



· 化学工程 ·

油茶籽粕发酵菌株的筛选鉴定及发酵产物特性分析

朱晓丽¹, 赵锦绣¹, 李富松¹, 张 星¹, 柯玉鑫¹, 申烨华², 张子夜³, 王军强³

(1. 西北大学 城市与环境学院, 陕西 西安 710127; 2. 西北大学 化学与材料科学学院, 陕西 西安 710127;
3. 西安金博瑞生态科技有限公司, 陕西 西安 710065)

摘要 油茶行业的迅速发展导致油茶籽粕废弃物的大量产生, 其落后的处理方式造成了严重的资源浪费, 制约了我国油茶行业的可持续发展。油茶籽粕中富含有机质, 利用微生物发酵法降解其中的纤维素、木质素及茶皂素等生物大分子来制备有机肥是实现油茶籽粕合理资源化利用的有效途径。通过筛选获得 3 株针对油茶籽粕中纤维素和木质素的高效降解菌, 包括 1 株真菌 X1-1, 属于 *Pleurostomariaceae*, 以及 2 株细菌 M4-2 和 M5-2, 分别为蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*)和类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.) 属, 可有效降低发酵产物中茶皂素的含量, 实现油茶籽粕的无害化处理。实验结果显示, 经菌株 X1-1、M4-2 和 M5-2 发酵处理 28 d 后, 油茶籽粕中纤维素含量的降解率分别为 29.74%、19.65% 和 13.19%, 木质素含量的降解率分别为 12.84%、17.85% 和 26.39%, 茶皂素含量的降解率分别为 34.06%、45.05% 和 46.15%; 且发酵后的油茶籽粕腐熟度、有机质含量和养分含量等指标均符合有机肥标准。研究结果拓展了油茶籽粕的资源化利用途径, 同时为木质素和纤维素的高效降解提供了良好的菌种资源。

关键词 油茶籽粕; 纤维素; 木质素; 茶皂素; 降解菌; 有机肥

中图分类号: X53 **DOI**: 10.16152/j.cnki.xdxbr.2024-02-010

Screening and characterization of fermentation strains of camellia sinensis seed meal and fermentation products

ZHU Xiaoli¹, ZHAO Jinxiu¹, LI Fusong¹, ZHANG Xing¹, KE Yuxin¹,
SHEN Yehua², ZHANG Ziye³, WANG Junqiang³

(1. School of City and Environment, Northwest University, Xi'an 710127, China;

2. School of Chemistry & Materials Science, Northwest University, Xi'an 710127, China;

3. Xi'an Jinborui Ecological Technology Co., Ltd., Xi'an 710065, China)

Abstract The rapid development of camellia oleifera industry has led to a large number of camellia oleifera seed residue, which caused serious waste of resources, restricting the sustainable development of China's camellia oleifera industry. Considering the high contents of organic matter, using camellia oleifera seed residue to prepare organic fertilizer is an effective way for resource utilization. In the process of composting, cellulose,

收稿日期: 2023-11-19

基金项目: 国家重点研发计划项目(2019YFD1002404); 陕西省重点研发计划项目(2019NY-200, 2020ZDLNY06-06, 2020ZDLNY07-10); 西安市科技计划项目(2019-GXYD18.9, 20193057YF045NS045)。

第一作者: 朱晓丽, 女, 博士, 教授, 博士生导师, 从事污染土壤修复研究, xiaolizhu@nwu.edu.cn。

lignin and tea saponin and other biological macromolecules should be effectively biodegraded by microorganisms. In this paper, three highly efficient degrading strains targeting cellulose and lignin in camellia oleifera seed residue were obtained by screening and domestication, including 1 strain of fungus X1-1 (*Pleurostomari-chardsiae*), and 2 strains of bacteria M4-2 (*Pseudomonas monteilii*) and M5-2 (*Paenibacillus* sp.). The three strains can also effectively reduce the content of tea saponin in fermentation products, to realize the harmless treatment of camellia oleifera seed residue. The experimental results showed that after 28 days of fermentation with strain X1-1, M4-2 and M5-2, the degradation rates of cellulose content in camellia oleifera seed residue were 29.74%, 19.65% and 13.19%, the degradation rates of lignin content were 12.84%, 17.85% and 26.39%, and the degradation rates of tea saponin content were 34.06%, 45.05% and 46.15%, respectively. Moreover, the maturity, organic matter content, and nutrient content in fermentation product of camellia oleifera seed residue all met the organic fertilizer standards. The results of this study expand the resource utilization path of camellia oleifera seed residue, and provide good strain resources for the efficient degradation of lignin and cellulose.

Keywords camellia oleifera seed residue; cellulose; lignin; tea saponins; fermentation strains; organic fertilizer

作为我国特有的食用木本油料作物,油茶在湖南、江西等地广泛分布,种植面积高达400多万亩,年产油茶籽超过100多万吨^[1-2]。自2016年油茶正式被列为我国大宗油料作物以来,其产量及产值逐年稳步增长^[2],与此同时,油茶行业的快速发展也产生了大量的油茶籽粕废弃物,并造成了严重的资源浪费。据估算,我国每年的油茶籽粕废弃物产量超过70万吨,而其高值化利用技术的发展则严重滞后,极大地制约了油茶行业的健康可持续发展^[3-4]。

油茶籽粕废弃物中富含丰富的营养物质,包括蛋白质、糖类和多酚等^[5],可广泛应用于医药、食品和饲料等领域^[6]。然而,从我国目前的油茶籽粕废弃总量和发展趋势考虑,现有的废弃物利用方式均难以满足油茶行业的快速发展。相较之下,以油茶籽粕为底物进行发酵处理制备有机肥,是实现油茶籽粕大规模资源化利用的有效处理方式^[7]。油茶籽粕中富含大分子物质木质素和纤维素,木质素是以苯基丙烷为结构单元的一种高分子聚合物^[8],纤维素是以 β -D-葡萄糖为结构单元,通过 β -1,4-糖苷键连接的一种线性高分子多糖化合物^[9]。这些大分子物质不能被作物直接吸收,在自然界中降解缓慢^[10],因此在使用油茶籽粕制备有机肥的过程中,需要通过微生物降解将其转化为能够被作物吸收利用的小分子营养物质。研究发现,白腐菌、褐腐菌、软腐菌、木霉属、青霉属、曲霉属等真菌均对木质素和纤维素表现出较强的降解性能,其中,部分菌株对木质素、纤

