

1 株木质素降解菌的筛选、鉴定及液态发酵条件优化

李雅琳, 李素艳, 孙向阳, 郝丹, 蔡琳琳, 常晓彤

(北京林业大学 林学院, 北京 100083)

摘要: 【目的】制作应用于园林绿化废弃物的以木质素降解菌为原材料的高效液体菌剂。【方法】通过苯胺蓝平板褪色圈法和愈创木酚平板变色圈法从分离纯化得到的 22 株菌中筛选目标菌株, 并用内转录间隔区 (ITS) 测序法对目标菌株进行鉴定, 然后通过单因素试验对目标菌株的培养时间、接种量和培养基配方 (碳源和氮源) 进行优化, 最后根据单因素试验结果, 采用均匀实验结合人工神经网络算法寻找目标菌株的最佳发酵条件。【结果】根据平板褪色和显色结果, 选定菌株 Q01 为目标菌株。经鉴定, 菌株 Q01 为栓菌属 *Trametes* 真菌。根据单因素试验和均匀试验结果, 确定菌株 Q01 的最优发酵条件为培养时间 5 d, 接种菌液体积分数为 12.5%; 培养基配方为木质素磺酸钠 $14.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、蛋白胨 $12.30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、酵母粉 $5.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、豆饼粉 $3.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、五水合硫酸铜 $0.12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、氯化钠 $0.53 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、pH 自然。优化条件后菌株 Q01 的生物量提高 1.27 倍, 锰过氧化物酶活性提高 31.71 倍, 木质素过氧化物酶活性提高 19.12 倍, 漆酶活性略有降低, 但 3 种木质素酶的总酶活性提高了 4.38 倍。【结论】菌株 Q01 在优化后的发酵条件下制得的液体菌剂具有高酶活性和高生物量的特点, 在降解园林绿化废弃物木质素方面具有一定应用潜力。图 6 表 3 参 29

关键词: 木质素降解菌; 筛选; 漆酶; 锰过氧化物酶; 木质素过氧化物酶; 发酵条件

中图分类号: S718.8 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2021)06-1297-08

Screening and identification of a lignin degrading strain and its optimized liquid fermentation conditions

LI Yalin, LI Suyan, SUN Xiangyang, HAO Dan, CAI Linlin, CHANG Xiaotong

(College of Forestry, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract: [Objective] The purpose is to produce a high efficient liquid inoculum with lignin-degrading bacteria as raw materials for garden waste. [Method] The target strains were screened from 22 isolated and purified strains by the aniline blue plate fading circle method and the guaiacol plate fading circle method, and were identified by Internal Transcribed Spacer (ITS) sequencing, and then the single factor test was used to optimize the culture time, inoculum amount and medium formula (carbon and nitrogen source) of the target strains. Finally, according to the results of single factor test, the optimal fermentation conditions of the target strains were found by uniform experiment combined with artificial neural network algorithm. [Result] According to the results of plate fading and color development, strain Q01 was selected as the target strain and was identified as *Trametes*. According to the results of single factor test and uniform test, the optimal fermentation conditions for strain Q01 were determined as the culture time of 5 days, inoculation amount 12.5%. The medium formula was composed of sodium lignosulfonate $14.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, peptone $12.30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, yeast powder $5.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, soybean cake powder $3.00 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, copper sulfate pentahydrate $0.12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, sodium chloride

收稿日期: 2021-01-07; 修回日期: 2021-07-09

基金项目: 北京市自然科学基金资助项目 (6202021)

作者简介: 李雅琳 (ORCID: 0000-0002-5228-7926), 从事农林废弃物处理与资源化利用研究。E-mail: 294792182@qq.com。通信作者: 李素艳 (ORCID: 0000-0002-4391-8263), 教授, 博士, 从事农林废弃物处理与资源化利用研究。E-mail: lisuyan@bjfu.edu.cn

0.53 g·L⁻¹, and natural pH. Under the optimized conditions, the biomass, manganese peroxidase activity and lignin peroxidase activity of strain Q01 increased by 1.27 times, 31.71 times and 19.12 times respectively. Laccase activity decreased slightly, but the total enzyme activities of three kinds of lignin enzymes increased by 4.38 times. [Conclusion] The liquid inoculum prepared by strain Q01 under optimized fermentation conditions has the characteristics of high enzyme activity and high biomass, which has certain application potential in degrading lignin in garden waste. [Ch, 6 fig. 3 tab. 29 ref.]

Key words: lignin degrading bacteria; screening; laccase; manganese peroxidase; lignin peroxidase; fermentation conditions

