



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107699552 B

(45)授权公告日 2018.10.23

(21)申请号 201711181390.7

C12R 1/885(2006.01)

(22)申请日 2017.11.23

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107699552 A

梅炼等.绿色木霉的选育及固态发酵产纤维素酶的研究.《可再生能源》.2013,第31卷(第11期),第94-100页.

(43)申请公布日 2018.02.16

审查员 冷千里

(73)专利权人 中国科学院近代物理研究所

地址 730000 甘肃省兰州市城关区南昌路509号

(72)发明人 王曙阳 董妙音 肖国青 李文建
陈积红 许富强

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 关畅

(51)Int.Cl.

C12N 9/42(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

一种提高绿色木霉产纤维素酶酶活的方法

(57)摘要

本发明公开了一种提高绿色木霉产纤维素酶酶活的方法。本发明通过在绿色木霉种子培养基中添加一定浓度的 Al_2O_3 微粒,使发酵液中绿色木霉菌球直径明显变小,从而显著的提高了纤维素酶的酶活。本发明通过控制发酵液中菌球直径来提高绿色木霉产纤维素酶酶活的方法简单易行,使用范围广,可用于工业化纤维素酶的发酵生产,为纤维素酶的商业化生产提供新的视角。

1. Al₂O₃微粒在如下(1)-(4)中任一种中的应用:

- (1) 调控绿色木霉生产的纤维素酶的酶活;
- (2) 制备调控绿色木霉生产的纤维素酶的酶活的产品;
- (3) 调控绿色木霉的菌球形态;
- (4) 制备调控绿色木霉的菌球形态的产品。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在於:

所述纤维素酶的酶活为滤纸酶活和/或内切葡聚糖苷酶酶活;
或,所述菌球形态为菌球直径。

3. 一种绿色木霉生产纤维素酶的方法,包括如下步骤:

(1) 将绿色木霉接种于种子培养基中进行种子培养,得到种子液;

所述种子培养基中含有Al₂O₃微粒;

所述Al₂O₃微粒在所述种子培养基中的浓度为1-10 g/L;

(2) 将所述种子液接种于发酵培养基中进行发酵培养,得到所述纤维素酶。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在於:

所述发酵培养中每隔15-30h检测发酵液的滤纸酶活和内切葡聚糖苷酶活,直至所述酶活不在增加时结束发酵;

或,所述种子培养的条件为28-32°C, 200rpm培养12-24 h;

或,所述发酵培养的条件为28-32°C, 200rpm培养4-7天。

5. 一种调控绿色木霉菌球直径的方法,包括如下步骤:向绿色木霉培养体系中添加Al₂O₃微粒,通过调控所述Al₂O₃微粒在所述培养体系中的浓度来调控菌球直径大小;所述Al₂O₃微粒在所述培养体系中的浓度为1-10 g/L;

所述菌球直径根据Al₂O₃微粒在所述培养体系中的浓度计算得到;所述计算公式如下: $Y = 105.3 + 336.81e^{-c/7.32}$,

c为Al₂O₃微粒在所述培养体系中的浓度;

Y为菌球直径。

6. 权利要求5所述的方法在绿色木霉生产纤维素酶中的应用。

一种提高绿色木霉产纤维素酶酶活的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物过程工程控制领域,具体涉及纤维素酶发酵过程中在种子瓶培养时通过添加 Al_2O_3 微粒控制菌球直径来提高纤维素酶酶活的方法。

背景技术

[0002] 纤维素酶是一种重要的商业用酶,广泛的应用于食品、饲料、纺织、淀粉处理、造纸业、乙醇发酵和酿酒业等工业领域。由于燃料乙醇行业的迅速发展,推动了纤维素酶行业的高速发展,但是由于纤维素酶生产存在着生产成本低、酶产量低等缺点,严重制约了相关行业的发展。因此,许多研究者致力于降低纤维素酶生产成本、提高酶产量的研究。

[0003] 由于纤维素酶的主要生产者为丝状真菌,而丝状真菌在生产过程中形态复杂,不仅在发酵罐的不同部位生长的不尽相同,而且在不同培养基和生理条件下也是形态各异。丝状真菌的菌丝形态在液体发酵中主要呈现为分散的菌丝状和缠绕致密的菌球状。而发酵中不同的菌丝形态对代谢产物的分泌合成有着强烈的影响,因为不同的菌丝形态在发酵过程中影响着发酵的传质(主要为氧传质和营养传质)。所以分散的菌丝或较小直径的菌球比大直径菌球能够更好的为发酵生产提供传质。但是分散的菌丝增加了发酵液的粘稠度,也不利于发酵过程的进行。

