

秦翠静,陈宝江,忻龙祚,等. 菌糠中产纤维素酶菌株的筛选、鉴定及增殖条件响应面法优化[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):457-460.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.131

菌糠中产纤维素酶菌株的筛选、鉴定 及增殖条件响应面法优化

秦翠静¹, 陈宝江², 忻龙祚³, 程书梅¹

(1. 河北农业大学食品科技学院, 河北保定 071000; 2. 河北农业大学动物科技学院, 河北保定 071000;

3. 河北北方学院植物科学系, 河北张家口 075000)

摘要:为了从菌糠中筛选高产纤维素酶的菌株, 鉴定并优化其培养条件, 利用纤维素刚果红筛选平板初筛, 摇瓶复筛后得到菌株, 鉴定后通过响应面法优化培养条件。结果表明, 分离筛选得到的高产纤维素酶的菌株, 经过形态观察、生理生化鉴定以及 16S rRNA 序列分析, 初步鉴定为芽孢杆菌属枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 命名为 S-4。采用响应面法对菌株 S-4 进行增殖条件的优化, 得到 3 个显著因子, 分别为葡萄糖添加量 13.08 g/L, 蛋白胨添加量 6.52 g/L, KH_2PO_4 添加量 0.37 g/L。通过响应面法优化后, 活菌量比初始培养提高了 34.49%。

关键词: 菌糠; 枯草芽孢杆菌; 纤维素酶; 响应面法; 培养基优化

中图分类号: S816.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0457-03

菌糠是培育食用菌后所剩的糠类物质, 含有丰富的纤维素、粗蛋白等营养物质。随着我国对食用菌需求量的加大, 菌糠的产量也大大增加, 菌糠资源的二次利用以及环境保护等方面面临极大的挑战^[1-2]。近年来的大量研究表明, 利用微生物发酵菌糠可以制成微生物制剂及饲料, 纤维素、木质素等被不同程度地降解, 粗蛋白、粗脂肪均高于未经发酵的基质, 可以缓解资源的浪费^[3]。另外, 将菌糠制备成益生菌制剂用于动物饲养, 不仅有利于动物的消化吸收, 而且降低了饲料成本^[4-5]。

以往研究中的发酵菌糠所用菌株多为保藏菌种, 关于菌糠中菌种利用的报道很少。本试验从菌糠中筛选出 1 株产纤维素酶能力强的菌株 S-4, 该菌株产生的纤维素酶可以更好地利用菌糠中的纤维素, 降低纤维素含量。经生理生化、16S rRNA 序列对比及分析鉴定, 菌株 S-4 为枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*), 羧甲基纤维素酶 (carboxymethyl cellulase enzyme, CMCase) 活力为 67.5 U/ml。采用软件 Design-Expert 8.0 的 Plackett-Burman 试验筛选出对响应值影响较大的 3 个因素, 利用最陡爬坡试验逼近最大响应区域, 用 Box-Behnken 试验进一步优化得到最大响应值及最优增殖条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 样品 菌糠样品由河北农业大学动物科技学院提供。

1.1.2 试剂 羧甲基纤维素钠 (简称 CMC-Na)、酵母提取

物、蛋白胨、牛肉膏均由北京奥博星有限公司提供。MgSO₄·7H₂O、K₂HPO₄、KH₂PO₄、葡萄糖由天津福晨化学试剂厂提供。

1.1.3 培养基 牛肉膏蛋白胨液体培养基: 牛肉膏 3 g、蛋白胨 10 g、NaCl 5 g, 加水补足至 1 000 mL, pH 值 7.0~8.0, 121 ℃ 灭菌 20 min, 备用; 发酵产酶培养基: CMC-Na 10 g、KH₂PO₄ 2 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、蛋白胨 5 g、酵母粉 5 g, 加水补足至 1 000 mL, 121 ℃ 灭菌 20 min, 备用。刚果红筛选培养基: CMC-Na 2 g、(NH₄)₂SO₄ 2 g、MgSO₄·7H₂O 0.5 g、K₂HPO₄ 1 g、NaCl 0.5 g、刚果红 0.4 g、琼脂 20 g, 加水补足至 1 000 mL, pH 值 7.0, 121 ℃ 灭菌 30 min。

