

## 研究报告

## 一株竹木质素降解菌的筛选及降解效果

刘瑞<sup>1</sup>, 郭琪<sup>1</sup>, 曹颖<sup>1</sup>, 徐刚<sup>1</sup>, 张丽<sup>2</sup>, 孙鹏<sup>2</sup>, 胡尚连<sup>\*1</sup>, 赵博<sup>\*1</sup>

1 西南科技大学生命科学与工程学院竹类研究所, 四川 绵阳 621010

2 四川省林业科学研究院, 四川 成都 610081

刘瑞, 郭琪, 曹颖, 徐刚, 张丽, 孙鹏, 胡尚连, 赵博. 一株竹木质素降解菌的筛选及降解效果[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2170-2181.

LIU Rui, GUO Qi, CAO Ying, XU Gang, ZHANG Li, SUN Peng, HU Shanglian, ZHAO Bo. A bamboo lignin-degrading strain: screening and degradation performance[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2170-2181.

**摘要:**【背景】竹子纤维素含量高, 被认为是优质的生物精炼资源。然而, 竹子中的木质素与纤维素结合紧密, 降解木质素成为有效利用竹子纤维素的关键。【目的】筛选专一降解竹木质素的细菌, 并探究其酶活活性及木质素降解效果。【方法】以木质素为唯一碳源的培养基进行初筛, 苯胺蓝、刚果红培养基进行复筛, 通过测定酶活性评估其木质素降解能力。通过扫描电镜、傅里叶变换红外光谱和 X 射线衍射分析竹子降解前后的形貌以及结构变化。【结果】从竹林中筛选分离出一株细菌 XKG6, 为食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)。菌株 XKG6 分泌的漆酶、木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、滤纸酶和木聚糖酶活性最高分别为 1 543.21、6 229.32、826.41、2 602.1 和 1 889.25 U/L。菌株 XKG6 降解碱木质素 7 d 后的降解率为 14.04%。通过傅里叶变换红外光谱和扫描电镜发现竹木质素经菌株 XKG6 处理后结构有明显变化。【结论】本研究筛选获得了一株具有较强木质素降解能力的细菌, 该菌株在降解竹木质素过程中保留了较多的纤维素, 为纤维素资源的工业生产提供了潜在的替代菌株。

**关键词:** 竹木质素; 细菌; 微生物降解; 筛选

资助项目: 国家重点研发计划(2021YFD2200504\_1, 2021YFD2200505\_2); 四川省“十四五”农作物及畜禽育种攻关计划(2021YFYZ0006)

This work was supported by the National Key Research and Development Program of China (2021YFD2200504\_1, 2021YFD2200505\_2), and the Key Projects of Crop and Livestock Breeding of Sichuan Province During the Fourteenth Five-year Plan Period (2021YFYZ0006).

\*Corresponding authors. E-mail: HU Shanglian, hushanglian@swust.edu.cn; ZHAO Bo, bozhao@swust.edu.cn

Received: 2023-10-23; Accepted: 2024-01-05; Published online: 2024-03-07

# A bamboo lignin-degrading strain: screening and degradation performance

LIU Rui<sup>1</sup>, GUO Qi<sup>1</sup>, CAO Ying<sup>1</sup>, XU Gang<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>2</sup>, SUN Peng<sup>2</sup>, HU Shanglian<sup>\*1</sup>, ZHAO Bo<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup> Bamboo Research Institute, School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang 621010, Sichuan, China

<sup>2</sup> Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, Sichuan, China

**Abstract:** [Background] Bamboo is considered an excellent source for biorefining for its high cellulose content. However, the complex interactions between lignin and cellulose present an obstacle to the efficient utilization of bamboo. The process of lignin degradation is essential for the efficient utilization of bamboo. [Objective] To screen out the strains that specialize in degrading bamboo lignin and investigate their enzyme activities and effects of lignin degradation. [Methods] A culture medium with lignin as the solo carbon source was used for the primary screening, which was followed by the secondary screening with the media containing aniline blue and Congo red. The activities of enzymes were measured to assess the lignocellulose degradation performance. X-ray diffraction, Fourier-transform infrared spectroscopy, and scanning electron microscopy were employed to study the changes of bamboo appearance and structure after degradation. [Results] A strain XKG6 capable of degrading lignin was isolated from the bamboo forest and identified as *Pseudomonas oleovorans*. The maximum activities of lactase, lignin peroxidase, manganese peroxidase, filter paper enzyme, and xylanase secreted by the strain reached 1 543.21, 6 229.32, 826.41, 2 602.1, and 1 889.25 U/L, respectively. The strain showed a degradation rate of 14.04% against alkaline lignin on day 7. Fourier transform infrared spectroscopy and scanning electron microscopy showed the significant structural changes in bamboo lignin after treatment with XKG6. [Conclusion] In this study, a bacterial strain with the ability to degrade lignin was screened out. This strain retained much cellulose while degrading bamboo lignin, serving as an alternative strain for the industrial production of lignocellulosic resources.

**Keywords:** bamboo lignin; bacteria; microbial degradation; screening

随着世界人口的增长和能源需求的不断增加,大量化石燃料和化学品的过度使用,导致了全球变暖、水土污染等一系列严重的环境问题。因此,开发可再生的生物质资源并将其转化为绿色能源显得十分迫切<sup>[1]</sup>。通过生物精炼的过程可以将生物质转化为能源以及其他有价值的副产品,如化学品和食品等<sup>[2]</sup>。中国是世界上竹类资源最丰富的国家,竹子种植面积和积蓄量均为世界第一<sup>[3]</sup>。相较于其他植物,竹

子具有纤维含量高、生长期短、适应性强和易繁殖等优点,是一种非常重要的可再生资源。竹子的细胞壁中纤维素约占 38%–50%,半纤维素约占 23%–32%,木质素约占 15%–25%,由于其高含量的纤维素使得竹子成为优质的生物精炼资源<sup>[4]</sup>。纤维素经酶解产生的葡萄糖可以通过微生物发酵转化为各种有价值的化学品<sup>[5]</sup>。例如,利用发酵生产乳酸、琥珀酸和纤维素乙醇等,其中纤维素乙醇可作生物燃料<sup>[5–6]</sup>。竹子除

了可以精炼成为能源、化学品之外,还是造纸工业中的重要资源,我国造纸工业原料紧缺,用竹子造纸可节约大量的木材从而保护森林,竹材是我国造纸工业纤维原料的重要补充。但是,由于竹子质地紧密、硬度高,木质素与纤维素紧密结合,使得竹子纤维素的利用变得非常困难。