园林绿化废弃物包括树木、花草等植物在生长过程中的自然凋落物或者人为修剪的植物残体^[1], 主要成分有木质素、纤维素和多糖等^[2]。其中, 木质素由于组分种类多样, 结构复杂且无规则, 降解比较困难^[3-5]。堆肥是一种较好的降解园林绿化废弃物的方式^[6], 堆肥过程中多个微生物群体共同作用, 分泌木质素降解相关酶系而使园林绿化废弃物中的木质素降解^[7]。因此, 通过研制微生物菌剂, 使分泌木质素降解酶系的菌株迅速构建优势群落, 能有针对性地加快园林绿化废弃物中木质素的降解, 提高堆肥效率和质量^[8-9]。但是, 新菌剂的制备需要在选定目标菌株的条件下, 对菌剂制作涉及的培养基配方和发酵条件进行优化。优化过程主要包括试验设计、数学建模和优化设计3个部分^[10]。合理的试验设计能用较少的试验数据进行建模, 从而获取各因素范围内的最优解。用于发酵条件优化的方法多为响应面法^[11-12], 但胡欣颖等^[13]研究发现: 人工神经网络算法比响应面法在预测实验结果方面更准确, 误差更小。目前, 运用人工神经网络算法对木质素降解菌发酵条件进行优化的研究鲜有报道。因此, 本研究拟从北京市植物园的腐叶土和朽木中筛选木质素降解菌, 对其进行鉴定, 并通过单因素试验对菌株的培养时间、接种量和培养基配方(碳源和氮源)进行优化; 采用均匀试验结合 Python 实现人工神经网络建模与优化, 寻找菌株最佳发酵条件, 为园林绿化废弃物中木质素的降解提供高效菌剂。

1 材料与方法

1.1 材料

腐叶土和朽木采集于北京市植物园。PDA 培养基: 称取 200.00 g 土豆, 去皮去芽切成小块后加蒸馏水煮沸 30 min, 保留滤液并用蒸馏水补足 1 L, 制成马铃薯浸汁; 葡萄糖 20.00 g, 蛋白胨 15.00 g, 琼脂 20.00 g, pH 自然^[14]。PDA-苯胺蓝培养基: 称取 0.10 g 苯胺蓝溶于 1 L PDA 培养基中, pH 自然。PDA-愈创木酚培养基: 量取 0.1 mL 愈创木酚溶于 1 L PDA 培养基中, pH 自然。PDB 液体培养基: 马铃薯浸汁(同 PDA 培养基), 葡萄糖 20.00 g, 蛋白胨 15.00 g, pH 自然。基本发酵培养基: 葡萄糖 10.00 g·L⁻¹、蛋白胨 5.00 g·L⁻¹、酵母粉 3.00 g·L⁻¹、酒石酸铵 10.00 g·L⁻¹、五水合硫酸铜 0.25 g·L⁻¹、氯化钠 1.00 g·L⁻¹、pH 自然^[15]。所有培养基均 121 °C 高压蒸汽灭菌 20 min。

1.2 方法

1.2.1 菌株的分离与筛选 将采集的样品捣碎^[16], 称取 10.00 g 加入装有 90 mL 无菌水的三角瓶中, 在 28 °C、200 r·min⁻¹ 下震荡摇匀后静置 1 h。取上清液 1.0 mL 稀释成不同质量浓度梯度(10⁻³~10⁻⁷ g·L⁻¹)的溶液, 取不同质量浓度稀释液 0.1 mL, 加入 PDA 培养基中涂布均匀, 28 °C 下培养 5~7 d, 观察菌落形态, 用平板划线分离法纯化菌株。将得到的纯菌株以点接法接到 PDA-苯胺蓝平板和 PDA-愈创木酚平板中, 用苯胺蓝平板褪色圈法和愈创木酚平板变色圈法确定该菌株是否具有降解木质素的能力。

1.2.2 菌株的鉴定 观察 PDA-苯胺蓝平板上菌体形态特征, 并挑取少量菌丝于显微镜下拍照记录。菌株送往北京睿博兴科生物技术有限公司进行内转录间隔区(ITS)测序, 测序结果与 Genbank 数据库中已知的真菌序列 BLAST 检索对比, 采用 Mega 5.0 软件与相近种菌株构建系统发育树^[17]。

1.2.3 种子液的制备 将菌株接种至装有 100.0 mL PDB 液体培养基的三角瓶中, 在 IS-RDD3 台式恒温振荡器中以 30 °C、200 r·min⁻¹ 培养 3 d, 制得种子液。

1.2.4 测定指标 木质素过氧化物酶、锰过氧化物酶和漆酶活性的测定参照田林双^[18]的方法。3种木质

素降解相关酶活性总和标记为总酶活。生物量的测定用称干质量法^[19]。

1.2.5 数据统计与分析 试验数据采用 Excel 2007 和 SPSS 22.0 进行处理。发酵条件优化用单因素方差分析法, 平均值多重比较用 LSD 最小显著性差异法 ($P < 0.05$)。均匀试验利用人工神经网络^[20]建模与优化(基于深度学习框架 Pytorch^[21])。将本实验目标建模为回归任务, 并采用 Smooth_{L1} 损失函数^[22]以平滑训练过程。训练过程中, 采用 k -折交叉验证 (k -fold cross-validation) 和自适应矩估计 (Adam) 算法^[23]优化神经网络。

2 结果与讨论

2.1 木质素降解菌的筛选

PDA-苯胺蓝平板上褪色圈的出现表示该菌株具有分泌锰过氧化物酶和木质素过氧化物酶的能力, PDA-愈创木酚平板上显色圈的出现表示该菌株具有分泌漆酶的能力^[24]。由表 1 可知: 筛选得到的 22 株菌(分别命名为 Q01~Q22)中, 共有 10 株菌出现褪色圈或/和显色圈。其中: Q01、Q02、Q09 和 Q11 既能出现褪色圈又能出现显色圈, 说明这些菌株具备分泌 3 种木质素降解酶的能力。根据褪色圈和显色圈的出现时间及直径可知(表 1), Q01 于 48 h 时在 PDA-苯胺蓝平板上出现褪色圈, 12 h 时在 PDA-愈创木酚培养基上出现显色圈, 在 72 h 时显色圈最大, 因此, 选定菌株 Q01 为目标菌株。

