

研究报告

马尾藻中产不饱和脂肪酸真菌的分离及其脂肪酸组成分析

黄颖淇 焦冬冬 伍彬* 邓绮雯 房志家 王雅玲 刘颖*

(广东海洋大学食品科技学院 广东 湛江 524088)

摘要:【背景】随着从鱼类、农作物原料中提取不饱和脂肪酸的成本越来越高,寻找特殊且成本低的提取原料迫在眉睫。海洋环境的特殊性造就了丰富而特有的微生物资源,成为获取产不饱和脂肪酸的新策略。【目的】从湛江徐闻马尾藻中分离筛选产油脂真菌,并对其脂代谢产物进行气相色谱分析(GC)。【方法】通过利用选择性培养基及苏丹黑染色方法从马尾藻中筛选高产油脂真菌,对目标菌进行形态特征、培养特征及 ITS 序列鉴定,利用 GC 技术对三氯甲烷-甲醇提取的油脂进行组成成分分析与含油量测定。【结果】共筛选到 7 株产油脂真菌,其中菌株 A17 脂肪颗粒大且密集,是一株高产菌株,经形态与基因水平鉴定,确定菌株 A17 为变红镰孢菌(*Fusarium incarnatum*)。提取的油脂占细胞干重的 24.75%,并且不饱和脂肪酸占总油脂的 60.76%,其中油酸与亚油酸分别为 32.80%和 26.20%。【结论】该研究可为开发马尾藻中产油脂菌株提供理论依据。

关键词: 马尾藻, 不饱和脂肪酸, 真菌, 分离, GC 分析

Separation of unsaturated fatty-acid producing fungi from *Sargassum* and analysis of fatty acid composition

HUANG Ying-Qi JIAO Dong-Dong WU Bin* DENG Qi-Wen FANG Zhi-Jia
WANG Ya-Ling LIU Ying*

(College of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, Guangdong 524088, China)

Abstract: [Background] A special extracting raw material with low cost is extremely urgent, as the expense of extracting unsaturated fatty acids from fish and crops is growing high. The particularity of ocean environment results in a rich and unique microbial resource, which have been regarded as a new strategy for obtaining unsaturated fatty acids. [Objective] The aim was to isolate oil-producing fungi from *Scagassum* collected from Xuwen Port, Zhanjiang, Guangdong Province, and analyze its fatty acid composition by gas chromatography (GC). [Methods] The

Foundation item: Project of Innovation and Entrepreneurship Training for College Students of Guangdong Province (524000087188)

*Corresponding authors: Tel: 86-759-2396027

E-mail: WU Bin: wubin23air@126.com; LIU Ying: liuyingxk@sina.com

Received: January 12, 2017; **Accepted:** August 28, 2017; **Published online** (www.cnki.net): September 27, 2017

基金项目: 广东省大学生创新创业训练项目(524000087188)

*通信作者: Tel: 86-759-2396027

E-mail: 伍彬: wubin23air@126.com; 刘颖: liuyingxk@sina.com

收稿日期: 2017-01-12; 接受日期: 2017-08-28; 网络首发日期(www.cnki.net): 2017-09-27

selective plating medium and method of Sudan Black B staining were used to screen high-yield oil-producing fungi. The target strain was identified by morphological and culture characteristics and analysis of ITS sequences. GC was used to determine the composition and content of the lipids which were extracted by chloroform-methanol. **[Results]** A total of 7 oil-producing fungal strains were screened, among which strain A17 was the high-yield oil-producing fungus with larger lipochondrion. The analysis of morphology and molecular identification of ITS sequence showed that the strain A17 was *Fusarium incarnatum*. The oil extracted from the strain A17 accounted for 24.75% of the cell dry weight, and unsaturated fatty acid accounted for 60.76% of the total oil content, which oleic acid and linoleic acid were 32.80% and 26.20 %, respectively. **[Conclusion]** This study may provide a theoretical base for the development of oil-producing strains in *Scagassum*.