[0004] 通常来说,丝状真菌的形态可以分为分散菌丝(Dispersed mycelia)、聚集成簇(Clumps)和成团结球(Dense pellets)三类。丝状真菌的液体培养往往伴随着高度非牛顿特性以及菌体形态的变化,其每一种代谢产物都对应于其特定的形态,而这种菌体形态的变化是较难检测及控制的,尤其是对于某一特定代谢产物的最优生产形态,并且其变化会伴随着发酵液流变特性、传质特性及混合特性的变化。目前有文献报道的影响菌体形态的因素包括接种量、接种方式、培养基组分、溶氧水平、环境pH、温度、搅拌转速、发酵罐规模、发酵罐形式、搅拌形式与功率输入等,但这些因素都只是在菌丝形态形成后有略微的影响,并不能从根本上改变以及控制菌丝形态。

发明内容

[0005] 本发明的第一个目的是提供 Al_2O_3 微粒的新用途。

[0006] 本发明提供了 Al_2O_3 微粒在如下(1)-(6)中任一种中的应用:

[0007] (1) 调控绿色木霉生产的纤维素酶的酶活;

[0008] (2) 制备调控绿色木霉生产的纤维素酶的酶活的产品;

[0009] (3) 绿色木霉生产纤维素酶;

[0010] (4) 制备绿色木霉生产纤维素酶的产品;

[0011] (5) 调控绿色木霉的菌球形态;

[0012] (6) 制备调控绿色木霉的菌球形态的产品。

[0013] 上述应用中,所述纤维素酶的酶活为滤纸酶活和/或内切葡聚糖苷酶酶活。所述酶活力单位定义如下:以每毫升酶液在每分钟内水解反应体系中的底物生成每微克葡萄糖的

酶量定义为1个酶活单位(U)。

[0014] 上述应用中,所述菌球形态为菌球直径。所述调控绿色木霉生产的纤维素酶的酶活是通过调控绿色木霉菌球直径来实现的。

[0015] 本发明的第二个目的是提供一种绿色木霉生产纤维素酶的方法。

[0016] 本发明提供的绿色木霉生产纤维素酶的方法包括如下步骤:

[0017] (1) 将绿色木霉接种于种子培养基中进行种子培养,得到种子液;

[0018] 所述种子培养基中含有 Al_2O_3 微粒;

[0019] (2) 将所述种子液接种于发酵培养基中进行发酵培养,得到所述纤维素酶。

[0020] 上述方法中,所述 Al_2O_3 微粒在所述种子培养基中的浓度为1-30g/L,所述 Al_2O_3 微粒在所述种子培养基中的浓度优选为10g/L。

[0021] 上述方法中,所述 Al_2O_3 微粒的粒径小于40 μm 。

[0022] 上述方法中,所述种子培养基(1L)的配方如下:50g蔗糖、5g蛋白胨、0.3g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、4g $(NH_4)_2SO_4$ 、2g KH_2PO_4 、0.3g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.005g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.0016g $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、0.0014g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.002g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$,蒸馏水定容到1000mL;

[0023] 所述发酵培养基的配方如下:50g蔗糖、3g蛋白胨、0.4g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、5g $(NH_4)_2SO_4$ 、2g KH_2PO_4 ,蒸馏水定容到1000mL。

[0024] 上述方法中,所述绿色木霉的孢子悬浮液按体积分数为4-10%的接种比例接种至种子培养基中;所述种子液按体积分数为4-10%的接种比例接种至发酵培养基;所述接种比例具体为5%。

[0025] 上述方法中,所述发酵培养中每隔15-30h检测发酵液的滤纸酶活和内切葡聚糖苷酶活,直至所述酶活不在增加时结束发酵。在实际操作时,两种酶具有较好的协同性,基本保持一致的变化趋势。当两种酶的变化趋势不一致时,一般以FPA酶的酶活为参考依据。

[0026] 上述方法中,所述种子培养的条件为28-32 $^{\circ}C$,200rpm培养12-24h;所述发酵培养的条件为28-32 $^{\circ}C$,200rpm培养4-7天。

[0027] 本发明的第三个目的是提供一种绿色木霉生产纤维素酶的方法。

[0028] 本发明提供的绿色木霉生产纤维素酶的方法包括将绿色木霉进行发酵培养的步骤:

[0029] 所述绿色木霉在发酵培养体系中的菌球直径为190-200 μm ,所述菌球直径优选为192.9 μm 。

[0030] 本发明的第四个目的是提供一种调控绿色木霉菌球直径的方法。

[0031] 本发明提供的调控绿色木霉菌球直径的方法包括如下步骤:向绿色木霉培养体系中添加 Al_2O_3 微粒,通过调控所述 Al_2O_3 微粒在所述培养体系中的浓度来调控菌球直径大小;所述菌球直径可根据 Al_2O_3 微粒在所述培养体系中的浓度计算得到;所述计算公式如下: $Y = 105.3 + 336.81e^{-c/7.32}$,

