

一株高效木质素降解菌的筛选、鉴定及降解效果评价

李文才¹, 战利², 韩月颖³, 张喜庆³, 高云航^{1*}

(1. 德惠市畜牧总站, 吉林 德惠 130300; 2. 长春职业技术学院现代农业学院, 长春 130033; 3. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118)

摘要:为筛选高效木质素降解菌, 有效提高农业秸秆降解效率, 本试验从长白山阔叶林土壤采样, 通过苯胺蓝-鉴别培养基初筛、酶活性复筛的方法进行菌株分离筛选, 对筛得的高效目的菌株进行 16S rRNA 菌种鉴定。为提高菌株产酶性能, 选择碳源、氮源及初始 pH 值、培养温度、接种量和时间等因素, 采用正交试验进行产酶条件优化, 后进行秸秆固态发酵试验, 验证其降解能力。结果表明, 复筛所得菌株 DT-2 具有较高酶活性, 可作为目的菌株进行下一步试验, 经鉴定其属于枯草芽孢杆菌。产酶优化试验结果显示, 菌株 DT-2 在以木质素为唯一碳源、尿素为唯一氮源、初始 pH 值 6、培养温度 37 °C、接种量 5%、培养时间 30 h 时, 其产酶效果最佳, 其中 Lip 酶活为 38.44 U/mL, Lac 酶活为 26.78 U/mL, Mnp 酶活为 35.56 U/mL。固态发酵试验结果显示, 对照组秸秆失重率为 2.1%, 试验组秸秆失重率为 13.5%, 降解效率提高 20 倍以上。综上所述, 本研究分离得到的菌株 DT-2 具有较高木质素降解酶活性, 可有效提高秸秆降解效率, 在农业秸秆无害化处理方面具有良好的应用前景。

关键词:木质素; 降解菌; 产酶优化; 正交试验; 秸秆降解

中图分类号: X172

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2023)06-0125-07

Screening, Identification and Degradation Effect Evaluation of a High-Efficiency Lignin Degrading Bacteria

LI Wencai¹, ZHAN Li², HAN Yueying³, ZHANG Xiqing³, GAO Yunhang^{2*}

(1. Dehui City Animal Husbandry General Station, Dehui 130300; 2. College of Modern Agriculture, Changchun Vocational and Technical College, Changchun 130033; 3. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: In order to screen high-efficiency lignin-degrading bacteria, effectively improve the degradation efficiency of agricultural straw. In this experiment, samples were collected from the broad-leaved forest soil in Changbai Mountain, and strains were isolated and screened through the method of aniline blue-differentiation medium primary screening and enzyme activity re-screening. The screened high-efficiency target strains were identified for 16S rRNA strains. In order to improve the enzyme production of the strains Performance, select carbon source, nitrogen source and initial pH, culture temperature, inoculation amount and time, etc. We use orthogonal test to optimize enzyme production conditions, and then conduct straw solid state fermentation test to verify its degradation ability. The results show that the strain DT-2 obtained by the re-screening has high enzyme activity and can be used as the target strain for the next test, it was identified as *Bacillus subtilis*. The results of the enzyme production optimization test showed that when the strain DT-2 uses lignin as the only carbon source and urea as the only nitrogen source, the initial pH value is 6, the cultivation temperature is 37 °C, the inoculum amount is 5%, and the cultivation time is 30 h. The activity has the optimal value, in which Lip enzyme activity is 38.44 U/mL, Lac enzyme activity is 26.78 U/mL, Mnp enzyme activity is 35.56 U/mL. The results of the solid-state fermentation test showed that the straw weight loss rate in the control group was 2.1%, and the straw weight loss rate in the test group was 13.5%, and the

收稿日期: 2022-12-26

基金项目: 国家重点研发计划专项(2022YFD1601203、2022YFD1602501); 吉林省科技发展计划项目(JL2023-07); 国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-37)

作者简介: 李文才(1969-), 男, 高级兽医师, 从事动物疾病防控及养殖场环境控制研究。

通讯作者: 高云航, 男, 博士, 教授, E-mail: gaoyunhang@163.com

degradation efficiency was increased by more than 20 times. In summary, the strain DT-2 isolated in this study has high lignin-degrading enzyme activity, can effectively improve the efficiency of straw degradation, and has a good application prospect in the harmless treatment of agricultural straw.

