

研究报告

芽孢八叠球菌(*Sporosarcina* sp.) N2 的分离与低温降解木质素的特征解析

徐一鸣¹, 王敬红¹, 徐红敏¹, 邓常宇¹, 范寒雪¹, 邹世杰¹, Aman Khan², 李祥锴³, 赵洪颜⁴, 魏丹⁵, 王伟东^{*1,2}

1 黑龙江八一农垦大学 生命科学技术学院, 黑龙江 大庆 163319

2 东北林业大学 生命科学学院 东北盐碱植被恢复与重建教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040

3 兰州大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730000

4 延边大学 农学院, 吉林 延吉 136200

5 北京市农林科学院植物营养与资源环境研究所, 北京 100081

徐一鸣, 王敬红, 徐红敏, 邓常宇, 范寒雪, 邹世杰, Aman Khan, 李祥锴, 赵洪颜, 魏丹, 王伟东. 芽孢八叠球菌(*Sporosarcina* sp.) N2 的分离与低温降解木质素的特征解析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(12): 5121-5140.

XU Yiming, WANG Jinghong, XU Hongmin, DENG Changyu, FAN Hanxue, ZOU Shijie, Aman Khan, LI Xiangkai, ZHAO Hongyan, WEI Dan, WANG Weidong. *Sporosarcina* sp. N2: isolation and degradation of lignin at low temperatures[J]. Microbiology China, 2024, 51(12): 5121-5140.

摘要:【背景】东北地区每年都会产生大量的作物秸秆类农业废弃物, 低温导致自然条件下秸秆降解缓慢。【目的】筛选耐低温高效降解木质素的细菌, 探究其木质素降解相关途径。【方法】通过形态学及 16S rRNA 基因测序进行菌株鉴定, 在低温条件下进行木质素降解条件优化, 利用转录组学方法对菌株木质素降解特征进行分析。【结果】筛选了一株能在 15 °C 条件下高效降解木质素的菌株芽孢八叠球菌(*Sporosarcina* sp.) N2, 低温培养 8 d 木质素的降解率为 20.8%, 条件优化后提高至 31.7%。通过转录组测序分析确定不同时期间的差异表达基因, 发现与抗冻、木质素降解相关的功能基因在不同降解时期上下调变化明显, 通过其基因表达推测了该菌株木质素降解途径为苯甲酸途径与原儿茶酸途径。【结论】本研究丰富了低温木质素降解微生物资源, 为后续秸秆低温生物强化降解提供了数据支持。

关键词: 木质素; 生物降解; 芽孢八叠球菌; 低温; 酶活性

资助项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金(U22A20444); 国家重点研发计划(2023YFD1500501); 中央高校基本科研业务费专项基金(2572023CT08)

This work was supported by the Regional Innovation and Development Joint Funds of the National Natural Science Foundation of China (U22A20444), the National Key Research and Development Program of China (2023YFD1500501), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities (2572023CT08).

*Corresponding authors. E-mail: WANG Weidong, wwdcyy@126.com; WEI Dan, wd2087@163.com

Received: 2024-06-01; Accepted: 2024-08-03; Published online: 2024-09-23

Sporosarcina sp. N2: isolation and degradation of lignin at low temperatures

XU Yiming¹, WANG Jinghong¹, XU Hongmin¹, DENG Changyu¹, FAN Hanxue¹, ZOU Shijie¹, Aman Khan², LI Xiangkai³, ZHAO Hongyan⁴, WEI Dan^{*5}, WANG Weidong^{*1,2}

1 College of Life Science and Biotechnology, Heilongjiang Bayi Agricultural University, Daqing 163319, Heilongjiang, China

2 Key Laboratory of Restoration and Reconstruction of Salt-alkali Vegetation in Northeast China, Ministry of Education, School of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, Heilongjiang, China

3 School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, Gansu, China

4 College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 136200, Jilin, China

5 Institute of Plant Nutrition, Resources and Environment, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100081, China

Abstract: [Background] A large amount of crop straw as agricultural waste is produced in northeast China every year. Low temperature leads to slow degradation of straw under natural conditions. [Objective] To screen the bacterial strain capable of degrading lignin efficiently at low temperatures and explore the pathways of lignin degradation. [Methods] The strain was identified by morphological observation and 16S rRNA gene sequencing. The lignin degradation conditions were optimized at low temperatures, and transcriptome sequencing was employed to predict the pathways of lignin degradation. [Results] A strain *Sporosarcina* sp. N2 capable of efficiently degrading lignin at 15 °C was screened out. The degradation rate of lignin was 20.8% after 8 days of low temperature culture and increased to 31.7% after degradation condition optimization. The differentially expressed genes in different time periods were identified by transcriptome sequencing. The functional genes related to cold resistance and lignin degradation presented down-regulated or up-regulated expression in different degradation periods. According to the gene expression pattern, we hypothesized that the strain degraded lignin via the benzoic acid pathway and protocatechuic acid pathway. [Conclusion] This study enriched the microbial resources for degrading lignin at low temperatures and provided data support for enhancing microbial degradation of straw at low temperatures.

Keywords: lignin; biodegradation; *Sporosarcina* sp.; low temperature; enzymatic activity

2022年中国的秸秆理论资源量高达9.77亿t^[1]。秸秆主要由纤维素、半纤维素、木质素等构成。其中木质素是一种含许多负电基团的多环高分子有机物,包裹纤维素阻碍其分解利用^[2-3]。秸秆高价值利用核心在于木质素的高效分解或去除,这也是秸秆还田后秸秆降解的关键限速步骤^[4]。

自然界中降解木质素的微生物类型主要是真菌和细菌^[5]。木质素降解真菌主要为软腐病、

白腐病和褐腐病相关真菌,其中白腐真菌能将木质素完全降解为CO₂和H₂O^[6]。木质素降解细菌主要有微球菌(*micrococci* sp.)、不动杆菌(*Acinetobacter* sp.)、红球菌(*Rhodococcus* sp.)、黄单胞菌(*Xanthomonas* sp.)等^[7-8]。相较于真菌,细菌可耐受的pH、温度和氧浓度范围更大^[9]。Mei等^[10]分离的解淀粉芽孢杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*)在37 °C发酵15 d,木质素降

解率为 28.55%。丛毛单胞菌(*Comamonas* sp.) B-9 在 30 °C 和 pH 7.0 条件下培养 7 d, 3 g/L 木质素的降解率为 32%^[11]。基于细菌的强环境适应能力, 其可在低温环境下降解木质素, 因而在寒冷地区秸秆还田研究领域受到关注。青格尔等^[12]的复合菌系 GF-20 在 10 °C 培养 30 d 后, 玉米秸秆的降解率达到了 31.97%。张鑫等^[13]分离出的玉米秸秆低温高效降解复合菌系 M44, 在 15 °C 培养 20 d, 玉米秸秆降解率比 GF-20 高 12.25%。Cagide 等^[14]则从南极分离出的假单胞菌(*Pseudomonas* sp.) 中发现了冷活性染料脱色过氧化物酶, 为低温下促木质素降解提供更多可能。Jiang 等^[15-16]分离出的节杆菌(*Arthrobacter* sp.) C2 最佳酶活性温度为 14.9 °C, 优化后木质素过氧化物酶(lignin peroxidase, LiP)和锰过氧化物酶(manganese peroxidase, MnP)酶活性分别为 29.8 U/L 和 56.4 U/L, 木质素磺酸钠降解率高达 40.1%。后续的基因组学研究揭示了该低温嗜性木质素降解菌的降解机制。

为了适应寒冷, 嗜冷菌形成相关遗传与生化机制^[17], 如抗冻蛋白、冷适应蛋白、膜柔韧性、冷活性酶及次级代谢途径的改变^[18]。微生物在突然暴露于低温环境时, 调整其基因表达量的过程称作冷休克反应^[19]。低温下编码冷休克蛋白的基因高效表达, 该基因调控 DNA 结合蛋白, 调控细胞过程如转录、翻译、蛋白质折叠和细胞膜流动性^[20]。嗜冷菌如嗜冷芽孢八叠球菌(*Sporosarcina psychrophila*)的现有研究基于基因组^[21]与酶学对其抗冻机制进行过较为全面的分析^[22]。但无论是作为曾用名嗜冷芽孢杆菌(*Bacillus psychrophilus*)还是现用名嗜冷芽孢八叠球菌(*Sporosarcina psychrophila*), 都未曾有过低温下木质素降解的相关报道。

为了选育适合东北寒区低温下降解木质素菌株, 本研究旨在从低温土壤样本中分离耐低

温的木质素降解细菌, 优化菌株的木质素降解条件, 测定木质素降解酶; 并进一步探究目标菌株的功能基因, 对与木质素降解相关的功能基因进行详尽的研究, 以阐明菌株降解木质素的特征, 为低温条件下木质素降解转化提供新的微生物资源。

1 材料与方法

1.1 样品

2021 年 11 月中旬于黑龙江省齐齐哈尔市克山农场试验站(125.27°E, 48.24°N)采集土壤, 土壤类型为黑钙土。用无菌铲进行多点采样, 取样深度表层至 25 cm。土样使用无菌离心管分装, 低温条件下带回实验室, 并于 4 °C 环境保存。

1.2 培养基

木质素液体培养基(g/L): 碱性木质素 2.00, (NH₄)₂SO₄ 1.33, MgSO₄ 0.50, KH₂PO₄ 0.20, pH 5.5–6.0。

木质素固体培养基: 木质素液体培养基基础上加入琼脂 18.0 g/L。

苯胺蓝脱色固体培养基(g/L): 酵母粉 10.0, 葡萄糖 10.0, 苯胺蓝 0.1, 琼脂 18.0。

LB 液体培养基(g/L): 酵母粉 5.0, 胰蛋白胍 10.0, NaCl 10.0, pH 5.5–6.0。

LB 木质素液体培养基(g/L): 脱碱木质素 0.5, 酵母粉 2.5, 胰蛋白胍 5.0, NaCl 5.0, pH 5.5–6.0。

LB 木质素固体培养基: LB 木质素液体培养基基础上加入琼脂 18.0 g/L。

1.3 主要试剂和仪器

脱碱木质素, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司。恒温振荡培养箱和冷冻离心机, Eppendorf 公司; 高压蒸汽灭菌器, Sanyo 公司; 万位天平, Ohaus 公司; 洁净

工作台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;医用低温冰箱,海信公司;扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM), HITACH 公司。

