

## 可利用纤维素产油脂的意杨内生真菌 的筛选与发酵条件研究



JIANG Bao-juan

姜宝娟, 戴传超\*, 陶杰, 陈晓丽

(南京师范大学生命科学学院; 江苏省生物多样性与生物技术重点实验室, 江苏 南京 210046)

**摘 要:** 从意大利白杨韧皮部中筛选得到一株能够利用纤维素并高产油脂的内生真菌, 初步鉴定为茎点霉属。利用意杨树叶粉碎物作为唯一碳源进行液体发酵, 该菌株在培养至第 8 天时, 油脂产量和滤纸酶活力达到最高, 分别为 0.78 g/L、5.67 mg/(L·min) (以葡萄糖计)。通过单因子分析及正交优化试验, 得到发酵条件最佳组合为: 玉米秆 50 g/L, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3 g/L, 温度 25 °C, 摇床转速 150 r/min, 此时真菌油脂产量达到 1.12 g/L。分析菌体发酵获得的油脂成分, 主要为软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸, 可以作为生物柴油的原料。

**关键词:** 意大利白杨; 内生真菌; 纤维素; 茎点霉属; 生物柴油

中图分类号: TQ351.0

文献标识码: A

文章编号: 0253-2417(2009)04-0027-06

## Studies on Screening of Microbial Lipid-producing Endophytic Fungi Capable of Using Cellulose from *Populus euramevicana* and Its Fermentation Conditions

JIANG Bao-juan, DAI Chuan-chao, TAO Jie, CHEN Xiao-li

(Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology; College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

**Abstract:** An endophytic fungus was screened from the phloem of *Populus euramevicana*, which can utilize cellulose to produce lipid. It was identified as *Phoma* sp. Using smashed leaves of *P. euramevicana* as the sole carbon source, the rules of the fungus to produce microbial oil in deep-liquid fermentation was studied. On the 8th day, the highest lipid content and filter-paper activity were 0.78 g/L and 5.67 mg/(L·min) (using glucose as substrate) respectively. Various factors were investigated and orthogonal test was used to study their effects on lipid production. The results showed that the optimum condition for producing microbial oil included: corn stalks 50 g/L, NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3 g/L, 25 °C, 150 r/min. Lipid productivity thus reached 1.12 g/L. The oils produced under this condition were studied by GC, the main components were palmitic acid, stearic acid, oleic acid and linoleic acid, which could be used as raw materials of biodiesel.

**Key words:** *Populus euramevicana*; endophytic fungi; cellulose; *Phoma* sp.; biodiesel

生物柴油作为典型的“绿色能源”是优质的石化柴油替代品, 一直以来由于成本较高得不到广泛推广, 生物柴油常用的原料有植物油、动物油和废弃油脂等, 占生物柴油成品成本的 70%~85%<sup>[1]</sup>, 因此寻找新的廉价原料迫在眉睫。本课题组尝试利用微生物发酵廉价碳源来积累油脂, 进一步利用微生物油脂转化为生物柴油。前面的研究中筛选得到一株能够利用木糖积累油脂的胶黏红酵母 (*Rhodotorula glutinis*), 利用意大利白杨树树叶水解糖时, 得到最高油脂产量为 6.18 g/L<sup>[2]</sup>, 但该酵母不分泌降解秸秆相关的水解酶类 (如纤维素酶等), 因而不能直接利用秸秆粉碎物, 而酸解并脱毒处理秸秆增加生产成本。植物内生菌是寄生在健康植物茎干或叶片及根部, 完成其全部或部分生活周期, 但不形成明显侵染的一

收稿日期: 2008-06-18

基金项目: 江苏省高技术项目 (BG2005326)

作者简介: 姜宝娟 (1983-), 女, 江苏扬州人, 硕士, 主要从事生物柴油研究工作

\* 通讯作者: 戴传超, 教授, 硕士生导师, 研究领域: 从事微生物资源与生态研究; E-mail: daichuanhao@njnu.edu.cn.

