

柠条木质素降解菌的筛选及其降解条件优化

崔家荣, 段开红* (内蒙古农业大学, 内蒙古呼和浩特 010018)

摘要 [目的]将柠条转化为可被牲畜高效利用的优良饲料。[方法]采用柠条作为单一碳源的筛选培养基、苯胺蓝筛选培养基从牲畜粪便以及柠条腐质中分离筛选出对柠条木质素具有降解作用的菌株 D-11。[结果]经微生物形态学和 16S rDNA 鉴定, D-11 为地衣芽孢杆菌, 同时对 D-11 降解条件进行优化。菌株 D-11 的最佳降解条件如下: 最佳氮源为蛋白胨; 温度为 28~32 ℃; pH 为 7; 添加诱导剂 Mn^{2+} 的浓度为 0.6 mmol/L。在最优条件下, 菌株 D-11 对柠条木质素降解率为 18.21%, 半纤维素的降解率为 16.11%, 纤维素的降解率为 13.19%。[结论]采用菌株 D-11 对柠条进行发酵降解, 使其转化为可被牲畜利用的优良饲料。

关键词 柠条; 木质素; 木质素降解菌; 筛选; 发酵降解; 降解条件优化

中图分类号 S816.6 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2019)19-0107-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2019.19.031

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Screening of Lignin Degrading Bacteria of *Caragana korshinskii* and Optimization of Its Degradation Conditions

CUI Jia-rong, DUAN Kai-hong (Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010018)

Abstract [Objective] To convert *Caragana korshinskii* into a good feed efficiently utilized by livestock. [Method] *C. korshinskii* was used as a single carbon source for screening medium and aniline blue screening medium was used to separate and screen out lignin degrading strain D-11 from livestock manure and *C. korshinskii* humus. [Result] Strain D-11 was identified by microbial morphology and 16S rDNA as *Bacillus licheniformis*, and the degradation conditions of D-11 were optimized. The optimal degradation conditions of strain D-11 were as follows: optimal nitrogen source was peptone, temperature was 28~32 ℃, pH was 7, the concentration of added inducer Mn^{2+} was 0.6 mmol/L. Under the optimal conditions, the degradation rate of strain D-11 to *C. korshinskii* lignin was 18.21%, the degradation rate of hemicellulose was 16.11%, the degradation rate of cellulose was 13.19%. [Conclusion] Strain D-11 can be used to ferment and degrade *C. korshinskii*, which can be transformed into an excellent feed utilized by livestock.

Key words *Caragana korshinskii*; Lignin; Lignin-degrading bacteria; Screening; Fermentation and degradation; Optimization of degradation conditions

柠条是多年生豆科灌木, 作为一种非竞争性资源, 在我国北方地区具有数量大、分布广、价格低廉的特点, 由于其枝繁叶茂、营养丰富, 含有 10 多种生物活性物质, 尤其是氨基酸含量丰富^[1], 因此也是良好的饲用植物, 但其木质纤维素含量高, 且收获干燥后茎秆粗硬, 并具有脱叶刺也成为影响牲畜对其高效利用的关键问题^[2]。笔者从微生物丰富的粪便及其柠条腐殖质中分离筛选出具有高效降解柠条木质素的菌株, 将柠条中难以被牲畜直接消化利用的木质素, 通过生物处理的方式降解为可被生物利用的小分子物质, 提高柠条的饲料营养价值和利用率, 来发挥柠条潜在的饲用价值。

1 材料与方

1.1 样品来源及处理方法 试验所用样品采自市区周边郊区农户的牲畜粪便、腐质柠条, 分别装入无菌袋带回并保存于 4 ℃ 冰箱中。

1.2 培养基 ①初筛培养基。柠条粉 10 g(柠条磨粉, 过 40 目筛, 65 ℃ 烘 16 h), NH_4NO_3 1.0 g, K_2HPO_4 0.5 g, KH_2PO_4 0.5 g, NaCl 0.2 g, $MgSO_4$ 0.2 g, $CaCl_2$ 0.2 g, 微量 $MnSO_4 \cdot H_2O$, 琼脂粉 20 g, 蒸馏水 1 L。②基本培养基(BM)。酵母膏 10 g, 葡萄糖 20 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1L。③苯胺蓝筛选培养基。配制浓度为 1.0% 的苯胺蓝(Azure-B)母液, 在制作平板