1.4 菌株的分离与鉴定

于 100 mL 锥形瓶中加入 50 mL 无菌生理盐水与 1 g 土壤。15 °C、150 r/min 振荡培养 1 h 后静置 30 min。取上清液,应用稀释涂布法在 LB 木质素固体培养基上进行涂布,15 °C 静置培养 7 d,通过重复传代培养提取和纯化不同细菌菌落获得纯分离株。采用苯胺蓝脱色法进行快速筛选,检测分离菌株的木质素分解能力。将强脱色能力的菌株接种至 LB 液体培养基中,培养条件为 100 mL 锥形瓶中加入 50 mL 培养基,150 r/min、15 °C 振荡培养 7 d。

对筛选出的菌株进行形态学观察,并进行生理生化鉴定。扫描电子显微镜观察需要新鲜取材,取少量菌液在 6 000 r/min、4 °C 条件下离心 3 min 后,取出菌体放入装有 2.5%戊二醛的 1.5 mL (2 mL)离心管中于 4 °C 冰箱固定 12–24 h。固定后用磷酸缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.0)漂洗 3 次,每次 15 min;逐一使用不同浓度的乙醇溶液(30%、50%、70%、80%、90%和 95%)对样品进行脱水处理,每次 15 min;使用无水乙醇对样品进行 2 次处理,每次 20 min;将样品置于乙醇与醋酸异戊酯的混合液中(体积比为 1:1)处理 30 min;用纯醋酸异戊酯处理样品 1 h,临界点干燥,镀膜,观察^[23]。

通过淀粉酶活性测试、明胶液化能力检测、脲酶试验等对菌株 N2 进行生理生化特性研究。

对菌株进行 16S rRNA 基因测序分析^[24]。使用通用引物 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGC TCAG-3')和 1492R (5'-GGTACCTTGTTACGA CTT-3')对目标菌株的 16S rRNA 基因进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μL):基因组 DNA (20 ng/μL)

1.0 μL, 10×Buffer (含 2.5 mmol/L Mg²⁺) 5.0 μL, *Taq* 聚合酶(5 U/μL) 1.0 μL, dNTPs (10 mmol/L) 1.0 μL, 上、下游引物(10 μmol/L)各 1.5 μL, ddH₂O 39.0 μL。PCR 反应条件:95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 1.5 min, 35 个循环; 72 °C 7 min; 4 °C 保存。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测后送至上海美吉生物医药科技有限公司进行测序,将测得序列上传至 NCBI 获得登录号。测得序列通过 GenBank 数据库进行同源性比对后采用 MEGA 11.0 软件构建系统发育树。

对菌株适温性进行测试。通过将纯培养菌株菌液稀释到 10⁻⁷ 倍,并吸取 100 μL 稀释液进行平板涂布,培养 15 d,观察菌株在不同温度下的菌落生长速度,确定菌株在 5、10、15、20、25、30 °C 条件下的生长情况。

1.5 低温木质素降解细菌的降解特性

1.5.1 菌株的生长曲线和木质素降解率的测定

配制 0.01、0.05、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30 和 0.35 mol/L 的脱碱木质素水溶液并测定 OD₂₈₀ 值,根据该结果计算木质素标准吸收曲线^[25]。将菌株按 10%接种量接种至 LB 木质素液体培养基中,15 °C、150 r/min 培养。每 24 h 取 1 mL 菌液,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液稀释 30 倍,测定 OD₂₈₀ 值^[26]。将值代入标准吸收曲线计算出降解率,3 次重复。每隔 24 h 取 3 mL 菌液,12 000 r/min 离心 3 min 后收集菌体,使用等渗盐溶液重新悬浮。利用该盐溶液将紫外可见光谱仪在 600 nm 波长处的校零,测量绘制生长曲线,3 次重复。

1.5.2 菌株发酵过程中 pH 与降解木质素酶活性的测定

使用 LB 木质素液体培养基作为试验培养基,15 °C、150 r/min 振荡培养,通过酸度计对纯培养菌株在生长过程中 pH 的变化进行测量。

实验在无菌条件下进行,样品的采集间隔为每天 1 次,并对每个样品进行了 3 次重复测定。在此基础上,记录 pH 的变化并绘制相应的 pH 曲线。

测定菌株 N2 的 LiP、MnP、漆酶(laccase, Lac)的酶活性。参照 Blanchette^[27]的方法测定 LiP 活性;参照 Kuwahara 等^[28]的方法测定 MnP 活性;Lac 活性的测定参照 ABTS 氧化法^[29]。每隔 1 d 取 1 次样品,共取 10 d。

1.6 菌株降解木质素条件优化

选择胰蛋白胨与酵母粉添加比例(0:1、1:2、1:1、2:1、1:0,总添加量为 7.5 g/L),初始 pH (5.0–7.0),接种量(2.5%、5.0%、7.5%、10.0%、12.5%),脱碱木质素添加量(0.4–0.8 g/L),装液量每 100 mL 三角瓶装 20、30、40、50 和 60 mL 作为优化条件进行单因素试验,每组实验设置 3 个重复样本。培养温度为 15 °C,转速为 150 r/min,培养 12 d 后测定木质素降解率。

在单因素试验的基础上,利用 Plackett-Burman 试验从初始 pH,氮源添加比例,接种量,木质素添加量,装液量 5 个因素中筛选出对木质素降解率影响显著的因素。获得显著影响因素后,采用 Design-Expert 11.0 设计响应面试验,进行 3 因素 3 水平的 Box-Behnken 设计, $N=17$ 次试验,以木质素降解率为响应值,对培养条件进行优化,确定最佳培养条件并验证。

1.7 转录组测序与分析

使用优化后的最佳培养条件培养菌株。选择菌株降解木质素的初期、中期、末期(分别为菌株培养的第 1 天、第 3 天、第 7 天)样品,样品送至上海美吉生物医药科技有限公司完成转录组测序与数据整理。

1.8 统计分析

实验数据使用 Origin 2022 进行处理分析与统计学分析。响应面试验中得到的数据由 Design-Expert 8.0.6 进行分析检验与绘图。转录

组数据在美吉生物云平台进行处理分析,数据库选用 GO 数据库、NR 数据库、NCBI 物种分类数据库、EggNOG 数据库、KEGG 数据库、UniProt 数据库。

2 结果与分析

2.1 菌株的分离与鉴定结果

从土壤样品筛选出纯培养菌株 135 株,其中 4 株菌具有较强的苯胺蓝脱色能力(初步命名为 N2、S2、J5、K1)。菌株 N2 脱色能力最强,S2、J5、K1 脱色能力相近。选择具有最高木质素降解率的菌株 N2 进行进一步研究。

菌株 N2 的菌落形态如图 1A 所示, LB 木质素培养基上生长的菌落表面光滑、黏稠、易于挑取,菌落呈白色。SEM 照片观察到菌体呈棒杆状,约为 1.00–1.25 μm (图 1B)。菌株 N2 革兰氏阳性、过氧化氢酶阳性和氧化酶阳性,可水解明胶、酪氨酸(表 1)。将菌株 N2 的 16S rRNA 基因序列提交 GenBank 数据库进行同源性比对,菌株 N2 与嗜冷芽孢八叠球菌一致性高达 99.85%,通过 MEGA 11.0 软件绘制菌株 N2 系统发育树(图 2),初步将菌株 N2 归类为芽孢八叠球菌属(*Sporosarcina*)。将菌株放置在 5、15、20、25、30 °C 培养箱中培养,观察记录菌株 N2 在不同温度条件下的生长情况。经过 15 d 的培养观察,发现菌株 N2 在 15–30 °C 这几种温度条件下表现出较快的生长速度。此外,虽然在 5 °C 和 10 °C 的环境下仍然能够生长,但其生长速度相对较慢。由此可初步确定菌株 N2 具有耐寒的特性。

2.2 *Sporosarcina* sp. N2 的降解特性

菌株 N2 在 1–3 d 处于对数生长期。3–9 d,菌株的增长速度开始减缓,木质素降解率也逐渐提升并保持稳定并在第 8 天时达到最大,为 20.8%,第 9 天时菌株进入衰亡期(图 3)。菌株

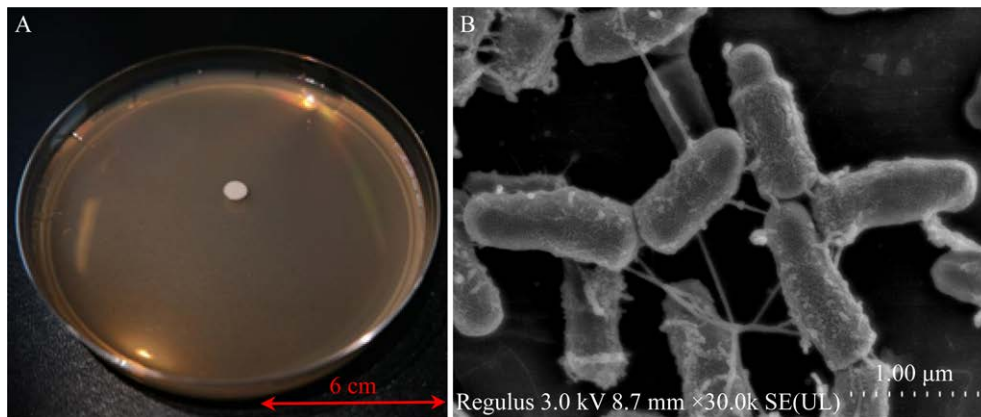


图 1 菌株 N2 的菌落形态(A)及扫描电子显微镜照片(B)

Figure 1 Colony morphology (A) and scanning electron microscopy images (B) of strain N2.

表 1 菌株 N2 的生理生化特性

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of strain N2

试验项目 Experimental item	结果 Result
淀粉酶试验 Starch hydrolysis test	-
明胶水解试验 Gelatin liquefaction test	+
脲酸反应试验 Urea acid reaction test	+
次黄嘌呤水解试验 Hypoxanthine hydrolysis test	-
酪蛋白试验 Casein test	-
葡萄糖氧化发酵试验 Glucose oxidation fermentation test	-
吐温-80 Tween-80	-
黄嘌呤水解试验 Xanthine hydrolysis test	-
酪氨酸水解试验 Tyrosine hydrolysis test	+
氧化酶活性试验 Oxidase activity test	+
过氧化氢酶试验 Catalase test	+

+: 阳性; -: 阴性

+: Positive; -: Negative.