[0032] c为 Al_2O_3 微粒在所述培养体系中的浓度(g/L);

[0033] Y为菌球直径(μm)。

[0034] 上述调控绿色木霉菌球直径的方法在绿色木霉生产纤维素酶中的应用也属于本发明的保护范围。

[0035] 本发明最后一个目的是提供一种产品;所述产品的活性成分为 Al_2O_3 微粒;

[0036] 所述产品的功能为如下1)-3)中任一种:

[0037] 1) 调控绿色木霉生产的纤维素酶的酶活;

[0038] 2) 绿色木霉生产纤维素酶;

[0039] 3) 调控绿色木霉的菌球形态。

[0040] 上述产品中,所述纤维素酶的酶活为滤纸酶活和/或内切葡聚糖苷酶酶活;所述菌球形态为菌球直径。

[0041] 上述应用或上述方法或上述产品中,所述绿色木霉*Trichoderma viride*为绿色木霉My菌株,其是由绿色木霉GSTCC 62010 (NM01) 和黑曲霉GSTCC 60108 (NH01) 菌株经混合发酵选育得到的高产纤维素酶菌株。

[0042] 本发明提供了一种定量的控制绿色木霉形态的方法——形态工程学方法,并将其引入到绿色木霉的发酵过程中,通过在培养体系中添加一定浓度的微粒颗粒来控制相应的菌丝形态,从而来提高绿色木霉在摇瓶中生产纤维素酶的酶活。通过实验证明:在种子培养基中添加 Al_2O_3 微粒后,发酵液中的菌球直径显著减小,在 Al_2O_3 微粒浓度为10g/L的条件下纤维素酶的酶活最高,其FPA酶活从519.11U/mL提高到607.35U/mL、EG酶活从810.08U/mL提高到917.59U/mL,与对照相比分别提高了17.1%和13.3%。 Al_2O_3 的添加能够明显改变绿色木霉的菌球形态,从而提高纤维素酶的酶活。此外,拟合了添加 Al_2O_3 微粒后菌球直径的预测数学模型,此模型可以通过添加一定浓度的 Al_2O_3 来定量的预测菌球直径以达到产酶的最佳形态。本发明通过应用形态工程学技术和数学建模手段为纤维素酶的商业化生产提供新的视角。

附图说明

[0043] 图1为绿色木霉种子培养基中添加不同浓度的 Al_2O_3 在发酵到120h时对纤维素酶活和菌球直径的影响。

[0044] 图2为在绿色木霉种子培养基中添加不同浓度的 Al_2O_3 培养24h后的菌球直径的图像分析。A: control (0g/L); B: 1g/L; C: 3g/L; D: 5g/L; E: 10g/L; F: 15g/L; G: 20g/L; H: 30g/L; 标尺长度为500 μ m。

[0045] 图3为纤维素酶发酵培养中添加不同浓度的 Al_2O_3 对菌球直径的影响。

[0046] 图4为种子培养24h后菌球直径与 Al_2O_3 添加浓度之间的关系。黑色方块代表菌球直径实测值;直线代表菌球直径数学模型预测值。

[0047] 图5为黑曲霉种子培养基中添加不同浓度的 Al_2O_3 在发酵到120h时FPA和CMC酶活。

[0048] 图6为在黑曲霉种子培养基中添加不同浓度的 Al_2O_3 培养24h后的菌球直径的图像分析。A: control (0g/L); B: 1g/L; C: 3g/L; D: 5g/L; E: 10g/L; F: 15g/L; G: 20g/L; H: 30g/L; 标尺长度为500 μ m。

[0049] 图7为发酵培养中菌丝形态变化情况。其中,添加浓度为3、10、20、30g/L的菌球体在发酵培养48h后结成团块状存在。

具体实施方式

[0050] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0051] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0052] 下述实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0053] 下述实施例中的绿色木霉My菌株是由绿色木霉GSTCC 62010 (NM01) 和黑曲霉GSTCC60108 (NH01) 菌株经混合发酵选育得到的高产纤维素酶菌株,记载于文献“Wang S-Y, Jiang B-L, Zhou X, Chen J-H, Li W-J, Liu J, et al. Study of a High-Yield Cellulase System Created by Heavy-Ion Irradiation-Induced Mutagenesis of *Aspergillus niger* and Mixed Fermentation with *Trichoderma reesei*. PLoS ONE 10 (12): e0144233. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144233>)”中,公众可从中国近代物理研究所获得。My菌株保存在PDA斜面上,每两周传代一次。在发酵前,斜面用质量分数为0.1%的蛋白胍水洗下孢子悬液,并用血球计数板将孢子浓度调至为 10^6 个/mL,得到My菌株孢子悬浮液。