维素的降解率可达20%以上^[11-14]。有研究显示,通过添加地衣芽孢杆菌、酿酒酵母及植物乳杆菌对油茶籽粕进行发酵,大部分粗纤维中的高分子芳香化合物分解为低分子物质,有效破坏了木质纤维素分子结构,将部分糖类物质转化为菌体蛋白,从而使得粗纤维含量降低,粗蛋白的含量升高^[15-17],因此制备的有机肥的肥力也明显提升。除木质素、纤维素外,油茶籽粕中还含有较多的茶皂素,作为一种糖甙化合物,茶皂素对多种微生物的生长具有显著抑制作用^[18-19],因此不仅会阻碍油茶籽粕固态发酵的进程,在进入土壤后也会对土壤益生菌产生不利影响^[20]。此外,茶皂素随有机肥施入土壤后,还会对作物种子发芽产生抑制作用,同时减缓土壤有机质的分解,阻碍土壤营养物质循环过程,降低土壤肥力^[21]。然而,现有关于油茶籽粕发酵的研究中大多关注木质素、纤维素的降解以及养分物质的变化,而忽略了油茶籽粕中茶皂素的降解,难以获得腐熟程度理想的有机肥产物。

由此可知,以油茶籽粕发酵生产有机肥,需要综合考虑木质素、纤维素和茶皂素的降解,以实现油茶籽粕的脱毒处理。因此,本研究通过筛选获得可高效降解油茶籽粕中纤维素、木质素及茶皂素的功能菌株,评价了功能菌株对纤维素、木质素和茶皂素的降解效果,将其用于油茶籽粕发酵制备有机肥,获得了腐熟度、有机质含量、养分和重金属含量等指标均符合标准的有机肥,为油茶籽粕废弃物的大规模资源化利用提供了良好的思

路和可行的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 原料及试剂

本实验所用油茶籽粕原料购自湖南大三湘茶油资源有限公司。葡萄糖、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、磷酸氢二钾、羧甲基纤维素钠硫酸铵和七水合硫酸镁均为分析纯。酵母浸粉和蛋白胨均为 BR 生物试剂。

马铃薯液体(PDA)培养基:将 200 g 马铃薯切成小块煮沸 20 min,用 8 层纱布过筛,冷却后加入 20.00 g 葡萄糖,加蒸馏水定容至 1 000 mL,灭菌处理。

木质素初筛液体培养基:碱性木质素 2.00 g、硫酸铵 1.00 g、七水合硫酸镁 0.50 g、磷酸二氢钾 1.00 g、磷酸氢二钠 0.20 g 溶于蒸馏水,pH 调至 7.00,蒸馏水定容至 1 000 mL,灭菌处理。

苯胺蓝显色培养基:酵母浸粉 5.00 g、氯化钠 10.00 g、蛋白胨 10.00 g、琼脂 20.00 g、苯胺蓝 0.25 g、蒸馏水 1 000 mL,pH 调至 7.00 ~ 7.20^[22],灭菌处理。

刚果红纤维素培养基:刚果红 0.20 g、微晶纤维素 1.88 g、七水合硫酸镁 0.25 g、磷酸氢二钾 0.50 g、琼脂 20.00 g、去离子水 1 000 mL,灭菌处理。

羧甲基纤维素钠(CMC-Na)液体培养基:硫酸铵 1.00 g、氯化钙 0.02 g、七水合硫酸镁 0.20 g、羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 10.00 g、六水合氯化铁 0.05 g、磷酸氢二钾 1.00 g、茶皂素 5.00 g、琼脂 20.00 g、去离子水 1 000 mL^[23-24],灭菌处理。

LB 培养基:氯化钠 10.00 g、蛋白胨 10.00 g、酵母提取物 5.00 g、蒸馏水 1 000 mL,灭菌处理。

固体培养基:在其对应的液体培养基中加入 20 g 琼脂,灭菌处理。

1.1.2 试剂配制

中性洗涤剂:称取乙二胺四乙酸(EDTA) 18.6 g 和四硼酸钠($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$) 6.8 g,加一定量的去离子水适当加热,再加乙二醇乙醚 10 mL 后加 30 g 十二烷基硫酸钠(SDS);用天平量取 4.65 g 磷酸氢二钠放入到另一个三角瓶中,加适量去离子水后溶解,可适当加热,待溶液温度降至室温后,将配好的 2 种溶液放入 1 000 mL 容量

瓶中用去离子水定容到刻度线。此溶液 pH 值应在 6.9 ~ 7.1。

酸性洗涤剂:移液枪抽取 27.87 mL 98% 的浓硫酸用玻璃棒引流缓慢滴加 500 mL 去离子水中,待温度稳定后,向体系内加入 20 g 十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)拌混匀,待液体呈现透明并带有少量气泡证明溶解完全,将溶液定容到 1 000 mL 即可,备用。

72% 的硫酸:量取质量分数为 98.3% 的浓硫酸 398 mL,用玻璃棒引流至去离子水中,定容至 1 000 mL 即可。

8% (w/v) 香草醛无水乙醇溶液:准确称取 8.0 g 香草醛,用无水乙醇溶解,置于 100 mL 容量瓶中定容。为使测定的数据具有良好的重现性和稳定性,每次进行样品分析时,都需新配制香草醛无水乙醇溶液。同时,反应过程中,需振摇容量瓶 3 次,使反应均匀。

77% (v/v) 硫酸:取硫酸(98% w/w) 77 mL 加到 23 mL 去离子水中。

1.2 油茶籽粕理化性质测定

油茶籽粕样品的水分、灰分、总酸、粗纤维、粗脂肪和茶皂素的含量测定分别参照《食品安全国家标准食品中水分的测定》(GB 5009.3—2016)^[25]、《食品安全国家标准食品中灰分的测定》(GB 5009.4—2016)^[26]、《食品中总酸的测定》(GB/T 12456—2008)^[27]、《植物类食品中粗纤维的测定》(GB/T 5009.10—2003)^[28]、《食品安全国家标准食品中脂肪的测定》(GB 5009.6—2016)^[29]和《油茶籽粕中茶皂素的提取工艺研究》^[30]的规定方法。

1.3 菌株的筛选

1.3.1 纤维素降解菌株的筛选

取油茶籽粕样品 10.00 g,加入少许无菌水,发酵 7 d 后转入 100 mL 的 PDA 液体培养基,在 28 ℃、120 r/min 条件下培养,待长出大量菌体后,一部分转入纤维素初筛液体培养基用于纤维素降解菌的筛选,另一部分转入木质素初筛液体培养基用于木质素降解菌的筛选。转入羧甲基纤维素钠(CMC-Na)液体初筛培养基中的菌体在摇床继续培养 2 d 后,将菌液进行 10 倍梯度的稀释,得到稀释度为 10^{-1} ~ 10^{-6} 的培养液。随后,取不同浓度的菌液各 100 μL ,通过平板涂布法接种到刚果红纤维素固体培养基上,并在 28 ℃、120 r/min 条件下培养 3 ~ 5 d。观察菌落生长情况,

当出现有透明圈的菌落即初步认为菌株具备纤维素降解能力,选取其中透明圈直径较大的菌落进行多次划线并分离纯化。将初筛得到的单菌落挑取在 CMC-Na 液体培养基中,孵育 2 d 后进行稀释,并采用稀释涂布法进一步在羧甲基纤维素钠(CMC-Na)固体培养基上纯化纤维素降解菌,挑选出长势良好的菌株。将复筛选出的菌株接种至 LB 培养基中培养 1 d,成为菌种活化液,将活化液与 50% 的甘油混合,冻存至 -80 ℃ 冰箱中待用。