N2 的 pH 呈现先快速增长至 8.0, 后缓慢增长, 最后数值在 8.3 趋于稳定(图 4A)。pH 对照组为无菌培养基, 灭菌后测定初始 pH 值为 5.7 ± 0.1 。

菌株降解过程中 3 种酶的酶活性变化见图 4B。在实验的第 1–2 天, MnP 酶活性迅速上升, 达到了最高值 152.26 U/mL。然而, 在第 6–7 天时, MnP 的酶活性又迅速下降至 28.80 U/mL。LiP 在第 3 天的酶活性也出现了快

速增长, 达到了 25.08 U/mL 的峰值。Lac 的酶活性最大值 32.47 U/mL。从酶活性表现看, 菌株 N2 具有较高的 MnP 酶活性, Lac 与 LiP 酶活性较低。

2.3 *Sporosarcina* sp. N2 降解木质素条件优化

初始 pH、接种量、氮源添加比例、装液量对木质素降解的影响不同, 结果如图 5 所示。木质素降解率在 pH 6.0–7.0 之间呈现先升再降的趋势。pH 6.5 时, 木质素降解率最高为 23.8%。接种量在 5.0%–10.0% 之间时较高, 其中木质素降解率在接种量为 7.5% 时达到最高值 22.8%。

当胰蛋白胍与酵母粉的添加比例设定为 1:1 时, 木质素的降解率最高, 为 27.7%。当氮源添加比例为 1:0 时, 降解率显著降低, 仅为 7.12%。后续实验将重点关注氮源添加比例在 2:1 至 1:2 之间的范围。

装液量为 30 mL/100 mL 时, 木质素降解率最高, 为 25.7%。在装液量为 30–50 mL/100 mL 时, 木质素的降解率无显著差异 ($P < 0.05$)。因此, 后续实验将聚焦于装液量在 30–50 mL/100 mL 之间。

通过 Plackett-Burman 筛选单因素试验分析, 其中相关系数 R^2 为 0.957 7, 按影响大小依次排序为: 氮源添加比例 > 接种量 > 初始 pH > 装液量 > 木质素添加量。

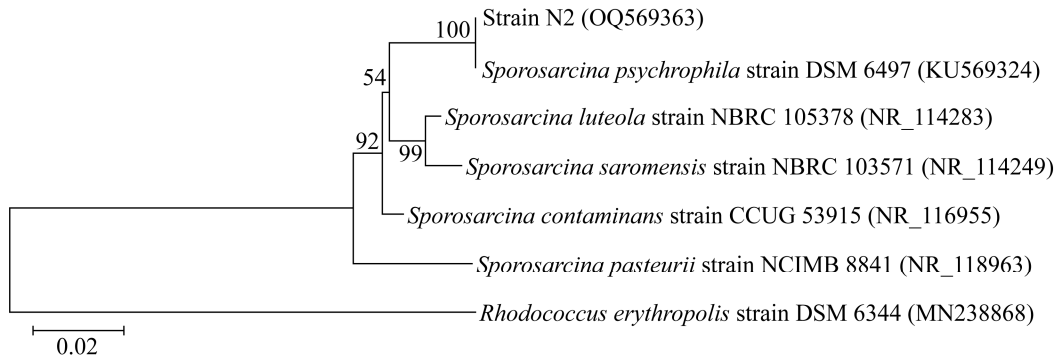


图2 菌株 N2 基于 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 参与对比的菌株 GeneBank 列于括号中；分支位置的数字代表自展值；标尺长度为 0.02 核苷酸置换率

Figure 2 The phylogenetic tree of the strain N2 constructed based on the 16S rRNA gene sequence. The preservation numbers for the standard strains included in the comparison are indicated in parentheses; The values for self-expansion are represented by the numbers in the branch positions; Scale lengths correspond to a rate of 0.02 nucleotide substitutions.

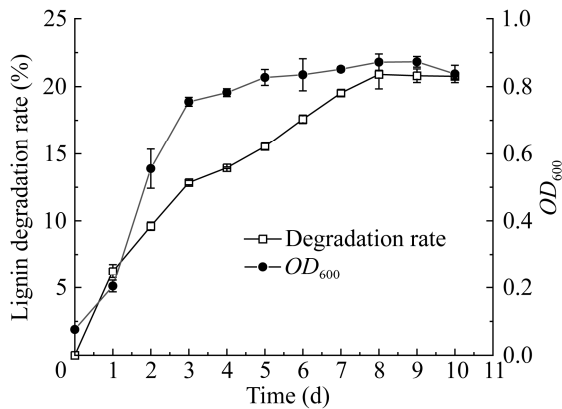


图3 菌株 N2 木质素降解率及生长情况测定
Figure 3 Determination of lignin degradation rate and growth of strain N2.

2.3.1 利用响应面法优化木质素降解率

Plackett-Burman 试验结果显示，接种量、初始 pH 值以及胰蛋白胨与酵母粉的添加比例为菌株降解木质素的显著影响因素。依照 Box-Behnken 中心组合设计的原理，选择 3 个因素作为自变量： A 代表接种量(取值为 5.0%、7.5%和 10.0%)， B 代表初始 pH(取值为 6.0、6.5 和 7.0)， C 代表胰蛋白胨与酵母粉的添加比例(取值为 2:1、1:1 和 1:2)。响应值为木质素降解率(%), 进行了 3 因

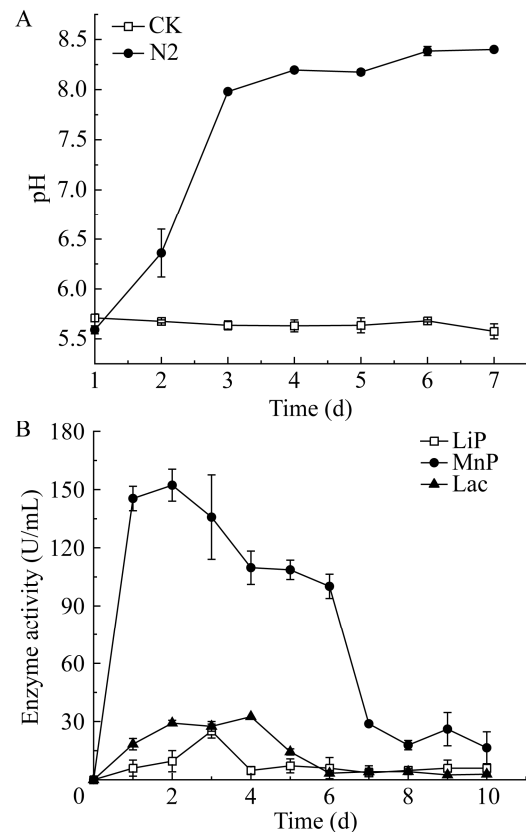


图4 菌株 N2 降解过程中 pH (A)与酶活性(B)变化情况

Figure 4 The changes of pH (A) and enzyme activity (B) during the degradation of strain N2.

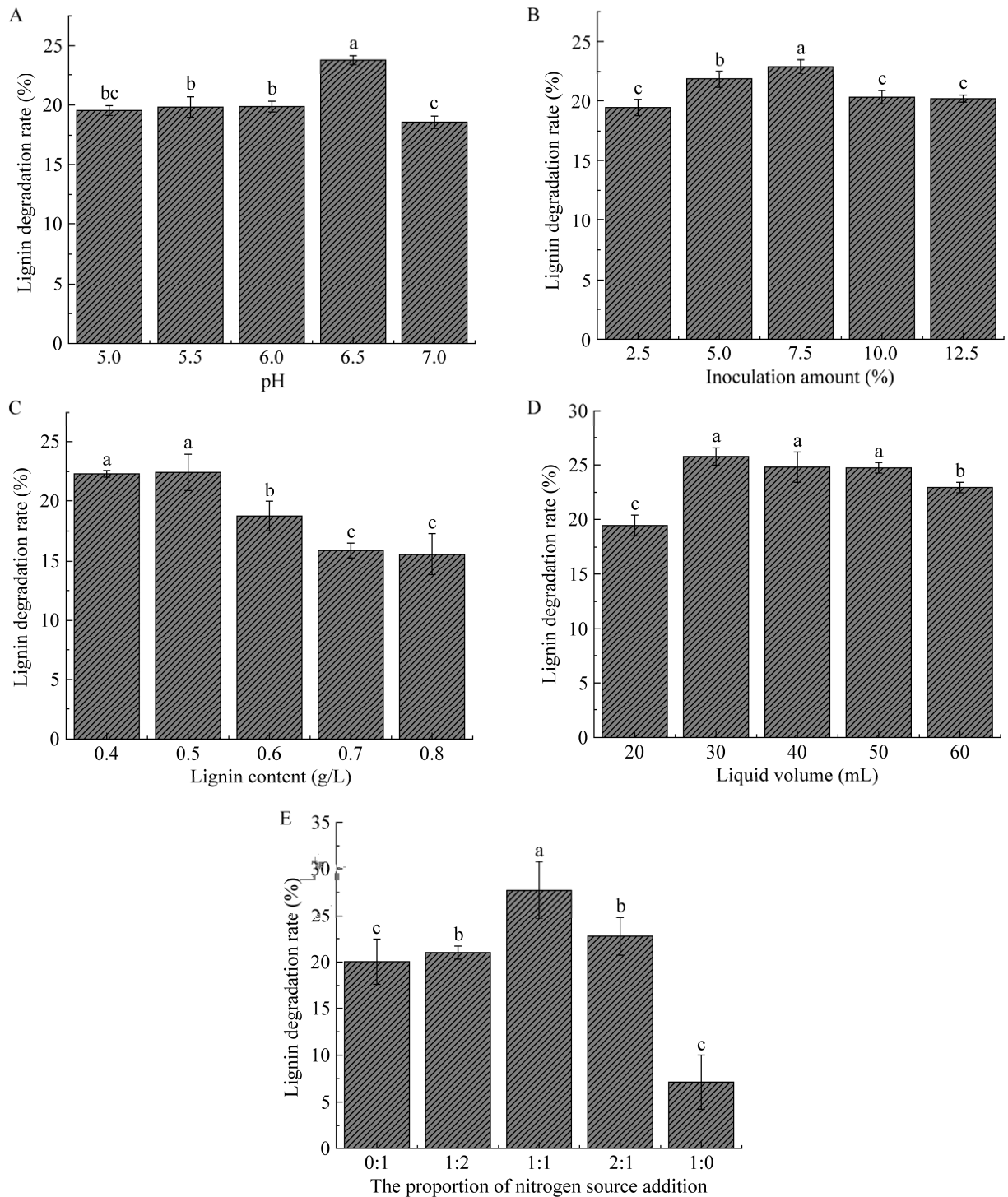


图5 不同因素对菌株 N2 木质素降解率的影响 A: 初始 pH. B: 接种量. C: 木质素添加量. D: 装液量. E: 氮源添加比例. 不同小写字母代表显著性差异 ($P < 0.05$)

Figure 5 Effects of different factors on lignin degradation rate of strain N2. A: Initial pH. B: Inoculation amount. C: Lignin content. D: Liquid volume. E: The proportion of nitrogen source addition. Different lowercase letters represent significant differences ($P < 0.05$).