2.2 菌株的鉴定

2.2.1 菌株 Q01 的形态特征及显微观察 菌株 Q01 在 PDA-苯胺蓝平板上的菌落形态为白色圆形, 菌丝为致密的短绒状, 向四周扩展, 紧贴平板生长

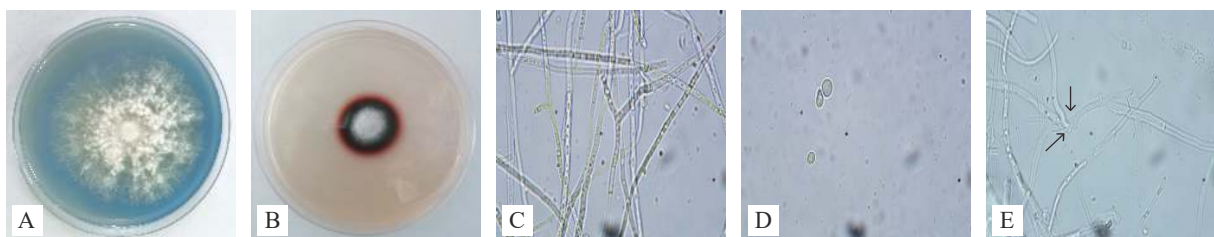
(图 1A、图 1B); 前期生长较慢, 1~2 d 有菌丝长出, 此后生长较快, 3~5 d 铺满整个平板。显微形态可见, 菌丝较细长, 有分支(图 1C), 孢子呈球状或柱状(图 1D), 菌丝可观察到隔膜和锁状联合(图 1E, 如箭头所示)。

表 1 不同菌株选择培养基的显色和褪色结果

Table 1 Coloring and decoloring results of different strains on selective mediums

菌株	苯胺蓝褪色结果					愈创木酚显色结果				
	12	24	36	48	72	12	24	36	48	72 h
Q01	-	-	-	+	++	+	++	+++	++++	++++
Q02	-	-	-	-	+	-	-	-	+	++
Q06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Q09	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Q11	-	+	+	++	+++	-	-	-	+	+
Q12	-	+	++	+++	+++	-	-	-	-	-
Q14	-	+	+	++	++	-	-	-	-	-
Q17	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Q19	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Q22	-	+	+	++	++	-	-	-	-	-

说明: -表示不褪色(或不显色); +、++、+++、++++表示褪色(或显色)圈逐渐增大



A. 菌株 Q01 在 PDA-苯胺蓝培养基中的褪色圈; B. 菌株 Q01 在 PDA-愈创木酚培养基中的显色圈; C. 菌丝显微照片 (10×100 倍); D. 孢子显微照片 (10×100 倍); E. 菌丝隔膜和锁状联合显微照片 (10×100 倍)

图 1 菌株 Q01 在选择培养基中显色和褪色表现及显微镜观察

Figure 1 Color development and fading performance of strain Q01 in selective medium and microscopic observation

2.2.2 菌株 Q01 的 ITS 序列分析及系统发育树 构建菌株 Q01 系统发育树(图 2)可知: 菌株 Q01 与栓菌属 *Trametes* 真菌的同源性相似度最高, 达到 100%。结合形态特征可确定菌株 Q01 为栓菌属真菌。

2.3 液态发酵条件的优化

2.3.1 培养时间的优化 分别在 12 瓶 100 mL 基本发酵培养基中接种体积分数为 12.5% 的菌株 Q01 种子液, 于 30 ℃、200 r·min⁻¹ 下培养, 每 24 h 取出 1 瓶, 测量菌株木质素降解相关酶活性和 1 mL 菌液中生物量的干质量。由图 3 可知: 3 种木质素降解相关酶的酶活性达到最高值时间不同, 其中漆酶活性在培

