

一株耐烟碱木质素降解菌的筛选及其对烟梗的降解效果

杨苹^{1,2}, 刘京³, 周郑雄³, 王坡^{1,2}, 谢世爽³, 黄莺^{*1,2}

1 贵州大学烟草学院, 贵州 贵阳 550025

2 贵州省烟草品质研究重点实验室, 贵州 贵阳 550025

3 贵州省烟草公司遵义市公司, 贵州 遵义 563000

杨苹, 刘京, 周郑雄, 王坡, 谢世爽, 黄莺. 一株耐烟碱木质素降解菌的筛选及其对烟梗的降解效果[J]. 微生物学通报, 2024, 51(6): 2182-2192.

YANG Ping, LIU Jing, ZHOU Zhengxiong, WANG Po, XIE Shishuang, HUANG Ying. A lignin-degrading strain with nicotine tolerance: screening and the degradation effect on tobacco stems[J]. Microbiology China, 2024, 51(6): 2182-2192.

摘要: 【背景】在烟草废弃物中, 木质素是环境微生物降解烟梗或其他秸秆木质纤维素的主要屏障, 同时, 烟梗中含有的烟碱使大部分已有报道的木质素降解微生物无法生存。【目的】筛选出对烟梗降解作用较强的菌株, 为解决烟梗难降解而长时间堆积的问题和增加其工业可用性提供参考。【方法】以牛粪为材料, 采用苯胺蓝褪色法以及愈创木酚显色法进行木质素降解优势菌株的筛选, 并对降解菌进行烟碱耐受性测试, 同时验证其对烟梗的降解效果。【结果】筛选出的耐烟碱木质素优势降解菌 YP-2023-9 为肠杆菌属(*Enterobacter*)菌株, 对不超过 0.60% 的烟碱耐受, 能产生木质素过氧化物酶 Lip 和锰过氧化物酶 Mnp, 促进烟梗木质素降解, 在产酶培养基中, 分别在第 5 天和第 1 天达到最大值为 309.68 U/mL 和 21.76 U/mL。扫描电镜显示, 该菌主要促进了烟梗表面木质素和半纤维素降解, 对烟梗细胞壁有明显的破坏作用。30 °C 条件下, 接种菌株 YP-2023-9 15 d 后烟梗降解率为 42.42%, 半纤维素和木质素的相对降解率分别为 13.17% 和 33.12%。【结论】菌株 YP-2023-9 在降解烟梗和烟草废弃物方面具有很好的应用潜力。

关键词: 木质素降解菌; 烟梗; 烟碱耐受性; 降解效果

资助项目: 贵州省烟草公司遵义市公司科技项目(2022XM05)

This work was supported by the Guizhou Tobacco Company Zunyi Company Technology Project (2022XM05).

*Corresponding author. E-mail: yhung6@gzu.edu.cn

Received: 2023-11-02; Accepted: 2023-12-30; Published online: 2024-01-30

A lignin-degrading strain with nicotine tolerance: screening and the degradation effect on tobacco stems

YANG Ping^{1,2}, LIU Jing³, ZHOU Zhengxiong³, WANG Po^{1,2}, XIE Shishuang³, HUANG Ying^{*1,2}

1 College of Tobacco Science, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China

2 Key Laboratory of Tobacco Quality Research in Guizhou Province, Guiyang 550025, Guizhou, China

3 Zunyi Company, Guizhou Tobacco Company, Zunyi 563000, Guizhou, China

Abstract: **[Background]** The lignin in tobacco waste acts as a primary obstacle for environmental microorganisms to degrade lignocellulose in tobacco stems or other straw. Additionally, the nicotine in tobacco stem threatens the survival of most reported lignin-degrading microorganisms. **[Objective]** To screening the strains with strong degrading effects on tobacco stems, so as to solve the problem of long-term accumulation of tobacco stems which are difficult to degrade and enhance the industrial availability of tobacco stems. **[Methods]** The aniline blue fading method and the guaiacol assay were employed to screen out the dominant strains capable of degrading lignin from cattle manure. The nicotine tolerance of the strains was tested, and the degradation effects of the strains on tobacco stems were verified. **[Results]** The lignin-degrading strain YP-2023-9 screened belonged to *Enterobacter* and showed tolerance to nicotine with the concentration $\leq 0.60\%$. The strain produced lignin peroxidase and manganese peroxidase, thereby promoting lignin degradation in tobacco stems. The maximum levels of the two enzymes reached 309.68 U/mL on day 5 and 21.76 U/mL on day 1, respectively. Scanning electron microscopy demonstrated that the strain primarily facilitated the degradation of lignin and hemicellulose on the tobacco stem surface, causing evident damage to the cell wall structure of tobacco stems. After incubation at 30 °C for 15 days, YP-2023-9 showed a degradation rate of 42.42% against tobacco stems, with the relative degradation rates of 13.17% and 33.12% against hemicellulose and lignin, respectively. **[Conclusion]** This strain exhibits promising potential for application in the degradation of both tobacco stems and associated waste.

