

木霉 T6 固态罐发酵产淀粉酶与尾气分析*

张洁¹ 吴克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)

T092 A

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

摘要 建立了一个2L玻璃发酵罐的固态通风培养和尾气检测系统。以天然原料麸皮200 g为培养基,加入150 mL Mandels营养盐,接种量 $25\text{ mL}(2 \times 10^8\text{ 孢子/mL})$,自然pH,室温下,对木霉T6进行培养。通过定时取样测定淀粉酶活力,并对尾气(CO_2)连续测定,结果显示,菌体 CO_2 的释放与淀粉酶合成具有相关性,且呈同步关系。说明尾气的 CO_2 含量变化可以作為固态发酵某些产物合成的研究参数。

关键词 固态发酵,发酵罐,淀粉酶,木霉,尾气分析

酶产量的高低与生长代谢有着直接的关系。一般情况下,对于微生物液态培养的生物量测定采用离线检测手段是容易做到的。而在以天然材料为培养基的固态培养中,该参数的检测因无法使菌体与固态培养基分离而难以获得,从而影响了固态生物发酵的过程控制以及发酵动力学的研究。建立固态发酵过程中生物量的测定方法已越来越受到大多数科学家的重视。到目前为止,已报道的固态发酵生物量测定的方法有:葡萄糖胺测定法^[1]、麦角固醇测定法^[2]、酶联免疫吸附法^[3]、基质色泽变化的不同粒子光散射法^[4]、ATP测定法^[5]、 CO_2 释放期的呼吸率^[6]等等。这些方法都在不同程度上描述了它们与生物量间的关系。其中 CO_2 测定是直接有效的方法之一。再加上其可以实现在线检测,可以直接与计算机连接,建模来控制发酵过程。木霉T6菌是一产木聚糖酶活力高的菌株^[7,8]。本文报道了利用一自制的2L固体发酵罐进行木霉菌T6发酵生产淀粉酶并同时在线测定尾气中 CO_2 含量,讨论了T6菌的生物量与产淀粉酶的关系。探寻该菌的淀粉酶产酶机制,建立发酵模型,为其固态发酵的研究及工业化生产打下基础。

1 材料与方法

1.1 菌株

木霉T6(*Trichoderma* sp.)由本课题组提供。在PDA琼脂斜面上28℃培养7d。用无菌蒸馏水将斜面孢子洗脱制成孢子悬液($2 \sim 4 \times 10^8$ 孢子/mL),接入固态发酵培养基。

1.2 培养基及培养条件

200 g 麸皮入2 L烧杯中,加入150 mL Mandels营养盐^[9]和4 g NaNO_3 ^[10]拌匀,自然pH,121℃灭菌30 min,冷却后,用孢子悬液接种拌匀,倒入灭过菌的玻璃发酵罐中(料高18.5 cm)。室温(平均温度20℃)通气培养,通气量为10 L/h。

1.3 样品处理

定时取样约10 g,经冷冻干燥后获得干曲,供测试分析,测定干重及酶活力、还原糖含量、蛋白质含量。

1.4 发酵装置

固态发酵系统见图1。发酵罐为玻璃制圆柱体,总高34 cm,上部高29 cm,内径10 cm,壁厚约4 mm,下部侧面有一入口管,通入增湿的无菌空气,上侧面有一尾气出口管,尾气经干燥瓶后进入 CO_2 分析仪。

第一作者:学士,副教授。

* 德国下萨克森州科文部资助,安徽省教育厅自然科学基金资助项目(No. 2000j1267)