1.3.2 木质素降解菌株的筛选

转入木质素液体初筛培养基的菌体,在摇床中保持 28 ℃、120 r/min 条件下培养 2 d。之后,同样进行 10 倍梯度稀释处理,得到 $10^{-1} \sim 10^{-6}$ 稀释度的培养液。随后将不同浓度梯度的菌液各取 100 μL 用平板涂布法接种到木质素初筛固体培养基上,并在 28 ℃、120 r/min 条件下培养 3 ~ 5 d。选择木质素初筛固体培养基上长出的单独菌落,挑到木质素液体培养基中培养 3 d 之后,取菌液稀释至 10^{-5} 后在苯胺蓝显色培养基上进行不同浓度梯度的菌液涂布,筛选出变色圈较大或者使培养基完全变色的菌株。将筛选出的菌株挑到 LB 培养基中培养 1 d,成为菌种活化液,将活化液与 50% 的甘油保存,冻存至 -80 ℃ 冰箱。

1.4 菌株鉴定

1.4.1 显微形态特征

霉菌采用水浸片法观察细胞形态,细菌采用革兰氏染色法染色后镜检。

1.4.2 ITS、16S rDNA 序列鉴定

筛选出的菌株送至上海凌恩生物科技有限公司进行 ITS、16S rDNA 测序。具体过程为:以提取的菌株总 DNA 为模板进行 ITS、16S rDNA 基因 PCR 扩增、测序, X1-1、M4-2 和 M5-2 分别获得 556bp、1422bp 和 1446bp 的 PCR 扩增片段, GenBank 数据库登录号分别为 OL677875、OL855974 和 OL872184。将测序得到的菌株 ITS、16S rDNA 与 Genbank 数据库进行 Blast 比对,采用 MEGA 软件对比对结果进行分析,将目标菌株鉴定到属,并绘制系统发育树分析菌株种属特性。

1.5 降解实验

1.5.1 纯木质素降解实验

分别配制浓度为 0.00、0.10、0.20、0.30、0.40 和 0.50 g/L 的碱性木质素水溶液,测定其 OD280 值以制作木质素标准吸收曲线,所得回归方程为 $Y = 4.2349X - 0.01$, $R^2 = 0.9995$ 。

将菌液(OD = 1)按 30% (v/m) 的接种量接入 100 mL 木质素液体培养基中,并在 28 ℃、120 r/min 条件下振荡培养。使用 5.00 mL 无菌 EP 管每隔 7 d 取 1 次样品。取样时摇匀培养基,每次吸取 4.00 mL 液体,于 8 000 r/min 条件下离心 10 min,所得上清液用 0.45 μm 的水系滤膜过滤,测定其 OD280 浓度为 0.40 g/L 的值,所得结果代入回归方程计算碱性木质素降解率,

$$\text{木质素降解率}(\%) = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100\% \quad (1)$$

式中: C_1 表示初始培养基中碱性木质素浓度, g/L; C_2 表示待测样品中碱性木质素浓度, g/L。

1.5.2 油茶籽粕中木质素、纤维素的含量测定

参照范式粗纤维分析法^[31]测定油茶籽粕发酵过程中的纤维素和木质素含量。具体方法为:将发酵后的油茶籽粕于 105 ℃ 烘干,取烘干样 1 g 于直筒烧杯,加入 100 mL 中性洗涤后,剩余的残渣烘干,其成分是半纤维素、纤维素、木质素和硅酸盐;再经过 100 mL 酸性洗涤剂洗涤后,剩余残渣烘干,其成分为纤维素、木质素和硅酸盐,质量差为半纤维素质量;随后用 72% 硫酸洗涤,剩余物质烘干,其成分是木质素和硅酸盐,质量差为纤维素质量,再经马弗炉 550 ℃ 烧制 4 h,剩余的灰分即为硅酸盐质量,其质量差为木质素质量。

1.5.3 油茶籽粕中茶皂素的测定

采用香草醛-浓硫酸显色法测定茶皂素的含量变化^[30],其原理为:茶皂素中含有皂苷,皂苷是一类含有糖苷键的四环或五环三萜的化合物,其 C_3 、 C_{12} 上的羟基可与香草醛上的醛基发生反应形成缩醛,成为新的共轭体系而显色^[32]。具体方法为:①茶皂素提取,称取 105 ℃ 烘干的油茶粕 5.00 g,与 70% (v/v) 乙醇按 1: 7 比例混合,于 60 ℃ 水浴锅加热 2 h,将滤液用 70% (v/v) 乙醇定容至 50.00 mL;②茶皂素的测定,移取上述样液 0.10 mL、蒸馏水 0.40 mL 及 8% (v/m) 香草醛无水乙醇溶液 0.50 mL 于 10 mL 试管中,将试管移至冰水浴中,加入 77% (v/v) 硫酸溶液 4.00 mL,摇匀,再将试管放在恒温 60 ℃ 的水浴锅中加热 15 min,进行显色反应,取出试管放置到室温,用 70% 乙醇定容至 10 mL,摇匀,以 70% 乙醇为空白,在波长为 550 nm 时测定,外标法定量^[30]。

1.5.4 油茶籽粕的降解实验

将油茶籽粕原料置于烘箱中保持 105 ℃ 条件烘干至恒重,粉碎后称取 10.00 g 放入锥形瓶中,

加入 10.00 mL 的无菌蒸馏水,使其含水率为 50%,并在 121 ℃ 下灭菌 20 min 以去除样品中原有微生物的干扰。待冷却后,在无菌环境下加入 30% 筛选出来的菌种活化液,置于 25 ℃、120 r/min 条件下以半固态进行好氧发酵。发酵实验共持续 28 d,在 7、14、28 d 取样,分别依据 1.5.2 节和 1.5.3 节中的步骤测定发酵后的油茶籽粕中纤维素、木质素及茶皂素含量,并计算 3 种物质的降解率。

1.5.5 生物炭的制备

将小麦秸秆用去离子水进行清洗,经烘干、粉碎后过 0.150 mm 筛,密封保存备用。将处理过的小麦秸秆置于马弗炉中 700 ℃ 下缺氧炭化 2 h,冷却后留备用^[33]。

1.6 发酵产物指标测定

1.6.1 腐熟度测定

称取发酵 28 d 后的油茶籽粕试样(鲜样) 10.00 g 于 250 mL 锥形瓶中,按照固液比 1:10 加入相应质量的水,密封后垂直固定于摇床中,以 25 ℃、120 r/min 震荡浸提 1 h,之后静置 0.5 h,取上清液过滤摇匀后备用。

在培养皿中放置定性滤纸,之后均匀放入 50 粒大小一致、颗粒饱满的小白菜种子,加入上述浸提液 10.00 mL,盖上保鲜膜并戳孔保持透气,在培养箱中 25 ℃ 条件下避光培养 48 h,统计发芽种子的粒数,并用游标卡尺逐一测量主根长,以水培发芽结果作为对照。通过公式(2)计算种子发芽指数(GI)^[34]。

$$GI = \frac{A_1 A_2}{B_1 B_2} \times 100\%$$

(2)

