

# TỐI ƯU HÓA PHƯƠNG PHÁP ĐỊNH LƯỢNG SINH KHỐI NẤM DỰA TRÊN ERGOSTEROL TRONG QUÁ TRÌNH LÊN MEN Ở TRẠNG THÁI RẮN

Dương Hiếu Linh<sup>1</sup>, Dietmar Schlosser<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Đại học Việt Đức (VGU), đường Vành đai 4, khu phố 4, phường Thới Hòa, thành phố Bến Cát, tỉnh Bình Dương, Việt Nam

<sup>2</sup>Khoa Sinh thái Vi sinh vật Ứng dụng, Trung tâm Nghiên cứu môi trường Helmholtz - UFZ, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Đức

## TÓM TẮT

Một thách thức lớn trong các quá trình lên men ở trạng thái rắn có liên quan đến sự phát triển/lớn lên không đồng nhất của vi sinh vật trên chất nền rắn, dẫn đến những khó khăn đáng kể trong việc kiểm soát và tối ưu hóa quá trình. Một trở ngại khác là do nấm liên kết chặt chẽ với chất nền và sợi nấm xâm nhập vào vật liệu rắn nên chúng không thể được cân độc lập với chất nền, khiến cho việc xác định trực tiếp trọng lượng khô của sinh khối nấm gần như không thể. Vì việc sử dụng kỹ thuật trực tiếp là không thực tế nên việc sử dụng kỹ thuật ước lượng gián tiếp là lựa chọn thay thế duy nhất. Trong số các kỹ thuật ước lượng gián tiếp, ergosterol đã được chứng minh là một chỉ số phù hợp và nhạy cảm để định lượng sinh khối của nấm sợi. Quá trình phân tích ergosterol được thực hiện theo ba bước: (I) thủy phân và xà phòng hóa mẫu để giải phóng ergosterol khỏi màng huyết tương, (II) chiết xuất ergosterol, và (III) định lượng ergosterol. Trong nghiên cứu này, chúng tôi kiểm nghiệm các thông số cần thiết trong quá trình chiết xuất ergosterol cho việc định lượng sinh khối nấm trong quá trình lên men ở trạng thái rắn sử dụng nấm *Stachybotrys chlorohalonata* (ascomycete). Các thông số khảo sát bao gồm thể tích toluene cần cho việc chiết xuất và số lần chiết. Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng 100 mg mẫu rắn (khô) được chiết xuất với 2 mL toluene (có chứa thêm 125  $\mu$ M phenanthrene (nồng độ cuối cùng) làm chất chuẩn nội) là đủ cho việc định lượng sinh khối nấm. Sinh khối nấm có thể cung cấp những thông tin giá trị cho các nghiên cứu công nghệ sinh học cũng như nghiên cứu sinh thái khi được kết hợp với các thông số khác.

**Từ khóa:** Định lượng sinh khối nấm, ergosterol, kiểm soát và tối ưu hóa quá trình, kỹ thuật ước lượng gián tiếp, lên men ở trạng thái rắn

