

文章编号:1001-6880(2014)3-0309-05

降解菜籽饼粗蛋白耐盐菌的筛选、鉴定及 固体发酵的初步研究

吴民熙*, 刘清术, 刘前刚, 单世平

湖南省微生物研究所, 长沙 410009

摘要:从保存6个月含菜籽饼的堆肥样品中筛选到3株耐盐菌株A₂、A₄、A₇,这些菌株能以菜籽饼为氮源生长,最高耐盐浓度达到10%,经分子生物学及系统发育分析,A₂、A₄为解淀粉芽孢杆菌,A₇为栗褐芽孢杆菌,通过单一菌株固体发酵菜籽饼试验,这些细菌均对菜籽饼表现出了一定的降解能力。

关键词:菜籽饼;蛋白酶活力;耐盐性;菌种鉴定;单一菌种固体发酵

中图分类号:Q939.97

文献标识码:A

Screening, Identification and Preliminary Study of Solid-State Fermentation of the Crude Protein-Degradation Salt-Tolerant Strains in Rapeseed Cake

WU Min-xi*, LIU Qing-shu, LIU Qian-gang, SHAN Shi-ping

Hunan Institute of Microbiology, Changsha 410009, China

Abstract: In this study, three salt-tolerant strains (A₂, A₄, A₇) were isolated from 6 months preserved rapeseed cake compost. The three strains can grow by taking rapeseed cake as the nitrogen source under the salt concentration of 10%. By molecular biology and phylogenetic analysis, strains A₂ and A₄ belonged to *Bacillus amyloliquefaciens* and A₇ was identified as *Bacillus badius*. These bacteria had showed some ability to degrade rapeseed cake in the single strain solid fermentation test.

Key words: rapeseed cake; protease activity; salt tolerant; fungus stain identify; single-strain fermentation

中国油菜资源十分丰富,其榨油后副产物菜籽饼粕年产量约为800万吨^[1],菜籽饼粕是一种优良的有机肥料,蛋白质含量高,富含氮、磷、有机质,特别是对烟草的肥效优于普通有机肥,在烟田间直接施用菜籽饼粕,可改善烟田土壤结构,增加温度促进微生物活动以及保蓄养分^[2-6],还有研究表明,配施不同形态菜籽饼肥的烟草,以施菜籽饼肥滤渣处理增加烤烟主要挥发性香气物质方面效果明显,其新植二烯、类胡萝卜素降解物、类西柏烷化合物、美拉德反应物、芳香族氨基酸降解物以及非新植二烯中性香气物的含量最高^[6],但自然降解速度极慢,且肥效不易发挥。目前,大量试验证明,利用微生物发酵将菜籽粕中蛋白质等大分子降解后,制成烟草专用生物有机肥施入烟田,有利于烟草合成较多的蛋白质,促进细胞的合成和植株中香气物质的积累,从

而形成较好的产量和品质^[7-9]。而长期以来,烟草专用生物有机肥研究过程中,功能菌一直存在着保质期不够长的问题,这主要是专用肥中高盐环境影响了功能菌存活率。本研究将自制的含菜籽饼烟草专用生物有机肥的堆肥,露天堆肥腐熟10 d后,取6.8 kg置于20 L的塑料桶内,盖好顶盖,保存6个月后,从发酵样品中筛选得到3株能以菜籽饼为原料生长且具备较高耐盐能力的菌株A₂、A₄、A₇,并初步摸索和探讨其在灭菌条件下单一菌株对菜籽饼的降解能力。所筛选的3株耐盐菌株,为今后研制含菜籽饼的烟草专用生物有机肥延长保质期提供了有利保证。

1 材料与方法

1.1 材料

市购菜籽饼:棕色,呈颗粒状,将菜籽粕于70 °C下烘干,粉碎40目过筛备用。烟草专用生物有机肥为湖南省微生物研究所植保组研制。

收稿日期:2013-04-18 接受日期:2013-07-24

基金项目:湖南省农业厅资助项目(2013122)