表 1 油茶籽粕基本性质
Tab. 1 Basic properties of camellia seed residue

检测指标	水分	灰分	总酸	粗纤维	粗脂肪	茶皂素	其他
含量/%	7.17	1.72	0.25	46.18	5.35	10.23	29.10

2.2 菌株筛选

微生物降解纤维素的效果可以根据其在富含纤维素的培养基上产生透明圈的大小来判断^[36]。实验结果表明,菌株在 2 种培养基上呈现出明显的透明圈[见图 1(a)、(b)],表明筛选的菌株具有较强的纤维素分解能力。同一个平板经过多次分离、纯化后,得到 1 株纤维素降解菌,编号为 X1-1。

式中: A_1 为油茶籽粕有机肥料浸提液培养下的种子中发芽粒数百分比,%; A_2 为油茶籽粕机肥料浸提液培养的种子平均根长,mm; B_1 为水培种子中发芽粒数百分比,%; B_2 为水培种子的平均根长,mm。

取 3 次测定结果的算术平均值为最终测定结果,平行实验结果的绝对误差值保持在 5% 以内。其中,发芽指数大于 50% 视为基本腐熟,发芽指数大于 85% 视为完全腐熟。

1.6.2 产物 pH 及养分含量测定

称取 5.00 g 的油茶籽粕风干样(过 0.250 mm 筛)于烧杯中,加入 50.00 mL 不含 CO₂ 的水(经煮沸 10 min 驱除 CO₂),使用磁力搅拌器搅动 3 min 后静置 30 min,用 pH 计测定产物的 pH 值。

将发酵 28 d 后的油茶籽粕样品烘干、粉碎并过 0.150 mm 筛,称取 1.00 mg 左右的样品用锡纸包覆后,使用 EA3000 元素分析仪测定其有机碳和养分氮含量^[35]。

SOM = SOC × 1.724

(3)

式中:SOM 为有机质含量,g/kg;SOC 为有机碳含量,g/kg;1.724 为有机质和有机碳换算系数。

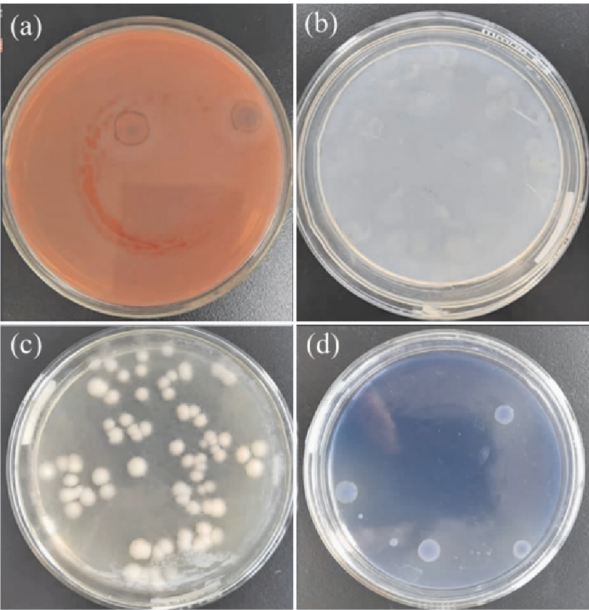
2 结果与分析

2.1 基本理化性质

油茶籽粕的基本理化性质如表 1 所示。可以看出,粗纤维(主要成分是木质素和纤维素)和茶皂素含量较高,占总质量比例超过 50%,如果不对其进行有效处理,难以得到效果较好的有机肥。

苯胺蓝固体培养基的褪色程度可以反应木质素降解菌的降解能力^[37]。实验结果显示,部分菌株使苯胺蓝培养基完全褪色[见图 1(c)、(d)],说明该类菌株对木质素降解能力较强。同一个平板经过多次分离、纯化后,初步得到 3 株木质素降解菌,分别编号为 M4-2、M4-3 和 M5-2。杜海萍等研究表明^[38],单是苯胺蓝培养基的褪色情况仅能定性判断菌种是否产生过氧化氢酶,因此需要进一步分析菌株对于纯木质素的降解率。图 2 显示

了菌株在 7 d 和 14 d 时对碱性纯木质素的降解率。可以看出,菌株对碱性木质素的降解率随发酵时间的增加而提高,且筛选的 4 种菌株中,M4-2 和 M5-2 对碱性木质素的降解效果最好。



(a)刚果红纤维素固体培养基;(b)羧甲基纤维素钠固体培养基;(c)、(d)苯胺蓝固体培养基。

图 1 菌株在培养基上的生长情况

Fig. 1 The growth of the strain on the me

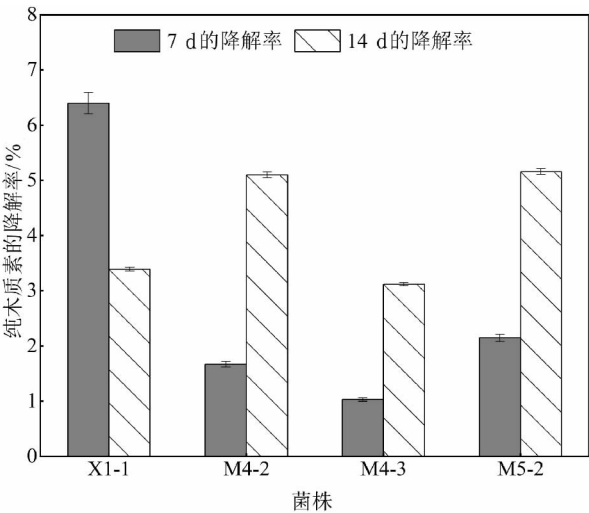


图 2 菌株对纯木质素的降解率

Fig. 2 Degradation rate of pure lignin

2.3 菌株降解性能

2.3.1 降解菌株的优选

通过筛选的 4 株降解菌株对油茶籽粕进行发酵,测定发酵产物中木质素、纤维素及茶皂素的降解率,以筛选出对油茶籽粕发酵效果最佳的菌株。4 株降解菌株对油茶籽粕进行 7 d 发酵处理后,其

对纤维素、木质素和茶皂素的降解率结果如图 3 所示。其中,菌株 X1-1 对纤维素和茶皂素的降解率最高,分别达到 36.24% 和 14.28%;而菌株 M5-2 对木质素的降解率最高的,为 20.55%;相较于其他 3 株菌而言,菌株 M4-2 对 3 种物质的降解能力均不是最高,但综合效果较好。