## ĐẶT VẤN ĐỀ

Quá trình lên men ở trạng thái rắn sử dụng nấm có thể chuyển đổi trực tiếp chất thải từ nông nghiệp và lâm nghiệp thành các hóa chất hữu ích, chất hoạt động bề mặt sinh học, vật liệu composite, và năng lượng sinh học trong khuôn khổ ứng dụng tinh chế sinh học hoặc đơn giản được sử dụng để sản xuất nấm (Duong, 2024). Mặc dù quá trình này mang lại những lợi ích lớn nhưng nó vẫn đặt ra những thách thức đáng kể về mặt giám sát và kiểm soát quá trình (Mondala, 2015; Steudler and Bley, 2015a). Một thách thức lớn trong các quá trình lên men ở trạng thái rắn có liên quan đến sự phát triển/lớn lên không đồng nhất của vi sinh vật trên chất nền rắn, dẫn đến những khó khăn đáng kể trong việc kiểm soát và tối ưu hóa quá trình (Mondala, 2015; Raimbault, 1998; Steudler and Bley, 2015a). Một thách thức khác là do sự gia tăng nhiệt độ cục bộ, gây phá hủy các sản phẩm nhạy cảm với nhiệt như enzyme do biến tính nhiệt (Altwasser *et al.*, 2017; Muller dos Santos *et al.*, 2004). Do đó, những thách thức đòi hỏi phải phát triển các chiến lược kiểm soát phù hợp, lý tưởng nhất là chỉ dựa trên một hoặc một vài tham số, cho phép mô tả đầy đủ đặc tính của quy trình tổng thể trong thời gian ngắn hợp lý (Raimbault, 1998; Steudler and Bley, 2015a). Hơn nữa, dựa trên đặc tính đã biết của quy trình tổng thể, có thể đưa ra các biện pháp thích hợp liên quan đến thiết kế lò phản ứng và các thông số vận hành (Altwasser *et al.*, 2017).

Một trở ngại khác là do nấm liên kết chặt chẽ với chất nền và sợi nấm xâm nhập vào vật liệu rắn khiến cho việc xác định trực tiếp trọng lượng khô của sinh khối nấm gần như không thể (Mitchell *et al.*, 2004). Vì việc sử dụng kỹ thuật trực tiếp là không thực tế nên việc sử dụng kỹ thuật ước lượng gián tiếp là lựa chọn thay thế duy nhất. Nhiều kỹ thuật ước tính gián tiếp đầy hứa hẹn đã có sẵn, ví dụ như dựa trên định lượng các thành phần đặc hiệu tế bào được tìm thấy trong nấm (ergosterol, glucosamine, chitin, axit nucleic, protein, bào tử) (Steudler and Bley, 2015b). Trong số các kỹ thuật này, ergosterol đã được chứng minh là một chỉ số phù hợp và nhạy cảm để định lượng sinh khối của nấm sợi, đặc biệt là nấm basidiomycetes (Steudler and Bley, 2015a). Ergosterol là sterol có nhiều nhất trong màng sinh chất của sợi nấm và có thể chiếm từ 0,7 đến 1% chất khô của nấm (Steudler and Bley, 2015a). Ergosterol không được tìm thấy trong thực vật, động vật hoặc sinh vật khác và chỉ được tìm thấy với lượng tối thiểu ở một số vi khuẩn, động vật nguyên sinh, vi khuẩn lam và các vi tảo khác (Steudler and Bley, 2015a). Quá trình phân tích ergosterol được thực hiện theo ba bước: (I) thủy phân và xà phòng hóa mẫu để giải phóng ergosterol khỏi màng huyết tương, (II) chiết xuất ergosterol, và (III) định lượng ergosterol (Steudler and Bley, 2015a). Mặc dù ergosterol đã được chứng minh là một chỉ số phù hợp và nhạy cảm để định lượng sinh khối của nấm sợi, các thông số trong quá trình phân tích, đặc biệt là bước chiết xuất ergosterol, vẫn cần được nghiên cứu và kiểm nghiệm để đảm bảo tính chính xác của phương pháp.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi kiểm nghiệm các thông số cần thiết trong quá trình chiết xuất ergosterol cho việc định lượng sinh khối nấm trong quá trình lên men ở trạng thái rắn sử dụng nấm *Stachybotrys chlorohalonata* (ascomycete). Các thông số khảo sát bao gồm thể tích toluene cần cho việc chiết xuất và số lần chiết. *S. chlorohalonata* là một loại nấm mốc phổ biến trong môi trường với khả năng sản sinh ra các enzyme phân hủy cellulose, trước đây đã được chứng minh là làm giảm hàm lượng lignin trong rơm lúa mì ở một mức độ nào đó bất chấp các hoạt động không thể phát hiện được của các enzyme biến đổi lignin ngoại bào điển hình (Duong, 2024). Loại nấm này là loài phát triển nhanh và liên quan đến các tòa nhà ẩm ướt, thích các chất nền giàu cellulose (ví dụ: giấy dán tường hoặc ván dăm), và thuộc nhóm nấm mốc đen có khả năng sinh độc tố (Duong, 2024). Ngoài ra, tiền xử lý rơm lúa mì hiệu quả bằng *Stachybotrys* sp. đã được quan sát (Singh *et al.*, 2014).

