

文章编号:1673-1689(2006)01-0060-05

3 种固态发酵生物量测定方法的比较

魏培莲^{1,2}, 岑沛霖¹, 盛春琦²

(1. 浙江大学材料与化学工程学院, 浙江 杭州 310027; 2. 浙江科技学院生物与化学工程系, 浙江 杭州 310012)

摘要:对固态发酵中生物量测定常用的 3 种细胞组分(核酸、麦角固醇、氨基葡萄糖)作为生物量测定指标的可行性进行了比较研究。结果表明:核酸组分在细胞中含量比较稳定,可较好地指示生物量的变化,氨基葡萄糖受培养基成分影响较大,只适合固定成分培养基中生物量的表征,而麦角固醇在细胞中的含量不太稳定,不适合作为生物量测定的指标。运用核酸法对土曲霉固态发酵产 lovastatin 过程中的菌体量变化进行了描述。

关键词: 固态发酵;核酸;麦角固醇;氨基葡萄糖;生物量测定

中图分类号:Q 93

文献标识码:A

Comparison of Three Biomass Estimation Methods in Solid State Fermentation

WEI Pei-lian^{1,2}, CEN Pei-lin¹, SHENG Chun-qi²

(1. College of Materials Science and Chemical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China; 2. Department of Bio-Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310012, China)

Abstract: Cell components are usually used as indicators for biomass estimation in solid state fermentation (SSF). Three cell components (nucleic acid, ergosterol and glucosamine) were used for biomass estimation of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 in SSF. The changes of three biomass constituents during cultivation were examined. Results showed that nucleic acid could be a good biomass indicator as it remained constant with the changes of cultivation time and the medium. Under the condition that the medium had the same constituents, glucosamine could also be a good biomass indicator. Ergosterol amount changed with the cultivation time and medium type, thus, it could not accurately represent the biomass changes.

Key words: solid state fermentation; nucleic acid; ergosterol; glucosamine; biomass estimation

生物量是表征微生物生长状况的一项基本参数,测定生物量对了解发酵过程中微生物的生长情况及发酵情况至关重要。固态发酵是微生物在没有或基本没有游离水的固态基质上的生长过程。

微生物,尤其是丝状微生物在固态基质中生长的时侯,菌丝深入培养基内部,紧密缠绕在一起,不易从底物中分离,所以很难直接测定生物量。为了解决这一问题,通常采用间接法来进行生物量的测定,

收稿日期:2005-05-04; 修回日期:2005-07-09.

作者简介:魏培莲(1976-),女,山东邹城人,讲师,微生物工程博士研究生。
万方数据

这些方法大致可归为 3 类: 1) 测定细胞的生物活性, 如 ATP 的测定、酶活的测定、呼吸速率的测定、免疫活性的测定等; 2) 测定营养物质的消耗; 3) 测定细胞的组分, 如几丁质/氨基葡萄糖^[1,2]、麦角固醇^[3,4]、核酸^[5,6]和蛋白质等。所有这些测定方法都有它们的局限性, 如不同的细胞组分其含量会随菌种的不同、生长条件的不同和培养时间的不同而发生改变, 而且大多数分析方法比较复杂, 造成分析结果和实际结果之间有一个时间上的滞后, 基质成分对分析结果也可能产生干扰; 测定营养的消耗只有在无外来污染物的情况下才可以采用; 测定氧气的消耗或二氧化碳的产生可以实现在线测定, 但是二氧化碳的积累并不总能反应生物量的变化情况。因此, 很难说哪一种生物量测定方法更适合某一发酵过程。

选择何种参数来表示发酵过程中的菌体生长量, 要根据菌种、培养基组成和培养条件而定, 更重要的是, 作为代表菌体生长量的任何参数, 必须在微生物的整个生长周期内基本维持恒定, 而且在不同的培养条件下基本保持相同。现有文献对采用测定菌体细胞组分来表示固态基质中生物量的报道较多, 但是这些文献中大多只是直接采用, 而缺乏对这些方法作为生物量指标的可行性和准确性方面的研究。C. Tomaselli Scotti 等^[7]提出一种细胞组分能否作为生物量的表征需经过图 1 的验证过程。

