

# 一株木质素降解菌高温驯化及酶学性质的测定

何艳玲, 孙向阳\*, 李素艳, 郝丹

北京林业大学林学院 森林培育与保护教育部重点实验室, 北京 100083

何艳玲, 孙向阳, 李素艳, 郝丹. 一株木质素降解菌高温驯化及酶学性质的测定[J]. 微生物学通报, 2023, 50(1): 163-174.

HE Yanling, SUN Xiangyang, LI Suyan, HAO Dan. High temperature acclimation and enzymatic properties of a lignin-degrading strain[J]. Microbiology China, 2023, 50(1): 163-174.

**摘要:**【背景】高温引起的微生物活性降低是限制园林绿化废弃物堆肥过程中木质素降解的主要因素。【目的】驯化一株木质素降解菌芽孢杆菌 NO.2, 提高其在高温下的微生物活性, 探究其生长情况及酶学特性。【方法】采用温度梯度方法驯化菌株, 以菌株生长曲线、酶活力、木质素降解率为评价指标, 探究驯化前后菌株间差异, 以及驯化后菌株所产木质素降解酶的酶促反应温度和 pH 范围。【结果】与原菌株相比, 驯化后菌株在 60 °C 培养时最大生物量间差异不显著; 漆酶(laccase, Lac)、锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP)和木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)酶活力得到进一步提高, 分别提高了 30.75%、35.98%和 29.62%, 木质素降解率提高 60.52%。酶学性质研究表明, 驯化后菌株所产 Lac、MnP 和 LiP 在 20–60 °C、pH 3.0–9.0 范围内酶活力均较高, 而且具有较好的稳定性, 稳定性依次为 Lac>LiP>MnP。【结论】温度梯度驯化方法可有效提高微生物对高温环境的适应性, 扩大木质素降解酶的酶促反应温度和 pH 范围, 在进一步自主研发专用降解园林废弃物微生物菌剂中具有应用潜能。

**关键词:** 芽孢杆菌 NO.2; 温度梯度驯化; 酶学性质

## High temperature acclimation and enzymatic properties of a lignin-degrading strain

HE Yanling, SUN Xiangyang\*, LI Suyan, HAO Dan

Key Laboratory for Silviculture and Conservation of Ministry of Education, College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

**Abstract:** [Background] High temperature decreases microbial activity, thus limiting the lignin

资助项目: 北京市自然科学基金(6202021); 科技基础资源调查专项(2021FY100802)

This work was supported by the Beijing Natural Science Foundation (6202021) and the Science and Technology Fundamental Resources Investigation Program of China (2021FY100802).

\*Corresponding author. E-mail: sunxy@bjfu.edu.cn

Received: 2022-04-20; Accepted: 2022-06-16; Published online: 2022-07-14

degradation in garden waste composting. **[Objective]** To acclimatize a lignin-degrading strain—*Bacillus* sp. NO.2, improve its activity at high temperature, and observe its growth status and enzymatic properties. **[Methods]** The temperature gradient method was used to domesticate the strain, and the growth curve, enzyme activity, and lignin degradation rate were compared before and after the domestication. Moreover, the temperature range and pH range for the enzymatic reaction of lignin-degrading enzymes generated by the strain were determined. **[Results]** The maximum biomass was insignificantly different between the original strain and the domesticated strain at 60 °C. However, the activity of laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP), and lignin peroxidase (LiP) was 30.75%, 35.98%, and 29.62% higher, and the lignin degradation rate was 60.52% higher than those of the original strain, respectively. The Lac, MnP and LiP produced by the domesticated strain showed high activity at 20–60 °C and pH 3.0–9.0, and were stable, with the stability following the order of Lac>LiP>MnP. **[Conclusion]** The temperature gradient method can improve the activity of *Bacillus* at high temperature and widen the temperature and pH ranges for enzymatic reaction of lignin-degrading enzymes. Furthermore, it has potential for developing a special microbial agent for degrading garden waste. **Keywords:** *Bacillus* sp. NO.2; acclimation by temperature gradient; enzymatic properties

目前, 由园林植物自然凋落或人工修剪过程中产生的枯枝落叶、草屑花败、树木与灌木剪枝及其他植物残体等<sup>[1]</sup>组成的园林绿化废弃物已成为当下城市固废中除污泥外的又一大污染源<sup>[2]</sup>, 是继生活垃圾之后的第二大城市固体废弃物<sup>[3]</sup>。高温好氧堆肥是现阶段被广泛认可的减量化、无害化、资源化处理园林绿化废弃物的常用方式之一, 而在植物组分中, 木质素占 30%<sup>[4]</sup>, 包围纤维素和半纤维素一起填充于细胞壁的间隙, 提高植物机械强度, 是阻碍废弃物堆肥腐熟的主要因素。相较于其他物理、化学方法, 利用微生物的生物学功能分泌木质素降解相关酶系来促进木质素降解和堆肥腐熟<sup>[5]</sup>是较理想的方法。

另外, 高温好氧堆肥是一个动态变化过程, 温度变化能有效反映堆肥过程中有机质的转化效率, 是指示堆肥腐熟的重要指标<sup>[6]</sup>, 也是影响木质素降解的关键因素<sup>[7-10]</sup>。有报道称, 在堆肥过程中控制堆体在 50 °C 发酵 35 d, 木质素降解率可高达 70%, 当不再控制温度后木质素降解减慢<sup>[10]</sup>。与此同时, 当堆体温度超过 50 °C 时,