Keywords: lignin-degrading bacteria; tobacco stem; nicotine tolerance; degradation effect

我国是烟草的生产大国和消费大国。我国的烟草种植面积、烟草产量及销售均居世界首位。在 2015 年, 我国的烟草种植面积约为 160 万 hm^2 , 生产烟叶 220 万余 t, 伴随产生的烟梗有 120 万 $\text{t}^{[1]}$ 。烟梗是烟叶的粗硬叶脉, 占叶重的 25%–30%^[2], 是烟草工业的副产物。对于烟梗的处理, 只有少量被用于卷烟生产, 而大

部分则直接填埋或集中焚烧, 从而造成很多资源的浪费^[3-4]。目前, 以烟梗为原料制成薄片和梗丝添加到卷烟中是其主要利用途径^[5-6], 但烟梗的主要成分木质素会造成梗丝木质气重、燃烧时产生灼喉感, 这使得烟梗的利用在很多方面受到了限制^[7]。木质素由多个苯丙环结构单元在三维结构上高度偶联共聚而成, 其复杂的结构和稳

定的性质导致目前对其有效转化和利用较为有限^[8-10]。在植物细胞壁中,木质素嵌入纤维素和半纤维素结构之间,形成复杂的异质网络,限制了半纤维素降解菌和纤维素降解菌的可及性。因此,木质素是环境微生物降解烟梗或其他秸秆木质纤维素的主要屏障^[11]。与此同时,烟梗中含有的烟碱使大部分已有报道的木质素降解微生物无法生存。烟碱的含量介于 0.47%–0.71%^[12],其结构稳定,难以降解,并且具有细胞毒性,在自然界中会抑制微生物降解烟梗或烟杆的活性,甚至是杀死微生物,从而影响木质素的降解过程,增加烟草废弃物的降解难度^[13]。为了降低烟叶和烟梗中细胞壁物质含量,提升抽吸品质及使用价值,有大量研究集中于从专一性较强的酶制剂进行细胞壁物质的降解^[14-19],如利用 Fe-CA 仿酶和漆酶分别处理梗丝发现梗丝中木质素降解率分别达到 53.03%和 55.05%^[20]。同时也有研究利用微生物制剂改善烟叶或梗丝品质^[21-24],如周元清等用微生物复合菌黄抱厚毛平革菌和 *Phlebia brevispora* 的混合处理液处理烟梗后,发现对烟梗木质素含量有显著降低作用,降解率 64.7%–68.4%^[7]。到目前为止,利用微生物降解木质素是一种极具发展潜力的方法,而降解烟草废弃物的菌株报道较少,因此通过微生物途径对于烟草废弃物的利用有重要意义。

本研究以牛粪为材料筛选耐烟碱的木质素降解菌,并将其施用于烟梗进行降解效果研究,可为木质素降解机制研究提供数据支撑,为解决烟梗难降解问题和增加烟梗工业可利用性提供参考,还可丰富烟草木质素降解菌资源。

1 材料与方 法

1.1 样品

牛粪采自贵州省贵阳市息烽县流长镇。

供试烟梗为云烟 87,含烟碱 0.60%、半纤维素 15.38%、纤维素 28.33%、木质素 13.83%。

1.2 培养基

富集培养基参考文献[25]配制,另外加入碱木质素 10.0 g/L。分离培养基:NA 培养基(细菌)、马丁氏琼脂培养基(真菌)、改良高氏I号培养基(放线菌)均参考文献[26]配制。LB 培养基参考文献[27]配制。PDA 培养基参考文献[28]配制。初筛培养基:苯胺蓝培养基(细菌、放线菌:LB 固体培养基中加入 0.4 g/L 苯胺蓝;真菌:PDA 固体培养基中加入 0.4 g/L 苯胺蓝)、愈创木酚培养基(细菌、放线菌:LB 固体培养基中加入 0.4 mL 愈创木酚;真菌:PDA 固体培养基中加入 0.4 mL 愈创木酚)。产酶培养基参考文献[27]配制。烟梗固体培养基参考文献[29]配制,将烟草秸秆粉末 10.0 g 替换为烟梗粉末(过 40 目筛) 10.0 g。烟梗液体发酵培养基:烟梗粉末(过 40 目筛) 1.0 g,蒸馏水 100 mL。

1.3 主要试剂和仪器

碱性木质素,北京华迈科生物技术有限责任公司;水溶苯胺蓝和愈创木酚,天津市光复科技发展有限公司;木质素过氧化物酶(Lip)活性检测试剂盒、锰过氧化物酶(Mnp)活性检测试剂盒、漆酶(Lac)活性检测试剂盒,北京索莱宝科技有限公司;细菌基因组 DNA 提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司;1.1×T3 Super PCR Mix,北京擎科生物科技有限公司。紫外可见分光光度计,上海元析仪器有限公司;离子溅射仪和扫描电镜,株式会社日立制作所。

1.4 分离、纯化和初步筛选木质素降解菌

称取 10.0 g 牛粪加入 90 mL 经灭菌处理的含有玻璃珠的蒸馏水中,25 °C、150 r/min 振荡 1 h,并静置 5 min。然后,取 2 mL 上清液放入富集培养基中,30 °C、180 r/min 培养 3 d。根据无菌操作要求将经富集的培养液进行梯度稀释。

取 10^{-6} 、 10^{-7} 和 10^{-8} 稀释液各 0.1 mL 分别涂布于 NA 培养基上, 以实现细菌的分离。同时, 取 10^{-4} 、 10^{-5} 和 10^{-6} 稀释液各 0.1 mL 分别涂布于马丁氏琼脂培养基和改良高氏 I 号培养基上, 用于真菌和放线菌的分离。分别挑取分离纯化的细菌、真菌、放线菌单菌落接种在苯胺蓝培养基、愈创木酚培养基上, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中倒置培养 3–5 d, 观察菌株的生长情况, 根据是否有透明圈或显色圈, 获取具有产生木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶、漆酶的菌株。测量培养皿中菌落的直径、褪色圈或显色圈的直径, 并计算褪色圈或显色圈与菌落直径之间的比值。每个菌株设置 3 个重复。选择生长速度较快且褪色圈或显色圈与菌落直径比值较大的菌株进行保存备用。

1.5 木质素降解菌生长曲线的绘制

将纯化活化的单菌株接种至 LB 培养基中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 52 h。每隔 4 h 取样, 并使用紫外可见分光光度计测定其浓度(以 OD_{600} 表示), 绘制生长曲线。对于高浓度的菌悬液, 需在未接种的 LB 培养基中适当稀释后再次测定, 使其 OD_{600} 保持为 0.10–0.65。

