

DOI: [10.11929/j.swfu.202007011](https://doi.org/10.11929/j.swfu.202007011)

引文格式: 杨雄, 史正军, 赵长林. 高效降解巨龙竹白腐菌株筛选及降解机制研究 [J]. 西南林业大学学报 (自然科学), 2021, 41(6): 1–10.

高效降解巨龙竹白腐菌株筛选及降解机制研究

杨 雄¹ 史正军² 赵长林¹

(1. 西南林业大学生物多样性保护学院, 云南昆明 650233; 2. 西南林业大学化学工程学院, 云南昆明 650233)

摘要: 为了获得高效降解巨龙竹木质素菌株, 采用固体发酵法和化学测定法筛选高效降解巨龙竹木质素的菌株, 并通过形态学与分子系统学相结合方法鉴定菌株; 采用主成分分析揭示存在的降解类型, 运用紫外扫描法揭示木质素初步降解机制。结果表明: 从30株白腐菌株中筛选出1株高效降解巨龙竹木质素的菌株 SWFU000072 *Cerrena zonata*, 该菌株对巨龙竹具有极强的选择性降解木质素作用; 30株白腐菌共存在3种降解类型: 选择性降解木质素、选择性降解综纤维素、强烈选择性降解综纤维素; 3株白腐菌降解后的乙醇提取液在260 nm处无明显的吸收峰, 表明木质素中芳香环结构遭到破坏。白腐菌通过破坏木质素中的芳香环结构完成高效降解巨龙竹木质素的降解机制。

关键词: 白腐菌; 分离纯化; 巨龙竹; 木质素; 选择性降解; 主成分分析

中图分类号:

文献标志码: A

文章编号: 2095-1914(2021)06-0001-10

Screening and Preliminary Degradation Mechanism of White Rot Fungi Strain of *Dendrocalamus sinicus*

Yang Xiong¹, Shi Zhengjun², Zhao Changlin¹

(1. College of Biodiversity Conservation, Southwest Forestry University, Kunming Yunnan 650233, China;
2. School of Chemical Engineering, Southwest Forestry University, Kunming Yunnan 650233, China)

Abstract: In order to obtain high efficient degradation strains of *Dendrocalamus sinicus*, and its initial degradation mechanism, this study employed the solid fermentation method and chemical determination method to screen the strains that could degrade lignin efficiently. The strains were identified by combining morphology with molecular method. The degradation types were revealed by principal component analysis. Ultraviolet scanning was used to reveal the initial degradation mechanism of lignin. The results showed that In this study, the strain SWFU000072 of *Cerrena zonata* was selected from 30 white-rot fungi to degrade lignin efficiently. The strain had strong selective degradation of lignin and caused little loss of synthetic cellulose. There were 3 degradation types in 30 strains of white-rot fungi: selective degradation of lignin, selective degradation of synthetic cellulose, and intense selective degradation of synthetic cellulose. The ethanol extract of the 3 white-rot fungi showed unobvious absorption peak at 260 nm, indicating that the aromatic ring structure in lignin was destroyed, thus it revealed that the white rot fungi could degrade lignin efficiently by destroying the aromatic ring structure in lignin.

Key words: white-rot fungi; isolate and purification; *Dendrocalamus sinicus*; lignin; selective degradation; principal component analysis

收稿日期: 2020-07-04; 修回日期: 2020-09-02

基金项目: 西南林业大学高层次人才专项 (111715) 资助; 国家基金面上项目 (31760194) 资助; 云南省教育厅博士后培养项目 (519008) 资助。

第1作者: 杨雄 (1997—), 男, 本科生。研究方向: 白腐真菌降解木质素。Email: fungixiongy@163.com。

通信作者: 赵长林 (1985—), 男, 博士, 副教授。研究方向: 真菌分子系统。Email: Fungichagnlinz@163.com。

木质素在自然界中含量非常丰富，它是一种拥有极其复杂结构的天然高分子化合物，在高等植物细胞壁中木质素广泛存在，是仅次于纤维素的一种生物多聚体化合物^[1-2]，微生物难以降解木质素的原因在于木质素中各种生物学稳定的复杂键型^[3]。如何高效率的利用这类作物资源为目前所研究的热点课题，传统工业制备纤维素材料的方法不仅浪费大量的化学资源和能源，产生的制浆废液也污染环境^[4-5]；白腐真菌是目前应用广泛的、公认安全环保且无公害的可以将木质素降解为简单无机物的一类微生物^[6]。木材腐朽真菌主要包括白色腐朽菌和褐色腐朽菌两种^[7-8]，其中白色腐朽真菌是木材腐朽真菌中最大的类群，包括大部分木生担子菌、少数子囊菌和半知菌^[9-13]，大多白腐菌可产生漆酶和锰过氧化物酶，极少数能产生木质素过氧化物酶^[14-16]，使木质素发生侧链氧化断裂、 β -芳醚键断裂、芳香环氧化开裂以及苯环上脱甲氧基或甲基化反应而降解^[17]；同时木材腐朽真菌也是森林生物多样性的重要组成部分，在森林生态系统中起着关键的降解还原作用，能维持森林生态系统的物质循环和能量流动^[18-20]。

巨龙竹 (*Dendrocalamus sinicus*) 属禾本科竹亚科牡竹属竹种，热带巨大型丛生竹，为我国特有物种，发现于云南省西南部临沧、西双版纳地区，其生长速度快、经济用途广、生态效益显著，作为一种特色明显的资源植物具有很大的开

