

Trichoderma viride 菌生物量测定及其纤维素酶合成特征*

吴 克¹ 杨本宏¹ 张 洁¹ 刘 斌¹ 蔡敬民¹

潘仁瑞¹ Marinus Meiners²

1(合肥联合大学生物工程教研室 ,合肥 230022)

2(University of Applied Sciences Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven , Emden , Germany , 26723)

摘 要 利用 HPLC 法测定 *Trichoderma viride* 菌固态发酵曲中的麦角固醇含量。研究了麦角固醇与菌丝体间的关系。该菌固态曲中麦角固醇分离条件以 1:2(m/v)的丙酮抽提 1.5 h 为最佳。当固态发酵培养至 69 h 时 ,曲中的生物量达到最大值 ,为每克干曲中含有 0.575 g 菌丝体。此时该菌所产生 CMC 酶和 FP 酶活力均达到最大值 ,呈现正相关性 ,说明这 2 种酶的合成特征均为同步合成型 ,而 C₁ 酶活力高峰滞后 ,出现在 72 h。

关键词 固态发酵 ,麦角固醇 ,*Trichoderma viride* ,生物量 ,纤维素酶

木霉是重要的工业用酶制剂菌株 ,它可以被用来生产纤维素酶^[1]、木聚糖酶^[2,3]等重要的酶制剂产品 ,这些酶制剂可广泛地应用在食品加工、饲料工业、制浆造纸、保健品生产、纺织工业等领域。

木霉属于丝状真菌 ,在自然界中它们具有习惯在固态支持物上生长的习性 ,因此 ,可以利用固态发酵方式生产工业用酶制剂。在固态发酵过程中 ,由于菌丝与发酵基质之间紧密地结合在一起 ,这给此过程中生物量的测定及发酵罐控制带来了困难。固态发酵培养基中的生物量测定可采用呼吸率法^[4] ,即通过尾气中的 CO₂ 释放量来描述菌丝在基质中的生长量 ;也可通过细胞的代谢产物如胞内 ATP 酶的活性^[5] ,胞壁 N-乙酰葡萄糖酰胺含量^[6] ,胞外酶产量^[7] 及培养基质中底物消耗量等变化及培养基中 C 平衡等来评价^[8]。随着现代生物工程技术的发展 ,酶联免疫吸附测定法也可以应用在固态发酵中生物量的测定上^[9]。细胞壁上麦角固醇含量^[10]也是生物量测定方法之一。为了建立 *Trichoderma viride* 在固态发酵中的生物量测定方法及其与产酶间的关系 ,本文选择

HPLC 法测定 *T. viride* 菌固态发酵过程中的麦角固醇变化 ,以此来描述基质中的生物量变化 ,同时对该菌的纤维素酶合成机制进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 菌 种

Trichoderma viride 菌 ,PDA 斜面保存 ,由课题组提供。

1.2 试 剂

所用药品及试剂为分析纯或色谱纯。

1.3 培养基

菌丝培养基 :葡萄糖 30 g 溶于 1 000 mL Mandels 氏盐液中。

固态发酵培养基 选择无霉变的麸皮、玉米芯和麦秸粉 ,并以质量比为 3.0:1.0:3.5 混合加入 1.5 倍(v/m)的 Mandels 氏盐溶液 ,搅匀备用。

1.4 实验方法

1.4.1 菌丝体和固体曲的制备

在 250 mL 三角瓶中加入 100 mL 菌丝培养基 ,121℃ 灭菌 30 min 后 ,接 *T. viride* 菌孢子悬液 5 mL(1×10^8 个孢子/mL) ,28℃

第一作者 硕士 ,副教授。

* 德国下萨克森州科文部资助项目 安徽省教育厅自然科学基金资助项目(No. 2000j1267zc)

收稿日期 2002-04-22

下,120 r/min 恒温振荡培养 3 d 后,过滤并充分洗涤,收集菌丝体,置于 40℃ 真空干燥箱中烘干后粉碎待用。

在 250 mL 三角瓶中加入固态培养基,121℃ 灭菌后接入 *T. viride* 菌孢子悬液 2 mL(浓度同上)28℃ 恒温培养,并定时取样,40℃ 真空干燥箱中烘干,粉碎后待用。