高温胁迫使微生物的生命活动速率降低甚至死亡, 进而影响木质素降解效率。为解决以上问题, 学者们从堆肥<sup>[11]</sup>、马粪<sup>[12]</sup>和土壤<sup>[13]</sup>等环境中定性筛选可降解木质素的高温菌株, 发现在堆肥高温期有木质素降解能力的微生物, 87% 属于杆菌属<sup>[14]</sup>。其中芽孢杆菌属细菌具有特殊保护机制, 抗逆性强, 在高温期可增强对难降解木质纤维素的分解, 提高堆肥效率<sup>[15]</sup>, 从而备受关注。武肖莎等<sup>[16]</sup>将高温降解菌株枯草芽孢杆菌应用于牛粪秸秆混合堆肥, 结果表明, 接种菌株的处理发酵启动快、升温迅速、高温持续时间长、木质纤维素降解充分, 有效提高了堆肥发酵效率。张鹏飞等<sup>[17]</sup>将嗜热嗜脂肪地芽孢杆菌应用于园林绿化废弃物堆肥, 28 d 后木质素降解率为 20.10%, 比链霉菌降解率更高、所需周期更短。但堆肥进入高温期时, 芽孢杆菌产生芽孢进入休眠状态, 微生物活性和产酶能力均降低, 其降解木质素的效率也随之减小。余克非<sup>[18]</sup>将 2 株从堆肥高温期筛选的芽孢杆菌按优化比例复合后加入高温期堆肥, 结果高温

抑制微生物活性及酶活性, 复合菌剂未产生显著影响。因此, 芽孢杆菌作为堆肥过程中的优势菌, 对难降解木质素的分解能力强弱, 关键在于其微生物活性的高低, 后续提高芽孢杆菌的活性对适应高温环境极为重要。

温度梯度驯化是一种具有方向性好和菌株遗传性状稳定等优点的有效方法<sup>[19]</sup>。本研究采用此方法驯化一株芽孢杆菌, 以提高菌株对高温环境的适应性, 并且通过单因素试验探讨其酶促反应温度和 pH 范围, 确保微生物应用于高温堆肥的效果, 以期为园林废弃物降解菌剂的制备提供新思路。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

芽孢杆菌属(*Bacillus* sp.) NO.2 和 NO.5, 课题组前期从园林绿化废弃物堆肥中筛选保存。

#### 1.1.2 培养基

种子液培养基: 牛肉膏蛋白胨培养基<sup>[18]</sup>。

驯化培养基(g/L): 牛肉膏蛋白胨液体培养基中蛋白胨替换为胰蛋白胨, 固体培养基中加入琼脂 20.0。

发酵培养基(g/L): 木质素磺酸钠 5.0, 牛肉膏 5.0, 氯化钠 5.0, 蛋白胨 10.0, 蒸馏水 1.0, pH 6.5–7.0<sup>[20]</sup>。

木质素降解培养基(g/L): 木质素磺酸钠 2.0, 磷酸二氢钾 1.0, 七水合硫酸镁 1.0, 蛋白胨 1.0, 蒸馏水 1.0。

以上培养基中含木质素磺酸钠的培养基, 防止其变性需在  $0.7 \times 10^5$  Pa 下灭菌 20 min, 其余均在  $1 \times 10^5$  Pa 灭菌 30 min。

#### 1.1.3 主要试剂和仪器

木质素磺酸钠, 上海麦克林生化科技有限公司; 2,2'-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐 [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate),

ABTS], 北京博奥拓达科技有限公司。

丙二酸-丙二酸钠缓冲液, 分别配制 100 mmol/L 丙二酸和丙二酸钠溶液, 按比例混合, 调节 pH 值(3.0–9.0), 用于 Lac 和 MnP 酶测定; 酒石酸缓冲液, 分别配制 200 mmol/L 酒石酸和酒石酸钠溶液, 按比例混合, 调节 pH 值(3.0–9.0), 用于 LiP 酶测定。

台式恒温振荡器, 精骐有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; 高速冷冻离心机, 北京吉奥森科技有限公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 菌株活化与种子液制备

将 4 °C 斜面保存的菌株 NO.2 和 NO.5 分别划线接种到固体培养基上, 30 °C 培养 2–4 d 完成活化。活化后挑取各活化菌株分别接入装有 100 mL 种子液培养基的 250 mL 锥形瓶中, 置于恒温振荡器中 30 °C、180 r/min 振荡培养 2 d, 获得种子液备用。

### 1.2.2 菌株筛选

菌株种子液用无菌水按 1:9 稀释浓度至  $10^{-8}$ , 再吸取 0.1 mL 稀释菌悬液转移至固体培养基上, 涂布均匀后分别在 30、40、45、50、55、60 °C 倒置培养, 观察并记录菌落出现时间及其生长情况。

### 1.2.3 温度梯度驯化过程

根据 1.2.2 菌株生长情况选择用于高温驯化的菌株。其驯化过程分为两个阶段。

第一阶段: 将菌株 No.2 的种子液按 1% 接种量接入驯化培养基中, 40 °C、180 r/min 培养 24 h 后, 再次转移到新的培养液中于 40 °C 继续驯化, 传代驯化 3 次。以 5 °C 为温度梯度间隔, 重复上述操作驯化至 50 °C<sup>[21–22]</sup>。

第二阶段参考赖水明等<sup>[23]</sup>极限温度液体培养与固体平板菌落筛选的驯化方法: 第一阶段驯化后的菌液涂布平板于 50 °C 培养, 挑选长势优良的菌落接入新的液体培养基中, 55 °C、

180 r/min 液体培养 24 h 后将培养液涂布于固体培养基上, 45 °C 培养 24 h 后挑选优势菌落接种于新鲜液体驯化培养基中, 55 °C、180 r/min 培养 24 h。55 °C 液体培养与 45 °C 的平板培养菌落筛选相结合重复传代驯化 3 次后, 继续按此方法提高驯化温度至 60 °C 液体培养与 50 °C 固体培养。驯化完成后, 将驯化后的菌液涂布挑选菌落至斜面培养基继续高温培养, 传 3 代以验证耐高温的稳定性, 选取传代稳定的菌株保存。

#### 1.2.4 菌株生长情况测定

驯化后菌株与原始菌株分别接种于种子液培养基中, 先后置于 60 °C 和 40 °C, 于 180 r/min 振荡培养, 每隔 3 h 测定菌液  $OD_{600}$  值, 分别绘制生长曲线。