发潜力和广泛的应用前景^[21-26]；因该物种发现时间较晚，分布地区科研资金投入不足、科研水平相对落后，对巨龙竹深入开发利用欠缺，尤其在巨龙竹木质素降解研究方面还远远不够^[27-28]，如巨龙竹在制浆造纸、人造板材和生物精炼工业领域有极高的开发潜力，但由于木质素的存在导致纤维素在分离过程中呈现耗能高、污染大、耗时多、产量低、其不仅浪费资源同时污染环境^[4-5, 29]。因此，针对目前存在木质素限制竹资源高效深度开发利用，传统物理化学预处理方法既不经济又不环保的问题，本研究提出利用生物方法降解竹材中的木质素观点，并利用固体发酵法和化学测定法筛选高效降解巨龙竹木质素的菌株；采用形态学与分子系统学相结合方法将该菌株鉴定；通过主成分分析揭示存在的降解类型；运用紫外扫描法揭示木质素初步降解机制。

1 材料与方法

1.1 供试材料及处理

野外调查并采集白色腐朽真菌，并记录采集编号、采集地点、寄主信息，将新鲜标本带回实验室进行分离纯化，将分离纯化出的白色腐朽真菌菌株保存于4℃冰箱备用。本研究共分离纯化出可用于巨龙竹竹材降解的菌株30号（表1），现保藏于西南林业大学真菌标本馆（SWFC）。巨龙竹材料采自于云南省临沧市的沧源地区。

表 1 供试白腐菌株

Table 1 The information for the test strain of white-rot fungi

菌种编号	拉丁学名	采集地点	寄主
SWFU000013	<i>Trametes versicolor</i>	云南省文山州小桥沟自然保护区	阔叶树倒木
SWFU000028	<i>Ganoderma gibbosum</i>	云南省文山州小桥沟自然保护区	阔叶树树桩
SWFU000042	<i>Armillaria cepistipes</i>	云南省文山州小桥沟自然保护区	阔叶树倒木
SWFU000072	<i>Cerrena zonata</i>	云南省文山州小桥沟自然保护区	阔叶树倒木
SWFU000073	<i>Irpea lacteus</i>	云南省文山州八宝镇	阔叶树倒木
SWFU000074	<i>Phlebia acerina</i>	云南省文山州小桥沟自然保护区	阔叶树倒木
SWFU000075	<i>Aleurodiscus</i> sp.	云南省文山州富宁县平耶水库	阔叶树落枝
SWFU000076	<i>Phanerochaete</i> sp.	云南省文山州八宝镇	阔叶树落枝
SWFU000077	<i>Auricularia auricula</i>	云南省昆明市野鸭湖森林公园	阔叶树倒木
SWFU000078	<i>Flammulina velutipes</i>	云南省昆明市野鸭湖森林公园	阔叶树倒木
SWFU000079	<i>Hypsizygus marmoreus</i>	云南省昆明市野鸭湖森林公园	阔叶树倒木
SWFU000080	<i>Ramalina</i> sp.	云南省昆明市野鸭湖森林公园	阔叶树倒木
SWFU000081	<i>Hericium erinaceus</i>	云南省昆明市野鸭湖森林公园	阔叶树倒木

续表 1

菌种编号	拉丁学名	采集地点	寄主
SWFU000082	<i>Lentinula edodes</i>	云南省昆明市野鸭湖森林公园	阔叶树倒木
SWFU000083	<i>Pleurotus ostreatus</i>	云南省昆明市野鸭湖森林公园	阔叶树树桩
SWFU000084	<i>Trametes hirsuta</i>	云南省昆明市西南林业大学校园	阔叶树树桩
SWFU000085	<i>Laetiporus sulphureus</i>	云南省昆明市西南林业大学校园	阔叶树树桩
SWFU000086	<i>Ganoderma applanatum</i>	云南省昆明市黑龙潭公园	阔叶树树桩
SWFU000087	<i>Phlebia rufa</i>	云南省昆明市黑龙潭公园	阔叶树倒木
SWFU000089	<i>Ganoderma australe</i>	云南省昆明市西南林业大学校园	阔叶树树桩
SWFU000090	<i>Inonotus radiatus</i>	云南省昆明市西南林业大学校园	阔叶树倒木
SWFU000091	<i>Phlebia</i> sp.	云南省昆明市西南林业大学校园	阔叶树树桩
SWFU000092	<i>Phlebia</i> sp.	云南省昆明市金殿公园	阔叶树树桩
SWFU000093	<i>Phlebia</i> sp.	云南省昆明市金殿公园	阔叶树树桩
SWFU000094	<i>Phlebia</i> sp.	云南省昆明市金殿公园	阔叶树树桩
SWFU000095	<i>Phlebia</i> sp.	云南省昆明市金殿公园	阔叶树树桩
SWFU000096	<i>Ganoderma</i> sp.	云南省昆明市金殿公园	阔叶树树桩
SWFU000097	<i>Vanderbylia</i> sp.	云南省昆明市西南林业大学校园	阔叶树树桩
SWFU000098	<i>Pycnoporus sanguineus</i>	云南省昆明市昙华寺公园	阔叶树倒木
SWFU000115	<i>Ganoderma lingzhi</i>	云南省文山州小桥沟自然保护区	阔叶树树桩

1.2 竹材降解试验

1.2.1 竹材的固体发酵

1) 将新鲜的巨龙竹切成约 3 cm×1 cm×0.3 cm 的竹片, 放入烘箱 105 °C 烘干至恒质量。

2) 将上述烘干后的竹片取出 5 g (精确到 0.0001) 分别放入培养皿中写上标签, 依次加入适量的水, 充分淹没浸泡 12 h。

3) 到达规定时间后, 沥干表面水分, 121 °C 灭菌 30 min 备用。

4) 取供试菌株菌柄饼 (约 1 cm²) 接种在装有 2% 麦芽浸粉培养基的 250 mL 三角瓶中, 28 °C 湿度 75% 静置培养。

5) 待菌丝长满培养基表面, 放入上述灭菌的 5 g 竹片, 用接种针将其均匀分布于培养基表面, 放入恒温恒湿箱培养箱, 温度 28 °C、湿度 75% 静置培养 30 d; 每个菌种 2 个重复, 未接种的 2 组竹片作为空白对照组。