*通讯作者 Tel:86-013875837463; E-mail:276445293@qq.com

1.2 培养基

酪蛋白培养基: 酪蛋白 2%, 用 NaOH 加热湿润, 用 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.2) 定容至 100 mL; 完全培养基: 牛肉膏 0.3%、蛋白胨 1.0%、NaCl 1%、琼脂 1.5%, pH 7.2 ~ 7.5; 液体发酵培养基: 淀粉 1.0%、菜籽饼 6%、MgSO₄ · 7H₂O 0.04%、KH₂PO₄ 0.15%, pH 7.2 ~ 7.5。

1.3 试验方法

1.3.1 菌种的筛选

1.3.1.1 高产蛋白酶菌种初筛

取保存 6 个月生物有机肥样品 5 g, 混于 100 mL 无菌水, 取 1 mL, 稀释 1000 倍, 均匀涂布到酪蛋白培养基上, 30 °C 恒温培养 24 ~ 48 h 后观察, 测菌落直径 (d, mm) 和水解圈直径 (D, mm), 采用 DP 表示水解能力: DP = D-d。在酪蛋白培养基上挑取 DP 较大的菌落, 再经过四分区划线, 挑得单一菌落后保存。

1.3.1.2 高产蛋白酶菌种复筛

将分离纯化的菌接入液体发酵培养基中, 30 °C, 170 rpm 培养 24 h, 用以测定蛋白酶活力。以 10% 的接种量到菜籽粕液体发酵培养基中发酵 48 h 后, 将发酵液用离心机 4000 rpm, 离心 10 min, 取上清液 1 mL, 稀释 20 倍, 用福林法测定。

1.3.1.3 耐盐菌的筛选

所筛选高产蛋白酶的菌种接入液体完全培养基中, 30 °C 下恒温培养分别转接到含 5%、10%、15%、20%、25% NaCl 的固体完全培养基上划线, 30 °C 下培养 3 d, 观察生长情况, 以确定细菌耐盐程度^[10]。

1.3.1.4 单一菌种发酵菜籽饼的初步摸索

将培养好的 3 个菌种的发酵液按接种量 10% 分别接入装有已灭菌的 100 g 菜籽饼具棉花塞的 500 mL 锥形瓶中, 放入 35 °C 恒温箱进行固体发酵, 每天上下翻动数次, 发酵 5 d 后用分别测定各个发酵样品中粗蛋白、游离氨基酸、粗纤维、总糖、粗脂肪、灰分含量, 发酵 10 d 后测定各个发酵样品中的粗蛋白、游离氨基酸含量。

1.4 分析方法

1.4.1 蛋白酶活力

采用福林法测定。

1.4.2 发酵物中粗蛋白含量

取发酵物少许, 125 °C 过夜烘干, 碾磨成粉末状, 称取 0.4 g, 加 50 mL 蒸馏水煮沸 5 min, 50 °C 下水浴保温 30 min, 加 10 mL 6% 硫酸铜溶液, 静置过

夜, 过滤收集沉淀, 用凯氏定氮法测定蛋白氮含量 (硝化连同滤纸一起放入凯氏瓶内硝化)。

$$\text{粗蛋白含量} = \text{蛋白氮含量} \times 6.25$$

1.4.3 其他物质含量的测定

游离氨基酸含量, 利用茚三酮法测定; 总糖含量, 菲酮比色测定; 粗纤维含量, 采用酸碱法测定; 粗纤维含量, 用酸碱法测定; 粗脂肪含量, 用油重法测定; 灰分含量, 用灼烧法测定。

$$\text{蛋白质降解率} (\%) = [(\text{发酵前蛋白质含量} - \text{发酵后蛋白质含量}) / \text{发酵前蛋白质含量}] \times 100$$