Key words: Lignin; Degrading bacteria; Enzyme production optimization; Orthogonal test; Straw degradation

木质素作为生态系统中第二位丰富的有机物来源广泛,能够满足可再生能源要求^[1],是打造生态经济的一种可持续性资源。作为农业和工业生产过程中的废弃物,木质素造成环境污染和资源浪费。农业方面,我国为农作物生产大国,秸秆产量约占世界总产量的1/3^[2],大部分秸秆无法得到有效处理,其主要原因是作为植物细胞壁主要组成成分的木质素难以自然高效降解^[3]。工业方面,在木材生产和造纸产业中,木质素作为副产物造成水资源环境的高污染且处理成本较高^[4]。因此,研究高效且环保的木质素降解方法具有重要意义。

木质素虽难降解,但仍可被某些微生物分解,其中真菌、细菌和放线菌占主导作用^[5-6]。微生物降解木质素是在木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶的协同作用下完成的^[7]。Kirk等^[8]1983年首次从真菌胞外液中发现参与木质素降解的木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶。自此,微生物分泌木质素降解酶的相关研究逐渐成为热点。为提高微生物的产酶性能,研究人员进行大量产酶优化试验。大量研究表明,影响木质素降解酶活性的因素主要有碳氮源、温度、时间、pH值及接种量等。以酶活性为评价指标,对一株白腐真菌的产酶条件进行优化,包括碳氮源、pH值、时间和底物浓度等,优化后的酶活性较之前提高6~8倍^[9]。对一株白腐真菌所产锰过氧化物酶的条件进行优化,使得酶活性提高3.59倍^[10]。由此可见,产酶优化可以提高木质素降解酶活性,酶活性的高低与微生物对木质素降解率密切相关。目前,在筛选具有木质素降解功能的微生物研究中,细菌由于生长繁殖速度快、结构简单以及生物多功能性和强大的环境适应性等特点,逐渐成为近年来木质素降解的主要研究方向。本试验从长白山阔叶林长期自然腐烂树叶下土壤中分离获得一株具有高效木质素降解能力的菌株DT-2,通过单因素试验和正交试验对其进行产酶条件优化,通过方差分析研究各因素对不同降解酶的影响差异性,通过固态发酵试验研究其对秸秆的降解效率,以期为木质素高效降解及农业秸秆无害化处理方面提供优质微生物菌种资源和一定理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品来源

样本采自长白山阔叶林自然腐烂树叶下的土壤;玉米秸秆购自吉林省五禾源科技有限公司。

1.1.2 培养基

木质素培养基:蛋白胨0.2 g,木质素0.6 g, NaCl 1 g,琼脂粉3 g,蒸馏水200 mL,pH值自然,121 °C高压灭菌。

苯胺蓝培养基:将1%的苯胺蓝母液按1%体积比加入LB培养基中,121 °C高压灭菌。

发酵培养基:木质素1 g,牛肉膏1 g,NaCl 1 g,蛋白胨2 g,蒸馏水200 mL,pH值自然,121 °C高压灭菌。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株筛选

富集:将5 g土壤样品装入200 mL生理盐水中,在37 °C,120 r/min的恒温摇床中振荡混匀3 h。静置1 h后稀释涂板。

初筛:采用苯胺蓝脱色法^[11]初步筛选出具有产木质素降解酶能力的菌株,测量透明圈直径。

复筛:将初筛得到的菌株培养至浓度为 1.0×10^8 CFU/mL。菌液以1%接种量接种至50 mL发酵培养基中,37 °C,120 r/min培养30 h。4 °C,8 000 r/min离心10 min,取上清作为粗酶液进行酶活性测定。