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

#### Vật liệu

Tất cả các hóa chất đều thuộc loại dùng cho phân tích (cấp gradient trong trường hợp dung môi sắc ký). Tất cả các hóa chất được mua từ Merck, Sigma-Aldrich và Th. Geyer GmbH (Renningen, Đức).

#### Nuôi cấy nấm trên rơm lúa mì

*Stachybotrys chlorohalonata* A-2008-2 (DSM 27588) là loài nấm được dùng cho nghiên cứu, thu được từ bộ sưu tập của Khoa Sinh thái Vi sinh vật Ứng dụng tại Trung tâm Nghiên cứu Môi trường Helmholtz - UFZ (Leipzig, Đức). Chủng nấm này cũng có sẵn tại Bộ sưu tập Vi sinh vật và Nuôi cấy Tế bào Đức (DSMZ; Braunschweig, Đức). Chủng nấm được duy trì trên đĩa thạch chiết xuất mạch nha 2% (w/v) (thạch 1,5%; pH 5,7) ở 28°C trong bóng tối. Nuôi cấy nấm trên rơm lúa mì đã được mô tả chi tiết trong luận án của Duong (2024). Tóm lại, thí nghiệm được thực hiện trong lọ polypropylene. Các lọ được trang bị nắp vặn màng thông hơi (màng PTFE có đường kính 25 mm và độ xốp 0,2 µm, Whatman/GE Healthcare, Đức). Để cấy nấm, các phần thạch (được lấy từ các cạnh của cụm nấm mọc trên đĩa thạch mạch nha) được đồng nhất hóa trong môi trường chiết xuất mạch nha 2% (một phần thạch trên 1 mL môi trường chiết xuất mạch nha) với sự trợ giúp của Ultra-Turrax (Staufen, Đức). Sau đó, 0,5 mL huyền phù nấm thu được được sử dụng để cấy vào 0,5 g rơm lúa mì đã được cắt nhỏ và hấp khử trùng. Rơm lúa mì (đã được cắt nhỏ) không được xử lý bằng bất cứ phương pháp nào được dùng làm đối chứng. Tất cả các mẫu được thực hiện ba lần và ủ ở 28 °C trong 14 ngày. Mẫu sau khi ủ đã được lưu trữ ở -20 °C, sau đó được làm sạch bằng 0,1 M McIlvaine buffer (pH 7,0). Phần chất rắn sau đó được làm khô ở 50 °C trong 48 giờ.

#### Xác định sinh khối nấm dựa trên hàm lượng ergosterol

Phần chất rắn sau khi được làm khô ở trên được đồng nhất bằng máy nghiền bi (Pulverisiette 23; Fritsch, Idar-Oberstein, Đức) ở tốc độ 50 oscillations mỗi giây trong 5 phút và được bảo quản ở nhiệt độ phòng trong điều kiện khô ráo trong bóng tối cho đến khi phân tích sâu hơn về hàm lượng ergosterol (dấu ấn sinh học để xác định sinh khối nấm).