1.4.4 16SrDNA 分子水平菌种鉴定

根据已发表的 16S rRNA 序列设计保守的扩增引物 27F 和 1492R。

2 结果与讨论

2.1 菌种的筛选及菌种产蛋白酶活性的测定

利用酪蛋白培养基初筛出 DP 均大于 8 mm 的 9 个菌株 A₁ ~ A₉, 如图 1 所示。

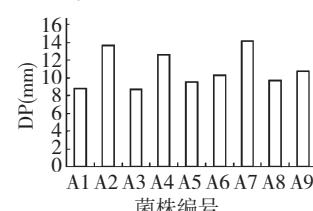


图 1 菌种水解酪蛋白情况

Fig. 1 Effect of different strains on hydrolysis of casein

再通过将所筛选菌种接入液体完全培养基 30 °C 恒温培养, 菌液用福林法测定蛋白酶活力, 如图 2 所示。

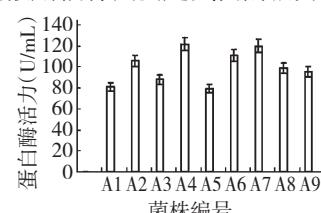


图 2 不同菌种液体培养产蛋白酶活力

Fig. 2 Effect of different hydroponic strains on protease activity

其中蛋白酶活力较高的菌株 A₂、A₄、A₆、A₇ 与有关研究^[11]比较, 可知该四株菌的酶活力较高, 可作为良好的出发菌株。

2.2 耐盐性菌种的筛选与单一菌种对菜籽饼降解程度的测定

由于菌种在固体和液体培养基中生长的耐盐性表现可能不同, 所以将所挑选蛋白酶活力较高的菌

株 A₂、A₄、A₆、A₇, 分离纯化后, 分别转接到含 5%、10%、15%、20%、25% NaCl 的固体和液体完全培养基中培养。固体完全培养基划线, 30 ℃下培养 3 d, 观察生长情况, 以确定细菌耐盐程度; 液体完全培养基以培养好的菌液稀释 5 倍并以空白培养液(稀释 5 倍)为对照, 采用 UV-1600 分光光度计, 在波长为 600 nm 下测定菌液的光密度。每一组菌液重复测量 3 次, 取平均值。固体培养基生长情况如表 1 所示。

表 1 耐盐菌种在含盐平板上生长情况

Table 1 Result of salt-tolerant bacteria growth on salt flat

NaCl 含量 NaCl conc	A2	A4	A6	A7
5%	+	+	+	++
10%	+	+	-	+
15%	-	-	-	-
20%	-	-	-	-
25%	-	-	-	-

注:“+”代表菌株在含盐平板上正常生长;“++”代表菌株在含盐平板上生长旺盛;“-”代表菌株在含盐平板上生长受抑制或基本不生长。

Note: “+” indicated that strains can grow under the salt concentration; “++” indicated that strains can grow well under the salt concentration; “-” indicated that strains can not grow under the salt concentration.

液体完全培养基生长情况如表 2, NaCl 含量 5%、10%、15%、20%、25% 的摇瓶培养 72 h 后观察, 每个菌种做 3 个平行, 结果如表 2 所示。

表 2 菌种 A₂、A₄、A₆、A₇ 耐盐性试验结果Table 2 Effect of NaCl concentrations on strains A₂, A₄, A₆ and A₇

NaCl 含量 NaCl conc	A2 OD ₆₀₀	A4 OD ₆₀₀	A6 OD ₆₀₀	A7 OD ₆₀₀
5%	0.3834	0.3712	0.0268	0.6349
10%	0.2322	0.2077	0.0124	0.3445
15%	-	-	-	-
20%	-	-	-	-
25%	-	-	-	-

注:“-”代表菌株在含 15%、20%、25% NaCl 的摇瓶中无明显生长, OD₆₀₀ 趋于 0.01 以下。

Note: “-” indicated that four strains showed no growth under the salt concentrations of 15%, 20% and 25%, OD₆₀₀ was below to 0.01.