Keywords: *Sargassum*, Unsaturated fatty acid, Fungi, Isolation, Gas chromatography (GC)

不饱和脂肪酸是碳链未完全被氢原子所饱和的含有一个或多个双键的一类物质, 它们不仅具有加强细胞膜的相对流动性、胆固醇的酯化、降低血液粘稠度等生理功能^[1], 而且还参与体内脂肪的合成, 是人体必需的一类物质。目前, 不饱和脂肪酸商业来源主要来自于鱼类和一些农作物原料的提取物, 但这类来源的不饱和脂肪酸生产存在易受原料限制且提取费用高等缺陷。另一方面, 有些酵母菌、霉菌、细菌和藻类等微生物在生长代谢过程中可以产生并储存油脂, 而且具有生长快、转化效率高、生产易于管理等优点, 尤其霉菌的油脂含量高, 含有丰富的 γ -亚麻酸、花生四烯酸等功能性多不饱和脂肪酸, 因而被深入研究^[2-3]。但目前可用于开发的产不饱和脂肪酸霉菌种类偏少, 能高产的菌株更是少之又少。海洋由于其环境的特殊性与多变性, 不仅赋予了海洋微生物丰富的种类, 而且在基因组成和功能上也具有其自身的特殊性^[4], 因此海洋微生物成为获取产量高、组成成分特殊优良菌株的重要来源。南海(105°E-118°E, 4°N-21°N)作为中国最广阔的海域, 属于热带海洋性季风气候, 以往的研究表明, 这里蕴藏着丰富的微生物资源^[5]。本研究利用选择性培养基及苏丹黑染色方法, 从南海徐闻海域马尾藻中筛选高产油脂真菌, 并对高产菌株进行鉴定及油脂组成 GC 检测, 为开发与利用海洋源产油脂真菌提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 菌株来源和主要试剂、仪器及培养基

全缘马尾藻(*Sargassum integririmum*)采集于广东湛江徐闻县海域, 装入无菌袋中, 冰藏保存并立即送至实验室。

主要试剂和仪器: ITS 基因的 PCR 扩增采用通用引物 ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 和 ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), 由上海英俊生物技术有限公司合成; Mighty Amp DNA Polymerase 和 2×Mighty Amp Buffer, 生物工程(大连)有限公司; 苏丹黑, 上海迈坤化工有限公司。尼康 YS100 生物显微镜, 日本尼康公司; 高速离心机, 德国 Sigma 公司; PCR 仪, 美国 Labnet 公司; 凝胶成像系统, 美国 Bio-Rad 公司。

PDA 培养基购自北京陆桥技术有限责任公司; 发酵培养基(g/L): 葡萄糖 150.0, 酵母膏 0.5, 磷酸二氢钾 2.0, 硫酸铵 2.0, 柠檬酸钠 0.1, 蒸馏水 1 000 mL, pH 5.8。

1.2 全缘马尾藻真菌的分离

取新鲜全缘马尾藻 10 g, 用无菌海水 28 °C、150 r/min 振荡培养 30 min 后, 进行 10 倍梯度稀释, 选取适当浓度的稀释液 0.1 mL 均匀涂布于 PDA 平板上, 28 °C 培养 3 d, 挑取形态不同的菌落反复纯化, 并将纯化好的菌株斜面保存于 4 °C, 同时保存在 20% 的甘油中, -20 °C 保存。

1.3 产油脂菌的筛选

采用苏丹黑染色法对分离纯化的菌株进行产脂菌的筛选,挑取少许分离菌涂片、固定,用0.3%苏丹黑染色15 min,二甲苯冲洗至洗脱液无色,再用番红复染1 min,水洗干燥后显微镜观察,若油脂粒呈蓝黑色、菌体呈红色的判定为产油脂菌^[6]。