时, 每 100 mL 基本培养基(BM)中加入 1.0 mL 母液即可。④LB 培养基。胰蛋白胨 10 g, 酵母浸膏 5 g, NaCl 10 g, 琼脂 20 g, 蒸馏水 1 L。⑤液体发酵培养基。柠条粉 10 g, 蒸馏水 1 L, 自然 pH, 121 ℃ 灭菌 30 min。

1.3 方法

1.3.1 降解木质素菌的筛选。

1.3.1.1 初筛。 分别称取各样品 10 g, 捣碎后无菌水振荡活化 12 h, 取上清液稀释成 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 浓度梯度的稀释液, 取 0.1 mL 涂布到初筛培养基平板上, 置于 30 ℃ 恒温箱中恒温培养 1~3 d, 挑取能够在初筛培养基上生长的细菌菌株在 LB 培养基上进行划线分离、纯化, 最后保存在 LB 斜面培养基上。

1.3.1.2 复筛。 将初筛得到的菌株扩培, 转接到 BM 培养基中, 置于 37 ℃ 恒温培养 48 h 后, 每株菌做 2 个平行。10 000 r/min, 4 ℃ 离心 5 min, 取上清液点样于 Azure-B 平板的微孔, 每孔点样 100 μ L。37 ℃ 避光培养 2 d 后, 观察并记录脱色圈的有无及大小。

1.3.2 木质素酶活力的测定方法。 因为所筛菌株未检测漆酶活性, 所以仅对木质素过氧化物酶和锰过氧化物酶进行测定。制得菌株粗酶液后, 按照 Klopman 等^[3] 和 Heinfling 等^[4] 的测定方法分别对木质素过氧化物酶(Lip)和锰过氧化物酶(Mnp)活力进行测定。

1.3.3 菌株液体发酵培养。 将保存在 LB 斜面上的菌株转接到 LB 液体培养基中活化培养后, 转接到液体发酵培养基中, 以 10% 的接种量接种于液体发酵培养基中, 30 ℃ 下恒温振荡培养 15 d。

基金项目 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZY19056); 呼和浩特市科技计划项目(2017150103000011); 内蒙古自治区农业微生物发酵产业创新人才团队项目。

作者简介 崔家荣(1993—), 男, 内蒙古呼和浩特人, 硕士研究生, 研究方向: 发酵工程。* 通信作者, 教授, 硕士, 硕士生导师, 从事发酵工程研究。

收稿日期 2019-03-29; **修回日期** 2019-04-08

1.3.4 柠条发酵产物中木质纤维素各组分含量的测定。发酵产物在 121 ℃ 下灭菌 30 min, 过滤后收集残渣, 并在烘箱中 55 ℃ 烘干至恒重, 参照 Van Soest 等^[5]的木质纤维素测定方法对柠条发酵物中的木质素、纤维素和半纤维素含量进行测定, 以未发酵柠条粉为对照, 计算出柠条中各组分的相对降解率。以上试验重复 3 次。

1.3.5 菌种鉴定。将分离纯化的菌株在 LB 液体培养基中培养 3~5 d。利用引物 27F 和 1492R 扩增所筛选微生物 16S rDNA, 送交测序公司测序后, 将序列与 NCBI 网站登录序列进行比对。根据比对结果及形态特征确定所筛选菌株的种属。

2 结果与分析

2.1 降解木质素菌株的筛选 从样品中共分离到木质素降解菌 31 株, 采用苯胺蓝平板法初筛到具有水解透明圈的菌株 12 株。选取初筛菌株中水解圈直径较大的前 5 株菌株进行液体发酵, 测定发酵上清液的水解圈大小, 同时结合木质素降解酶活力的测定结果进行复筛(表 1)。从表 1 可以看出, 以上菌株在发酵培养基上产酶活力以菌株 D-11、Y-1、S-3 较高。选