素 3 水平的响应面分析试验。试验共计 17 个试验点, 填入降解率测定结果利用响应面软件分析得到回归方程:

$$\text{木质素降解率(\%)}=24.96+0.0488\times A-0.2075\times B+2.32\times C-0.0575\times AB+0.7400\times AC-0.3975\times BC-0.2250\times A^2-1.92\times B^2-4.17\times C^2。$$

对回归模型进行方差分析。响应面分析的结果显示, 正决定系数 R^2 (adj) (0.843 4>0.80), 变异系数(coefficient of variation)为 5.52%。这表明该模型能真实反映实验的实际情况。模型 $P<0.0001$, R^2 为 0.931 5, 这表明该回归方程的显著性非常高, 并且与研究变量之间的相关性较强。本实验中失拟项 F 值为 0.247 7 (大于 0.05), 这表明模型对结果的拟合有利, 不存在失拟因素。综上所述, 这些分析结果进一步支持了模型的良好拟合优度, 使其能够用于对纯培养菌株 N2 在木质素降解过程中的初步分析与预测。

使用响应面分析软件 Design-Expert 8.0.6 处理实验结果。通过试验因素与响应值关系, 绘制出等高线图和三维响应图(图 6)。

如图 6A、6B 所示, 氮源添加比例保持不变时, 接种量与初始 pH 之间的等高线图呈椭圆状, 这表明 2 个因素间的相互作用对菌株降解木质素的影响显著($P<0.05$)。

在恒定 pH 条件下, 接种量与氮源添加比例之间的相互作用对木质素降解率产生显著影响($P<0.05$)。氮源添加比例保持不变, 木质素降解率随着接种量的增加先升高后降低。这一现象表明在一定范围内, 接种量的增加能够有效促进木质素的降解, 但超过某一临界值后, 其降解效果又会有所减弱。当接种量处于 6.0%至 9.5%之间时, 木质素的降解率达到了最高水平(图 6C、6D)。

如图 6E、6F, 初始接种量保持不变时, 氮源添加比例和初始 pH 值两者间的相互作用对

木质素降解率产生的影响并不显著($P>0.05$)。初始 pH 值不变时, 木质素的降解率随接种量的增加呈现出先上升后下降的趋势。

2.3.2 优化培养条件下木质素降解能力验证结果

试验采用响应面分析 pH、氮源添加比例与接种量 3 个因素之间的交互作用对木质素降解率的影响。在本研究中, 通过系统的实验优化确定了最优接种量为 9.21%、初始 pH 为 6.45、氮源添加比例为 1.3:1.7 (添加总量为 7.5 g)。此条件下木质素理论降解率为 25.328%。将最佳条件修正为初始 pH 6.5、氮源比例为 1:2 及接种量为 9%。经过验证, 该条件下木质素的降解率提升至 31.7%, 相较于之前的结果提高了 10.9%。此外, 在这一条件下, 达到最大降解率所需的培养时间也显著减少, 这表明优化后的培养条件不仅提升了降解水平, 同时也改善了培养过程的降解效率(图 7)。

2.4 低温条件下菌株 N2 的木质素降解特征分析

2.4.1 转录组数据分析和新基因挖掘

对菌株 N2 降解过程前期 Treat1、中期 Treat2、末期 Treat3 进行转录测序分析共获得 40.54 Gb clean data, 组装后将 clean reads 与嗜冷芽孢八叠球菌(*Sporosarcina psychrophila*)参考基因组进行比对, 比对率从 80.36%到 88.34%不等。Venn 分析显示样本间或组间的共表达和特表达基因^[30](图 8)。

在菌株 N2 转录组数据中发现 275 个新基因。对新基因进行 GO 富集分析(图 9A), 这些新基因被富集到生物过程(biological process, BP)和分子功能(molecular function, MF)两大类。在 BP 分类中, 基因主要富集到丙酸代谢过程(propionate metabolic process)、细菌芽孢生成(sporulation resulting in formation of a cellular spore); 在 MF 分类中, 基因主要富集到异丁酰-CoA 变位酶活

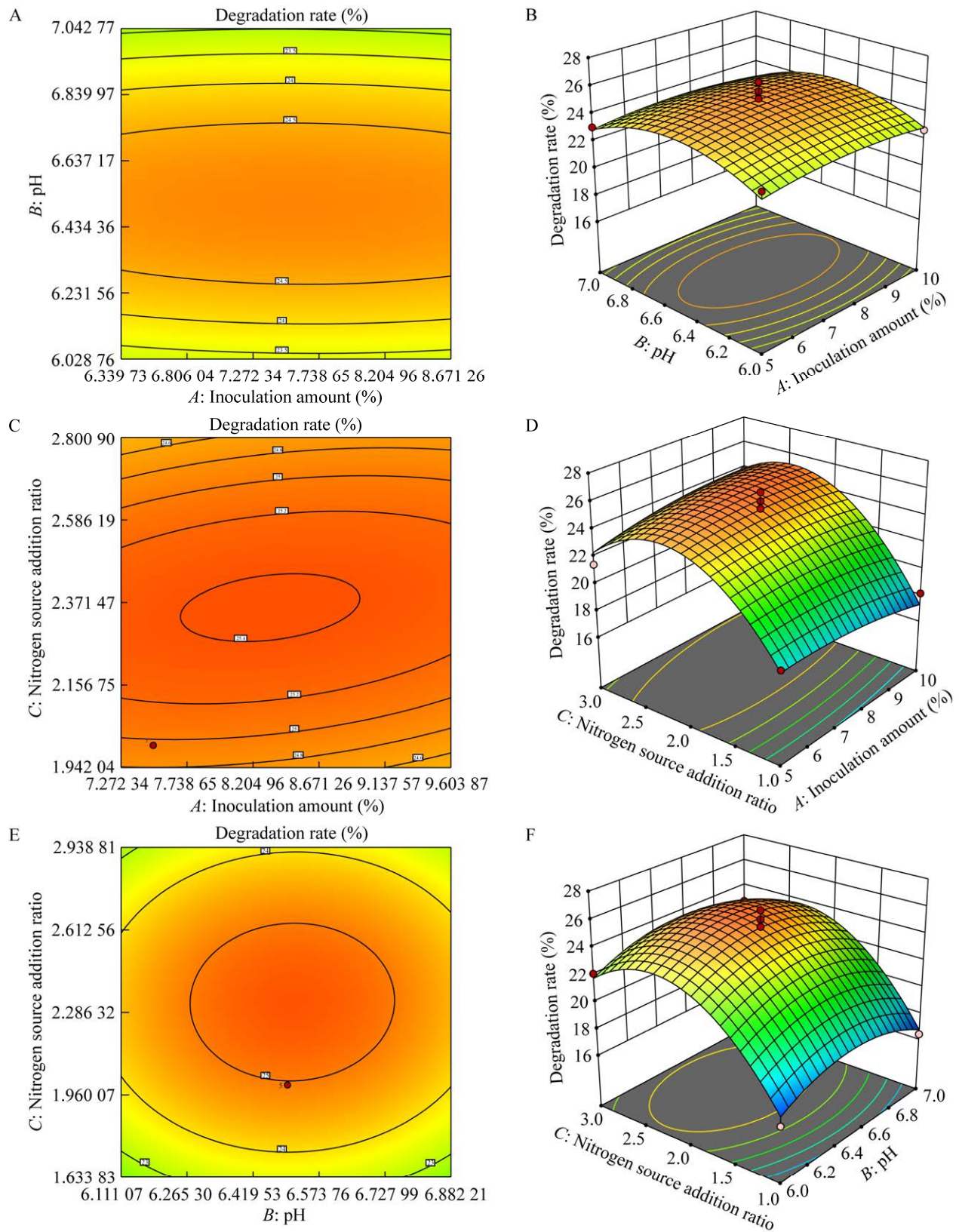


图 6 初始 pH、接种量和氮源添加比例对菌株 N2 降解木质素的交互影响曲面图 A 和 B: pH 与接

种量影响下的木质素降解率二维等高线与三维响应面. C 和 D: 接种量与氮源添加比例影响下的木质素降解率二维等高线与三维响应面. E 和 F: pH 和氮源添加比例影响下的木质素降解率二维等高线与三维响应面

Figure 6 Curved surface of the interaction effects of inoculation amount, initial pH and nitrogen source addition ratio on lignin degradation by strain N2. A and B: Two-dimensional contour and three-dimensional response surface of lignin degradation rate under the influence of pH and inoculation amount. C and D: Two-dimensional contour and three-dimensional response surface of lignin degradation rate under the influence of inoculation amount and nitrogen source addition ratio. E and F: Two-dimensional contour and three-dimensional response surface of lignin degradation rate under the influence of pH and nitrogen source addition ratio.

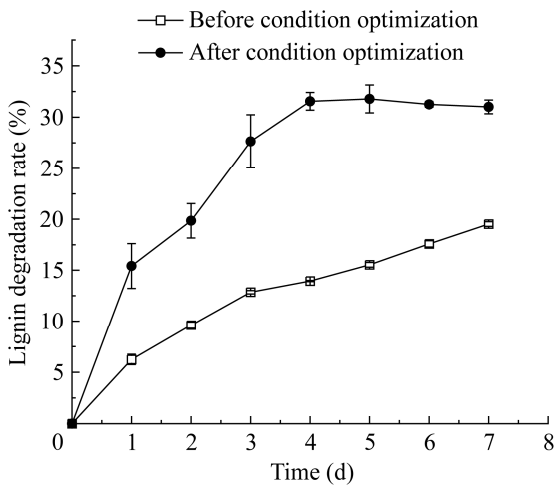


图7 菌株 N2 条件优化前与优化后的木质素降解率
Figure 7 The lignin degradation rate of strain N2 before and after optimization.