1.4 真菌菌株鉴定

1.4.1 形态学鉴定

参考《常见与常用真菌》方法^[7],对目标菌株菌落、孢子丝及孢子等进行观察鉴定。

1.4.2 ITS 基因序列测定及系统发育树构建

采用真菌 ITS 基因扩增通用引物对 ITS1/ITS4,使用 Mighty Amp DNA Polymerase 进行菌落 PCR,PCR 反应体系与反应条件按照 Lu 等的方法^[8]。PCR 反应体系(30 μ L):用接种针挑取少量目标菌作模板,2×Mighty Amp Buffer 15 μ L, Mighty Amp DNA Polymerase 0.75 μ L, ITS1 (10 μ mol/L) 0.75 μ L, ITS4 (10 μ mol/L) 0.75 μ L, ddH₂O 12.75 μ L。反应条件:98 °C 2 min; 98 °C 10 s, 55 °C 15 s, 68 °C 1.5 min, 40 个循环; 10 °C 10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物,将确认的目标产物送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

根据测得的 ITS 基因序列,从 CBS 和 NRRL 数据库进行同源性搜索,下载相似性高的已知菌株对应的基因序列,用 Maximum likelihood (ML)方法构建系统发育树,并用 Bootstrap 方法统计所构建系统发育树的可靠性^[9-10]。

1.5 菌株油脂的发酵与提取

将目标菌接种到发酵培养基中,28 °C、180 r/min 摇瓶发酵 5 d,于 5 000 r/min 离心 15 min 去除上清液,收集湿菌体于 80 °C 烘干至恒量。

准确称取 0.5 g 干菌体,加入 6 mol/L 盐酸混合均匀浸泡 1 h,再沸水处理 5 min 后于-20 °C 快速冷却 20 min,加入 10 mL 三氯甲烷-甲醇溶液(体积比为 1:1),放入摇床 28 °C、150 r/min 振荡 20 min,3 000 r/min 离心 15 min 后吸取三氯甲烷层,加入等体积 0.1%氯化钠溶液混匀,3 000 r/min 离心 15 min,

收集三氯甲烷层并水浴挥发三氯甲烷层^[11]。

1.6 菌株产油脂的 GC 分析

油脂甲酯化处理:0.5 g 干菌体提取的油脂,加入 0.6 mol/L 氢氧化钾-甲醇溶液 2 mL 和正己烷 2 mL 后,剧烈振荡 2 min,在 30 °C 放置 15 min,加入蒸馏水 5 mL,静置分层,取正己烷层分析脂肪酸组成与含量。

GC 条件:气相色谱仪 Agilent 7820;气相色谱柱为 HP88 (安捷伦,60 mm×0.25 mm×0.25 μ m);流速 0.8 mL/min,分流比 10:1,进样量 1 μ L;初始温度 100 °C,保持 2 min,以 10 °C/min 升至 150 °C,再以 2 °C/min 升温至 220 °C,保持 2 min,再以 10 °C/min 升温至 230 °C,保持 1 min;载气为氦气,流速 0.8 mL/min,分流比为 10:1,进样量为 1 μ L。

2 结果与分析

2.1 菌株分离结果

采用 PDA 培养基平板对全缘马尾藻中的真菌进行分离,共筛选到 17 个菌株,其中菌株 A2、A5、A8、A9、A11、A16 及 A17 共 7 株真菌经苏丹黑染色均不同程度出现蓝黑色,表明为潜在的产油脂菌株,而菌株 A17 着色最深,黑色脂粒最大且较密集,是产油脂最高的菌株(图 1)。

2.2 菌株 A17 的鉴定

2.2.1 形态学鉴定

如图 2 所示,菌株 A17 在 PDA 培养基上生长 5 d 后菌落直径达 6.1 cm,气生菌丝棉絮状,初期白色至淡粉红色,菌落背面粉色,后期菌落变为浅驼色至褐色。

对 SNA 培养基上生长 7 d 的孢子进行镜检,结果表明,气生菌丝上没有发现明显的界限以区分大小分生孢子,分生孢子为镰刀形、纺锤形,弯曲而近于直,较宽,顶端细胞弯曲(图 3A)。同时发现,厚壁孢子稀少,呈球形,壁光滑,串生于菌丝中间(图 3B、C),鉴定结果与 Booth^[12]、孔华忠^[13]对变红镰孢[*Fusarium incarnatum* (Desm.) Sacc]的形态学描述一致。

