测 P 值均大于0.05,模型决定系数 R^2 值均在0.9以上,说明模

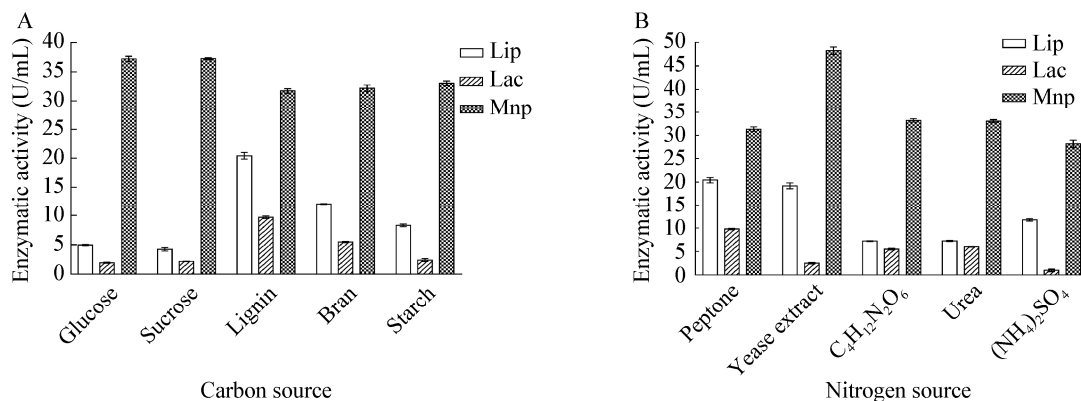


图5 碳源(A)和氮源(B)对菌株 LS-1 酶活力的影响

Figure 5 Effect of carbon source (A) and nitrogen source (B) on enzyme activity of strain LS-1

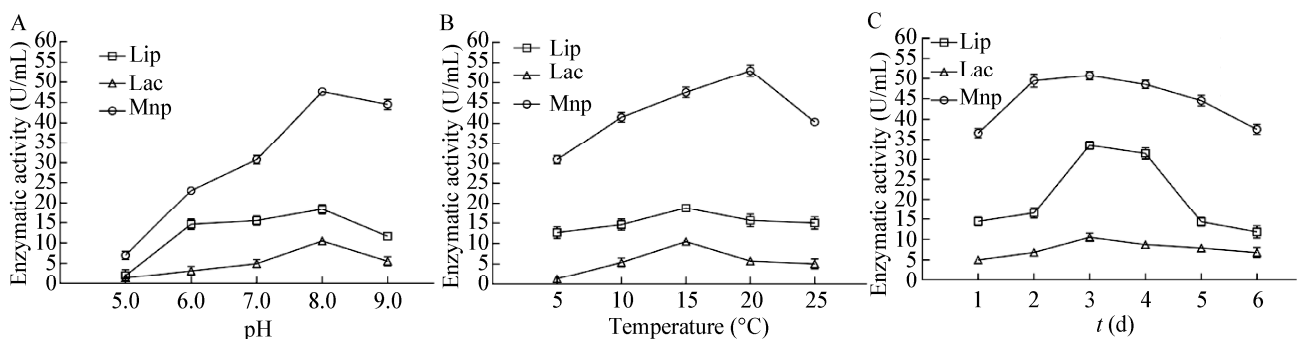


图6 pH值(A)、温度(B)和时间(C)对菌株 LS-1 酶活力的影响

Figure 6 Effect of pH (A), temperature (B) and time (C) on enzyme activity of strain LS-1

表 2 响应面法设计的 17 组试验方案及结果

Table 2 The response surface method was used to design 17 experimental schemes and results

试验号 No.	A pH 值 pH	B 温度 Temperature (°C)	C 时间 Time (d)	Y_1 Lip 酶活力 Lip activity (U/mL)	Y_2 Lac 酶活力 Lac activity (U/mL)	Y_3 Mnp 酶活力 Mnp activity (U/mL)
1	0	0	0	24.32	9.64	49.69
2	1	1	0	11.75	6.69	37.73
3	0	0	0	22.56	9.03	50.06
4	0	1	-1	9.67	5.28	30.00
5	-1	0	1	11.12	4.00	31.11
6	-1	0	-1	10.90	1.82	30.56
7	1	0	1	15.00	6.81	38.65
8	-1	-1	0	12.16	2.12	20.96
9	1	-1	0	17.24	4.83	26.40
10	0	0	0	21.99	8.94	49.97
11	0	-1	-1	17.90	3.53	26.99
12	0	1	1	12.70	5.67	34.05
13	1	0	-1	13.19	5.21	36.91
14	-1	1	0	8.68	3.14	30.37
15	0	0	0	23.77	8.11	50.62
16	0	0	0	22.10	10.39	52.64
17	0	-1	1	18.89	4.89	27.65