#### 1.2.5 粗酶液的制备及酶活力测定

接种 5% 驯化前后菌株的菌液于发酵培养基中, 60 °C、180 r/min 培养 3 d, 将发酵液于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液。木质素过氧化物酶活力的测定参照田林双<sup>[24]</sup>和 Tien 等<sup>[25]</sup>的方法, 锰过氧化物酶活力测定参照田林双<sup>[24]</sup>和 Wariishi 等<sup>[26]</sup>的方法, 漆酶活力测定参照田林双<sup>[24]</sup>和 Wolfenden 等<sup>[27]</sup>的方法。

#### 1.2.6 木质素降解率测定

分别配制一组浓度为 10、20、30、40、50 mg/L 的木质素磺酸钠标准溶液, 以蒸馏水为对照在 280 nm 处用石英比色皿分别测出各浓度相对应的吸光度值<sup>[28]</sup>, 以木质素磺酸钠浓度为纵坐标、吸光度值为横坐标绘制标准曲线, 得回归直线方程  $y=133.28x-1.054$ ,  $R^2=0.9983$ 。

将驯化前后菌株菌液按 3% 接种量接入 100 mL 木质素降解培养基中, 60 °C、180 r/min 培养 5 d, 吸取培养液于离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min, 0.22  $\mu$ m 滤膜过滤上清液, 滤液用蒸馏水稀释 30 倍后测定  $OD_{280}$  值, 重复 3 次。将  $OD_{280}$  值代入回归方程计算木质素降解率, 计算公

式<sup>[29]</sup>为:

$$\text{木质素降解率(\%)} = \frac{C_1 - 30 \times C_2}{C_1} \times 100$$

式中  $C_1$  为初始培养基中木质素的浓度,  $C_2$  为待测样品中剩余木质素的浓度。

#### 1.2.7 酶学性质研究

##### (1) 温度对酶活力的影响

驯化前后菌株按照上述 1.2.5 方法进行产酶培养, 获得粗酶液并保存备用。参考文献[20]的方法, 将酶液在 20–60 °C 反应 5 min 后测定 Lac、MnP、LiP 酶活力, 确定 3 种酶的最适反应温度。在最适反应温度将粗酶液保温处理 20–100 min, 每隔 20 min 测一次酶活, 与未保温粗酶液酶活力对比, 计算相对酶活力, 确定酶的热稳定性。

##### (2) pH 对酶活力的影响

配制不同 pH 值(3.0–9.0)的丙二酸和酒石酸缓冲液, 根据韩月颖等<sup>[20]</sup>的方法, 在最适反应温度下, 将粗酶液分别与不同 pH 值的缓冲液反应 5 min 后测定 Lac、MnP、LiP 酶活力, 确定酶最适反应 pH。粗酶液在最适反应 pH 值的缓冲液中反应 20–100 min, 每隔 20 min 测一次酶活, 与未作用时酶活对比, 计算相对酶活力, 确定酶的 pH 稳定性。

#### 1.2.8 数据统计与分析

所有试验重复 3 次, 试验数据采用 Excel 2007 和 SPSS 22.0 进行处理。驯化前后菌株酶学性质的研究采用单因素方差分析法, 平均值多重比较用最小显著性差异法(least-significant difference, LSD) ( $P < 0.05$ ), 运用 Origin 2021 进行数据作图处理。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌株在不同温度下的生长适应性

由表 1 可知, 在 30–55 °C 时菌株均能生长,

表 1 不同温度下菌株生长情况

Table 1 Growth condition of stains at different temperatures

菌株 Strain	观察项目 Observation items	培养温度 Temperature (°C)					
		30	40	45	50	55	60
NO.2	菌落数 Number of bacteria colonies	154	307	288	227	8	0
	出菌时间 Outbacterial time (h)	23	18	18	10	9	
	菌落数 Number of bacteria colonies	138	280	225	208	7	0
NO.5	出菌时间 Outbacterial time (h)	18	18	18	10	20	

高温 60 °C 无菌落出现, 相对最适生长温度为 40 °C。通过观察, 菌株 NO.2 随温度升高菌落出现时间缩短, 在 50 °C 培养 10 h 出现菌落且生长较好, 升温至 55 °C 时仍有少许菌落生长。菌株 NO.5 在培养温度超过 40 °C 后, 菌落数随温度的升高而逐渐减少, 在 55 °C 培养 20 h 后才出现菌落, 与菌株 NO.2 相比对高温响应缓慢, 适应时间延长。因此, 菌株 NO.2 耐热能力较强, 比菌株 NO.5 更能适应高温环境, 选择 NO.2 为目标菌株进行温度梯度驯化, 进一步提高其对高温的耐受性, 使其更加适应温度动态变化的堆肥过程。

## 2.2 驯化前后菌株的生长曲线

由图 1 可知, 驯化后菌株 TANO.2 与原始菌株 NO.2 在最适温度 40 °C 培养相比较, 对数期持续时间更长, 进入稳定期后最大生物量显著高于驯化前。在 60 °C 条件下培养, 驯化前后菌株的生长趋势较为接近, 培养 30 h 后进入对数生长期, 最大生物量之间无显著差异, 但驯化株较原始菌株在对数期生物量上升速度快, 提前 3 h 进入稳定期。综上所述, 对菌株 NO.2 进行温度驯化可以提高菌株对高温胁迫的适应性及微生物活性。

## 2.3 驯化前后菌株产酶能力、木质素降解率的比较

原始菌株 NO.2 和驯化后菌株 TANO.2 于高

温 60 °C 培养所测酶活和木质素降解率如表 2 所示。驯化后菌株的 Lac、MnP 和 LiP 酶活力较原菌株分别提高 30.75%、35.98% 和 29.62%, 木质素降解率提高 60.52%。综合考虑, 菌株驯化后明显提高了其在高温下的产酶能力和木质素降解效果, 后续进一步考察其驯化前后酶促反应温度和 pH 范围。