Để xác định hàm lượng ergosterol của nấm, các mẫu đồng nhất rắn (100 mg) được trộn với 1 mL nước khử ion (Q-Gard 2, Millipore, Schwalbach, Đức), 0,5 g KOH, 5 mL methanol, và 1,25 mL ethanol trong ống ly tâm 50-mL (VWR International, Darmstadt, Đức). Sau đó, các ống này được ủ trong điều kiện lắc nhẹ liên tục trong bể nước ở nhiệt độ 70 °C trong 30 phút. Sau khi làm nguội và lắng chất rắn, 4 mL chất nổi phía trên được chuyển tương ứng vào ống ly tâm 15 mL (VWR International). Các ống 15 mL được bổ sung toluene (độ tinh khiết cấp HPLC/UPLC), có chứa thêm 125 µM phenanthrene (nồng độ cuối cùng) làm chất chuẩn nội để cho phép hiệu chỉnh dữ liệu về sự bay hơi dung môi. Quá trình chiết ergosterol được thực hiện trong điều kiện lắc ở tốc độ 150 nhịp/phút trong 1 giờ, sử dụng máy lắc ngang GFL 3018 (Burgwedel, Đức). Sau khi lắc, các ống được để yên cho đến khi đạt được sự tách pha đủ. Sau đó, pha trên (toluene) được chuyển vào lọ UPLC và được bảo quản ở -20 °C cho đến khi thực hiện phân tích sắc ký lỏng siêu hiệu năng (UPLC) bằng hệ thống UPLC. Hai trường hợp thí nghiệm sau đây đã được kiểm nghiệm:

- Trường hợp 1: Trích xuất lần một với 1 mL toluene, sau đó trích xuất thêm lần hai với 1 mL toluene.
- Trường hợp 2: Trích xuất lần một với 2 mL toluene, sau đó trích xuất thêm lần hai với 1 mL toluene.

Để phân tích UPLC về ergosterol, các mẫu (3,3 µL) được đưa vào hệ thống Acquity™ UPLC được trang bị cột Acquity™ UPLC BEH C18 (cỡ hạt 1,7 µm; 2,1 x 50 mm; Waters, Eschborn, Đức) (nhiệt độ cột 40 °C). Dung dịch rửa giải A bao gồm 10% (v/v) methanol (loại gradient; Roth, Đức) trong nước khử ion (Q-Gard 2) và dung dịch rửa giải B là methanol. Cấu hình rửa giải sau đây đã được áp dụng: rửa giải đẳng cấp ở 30% B trong 0,14 phút, tăng tuyến tính lên 99,9% B cho đến 2,6 phút, rửa giải đẳng cấp ở 99,9% B cho đến 3,3 phút, giảm tuyến tính xuống 30% B cho đến 3,35 phút và rửa giải đẳng cấp ở mức 30% B cho đến 4 phút (tốc độ dòng 0,5 mL/phút). Bước sóng phát hiện được đặt tại 278 nm. Việc hiệu chuẩn phương pháp được thực hiện bằng cách sử dụng external ergosterol (thời gian lưu khoảng 3,59 phút) và chất chuẩn phenanthrene (thời gian lưu khoảng 2,67 phút).