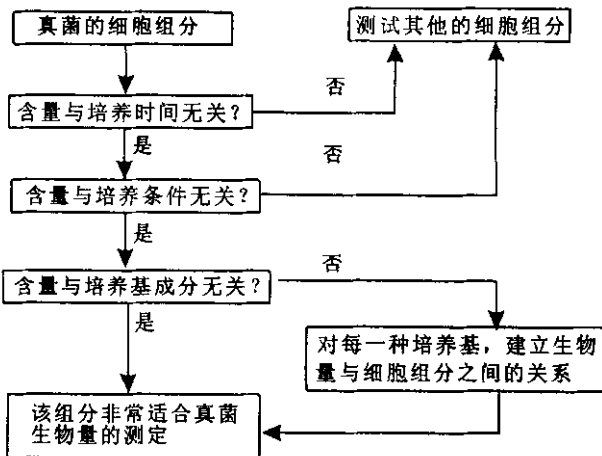


图 1 细胞组分作为生物量表征的实验验证过程

Fig. 1 Flowchart of validation process

由图 1 可以看出, 所选细胞组分其浓度在整个细胞生长过程中应保持恒定, 同时, 培养条件也不能影响所选细胞组分的含量。如果这两个条件有一个不能实现, 此细胞组分就不能作为生物量的指标。另一方面, 如果培养基的成分对所选细胞组分有影响, 那么此组分作为生物量指标的时候就需有

一定的限制条件。

作者将文献中较为常见的 3 种测定细胞组分的方法(测核酸、测麦角固醇和测氨基葡萄糖)用于土曲霉固态发酵产降胆固醇物质 Lovastatin 过程中生物量的测定, 验证了 3 者含量与菌体量的线性关系, 考察了培养时间、培养基成分对细胞中 3 者含量的影响情况, 并对测定结果的可靠性和准确性进行了比较研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

Aspergillus terreus ATCC 20542, 麦芽汁试管斜面保存, 由浙江大学生物化工研究所提供。

1.2 培养基

麦芽汁琼脂斜面培养基(g/dL): 葡萄糖 2, 蛋白胨 0.1, 琼脂 2。麦芽汁 5 mL/dL, pH 值自然。

液态摇瓶发酵培养基: 包括麦芽汁培养基、培养基 I、培养基 II, 其营养成分如下。

麦芽汁培养基(g/dL): 葡萄糖 3.5, 蛋白胨 0.5。麦芽汁 10 mL/dL。

培养基 I(g/dL): 葡萄糖 5, 蛋白胨 0.5, MgSO₄ 0.05, KH₂PO₄ 0.1。

培养基 II(g/dL): 蔗糖 5, NaNO₃ 0.5, MgSO₄ 0.05, KH₂PO₄ 0.1。

固态发酵种子培养基(g/dL): 葡萄糖 5, 蛋白胨 0.5, NaNO₃ 0.5, MgSO₄ 0.1, KH₂PO₄ 0.25。

固态发酵培养基(g/dL): 大米培养基加葡萄糖 5, 蛋白胨 3。初始含水量控制在 50% 左右, 初始 pH 值 5.5。

1.3 实验方法

1.3.1 培养方法

1) 斜面种子培养: 32 °C 下霉菌培养箱中培养 6 d, 斜面长满孢子置冰箱中备用。

2) 液体种子培养: 用接种铲刮取试管斜面孢子接种到盛有液体培养基的 250 mL 三角瓶中(装液量为 75 mL/250 mL 三角瓶), 34 °C、150 r/min 恒温振荡培养 36 h。