6) 30 d 天后取出样品, 洗去木片表面的菌丝 (洗的过程应防止竹材的细小部分掉落, 影响失重率的测定), 105 °C 风干至恒质量^[30]。

1.2.2 竹材化学组分的测定

用定性滤纸将上述风干后的样品包好并用棉线捆牢, 参照 GB/T 2677.6 加入苯醇混合液进行抽提, 每小时约 4 次循环, 抽提时间为 6 h, 然后

将抽提好的样本放入烘箱 105 °C 烘至恒质量, 参照国标 GB/T 2677.10—1995 测定综纤维素含量, 参照国标 GB/T 2677.8—1994 测定 Klason 木素含量^[30]。

1.2.3 失重率、木质纤维素降解率及选择系数的计算

$$\text{失重率} = \frac{(\text{原样品质量} - \text{降解后样品质量})}{\text{原样品质量}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{Klason木素降解率} = \frac{\text{Klason木素的降解总量}}{\text{原料中的Klason木素总量}} \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{综纤维素降解率} = \frac{\text{综纤维素降解总量}}{\text{原料中的综纤维素总量}} \times 100\%; \quad (3)$$

$$\text{脱木质素选择系数(SI)} = \frac{\text{Klason木素降解率}}{\text{综纤维素降解率}} \quad (4)$$

1.3 分析方法

1.3.1 主成分分析方法

利用 SPSS 数据分析软件, 将竹材失重率及各化学变量提取 2 个主成分并计算其主成分得分系数。根据得分系数计算出每株菌的主成分得分, 并做出主成分分析散点图^[30]。

1.3.2 紫外扫描分析方法

1) 取 1 g 过 40 目标准筛的竹粉与适量的质量体积分数 2% 的麦芽浸粉培养基装入到三角瓶

中 (250 mL) 灭菌备用;

2) 向上述灭菌后的三角瓶中接入供试菌株的菌饼 (约 1 cm²), 放入培养箱恒温恒湿静置培养 20 d。未接种的作为对照组, 处理同上;

3) 培养 20 d 后, 向每个三角瓶中加入 50 mL 95% 乙醇, 瓶口覆盖上锡箔纸, 50 ℃ 发酵 1 h;

4) 发酵结束后放入冰箱中冷却至室温;

5) 取 2 mL 菌液放于离心管中, 10 000 r/min 离心 2 min;

6) 取上清液以 1 : 10 的比例与 95% 乙醇混合稀释;

7) 室温下测 220 ~ 400 nm 的光谱值^[30]。

1.4 菌株鉴定方法

1.4.1 DNA 提取、PCR 扩增及系统发育分析

OMEGA HP Fungal DNA Kit 试剂盒用于 SWFU 000072 菌株 DNA 基因组提取^[31]。本研究选用 ITS 基因片段完成系统发育分析, 引物 TS5/ITS4^[32], 订购在生工生物工程 (上海) 股份有限公司。ITS 片度 PCR 程序参考木腐菌系统发育研究^[31], 产物纯化和测序均送至北京擎科生物科技有限公司昆明分公司。

DNA 序列用 MAFFT version 7 (<http://mafft.cbr.jp/alignment/server>) 进行比对, 手工校正和去掉两端参差排列后保存为 NBRF/PIR 格式文件, 再用 ClustalX 1.83^[33] 将 NBRF/PIR 格式文件转化为 NEXUS 格式文件以及 PHYLIP 格式文件; 经过编辑后用于系统发育树的构建。系统发育树构建采用 PAUP* 4.0b10^[34] 中的最大简约法 (maximum parsimony analysis); 设置如下: 1) 非模糊排列的缺失位点处理为新特征 (new state); 2) 模糊排列位点不予采用; 3) 进行 1 000 次自持分析^[35]; 4) 所有特征等权; 5) 采用启发式搜索方式 (heuristic search); (6) Max-trees 设为 5 000, 其他参数采用默认值^[35]。

1.4.2 形态学研究方法

宏观研究方法: 肉眼直接观察及在体视显微镜下观察林木腐朽真菌标本以下主要特征并拍照记录:

1) 一般特征: 一年生/多年生, 有柄/菌盖/平伏反转/平伏, 大小, 形状, 厚度, 质地;

2) 菌盖表面: 颜色, 光滑/粗糙, 绒毛/粗毛, 环沟/环带, 边缘薄/厚, 锐/钝, 孔口形状及大小。

显微研究方法: 所有显微研究均在 Nikon Eclipse E 100 显微镜和 Leica DM2500 (375 582) 生

物正置荧光显微镜下进行。利用 Melzer 试剂 (简写为 IKI)、棉蓝试剂 (简写为 CB) 和 5% 氢氧化钾试剂 (简写为 KOH) 作为浮载剂。真菌定名人名称的缩写基于国际缩写标准 Authors of Plant Names^[36]; 有关子实体的颜色术语则根据 Petersen 的《真菌颜色图谱》^[37]。

