

杨 勇, 聂 旭, 王 健, 等. 油茶饼粕纤维素降解菌的筛选与鉴定[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(5): 299–301.

油茶饼粕纤维素降解菌的筛选与鉴定

杨 勇, 聂 旭, 王 健, 杨 帆, 杨文蛟, 吴永尧

(湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南长沙 410128)

摘要:从土壤中筛选出酶活性相对较高且对油茶饼粕中的抑菌物质具有较高抗性的菌种 YY-1、YY-2 和 YY-3, 在此基础上测定它们的酶活性[5 843、1 4834、8 264 U/(mol·h)], 并比较这 3 个菌种的生物量, 最终确定 YY-2 为最佳菌种。通过菌种 18S rDNA 测序比对后发现, YY-2 菌种与烟曲霉的相似性达 99%。

关键词:油茶饼粕; 纤维素; 还原糖; 降解菌

中图分类号: Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0299-02

油茶(*Camellia oleifera* Abel) 属山茶科(Theaceae)山茶属植物, 为常绿小乔木或灌木, 为我国特有的木本食用油料树种, 有 2 000 多年的栽培和利用历史, 与油橄榄、油棕、椰子并称为世界四大木本油料植物, 与乌桕、油桐和核桃并称为我国四大木本油料植物^[1]。近年来, 油茶越来越受到人们的青睐和关注, 但是目前油茶产业仍面临着很多问题, 其中之一是油茶饼粕的综合利用效率较差, 一般主要作为燃料和清塘剂等使用, 使茶粕中含量较高的粗纤维没有得到充分的利用^[2]。所以, 如何能够有效地利用油茶饼粕是一个亟待研究的问题。油茶饼粕中的粗纤维、粗蛋白含量达到了 21.7%、14.4%, 具有很高的应用价值, 近年来关于油茶饼粕的应用研究兴起, 人们发现油茶饼粕在饲料和肥料上的应用具有良好的前景, 用作肥料时利用茶皂素抑菌及其对农业害虫的灭杀作用^[3], 减少了农药的使用量^[4]; 但茶皂素对微生物都有抑制作用, 且纤维素含量高, 自然分解慢, 不能快速、充分地土壤微生物的生长提供足够的营养, 导致土壤中某些功能丧失或减弱。因此, 降解纤维素、增加还原糖含量、提供微生物生长的营养非常有必要。本试验主要是从笔者所在实验室周边的多种土样中选出能够抗油茶饼粕中抑菌成分且具有高活性的纤维素分解菌株, 通过对比分析寻找出最佳菌株, 并进一步进行菌种的鉴定, 确定筛选出笔者所需要的菌种。

1 材料与方法

1.1 材料

试验菌种主要由笔者所在实验室自行筛选。茶粕由郴州邦尔泰苏仙油脂有限公司提供。

1.2 纤维素分解菌的筛选

1.2.1 培养基的制备 纤维素分解初筛培养基^[5]: 茶粕 15 g、(NH₄)₂SO₄ 2.0%、MgSO₄ 0.05%、KH₂PO₄ 0.1%、水 100 mL。纤维素分解菌复筛培养基^[6]: 羧甲基纤维素钠

(CMC-Na) 1.5 g、NH₄NO₃ 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、KH₂PO₄ 0.5 g、水 100 mL、茶皂素 5 g, pH 值自然, 121 ℃ 灭菌 30 min。液体产酶鉴定培养基: CMC-Na 1.5 g、NH₄NO₃ 0.5 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、KH₂PO₄ 0.5 g、NaH₂PO₄ 0.5 g、CaCl₂ 0.5 g、水 100 mL、茶皂素 5 g, pH 值自然, 121 ℃ 灭菌 30 min。

1.2.2 菌种的富集 从笔者所在实验室周边称取 1 g 土壤, 置于 100 mL 无菌水中, 于 150 r/min 摇床上摇动 30 min; 吸取 1 mL 上清液于富集培养基中, 37 ℃、150 r/min 摇床上培养 24 h。