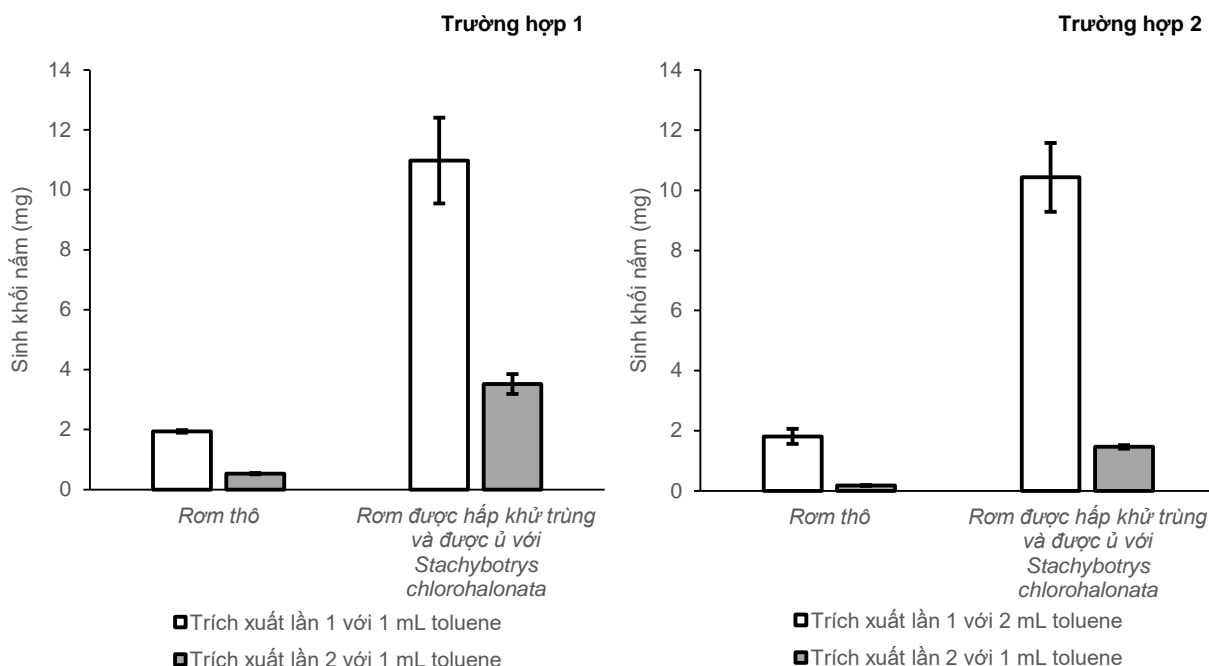
Sinh khối khô của nấm được tính toán dựa trên giá trị được báo cáo là 5,4 mg ergosterol trên g sinh khối khô của nấm (Klamer, Baaht, 2004).

**Phân tích thống kê**

Các ngoại lệ (outlier) trong số các bộ dữ liệu ba lần được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm Dean-Dixon. Bài kiểm tra f-tests và Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi được thực hiện bằng Microsoft® Excel® 2013 (phiên bản 15.0.5327.1000).

**KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

Hình 1 và Bảng 1 trình bày sinh khối nấm (mg) được tính toán dựa trên ergosterol và được trích xuất từ 100 mg trọng lượng khô của rơm thô (không được xử lý bằng bất cứ phương pháp nào) hoặc rơm được hấp khử trùng và được ủ với *S. chlorohalonata* cho hai trường hợp được kiểm nghiệm. Kết quả thí nghiệm cho thấy rằng lượng sinh khối nấm trích xuất từ lần hai luôn thấp hơn so với lượng sinh khối được chiết xuất ở lần một, và sinh khối nấm của rơm được ủ với *S. chlorohalonata* luôn cao hơn so với rơm thô.



**Hình 1. Sinh khối nấm (mg) được tính toán dựa trên ergosterol cho hai trường hợp thí nghiệm**

**Bảng 1. Sinh khối nấm (mg) được tính toán dựa trên ergosterol cho hai trường hợp thí nghiệm**

		Rơm thô	Rơm được hấp khử trùng và được ủ với <i>S. chlorohalonata</i>
Trường hợp 1	Trích xuất lần một với 1 mL toluene	1,9 ± 0,04	11,0 ± 1,43
	Trích xuất lần hai với 1 mL toluene	0,5 ± 0,02	3,5 ± 0,33
Trường hợp 2	Trích xuất lần một với 2 mL toluene	1,8 ± 0,25	10,4 ± 1,15
	Trích xuất lần hai với 1 mL toluene	0,2 ± 0,01	1,5 ± 0,06