1.2 试验方法

1.2.1 菌株筛选

1.2.1.1 富集培养 菌糠中添加 2% 糖蜜、1% 硫酸铵、60% 水, 于 30 ℃ 恒温培养箱中培养 48 h。将发酵后的菌糠按 1:9 的比例置于生理盐水中, 静置 30 min, 5 000 r/min 离心 5 min, 将离心后得到的菌悬液进行梯度稀释, 涂布后于 30 ℃ 恒温培养箱倒置培养 48 h。

1.2.1.2 产纤维素酶菌株初筛 将培养后的菌糠按 1:9 的比例溶于生理盐水中, 5 000 r/min 离心 5 min, 将离心后得到的菌悬液进行梯度稀释, 并涂布于刚果红筛选培养基上, 37 ℃ 培养 24 h 后放置 2 d, 测量透明圈直径与菌落直径, 挑选出透明圈直径与菌落直径比值 (简称圈菌比) 较大的作为初筛菌株^[6-7], 在刚果红初筛平板上进行划线分离纯化, 并于斜面保存菌种。

1.2.1.3 产纤维素酶菌株复筛 将初筛得到的菌株接种到产酶培养基中, 于 37 ℃、160 r/min 培养 48 h, 后于 4 ℃、5 000 r/min 离心 10 min, 测定上清液的羧甲基纤维素酶活性^[8]。

1.2.2 菌株鉴定

1.2.2.1 形态学特征及生理生化鉴定 观察菌株的菌落形态, 革兰氏染色后观察菌株显微形态。利用细菌微量生化鉴

收稿日期: 2015-08-18

基金项目: 河北省农业厅现代农业产业技术体系河北省创新团队。

作者简介: 秦翠静 (1989—), 女, 河北保定人, 硕士, 研究方向为发酵工程。E-mail: 1085907192@qq.com。

通信作者: 陈宝江, 博士, 教授, 研究方向为动物营养与饲料资源开发, E-mail: chenbaojiang@vip.sina.com; 程书梅, 博士, 副教授, 研究方向为微生物、发酵工程, E-mail: 516089669@qq.com。

定管进行生理生化鉴定^[9]。

1.2.2.2 菌株的基因鉴定 提取菌株的基因组,并对基因组进行扩增,采用试剂盒割胶回收之后连接片段,进行热转化,对基因片段进行 PCR 扩增。扩增引物的合成以及测序工作由华大基因完成。得到 16S 序列后,在 NCBI 系统通过 Blast 进行序列比对分析,利用 Mega 5.0 软件的邻接法创建系统发育树^[10-12]。

1.2.3 响应面法优化菌株 S-4 发酵条件 通过 Plackett - Burman (PB) 试验设计,从 7 个试验因素中筛选出 3 个显著影响因子^[13-14],利用最陡爬坡试验,使因素水平值逼近最大响应区域,结合响应面法 BB 试验设计进一步研究,并利用 Design Expert 软件进行回归分析^[15-16],寻求最佳水平,得到最优发酵条件^[17]。

2 结果与分析

2.1 菌糠筛菌

由表 1 可知,圈菌比最大的菌株 S-4 为产纤维素酶能力最强的菌株。

表 1 菌株产纤维素酶圈菌比

菌株	透明圈直径 (cm)	菌落直径 (cm)	圈菌比
S-1	0.71	0.35	2.02
S-2	2.21	1.82	1.21
S-3	1.70	1.12	1.51
S-4	3.51	0.78	4.50

摇瓶发酵复筛结果显示,菌株 S-1、S-4 的 CMC 活性分别为 22.4、67.5 U/mL (表 2)。综合圈菌比和 CMC 活性可知,S-4 为目的菌株。

