

文章编号:1673-1689(2005)03-0101-05

绿色木霉固态发酵纤维素酶生物量的测定 及发酵培养基的初步优化

姜绪林, 孙瑶, 杨毅, 杜大庆, 张星元
(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 为了测定绿色木霉固态发酵纤维素酶的生物量, 采用紫外分光检测固态发酵过程中麦角固醇的量. 确定了其最佳提取工艺: 在 75 °C 恒温水浴中反应 0.5 h, 用乙醚萃取, 乙醇定容, 紫外 282 nm 检测. 在此基础上对绿色木霉固态发酵的培养基进行了初步的优化, 并得到了最佳的培养基组合: 碳源为蔗糖, 无机氮源为 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 水料质量比为 2.2, pH 为 5.5. 用该培养基, CMC 酶活和滤纸酶活分别比优化前提高了 21.0% 和 44.1%.

关键词: 绿色木霉; 纤维素酶; 固态发酵; 麦角固醇

中图分类号: Q 815

文献标识码: A

Trichoderma viride Biomass Assay in the Solid Fermentation of Cellulase and the Preliminary Optimization of the Medium

JIANG Xu-lin, SUN Yao, YANG Yi, DU Da-qing, ZHANG Xing-yuan

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: In order to obtain the data of the biomass in the solid cellulase fermentation, the method of biomass assay was firstly studied. The optimal extraction condition of ergosterol (an element in the mycelium wall) was determined as following: reacting at 75 °C for 0.5 h, then the reaction liquid was extracted with ether, solved with 10 mL ethanol, and detected at 282 nm by UV spectrophotometer. On the basis of this biomass assay, the medium for the solid fermentation was optimized: sugar was used as the carbon source, and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ was used as the inorganic nitrogen source, the mass ratio of water to solid material was 2.2, and the initial pH was 5.5. The enzyme activities using CMC-Na and filter paper as the substrate increased by 21.0% and 44.1%, respectively.

Key words: *Trichoderma viride*; cellulase; solid fermentation; ergosterol

无论是液态发酵还是固态发酵, 绿色木霉都已经应用于纤维素酶的工业化生产中, 它是一种高产纤维素酶的菌株, 所分泌的纤维素酶广泛应用于食品酿造, 动物饲料, 纺织工业, 造纸工业等领域^[1].

现代微生物工程是利用微生物活细胞来实现发酵过程中产品的合成, 从这个意义上说, 微生物活细胞就是现代工业发酵生产线上不可缺少的“生物机器”. 因此, 通过监控发酵过程中的生物量的变

收稿日期: 2004-09-09; 修回日期: 2004-12-11.

作者简介: 姜绪林(1981-), 男, 江苏南京人, 发酵工程硕士研究生.
万方数据

化,来控制优化培养条件,对于提高产物的产率有很重要的意义.绿色木霉属于丝状真菌,在固态发酵过程中菌丝体与培养基紧密地结合在一起,给测定生物量带来了不便.真菌细胞壁上含有一种甾醇类物质——麦角固醇,通过测定麦角固醇的量也可以间接地反映生物量的多少^[2].为此,作者采用紫外分光检测固态发酵过程中麦角固醇的量,以此来描述基质中菌丝体量的变化,并在此基础上对纤维素酶固态发酵的培养基组分进行了初步的优化.

1 材料与方 法

1.1 菌种

绿色木霉,作者所在实验室保藏.

1.2 主要试剂

羧甲基纤维素钠(CMC-Na),3,5-二硝基水杨酸(DNS):中国医药集团上海化学试剂公司产品;麦角固醇:Sigma公司产品.

1.3 培养基

斜面培养基:马铃薯培养基.培养菌丝体时,不加琼脂.

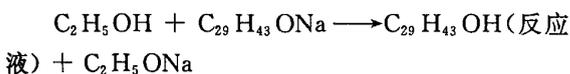
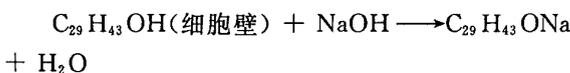
酶曲培养基:固体物料(新鲜稻草粉:豆粕粉(m:m)=9:1)10g,营养液(蔗糖22.8g,(NH₄)₂SO₄10g,K₂HPO₄5.0g,MgSO₄2.5g,溶于1000mL水中,自然pH值)22mL.