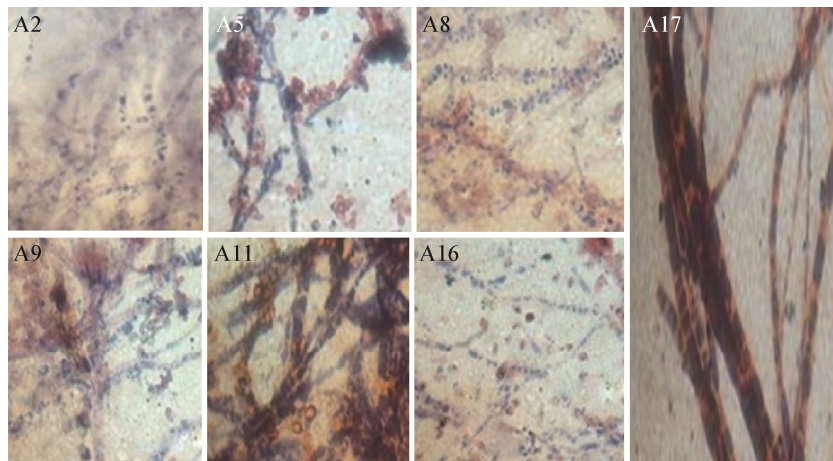


图 1 苏丹黑染色筛选产油脂菌株
Figure 1 Producing oleaginous strains screened by sudan staining

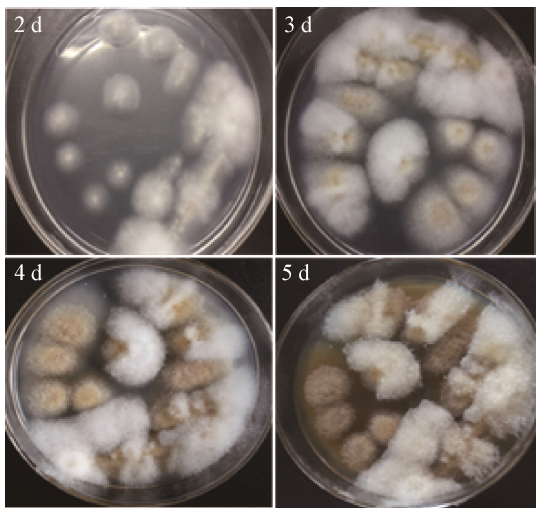


图 2 菌株 A17 菌落形态
Figure 2 Colony morphology of strain A17

2.2.2 系统发育学鉴定

菌株 A17 的 ITS 基因序列与已知菌序列进行比对后, 使用与其亲缘关系较近的 *Fusarium incarnatum-equiseti* (FIE) 复合种及 *F. chlamydosporum* (FC) 复合种中不同分型的部分代表序列^[10], 并以 *F. tricinctum* NRRL25481 序列为外群构建系统发育树(图 4), 结果发现菌株 A17 位于 FIE 复合种分支内。目前镰孢属在分类学研究使用的形态学及系统发育学鉴定存在的分歧有的尚未完全解决^[14], 但本文形态与系统发育鉴定结果比较吻合, 因此确定 A17 菌株为变红镰孢 (*Fusarium incarnatum*)。

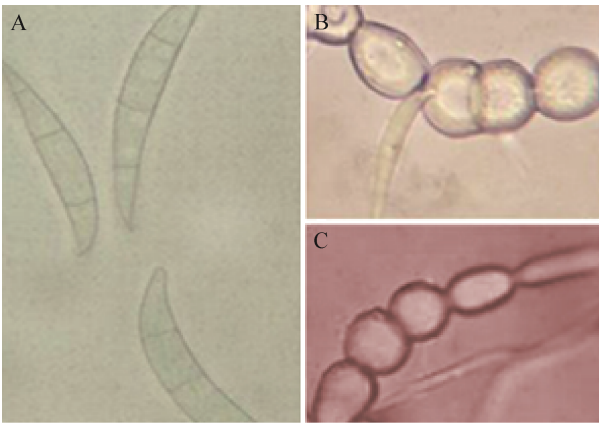


图 3 菌株 A17 显微形态
Figure 3 Microscopic morphology of strain A17 (16×40)
注: A: 大型分生孢子; B、C: 厚垣孢子.
Note: A: Macroconidium; B, C: Hlamydosporem.