因此,综合考虑 4 种菌株在纯木质素和油茶籽粕中的降解结果,确定选取菌株 X1-1、M4-2 和 M5-2 为目标进行进一步的菌种鉴定和后续发酵模拟试验。

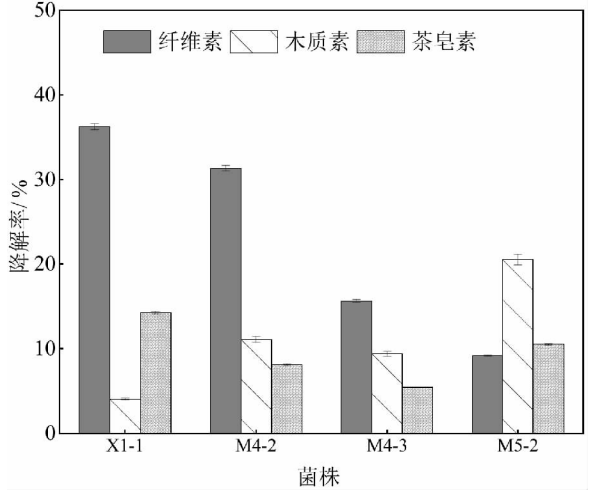


图 3 菌株对纤维素、木质素和茶皂素 7 天的降解率
Fig. 3 The 7-day degradation rate of the strain to cellulose, lignin and tea saponin

2.3.2 菌株发酵对油茶籽粕中纤维素、木质素和茶皂素的降解效果

菌株 X1-1、M4-2 和 M5-2 对油茶籽粕中纤维素、木质素和茶皂素在不同发酵时间下的降解率如图 4 所示。由图 4(a)可知,在菌株 X1-1、M4-2 和 M5-2 的作用下,木质素降解率与发酵时间呈正相关,并且 M5-2 对木质素的降解率显著高于 X1-1 和 M4-2,在第 28 d 时最高降解率达到 26.39%。由图 4(b)可知,菌株 M5-2 对纤维素的降解率随着发酵时间的增加呈现升高趋势,而菌株 X1-1 和 M4-2 对纤维素的降解率则呈现先降低后增加的趋势。推测此现象的主要原因为范式粗纤维分析法所测纤维素初始含量并不包括被木质素包埋的形式所禁锢的部分^[31],导致纤维素降解率计算公式中分母取值偏小,菌株在降解木质素过程中会释放部分额外的纤维素^[39],致使计算降解率数值降低。伴随发酵过程的进行,释放出的纤维素会进一步被菌株降解,使得计算降解率升高。相较之下,菌株 M5-2 对木质素降解能

力较强,在短期内即可释放被包埋的纤维素。因此,在整个发酵期内对纤维素的计算降解率较低,但始终保持增长趋势。这与张仲卿等人研究发现混合真菌对玉米秸秆发酵产物中木质素和纤维素的降解率为 36.80% 和 28.87% 的结果相似^[40]。图 4(c) 显示 3 种菌株对茶皂素也表现出了显著的降解性能,而且降解率随着发酵时间延长而迅速增加,在 28 d 后,X1-1、M4-2 和 M5-2 对油茶籽粕中的茶皂素降解率分别达到 34.06%、45.05% 和 46.15%。此结果高于黄浦等人采用桔青霉(*Penicillium citrinum*)对茶皂素的降解率(36.71%)^[41]。

综合木质素、纤维素和茶皂素的降解率随发酵时间的变化情况来看,第 28 d 的降解效果较好,说明适当延长发酵时间有助于 3 种物质特别是茶皂素的充分降解。

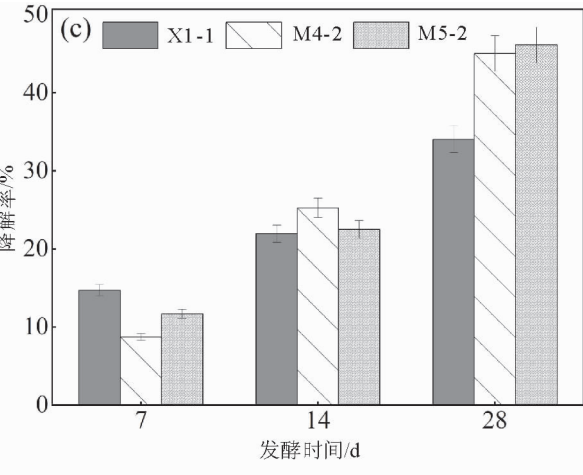
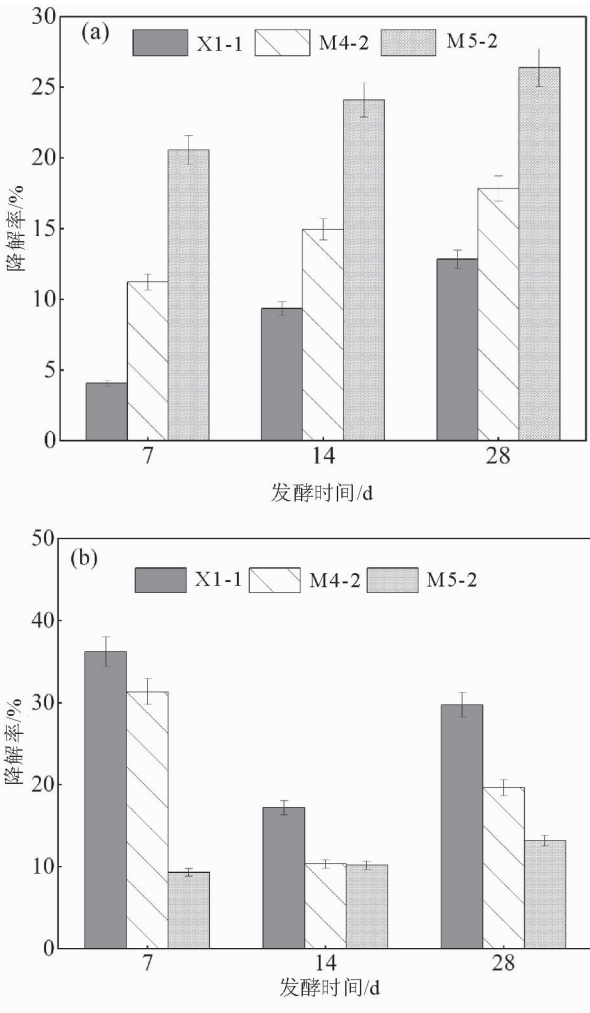


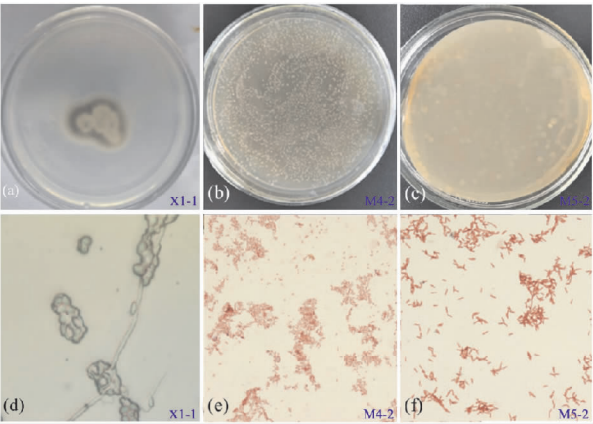
图 4 油茶籽粕中木质素(a)、纤维素(b)、茶皂素(c)的降解率随发酵时间的变化