1.4 原理和方法

1.4.1 菌丝体的制备 250mL三角瓶中加入40mL马铃薯液体培养基,接入新鲜的成熟(培养约4d后)绿色木霉孢子1环,30℃下,160r/min恒温培养36h后,离心洗涤,60℃烘干24h,粉碎待用.

1.4.2 酶曲的制备 250mL三角瓶中加入酶曲培养基,接入2mL孢子悬液(孢子浓度控制在10⁶~10⁷个/mL).恒温恒湿培养箱中(30℃,湿度70%)培养5d后测定酶活及菌丝体含量.

1.4.3 麦角固醇提取原理 提取过程如下面的反应式所示:



1.4.4 麦角固醇的提取及测定 精确称取0.1g菌丝或酶曲,放入25mL具塞比色管中,加入10mL醇碱混合液($V_{(\text{无水乙醇})} : V_{(\text{NaOH溶液})} = 3 : 5$),于85~90℃恒温水浴中反应1.5h.流水冷却,离心.取上清液沸水浴中将乙醇蒸尽,然后加入10mL无水乙醚,充分振荡,静置萃取2h.吸取上层乙醚层,

将乙醚蒸尽后(管壁上残留白色粉末状物质),用无水乙醇溶解并定容至10mL^[3].

紫外分光光度计检测:波长282nm处比色^[4],测定OD值.

1.4.5 纤维素酶活测定 主要以CMC-Na和滤纸为作用底物,测定CMC酶活和滤纸酶活,测定方法见文献^[5].

CMC酶活定义为:以CMC-Na为底物,在50℃,pH4.8条件下,每秒钟产生1微摩尔的葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位.滤纸酶活定义为:以滤纸为底物,在50℃,pH值4.8条件下,每分钟产生1微摩尔的葡萄糖所需的酶量为一个酶活力单位.

2 结果与讨论

2.1 紫外分光光度计测定麦角固醇含量标准曲线的绘制

精确称取麦角固醇标准样品5mg,用乙醇溶解定容到50mL,质量浓度为0.1mg/mL,然后分别吸取1,2,3,4,5mL,再用乙醇分别定容到10mL,这时,最终质量浓度分别为0.01,0.02,0.03,0.04,0.05mg/mL,在波长282nm处,分别测定其OD值.以麦角固醇的质量浓度为横坐标,OD值为纵坐标绘制标准曲线.

2.2 麦角固醇提取条件的研究

2.2.1 反应温度对麦角固醇提取的影响 称取0.1g的菌丝或酶曲,分别在50,60,70,80和90℃的水浴中恒温提取麦角固醇.温度对麦角固醇提取的影响如表1所示.

表1 温度对麦角固醇提取的影响

Tab.1 The effect of temperature on the extraction of ergosterol

反应温度/ ℃	麦角固醇提取量/ mg
50	0.120
60	0.133
70	0.139
80	0.133
90	0.062

由表1可以看出,温度超过约75℃后,麦角固醇的提取量迅速下降,这是由于,在这个温度范围内反应液里的乙醇挥发很快,影响了其与麦角固醇的置换,从而不能有效地提取麦角固醇.温度为

75 ℃, 麦角固醇的提取情况最好。

2.2.2 反应时间对麦角固醇提取的影响 称取 0.1 g 的菌丝或酶曲, 分别在 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 h 时停止提取反应, 反应时间对麦角固醇提取的影响见表 2。

表 2 反应时间对麦角固醇提取的影响

Tab.2 The effect of time on the extraction

反应时间/ h	麦角固醇提取量/ mg
0.5	0.112
1.0	0.109
1.5	0.115
2.0	0.113
2.5	0.113

由表 2 可以看出, 在 0.5 h 后, 提出的麦角固醇变化很小, 说明此时麦角固醇基本已经完全提取出来。通过这个实验, 大大缩短了原定的提取时间。

2.2.3 反应液体积对麦角固醇提取的影响 称取若干份 0.1 g 固体曲置于具塞比色管中, 再分别加入 4, 8, 12, 16, 20 mL 醇碱溶液, 抽提麦角固醇并比色测定其浓度, 反应液体积对麦角固醇提取的影响见表 3。可以看出, 当醇碱溶液的体积为 12 mL 时, 最有利于麦角固醇的提取。