收稿时间:2002-05-18,改回时间:2002-12-24



1.5 分析测定方法

1.5.1 淀粉酶活力

参照 Bernfeld^[11]法。以葡萄糖为标准,每分钟生成 $1\ \mu\text{mol}$ 葡萄糖定义为 1 个酶活力单位。

1.5.2 还原糖

以葡萄糖为标准,采取 DNS 法^[12]测定。

1.5.3 蛋白质

采取 Bradford 比色法测定^[13]。

1.5.4 尾气中 CO_2 含量

由 CO_2 、 O_2 分析仪 (Maihak-Unor610—德国产) 连续测定并记录数据。

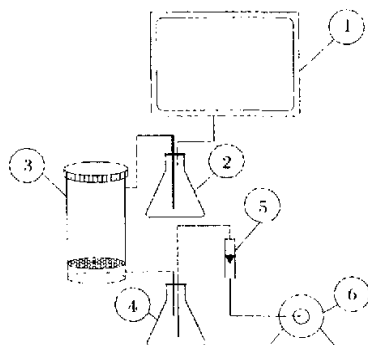


图1 固态发酵系统

① CO_2 、 O_2 分析仪, ② 干燥瓶, ③ 发酵罐,

④ 增湿瓶, ⑤ 流量计, ⑥ 空压机。

2 结果与讨论

2.1 淀粉酶合成过程

以麸皮为唯一碳源的培养基,在室温下,进行 T6 菌的固态罐发酵,获得了其产酶过程曲线,结果见图 2。在发酵开始阶段,曲中孢子萌发生长,培养至 30 h 淀粉酶活力开始上升,并快速增加。接种后的 48 h 出现少量白色菌丝,至 72 h 酶活力达到峰值,约为 $21\ \text{IU/g}$ 干曲。此时发酵罐中生长出大量白色菌丝并在罐壁伴有少量绿色孢子。曲中还原糖含量随时间的变化也与淀粉酶活力呈现相同的趋势(见图 3)。72 h 发酵曲中还原糖含量也达最大值,为 $92\ \text{mg/g}$ 干曲。72 h 后,酶

活力开始下降。96 h 观察曲中出现大量绿色孢子。

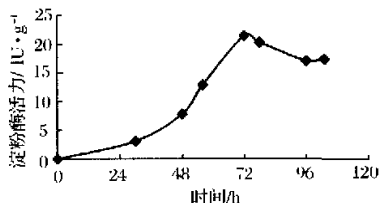


图2 淀粉酶合成曲线

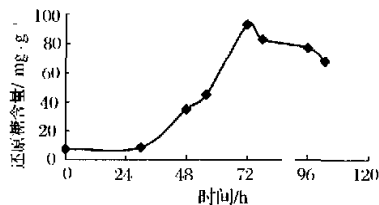


图3 发酵曲中还原糖变化曲线

2.2 淀粉酶比活力变化情况

在试验培养条件下,曲中可溶性蛋白质含量在 48 h 开始上升,并在测定时间内保持增加趋势(见图 4)。淀粉酶比活力在 30 h 也已上升,最大比活力出现在 72 h,为 $83\ \text{IU/mg}$ 蛋白质(见图 5)。

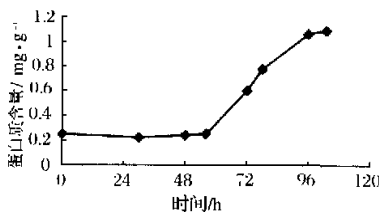


图4 曲中可溶性蛋白质变化曲线

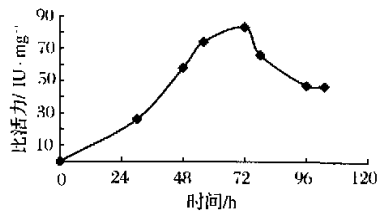


图5 淀粉酶比活力变化曲线

2.3 发酵过程尾气 CO_2 分析

在T6菌发酵过程尾气中,对其尾气的CO₂进行了在线测定(见图6)。从图中结果可看出CO₂变化的情况。从20 h起,尾气CO₂开始上升,40 h后快速增高,在72 h CO₂到达峰值,为5.03%,此时,淀粉酶活力也为最大值,CO₂与酶活力变化趋势相同。尾气中CO₂含量可以反映菌体呼吸代谢的程度,此结果与Mejia利用CO₂在线检测固态发酵生产青霉素的结果评价一致^[14],提示利用木霉T6的淀粉酶固态培养可能为生长关联型的动力学关系。