1.4.2 麦角固醇的提取

称取不同量的菌丝或固体曲,在 250 mL 圆底烧瓶中,分别将菌丝浸入 30 mL 丙酮溶剂中或 $m(\text{固体曲}):V(\text{丙酮})=1:25$ 浸提比的溶剂量,同时加入适量 NaOH 皂化,60℃ 回流 2.5 h,冷却后过滤,用丙酮充分洗涤,收集滤液,再用一定量的 $V(\text{正己烷}):V(\text{水})=1:1$ 混合液洗涤,混匀后,置于室温下 20 min 分层,弃去水相,反复多次洗至中性,浓缩干燥,用甲醇溶解并定容,待测。

1.4.3 麦角固醇 HPLC 的测定方法

参考文献[11],并经多次试验确定了麦角固醇 HPLC 的测定方法为:色谱柱 Hyper-sil C-18,流动相为甲醇,流速 1.3 mL/min;压力 9321.9 kPa;保留时间 12 min 22 s;柱温 30℃,灵敏度 16×10^2 AU。得出峰面积与麦角固醇间的关系为: $A = 268643 C + 2980$ (A 为峰面积, C 为麦角固醇浓度, $R = 0.9992$)

1.4.4 酶活力测定

CMC 酶和 FP 酶活力测定,参考文献[12],每分钟释放 1 μmol 葡萄糖的酶量定义为 1 个酶活力单位。 C_1 酶活力测定按张树政采用的方法[13],1 个酶活力单位为每分钟释放 1 μmol 葡萄糖的酶量。

1.4.5 培养基成分分析

水溶性蛋白质测定参照 Bradford 比色法测定[14]。还原糖含量按 Miller 方法测定[15]。pH 计测定固体曲水浸提液 pH 值。

2 结果与讨论

2.1 菌丝体与麦角固醇间质量关系的确定

将不同质量的 *T. viride* 菌丝体,分

别置于圆底烧瓶中,利用丙酮浸提,分离其中的麦角固醇。经 HPLC 测定出麦角固醇的量,建立不同质量的菌丝体与其所含麦角固醇间的关系,结果见图 1。由图 1 可见,麦角固醇(Y)的提取量与菌丝体(X)的质量呈直线关系。其线性方程为 $Y = 0.484X + 0.038$ ($R = 0.9946$)。

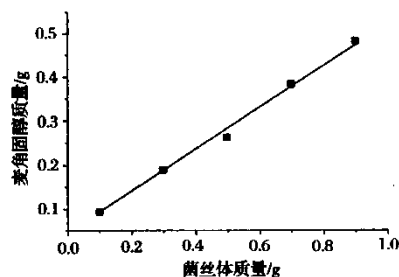


图 1 菌丝体与麦角固醇质量对应关系

2.2 固体曲中影响麦角固醇提取的因素

影响固体曲中麦角固醇提取量的因素除了固体曲自身因素外,主要还有溶剂、回流时间和浸提体积等。本试验分别称取未产孢子的干培养曲 2 g 进行浸提,并提取麦角固醇。待测的样品终体积为 4 mL。表 1 显示了溶剂对固体曲中菌丝麦角固醇的影响。结果表明乙酸乙酯和丙酮作为溶剂对麦角固醇提取有利。综合考虑,选用丙酮作为麦角固醇提取最佳溶剂。

表 1 溶剂对麦角固醇提取的影响

溶 剂	乙酸乙酯	石油醚	丙 酮	苯
麦角固醇 /mg·g ⁻¹ (干曲)	0.165	0.085	0.165	0.065

回流时间对固体曲中菌丝体的麦角固醇含量也有影响,回流时间短,不利于菌丝体中的麦角固醇的充分提取,时间过长工作效率低。试验结果显示,回流 1.5 h 以后,浸提液中的麦角固醇含量基本一致(见表 2),所以确定 1.5 h 为试验的最佳浸提时间。