在以木质素为原料的工业生产中,大部分都需要将原料中的木质素尽可能地降解<sup>[7]</sup>。例如,生物乙醇的生产需要通过预处理尽可能地去除原料中的木质素,否则残留的木质素会严重影响后续纤维素的酶解过程<sup>[8]</sup>,因此木质素的降解是有效利用纤维素资源的先决条件<sup>[9-10]</sup>。木质素是一种结构复杂的芳香族聚合物,因此难以被降解<sup>[11]</sup>。目前处理木质素的传统方法有高温高压等物理法和酸碱处理、有机溶剂处理等化学法,这些方法的弊端在于能耗高、设备要求严格且会污染环境<sup>[12-14]</sup>。相较于物理、化学法,生物法降解木质素具有能耗低、反应条件温和且对环境非常友好的优势<sup>[14]</sup>。自然界中部分真菌、细菌和放线菌等微生物能够参与木质素的降解,它们通过分泌木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)、锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP)、漆酶(laccase, Lac)、多功能过氧化物酶(versatile peroxidase, VP)等与木质素结合形成木质素苯氧自由基从而降解木质素<sup>[15]</sup>,在已有的报道中,真菌降解木质素的研究相对更早并且更加广泛<sup>[16]</sup>,然而真菌的生长对环境和温度非常敏感,不适用于大规模的工业生产。与真菌相比,细菌具有更强的pH耐受性,生长温度的适应性<sup>[17]</sup>,此外,在进行基因工程改造时更加易于操作<sup>[18]</sup>,因此利用细菌降解木质素在生物质资源的工业生产中具有广阔的前景,如Luo等<sup>[19]</sup>探究了长足大竹象肠道菌群降解竹笋木质素的能力。然而,目前国内外关于专一降解竹子木质素的细菌报道很

少,生产上特别是竹浆造纸厂在生物制浆时也缺乏专门的竹木质素降解菌株,因此挖掘专门针对竹材的木质素降解细菌具有十分重要的意义。

本研究旨在从竹林中筛选分离出木质素降解能力强且纤维素降解能力较弱的细菌,优化其最佳生长条件,测定木质素降解酶、滤纸酶(filter paper activity, FPA)和木聚糖酶(xylanase, Xyl)的活性,并进一步探究目标菌株降解竹粉和碱性木质素的效果。为纤维素资源的工业生产提供一定的理论基础及可替代菌株。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 样品

采自四川省绵阳市北川羌族自治县羌王竹海(104.433 928°E, 31.745 489°N)和四川省绵阳市涪城区西南科技大学校园竹林(104.695 361°E, 31.535 004°N),采样当天温度为23℃,采集腐朽的竹子及周边土样,用冰盒装回实验室进行菌株的分离筛选。

#### 1.1.2 培养基

LB培养基(g/L):蛋白胨10.0, NaCl 10.0, 酵母提取物5.0, pH自然。

初筛培养基(g/L): NaCl 0.5, MgSO<sub>4</sub> 0.5, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0, 碱木质素5.0, pH自然。

马铃薯葡萄糖肉汤培养基(potato dextrose broth, PDB)培养基(g/L):马铃薯提取物4.0, 葡萄糖20.0, pH自然。

苯胺蓝培养基:在PDB培养基中加入0.1 g/L苯胺蓝染料, pH自然。

羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na)培养基(g/L): CMC-Na 15.0, 蛋白胨2.0, 酵母提取物1.0, NaCl 1.0, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2, pH自然。以上固体培养基均加

入 20.0 琼脂。

液体产酶培养基(g/L):  $\text{NaNO}_3$  2.5,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1.0,  $\text{NaCl}$  1.0,  $\text{CaCl}_2$  0.5,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2.0,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.15,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, 竹粉 20.0, pH 自然。

碱木质素降解培养基(g/L): 碱木质素 3.0,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.0,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.0,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5,  $\text{CaCl}_2$  0.1,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  0.15,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.05, 蛋白胨 2.0, pH 自然。

竹粉降解培养基(g/L): 在液体产酶培养基的基础上加入 50.0 竹粉。

### 1.1.3 主要试剂和仪器

刚果红和 3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS), 国药集团化学试剂有限公司; 苯胺蓝、2,2'-联氨-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐[2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid ammonium salt), ABTS]、2,6-二甲基苯酚和藜芦醇、细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司。

全温振荡器, 江苏金怡仪器科技有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海尤尼柯仪器有限公司; 中药粉碎机, 上海淀久中药机械制造有限公司; 傅里叶变换红外光谱仪, PerkinElmer 公司; X 射线衍射仪, 马尔文帕纳科公司; 钨灯丝扫描电镜, Zeiss 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 木质素降解菌的筛选

将采集到的腐烂竹子样品剪碎, 取 5 g 置于装有 100 mL 无菌水的锥形瓶中, 30 °C、160 r/min 振荡富集 2 h, 富集完成后静置 30 min, 随后使用平板稀释涂布法按  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$  这 6 个浓度梯度涂布于初筛培养基, 30 °C 培养 48 h, 挑取单菌落转接到 LB 固体培养基中进行划线纯化, 纯化 3-4 次即为纯菌株, 保存在 4 °C 备用。

复筛: 将已纯化的菌株分别点接种至苯胺蓝培养基和 CMC-Na 培养基中, 30 °C 培养 2 d, 并观察苯胺蓝褪色情况, CMC-Na 培养基培养 2 d 后, 用 1 mg/mL 刚果红溶液染色 30 min, 随后用蒸馏水漂洗, 再用 1 mol/L NaCl 脱色 30 min, 观察刚果红褪色情况。筛选出苯胺蓝褪色圈最大, 刚果红褪色圈最小的菌株保藏备用。

### 1.2.2 菌株 16S rRNA 基因鉴定

用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的基因组 DNA, 利用 16S rRNA 基因扩增通用引物 27F (5'-AGAGTTTGTATCCTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(25  $\mu\text{L}$ ): Taq DNA Master Mix 12.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ ) 各 1  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应条件: 94 °C 3 min; 94 °C 45 s, 58 °C 45 s, 72 °C 2 min, 30 个循环; 72 °C 10 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后送至杭州研趣信息技术有限公司完成测序, 所得序列通过 GenBank 数据库进行同源性比对, 利用 MEGA 6.0 构建系统发育树。

### 1.2.3 菌株最适生长条件

将菌株接入 LB 液体培养基中 30 °C、160 r/min 培养过夜活化, 培养至  $OD_{600}$  为 0.6 作为种子液。

最适生长温度的测定: 取同一时期的种子液按 5% 的接种量接入 LB 培养基中, 在不同温度(10、15、20、25、30、35、40、45 °C)的培养箱中 160 r/min 培养 24 h, 分别测定每个温度下菌株的  $OD_{600}$ , 从而获得菌株最适生长温度。

