

土壤中单宁和植酸降解菌的筛选、鉴定及液态发酵研究

王晓东, 胡海滨, 麦康森, 张彦娇*,
徐玮, 艾庆辉, 张文兵

(中国海洋大学农业部水产动物营养与饲料重点实验室,
教育部海水养殖重点实验室, 山东青岛 266003)

摘要: 为从土壤中筛选能够同时降解单宁和植酸的微生物, 本实验利用富集培养技术, 分离、筛选、鉴定土壤中的单宁和植酸降解菌, 并研究其在液态发酵下的产酶能力。结果显示, 从土壤中共获得109株纯菌落, 包括39株细菌、46株酵母菌以及24株霉菌。分别用单宁筛选性培养基和植酸筛选性培养基筛选上述菌株, 获得27株植酸降解菌和14株单宁降解菌, 其中霉菌M-6、M-3和M-1可以同时分解单宁和植酸, 且霉菌M-6的水解圈直径大于M-3和M-1。在液态发酵条件下, 随着发酵温度的升高(20~35°C), 霉菌M-6产单宁酶和植酸酶的活力呈现先升高而后降低的趋势, 在发酵温度为30°C时达到最高值($P<0.05$)。随着发酵pH的升高(pH 4~7), 霉菌M-6产单宁酶和植酸酶的活力呈先升高后降低的趋势($P<0.05$); 其中单宁酶活力在发酵pH值为5时达到最高值, 显著高于其他处理组($P<0.05$); 而植酸酶活力在发酵pH值为5时达到最高值, 显著高于发酵pH 4和7处理组($P<0.05$), 但与发酵pH 6处理组差异不显著($P>0.05$)。通过菌落和菌株形态学以及分子测序方法, 鉴定M-6为黑曲霉。因此, 本研究从土壤中分离筛选出3株(M-6、M-3和M-1)能够同时水解单宁和植酸的降解菌, 在液态发酵条件下, 黑曲霉M-6产单宁酶和植酸酶的最佳发酵温度为30°C, 最佳发酵pH值为5。

关键词: 降解微生物; 水产饲料; 单宁; 植酸; 液态发酵

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

广泛存在于植物蛋白源中的抗营养因子: 单宁和植酸, 是影响水产养殖动物生长性能和营养物质利用水平、限制水产养殖动物对植物蛋白的利用以及制约植物蛋白在水产饲料中应用的重要原因之一。因此, 去除植物蛋白源中的单宁和植酸, 对于提高水产养殖动物对植物蛋白营养物质的利用水平及水产饲料中植物蛋白源的应用有重要意义。研究发现, 热处理、酸碱处理和溶液浸泡等化学方法, 对植物蛋白源中单宁和植酸的去除往往并不彻底, 而且会破坏植物蛋白源中的蛋白质和矿物质等营养成分。因此, 采用高效环保的微生物降解方法来

降解植物蛋白源中单宁和植酸, 受到越来越多的关注^[1-2]。

目前, 已有大量研究表明, 自然界中的部分霉菌、细菌及酵母菌等菌种, 对单宁或植酸具有一定的降解能力^[3-5]。但是, 鲜有报道能够同时高效降解单宁和植酸这两种抗营养因子的菌种。先前研究表明, 植物性蛋白源中存在包括单宁和植酸在内的多种抗营养因子, 不同的抗营养因子之间存在复杂的协同抗营养作用, 能够进一步抑制水产养殖动物的生长性能并降低动物对植物蛋白中营养物质的消化吸收利用能力^[6-10]。因此, 筛选出能同时且高效地降

收稿日期: 2015-05-10 修回日期: 2016-06-20

资助项目: 教育部博士点专项基金(20120132120025); 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金计划(BS2013SW007); 国家自然科学基金课题(31202006)

通信作者: 张彦娇, E-mail: yanjiaozhang@ouc.edu.cn

解单宁和植酸等多种抗营养因子的菌种具有重要的意义。

本研究的目的是利用富集培养技术,从富含单宁和植酸成分的土壤中,分离、筛选并鉴定出能够同时降解单宁和植酸的菌种,研究其在液态发酵条件下产单宁酶和植酸酶的能力。

1 材料与amp;方法

1.1 实验用培养基

察氏琼脂培养基(g/L):蔗糖 30; NaNO₃ 3; K₂HPO₄ 1; MgSO₄·7H₂O 0.5; KCl 0.5; FeSO₄ 0.01; 琼脂18。121 °C灭菌20 min。

察氏液体培养基(g/L):蔗糖 30; NaNO₃ 3; K₂HPO₄ 1; MgSO₄·7H₂O 0.5; KCl 0.5; FeSO₄ 0.01。121 °C灭菌20 min。