Fig. 4 Effect of fermentation time on the degradation rate of cellulose, lignin and tea saponin in camellia oleifera seed residue

2.4 菌株鉴定

根据油茶籽粕发酵试验,综合其降解效果,确定菌株 X1-1、M4-2 和 M5-2 为最优目的菌株,对其进行形态观察以及 DNA 测序和同源性分析。如图 5(a)和(d)、(b)和(e)、(c)和(f)分别为纯化后菌株 X1-1、M4-2 和 M5-2 的菌落形态及显微形态镜检图。菌株 X1-1 的菌落生长迅速,呈粉状至绒毛状或簇状,灰褐色,反面灰褐色至寡黑色,其为真菌,菌丝生长迅速,呈细长状,无隔中空且无分枝,孢子是由菌丝逐渐断裂形成的节孢子,孢子呈椭圆形。菌株 M4-2 菌落呈浅黄色不透明状,具有光滑的表面和规则的边缘,镜检图表明其呈短杆状,革兰氏染色为红色,革兰氏阴性菌。菌株 M5-2 形成菌落呈透明状圆形、表面光滑湿润、边缘整齐,镜检图表明其呈长杆状,革兰氏染色为红色,革兰氏阴性菌。

将 X1-1 的 ITS 和 M4-2、M5-2 的 16S rDNA 测序结果在 NCBI 中进行 BLAST 比对,构建系统发育树(见图 6)。结果表明,X1-1、M4-2 和 M5-2 分别与 *Pleurostomarichardsiae*、*Pseudomonas monteilii* 和 *Paenibacillus*sp 位于同一个系统发育分支中,与模式菌株 *Pleurostomarichardsiae*、*Pseudomonas monteilii* 和 *Paenibacillus*sp 菌株的序列相似性达 99%,结合形态学特征、生理生化特性和系统发育的分析结果,将 X1-1 菌株鉴定为 *Pleurostomarichardsiae*,M4-2 菌株鉴定为蒙氏假单胞菌(*Pseudomonas monteilii*),M5-2 菌株鉴定为类芽孢杆菌(*Paenibacillus* sp.)。



(a)、(b)和(c)菌落形态图,(d)、(e)和(f)显微形态镜检图。

图 5 纯化后菌株的菌落形态及显微形态镜检图
Fig. 5 The colony morphology and microscopic morphology of the purified strains

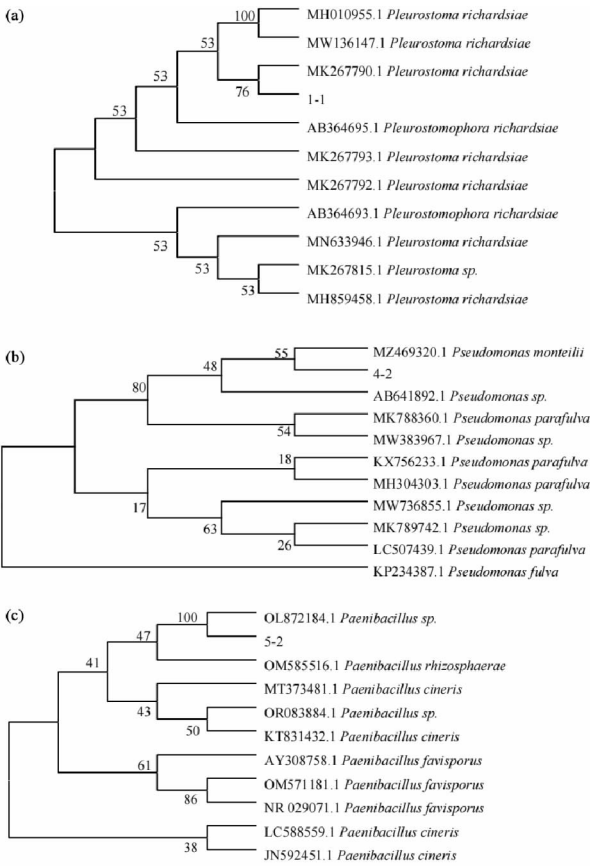


图 6 X1-1(a)、M4-2(b)、M5-2(c)基于 ITS、16S rDNA 序列构建的系统发育树
Fig. 6 Phylogenetic tree of X1-1 (a), M4-2 (b), M5-2 (c) based on ITS and 16S rDNA sequence

2.5 油茶籽粕发酵产物性质测定

图 7 为菌株处理的油茶籽粕发酵不同时间后发酵产物的种子发芽指数。按照农业行业标准

《有机肥料》(NY/T 525—2021)要求,种子发芽指数(GI)需要达到 70% 以上。由图 7 可以看出,种子发芽指数随着发酵时间的延长而增加,只有在发酵时长达到 28 d 时油茶籽粕发酵产物的腐熟度才能达标。经 X1-1、M4-2 和 M5-2 发酵 28 d 后的浸提液培养的种子发芽指数分别为 70.65%、72.18% 和 104.41%,全部符合有机肥的国家标准,且 M5-2 腐熟度最高,说明 M5-2 这株菌在发酵中更具有优势。

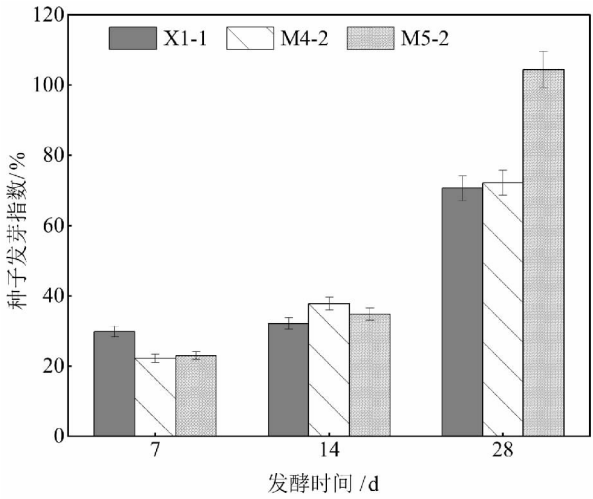


图 7 各菌株发酵不同天数的种子发芽指数
Fig. 7 Seed germination index for different days of fermentation for each strain

按照农业行业标准《有机肥料》(NY/T 525—2021)的要求,有机肥的 pH 值需要在 5.5 ~ 8.5。测定发现,经过 X1-1、M5-2 和 M4-2 发酵后的油茶籽粕 pH 分别为 5.52、5.0、4.74,发酵产物呈酸性的原因可能是微生物在发酵过程中产生了有机酸类物质,而真菌比细菌发酵产物 pH 偏高的原因可能是真菌在发酵的过程中会生成生物碱中和了一部分酸。生物炭具有微孔结构、较大的比表面积及富含碳等特点,可以有效改善土壤的酸碱度,提高土壤的保水性和通透性,给微生物制造一个良好的栖息空间和生存环境^[42]。其 pH 为 10.07,比表面积为 71.209 m²/g,灰分含量为 26.53%,产率为 13.21%。因此将有机肥与生物炭按照 1:1 的质量比向 X1-1、M5-2 和 M4-2 混合,得到混合有机肥的 pH 分别为 7.08、6.34 和 6.16,全部符合有机肥的国家标准。由图 8 可以看出,由 X1-1、M4-2 和 M5-2 发酵 28 d 后的油茶籽粕制备的混合有机肥中有机质含量分别为 89.15%、90.89% 和 82.51%,全部符合有机肥的国家标准(大于 30%)。总养分(N + P + K)的含