最适生长 pH 的测定: 取同一时期的种子液按 5% 的接种量接入不同 pH 的 LB 培养基中, 分别调节 pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0, 在最适温度和转速为 160 r/min 的条件下培养 24 h, 分别测定每个 pH 条件下菌株的  $OD_{600}$ , 从而得到菌株最适生长 pH。

### 1.2.4 液体产酶实验

将种子液按 5%接种量转接至液体产酶培养基,每 2 d 取一次样,8 000 r/min 离心 15 min,上清液即为粗酶液,用于测定 MnP、LiP、Lac、FPA 和 Xyl 的酶活性。

Lac、MnP 和 LiP 的活性分别用 ABTS 法、2,6-二甲基苯酚法和藜芦醇法进行测定<sup>[20-23]</sup>。Lac 酶活定义:1 L 菌液每 1 min 氧化 1  $\mu\text{mol}$  底物 ABTS 所需的酶量为 1 个酶活力单位;MnP 酶活定义:1 L 菌液每 1 min 氧化 1  $\mu\text{mol}$  底物 2,6-二甲基苯酚所需的酶量为 1 个酶活力单位;LiP 酶活定义:1 L 菌液每 1 min 氧化 1  $\mu\text{mol}$  藜芦醇所需的酶量为 1 个酶活力单位。

FPA 的活性以滤纸为底物,用 DNS 比色法进行测定,将 1 min 内水解生成 1  $\mu\text{mol}$  还原糖所消耗的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)<sup>[24]</sup>。Xyl 的活性以木聚糖为底物,采用 DNS 比色法,将 1 min 内水解生成 1  $\mu\text{mol}$  木糖所消耗的酶量定义为 1 个酶活力单位(U)<sup>[25]</sup>。

### 1.2.5 碱木质素降解率的测定

用蒸馏水配制一组浓度为 10、20、30、40、50 mg/L 的碱木质素溶液,使用紫外分光光度计在 280 nm 处测定相对应的吸光度值,以木质素浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标绘制标准曲线。将菌株种子液按 5%的接种量接入碱木质素降解培养基中,30  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 培养 7 d,每 24 h 取培养液,8 000 r/min 离心 15 min,取上清液测定  $OD_{280}$ ,重复 3 次,将  $OD_{280}$  值代入标准曲线计算碱木质素降解率。

### 1.2.6 菌株处理竹子前后表征分析

竹子经粉碎机粉碎,过 80 目筛,将菌株种子液按 10%的接种量接入竹粉降解培养基中,以未接菌的培养基为对照,30  $^{\circ}\text{C}$ 、160 r/min 处理 60 d 后用蒸馏水冲洗掉附着的菌体并 60  $^{\circ}\text{C}$  烘干保存,用于表征分析。

傅里叶变换红外光谱(Fourier transform

infrared spectroscopy, FTIR)分析:将烘干后的竹粉样品置于玛瑙研钵中,与溴化钾以 1:100 的比例研磨混匀,取适量粉末进行压片,压片成形后置于傅里叶变换红外光谱仪的检测台上,扫描范围为 400–4 000  $\text{cm}^{-1}$ 。X-射线衍射(X-ray diffraction, XRD)分析:将烘干后的竹粉样品均匀地倒入制样框的窗口中,使粉末在窗口内均匀摊开,然后用小抹刀把粉末轻轻压紧,并将多余的粉末削去得到一个平整的表面进行 XRD 测试,2 $\theta$  扫描范围为 5 $^{\circ}$ –50 $^{\circ}$ ,扫描速度 2 $^{\circ}$ /min,工作电压 45 kV,工作电流 50 mA。结晶度计算公式:  $\text{CrI}(\%) = [(I_{002} - I_{\text{amorphous}}) / I_{002}] \times 100$ ,其中 CrI 为结晶度指数;  $I_{002}$  为纤维素结晶部分(2 $\theta$ =22.2 $^{\circ}$ )的峰强度;  $I_{\text{am}}$  为无定形区(2 $\theta$ =18.0 $^{\circ}$ )的强度<sup>[26]</sup>。扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)分析:将烘干后的竹粉样品用导电胶带固定在扫描电镜样品台,真空喷金后利用钨灯丝扫描电镜观察竹粉表面形态的微观变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 木质素降解菌的分离纯化与鉴定结果

#### 2.1.1 木质素降解菌的分离纯化

通过腐烂的竹材样品筛选分离出 48 株能够在碱木质素培养基中生长的菌株。利用苯胺蓝和刚果红平板脱色法复筛出 4 株出现明显苯胺蓝褪色圈并且刚果红褪色圈不明显的菌株,分别命名为 XKG2、XKG3、XKG6、XKL8。如图 1 所示,菌株 XKG6 的苯胺蓝褪色圈最大,脱色效果最好,初步说明菌株 XKG6 降解木质素的能力最强,刚果红褪色圈很小,说明菌株 XKG6 降解纤维素的能力较弱。

#### 2.1.2 菌株 XKG6 的菌种鉴定结果

将菌株 XKG6 的 16S rRNA 基因序列在 GenBank 中进行同源性比对,结果显示与食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)相似度超过 99%,利用 MEGA 6.0 构建系统发育树(图 2),

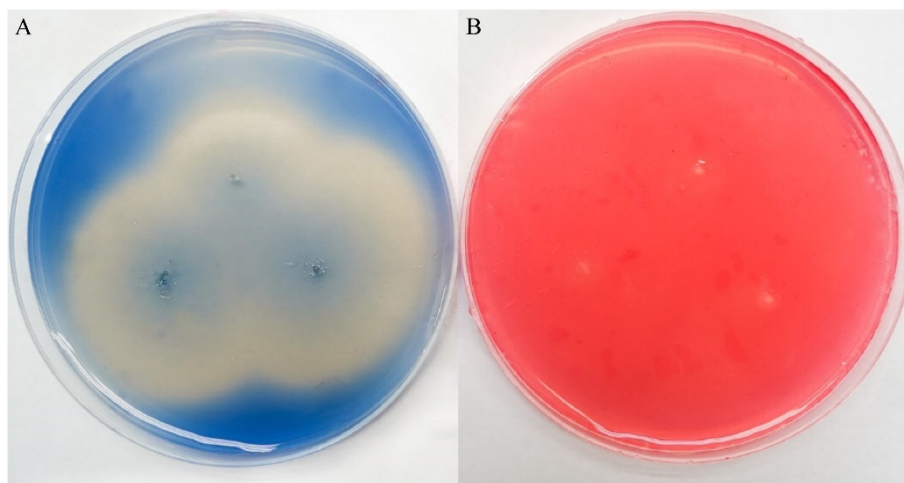


图 1 菌株 XKG6 在不同培养基上的褪色情况 A: 苯胺蓝褪色圈. B: 刚果红褪色圈

Figure 1 Decolorization zone of strain XKG6 on different culture media. A: Aniline blue. B: Congo red.