[0054] 下述实施例中的黑曲霉NH11-1菌株是由黑曲霉GSTCC 60108 (NH01) 菌株经碳离子束辐照诱变选育得到的高产纤维素酶菌株,记载于文献“Wang S-Y, Jiang B-L, Zhou X, Chen J-H, Li W-J, Liu J, et al. Study of a High-Yield Cellulase System Created by Heavy-Ion Irradiation-Induced Mutagenesis of *Aspergillus niger* and Mixed Fermentation with *Trichoderma reesei*. PLoS ONE 10 (12): e0144233. (<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144233>)”中,公众可从中国近代物理研究所获得。

[0055] 下述实施例中的种子培养基的配方:50g蔗糖、5g蛋白胍、0.3g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、4g $(NH_4)_2SO_4$ 、2g KH_2PO_4 、0.3g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 、0.005g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.0016g $MnSO_4 \cdot H_2O$ 、0.0014g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、0.002g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$,蒸馏水定容到1000mL。

[0056] 下述实施例中的发酵培养基的配方:50g蔗糖、3g蛋白胍、0.4g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、5g $(NH_4)_2SO_4$ 、2g KH_2PO_4 ,蒸馏水定容到1000mL。

[0057] 下述实施例中的 Al_2O_3 微粒是Sigma-Aldrich的产品,货号为11037,粉末状固体,粒径 $<40\mu m$ 。

[0058] 下述实施例中的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液(pH 4.8)配方如下:将9.86mL 0.2mol/L的 Na_2HPO_4 溶液(Na_2HPO_4 溶液的浓度为28.40g/L)和10.14mL 0.1mol/L柠檬酸溶液(柠檬酸溶液的浓度为21.01g/L)混匀,得到 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲液。

[0059] 下述实施例中的DNS配方如下:首先称取6.3g的3,5-二硝基水杨酸,置于约600ml水中,逐渐加入20g的NaOH,在50℃水浴中搅拌溶解,再依次加入182g酒石酸钾钠,5g重蒸苯酚,5g无水 Na_2SO_3 ,搅拌溶解并冷却后于容量瓶中定容至1L,贮存在棕色瓶中,即为DNS溶液。

[0060] 下述实施例中的CMC-Na溶液配方如下:称取羧甲基纤维素钠(CMC-Na) 2.00g,加入100mL pH 4.8的 Na_2HPO_4 -柠檬酸缓冲溶液中加热搅拌均匀,即为质量分数为2%的CMC-Na溶液。

[0061] 实施例1、 Al_2O_3 微粒在调控木霉生产的纤维素酶酶活及菌球直径中的应用

[0062] 一、发酵生产纤维素酶

[0063] 1、种子培养

[0064] 将My菌株孢子悬浮液按体积分数为5%的接种比例接种至种子培养基中进行种子培养,在30℃、200rpm的条件下培养24小时后,得到种子液;

[0065] 上述种子培养基是将 Al_2O_3 微粒作为形态控制剂添加到种子培养基中得到的培养基, Al_2O_3 微粒在种子培养基中的浓度分别为0g/L、1g/L、3g/L、5g/L、10g/L、15g/L、20g/L和

30g/L。

[0066] 2、发酵培养

[0067] 将步骤1得到的种子液按体积分数为5%的接种比例接种至发酵培养基中进行发酵培养,在30℃、200rpm的条件下发酵培养5天后,得到发酵液。

[0068] 发酵培养过程中每24h取一次样,测定发酵液中的酶活和菌球直径。另外在发酵结束后,测定发酵液的最终pH值。

[0069] 上述种子培养和发酵培养均在250ml (装液量50ml) 三角瓶中进行。

[0070] 二、Al₂O₃微粒的添加对绿色木霉纤维素酶活的影响

[0071] 将步骤一获得的发酵液4000rpm,4℃离心10min,取上清液即为粗酶液,然后进行纤维素酶酶活的测定。纤维素酶酶活的测定包括滤纸酶活(FPA)和内切葡聚糖苷酶(EG)酶活的测定。

[0072] FPA酶活和EG酶活的测定方法如下:

[0073] FPA酶活:实验组:每个1.5mL离心管中放置4×4mm滤纸片一张,添加40uL Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液(pH 4.8),使滤纸片浸入在缓冲液中,添加20uL粗酶液,在50℃金属浴上反应1h,反应结束后每个反应体系中添加140uL DNS于95℃振荡型金属浴上反应5min,迅速冷却。空白对照组:每个1.5mL离心管中放置4×4mm滤纸片一张,添加40uL Na₂HPO₄-柠檬酸缓冲液(pH 4.8),使滤纸片浸入在缓冲液中,在50℃金属浴上反应1h,反应结束后添加20uL粗酶液,每个反应体系中添加140uL DNS,于95℃振荡型金属浴上反应5min,迅速冷却。每个96孔板中添加140uL蒸馏水,将空白样及待检样品分别混匀使其颜色分布均匀后取40uL加入96孔酶标板中,使用酶标仪在520nm下检测其OD值。

[0074] EG酶活的测定:实验组:每个1.5mL离心管中添加40uL CMC-Na溶液及20uL粗酶液,在50℃金属浴上反应30min,每个反应体系中添加140uL DNS,在95℃金属浴上反应5min迅速冷却。空白对照组:每个1.5mL离心管中添加40uL CMC-Na溶液,在50℃金属浴上反应1h,反应结束后添加20uL粗酶液,每个反应体系中添加140uL DNS,于95℃振荡型金属浴上反应5min,迅速冷却。每个96孔板中添加140uL蒸馏水,将空白样及待检样品分别混匀使其颜色分布均匀后取40uL加入96孔板中,使用酶标仪在520nm下检测其OD值。

[0075] 测得的OD值通过葡萄糖标准曲线式(I)来计算还原糖的生成量,然后再通过式(II)换算成酶活。酶活力单位定义:以每毫升酶液在每分钟内水解反应体系中的底物生成每微克葡萄糖的酶量定义为1个酶活单位(U)。

[0076] $C_{\text{reducing sugars}} = 4.1254 \times OD_{520} - 0.2823$ (I)

[0077] 其中, $C_{\text{reducing sugars}}$ 是反应中生成的还原糖的含量(mg/ml)。

[0078]
$$\text{Cellulase activity(U/ml)} = \frac{C_{\text{reducing sugars}} \times 1000}{Df \times t} \quad (\text{II})$$

[0079] 其中,Cellulase activity包括FPA和EG,Df是稀释倍数,t是反应时间。

[0080] 结果如图1和表1所示(发酵培养120h时的纤维素酶活和菌球直径)。结果表明:当种子培养基中Al₂O₃微粒的浓度为10g/L时,PA酶活和EG酶活均达到最大值,FPA酶活和EG酶活分别达到了607.35U/mL和917.59U/mL,与对照519.11U/mL和810.08U/mL相比分别提高了17.1%和13.3%。EG酶在Al₂O₃浓度小于10g/L时酶活随着Al₂O₃浓度的增加而增加,当浓度高于10g/L时酶活随着浓度的增加而降低。相似的,FPA酶在Al₂O₃浓度小于10g/L时酶活随着

Al₂O₃浓度的增加而增加,当浓度高于10g/L时酶活随着浓度的增加而降低。此外,在发酵瓶发酵结束后,发酵瓶中的pH也是随着添加浓度的增加而升高。因此,在种子培养基中添加不同浓度的Al₂O₃微粒,对纤维素酶活有着显著的影响,Al₂O₃微粒的添加能够有效的调控纤维素酶的酶活性。

[0081] 表1、不同浓度的Al₂O₃对纤维素酶生产、酶产速率、最终pH以及菌丝形态的影响

[0082]

Al ₂ O ₃ 浓度 (g/L)	发酵 120h 时最高酶活 (U/ml)		最大酶产速率 (U/ml/h)		发酵 120h 时的 pH	种子瓶 24h 菌球 数量/ml	种子瓶 24h 菌球形态
	FPA	EG	FPA	EG			
0	519.11±4.86	810.08±24.47	5.69	11.89	3.19	1.7×10 ²	大菌球
1	430.03±14.59	811.49±13.44	6.30	11.67	3.25	2.2×10 ²	大菌球
3	459.1±24.95	832.42±29.71	5.58	15.42	3.27	3.5×10 ²	大菌球
5	539.74±4.86	866.33±25.73	9.97	13.13	3.28	3.9×10 ²	大菌球
10	607.35±16.92	917.59±25.61	8.44	11.40	3.34	6.3×10 ²	大菌球
15	407.11±26.53	683.59±91.27	6.72	9.33	3.36	9.2×10 ²	菌球
20	354.1±24.31	504.82±58.97	4.04	7.35	3.41	1.23×10 ³	菌球
30	270.44±31.3	482.75±21.25	4.07	8.59	3.41	>3.0×10 ³	菌球+菌丝