2.3 油脂含量及成分分析

利用三氯甲烷-甲醇提取细胞内油脂, 发现菌株 A17 油脂含量占细胞干重的 24.75%。根据与混标出峰时间作比较(图 5), 菌株 A17 代谢产物提取的油脂经甲酯化后的 GC 分析(图 6)共出现 16 个有效峰, 但只有油酸、亚油酸、亚麻酸 3 种不饱和脂肪酸和棕榈酸、硬脂酸 2 种饱和脂肪酸含量大于 1%, 分别占总检测成分的 32.80%、26.20%、1.10%、20.70% 和 15.40% (表 1)。

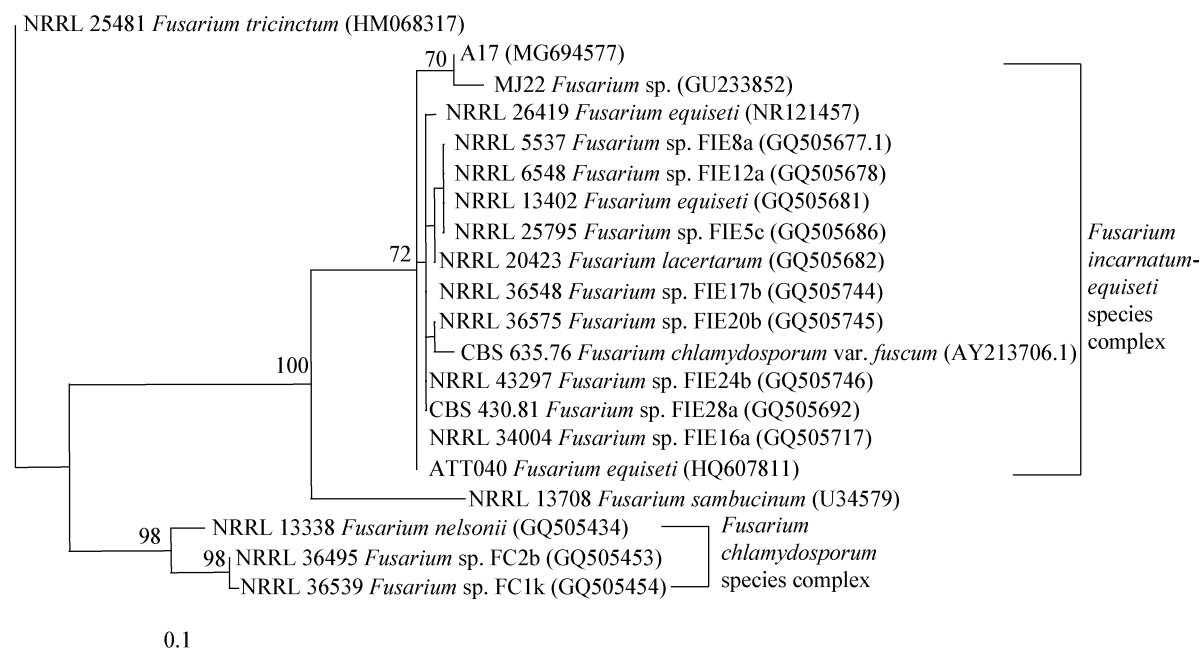


图4 基于ITS基因序列构建的ML树

Figure 4 Phylogenetic tree based on ITS sequences using Maximum Likelihood (ML) method

注：发育树节点的数值为 Bootstrap 值，表示构建系统树时计算 1 000 次形成该节点的百分比；括号内数值为 GenBank 登录号；标尺或刻度 0.1 代表 10% 的 16S rRNA 基因序列的进化差异。

Note: Bootstrap values are based on 1 000 replicates; The numbers in the bracket denote the GenBank accession number; The scale bar indicates 10% nucleotides.