1.6 降解菌的烟碱耐受性筛选和木质素酶活性测定

1.6.1 烟碱耐受性筛选

由于烟梗中含有一定量的烟碱, 将菌株接种在以烟梗为唯一碳源的烟梗固体培养基, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 培养 3–5 d, 观察菌株生长情况。根据菌落生长情况筛选出有较强耐烟碱的木质素降解菌。

1.6.2 木质素酶活性测定

将培养 24 h 的菌液作为种子液接种至产酶培养基中, $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养。连续 7 d 取样, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min, 上清液即为粗酶液, 酶活力测定使用木质素过氧化物酶(Lip)活性检测试剂盒、锰过氧化物酶(Mnp)活性检测试剂盒和漆酶(Lac)活性检测试剂盒。

1.7 菌株鉴定

形态学鉴定: 观察菌株的宏观特征和微观特征, 通过菌株的形态学鉴定可以初步判断菌株的属。在培养基上观察菌落的颜色、形态大小、生长速度以及表面有无光泽等情况, 并对菌株进行革兰氏染色油镜观察。

分子生物学鉴定: 采用细菌基因组 DNA 提取试剂盒提取菌株的 DNA。选用细菌 16S rRNA 基因序列通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') 进行 PCR。PCR 反应体系 (25 μL): 1.1 \times T3 Super PCR Mix 22.0 μL , 引物 27F (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , 引物 1492R (10 $\mu\text{mol/L}$) 1.0 μL , 模板 DNA 1.0 μL 。PCR 反应条件: $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min; $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 20 s, 共 32 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 2 min; $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。取 2 μL PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳检测。最终将 PCR 产物送至北京擎科生物科技有限公司进行基因序列测定, 测序结果通过 NCBI 中 BLAST 程序进行序列相似性搜索, 并利用 MEGA 11 软件构建系统发育树。

1.8 木质素降解菌的降解效果验证

将 10 mL 菌液(菌株含量 $\geq 1 \times 10^{10}$ CFU)接种于烟梗液体发酵培养基中, 以不施菌剂为对照, 即 2 个处理, 重复 3 次。在施菌液后 15 d 用 3 号砂芯漏斗过滤得到烟梗滤渣于 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干至恒重, 测定样品的失重率^[30], 采用改良的范式洗涤法测定木质纤维素各组分含量^[31]。

1.9 烟梗微形态特征观察

烟梗样品使用离子溅射仪喷金 2 min (黄金)。用扫描电镜(加速电压为 15 kV)对其表面结构进行观察^[32]。

1.10 数据分析

采用软件 SPSS statistics 26 进行数据分析, 采用 GraphPad Prism 9.5 进行相关绘图。

2 结果与分析

2.1 菌株 YP-2023-9 的鉴定结果

2.1.1 菌株 YP-2023-9 的形态学特征

菌株 YP-2023-9 在 LB 固体培养基上划线纯化, 30 °C 培养箱内培养, 24 h 后观察。在 LB 培养基上的菌落颜色为白色, 菌落直径为 0.1–0.4 cm, 约 1 d 后长出单菌落, 易挑起; LB

培养基上的菌落为圆形、光滑、隆起、湿润、有光泽、不透明(图 1A)。菌株为革兰氏阴性菌, 在油镜下观察菌体细短而密集(图 1B)。

2.1.2 菌株 YP-2023-9 的分子生物学特征

通过将菌株 YP-2023-9 的 16S rRNA 基因序列与 NCBI 数据库进行比对分析, 选取结果中相似度最高的属作为对应菌株分类标准, 并绘制了系统发育树。由图 2 可知, 菌株 YP-2023-9 的

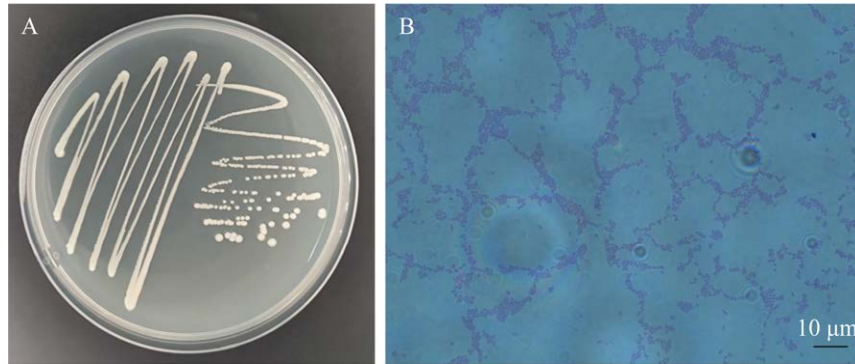


图 1 木质素分解菌 YP-2023-9 菌株形态(A)及其革兰氏染色显微形态(B)

Figure 1 Morphology and Gram staining microscopic morphology of the lignin-degrading strain YP-2023-9.