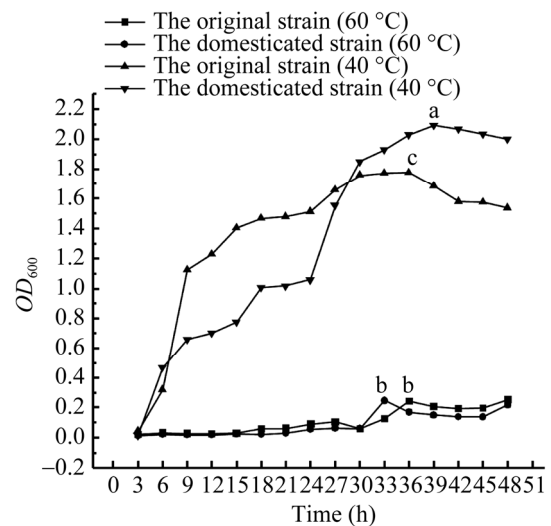


图 1 驯化后菌株和原始菌株的生长曲线 不同小写字母表示最大生物量间差异显著 ( $P < 0.05$ )

Figure 1 The growth curves of the domesticated and original strains. Different lowercase letters indicate significant differences between maximum biomass ( $P < 0.05$ )

表 2 驯化前后菌株酶活性与木质素降解率(平均值±标准差)

菌株	漆酶	锰过氧化物酶	木质素过氧化物酶	木质素降解率
Strain	Lac (U/L)	MnP (U/L)	LiP (U/L)	Lignin degradation rate (%)
NO.2	37.92±4.98	21.79±3.69	13.03±3.07	15.07±2.94
TANO.2	49.58±4.12	29.63±2.46	16.89±2.76	24.19±3.30

## 2.4 驯化前后菌株的酶学性质研究

### 2.4.1 最适反应温度及热稳定性

由表 3 可知, 驯化前后菌株所产 3 种酶在 20–60 °C 之间均有酶活, 随着温度的升高, 底物分子与酶有效碰撞率越大, 酶活就越高, 但在最适反应温度酶活才最高, 进一步提高反应温度则酶活下降<sup>[30]</sup>。驯化前 Lac 和 LiP 最适反应温度均为 30 °C, 酶活最高分别为(37.92±4.98) U/L 和 (13.03±3.07) U/L; MnP 最适反应温度为 50 °C, 酶活达(23.33±1.06) U/L。而驯化后 Lac 和 LiP 最适反应温度均为 50 °C, 酶活分别为 (50.90±3.50) U/L 和(24.13±2.76) U/L; MnP 在反应温度为 60 °C 时, 酶活最高为(31.37±1.97) U/L, 为该种酶的最适反应温度。综上所述, 与驯化前相比, Lac、LiP 和 MnP 这 3 种酶的最适反应温度均有所提高, 而且最高酶活力分别提高了

34.23%、85.19%和 60.18%。

在最适反应温度下, 将 3 种酶与缓冲液共同作用 20–100 min, 以未保温的粗酶液酶活力为 100%, 计算相对酶活力。如图 2 所示, 在最适反应温度下保温处理 20 min 后, 3 种酶的酶活性仍较高, 随着反应时间的延长, 则逐渐下降。保温 100 min 后, 驯化后菌株所产 Lac 仍保持 60%以上的活性, 具有良好的热稳定性且高于驯化前; MnP 和 LiP 活性均低于 40%, 稳定性较差, 但优于驯化前, 随着反应时间的延长, LiP 酶活性下降趋势较缓慢, 100 min 后相对酶活力高于 MnP。综上所述, 驯化后菌株所产 3 种酶在各自最适反应温度下保温处理 100 min 后, 按剩余相对酶活力大小, 热稳定性依次为 Lac>LiP>MnP, 且相较于驯化前, 驯化后酶活热稳定性更高。

表 3 驯化前后 3 种酶的最适反应温度比较(平均值±标准差)

Table 3 Optimal reaction temperature of the enzyme (mean±SD)

培养温度 Temperature (°C)	漆酶 Lac (U/L)		锰过氧化物酶 MnP (U/L)		木质素过氧化物酶 LiP (U/L)	
	原始菌株 The original strain	驯化后菌株 The domesticated strain	原始菌株 The original strain	驯化后菌株 The domesticated strain	原始菌株 The original strain	驯化后菌株 The domesticated strain
20	25.27±1.51Aa	9.26±1.17Aa	15.75±1.65Aa	8.71±2.46Aa	9.77±1.54Aa	19.91±1.47Aa
30	37.92±4.98Ba	49.58±4.12Bb	21.79±3.69Aa	29.63±2.46Ba	13.03±3.07Ba	16.89±2.76Aa
40	18.59±1.00Ca	37.63±2.06Ab	21.00±1.17Aa	22.66±3.75Ba	11.95±1.35Aa	22.63±3.83Ba
50	13.07±1.23Da	50.90±3.50Bb	23.33±1.06Ba	20.91±1.48Ba	5.43±0.54Ca	24.13±2.76Bb
60	8.28±3.08Ea	21.73±2.20Aa	20.71±4.53Aa	31.37±1.97Ba	5.43±0.36Ca	10.86±1.81Cb

不同大写字母表示同一菌株在不同培养温度的酶活间差异显著; 不同小写字母表示同一培养温度下不同菌株间酶活差异显著,  $P<0.05$

Different capital letters indicate significant differences in enzyme activity of the same strain at different culture temperatures; Different lowercase letters indicate significant differences in enzyme activities among different strains at the same culture temperature,  $P<0.05$ .

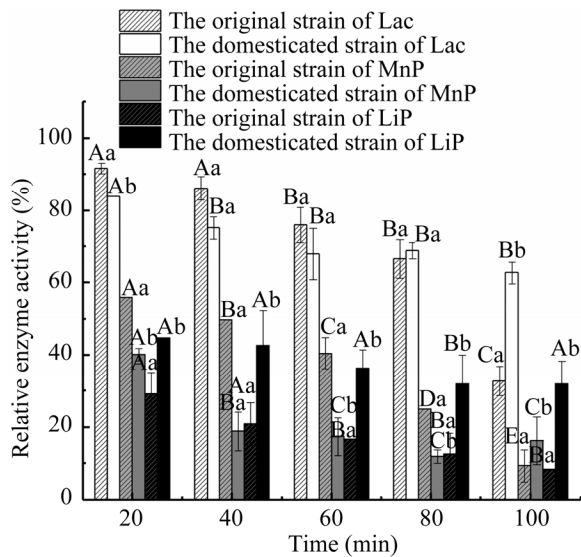


图 2 酶的热稳定性 不同大写字母表示同一酶在不同时间的相对酶活力间差异显著; 不同小写字母表示同一酶在驯化前后的相对酶活力间差异显著( $P<0.05$ )

Figure 2 Thermal stability of the three enzymes. Different capital letters indicate significant differences between the relative enzyme activities of the same enzyme at different times; Different lowercase letters indicate significant differences between the relative enzyme activities of the same enzyme before and after domestication ( $P<0.05$ ).