1.2.2 酶活性测定

木质素过氧化物酶(Lip)和锰过氧化物酶(Mnp)酶活性测定参照Chen等^[12]方法。漆酶(Lac)酶活性测定参照Nakagawa等^[13]方法。

1.2.3 菌株鉴定

将复筛出的菌株进行菌落形态观察和革兰氏染色,根据《常见细菌系统鉴定手册》^[14]进行生理生化试验鉴定。

细菌DNA的提取按照基因组提取试剂盒进行。以菌株DNA为模板,使用16S rRNA通用引物进行PCR扩增,PCR产物经纯化、连接、转化,提取质粒送至上海生工生物工程有限公司进行测序分析,测序结果在GenBank数据库中进行Blast比对分析,利用MEGA 7.0软件构建系统发育树。

1.2.4 培养基组分优化

分别选取木质素、葡萄糖、蔗糖、秸秆粉、麸皮和淀粉作为唯一碳源,进行菌株产酶的碳源单因素优化。选取蛋白胨、酵母粉、酒石酸钠、尿素、硫酸铵和氯化铵作为唯一氮源,进行菌株产酶的氮源单因素优化。

1.2.5 培养条件优化

在优化好培养基碳氮源的基础上,对培养条件进行单因素优化,包括pH值、培养温度、菌液接种量和培养时间。pH值选取4、5、6、7、8、9,温度选取27、32、37、42、47℃,接种量选取1%、3%、5%、7%、9%,时间选取25、30、35、40、45h。

1.2.6 培养条件正交优化试验设计

以单因素试验结果为基础,对温度、pH值、接种量和时间四个因素进行 $L_9(3^4)$ 的正交试验,试验因素与水平设计见表1。

表1 菌株正交试验因素水平设计

水平	A. pH	B. 温度(°C)	C. 接种量(%)	D. 时间(h)
1	5	32	1	30
2	6	37	3	35
3	7	42	5	40

1.2.7 固态发酵测定秸秆木质素降解率

玉米秸秆粉碎至1~2cm,高压灭菌,105℃烘干。将秸秆与菌液按1:1的体积比接种至200mL优化后的产酶培养基中进行固态发酵,对照组接种生理盐水。3d后取发酵秸秆烘干至恒重,测定秸秆失重率,采用Van soest酸性洗涤法^[15]测定木质素含量,计算木质素降解率。

失重率(%)=

$$\frac{\text{发酵前秸秆干重} - \text{发酵后秸秆干重}}{\text{发酵前秸秆干重}} \times 100$$

木质素降解率(%)=

$$100 - 100 \times (1 - \text{失重率}) \times \frac{\text{降解前木质素含量}}{\text{降解后木质素含量}}$$

1.3 数据分析

采用Excel 2019进行试验数据计算,Graph

Prism 7.0进行绘图,SPSS 24.0进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 降解菌株的筛选

经苯胺蓝初筛共获得4株产生透明圈的菌株。对4株菌进行酶活性测定复筛(表2),结果发现菌株DT-2产酶效果最佳,故将其作为目标菌株进行后续研究。

表2 菌株酶活性测定结果

菌株	Lip	Lac	Mnp
DT-1	13.22	5.01	21.43
DT-2	24.66	2.34	30.31
DT-3	17.44	-	20.16
DT-5	-	2.56	6.28

2.2 菌株鉴定

菌株DT-2在LB培养基上培养12h后菌落呈现灰白色或淡黄色,表面粗糙且形态不规则,如图1(a)所示。染色镜检可见菌体呈蓝紫色,短杆状,如图1(b)所示。生化试验结果见表3。

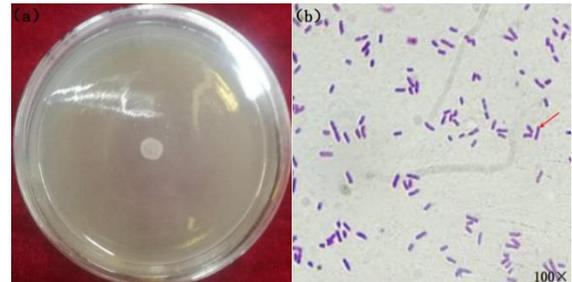


图1 菌株DT-2的菌落形态(a)和革兰氏染色(b)

菌株DT-2 PCR扩增产物核苷酸序列长度为1456bp,将序列在GenBank数据库中进行Blast比对,利用MEGA 7.0软件构建系统发育树,结果显示菌株DT-2与枯草芽孢杆菌在同一个分支上,综合形态学特征及生理生化试验结果,确定DT-2为枯草芽孢杆菌。