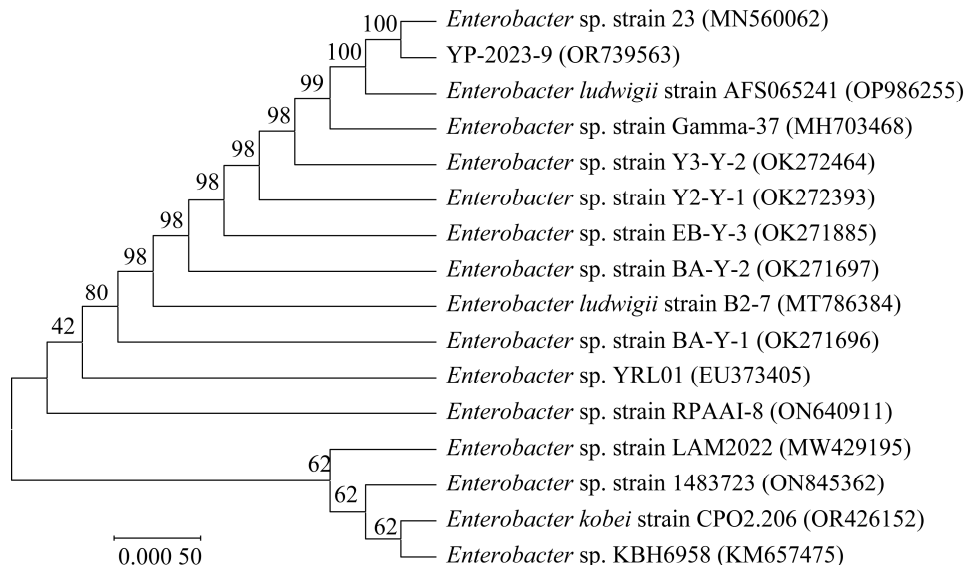


图 2 基于菌株 YP-2023-9 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内数值为 GenBank 登录号; 分支上的数值表示 bootstrap 的支持率; 标尺 0.000 50 表示序列的进化差异

Figure 2 Phylogenetic tree constructed based on the 16S rRNA gene sequence of strain YP-2023-9. The value in parentheses is the GenBank login number; The numerical values on the branch represent the support rate of bootstrap; Ruler 0.000 50 indicates evolutionary differences in sequences.

16S rRNA 基因序列与肠杆菌属菌株 *Enterobacter* sp. strain 23 相似度最高, 为 100%, 结合菌株形态学和革兰氏染色结果, 可初步判定该菌为肠杆菌属。因此鉴定菌株 YP-2023-9 为肠杆菌, 命名为 *Enterobacter* sp. YP-2023-9。

2.2 菌株 YP-2023-9 的生长

由图 3 可以看出, 菌株 YP-2023-9 在 32 h 内呈现对数生长, 32 h 时菌株的生长量达到最大, 此时 OD_{600} 为 4.92; 32 h 后 OD_{600} 下降, 生长进入稳定期。

2.3 菌株 YP-2023-9 木质素酶活和烟碱耐受性定性检测

木质素的降解主要依赖于一系列酶的协同作用, 其中包括木质素过氧化物酶(lignin peroxidases, Lip)、锰过氧化物酶(manganese peroxidases, Mnp)和漆酶(laccase, Lac)。苯胺蓝的脱色反应与 Lip 及 Mnp 的生成密切相关, 漆酶能使愈创木酚显色。经过 1 d 培养后, 菌株 YP-2023-9 对苯胺蓝有较强的脱色能力(图 4A); 而该菌培养 1 d 后对愈创木酚无显色效果(图 4B), 培养至第 5 天仍未出现显色圈, 说明该菌不能产生漆酶。在苯胺蓝培养基上, 菌体直径较大(约为 0.8 cm)且产生明显的褪色圈, D/d 值为

3.12, 可有效分解木质素。将菌接种在以烟梗(木质素含量 13.83%, 烟碱含量 0.60%)为唯一碳源的培养基上(图 4C), 培养 5 d 后菌落直径达到 1.3 cm, 证明菌株对烟梗中烟碱耐受, 可作为后续试验菌株。

2.4 菌株 YP-2023-9 Lip、Mnp 酶活定量检测

由图 5 可知, 不同培养时间对菌株的 Lip、Mnp 活性有极大影响, Lip 活性影响趋势均先上升后下降, 之后再上升后下降, Mnp 活性影响趋势从第 1 天时开始下降, 3 d 后趋于稳定。Lip 活性培养至 5 d 时达最大值, 为 309.68 U/mL; Mnp 活性培养至 1 d 时达最大值, 为 21.76 U/mL。

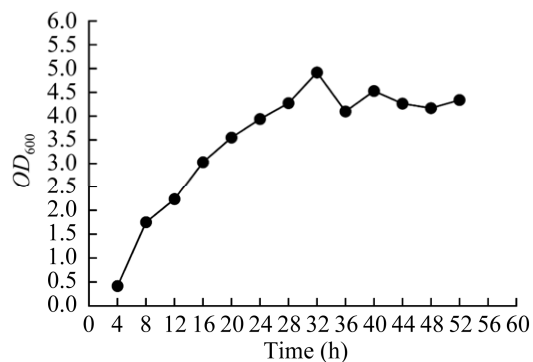


图 3 菌株 YP-2023-9 的生长曲线

Figure 3 Growth curve of strain YP-2023-9.

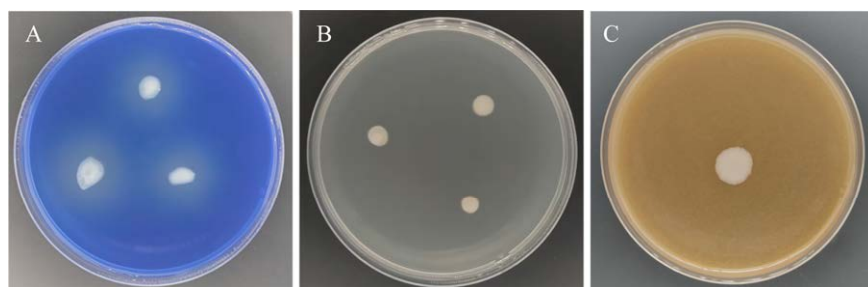


图 4 菌株 YP-2023-9 在苯胺蓝平板(A)、愈创木酚平板(B)及烟梗平板上(C)的生长情况

Figure 4 Growth of strain YP-2023-9 on aniline blue plate (A), guaiacol plate (B), and tobacco stem plate (C).

