

张玲秀,田 婷,许 菁,等. 1 株产纤维素酶丝状真菌产油工艺的优化[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):316-318.

# 1 株产纤维素酶丝状真菌产油工艺的优化

张玲秀,田 婷,许 菁,张 薇

(忻州师范学院,山西忻州 034000)

**摘要:**以 1 株峡串脉孢霉为材料,利用玉米秸秆纤维素为主要碳源,以产油率为指标,通过单因素及正交试验方法优化产油发酵工艺,发现最优产脂发酵工艺为:碳源为 2% 纤维素 + 2% 葡萄糖,氮源为硝酸铵,温度为 28 ℃,培养时间为 5 d,初始 pH 值为 4,C/N 比为 8 : 1。氮源选择具有统计学上的显著性,所做交互作用不明显。

**关键词:**丝状真菌;产油工艺;正交试验;纤维素酶;峡串脉孢霉

**中图分类号:** Q939.9 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0316-02

纤维素类物质是地球上分布最广、含量最丰富的碳源物质,是自然界中数量最大的可再生资源,纤维素的转化利用对于解决目前世界能源危机、粮食短缺、环境污染等问题,具有重要的意义。通过菌种选育和发酵工艺等基础研究,分离和筛选出针对不同行业的高效纤维素分解菌群,有望解决纤维素酶产量和活性都不高、成本偏高的问题<sup>[1]</sup>。最近,石油价格波动和国家能源安全的需求,促使全球发展可持续生物工艺替代传统的石油加工,通过微生物代谢,生产下一代生物燃料,包括游离脂肪酸、长链脂肪醇和酯类、长链烯烃等。工程菌株可利用糖类来生产生物燃料,通过传统的工艺优化进一步提高产量<sup>[2]</sup>。试验所使用的丝状真菌,不仅可高产纤维素酶(45.32 U),而且菌体可积累 14.24% 的油脂,具有一定的应用价值和进一步研究的必要性<sup>[3]</sup>。本试验对该真菌产纤维素酶和胞内产油脂的工艺进行优化,旨在筛选高效降解纤维素和产油脂菌株的基础上,建立一种利用农业秸秆生产微生物油脂的工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

**1.1.1 试验菌株** 所用菌株为忻州师范学院筛选获得的 1 株峡串脉孢霉(*Paepalopsis Kühn*),该菌株的纤维素酶活和滤纸酶活均高于里氏木霉(*Trichoderma reesei*)<sup>[3]</sup>。

**1.1.2 培养基** 产脂发酵培养基:玉米秸秆纤维素(CMC)2%,酵母膏0.3%,柠檬酸三钠0.1%,硝酸钠0.3%,K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>0.1%,KCl0.05%,FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O0.015%,CaCl<sub>2</sub>、CuSO<sub>4</sub>、ZnSO<sub>4</sub>均为0.004%,1×10<sup>5</sup> Pa灭菌30 min。

**1.1.3 主要仪器** UV2550 紫外可见光谱(日本岛津);SY-305B 发酵罐,由上海世远生物设备工程有限公司生产;YXQ-LS-50G 立式压力蒸汽灭菌器,由上海博迅实验有限公司医疗设备厂生产;天平,由梅特勒托利多仪器有限公司生产;THZ-98A 恒温振荡器,由上海一恒科学仪器有限公司生产;旋转蒸发仪,由上海亚荣生化仪器厂生产。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 油脂含量的测定** 菌种在 PDA 培养基试管斜面上 27 ℃ 培养活化 3 次后转接到产脂发酵培养基中,再经 5 d 振荡培养,收集菌体,用水充分洗涤后 80 ℃ 烘干,称质量。干菌体用氯仿-甲醇(体积比 2 : 1)混合溶剂在索氏抽提器中 80 ℃ 回流 6 h,用旋转蒸发仪减压,去除溶剂得粗油脂,再用石油醚充分溶解粗油脂后,过滤去除杂质,减压蒸馏去除石油醚即得油脂,称质量。油脂质量与干菌体质量之比即为产油率<sup>[4]</sup>。

**1.2.2 单因素及正交优化设计** 本试验单因素优化选取 6 个因素:纤维素浓度、氮源、培养温度、培养时间、初始 pH 值、C/N,以含油率为指标,得到各因素最适水平。在单因素试验的基础上进一步做 L<sub>27</sub>(3<sup>13</sup>)正交优化试验(表 1、表 2)。