#### 2.4.2 最适反应 pH 及 pH 稳定性

pH 会影响到酶蛋白结构及与底物的结合能力, 从而改变酶活力<sup>[30]</sup>。由表 4 可知, 在 pH 4.5–9.0 之间 3 种酶均有较高的酶活, 但不同的 pH 条件下酶活以不同的解离态存在, 只有一种状态最适合。与驯化前相比, 驯化后 Lac 活性随着 pH 的升高而升高, 在 pH 值为 9.0 时产酶能力最好, 此时酶活为(85.75±7.66) U/L, 驯化后显著提高了最适反应 pH 范围; MnP 和 LiP 最适作用 pH 值均为 6.0, 这 2 种酶在酸性条件下以最适解离状态存在, 酶活分别最高达(24.40±2.46) U/L 和(16.89±1.17) U/L, 最适反应 pH 未得到明显提高, 但酶活力高于驯化前, 分别提高了 23.23%和 139.24%。

在最适反应 pH 条件下, 将 3 种酶与缓冲液作用 20–100 min, 以未作用的粗酶液酶活力为 100%, 计算相对酶活力。由图 3 可知, 3 种酶与缓冲液作用 20 min 后活性仍较高, 均保持在 60%以上, 与缓冲液作用时间越长, 酶活性呈下降趋势。作用 100 min 后, 驯化后菌株所产 Lac 在 pH 9.0 的碱性环境中酶活力仍保持 64.76%,

表 4 驯化前后 3 种酶的最适反应 pH (平均值±标准差)

Table 4 Optimal reaction pH of the three enzymes (mean±SD)

pH	漆酶 Lac (U/L)		锰过氧化物酶 MnP (U/L)		木质素过氧化物酶 LiP (U/L)	
	原始菌株 The original strain	驯化后菌株 The domesticated strain	原始菌株 the original strain	驯化后菌株 The domesticated strain	原始菌株 the original strain	驯化后菌株 The domesticated strain
3.0	18.67±0.82Aa	19.83±6.60Aa	16.13±1.47Aa	21.48±0.80Aa	2.72±0.77Aa	4.53± 2.39Aa
4.5	31.21 ±1.12Ba	53.67±1.87Bb	12.47±1.27Aa	22.35±0.43Ab	3.26±0.10Aa	15.98±1.16Bb
6.0	15.17±1.75Ca	62.64±1.76Bb	19.80±1.24Aa	24.40±2.46Ba	3.80±0.76Aa	16.89±1.17Bb
7.5	21.58±0.85Da	65.24±1.69Bb	7.26± 0.53Ba	14.81±3.70Ca	7.06±2.30Ba	14.48±1.36Ba
9.0	4.47 ±0.89Ea	85.75 ±7.66Cb	5.23±1.74Ba	7.19± 0.03Da	3.80±0.77Aa	16.29±0.88Bb

不同大写字母表示同一菌株在不同 pH 值的酶活间差异显著; 不同小写字母表示同一 pH 值不同菌株间酶活差异显著 ( $P<0.05$ )

Different capital letters indicate significant differences in enzyme activity of the same strain at different pH values; Different lowercase letters indicate significant differences in enzyme activities between different strains at the same pH value ( $P<0.05$ ).

远高于驯化前(19.44%),说明 Lac 对于碱性环境有较强的适应能力,属于碱性酶; MnP 和 LiP 酶活力分别还剩 45.6%和 48.9%,比驯化前分别提高 113.78%和 217.95%,在酸性环境中具有较好的稳定性。综上所述,相较于驯化前,驯化后 3 种酶的酶活力下降缓慢,在最适反应 pH 下与缓冲液作用 100 min 后,根据所剩相对酶活力大小, pH 稳定性依次为 Lac>LiP>MnP。

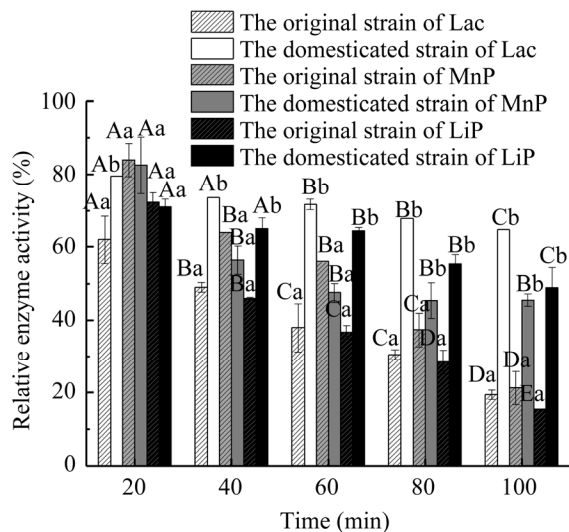
### 3 讨论与结论

目前,针对园林绿化废弃物高温好氧堆肥存在的木质纤维素结构复杂难降解和高温胁迫问题,从特定高温环境中定性筛选可分泌木质

素降解相关酶系的高温菌已成为趋势。已有研究发现,芽孢杆菌类细菌因具备特殊耐热机制使其可以安全度过堆肥高温期,是堆肥过程中常见的优势菌,而且对木质素降解有较大的应用潜力<sup>[31]</sup>。但在高温环境下微生物产生芽孢进入休眠状态,微生物活性降低,代谢缓慢,分泌酶减少,影响微生物降解木质素的效果。本实验将一株筛选自堆肥且具有木质素降解能力的芽孢杆菌通过温度梯度方法驯化后,在高温环境下考察其生长情况、产酶能力和木质素降解率,以及探究温度和 pH 对其酶促反应的影响。