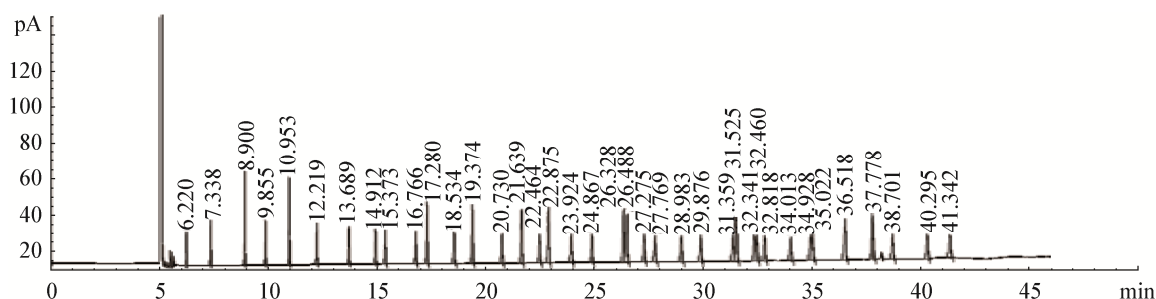


图5 脂肪酸标准样品气相色谱图

Figure 5 Gas chromatogram of fatty acids for the standard sample

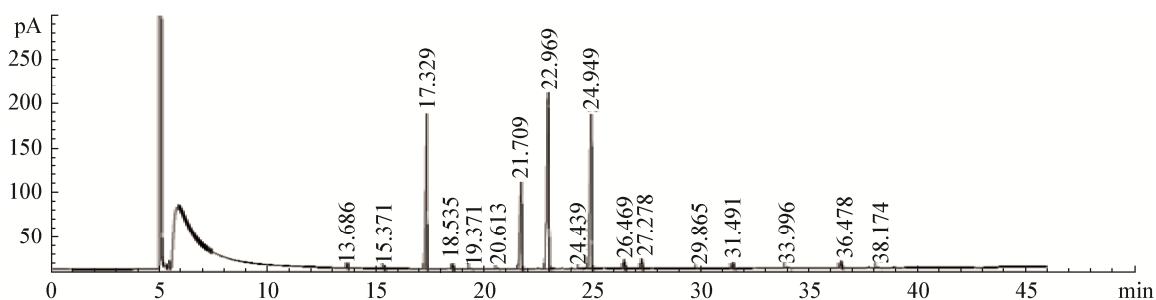


图6 菌株A17代谢产物油脂气相色谱图

Figure 6 Gas chromatogram of fatty acids for strain A17

表 1 菌株 A17 代谢产物油脂中各脂肪酸的含量
Table 1 Content of each fatty acid in strain A17

脂肪酸 Fatty acid	化学式 Chemical formula	百分含量 Percentage contents (%)
肉豆蔻酸 Myristic acid	C ₁₃ H ₂₇ COOH	0.30
十五烷酸 Pentadecanoic acid	C ₁₄ H ₂₉ COOH	0.09
棕榈酸 Palmitic acid	C ₁₅ H ₃₁ COOH	20.70
棕榈油酸 Palmitoleic acid	C ₁₅ H ₂₉ COOH	0.40
十七烷酸 Heptadecanoic acid	C ₁₆ H ₃₃ COOH	0.07
十七碳烯酸 Heptadecenoic acid	C ₁₆ H ₃₁ COOH	0.07
硬脂酸 Stearic acid	C ₁₇ H ₃₅ COOH	15.40
油酸 Oleic acid	C ₁₇ H ₃₃ COOH	32.80
亚油酸 Linoleic acid	C ₁₇ H ₃₁ COOH	26.20
亚麻酸 Linolenic acid	C ₁₇ H ₂₉ COOH	1.10
花生酸 Arachidic acid	C ₁₉ H ₃₉ COOH	0.98
二十碳二烯酸 Eicosandienoic acid	C ₁₉ H ₃₆ COOH	0.06
山萘酸 Behenic acid	C ₂₁ H ₄₃ COOH	0.64
二十二碳二烯酸 Docosadienoic acid	C ₂₁ H ₃₉ COOH	0.24
木焦油酸 Lignoceric acid	C ₂₃ H ₄₇ COOH	0.89
二十四碳烯酸 Nervonic acid	C ₂₃ H ₄₅ COOH	0.13

