

柑橘皮渣降解菌的筛选及产酶条件优化^①

李治玲, 李 勇, 李世忠, 黄建国

西南大学 资源环境学院, 重庆 400715

摘要: 柑橘加工产生大量皮渣, 严重污染环境, 亟须处理. 本试验从堆肥中分离得到几株耐高温细菌, 以 CMC 和果胶为唯一碳源, 再经刚果红染色法初筛得到菌株 L207 和 L702; 以枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* L520 为对照, 其纤维素酶活性和果胶酶活性显著大于对照菌株 ($p=0.05$), 表明 L207 和 L702 具有很好的降解柑橘皮渣能力. 对菌株 L207 和 L702 产酶条件初步研究表明: 菌株 L207 在接种量为 4% (V/V)、pH6 于 40 ℃、培养 60 h 时纤维素酶活性最高, 在 40 ℃、pH6、培养 48 h 时果胶酶活性最高; 菌株 L702 在接种量为 6% (V/V)、pH6 于 40 ℃、培养 72 h 时纤维素酶活性最高; 在 40 ℃、pH6、培养 36 h 果胶酶活性最高. 菌株 L207 和 L702 在柑橘皮渣降解处理过程具有潜在的开发价值.

关键词: 柑橘皮渣; 纤维素酶; 果胶酶; 细菌

中图分类号: Q939.9; X172

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2016)01-0159-06

在我国南方, 柑橘是第一大主产水果, 据统计 2009 年, 我国柑橘种植面积 203 万 hm^2 , 产量已达到 2 520 万 t, 面积和产量均位居世界第一^[1]. 柑橘除少量直接食用外, 大部分用于果汁加工, 据统计我国柑橘产量的约 100 万 t 用于加工, 约产生 50 万 t 皮渣^[2], 严重影响人们的生产、生活及健康^[3].

柑橘皮渣含有约 80% 的水分、约 0.5%~2.0% 柑橘精油, 还含 20% 果胶和 15% 纤维素^[4]. 柑橘皮渣含有果胶和纤维素等大分子物质, 外围包裹木质素^[5], 增加了普通微生物降解皮渣的难度. 因此, 利用普通微生物降解柑橘皮渣具有一定的局限性.

国内外对柑橘皮渣的转化应用的相关研究较多^[6], 大多数研究人员主要研究方面就是将皮渣内的活性成分进行提取分离^[7], 关于柑橘皮渣微生物转化的研究也有报道. 其中黄键^[8]等利用黑曲霉优化了柑橘皮渣发酵生产柠檬酸的工艺参数; 苏海锋^[9]等以白腐真菌为菌种的酶活实验表明该菌株对柑橘皮渣的短分子链有较好的分解效果, 但对于纤维素的二、三级聚结结构的分解有限; Srilatha 等^[10]将柑桔加工废弃物作为甲烷生产原料, 侧孢霉属、曲霉属、镰刀霉和青霉菌选择性菌种在固体状态发酵条件下预处理后, 提高了沼气和甲烷的产率. 但由于受到一些如发酵温度、发酵时间、微生物、pH、培养基等因素的影响, 导致微生物生物转化效率不高, 使柑橘皮渣工业生产转化不能大规模进行^[11], 柑橘皮渣污染问题并没有消除, 成为农业面源污染的一个因素^[12], 影响柑橘产业的可持续发展^[13], 因此如何有效处理柑橘皮渣, 成为柑橘加工工厂亟需解决的问题.

为此, 本试验从堆肥中筛选分离获得柑橘皮渣降解菌株, 对其纤维素酶和果胶酶活性及产酶条件进行相关研究和优化, 为柑橘皮渣的生物降解处理的研究和实际应用提供一定理论基础.

① 收稿日期: 2014-03-20

基金项目: 科技部农业成果转化资金项目(2013GB2F100396); 国家自然科学基金项目(41171215); 重庆市重大科技攻关项目(cstc2012gg-yyjsB80007); 西南大学博士基金项目(SWU113018)资助.

作者简介: 李治玲(1991-), 女, 内蒙古呼伦贝尔人, 硕士研究生, 主要从事环境微生物学、有机污染物的研究.

通信作者: 李 勇, 副教授, 硕士研究生导师.

