

研究报告

棉粕发酵菌株 M-15 的筛选及全基因组测序分析

李佳, 徐明洋, 高同国, 王伟, 姜军坡, 赵朔, 封晓娜, 谢艺菲, 朱宝成*

河北农业大学 生命科学院, 河北 保定 071000

李佳, 徐明洋, 高同国, 王伟, 姜军坡, 赵朔, 封晓娜, 谢艺菲, 朱宝成. 棉粕发酵菌株 M-15 的筛选及全基因组测序分析[J]. 微生物学通报, 2024, 51(9): 3535-3550.

LI Jia, XU Mingyang, GAO Tongguo, WANG Wei, JIANG Junpo, ZHAO Shuo, FENG Xiaona, XIE Yifei, ZHU Baocheng. Screening and whole genome sequencing of strain M-15 for cottonseed meal fermentation[J]. Microbiology China, 2024, 51(9): 3535-3550.

摘要:【背景】棉粕中的游离棉酚致使其释放营养价值及蛋白饲料应用受到限制, 微生物发酵是棉粕脱酚的有效策略。【目的】筛选具有棉酚降解活性的发酵菌株, 初步探索菌株降解棉酚的机制。【方法】以棉酚降解率为检测指标筛选棉酚高效降解菌株, 采用形态学观察、生理生化鉴定和基于 16S rRNA 基因序列的系统发育分析进行菌株鉴定。同时, 分析筛选到的菌株代谢棉酚可能的中间产物及对多环芳烃类物质代谢关键中间产物的利用能力, 并通过菌株全基因组测序发掘菌株中相关代谢酶对应基因的存在。【结果】从河北省保定市近郊某土壤样品中筛选出一株具有较高棉酚降解活性的菌株, 命名为 M-15。该菌株发酵棉粕, 将其中的游离棉酚含量由 882.07 mg/kg 降至 32.38 mg/kg, 降解率高达 96.33%; 菌株 M-15 被鉴定为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。此外, 菌株 M-15 降解棉酚的培养液中检测到关键中间产物有水杨酸、邻苯二酚及龙胆酸, 结合该菌株对多环芳烃类物质代谢关键中间产物利用能力, 推测菌株 M-15 发酵棉粕降解棉酚可能的代谢途径由棉酚的联萘结构分解形成萘类化合物, 再经水杨酸途径形成邻苯二酚或龙胆酸, 通过邻苯二酚和龙胆酸分别进行间位开环, 最后由三羧酸循环途径代谢。【结论】本研究筛选得到高效降解棉酚的菌株 M-15, 初步推定其应该通过水杨酸途径降解棉酚, 为微生物发酵棉粕脱毒技术的开发与应用奠定了一定的理论基础。

关键词: 棉粕; 枯草芽孢杆菌; 固态发酵; 棉酚; 脱毒

资助项目: 河北省科技厅中央引导地方科技发展资金项目(236Z2905G)

This work was supported by the Central Guide Local Science and Technology Development Fund Project of Hebei Science and Technology Department (236Z2905G).

*Corresponding author. E-mail: zhu2222@126.com

Received: 2024-01-06; Accepted: 2024-03-20; Published online: 2024-05-07

Screening and whole genome sequencing of strain M-15 for cottonseed meal fermentation

LI Jia, XU Mingyang, GAO Tongguo, WANG Wei, JIANG Junpo, ZHAO Shuo, FENG Xiaona, XIE Yifei, ZHU Baocheng*

College of Life Sciences, Hebei Agricultural University, Baoding 071000, Hebei, China

Abstract: [Background] Free gossypol in cottonseed meal limits the release of nutrients and the application of cottonseed meal as protein feed, and microbial fermentation is an effective approach for the removal of gossypol from cottonseed meal. [Objective] To screen a strain capable of degrading gossypol and decipher the mechanism of gossypol degradation by the strain. [Methods] The strain capable of degrading gossypol was screened with the degradation rate of gossypol as the indicator and identified by morphological observation, physiological and biochemical tests, and phylogenetic analysis based on 16S rRNA sequences. The possible intermediates of gossypol metabolism by the selected strain were analyzed and the utilization capability of the strain for the key intermediates of polycyclic aromatic hydrocarbons was determined. Furthermore, whole genome sequencing of the strain was carried out to mine the genes encoding the enzymes involved in the degradation of gossypol. [Results] A strain capable of degrading gossypol was isolated from a soil sample in the outskirts of Baoding and named M-15. After fermentation by strain M-15, the content of free gossypol in cottonseed meal decreased from 882.07 mg/kg to 32.38 mg/kg, which indicated a degradation rate as high as 96.33%. The strain was identified as *Bacillus subtilis*. Salicylic acid, catechol, and gentianic acid were the major intermediates in the degradation of gossypol by strain M-15. According to the utilization capacity of the intermediates in the metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons, the possible degradation pathway of gossypol in the fermentation of cottonseed meal by strain M-15 was deduced as follows. Naphthalenes were produced from gossypol with the binaphthalene structure and then formed catechol or gentianic acid via the salicylic acid pathway. Catechol and gentianic acid underwent ring opening at the meta position, and the products entered the tricarboxylic acid cycle to complete the degradation. [Conclusion] The strain M-15 highly effective in degrading gossypol was screened out. It may degrade gossypol via the salicylic acid pathway. The findings provided a theoretical basis for the development and application of microbial fermentation for detoxification of cottonseed meal.

Keywords: cottonseed meal; *Bacillus subtilis*; solid-state fermentation; gossypol; detoxification

我国养殖业豆粕需求缺口大,饼粕类蛋白饲料缺乏。农业农村部将开发新型饲料资源列为突破农业农村关键领域的重大科技问题之一。棉粕

富含蛋白质(40%–45%)且在我国年产量达600万t,但因含有致毒物质游离棉酚,限制了其在养殖业的有效应用^[1-2]。

通过微生物发酵可有效消减棉粕中的棉酚,同时,微生物发酵还可预消化棉粕中的大分子蛋白,提高棉粕营养成分消化率,增加其中活性代谢产物,改善其品质,为我国养殖业提供优质饲料蛋白源,有效补充我国豆粕供给不足^[3]。

筛选安全高效的发酵菌种是获得优质发酵棉粕的基础与关键。枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)产酶类丰富,对大分子营养物质和抗营养因子均有较好的降解效果;迅速耗氧,可促进发酵体系中乳酸菌数量增加,降低物料 pH 值,抑制有害菌;分泌多种有益物质,调节动物肠道菌群平衡,增强免疫力,已成为理想微生物添加剂之一^[4-5]。实际生产中枯草芽孢杆菌也具有以下优势:(1) 具有抗逆性强、耐高温高压、耐酸碱等生物学特性,在菌剂生产、运输、储存、使用过程中具有良好适应性,应用效果得以保障;(2) 枯草芽孢杆菌为兼性厌氧菌株,可适应深层嫌氧固态发酵(在发酵初期,发酵罐中会有一定氧气,随着温度时间的延长,会变成厌氧的环境)工艺中先好氧后厌氧的环境,有利于大规模工业化生产的实现^[6-8]。因此,本研究以棉酚降解率为主要指标,筛选具有高效脱酚效果的芽孢杆菌菌株,并通过分析棉酚降解产物探索菌株降解棉酚机制,为棉粕复合发酵菌剂的研制及棉粕固态发酵工艺的建立等后期研究提供相应基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

棉粕购自保定东光榨油厂,经粉碎加工成粒度为 10–12 目的粉状,采用国家标准 GB/T 13086—2020 中规定的方法测定^[9]棉粕中棉酚含量为 980 mg/kg。取河北省保定市近郊棉田 10–15 cm 深处土样用于菌种筛选。

1.2 培养基

以棉酚为唯一碳源的固体培养基(g/L):棉酚

0.5, (NH₄)₂SO₄ 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, NaH₂PO₄·H₂O 0.5, CaCl₂·2H₂O 0.1, K₂HPO₄ 0.5, 琼脂 15.0, pH 7.2–7.4。