[0083] 三、Al₂O₃微粒的添加对绿色木霉菌丝形态的影响

[0084] 用光学显微镜 (Olympus BX53, Japan) 分析发酵液中绿色木霉菌球直径和形态。具体步骤如下:

[0085] 1、菌球直径大小的检测

[0086] 首先取未过滤的发酵液40ml装入培养皿中在显微镜下进行拍照,把照片先进行反色,然后用软件Image进行分析,分别得到不同培养时间、不同Al₂O₃微粒浓度下对应的菌球直径(菌球直径来自60个菌球的平均直径)。

[0087] 结果如图2-图4所示。结果表明:通过向种子培养基中添加Al₂O₃微粒造成了菌球直径的显著变化,高浓度Al₂O₃微粒的添加不仅减小了菌球直径,而且还增加了菌球的数量。Al₂O₃微粒在30g/L浓度下种子培养24h后的菌球直径(105.32μm)比对照的菌球直径(508.41μm)降低了384%(图4)。因此,Al₂O₃微粒可以作为一种有效的控制绿色木霉菌球直径的添加剂。

[0088] 2、菌球直径的数学模型预测

[0089] 用(III)所示的指数衰减函数模型对发酵液中的菌球直径变化趋势进行拟合,通过该函数模型预测在不同浓度Al₂O₃微粒下特定的菌球直径,从而通过控制Al₂O₃微粒的添加量来定量的控制菌球直径,最终来控制纤维素酶产量。指数衰减函数模型如下:

$$[0090] \quad Y = y_0 + A_1 e^{-c/Kc} \quad (III)$$

[0091] 其中,Y是发酵中绿色木霉的菌球直径,y₀是当Al₂O₃浓度趋近于30g/L时的一个常量,A₁为常数,Kc为浓度的比例系数,c为Al₂O₃浓度。

[0092] 将步骤1中得到的在Al₂O₃微粒不同浓度下的菌球直径实测值大小分别带入式(III)的指数衰减函数模型,成功得到(IV)所示的用于预测在Al₂O₃微粒不同浓度下的菌球直径的指数衰减函数模型。拟合的指数衰减函数模型如下:

[0093] $Y=105.32+336.81e^{-c/7.32}$ (IV)

[0094] 其中,拟合参数为 $y_0=105.32\mu\text{m}$, $A_1=336.81$, $k_c=7.32\text{L/g}$, $R^2=0.9562$ 。 R^2 值揭示了菌球直径的实测值与预测值之间的相关性良好。

[0095] 在 Al_2O_3 微粒不同浓度下的菌球直径实测值与预测值的结果如图4所示。从图4可以看出:指数衰减模型成功的预测了在 Al_2O_3 微粒不同浓度下的菌球直径的变化趋势,产酶的最佳形态是在 Al_2O_3 微粒浓度为 10g/L 时形成的,在此浓度下菌球直径在种子培养基中培养 24h 时为 $192.9\mu\text{m}$ (种子培养 24h 后的菌球直径大小的实测值)。因此可以有效的利用这种数学模型来预测产酶的最佳菌球形态并加以人工控制。

[0096] 实施例2、 Al_2O_3 微粒对黑曲霉纤维素酶活及菌丝形态的影响

[0097] 一、发酵生产纤维素酶

[0098] 1、种子培养

[0099] 将黑曲霉NH11-1菌株的孢子悬浮液按体积分数为5%的接种比例接种至种子培养基中进行种子培养,在 30°C 、 200rpm 的条件下培养 24 小时后,得到种子液;

[0100] 上述种子培养基是将 Al_2O_3 微粒作为形态控制剂添加到种子培养基中得到的培养基, Al_2O_3 微粒在种子培养基中的浓度分别为 0g/L 、 1g/L 、 3g/L 、 5g/L 、 10g/L 、 15g/L 、 20g/L 和 30g/L 。

[0101] 2、发酵培养

[0102] 将步骤1得到的种子液按体积分数为5%的接种比例接种至发酵培养基中进行发酵培养,在 30°C 、 200rpm 的条件下发酵培养 5 天后,得到发酵液。

[0103] 发酵培养过程中每 24h 取一次样,测定发酵液中的酶活和菌球直径。另外在发酵结束后,测定发酵液的最终 pH 值。

[0104] 上述种子培养和发酵培养均在 250ml (装液量 50ml)三角瓶中进行。

[0105] 二、 Al_2O_3 微粒的添加对黑曲霉纤维素酶活的影响

[0106] 将步骤一获得的发酵液 4000rpm , 4°C 离心 10min ,取上清液即为粗酶液,然后进行纤维素酶酶活的测定。纤维素酶酶活的测定包括滤纸酶活(FPA)和内切葡聚糖苷酶(EG)酶活的测定。FPA酶活和EG酶活的测定方法同实施例1步骤二中的方法。