3) 液态发酵培养: 在 250 mL 三角瓶中加入 100 mL 液体培养基, 121 °C 灭菌 30 min 后, 接土曲霉孢子悬浮液 5 mL, 32 °C、150 r/min 恒温振荡培养 7 d。

4) 固态发酵培养: 在 500 mL 三角瓶中加入固态培养基 50 g, 121 °C 灭菌后接入土曲霉液体种子 20 mL, 32 °C 下培养 3 d 后, 28 °C 继续培养至第 15 天。

1.3.2 纯菌丝体的获得

1) 用液体培养的方法获得:培养结束后,发酵液用6层纱布过滤,并用蒸馏水充分洗涤纱布上的滤出物,收集滤出物,置60℃干燥箱中烘干至恒重,研钵研碎,置干燥处保存备用。

2) 用琼脂平板培养的方法获得:制备麦芽汁琼脂平板,取新鲜斜面菌种。用接种针挑取少许斜面菌丝,采取3点接种式进行接种,置32℃温箱培养至开始有土褐色孢子形成后取出。利用加热煮沸的方法将琼脂融化,趁热用6层纱布过滤,并用蒸馏水充分洗涤纱布上的滤出物,收集滤出物,置60℃干燥箱中烘干至恒重,研钵研碎,置干燥处保存备用。

1.3.3 核酸的提取测定方法

1) 纯菌体中核酸的提取测定方法^[6]:精密称取0.1g纯菌体,加入25mL5%的三氯乙酸溶液,于80℃水浴中提取25min,其间不断进行搅拌,取出后冰浴冷却,然后8000r/min,4℃离心15min,稀释5倍,以5%三氯乙酸作空白对照,于260nm处测OD值。

2) 土曲霉固态发酵物中核酸的提取测定方法:取0.25g干燥培养物,适当研磨,按照纯菌体中核酸的提取方法进行提取,未经发酵的固态基质采用同样的方法处理作为空白对照,在260nm处测定提取液的OD值,由所测OD值对照纯菌体与核酸紫外吸收曲线关系(见图2),换算成菌体量。

1.3.4 麦角固醇的提取和测定方法 精密称取干菌体0.3g(空白不加)置于100mL磨口三角瓶中,加入24mL50%NaOH、40mL甲醇,85~90℃皂化1.5h,再加8mL95%乙醇继续皂化1.5h,冷却后加蒸馏水16mL、正庚烷40mL,振荡30s,静置30min分层。取上层清液0.5mL,加4.5mL95%乙醇,紫外分光光度计测定282nm处的吸光度值^[8]。

1.3.5 氨基葡萄糖的提取和测定方法 精密称取干菌体0.3g,加2mL60% H_2SO_4 ,25℃浸泡24h,稀释至1mol/L H_2SO_4 ,置于250mL三角瓶中,9.8×10⁴Pa高压加热1h,冷却后用1mol/LNaOH中和至pH7,定容到100mL。取2mL样液(空白为0.5mL蒸馏水)加1mL乙酰丙酮试剂(3.5mL乙酰丙酮+50mL1.2mol/L Na_2CO_3),沸水浴加热30min,冷却后加入2mL无水乙醇、1mL对二氨基苯甲醛试剂(1.333g对二氨基苯甲醛溶于25mL无水乙醇及25mL浓盐酸的混合液中,棕色瓶中保存,现用现配。)振荡,再加入4mL无水

乙醇,60℃保温1h,495nm处测定吸光度值^[9]。

1.3.6 实验结果的处理方法 为保证结果的准确可靠,所有测定都进行3个重复,取其平均值。为比较培养时间、培养基成分对菌体中核酸、麦角固醇、氨基葡萄糖含量影响的大小,引入了相对偏差的概念,其计算方法为:

$$\text{相对偏差} = \frac{\text{测定最大值} - \text{测定最小值}}{\text{所有测定值的平均值}} \times 100\%$$