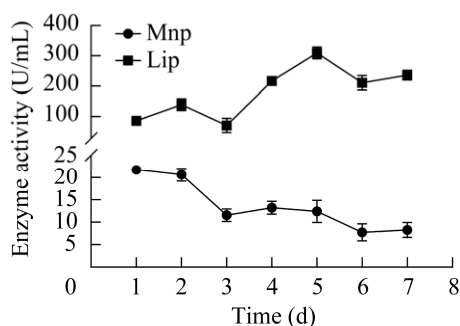


图5 不同培养时间对菌株 YP-2023-9 产酶能力的影响
Figure 5 The effect of different cultivation times on the enzyme production ability of strain YP-2023-9.

2.5 菌株对烟梗的降解效果

采用液体培养,将菌接种在以烟梗为唯一碳源的培养基上,15 d后,菌剂处理颜色由黄色变黑色,证明有明显的物质转化(图 6)。此时,其烟梗降解率显著高于对照(图 7),降解率为 42.42%,是对照的 1.12 倍;木质素含量和半纤维素均显著低于对照(图 8),其相对降解率分别为 33.12%和 13.17%;纤维素含量与对照无显著差异。

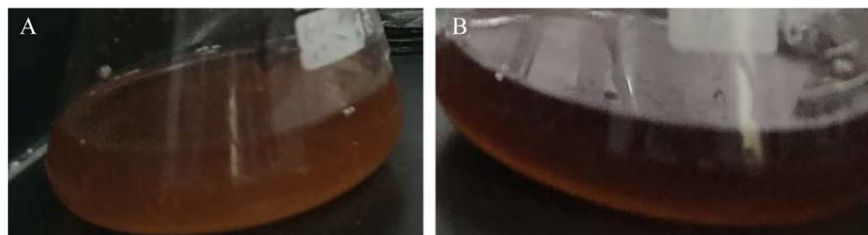


图6 15 d 后烟梗液体发酵培养基外观变化 A: 未接种菌株 YP-2023-9 培养 15 d 的烟梗液体发酵培养基. B: 接菌 YP-2023-9 培养 15 d 的烟梗液体发酵培养基

Figure 6 Appearance changes of tobacco stem liquid fermentation medium after 15 days. A: Non-inoculated strain YP-2023-9 was cultured for 15 days on the liquid fermentation medium of tobacco stem. B: Strain YP-2023-9 was inoculated into the liquid fermentation medium of tobacco stem for 15 days.

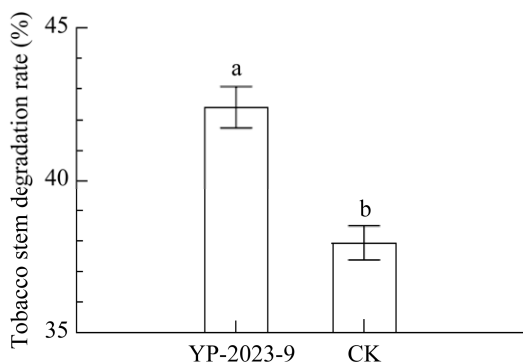


图7 菌株 YP-2023-9 处理 15 d 烟梗降解率 不同小写字母表示不同处理间烟梗降解率差异显著,下同
Figure 7 Degradation rate of tobacco stems treated with strain YP-2023-9 for 15 days. Different lowercase letters indicate significant differences in the degradation rate of tobacco stems among different treatments, the same below.

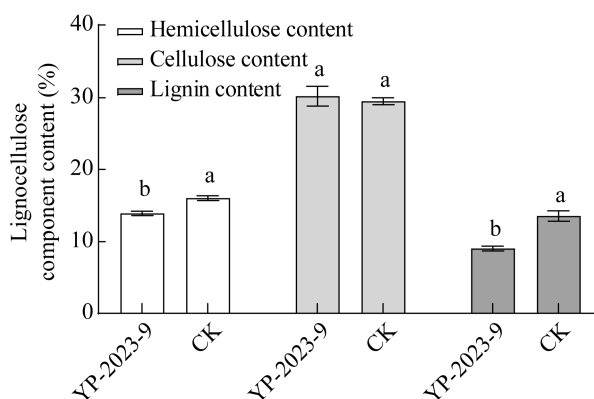


图8 菌株 YP-2023-9 处理 15 d 烟梗木质纤维素各组分含量

Figure 8 Content of lignocellulose components in tobacco stem after 15 days of treatment with strain YP-2023-9.

2.6 菌株降解烟梗后的扫描电镜分析

利用扫描电镜观察木质素降解过程中的形态变化,是目前证明木质素能否被微生物修饰或降解的重要手段之一^[33],纤维素、半纤维素、木质素和果胶等细胞壁物质是烟梗的主要组成部分,在木质纤维素的结构中,半纤维和纤维素在内部紧密交织,而木质素将二者包裹,三者共同形成植物的细胞壁^[34]。菌株 YP-2023-9 对烟梗进行固体发酵 15 d,将烟梗样品在 YP-2023-9 降解前后的形态放大相同的倍数后,可以看出原始烟梗(图 9A)结构致密且呈块状,未接种菌株处理的烟梗样品(图 9B)与原始烟梗相比,无明显变化。经菌株 YP-2023-9 处理 15 d 后的样品(图 9C),菌株 YP-2023-9 在烟梗表皮组织层良好生长,使原本因富含果胶、蜡质等不易被单一酶进行分解的表皮组织层在其作用下破坏明显,结合前面烟梗木质纤维素含量变化,证明其表面的木质素有一定程度的降解,所以出现明显的缝隙,结构明显呈疏松多孔状,有利于纤维素降解酶、半纤维素降解酶、木质素酶等渗入到烟梗组织内部。