[0107] 结果如表2和图5所示。结果表明:在种子培养基中添加不同浓度的 Al_2O_3 微粒培养 24h ,接种发酵瓶培养 48h 后,所有处理组和对照组之间的菌球形态没有差异。且纤维素酶活与 Al_2O_3 微粒的添加浓度没有出现规律性变化。

[0108] 表2、不同浓度的 Al_2O_3 对纤维素酶生产、最终 pH 以及菌丝形态的影响

Al ₂ O ₃ 浓度 (g/L)	发酵 120h 时的最高酶活 (U/ml)		发酵 120h 时的 pH	种子瓶 24h 菌球 数量/ml	种子瓶 24h 菌球形态
	FPA	EG			
0	312.66±5.37	443.05±31.66	2.97	24	大菌球
1	320.27±1.79	455.46±56.39	3.31	35	大菌球
[0109] 3	281.02±6.45	333.56±47.51	2.82	27	大菌球
5	362.04±54.62	467.1±85.38	3.08	24	大菌球
10	244.31±36.99	383.56±51.44	2.95	19	大菌球
15	289.88±7.8	320.9±11.7	2.89	68	菌球
20	139.24±4.74	208.87±7.1	2.76	23	大菌球
30	153.17±21.78	229.75±32.67	2.64	45	大菌球

[0110] 三、Al₂O₃微粒的添加对黑曲霉菌丝形态的影响

[0111] 用光学显微镜(Olympus BX53, Japan)分析发酵液中黑曲霉菌球直径和形态。具体步骤如下：

[0112] 1、菌球直径大小的检测

[0113] 首先取未过滤的发酵液40ml装入培养皿中在显微镜下进行拍照，把照片先进行反色，然后用软件Image进行分析，分别得到不同培养时间、不同Al₂O₃微粒浓度下对应的菌球直径(菌球直径来自60个菌球的平均直径)。

[0114] 结果如图6、图7和表2所示。结果表明：通过向种子培养基中添加Al₂O₃微粒造成了菌球数目和直径的不同变化。

[0115] 2、发酵培养瓶中的菌球形态

[0116] 种子培养24h后，将不同形态大小的种子液接种至发酵瓶中进行发酵培养，发酵培养至第二天所有添加组和对照组菌球形态都达到同一水平，所有处理组和对照组之间的菌球形态没有差异，从发酵培养第三天开始，添加浓度为3、10、20、30g/L的菌丝体结成团块状。

[0117] 由上述酶活和菌丝检测结果显示，在添加不同浓度的Al₂O₃后，虽然菌丝和酶活都有了一定改变，但是黑曲霉发酵过程中菌丝形态和酶活的变化并没有像绿色木霉一样呈现出一定的规律，而且在发酵瓶中Al₂O₃的添加对菌丝形态没有影响。因此证明添加Al₂O₃无法实现对黑曲霉规律性的调控。