溶剂体积对固体曲中菌丝体的麦角固醇提取的影响见表 3。试验结果显示,固液比为 1:25 为最佳。

表 2 回流时间与麦角固醇提取量间的关系

回流时间/h	1.0	1.5	2.0	2.5	3.0	4.0
麦角固醇 /mg·g ⁻¹ (干曲)	0.125	0.19	0.185	0.185	0.185	0.19

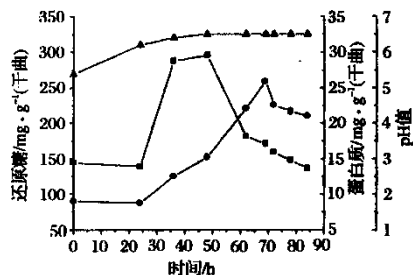
表 3 浸提体积与麦角固醇提取量间的关系

m(固体曲):V(丙酮)	1:17.5	1:25	1:32.5	1:40	1:47.5
麦角固醇 /mg·g ⁻¹ (干曲)	0.13	0.17	0.16	0.17	0.18

综合上述试验结果,可以确定固体曲中菌丝体麦角固醇提取的试验条件为:溶剂为丙酮,固液浸提比为 1:25,回流时间 1.5 h,并以此条件对 *T. viride* 菌固态培养过程中的菌丝麦角固醇提取,以供 HPLC 测定。

2.3 *T. viride* 菌固态发酵的生物量测定

T. viride 菌在固态培养基上培养 24 h 后,培养基中有少量的白色菌丝,36 h 后出现大量菌丝,48 h 后,培养基中长满菌丝并伴有少量绿色孢子,培养至 69 h 后产生大量的绿色孢子,84 h 后,培养基表面堆积了厚重的孢子层,培养至 120 h 止。培养过程中,培养基里的还原糖、水溶性蛋白质及 pH 的变化,如图 2 所示。直接还原糖含量在培养至 48 h 为最大,达 295.9 mg/g(干曲),随后就呈下降趋势。水溶性蛋白质含量在培养 69 h 为最高为 25.97 mg/g(干曲)。起始 pH 为 5.4,最终升为 6.5。

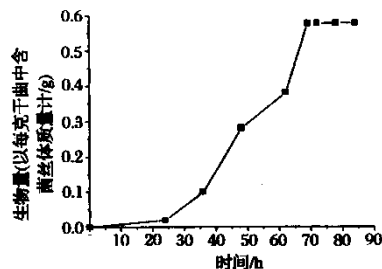
图 2 *T. viride* 菌固态发酵中

还原糖及蛋白质含量变化

—■—还原糖; —●—蛋白质; —▲—pH 值

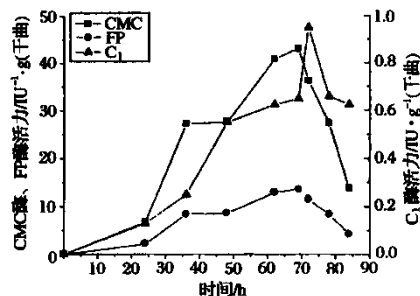
图 3 显示了 *T. viride* 菌株固态发酵过程中的生物量变化情况。随着培养时间增

加,菌丝体含量显现正常的生长变化曲线。在 24 h 前,曲中几乎无菌丝,24 h 后培养基中生物量迅速增加。至 69 h 时培养基中的菌丝体生长趋势进入平衡期,此时培养曲中的生物量达到最大值,为每克干曲中含有 0.575 g 菌丝体。

图 3 *T. viride* 菌的固态发酵生物量变化

2.4 *T. viride* 菌产酶特征

在测定生物量的同时,对 CMC 酶、FP 酶及 C₁ 酶活力进行同步测定,结果见图 4。结合图 3 所示结果可知,*T. viride* 菌的 CMC 酶和 FP 酶生物合成与 *T. viride* 菌的生长具有正相关性,即当培养至 69 h 时,CMC 酶和 FP 酶活力都达到最大值,分别为 43 IU/g(干曲)和 13.6 IU/g(干曲),此时生物量也达到最大值,故该菌在此种方式下培养生产的这 2 种酶的生物合成特征均为同步合成型。而 C₁ 酶活力持续上升,至 72 h 时为最大值 0.95 IU/g(干曲),滞后于上述 2 种酶的合成速度。