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株来源

对照菌株:枯草杆菌(*Bacillus subtilis* L520),由西南大学资源环境学院微生物实验室提供;试验菌株:菌株 L106,L202,L207,L309 和 L702,从堆肥土壤中分离获得。

1.1.2 主要培养基

1) 牛肉膏蛋白胨培养基,用于细菌的初步分离纯化和菌种保藏;

2) 纤维素刚果红固体培养基^[14],用于纤维素降解菌的分离筛选;果胶刚果红固体培养基^[15],用于果胶降解菌的分离筛选;

3) 纤维素液体发酵培养基(L):CMC-Na 10 g,(NH₄)₂SO₄ 4 g,MgSO₄·7H₂O 0.1 g,蛋白胨 1 g,酵母膏 10 g,蒸馏水 1 000 mL;果胶液体发酵培养基(L):果胶 5 g,酵母膏 5 g,(NH₄)₂SO₄ 2 g,K₂HPO₄ 2 g,MgSO₄·7H₂O 0.5 g,NaCl 0.3 g,蒸馏水 1 000 mL。

1.2 试验设计

1.2.1 菌株的分离与纯化

将采集的堆肥样品通过稀释涂布平板法接种到牛肉膏蛋白胨培养基上,放置在 45,50,55,60,65,70,75 ℃ 温度下培养 24 h,挑起单菌落到试管斜面中,再通过平板划线法纯化备用。分离得到在 55 ℃ 正常生长的菌株 5 株(L106, L202, L207, L309, L702)。

1.2.2 产纤维素酶和果胶酶菌株的初步筛选

将菌株接种到纤维素固体培养基和果胶固体培养基中,37 ℃ 培养 24 h。用 0.1% 的刚果红染液染色 15 min,用 1 mol/L 的 NaCl 溶液洗涤 2 次,用 5% 的乙酸溶液浸泡 5 min,能够产生黄色水解圈的是纤维素酶和果胶酶产生菌。

1.2.3 菌株纤维素酶和果胶酶活性测定

1) 纤维素酶活性测定 粗酶液的提取:接种量为 4%(为体积比,即向 50 mL 的培养基中接入 2 mL 菌株悬液。使菌株处于对数生长期,菌液浓度为 10⁸ cfu/mL),以 CMC-Na 为唯一碳源的摇瓶发酵培养基在 37 ℃,120 r/min 恒温培养 3 d;在 10 000 r/min,4 ℃ 离心 10 min,所得上清液即为粗酶液。

酶活性测定:采用 CMCA-DNS 法^[16]。

酶活定义:在上述测定条件下,每分钟水解纤维素产生 1 μmol 葡萄糖所需要的酶量为 1 个酶活力单位 U。

2) 果胶酶活性测定 粗酶液的提取:接种量为 4%,以果胶为唯一碳源的摇瓶发酵培养基在 37 ℃,120 r/min 恒温培养 2 d;在 10 000 r/min,4 ℃ 离心 15 min,所得上清液即为粗酶液。

酶活性测定:采用 DNS 法^[17]。

酶活定义:在上述测定条件下,每小时水解果胶产生 1 μmol 还原糖(半乳糖醛酸)所需酶量为 1 个酶活力单位 U。

1.2.4 菌株纤维素酶和果胶酶活性参数优化

1) pH 将初筛得到的菌株接种到 pH 值分别为 4,5,6,7,8 和 9 的液体产酶培养基中,每个处理重复 3 次(以下均同),然后测定不同培养条件下菌株产纤维素和果胶酶的活性,选出产酶最佳 pH。

2) 温度 将菌株接种到培养基中,设置产纤维素酶的液体培养基的培养温度梯度为 25,30,35,40,45,50 和 55 ℃,产果胶酶液体培养基的培养温度为 35,40,45,50,55 和 60 ℃,然后测定不同培养温度下菌株产纤维素和果胶酶的活性。

3) 时间 将菌株接种到培养基中,产纤维素酶液体培养基中分别在 12,24,36,48,60,72 和 84 h 取样测酶活性,产果胶酶液体培养基中分别在 24,36,48,60,72 和 84 h 取样测酶活性,以确定产酶的最佳培养时间。

4) 接种量 向 50 mL 的液体产酶培养基中分别接入 0.5,1,2,3 和 4 mL 菌液即 1%,2%,4%,6% 和 8% 的接种量,并测定不同接种量下菌株产纤维素和果胶酶的活性,确定产酶最佳接种量。

1.3 数据分析

用 Excel 对试验数据进行基本计算和作图, DPS 7.0 软件进行统计分析, LSD 法检验差异显著性, 显著水平设置为 $p=0.05$.