表 3 Lip 模型回归分析

Table 3 Model regression analysis of Lip

误差来源 Source	平方和 Sum of mean square	自由度 Free degree	均方 Mean square	F 值 F value	P 值 P value
模型 Model	446.02	9	49.56	38.36	<0.000 1
A	25.63	1	25.63	19.84	0.003 0
B	68.39	1	68.39	52.93	0.000 2
C	4.58	1	4.58	3.54	0.101 9
AB	1.01	1	1.01	0.78	0.405 9
AC	0.63	1	0.63	0.49	0.506 8
BC	1.04	1	1.04	0.81	0.399 3
A^2	170.53	1	170.53	132.00	<0.000 1
B^2	71.70	1	71.70	55.50	0.000 1
C^2	68.43	1	68.43	52.97	0.000 2
残差 Residual	9.04	7	9.04		
失拟 Lack of fit	4.70	3	4.70	1.44	0.355 7
纯误 Pure error	4.35	4	4.35		

表 4 Lac 模型回归分析
Table 4 Model regression analysis of Lac

误差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
Source	Sum of mean square	Free degree	Mean square	<i>F</i> value	<i>P</i> value
模型 Model	106.96	9	11.88	24.30	0.000 2
<i>A</i>	19.41	1	19.41	39.69	0.000 4
<i>B</i>	3.66	1	3.66	7.48	0.029 1
<i>C</i>	3.82	1	3.82	7.82	0.026 7
<i>AB</i>	0.18	1	0.18	0.36	0.567 0
<i>AC</i>	0.084	1	0.084	0.17	0.690 8
<i>BC</i>	0.24	1	0.24	0.48	0.510 3
<i>A</i> ²	30.80	1	30.80	63.00	<0.000 1
<i>B</i> ²	22.71	1	22.71	46.44	0.000 2
<i>C</i> ²	17.82	1	17.82	36.44	0.000 5
残差 Residual	3.42	7	3.42		
失拟 Lack of fit	0.53	3	0.53	0.24	0.861 5
纯误 Pure error	2.89	4	2.89		

表 5 Mnp 模型回归分析
Table 5 Model regression analysis of Mnp

误差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i> 值	<i>P</i> 值
Source	Sum of mean square	Free degree	Mean square	<i>F</i> value	<i>P</i> value
模型 Model	1 644.42	9	182.71	56.58	<0.000 1
<i>A</i>	89.04	1	89.04	27.57	0.001 2
<i>B</i>	113.63	1	113.63	35.19	0.000 6
<i>C</i>	6.13	1	6.13	1.90	0.210 9
<i>AB</i>	0.92	1	0.92	0.29	0.609 7
<i>AC</i>	0.35	1	0.35	0.11	0.750 3
<i>BC</i>	2.87	1	2.87	0.89	0.377 0
<i>A</i> ²	307.66	1	307.66	95.27	<0.000 1
<i>B</i> ²	731.75	1	731.75	226.60	<0.000 1
<i>C</i> ²	252.28	1	252.28	78.12	<0.000 1
残差 Residual	22.61	7	22.61		
失拟 Lack of fit	16.93	3	16.93	3.97	0.107 9
纯误 Pure error	5.68	4	5.68		

型与试验情况拟合良好,可以用来分析和预测最佳产酶条件。方差分析结果表明, pH 和温度因素对 3 种酶的酶活力影响 *P* 值均小于 0.05,说明 pH 和温度对 3 种酶活力影响均显著;而时间因素仅对 Mnp 结果影响显著,对其余 2 种酶影响不显著。

(2) 响应面分析

为考察各因素交互作用对 3 种酶活力的影响,对试验结果进行二次响应面立体分析,其中部分等高线

和响应面图如图 7-9 所示, pH 和温度因素交互作用对 3 种酶活力影响等高线图均趋近于圆形,说明两者交互作用对 3 种酶活力影响均不显著。同样地, pH 与时间及温度与时间的交互作用对 3 种酶活力影响均不显著。在培养时间为 3 d 时, pH 7.0 增加至 pH 9.0, 温度 10 °C 增加至 20 °C, 3 种酶活力均呈先升高后下降趋势, 凸起顶点处即为响应优化最大值。同样, pH 与时间及温度与时间的交互作用对 3 种酶的影响趋势相同。

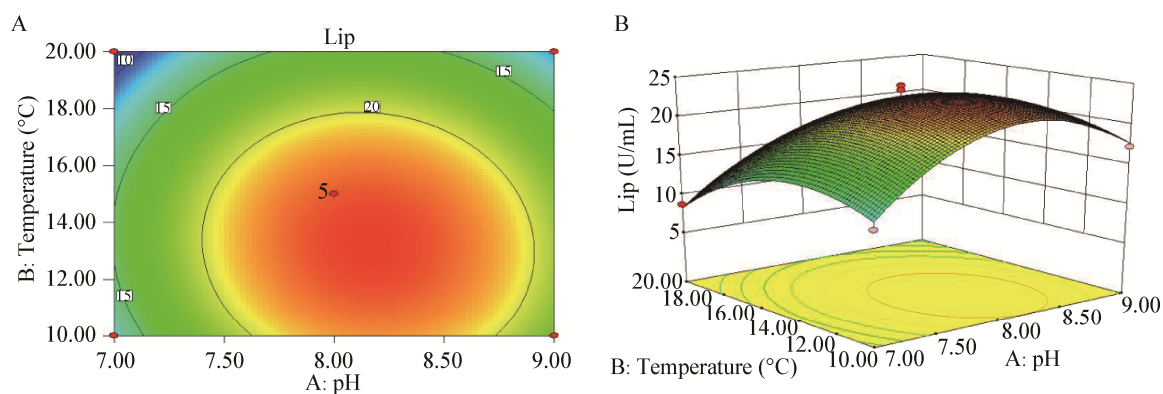


图 7 因素交互作用对 Lip 酶活力影响的部分等高线(A)和响应面图(B)