牛肉膏蛋白胨琼脂培养基(g/L):牛肉膏 3; 蛋白胨 10; NaCl 5; 琼脂 18; pH 7.0~7.2。121 °C灭菌20 min。

牛肉膏蛋白胨液体培养基(g/L):牛肉膏 3; 蛋白胨 10; NaCl 5; pH 7.0~7.2。121 °C灭菌20 min。

马铃薯葡萄糖琼脂培养基(PDA培养基):马铃薯提取液1000 mL; 葡萄糖20 g; 琼脂20 g。pH 6.0。105 °C高压灭菌30 min。

马铃薯葡萄糖液体培养基:马铃薯提取液1000 mL; 葡萄糖20 g。pH 6.0。105 °C高压灭菌30 min。

单宁筛选培养基(g/L):NaNO₃ 3; KCl 0.5; K₂HPO₄ 1; FeSO₄ 0.01; MgSO₄·7H₂O 0.5; 单宁酸10; 琼脂18。121 °C灭菌20 min后,于超净台中加入用孔径0.22 μm滤膜过滤除菌的单宁酸。

植酸筛选培养基(g/L):植酸钙 5; 葡萄糖 15; NH₄NO₃ 5; K₂HPO₄ 1; MgSO₄·7H₂O 0.5; KCl 0.5; FeSO₄ 0.01; MnSO₄·4H₂O 0.01; 琼脂 18。121 °C灭菌20 min。

1.2 土壤微生物富集

取6 kg双低菜粕(富含单宁和植酸,购自山东六和集团有限公司,蛋白含量37%)分3份分别埋于中国海洋大学校园内向阳、不积水土壤约20 cm深处。分别在埋入后第7 d、14 d、21 d的08:00—09:00取样。取样时从紧靠菜粕处分三点取3次距土壤表面约10 cm土壤样品,用无菌样品

袋保存并混合均匀。

1.3 土壤微生物分离纯化

将10 g样品混合于100 mL无菌生理盐水(浓度:0.85%)中配置成0.1 g/mL混合液,震荡摇匀30 min之后静置15 s。分别用无菌生理盐水进行10倍梯度稀释,稀释为1×10⁻² g/mL、1×10⁻³ g/mL、1×10⁻⁴ g/mL、1×10⁻⁵ g/mL、1×10⁻⁶ g/mL、1×10⁻⁷ g/mL、1×10⁻⁸ g/mL和1×10⁻⁹ g/mL的混合液。取0.1 mL稀释浓度为1×10⁻⁷ g/mL、1×10⁻⁸ g/mL和1×10⁻⁹ g/mL的样品,分别均匀涂布于三种选择培养基(察氏琼脂平面培养基、牛肉膏蛋白胨琼脂平面培养基和马铃薯葡萄糖琼脂平面培养基)上,将选择培养基放在恒温培养箱中培养,培养温度为30 °C,培养时间分别为:牛肉膏蛋白胨琼脂平面培养基24 h、察氏琼脂平面培养基和马铃薯葡萄糖琼脂平面培养基各96 h。培养结束后,在超净工作台无菌环境中,将各个单菌落用接种环分别转接到相应的选择培养基上于前面所述条件下培养。经3次重复培养之后获得纯培养菌株。根据菌落的生长特征进行初步分类鉴定,将细菌接种于牛肉膏蛋白胨琼脂斜面培养基上、霉菌接种于察氏琼脂斜面培养基上、酵母菌接种于PDA斜面培养基上,在4 °C下保存。另外,将每种菌株接于20%甘油生理盐水中,-80 °C下保种。筛选之前将保种菌株在相应斜面培养基上活化,活化培养温度为30 °C,活化时间为细菌和酵母菌24 h、霉菌96 h。

1.4 单宁降解微生物筛选

筛选单宁降解微生物选用水解透明圈法^[11-12]。无菌环境下,挑取活化后的细菌单菌落接种至装有5 mL牛肉膏蛋白胨液体培养基的试管中,挑取活化后的酵母菌单菌落接种到装有5 mL马铃薯葡萄糖液体培养基的试管中,于摇床上培养(30 °C, 150 r/min, 24 h),使培养液菌种浓度达到约1×10⁸个/mL(血球计数板显微镜下计数),用漩涡振荡器摇匀5 s;无菌环境下,挑取活化后的霉菌孢子接种到察氏斜面培养基上培养(30 °C, 96 h),孢子长出后,用5 mL无菌生理盐水(0.85%)将孢子冲洗下来,充分振荡摇匀5 s后,稀释菌液,使孢子浓度到约1×10⁸个/mL(血球计数板显微镜下计数)。

将上述少量菌液点种于平面单宁筛选培养

基上,每个平板点3处样,保证3个点之间距离相同。每次点样前充分灼烧接种环,再蘸取菌液点样。点样后的培养基放于恒温培养箱中培养(30℃,72 h),培养结束后用游标卡尺测量菌落及所出现水解透明圈的直径。如果菌落周围产生透明水解圈,则表明该菌株具有降解单宁的能力。

1.5 植酸降解微生物筛选

筛选植酸降解微生物选用水解透明圈法^[12-13]。按照步骤1.4操作,获得相应的细菌和酵母菌种、霉菌孢子悬液,接种于植酸筛选培养基上,培养后观察并测量水解透明圈。如果菌落周围产生透明水解圈,则表明该菌株具有降解植酸的能力。