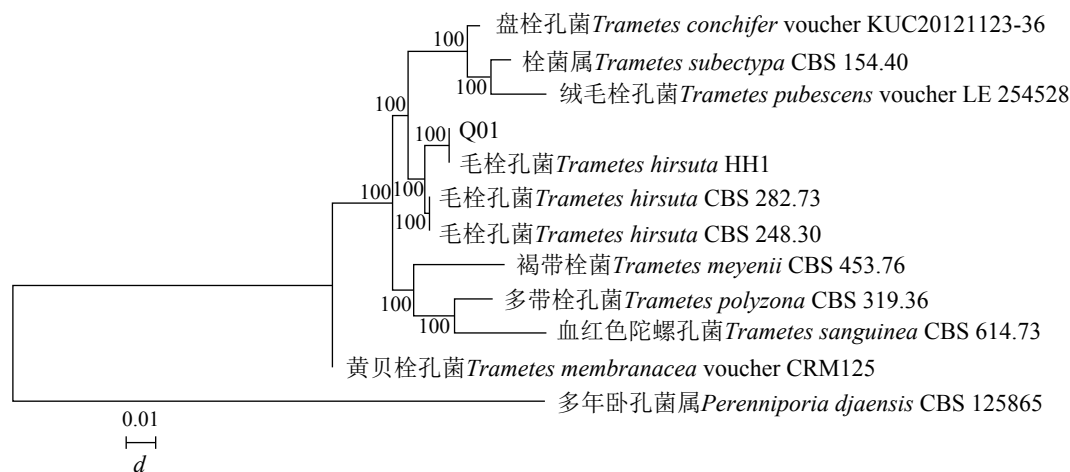


图2 基于 ITS 序列构建的菌株 Q01 系统发育树

Figure 2 Phylogenetic tree of strain Q01 constructed based on ITS sequence

养 5 d 时达最高 ($3\ 835.25 \times 16.67 \text{ nkat} \cdot \text{L}^{-1}$), 锰过氧化物酶活性在培养 2 d 时达最高 ($1\ 690.60 \times 16.67 \text{ nkat} \cdot \text{L}^{-1}$), 木质素过氧化物酶活性在培养 8 d 时达到最高 ($1\ 096.88 \times 16.67 \text{ nkat} \cdot \text{L}^{-1}$)。3 种木质素降解相关酶在木质素降解中具有同样重要的作用^[25], 但不同木质素降解酶活性最高值时间不同, 因此以 3 种木质素降解相关酶的总酶活性作为确定培养时间的依据。随着木质素降解, 真菌生物量逐渐增多^[26]。图 3 可知: 菌株 Q01 的总酶活性与生物量均在培养 5 d 时最高, 因此选择培养时间为 5 d 进行后续研究。

2.3.2 接种量的优化 分别在 100 mL 基本发酵培养基中接种体积分数为 5.0%、7.5%、10.0%、12.5% 和 15.0% 的种子液, 于 30 °C、200 r·min⁻¹ 下培养 5 d, 测定菌株木质素降解相关酶活性和菌株生物量。由图 4 可知: 总酶活性在菌液体积分数为 12.5% 时最高, 达到 $5\ 129.80 \times 16.67 \text{ nkat} \cdot \text{L}^{-1}$ 。随菌液体积分数增加, 菌株生物量呈先上升后下降趋势, 体积分数为 12.5% 时达到最高。与缪晓磊^[19]对竹林毛栓菌 *Trametes* sp. 接种量优化的结果一致。可见菌株的繁殖速度受接种量影响, 当接种量较少时, 菌株需要更多时间适应环境后繁殖生长; 而接种量较多时, 大量菌株接触新环境, 迅速繁殖, 使液体培养基黏稠不透气, 溶解氧下降, 影响菌株的后续生长^[19]。因此, 综合总酶活性和生物量的变化, 选取体积分数 12.5% 为最适接种量。

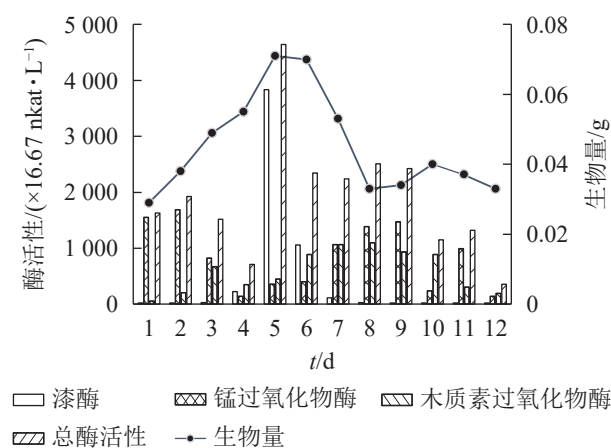


图3 培养时间对菌株产生木质素降解相关酶及生物量的影响

Figure 3 Changes in culture time to the enzymes and biomass related to lignin degradation produced by the strain

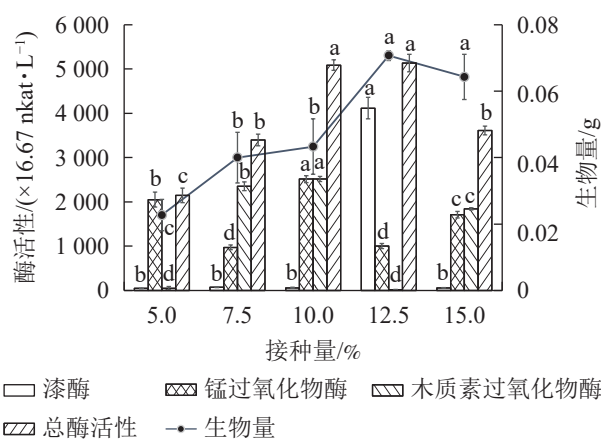


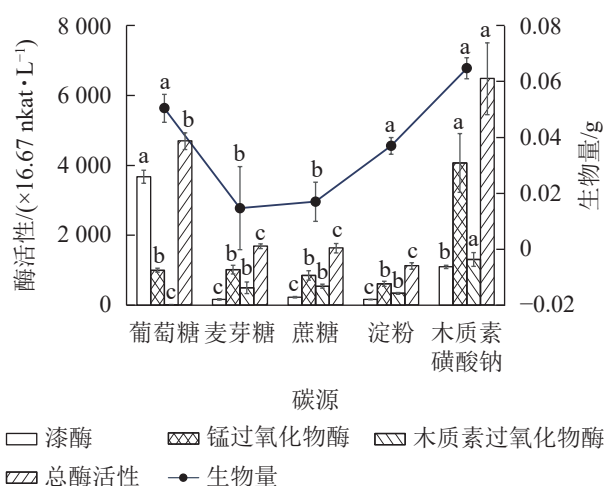
图4 接种量对菌株产生木质素降解相关酶及生物量的影响

Figure 4 Changes in the amount of inoculum to produce lignin degradation related enzymes and biomass