类真菌<sup>[3]</sup>。内生真菌在植物中定殖的过程本身就是水解木质纤维素的过程<sup>[4-5]</sup>。另一方面长期的共生关系,内生真菌可能具有耐受植物降解过程中产生的有毒物质的能力,基于此,作者尝试从意大利白杨中筛选可以利用纤维素并积累油脂的内生真菌,并从中筛选出高产油脂的菌株,利用该菌株适应植物体内环境的优势,直接利用秸秆作为唯一碳源积累油脂。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

植物样品:意大利白杨(*Populus euramevicana*)样品采自南京市郊。内生真菌的分离参见文献[6~7]。培养基:1)马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)液体及固体培养基<sup>[8]</sup>;2)产脂培养基:PDA液体培养基+30 g葡萄糖;3)羧甲基纤维素钠(CMC-Na)液体及固体培养基:CMC-Na 10 g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  4 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2 g, 蛋白胨 1 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值自然。121 °C 湿热灭菌 20 min。固体培养基加 20.0 g 琼脂;4)发酵种子液:查氏培养基<sup>[9]</sup>略作修改,  $\text{NaNO}_3$  3 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{KCl}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4$  0.01 g, 蔗糖 15 g, CMC-Na 5 g, 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 6.0。121 °C 湿热灭菌 20 min;5)发酵液: $\text{NaNO}_3$  3 g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g,  $\text{KCl}$  0.5 g,  $\text{FeSO}_4$  0.01 g, 各种秸秆粉碎物 50 g 过筛(筛孔尺寸 0.25 mm), 蒸馏水 1 000 mL, pH 值 6.0。121 °C 湿热灭菌 20 min;6)碳源实验培养基(g/L):不添加碳源的查氏培养基, 待测碳源 50 g;7)氮源实验培养基(g/L):不添加碳源、氮源的查氏培养基, 优化碳源 50 g, 待测氮源 3 g。

### 1.2 培养及分析方法

**1.2.1 降解纤维素菌株的初步筛选** 将分离得到的内生真菌用点植法接种到羧甲基纤维素(CMC)平板上,观察各菌在平板上的生长情况,测量菌落直径。

**1.2.2 产油脂菌株的初步筛选** 苏丹黑染液配制参见文献[10]。真菌油脂含量的初步检测<sup>[11]</sup>:取摇瓶培养的菌丝少许,置 10 mL 的小烧杯中,吸干液体培养基,加入苏丹黑染液 1~2 mL 于室温染色 5 min,取出菌丝于水中洗涤 5 min,挑取菌丝制作临时装片,镜检观察菌丝内油脂小滴的数量、大小、着色深浅情况。

**1.2.3 油脂含量测定** 将分离纯化获得的菌种转移至新斜面上,28 °C 培养 5 d,倒入无菌水,用接种铲刮取菌丝,转移至含 50 mL 产脂液体培养基的 250 mL 三角瓶中,28 °C、150 r/min 摇瓶培养 10 d。纱布过滤收集菌体,用蒸馏水充分洗涤,60 °C 烘干,称质量。索氏抽提法测定油脂含量<sup>[12]</sup>。抽提前后烘干滤纸包质量的差值即为粗脂肪质量。油脂质量与干菌体的质量之比即为油脂含量。

#### 1.2.4 YY11 菌种的分类鉴定

**1.2.4.1 YY11 菌株的形态特征观察** 参照《真菌鉴定手册》方法<sup>[13]</sup>。

**1.2.4.2 分子鉴定** 采用 CTAB 法<sup>[14]</sup>提取基因组 DNA,真菌 ITS(包括 ITS1, 5.8SrDNA, ITS2)序列用通用引物 ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')和 ITS5(5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')扩增,引物由上海生物工程有限公司合成。

反应体系:10 × PCR buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 1 μL, ITS4, ITS5 各 4 μL, 25 mmol/L  $\text{MgCl}_2$  4 μL, DNA 模板 5 μL, Taq 聚合酶 0.5 μL, 加双蒸水至 50 μL。

PCR 扩增条件:94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 1 min, 61 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min。测序工作由上海生物工程有限公司完成。

将测序获得的 ITS 序列通过与 GenBank 中核酸数据库序列进行 Blast 分析,利用 Clustal x 软件包构建系统发育树,进行亲缘关系和系统发育分析。

**1.2.5 YY11 发酵培养及分析方法** 斜面菌种在 PDA 培养基上 28 °C 培养 5 d,倒入无菌水,用接种铲刮取菌丝转移接入种子液,150 r/min、28 °C 培养 24 h 后,按 10% 的接种量将种子液转接至发酵液,相同条件下培养 8 d。跟踪实验培养 16 d,每隔 2 d 取样。样品 4 °C, 8 000 r/min 离心 10 min,上清液用于 pH 值、残糖、滤纸酶活力测定,菌体与秸秆混合物蒸馏水洗涤 3 次,60 °C 烘干后充分研磨,用索氏抽提法测定菌体发酵秸秆积累的油脂含量(未经发酵的秸秆的抽提结果作为空白对照),利用核酸的提取测