2 结果与分析

2.1 竹材降解试验结果

采用 30 株白腐菌对巨龙竹竹片开展降解试验, 经过 30 d 培养后, 竹片失重率、综纤维素降解率、酸不溶木质素降解率发生变化 (表 2), 其中失重率表示白腐菌对巨龙竹的分解力, 其失重率越高表明其对巨龙竹的分解能力越强; 由表 2 可知, 巨龙竹竹片的失重率从 0.45% 至 18.36% 不等, 竹材失重率差距较大, 其中 SWFU 000096 的失重率最高为 18.36%, 表明其对巨龙竹的降解能力最强, 两菌株 SWFU 000089, SWFU 000013 次之, 失重率依次为 15.53%, 15.45%。当 Klason 木素降解率与综纤维降解率的比值 (脱木质素选择系数 SI) 大于 1 时, 则可以判断木腐菌产生了选择性脱木质化作用^[30]。根据表 2 中的选择系数 SI 表明, 30 个菌株中有 10 株白腐菌对巨龙竹进行了选择性脱木质化作用, 其菌株编号分别为 SWFU 000072、SWFU 000094、SWFU 000013、SWFU 000084、SWFU 000028、SWFU 000086、SWFU 000074、SWFU 000073、SWFU 000097、SWFU 000080, 其 SI 依次为 3.10、2.71、2.04、1.80、1.70、1.66、1.25、1.22、1.09、1.05; 尽管 SWFU 000096 对巨龙竹的分解能力最强, 但其没有发生脱木质化作用, 它不加选择地降解了木质素和综纤维素, 其综纤维降解率高达 19.16%; 本研究的目的在于筛选高效选择性降解巨龙竹木质素的白腐真菌, 所以该菌株不满足条件。失重率相对于 SWFU 000096 稍低的 3 个菌株 SWFU 000072、SWFU 000094、SWFU 000013, SI 依次为 3.10、2.71、2.04, 表明这 3 个菌株对巨龙竹的选择性脱木质化作用更显著。其中菌株 SWFU 000072 对酸不溶木素的降解率高达 19.65%, 对综纤维素的降解率仅有 6.39%, 且对巨龙竹综纤维损失极少, 综合供试菌株降解巨龙竹的数据分析, 通过 SPSS 软件分析了失重率和选择性系数两者的相关性, 其相关性系数为 0.45012, 其表明 30 株白腐菌降解巨龙竹的能力与其选择性系数之间没有明显的相关关系。

表 2 30 株白腐菌降解巨龙竹 30 d 后各组分情况

Table 2 Degradation of different component of *D. sinicus* treated by 30 white rot fungi for 30 days

编号	失重率/%	酸不溶木素含量/%	综纤维含量/%	酸不溶木素降解率/%	综纤维降解率/%	选择性系数 (SI)
SWFU000072	9.94	19.65	68.34	19.79	6.39	3.10
SWFU000094	9.69	19.93	67.97	18.66	6.89	2.71
SWFU000013	15.45	19.08	65.08	22.13	10.85	2.04
SWFU000084	9.46	21.69	68.63	11.45	6.38	1.80
SWFU000028	8.57	21.56	67.85	11.99	7.06	1.70
SWFU000086	13.97	20.73	66.22	15.40	9.30	1.66
SWFU000074	8.55	22.27	67.67	9.10	7.31	1.25
SWFU000073	10.56	21.94	66.75	10.47	8.56	1.22
SWFU000097	6.73	22.70	68.06	7.36	6.77	1.09
SWFU000080	3.96	23.58	70.40	3.75	3.57	1.05
SWFU000090	3.45	23.37	69.50	4.61	4.80	0.96
SWFU000093	3.50	23.56	70.03	3.83	4.07	0.94
SWFU000096	18.36	20.17	59.01	17.69	19.16	0.92
SWFU000075	9.35	22.82	67.44	6.85	7.62	0.90
SWFU000089	15.53	21.83	63.72	10.88	12.71	0.86
SWFU000083	5.55	23.25	68.63	5.11	5.99	0.85
SWFU000087	5.90	22.76	66.82	7.09	8.47	0.84
SWFU000078	3.74	23.61	69.79	3.63	4.41	0.82
SWFU000091	3.55	23.23	68.30	5.18	6.44	0.80
SWFU000042	1.51	23.68	69.93	3.36	4.21	0.80
SWFU000077	7.04	23.03	67.20	6.00	7.95	0.75
SWFU000076	10.64	22.22	63.59	9.30	12.89	0.72
SWFU000115	2.37	24.23	71.86	1.11	1.57	0.71
SWFU000079	3.55	23.80	69.97	2.84	4.15	0.69
SWFU000081	3.60	23.84	69.18	2.71	5.23	0.52
SWFU000095	3.29	24.33	71.84	0.70	1.59	0.44
SWFU000085	5.63	23.95	69.10	2.23	5.35	0.42
SWFU000082	0.45	24.32	71.61	0.73	1.91	0.38
SWFU000098	9.96	23.45	64.57	4.30	11.55	0.37
SWFU000092	3.64	24.06	69.25	1.79	5.14	0.35
空白对照	—	24.50	73.00	—	—	—

2.2 主成分分析结果

为进一步解析 30 株白腐真菌对巨龙的降解类型，利用竹材失重率及各化学变量提取 2 个主成分 (PC)，第 1 主成分和第 2 主成分分别解释了 85.43% 和 12.54% 的变量，其表明 2 个主成分能解释 3 个指标总计 97.97% 的数据量。组分降解率的 3 个指标的数据做主成分分析 (PCA)，其结果显示上述 3 个指标。

主成分分析 (PCA) 结果为：Klason 木质素降解率主成分得分系数 PC1=0.345、PC2=1.221，综纤维降解率主成分得分系数 PC1=0.354、PC2=

1.074，失重率主成分得分系数 PC1=0.382、PC2=0.107 根据上述得分系数利用数据处理软件计算出每株菌的主成分得分，再以表 2 中 30 株白腐菌的编号后 2 位为序号，得出主成分分析散点图 (图 1)，其表明当 PC1 的得分越高，失重率、综纤维素降解率、木质素降解率就越大；当 PC2 的得分越高，菌株降解巨龙竹时选择系数就越高，结果表明 PC2 所反映的是菌株对木质素的选择性降解。本研究主成分分析数据变化规律与微生物在其他植物降解应用研究结果分析趋势相似^[30, 38]。