有报道称,盐类的存在对微生物受热力损伤具有保护作用,其作用效果随盐的种类、浓度及菌种等因素的变化而有相当大的差异<sup>[32]</sup>。

一般认为,低浓度的 NaCl 主要通过调节细胞内外的渗透压进而对细胞起到保护作用,高浓度则具有破坏作用。本实验所采用的驯化培养基和发酵培养基中均添加了适宜浓度的 NaCl,可有效降低高温胁迫损伤微生物细胞。另外,在温度梯度驯化锻炼过程中,可能由于菌株细胞质膜随培养温度的升高,类脂总含量和高熔点饱和脂肪酸增加,提高了菌株的耐热性<sup>[33]</sup>,从而提高微生物在高温环境下的生命活动速率,缩短芽孢杆菌类细菌的休眠时间,减少抵抗不利条件的芽孢形成。因此,与原菌株比较,驯化后生物量和次级代谢产物胞外酶显著增加。在高温(60 °C)培养 3 d 后,驯化后菌株所产漆酶(Lac)达 49.58 U/L,锰过氧化物酶(MnP) 29.63 U/L,木质素过氧化物酶(LiP) 16.89 U/L,较原始菌分别提高了 30.75%、35.98%和 29.62%。王敬红<sup>[34]</sup>从腐木不同部位的土壤样品中驯化得到一组具有高效木质素降解能力的细菌复合菌系 LDH,在 50 °C 培养,所产 Lac、MnP 和 LiP 的酶活力分别最高为 41.11、16.05 和 15.41 U/L。与前人研究结果相比,进一步表



**图 3 酶 pH 稳定性** 不同大写字母表示同一酶在不同时间下的相对酶活力间差异显著;不同小写字母表示同一酶在驯化前后的相对酶活力间差异显著( $P<0.05$ )

Figure 3 pH stability of the three enzymes. Different capital letters indicate significant differences between the relative enzyme activities of the same enzyme at different times; Different lowercase letters indicate significant differences between the relative enzyme activities of the same enzyme before and after domestication ( $P<0.05$ )



明驯化后可提高菌株微生物活性及产酶能力, 使菌株对高温环境的适应性更强。

堆肥过程中微生物通过分泌木质素降解相关酶系来实现降解作用, 木质素降解酶的产量高低直接决定木质素降解速度及程度, 但高温影响酶活性, 使木质素降解缓慢。目前, 关于定性筛选高温木质素降解菌的研究较少, An 等<sup>[35]</sup>发现了一株嗜热嗜碱细菌 *Serratia* sp. AXJ-M, 该菌能在极端环境下降解木质素, 降解率达 52.5%。贺鹏亮<sup>[36]</sup>通过限制性培养从菌渣堆高温部位材料中驯化得到一组高效木质素降解菌系 SD, 共获得 7 株可培养菌株, 单一菌株在高温 (50 °C) 培养 5 d 的木质素降解率为 8.50%–33.75%, 复合菌系 SD 对木质素的降解率达 41.60%。王敬红<sup>[34]</sup>驯化得到的复合降解菌系 LDH 在 50 °C 培养 10 d, 木质素降解率达 32.4%。刘心吾等<sup>[13]</sup>在林区温泉采集土壤样品中筛选出 2 株耐高温的产芽孢细菌, 双菌降解 20 d 后木质素的降解率为 24.51%。而此实验中, 驯化后单菌株液态发酵 5 d 后木质素降解率达 24.19%, 与原始菌株相比提高了 60.52%。与上述研究结果相比, 同等高温环境条件下, 驯化后菌株在单一菌株作用情况下降解率较高, 进一步佐证了驯化后提高菌株分泌木质素降解相关酶系的能力。

酶学性质的研究对于木质素降解和酶的生产应用意义不可忽视。据报道, 细菌漆酶(Lac) 耐受 pH 值为 1.0–7.2, 温度为 30–85 °C<sup>[37]</sup>; 锰过氧化物酶(MnP) 在 35–55 °C 温度范围内产酶效果最佳, 耐受 pH 3.0–7.0<sup>[38]</sup>; 木质素过氧化物酶(LiP) 最佳反应温度为 35 °C, 耐受 pH 2.5–7.0<sup>[39]</sup>。本研究中, 与驯化前相比, 菌株驯化后提高了所产 3 种酶的最适反应温度和 pH 范围, Lac、MnP 和 LiP 最适反应温度分别为 50、60 和 50 °C, 最适作用 pH 值分别为 9.0、6.0 和 6.0, 而且在最佳酶促反应条件下具有较

好的热稳定性和 pH 稳定性, 其中 Lac 的稳定性相对最高, 属于高温碱性酶。此实验结果在上述报道范围内, 并且随着培养温度的逐渐提高, 可能引起酶的一级结构中某些关键区域个别氨基酸的改变, 从而引起高级结构的变化, 使酶蛋白结构中的氢键、离子键或疏水键增加, 提高了酶分子的热稳定性<sup>[40]</sup>, 但对于相关氨基酸是如何变化和影响菌株稳定性的认识有待进一步研究。

综上所述, 温度梯度驯化方法有效提高了该菌株对高温的适应性。本研究驯化后得到的菌株在高温环境的产酶能力与木质素降解能力均显著高于原始菌株, 木质素降解酶的酶促反应温度和 pH 耐受范围更宽, 能够更加适应温度和 pH 动态变化的堆肥过程。下一步研究可采用数学统计方法优化微生物发酵培养基组分和发酵条件, 最大化提高驯化后菌株的酶活力, 为研制高效降解园林绿化废弃物微生物菌剂提供菌种资源。

## REFERENCES

- [1] 孙向阳, 徐佳, 杜建军. 北京市园林绿化废弃物资源化再利用现状及思考[A]// 2010“北京园林绿化”学术研讨会论文集[C]. 北京: 中国林业出版社, 2010: 414-421. SUN XY, XU J, DU JJ. The status quo and thinking of the recycling of landscaping waste in Beijing[A]// Proceedings of the 2010 “Beijing Landscaping” Symposium[C]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2010: 414-421 (in Chinese).
- [2] 郭泽莉, 张玉强. 浅析我国园林废弃物行业的发展及对策[J]. 国土绿化, 2019(3): 51-53. GUO ZL, ZHANG YQ. A brief analysis of the development of China's garden waste industry and countermeasures[J]. Land Greening, 2019(3): 51-53 (in Chinese).
- [3] 张志卿, 于光辉, 熊天龙, 梁娟, 李建军. 园林废弃物资源化利用进展[J]. 四川环境, 2015, 34(2): 154-158. ZHANG ZQ, YU GH, XIONG TL, LIANG J, LI JJ. Research on garden waste resource utilization[J]. Sichuan Environment, 2015, 34(2): 154-158 (in Chinese).