1.6 单宁酶活力测定

参照Mondal和Pati^[14]测定单宁酶活力的方法,略作改动。用约5 mL无菌0.85%生理盐水,按照本研究1.4步骤制作霉菌M-6菌种悬液。取0.5 mL充分混匀的菌种悬液接种于装有50 mL察氏液体培养基的250 mL三角瓶中,分别于发酵温度20℃、25℃、30℃、35℃(pH 6),以及发酵pH 4、5、6、7(温度30℃)条件下,于摇床上培养(180 r/min, 24 h)。每个处理设3个平行。培养结束后,4 348 r/min离心10 min,取0.1 mL上清液(粗酶液)加入0.3 mL 1.0%(w/v)用0.2 mol/L醋酸缓冲液调成相应pH的单宁酸,30℃水浴反应30 min,0℃终止反应,加入2 mL 1 mg/mL的牛血清蛋白溶液,4 348 r/min离心10 min,取沉淀,加入3 mL SDS-三乙醇胺混合液(1%的SDS,5%的三乙醇胺),漩涡震荡待沉淀完全溶解后加入1 mL 0.013% FeCl₃溶液,用分光光度计读取360 nm处的吸光值。对照组使用沸水浴灭活10 min的粗酶液。每个处理设3个平行。单宁酶活力单位:在相应条件下,1 min水解1 μmol单宁酸所需要的酶量,定义为1个单宁酶活力单位U。

1.7 植酸酶活力测定

采用磷钼蓝抗坏血酸法测定植酸酶活力^[15],并略作改动。用约5 mL无菌0.85%生理盐水,按照本研究1.4步骤制作霉菌M-6菌种悬液。取0.5 mL充分混匀的孢子悬液接种于装有50 mL察氏液体培养基的250 mL三角瓶中,分别于发酵温度20℃、25℃、30℃、35℃(pH 6),发酵pH 4、5、

6、7(温度30℃),于摇床上培养(180 r/min, 24 h)。每个处理3个平行。取约5 mL发酵液8000 r/min离心5 min,取0.5 mL上清液(粗酶液)加入1.5 mL 3.0 mmol/L植酸钠,加入1.5 mL相应pH的醋酸-醋酸钠缓冲液,相应条件下保温30 min,加入1.5 mL 10%的三氯乙酸终止反应。取3 mL反应液加入3 mL显色液(6NH₂SO₄:双蒸水:2.5%钼酸铵:10%V_C=1:2:1:1)于相应温度保温25 min,冷却至室温,测定660 nm处的OD值。对照组使用沸水浴灭活10 min的粗酶液。每个处理设3个平行。根据磷酸盐标准曲线可算出释放出的磷酸盐量,从而计算出酶活。植酸酶活力单位:在相应条件下,每分钟释放1 μmol无机磷所需要的酶量为一个活力单位U。

1.8 菌种鉴定

菌落形态学鉴定 用5 mL无菌0.85%生理盐水将M-6的孢子从斜面察氏琼脂培养基上轻轻冲下,点状接种于察氏琼脂培养基平板的中央,每个平板上点一个样,设置5个平行,30℃培养5~7 d,观察菌落特征。

菌种形态学鉴定 将纯化后的菌株在25℃下培养7 d。体视镜下,挑取少量菌丝体于载玻片上,以乳酚油为浮载剂。玻片于倒置显微镜(Olympus IX51)下拍照,并对菌株的孢子、产孢梗等菌体结构进行测量。

分子生物学鉴定 M-6菌种的DNA采用热裂解法提取^[16]。扩增引物选用ITS1(TCCGTA GGTGAACCTGCGG)和ITS4(TCCTCCGC TTATTGATATGC)^[17],扩增片段为ITS1-5.8S rDNA-ITS2。PCR体系为50 μL:模板2 μL,ITS1(25 μmol/L)和ITS4(25 μmol/L)各1 μL,dNTP(2.5 μmol/L)4 μL,10×Buffer(含Mg²⁺)5 μL,Taq酶(5 U/μL)0.5 μL,双蒸水36.5 μL。扩增程序为:95℃预变性3 min;94℃变性1 min,54℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环;72℃终延伸10 min。PCR产物直接送生工生物工程(上海)有限公司纯化后测序。所得序列通过NCBI网站进行Blast比对。

生长曲线测定 用约5 mL无菌0.85%生理盐水将M-6的孢子从斜面察氏琼脂培养基轻轻冲下,配制成浓度约为1×10⁸个孢子/mL的孢子悬液,取0.5 mL充分混匀的孢子悬液接种于装有50 mL察氏液体培养基的250 mL三角瓶中,在84 h内,每6 h用离心或过滤的方法收集单位体积培养液

中的菌体, 用清水充分洗净后将菌丝于80 °C的干燥箱内烘干到恒重后称其重量。每个处理设置三个平行。

1.9 数据分析

采用SPSS 16.0 for Windows对实验数据进行单因素方差分析, 若差异显著, 则用Duncan检验法进行多重比较, 显著水平为 $P<0.05$, 所有数据均以平均值±标准误(Mean±S.E.)表示。