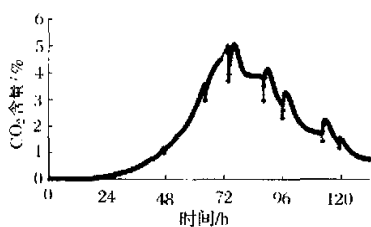


图6 尾气CO₂%的时间曲线

2.4 固态发酵曲失重情况

对发酵曲取样处理,计算出干物料失重情况(见图7)。物料的失重量从20 h开始随发酵的进行而增加,40 h后增加迅速,说明发酵过程菌体代谢处于旺盛期时,随着尾气的释放曲重迅速减少,至72 h,固态发酵曲失重与尾气中CO₂释放趋势一致,可以判断20 h起,菌体开始进入生长阶段,这与尾气CO₂含量的变化是一致的。72 h后,即在CO₂释放率达最大值后发酵曲失重继续增加。

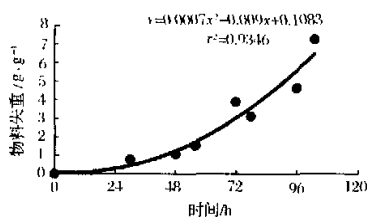


图7 固态曲干物质失重曲线

3 结 语

固态曲盘发酵生产已广泛应用在生物农

药、饲料等行业中。其特点是培养条件简易、快速、容易推广和生产等。但固态发酵存在一个难以解决的问题,即生物量的测定,从而很难对固态发酵过程进行有效控制,限制了这一生产方式的大规模应用。发酵过程中尾气的CO₂是反映菌体生长、代谢的重要参数,实验结果显示,T6菌CO₂的释放与淀粉酶合成之间存在着同步关系。从这一实验结果可以预见,采用尾气CO₂的在线检测,对掌握具有某些特点的固态发酵过程中菌体生长和产物合成的规律是行之有效的方法,为建立发酵过程控制模型提供参数。

参 考 文 献

- 1 Sakurai Y, Lee T H, Shiota H. Biol. Chem., 1977, 41:619~624
- 2 Desgranges C, Vergoignan C, Georges M et al. Appl. Microb. Biotechnol., 1991a, b, 35: 200 ~ 205, 35:206~209
- 3 Dubey A K, Suresh C et al. Appl. Microb. Biotechnol., 1998, 50:299~302
- 4 Ramanamurthy M V, Thakur M S, Karanth N G. Biosensors Bioelectronics, 1993, 8:59~63
- 5 West A W, Ross D J, Cowling J C. Biol. Biochem., 1986, 18:141~148
- 6 Sakurai Y, Misawa S, Shiota H. Agric. Biol. Chem., 1985, 49:745~750
- 7 刘 斌,吴 克,蔡敬民等. 生物学杂志, 2000, 17(2): 17~19
- 8 吴 克,蔡敬民,刘 斌等. 菌物系统, 2001, 20(2): 191~195
- 9 Mandels M, Weber J. Adv. Chem., Series, 1969, 95:391~414
- 10 蔡敬民,吴 克,张 洁等. 工业微生物, 1997, 27(2):1~4
- 11 Bernfeld P. Methods Enzymol., 1955, 1:149~158
- 12 Miller G L. Anal. Chem., 1959, 31(3): 426~428
- 13 Bradford M M. Anal. Biochem., 1976, 72:248~254
- 14 Mejia A, Tomasini A, Barrios Gonzalez J. Advances in Solid State Fermentation. Montpellier: Kluwer Academic Publishers, 1995. 417~426



Amylase Production and Exhaust Gas Analysis of *Trichoderma* sp. in Solid State Fermentation Tank

Zhang Jie¹ Wu Ke¹ 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 A 2 L solid state fermentation glass tank with aeration and exhaust gas analysis system was equipped. *Trichoderma* sp. T6 was cultured at room temperature, nature pH in the medium contained natural material wheat bran 200g, Mandel's nutrient solution 150 mL with inoculum 25 mL (2×10^8 spores/mL). Amylase activity was determined and the exhaust gas was analyzed during fermentation. The result showed that the relationship between the release of carbon dioxide and the synthesis of amylase of mycelium was positive and synchronic. The result showed that the content of carbon dioxide in the end gas was an indicator of mycelium growth in the solid state fermentation.