Figure 7 Partial contour lines (A) and response surface diagrams (B) of the influence of factor interaction on Lip activity

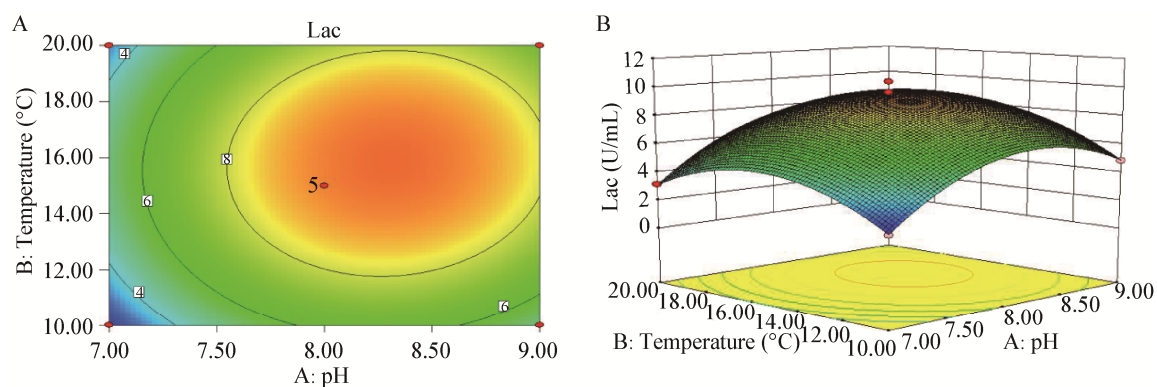


图 8 因素交互作用对 Lac 酶活力影响的部分等高线(A)和响应面图(B)

Figure 8 Partial contour lines (A) and response surface diagrams (B) of the influence of factor interaction on Lac activity

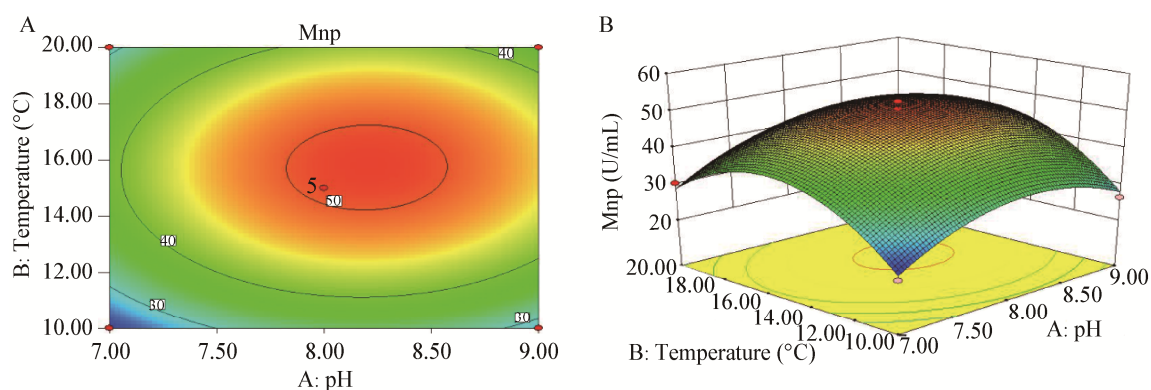


图 9 因素交互作用对 Mnp 酶活力影响的部分等高线(A)和响应面图(B)

Figure 9 Partial contour lines (A) and response surface diagrams (B) of the influence of factor interaction on Mnp enzyme activity

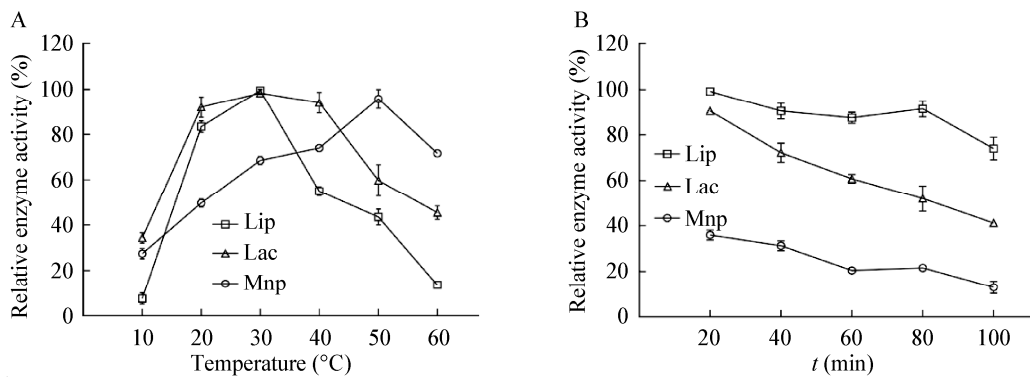


图 10 3 种酶的最适温度(A)及热稳定性(B)