棉酚碳源培养液(g/L):棉酚 0.5,牛肉膏 1.0, 蛋白胨 2.0, (NH₄)₂SO₄ 2.0, MgSO₄·7H₂O 0.2, NaH₂PO₄·H₂O 0.5, CaCl₂·2H₂O 0.1, K₂HPO₄ 0.5, pH 7.2–7.4。

固体发酵培养基:由棉粕和玉米粉组成发酵底物。棉粕与玉米粉按 9:1 的比例混合均匀。发酵时底物与水再按 1:0.8 的比例混合。

以棉酚为唯一碳源的无机盐液体培养基(g/L):棉酚 0.5, MgSO₄·7H₂O 0.2, (NH₄)₂SO₄ 2.0, NaH₂PO₄·H₂O 0.5, CaCl₂·2H₂O 0.1, K₂HPO₄ 0.5, pH 7.2–7.4。

NA、NB 培养基参照文献[10]配制。

1.3 主要试剂和仪器

NaH₂PO₄·H₂O、CaCl₂·2H₂O 和蛋白胨,北京奥博星生物技术有限责任公司;(NH₄)₂SO₄ 和 MgSO₄·7H₂O,上海麦克林生化科技股份有限公司;牛肉膏和 K₂HPO₄,保定楚瀚生物科技有限公司。

扫描电子显微镜,卡尔蔡司有限公司;光学显微镜,杭州华盼科技有限公司;高效液相色谱仪,通微(上海)分析技术有限公司;可见分光光度计,上海美谱达仪器有限公司;电热恒温培养箱,天津市泰斯特仪器有限公司。

1.4 棉酚降解菌株的筛选及鉴定

采用土壤稀释法^[11]将适当浓度的稀释液接种到以棉酚为唯一碳源的固体培养基中,在恒温培养箱中 30 °C 培养 1–2 d 后分离得到不同形态单菌落,进行初筛和复筛后选取优良菌株对棉粕中棉酚实际降解能力进行考察。

初筛:将分离得到的单菌落分别接种到以棉酚为唯一碳源的固体培养基,30 °C 培养 48 h。观察选取能够生长的菌株,光学显微镜验纯后制

成斜面菌种于 4 °C 保存备用。

复筛:将活化初筛得到的菌株接种至棉酚碳源培养液, 30 °C、180 r/min 培养 72 h。参考文献[9]分别测定发酵前后棉酚的含量, 根据发酵液中棉酚的残留量, 选取优良菌株。

菌株对棉粕中棉酚实际降解能力的考察:将选定的菌株活化后接种至固体发酵培养基中, 室温培养 10 d 后, 参考文献[9]分别测定发酵前后样品中棉酚的含量。

菌株形态鉴定:将菌株划线接种于 NA 培养基培养, 30 °C 培养 24 h, 使用无菌水收集菌体细胞, 采用 0.3 μm 滤膜过滤后在扫描电子显微镜和光学显微镜下观察其菌体形态。

菌株的生理生化鉴定:根据《常见细菌系统鉴定手册》^[12]进行过氧化氢酶试验、酪素水解试验等 17 项试验。

参考张莉等^[11]的方法进行 16S rRNA 基因鉴定并构建系统发育树。

1.5 菌株全基因组测序分析

将菌株单菌落接种到 NB 培养基中, 30 °C、180 r/min 培养 12–14 h, 于 4 °C、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 委托北京百迈克生物科技有限公司提取其 DNA 并基于 PacBio 平台的第三代全基因组测序技术对菌株进行全基因组测序。利用 OAT (<https://www.ezbiocloud.net/tools/orthoani>) 比对工具将分离菌株同其他具有代表性的芽孢杆菌进行平均核苷酸一致性 (average nucleotide identity, ANI) 比对。利用 FastQC 软件对数据进行质控分析, 数据过滤去除原始数据中的接头和低质量 reads, 并使用 Canu v1.5 软件组装过滤后的 subreads, 通过 Racon v3.4.3 软件校正组装结果, 通过 Circlator v1.5.5 软件环化并调整起始位点。采用 Glimmer v3.02 软件对细菌基因组进行基因结构、开放阅读框 (open reading frame, ORF) 及蛋白基因的预测。采用 Non-redundant Protein

Database (Nr)、Gene Ontology (GO) 等 12 个数据库比对测序结果并进行基因功能注释。

1.6 菌株降解棉酚可能产生的中间产物分析

1.6.1 菌株降解棉酚培养液中中间产物的测定

将筛选得到的棉酚降解菌株 M-15 接种到以棉酚为唯一碳源的无机盐液体培养基中, 30 °C、180 r/min 培养, 每隔 12 h 取样, 采用高效液相色谱法测定培养液中可能的多环芳烃降解的中间代谢产物。

1.6.2 菌株对多环芳烃降解的典型中间产物利用能力的测定

将棉酚降解菌株 M-15 接种到添加 2 mmol/L 不同底物 (萘、联苯、邻苯二甲酸、水杨酸、邻苯二酚、原儿茶酸、龙胆酸) 的无机盐液体培养基中, 以不添加底物的培养基作为对照, 30 °C、180 r/min 培养 72 h, 每隔 12 h 取样测定 OD_{600} , 观察菌株生长情况, 判断菌株对不同底物的利用能力。

2 结果与分析

2.1 游离棉酚标准曲线的测定

采用参考文献[9]的方法测定标准溶液吸光度值 (表 1)。根据棉酚含量与吸光度值绘制标准曲线 (图 1) 并进行回归计算, 得回归方程为 $y=0.018x$ ($R^2=0.9940$)。

表 1 不同浓度棉酚标准液吸光度值

Table 1 Absorbance values of gossypol standard solution with different concentrations

棉酚标准溶液 Gossypol standard solution (mL)	棉酚含量 Gossypol content (μg/mL)	OD_{440}
0.000	0	0.000
0.200	19	0.358
0.400	38	0.655
0.600	57	1.072
0.800	76	1.282
1.000	95	1.751

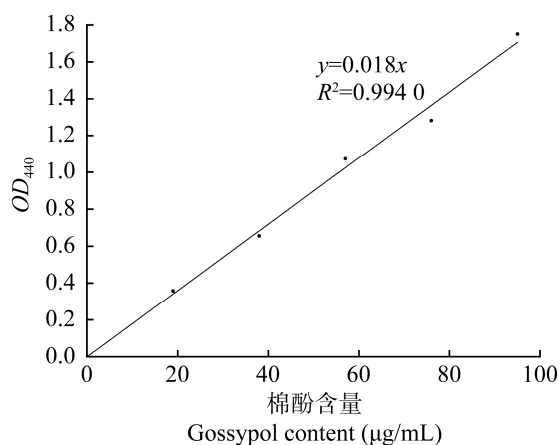


图 1 棉酚标准曲线

Figure 1 Standard curve of gossypol.