2.3.3 培养基碳源的优化 以基本发酵培养基为对照, 分别用 $10.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖、麦芽糖、木质素磺酸钠和可溶性淀粉替代对照中 $10.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的葡萄糖, 接种体积分数为 12.5%, 于 30 °C、200 r·min⁻¹ 下培养 5 d。由图 5 可知: 以葡萄糖为碳源时, 菌株 Q01 漆酶活性达 $3\ 675.23 \times 16.67 \text{ nkat} \cdot \text{L}^{-1}$, 显著高于其他碳

源 ($P < 0.05$)；认为简单的糖有利于菌体生长^[27]，可以缩短漆酶的生产时间，与刘宇等^[15]结果相似。但就总酶活性和生物量而言，以木质素磺酸钠为碳源对菌株 Q01 生长和木质素降解相关酶分泌效果最好，最显著 ($P < 0.05$)，其中总酶活性为 $6\,474.16 \times 16.67 \text{ nkat} \cdot \text{L}^{-1}$ ，总生物量为 0.065 g 。可能原因是来源于木质素的木质素磺酸钠能刺激菌株 Q01 分泌木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶，并促进细胞快速生长，使生物量最高，与熊乙^[28]研究结果相似。综合考虑各碳源生产成本及对菌株 Q01 生长的促进效果，选择木质素磺酸钠为菌株 Q01 的液体培养基碳源。

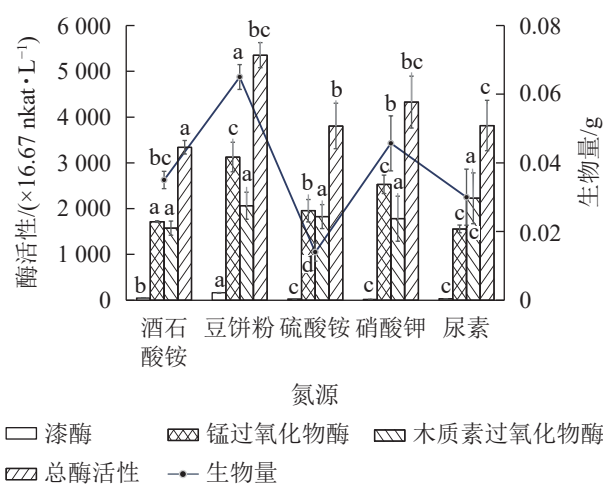
2.3.4 培养基氮源的优化 以基本发酵培养基为对照，有效含氮量按 $1.52 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行换算，分别用 $7.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的豆饼粉、 $6.50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 尿素、 $14.30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铵、 $11.00 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硝酸钾替代对照组中的酒石酸铵，发酵培养条件为 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，培养 5 d。由图 6 可知：以豆饼粉为有机氮源发酵时，菌株 Q01 总酶活性最高、生物量最大，与其他无机氮源差异显著 ($P < 0.05$)。豆饼粉营养丰富，含大量碳水化合物、蛋白质及少量异黄酮类物质和可溶性多糖，可作为发酵氮源及生长因子。有研究表明^[29]：在培养某些真菌时，培养基中添加豆饼粉有利于生物量的积累。综合考虑各氮源生产成本及对菌株 Q01 生长的促进效果，选择豆饼粉作为菌株 Q01 的液体培养基氮源。



不同小写字母表示不同碳源处理下差异显著 ($P < 0.05$)

图 5 碳源对菌株产生木质素降解相关酶及生物量的影响

Figure 5 Effect of carbon source on lignin degradation related enzymes and biomass produced by the strain



不同小写字母表示不同氮源处理下差异显著 ($P < 0.05$)

图 6 氮源对菌株产生木质素降解相关酶及生物量的影响

Figure 6 Effect of nitrogen source on lignin degradation related enzymes produced by the strain and biomass

2.3.5 均匀试验结合 Python 实现人工神经网络建模与优化 均匀试验设计 6 因素 5 水平的 10 组试验，获取实测值，再通过基于 Smooth_{L1} 损失函数的人工神经网络模型的训练及自适应矩估计 (Adam) 算法寻优，得到仿真值。对比实测值和仿真值 (表 2) 可知：3 种酶活性误差均小于 10.0%，生物量的仿真值基本与观察值相同，可知该模型预测值可信赖。

2.3.6 优化后菌株木质素降解相关酶活性及生物量 根据模型预测得到最优发酵培养基组成并进行实验验证。由表 3 可知：优化后的发酵培养基酶活性和生物量，实测值与预测值误差约为 3.0%；结合图 3 可知：优化前锰过氧化物酶活性为 $357.29 \times 16.67 \text{ nkat} \cdot \text{L}^{-1}$ 、木质素过氧化物酶活性为 $445.27 \times 16.67 \text{ nkat} \cdot \text{L}^{-1}$ 、总酶活性为 $4\,637.81 \times 16.67 \text{ nkat} \cdot \text{L}^{-1}$ 、生物量为 0.071 g ；即在优化培养基上生长的菌株 Q01，其生物量比优化前提高 1.27 倍，锰过氧化物酶活性提高 31.71 倍，木质素过氧化物酶活性提高 19.12 倍，总木质素酶活性提高 4.38 倍。