2 结果与分析

2.1 菌株的分离及筛选

将采集的堆肥样品经过适当稀释涂布平板法接种到牛肉膏蛋白胨培养基中不同温度下培养, 分离得到在 55 ℃ 正常生长的 2 株菌株 L207 和 L702. 将菌株 L207 和 L702 分别接种到以纤维素和果胶为唯一氮源的培养基中于 37 ℃ 恒温培养 24 h, 刚果红染色, 培养基中均出现黄色透明水解圈, 说明菌株 L207 和 L702 均同时具有降解纤维素和果胶能力.

2.2 菌株产纤维素酶和果胶酶活性的测定

由图 1(a)可知, 菌株 L207 和 L702 的纤维素降解酶活性均显著大于对照菌株, 分别是对照菌株的 1.31 倍和 2.08 倍, 差异达到显著水平($p=0.05$).

由图 1(b)可知, 菌株 L207 和菌株 L702 果胶降解酶活性均显著大于对照菌株, 分别是对照菌株的 12.68 倍和 7.30 倍, 差异达到显著水平($p=0.05$).

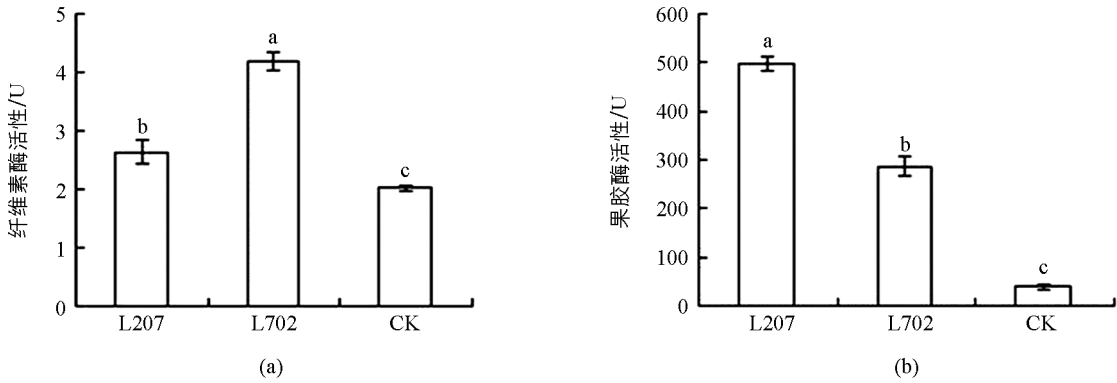


图 1 菌株纤维素酶和果胶酶活性

2.3 起始 pH 对菌株酶活性的影响

由图 2(a)可知, 随着 pH 值的升高, 菌株 L207 和 L702 的纤维素酶活性先升高后降低, 都在 pH6.0 左右时, 其酶活性最高. 菌株 L207 和 L702 在 pH6.0 时的纤维素酶活性分别是 pH9.0 的 3.99 倍和 4.46 倍, 差异达到显著水平($p=0.05$).

由图 2(b)可知, 随着 pH 值升高, 其果胶酶活性先升高后降低, 在 pH6 左右时酶活性最高. 菌株 L207 和 L702 的最大酶活性分别是最低酶活性的 4.07 倍和 3.39 倍, 差异达到显著水平($p=0.05$).