量分别为 9.89%、8.73%、13.01%，同样均符合国家标准（大于 4.0%）。

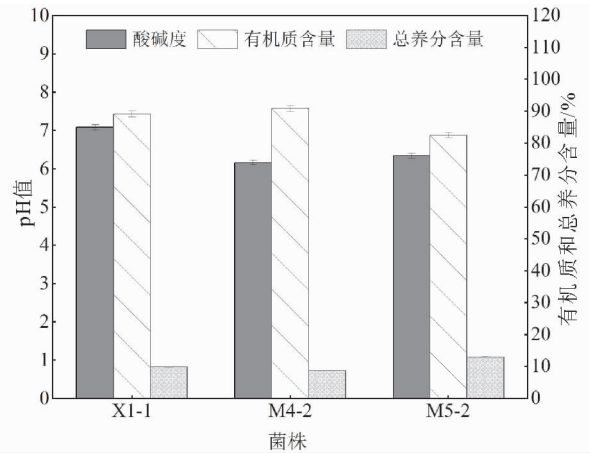


图 8 各菌株发酵后的 pH、有机质及总养分含量
Fig.8 The pH, organic matter, and total nutrient content of each strain after fermentation

3 结论

本文筛选了能同时降解木质素、纤维素及茶皂素的功能菌株,并将其用于油茶籽粕发酵,成功制备了有机肥,主要结论如下。

1)从油茶籽粕中筛选纯化出 3 株木质素降解菌 (M4-2、M4-3、M5-2) 和 1 株纤维素降解菌 (X1-1)。通过测定 4 种菌株对油茶籽粕中纤维素、木质素和茶皂素的降解率,综合分析得出,X1-1、M4-2 和 M5-2 对油茶籽粕发酵 28 d 的效果较好。其中,X1-1 对纤维素、木质素、茶皂素的降解率分别为 29.74%、12.84%、34.06%；M4-2 对纤维素、木质素、茶皂素的降解率分别为 19.65%、17.85%、45.05%；M5-2 对纤维素、木质素、茶皂素的降解率分别为 13.19%、26.39%、46.15%。进而对 X1-1、M4-2 和 M5-2 进行菌种鉴定,分别是 *Pleurostomarichardsiae*、蒙氏假单胞菌 (*Pseudomonas monteilii*) 和类芽孢杆菌 (*Paenibacillus* sp)。

2)油茶籽粕经过 X1-1、M4-2 和 M5-2 发酵 28 d 后,发酵产物提取液的种子发芽指数分别为 70.65%、72.18% 和 104.41%，表明其腐熟度均达标,且 M5-2 的腐熟度最佳。经生物炭调节后的 pH 分别为 7.08、6.34 和 6.16,有机质含量分别为 89.15%、90.89% 和 82.51%，总养分含量为 9.89%、8.73%、13.01%，均符合国家标准。

综上所述,本研究筛选出的 3 株菌株对木质素、纤维素及茶皂素均有较好的降解效果,添加功

能菌株对油茶籽粕进行发酵制备有机肥,具有成本低、腐熟度高、养分充足、安全无害等优点,为油茶籽粕的大规模资源化利用提供了有效途径,具有良好的应用前景。

参考文献

[1] 钟旭美, 张百刚, 朱杰. 我国油茶籽的综合利用[J]. 粮油食品科技, 2007, 15(2): 34-36.
ZHONG X M, ZHANG B G, ZHU J, The comprehensive utilization of camellia oleifera seed[J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2007, 15(2): 34-36.

[2] 侯黔灵, 范丽美. 低共熔溶剂提取油茶籽壳中原花青素的工艺优化[J]. 中国油脂, 2023, 48(2): 129-132.
HOU Q L, FAN L M. Optimization of extraction of procyanidins from oil-tea camellia seed shell with deep eutectic solvents[J]. China Oils and Fats, 2023, 48(2): 129-132.

[3] 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.
FANG F, WANG L S. Research progress of comprehensive development and utilization on the resources of oil-tea-cake[J]. Feed Review, 2011(6): 30-32.

[4] ZHAO Y, SU R Q, ZHANG W T, et al. Antibacterial activity of tea saponin from camellia oleifera shell by novel extraction method[J]. Industrial Crops and Products, 2020, 153: 112604.

[5] ZHANG J P, YING Y, LI X B, et al. Evaluation of three kinds of nutshell with respect to utilization as culture media[J]. BioResources, 2018, 13(4): 7508-7518.

[6] 赵光远, 刘倩茹, 王瑛瑶, 等. 油茶籽加工的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2011, 32(10): 169-172.
ZHAO G Y, LIU Q R, WANG Y Y, et al. Research progress on the processing of camellia oleifera seeds[J]. Food Research and Development, 2011, 32(10): 169-172.

[7] WANG R, ZHANG J Y, SUI Q W, et al. Effect of red mud addition on tetracycline and copper resistance genes and microbial community during the full scale swine manure composting[J]. Bioresource Technology, 2016, 216: 1049-1057.

[8] TAHERZADEH M J, KARIMI K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2008, 9(9): 1621-1651.