3 讨论与结论

在适宜的条件下，能够在体内积累油脂高于细胞干重 20% (质量比)的微生物被称作产油微生物 (Oleaginous microorganisms)^[15]。目前的研究发现，酵母菌、霉菌、细菌和微藻类都可以作为产油微生物，但霉菌因其油脂含量高、胞内脂肪酸成分与植物油脂相近，并且产脂霉菌类群丰富等优点而被深入研究^[16]。近年来，热带红树林、盐沼和海洋等特殊环境中产油脂真菌受到了广泛的关注。柴慧子等

对湛江海域海鞘进行了产油脂菌分离与油脂含量测定，分离到 *Penicillium citrinum*、*Penicillium* sp. 与 *Aspergillus terreus* 3 株产油脂霉菌，且油脂含量均在 20.00%以上^[17]。对从 369 株大洋沉积物中筛选获得的 61 株产油霉菌进行鉴定，发现它们分别属于 *Aspergillus*、*Fusarium*、*Cladosporium*、*Penicillium*、*Engyodontium*、*Sarocladium*、*Alternaria*、*Aureobasidium*、*Lecytophor* 与 *Nectria* 10 个属，产油霉菌占分离菌株的 16.53%，其中 *Aspergillus* 产油菌株所占比例最高，其次为 *Fusarium* 菌，分别占产油菌株的 30.43%和 18.84%^[3]。本研究从湛江徐闻马尾藻中分离筛选到 7 株产油脂真菌，其中一株油脂含量占细胞干重 24.75%的菌为变红镰孢菌 (*Fusarium incarnatum*)。产油菌若要用于工业化生产，不仅需要有一定的含油量，还需要对产油菌所产脂肪酸的成分进行测定，这也是判定其性能的重要指标。黄昌旭对普里兹湾沉积物中获得的 8 株产油菌胞内脂肪酸成分进行分析，发现 *Aspergillus sydowii* 产油量为 2.99 g/L，分析发现不饱和脂肪酸主要是油酸与反油酸且分别占总脂肪酸的 57.2%和 19.32%，而饱和脂肪酸主要是棕榈酸，占脂肪酸的 16.30%；*Fusarium oxysporum* 产生的不饱和脂肪酸也主要是油酸、反油酸和十七碳烯酸，比例分别为 66.94%、6.20%和 2.07%，饱和脂肪酸为棕榈酸，占 24.78%^[3]。本研究分离的 *Fusarium incarnatum* A17 产生的不饱和脂肪酸主要也是油酸与亚油酸，分别占总脂肪酸的 32.80%与 26.20%，但饱和脂肪酸除了 20.70%的棕榈酸外，还有 15.40%的硬脂酸，这 4 种脂肪酸占了总脂肪酸的 95.10%，说明菌株 A17 产生的脂肪酸组成成分相对简单，这一特点有利于后续对脂肪酸的分离与提取。

REFERENCES

[1] Sun XY, Gao GT, Duan AL, et al. Research progress in polyunsaturated fatty acids[J]. Science and Technology of Food Industry, 2012, 33(7): 418-423 (in Chinese)
孙翔宇, 高贵田, 段爱莉, 等. 多不饱和脂肪酸的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(7): 418-423
[2] Yi SJ, Zheng YP. Research and application of oleaginous