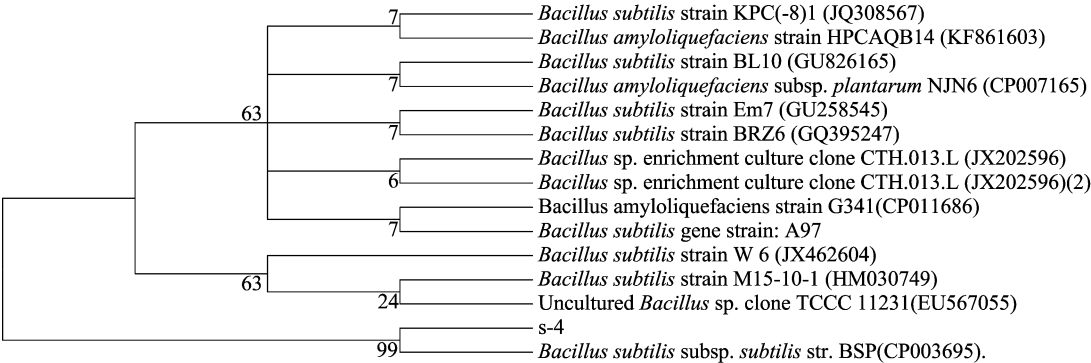


图1 菌株 S-4 与相关菌株 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树

2.3 响应面法优化菌株 S-4 发酵条件

2.3.1 PB 试验 以枯草芽孢杆菌 S-4 为试验菌株,以菌悬液 $D_{546\text{nm}}$ 为响应值,于 37℃、160 r/min 摇床发酵,分析影响发酵的 7 个因素:A、葡萄糖;B、酵母粉;C、 KH_2PO_4 ;D、 K_2HPO_4 ;E、 MgSO_4 ;F、蛋白胨;G、牛肉膏。由表 4 可见,该模型相关性极显著 (P 值 = 0.000 1 < 0.01),在 90% 的置信区间内,对于活菌量影响显著的 3 个因素依次为 A:葡萄糖,F:蛋白胨,C: KH_2PO_4 ,以此作进一步的响应面分析。

2.3.2 最陡爬坡试验 根据一阶方程,确定其变化的步长以及方向,试验组合设计及结果见表 5,可见第 2 组的 Y 值 ($D_{546\text{nm}}$),即发酵后菌液中菌种生物含量最高。因此,将葡萄

表 2 摇瓶发酵复筛结果

菌株	圈菌比	CMC 酶活性 (U/mL)
S-1	2.02	22.4
S-4	4.50	67.5

2.2 菌株 S-4 的鉴定

2.2.1 形态学特征及生理生化鉴定 形态观察表明,菌株 S-4 菌落形态为圆形,边缘不整齐,表面褶皱,干燥不透明,白色;液体培养形成菌膜,分层明显;经过染色后,油镜下观察到菌体形态为杆状,单个排列,革兰氏染色阳性,有芽孢。表 3 为菌株 S-4 的生理生化鉴定结果。

表 3 菌株 S-4 生理生化鉴定结果

试验项目	结果	试验项目	结果
七叶苷	+	乳糖 A	-
鼠李糖	-	麦芽糖	-
山梨醇	-	棉籽糖	-
甘露醇	-	葡萄糖	+
淀粉水解	+	蔗糖	+
菌膜形成	+	纤维二糖	+
水杨苷	-	乙酰甲基甲醇试验 (简称 VP 试验)	+

注:“+”表示阳性反应;“-”表示阴性反应。

2.2.2 菌株的分子鉴定 提取菌株 S-4 的基因,进行 PCR 扩增,扩增产物进行琼脂糖电泳。S-4 菌株 16S rRNA 序列的扩增产物约为 1 500 bp。序列信息在 NCBI 进行 Blast 比对,S-4 菌株 16S rRNA 序列与枯草芽孢杆菌的 16S rRNA 序列同源性为 97%。从系统进化发育树分析可知,菌株 S-4 与枯草芽孢杆菌的 16S rRNA 序列相似度最高 (图 1)。结合序列对比分析,初步判断菌株 S-4 为枯草芽孢杆菌。

表 4 PB 试验各因素的主效应分析结果

因素	F 值	P 值	显著性排序
模型	148.21	0.000 1	
A	968.20	<0.000 1	1
B	4.68	0.096 6	5
C	19.44	0.011 6	3
D	13.35	0.021 7	4
E	1.79	0.252 2	6
F	28.59	0.005 9	2
G	1.45	0.294 2	7