1.2.3 纤维素分解菌的处理 (1) 初筛。吸取富集发酵液 0.1 mL, 均匀地涂布于纤维素分解初筛培养基上, 置于 37 ℃ 下培养 72 h。(2) 复筛。挑选出生长较好的菌株, 在纤维素分解菌复筛培养基上接种, 置于 37 ℃ 下培养 72 h。(3) 纯化。挑取长势好的菌株, 进行 10⁻¹、10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶、10⁻⁷、10⁻⁸、10⁻⁹ 稀释, 并涂布在纤维素分解菌复筛培养基上, 置于 37 ℃ 下培养 72 h, 挑选单菌落进行保存。

1.3 项目测定及其方法

1.3.1 纤维素酶活性的测定 将筛选的菌落用茶籽饼粕液体发酵培养基培养^[7], 取 1 mL 发酵液, 经 3 000 r/min 离心 15 min, 取上清即为粗酶液; 移取 1.5 mL 含有 0.5% CMC-Na 的醋酸缓冲液(0.05 mol/L, pH 值 4.8) 于试管中, 加入酶液 0.5 mL, 于 50 ℃ 下保温 30 min, 用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)比色定糖法测定降解后的溶液中的还原糖含量^[8]。在上述条件下, 定义 1 h 催化纤维素水解生成 1 mol 葡萄糖的酶量为 1 个酶活性单位(U)。试验结果均为 3 次重复所得的平均值。

1.3.2 纤维素含量的测定 称取烘干至恒重的样品 1 g 于圆底烧瓶中, 加入 100 mL 0.255 mol/L H₂SO₄ 溶液, 在 3~5 min 内迅速沸腾, 然后缓沸 1 h, 倒掉酸性溶剂, 调节 pH 值至中性; 加入 100 mL 0.333 mol/L NaOH 溶液, 在 3~5 min 内迅速沸腾, 然后缓沸 1 h, 倒掉溶液, 调节 pH 值至中性; 加入 25 mL 乙醇, 倒掉液体, 烘干至恒重, 称重即为纤维素含量。

1.3.3 降解纤维素菌种生物量的测定 将纯化后的菌种接种于纤维素复筛培养基上, 每隔 24 h 吸取发酵液 1 mL, 于 3 000 r/min 下离心 10 min, 弃掉上清液, 烘干至恒重, 称重。

收稿日期: 2013-09-18

作者简介: 杨 勇(1988—), 男, 湖南常德人, 硕士研究生, 研究方向为酶、微生物与发酵工程。E-mail: 406863865@qq.com。

通信作者: 吴永尧, 教授, 博士生导师, 研究方向为微量元素硒锌的生物学、微生物发酵与酶工程及生物资源利用。Tel: (0731) 84673954; E-mail: yw@sohu.com。

2 结果与分析

2.1 菌种的筛选

油茶饼粕中含有一定量的茶皂素,茶皂素对微生物的生长具有一定的抑制作用。通过在纤维素分解菌复筛培养基、液体产酶培养基的摇床上培养后,测定菌种的生物量及酶活性,筛选出能在含有茶皂素的情况下生长且具有纤维素酶活性的 3 个菌种 YY-1、YY-2 和 YY-3。从图 1 可以看出,在培养后 4 d,所筛选出的 YY-2 和 YY-3 菌种的生物量达到最大,YY-1 菌种则是培养后 3 d 达到最大,且 YY-2 菌种的最大生物量最大。