Figure 10 Optimum temperature (A) and thermal stability (B) of the three enzymes

3.5 酶学性质的研究

3.5.1 3 种酶的最适温度及热稳定性

由图 10A 可知, 3 种酶在 10–60 °C 之间均具有酶活性, Lip 和 Lac 最适作用温度为 30 °C, 而 Mnp 最适作用温度为 50 °C。

由图 10B 可知, Lip 和 Lac 具有良好热稳定性, 在 30 °C 保温 100 min 后保持约 70% 和 40% 活性。Mnp 热稳定性较差, 50 °C 保温 20 min 后仅保持约 35% 活性。

3.5.2 3 种酶的最适 pH 值及 pH 值稳定性

由图 11A 可知, Lac 最适作用 pH 值为 4.0, Lip 和 Mnp 最适作用 pH 值为 5.0, 说明 3 种酶在酸性环境条件下均能发挥最大酶活性。

由图 11B 可知, Lip 和 Mnp 在 pH 5.0 的缓冲液中作用 20 min 后均保持着约 60% 的活性, 随着时间的延长酶活性逐渐下降, 100 min 后酶活力仅剩约

20%。然而 Lac 在 pH 4.0 环境条件下作用 20 min 可保持约 70% 的酶活性, 100 min 后酶活力剩余约 40%。由此可见, Lac 对于酸性环境的适应能力更强。

3.5.3 最佳诱导剂的选择

由图 12 可知, 金属离子中, Mg^{2+} 对 Lip 酶活力有一定促进作用, Cu^{2+} 对 Lac 酶活力有一定促进作用, 而 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+} 对 3 种酶均有不同程度的抑制作用。此外, 吐温-20 对 Lip、Mnp 酶活力有一定促进作用, 丁香酸对 Lac 酶活力有一定促进作用。

3.5.4 不同诱导剂浓度对酶活性的影响

由图 13A 和 13B 可知, Mg^{2+} 对 Lip 的促进作用随着浓度增加呈下降趋势, 0.75 mmol/L 为最佳浓度, 吐温-20 对 Lip 的促进作用随着浓度增加呈上升趋势, 0.5% 为最佳添加量。由图 13C 可知, Cu^{2+}

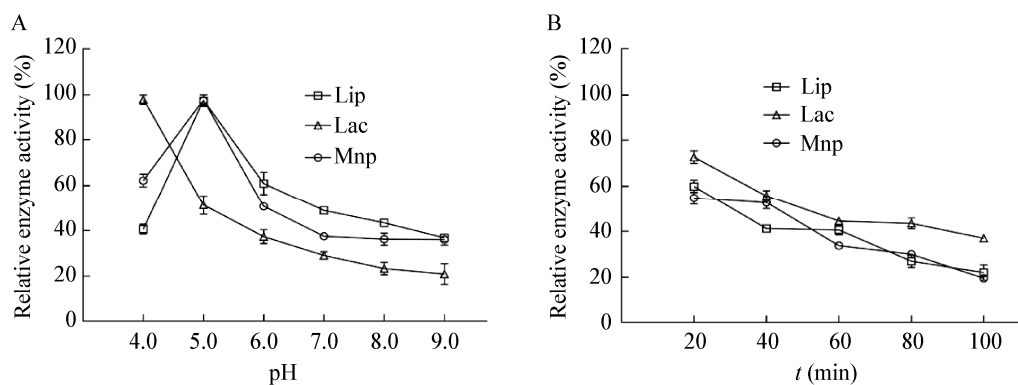


图 11 3 种酶的最适 pH (A) 及 pH 稳定性 (B)