取 D-11 菌株进行种属鉴定及后续研究。

表 1 木质素降解菌的复筛结果

Table 1 The secondary screening results of lignin-degrading strains

菌株 Strains	脱色圈直径 Detachment ring's diameter mm	木质素过氧化 物酶酶活力 Activity of lignin peroxidase enzyme activity//U/g	锰过氧化 物酶酶活力 Activity of manganese peroxidase enzyme U/g
D-11	29.35	54.83	41.07
Y-1	30.54	62.25	25.61
Y-9	27.47	27.34	15.83
S-3	23.46	40.32	50.00
J-3	29.60	43.54	35.62

2.2 菌株 D-11 的 16S rDNA 序列分析及系统发育树分析 将木质素降解菌株 D-11 的 16S rDNA 序列经测序获得的序列在 NCBI 网站中进行 BLAST 搜索和序列比对, 结果显示所获得序列的同源性很高的序列大多来自芽孢杆菌属 (*Bacillus*)。根据 16S rDNA 序列比对结果以及系统发育树的遗传距离分析(图 1), 初步鉴定菌株 D-11 为地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis* strain)。

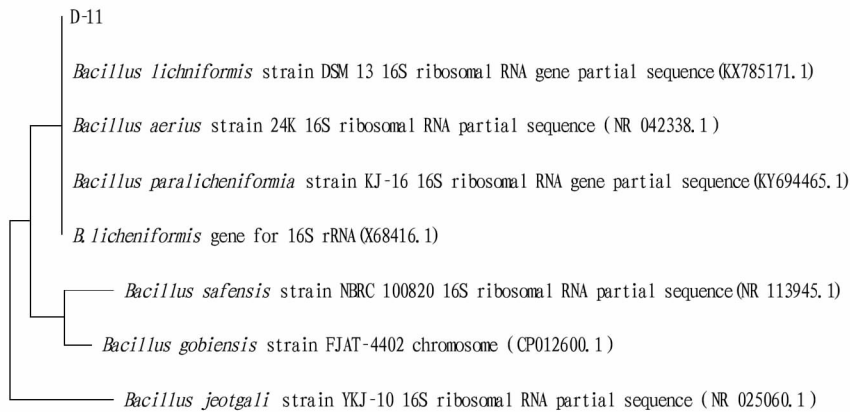


图 1 依据 16S rDNA 序列构建的 D-11 菌株系统发育树分析

Fig. 1 Phylogenetic tree analysis of strain D-11 constructed based on 16S rDNA sequences

2.3 D-11 菌株对柠条木质素的降解率测定 对未发酵柠条粉和发酵 15 d 后柠条粉中木质素、纤维素和半纤维素含量进行测定, 结果见图 2。从图 2 可以看出, 柠条粉经菌株 D-11 发酵 15 d 后, 对木质素的降解率最高, 达到 10.12%; 半纤维素和纤维素的降解率分别为 9.63% 和 7.37%。这说明 D-11 对柠条木质纤维素中各组分均具有一定的降解能力, 尤其以木质素的降解能力最好, 与纤维素和半纤维素相比降解效果最为明显。

2.4 木质素降解条件的优化

2.4.1 氮源的影响。以柠条固定碳源, 为发酵培养基中分别添加 0.05% 尿素、蛋白胨、硫酸铵以及硝酸钠作为不同的氮源, 接种 D-11 培养 15 d 后测定其各木质素降解率, 结果见表 2。从表 2 可以看出, 选取的 4 种氮源中, D-11 菌株对蛋白胨的利用较好, 其降解能力较其他氮源总体上有所提升, 使用硫酸铵以及硝酸钠为氮源是对于木质素降解率的提高不大, 而以尿素为氮源时, 其降解能力均有一定程度的下降。因此, 蛋白胨为菌株 D-11 的适宜氮源。