图 4 *T. viride* 菌固态发酵过程中纤维素酶系变化情况

3 讨 论

真菌的细胞中含有麦角固醇,可以作为衡量菌丝体质量的标志性物质。本试验建立以 HPLC 测定菌丝体中的麦角固醇的方法,来确立固态发酵过程中的生物量测量手段,方法简便、快速可行。

不同的有机溶剂对固态曲中菌丝体中的麦角固醇抽提会有影响。通过试验比较,丙酮是理想的溶剂。此外抽提时间的长短、溶剂体积大小等也影响麦角固醇的得率。值得一提的是,固态发酵曲中孢子的存在及含量会干扰实际结果。Desgranges 等^[10]在 *Beauveria bassiana* 菌的固态培养及 Dubey 等的酶联免疫吸附法生物量^[6]测定时,都出现同样情况。在本试验过程中,当培养至后期尤其是 84 h 以后,也出现类似情况。由于曲表面堆积了厚重的孢子,干曲中麦角固醇的量也相应增加,不能客观地反映正常的菌丝生长状态。因此建议对产孢菌的固态生物量测定选择恰当时间段,控制产孢量在未达到影响测定结果的范围之内。

本试验方法为工业生产中的固态发酵过程中的生物量测定,以及研究真菌固态发酵产酶机制,提供了一定的参考。

参 考 文 献

- 1 Persson I, Tjerneld F, Hahn-haogerdal B. *Process Biochem.*, 1991, 26: 65~81
- 2 刘 斌,吴 克,蔡敬民等. *生物学杂志*, 2000, 17(2): 17~19
- 3 吴 克,蔡敬民,刘 斌等. *菌物系统*, 2001, 20(2): 191~195
- 4 Narahara A, Kyoama Y, Yoshida T et al. *J. Ferment. Technol.*, 1982, 60: 311~319
- 5 Brezonik P L, Browne F X, Fox J L. *Water Res.*, 1975, 9: 115~162
- 6 Koch A L. *J. Gen. Microbiol.*, 1975, 89: 209~216
- 7 Barak R, Chet I. *Soil Biol. Biochem.*, 1986, 18: 315~319
- 8 Smits J, Rinzema A, Tramper J et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1996, 46: 489~496
- 9 Dubey A K, Suresh C, Umesh Kumar S et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, 50: 299~302
- 10 Desgranges C, Georges M, Vergoignan C et al. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1991, 35: 206~209
- 11 Schwadorf K, Mueller H-M. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1989, 72(3): 457~462
- 12 Mandels M, Weber J. *Adv. Chem. Ser.*, 1969, 95: 391~414
- 13 张树政主编. *酶制剂工业*. 北京: 科学出版社, 1984. 387~653
- 14 Bradeford M M. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248~254
- 15 Miller G L. *Anal. Biochem.*, 1959, 31(3): 416~428

Trichoderma viride Biomass Assay and Its Cellulase Synthesis Characteristic

Wu Ke¹ Yang Benhong¹ Zhang Jie¹ Liu Bin¹

Cai Jingmin¹ Pan Renrui¹ Marinus Meiners²

(¹ Biotechnology Institute, Hefei Union University, Hefei, 230022)

(² University of Applied Sciences Oldenburg/Ostfriesland/Wilhelmshaven, Emden, Germany, 26723)

ABSTRACT The biomass of *Trichoderma viride* in solid state fermentation was assayed by the HPLC. The relationship of fungi to the ergosterol content was studied. The investigation results showed that the best conditions for extracting ergosterol from mycelium in the culture were using acetone with the ratio of 1:25 (m/v) for 1.5 h. The biomass in the culture reached to maximum 0.575 g mycelium/g dry medium after cultured 69h together with CMCase and Fpase activities. The relationship of biomass to CMCase and to FPase showed positive relevance. This indicated that these two enzymes were belong to synchronic synthesis model. C₁ase synthesis speed was delayed to that of CMCase and FPase, its maximum activity appeared after cultured 72 h.

Key words solid state fermentation, ergosterol, *Trichoderma viride*, biomass, cellulase