2.2 棉酚降解菌株的筛选结果

根据菌株是否仅利用棉酚生长筛选得到 182 株可能具有棉酚降解作用的细菌。经过复筛,从 182 株菌中筛选得到一株棉酚降解性能较好的菌株,命名为 M-15 (表 2)。菌株 M-15 在棉酚培养液中培养 72 h 可将棉酚由 500 mg 降解至 32.70 mg,降解率为 93.46%;通过固体发酵 10 d 可将棉粕中游离棉酚含量由 882.07 mg/kg 降

至 32.38 mg/kg,降解率为 96.33%。

通过对比分析菌株对棉酚培养液和固体发酵棉粕中棉酚的降解活性,可发现 2 种培养条件下菌株的降解能力基本一致,并且固体发酵条件下供试菌株的降解能力均略高于液体培养条件,可能是因为固体发酵条件物料中营养成分更加丰富,有利于菌株生长。

2.3 供试菌株的鉴定结果

2.3.1 菌落特征

菌株 M-15 在 NA 培养基上培养 24 h 后菌落 (图 2) 呈乳白色不规则圆形,正反面颜色一致且不透明,不分泌其他色素,表面粗糙多皱褶,具有火山口状,符合芽孢杆菌菌落的典型特征。

2.3.2 菌体特征

菌株 M-15 菌体形态特征见图 3 和图 4。扫描电子显微镜下观察到菌株 M-15 的菌体呈杆状,个体均匀饱满,轮廓清晰,表面被微小绒毛感颗粒包裹菌体长约 2.2 μm,宽约 0.9 μm。菌体细胞经结晶紫染色后在光学显微镜下观察,菌体有芽孢生成,呈椭圆状,中生,长约 1.1 μm,宽约 0.9 μm,符合芽孢杆菌的菌体形态特征。

表 2 供试菌株降解棉酚能力的测定结果

Table 2 Determination results of the ability of the strains to degrade gossypol

菌株编号 Strain No.	培养液中棉酚残存量 Gossypol content in the culture medium (mg)	培养液中棉酚降解率 Degradation rate of gossypol in culture medium (%)	发酵棉粕中棉酚残存量 Gossypol content in fermented cottonseed meal (mg)	发酵棉粕中棉酚降解率 Degradation rate of gossypol in fermented cottonseed meal (%)
M-4	35.95±0.36	92.81±0.24	29.97±2.64	96.60±0.22
M-5	121.60±2.01	75.68±0.20	178.43±6.51	81.79±0.65
M-6	105.75±2.98	78.85±0.36	131.76±6.18	86.56±0.67
M-9	54.20±1.59	89.16±0.11	62.11±3.50	93.66±0.35
M-11	117.15±2.87	76.57±0.23	190.66±7.84	80.54±0.87
M-12	116.75±3.01	76.65±0.39	195.24±8.16	80.08±0.88
M-13	74.45±1.74	85.11±0.20	110.28±5.02	88.75±0.42
M-15	32.70±1.51	93.46±0.19	32.38±2.79	96.33±0.21
M-20	84.40±2.86	83.12±0.21	99.58±6.88	89.84±0.88
M-44	42.45±1.78	91.51±0.23	72.23±4.30	92.63±0.45
M-57	98.25±3.36	80.35±0.37	168.75±6.48	82.78±0.73
M-72	93.75±4.43	81.25±0.48	147.85±6.31	84.91±0.63



图2 菌株 M-15 的菌落特征

Figure 2 Colony characteristics of strains M-15.

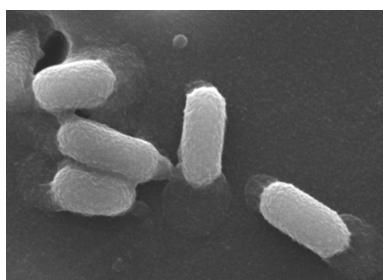


图3 扫描电子显微镜下菌株 M-15 的形态特征

Figure 3 Morphological characteristics of strain M-15 under scanning electron microscope.

表3 供试菌株的生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of the test strains

项目 Item	菌株 M-15 Strain M-15	地衣芽孢杆菌 ATCC 14580 <i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	枯草芽孢杆菌 168 <i>Bacillus subtilis</i> 168
硝酸盐还原 Nitrate reduction	+	+	+
酪素水解 Casein hydrolysis	+	—	+
淀粉水解 Starch hydrolysis	+	+	+
柠檬酸盐利用 Citrate utilization	+	+	+
过氧化氢酶试验 Catalase test	+	/	/
明胶液化 Gelatin liquefaction	—	+	+
吡啶反应 Indole reaction	+	—	—
硫化氢试验 Hydrogen sulfide test	+	/	/
V-P 试验 V-P test	+	+	+
耐盐试验 2% NaCl	+	+	+
Salt resistance test	5% NaCl	+	+
	7% NaCl	+	+
	10% NaCl	—	—
生长温度试验 4	—	—	—
Growth temperature test (°C)	20	+	+
	37	+	+
	45	+	+
	65	+	—

+: 阳性; —: 阴性; /: 未检测到结果

+: Positive; —: Negative; /: No results detected.



图4 光学显微镜下菌株 M-15 的形态特征

Figure 4 Morphological characteristics of strain M-15 under optical microscope.

2.3.3 生理生化试验结果

对菌株 M-15、地衣芽孢杆菌标准菌株 ATCC 14580 以及枯草芽孢杆菌标准菌株 168 进行生理生化试验, 对比其相应的生理生化特征。结果显示(表 3), 在硝酸盐还原试验、淀粉水解试验、柠檬酸盐利用试验、V-P 试验、耐盐试验中反应特征呈阳性, 与《常见细菌系统鉴定手册》^[10]中规定的芽孢杆菌属的生理生化特征较一致, 因此, 初步判断菌株 M-15 属于芽孢杆菌(*Bacillus* sp.), 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的典型反应特征最为接近, 因此通过分子生物学技术来进一步鉴定。

2.3.4 16S rRNA 基因序列分析及系统发育树的构建

菌株 M-15 基因组序列经与 NCBI GenBank 比对后,利用 MEGA 软件构建系统发育树(图 5),观察发现菌株 M-15 与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)聚为一枝。根据序列同源比对分析,菌株 M-15 的 16S rRNA 基因序列与芽孢杆菌属(*Bacillus*)相应标准菌株相似度均在 97%以上,与枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的标准菌株 DSM 10 的相似性最高,为 100.00% (表 4)。结合形态特征与生理生化特性,初步鉴定菌株 M-15 为一株枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。

2.4 菌株 M-15 全基因组测序分析结果

2.4.1 基因组完成图信息

菌株 M-15 完成图(图 6)包括一个环形染色体,无质粒。其染色体全长为 4 123 640 bp, G+C 含量为 43.97%。预测到的编码基因数为 4 093 个,所有编码基因的总长度为 3 620 307 bp,编码基因的平均长度为 884 bp。如图 7 所示,将菌株 M-15 与 GenBank 中各地区芽孢杆菌进行 ANI 值比对后发现,其全基因组序列与 *Bacillus subtilis* 高度相似,序列相似度达 100%,与其他芽孢杆菌属(*Bacillus*)相应标准菌株序列相似度均大于 97.7%。这与 16S rRNA 基因测序的结果一致。

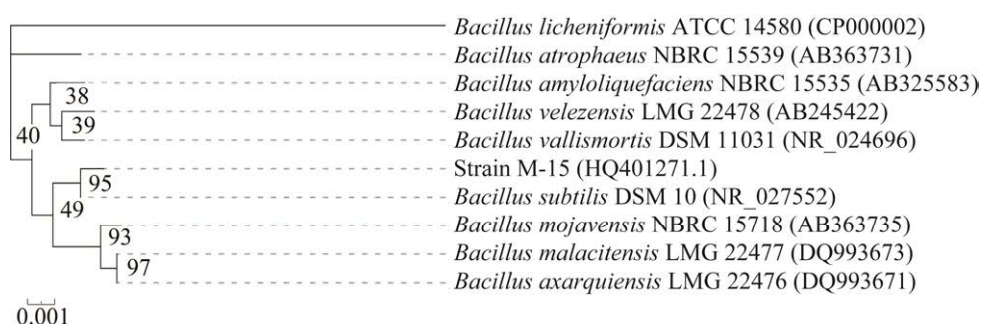


图 5 基于菌株 M-15 的 16S rRNA 基因序列构建的系统发育树 括号内为 GenBank 登录号;分支点上数字代表可信度;标尺 0.001 代表进化距离

Figure 5 Phylogenetic tree of strain M-15 based on 16S rRNA gene sequence. The serial numbers in parentheses are GenBank accession numbers; The numbers on the nodes indicates the credibility; The scale data 0.001 represents the evolutionary distance.