表 1 试验菌株产油发酵工艺 L<sub>27</sub>(3<sup>13</sup>)正交试验因素及水平

水平	纤维素浓度 (%)	氮源	培养温度 (℃)	初始 pH 值	C/N 比
1	1	硝酸钠	20	2	4 : 1
2	2	蛋白胨	24	4	8 : 1
3	3	硝酸铵	28	6	12 : 1

## 2 结果与分析

### 2.1 单因素试验结果

**2.1.1 碳源对产油率的影响** 通过改变产脂发酵培养基中纤维素浓度和葡萄糖(Glu)的添加量,进行最适碳源浓度的筛选。由图 1 可知,随着纤维素浓度升高,产油率不断提高,当增加到一定浓度时则产油率不再提高,2% 纤维素 + 2% 葡萄糖(Glu)为最适碳源,产油率为 14.48%,这可能是因为碳源达到饱和后,将不再影响产油率。另外,一定量的葡萄糖将有助于提高产油率,这是因为葡萄糖作为可高效利用的碳源,有利于菌体的快速生长。

**2.1.2 氮源对产油率的影响** 以 2% 纤维素 + 2% 的葡萄糖为碳源,分别选取酵母膏、蛋白胨、硫酸铵、硝酸钠、硝酸铵为氮源,对最适氮源进行筛选。由图 2 可知,硝酸铵为最适氮源,产油率为 30%,这可能与菌体积累油脂是在氮缺乏下进行有关,与 Gill 等的研究结果<sup>[5]</sup>一致。

**2.1.3 培养温度对产油率的影响** 分别采用 20、24、28、32、36 ℃ 等不同培养温度进行培养,结果(图 3)表明,28 ℃ 为最佳培养温度,产油率为 25.32%,这与丝状真菌菌体最佳生长

收稿日期:2013-10-13

基金项目:忻州师范学院科研项目(编号:201005)。

作者简介:张玲秀(1975—),男,山西定襄人,硕士,助教,主要从事资源微生物和应用微生物研究。E-mail:twozeroxiu@126.com。

表 2 试验菌株产油发酵工艺 L<sub>27</sub> (3<sup>13</sup>) 正交试验方案及结果

试验 组号	纤维素 浓度 (%)	氮源	培养温度 (℃)	初始 pH 值	C/N 比	产油率 (%)
1	1	1	1	1	1	20.18
2	1	1	2	2	2	20.34
3	1	1	3	3	3	17.65
4	1	2	1	2	3	14.89
5	1	2	2	3	1	16.93
6	1	2	3	1	2	23.28
7	1	3	1	3	2	19.72
8	1	3	2	1	3	20.97
9	1	3	3	2	1	19.88
10	2	1	1	1	1	14.76
11	2	1	2	2	2	24.82
12	2	1	3	3	3	13.55
13	2	2	1	2	3	14.12
14	2	2	2	3	1	14.25
15	2	2	3	1	2	16.95
16	2	3	1	3	2	15.92
17	2	3	2	1	3	15.24
18	2	3	3	2	1	24.64
19	3	1	1	1	1	23.75
20	3	1	2	2	2	22.91
21	3	1	3	3	3	17.65
22	3	2	1	2	3	15.74
23	3	2	2	3	1	15.87
24	3	3	3	1	2	21.45
25	3	3	1	3	2	18.56
26	3	3	2	1	3	16.84
27	3	3	3	2	1	23.14

温度相匹配。

2.1.4 培养时间对产油率的影响 由图 4 可见,菌种 1~7 d

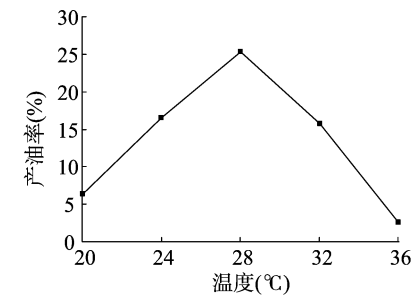


图3 温度对产油率的影响

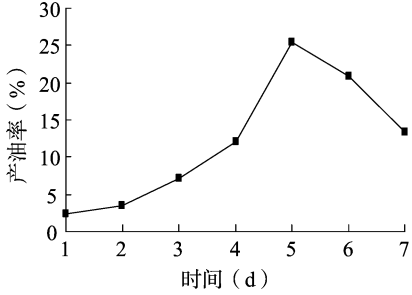


图4 培养时间对产油率的影响

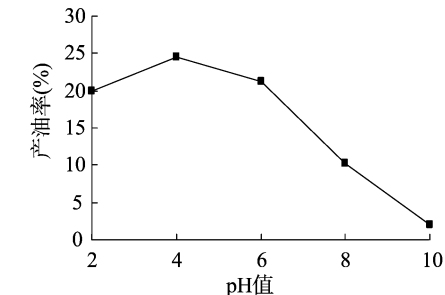


图5 不同初始pH值对产油率的影响

2.1.6 C/N 比对产油率的影响 以 2% 纤维素 + 2% 葡萄糖作为碳源,液体培养基中加入 C/N 比为 2 : 1、4 : 1、8 : 1、12 : 1、16 : 1 的硝酸铵溶液。由图 6 可见,C/N 比为 8 : 1 时产油率最高,可达 18.41%。