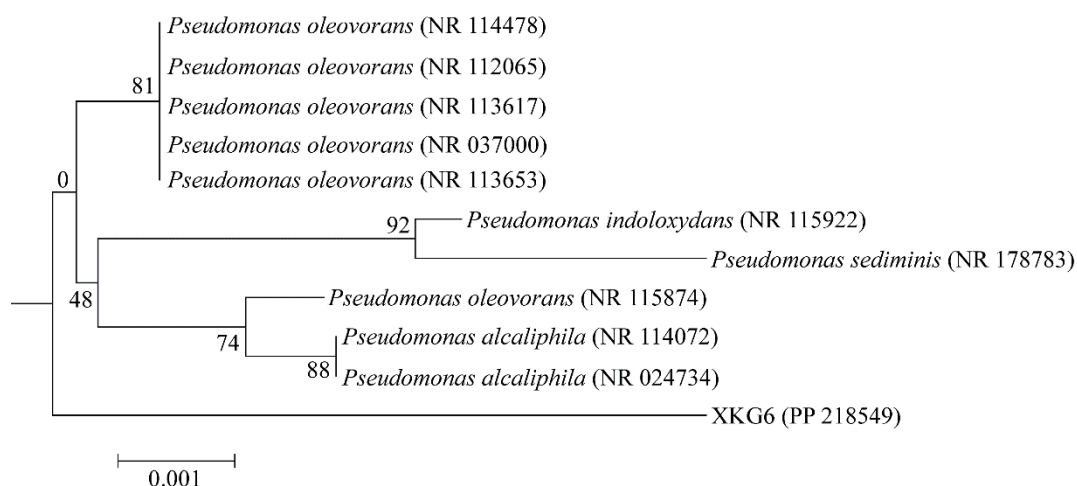


图 2 基于菌株 XKG6 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号中的序号为菌株的 GenBank 登录号; 标尺 0.001 代表序列偏差值; 分支点上的数字代表计算 1 000 次聚类到一起的几率

Figure 2 The phylogenetic tree constructed based on the 16S rRNA gene sequence of the strain XKG6. The serial number in brackets is the GenBank accession number of the strain, and the value of 0.001 represents the sequence deviation value. The number at the node means the percentage of occurrence in 1 000 boot-strapped trees.

结合形态学特征, 初步确定菌株 XKG6 为食油假单胞菌(*Pseudomonas oleovorans*)。

## 2.2 菌株的最适生长 pH 和温度

为了探究菌株 XKG6 的最适生长条件, 在不同的 pH 和温度条件下对其进行培养, 通过测定  $OD_{600}$  判断其生长情况。由图 3A 可知, 菌株

XKG6 的最适生长 pH 值为 5.0–10.0, 其中 pH 值为 7.0 时菌株生长的最好。当 pH 值分别为 4.0 和 11.0 时, 环境过酸或过碱, 导致菌株几乎无法正常生长。由图 3B 可知, 其最适生长温度为 20 °C, 当温度低于 15 °C 时, 菌株生长较为缓慢, 当温度高于 40 °C 时, 菌株几乎无法正常生长。

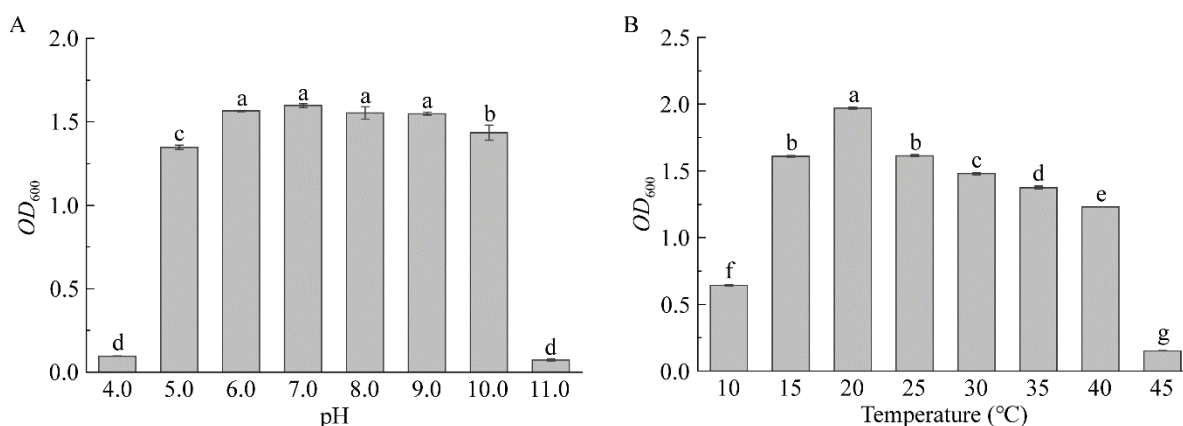


图3 菌株 XKG6 生长的最适 pH (A)和最适温度(B) 不同小写字母表示处理间差异显著( $P < 0.05$ )

Figure 3 Optimal pH (A) and optimal temperature (B) for the growth of strain XKG6. The different lowercase letters indicate significant differences among treatments ( $P < 0.05$ ).

## 2.3 菌株 XKG6 产酶活性测定结果

筛选出的菌株 XKG6 具有较高的木质素降解酶活性,能够分泌 Lac、LiP 和 MnP,结果如图 4 所示,这 3 种木质素酶的活性都是呈现先上升后下降的趋势,MnP 和 LiP 活性均在第 8 天达到最大,分别为 826.41 U/L 和 6 229.32 U/L,Lac 活性在第 10 天达到最大为 1 543.21 U/L。除此之外,菌株 XKG6 也能分泌一些纤维素酶和木聚糖酶,但相对来说活性较低,测得 FPA 活性在第 10 天达到最大为 2 602.1 U/L,Xyl 活性在第 8 天达到最大为 1 889.25 U/L。

## 2.4 菌株 XKG6 降解碱木质素结果

为了探究菌株 XKG6 降解木质素的情况,将菌株 XKG6 种子液按 5%的接种量接入碱木质素液体培养基中测定碱木质素的降解率。结果如图 5 所示,第 0 天处理的碱木质素浓度为 222.65 mg/L,经过接菌处理的碱木质素随着降解时间的延长,碱木质素浓度发生了变化,前 3 天下降趋势明显,在第 3 天时达到 198.67 mg/L,此时碱木质素的降解率达到 10.77%,之后碱木质素浓度及降解率变化逐渐缓慢,7 d 后的碱木