表 4 菌株 M-15 与参比菌株的 16S rRNA 基因序列相似性

Table 4 Similarity of 16S rRNA gene sequences between strain M-15 and reference strains

序列登录号	菌株名称	菌株编号	相似性
Sequence accession number	Strain	Strain No.	Similarity (%)
BFAF004589	<i>Anoxybacillus flavithermus</i>	DSM 2641	89.68
AB325583	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	NBRC 15535	99.48
AB363731	<i>Bacillus atrophaeus</i>	NBRC 15539	99.17
DQ993671	<i>Bacillus axarquiensis</i>	LMG 22476	99.78
CP000002	<i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 14580	97.73
DQ993673	<i>Bacillus malacitensis</i>	LMG 22477	99.78
AB363735	<i>Bacillus mojavensis</i>	NBRC 15718	99.78
NR_027552	<i>Bacillus subtilis</i>	DSM 10	100.00
NR_024696	<i>Bacillus vallismortis</i>	DSM 11031	99.70
AB245422	<i>Bacillus velezensis</i>	LMG 22478	99.85

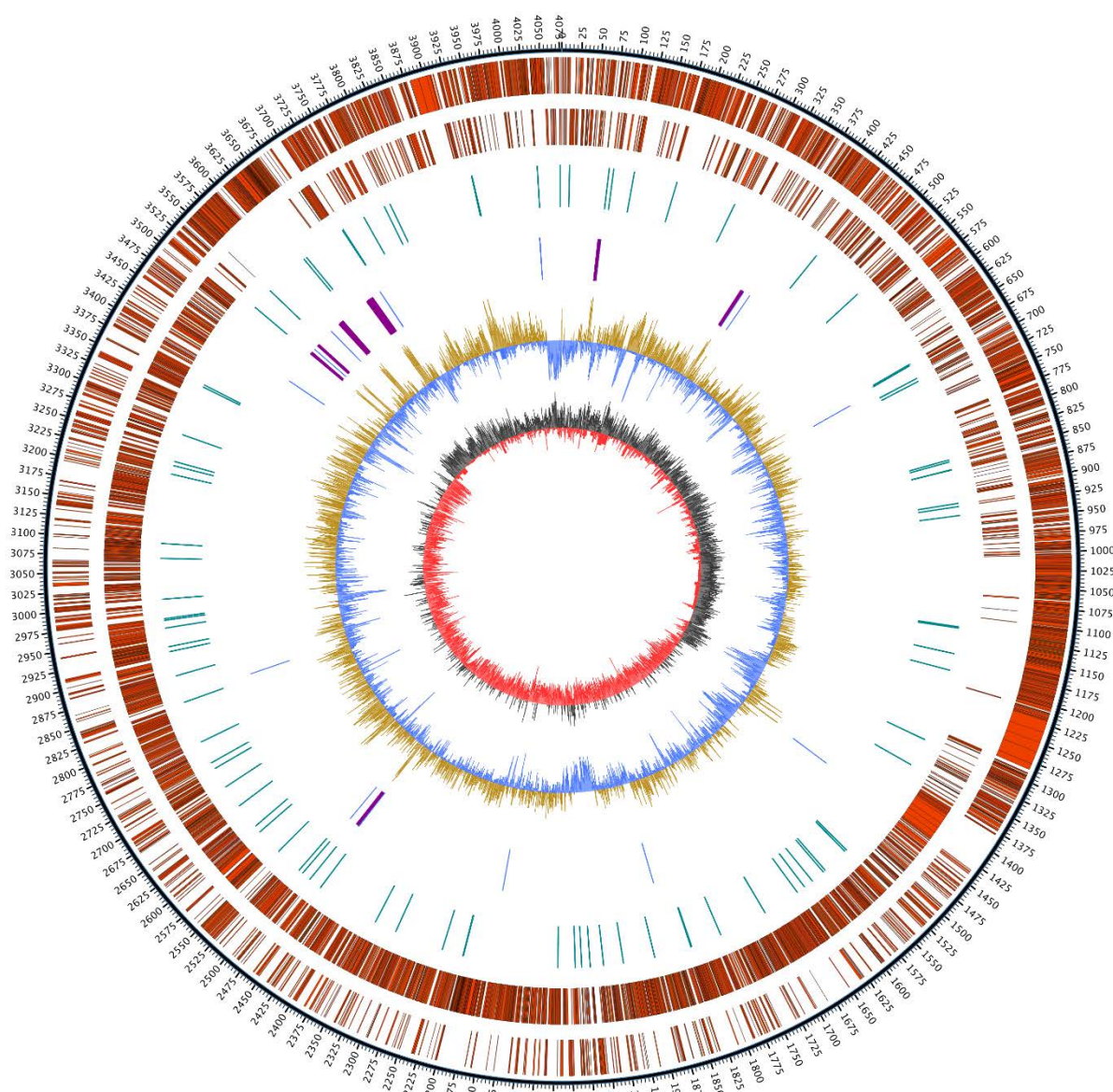


图 6 菌株 M-15 全基因组圈图 最外面一圈为基因组大小的标示, 每个刻度为 5 kb; 第二圈和第三圈分别为基因组正链和负链上的基因, 不同颜色代表不同的 COG 功能分类; 第四圈为重复序列; 第五圈为 tRNA 和 rRNA, 蓝色为 tRNA, 紫色是 rRNA; 第六圈为 G+C 含量, 浅黄色部分表示该区域 G+C 含量高于基因组的平均 G+C 含量, 峰值越高则与平均 G+C 含量差异越大, 蓝色部分则表示该区域 G+C 含量低于基因组的平均 G+C 含量; 最内圈是 G+C-skew, 深灰色代表 G 含量大于 C 的区域, 红色代表 C 含量大于 G 的区域

Figure 6 Genomic circle of strain M-15. The outermost circle is indicated by the size of the genome, and each scale is 5 kb; The second and third circles are genes on the positive and negative strands of the genome, respectively, and different colors represent different COG functional classifications. The fourth circle is a repeating sequence; The fifth circle is tRNA and rRNA, blue is tRNA, purple is rRNA; The sixth circle is the G+C content, the light yellow part indicates that the G+C content in the region is higher than the average G+C content of the genome, the higher the peak, the greater the difference from the average G+C content, and the blue part indicates that the G+C content in the region is lower than the average G+C content of the genome. The innermost ring is G+C-skew, dark gray represents areas with G content greater than C, and red represents areas with C content greater than G.

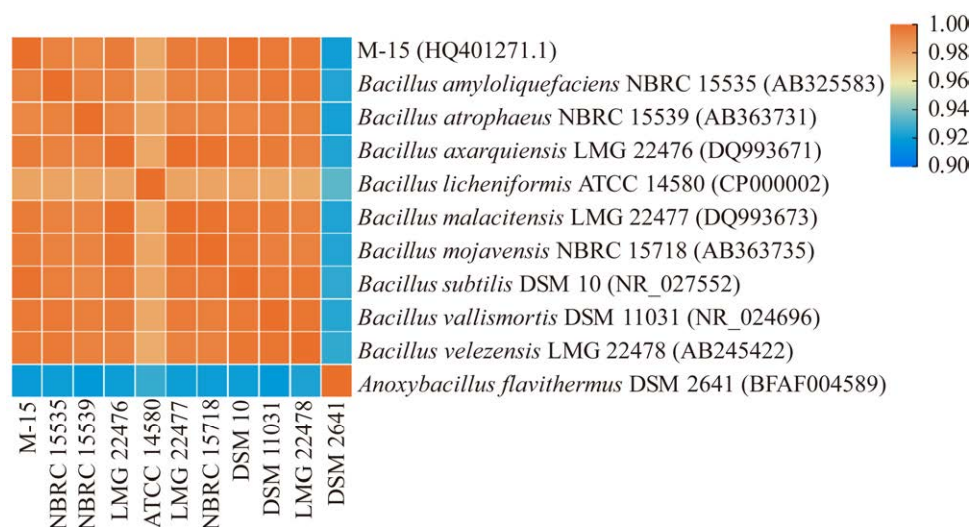


图 7 菌株 M-15 与参比菌株的平均核苷酸一致性比对

Figure 7 Average nucleotide identity comparison of strain M-15 with the reference strain.