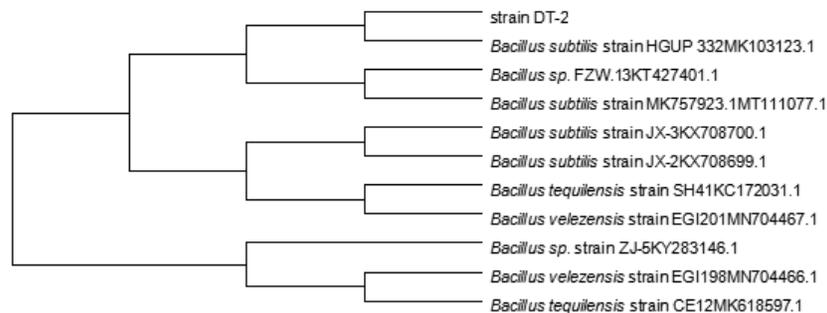


图2 菌株DT-2的16S rRNA系统发育树

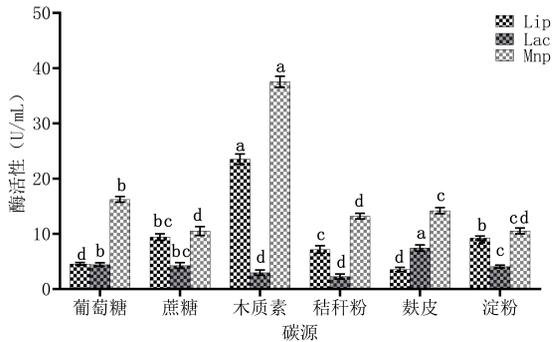
表3 DT-2菌株生理生化试验结果

项目	结果	项目	结果
甘露醇	+	淀粉水解	+
甲基红	+	明胶液化	+
吲哚试验	-	尿酶反应	+
蔗糖	+	溶菌酶	-
V-P试验	+	硝酸盐还原	-
葡萄糖	+	木糖	+
乳糖	-	酪素	+
半乳糖	-	柠檬酸盐	+

注：“+”代表阳性反应，“-”代表阴性反应

2.3 最佳碳源的确定

碳源作为细菌生长的主要能源,对其产酶能力影响较大。本试验探索了不同碳源条件下菌株的产酶能力情况。如图3所示,当以木质素为唯一碳源时,Lip和Mnp酶活性均显著高于其他碳源条件下的酶活性($P<0.05$),分别为24.66、37.37 U/mL,麸皮条件下的Lac酶活性最高,综合三种酶共同作用的情况,最终选择木质素作为最优的唯一碳源。



注:小写字母不同表示差异显著($P<0.05$),下同

图3 碳源对于菌株DT-2酶活性的影响

2.4 最佳氮源的确定

氮源主要提供细菌生长过程中氨基酸、蛋白质、核酸等合成所需的氮元素。本试验中不同氮源条件下菌株的产酶情况如图4所示。当以尿素

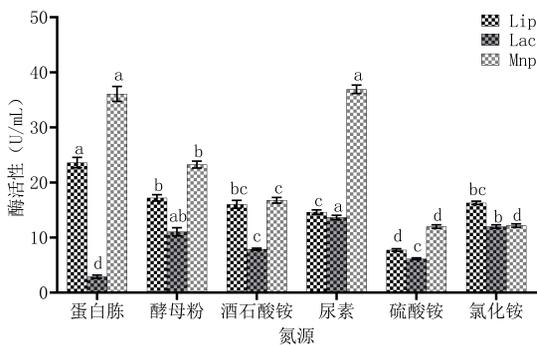


图4 氮源对于菌株DT-2酶活性的影响

作为氮源时,Mnp和Lac酶活性均高于其他氮源下酶活性,Lip、Lac和Mnp三种酶活性分别为12.33、12.00、35.99 U/mL,最终确定尿素为最优唯一氮源。