相对偏差代表了测定值与平均值的偏离大小,一般认为:如果相对偏差小于5%,可看作影响不大,影响因素可忽略;相对偏差若大于5%,则视为影响较大,影响因素不能忽略。

2 结果与讨论

2.1 各细胞组分与菌体量的线性关系

一种细胞组分能否作为生物量的测定指标,首要的问题就是其在细胞中的含量应与生物量具有良好的线性关系。因此,首先对细胞中核酸、麦角固醇、氨基葡萄糖含量与菌体量的线性关系进行了考察。

2.1.1 核酸含量与菌体量的线性关系 核酸在细胞中的含量十分稳定,而且它在代谢上较为稳定,不受营养条件、菌龄等因素的影响,理论上讲应与生物量具有较好的线性关系。由于固态发酵所用基质一般为植物性的农业副产物,其中不可避免地含有少量DNA,但只要菌株在代谢过程中不具备分解DNA的能力(不产胞外脱氧核糖核酸酶),就不会对测定结果有较大影响。

精密称取0.5,1.0,1.5,2.0,2.5g的液体培养所得纯菌体,提取菌体中的核酸并测定吸光度值,结果见图2。

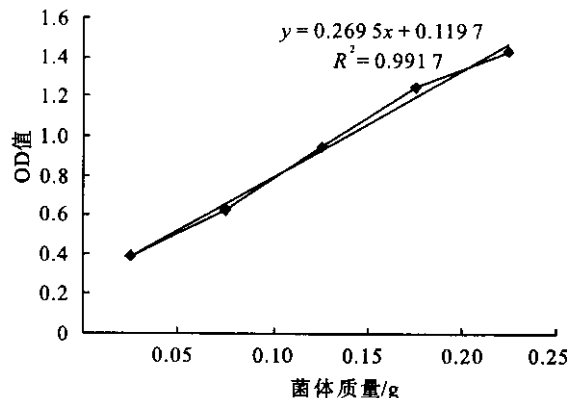


图2 菌体中核酸量与菌体量的关系

Fig. 2 Correlation between amount of mycelia and nucleic acid content

由图2可知,土曲霉菌体中的核酸量与菌体量之间具有良好的线性关系,线性方程为 $y = 0.2695x + 0.1197$,相关系数 $r = 0.9958$ 。

2.1.2 菌体中麦角固醇含量与菌体量的线性关系
精密称取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 g 的液体培养所得纯菌体, 提取菌体中的麦角固醇并测定吸光度值, 结果见图 3。由图 3 可知, 土曲霉菌体中的麦角固醇量与菌体量之间有良好的线性关系, 线性方程为 $y=0.2472x+0.4666$, 相关系数 $r=0.9999$ 。

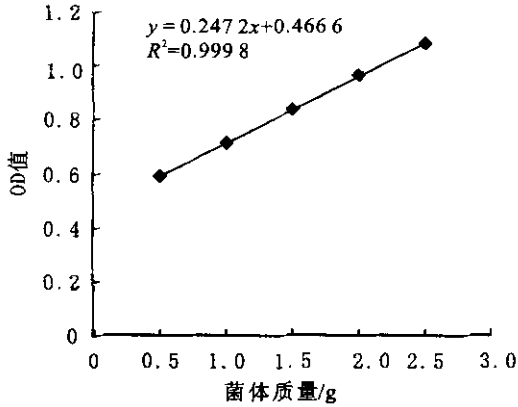


图 3 菌体中麦角固醇含量与菌体量的关系

Fig. 3 Correlation between amount of mycelia and ergosterol content

2.1.3 菌体中氨基葡萄糖含量与菌体量的线性关系
几丁质是 N-乙酰葡萄糖胺(氨基葡萄糖)单体通过 α -1,4 糖苷键联结而成的直链多聚物, 是真菌细胞壁的主要成分。许多研究者认为测定氨基葡萄糖(几丁质)来估计固态发酵中的菌体量是一个简单而可靠的方法。