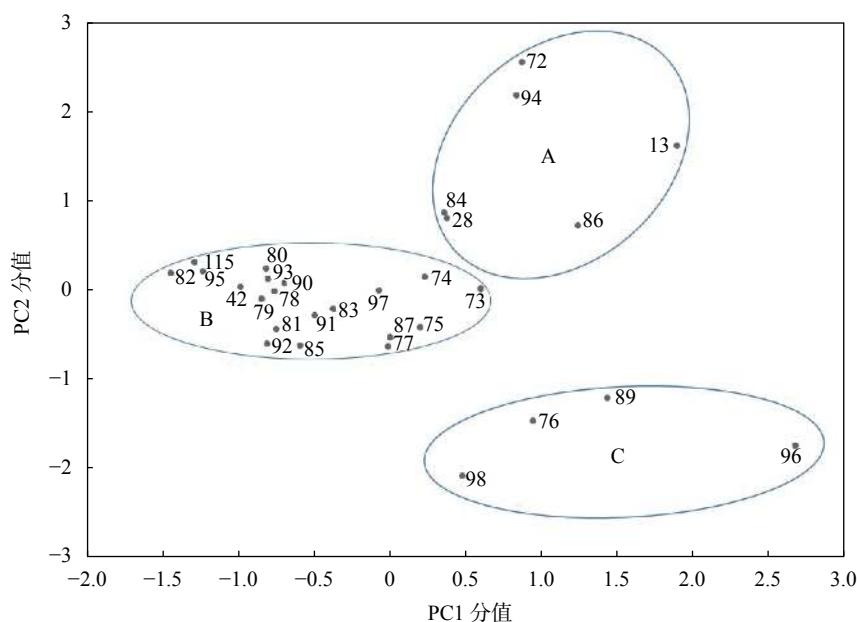


图 1 3 种指标的主成分散点图
Fig. 1 Main dispersion point diagram of 3 indexes

根据主成分分值高低划分类型(图 1)，30 株白腐菌可分为 3 种主要的降解类型：类型 A 包含选择性降解木质素的菌株，菌株的选择系数也越大，PC2 分值也相应增高。类型 B 和 C 都代表选择性降解综纤维素的菌株，但 B 类型中的菌株对木质纤维素的降解能力极其微弱，C 类型中的菌株对巨龙竹综纤维素和木质素的降解能力都较强，尤其对综纤维素的降解能力非常强烈，其降解的强烈程度反映在 PC1 的分值上，PC1 分值越大的菌株则综纤维素降解率越高。图 1 显示 SWFU 000072 的 PC1 得分较低，PC2 得分最高，

其揭示该菌株择性降解木质素能力在 30 株白腐菌中最强。

2.3 紫外扫描分析结果

将选择性系数大于 1 的 3 个菌株 SWFU 000072、SWFU 000013、SWFU 000086 接种于过 40 目筛的巨龙竹粉，发酵 20 d 后用 95% 乙醇对的竹粉进行提取，对其提取液进行紫外光谱扫描，其紫外扫描光谱图(图 2)表明空白对照组的在 260 nm 有明显的吸收峰，该吸收峰代表木质素中芳香环的吸收^[39]；而其他组别在 260 nm 处无明显的吸收峰。