2.5 单因素优化试验

2.5.1 不同起始pH值对酶活性的影响

由图5可知,三种木质素降解酶酶活性随pH值升高呈先升高后下降的趋势,在pH值为6时,三种酶活性最高,与其他pH值条件下的酶活性差异显著($P<0.05$)。

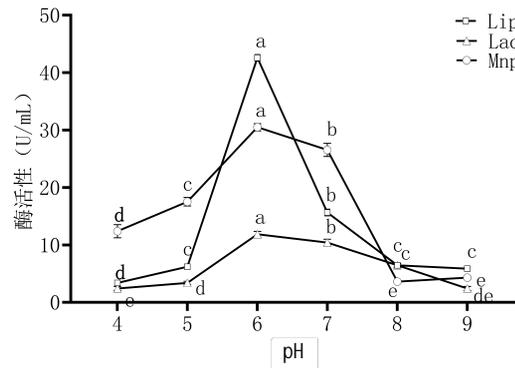


图5 pH对于菌株DT-2酶活性的影响

2.5.2 不同温度对酶活性的影响

由图6可知,三种降解酶对温度选择敏感,过低或过高的温度均能显著抑制酶活性,当温度由27℃升至37℃时,三种酶酶活性呈现明显的上升趋势,随后急剧下降。在37℃条件下时,三种酶活性均显著高于其他温度下的酶活性($P<0.05$),因此确定37℃为最佳培养温度。

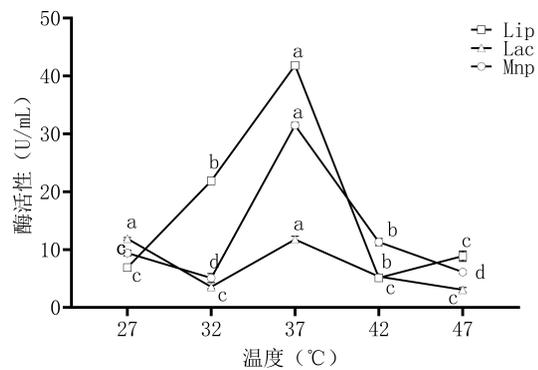


图6 温度对于菌株DT-2酶活性的影响

2.5.3 不同接种量对酶活性的影响

由图7可知,当接种量为1%时,菌液浓度过低,木质素降解酶的生产与积累过少。当接种量为5%~9%时,菌液浓度过高,产酶培养基的溶氧量减少,酶活性降低。当接种量为3%时,Lip和Mnp酶活性最高($P<0.05$),Lac酶活性相比9%接

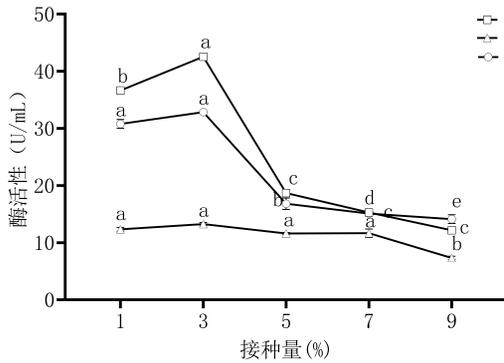


图7 接种量对于菌株DT-2酶活性的影响

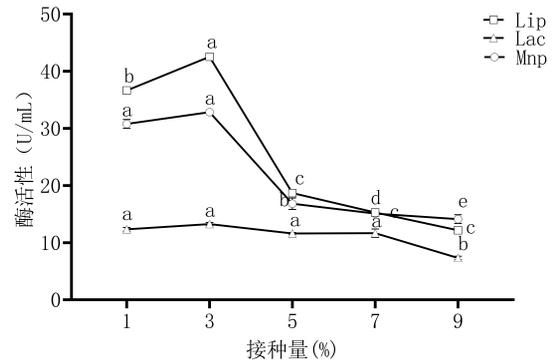


图8 接种量对于菌株DT-2酶活性的影响

接种量条件下差异显著($P < 0.05$), 相比于1%和5%接种量差异不显著($P > 0.05$)。综合可知, 最佳接种量为3%。

2.5.4 不同培养时间对酶活性的影响

由图8可知, Lip和Mnp在培养35 h后酶活性达到最高, 显著高于其他培养时间($P < 0.05$); Lac在培养30 h和35 h后均与其他时间差异显著($P < 0.05$)。因此, 35 h为最佳培养时间, Lip、Lac和Mnp三种酶活性分别为42.44、27.68、32.00 U/mL。