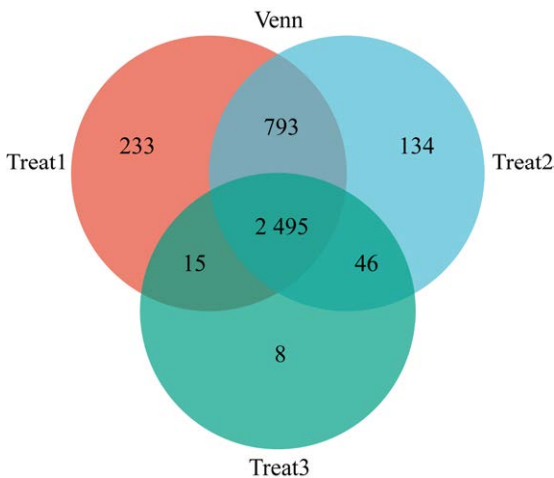


图8 基础注释统计 Venn 图
Figure 8 Basic annotation statistics Venn diagram.

性(isobutyryl-CoA mutase activity)、环核苷酸磷酸二酯酶活性(cyclic-nucleotide phosphodiesterase activity)、2',3'-环核苷酸 2'-磷酸二酯酶活性(2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase activity)、新戊酰-CoA 变位酶活性(pivalyl-CoA mutase activity), 3'-核苷酸酶活性(3'-nucleotidase activity)。KEGG 功能注释(图 9B)显示这些新基因中 26 个与碳水化合物代谢相关, 20 个与氨基酸代谢相关。其新基因变化可能是为了适应木质素降解与低温环境等需求。

2.4.2 基因表达模式和差异表达基因功能富集

为了研究菌株 N2 所有差异基因随时间表达出现的趋势与变化, 对其进行时序表达趋势分析。根据基因表达模式, 使用 STEM 软件将 3 个时期的差异表达基因(differentially expressed gene, DEG)聚类为 8 个趋势。其中基因主要聚类到 trend 0、1、3、5 中, trend 0、1、3 表现出显著性($P < 0.05$)。其中 trend 1、3 有相同的趋势, 从初期到末期逐级递减, 对不同趋势的 DEG 进行 GO 注释, 如图 10 所示。trend 0、trend 3 中大量基因注释到细胞组分合成如细胞膜组成和细胞质的合成, 对应了细菌 N2 从迟缓期到指数期之间细菌生长所需。对趋势不同的 trend 1 进行功能富集, 基因多被富集到分子功能、杂环分解代谢过程、芳香族化合物分解代谢过程等。

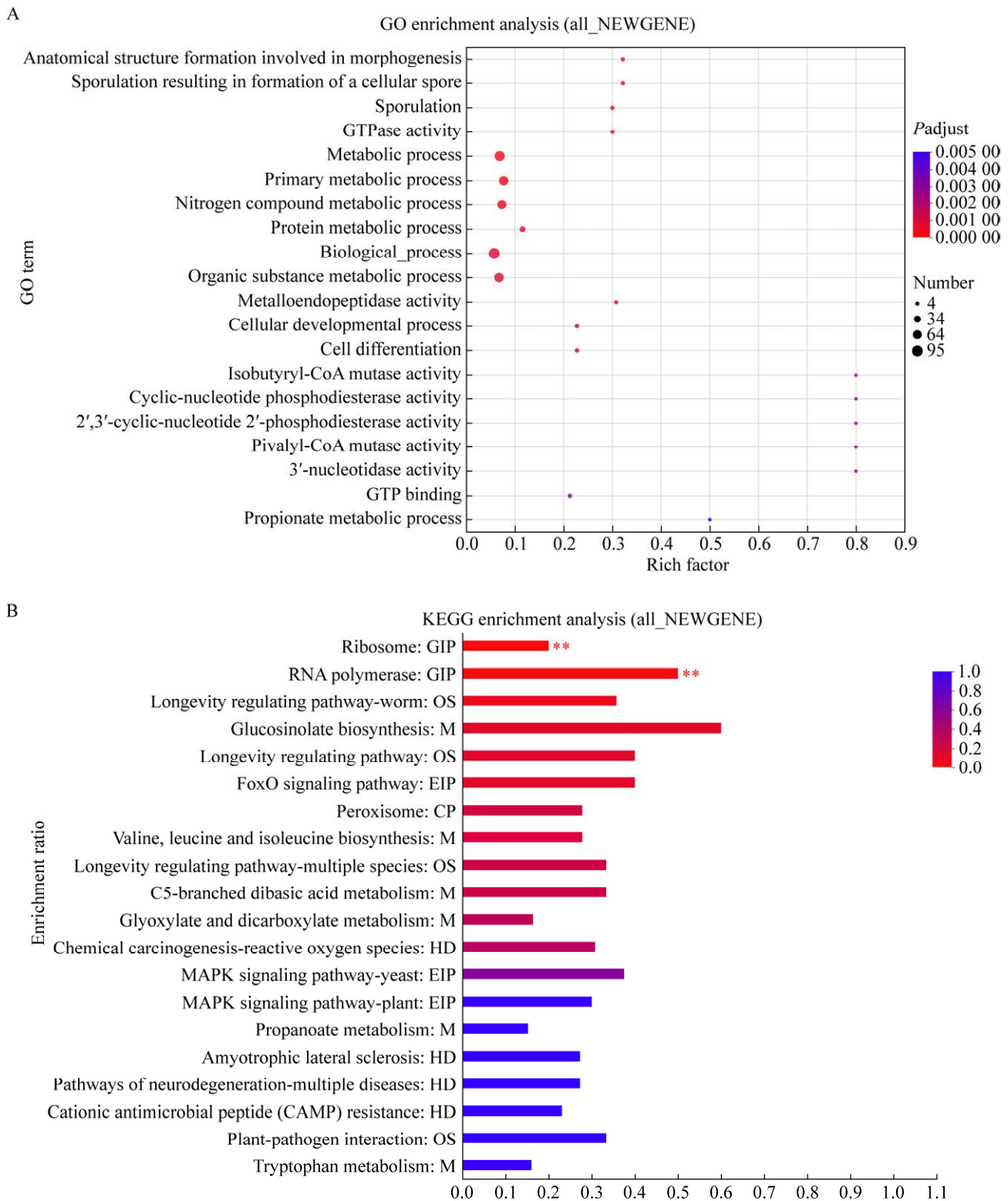


图9 新基因的GO功能注释(A)与KEGG注释富集分析(B)

Figure 9 GO functional annotation (A) and KEGG annotation enrichment analysis (B) of new genes. **: $P < 0.01$.

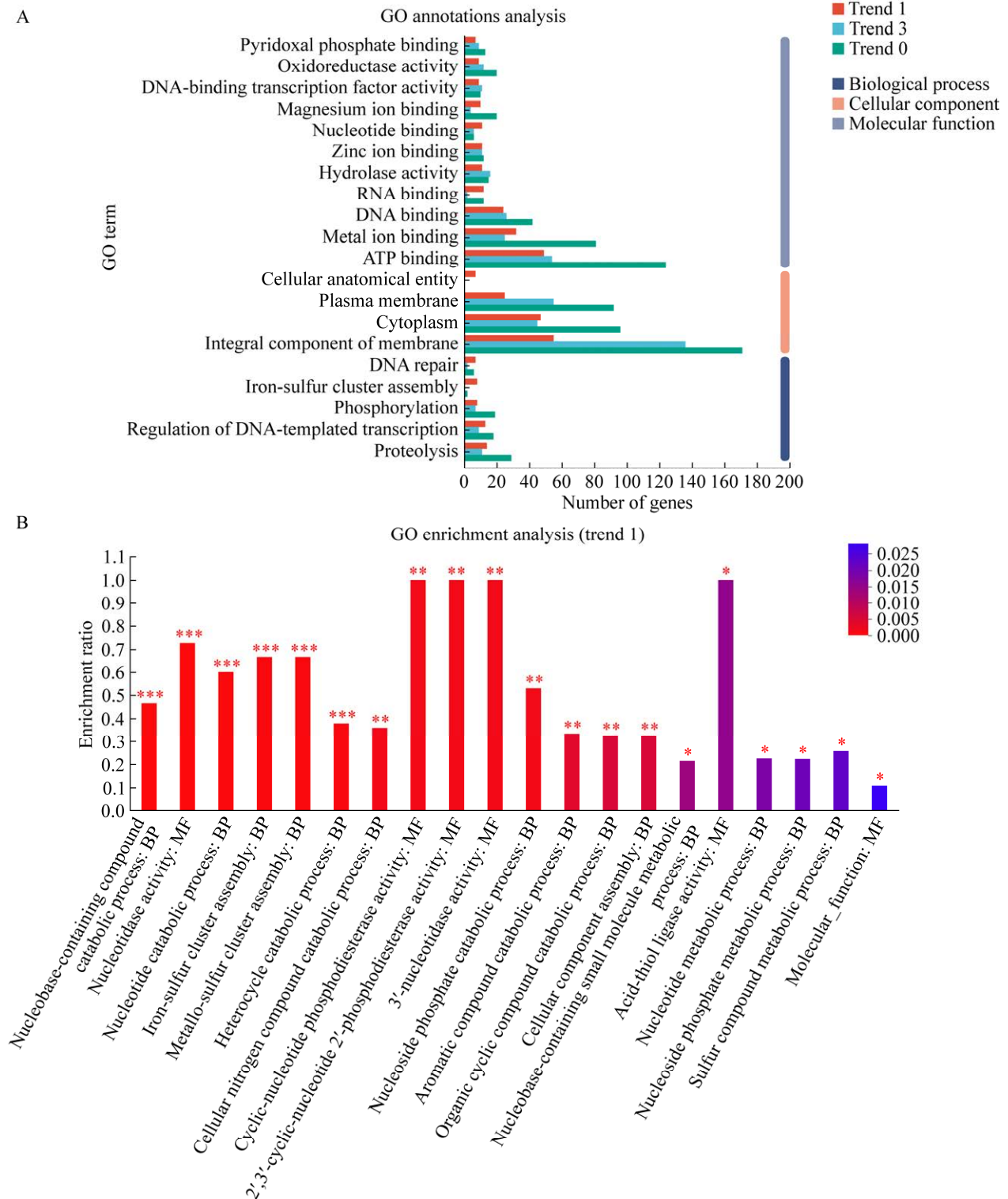


图 10 三种基因表达趋势的 GO 功能注释(A)与 trend 1 的 GO 功能富集(B)

Figure 10 GO functional annotation of three gene expression trends (A) and GO functional enrichment of trend 1 (B). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