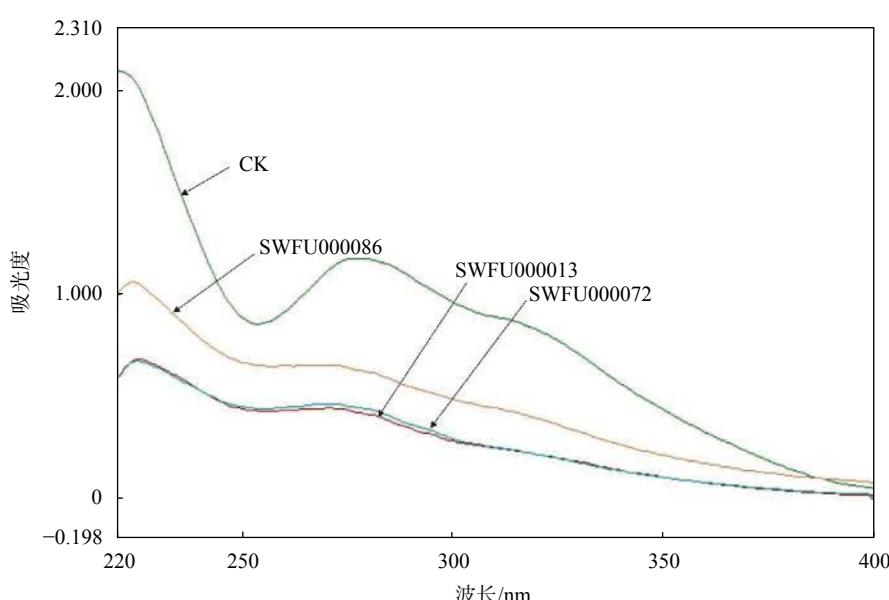


图 2 乙醇提取液的紫外光谱图
Fig. 2 UV spectrum of ethanol extract

2.4 菌株鉴定结果

形态学鉴定结果：如图 3a 所示：担子果 1 年生，菌盖表面具粗毛和轮纹，菌肉异质；如图 3b 所示：子实层体初期为孔状，后期撕裂为齿



图 3 白腐真菌 SWFU 000072 担子果形态特征

Fig. 3 Basidiomata of specimen SWFU 000072

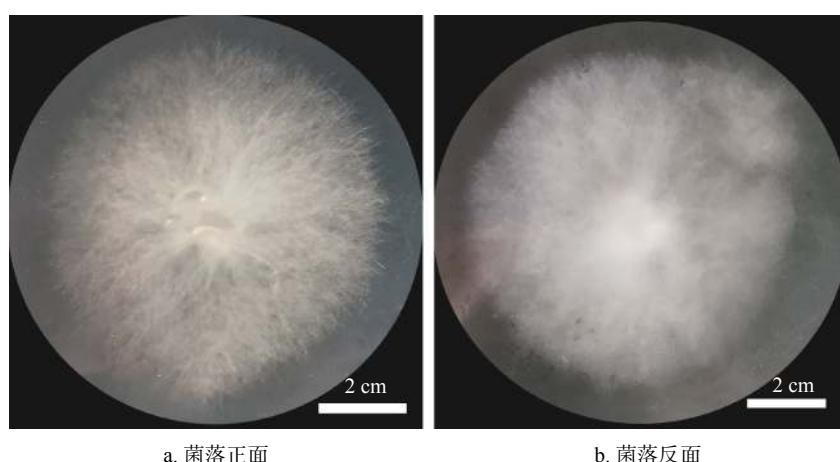


图 4 白腐菌株 SWFU 000072 菌落形态

Fig. 4 Colony characters of white-rot fungi strain SWFU 000072

基于宏观生境特征（图 3）、培养菌落性状及显微菌丝数据（图 4），鉴定其为 *Cerrena* 属水平。

分子系统学鉴定结果：如图 5 所示，基于 ITS 序列构建的系统发育树表明，菌株 SWFU

000072 (GenBank no. MK809429) 在系统发育树中与分子序列 Dai 7872、Dai 7359、JXSB1742 聚为一个支系，且具有高支持率 (100% MP)。因此，该菌株鉴定为 *Cerrena zonata*。

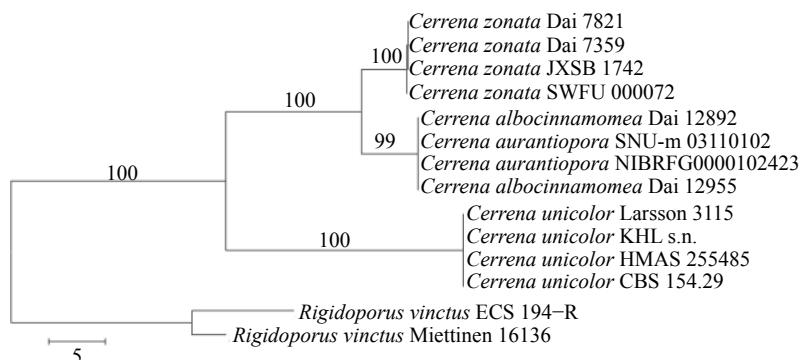


图 5 白腐菌株 SWFU 000072 系统发育树

Fig. 5 The phylogenetic tree of white-rot fungi strain SWFU 000072

3 结论与讨论

本研究从 30 株白腐真菌中筛选出 1 株高效降解巨龙竹木质素的菌株 SWFU 000072，经过形态学与分子系统学鉴定为 *Cerrena zonata*。基于主成分分析（PCA），揭示 30 株白腐菌存在 3 种降解类型：选择性降解木质素、选择性降解综纤维素、强烈地选择性降解综纤维素。通过对巨龙竹粉乙醇提取液进行紫外扫描分析表明木质素中的芳香环结构遭到了破坏，进而揭示了白腐菌通过破坏木质素中的芳香环结构完成高效降解巨龙竹木质素的降解机制。降解木材及农林废弃物木质素的真菌在国内外相继报道，如 *Ceriporiopsis subvermispora*, *Ganoderma australe*, *Lentinus edodes*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*, *Pleurotus ostreatus*, *Stereum hirsutum*, *Trametes versicolor*，其降解类型属白色腐朽^[30, 40–47]。本研究筛选菌株物种为 *Cerrena zonata*，该种隶属于 Cerrenaceae 科，Polyporales 目，与国内已报道多种林木腐朽真菌均为 Polyporales 目，表明该目物种在降解木材及农林废弃物木质素方面具有独特性，且该种为新整合种类^[48]，为未来的深入研究提供了特殊材料。利用白腐真菌降解木质素研究结果揭示白腐菌在木材预处理阶段具有节约资源、减少污染物的排放、提高产能的优势^[49–51]。王伟从 23 株白腐真菌中筛选出 3 个高效降解黑杨木质素的物种，*Funalia trogii* (Berk.) Bondartsev & Singer, *Trametes orientalis* (Yasuda) Imazeki, *Truncospora ochroleuca* (Berk.) Pilát，并提出了 3 株白腐真菌降解黑杨的初步降解机制^[52]。本研究采用巨龙竹为研究对象，研究表明竹材失重率比木材失重率较低，分析其主要原因为竹材与木材木质素不同，竹材属于典型的禾草类木质素^[28]。尽管真菌降解木质素已研究多年，但研究成果从实验室走到大田、生产车间还处在瓶颈期，从成果产出到实际转化、产生效益还有待继续开展深入研究和探索，尽管困难重重，始终坚信通过创新的、严谨的、科学的试验研究必定能开发出适合工业生产的高活性白腐菌株和培养体系，解决木质纤维素材料高效利用的瓶颈问题^[27, 29]。我国竹林面积居世界第一^[53]，竹资源及其丰富，其孕育了竹资源加工利用及产业化高效快速发展的格局，但选择性去除竹材中的木质素极大地限制了竹资源深度利用，已成为竹生物制浆、竹纤维素