2.6 正交试验结果

对初始pH值、发酵温度、菌液接种量、培养时间四个因素进行的 $L_9(3^4)$ 正交试验结果与分析见表4, 方差分析结果见表5。

通过表4比较R值可知, 四种因素对Lip和Lac酶活性影响大小为B(温度) $>$ A(pH值) $>$ C(接种量) $>$ D(时间), 对Mnp酶活性影响大小为B(温度) $>$ A(pH值) $>$ D(时间) $>$ C(接种量)。极差结果显示, Lip和Lac产酶条件最优组合为 $A_2B_2C_3D_1$,

表4 影响三种酶活性正交试验结果

	水平	A. pH	B. 温度(°C)	C. 接种量(%)	D. 时间(h)	Lip(U/mL)	Lac(U/mL)	Mnp(U/mL)
	1	5	32	1	30	12.44	10.65	16.87
	2	5	37	3	35	28.14	14.76	23.26
	3	5	42	5	40	3.44	5.27	9.90
	4	6	32	3	40	30.28	17.36	25.74
	5	6	37	5	30	35.44	26.78	31.56
	6	6	42	1	35	8.73	8.76	10.56
	7	7	32	5	35	10.45	15.24	20.17
	8	7	37	1	40	20.89	20.16	28.41
	9	7	42	3	30	9.67	6.50	11.70
Lip	K_1	44.02	53.17	42.06	57.55			
	K_2	74.45	84.47	68.09	47.32			
	K_3	41.01	21.84	49.33	54.61			
	R	33.44	62.63	18.76	2.94			
Lac	K_1	30.68	43.25	39.57	43.93			
	K_2	52.90	61.70	38.62	38.76			
	K_3	41.90	20.53	47.29	42.79			
	R	22.22	41.17	8.67	5.17			
Mnp	K_1	50.03	62.78	55.84	60.13			
	K_2	67.86	83.23	60.7	53.99			
	K_3	60.28	32.16	61.13	64.05			
	R	17.83	51.07	5.79	10.06			

表5 正交试验方差分析结果

变异来源		DF	SS	MS	F值	P值
A	Lip	2	247.320	123.658	300.85	0.003
	Lac	2	92.808	46.404	153.44	0.006
	Mnp	2	75.979	37.989	50.85	0.019
B	Lip	2	703.600	351.801	855.91	0.001
	Lac	2	314.535	157.268	520.02	0.002
	Mnp	2	466.375	233.187	312.15	0.003
C	Lip	2	140.610	70.305	171.05	0.006
	Lac	2	14.499	7.250	23.97	0.04
	Mnp	2	8.825	4.413	5.91	0.145
D	Lip	2	23.150	11.573	28.16	0.034
	Lac	2	5.475	2.738	9.05	0.099
	Mnp	2	20.609	10.304	13.79	0.068
误差	Lip	2	0.820	0.411		
	Lac	2	0.605	0.302		
	Mnp	2	1.494	0.747		
总计	Lip	10	1 143.970			
	Lac	10	395.130			
	Mnp	10	541.960			

注: $P>0.05$ 表示差异不显著, $P<0.05$ 表示差异显著, $P<0.01$ 表示差异极显著

Mnp 的最优组合为 $A_2B_2C_3D_3$, $A_2B_2C_3D_3$ 组合未出现在正交表中, 需要对该组合条件下的酶活性进行测定与 $A_2B_2C_3D_1$ 组合进行对比。结果显示 $A_2B_2C_3D_3$ 条件下 Mnp 酶活性为 32.34 U/mL, 这与正交表中最优组合差距较小, 因此三种降解酶的优化组合确定为 $A_2B_2C_3D_1$ 。由表 5 方差分析结果可知, 温度和 pH 值相对于接种量和时间对三种酶的酶活性有着更大的影响, 这与表 4 的极差分析结果一致。