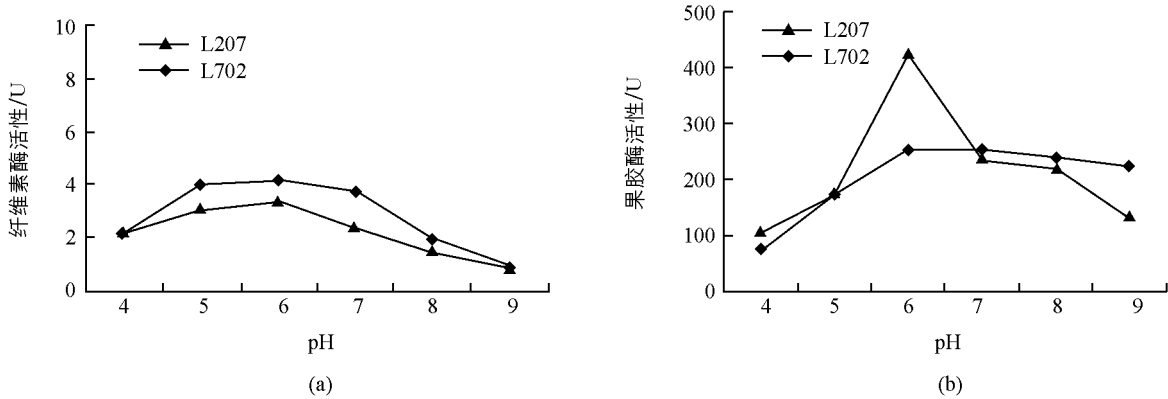


图 2 起始 pH 对菌株纤维素酶和果胶酶活性的影响

2.4 培养温度对菌株酶活性的影响

由图 3(a)可知,随着培养温度的升高,菌株 L702 和 L207 的纤维素酶活性先升高后降低,在温度为 40 ℃左右,2 株菌株的纤维素酶活性达到最高.菌株 L207 和 L702 在 40 ℃时的酶活性分别是 25 ℃时的 2.11 倍和 1.86 倍,差异达到显著水平($p=0.05$).

由图 3(b)可知,随温度升高,菌株 L207 和菌株 L702 的果胶酶活性先升高后降低,在温度为 40 ℃左右时,达到最大值,在 60 ℃果胶酶活性很低.菌株 L207 和 L702 在 40 ℃左右时的酶活性分别是 60 ℃的 5.48 倍和 8.61 倍,差异达到显著水平($p=0.05$).

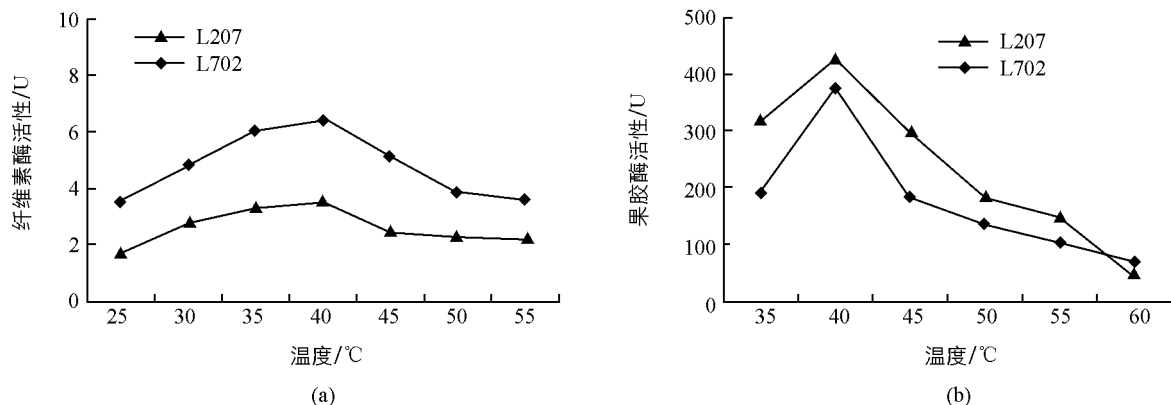


图 3 培养温度对菌株纤维素酶和果胶酶活性的影响

2.5 培养时间对菌株酶活性的影响

由图 4(a)可知,菌株 L207 和 L702 的纤维素酶活性随时间变化均呈现先升高后降低,在最初的 12 h,其酶活性均较低,分别在第 60 h 和 72 h 达到其最大值,当培养时间超过 60 h 和 72 h 时,其酶活性降低.菌株 L207 和 L702 的最大酶活性分别是最低酶活性的 2.67 倍和 2.47 倍,差异达到显著水平($p=0.05$).

由图 4(b)得知,菌株 L207 和 L702 的果胶酶活性随时间变化先升高后降低,其最大酶活性分别出现在 48~60 h 和 36~60 h 之间.菌株 L207 和 L702 的果胶酶最大酶活性分别是最低酶活性的 4.50 倍和 3.35 倍,差异达到显著水平($p=0.05$).