Figure 11 Optimal pH (A) and pH stability (B) of the three enzymes

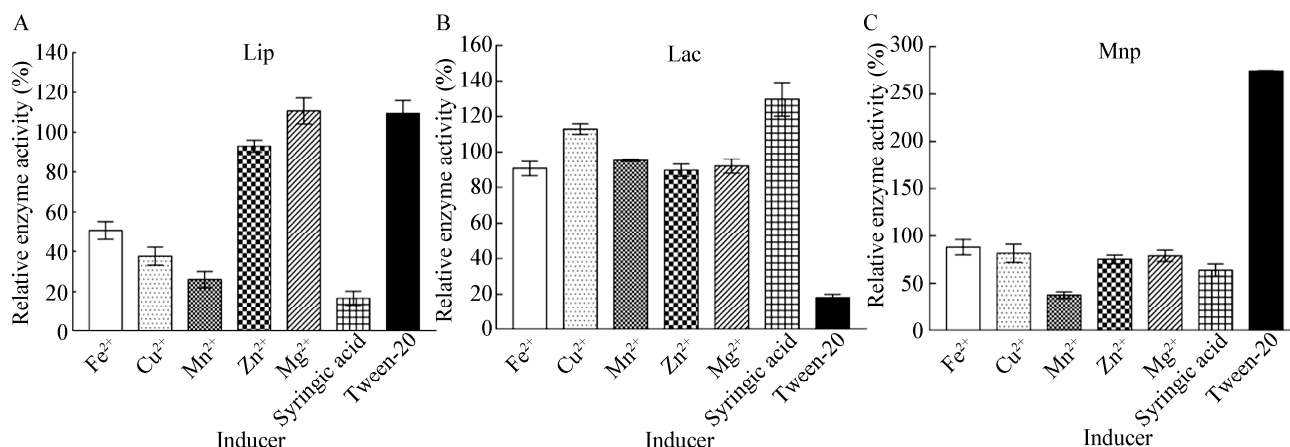


图 12 不同诱导剂对菌株 LS-1 产 Lip (A)、Lac (B) 和 Mnp (C) 的影响

Figure 12 The effect of different inducers on Lip (A), Lac (B) and Mnp (C) produced by strain LS-1

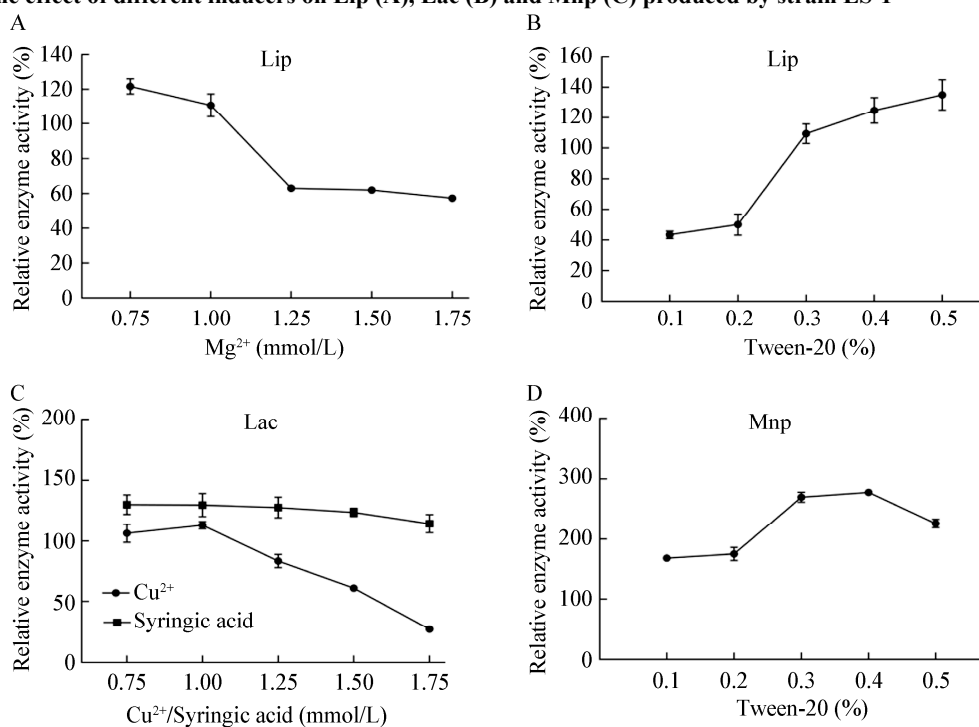


图 13 诱导剂不同浓度对菌株 LS-1 产 Lip (A)、Lac (B) 和 Mnp (C) 的影响

Figure 13 Effect of different concentration of inducer on Lip (A), Lac (B) and Mnp (C) produced by strain LS-1

和丁香酸均在 1.00 mmol/L 时对 Lac 酶活力具有最大促进作用, 其他浓度的 Cu²⁺ 对于 Lac 的促进作用不显著。当丁香酸浓度高于 1.00 mmol/L 时, 其对 Lac 有显著抑制作用。由图 13D 可知, 0.1%–0.5% 吐温-20 对 Mnp 酶活力均有促进作用, 其中 0.3% 为最佳浓度。

3.6 秸秆降解试验

经过 20 d 的低温固态发酵, 对照组秸秆失重率

为 6.51%、木质素含量为 21.83%; 试验组秸秆失重率为 18.85%、木质素含量为 16.73%。菌株 LS-1 对秸秆中木质素降解率达 36.14%, 与对照组相比提高约 6 倍以上。通过扫描电镜观察秸秆表面形态变化, 结果如图 14 所示, 对照组秸秆(图 14A 和 14B)表面结构紧密, 未见组织壁变薄情况, 试验组秸秆(图 14C 和 14D)经菌株发酵处理后可见组织壁变薄、结构疏松、表面出现清晰可见的蜂窝状降解孔洞。