质素降解率为 14.04%。

## 2.5 竹子降解前后的表征分析

### 2.5.1 FTIR 分析结果

通过傅里叶变换红外光谱对竹子降解前后的分子结构和化学键进行分析,探究其变化情况。结果如图 6 所示,其中  $1\,735\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰属于 C=O 伸缩振动, $1\,513\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰是木质素中苯环骨架特征峰, $1\,164\text{ cm}^{-1}$  可能与纤维素中的 C-O-C 伸缩振动有关,也可能与木质素中的芳香环上的 C-O 伸缩振动有关, $1\,035\text{ cm}^{-1}$  处的吸收峰与芳香环上的 C-H 振动有关<sup>[27]</sup>。菌株处理后的竹子样品在  $1\,035$ 、 $1\,164$ 、 $1\,513$  及  $1\,735\text{ cm}^{-1}$  这几处吸收峰减弱,说明木质素中芳香环开环,侧链断裂,木质素结构受到破坏。

### 2.5.2 XRD 分析结果

竹子样品处理前后的 XRD 分析如图 7 所示。(002)晶面( $2\theta=22.2^\circ$ )的峰强度代表结晶纤维素,而非晶相的峰强度出现在  $2\theta=18^\circ$  处。经过计算,竹子在菌株处理前的结晶度为 57.92%,处理后的结晶度为 63.24%,XRD 分析表明,竹子通过菌株 XKG6 处理后结晶度增加了 5.32%。



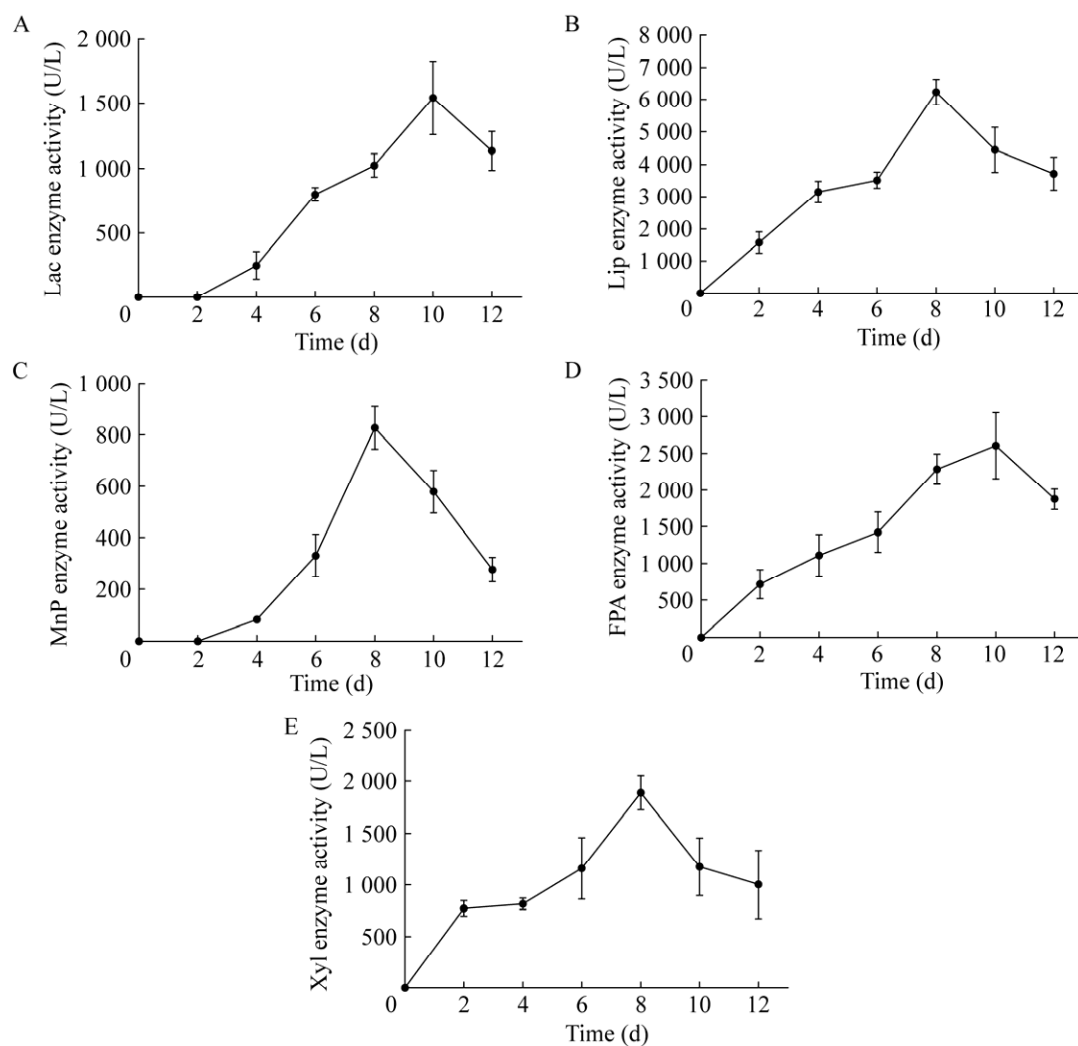


图 4 菌株 XKG6 液体发酵 12 d 内的酶活变化

Figure 4 Changes in enzyme activity within 12 days of liquid fermentation of strain XKG6.

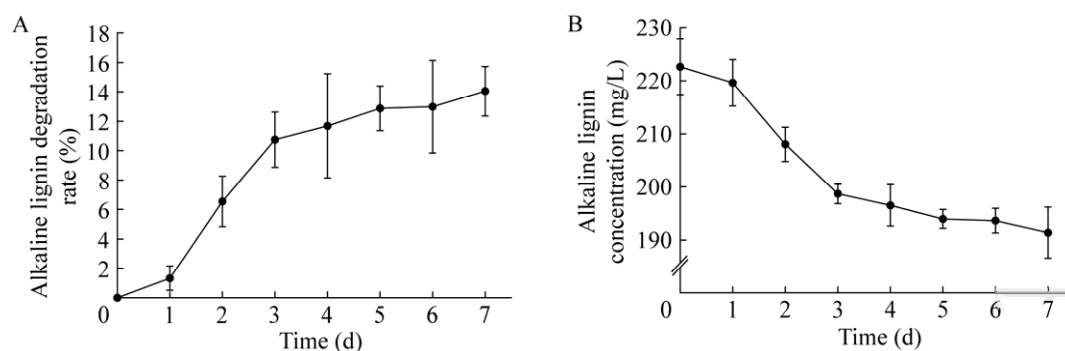


图 5 碱木质素经菌株 XKG6 处理后降解率(A)和含量(B)的变化

Figure 5 Changes in the degradation rate (A) and content (B) of alkaline lignin after treatment by the strain XKG6.