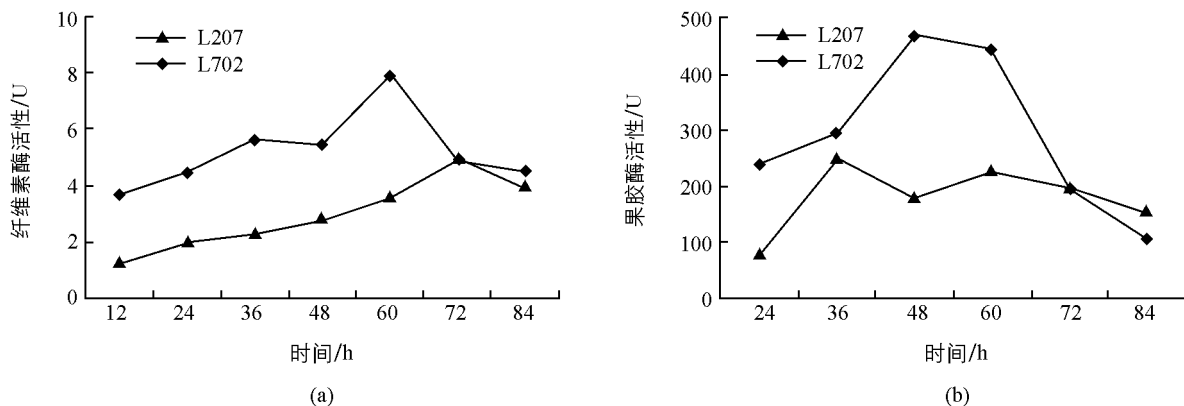


图 4 培养时间对菌株纤维素酶和果胶酶活性的影响

2.6 接种量对菌株酶活性的影响

接种量的多少影响了菌体进入对数生长期的时间早晚.由图 5(a)可知,在接种量小于 4% (V/V) 时,随着接种量的增加,菌株 L207 和 L702 纤维素酶活性有所增加,均在 4% 时达到酶活性最大值,分别为 3.93 U 和 6.25 U.延长发酵时间,可以弥补接种量不足对纤维素酶活性的影响,进一步加大接种量不会提高纤维素酶活性.

不同接种量对果胶酶活性的影响如图 5(b).随着接种量的增加,菌株 L207 和 L702 的果胶酶活性均呈现先增加后降低的趋势,分别在接种量为 4% (V/V) 和 6% (V/V) 时达到其最大值,分别为 397.85 U 和 338.1 U,即菌株 L207 和 L702 果胶酶活性最大的最适接种分别为 4% (V/V) 和 6% (V/V).