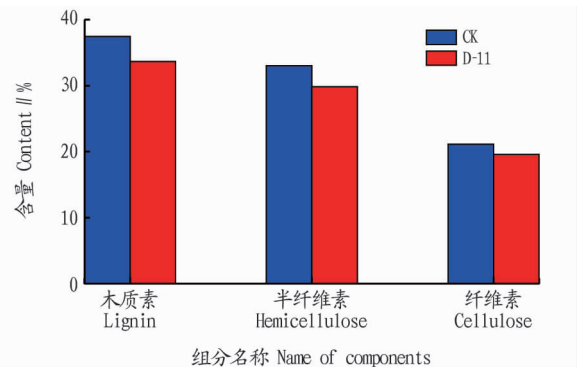


图 2 液态发酵 15 d 后柠条中木质纤维素各组分的含量

Fig. 2 The lignocelluloses content of *C. korshinskii* after 15 days of fermentation in liquid state

2.4.2 温度的影响。从图 3 可以看出, 各组分降解能力所对应的最适温度范围比较宽泛。木质素与纤维素降解的最适温度为 32 ℃, 但纤维素的降解在 28~35 ℃ 内变化不大; 半纤维素的最适降解温度为 28 ℃, 但在升温至 32 ℃ 过程中木

木质素降解率的下降幅度并不大。各组分的降解能力在超过 36 °C 时有明显下降,究其原因可能是温度的升高使降解酶的酶活发生变化,从而降低了木质素的降解率。

表 2 不同氮源对各组分相对降解率的影响

Table 2 Effects of different nitrogen sources on relative degradation rate of each component %

氮源 Nitrogen sources	木质素降解率 Lignin Degradation rate of lignin	半纤维素 降解率 Degradation rate of he- micellulose	纤维素 降解率 Degradation rate of cellulose
尿素 Urea	6.21	7.15	6.10
蛋白胨 Peptone	12.63	10.57	9.33
硫酸铵 Ammonium sulfate	10.35	10.89	8.04
硝酸钠 Sodium nitrate	9.53	10.27	8.31

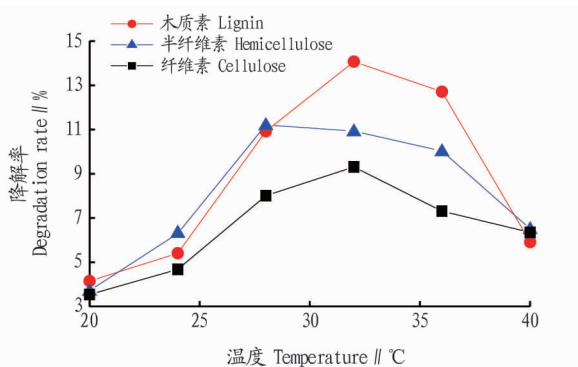


图 3 不同温度对木质素降解率的影响

Fig. 3 Effects of different temperature on lignin degradation rate

2.4.3 pH 的影响。木质素降解能力受培养液 pH 的影响较大。从图 4 可以看出,当培养液的 pH 为 7 时,木质素、纤维素与半纤维素的降解能力均达到峰值。这说明中性环境对于 D-11 的产酶以及木质素的降解更为有利,过高或者过低的 pH 都可能使菌株的生长发育产生了一定的消极影响,同时极端 pH 也会使降解所需酶失活变性,从而影响了木质素的降解效率。D-11 对于木质素的降解在 pH 为 7 时达到 12.93%,而纤维素的降解率在 pH 为 6~8 时变化幅度不大。