糖含量 12 g/L、蛋白胨含量 6 g/L、 KH_2PO_4 含量 0.4 g/L 作为

后续响应面 Box - Behnken 试验的中心点。

表 5 最陡爬坡试验设计及结果

试验号	葡萄糖含量 (g/L)	蛋白胨含量 (g/L)	KH ₂ PO ₄ 含量 (g/L)	Y 值 (D _{546 nm})
1	10	4	0.2	2.223
2	12	6	0.4	2.370
3	14	8	0.6	2.136
4	16	10	0.8	2.102
5	18	12	1.0	2.052
6	20	14	1.2	1.968

表 6 Box - Behnken 试验回归模型及方差分析结果

来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值	显著性
模型	0.59	9	0.065	19.82	0.000 4	显著
失拟项	5.966 × 10 ⁻³	3	1.989 × 10 ⁻³	0.47	0.002 3	显著
误差	0.017	4	4.276 × 10 ⁻³			
总和	0.61	16				
R ²			0.966 2			
校正 R ²			0.913 7			

2.3.4 响应面分析 采用响应面法分析研究培养基成分,将 PB 试验、最陡爬坡试验、Box - Behnken 试验结合。结果显示,当 3 个显著因子分别为葡萄糖含量为 13.08 g/L、蛋白胨含量为 6.52 g/L、KH₂PO₄ 含量为 0.37 g/L 时,优化后活菌量比初始培养提高了 34.49%。由图 2、图 3、图 4 可知,AB、BC 之间具有十分明显的交互作用,AC 之间的交互作用较小。

2.3.3 响应面 Box - Behnken 试验 在本研究的条件和方法的基础上,将 A (葡萄糖 12 g/L)、B (蛋白胨 6 g/L)、C (KH₂PO₄ 0.4 g/L) 作为 Box - Behnken 试验的中心点,采用 Design Expert 8.0 软件对 Box - Behnken 试验结果进行方差分析和二次多项拟合。由表 6 可知,模型的 P 值 = 0.000 4,此模型高度显著,可信度高。A、C、AB、BC、A²、B²、C² 对响应值都有显著影响,表明 3 个因素对响应值不是简单的线性关系。另外模型的 R² = 0.966 2,校正 R² = 0.913 7,说明该模型可以很好地模拟和验证试验的结果。变异系数为 1.77%,置信度比较高,说明模型可以反映真实的试验值。