定法测定干物质中菌体生物量,利用气相色谱法测定菌体中的油脂组分:1)发酵液中残糖的测定参照文献[15];2)滤纸酶活力测定参照文献[16];3)菌体生物量测定参照文献[17];4)油脂组分测定参照文献[18]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 内生真菌在 CMC 平板上的生长情况

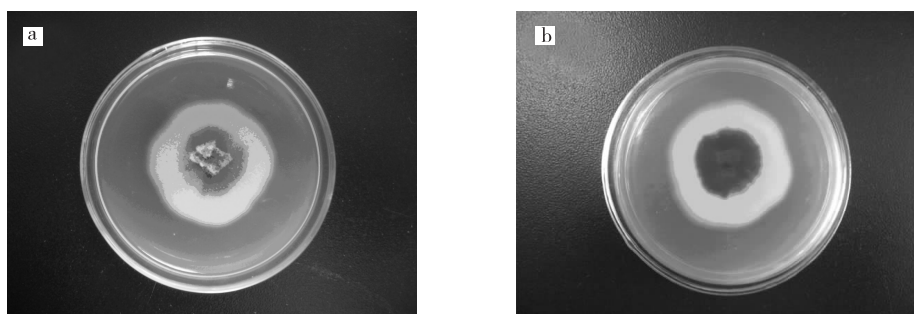
从意杨韧皮部共分离得到内生真菌 39 株,在以 CMC-Na 为唯一碳源的培养基上,39 株内生真菌都能生长,培养 3 d 后测量菌落直径约为 1.2~7 cm 之间,培养 6 d 后菌落直径最小的约为 2.8 cm,生长最快的已长满半径 4.5 cm 的平皿。说明这些内生真菌都具有利用纤维素的能力。通过肉眼观察,大部分菌落菌丝生长较为稀疏,菌落较薄。

### 2.2 产油脂菌株的初步筛选以及部分菌株的油脂含量测定

39 株内生真菌经过 PDA 液体摇瓶 150 r/min、28 ℃ 培养 7 d 后,通过苏丹黑染色对菌株积累油脂的情况进行了初步筛选,发现在其中 16 株内生真菌内明显观察到了油脂小滴的存在。将这 16 株内生真菌接种到 CMC 液体培养基中,相同条件下培养 10 d,挑取菌丝用同样的方法染色后观察,其中 6 株可以观察到有油脂小滴的存在。利用产脂培养基相同条件下摇瓶培养 10 d,收集菌丝,索氏抽提测定油脂含量,结果在 9.73%~22.67% 之间。在测定的 6 株菌中,YY11 含油脂最高达到 22.67%,所以选择 YY11 进行后续实验。

### 2.3 YY11 菌种的分类鉴定

根据形态观察,YY11 在 PDA 平板上菌落呈圆形,菌丝每天约伸长 0.4 cm,初生菌丝为乳白色,后为灰绿色,菌落背面为黑色,边缘未老熟菌丝呈乳白色(见图 1)。显微观察,菌丝无色,老熟后浅褐色,有隔,有明显分支。分生孢子器为球形、扁球形,深褐色,壁厚,未观察到明显孔口。分生孢子单孢,圆形、椭圆形,浅褐色(见图 2)。



a. 正面 obverse side; b. 反面 reverse side

图 1 PDA 培养基上菌落的生长状态

Fig. 1 Colony of YY11 on the PDA substrate

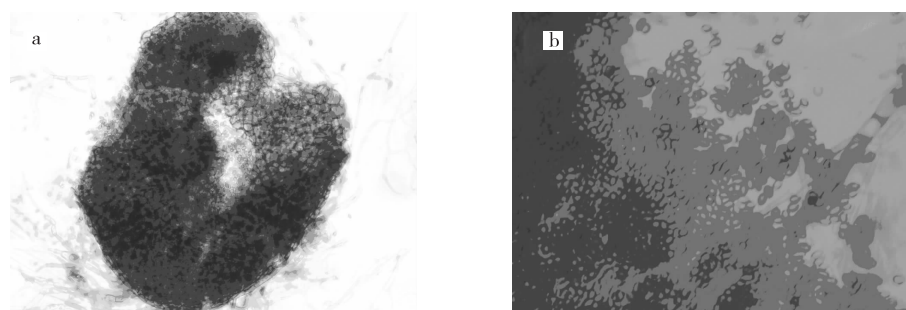


图 2 分生孢子器(a)及分生孢子(b)