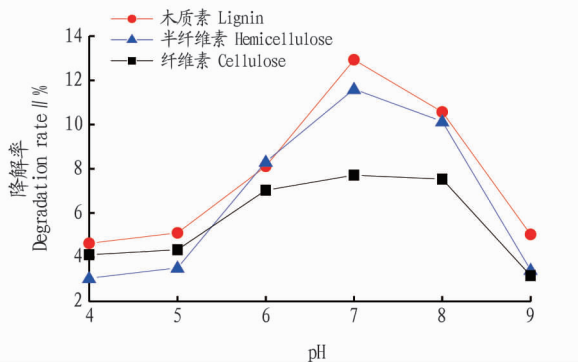


图 4 不同 pH 对木质素降解率的影响

Fig. 4 Effects of different pH on lignin degradation rate

2.4.4 Mn^{2+} 浓度的影响。菌株 D-11 的所产 Mnp 的酶活相对于 S-3 较弱,同时 Mnp 活性较为依赖 Mn^{2+} 的浓度,所以添

加一定浓度的 Mn^{2+} 可以提高 Mnp 的活力,从而提高木质素的降解能力。从图 5 可以看出,木质素与纤维素降解率随 Mn^{2+} 浓度的增加而升高,但当 Mn^{2+} 浓度低于 0.8 mmol/L 时对木质素与纤维素的降解有一定的促进作用,但对半纤维素降解的影响较小,当 Mn^{2+} 浓度大于 0.8 mmol/L 时菌株 D-11 对木质纤维素的降解能力整体呈下降趋势。这说明过量的 Mn^{2+} 可能会变成毒性离子,会影响菌株的正常生长,将促进作用转变为抑制作用。

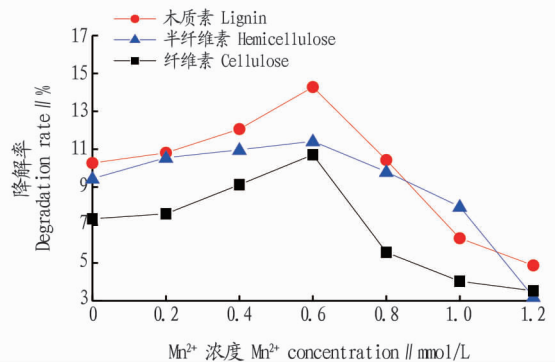


图 5 不同 Mn^{2+} 浓度对木质素降解率的影响

Fig. 5 Effects of different Mn^{2+} concentrations on lignin degradation rate

3 讨论

目前,木质素的生物质降解利用主要集中在真菌与复合菌剂的研究,然而真菌虽然在降解效果上较为理想^[6],但其培养周期长,保存运输不便以及在饲料青贮过程中容易引起饲料变质等问题也限制了其在生物质降解利用方面的推广。在针对木质素降解菌的研究中发现许多可以降解木质素的细菌,Bugg 等^[7]与 Tuomela 等^[8]从造纸厂废水中筛选出几株芽孢杆菌,并在其细胞提取物中都分离出活性较高的木质素降解酶。另外,Bandounas 等^[9]也成功分离出几株可以降解碱性卡夫木质素的芽孢杆菌。这些研究结果表明芽孢杆菌可能是木质素降解中起到关键作用的微生物。该研究通过筛选成功分离到一株具有单独降解柠条木质素能力的地衣芽孢杆菌 D-11,这对于柠条木质素降解的研究具有一定的理论指导意义。

该研究采用单因素试验对氮源、温度、pH 以及诱导剂等影响木质素降解的主要因素进行优化,从而提高菌株 D-11 对 3 种生物质的降解能力,在优化条件下菌株 D-11 对柠条木质素发酵 15 d 的降解率为 18.21%,低于李红亚等^[10]采用细菌液态发酵玉米秸秆 16 d 后 24% 的木质素降解率。筛选菌株的木质素降解率较低可能是由于多年生的平茬柠条木质化程度高,远远大于一般作物秸秆中的木质素含量,使相比更一般作物秸秆更难被降解;同时,该研究仅对部分发酵条件进行优化,可能未达到菌株的最佳发酵条件。王仁佑等^[11]研究表明金属离子添加可以促使微生物的生长而提高产酶量,而且可以通过添加表面活性剂改变菌株细胞膜的通透性来提高胞外酶的分泌,促使微生物酶活的增加,提高木

插基质为菜园土,吲哚乙酸(IAA)浓度为300 mg/L,处理时间为6 h时高粱泡无性繁殖的生根效果最好。用该组合(A₂B₂C₃D₃)进行验证试验,结果得出生根质量Q值为53.58,明显高于正交试验的其他组合和清水对照组。因此,用萘乙酸(NAA)处理更利于提高高粱泡的生根质量。