精密称取 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 g 的液体培养所得纯菌体, 提取菌体中的氨基葡萄糖并测定吸光度值, 结果见图 4。由图 4 可知, 土曲霉菌体中的氨基葡萄糖量与菌体量之间有良好的线性关系, 线性方程为 $y=0.2762x+0.8725$, 相关系数 $r=0.9997$ 。

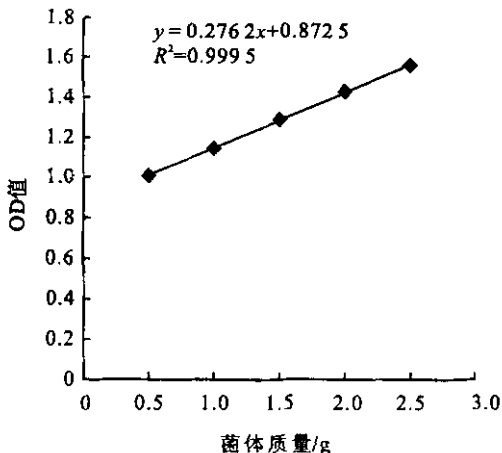


图 4 菌体中氨基葡萄糖含量与菌体量的关系

Fig. 4 Correlation between amount of mycelia and glucosamine content
万方数据

2.2 培养条件对菌体中核酸、麦角固醇、氨基葡萄糖含量的影响

一种细胞组分是否能够作为细胞生物量的测定指标, 仅有良好的线性关系是不够的, 此组分在细胞中的含量还应相对恒定, 即不受培养条件改变的影响。作者考察了培养时间和培养基成分对菌体中核酸、麦角固醇、氨基葡萄糖含量的影响情况。

2.2.1 培养时间对菌体中核酸、麦角固醇、氨基葡萄糖含量的影响
对以培养基 I 为基质、培养时间分别为 3, 4, 5 d 的纯菌体中核酸、麦角固醇和氨基葡萄糖的量进行了测定, 结果见表 1。

表 1 培养时间对菌体中核酸、麦角固醇和氨基葡萄糖含量的影响

Tab. 1 Effect of cultivation time on content of nucleic acid, ergosterol and glucosamine

测定项目	不同培养时间的测定结果			相对偏差/%
	3 d	4 d	5 d	
核酸 OD 值	0.613	0.618	0.621	1.3
麦角固醇 OD 值	0.513	0.531	0.550	7.0
氨基葡萄糖 OD 值	0.959	0.975	0.988	3.0

由表 1 可知, 在 3~5 d 内, 菌体中核酸量、麦角固醇量和氨基葡萄糖的量均随培养时间的改变有所改变, 从变化的幅度上来看, 核酸的变化幅度最小, 氨基葡萄糖次之, 二者的相对偏差均在 5% 以下, 可视为培养时间变化对它们的含量影响不大。麦角固醇的变化幅度最大, 相对偏差超过 5% 以上, 应视为培养时间对含量有较大影响。

2.2.2 培养基成分对菌体中核酸、麦角固醇、氨基葡萄糖含量的影响
分别以麦芽汁培养基、培养基 I、培养基 II 对土曲霉进行培养, 获得纯菌丝体, 测定其中的核酸、麦角固醇、氨基葡萄糖的含量, 结果见表 2。

表 2 培养基成分对菌体中核酸、麦角固醇和氨基葡萄糖含量的影响

Tab. 2 Effect of different mediums on content of nucleic acid, ergosterol and glucosamine

测定项目	不同培养基中的测定结果			相对偏差率/%
	麦芽汁培养基	培养基 I	培养基 II	
核酸 OD 值	0.621	0.617	0.620	0.6
麦角固醇 OD 值	0.592	0.587	0.564	4.8
氨基葡萄糖 OD 值	1.032	1.010	0.978	5.4