表 3 反应液体积对麦角固醇提取的影响

Tab.3 The effect of the reactive liquid volume on the extraction of ergosterol

反应液体积/ mL	麦角固醇提取量/ mg
4	0.078
8	0.094
12	0.108
16	0.098
20	0.093

2.2.4 反应液中醇碱比对麦角固醇的提取的影响

分别向装有 0.1 g 固体曲的比色管中加入 2, 4, 6, 8, 10 mL 无水乙醇, 然后补加质量分数为 20% 的 NaOH 溶液至 12 mL, 提取麦角固醇并进行比色测定, 醇碱比对麦角固醇提取的影响见表 4。当碱的量太少时, 影响了细胞壁中麦角固醇的皂化, 而当醇太少时, 又会影响醇对皂化后的麦角固醇的置换。由表 4 可以看出, 当醇碱体积比为 1:1 时, 最有利于麦角固醇的提取。

万方数据

表 4 反应液醇碱比对麦角固醇提取的影响

Tab.4 The effect of the ratio of ethanol to NaOH on the extraction of ergosterol

反应液醇碱 体积比	麦角固醇提取量/ mg
0.2	0.091
0.5	0.121
1.0	0.135
2.0	0.117
5.0	0.099

2.2.5 反应液中 NaOH 溶液的浓度对麦角固醇的提取的影响 向装有 0.1 g 固体曲的比色管中加入等体积比的醇碱溶液 12 mL, 其中 NaOH 的质量分数分别为 10%, 20%, 30%, 40% 和 50%。提取后比色测定并进行比色测定, 结果见表 5。

表 5 反应液中 NaOH 浓度对麦角固醇提取的影响

Tab.5 The effect of the concentration of NaOH on the extraction of ergosterol

反应液中 NaOH 的 质量分数/%	麦角固醇 提取量/mg
10	0.126
20	0.124
30	0.068
40	0.047
50	0.019

由于 NaOH 溶液的质量分数越高, 其溶液的粘度越大, 这不利于麦角固醇从细胞壁中提取出来, 而当其质量分数约为 15% 时, 麦角固醇的提取情况最好。

2.3 菌丝体与麦角固醇含量之间的关系

称取不同质量的绿色木霉的菌丝体置于比色管中, 按上述的提取条件提取细胞壁中的麦角固醇, 比色测定麦角固醇的含量, 以菌丝体质量为横坐标, 麦角固醇含量为纵坐标绘制曲线。曲线如图 1 所示。

由图 1 我们得到, 麦角固醇含量 y 与菌丝体质量 x 之间的关系: $y = 0.006x$, 其相关系数达到 0.9983, 由此, 就可以根据麦角固醇的含量确定固体曲中菌丝体的含量。

2.4 基于生物量测定的纤维素酶固态发酵工艺的初步优化

2.4.1 绿色木霉固态发酵生物量的变化 向酶曲培养基中接种绿色木霉单孢子悬液, 拌匀后静置培

养. 观察发现, 培养 20 h 后, 固料中隐约可见少量的白色菌丝; 48 h 时菌丝丰富并伴有少量的绿色孢子; 70 h 时培养基的表面被丰富的绿色孢子覆盖; 培养至 4 d 时, 绿色孢子继续增多, 并且孢子颜色有所加深; 继续培养, 孢子呈现墨绿色, 并铺满整个固体曲表面。

于不同时间停止培养, 将曲烘干, 粉碎, 测定其中的菌丝体含量, 在 120 h 内菌丝体含量的变化曲线见图 2。

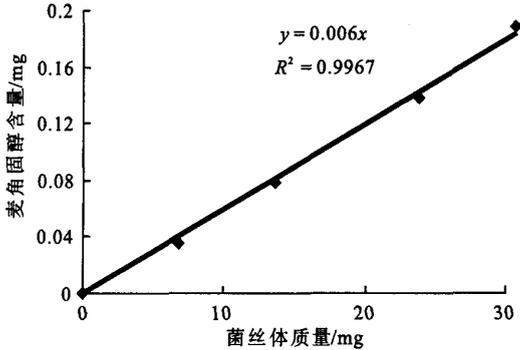


图 1 菌丝体质量与麦角固醇含量之间的关系曲线
Fig. 1 The relation curve between mycelium and ergosterol