3 讨论与结论

(1)试验表明,萘乙酸(NAA)和吲哚乙酸(IAA)作为植物生长调节剂均可提高高粱泡的生根质量,但相对来说,萘乙酸(NAA)的效果更佳,这可能是由于不同植物所需的促进扦插生根的生长调节剂种类不同^[9-12]。

(2)用萘乙酸(NAA)处理的高粱泡插穗,生根质量最佳的组合为A₁B₂C₃D₁。在4种因素中,对生根质量影响的程度依次为插穗类型>扦插基质>处理时间>生长调节剂浓度。表明插穗类型对生根质量的影响最大,其中顶芽茎段对高粱泡无性繁殖生根质量最好,其次是带叶茎段,最差的为无叶茎段,这可能是由于顶芽茎段和带叶茎段可以进行光合作用,产生插穗生长所需的营养物质,从而有利于插穗生根^[13-14]。

(3)扦插基质对高粱泡扦插生根质量的影响较大,其中菜园土为最适宜高粱泡无性繁殖的扦插基质,平均根长和平均根数2个指标上都明显优于其他2个基质,其次是生黄泥,最差的是河沙。这可能是由于生黄泥保水性好但透气性差,河沙透气性好但保水性差,而菜园土透气性和保水性都较为平衡并且还含有大量有机质,pH与高粱泡自然居群的土壤接近,从而更加有利于高粱泡的生根生长^[15]。

(4)从生长调节剂浓度对高粱泡扦插生根质量的影响来看,其中300 mg/L萘乙酸(NAA)最适宜高粱泡生根生长,这可能是在一定的范围内,随着生长调节剂浓度的增大,生根效果越好^[16-17]。

(上接第109页)

质素降解能力^[12]。因此,该研究下一步的研究重点是继续优化发酵培养条件,考量其他诱导剂以及表面活性剂对菌株产酶和降解能力的影响,同时会研究多种微生物分部处理的生物预处理方法,加快降解速率并侧重于实现木质素的选择性降解,从而达到柠条纤维素回收利用的目的,提高发酵饲料的营养价值。

4 结论

从柠条作为唯一碳源的筛选培养基和苯胺蓝筛选培养基中分离出木质素降解菌株D-11,经过16S rRNA序列分析鉴定为地衣芽孢杆菌,对其采用优化的降解条件:氮源为蛋白胨;温度28~32℃;pH为7;添加Mn²⁺的浓度为0.6 mmol/L进行柠条发酵,其木质素降解率为18.21%,半纤维素的降解率为16.11%,纤维素的降解率为13.19%,其中木质素降解率较优化前提高了79.94%。该研究结果为后续对柠条木质素的降解研究提供更多试验依据。

参考文献

- [1] 朱德文. 农作物秸秆用作动物饲料——可行性与限制因素分析[J]. 饲料研究,2003(2):34-36.
- [2] 温学飞,李明,黎玉琼. 柠条微贮处理及饲喂试验[J]. 中国草食动物,

(5)在时间处理上,萘乙酸(NAA)处理时间越长生根率越低,这可能与高粱泡的生理特性和生长调节剂特性有关。要注意选取合适的生长调节剂浓度和处理时间从而控制在最有利于高粱泡无性繁殖的生长条件内^[18]。