Fig. 2 Pycnidia (a) and conidia (b) of YY11 cultured on PDA agar plate

通过分子生物学方法,PCR 产物纯化后,得到的 ITS 序列为 575 bp,将结果在 NCBI 网站上进行比对,与茎点霉属(*Phoma* sp.) 同源性达到 99%,通过构建的系统发育树分析(见图 3),将该菌初步鉴定为半知菌腔孢纲,球壳孢目,球壳孢科,茎点霉属。

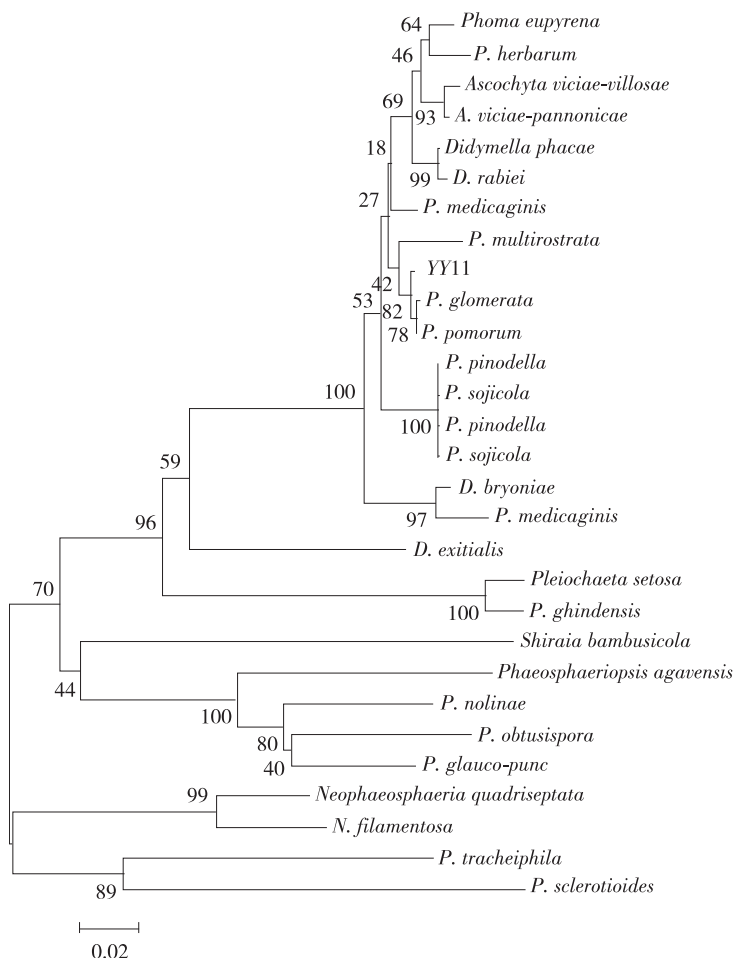


图 3 基于 ITS 序列的系统发生树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on ITS sequence of YY11

#### 2.4 YY11 以意杨树叶粉碎物为唯一碳源的生长曲线

利用粉碎后的意杨树叶作为唯一碳源液体发酵 YY11,油脂产量、滤纸酶活力变化等见图 4。菌体生物量在第 4 天达到峰值,其后明显下降,到第 16 天,用该法已检测不出明显的生物量;还原糖前两天下降明显,后 14 天趋于稳定;pH 值在培养前 4 天上升明显,后 12 天维持在 9.0 左右;油脂产量和滤纸酶活力变化基本呈同步化趋势,在第 8 天达到峰值,分别为 0.78 g/L、5.67 mg/(L·min)(以葡萄糖计)。因此确定 8 天为最佳收获时间。

从图中可以看出,滤纸酶活力与油脂积累有同步化趋势,而菌体生物量则与油脂的积累呈不完全同步;开始因为培养基中有葡萄糖存在,滤纸酶活力受到抑制,随着培养时间的延长以及秸秆的诱导作用,酶活力逐步