2.4.2 基因组组分分析

根据基因组组分分析结果, 菌株 M-15 基因组中重复序列长度为 3 812 bp, 占全基因组的 0.09%。其中假基因 22 个, 序列长度 2 647 bp, 非编码 RNA 有 86 个 tRNA、33 个 rRNA (5S rRNA、16S rRNA 和 23S rRNA 各 11 个) 及 92 个 other ncRNA。菌株基因组中共预测到 5 个 CRISPR 序列、6 个基因岛 (总长 121 416 bp)、10 个基因簇 (序列总长度为 480 518 bp, 平均长度为 48 051 bp)、1 836 个启动子。

2.4.3 功能基因注释

将菌株 M-15 的基因组数据与 KEGG 数据库比对进行功能基因注释, 本研究重点关注了微生物降解多环芳烃的关键酶——加氧酶的注释结果。结果显示, 菌株 M-15 基因组中注释到了邻苯二酚 2,3-双加氧酶 (catechol 2,3-dioxygenase) 对应的基因 GE000308, 该基因对应的 KO 编号为 K07104, 参与的 KEGG 通路有 ko00622、ko01220、ko01120、ko00361、ko01100 和 ko00362, 以上路径中涉及芳香族化合物降解 (degradation of aromatic compounds) 的代谢通路见图 8。

已知邻苯二酚 2,3-双加氧酶主要用于芳香族化合物降解过程中的重要中间产物——邻苯二酚和龙胆酸的间位裂解。因此, 推测菌株 M-15 可能通过双加氧酶催化多环芳烃开环, 经邻苯二酚间位开环或龙胆酸间位开环途径对棉酚代谢降解。

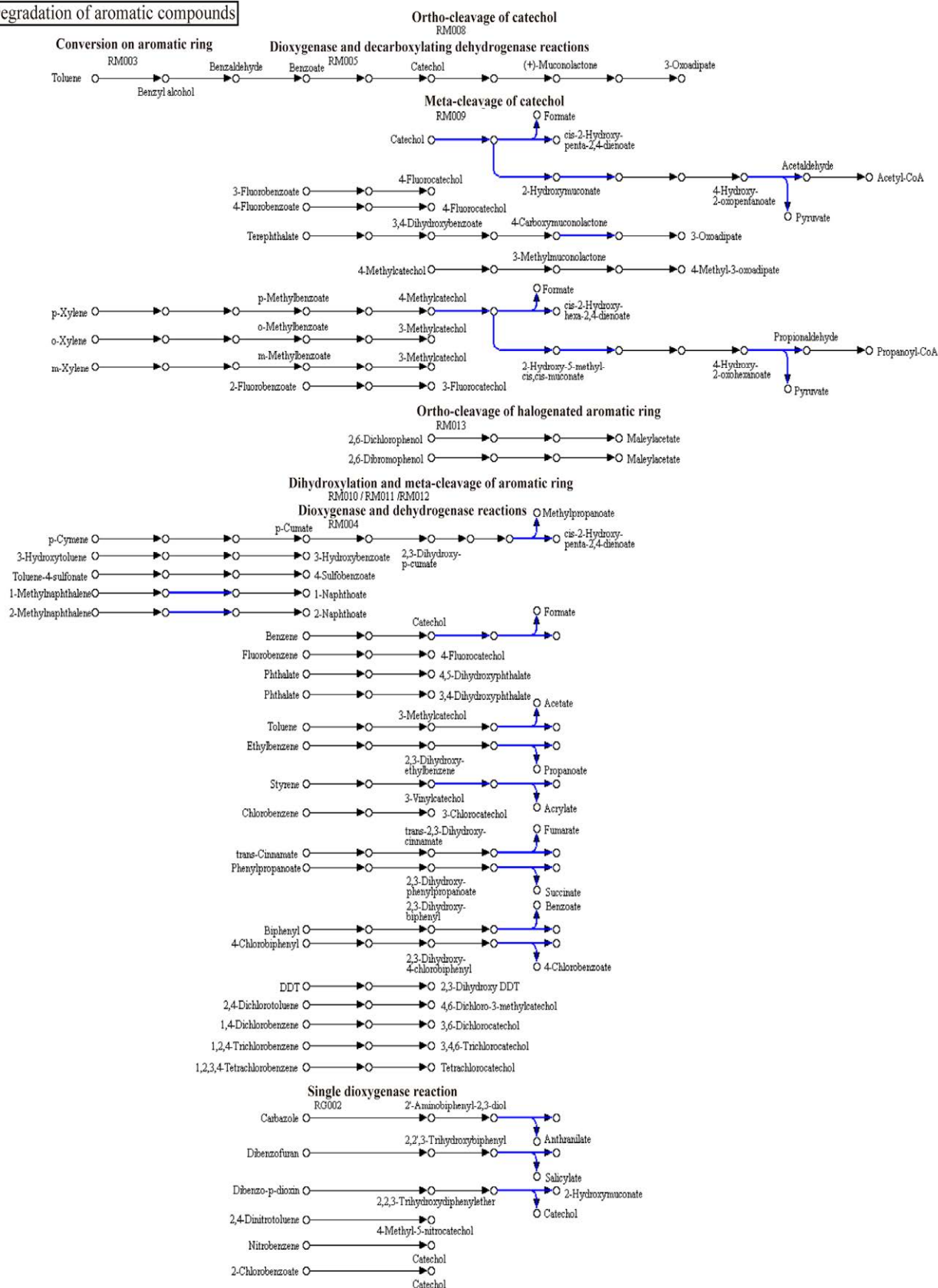
综上, 可推定菌株 M-15 降解棉酚可能经由萘类化合物形成水杨酸, 之后分两条途径代谢。一条是水杨酸生成邻苯二酚, 再经邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化间位开环, 最后通过三羧酸循环彻底降解; 另一条途径为龙胆酸开环途径, 水杨酸在邻苯二酚 2,3-双加氧酶催化下生成龙胆酸, 龙胆酸通过间位开环进一步降解 (图 9)。

2.5 菌株 M-15 降解棉酚可能产生的中间产物分析结果

2.5.1 菌株 M-15 培养液中多环芳烃降解关键中间产物的测定结果

据报道, 棉酚作为联萘类芳香烃, 其降解过程中可能的关键中间代谢产物主要有水杨酸、邻苯二甲酸、原儿茶酸、龙胆酸和邻苯二酚等^[13]。

Degradation of aromatic compounds



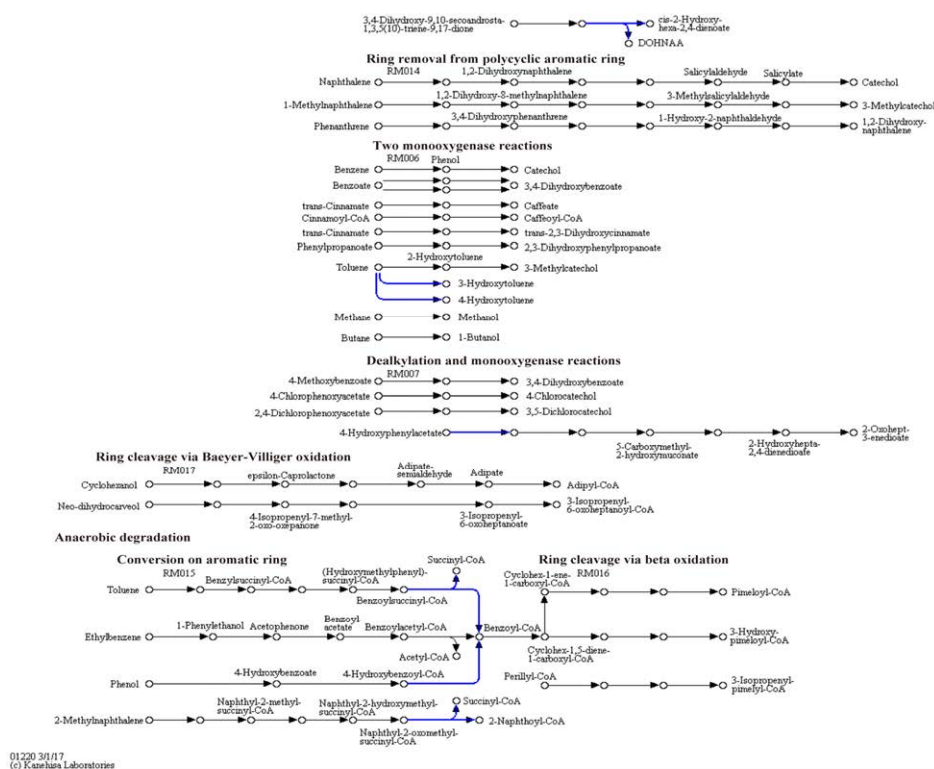


图 8 KEGG 注释到的常规代谢通路的代谢通路图 芳香族化合物的降解途径

Figure 8 Metabolic pathway diagram of conventional metabolic pathways annotated by KEGG. Degradation of aromatic compounds.