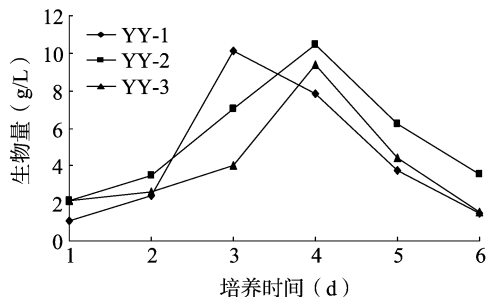


图1 各茶籽饼粕纤维素降解菌的生物量情况

2.2 纤维素酶活性的测定

每个菌种进行 3 组平行试验,以 CMC-Na 为底物,测定吸光度 ($D_{520\text{ nm}}$) 以及酶活性。从图 2 可以看出,YY-2 和 YY-3 菌种的酶活性在发酵前 4 d 逐渐增强,并在发酵后 4 d 时达到最高值,然后开始下降;而 YY-1 菌种则是在发酵后 5 d 时达到最高值,然后下降,这可能是因为 YY-3 菌种的适应性比其他菌种弱一些。其中,在供试 3 个菌种中 YY-2 菌种的酶活性最强,其次是 YY-1 菌种,且 YY-2 菌种的酶活性比其他 2 个菌种强很多,因此 YY-2 菌种是降解油茶饼粕中纤维素的适宜菌种。

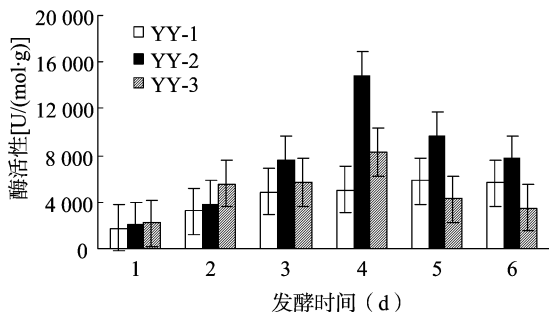


图2 茶籽饼粕纤维素降解菌的酶活性与发酵时间的关系

2.3 纤维素降解菌对茶籽饼粕的影响

用茶籽饼粕液体发酵培养基比较 3 个菌种发酵前后的还原糖及降解后的纤维素含量,结果见图 3。由图 3 可知,3 个菌种的纤维素均不同程度地被降解。其中,YY-2 菌种纤维素降解率及还原糖含量均高于其他 2 个菌种,纤维素降解了 9.63%,还原糖含量增加了 3.08%;其次是 YY-3 菌种;降解率最低的是 YY-1 菌种。

2.4 茶籽饼粕纤维素降解菌菌株的分子鉴定

比较生物量和酶活性后,选取 YY-2 菌种进行分子生物

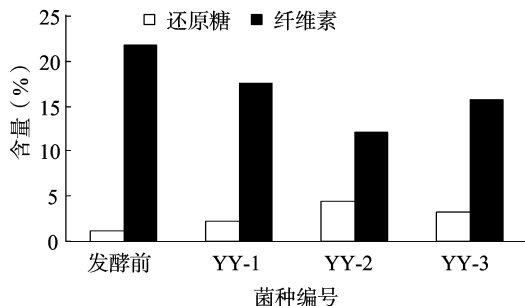
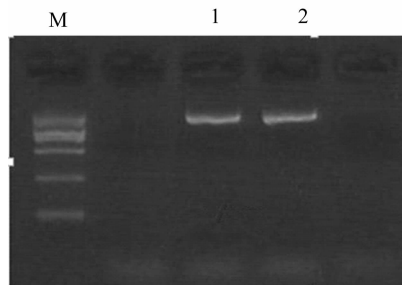


图3 不同降解菌菌种对还原糖、纤维素含量的影响

学鉴定,通过 NS1 + NS8 进行 PCR 扩增后电泳,结果见图 4。由图 4 可知,加入 NS1 + NS8 引物后能有效地进行 PCR 扩增,然后对扩增后的样品进行基因序列测定,通过 NCBI 的 Blast 检索系统同源性检索,结果表明 YY-2 菌株与菌株烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*, AB008401.1) 有 99% 的相似性。