2 实验结果

2.1 菌种分离纯化

经过分离纯化, 获得109株纯菌株, 根据菌落特征初步鉴定为细菌39株(菌株编号首字母

B)、酵母菌46株(菌株标号首字母Y)和霉菌24株(菌株编号首字母M)。

2.2 单宁和植酸降解微生物的筛选

将以上分离到的109株菌株, 采用水解透明圈法进行筛选, 获得能够水解单宁或植酸的菌株。筛选结果发现: 植酸筛选培养基上有27株菌株产生透明水解圈, 其中6株细菌、17株酵母菌和4株霉菌; 单宁筛选培养基上有14株菌株产生透明水解圈, 其中6株细菌和8株霉菌; 其中, 霉菌M-6、M-3和M-1可以同时分解单宁和植酸。统计分析以上各株菌株降解单宁和植酸产生的透明圈的直径, 数据结果以平均值±标准误(Mean±S.E.)表示(表1), 发现霉菌M-6在植酸筛选培养基和单宁筛选培养基上水解单宁和植酸产

表1 单宁和植酸降解菌的筛选

Tab. 1 Screening of tannic acid and phytic acid degradative microorganisms

菌种 microorganisms	H.Z.T./cm	H.Z.P./cm	菌种 microorganisms	H.Z.T./cm	H.Z.P./cm
Y-1	-	1.31±0.05	B-13	-	1.53±0.02
Y-3	-	1.44±0.08	B-17	-	2.06±0.02
Y-4	-	1.89±0.03	B-18	-	2.00±0.04
Y-9	-	1.54±0.02	B-20	-	2.47±0.04
Y-10	-	1.38±0.03	B-22	-	1.17±0.08
Y-13	-	1.65±0.05	B-23	-	1.87±0.06
Y-15	-	2.24±0.01	B-24	3.21±0.05	-
Y-18	-	0.87±0.02	B-27	-	1.42±0.03
Y-19	-	1.44±0.09	B-29	-	1.78±0.01
Y-22	-	1.61±0.05	B-31	-	0.76±0.05
Y-25	-	2.62±0.07	B-33	-	2.49±0.06
Y-26	-	0.65±0.03	B-35	-	2.23±0.02
Y-28	-	1.32±0.02	B-39	-	1.75±0.02
Y-33	-	1.75±0.05	M-1	3.86±0.04	2.99±0.09
Y-34	-	0.94±0.07	M-2	3.94±0.01	-
Y-37	-	1.21±0.03	M-3	4.00±0.06	2.91±0.02
Y-42	-	1.52±0.04	M-4	3.96±0.06	-
B-1	4.32±0.01	-	M-5	4.76±0.03	-
B-2	4.00±0.12	-	M-6	4.44±0.07	3.04±0.01
B-3	3.69±0.05	-	M-8	3.85±0.04	-
B-7	3.63±0.01	-	M-17	-	3.33±0.03
B-9	2.30±0.05	-	M-24	4.02±0.05	-
B-10	-	1.49±0.03			

注: H.Z.T.表示菌株在单宁筛选培养基上产生的水解透明圈直径; H.Z.P.表示菌株在植酸筛选培养基上产生的水解透明圈直径; -: 表示未发现透明圈。数据用平均值±标准误表示

Notes: H.Z.T.: Diameter of hydrolytic zone on tannic acid agar plates; H.Z.P.: Diameter of hydrolytic zone on phytic acid agar plates; -: No hydrolytic zone was found. Data are showed as: Mean±S.E

生的透明圈直径大于霉菌M-3和M-1,说明霉菌M-6对植酸和单宁有更优的降解能力。

2.3 液态发酵下不同发酵温度对霉菌M-6产单宁酶和植酸酶活力的影响

在液态发酵条件下,随着发酵温度的升高(20~35℃),霉菌M-6产单宁酶和植酸酶的活力均呈现先升高而后降低的趋势(图1)。霉菌M-6产单宁酶和植酸酶活力均在发酵温度为30℃时达到最高值,显著高于其他温度处理组($P<0.05$),分别为(5.13±0.03)U/mL和(4.33±0.12)U/mL。

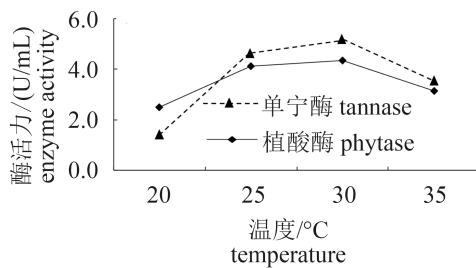


图1 液态发酵下不同发酵温度对黑曲霉M-6产单宁酶和植酸酶活力的影响

Fig. 1 The effects of fermentative temperature on tannase and phytase activities of M-6 under submerged fermentation