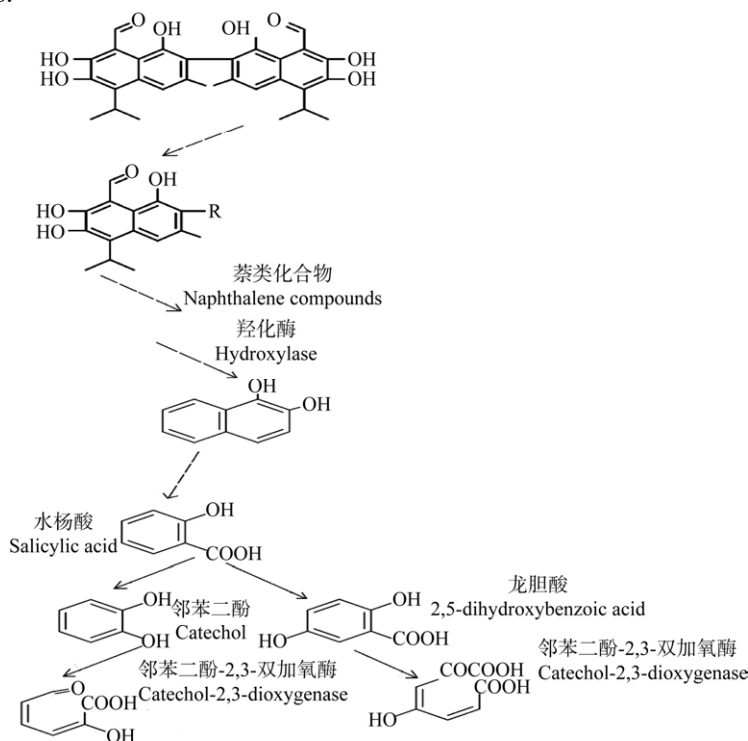


图 9 菌株 M-15 降解棉酚可能的途径

Figure 9 Possible pathways for degradation of gossypol by strain M-15.

将菌株 M-15 接种到以棉酚为唯一碳源的无机盐液体培养基中培养, 每隔 12 h 取样, 检测其中是否存在相应的中间代谢产物(表 5)。

在菌株 M-15 培养液中检测到水杨酸、邻苯二甲酸和龙胆酸等中间代谢产物, 未检测出邻苯二甲酸和原儿茶酸。其中发酵 24 h 就可检测到水杨酸, 发酵 36 h 检测到邻苯二甲酸, 发酵 72 h 检测到龙胆酸, 因此可推断菌株 M-15 降解棉酚可能涉及水杨酸的两条途径代谢, 一条是水杨酸生

成邻苯二甲酸; 另一条途径为水杨酸生成龙胆酸, 随后再一步降解。

2.5.2 菌株 M-15 对多环芳烃降解中间产物的利用能力测定结果

通过观察菌株 M-15 对不同底物的利用能力, 发现菌株 M-15 除可利用棉酚外, 还可利用萘、水杨酸、邻苯二甲酸、原儿茶酸和龙胆酸作为唯一碳源生长, 不能利用联苯和邻苯二甲酸作为唯一碳源生长(表 6)。

表 5 菌株 M-15 培养液中多环芳烃降解中间产物的检测情况

Table 5 Detection of intermediate products of polycyclic aromatic hydrocarbon degradation in strain M-15 culture medium

发酵时间 Fermentation time (h)	邻苯二甲酸 Phthalic acid (mmol/L)	水杨酸 Salicylic acid (mmol/L)	邻苯二甲酸 Catechol (mmol/L)	原儿茶酸 Protocatechuic acid (mmol/L)	龙胆酸 Gentianic acid (mmol/L)
12	—	—	—	—	—
24	—	0.21±0.000 2	—	—	—
36	—	0.83±0.003 5	0.07±0.000 2	—	—
48	—	1.16±0.006 6	0.11±0.003 5	—	—
60	—	0.31±0.000 9	0.37±0.002 6	—	—
72	—	0.17±0.001 1	0.82±0.000 9	—	0.12±0.000 9

—: 未检测到该物质

—: The substance was not detected.

表 6 菌株 M-15 在不同底物培养基中的生长情况

Table 6 The growth of strain M-15 in different substrates

发酵时间 Fermentation time (h)	萘 Naphthalene	联苯 Biphenyl	邻苯二甲酸 Phthalic acid	水杨酸 Salicylic acid	邻苯二甲酸 Catechol	原儿茶酸 Protocatechuic acid	龙胆酸 Gentianic acid
12	—	—	—	—	—	—	—
24	—	—	—	—	—	—	—
36	—	—	—	+	—	+	—
48	+	—	—	+	—	+	—
60	+	—	—	+	+	+	—
72	+	—	—	+	+	+	+

+: 检测到该物质; —: 未检测到该物质

+: The substance was detected; —: The substance was not detected.

3 讨论

微生物发酵法是棉粕脱毒提质最具潜力的方法,高效的发酵菌种是保证微生物发酵法高效应用于棉粕脱毒提质的基础。筛选功能优良的发酵菌种是制备发酵棉粕的关键环节。目前报道的常用棉粕发酵菌种主要有霉菌、酵母菌、乳酸菌和芽孢杆菌。

张莉等^[11]以棉酚为唯一碳源,筛选了一株具有较好降解棉酚能力的乳酸片球菌(*Pediococcus lactis*),对棉粕中棉酚的脱毒率达 40%。吴慧吴等^[14]从藜麦茎叶样品中筛选分离出一株乳酸菌株,游离棉酚脱除率为 62.87%。魏满红^[15]筛选得到具有产蛋白酶活性的热带假丝酵母(*Candida tropicalis*) Y42、Y45,毕赤酵母(*Pichia pastoris*) Y6、Y18,以及酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) Y14、Y34,用于棉粕发酵,使棉粕中多肽含量增长 48.72%–485.89%、游离棉酚含量降低 16.32%–71.00%。王文奇等^[16]利用白地霉(*Geotrichum candidum*)发酵棉粕,游离棉酚脱毒率达 90%以上。贾晓锋^[17]利用假丝酵母及黑曲霉(*Aspergillus niger*)发酵棉粕,降解了大分子蛋白质。罗远琴^[18]采用枯草芽孢杆菌和酿酒酵母对棉粕进行复合发酵,提高了其中的酸溶蛋白含量。孙珊珊等^[19]利用杰丁塞伯林德纳氏酵母(*Cyberlindnera jadinii*)和枯草芽孢杆菌发酵棉粕,游离棉酚降解率达 77.38%。亓秀晔等^[20]利用枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 需氧条件下发酵棉籽粕,酸溶蛋白含量达 26.96%,游离棉酚降解率达 97.81%。

本研究筛选获得一株棉酚降解菌株 M-15,相较于已有报道,菌株 M-15 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),抗逆性强,耐高温高压,用于发酵菌剂的工业生产,具有产量高、耐储存、货架期长等优势。在嫌氧固态发酵条件下,菌株