参考文献

- [1] 傅立国,陈潭清,郎楷永,等. 中国高等植物:第6卷[M]. 青岛:青岛出版社,2003:582-647.
- [2] 林来官,张水田. 福建植物志:第2卷[M]. 福州:福建科学技术出版社,1985:293-310.
- [3] 《全国中草药汇编》编写组. 全国中草药汇编彩色图谱[M]. 北京:人民卫生出版社,1977:109.
- [4] 朱学灵,郭凌,叶永忠. 河南宝天曼自然保护区野生灌木观赏植物资源多样性研究[J]. 河南科学,2017,35(8):1330-1335.
- [5] 常见观赏灌木的特征与用途[J]. 滇西科技师范学院学报,2016,25(3):141.
- [6] 曾凡君,罗太坤,陈勇,等. 硬高粱泡粮新工艺生产酱香型白酒的研究[J]. 酿酒科技,2015(10):47-50.
- [7] 蒋盛岩,陈立德,赵良忠,等. 树头发菌丝体最适培养基的正交试验研究[J]. 邵阳学院学报(自然科学版),2007,4(4):88-90.
- [8] 周贱平,卢俊鸿,廖伟清. 基质和植物生长调节剂对九重葛插条生根的影响[J]. 园艺学报,1994,21(2):205-206.
- [9] 李海东. 红叶石楠扦插繁殖技术与其生理生化研究[D]. 昆明:昆明理工大学,2017.
- [10] 梁玉婷,邓永成,夏文胜,等. 吲哚乙酸和萘乙酸对红花玉兰嫩枝扦插生根的影响[J]. 安徽农学通报,2018,24(5):87-88.
- [11] 何克虎. 不同激素处理对祁连圆柏嫩枝扦插生根的影响[J]. 农业与技术,2018,38(17):64-65.
- [12] 罗毅. 紫叶矮樱嫩枝扦插研究[D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2018.
- [13] 武春红. 川黔紫薇嫩枝扦插繁殖效应研究[J]. 湖南林业科技,2016,43(1):97-100,119.
- [14] 张应团,易咏梅. 狭叶四照花扦插繁殖试验[J]. 湖北民族学院学报(自然科学版),2011,29(2):216-219.
- [15] 汪仁,孟祥静,何丽斯,等. 双瓣茉莉扦插繁殖技术研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(5):260-262.
- [16] 张立军,李晓环. 不同浓度萘乙酸处理对五叶地锦嫩枝扦插生根率的影响[J]. 安徽农学通报,2017,23(17):90-91,141.
- [17] 李春平,李政. 萘乙酸处理对石榴扦插育苗的影响[J]. 中国南方果树,2019,48(1):111-114.
- [18] 贺欢,王卫成,汤玲,等. 萘乙酸生根粉及扦插基质对金叶复叶槭扦插苗成活率的影响[J]. 甘肃农业科技,2018(3):42-44.

2005,25(1):56-57.

- [3] KLOPMAN G, TU M H, FAN B T. Prediction of the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Theor Chem Acc, 1999, 102:33-38.
- [4] HEINFLING A, MARTINEZ M J, MARTINEZ A T, et al. Transformation of industrial dyes by manganese peroxidases from *Bjerkandera adusta* and *Pleurotus eryngii* in a manganese-independent reaction [J]. Appl Environ Microbiol, 1998, 64(8):2788-2793.
- [5] VAN SOEST P J, ROBERTSON J B, LEWIS B A. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition [J]. Journal of dairy science, 1991, 74(10):3583-3597.
- [6] 陈忠华. 真菌降解木质素的研究进展及发展前景[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2009(9):28-29.
- [7] BUGG T D H, AHMAD M, HARDIMAN E M, et al. The emerging role for bacteria in lignin degradation and bio-product formation [J]. Curr Opin Biotechnol, 2011, 22(3):394-400.
- [8] TUOMELA M, VIKMAN M, HATAKKA A, et al. Biodegradation of lignin in a compost environment: A review [J]. Bioresour Technol, 2000, 72(2):169-183.
- [9] BANDOUNAS L, WIERCKX N J P, WINDE J H D, et al. Isolation and characterization of novel bacterial strains exhibiting lignin lytic potential [J]. BMC Biotechnol, 2011, 11:1-11.
- [10] 李红亚,李木娜,王树香,等. 产芽孢木质素降解菌MN-8的筛选及其对木质素的降解[J]. 中国农业科学,2014,47(2):324-333.
- [11] 王仁佑,刘剑潇,黄红丽,等. 鼠李糖脂对两株木质素降解菌产酶能力的影响[J]. 湖南大学学报(自然科学版),2008,35(10):70-74.
- [12] STOLZ A. Molecular characteristics of xenobiotic-degrading sphingomonads [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2009, 81:793-811.