为对试验结果进行验证, 采用优化后的培养基和培养条件进行三次平行试验, 所测得 Lip、Lac 和 Mnp 酶活性分别为 38.44、26.78、35.56 U/mL。

2.7 固态发酵试验结果

经过 3 d 固态发酵后, 木质素含量及降解率结果如图 9 所示。与对照组相比, 试验组中木质素

含量显著降低 ($P<0.05$)。试验组秸秆降解率为 47.5%, 与对照组 2.1% 的降解率相比提高约 20 倍以上, 说明菌株 DT-2 对秸秆中的木质素有显著降解效果。

3 讨论

木质素作为结构复杂的第二大有机物, 探索高效且环保的降解方法逐渐成为国内外研究热点。传统的物理化学方法在处理过程中易造成二次污染, 因此微生物方法逐渐成为主流趋势。目前对于微生物降解木质素的研究多为真菌, 细菌则较少。本试验通过苯胺蓝初筛法从长白山阔叶林长期自然腐烂树叶下的土壤中分离出四株具有产酶效果的细菌, 通过酶活性测定复筛确定菌株 DT-2 相比于其他菌株产酶能力更强, 选择菌株 DT-2 进行后续产酶条件优化和秸秆降解试验研究。

依靠酶作用^[16]进行降解是微生物降解木质素的主要机制, 所以高效产酶能力的微生物在木质素降解方面效果更佳。如将 Lip、Lac、Mnp 三种酶共培养进行碱木质素降解, 去除率达到 28.98%^[17]。为提高烟秆木质素降解率, 对一株粗毛栓菌进行发酵条件优化^[17]。本研究中, 为提高菌株 DT-2 产酶效果及秸秆降解率, 通过单因素和正交试验对其进行产酶条件优化。培养基组成成分优化结果

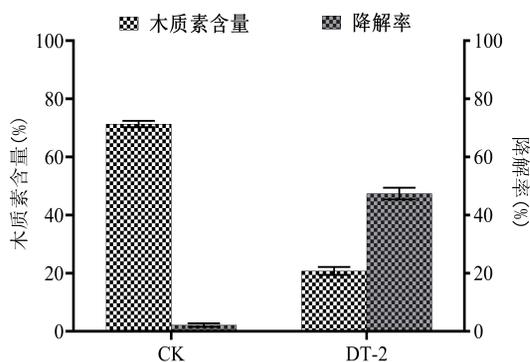


图9 秸秆木质素含量及降解率的测定

表明,当产酶培养基在以木质素和尿素作为碳源和氮源时,菌株DT-2产酶效果最佳^[18]。除培养基的组成会对酶活性有影响外,培养条件也会对菌株酶活性有所影响。对一株木质素的产酶条件进行正交试验优化,结果使得木质素降解率达40.39%^[19]。李丹等^[20]分离到一株高产漆酶的烟管菌,发酵15 d后木质素降解率达66.13%。对菌株DT-2的培养条件优化结果表明,当pH值6,温度37℃,时间30 h,接种量5%时,产酶效果最佳,Lip、Lac和Mnp酶活性分别为38.44、26.78、35.56 U/mL,分别为优化前的1.6、11.4、1.2倍。秸秆降解试验中,菌株DT-2仅发酵3 d,秸秆失重率达13.5%,木质素降解率达47.5%,木质素去除率显著提高。由此可见,同样在条件优化的基础上,本试验所筛选到的菌株DT-2在产酶性能和秸秆降解方面都远远超过Verma等^[19]和李丹等^[20]所筛选到的菌株。此外,与尚洁等^[10]筛选到的白腐真菌相比,菌株DT-2不仅所产Mnp活力较高,而且还具有同时产Lip和Lac的能力。说明该菌株在木质素降解方面具有良好的应用前景。

研究表明,外源化合物的添加同样可以提高微生物的产酶能力。Nayana等^[21]在对一株降解功能菌优化的基础上添加0.5 g/L的Mn²⁺和1.5%的吐温80,结果Lip活力高达345.26 U/mL,这也为后续试验研究提供了方向。本研究筛选到的菌株DT-2无论在产酶方面还是木质素降解方面效果都非常显著,为木质素的降解研究提供了良好的试验依据。