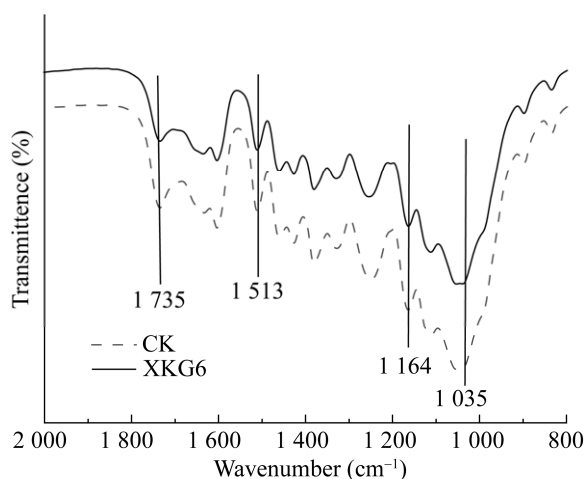


图 6 竹子降解前后的傅里叶变换红外光谱图  
CK: 处理前; XKG6: 处理后

Figure 6 Fourier transform infrared spectroscopy graphs before and after bamboo degradation. CK: Before treatment; XKG6: After treatment.

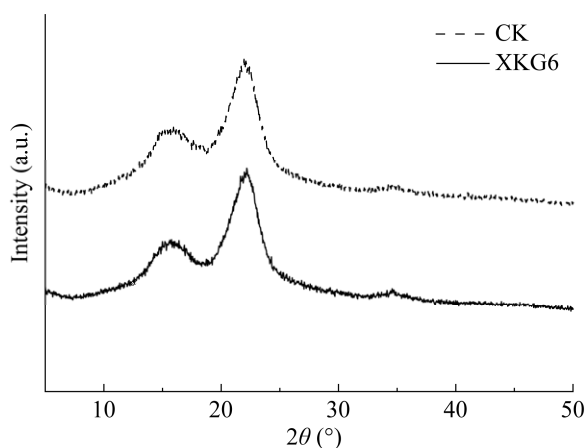


图 7 竹子降解前后的 XRD 图谱 CK: 处理前;  
XKG6: 处理后

Figure 7 XRD patterns before and after bamboo degradation. CK: Before treatment; XKG6: After treatment.

### 2.5.3 SEM 分析结果

竹子处理前后的 SEM 结果如图 8 所示, 可以看出未处理的竹子表面光滑, 结构致密完整, 未遭到破坏。相比之下, 处理后的大部分竹子表面变得粗糙、不平坦, 碎裂成许多细小的结

构, 并产生了许多微小的孔洞, 竹子结构明显遭到破坏。

## 3 讨论与结论

竹子中的纤维素是非常重要的生物质原料, 既可以用于造纸也可以进行生物精炼生产能源, 但利用竹子纤维素的前提是尽可能地除去与之结合的木质素。木质素结构复杂难以被解聚, 并且竹子结构致密, 木质素与纤维素结合更加紧密, 使得竹子纤维素的利用变得非常困难。通过微生物降解木质素是一种绿色环保的具有前景的预处理方法。然而, 目前的研究大多集中在各种秸秆的预处理, 微生物降解竹材木质素的研究很少被报道。本研究从竹林中筛选出一株木质素降解能力强, 纤维素降解能力弱的细菌 XKG6, 通过测序分析确定菌株 XKG6 为食油假单胞菌。目前已经发现有多种细菌能够降解木质素。例如, 买尔哈巴·艾合买提等<sup>[28]</sup>从羊、牛、骆驼的瘤胃液中分离出 10 株具有木质素降解能力的苍白杆菌(*Ochrobactrum*)。一些芽孢杆菌, 如解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) SL-7<sup>[29]</sup>、弯曲芽孢杆菌(*Bacillus flexus*) RMWW II<sup>[30]</sup>和嗜木质素芽孢杆菌(*Bacillus ligniniphilus*) L1<sup>[31]</sup>, 也被报道具有降解木质素的能力。此外, 研究发现假单胞菌属(*Pseudomonas*)可以分泌氧化酶来解聚高分子木质素并分解部分低分子芳香族化合物<sup>[32]</sup>, 可能是木质素降解的重要微生物。

木质素的降解主要依靠一系列酶的作用, 如 Lac、LiP 和 MnP<sup>[33-36]</sup>。这些酶的作用机制是大分子与小分子进行反应, 然后形成高活性中间体与木质素反应并降解木质素。最后, 木质素结构中的化学键断裂。例如, Lac 是一种铜氧化酶, 它们氧化木质素的酚羟基, 破坏芳香环的内部稳定性, LiP 和 MnP 都是含铁离子的

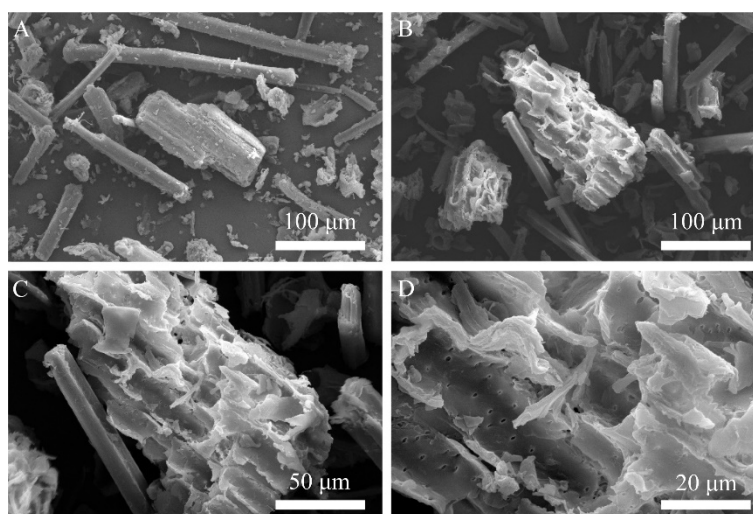


图 8 竹子降解前后的 SEM 图 A: 竹子处理前. B-D: 竹子处理 60 d 后

Figure 8 SEM diagram before and after bamboo degradation. A: Before bamboo treatment. B, C and D: After 60 days of bamboo treatment.