3 讨论与结论

从牛粪中分离得到一株能高效降解烟梗木

质素的细菌 YP-2023-9,经过形态学和 16S rRNA 基因序列的系统发育树分析,该菌株属于肠杆菌属(*Enterobacter*),菌株能够耐受至少 0.60%的烟碱。目前对于 *Enterobacter* sp. 的报道,包括 58 个有效发表的种(www.bacterio.net/chryseobacterium.html),在报道的菌中,肠杆菌 K3 具有较高的木质素降解率(32.05%),对玉米、稻草的木质素降解能力较好^[35]。另外尚华蓉等从食木白蚁肠道中发现可高效利用木质素的菌株 *Enterobacter* sp. YC105C^[36]。Kamei 将云芝与肠杆菌属(*Enterobacter*)细菌联合培养,木质素降解率提高 5%左右^[37]。综上所述,肠杆菌属菌株对于木质素的降解研究较少,对于烟梗的降解研究鲜见报道,对烟碱耐受性的研究也鲜见报道。

通过酶活的定性检测,明确了细菌 YP-2023-9 主要通过分泌 Lip 或 Mnp 促使木质素降解,通过酶活性的大小及不同培养时间下酶活的变化趋势,推测菌株 YP-2023-9 在木质素降解前期,其产生的 Mnp 和 Lip 共同作用于木质素,而在降解中后期 Lip 起主要作用。菌株 YP-2023-9 破坏包裹在半纤维和纤维素表面的木质素,加速烟梗的分解。扫描电镜影像显示,菌株 YP-2023-9 接种 15 d 后能在烟梗表皮组织层良好生长,使烟梗组织结构疏松、空隙增大,细胞间连接物质

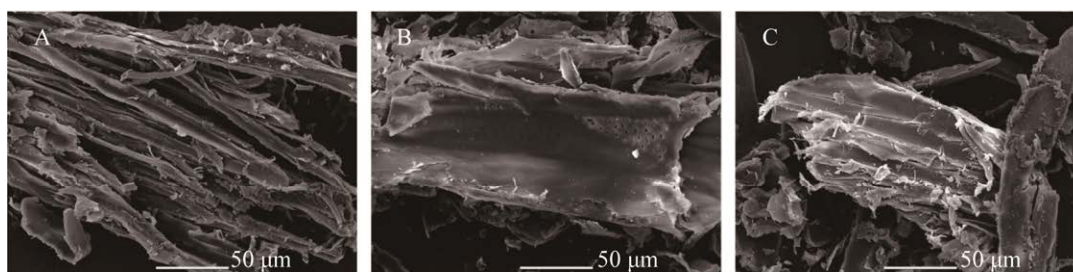


图 9 烟梗样品扫描电镜图 A: 原始烟梗. B: 未接种菌株培养 15 d 的烟梗. C: 接种菌株 YP-2023-9 培养 15 d 的烟梗

Figure 9 Scanning electron microscopy of tobacco stem samples. A: Original tobacco stem. B: Tobacco stems cultured for 15 days without inoculation of strains. C: Tobacco stems cultured with YP-2023-9 for 15 days.

和细胞壁变薄,细胞结构降解明显。烟梗木质纤维素的组分含量变化进一步说明,菌株 YP-2023-9 对木质素、半纤维素具有较高的降解效果,对纤维素影响不显著。据此可知,菌株 YP-2023-9 通过分泌 Lip 和 Mnp 促使木质素和半纤维素降解,进而破坏烟梗的细胞壁结构,从而使纤维素露出来以便下一步纤维素的降解,但其本身对烟梗纤维素的降解无明显影响。