Key words solid state fermentation, fermentation tank, amylase, *Trichoderma* sp., exhaust gas analysis

我国芦荟产业发展概况

据不完全统计,2000年全球芦荟原料销售约6 000~8 000万美元,终端产品销售达310亿美元,未来几年中全球与芦荟相关产业的产值将超过千亿美元。目前美国市场上各种芦荟产品有1 500多种,我国只有几十种,相关芦荟产品的产值也只有几亿人民币。入世后,国外的芦荟产品已进入我国市场,与发展几十年的国外芦荟产业相比,我国芦荟产业还处于发展初期,我国芦荟行业不能不面对现实,探讨行业的出路问题。

据了解,我国芦荟生产企业销售到化妆品厂的原料并不是很多,芦荟化妆品中只有少数几家真正添加了芦荟原料,多数化妆品企业只是借芦荟可以美容这个概念已被消费者认同而借势搭车来销售产品。芦荟的美容功效确实十分显著,但市场上有了以假充真的产品,难免消费者对芦荟功效产生怀疑。保健品市场,也有些不负责任的企业在利润的驱使下,用一种非洲的芦荟生产保健品,但这种芦荟只含大黄素,不含一般芦荟中的多糖,具有腹泻作用,长期食用对人体无益。真正意义上的芦荟含有芦荟多糖和一些活性物质,它具有缓泻作用,且有双向调节的功能,对人体确有保健作用。另外,芦荟添加量不适、加工过程不合理、有效成分保留不全、原料因受到污染等原因质量下降等,也影响芦荟的营养价值和保健功效。

一些芦荟企业建议,除了已经制定的芦荟制品行业标准以外,相关部门要尽快出台芦荟终端产品的标准,使终端产品的生产和鉴别做到有据可依。目前,我国对芦荟产品的检验多是定性的,定量检测则很少,应尽快建立完善的质量监督和检测机制或者市场准入机制,制定和完善芦荟制品的标准体系,加强产业的规范化管理,只有这样才能保证芦荟产品市场健康有序地发展。

大企业的介入也是芦荟行业发展的关键。芦荟行业目前中小型企业占绝大多数,技术水平、经营管理水平不高,资金不够充足,如果有大的企业集团进入,无论从技术创新能力上、经营管理水平上还是资金注入上,都可以带动芦荟行业从整体上提高一个档次,同时,在芦荟行业可以形成一个有序竞争的环境,经过重新整合,实力不强的小企业自然会被淘汰,整个行业就会发展壮大。

我国的芦荟产业起步于20世纪80年代末,比美国落后了近20年,但已形成了良好的发展势头,并已经初具规模。据芦荟产业联系会的统计,除了西藏、青海外,全国各地都有芦荟的种植,总计约6666hm²,其中云南、海南、广东、江苏、河北、河南、山东等地都在667hm²左右。芦荟及相关产品的种类也日益增多,北京、上海等地用芦荟鲜叶和幼苗制成净菜,直接进入超市;在中高档餐馆内也时常看到各式芦荟菜肴;用不同品种芦荟制成的各种规格的芦荟原料在园内都可看到,如芦荟原汁、浓缩汁、干粉、芦荟油以及芦荟酱、芦荟丁块等;含有芦荟的食品、保健品、化妆品等终端产品更是琳琅满目。同时,生产工艺日趋完善、产品质量稳步提高,芦荟专用的清洗、去皮、切丁机械设备也已在生产中正式使用。生产芦荟产品的厂家已达二十几家,如海南“金芦荟”、福建“智丹”、北京“国荟”、云南“万绿”、河北“华美”、苏州“赛恩”等,都在消费者中享有一定的知名度。