2.2 正交试验结果

正交试验结果见表 2。用 SPSS Statistics 20 软件分析各因素显著性及交互作用,结果见表 3。由表 3 可见,各因素对产油率影响大小依次为氮源 > 纤维素浓度 > 初始 pH 值 > C/N 比 > 培养温度。其中,氮源在统计学上显著 ( $P < 0.05$ ),纤维素浓度在  $\alpha = 0.1$  水平上显著,所做 3 项交互作用不显著。可以不予考虑。综合考虑,确定最优产脂发酵工艺:碳源

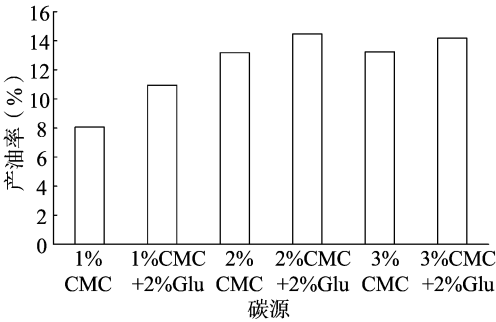


图1 不同碳源对产油率的影响

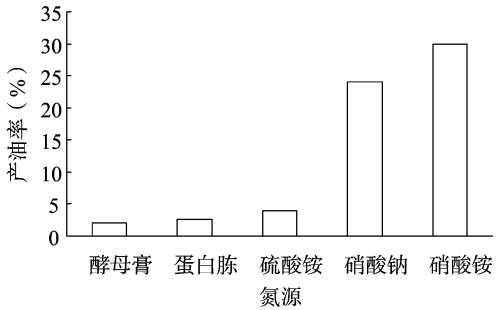


图2 不同氮源对产油率的影响

不断培养过程中,产油率不断变化;培养 5 d 产油率最高,达 25.41%,为最适培养时间。这是因为菌体在不断生长过程中,随着外界培养条件的恶化,积累油脂量逐渐达到最大值。  
2.1.5 培养基初始 pH 值对产油率的影响 分别配制初始 pH 值为 2、4、6、8、10 的液体培养基,碳源为 2% 纤维素 + 2% 葡萄糖,氮源为硝酸铵,于 28 ℃ 连续培养 5 d 后,离心沉淀菌丝体并提取油脂计算产油率。由图 5 可见,在酸性培养条件下产油率较高,其中初始 pH 值为 4 时产油率最高,为 24.46%。

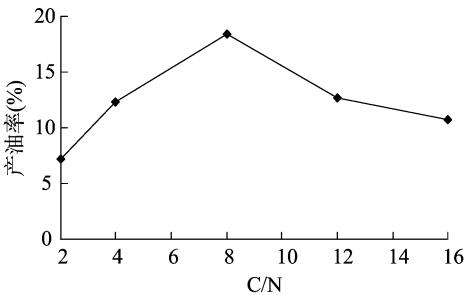


图6 不同C/N对产油率的影响

为纤维素 2% + 葡萄糖 2%,氮源为硝酸铵,温度为 28 ℃,初

马晓丽,张婷婷,郭 欢,等. 红花根际磷细菌筛选、鉴定及其促生效果[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):318-322.

# 红花根际磷细菌筛选、鉴定及其促生效果

马晓丽,张婷婷,郭 欢,龙丽红,蒋 静,张 霞

(石河子大学生命科学学院,新疆石河子 832003)

**摘要:**通过选择培养基,从红花根际土中分离出 8 株溶磷效果好的解磷细菌。钼锑抗比色法测量其溶磷能力,通过形态学、生理生化表型测定,结合 16S rDNA 基因序列同源性分析鉴定,并对获得的溶磷效果较好的菌株进行盆栽试验。试验结果表明:8 株菌分为以下几个属,CM1 和 CM6 属于假单胞菌属(*Pseudomonas*),CM4、CM7、CM8 属于芽孢杆菌属(*Bacillus*),CM2、CM3、CM5 分别属于根瘤菌属(*Bradyrhizobium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)。CM5、CM6 两株菌对红花生长有明显的促进作用。