2.4.3 菌株 N2 低温相关 DEG 与木质素降解 DEG 表达趋势

对所有基因进行注释整理, 挑选出与低温适应和木质素降解相关的 DEG。选取 3 个时间段构建基因表达热图如图 11A、11B 所示。N2 中注释到的冷休克蛋白表达基因 *novel0055*、*AZE41_RS14775* 和 *AZE41_RS02100* 属于 *CspA* 家族, *AZE41_RS13260* 属于 *CspB* 家族。冷休克蛋白相关基因则在这些抗冻基因中表现出不一样的趋势即中期上调明显。结合表达量和表达趋

势来看, 基因 *novel0055* 与 *AZE41_RS02100* 表达量高且两基因上下调趋势相同。*AZE41_RS15325*、*AZE41_RS15315* 和 *AZE41_RS15340* 等与低温适应性相关基因则在 3 个时期逐渐降低。冷适应蛋白基因 *AZE41_RS17630* 在末期则呈现出较大幅度的降低。冷适应蛋白基因在低温条件下表达下调、可能是为了避免过度的冷适应、导致细胞对温度变化的敏感性降低。冷适应蛋白可能在细胞膜上发挥作用, 增加膜的流动性和透性, 但过多的冷适应蛋白可能破坏膜的稳定性

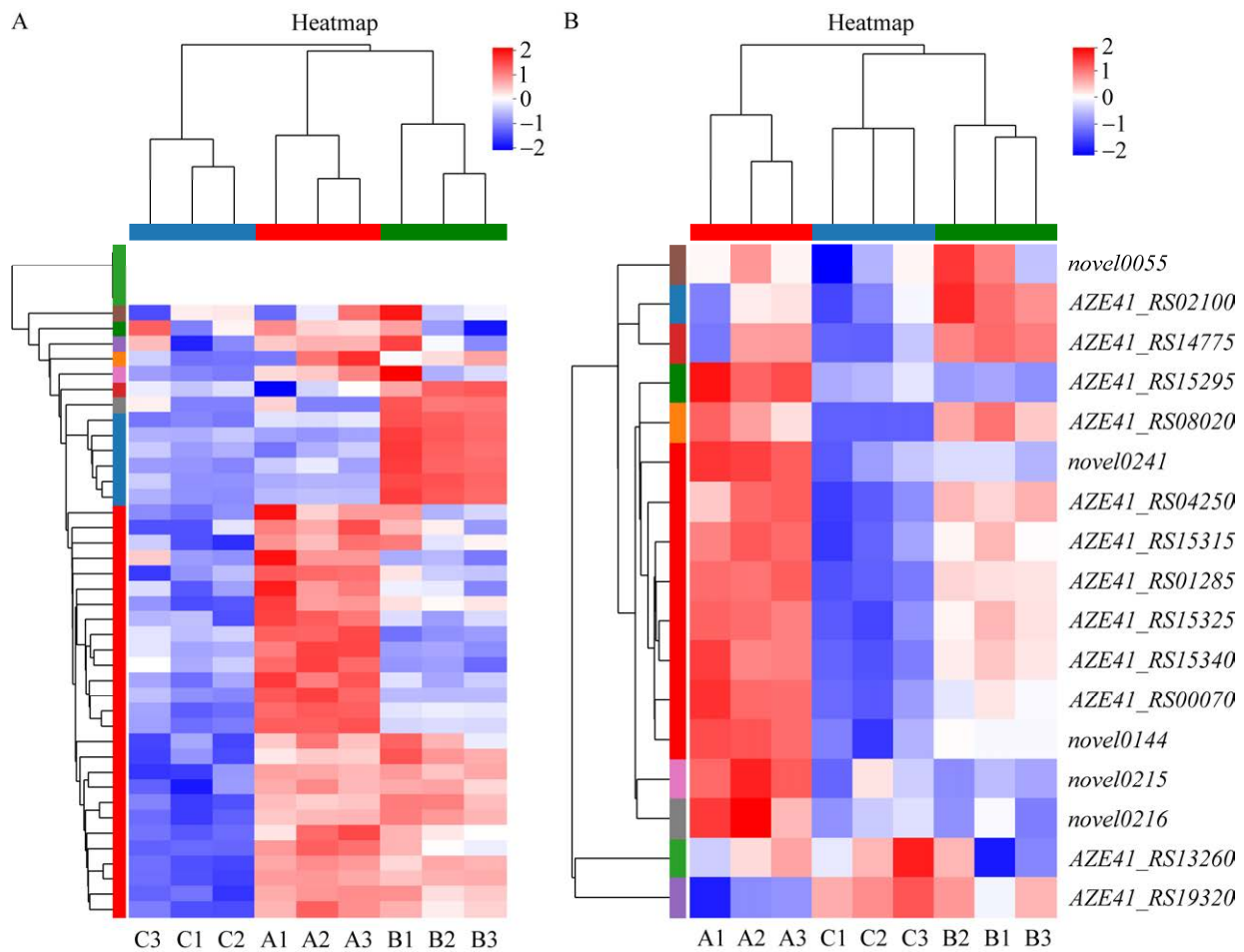


图 11 木质素降解相关差异表达基因(A)和低温适应相关差异表达基因(B)的热聚类分析 A1–A3: 木质素降解前期 3 个样品。B1–B3: 木质素降解中期 3 个样品。C1–C3: 木质素降解末期 3 个样品

Figure 11 Thermal clustering analysis of differentially expressed genes related to lignin degradation (A) and low-temperature adaptation (B). A1–A3: Three samples in the early stage of lignin degradation. B1–B3: Three samples in the middle stage of lignin degradation. C1–C3: Three samples at the end of lignin degradation.

和选择性。木质素降解相关基因中, 大多是过氧化氢酶在降解中期上调明显, 其中 MnP 表达基因 *AZE41_RS11795* 上调倍数极高, 对应了酶活测定中该酶于第 2–3 天到达最大值。一个新的过氧化氢酶类基因 *novel_0270* 在表达中有着与 MnP 表达基因相似的趋势, 该基因甚至在初期与末期不进行表达, 仅在产酶降解高峰期进行表达。

对 *B* (木质素降解中期)_vs._*A* (木质素降解前期)_与 *C* (木质素降解后期)_vs._*B* 进行 KEGG pathway 富集分析(图 12A、12B), 在不同时间段部分基因富集到了苯甲酸代谢途径。在 MnP 处理后的木质素解聚芳香族代谢中菌株 N2 主要通过苯甲酸途径将芳香族单体化合物开环转化为乙酰辅酶 A。

将已知基因注释到通路中, 推测苯甲酸代谢途径为苯甲酰乙酰基辅酶 A 通过 *fda* (*AZE41_RS04875*, *AZE41_RS20580*) 转化为苯甲酰辅酶 A, 再进入 M00541 benzoyl-CoA degradation 代谢途径。后经通路转化为 3-甲基邻苯二酚, 经 *AZE41_RS04870* 生成 3-keto-pimeloyl-CoA 直至生成 Acetyl-CoA 进入三羧酸循环。另一个途径起点推测为原儿茶酸转化为 4-甲基儿茶酚。该途径因甲苯降解影响会产生 4-甲基儿茶酚作为第二个起点。此时的代谢途径为通过 *dmpB*、*catE* 生成 *cis,cis-2-hydroxy-6-oxohept-2,4-dienoate*, 并于后续由 *mhpE* 生成丙酮酸进入后续代谢。4-甲基儿茶酚则通过 *praC* 生成 *2-oxo-5-methylcis-muconate*, 最后生成丙酮酸。

3 讨论

东北地区平均气温低, 低温周期长的气候特点给秸秆的资源化利用更是增加压力。因此, 为低温条件下的木质素降解、秸秆处理分离出耐低温木质素降解菌株非常必要。

本研究固定培养温度为 15 °C, 以脱碱木质素^[31]为唯一碳源分离获得一株木质素降解细菌, 命名为芽孢八叠球菌(*Sporosarcina* sp.) N2, 16S rRNA 基因一致性最高的标准菌株嗜冷芽孢八叠球菌(*Sporosarcina psychrophila*) DSM 6497^[32] 相关研究主要聚焦于降解有机污染物 3-氯吡啶的具体机制。在之前报道的研究中该菌株显示出积极的脲酶活性介导碳酸钙沉淀^[33], 但尚未见报道该菌株在低温下具有降解木质素的能力。本研究报道了 *Sporosarcina* sp. 的木质素降解能力, 并对其低温下的酶活力与降解途径进行了研究(图 13)。

利用转录组测序分析菌株 N2 在不同时间点的基因表达变化和相互作用。在培养初期, 基因主要参与分子功能和芳香族化合物代谢, 表明菌株 N2 先利用简单的碳氮源增殖, 再通过过氧化物酶降解木质素。

适温性试验表明该菌株在最低温度 5 °C 至最高 30 °C 时均可以生长, 并且在 25 °C 时生长最佳即对温度适应范围广、耐寒性能强。从 *CspA* 家族基因培养初期表达量远高于中后期来看, 推测其为菌株 N2 应对低温环境下的关键调节因子, 且 *AZE41_RS02100* 与新基因 *novel0055* 表达趋势相同, 可能存在组成型表达。除 *Csp* 家族外, 本研究从转录组注释出促进与低温适应性相关的蛋白表达基因^[34] *AZE41_RS15315*、*AZE41_RS15340* 和 *AZE41_RS15295* 等, 即微生物的耐寒机制是多基因调控的结果, 涉及微生物细胞膜的适应、冷适应酶及低温转录水平调控等。

本研究测定了 Lac 和 II 类含血红素过氧化物酶等木质素降解酶的活性和表达。末期组中 3 种巯基过氧化物酶基因显著上调, 与李锋^[35] 研究相符。此外, 不同时期上调的基因主要涉及芳香族化合物的代谢, 可降解脱氢双松柏醇^[36]。