由表 2 可知, 培养基成分对菌体中的核酸量几乎没有什么影响, 而对麦角固醇和氨基葡萄糖的影响则相对要大, 从相对偏差来看, 二者均应视为有

影响。结合表1的结果,可以认为:菌体中的核酸量在菌体中相对稳定,可以作为生物量量度的较好指标;氨基葡萄糖受培养时间的影响较小,但受培养基成分的影响稍大,可以作为成分培养基中生物量测定的指标;麦角固醇受培养时间和培养基成分的影响都较大,不太适合作为固态发酵生物量测定的指标。

2.3 3种方法的测定结果比较

为了进一步比较3种测定方法,将3种方法分别用于麦芽汁琼脂平板培养生物量的测定。精密称取麦芽汁琼脂平板培养法所获菌体0.3g,分别利用测麦角固醇、氨基葡萄糖和核酸的方法进行菌体量的测算,结果见表3。

表3 3种方法用于琼脂平板法生物量测定的比较

Tab. 3 Comparison of three methods for determination of agar plate mycelia

方法	实测菌体量/g	误差率/%
核酸法	0.288	-4.0
麦角固醇法	0.269	-10.3
氨基葡萄糖法	0.317	+5.7

注:误差率为实测值与实际值之差与实际值之比的百分率。

由表3可见,3种测定方法测定误差最小的为核酸法,其次是氨基葡萄糖法,麦角固醇法的误差最大,达到10.3%。

2.4 土曲霉固态发酵产 Lovastatin 过程中的菌体量变化情况

洛伐他汀是土曲霉产生的一种强力降胆固醇活性物质(lovastatin),目前作为药物已广泛使用^[10]。其生产主要采取液态发酵的方法,在发酵过程中,利用核酸法测定其生物量的变化情况,结果见图5。

由图5可知,在土曲霉的固态发酵过程中,在第1至第5天内生物量快速增加,第5到第9天仍

进行增长,但增长的速度比较缓慢,9d以后生物量基本保持恒定,最大生物量达到了0.091g/g干基质。这一结果与发酵过程中总糖、还原糖、底物减重等的变化都比较吻合,说明核酸法能够较好的反映土曲霉固态发酵过程中生物量的变化。

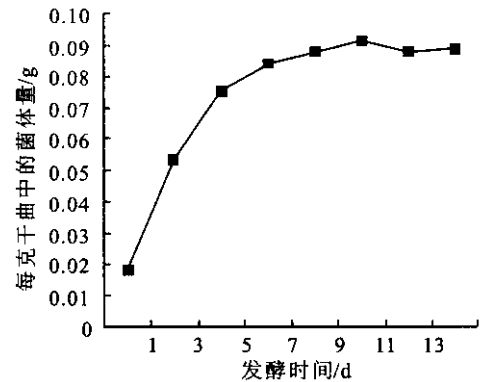


图5 土曲霉固态发酵过程中的菌体量变化

Fig. 5 Mycelia development of *Aspergillus terreus* ATCC 20542 during solid state fermentation cycle

3 结论

土曲霉菌体中的核酸量、麦角固醇量、氨基葡萄糖量都和菌体量有较好的线性关系,但麦角固醇的含量受培养时间、培养基成分的影响较大,不适合作为土曲霉固态发酵中生物量多少的量度;氨基葡萄糖量受培养基成分的影响较大,但基本不受培养时间的影响,在培养基成分恒定的情况下,亦可作为生物量量度的一个指标;核酸量受培养时间和培养基成分的影响均较小,且提取测定方法比较简单,可作为生物量测定的一个较好指标,这些结果与文献[11]中的报道基本相符。

土曲霉固态发酵产 Lovastatin 的过程中,在第1至第5天内生物量快速增加,第5到第9天仍进行增长,但增长的速度比较缓慢,9d以后生物量基本保持恒定,最大生物量达到了0.091g/g干基质。