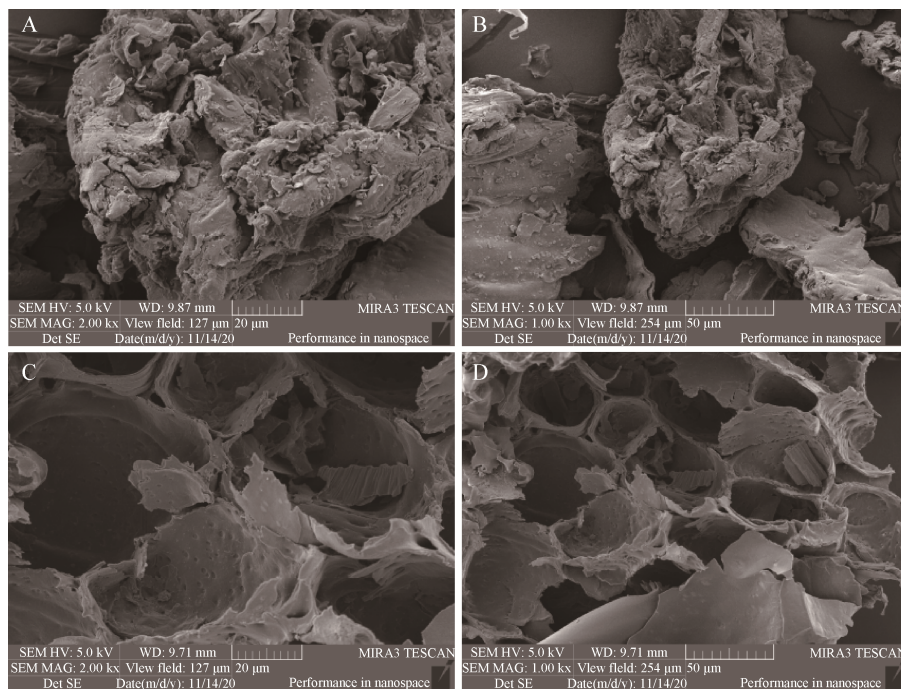


图 14 菌株 LS-1 固态发酵 20 d 后秸秆扫描电镜观察

Figure 14 Scanning electron microscope observation of the straw after 20 days of solid-state fermentation of strain LS-1

注: A: 未接菌处理秸秆, 放大倍数为 2 000 \times ; B: 未接菌处理秸秆, 放大倍数为 1 000 \times ; C: LS-1 处理秸秆, 放大倍数为 2 000 \times ; D: LS-1 处理秸秆, 放大倍数为 1 000 \times

Note: A: Uninoculated treated straw, magnification is 2 000 \times ; B: Uninoculated treated straw, magnification is 1 000 \times ; C: LS-1 treatment of straw, magnification is 2 000 \times ; D: LS-1 treatment of straw, magnification is 1 000 \times

4 讨论与结论

木质素、纤维素和半纤维素是木质纤维素三大主要组成物质, 其中木质素来源广泛、资源丰富, 是打造生态经济的一种可持续性资源。生态循环系统中, 大部分地区常年气温较低, 造成木质素和纤维素资源未能得到有效处理与利用^[22]。目前对于低温木质素降解的研究相对较少。本实验分离得到一株高效低温木质素降解菌, 经鉴定为嗜麦芽窄食单胞菌。通过单因素和响应面法对其进行产酶条件优化, 探究其酶学性质和秸秆降解功能。

产酶优化结果显示, 菌株 LS-1 在以木质素和蛋白胨作为碳氮源、pH 8.0、培养温度 15 $^{\circ}\text{C}$ 、培养时间 3 d 时产酶效果最佳。张淑红等^[23]从青藏高原冰雪样中筛选到的低温纤维素降解菌最适产酶温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 。罗立津等^[24]所筛选到的一组低温木质纤维素降解菌群最适发酵时间为 120 h。与

上述研究相比, 菌株 LS-1 对低温环境的适应性更强、发酵时间更快。尹静等^[25]分离出一株同时产 3 种降解酶的真菌, 其中所产锰过氧化物酶活性最强但仅为 16.4 U/mL。本研究中, 菌株 LS-1 不仅具有同时产 3 种降解酶的能力, 而且产酶效果远远高于上述研究。

酶学性质的研究对于木质素降解和酶的生产应用意义重大。大多研究^[26-27]发现 Lac 最适反应温度在 20–60 $^{\circ}\text{C}$ 之间, 最佳 pH 值为 4.0–5.5 之间。孔令营等^[28]发现 Lip 最适反应温度为 35 $^{\circ}\text{C}$ 、最适 pH 2.5–7.0。程晓滨^[29]发现 Mnp 最适反应温度为 35–55 $^{\circ}\text{C}$, 最适 pH 3.0–7.0。本研究中, Lip 和 Lac 最适作用温度为 30 $^{\circ}\text{C}$ 且热稳定性良好, Mnp 最适作用温度为 50 $^{\circ}\text{C}$, 热稳定性较差。这 3 种酶最适作用环境均为酸性条件, 其中 Lac 耐酸性相对较好。这与上述研究结果基本一致。关于诱导元素对酶活

性的影响, Baldrian^[30]和 Qin 等^[31]研究表明一定浓度的金属离子对 Lip、Lac 和 Mnp 酶活力有一定促进作用,而表面活性剂对酶活力的影响早有研究^[32],表面活性剂能够降低液体表面张力,提高酶的稳定性。本研究中,0.75 mmol/L Mg²⁺和 1 mmol/L Cu²⁺分别对 Lip 和 Lac 有显著的促进作用,0.5%和 0.3%的吐温-20 对于 Lip 和 Mnp 有显著的促进作用。