参考文献:

- [1] Mc Cannme, Carpitanc. Biomass recalcitrance: a multiscale, multi-factor, and conversion-specific property [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2015, 66(14):4109-4118.
- [2] 姜立春,赵丽萍,杨萍,等.木质素降解菌BP01的筛选、鉴定及其产酶特性[J].*江苏农业科学*,2018,46(9):241-246.
- [3] Qingquan L, Le L, Luqing Z. Lignins: Biosynthesis and Biological Functions in Plants [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2018, 19(2): 335.
- [4] Chi Z X, Wang Z, Liu Y, et al. Preparation of organosolv lignin-stabilized nano zero-valent iron and its application as granular electrode in the tertiary treatment of pulp and paper wastewater [J].*Chemical Engineering Journal*, 2018, 331: 317-325.
- [5] 王敏.白腐菌降解木质素研究进展[J].*衡水学院学报*, 2011,13(1):51-53.
- [6] 胡雪竹.木质素降解酶的研究进展[J].*安徽农业科学*, 2011,39(11):6326-6328,6363.
- [7] Zhou H, Guo W, Xu B, et al. Screening and identification of lignin-degrading bacteria in termite gut and the construction of LiP-expressing recombinant *Lactococcus lactis*[J]. *Microbial Pathogenesis*, 2017, 112: 63-69.
- [8] Tien M, Kirk T K. Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: Purification, characterization, and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1984, 81(8): 2280-2284.
- [9] 孟庆辉,代莉蓉,崔艳红.黄孢原毛平革菌低温产酶条件优化及酶学性质研究[J].*西北民族大学学报(自然科学版)*, 2009,30(2):66-70.
- [10] 尚洁,刘继芳,隋琼,等.小麦秸秆产锰过氧化物酶白腐真菌的筛选及产酶条件优化[J].*饲料研究*,2020,43(6):63-67.
- [11] 赵敏,钱程.白腐菌木素氧化酶系的检测及其漆酶诱导产生的研究[J].*中国造纸学报*,2005,23(2):107-111.
- [12] Chen Y H, Chai L Y, Zhu Y H, et al. Biodegradation of kraft lignin by a bacterial strain *Comamonas* sp. B-9 isolated from eroded bamboo slips. *Journal of applied microbiology*, 2012: 112(5): 900-906.
- [13] Nakagawa Y, Sakamoto Y, Kikuchi S, et al. A chimeric laccase with hybrid properties of the parental *Lentinula edodes* laccases [J]. *Microbiological Research*, 2010, 165(5): 392-401.
- [14] 东秀珠,蔡妙英.常见细菌系统鉴定手册(第8版)[M].北京:科学出版社,2001:43-63.
- [15] Tsang L J, Reid I D, Coxworth E C. Delignification of Wheat Straw by *Pleurotus* spp. under Mushroom-Growing Conditions [J]. *Applied & Environmental Microbiology*, 1987, 53(6): 1304.
- [16] Weiss R, Guebitz G M, Pellis A, et al. Harnessing the Power of Enzymes for Tailoring and Valorizing Lignin[J].*Trends in Biotechnology*, 2020, 38(11): 369-378.
- [17] Zhang S, Xiao J, Wang G, et al. Enzymatic hydrolysis of lignin by ligninolytic enzymes and analysis of the hydrolyzed lignin products [J]. *Bioresource Technology*, 2020, 304:122975.
- [18] 杨亮,宋丹丹,李琼,等.降烟秆木质素粗毛栓菌液态发酵工艺研究[J].*东北农业科学*,2019,44(4):76-80.
- [19] Verma M, Ekka A, Mohapatra T, et al. 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.
- [20] 李丹,张波,李玉.高产漆酶菌株的筛选及其对秸秆降解初探[J].*吉林农业科学*,2013,38(6):90-94.
- [21] Nayana P, Aiswarya C, Aparna C K, et al. Dataset on optimization of lignin peroxidase production by *Endomelanconioopsis* sp. under submerged fermentation using one factor at a time approach [J]. *Data in Brief*, 2020, 29: 105244.

(责任编辑:王昱)