2.4 液态发酵下不同发酵pH对霉菌M-6产单宁酶和植酸酶活力的影响

在液态发酵条件下,随着发酵pH的升高(pH 4~7),霉菌M-6产单宁酶和植酸酶的活力均呈先升高后降低的趋势(图2)。霉菌M-6产单宁酶活力在发酵pH为5时达到最高值(5.97±0.12)U/mL,显

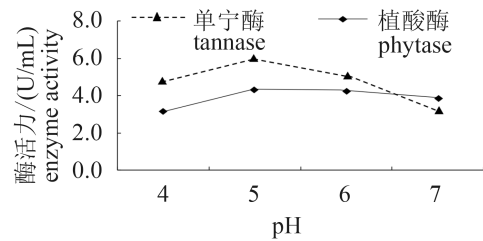


图2 液态发酵下不同发酵pH对黑曲霉M-6产单宁酶和植酸酶活力的影响

Fig. 2 The effects of fermentative pH on tannase and phytase activities of M-6 under submerged fermentation

著高于其他处理组($P<0.05$)。霉菌M-6产植酸酶活力在发酵pH为5时达到最高值(4.47±0.03)U/mL,显著高于发酵pH4和7处理组($P<0.05$),但与发酵pH6处理组的差异不显著($P>0.05$)。

2.5 霉菌M-6的生长曲线

菌种生长曲线表明,0~30h霉菌M-6处于生长延滞期,30~66h处于生长的对数期,生长速度明显加快,66h后进入稳定期(图3)。

2.6 霉菌M-6的菌落和菌种形态学特征及5.8S rDNA测序结果

在察氏琼脂培养基平板上,霉菌M-6迅速生长蔓延。第3d即可长出较为明显的菌落,菌丝呈现白色,较发达。随着培养时间的延长,菌丛顶部逐渐从黄色变成黑色厚绒状。成熟的菌落直径为3~4cm,边缘粗糙为白色,菌丝发达,多分枝,菌丝底部呈白色,菌丝顶部分生孢子头呈黑褐色,可产生孢子,有霉味。

在显微镜下,M-6分生孢子头呈放射状。分

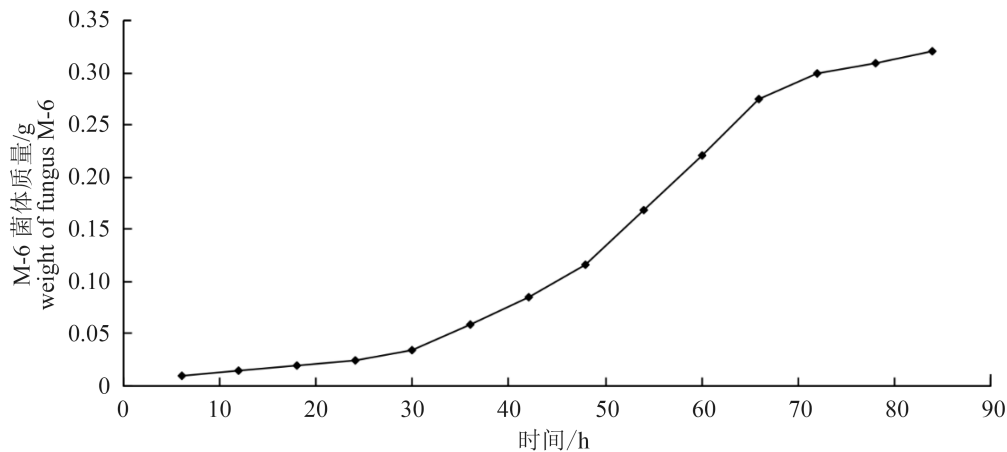


图3 黑曲霉M-6的生长曲线

Fig. 3 Growth curve of M-6

生孢子梗壁光滑,较厚。顶囊呈球形,小梗双层、密生于顶囊的全部表面。分生孢子球形、有褐色色素沉积在细胞壁,粗糙有刺。

通过对M-6菌落形态及产孢结构特征的观察,根据《真菌鉴定手册》(魏景超,1979)以及《菌种保藏手册》(《菌种保藏手册》编写组,1980)初步将M-6鉴定为黑曲霉(*Aspergillus niger*)。将测得的ITS序列(见附录)进行Blast对比,其与*A. niger*(GenBank登陆号:JF838357.1)的相似度为99%。结合形态学和分子学手段,鉴定M-6为黑曲霉*A. niger*,其分类学地位是子囊菌亚门(Ascomycotina)、丝孢纲(Hyphomycetes)、丝孢目(Moniliales)、丛梗孢科(Moniliaceae)、曲霉属(*Aspergillus*)。

3 讨论

本实验从富含双低菜粕的土壤中分离得到109株菌株中,单宁降解菌株仅为14株(6株细菌和8株霉菌),这远少于植酸降解菌株27株(6株细菌、17株酵母菌和4株霉菌)。本实验结果中,单宁降解菌种类稀少,可能是由于单宁是植物在长期进化中形成的一类可以抵御致病微生物感染的次级代谢产物,具有广谱抑菌能力^[3,18]。此外,本实验发现霉菌和细菌能够降解单宁,但是本实验未发现能够降解单宁的酵母菌,这说明细菌和霉菌对单宁的降解能力要远远好于酵母菌,这与Bhat等^[3]的研究结果相符。这可能与单宁能与酵母菌细胞壁上的某些物质发生作用,破坏酵母菌细胞结构的完整性,影响酵母菌存活有关^[19]。