M—marker; 1、2—PCR 扩增产物

图4 NS1+NS8 引物 PCR 后的电泳结果

3 结论与讨论

近年来随着茶油的盛行、茶籽产量的增加,其副产物油茶饼粕的产量也不断增加,对于油茶饼粕的处理也面临着很多问题。以前油茶饼粕大部分都是抛弃或者作为燃料处理,但是油茶饼粕中的茶皂素对环境微生物有一定的影响^[9],同时油茶饼粕中的茶籽多糖、粗蛋白和粗纤维等都没有得到很好的应用,这样会造成一定的浪费^[10]。

已有的文献大多是关于如何利用微生物降解油茶饼粕中茶皂素的研究^[11],而关于降解纤维素的研究比较少,且筛选出来的菌种活性不够强,不能很好地适应实际需要。因此,笔者从土壤中筛选出 3 种酶活性相对较高且对油茶饼粕中的抑菌物质具有较高抗性的菌株 YY-1、YY-2 和 YY-3,在没有进行发酵条件优化的前提下,进一步比较 3 个菌种之间的生物量和酶活性以及发酵前后纤维素和还原糖含量后发现,YY-2 菌种的生物量和酶活性在 3 个菌种中是最高的,且其纤维素降解率及还原糖含量比其他 2 个菌种都要高一些,纤维素含量降解了 9.63%,还原糖含量增加了 3.08%。因此,YY-2 菌种是降解油茶饼粕中纤维素的最佳菌种。但是,本试验只是针对纤维素降解进行了研究,对菌种能否在降解纤维素的同时降解油茶饼粕中的茶皂素还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 邓桂兰,彭超英,卢峰.油茶饼粕的综合利用研究[J].广州食品工业科技,2004,20(3):130-132.

高 杨,胡振琪,肖 武,等.造林对土壤有机碳储量的影响(综述)[J].江苏农业科学,2014,42(5):301-305.

造林对土壤有机碳储量的影响(综述)

高 杨,胡振琪,肖 武,余 洋,曾纪勇

[中国矿业大学(北京)土地复垦与生态重建研究所/矿山生态安全教育部工程研究中心,北京 100083]

摘要:造林作为一种重要的增加碳汇方式已经或正在被很多国家应用,但是造林后土壤有机碳库储量的变化和影响因素尚不明确。在总结了近年来的相关文献后认为:造林前土地利用类型、纬度变化、土壤类型和树种选择都能对造林后土壤有机碳储量的变化产生重要影响;农田和裸地造林后土壤有机碳汇显著增加,草地造林后土壤有机碳变化的不确定性是由林龄的不同导致的;温带地区造林后土壤有机碳汇快速增加,随着纬度的上升,造林后土壤有机碳储量先下降后达到或高于造林前的水平所需要的时间越来越长;土壤黏粒与粉粒的含量与造林后土壤有机碳库储量呈正相关关系;农田造乔木林和灌木林土壤有机碳储量都会显著增加,而草地最好选择阔叶乔木,灌木可以广泛应用于造林前的各种土地利用类型。

关键词:造林;土壤有机碳;土地利用类型;纬度变化;土壤类型;树种选择

中图分类号: S153.6⁺2;S714.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)05-0301-05

土壤是陆地生态系统最大的有机碳库。据估算,全球 1 m 深度的土壤中储存的有机碳量约为 1.5×10^{15} kg,约为植物碳库的 3 倍、大气碳库的 2 倍^[1]。由于土壤有机碳储量巨大,其微弱的波动就可能影响到大气 CO₂ 浓度的变化,进而影响全球气候变化。作为影响土壤有机碳库的重要方式之一,土地利用和土地覆被的变化越来越受到学术界的关注。其中,森林砍伐等植被破坏活动会使土壤有机碳大量流失^[2]的观点已经得到公认,而造林是否能够增加土壤有机碳库的储量却饱受争议。已有的结果表明,造林后土壤有机碳库的变化差异很大,可能会出现 3 种状态:增加、减少或没有显著变化。造成这种现象的原因除了土壤有机碳库本身对土地利用变化的敏感程度有很大差异之外,造林前的土地利用类型众多,而造林后能够影响土壤有机碳变化的因素错综复杂是重要原因。因此,总结和分析造林后土壤有机碳的变化和影响土壤有机碳变化的因素就显得尤为重要。