A₆ 在含 5%、10% NaCl 的完全培养基中生长缓慢, 耐盐程度不高予以淘汰, A₂、A₄、A₇ 在含 5%、10% NaCl 的完全培养基中生长良好。经传代 10 次以上后在 10% NaCl 的完全培养基能生长, 说明此 3 种菌株的耐盐性在遗传上具有稳定性, 因此可作耐

盐菌予以保留并进行菌种鉴定。

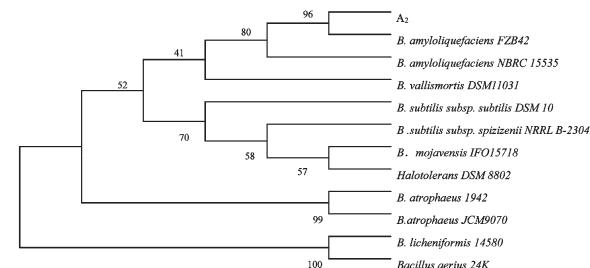
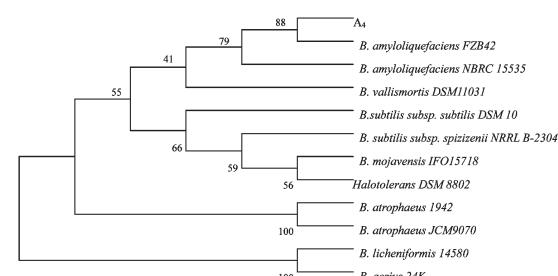
2.3 菌种的鉴定

2.3.1 形态观察

经过稀释平板法观察到菌株菌落乳白色, 表面湿润光滑, 边缘呈发射分支状, 在油镜下观察, 菌株 A₂、A₄、A₇ 经过 12 h 培养后细菌呈直杆状, 革兰氏染色为阳性, 48 h 后细菌呈椭圆状, 革兰氏染色为阴性, 有芽孢, A₂、A₄ 芽孢呈卵圆, A₇ 呈椭圆状。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》和《常见细菌鉴定手册》初步确定为芽孢杆菌属。

2.3.2 16S rDNA 序列分析及系统发育分析

对 3 菌株进行总 DNA 提取, PCR 获得 16S rDNA 基因交由生物公司测序, 分别获得菌株 A₂、A₄、A₇ 长度为 1457、1460、1464 bp 核苷酸序列。利用 MEGA5.1 软件与 NCBI 数据库中的 DNA 序列进行比对, 并构建系统发育进化树(图 3~5)。结果表明, A₂ 菌与解淀粉芽孢杆菌菌株(*Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42)的同源性最高, 为 96%, 初步鉴定其为解淀粉芽孢杆菌。A₄ 菌与解淀粉芽孢杆菌菌株(*Bacillus amyloliquefaciens* strain FZB42)的同源性最高, 为 88%, 初步鉴定其为解淀粉芽孢杆菌, A₇ 菌与栗褐芽孢杆菌(*Bacillus badius* strain 110)的同源性最高, 为 100%, 初步鉴定其为栗褐芽孢杆菌。

图 3 菌株 A₂ 的 16S rDNA 系统发育树Fig. 3 Phylogenetic analysis of strain A₂ based on 16S rDNA gene sequence图 4 菌株 A₄ 的 16S rDNA 系统发育树Fig. 4 Phylogenetic analysis of strain A₄ based on 16S rDNA gene sequence

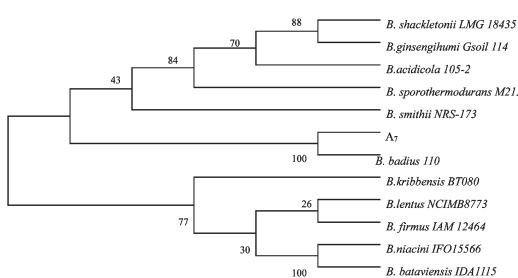


图 5 菌株 A₇ 的 16S rDNA 系统发育树

Fig. 5 Phylogenetic analysis of strain A₇ based on 16S rDNA gene sequence

2.3.3 生理生化指标测定

根据相关文献^[18]及《常见细菌鉴定手册》中芽孢杆菌属中各个种的特征,结合以上检测到的生理生化特性及 16S rDNA 序列分析可以确定:A₂ 和 A₄ 为解淀粉芽孢杆菌菌株 (*Bacillus amyloliquefaciens* strain); A₇ 为栗褐芽孢杆菌菌株 (*Bacillus badius* strain)。