3 结论

通过苯胺蓝平板褪色圈法和愈创木酚平板变色圈法筛选出目标菌株 Q01。经鉴定，菌株 Q01 为栓菌属 *Trametes* 真菌。实验证明人工神经网络模型预测结果可值得信赖。根据单因素试验和人工神经网络算法结果，确定菌株 Q01 的最优发酵条件：培养时间 5 d，温度 $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ，转速 $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ ，接种菌液体积分

表2 均匀试验设计及结果

试验号	木质素 磺酸钠/ (g·L ⁻¹)	蛋白胨/ (g·L ⁻¹)	酵母粉/ (g·L ⁻¹)	豆饼粉/ (g·L ⁻¹)	五水合 硫酸铜/ (g·L ⁻¹)	氯化钠/ (g·L ⁻¹)	锰过氧 化酶活性/ (×16.67 nkat·L ⁻¹)	木质素过 氧化酶活性/ (×16.67 nkat·L ⁻¹)	漆酶活性/ (×16.67 nkat·L ⁻¹)	总酶活性/ (×16.67 nkat·L ⁻¹)	生物量/ g
实测值1	6.00	5.00	3.00	11.00	0.20	1.50	4 296.20	1 520.43	219.19	6 035.83	0.037
仿真值1	6.00	5.00	3.00	11.00	0.20	1.50	3 186.76	2 888.58	218.40	6 293.73	0.037
实测值2	8.00	10.00	1.00	11.00	0.25	1.25	4 200.35	3 790.22	252.62	8 243.18	0.055
仿真值2	8.00	10.00	1.00	11.00	0.25	1.25	4 190.01	3 799.79	288.91	8 278.71	0.049
实测值3	10.00	2.50	4.00	9.00	0.35	1.00	4 095.77	3 605.59	318.60	8 019.96	0.048
仿真值3	10.00	2.50	4.00	9.00	0.35	1.00	4 094.32	3 712.88	282.19	8 089.38	0.048
实测值4	12.00	7.50	1.00	9.00	0.15	0.75	4 601.21	5 278.06	313.29	10 192.56	0.014
仿真值4	12.00	7.50	1.00	9.00	0.15	0.75	4 607.23	4 178.73	318.24	9 104.20	0.024
实测值5	14.00	12.50	4.00	7.00	0.20	0.50	5 263.50	5 028.28	399.44	10 691.23	0.059
仿真值5	14.00	12.50	4.00	7.00	0.20	0.50	5 290.88	4 799.66	366.29	10 456.83	0.062
实测值6	6.00	2.50	2.00	7.00	0.30	1.50	4 453.06	3 746.77	178.82	8 378.66	0.123
仿真值6	6.00	2.50	2.00	7.00	0.30	1.50	4 446.86	4 033.08	306.97	8 786.91	0.092
实测值7	8.00	7.50	5.00	5.00	0.35	1.25	3 999.91	4 387.53	186.13	8 573.57	0.042
仿真值7	8.00	7.50	5.00	5.00	0.35	1.25	4 018.98	3 644.46	276.89	7 940.33	0.047
实测值8	10.00	12.50	2.00	5.00	0.15	1.00	3 215.62	4 322.37	363.36	7 901.34	0.050
仿真值8	10.00	12.50	2.00	5.00	0.15	1.00	4 289.80	3 890.43	295.93	8 476.16	0.050
实测值9	12.00	5.00	5.00	3.00	0.25	0.75	5 411.65	3 822.80	432.66	9 667.11	0.063
仿真值9	12.00	5.00	5.00	3.00	0.25	0.75	5 287.09	4 905.21	374.46	10 566.76	0.063
实测值10	14.00	10.00	3.00	3.00	0.30	0.50	5 120.37	4 356.31	385.32	9 862.00	0.060
仿真值10	14.00	10.00	3.00	3.00	0.30	0.50	5 241.27	4 754.60	362.81	10 358.68	0.061

表3 人工神经网络寻优结果

试验号	木质素磺酸钠/ (g·L ⁻¹)	蛋白胨/ (g·L ⁻¹)	酵母粉/ (g·L ⁻¹)	豆饼粉/ (g·L ⁻¹)	五水合硫酸铜/ (g·L ⁻¹)	氯化钠/ (g·L ⁻¹)	锰过氧化物酶活性/ (×16.67 nkat·L ⁻¹)	木质素过氧化物酶活性/ (×16.67 nkat·L ⁻¹)	漆酶活性/ (×16.67 nkat·L ⁻¹)	总酶活性/ (×16.67 nkat·L ⁻¹)	生物量/ g
预测值	14.00	12.30	5.00	3.00	0.12	0.53	11 727.39	8 795.36	505.56	21 028.31	0.093 7
实测值	14.00	12.30	5.00	3.00	0.12	0.53	11 328.73	8 514.41	484.73	20 327.87	0.090 0

数为 12.5%，培养基配方为木质素磺酸钠 14.00 g·L⁻¹、蛋白胨 12.30 g·L⁻¹、酵母粉 5.00 g·L⁻¹、豆饼粉 3.00 g·L⁻¹、五水合硫酸铜 0.12 g·L⁻¹、氯化钠 0.53 g·L⁻¹、pH 自然。

菌株 Q01 在优化后的发酵条件下制得的液体菌剂具有高酶活性和高生物量的特点，可促进园林绿化废弃物堆体初始微生物的数量增长，提高木质素降解相关酶的酶活性，加快木质素的降解。