**关键词:**红花;溶磷细菌;筛选和鉴定;促生

**中图分类号:** S154.3      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0318-05

磷是植物生长发育所必需的营养元素<sup>[1]</sup>,缺磷可导致农作物产量明显降低。土壤全磷含量虽然较高,但易与土壤中的金属离子相结合形成难溶的磷化物,只有少量磷肥可以被植物吸收利用。当季的作物对施入磷肥的利用率仅为 25%,因此,磷被认为是限制性营养元素<sup>[2]</sup>。红花生长发育受化学肥料尤其是磷酸盐肥料影响较大,但使用这些化学肥料会增加土壤及水污染,过量使用磷肥会造成水体富营养化<sup>[3]</sup>,同

时会积累一些重金属,威胁人类的健康。另一方面,长期使用化学肥料会导致土壤结构退化<sup>[4]</sup>。如今,基于化学肥料价格及对农业系统可持续发展的考虑,人们对生物肥料的关注越来越高。

一些细菌可以提供植物生长所需的磷,同时扮演了溶磷微生物的角色。土壤中存在大量有溶磷能力的微生物,称为溶磷微生物<sup>[5]</sup>。溶磷微生物能将难以被植物吸收的磷元素转化为易于吸收利用的状态,提高磷元素的利用率,从而提高作物产量,也减少了磷肥的过度使用。利用溶磷微生物将难溶性磷酸盐转变为可溶性磷是非常有必要的。溶磷微生物提高有效磷含量的同时,还可改善施用化学磷肥所带来的环境污染。因此研究根际磷细菌,对发展溶磷微生物肥料具有重要的现实意义。目前已有的溶磷微生物种类很多,有细菌、真菌、放线菌等,溶磷能力差异较大<sup>[6]</sup>。所以,从根际土中筛选

收稿日期:2013-11-12

基金项目:国家自然科学基金(编号:31160410);石河子大学优秀青年项目(编号:2012ZRKXYQ13)。

作者简介:马晓丽(1989—),女,硕士研究生,研究方向为土壤微生物。E-mail:1836615688mx@sina.cn。

通信作者:张 霞,教授,硕士生导师,从事植物遗传研究。E-mail:xiash@shzu.edu.cn。

表 3 正交试验各因素统计分析

来源	Ⅲ型方差	自由度	均方	F 值	P 值
校正模型	0.076	22	0.003	4.570	0.045
截距	18.223	1	18.223	24 218.034	0.000
A	0.009	2	0.004	5.932	0.064
B	0.024	2	0.012	15.898	0.012
C	0.003	2	0.002	2.068	0.242
D	0.004	2	0.002	2.847	0.170
E	0.003	2	0.002	2.271	0.219
A × B	0.015	4	0.004	4.847	0.078
A × C	0.008	4	0.002	2.814	0.170
A × E	0.009	4	0.002	2.966	0.159
误差	0.003	4	0.001		
合计	18.302	27			
校正误差	0.079	26			

注: $R^2=0.962$ ,调整  $R^2=0.751$ 。

始 pH 值为 4,C/N 比为 8:1。

## 3 小结

本试验以高产纤维素酶的 1 株丝状产油真菌为材料,利用农业玉米秸秆纤维素为主要碳源,通过单因素及正交试验

方法优化产油发酵工艺,发现最优产油发酵工艺为:碳源为 2% 纤维素+2% 葡萄糖,氮源为硝酸铵,温度为 28℃,培养时间为 5 d,初始 pH 值为 4,C/N 比为 8:1,这为进一步开发和利用农业秸秆、生产微生物油脂提供了参考,具有一定的理论研究和实际应用价值。

## 参考文献:

- [1] 张传富,顾文杰,彭科峰,等. 微生物纤维素酶的研究现状[J]. 生物信息学,2007,5(1):34-36.
- [2] Perlack R D, Wright L L, Turhollow A F, et al. Biomass as feedstock for a bioenergy and bioproducts industry: the technical feasibility of a billion ton annual supply [D]. USDA: Oak Ridge National Laboratory, 2005.
- [3] 张玲秀,温雪梅,郑小妹,等. 降解玉米秸秆纤维素真菌的筛选及产油特性的研究[J]. 安徽农学通报,2012,18(17):47-49.
- [4] 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):43-44,40.
- [5] Gill C O, Hall M J, Ratledge C. Lipid accumulation in an oleaginous yeast (*Candida* 107) growing on glucose in single-stage continuous culture[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1977,33(2): 231-239.