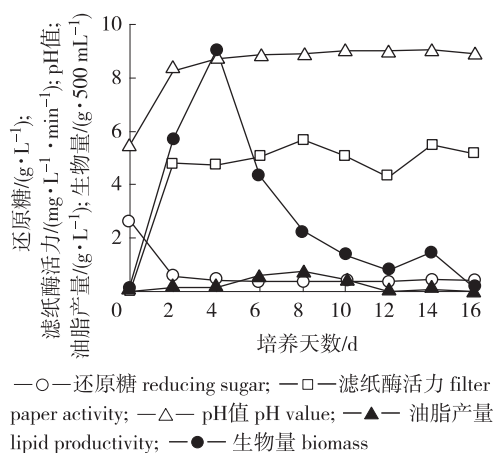


图 4 YY11 发酵意杨树叶粉碎物生长曲线

Fig. 4 Growth curves of YY11 fermented on smashed leaves of *P. euramericana*

增大,滤纸酶活力在第8天达到高峰后,在第14天出现第2个高峰,可能是因为被菌体束缚在表面和菌体内部的酶因为培养时间的延长,菌体发生自溶而得到了释放;培养基中的还原糖在前两天得到了较大消耗,后14天趋于稳定,由菌体产生的纤维素酶水解部分秸秆得到的还原糖,一经释放便被菌体利用,所以维持了培养基中较为平稳的还原糖质量浓度。

## 2.5 单因子及正交试验

选择碳源、氮源及碳源浓度3个单因子进行试验(数据未给出)。选择6种不同的秸秆粉碎物为不同的碳源,其中以意杨树叶粉碎物为唯一碳源时,油脂产量最高,玉米秆次之,玉米芯、花生壳、水稻秆、麦秆的油脂产量相差不大。说明YY11利用纤维素产油的特性可以在其它农林废弃物中推广应用。

以意杨树叶粉碎物为碳源,比较了6种不同的氮源对YY11积累油脂的影响。结果表明,酵母膏与意杨组合最有利于微生物油脂的积累,NaNO<sub>3</sub>、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>次之,且相差不大,蛋白胨、尿素、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>则对YY11积累油脂不利。

以意杨树叶粉碎物为碳源,酵母膏为氮源,设置6种不同的碳源质量浓度(g/L):95、80、65、50、35和20。结果表明碳源质量浓度为50 g/L时得到最大的油脂产量1.06 g/L,说明碳源浓度过高或过低均不利于微生物油脂的积累。

选取碳源、氮源、温度及转速4种因素进行正交试验,结果见表1。经极差分析可见,4种因素对油脂产量的影响次序为C>A>D>B,说明在本试验范围内,温度对发酵水平影响最大,而氮源种类影响最小。正交分析得到的最佳水平组合为A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>,但这组合不在9次试验内,表现最佳组合为A<sub>3</sub>B<sub>3</sub>C<sub>2</sub>D<sub>1</sub>,因此按照正交分析最佳组合,验证正交试验结果,在此条件下,测定得到油脂产量为1.12 g/L。综合单因素和正交试验结果可见,最佳产油条件为:玉米秆50 g/L、NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> 3 g/L、温度25℃、摇床转速150 r/min。

表1 培养基碳源、氮源、温度和转速正交试验结果

Table 1 Results of orthogonal experiment of different levels of reaction conditions

序号 No.	A 碳源 carbon sources	B 氮源 nitrogen source	C 温度/℃ temperature	D 转速/(r·min <sup>-1</sup> ) rotation speed	油脂产量/(g·L <sup>-1</sup> ) lipid productivity
1	意杨树叶 poplarleave	NaNO <sub>3</sub>	20	120	0.710
2	意杨树叶 poplarleave	酵母膏 yeast extract	25	150	1.060
3	意杨树叶 poplarleave	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	30	180	0.365
4	玉米芯 corncob	NaNO <sub>3</sub>	25	180	0.414
5	玉米芯 corncob	酵母膏 yeast extract	30	120	0.122
6	玉米芯 corncob	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	20	150	0.543
7	玉米秆 cornstalk	NaNO <sub>3</sub>	30	150	0.530
8	玉米秆 cornstalk	酵母膏 yeast extract	20	180	0.759
9	玉米秆 cornstalk	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	25	120	1.090
<i>k</i> <sub>1</sub>	0.712	0.551	0.671	0.641	
<i>k</i> <sub>2</sub>	0.360	0.647	0.855	0.711	
<i>k</i> <sub>3</sub>	0.793	0.666	0.339	0.513	
<i>R</i>	0.433	0.115	0.516	0.198	