制备、竹材综合开发与利用的卡脖子问题，因此如何高效且有选择性的去除竹材中木质素是一项集基础科学研究与产业应用转化于一体亟待解决的问题^[28, 54]。本研究尽管已筛选出高效降解巨龙竹白腐菌株，但是将其从实验室研究转移至产业应用转化还需要筛选出适应性较强的菌株。

随着化石资源枯竭，生物质资源利用研究日益突显。对于巨龙竹这种在制浆造纸、人造板材和生物炼制等工业领域表现出极高的研究开发价值的可再生资源开发利用刻不容缓^[55]，竹木质素的去除还是一个未攻克的难题，由于工业制备纤维素材料时主要靠传统的高温高压、强碱法等方法去除木质素，这样不仅浪费大量的资源和能源也污染环境。本研究筛选出了能够选择性高效降解巨龙竹木质素白腐菌株并对其进行了鉴定，同时对其初步降解机制进行了揭示，为后续的研究提供一定的理论支持。在后续的研究中可选定木腐菌固体发酵培养基成分及培养条件；运用两个或以上菌株同时或先后培养来进行预处理，补足木腐菌在不同降解阶段的不同酶系，优化共生条件使其脱木质程度更高^[52]。

[参 考 文 献]

- [1] Huber G W, Iborra S, Corma A. Synthesis of transportation fuels from biomass: chemistry, catalysts, and engineering [J]. Chemical Reviews, 2006, 106(9): 4044–4098.
- [2] Shankar Tumuluru J, Sokhansanj S, Hess J R, et al. Review: a review on biomass torrefaction process and product properties for energy applications [J]. Industrial Biotechnology, 2011, 7(5): 384–401.
- [3] Chaudhry A S. Chemical and biological procedures to upgrade cereal straws for ruminants [J]. Nutrition abstracts and reviews, 2008, 68(5): 319–331.
- [4] 吴敏雅. 木质素降解方法的研究进展 [C]/2019 中国环境科学学会科学技术年会论文集: 第 4 卷. 北京: 中国环境科学学会, 2019: 509–513.
- [5] 邓诗贵, 杨晨军, 冯加洲, 等. 一株木质素降解白腐菌的筛选、鉴定及其产漆酶培养基的优化 [J]. 食品研究与开发, 2019, 40(16): 178–184.
- [6] Zeng G M, Huang D L, Huang G H, et al. Composting of lead-contaminated solid waste with inocula of white-rot fungus [J]. Bioresource Technology, 2007, 98(2): 320–326.

- [7] Wei Y L, Dai Y C, Wang L, Zou H W. A preliminary study on ecology of wood brown-rot fungi of *Postia* [J]. Forest Research, 2008, 21: 55–59.
- [8] Dai Y C. Polypore diversity in China with an annotated checklist of Chinese polypores [J]. Mycoscience, 2012, 53(1): 49–80.
- [9] Zhao C L, Cui B K. A new species of *Perenniporia* (Polyporales, Basidiomycota) described from Southern China based on morphological and molecular characters [J]. Mycological Progress, 2012, 11(2): 555–560.
- [10] Dai Y C, Cui B K, Si J, et al. Dynamics of the worldwide number of fungi with emphasis on fungal diversity in China [J]. Mycological Progress, 2015, 14(8): 62.
- [11] 李玉, 李泰辉, 杨祝良, 等. 中国大型菌物资源图鉴 [M]. 郑州: 中原农民出版社, 2015.
- [12] Chen J Z, Zhao C L. Morphological and molecular identification of four new resupinate species of Lyomyces (Hymenochaetales) from Southern China [J]. MycoKeys, 2020, 65: 101–118.
- [13] He X, Shi Z J, Zhao C L. Morphological and molecular identification of two new species of *Tubulicrinis* (Hymenochaetaceae, Hymenochaetales) from Southern China [J]. Mycoscience, 2020, 61(4): 184–189.
- [14] 周金燕, 桑原正章. 真菌产生的锰过氧化物酶和漆酶研究Ⅱ. 一株产锰过氧化物酶的担子菌——血红密孔菌K-2352 [J]. 微生物学通报, 1994, 21(3): 152–156.
- [15] 池玉杰, 伊洪伟. 木材白腐菌分解木质素的酶系统·锰过氧化物酶、漆酶和木质素过氧化物酶催化分解木质素的机制 [J]. 菌物学报, 2007, 26(1): 153–160.
- [16] Huang S H, Huang D Y, Wu Q T, et al. Effect of environmental C/N ratio on activities of lignin-degrading enzymes produced by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. Pedosphere, 2020, 30(2): 285–292.
- [17] Andlar M, Režić T, Mardetko N, et al. Lignocellulose degradation: an overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation [J]. Engineering in Life Sciences, 2018, 18(11): 768–778.
- [18] 崔宝凯, 余长军. 大兴安岭林区多孔菌的区系组成与种群结构 [J]. 生态学报, 2011, 31(13): 3700–3709.
- [19] 戴玉成. 中国储木及建筑木材腐朽菌图志 [M]. 北京: 科学出版社, 2009.
- [20] 魏玉莲, 戴玉成. 木材腐朽菌在森林生态系统中的功能 [J]. 应用生态学报, 2004, 15(10): 1935–1938.
- [21] 普晓兰, 杜凡. 巨龙竹竹材结构及其变异的解剖学研究 [J]. 西南林学院学报, 2003, 23(1): 1–5.
- [22] 普晓兰, 丁雨龙, 杜凡. 巨龙竹营养器官解剖学研究 [J]. 西南林学院学报, 2004, 24(1): 6–11, 19.
- [23] 成聃睿, 史正军, 刘瑞华, 等. 厚壁型巨龙竹秆材的材性特征分析 [J]. 生物质化学工程, 2015, 49(4): 45–48.
- [24] 成聃睿, 史正军, 杨海艳, 等. 巨龙竹木质素化学结构研究 [J]. 世界竹藤通讯, 2015, 13(2): 1–6.
- [25] 刘世罗, 辉朝茂, 王兵益, 等. 厚壁型和薄壁型巨龙竹的分子标记研究 [J]. 西南林业大学学报, 2017, 37(1): 15–19, 35.
- [26] 石纯, 杨静, 杨海艳, 等. 巨龙竹全组分乙酰化膜的制备与性能表征 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2019, 41(1): 123–129.
- [27] 孟右成, 薛永常. 微生物降解木质素及其工业应用 [J]. 生命的化学, 2020, 40(6): 896–902.
- [28] 史正军. 甜龙竹及巨龙竹半纤维素、木质素结构诠释及相互间化学键合机制解析 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.
- [29] 吕世翔, 王秋玉. 白腐菌在木质纤维素降解中的应用进展 [J]. 森林工程, 2009(4): 28–33.
- [30] 王伟, 崔宝凯, 戴玉成. 白腐菌的筛选及其短期降解黑杨的初步机制 [J]. 北京林业大学学报, 2011, 33(5): 91–96.
- [31] Zhao C L, Wu Z Q. *Ceriporiopsis kunmingensis* sp. nov. (Polyporales, Basidiomycota) evidenced by morphological characters and phylogenetic analysis [J]. Mycological Progress, 2017, 16(1): 93–100.
- [32] White T J, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]//PCR Protocols. Amsterdam: Elsevier, 1990: 315–322.
- [33] Thompson J. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [34] Swofford D L. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10[M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.
- [35] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39(4): 783.
- [36] Brummitt P K, Powell C E. Authors of plant names: a list of authors of scientific names of plants, with recommended standard forms of their names, including abbreviations[M]. St. Louis, Missouri: Edinburgh University Press, 1992.
- [37] Petersen J H. Farvekort. The Danish Mycological Society's colour-chart[M]. Greve, Denmark: Foreningen til Svampekundskabens Fremme, 1996.