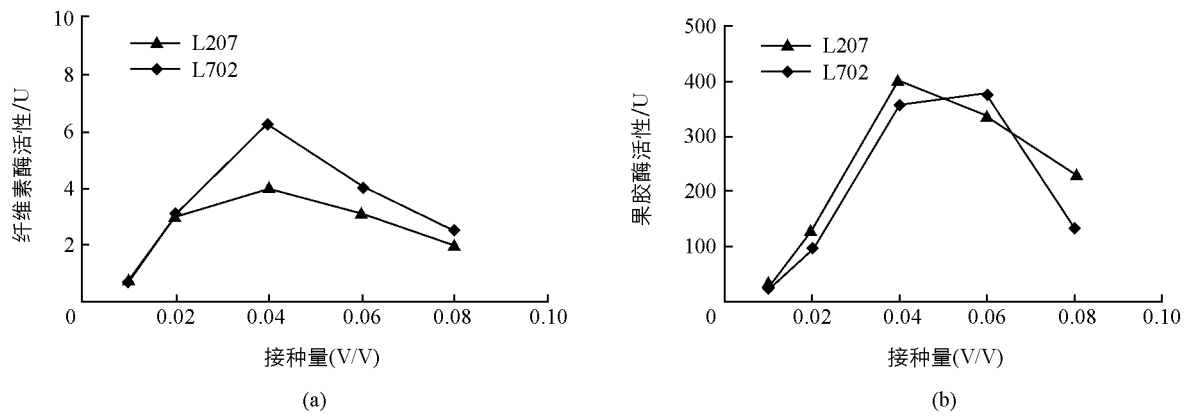


图 5 接种量对菌株纤维素酶和果胶酶活性的影响

3 讨论与结论

柑橘皮渣含有大量的果胶, 含量高达 20%, 果胶与水结合形成束缚水; 同时柑橘皮渣中含有大量的纤维素, 高达 15%, 由于纤维素具有水不溶性的高结晶结构, 外围又被木质素层包围, 这些大分子物质难以降解, 这些因素使得柑橘皮渣的脱水变得困难^[4-5]. 为有效处理柑橘皮渣, 纤维素和果胶大分子物质必须分解为小分子物质, 释放出束缚水. 到目前为止, 关于降解秸秆等木质纤维素微生物的研究报道较多^[18], 但降解柑橘皮渣中的纤维素和果胶的微生物菌群研究报道很少. 该试验所筛选出的 2 株菌种 L207 和 L702 同时产纤维素酶和果胶酶, 其酶活力大小分别为 2.64U 和 4.20U, 497.79U 和 286.56U, 显著大于对照菌株, 其具有分解柑橘皮渣中的纤维素和果胶的能力.

柑橘皮渣在进行厌氧发酵时, 其发酵产生大量的有机酸^[19], 会导致 pH 继续下降, 试验研究发现菌株 L207 和 L702 产纤维素和果胶酶的适宜 pH 是中性偏酸性, 在 pH6.0 时其酶活性最高, 当 pH4.0 时, 仍具有较高的酶活性. 所以在皮渣发酵分解过程中, 菌株 L207 和 L702 仍然具有较高的纤维素和果胶酶活性, 为在酸性条件下降解柑橘皮渣提供了可能. 在柑橘皮渣发酵过程的高温阶段, 耐高温微生物的活动是整个无害化处理柑橘皮渣生产有机肥的关键^[20], 菌株 L207 和 L702 在 37 °C 时, 其酶活性达到最大值, 但当培养温度升至 55 °C, 菌株仍能够存活并且具有一定的酶活性, 这对柑橘皮渣的高温降解具有十分重要的意义. 对菌株 L207 和 L702 而言, 分别在培养 60 h 和 72 h 其纤维素酶活性达到最大值; 分别培养 48~60 h 和 36~60 h 其果胶酶活性达到最大值. 由于菌株不同, 最佳产酶条件一般会存在差异^[21]. 这 2 株细菌产酶情况会出现这么大的相似性, 可能与酶的活性中心氨基酸组成有关^[22], 但目前并无相关报道, 其原因有待进一步研究.

果汁加工产生大量柑橘皮渣、体积大、含水量高、环境污染严重, 亟须有效处理^[23]. 本试验获得 2 株对纤维素和果胶有较好降解效果的细菌 L207 和 L702, 并对其最佳产酶条件进行了初步探索优化. 虽然该菌株并未对柑橘皮渣进行实际降解试验, 但仍是 2 株十分具有研究开发潜力的柑橘皮渣降解菌株, 对柑橘皮渣有效处理具有重要意义.

参考文献:

[1] 杨雪莲, 闫树堂, 贝学军, 等. qRealTime-PCR 检测 CsWIP1 在柑橘不同组织中的表达 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2011, 33(4): 67-71.

[2] 单 杨. 中国柑橘工业的现状、发展趋势与对策 [J]. 中国食品学报, 2008, 8(1): 1-8.

[3] 孙 凡, 李天云, 黄 轲, 等. 重庆市生态安全评价与监测预警研究——理论与指标体系 [J]. 西南农业大学学报(自然科学版), 2005, 27(6): 757-762.

[4] 关海宁, 刁小琴, 张润光. 柑橘功能性成分研究现状与发展前景 [J]. 食品开发与研究, 2008, 9(9): 169-173.

[5] 杨 丽, 周心智, 郭爱民, 等. 柑橘皮渣生产乙醇工艺流程及前景展望 [J]. 西南农业学报, 2012, 25(2): 736-739.

[6] 付复华, 李忠海, 单 杨, 等. 柑橘皮渣综合利用技术研究进展 [J]. 食品与科技, 2009, 25(5): 178-184.

[7] 吴 剑. 柑橘活性成份及皮渣再利用研究进展 [J]. 食品与发酵科技, 2013, (3): 93-96.

[8] 黄 健, 张迎君, 武 峥, 等. 柑橘皮渣发酵生产柠檬酸工艺参数优化研究 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2007, 32(3): 106-110.