M-15 对棉粕中游离棉酚降解率可达 96.33%,优于除亓秀晔等^[20]报道的枯草芽孢杆菌 BLCC1-0039 之外的绝大多数菌株,并比报道的需氧发酵更有利于大规模生产。若对本研究筛选的棉酚降解菌株发酵棉粕工艺进行优化,菌株棉酚降解能力有望进一步提高。

探索微生物菌株降解棉酚的机制,不仅可以确定棉粕中棉酚的降解效果,排除棉酚降解途径中毒性代谢产物的潜在危害,保证发酵棉粕的脱毒效果,还可更好地调控棉粕发酵过程,获得脱毒效果好、营养消化利用率高的发酵棉粕,对于发酵棉粕产业的持续发展至关重要。目前关于棉粕中的棉酚降解机制的研究甚少。20 世纪末,山东大学施安辉等^[21]对微生物降解棉酚的研究进行综述,阐述山东大学和中山大学筛选霉菌和酵母菌用于棉酚降解的研究进展,并对微生物降解棉酚的机制进行推测,提出棉酚降解途径可能与萜类物质代谢相联系,但是对上述关于棉酚降解机制的推测并未进行相关的验证研究。近年,周生飞^[22]对一株酵母菌降解棉酚的机制进行初步探索,推测出棉酚被酵母菌降解的两条途径为苯环的开环降解途径及赖氨酸的结合途径,但并未对该酵母菌菌株降解棉酚的功能基因进行探索,该酵母菌菌株发酵棉粕降解棉酚代谢途径和代谢产物也未完全明晰。周媛媛^[23]通过高通量转录组测序对黑曲霉进行分析,推测与棉酚降解直接或间接相关的功能基因。结合基因表达量差异、GO 注释和 KEGG 分析,推测菌株中的棉酚降解基因主要涉及生物合成通路和代谢通路,氧化脂肪族醛和芳香族醛的酶基因可能直接参与棉酚的降解。然而,对于黑曲霉降解棉酚的具体代谢通路和主要代谢产物结构并未加以研究。赵静^[24]采用聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)结合高效液相色谱-串联质谱(LC-MS)对一株土曲霉(*Aspergillus terreus*)菌株发酵棉粕中的蛋白质进

行分离检测,分离出 11 种可能与棉酚降解有关的蛋白,其中,木聚糖酶(xylanase)和 β -1,4-内切-木聚糖酶(endo- β -1,4-xylanase)可能是参与棉酚降解重要的酶,但对于棉酚降解的具体代谢通路未深入探讨。李道捷^[25]利用基因敲除技术发现氧化氢酶基因在红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)降解棉酚的过程中起到重要作用,但并未对具体作用机理加以研究。Zhao 等^[26]培养并分别收集枯草芽孢杆菌菌株的细胞、细胞内容物和上清液,测定其棉酚降解情况,推测枯草芽孢杆菌菌株细胞可能通过吸附、结合和代谢活性发挥棉酚降解作用,但并未进一步探究枯草芽孢杆菌菌株降解棉酚的具体代谢途径。还有报道对漆酶(laccases)及羧酸酯酶(carboxylesterases, CES)降解棉酚的机制进行探索^[27-28]。枯草芽孢杆菌基因组中曾检测出萜降解基因和多环芳烃降解基因等代谢相关基因的存在,但对枯草芽孢杆菌菌株降解棉酚的关键代谢通路及主要代谢产物分析以揭示其降解棉酚机制的相关研究目前为止少见报道。

本研究通过对菌株 M-15 降解棉酚的产物及菌株 M-15 利用多环芳烃降解中间产物能力进行分析,推定菌株 M-15 可将棉酚的联萜结构打断形成萜结构,再继续代谢形成水杨酸,再由水杨酸形成邻苯二酚或龙胆酸,通过邻苯二酚或龙胆酸的间位开环,最终进入三羧酸循环进行代谢,详细代谢途径需进一步探究。

4 结论

本研究筛选得到一株降解棉酚菌株 M-15,固态发酵条件下可将棉粕中的棉酚由 882.07 mg/kg 降至 32.38 mg/kg,降解率达到 96.33%。经鉴定,菌株 M-15 为枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)。该菌株染色体全长为 4 123 640 bp,无质粒。在其发酵棉酚的培养液中检测到水杨酸、邻苯二酚和

龙胆酸等中间代谢产物,初步推定菌株 M-15 降解棉酚途径为先将棉酚分解为萜类化合物,再经水杨酸途径分解形成邻苯二酚或龙胆酸,最终,在邻苯二酚 2,3-双加氧酶的作用下间位开环,进入三羧酸循环分解代谢,为菌株 M-15 应用于棉粕饲料的产业化综合利用奠定了理论基础。

REFERENCES

- [1] ZHANG ZT, YANG DL, LIU L, CHANG ZB, PENG N. Effective gossypol removal from cottonseed meal through optimized solid-state fermentation by *Bacillus coagulans*[J]. Microbial Cell Factories, 2022, 21(1): 252.
- [2] 宣秋希, 乔琳, 侯晓林, 李爱科, 王永伟, 王薇薇, 段涛, 罗鹏. 发酵棉粕的工艺研究及其在动物生产中的应用[J]. 饲料工业, 2021, 42(18): 29-35.
XUAN QX, QIAO L, HOU XL, LI AK, WANG YW, WANG WW, DUAN T, LUO P. Fermentation technology of fermented cottonseed meal and its application in animal production[J]. Feed Industry, 2021, 42(18): 29-35 (in Chinese).
- [3] 刘怡帆, 张传凯, 张立阳, 付彤, 高腾云, 廉红霞. 发酵棉粕的营养特性及其在畜禽生产中的应用[J]. 家畜生态学报, 2022, 43(12): 87-90.
LIU YF, ZHANG CK, ZHANG LY, FU T, GAO TY, LIAN HX. Nutritional properties of fermented cotton meal and its application in livestock and poultry production[J]. Journal of Domestic Animal Ecology, 2022, 43(12): 87-90 (in Chinese).
- [4] 周金影. 不同菌种发酵棉籽粕的效果评价[D]. 延吉: 延边大学硕士学位论文, 2021.
ZHO JY. Evaluation of the effect of different strains on fermented cottonseed meal[D]. Yanji: Master's Thesis of Yanbian University, 2021 (in Chinese).
- [5] LI J, GAO TG, HAO ZM, GUO XJ, ZHU BC. Anaerobic solid-state fermentation with *Bacillus subtilis* for digesting free gossypol and improving nutritional quality in cottonseed meal[J]. Frontiers in Nutrition, 2022, 9: 1017637.
- [6] 宣秋希, 乔琳, 侯晓林, 李爱科, 王永伟, 王薇薇, 刘宽博, 段涛. 固态生料发酵棉籽粕菌种筛选及发酵工艺的研究[J]. 动物营养学报, 2022, 34(5): 3376-3391.
XUAN QX, QIAO L, HOU XL, LI AK, WANG YW, WANG WW, LIU KB, DUAN T. Research on the screening and fermentation process of cottonseed meal fermented from solid raw meal[J]. Chinese Journal of