本研究从牛粪中分离得到一株具有高效降解烟梗木质素的细菌 YP-2023-9,经过形态学特征和分子生物学特征分析,该菌株为肠杆菌(*Enterobacter sp.*)。该菌在培养 4–32 h 达对数生长期,可产生 Lip 和 Mnp,在产酶培养基中,分别在第 5 天和第 1 天达到最大值为 309.68 U/mL 和 21.76 U/mL。对低于 0.60% 的烟碱耐受。接种 YP-2023-9 后第 15 天,菌株能在烟梗表皮组织层良好生长,使烟梗组织结构疏松、空隙增大、细胞间连接物质和细胞壁变薄,细胞结构降解明显;烟梗木质素、半纤维素降解率高于未接种菌剂的对照,烟梗降解率为 42.42%,半纤维素和木质素的相对降解率分别为 13.17% 和 33.12%,YP-2023-9 在卷烟加工和烟草废弃物资源利用方面具有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] CONG KL, HAN F, ZHANG YG, LI QH. The investigation of co-combustion characteristics of tobacco stalk and low rank coal using a macro-TGA[J]. *Fuel*, 2019, 237: 126-132.
- [2] 阮昕, 李彪, 候读成, 陈林, 符于虎, 资文华. 超声波耦合酶反应去除烟梗中果胶和纤维素的工艺优化[J]. *贵州农业科学*, 2015, 43(2): 145-149, 154.
RUAN X, LI B, HOU DC, CHEN L, FU YH, ZI WH. Process optimization of ultrasound-assisted coupling enzyme on digesting cellulose and pectin in tobacco stems[J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 2015, 43(2): 145-149, 154 (in Chinese).
- [3] WANG XB, WANG Z, DAI Y, MA KY, ZHU LJ, TAN HZ. Thermogravimetric study on the flue-cured tobacco leaf pyrolysis and combustion using a distributed activation energy model[J]. *Asia-Pacific Journal of Chemical Engineering*, 2017, 12(1): 75-84.
- [4] 赵桂红. 烟草废弃物堆肥过程控制及促腐研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学博士学位论文, 2017.
ZHAO GH. Study on control of tobacco waste composting process and promotion of rot[D]. Harbin: Doctoral Dissertation of Harbin Institute of Technology, 2017 (in Chinese).
- [5] THEOPHILUS EH, PENCE DH, MECKLEY DR, HIGUCHI MA, BOMBICK BR, BORGERDING MF, AYRES PH, SWAUGER JE. Toxicological evaluation of expanded shredded tobacco stems[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42(4): 631-639.
- [6] POTTS RJ, BOMBICK BR, MECKLEY DR, AYRES PH, PENCE DH. A summary of toxicological and chemical data relevant to the evaluation of cast sheet tobacco[J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2010, 62(2): 117-126.
- [7] 周元清, 周丽清, 章新, 李淑英. 用生物技术降解木质素提高烟梗使用价值初步研究[J]. *玉溪师范学院学报*, 2006, 22(6): 61-63.
ZHOU YQ, ZHOU LQ, ZHANG X, LI SY. Preliminary study on enhancing the use value of the cut-stem tobacco through the degradation of lignin by biotechnology[J]. *Journal of Yuxi Teachers' College*, 2006, 22(6): 61-63 (in Chinese).
- [8] WANG CY, XIA SP, CUI CX, KANG SS, ZHENG AQ, YU ZS, ZHAO ZL. Investigation into the correlation between the chemical structure of lignin and its temperature-dependent pyrolytic product evolution[J]. *Fuel*, 2022, 329: 125215.
- [9] LIU KF, ZHUANG YT, CHEN JC, YANG GH, DAI L. Research progress on the preparation and high-value utilization of lignin nanoparticles[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(13): 7254.
- [10] ZHONG YD, WANG T, YAN M, MIAO C, ZHOU XF, TONG GL. High-value utilization of bamboo pulp black liquor lignin: preparation of silicon-carbide derived materials and its application[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 217: 66-76.
- [11] WU YJ, GE SB, XIA CL, MEI CT, KIM KH, CAI LP, SMITH LM, LEE J, SHI SQ. Application of intermittent ball milling to enzymatic hydrolysis for efficient conversion of lignocellulosic biomass into glucose[J]. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2021, 136: 110442.
- [12] 彭国岗, 王磊, 白晓莉. 烟梗常规化学成分测定及分

- 析研究[J]. 轻工科技, 2015, 31(11): 38-40.
- PENG GG, WANG L, BAI XL. Determination and analysis of conventional chemical components of tobacco stems[J]. Light Industry Science and Technology, 2015, 31(11): 38-40 (in Chinese).
- [13] 郑秀成, 陈泽裕, 陈国庆, 李骏, 钟卫鸿. 烟草废弃物中的难降解有机物的微生物降解研究进展[J]. 微生物学报, 2020, 60(12): 2650-2663.
- ZHENG XC, CHEN ZY, CHEN GQ, LI J, ZHONG WH. Progress in microbial degradation of refractory organics in tobacco waste[J]. Acta Microbiologica Sinica, 2020, 60(12): 2650-2663 (in Chinese).
- [14] 周璐, 陶红, 沈光林, 林翔, 李峰, 郭文, 马青. 碱氧与酶处理改善梗丝性质的研究[J]. 现代食品科技, 2010, 26(5): 463-465, 485.
- ZHOU R, TAO H, SHEN GL, LIN X, LI F, GUO W, MA Q. Using alkaline-hydrogen peroxide and enzymic treatment to improve the quality of cut stem[J]. Modern Food Science and Technology, 2010, 26(5): 463-465, 485 (in Chinese).
- [15] 林凯. 酶法对烟梗丝降解效果的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(11): 6500-6501.
- LIN K. Research on degradation effect of tobacco stem-silk by enzyme treatment[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(11): 6500-6501 (in Chinese).
- [16] 陶红, 沈光林, 赵谋明, 饶国华. 酶技术改善烟叶品质的研究进展[J]. 现代食品科技, 2008, 24(7): 737-740, 708.
- TAO H, SHEN GL, ZHAO MM, RAO GH. Review of researches on tobacco quality improvement with enzymatic methods[J]. Modern Food Science and Technology, 2008, 24(7): 737-740, 708 (in Chinese).
- [17] 林翔, 陶红, 沈光林, 周璐, 李峰, 郭文, 马青, 饶国华. 利用复合酶改善烟梗品质的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(4): 2064-2066.
- LIN X, TAO H, SHEN GL, ZHOU R, LI F, GUO W, MA Q, RAO GH. Research on improving quality of tobacco stem by using compound enzyme[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(4): 2064-2066 (in Chinese).
- [18] 于建军, 马海燕, 杨寒文, 董高峰. 利用果胶酶降解烟叶中果胶的研究[J]. 江西农业学报, 2009, 21(3): 136-138.
- YU JJ, MA HY, YANG HW, DONG GF. Study on using pectinase to degradate pectin in flue-cured tobacco[J]. Acta Agriculturae Jiangxi, 2009, 21(3): 136-138 (in Chinese).
- [19] 巩效伟, 陈兴, 申晓峰, 邱昌桂, 李水荣, 朱勇, 何邦华. 利用果胶酶改善烟梗内在品质的研究[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(15): 6889-6891.
- GONG XW, CHEN X, SHEN XF, QIU CG, LI SR, ZHU Y, HE BH. Research on improving internal quality of tobacco stem using pectinase treatment[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2013, 41(15): 6889-6891 (in Chinese).
- [20] 魏登辉. 梗丝木质素降解及其在卷烟工业中的应用[D]. 郑州: 河南农业大学硕士学位论文, 2017.
- WEI DH. Lignin degradation of cut stem and its application in cigarette industry[D]. Zhengzhou: Master's Thesis of Henan Agricultural University, 2017 (in Chinese).
- [21] 黄静文, 段焰青, 者为, 王明峰, 张克勤, 杨金奎. 短小芽孢杆菌改善烟叶品质的研究[J]. 烟草科技, 2010, 43(8): 61-64.
- HUANG JW, DUAN YQ, ZHE W, WANG MF, ZHANG KQ, YANG JK. Improvement of flue-cured tobacco quality with *Bacillus pumilus*[J]. Tobacco Science & Technology, 2010, 43(8): 61-64 (in Chinese).
- [22] 陈兴, 申晓峰, 巩效伟, 陈微, 党立志, 段焰青. 利用微生物制剂提高梗丝品质的研究[J]. 中国烟草学报, 2013, 19(3): 83-86.
- CHEN X, SHEN XF, GONG XW, CHEN W, DANG LZ, DUAN YQ. Improving tobacco cut stem quality with microbial preparation[J]. Acta Tabacaria Sinica, 2013, 19(3): 83-86 (in Chinese).
- [23] 周瑾, 李雪梅, 许传坤, 张灼, 念小魁. 利用微生物发酵改良烤烟碎片品质的研究[J]. 烟草科技, 2002, 35(6): 3-5.
- ZHOU J, LI XM, XU CK, ZHANG Z, NIAN XK. Improvement on smoking quality of tobacco scraps with microorganism strain Yu-1[J]. Tobacco Science & Technology, 2002, 35(6): 3-5 (in Chinese).
- [24] 邓国宾, 李雪梅, 李成斌, 周瑾, 张灼. 降果胶菌改善烟叶品质研究[J]. 烟草科技, 2003, 36(11): 17-18, 20.
- DENG GB, LI XM, LI CB, ZHOU J, ZHANG Z. Improving tobacco quality with pectin-degrading microorganisms[J]. Tobacco Science & Technology, 2003, 36(11): 17-18, 20 (in Chinese).
- [25] 刘东阳, 王蒙蒙, 马磊, 赵政, 邱强, 沈其荣. 高效纤维素分解菌的分离筛选及其分解纤维素研究[J]. 南京农业大学学报, 2014, 37(6): 49-58.
- LIU DY, WANG MM, MA L, ZHAO Z, QIU Q, SHEN QR. Isolation of the efficient lignocelluloses degrading microbes and decomposition of cellulose[J]. Journal of Nanjing Agricultural University, 2014, 37(6): 49-58 (in Chinese).