Kết quả f-tests (Bảng 2) cho thấy Student's t-tests với phương sai bằng nhau nên được áp dụng ( $P > 0,05$ ). Kết quả Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi (Bảng 3) cho thấy không có sự khác biệt đáng kể giữa việc trích xuất lần một với 1 mL toluene (trường hợp 1) hay 2 mL toluene (trường hợp 2) ( $P > 0,05$ ). Tuy nhiên, ở lần trích xuất thứ hai, sinh khối nấm thu được đã có sự khác biệt đáng kể giữa hai trường hợp ( $P < 0,05$ ). Ngoài ra, trường hợp 1 cho thấy rằng lượng sinh khối thu được ở lần trích xuất thứ hai khoảng từ 27,4 đến 32,1% so với lần trích đầu tiên, trong khi đó lượng sinh khối ở lần trích xuất thứ hai của trường hợp 2 chỉ dao động từ 10,0 đến 14,1% so với lần đầu (Bảng 4). Kết quả này cho thấy rằng chỉ với một lần trích xuất với 2 mL toluene (trường hợp 2), hầu hết lượng ergosterol có thể được thu thập. Do đó, các thông số của trường hợp 2 được đề xuất sử dụng cho nghiên cứu trong tương lai.

Phương pháp xác định hàm lượng ergosterol đã được chứng minh là rất chính xác và có thể lặp lại nhưng cũng rất tốn thời gian và công sức (Matcham *et al.*, 1985; Steudler and Bley, 2015a). Steudler and Bley (2015b) đã so sánh các phương pháp khác nhau trong quá trình lên men ở trạng thái rắn của *Trametes hirsute* (basidiomycete) để tìm ra phương pháp phù hợp và chính xác để định lượng sinh khối nấm. Các phép đo hàm lượng ergosterol, số lượng hạt nhân, và hô hấp cho thấy ước tính sinh khối đáng tin cậy nhất (Steudler and Bley, 2015b). Trong

nghiên cứu này, chúng tôi kiểm nghiệm các thông số cần thiết trong quá trình chiết xuất ergosterol cho việc định lượng ergosterol trong quá trình lên men ở trạng thái rắn sử dụng nấm *S. chlorohalonata* (ascomycete). Kết quả nghiên cứu cho thấy rằng 100 mg mẫu rắn (khô) được chiết xuất với 2 mL toluene là đủ cho việc định lượng sinh khối nấm. Kết quả của nghiên cứu này cũng hỗ trợ cho các phát hiện trước đây được trình bày bởi Reeslev và đồng tác giả (Reeslev *et al.*, 2003).

Kết quả của nghiên cứu sẽ góp phần vào những nghiên cứu trong tương lai, khi kết hợp với các chỉ số khác (như là dữ liệu đo nhiệt lượng sinh học). Sinh khối nấm đã được chứng minh có sự tương quan chặt chẽ với dữ liệu đo nhiệt lượng sinh học, và chỉ số  $Y_{Q/X}$  (nhiệt trao đổi chất được giải phóng trên mỗi đơn vị sinh khối nấm) có thể được dùng để định lượng sinh khối nấm cho các quá trình lên men ở trạng thái rắn cho đơn loài (Duong, 2024). Xa hơn nữa, chỉ số  $Y_{Q/X}$  có thể được dùng cho các nghiên cứu sinh thái nấm và cho các mục đích công nghệ sinh học (Duong, 2024).

**Bảng 2. Kết quả kiểm tra f-tests được thực hiện bằng Microsoft® Excel® 2013 khi so sánh kết quả của trường hợp 1 và trường hợp 2**

	Rơm thô	Rơm được hấp khử trùng và được ủ với <i>S. chlorohalonata</i>
Trích xuất lần một	0,06	0,78
Trích xuất lần hai	0,64	0,06

**Bảng 3. Kết quả kiểm tra Student's t-tests hai mẫu (hai mặt) không ghép đôi được thực hiện bằng Microsoft® Excel® 2013 khi so sánh kết quả của trường hợp 1 và trường hợp 2**

	Rơm thô	Rơm được hấp khử trùng và được ủ với <i>S. chlorohalonata</i>
Trích xuất lần một	0,44	0,64
Trích xuất lần hai	0,00001	0,00044