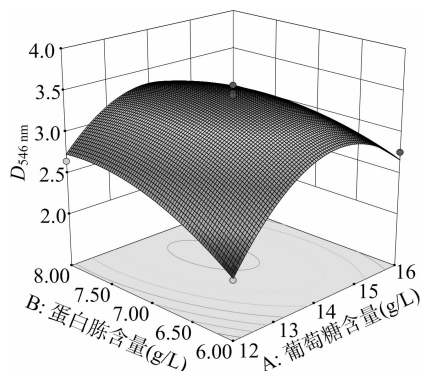


图2 葡萄糖与蛋白胨对响应值的响应面

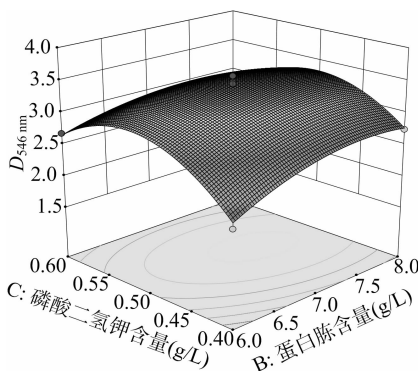


图3 蛋白胨与磷酸二氢钾对响应值的响应面

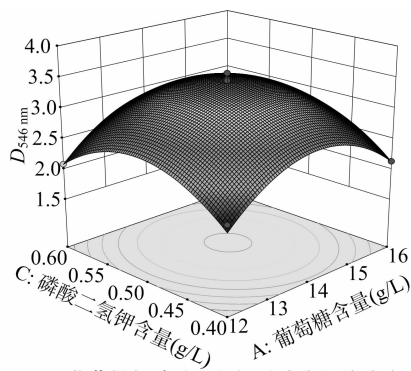


图4 葡萄糖与磷酸二氢钾对响应值的响应面

3 讨论与结论

通过对菌糠样品富集培养,利用纤维素筛选平板初筛、摇瓶发酵复筛,得到 1 株高产纤维素酶的菌株 S-4。经过生理生化鉴定,并结合 16S rRNA 序列对比分析,鉴定为枯草芽孢杆菌,CMC 活性为 67.5 U/mL。采用响应面法分析培养基成分得出,当 3 个显著因子分别为葡萄糖含量 13.08 g/L、蛋白胨含量 6.52 g/L、KH₂PO₄ 含量 0.37 g/L 时,优化后活菌量比初始培养提高了 34.49%。枯草芽孢杆菌为饲用益生菌,且高产纤维素酶,用它来发酵菌糠,不仅可以降低粗纤维的含量,还能提高蛋白含量。枯草芽孢杆菌也可以提高动物肠道内的消化利用率^[18-19]。响应面法优化增殖培养条件,试验次数少,周期较短,且对影响试验的各个因素进行分析总结,分析显著影响因子之间的交互作用,是一种高效优化发酵条件

为了验证结果的可靠性,保证发酵条件一致,分别于基础培养基、优化后的培养基中对菌株 S-4 进行试验,每组 3 个平行,并取平均值,得到优化后的 D_{546 nm} 为 3.478 ± 0.034,与响应面分析预测结果拟合良好,基础培养基 D_{546 nm} 为 2.586 ± 0.026,优化后的 D_{546 nm} 比初始培养的提高 34.49%。

的途径^[20-22]。

参考文献:

- [1] 张 昂. 菌糠的营养价值及其在畜禽生产中的应用[J]. 畜牧与饲料学,2014,35(7/8):46-47.
- [2] 卜文文,陶 鸿,赵大刚,等. 食用菌菌糠综合再利用研究概述[J]. 中国瓜菜,2012(3):40-43.
- [3] 卫智涛,周国英,胡清秀. 食用菌菌渣利用研究现状[J]. 中国食用菌,2010,29(5):3-6,11.
- [4] 陈世通,李梦杰,李荣春. 食用菌菌糠综合利用的研究现状[J]. 北方园艺,2011(19):152-154.
- [5] 周 巍,盛宣宜,彭霞薇,等. 菌糠的综合利用研究进展[J]. 生物技术,2011,21(2):94-97.
- [6] 张丽影,汪寒寒,潘 婷,等. 产纤维素酶菌株的筛选及产酶条件优化[J]. 纤维素科学与技术,2015,23(2):1-7.

卢兴霞,杨静慧,黄俊轩,等. 栎树乔灌木混合栽植对滨海盐碱地的生态改良效果[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):460-463.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.132

栎树乔灌木混合栽植对滨海盐碱地的生态改良效果

卢兴霞,杨静慧,黄俊轩,刘艳军,刘 艳,王鹏鹤,袁文慧,冯 渝

(天津农学院园艺园林学院,天津 300384)

摘要:比较了栎树纯林、栎树+金银木乔灌木组合、栎树+草木樨乔灌木组合在不同季节对滨海盐碱地的改良效果。结果表明:2013年秋季,栎树纯林、栎树+金银木乔灌木组合对土壤含水量、pH值、盐分含量、 HCO_3^- 含量的改良效果不明显,但可以明显降低土壤容重、 Cl^- 、 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 含量,增加土壤总孔隙度和有机质含量,总体上秋季栎树纯林对盐碱地的改良效果好于栎树+金银木乔灌木组合。2014年春季,栎树纯林、栎树+金银木乔灌木组合、栎树+草木樨乔灌木组合除对土壤含水量、 HCO_3^- 含量的改良效果不明显外,可以明显降低土壤容重、pH值、盐分含量以及可溶性离子(Cl^- 、 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+})含量,增加土壤总孔隙度和有机质含量,总体上春季以栎树+草木樨乔灌木组合对盐碱地理化性质的改良效果最佳,其次为栎树+金银木乔灌木组合,最后为栎树纯林。试验结果也表明,栎树与其他植物组合栽植后,对盐碱地的改良效果在不同季节有显著差异。

关键词:栎树;金银木;草木樨;滨海盐碱地;生态改良

中图分类号: S156.4⁺2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)11-0460-04

目前,应用生物措施进行盐碱地改良被普遍认为是盐碱地开发、利用和改良最有效的途径,其改良效果持久、稳定,还可以保持水土、维护生态平衡^[1]。关于生物措施改良盐碱地