随着气候变化的加剧,造林已经作为一种重要的增加碳汇手段正在被很多国家采用,造林增汇已经成为一项全球性

的工程。本研究总结了近十几年来国内外关于造林后土壤有机碳变化的研究结果,分析了形成这些结果的原因。本研究结果希望能为更客观准确地评价造林的生态效益和如何实现木材和碳汇的双赢提供参考。

1 造林前的土地利用类型对造林后土壤有机碳储量的影响

1.1 农田和裸地造林对土壤有机碳库的影响

造林前土地利用类型主要有 4 种:农田、草地、原有林地和裸地。其中,农田和裸地造林能够显著增加土壤有机碳库的储量。Paul 等总结了 2001 年以前 43 篇关于造林对土壤有机碳库影响的结果以后,认为农田造林在最初的 5 年内土壤有机碳含量会显著下降,5 年后开始回升,30 年后基本达到原农田的水平,而后以每年 0.50%~0.86% 的速度上升^[3]。本研究也认为农田造林后土壤有机碳很可能符合先下降后上升的过程,但是并不一定完全符合 Paul 等所认为的具体时间和变化的速率。例如,在中国东北,农田营造红松和樟子松开始的 12 年内,土壤有机碳以每年 1.2% 的速度下降,12~33 年内每年以 1.9% 的速度增加^[4]。Zhang 等在评价了中国的退耕还林工程后认为,在开始的 4~5 年内土壤有机碳储量会显著减少,但随后会以 $36.67 \text{ g}/(\text{m}^2 \cdot \text{年})$ 的速度增加^[5]。在俄罗斯东南部,农田弃耕后自然恢复起来的天然樟子松林地也呈现出先下降后上升的过程^[6]。

收稿日期:2013-12-31

基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(编号:2010YD03)。

作者简介:高 杨(1988—),女,山东禹城人,博士研究生,研究方向为煤矸石山复垦与生态重建。Tel:(010)62339045;E-mail:gyang1002@163.com。

[2]邢朝宏,李进伟,金青哲,等.我国油茶籽的综合利用[J].粮油食品科技,2011,19(4):13-16.

[3]董道青,陈建明,俞晓平,等.茶皂素对雷公藤乳油防治茶尺蠖幼虫的增效作用[J].茶叶科学,2008,28(3):228-233.

[4]王志高,谭济才,刘 军,等.茶皂素、生石灰等防治稻田福寿螺的效果评估[J].植物保护学报,2011,38(4):363-368.

[5]肖玉娟,邓泽元,范亚苇,等. *Neurospora crassa* 降解茶粕培养基粗纤维的发酵工艺研究[J].食品科学,2010(23):243-247.

[6]钟海雁,王承南,黄健屏,等.油茶枯饼固态发酵技术的研究[J].中南林学院学报,2001,21(1):21-25.

[7]钟海雁,王承南,黄健屏,等.油茶枯饼固态发酵技术的研究[J].中南林学院学报,2001,21(1):21-25.

[8]李君君,文 汉.降解茶粕高效纤维素酶的菌株的筛选[J].中国农学通报,2010,26(16):31-35.

[9]傅 力,丁友昉,张 麓.纤维素酶测定方法的研究[J].新疆农业大学学报,2000,23(2):45-48.

[10]袁钟宇,张石蕊,贺 喜,等.茶籽多糖及茶皂素对肉鸡生长性能和肠道微生物的影响[J].中国畜牧杂志,2010,46(7):28-31.

[11]方 飞,王力生.油茶粕资源综合开发利用研究进展[J].饲料博览,2011(6):30-32.