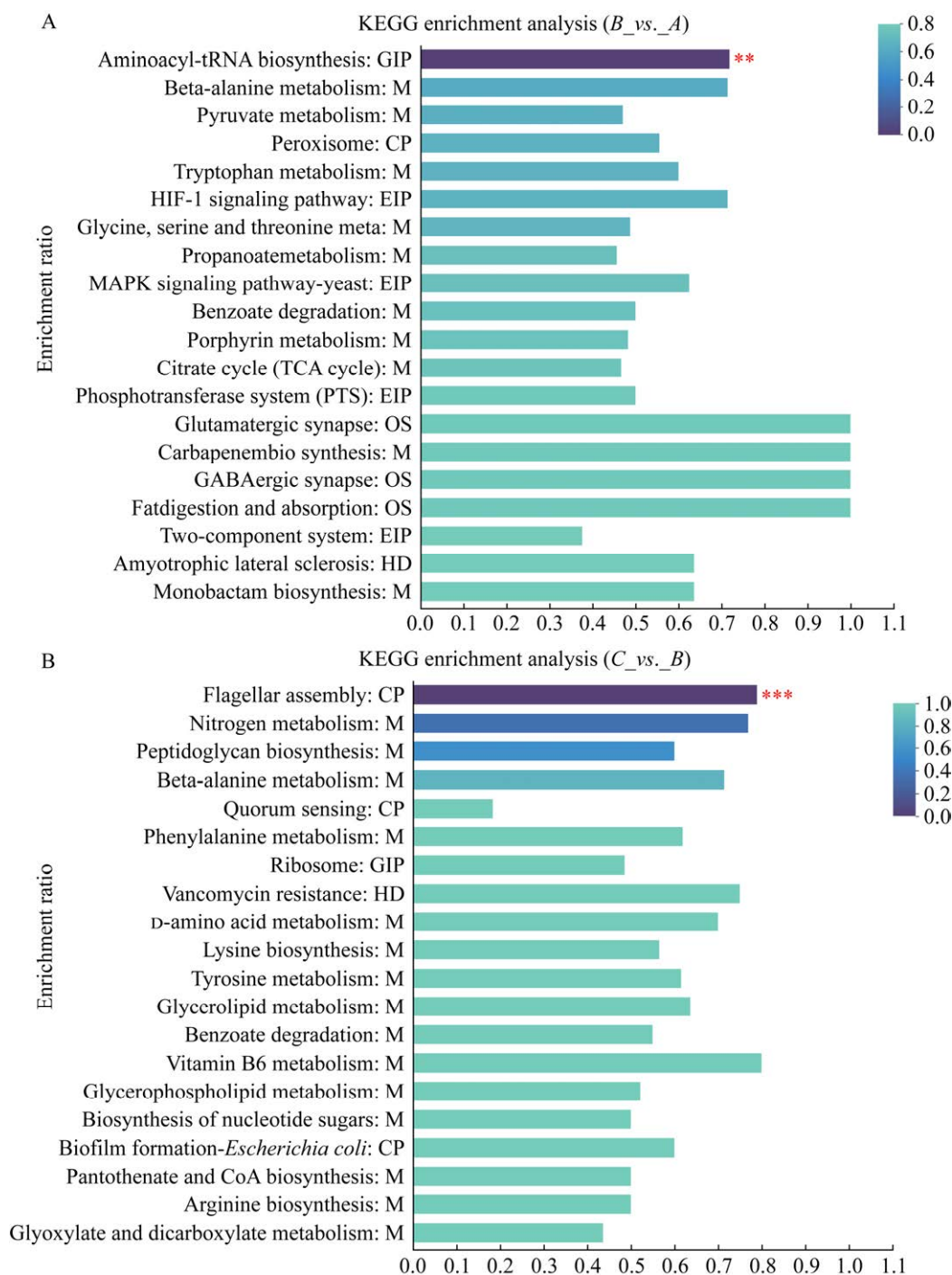


图 12 不同对照组下的 KEGG pathway 富集分析 A: B_{vs}_A 的 KEGG pathway 富集分析. B: C_{vs}_B 的 KEGG pathway 富集分析. GIP: 基因信息处理. M: 新陈代谢. CP: 细胞过程. EIP: 环境信息处理. OS: 有机系统. HD: 人类疾病

Figure 12 KEGG pathway enrichment analysis under different control groups. A: KEGG pathway enrichment analysis of B_{vs}_A . B: KEGG pathway enrichment analysis of C_{vs}_B . GIP: Genetic information processing; M: Metabolism; CP: Cellular processes; EIP: Environmental information processing; OS: Organismal systems; HD: Human diseases. ** $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

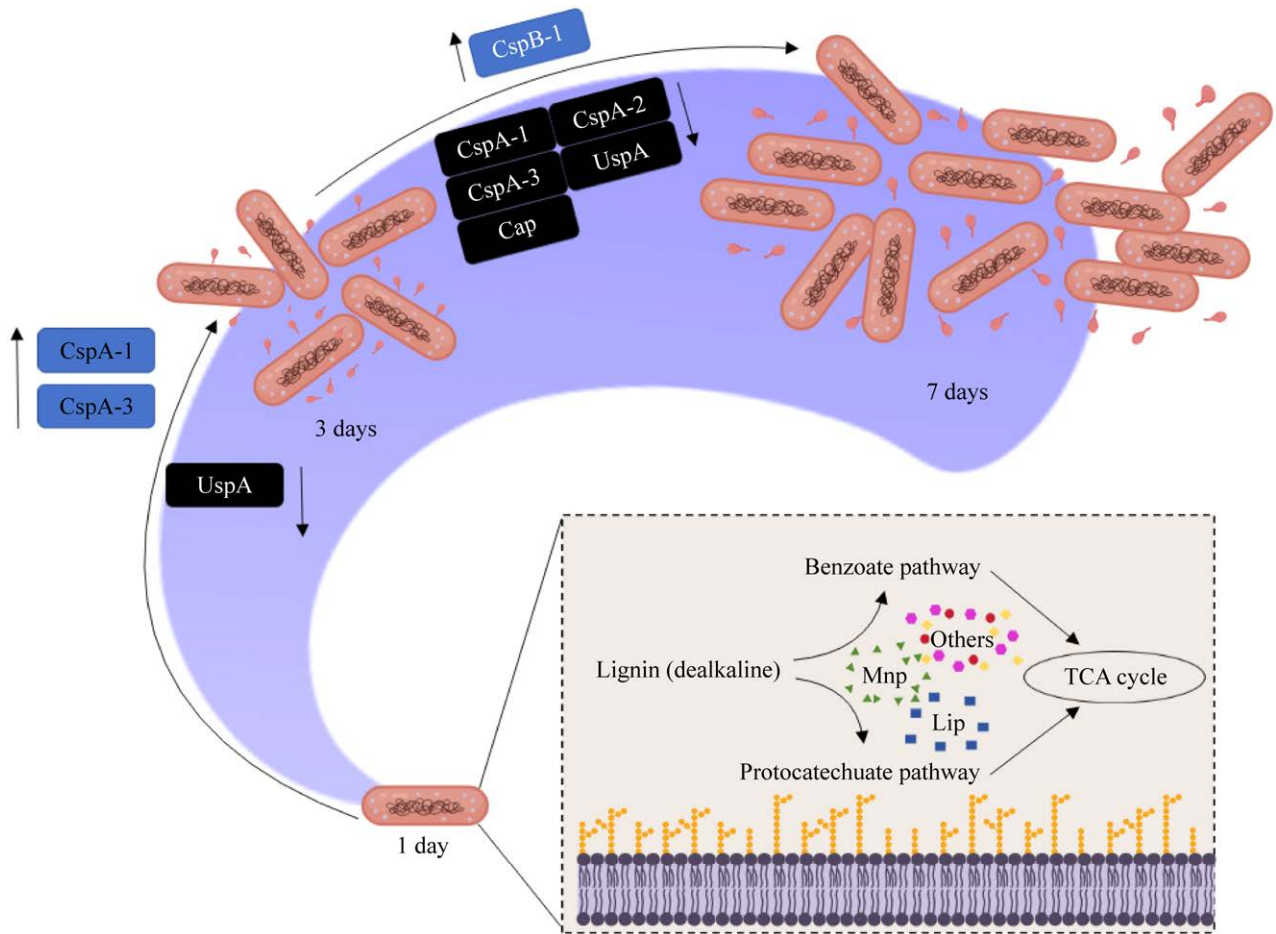


图 13 菌株 N2 不同时期耐寒基因调控与木质素代谢途径

Figure 13 Regulation of cold resistant genes and lignin metabolic pathways in different stages of strain N2.

即低温下的木质素降解基因表达规律与常温下的降解规律存在相同趋势。

采用 RNA-Seq 技术分析了菌株 N2 在最适条件下不同时间点的基因表达差异,并结合 KEGG 数据库注释了相关的代谢途径。可以发现参与苯甲酸代谢和原儿茶酸代谢的酶基因在各个时间点均有显著差异,表明菌株 N2 能够调节这 2 条代谢途径以适应木质素降解的需求。

苯甲酸的降解涉及多个酶的催化反应。苯甲酸羧化酶和苯丙酸羧化酶在该过程中发挥着至关重要的作用,它们分别催化苯甲酸转化为苯丙酸,以及苯丙酸转化为肉桂酸,最终形成

香豆酸^[37]。3-羟酰基 CoA 脱氢酶是苯甲酸降解的关键酶^[38],其相关基因在整个降解过程中持续下调,可能是为了避免苯甲酸的过度消耗,保证代谢的平衡。醛脱氢酶是参与多种代谢途径的重要酶^[39],如 β -丙氨酸代谢、组氨酸代谢、丙酮酸代谢和色氨酸代谢等,其相关基因在不同时期均有上调,可能是为了提供更多的能量和碳源,促进木质素降解。3,4-二羟基苯基乙酸 2,3-双加氧酶^[40]是催化儿茶酚外二醇裂解的关键酶。综上,推测其对脱碱木质素的降解途径为苯甲酸代谢途径与原儿茶酸代谢途径。

4 结论

中国东北地区平均气温低且低温周期长,木质素难以有效降解利用。本研究围绕低温木质素降解菌的分离开展,并对其培养条件优化,选取不同时间段的菌株样本通过转录组学研究低温下不同时间段的菌株 N2 的基因表达水平。

(1) 本试验筛选得到一株低温木质素降解细菌 N2, 其 MnP 酶活最高为 152.26 U/mL。

(2) 最佳培养条件为: 脱碱木质素 0.5 g/L, 酵母粉 5.0 g/L, 胰蛋白胨 2.5 g/L, NaCl 5.0 g/L, pH 6.5, 装液量为 50 mL/100 mL, 温度 15 °C、转速 150 r/min 振荡培养箱中培养。此时木质素降解率提升至 31.7%, 比优化前提高了 10.9%。

(3) 低温下木质素降解过程中时序上的基因表达差异体现了该菌株在不同生长时期的代谢策略, 根据其转录基因与表达水平对该菌株代谢木质素通路进行推测, 为深入理解木质素降解细菌的生理特性和分子机制提供了新的线索和数据。