**Bảng 4. Phần trăm trích xuất của lần trích thứ hai so với lần trích đầu tiên. Dữ liệu tính toán được lấy từ Bảng 1. Độ lệch chuẩn được tính toán dựa trên quy tắc lan truyền lỗi Gaussian**

	Rơm thô	Rơm được hấp khử trùng và được ủ với <i>S. chlorohalonata</i>
Trường hợp 1	27,4 ± 1,10	32,1 ± 5,15
Trường hợp 2	10,0 ± 1,53	14,1 ± 1,64

## KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã kiểm nghiệm các thông số của quá trình chiết ergosterol, bao gồm số lần chiết và thể tích toluene cần cho quá trình chiết, từ đó có thể định lượng sinh khối nấm trong các quá trình lên men ở trạng thái rắn sử dụng nấm. Dựa trên các kết quả kiểm nghiệm, chúng tôi đưa ra kết luận rằng 100 mg mẫu rắn (khô) được chiết xuất với 2 mL toluene (có chứa thêm 125 µM phenanthrene (nồng độ cuối cùng) làm chất chuẩn nội) là đủ cho việc định lượng sinh khối nấm. Kết quả của nghiên cứu sẽ góp phần vào những nghiên cứu trong tương lai và sinh khối nấm có thể cung cấp những thông tin giá trị cho các nghiên cứu công nghệ sinh học cũng như nghiên cứu sinh thái khi được kết hợp với các thông số khác.

**Lời cảm ơn:** Chúng tôi xin cảm ơn Hauke Harms, Thomas Maskow, Sven Paufler, Madlen Schubert, Stefanie Loth, Claudia Heber, Martina Kolbe, Katrin Lübke, Chau Nguyen, Quynh Nguyen, và Han Nguyen vì sự hỗ trợ tuyệt vời về thực nghiệm và kỹ thuật cũng như hỗ trợ về mặt phương pháp. Chúng tôi cũng chân thành cảm ơn sự tài trợ từ Đề án Đào tạo giảng viên có trình độ tiến sĩ cho các trường đại học, cao đẳng giai đoạn 2010-2020 (Đề án 911) của Chính phủ Việt Nam cho học bổng Tiến sĩ của Dương Hiếu Linh tại Đức. Công trình này được hỗ trợ bởi Hiệp hội các Trung tâm Nghiên cứu Đức Helmholtz trong khuôn khổ Nền tảng Tích hợp "Tapping nature's potential for sustainable production and a healthy environment" tại UFZ.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Altwaser V, Pätz RR, Lemke T, Paufler S, Maskow T (2017). A simple method for the measurement of metabolic heat production rates during solid-state fermentations using β-carotene production with *Blakeslea trispora* as a model system. *Eng Life Sci* 17, 620–628. <https://doi.org/10.1002/elsc.201600208>
- Duong HL (2024). Fungal Decomposition of Lignocellulosic Solid Substrates: Applicability and Information Value of Biocalorimetry for Ecological and Biotechnological Research. *PhD dissertation. Faculty of Life Sciences, University of Leipzig, Germany*. Available at: <https://phucvu.thuvientphcm.gov.vn/Viewer/EBook/794048>
- Klamer M, Bååth E (2004). Estimation of conversion factors for fungal biomass determination in compost using ergosterol and PLFA 18:2ω6,9. *Soil Biol Biochem* 36, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.08.019>
- Matcham SE, Jordan BR, Wood DA (1985). Estimation of fungal biomass in a solid substrate by three independent methods. *Appl Microbiol Biotechnol* 21, 108–112. <https://doi.org/10.1007/BF00252371>