- [38] Ferraz A, Rodriguez J, Freer J, et al. Biodegradation of *Pinus radiata* softwood by white- and brown-rot fungi [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2001, 17: 31–34.
- [39] 蒋挺大. 木质素 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2009.
- [40] Blanchette R A. Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation [J]. Applied and Environmental Microbiology, 1984, 48(3): 647–653.
- [41] Hakala T K, Maijala P, Konn J, et al. Evaluation of novel wood-rotting polypores and corticioid fungi for the decay and biopulping of Norway spruce (*Picea abies*) wood [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34(3/4): 255–263.
- [42] Wolfaardt F, Taljaard J L, Jacobs A, et al. Assessment of wood-inhabiting Basidiomycetes for biokraft pulping of softwood chips [J]. Bioresource Technology, 2004, 95(1): 25–30.
- [43] 叶汉玲, 尤纪雪, 房桂干. 选择性降解木质素白腐菌筛选的研究 [J]. 纤维素科学与技术, 2004, 12(1): 19–26.
- [44] Wu J, Xiao Y, Yu H. Degradation of lignin in pulp mill wastewaters by white-rot fungi on biofilm [J]. Bioresource Technology, 2005, 96(12): 1357–1363.
- [45] Fackler K, Gradinger C, Hinterstoisser B, et al. Lignin degradation by white rot fungi on spruce wood shavings during short-time solid-state fermentations monitored by near infrared spectroscopy [J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(7): 1476–1483.
- [46] 刘正贵, 王海毅, 房桂干, 等. 氮源用量对杨木白腐菌降解效率的影响 [J]. 陕西科技大学学报, 2007(2): 5–8.
- [47] van Erven G, Wang J L, Sun P C, et al. Structural motifs of wheat straw lignin differ in susceptibility to degradation by the white-rot fungus *Ceriporiopsis subvermispora* [J]. ACS Sustainable Chemistry & Engineering, 2019, 7(24): 20032–20042.
- [48] Yuan H S. Molecular phylogenetic evaluation of *Antrodiaella* and morphologically allied genera in China [J]. Mycological Progress, 2014, 13(2): 353–364.
- [49] Pérez V, de Troya M T, Martínez A T, et al. *In vitro* decay of *Aextoxicum punctatum* and *Fagus sylvatica* woods by white and brown-rot fungi [J]. Wood Science and Technology, 1993, 27(4): 295–307.
- [50] Elissetche J P, Ferraz A, Parra C, et al. Biodegradation of Chilean native wood species, *Drimys winteri* and *Nothofagus dombeyi*, by *Ganoderma australe* [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2001, 17(6): 577–581.
- [51] Machado E, Matumoto P P T, Ítavo L C V, Agustinho B C, Daniel J L P, Santos N W, Bragatto J M, Ribeiro M G, Zeoula L M. Reduction in lignin content and increase in the antioxidant capacity of corn and sugarcane silages treated with an enzymatic complex produced by white rot fungus [J]. PloS one, 2020, 15: e0229141.
- [52] 王伟. 白腐菌预处理与酶解转化杨木研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2014.
- [53] 张之亮, 张元明, 章悦庭, 等. 几种新型植物纤维的开发利用现状 [J]. 新纺织, 2004(5): 16–18.
- [54] Tarchoun A F, Trache D, Klapötke T M. Microcrystalline cellulose from *Posidonia oceanica* brown algae: Extraction and characterization [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 138: 837–845.
- [55] Xu G F, Shi Z J, Zhao Y H, et al. Structural characterization of lignin and its carbohydrate complexes isolated from bamboo (*Dendrocalamus sinicus*) [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2019, 126: 376–384.

(责任编辑 张 坤)