酶, LiP 可以降解含酚羟基的芳香环, 而 MnP 可以去除酚羟基上的甲基, 促进进一步的降解, 直至形成最终的小分子降解产物, 如甲烷和二氧化碳等<sup>[37]</sup>。本研究分离筛选出的食油假单胞菌 XKG6 不仅能产生 Lac 和 MnP, 还能产生高活性的 LiP, 与 Mei 等<sup>[29]</sup>分离的解淀粉芽孢杆菌 SL-7 相比, 菌株 XKG6 的 Lac 峰值是 SL-7 的 20 倍, LiP 峰值是 SL-7 的 14 倍, MnP 峰值是 SL-7 的 3 倍。Luo 等<sup>[19]</sup>探究了长足大竹象肠道菌群降解竹笋的能力, 其 LiP 峰值约为 2 250 U/L, 低于菌株 XKG6。此外, 为了进一步了解菌株 XKG6 降解木质素的能力, 连续 7 d 测定菌株 XKG6 的碱木质素降解率, 经过接菌处理的碱木质素随着时间的增加, 碱木质素含量逐渐降低, 在 7 d 时碱木质素减少了 14.04%。据 Luo 等<sup>[38]</sup>所报道的真菌 *Phanerochaete chrysosporium* 和 *Irpex lacteus* CD2 在 7 d 内碱木质素降解率分别为 6.7% 和 16.6%, 菌株 XKG6 的降解效果与真菌相当。在降解前 3 天下降趋势较明显, 随后逐渐变缓, 可能是在降解后期产生了不利于菌株生长的代谢废物等。竹子经菌株 XKG6 处理前后的 SEM 图像形成鲜

明对比, 经过菌株处理后的样品表面变得粗糙并出现孔洞, 这是由于受到了木质素降解酶的破坏<sup>[39]</sup>, 通过 XRD 测定分析, 结晶度增加的原因可能是菌株 XKG6 降解了竹子中的木质素和非纤维素多糖, 破坏了纤维素的无定形区域, 导致了纤维素的相对含量增加。这与 Zhang 等<sup>[40]</sup>利用微生物处理玉米秸秆后纤维素结晶度增加结果一致。结合傅里叶变换红外光谱中主要吸收峰的降低可知, 菌株 XKG6 产生的木质素降解酶主要破坏了竹木质素的关键化学键, 导致木质素中苯环结构的开环及化学键的断裂, 促进了木质素的降解。此外, 本研究中用于微生物降解的竹粉是经过 80 目筛的, 实际上, 竹粉颗粒的大小对其降解效果有很大的影响, 因此, 如何选择适合大小的竹粉颗粒有待进一步的研究。

综上所述, 本研究分离筛选的菌株 XKG6 具有较强的木质素降解能力及较弱的纤维素降解能力, 使其在降解木质素的同时能够保留大量的纤维素。由于竹子结构致密, 生物降解比较困难, 目前已经报道的竹子木质素降解菌主要集中在真菌上, 有关细菌降解竹子木质素的研究鲜有

报道。与其他已经报道的木质素降解细菌相比,菌株 XKG6 分泌木质素降解酶的能力很强,同时对竹子木质素具有较好的降解效果,为竹材纤维素资源的利用提供了潜在的微生物资源。

## REFERENCES

- [1] ABBASI KR, SHAHBAZ M, ZHANG JJ, IRFAN M, ALVARADO R. Analyze the environmental sustainability factors of China: the role of fossil fuel energy and renewable energy[J]. *Renewable Energy*, 2022, 187: 390-402.
- [2] de JONG E, JUNGMEIER G. Biorefinery concepts in comparison to petrochemical refineries[M]//*Industrial Biorefineries & White Biotechnology*. Amsterdam: Elsevier, 2015: 3-33.
- [3] 张齐生. 竹类资源加工及其利用前景无限[J]. *中国林业产业*, 2007(3): 22-24.
- ZHANG QS. The processing and utilization of bamboo resources have unlimited prospects[J]. *China Forestry Industry*, 2007(3): 22-24 (in Chinese).
- [4] ZHANG HY, HAN LJ, DONG HM. An insight to pretreatment, enzyme adsorption and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: Experimental and modeling studies[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2021, 140: 110758.
- [5] GULERIA A, KUMARI G, SARAVANAMURUGAN S. Cellulose valorization to potential platform chemicals[M]//*Biomass, Biofuels, Biochemicals*. Amsterdam: Elsevier, 2020: 433-457.
- [6] GUNNY AAN, ARBAIN D, EDWIN GUMBA R, JONG BC, JAMAL P. Potential halophilic cellulases for *in situ* enzymatic saccharification of ionic liquids pretreated lignocelluloses[J]. *Bioresource Technology*, 2014, 155: 177-181.
- [7] SUN ZH, FRIDRICH B, de SANTI A, ELANGOVAN S, BARTA K. Bright side of lignin depolymerization: toward new platform chemicals[J]. *Chemical Reviews*, 2018, 118(2): 614-678.
- [8] ZHAO B, HU SL. Promotional effects of water-soluble extractives on bamboo cellulose enzymolysis[J]. *BioResources*, 2019, 14(3): 5109-5120.
- [9] BILAL M, ASGHER M, IQBAL HMN, HU HB, ZHANG XH. Biotransformation of lignocellulosic materials into value-added products: a review[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 98: 447-458.
- [10] BILAL M, ASGHER M, IQBAL HMN, HU HB, ZHANG XH. Delignification and fruit juice clarification properties of alginate-chitosan-immobilized ligninolytic cocktail[J]. *LWT*, 2017, 80: 348-354.
- [11] BILAL M, IQBAL HMN, HU HB, WANG W, ZHANG XH. Metabolic engineering and enzyme-mediated processing: a biotechnological venture towards biofuel production: a review[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2018, 82: 436-447.
- [12] WANG W, YUAN TQ, WANG K, CUI BK, DAI YC. Combination of biological pretreatment with liquid hot water pretreatment to enhance enzymatic hydrolysis of *Populus tomentosa*[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 107: 282-286.
- [13] WANG P, CHANG J, YIN QQ, WANG EZ, ZHU Q, SONG AD, LU FS. Effects of thermo-chemical pretreatment plus microbial fermentation and enzymatic hydrolysis on saccharification and lignocellulose degradation of corn straw[J]. *Bioresource Technology*, 2015, 194: 165-171.
- [14] YU J, ZHANG JB, HE J, LIU ZD, YU ZN. Combinations of mild physical or chemical pretreatment with biological pretreatment for enzymatic hydrolysis of rice hull[J]. *Bioresource Technology*, 2009, 100(2): 903-908.
- [15] MARTÍNEZ AT, CAMARERO S, RUIZ-DUEÑAS FJ, MARTÍNEZ MJ. Chapter 8: Biological Lignin Degradation[M]//*Energy and Environment Series*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2018: 199-225.
- [16] 王垚, 韩燕峰, 梁宗琦. 两株戴氏霉对水稻秸秆的降解及产酶研究[J]. *菌物学报*, 2017, 36(5): 598-603.
- WANG Y, HAN YF, LIANG ZQ. Rice straw degradation and enzyme production of two *Taifanglania* strains[J]. *Mycosystema*, 2017, 36(5): 598-603 (in Chinese).
- [17] VENTORINO V, ALIBERTI A, FARACO V, ROBERTIELLO A, GIACOBBE S, ERCOLINI D, AMORE A, FAGNANO M, PEPE O. Exploring the microbiota dynamics related to vegetable biomasses degradation and study of lignocellulose-degrading bacteria for industrial biotechnological application[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8161.
- [18] SUMAN SK, DHAWARIA M, TRIPATHI D, RATURI V, ADHIKARI DK, KANAUIA PK. Investigation of lignin biodegradation by *Trabulsella* sp. isolated from termite gut[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2016, 112: 12-17.
- [19] LUO CB, LI YQ, CHEN Y, FU C, LONG WC, XIAO XM, LIAO H, YANG YJ. Bamboo lignocellulose degradation by gut symbiotic microbiota of the bamboo snout beetle *Cyrtotrachelus buqueti*[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2019, 12: 70.
- [20] CHEN Y, WANG YY, XU Z, LIU YY, DUAN HP.