关于木质素降解菌对秸秆的降解研究, Zheng 等^[8]筛选到一组低温木质纤维素降解复合菌 LTF-27, 15 °C 条件下培养 20 d, 其木质素降解率达 12.5%。萨如拉等^[33]筛选到 2 组玉米秸秆降解复合菌系 1 号和 8 号, 15 °C 培养 15 d, 秸秆分解率分别达到 30.21%和 32.21%。本实验中, 菌株 LS-1 与秸秆 15 °C 固态发酵 20 d 后, 秸秆失重率达 18.85%, 木质素的降解率达 36.14%, 与对照组相比提高约 6 倍以上。由此可见, 同等温度范围内, LS-1 在单一菌株作用情况下降解率较高, 说明该菌株在低温降解木质素方面具有良好的应用前景。

综上所述, 本研究筛选到的菌株 LS-1 无论在产酶方面还是秸秆降解方面效果均非常显著, 而且酶学性质较为稳定, 为木质素高效降解及秸秆资源利用提供了优质的微生物菌种资源和理论依据。

REFERENCES

- [1] Yu MT, Li CY, Li HT, Liu CL. Research progress in effect of straw returning on soil physical and chemical properties[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2021, 33(1): 33-39 (in Chinese)
于美婷, 李春雅, 李华泰, 刘长莉. 秸秆还田对土壤理化性质影响的研究进展[J]. 江西农业学报, 2021, 33(1): 33-39
- [2] Mei JF, Shen XB, Gang LP, Xu HJ, Wu FF, Sheng LQ. A novel lignin degradation bacteria-*Bacillus amyloliquefaciens* SL-7 used to degrade straw lignin efficiently[J]. Bioresource Technology, 2020, 310: 123445
- [3] Liu QQ, Luo L, Zheng LQ. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2018, 19(2): 335
- [4] Mccann MC, Carpita NC. Biomass recalcitrance: a multi-scale, multi-factor, and conversion-specific property[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 66(14): 4109-4118
- [5] Chi ZX, Wang Z, Liu Y, Yang GH. Preparation of organosolv lignin-stabilized nano zero-valent iron and its application as granular electrode in the tertiary treatment of pulp and paper wastewater[J]. Chemical Engineering Journal, 2018, 331: 317-325
- [6] Kang ZC. Construction and functional evaluation of novel lignocellulose degradation microbial consortia at low temperature[D]. Beijing: Master's Thesis of University of Chinese Academy of Sciences, 2019 (in Chinese)
康志超. 耐低温木质纤维素降解菌群的构建及其应用研究[D]. 北京: 中国科学院大学硕士学位论文, 2019
- [7] Zhang HY, Liu MZ, Zhang JJ. Decomposition law of organic materials in dryland soil[J]. Soils and Fertilizers, 1986(4): 7-11 (in Chinese)
张洪源, 刘明钟, 张家建. 有机物料在旱地土壤中分解规律的研究[J]. 土壤肥料, 1986(4): 7-11
- [8] Zheng GX, Yin T, Lu ZX, Boboua SYB, Li JC, Zhou WL. Degradation of rice straw at low temperature using a novel microbial consortium LTF-27 with efficient ability[J]. Bioresource Technology, 2020, 304: 123064
- [9] Zhou HZ, Guo W, Xu B, Teng ZW, Tao DP, Lou YJ, Gao YH. Screening and identification of lignin-degrading bacteria in termite gut and the construction of LiP-expressing recombinant *Lactococcus lactis*[J]. Microbial Pathogenesis, 2017, 112: 63-69
- [10] Tien M, Kirk TK. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1984, 81(8): 2280-2284
- [11] Chauhan PS. Role of various bacterial enzymes in complete depolymerization of lignin: a review[J]. Biocatalysis and Agricultural Biotechnology, 2020, 23: 101498
- [12] Biko O, Viljoen-Bloom M, Zyl W. Microbial lignin peroxidases: applications, production challenges and future perspectives[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 141: 109669
- [13] Zhang ST, Xiao JL, Wang G, Chen G. Enzymatic hydrolysis of lignin by ligninolytic enzymes and analysis of the hydrolyzed lignin products[J]. Bioresource Technology, 2020, 304: 122975
- [14] Shang J, Liu JF, Long Q, Chen X, Zhang KW. Screening of high yield manganese peroxidase white-rot fungi for bioprocessing of wheat straw and optimization of enzyme production conditions[J]. Feed Research, 2020, 43(6): 63-67 (in Chinese)
尚洁, 刘继芳, 陇琼, 陈湘, 张靠稳. 小麦秸秆产锰过氧化物酶白腐真菌的筛选及产酶条件优化[J]. 饲料研究, 2020, 43(6): 63-67
- [15] Nayana P, Aiswarya C, Aparna CK, Nambisan P. Dataset on optimization of lignin peroxidase production by *Endomelanconiopsis* sp. under submerged fermentation using one factor at a time approach[J]. Data in Brief, 2020,