(4) 该菌株在低温环境下的生长状态良好且具有一定的木质素降解能力, 为寒区秸秆降解微生物资源提供了新的菌种资源。

REFERENCES

- [1] BAI W, ZHANG L, YAN L, WANG XY, ZHOU ZQ. Crop straw resource utilization as pilot policy in China: an event history analysis[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2023, 20(5): 3939.
- [2] HIMMEL ME, DING SY, JOHNSON DK, ADNEY WS, NIMLOS MR, BRADY JW, FOUST TD. Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels production[J]. *Science*, 2007, 315(5813): 804-807.
- [3] GUAN WX, CHEN X, JIN SH, LI C, TSANG CW, LIANG CH. Highly stable Nb₂O₅-Al₂O₃ composites supported Pt catalysts for hydrodeoxygenation of diphenyl ether[J]. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 2017, 56(47): 14034-14042.
- [4] LIU QQ, LUO L, ZHENG LQ. Lignins: biosynthesis and biological functions in plants[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 335.
- [5] LUO J, LIU TL. Electrochemical valorization of lignin: Status, challenges, and prospects[J]. *Journal of Bioresources and Bioproducts*, 2023, 8(1): 1-14.
- [6] LI F, ZHAO YQ, XUE L, MA FY, DAI SY, XIE SX. Microbial lignin valorization through depolymerization to aromatics conversion[J]. *Trends in Biotechnology*, 2022, 40(12): 1469-1487.
- [7] ARAKI T, TANATANI K, KAMIMURA N, OTSUKA Y, YAMAGUCHI M, NAKAMURA M, MASAI EJ. The syringate *O*-demethylase gene of *Sphingobium* sp. strain SYK-6 is regulated by DesX, while other vanillate and syringate catabolism genes are regulated by DesR[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2020, 86(22): e01712-20.
- [8] WADA A, PRATES ÉT, HIRANO R, WERNER AZ, KAMIMURA N, JACOBSON DA, BECKHAM GT, MASAI E. Characterization of aromatic acid/proton symporters in *Pseudomonas putida* KT2440 toward efficient microbial conversion of lignin-related aromatics[J]. *Metabolic Engineering*, 2021, 64: 167-179.
- [9] NIU JY, LI XF, QI XG, REN YP. Pathway analysis of the biodegradation of lignin by *Brevibacillus thermoruber*[J]. *Bioresource Technology*, 2021, 341: 125875.
- [10] 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.
- [11] CHEN YH, CHAI LY, ZHU YH, YANG ZH, ZHENG Y, ZHANG H. Biodegradation of kraft lignin by a bacterial strain *Comamonas* sp. B-9 isolated from eroded bamboo slips[J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 112(5): 900-906.
- [12] 青格尔, 于晓芳, 高聚林, 王志刚, 胡树平, 孙继颖, 屈佳伟, 韩升才. 复合菌系 GF-20 低温降解玉米秸秆过程中群落演替与理化特性[J]. *微生物学通报*, 2021, 48(8): 2681-2694.
- [12] QINGGEER, YU XF, GAO JL, WANG ZG, HU SP, SUN JY, QU JW, HAN SC. Microbial community succession and straw degradation characteristics at low temperature in the composite microbial system

- GF-20[J]. *Microbiology China*, 2021, 48(8): 2681-2694 (in Chinese).
- [13] 张鑫, 青格尔, 高聚林, 于晓芳, 胡树平, 张必周, 韩升才, 冯彪. 玉米秸秆低温降解复合菌的筛选及其菌种组成[J]. *农业环境科学学报*, 2021, 40(7): 1565-1574.
ZHANG X, QINGGEER, GAO JL, YU XF, HU SP, ZHANG BZ, HAN SC, FENG B. Screening and composition of the microbial consortium with corn straw decomposition under low temperature[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(7): 1565-1574 (in Chinese).
- [14] CAGIDE C, MARIZCURRENA JJ, VALLÉS D, ALVAREZ B, CASTRO-SOWINSKI S. A bacterial cold-active dye-decolorizing peroxidase from an Antarctic *Pseudomonas* strain[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2023, 107(5/6): 1707-1724.
- [15] JIANG C, CHENG Y, ZANG HL, CHEN X, WANG Y, ZHANG YT, WANG JM, SHEN XH, LI CY. Biodegradation of lignin and the associated degradation pathway by psychrotrophic *Arthrobacter* sp. C2 from the cold region of China[J]. *Cellulose*, 2020, 27(3): 1423-1440.
- [16] JIANG C, YAN HH, SHEN XH, ZHANG YT, WANG Y, SUN SS, JIANG HY, ZANG HL, ZHAO XY, HOU N, LI ZW, WANG LW, WANG HJ, LI CY. Genome functional analysis of the psychrotrophic lignin-degrading bacterium *Arthrobacter* sp. C2 and the role of DyP in catalyzing lignin degradation[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 13: 921549.
- [17] FURHAN J. Adaptation, production, and biotechnological potential of cold-adapted proteases from psychrophiles and psychrotrophs: recent overview[J]. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2020, 18(1): 36.
- [18] SANTIAGO M, RAMÍREZ-SARMIENTO CA, ZAMORA RA, PARRA LP. Discovery, molecular mechanisms, and industrial applications of cold-active enzymes[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2016, 7: 1408.
- [19] GRAUMANN P, MARAHIEL MA. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock[J]. *Archives of Microbiology*, 1996, 166(5): 293-300.
- [20] CASANUEVA A, TUFFIN M, CARY C, COWAN DA. Molecular adaptations to psychrophily: the impact of 'omic' technologies[J]. *Trends in Microbiology*, 2010, 18(8): 374-381.
- [21] ZHAO Y, WAKAMATSU T, DOI K, SAKURABA H, OHSHIMA T. A psychrophilic leucine dehydrogenase from *Sporosarcina psychrophila*: Purification, characterization, gene sequencing and crystal structure analysis[J]. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2012, 83: 65-72.
- [22] CHOI JY, KIM SC, LEE PC. Comparative genome analysis of *Psychrobacillus* strain PB01, isolated from an iceberg[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2020, 30(2): 237-243.
- [23] 徐冉, 王海峰, 李风亭. 溶菌酶脂质体的制备及其对生物膜的剥离作用[J]. *同济大学学报(自然科学版)*, 2011, 39(1): 90-93, 120.
XU R, WANG HF, LI FT. Lysozyme-liposome Synthesis and Its Capability in Biofilm Removal[J]. *Journal of Tongji University (Natural Science Edition)*, 2011, 39(1): 90-93, 120 (in Chinese).
- [24] 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).
- [25] WILSON KH, BLITCHINGTON RB. Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(7): 2273-2278.
- [26] 徐红敏. *Sporosarcina* sp. N2 的筛选及木质素降解功能基因的转录组学研究[D]. 大庆: 黑龙江八一农垦大学硕士学位论文, 2023.
XU HM. Screening and the Transcriptomic studies of lignin degrading functional genes of *Sporosarcina* sp. N2[D]. Daqing: Master's Thesis of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2023 (in Chinese).
- [27] BLANCHETTE RA. Degradation of the lignocellulose complex in wood[J]. *Canadian Journal of Botany*, 1995, 73(S1): 999-1010.
- [28] KUWAHARA M, GLENN JK, MORGAN MA, GOLD MH. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*[J]. *FEBS Letters*, 1984, 169(2): 247-250.
- [29] MILLER NJ, RICE-EVANS C, DAVIES MJ, GOPINATHAN V, MILNER A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates[J]. *Clinical Science*, 1993, 84(4): 407-412.
- [30] XU SZ, CHEN X, TANG QL, LI A, LU XH, LIU XJ,

- YU FW. Pyrolysis of dealkaline lignin to phenols by loading grinding beads in a rotary kiln reactor[J]. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 2023, 169: 105824.
- [31] LARKIN JM, STOKES JL. Isolation of psychrophilic species of *Bacillus*[J]. *Journal of Bacteriology*, 1966, 91(5): 1667-1671.
- [32] YAN WK, XIAO X, ZHANG Y. Complete genome sequence of the *Sporosarcina psychrophila* DSM 6497, a psychrophilic *Bacillus* strain that mediates the calcium carbonate precipitation[J]. *Journal of Biotechnology*, 2016, 226: 14-15.
- [33] REN JS, NETTLESHIP JE, SAINSBURY S, SAUNDERS NJ, OWENS RJ. Structure of the cold-shock domain protein from *Neisseria meningitidis* reveals a strand-exchanged dimer[J]. *Acta Crystallographica*, 2008, 64(Pt 4): 247-251.
- [34] VERMA M, EKKA A, MOHAPATRA T, GHOSH P. Optimization of kraft lignin decolorization and degradation by bacterial strain *Bacillus velezensis* using response surface methodology[J]. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2020, 8(5): 104270.
- [35] 李锋. 白蚁肠道降解木质素细菌资源挖掘及代谢过程与机制研究[D]. 镇江: 江苏大学博士学位论文, 2019.
- LI F. Research on the symbiotic bacteria on lignin degradation from termite guts system and its metabolic mechanism[D]. Zhenjiang: Doctoral Dissertation of Jiangsu University, 2019 (in Chinese).
- [36] TAKAHASHI K, MIYAKE K, HISHIYAMA S, KAMIMURA N, MASAI E. Two novel decarboxylase genes play a key role in the stereospecific catabolism of dehydrodiconiferyl alcohol in *Sphingobium* sp. strain SYK-6[J]. *Environmental Microbiology*, 2018, 20(5): 1739-1750.
- [37] EGLAND PG, PELLETIER DA, DISPENSA M, GIBSON J, HARWOOD CS. A cluster of bacterial genes for anaerobic benzene ring biodegradation[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(12): 6484-6489.
- [38] HILLMER P, GOTTSCHALK G. Solubilization and partial characterization of particulate dehydrogenases from *Clostridium kluyveri*[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 1974, 334(1): 12-23.
- [39] XU ZY, PENG B, KITATA RB, NICORA CD, WEITZ KK, PU YQ, SHI TJ, CORT JR, RAGAUSKAS AJ, YANG B. Understanding of bacterial lignin extracellular degradation mechanisms by *Pseudomonas putida* KT2440 via secretomic analysis[J]. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 2022, 15(1): 117.
- [40] ZHANG XW, HUANG ZH, WANG D, ZHANG Y, ESER BE, GU ZY, DAI RR, GAO RJ, GUO Z. A new thermophilic extradiol dioxygenase promises biodegradation of catecholic pollutants[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 422: 126860.