- Enhanced humification of maize straw and canola residue during composting by inoculating *Phanerochaete chrysosporium* in the cooling period[J]. *Bioresource Technology*, 2019, 293: 122075.
- [21] KAPICH AN, PRIOR BA, BOTHA A, GALKIN S, LUNDELL T, HATAKKA A. Effect of lignocellulose-containing substrates on production of ligninolytic peroxidases in submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium* ME-446[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 34(2): 187-195.
- [22] NILADEVI KN, JACOB N, PREMA P. Evidence for a halotolerant-alkaline laccase in *Streptomyces psammoticus*: purification and characterization[J]. *Process Biochemistry*, 2008, 43(6): 654-660.
- [23] TIEN M, KIRK TK. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *Methods in Enzymology*, 1988, 161: 238-249.
- [24] GHOSE TK. Measurement of cellulase activities[J]. *Pure and Applied Chemistry*, 1987, 59(2): 257-268.
- [25] MCCLEARY BV, MCGEOUGH P. A comparison of polysaccharide substrates and reducing sugar methods for the measurement of endo-1,4- $\beta$ -xylanase[J]. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2015, 177(5): 1152-1163.
- [26] SEGAL L, CREELY JJ, MARTIN JR AE, CONRAD CM. An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer[J]. *Textile Research Journal*, 1959, 29(10): 786-794.
- [27] PANDEY KK, PITMAN AJ. FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2003, 52(3): 151-160.
- [28] 买尔哈巴·艾合买提, 樊振, 李越中, 古丽斯玛依·艾拜都拉, 乌斯满·依米提. 瘤胃中纤维素分解菌的分离、鉴定及其产酶条件的优化[J]. *微生物学报*, 2013, 53(5): 470-477.
- AIHEMAITI M, FAN Z, LI YZ, AIBAIDOU LA G, YIMIT W. Isolation and identification of rumen bacteria for cellulolytic enzyme production[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2013, 53(5): 470-477 (in Chinese).
- [29] 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.
- [30] KUMAR A, PRIYADARSHINEE R, SINGHA S, SENGUPTA B, ROY A, DASGUPTA D, MANDAL T. Biodegradation of alkali lignin by *Bacillus flexus* RMWW II: analyzing performance for abatement of rice mill wastewater[J]. *Water Science and Technology*, 2019, 80(9): 1623-1632.
- [31] ZHU DC, ZHANG PP, XIE CX, ZHANG WM, SUN JZ, QIAN WJ, YANG B. Biodegradation of alkaline lignin by *Bacillus ligniniphilus* L1[J]. *Biotechnology for Biofuels*, 2017, 10: 44.
- [32] SALVACHÚA D, KARP EM, NIMLOS CT, VARDON DR, BECKHAM GT. Towards lignin consolidated bioprocessing: simultaneous lignin depolymerization and product generation by bacteria[J]. *Green Chemistry*, 2015, 17(11): 4951-4967.
- [33] CHANDRA R, RAJ A, PUROHIT HJ, KAPLEY A. Characterisation and optimisation of three potential aerobic bacterial strains for kraft lignin degradation from pulp paper waste[J]. *Chemosphere*, 2007, 67(4): 839-846.
- [34] CHEN YH, CHAI LY, TANG CJ, YANG ZH, ZHENG Y, SHI Y, ZHANG H. Kraft lignin biodegradation by *Novosphingobium* sp. B-7 and analysis of the degradation process[J]. *Bioresource Technology*, 2012, 123: 682-685.
- [35] DICK GJ, TORPEY JW, BEVERIDGE TJ, TEBO BM. Direct identification of a bacterial manganese(II) oxidase, the multicopper oxidase MnxG, from spores of several different marine *Bacillus* species[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(5): 1527-1534.
- [36] SINGH G, CAPALASH N, GOEL R, SHARMA P. A pH-stable laccase from alkali-tolerant  $\gamma$ -proteobacterium JB: purification, characterization and indigo carmine degradation[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41(6/7): 794-799.
- [37] XU R, ZHANG K, LIU P, HAN HW, ZHAO S, KAKADE A, KHAN A, DU DL, LI XK. Lignin depolymerization and utilization by bacteria[J]. *Bioresource Technology*, 2018, 269: 557-566.
- [38] LUO RH, LIAO Q, XIA A, DENG ZC, HUANG Y, ZHU XQ, ZHU X. Synergistic treatment of alkali lignin via fungal coculture for biofuel production: comparison of physicochemical properties and adsorption of enzymes used as catalysts[J]. *Frontiers in Energy Research*, 2020, 8: 575371.
- [39] SUN FH, LI J, YUAN YX, YAN ZY, LIU XF. Effect of biological pretreatment with *Trametes hirsuta* yj9 on enzymatic hydrolysis of corn stover[J]. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2011, 65(7): 931-938.
- [40] ZHANG ZC, SHAH AM, MOHAMED H, TSIKLARI N, SONG YD. Isolation and screening of microorganisms for the effective pretreatment of lignocellulosic agricultural wastes[J]. *BioMed Research International*, 2021, 2021: 5514745.