- 29: 105244
- [16] Guo HW, Chang J, Yin QQ, Wang P, Lu M, Wang X, Dang XW. Effect of the combined physical and chemical treatments with microbial fermentation on corn straw degradation[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 148: 361-365
- [17] Zhao M, Qian C. Study on the examination of oxidative system in white-rot fungi and its laccase production by induction[J]. *Transactions of China Pulp and Paper*, 2005(2): 101-105 (in Chinese)
赵敏, 钱程. 白腐菌木素氧化酶系的检测及其漆酶诱导产生的研究[J]. *中国造纸学报*, 2005(2): 101-105
- [18] Wariishi H, Valli K, Gold MH. Manganese(II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. Kinetic mechanism and role of chelators[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1992, 267(33): 23688-23695
- [19] Wolfenden BS, Willson RL. Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis studies of 2, 2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate)[J]. *Journal of the Chemical Society Perkin Transactions*, 1982(7): 805-812
- [20] Tsang LJ, Reid ID, Coxworth EC. Delignification of wheat straw by *Pleurotus* spp. under mushroom-growing conditions[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, 53(6): 1304-1306
- [21] Dong XZ, Cai MY. Manual for Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese)
东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001
- [22] Fan ZY. Isolation and degradation characterization of cellulose-degrading microorganisms under low temperature[D]. Hohhot: Master's Thesis of Inner Mongolia Agricultural University, 2012 (in Chinese)
樊兆阳. 低温降解纤维素的微生物的分离及其降解特性分析[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学硕士学位论文, 2012
- [23] Zhang SH, Liu XH, Liang F, Wang L, Liu YH, Zhai XL, Zhao LF. Screening of cryophilic cellulose-degradable bacterium and its zymological properties[J]. *Journal of Microbiology*, 2009, 29(3): 97-100 (in Chinese)
张淑红, 刘秀花, 梁峰, 王莉, 刘源慧, 翟兴礼, 赵龙飞. 低温纤维素降解菌的筛选及其酶学性质初步研究[J]. *微生物学杂志*, 2009, 29(3): 97-100
- [24] Luo LJ, Wan L, Chen H, Wen CL, Xu FL, Jia W, Nie YL, Yuan HL. Enrichment culturing and bacterial community structures analysis of a cold-adapted lignocellulose degrading microflora[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2015, 23(6): 727-737 (in Chinese)
罗立津, 万立, 陈宏, 温翠莲, 徐福乐, 贾伟, 聂毅磊, 袁红莉. 耐低温木质纤维素降解菌群的富集培养及其种群结构分析[J]. *农业生物技术学报*, 2015, 23(6): 727-737
- [25] Yin J, Liu YQ, Yu F, Cai JC, Liu TY. Screening and identification of a lignin-degrading bacterium and its application in composting[J]. *Soil and Fertilizer Sciences in China*, 2019(3): 179-185 (in Chinese)
尹静, 刘悦秋, 于峰, 蔡建超, 刘天月. 一株木质素降解菌的筛选鉴定及其在堆肥中的应用[J]. *中国土壤与肥料*, 2019(3): 179-185
- [26] Zhao XY, Xing ZT, Shao Y, Liu HY, Wang XC. Preliminary study on enzyme property of *Grifola frondosa* extracellular laccase[J]. *Natural Product Research and Development*, 2012, 24(6): 824-827 (in Chinese)
赵晓燕, 邢增涛, 邵毅, 刘海燕, 汪学才. 灰树花漆酶酶学性质的初步研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2012, 24(6): 824-827
- [27] Xiao C, Liu J, Xu XH. Studies on enzymatic properties of laccase from *Auricularia*[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2011, 27(25): 158-161 (in Chinese)
肖楚, 刘佳, 许修宏. 黑木耳漆酶酶学性质的研究[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(25): 158-161
- [28] Kong LY, Guo DS, Zhao BG, Li RG. Preliminary purification and characterization of extracellular lignin peroxidase from *Pseudomonas fluorescens* GcM5-1A[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2010, 32(3): 112-116 (in Chinese)
孔令营, 郭道森, 赵博光, 李荣贵. 荧光假单胞菌 GcM5-1A 胞外木质素过氧化物酶的初步纯化及性质研究[J]. *北京林业大学学报*, 2010, 32(3): 112-116
- [29] Cheng XB. Purification of a new manganese peroxidase of the white-rot fungus *Schizophyllum* sp. F17, and decolorization of azo dyes by the enzyme[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui University, 2007 (in Chinese)
程晓滨. 裂褶菌 F17 锰过氧化物酶的分离纯化及其对偶氮染料脱色的研究[D]. 合肥: 安徽大学硕士学位论文, 2007
- [30] Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2006, 30(2): 215-242
- [31] Qin X, Zhang J, Zhang XY, Yang Y. Induction, purification and characterization of a novel manganese peroxidase from *Irpex lacteus* CD2 and its application in the decolorization of different types of dye[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113282
- [32] Helle SS, Duff SJ, Cooper DG. Effect of surfactants on cellulose hydrolysis[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 1993, 42(5): 611-617
- [33] Sarula, Gao JL, Yu XF, Hu SP. Screening of low temperature maize stalk decomposition microorganism[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2013, 46(19): 4082-4090 (in Chinese)
萨如拉, 高聚林, 于晓芳, 胡树平. 玉米秸秆低温降解复合菌系的筛选[J]. *中国农业科学*, 2013, 46(19): 4082-4090