- [4] BROWN ME, CHANG MC. Exploring bacterial lignin degradation[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 19: 1-7.
- [5] 梁丛颖, 林璐. 环境微生物介导的木质素代谢及其资源化利用研究进展[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(10): 3380-3392.  
LIANG CY, LIN L. Environmental microorganisms driven lignin biodegradation and their roles in lignin utilization[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(10): 3380-3392 (in Chinese).
- [6] 李伟雄, 曾雷, 谢继红, 陈颖乐. 园林废弃物高温堆肥过程的水溶性有机物转化特征[J]. *林业与环境科学*, 2021, 37(3): 8-14.  
LI WX, ZENG L, XIE JH, CHEN YL. Transformation characteristics of dissolved organic matter during thermophilic composting of agro-forestry wastes[J]. *Forestry and Environmental Science*, 2021, 37(3): 8-14 (in Chinese).
- [7] HASSEN A, BELQUITH K, JEDIDI N, CHERIF A, Cherif M, Boudabous A. Microbial characterization during composting of municipal solid waste[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 80(3): 217-225.
- [8] VIKMAN M, KARJOMAA S, KAPANEN A, WALLENIUS K, ITÄVAARA M. The influence of lignin content and temperature on the biodegradation of lignocellulose in composting conditions[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2002, 59(4/5): 591-598.
- [9] ZHOU C, LIU Z, HUANG ZL, DONG M, YU XL, NING P. A new strategy for co-composting dairy manure with rice straw: addition of different inocula at three stages of composting[J]. *Waste Management*, 2015, 40: 38-43.
- [10] TUOMELA M, VIKMAN M, HATAKKA A, ITÄVAARA M. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 72(2): 169-183.
- [11] LIU L, WANG SQ, GUO XP, ZHAO TN, ZHANG BL. Succession and diversity of microorganisms and their association with physicochemical properties during green waste thermophilic composting[J]. *Waste Management*, 2018, 73: 101-112.
- [12] 张亮, 林宁, 阚立. 高温木质素分解菌的分离、筛选及鉴定[J]. *安徽农业科学*, 2015, 43(33): 33-34, 37.  
ZHANG L, LIN N, KAN L. Isolation, screening and identification of high temperature lignin-decomposing bacteria[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2015, 43(33): 33-34, 37 (in Chinese).
- [13] 刘心吾, 张威, 马玲玲, 吕欣. 耐高温木质纤维素降解菌株的分离筛选、鉴定及降解工艺的研究[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(21): 118-125.  
LIU XW, ZHANG W, MA LL, LV X. Lignocellulose degradation strains with high-temperature resistance: isolation, screening, identification and degradation process[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(21): 118-125 (in Chinese).
- [14] 付春霞, 付云霞, 邱忠平, 江海涛, 刘志刚, 华建军. 木质素生物降解的研究进展[J]. *浙江农业学报*, 2014, 26(4): 1139-1144.  
FU CX, FU YX, QIU ZP, JIANG HT, LIU ZG, HUA JJ. Research progresses of lignin biodegradation[J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2014, 26(4): 1139-1144 (in Chinese).
- [15] DEES PM, GHIORSE WC. Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA[J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2001, 35(2): 207-216.
- [16] 武肖莎, 李再兴, 黄亚丽, 马骏, 韩学滨, 张凡. 高温木质纤维素降解菌的筛选鉴定及其堆肥应用[J]. *安徽农业科学*, 2021, 49(20): 68-71.  
WU XS, LI ZX, HUANG YL, MA J, HAN XB, ZHANG F. Screening, identification and its composting application of high-temperature strain for degrading lignocellulose[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, 49(20): 68-71 (in Chinese).
- [17] 张鹏飞, 李素艳, 余克非, 姜新福. 木质素降解细菌的筛选及园林废弃物降解研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2018, 45(4): 676-681.  
ZHANG PF, LI SY, YU KF, JIANG XF. Screening of lignin-degrading bacteria and study on degradation of garden waste[J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2018, 45(4): 676-681 (in Chinese).
- [18] 余克非. 园林绿化废弃物堆肥优势降解菌的筛选及复合菌剂配比研究[D]. 北京: 北京林业大学博士学位论文, 2020.  
YU KF. Isolation of lignocellulolytic microorganisms to develop a composite inoculum for green waste composting[D]. Beijing: Doctoral Dissertation of Beijing Forestry University, 2020 (in Chinese).
- [19] 赵戎蓉, 贺娟. 耐 60 °C 高温乳酸菌的驯化及鉴定[J]. *中国微生物学杂志*, 2011, 23(4): 328-331.  
ZHAO RR, HE J. Acclimation and identification of 60 °C thermotolerant lactic acid bacteria[J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2011, 23(4): 328-331 (in Chinese).
- [20] 韩月颖, 张喜庆, 曲云鹏, 高云航. 一株低温木质素降