4 参考文献

- [1] 王琳, 李素艳, 孙向阳, 等. 不同配比园林绿化废弃物和蘑菇渣混合蚯蚓堆肥的效果[J]. *浙江农林大学学报*, 2019, **36**(2): 326–334.
WANG Lin, LI Suyan, SUN Xiangyang, *et al.* Mixing garden wastes and spent mushroom compost of different ratios for vermicomposting [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2019, **36**(2): 326–334.
- [2] 蔡琳琳, 李素艳, 龚小强, 等. 好氧堆肥-蚯蚓堆肥结合法处理绿化废弃物与牛粪[J]. *浙江农林大学学报*, 2018, **35**(2): 261–267.
CAI Linlin, LI Suyan, GONG Xiaoqiang, *et al.* Composting-vermicomposting of green waste processing spiked with cow dung [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2018, **35**(2): 261–267.
- [3] HIMMEL M E, DING Shiyu, JOHNSON D K, *et al.* Biomass recalcitrance: engineering plants and enzymes for biofuels

- production [J]. *Science*, 2007, **315**(5813): 804 – 807.
- [4] KAMIMURA N, SAKAMOTO S, MITSUDA N, *et al.* Advances in microbial lignin degradation and its applications [J]. *Curr Opin Biotechnol*, 2019, **56**: 179 – 186.
- [5] 刘瑜, 赵佳颖, 周晚来, 等. 城市园林废弃物资源化利用研究进展[J]. 环境科学与技术, 2020, **43**(4): 32 – 38.
LIU Yu, ZHAO Jiaying, ZHOU Wanlai, *et al.* Progress on resource utilization of urban garden waste [J]. *Environ Sci Technol*, 2020, **43**(4): 32 – 38.
- [6] 孟童瑶, 李素艳, 邹荣松, 等. 固定化木质素降解菌对园林废弃物堆肥的影响[J]. 浙江农林大学学报, 2021, **38**(1): 38 – 46.
MENG Tongyao, LI Suyan, ZOU Rongsong, *et al.* Effect of immobilized lignin-degrading bacteria on green waste composting [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2021, **38**(1): 38 – 46.
- [7] 梁丛颖, 林璐. 环境微生物介导的木质素代谢及其资源化利用研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, **47**(10): 3380 – 3392.
LIANG Congying, LIN Lu. Environmental microorganisms driven lignin biodegradation and their roles in lignin utilization [J]. *Microbiol China*, 2020, **47**(10): 3380 – 3392.
- [8] 康跃, 李素艳, 孙向阳, 等. 园林废弃物木质素降解真菌的筛选、鉴别及其能力研究[J]. 林业科学研究, 2019, **32**(3): 80 – 87.
KANG Yue, LI Suyan, SUN Xiangyang, *et al.* Study on screening, identification and capability of lignin-degrading fungi for landscaping waste [J]. *For Res*, 2019, **32**(3): 80 – 87.
- [9] 赵恺凝, 赵国柱, 国辉, 等. 园林废弃物堆肥化技术中微生物菌剂的功能与作用[J]. 生物技术通报, 2016, **32**(1): 41 – 48.
ZHAO Kaining, ZHAO Guozhu, GUO Hui, *et al.* The function and role of microbial agents in composting technology of garden waste [J]. *Biotechnol Bull*, 2016, **32**(1): 41 – 48.
- [10] 李信军, 冯晓晓, 金慧清, 等. 2 株内生真菌菌株固态发酵培养基优化[J]. 微生物学通报, 2016, **43**(3): 550 – 558.
LI Xinjun, FENG Xiaoxiao, JIN Huiqing, *et al.* Optimization of solid-state fermentation media for growth of two endophytic fungal strains [J]. *Microbiol China*, 2016, **43**(3): 550 – 558.
- [11] 汪敦飞, 朱胜男, 肖清铁, 等. 基于响应面法的耐镉假单胞菌 TCd-1 培养条件优化[J]. 浙江农林大学学报, 2020, **37**(5): 914 – 921.
WANG Dunfei, ZHU Shengnan, XIAO Qingtie, *et al.* Optimization of culture conditions of Cd-tolerant strain *Pseudomonas* TCd-1 based on response surface methodology [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2020, **37**(5): 914 – 921.
- [12] 王维乐, 牟志美, 张淑君, 等. 响应面法优化 *Paraconiothyrium variabile* GHJ-4 产漆酶发酵条件[J]. 应用与环境生物学报, 2011, **17**(3): 321 – 325.
WANG Weile, MU Zhimei, ZHANG Shujun, *et al.* Optimization of fermentation conditions of *Paraconiothyrium variabile* GHJ-4 for laccase production by response surface methodology [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2011, **17**(3): 321 – 325.
- [13] 胡欣颖, 李洪军, 李少博, 等. 对比研究响应面法和 BP 神经网络-粒子群算法优化调理松板肉加工工艺[J]. 食品与发酵工业, 2019, **45**(24): 179 – 187.
HU Xinying, LI Hongjun, LI Shaobo, *et al.* A comparative study of the optimization of processing technology of conditioning pine board meat by response surface methodology and BP neural network-particle swarm optimization [J]. *Food Ferment Ind*, 2019, **45**(24): 179 – 187.
- [14] 周宇光. 菌种目录[M]. 4 版. 北京: 北京科学技术文献出版社, 2012: 694.
- [15] 刘宇, 汤斌, 李松, 等. *Trametes* sp. LS-10C 产漆酶发酵培养基优化及其漆酶对偶氮染料的脱色性能[J]. 环境科学学报, 2017, **37**(1): 193 – 200.
LIU Yu, TANG Bin, LI Song, *et al.* Optimization of fermentation medium for laccase production by *Trametes* sp. LS-10C and its properties in the decolorization of azo dyes [J]. *Acta Sci Circumstantiae*, 2017, **37**(1): 193 – 200.
- [16] 冯波, 林元山, 胡超, 等. 一株木质素降解菌的筛选、鉴定及其漆酶发酵条件的优化[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2015, **38**(2): 12 – 16, 73.
FENG Bo, LIN Yuanshan, HU Chao, *et al.* Screening and Identification of a lignin degrading strain and optimization of fermentation conditions for laccase [J]. *J Nat Sci Hunan Norm Univ*, 2015, **38**(2): 12 – 16, 73.
- [17] 李雪玲, 姚一建. 基于 28S rDNA 序列构建侧耳属系统发育树[J]. 菌物学报, 2004, **23**(3): 345 – 350.
LI Xueling, YAO Yijian. Assembling phylogenetic tree of *Pleurotus* based on 28S rDNA sequencing [J]. *Mycosystema*,