本研究中霉菌M-6、M-3和M-1能够在单宁和植酸筛选培养基上降解单宁和植酸,形成透明水解圈,且黑曲霉M-6产生的透明水解圈要大于霉菌M-3和M-1。Bradoo等^[13]和Pandey等^[5]报道,菌株在单宁和植酸筛选培养基上形成透明水解圈的大小,与菌株产外源单宁酶和植酸酶的能力有很强的正相关性。因此,本实验中筛选到的霉菌M-6、M-3和M-1对单宁和植酸都有很强的分解效果,其中黑曲霉M-6产单宁酶和植酸酶的能力要优于霉菌M-3和M-1。这与本实验室早期固态发酵研究结果相似^[20],在固态发酵条件下,黑曲霉M-6对双低菜粕中单宁和植酸的降解能力要显著优于霉菌M-1等其他菌种。这也在一

定程度上验证了Bhat^[3]和Shieh^[21]的研究结果,目前已知的拥有较强单宁和植酸分解能力的菌种大多是曲霉,曲霉所分泌的单宁酶和植酸酶往往拥有最强的活性。

本研究发现,在液态发酵条件下,发酵温度和pH显著影响黑曲霉M-6产单宁酶和植酸酶的活力,随着发酵温度和pH的升高,M-6产单宁酶和植酸酶活力呈现先升高后降低的趋势。这与本实验室早期固态发酵研究结果类似^[20]。本实验发现,当发酵温度为30℃时,霉菌M-6具有最大的产单宁酶和植酸酶活力。这与谢晓莉等^[22]、游见明^[23]以及叶明等^[24]对单宁降解菌和植酸降解菌的最佳发酵温度的研究结果相似^[12,14]。然而,本实验室早期固态发酵研究发现,M-6降解双低菜粕单宁和植酸的最佳起始发酵温度为25℃^[20],略低于本研究中发现的液态发酵最佳发酵温度30℃。这可能是因为在固态发酵过程中,微生物的发酵活动会产生大量的热,而物料的热传导率低,导致热量难以消散;此外,发酵过程中物料的收缩和空隙的减少也使热量更难以消散,这可以逐渐提升固态发酵体系的发酵温度。因此,尽管固态发酵的起始发酵温度25℃要比液态发酵起始发酵温度30℃稍低,但固态发酵一定时间后,发酵体系的温度会升高,并最终达到霉菌M-6对植酸和单宁的最适的发酵温度^[25]。本研究发现,在液态发酵条件下,当发酵pH值为5时,霉菌M-6具有最大的产单宁酶和植酸酶活力。这与Batra和Saxena^[12]、Mondal和Pati^[14]、Mondal等^[26]以及叶明等^[24]对单宁降解菌和植酸降解菌的最佳发酵pH的研究结果相一致。但是,本实验室早期固态发酵研究中发现^[20],霉菌M-6在固态发酵条件下降解双低菜粕中单宁和植酸的最佳发酵pH为6,略高于本研究发现液态发酵最佳发酵pH。这可能是由于菌种在较复杂的固态发酵环境下,生长代谢需要较高pH从而保持其产酶能力,但具体原因尚不明确,有待进一步深入研究。

通过形态学特征及分子生物学手段,鉴定M-6为黑曲霉*A. niger*。黑曲霉具有不产生真菌毒素,菌丝体易形成,有丰富的酶系,便于工业生产等优点,被广泛应用于食物发酵产业等领域。本研究中发现的M-6黑曲霉,为从发酵菜粕中去除单宁和植酸等抗营养因子、优化植物蛋白用以替代鱼粉以满足水产饲料对蛋白质的需求提供

了可能。但是,与国内外的一些研究相比^[12-13,23-24],本实验筛选出来的黑曲霉M-6在液态发酵下产单宁酶和植酸酶的能力较弱。因此,如果要将本实验筛选出的菌种应用于工业生产,还需进一步优化液态发酵工艺。

4 结论

本研究从土壤中分离筛选出3株(M-6、M-3和M-1)能够同时水解单宁和植酸的降解菌。在液态发酵的条件下,黑曲霉M-6(*A. niger*)产单宁酶和植酸酶的最佳发酵温度为30℃,最佳发酵pH值为5。

参考文献:

- [1] Lott J N A, Ockenden I, Raboy V, *et al.* Phytic acid and phosphorus in crop seeds and fruits: A global estimate[J]. *Seed Science Research*, 2000, 10(1): 11-33.
- [2] Makkar H P S. Effects and fate of tannins in ruminant animals, adaptation to tannins, and strategies to overcome detrimental effects of feeding tannin-rich feeds[J]. *Small Ruminant Research*, 2003, 49(3): 241-256.
- [3] Bhat T K, Singh B, Sharma O P. Microbial degradation of tannins- A current perspective[J]. *Biodegradation*, 1998, 9(5): 343-357.
- [4] Osawa R, Kuroiso K, Goto S, *et al.* Isolation of tannin-degrading lactobacilli from humans and fermented foods[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(7): 3093-3097.
- [5] Pandey A, Szakacs G, Soccol C R, *et al.* Production, purification and properties of microbial phytases[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 77(3): 203-214.
- [6] Egonunley M, Aworh O C. Effect of soaking, dehulling, cooking and fermentation with *Rhizopus oligosporus* on the oligosaccharides, trypsin inhibitor, phytic acid and tannins of soybean (*Glycine max* Merr.), cowpea (*Vigna unguiculata* L. Walp) and groundbean (*Macrotyloma geocarpa* Harms)[J]. *Journal of Food Engineering*, 2003, 56(2-3): 249-254.
- [7] Osman M A. Changes in sorghum enzyme inhibitors, phytic acid, tannins and in vitro protein digestibility occurring during Khamir (local bread) fermentation[J]. *Food Chemistry*, 2004, 88(1): 129-134.
- [8] 徐建雄, 叶陈梁, 王晶. 双低菜籽粕中营养成分与有毒有害物质的分析[J]. *粮食与饲料工业*, 2005(11): 28-29. Xu J X, Ye C L, Wang J. Analysis on nutritive ingredients and deleterious substances in double-low rapeseed meal[J]. *Cereal & Feed Industry*, 2005(11): 28-29 (in Chinese).
- [9] Somsu W, Kongkachuichai R, Sungpuag P, *et al.* Effects of three conventional cooking methods on vitamin C, tannin, myo-inositol phosphates contents in selected Thai vegetables[J]. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2008, 21(2): 187-197.
- [10] 陈佳毅, 叶元土, 张伟涛, 等. 双低菜粕是水产饲料中的优质植物蛋白源[J]. *饲料研究*, 2008(2): 58-60. Chen J Y, Ye Y T, Zhang W T, *et al.* The double low rapeseed meal is the high quality plant protein in aqua-feed[J]. *Feed Research*, 2008(2): 58-60 (in Chinese).
- [11] Osawa R. Formation of a clear zone on tannin-treated brain heart infusion agar by a *Streptococcus* sp. Isolated from feces of koalas[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990, 56(3): 829-831.
- [12] Batra A, Saxena R K. Potential tannase producers from the genera *Aspergillus* and *Penicillium*[J]. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5): 1553-1557.
- [13] Bradoo S, Gupta R, Saxena R K. Screening of extracellular tannase-producing fungi: Development of a rapid and simple plate assay[J]. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 1996, 42(4): 325-329.
- [14] Mondal K C, Pati B R. Studies on the extracellular tannase from newly isolated *Bacillus licheniformis* KBR 6[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2000, 40(4): 223-232.
- [15] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 2版. 北京: 高教出版社, 1997: 221-223. Zhang L X, Zhang T F, Li L Y. *Biological Experimental Methods and Techniques*[M]. 2nd ed. Beijing: Higher Education Press, 1997: 221-223 (in Chinese).
- [16] Zhang Y J, Zhang S, Liu X Z, *et al.* A simple method of genomic DNA extraction suitable for analysis of bulk fungal strains[J]. *Letters in Applied Microbiology*, 2010, 51(1): 114-118.
- [17] Choi I Y. First report of bark dieback on blueberry caused by *Botryosphaeria dothidea* in Korea[J]. *Plant Disease*, 2011, 95(2): 227.
- [18] Cowan M M. Plant products as antimicrobial agents[J].