表 3 菌株的生理生化特征

Table 3 Characteristics of strains A₂, A₄, A₇ in different physiological or biochemical reaction

实验项目 Items	A ₂	A ₄	A ₇
幼龄培养物呈杆状	+	+	+
芽孢形态	卵圆	卵圆	椭圆
抗溶菌酶	-	-	-
接触酶	+	+	+
水解淀粉	+	+	-
pH5.7 肉汤生长	+	+	-
pH6.8 肉汤生长	-	+	+
酪素水解	+	+	+
40 °C	+	+	+
50 °C	+	+	+
65 °C	-	-	-
甘露醇	+	+	+
v-p 反应	+	+	-
v-p 中的 pH	5.5	5.3	6.8

注: + 为阳性反应, - 为阴性反应。

Note: “+” indicated positive reaction, “-” indicated negative reaction.

2.4 单一菌种发酵降解菜籽饼的测定

以未发酵的菜籽饼粕作对照,经检测,粗蛋白含量为 37.72%,游离氨基酸态氮含量为 0.78%,粗纤维含量为 24.72%,粗脂肪含量为 6.08%,灰分为

3.97%,总糖含量为 1.68%,将本实验室筛选的 3 株菌种分别接种到已灭菌的菜籽饼中,发酵后 5 d 分别测定菜籽饼中粗蛋白、游离氨基酸、粗脂肪、粗纤维、灰分、总糖等含量,结果如下见图 6。

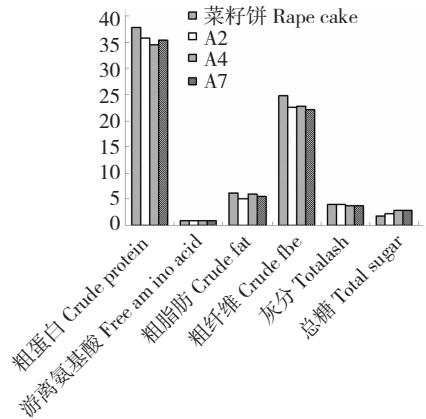


图 6 单一菌种发酵降解菜籽饼效果(第 5 d)

Fig. 6 Fermentation result of single fungus in rapeseed cake (the 5th day)

由于菜籽饼中粗蛋白含量较高,在微生物分解作用下,粗蛋白被大幅度降解,分解成小肽和氨基酸,决定微生物降解菜籽饼能力的重要指标是粗蛋白的含量和游离态氨基酸的含量,因此,我们选定第 10d 主要测定粗蛋白和游离氨基酸这两个指标,结果见图 7。

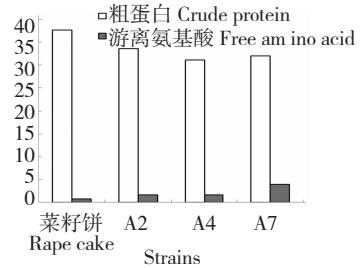


图 7 单一菌种发酵降解菜籽饼效果(第 10 d)

Fig. 7 Fermentation result of single fungus in rapeseed cake (the 10th day)

三菌株都是接入已灭菌的菜籽饼中,生长状况更能体现单一菌种对基质的降解能力和适应性,根据测定数据可知,三个所筛选出的菌株在第 5、10d 对菜籽饼粗蛋白降解率最高的菌株都是 A₄,而 A₇ 最低,A₄ 在第 10d 还达到 17.6%,并且游离氨基酸含量达到 1.54%,可能说明该解淀粉芽孢杆菌菌株 A₄ 在含硫代葡萄糖即芥子甙的菜籽饼中适应能力比栗褐芽孢杆菌菌株 A₇ 强,而 A₂ 与 A₇ 菜籽饼粗蛋白降解率相近,A₄ 与 A₇ 降解粗脂肪能力相似,这可

能说明该同属芽孢杆菌的不同种菌株降解菜籽饼粗蛋白、粗脂肪能力相当;A₂、A₄降解粗纤维的能力低于A₇,这可能说明该同种的芽孢杆菌不同菌株降解菜籽饼粗纤维能力不同。