主要是通过种植耐盐的草本、木本植物^[2-5],林木混交^[6],林草间作^[7]等来改善土壤的理化性质,但关于应用乔木纯林、乔灌木组合、乔草组合栽植对盐碱地改良效果比较方面的研究尚未见报道。本试验选用天津市常见绿化树种栎树、金银木灌木以及优良牧草草木樨进行混植,组成栎树纯林、栎树+金银木乔灌木组合、栎树+草木樨乔灌木组合进行盐碱地改良试验,系统研究乔木纯林、乔灌木组合、乔草组合栽植对盐碱地理化性质的改良效果,并就其改良效果进行比较,为改良盐碱地筛选最佳生物改良模式,也为林木在盐碱地的推广应用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为天津静海梁头镇盐碱地栽植的栎树纯林、栎

收稿日期:2015-08-27

基金项目:国家农业科技成果转化资金(编号:2012GB2A100015);国家星火项目(编号:2013GA610012);天津市高等学校“优秀青年教师资助计划”;天津市农业科技成果与推广项目(编号:201303070)。

作者简介:卢兴霞(1978—),女,内蒙古呼和浩特人,硕士,讲师,主要从事园艺植物遗传育种和逆境生理生化研究。E-mail:luxingxia_@163.com。

通信作者:杨静慧,博士,教授,主要从事园艺植物栽培、抗逆生理和分子育种研究。E-mail:jinghuiyang2@aliyun.com。

[7]李冠杰,刘莹莹,甄 静,等.一株降解纤维素细菌的分离、鉴定及酶学性质分析[J].河南科学,2015,4:530-534.

[8]孙 盈,田永强,赵丽坤.纤维素酶的CMC酶活测定条件的研究[J].食品工业科技,2013,34(2):68-71.

[9]廖延雄.《伯杰氏鉴定细菌学手册》与《伯杰氏分类细菌学手册》[J].微生物学通报,1992(4):249.

[10]黄春凯,左小明,王红蕾,等.一株产纤维素酶菌株的分离、鉴定及产酶特性[J].微生物学通报,2015,42(4):646-653.

[11]Yuan L, Wang W, Pei Y Y, et al. Screening and identification of cellulase-producing strain of *Fusarium oxysporum* [J]. Procedia Environmental Sciences, 2012, 12: 1213-1219.

[12]孙一博.高效纤维素降解菌的筛选鉴定及特性研究[D].哈尔滨:东北农业大学,2013.

[13]张 欢,丛丽娜,侯英敏,等.响应面法优化海洋枯草芽孢杆菌HS-A38增殖发酵培养基[J].大连工业大学学报,2012,31(1):19-23.

[14]胡丽娟,薛高尚,卢向阳,等.响应面法优化芽孢杆菌25-2产纤维素酶发酵条件[J].酿酒科技,2012(4):21-26.

[15]张 瑶,李 啸,潘冬瑞.Box-Behnken设计优化植物乳杆菌培养基[J].天津农业科学,2013,19(7):1-5.

[16]赵延存,李鹏霞,黄开红,等.适于解淀粉芽孢杆菌BGP20菌株生长的培养基响应面优化[J].食品科学,2014,35(3):157-162.

[17]Myers W R. Encyclopedia of biopharmaceutical statistics [M]. New York: Marcel Dekker, 2003: 858-869.

[18]张丽美,王秀玲,韩梅琳,等.枯草芽孢杆菌发酵菌糠制备饲料微生物添加剂的研究[J].饲料工业,2013,34(2):49-53.

[19]刘伯实.纤维素酶产生菌的筛选及其在菌糠开发中的利用[D].天津:天津大学,2008.

[20]库米拉·马吉提,王伟,张晓燕,等.响应面法优化枯草芽孢杆菌发酵产低温淀粉酶的工艺条件[J].新疆农业大学学报,2012,35(6):478-483.

[21]王雪莲,王 敏,路健美,等.枯草芽孢杆菌生防菌B579最佳培养基响应面法优化[J].江苏农业学报,2009,25(1):212-215.

[22]陈 羽,冯 镇,张宏伟,等.响应面法优化芽孢杆菌FC96培养基组分的研究[J].食品科技,2011(6):30-34.