参考文献:

- [1] 路秀玲,赵树欣,刘忠华. 红曲霉固态发酵中生物量的测定方法[J]. 食品与发酵工业,2002,27(6):45-49.
- [2] 高修功,章克昌. 纤维素酶固态发酵过程中菌体生长量的测定[J]. 工业微生物,1994,24(3):26-30,34.
- [3] 吴克,杨本宏,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] Nout M J R, Bonants-van Laarhoven, T M G de Jongh, et al. Ergosterol content of *Rhizopus oligosporus* NRRL 5905 grown in liquid and solid substrates[J]. *Appl MicrobiolBiotechnol*, 1987, 2: 456-461.
- [5] Koliander B, Hampel W, Roehr M. Indirect estimation of biomass by rapid ribonucleic acid determination[J]. *Appl MicrobiolBiotechnol*, 1984, 19: 272-276.

HPLC 检测其有效成分的相对分子质量分别为 742 200 和 25 200,其归一化含量分别为 8.77%和 28.62%,高于标准品 4.42%和 1.94%。经 10 批次发酵,所获得的产品符合要求,因此该生产技术可

进一步扩大。

在获得胞内糖肽的同时,可获得 7.85 g/L 胞外粗多糖,胞外多糖的功能性待进一步研究。

参考文献:

- [1] 邹巧根,朱玲. 云芝糖肽的研究进展[J]. 中成药,2003,25(7):578—580.
- [2] 鲁晓燕,孟凡振. 云芝糖肽药理作用进展[J]. 中国药师,1999,2(3):148—149.
- [3] 杨晓彤,糜可. 不同云芝菌株及提取工艺所得结合蛋白多糖的分析比较[J]. 中国医药工业杂志,2000,31(12):545—548.
- [4] 国标 WS-XG-021-2002, 国家药品标准[S].
- [5] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars[J]. **Anal Chem**, 1959, 31: 426—428.
- [6] T B N G. A review of research on the protein-bound polysaccharide(polysaccharopeptide, PSP) from the mushroom *Coriolus versicolor*[J]. **Gen Pharmac**,1998,30(1):1—4.
- [7] 张培玉,杨革,郑恒河. 云芝菌丝体生长的营养需求及液体发酵研究[J]. 曲阜师范大学学报 1998,24(3):65—68.
- [8] 潘继红,王登,查晓红,等. 云芝深层培养及发酵液的应用研究[J]. 中国野生植物资源,2000,19(1):19—21.

(责任编辑:李春丽)

(上接第 64 页)

- [6] LIU Gang, XU Zhi-nan, CEN Peilin. A morphologically structured model for mycelial growth and secondary metabolite formation[J]. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, 2000, 8(1):46—51.
- [7] Tomaselli Scotti C, Vergoignan C, Feron G, et al. Glucosamine measurement as indirect method for biomass estimation of *Cunninghamella elegans* grown in solid state cultivation conditions[J]. **Biochemical Engineering Journal**, 2001,7:1—5.
- [8] 许旭萍,李惠珍,余晨星,等. 麦角固醇产生菌 *Torulopsis famata* 优化发酵条件的研究[J]. 生物学杂志,2002,18(2):15—17.
- [9] 苏畅,夏文水,姚惠源. 氨基葡萄糖和乙酰氨基葡萄糖的测定方法[J]. 食品工业科技,2003,24(6):74—75.
- [10] Frishman W H, Zimetbaum P, Nadelmann J. Lovastatin and other HMG-CoA reductase inhibitors[J]. **J Clin Pharmacol**, 1989, 29:975—982.
- [11] Desgranges C, Vergoignan C, Georges M, et al. Biomass estimation in solid state fermentation I. Manual biochemical methods[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology (Historical Archive)**, 1991, 35(2): 200—205.

(责任编辑:李春丽)