3 结论及展望

试验筛选出三种细菌,经鉴定A₂、A₄为解淀粉芽孢杆菌菌株(*Bacillus amyloliquefaciens* strain);A₇为栗褐芽孢杆菌菌株(*Bacillus badius* strain),其中,栗褐芽孢杆菌菌株能产生有机酸,对土壤中不溶性的无机磷具有较好降解能力,可作土壤溶磷菌肥的组成菌种;解淀粉芽孢杆菌菌株在含硫代葡萄甙即芥子甙的菜籽饼中有较强的生存能力,能分泌高活性的胞外酶系,具有很强的蛋白酶、脂肪酶、淀粉酶活性,其胞外酶可以降解某些复杂的植物性碳水化合物如羧甲基纤维素、粗脂肪、淀粉等,而在本研究中所选育解淀粉芽孢杆菌和栗褐芽孢杆菌对菜籽饼粗蛋白均表现出较强的降解能力,解淀粉芽孢杆菌还表现出对菜籽饼液化能力,因此,对所得三个菌株的产蛋白酶、纤维素酶和脂肪酶等酶的活性有待于进一步的研究,其耐盐及分解菜籽饼能力正在进一步的开发中,据近期报道,解淀粉芽孢杆菌可以改善作物根际环境促进作物生长及耐盐能力^[12],因而具有很好的研究和应用前景,这些研究都为利用菜籽饼生产烟草专用生物有机肥打下基础。

参考文献

- 1 Yu GP(于国平). China's rapeseed, rapeseed oil and rapeseed meal price trend analysis in 2008. *Grain Iss Res*(粮食问题研究),2008,3:21-23.
- 2 Cao ZH(曹志洪). Soil and fertilization of high-quality flue-cured tobacco production(优质烤烟的生产与施肥). Nanjing:Jiangsu Science and Technology Press(江苏科学技术出版社),1995.
- 3 Li GC(李广才),Li FX(李富欣),Wang LH(王留河). The effects of humic acid and cake on soil nutrition and growth of flue-cured tobacco. *Tobacco Sci Technol*(烟草科技),1999,3:39-41.
- 4 Ogoshi A. PGPR-Present status&future prospects. *Sapporo Japan*,1997,73-321.
- 5 Halder AK. Solubilization of inorganic phosphate by rhizobium. *Folia Microbial*,1993,38:325-330.
- 6 Qiu X(邱鑫),Xiao HQ(肖汉乾),Xiang TY(向天勇),et al. Screening, identification and study of fermentation condition of the crude protein-degradation stain in rape cake. *China Biotechnol*(中国生物工程杂志),2005,Suppl:303-307.
- 7 Li J(黎娟),Zhou QM(周清明),Liu X(刘逊),et al. Effect of application of different forms of rapeseedcake fertilizers on volatile aroma content of tobacco. *Crop Res*(作物研究),2011,25:336-339.
- 8 Wang JY(王静雅),Zeng C(曾炽),Wu YY(吴永尧),et al. Solid state fermentation of rapeseed meal with mixture strains. *Hunan Agric Sci*(湖南农业科学),2011,7:14-17.
- 9 Li J(李季). Practical Handbook of Composting Project(堆肥工程实用手册). Beijing: Chemical Industry Press(化学工业出版社),2005.1-7.
- 10 Zhou YG(周钰钢),Wei W(魏巍). Isolation and identification of a strain of salt-tolerant bacillus sp.. *J Univ Sci Technol Beijing*(北京科技大学学报),2007,Suppl:221-222.
- 11 Yan YN(颜焱娜),Liu RP(刘仁萍),Wu YY(吴永尧),et al. Solation of strains degrains degrading the garbage of oil and fat. *Nat Prod Res Dev*(天然产物研究与开发),2010,22:674-677.
- 12 Nautiyal CS,Srivastava S,Chauhan PS,et al. Plant growth-promoting bacteria *Bacillus amyloliquefaciens* NBRISN13 modulates gene expression profile of leaf and rhizosphere community in rice during salt stress. *Plant Physiol Biochem*,2013,66:1-9.