- Chinese).
- [26] 李振高, 骆永明, 滕应. 土壤与环境微生物研究法[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 364-368.
LI ZG, LUO YM, TENG Y. Research Method of Soil and Environmental Microorganisms[M]. Beijing: Science Press, 2008: 364-368 (in Chinese).
- [27] 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).
- [28] 李雅琳, 李素艳, 孙向阳, 郝丹, 蔡琳琳, 常晓彤. 1株木质素降解菌的筛选、鉴定及液态发酵条件优化[J]. 浙江农林大学学报, 2021, 38(6): 1297-1304.
LI YL, LI SY, SUN XY, HAO D, CAI LL, CHANG XT. Screening and identification of a lignin degrading strain and its optimized liquid fermentation conditions[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2021, 38(6): 1297-1304 (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] 刘爽. 中低温秸秆降解菌的筛选及其秸秆降解效果研究[D]. 北京: 中国农业科学院硕士学位论文, 2011.
LIU S. Screening of straw degradation strains under medium low temperature and their degradation effects on crop straw[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2011 (in Chinese).
- [31] 薛惠琴, 杭怡琼, 陈谊. 稻草秸秆中木质素、纤维素测定方法的研讨[J]. 上海畜牧兽医通讯, 2001(2): 15.
XUE HQ, HANG YQ, CHEN Y. Discussion on determination method of lignin and cellulose in rice straw[J]. Shanghai Journal of Animal Husbandry and Veterinary Medicine, 2001(2): 15 (in Chinese).
- [32] 吴长伟, 弓新国, 张勃, 李仙, 郑琳. 烟梗纤维素降解菌株 HF-09 的分离鉴定和降解特性[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(13): 74-77, 100.
WU CW, GONG XG, ZHANG B, LI X, ZHENG L. Isolation, identification and degradation characteristics of tobacco stem lignocellulose-degrading bacteria HF-09[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(13): 74-77, 100 (in Chinese).
- [33] 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.
- [34] CHEN C, JIANG LF, MA GF, JIN DX, ZHAO LS, OUYANG XP. Lignin removal from tobacco stem with laccase improved by synergistic action of weak alkali and tween 80[J]. Waste and Biomass Valorization, 2019, 10(11): 3343-3350.
- [35] ZHANG Q, ZHANG J, ZHAO S, SONG PZ, CHEN YL, LIU P, MAO CL, LI XK. Enhanced biogas production by ligninolytic strain *Enterobacter hormaechei* KA3 for anaerobic digestion of corn straw[J]. Energies, 2021, 14(11): 2990.
- [36] 尚华蓉, 李成林, 朱道辰, 季荣, 孙建中. 食木白蚁肠道降解木质素及环境内分泌干扰物细菌的筛选与特性研究[J]. 农业与技术, 2022, 42(20): 99-102.
SHANG HR, LI CL, ZHU DC, JI R, SUN JZ. Screening and characterization of bacteria degrading lignin and environmental endocrine disruptors in intestinal tract of wood-eating termites[J]. Agriculture and Technology, 2022, 42(20): 99-102 (in Chinese).
- [37] KAMEI I. Co-culturing effects of coexisting bacteria on wood degradation by *Trametes versicolor*[J]. Current Microbiology, 2017, 74(1): 125-131.