- Animal Nutrition, 2022, 34(5): 3376-3391 (in Chinese).
- [7] 罗远琴, 胡倩, 芦岩, 张凡凡, 马贵军, 刘建成, 张文举. 枯草芽孢杆菌、酿酒酵母及其复合菌发酵棉粕营养成分变化的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2020, 47(2): 452-459.
- LOU YQ, HU Q, LU Y, ZHANG FF, MA JG, LIU JC, ZHANG WJ. Studies on nutrient composition of cotton meal fermented by *Bacillus subtilis*-1, *Saccharomyces cerevisiae* and their compound bacteria[J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2020, 47(2): 452-459 (in Chinese).
- [8] 陈佳瑞, 孔薪茹, 高同国, 李佳. 高效棉酚降解枯草芽孢杆菌 M-4 菌株的常压室温等离子体诱变及发酵工艺优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2212-2220.
- CHEN JR, KONG XR, GAO TG, LI J. Mutagenesis of *Bacillus subtilis* M-4 strain with high gossypol degradation by atmospheric and room temperature plasma and optimization of fermentation process[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2212-2220 (in Chinese).
- [9] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 饲料中游离棉酚的测定方法: GB/T 13086—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020.
- State Administration for Market Regulation, Standardization Administration of the People's Republic of China. Method for determination of free gossypol in feeds: GB/T 13086—2020[S]. Beijing: Standards Press of China, 2020 (in Chinese).
- [10] 刘军, 江宇琪, 刘康, 代航培, 黄翠欣, 王风青, 李丽, 李仲玄, 陈鲜鑫, 陈玲. 贝莱斯芽孢杆菌产抑菌物质培养基发酵优化[J]. 现代食品科技, 2024, 1(12): 1673-9078.
- LIU J, JIANG YQ, LIU K, DAI HP, HUANG CX, WANG FQ, LI L, LI ZX, CHEN XX, CHEN L. Optimization of *Bacillus velezensis* production antibacterial substance medium fermentation[J]. Modern Food Science and Technology, 2024, 1(12): 1673-9078 (in Chinese).
- [11] 张莉, 杨晓龙, 王海亮, 南珊珊, 马雪儿, 聂存喜, 张文举, 陈程. 一株棉酚降解菌株的筛选鉴定及对棉粕的脱毒效果[J]. 新疆农业科学, 2022, 59(12): 3057-3065.
- ZHANG L, YANG XL, WANG HL, NANG SS, MA XR, NIE CX, ZHANG WJ, CHEN C. Screening and identification of a gossypol degrading strain and its detoxification effect on cottonseed meal[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2022, 59(12): 3057-3065 (in Chinese).
- [12] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- DONG XZ, CAI MY. Manual for the Identification of Common Bacterial Systems[M]. Beijing: Science Press, 2001 (in Chinese).
- [13] 刘小娜, 李彪, 唐晨, 吴夏芈, 周俊, 贾红华, 雍晓雨. 蔡的微生物降解研究进展[J]. 生物加工过程, 2019, 17(6): 581-589.
- LIU XN, LI B, TANG C, WU XY, ZHOU J, JIA HH, YONG XY. Research progresses in microbial degradation of naphthalene[J]. Chinese Journal of Bioprocess Engineering, 2019, 17(6): 581-589.
- [14] 吴慧昊, 舒文秀, 刘梓琦, 李姿茹, 徐红伟, 周瑞, 臧荣鑫. 脱除游离棉酚乳酸菌的分离鉴定及益生性能研究[J]. 微生物学杂志, 2022, 42(3): 36-43.
- WU HH, SHU WX, LIU ZQ, LI ZR, XU HW, ZHO R, ZANG RX. Isolation, identification and probiotic performance of lactobacillus capable of gossypol removal[J]. Journal of Microbiology, 2022, 42(3): 36-43 (in Chinese).
- [15] 魏满红. 高产蛋白酶酵母菌的筛选鉴定及其发酵豆粕和棉粕效果的研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2021.
- WEI MH. Screening and identification of high yield protease yeast and study on its fermentation effect of soybean meal and cottons[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2021 (in Chinese).
- [16] 王文奇, 侯广田, 刘艳丰, 王世昌. 棉籽粕固体发酵脱毒工艺参数的优化研究[J]. 新疆农业科学, 2014, 51(1): 103-109.
- WANG WQ, HO GT, LIU YF, WANG SC. Optimization of the process parameters for detoxification of gossypol in fermentation of cottonseed meal[J]. Xinjiang Agricultural Sciences, 2014, 51(1): 103-109 (in Chinese).
- [17] 贾晓锋. 固态发酵对棉籽粕棉酚脱毒及蛋白质降解的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文, 2008.
- JIA XF. Effect of solid state fermentation on detoxification and protein degradation of gossypol from cottonseed meal[D]. Yangling: Master's Thesis of Northwest A&F University, 2008 (in Chinese).
- [18] 罗远琴. 富含棉籽肽的发酵棉粕对肉仔鸡生长性能、免疫功能及蛋白代谢影响的研究[D]. 石河子: 石河子大学硕士学位论文, 2020.
- LOU YQ. Effects of fermented cotton meal rich in cottonseed peptide on growth performance, immune function and protein metabolism of broilers[D]. Shihezi: Master's Thesis of Shihezi University, 2020 (in Chinese).

- [19] 孙珊珊, 杨霞, 陈倪慧, 雷西汀, 叶金云, 付石军, 沈志强. 混菌固态发酵复合植物蛋白源工艺优化[J]. 中国粮油学报, 2023, 38(10): 153-161.
SUN SS, YANG X, CHEN NH, LEI XT, YE JY, FU SJ, SHEN ZQ. Optimization of complex plant protein source for solid-state fermentation with mixed bacteria[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association, 2023, 38(10): 153-161 (in Chinese).
- [20] 亓秀晔, 谢全喜, 于佳民, 赵倩, 张志焱, 徐海燕. 高效降解游离棉酚菌株的鉴定、安全性评价及发酵工艺研究[J]. 现代食品科技, 2018, 34(5): 158-166.
QI XY, XIE QX, YU JM, ZHAO Q, ZHANG ZY, XU HY. Identification, safety evaluation and fermentation technology of high efficient free gossypol-degrading strains[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(5): 158-166 (in Chinese).
- [21] 施安辉, 甄明海. 微生物降解棉酚机理的探讨[J]. 山东食品发酵, 1995(3): 29-33.
SHI AH, ZHEN MH. Discussion on the mechanism of microbial degradation of gossypol[J]. Shandong Food Ferment, 1995(3): 29-33 (in Chinese).
- [22] 周生飞. 高效降解棉酚菌种筛选-降解机理及固体发酵工艺研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学博士学位论文, 2011.
ZHO SF. Screening of gossypol-degrading strain, mechanism of gossypol degradation and its application in fermentation of cottonseed meal[D]. Lanzhou: Doctoral Dissertation of Gansu Agricultural University, 2011 (in Chinese).
- [23] 周媛媛. 高效棉酚降解菌的筛选及黑曲霉 AN-1 高通量转录组测序分析[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2016.
ZHO YY. Screening of high-efficiency gossypol-degrading bacteria and high-throughput transcriptome sequencing analysis of *Aspergillus niger* AN-1[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [24] 赵静. 高效降解棉酚菌株的分离、鉴定及其降解机理的研究[D]. 新乡: 河南师范大学硕士学位论文, 2017.
ZHAO J. Isolation and identification of efficiently degrading gossypol strains and their degradation mechanism[D]. Xinxiang: Master's Thesis of Henan Normal University, 2017 (in Chinese).
- [25] 李道捷. 棉酚降解菌的选育及过氧化氢酶基因敲除对其降解棉酚的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学硕士学位论文, 2021.
LI DJ. Breeding of gossypol-degrading bacteria and effects of catalase gene knockout on gossypol-degrading bacteria[D]. Hefei: Master's Thesis of Anhui Agricultural University, 2016 (in Chinese).
- [26] ZHAO JY, MEI JJ, QIN F, WEI T. Mechanism of solid state fermentation in reducing free gossypol in cottonseed meal and the effects on the growth of broiler chickens[J]. Agricultural Science & Technology, 2022, 23(1): 17-23.
- [27] ZHANG L, YANG XL, HUANG RZ, NIE CX, NIU JL, CHENG C, ZHANG WJ. Biodegradation of free gossypol by *Helicoverpa armigera* carboxylesterase expressed in *pichia pastoris*[J]. Toxins, 2022, 14(12): 14120816.
- [28] WANG L, CHEN M, LUO XC, FAN YA, ZHENG Z, HE ZQ, YIN RC, MENG T, XU SY, PAN Y, SU JH, DU JF, ZHANG L, TIAN XH, TIAN YP, CHEN DD, GE HH, ZHANG NN, LI P. Intramolecular annulation of gossypol by laccase to produce safe cottonseed protein[J]. Frontiers in Chemistry, 2020, 8: 58317