- Clinical Microbiology Reviews, 1999, 12(4): 564-582.
- [19] McSweeney C S, Palmer B, McNeill D M, *et al.* Microbial interactions with tannins: Nutritional consequences for ruminants[J]. Animal Feed Science and Technology, 2001, 91(1-2): 83-93.
- [20] 王晓东, 麦康森, 张彦娇, 等. 双低菜粕中植酸和单宁的黑曲霉发酵降解及条件优化[J]. 中国海洋大学学报, 2013, 43(2): 15-22.
- Wang X D, Mai K S, Zhang Y J, *et al.* Degradation of tannins and phytic acid in double-low rapeseed meal by *Aspergillus niger* in solid fermentation and optimization of fermenting condition[J]. Journal of Ocean University of China, 2013, 43(2): 15-22 (in Chinese).
- [21] Shieh T R, Ware J H. Survey of microorganisms for the production of extracellular phytase[J]. Applied Microbiology, 1968, 16(9): 1348-1351.
- [22] 谢晓莉, 刘明, 邱树毅, 等. 黑曲霉B0201液体发酵产单宁酶最佳工艺条件研究[J]. 中国酿造, 2010(8): 30-33.
- Xie X L, Liu M, Qiu S Y, *et al.* Optimal conditions of tannase production from *Aspergillus niger* B0201 under submerged fermentation[J]. China Brewing, 2010(8): 30-33 (in Chinese).
- [23] 游见明. 黑曲霉单宁酶发酵工艺[J]. 现代食品科技, 2005, 21(3): 96-98, 101.
- You J M. Fermentation process of tannase from *Aspergillus niger*[J]. Modern Food Science and Technology, 2005, 21(3): 96-98, 101 (in Chinese).
- [24] 叶明, 沈君子, 叶敏, 等. 高产植酸酶菌株的选育及发酵条件优化[J]. 食品科技, 2009(4): 10-13.
- Ye M, Shen J Z, Ye M, *et al.* Breeding of high-yield phytase strains and optimization of its fermentation conditions[J]. Food Science and Technology, 2009(4): 10-13 (in Chinese).
- [25] 胡文锋, 郭志忠, 陈羨美. 固态发酵技术生产蛋白饲料的研究进展[J]. 农机化研究, 2005(6): 46-49.
- Hu W F, Guo Z Z, Chen X M. Current research progress of protein feed based on solid state fermentation[J]. Journal of Agricultural Mechanization Research, 2005(6): 46-49 (in Chinese).
- [26] Mondal K C, Banerjee D, Banerjee R, *et al.* Production and characterization of tannase from *Bacillus cereus* KBR 9[J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2001, 47(5): 263-267.

Screening and identification of tannic acid and phytic acid degradative microorganisms from soil and the submerged fermentation study

WANG Xiaodong, HU Haibin, MAI Kangsen, ZHANG Yanjiao*,
XU Wei, AI Qinghui, ZHANG Wenbing

(Key Laboratory of Aquaculture Nutrition and Feed, Ministry of Agriculture, and the Key Laboratory of Mariculture
(Ocean University of China), Ministry of Education, Qingdao 266003, China)

Abstract: Tannic acid and phytic acid are two important anti-nutritional factors that limit the utilization of plant ingredients in aqua-feed industry. Enrichment-culture technique was used to isolate, screen and identify the efficient microorganisms from soil which could degrade both tannic acid and phytic acid. In this study, 109 microorganisms were isolated, of which 27 isolates could degrade phytic acid and 14 isolates exhibited tannic acid degradation potential. Among these isolates, fungi M-6, M-3 and M-1 degraded both tannic acid and phytic acid, of which fungus M-6 possessed higher degradative capacity than fungi M-3 and M-1. With the increase of fermentative temperature (20 °C~35 °C), the activities of tannase and phylase produced by fungus M-6 in submerged fermentation both showed a firstly-increase-and-then-decrease trend, with the highest activities observed at 30 °C ($P<0.05$). With the increase of fermentative pH (4~7), the activities of tannase and phylase of fungus M-6 in submerged fermentation both firstly increased and then decreased ($P<0.05$). The activity of tannase from pH 5 treatment was significantly higher than other groups ($P<0.05$), the activity of phylase from pH 5 group was significantly higher than pH 4 and 7 groups ($P<0.05$), but the difference was not significant compared with pH 6 ($P<0.05$). The isolate fungus M-6 was characterized as *Aspergillus niger*, supported by the morphologic taxonomy as well as the sequences of the ITS1-5.8S-ITS2 ribosomal DNA region. Therefore, fungi M-6, M-3 and M-1 could degrade both tannic acid and phytic acid. The optimum fermentative temperature for fungus M-6 was 30 °C and the optimum fermentative pH was 5, under submerged fermentation.

Key words: degradative microorganism; aqua-feed; tannic acid; phytic acid; submerged fermentation

Corresponding author: ZHANG Yanjiao. E-mail: yanjiaozhang@ouc.edu.cn

Funding projects: Research Fund for the Doctoral Program of Higher Education of China (20120132120025); Promotive Research Fund for Excellent Young and Middle-aged Scientists of Shandong Province (BS2013SW007); National Natural Science Foundation of China (31202006)

•附录•

黑曲霉M-6(*Aspergillus niger*)5.8S rDNA测序拼接结果

```
GGGACTGCGGAAGGATCATTACCGAGTGCGGGTCCTTTGGGCCAACCTCCCATCCGTGTCTATTATACCCTGTGCTTCGGCGGGC
CCGCCGCTTGTGCGCCGCCGGGGGGCGCCTTTGCCCCCGGGCCCGTGCCCGCGGAGACCCCAACACGAACACTGTCTGAAAGCGTG
CAGTCTGAGTTGATTGAATGCAATCAGTTAAACTTTCAACAATGGATCTCTTGGTTCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGAT
AACTAATGTGAATTGAGAATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAG
CGTCATTGCTGCCCTCAAGCCCGGCTTGTGTGTTGGGTGCGCCGTCCCCCTCCGGGGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGGGCGGCACCGCG
TCCGATCCTCGAGCGTATGGGGCTTTGTCACATGCTCTGTAGGATTGGCCGGCGCCTGCCGACGTTTTCCAACATTTTTTCCAGGTTGAC
CTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGGCCGGAGGAA
```