- microorganism[J]. China Foreign Energy, 2006, 11(2): 90-94 (in Chinese)
- 易绍金, 郑义平. 产油微生物的研究及其应用[J]. 中外能源, 2006, 11(2): 90-94
- [3] Huang CX. Screening of identification of oleaginous fungi from the sediments of deep sea and Antarctica and optimization of fermentation conditions of the oleaginous fungi[D]. Xiamen: Master's Thesis of Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, 2015 (in Chinese)
- 黄昌旭. 深海和南极产油真菌筛选、鉴定和产油菌株发酵条件优化的研究[D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所硕士学位论文, 2015
- [4] Henriquez M, Vergara K, Norambuena J, et al. Diversity of cultivable fungi associated with Antarctic marine sponges and screening for their antimicrobial, antitumoral and antioxidant potential[J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2014, 30(1): 65-76
- [5] Liang Y, Shi WJ, Tian CY. A review of the methods for determining total lipid content in microalgae[J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(5): 35-40 (in Chinese)
- 梁英, 石伟杰, 田传远. 微藻总脂含量测定方法概述[J]. 中国海洋大学学报, 2012, 42(5): 35-40
- [6] Li WJ, Zhi XY, Tang SK. Actinobacterial systematics in China: past, present and future[J]. Microbiology China, 2013, 40(10): 1860-1873 (in Chinese)
- 李文均, 职晓阳, 唐蜀昆. 我国放线菌系统学研究历史、现状及未来发展趋势[J]. 微生物学通报, 2013, 40(10): 1860-1873
- [7] Wei JC. Fungal Identification Manual[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1979: 1-178 (in Chinese)
- 魏景超. 真菌鉴定手册[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1979: 1-178
- [8] Lu QF, Hu HQ, Mo JJ, et al. Enhanced amplification of bacterial and fungal DNA using a new type of DNA polymerase[J]. Australasian Plant Pathology, 2012, 41(6): 661-663
- [9] O'Donnell K, Rooney AP, Proctor RH, et al. Phylogenetic analyses of *RPB1* and *RPB2* support a middle cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria[J]. Fungal Genetics and Biology, 2013, 52: 20-31
- [10] O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, et al. Novel multilocus sequence typing scheme reveals high genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium incarnatum*-*F. equiseti* and *F. chlamydosporum* species complexes within the United States[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2009, 47(12): 3851-3861
- [11] Xu T, Dong TF, Chen M, et al. Optimization of fermentation process by a marine fungus strain *Schizochytrium* sp. DP-16 for DHA lipid production[J]. Journal of Dalian Polytechnic University, 2016, 35(6): 411-415 (in Chinese)
- 徐涛, 董天飞, 陈明, 等. 海洋真菌 *Schizochytrium* sp. DP-16 发酵产 DHA 油脂过程的优化[J]. 大连工业大学学报, 2016, 35(6): 411-415
- [12] Booth C. The Genus *Fusarium*[M]. London: Commonwealth Mycological Institute, 1971: 1-237
- [13] Kong HZ. Flora Fungorum Sinicorum: 35: *Penicillium* et Teleomorphi Cognati[M]. Beijing: Science Press, 2007: 1-284 (in Chinese)
- 孔华忠. 中国真菌志: 第三十五卷: 青霉属及其相关有性型属[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 1-284
- [14] O'Donnell K, Humber RA, Geiser DM, et al. Phylogenetic diversity of insecticolous fusaria inferred from multilocus DNA sequence data and their molecular identification via FUSARIUM-ID and *Fusarium* *MLST*[J]. Mycologia, 2012, 104(2): 427-445
- [15] Chi ZM, Zhang T, Cao TS, et al. Biotechnological potential of inulin for bioprocesses[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(6): 4295-4303
- [16] Wang CL. Studies on lipid production by the *Aureobasidium pullulans* P10[D]. Qingdao: Master's Thesis of Ocean University of China, 2014 (in Chinese)
- 王翠玲. 普鲁兰短梗霉 P10 菌株产油脂的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 2014
- [17] Chai HZ, Huang YY, Lei XL, et al. Screening of oil-producing fungi from *Asciidiacea* and analysis of fatty acid composition[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(12): 287-292 (in Chinese)
- 柴慧子, 黄蕴怡, 雷晓凌, 等. 海鞘中产油脂共附生真菌的筛选及脂肪酸组成成分分析[J]. 现代食品科技, 2016, 32(12): 287-292