- 2004, **23**(3): 345 – 350.
- [18] 田林双. 木质素降解相关酶类测定标准方法研究[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, **30**(10): 13 – 14.
TIAN Linshuang. Research on standard method for determining ligninolytic enzyme activity [J]. *Anim Husbandry Feed Sci*, 2009, **30**(10): 13 – 14.
- [19] 缪晓磊. 竹林毛栓菌的诱变选育及其产酶条件优化[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2019.
MIAO Xiaolei. *Mutation Breeding of Trametes sp. from Bamboo Forest and Optimization of Enzyme Production Conditions* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2019.
- [20] SUN Yong, YANG Gang, XU Mengxia, *et al.* A simple coupled ANNs-RSM approach in modeling product distribution of Fischer-Tropsch synthesis using a microchannel reactor with Ru-promoted Co/Al₂O₃ catalyst [J]. *Int J Energy Res*, 2020, **44**(2): 1046 – 1061.
- [21] FLORENCIO F, VALENÇA T, MORENO E D, *et al.* Performance analysis of deep learning libraries: TensorFlow and PyTorch [J]. *J Comp Sci*, 2019, **15**(6): 785 – 799.
- [22] LIU Yuliang, JIN Lianwen. Deep matching prior network: toward tighter multi-oriented text detection[C]//IEEE. *30th IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*. Honolulu: IEEE, 2017: 1962 – 1969.
- [23] AN Yang, WANG Xiaocen, CHU Ronghe, *et al.* Event classification for natural gas pipeline safety monitoring based on long short-term memory network and Adam algorithm [J]. *Struct Health Monit*, 2020, **19**(4): 1151 – 1159.
- [24] 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.
DENG Shigui, YANG Chenjun, FENG Jiazhou, *et al.* Screening and identification of a lignin-degrading white rot fungus and optimization of its laccase-producing medium [J]. *Food Res Dev*, 2019, **40**(16): 178 – 184.
- [25] 唐菊, 段传人, 黄友莹, 等. 白腐菌木质素降解酶及其在木质素降解过程中的相互作用[J]. *生物技术通报*, 2011(10): 32 – 36.
TANG Ju, DUAN Chuanren, HUANG Youying, *et al.* Characteristics of ligninolytic enzymes of white-rot fungus and their interactions in the process of lignin degradation [J]. *Biotechnol Bull*, 2011(10): 32 – 36.
- [26] 习兴梅. 农林废物堆肥化中木质纤维素降解微生物学研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2007.
XI Xingmei. *Research of Lignocelluloses Biodegradation by Different Microorganisms in Agriculture and Forestry Waste Composting* [D]. Changsha: Hunan University, 2007.
- [27] 杨柳, 吕丹丹, 邓杰勇, 等. 粗毛栓菌 (*Trametes hirsuta*)D2 固态发酵山核桃蒲壳产漆酶的营养条件研究[J]. *微生物学通报*, 2014, **41**(10): 1955 – 1960.
YANG Liu, LÜ Dandan, DENG Jieyong, *et al.* Nutritional conditions for laccase production by *Trametes hirsuta* D2 in solid-state fermentation using hickory hull [J]. *Microbiol China*, 2014, **41**(10): 1955 – 1960.
- [28] 熊乙. 木质纤维素降解菌的筛选鉴定及降解产物研究[D]. 太谷: 山西农业大学, 2019.
XIONG Yi. *Screening and Identification of Lignocellulose Degrading Bacteria and Degradation Products Research* [D]. Taigu: Shanxi Agricultural University, 2019.
- [29] 彭志妮, 郭丽琼, 张新超, 等. 蛹虫草固体发酵大豆基质的成分及抗氧化活性变化研究[J]. *菌物学报*, 2011, **30**(2): 338 – 342.
PENG Zhini, GUO Liqiong, ZHANG Xinchao, *et al.* Compositions and antioxidant activities of soybean substrate during solid-state fermentation by *Cordyceps militaris* [J]. *Mycosystema*, 2011, **30**(2): 338 – 342.