- [9] 苏海锋, 张 磊, 曹元良, 等. 利用白腐真菌对柑橘皮渣进行预处理及厌氧发酵产甲烷研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2009, 31(12): 71—76.
- [10] SRILATHA H R, NAND K, SUDHAKAR BABU K, et al. Fungal Pretreatment of Orange Processing Waste by Solid State Fermentation for Improved Production of Methane [J]. Process Biochemistry, 1995, 30(4): 327—331.
- [11] 孙金辉, 陈海桂, 卢沿钢, 等. 柑橘皮渣生物转化利用研究进展 [J]. 食品科学, 2011, 32(19): 312—315.
- [12] 孙 凡, 杨 松, 赵靖明, 等. 中国农业生态经济可持续发展分析 [J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 2011, (3): 217—223.
- [13] 马 杰, 刘 涓, 魏朝富. 三峡库区柑橘园种植田块立地条件及其改造工程设计 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2013, 35(3): 124—132.
- [14] 苏腾甲, 朱雄伟, 张佑红, 等. 一株果胶酶生产菌株的分离及其产酶条件优化 [J]. 武汉工程大学学报, 2012, 4(34): 15—19.
- [15] 李永胜, 胡军华, 姚廷山, 等. 柑橘园一株产纤维素酶细菌 SB3 的筛选鉴定及酶学性质研究 [J]. 西南农业学报, 2011, 24(3): 936—940.
- [16] 樊 程, 李双江, 李成磊, 等. 大熊猫肠道纤维素分解菌的分离鉴定及产酶性质 [J]. 微生物学报, 2012, 4(9): 1113—1121.
- [17] 蓝丽精, 周 琴, 蔡琪敏, 等. 一株高产果胶酶青霉菌株的筛选鉴定 [J]. 浙江师范大学学报(自然科学版), 2011, 11(4): 452—456.
- [18] 陈翠微, 刘长江, 郭文洁, 等. 微生物发酵农作物秸秆生产蛋白饲料的研究与应用 [J]. 微生物学通报, 2000, 27(4): 291—293.
- [19] 邓先余, 邹谋勇, 黄志坚, 等. 一株产纤维素酶细菌的分离鉴定及其酶学特性研究 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2012, 51(5): 93—99.
- [20] 王得武, 姚 拓, 杨巧丽, 等. 高效木质纤维素分解菌群筛选及其酸碱调节能力研究 [J]. 中国生态农业学报, 2013(5): 621—627.
- [21] 李艳宾, 张 磊, 张 琴, 等. 常温下厌氧消化技术处理柑橘皮渣的研究 [J]. 能源工程, 2007(5): 53—56.
- [22] 王伟东, 王小芬, 李玉花, 等. 复合系 WSC-6 的菌种组成特性及其木质纤维素分解能力 [J]. 农业工程学报, 2007, 23(10): 210—215.
- [23] 赵 建, 袁 玲, 黄建国, 等. 柑橘皮渣高温堆肥生产有机肥 [J]. 农业工程学报, 2011, 27(10): 270—276.

Screening of *Citrus* Peel-Degrading Bacteria and the Optimization of Enzyme-Production Conditions

LI Zhi-ling, LI Yong, LI Shi-zhong, Huang jian-guo

School of Resources and Environment, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: A large amount of *Citrus* peels are generated with citrus processing, which leads to severe environmental pollution and, therefore, is an urgent problem to be solved. In this study, several strains of high-temperature-resistant bacteria were isolated from compost and cultured with CMC and pectin as carbon sources. After a primary screening with Congo red staining, two strains, L207 and L702, were selected. Cellulase activity and pectinase activity of these two strains were remarkably higher than those of the control, *Bacillus subtilis* strain L5 ($p=0.05$), indicating that they were endowed with an excellent capability of citrus peel degradation. In our preliminary study for their fermentation conditions, the optimum conditions of L207 for enzyme production were: initial inoculum concentration 4% (V/V), fermentation temperature 40 °C, pH value 6.0, and fermentation time 48 h (with the best resulting pectinase activity) or 60 h (with the best resulting cellulase activity); the optimum conditions of L702 for enzyme production were: initial inoculum concentration 6% (V/V), fermentation temperature 40 °C, pH value 6.0, and fermentation time 36 h (with the best resulting pectinase activity) or 72 h (with the best resulting cellulase activity). Hence these two strains are of potential development value in the processing of citrus peels.

Key words: citrus peel slag; cellulase; pectinase; bacteria

责任编辑 陈绍兰