- Mitchell DA, Von Meien OF, Krieger N, Dalsenter FDH (2004). A review of recent developments in modeling of microbial growth kinetics and intraparticle phenomena in solid-state fermentation. *Biochem Eng J.* 17, 15–26. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00120-7](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00120-7)
- Mondala AH (2015). Direct fungal fermentation of lignocellulosic biomass into itaconic, fumaric, and malic acids: current and future prospects. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42, 487–506. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1575-4>
- Muller dos Santos M, Souza Da Rosa A, Dal'Boit S, Mitchell DA, Krieger N (2004). Thermal denaturation: Is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? *Bioresour Technol* 93, 261–268. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2003.11.007>
- Raimbault M (1998). General and microbiological aspects of solid substrate fermentation. *Electron J Biotechnol* 1, 174–188. <https://doi.org/10.2225/vol1-issue3-fulltext-9>
- Reeslev M, Miller M, Nielsen KF (2003). Quantifying mold biomass on gypsum board: Comparison of ergosterol and beta-N-acetylhexosaminidase as mold biomass parameters. *Appl Environ Microbiol* 69, 3996–3998. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.7.3996-3998.2003>
- Singh S, Harms H, Schlosser D (2014). Screening of ecologically diverse fungi for their potential to pretreat lignocellulosic bioenergy feedstock. *Appl Microbiol Biotechnol* 98, 3355–3370. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5563-4>
- Stuedler S, Bley T (2015a). Better one-eyed than blind—Challenges and opportunities of biomass measurement during solid-state fermentation of basidiomycetes. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 149, 223–252. [https://doi.org/10.1007/10\\_2014\\_300](https://doi.org/10.1007/10_2014_300)
- Stuedler S, Bley T (2015b). Biomass estimation during macro-scale solid-state fermentation of basidiomycetes using established and novel approaches. *Bioprocess Biosyst Eng* 38, 1313–1323. <https://doi.org/10.1007/s00449-015-1372-0>

## OPTIMIZATION OF A METHODOLOGY FOR THE QUANTIFICATION OF FUNGAL BIOMASS BASED ON ERGOSTEROL IN SOLID-STATE FERMENTATION PROCESSES

Duong Hieu Linh<sup>1\*</sup>, Dietmar Schlosser<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Vietnamese-German University (VGU), Ring Road 4, Quarter 4, Thoi Hoa Ward, Ben Cat City, Binh Duong Province, Vietnam

<sup>2</sup>Department of Applied Microbial Ecology, Helmholtz-Centre for Environmental Research - UFZ, Permoserstraße 15, 04318 Leipzig, Germany

### SUMMARY

A major challenge in solid-state fermentation processes is related to the inhomogeneous microbial growth on solid substrates, leading to significant difficulties in process control and optimization. Another obstacle is that because fungi bind tightly to the substrate and mycelia penetrate into the solid material, they cannot be weighed independently of the residual substrate, making it almost impossible to determine directly the dry weight of fungal biomass. Since the use of a direct techniques is impractical, the use of an indirect estimation technique is the only alternative. Among the indirect estimation techniques, ergosterol has been shown to be a suitable and sensitive indicator for quantifying the biomass of filamentous fungi. Ergosterol analysis is performed in three steps: (I) hydrolysis and saponification of the sample to release ergosterol from the plasma membrane, (II) ergosterol extraction, and (III) ergosterol quantification. In this study, we test the necessary parameters in the ergosterol extraction step for the quantification of fungal biomass in solid-state fermentation using the ascomycete *Stachybotrys chlorohalonata*. The parameters include the volume of toluene needed for extraction and the number of extraction times. The results of the study show that 100 mg of solid (dry) sample extracted with 2 mL of toluene (containing an addition of 125 µM phenanthrene (final concentration) as internal standard) is sufficient for the quantification of fungal biomass. Fungal biomass may provide valuable information for biotechnological research as well as ecological research when combined with other parameters.

**Keywords:** Ergosterol, indirect estimation techniques, process control and optimization, quantification of fungal biomass, solid-state fermentation.

\* Author for correspondence: Tel: 0906464666; Email: linh.duong@vgu.edu.vn