- [9] 张晓燕. 不同预处理方法对玉米秸秆和沙柳纤维素降解率和乙醇产量的影响[D]. 呼和浩特: 内蒙古工业大学, 2017.
- [10] BHALLA A, BANSAL N, KUMAR S, et al. Improved lignocellulose conversion to biofuels with thermophilic bacteria and thermostable enzymes[J]. *Bioresource Technology*, 2013, 128: 751-759.
- [11] ANDLAR M, REZIC T, MARDETKO N, et al. Lignocellulose degradation: An overview of fungi and fungal enzymes involved in lignocellulose degradation[J]. *Engineering in Life Sciences*, 2018, 18(11): 768-778.
- [12] 贾辉, 陈秀蓉, 芦光新, 等. 纤维素降解细菌的筛选、生物学特性及降解效果[J]. *草业学报*, 2016, 25(3): 60-66.
- JIA H, CHEN X R, LU G X, et al. Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their degradation activity[J]. *Acta Prataculturae Sinica*, 2016, 25(3): 60-66.
- [13] 王洪媛, 范丙全. 三株高效秸秆纤维素降解真菌的筛选及其降解效果[J]. *微生物学报*, 2010, 50(7): 870-875.
- WAGN H Y, FAN B Q. Screening of three straw-cellulose degrading microorganism[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(7): 870-875.
- [14] 张晨敏. 低温纤维素降解菌的筛选及复合菌剂在秸秆还田中的应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2014.
- [15] 王郝为. 油茶粕发酵处理及饲用价值评定[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2016.
- [16] 邓桂兰. 混合菌发酵油茶粕生产菌体蛋白饲料的研究[J]. *粮食与饲料工业*, 2008(6): 30-32.
- DENG G L. Research on protein feed produced from oil-tea meal fermented by mixed germs[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2008(6): 30-32.
- [17] 黄丹莲. 堆肥微生物群落演替及木质素降解功能微生物强化堆肥机理研究[D]. 长沙: 湖南大学, 2011.
- [18] 黄卫文, 敖常伟, 钟海雁. 油茶皂素抑菌效果研究[J]. *经济林研究*, 2002, 20(1): 17-19.
- HUANG W W, AO C W, ZHONG H Y. The Antibacterial effect of oiltea saponin[J]. *Non-wood Forest Research*, 2002, 20(1): 17-19.
- [19] 文莉, 芦苇, 蒋倩, 等. 茶皂素毒性刺激性试验及抑菌作用研究[J]. *中国油脂*, 2011, 36(6): 58-60.
- WEN L, LU W, JIANG Q, et al. Toxicity, irritation and bacteriostasis of tea saponin[J]. *China Oils and Fats*, 2011, 36(6): 58-60.
- [20] 叶雪良. 茶皂素的开发与利用[J]. *化工生产与技术*, 2002, 9(2): 6-8.
- YE X L. Development and utilization of tea saponin[J]. *Chemical Production and Technology*, 2002, 9(2): 6-8.
- [21] 侯俊杰, 李宁宁, 吕辉雄, 等. 茶皂素对种子发芽、根长及土壤酶活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2015, 34(4): 660-665.
- HOU J J, LI N N, LYU H X, et al. Effects of tea saponin on seed germination, root lengths and soil enzyme activities[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2015, 34(4): 660-665.
- [22] 李灵灵, 王敬红, 赵铎, 等. 木质素降解菌 BYL-7 的筛选及降解条件优化[J]. *微生物学通报*, 2020, 47(12): 4059-4071.
- LI L L, WANG J H, ZHAO D, et al. Screening of lignin degrading strain BYL-7 and optimization of degradation conditions[J]. *Microbiology China*, 2020, 47(12): 4059-4071.
- [23] 孟建宇, 陈勿力吉玛, 郭慧琴, 等. 常温 and 低温纤维素降解菌的分离及其降解特性[J]. *农业生物技术学报*, 2021, 29(1): 73-84.
- MENG J Y, CHEN W L J M, GUO H Q, et al. Isolation and degradation characteristics of cellulose-degradation bacteria at room and low temperature[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2021, 29(1): 73-84.
- [24] 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.
- YANG Y, NIE X, WAGN J, et al. Screening and characterization of cellulose degrading bacteria in oil tea cake meal[J]. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2014, 42(5): 299-301.
- [25] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品中水分的测定: GB 5009.3—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [26] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品中灰分的测定: GB 5009.4—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [27] 国家质量监督检验检疫总局. 食品中总酸的测定: GB/T 12456—2008[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [28] 国家卫生健康委员会. 植物类食品中粗纤维的测定: GB/T 5009.10—2003[S]. 北京: 中国标准出版社, 2004.
- [29] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准食品中脂肪的测定: GB 5009.6—2016[S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.

- [30] LI M, WANG C. Study on extraction of tea saponin from camellia cake [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2011, 26(5): 38-41.
- [31] SOEST P J V. Use of detergents in the analysis of fibrous feeds. 2. A rapid method for the determination of fiber and lignin[J]. Journal of AOAC International, 1963, 49(4): 546-551.
- [32] 陈莹, 刘松柏, 何良兴, 等. 油茶籽粕和茶皂素中皂苷的定量检测方法研究[J]. 中国粮油学报, 2012, 27(2): 105-111.
- CHEN Y, LIU S B, HE L X, et al. Quantitative analysis of saponins in camellia seed cake and tea saponins [J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2012, 27(2): 105-111.
- [33] 张杰. 生物炭固定化高效解磷菌对铅污染土壤的修复研究[D]. 西安: 西北大学, 2019.
- [34] 中华人民共和国农业部. 有机肥料: NY 525—2012 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- [35] WANG J, FU X, ZHAO F Z, et al. Response of soil carbon fractions and dryland maize yield to mulching [J]. Soil Science Society of America Journal, 2018, 82(2): 371-381.
- [36] 骆婷, 夏虹, 冯定胜, 等. 森林土壤中多功能降解菌的分离筛选及鉴定[J]. 西南农业学报, 2018, 31(5): 1032-1040.
- LUO T, XIA H, FENG D S, et al. Isolation and identification of multi-function degradation bacteria from forest soil[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2018, 31(5): 1032-1040.
- [37] 张东升, 徐一馨, 宋双民, 等. 细菌产纤维素酶和脂肪酶固体培养基及接种和培养时间的研究[J]. 微生物学杂志, 2022, 42(3): 44-53.
- ZHANG D S, XU Y X, SONG S M, et al. Inoculation and culture time of bacterial cellulase and lipase production with solid culture medium[J]. Journal of Microbiology, 2022, 42(3): 44-53.
- [38] 杜海萍, 宋瑞清, 王钰祺. 几种真菌产木质素降解酶的比较研究[J]. 林业科技, 2006, 31(4): 20-24.
- DU H P, SONG R Q, WANG Y Q. Comparative study on the lignocellulolytic enzymes produced by fungi [J]. Forestry Science & Technology, 2006, 31(4): 20-24.
- [39] 李希越, 王洪波, 赵玉晓, 等. 好氧生物预处理时间对玉米秸秆水解酸化的影响[J]. 生物质化学工程, 2022, 56(1): 13-22.
- LI X Y, WANG H B, ZHAO Y X, et al. Effect of aerobic biological pretreatment time on hydrolytic acidification of corn straw [J]. Biomass Chemical Engineering, 2022, 56(1): 13-22.
- [40] 张仲卿, 张爱忠, 姜宁. 混合真菌发酵对玉米秸秆纤维素与木质素降解率的影响[J]. 动物营养学报, 2019, 31(3): 1385-1395.
- ZHANG Z Q, ZHANG A Z, JIANG N. Effects of mixed fungal fermentation on degradation rate of cellulose and lignin of corn straw [J]. Chinese Journal of Animal Nutrition, 2019, 31(3): 1385-1395.
- [41] 黄浦, 肖瑜, 刘以清, 等. 桔青霉降解茶皂素的实验研究[J]. 桂林理工大学学报, 2016, 36(3): 592-596.
- HUANG P, XIAO Y, LIU Y Q, et al. Degradation of tea saponin by penicillium citrinum [J]. Journal of Guilin University of Technology, 2016, 36(3): 592-596.
- [42] HUSSAIN R, KUMAR GHOSH K, RAVI K. Impact of biochar produced from hardwood of mesquite on the hydraulic and physical properties of compacted soils for potential application in engineered structures [J]. Geoderma, 2021, 385: 114836.

(编辑 李波)