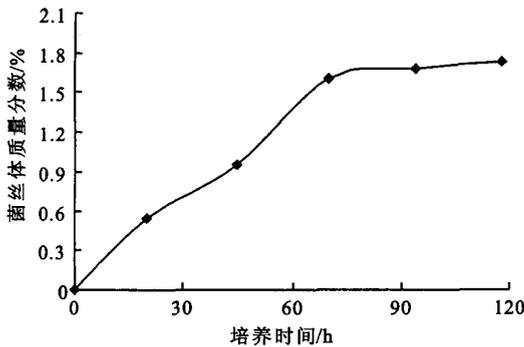


图 2 绿色木霉固态发酵生物量变化曲线
Fig. 2 The biomass curve in the solid fermentation of cellulase by *Trichoderma viride*

由图 2 可以看出, 在前 3 d 内菌丝体呈大量生长的趋势, 3 d 之后渐入稳定期。

2.4.2 不同碳源对产酶的影响 分别用葡萄糖、麦芽糖、乳糖和纤维二糖代替酶曲培养基中的蔗糖进行发酵, 另外做一不加任何碳源的对照样, 考察其对产纤维素酶的影响, 结果见图 3。

综合考虑 CMC 酶活和滤纸酶活, 从图 3 可以看出, 蔗糖的效果比较好, 其次为不加任何碳源的对照样, 而单糖葡萄糖的效果不如蔗糖可能是由于葡萄糖对纤维素酶的合成有一定的阻遏作用^[6,7,8]。纤维二糖的效果最差。

万方数据

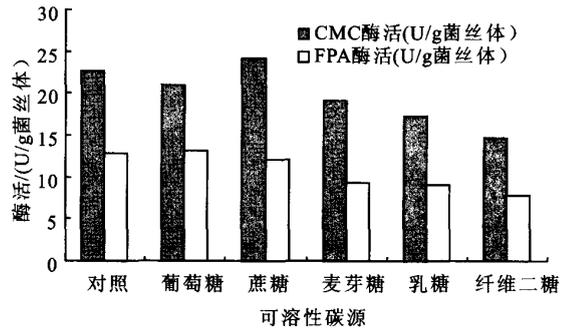


图 3 可溶性碳源对产酶的影响

Fig. 3 The effect of the soluble carbon source on the cellulase production

2.4.3 不同无机氮源对产酶的影响 分别用硝酸钠、硝酸铵、尿素和磷酸二氢铵代替硫酸铵(按照氮元素摩尔数相等进行实验, 同时做不加氮源的对照实验, 发酵结束后测定酶活和生物量, 不同无机氮源对产酶的影响见图 4。

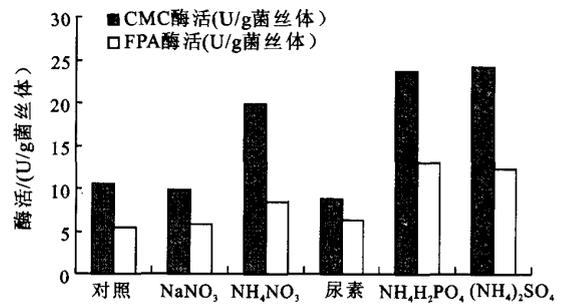


图 4 无机氮源对产酶的影响

Fig. 4 The effect of the nitrogen source on the cellulase production

由图 4 可以看出, 硫酸铵和磷酸二氢铵的效果比较好, 硝酸铵其次, 对照样, 硝酸钠和尿素不利于纤维素酶的合成, 可能与它们不利于合成菌丝体有关。

2.4.4 培养基中水料比对纤维素酶合成的影响 改变培养基中固料和营养液的质量比, 进行发酵。结束后测定酶活和生物量, 其结果如图 5 所示。

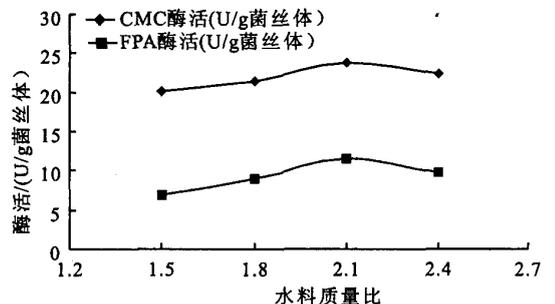


图 5 培养基水料比对产酶的影响

Fig. 5 The effect of the water content on the cellulase production

培养基中水分太少时,不利于霉菌的生长,从而影响了纤维素酶的分泌,从图5中可以看出,当水料比大约为2.2时,产酶情况最好。

2.4.5 培养基初始pH对产酶的影响 改变酶曲培养基中营养液的初始pH,使其分别为4.5,5.0,5.5,6.0和6.5。接种发酵,测定生物量和酶活。pH对纤维素酶合成的影响见图6。