## 2.6 YY11 发酵玉米秆油脂组分分析

利用气相色谱法分析YY11发酵玉米秆得到的油脂成分,对照标准品保留时间进行脂肪酸定性,结果见表2,所获得的脂肪酸主要为软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸等,与一般植物油的组成相近,因此可以用来代替植物油成为生物柴油的油源。

## 3 结论

3.1 从意杨韧皮部筛选得到的39株内生真菌都具有利用纤维素的能力,利用产脂培养基对其中6株

表2 YY11 发酵玉米秆油脂组分 GC 分析

Table 2 GC analysis of oils produced by YY11 fermented on smashed corn stalks

脂肪酸组成 fatty acid compositions	物质的量分数/% molar ratio
软脂酸 palmitic acid(C16:0)	16.27
硬脂酸 stearic acid (C18:0)	3.62
油酸 oleic acid (C18:1)	18.11
亚油酸 linoleic acid (C18:2)	55.02
其他(others)	6.98

摇瓶培养,油脂含量在 9.73%~22.67% 之间。其中油脂含量最高的菌株 YY11 通过形态和分子生物学的分析,初步鉴定为半知菌腔孢纲,球壳孢目,球壳孢科,茎点霉属(*Phoma* sp.)。

**3.2** 通过单因子分析及正交优化试验,YY11 利用秸秆产微生物油脂的最佳培养基为:玉米秆 50 g/L,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  3 g/L,温度 25 °C,摇床转速 150 r/min,在此条件下油脂产量达到 1.12 g/L。利用气相色谱分析所获得的油脂组分,主要为软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸等,与一般植物油的组成相近,因此可以用来代替植物油成为生物柴油的油源。

#### 参考文献:

- [1] 墨玉欣,刘宏娟,张建安,等.微生物发酵制备油脂的研究[J].可再生能源,2006(6):24-32.
- [2] DAI Chuan-chao,TAO Jie,XIE Feng, et al. Biodiesel generation from oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with xylose assimilating capacity [J]. African Journal of Biotechnology,2007,6(18):2130-2134.
- [3] CARROLL G. Fungal endophytes in stems and leaves: From latent pathogen to mutualistic symbiont[J]. Ecology,1988,69:2-9.
- [4] TAN R X,ZOU W X. Endophytes:A rich source of functional metabolites[J]. Nat Prod Rep,2001,18:448-459.
- [5] OSONO T. Role of phyllosphere fungi of forest trees in the development of decomposer fungal communities and decomposition processes of leaf litter[J]. Can J Microbiol,2006,52:701-716.
- [6] 彭小伟,杨丽源,陈有为,等.黄花夹竹桃内生真菌抗病原细菌的初步研究[J].菌物研究,2003,1(1):33-36.
- [7] 袁秀英,白红霞,白玉明,等.杨树内生真菌的分离和拮抗生防菌的筛选[J].林业科学研究,2006,19(6):713-717.
- [8] 范秀容,李广武,沈萍.马铃薯葡萄糖琼脂培养基[M]//微生物学实验.北京:高等教育出版社,1980:262.
- [9] 沈萍,范秀容,李广武.微生物学实验[M].3版.北京:高等教育出版社,1999:1-234.
- [10] 周德庆.微生物学实验手册[M].上海:科学技术出版社,1983:32-34.
- [11] 刘吉华,袁生,戴传超.一种新的丝状真菌油脂含量快速鉴定方法[J].生物技术,1998,8(1):43-44.
- [12] 大连轻工业学院,华南理工大学,郑州轻工业学院,等.食品分析[M].北京:中国轻工业出版社,1994:139-141.
- [13] 魏景超.真菌鉴定手册[M].上海:科学技术出版社,1979:489-496.
- [14] 张晓晖,郭春华,江晓霞,等.康氏木霉基因组 DNA 提取方法的比较研究[J].生物技术通报,2007,5:128-130.
- [15] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].2版.北京:高等教育出版社,1997:1-3.
- [16] 伍红,陆兆新,吕玫,等.黑曲霉 AF-98 固体发酵产纤维素酶的产酶条件研究[J].菌物学报,2006,25(3):475-480.
- [17] LIU Gang,XU Zhi-nan,CEN Pei-lin. A morphologically structured model for mycelial growth and secondary metabolite formation[J]. Chinese J of Chem Eng,2000,8(1):46-51.
- [18] 戴传超,袁生,刘吉华,等.真菌菌丝脂肪酸的气相色谱检测[J].生物技术,1999,9(2):21-25.