- 解菌的筛选、产酶优化及酶学性质[J]. 微生物学通报, 2021, 48(10): 3700-3713.
- HAN YY, ZHANG XQ, QU YP, GAO YH. Screening, enzyme-production optimization and enzymatic properties of a low-temperature lignin-degrading bacteria[J]. Microbiology China, 2021, 48(10): 3700-3713 (in Chinese).
- [21] 饶甜甜, 郭虹雯, 赵惠茹, 刘志彬, 张雯, 倪莉. 紫外诱变及高温驯化联用筛选耐高温嗜酸乳杆菌[J]. 中国食品学报, 2018, 18(9): 129-135.
- RAO TT, GUO HW, ZHAO HR, LIU ZB, ZHANG W, NI L. Screening of thermotolerant *Lactobacillus acidophilus* strain by UV mutation and high temperature acclimation[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2018, 18(9): 129-135 (in Chinese).
- [22] 王美珠, 范琳, 叶蕊芳. 皮状丝孢酵母的高温驯化及细胞膜脂肪酸组成的测定[J]. 中国油脂, 2014, 39(5): 48-52.
- WANG MZ, FAN L, YE RF. High temperature domestication of *Trichosporon cutaneum*. and fatty acid composition of its cytomembrane[J]. China Oils and Fats, 2014, 39(5): 48-52 (in Chinese).
- [23] 赖水明, 张志榕, 范格成, 吴贤峰, 吴有林. 一种耐高温粪肠球菌的筛选与驯化方法: 中国, CN111206006A[P]. 1970-01-19.
- LAI SM, ZHANG ZR, FAN GC, WU XF, WU YL. Method for screening and acclimating high-temperature resistant *Enterococcus faecalis*: China, CN111206006A[P]. 1970-01-19 (in Chinese).
- [24] 田林双. 木质素降解相关酶类测定标准方法研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(10): 13-15.
- TIAN LS. Research on standard method for determining ligninolytic enzyme activity[J]. Animal Husbandry and Feed Science, 2009, 30(10): 13-15 (in Chinese).
- [25] TIEN M, KIRK TK. Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* burds[J]. Science, 1983, 221(4611): 661-663.
- [26] 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.
- [27] 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 2, 1982(7): 805-812.
- [28] 乔乔. 木质素降解微生物的筛选及其降解特性的研究[D]. 合肥: 合肥工业大学硕士学位论文, 2013.
- QIAO Q. Study on screening and characterization of lignin biodegradation strains and study on its capability of biodegrading lignin[D]. Hefei: Master's Thesis of Hefei University of Technology, 2013 (in Chinese).
- [29] 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 D, LIU JL, SHEN GN, YUAN Y, GAO YM, YAN L, WEI D, WANG WD. Screening of lignin degrading strain BYL-7 and optimization of degradation conditions[J]. Microbiology China, 2020, 47(12): 4059-4071 (in Chinese).
- [30] 李明华, 孟秀梅, 王成龙. 纤维素酶高产菌筛选鉴定及酶学性质初步研究[J]. 中国酿造, 2021, 40(8): 134-138.
- LI MH, MENG XM, WANG CL. Screening and identification of high-producing cellulose strain and enzymatic property[J]. China Brewing, 2021, 40(8): 134-138 (in Chinese).
- [31] 张亚茹, 任静, 张伟涛, 王树香, 王硕, 马非雨, 李术娜, 李红亚. 解淀粉芽胞杆菌 MN-13 的分离、鉴定及木质素降解特性[J]. 农业生物技术学报, 2021, 29(7): 1389-1399.
- ZHANG YR, REN J, ZHANG WT, WANG SX, WANG S, MA FY, LI SN, LI HY. Screening, identification and lignin-degradation characteristics of *Bacillus amyloliquefaciens* MN-13[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2021, 29(7): 1389-1399 (in Chinese).
- [32] 赵越, 魏法山, 赵改名, 宋莲军, 李苗云, 高晓平, 赵莉君, 黄现青. NaCl 对嗜热脂肪芽孢杆菌耐热性影响的研究[J]. 现代食品科技, 2017, 33(4): 229-235.
- ZHAO Y, WEI FS, ZHAO GM, SONG LJ, LI MY, GAO XP, ZHAO LJ, HUANG XQ. Effect of sodium chloride on the thermal resistance of *Geobacillus stearothermophilus*[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(4): 229-235 (in Chinese).
- [33] 张文娟, 何宇, 王冰. 极端环境下微生物的适应机制[J]. 吉林农业, 2019(16): 64-65.
- ZHANG WJ, HE Y, WANG B. Adaptation mechanism of microorganisms in extreme environments[J]. Agriculture of Jilin, 2019(16): 64-65 (in Chinese).
- [34] 王敬红. 高温木质素降解复合菌系的筛选及其代谢通路解析[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2021.
- WANG JH. Screening of high-temperature lignin-

- degrading bacterial consortium and analysis of its metabolic pathway[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2021 (in Chinese).
- [35] AN XJ, ZHONG B, CHEN GT, AN WJ, XIA X, 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]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021, 406: 124285.
- [36] 贺鹏亮. 高温木质素降解菌系驯化筛选及在羊粪-菌渣堆肥中的应用[D]. 贵阳: 贵州师范大学硕士学位论文, 2021.
- HE PL. Domestication and screening of high-temperature lignin degradation bacteria and its application in sheep manure-mushroom residue composting[D]. Guiyang: Master's Thesis of Guizhou Normal University, 2021 (in Chinese).
- [37] 杨静, 蒋剑春, 张宁, 徐浩, 解静聪, 赵剑. 微生物降解木质素的研究进展[J]. *生物质化学工程*, 2021, 55(3): 62-70.
- YANG J, JIANG JC, ZHANG N, XU H, XIE JC, ZHAO J. Research progress on lignin degradation by microorganism[J]. *Biomass Chemical Engineering*, 2021, 55(3): 62-70 (in Chinese).
- [38] 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.
- 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).
- [39] 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.
- 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).
- [40] 梁利华, 阚振荣. 嗜热菌及嗜热酶的研究应用[A]// 微生物生态学研究进展——第五届微生物生态学术研讨会论文集[C]. 2003: 191-198.
- LIANG LH, KAN ZR. The development and application of thermophiles[A]// *Research Progress in Microbial Ecology-Proceedings of the Fifth Symposium on Microbial Ecology*[C]. 2003: 191-198 (in Chinese).