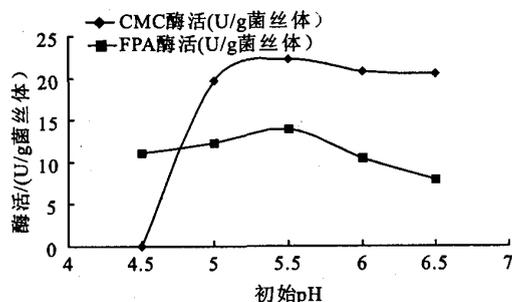


图6 培养基中初始pH对产酶的影响

Fig. 6 The effect of the initial pH on the cellulase production

当pH偏高或偏低时,不利于霉菌的生长,其分泌的纤维素酶也相对较少,而当pH处于霉菌最适生长pH 5.5时,纤维素酶的产量也最高。

2.4.6 培养基优化前后产酶比较实验 通过以上的优化实验,得到比较好的培养基组合,即可溶性碳源为蔗糖,无机氮源为硫酸铵,pH 5.5,水料质量比2.2,分别用此配方和优化前的培养基进行纤维素酶固态发酵实验,测定生物量和酶活,结果见表6。

表6 培养基配方优化前后产酶情况比较

Tab. 6 The enzyme activity comparison of the optimum medium to the initial

配方	CMC酶活/(U/g菌丝体)	FPA酶活/(U/g菌丝体)
优化前	22.14	12.39
优化后	26.78	17.85
提高幅度/%	21.0	44.1

3 结论

通过对绿色木霉菌丝体细胞壁中麦角固醇的提取工艺进行优化,确定了最佳的提取工艺:称取0.1 g菌丝或酶曲,放入25 mL具塞比色管中,加入12 mL醇碱混合液,其中 $V_{(\text{无水乙醇})} : V_{(\text{NaOH溶液})} = 1 : 1$,NaOH溶液的质量分数为15%,于75 °C恒温水浴中反应0.5 h。在此基础上,建立了菌丝体和其中所含麦角固醇之间的质量关系。

以每批培养的固体曲中含有的生物量为基准,对纤维素酶固态发酵的培养基进行了初步的优化,从而确定了最佳的培养基组合:可溶性碳源为蔗糖22.8 g/L,无机氮源为硫酸铵10 g/L,pH5.5,水料质量比2.2。CMC酶活和滤纸酶活分别比优化前提高了21.0%和44.1%。

参考文献:

- [1] 肖春玲,徐常新. 微生物纤维素酶的应用研究[J]. 微生物学杂志,2002,22(2):33-35.
- [2] Desgranges C, Georges M, Vergoignan C, et al. Biomass estimation in solid state fermentation[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1991. 35:206-209.
- [3] 吴克,杨宏本,张洁,等. *Trichoderma viride* 菌生物量测定及其纤维素酶合成特征[J]. 食品与发酵工业,2002,28(8):9-12.
- [4] 许旭萍,李惠珍,余晨兴,等. 麦角固醇产生菌 *Torulopsis farnata* 优化发酵条件的研究[J]. 生物学杂志,2002,18(2):15-17.
- [5] 张树政. 酶制剂工业[M]. 北京:科学出版社,1984. 606-608.
- [6] 韩峰,孙彩云,宋小焱,等. 拟康氏木霉 UV III 纤维素酶合成的诱导与阻遏[J]. 工业微生物,2003,33(1):23-26.
- [7] 王冬,曲音波,高培基. 丝状真菌纤维素酶合成机制的研究[J]. 纤维素科学与技术,1993,1(2):17-21.
- [8] Manabu Suto, Fusao Tomita. Induciton and catabolite repression mechanisms of cellulase in fungi[J]. *J Bioscience and Bioengineering*, 2001, 92(4):305-311.

(责任编辑:杨萌)