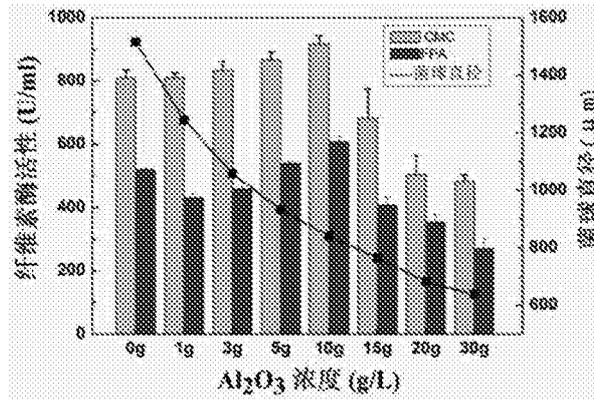


图1

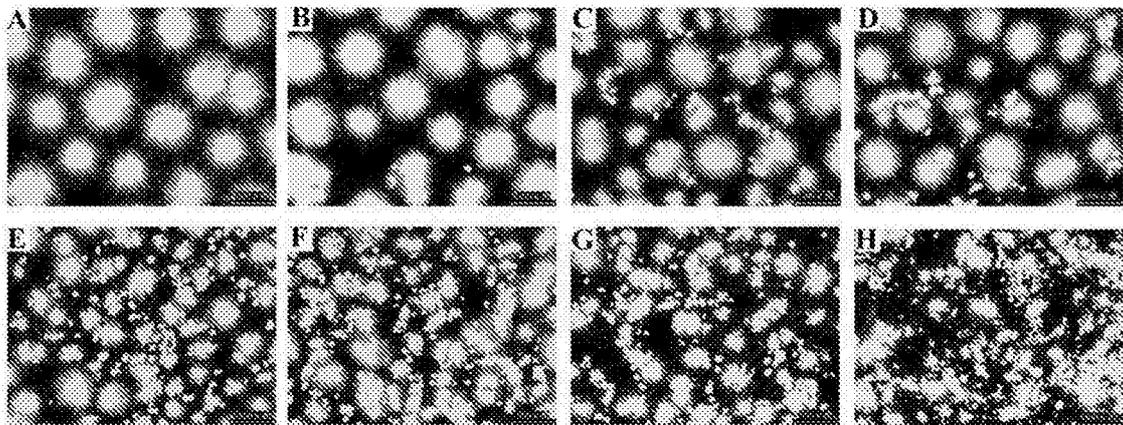


图2

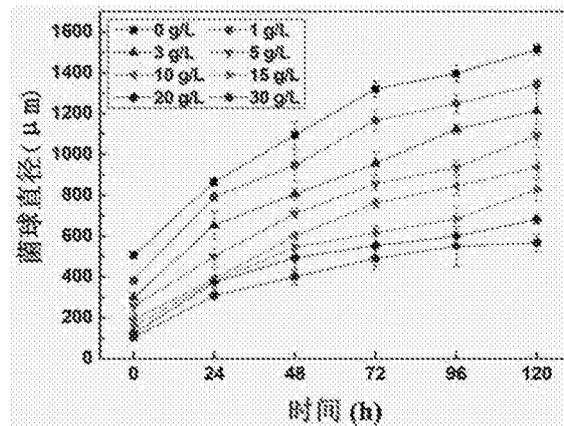


图3

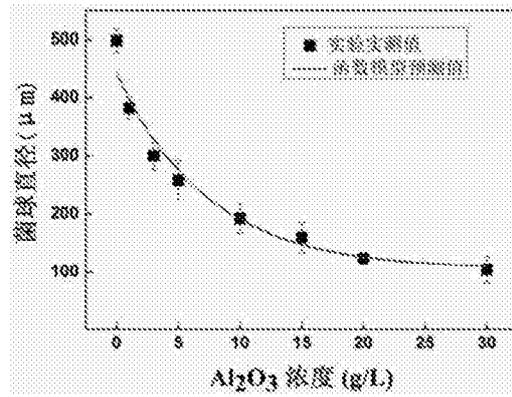


图4

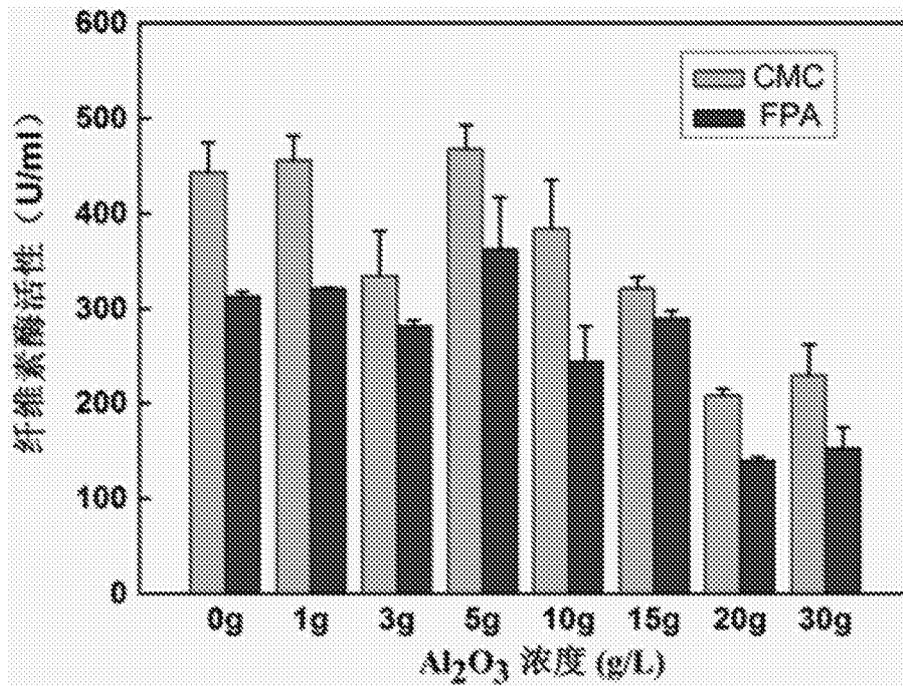


图5

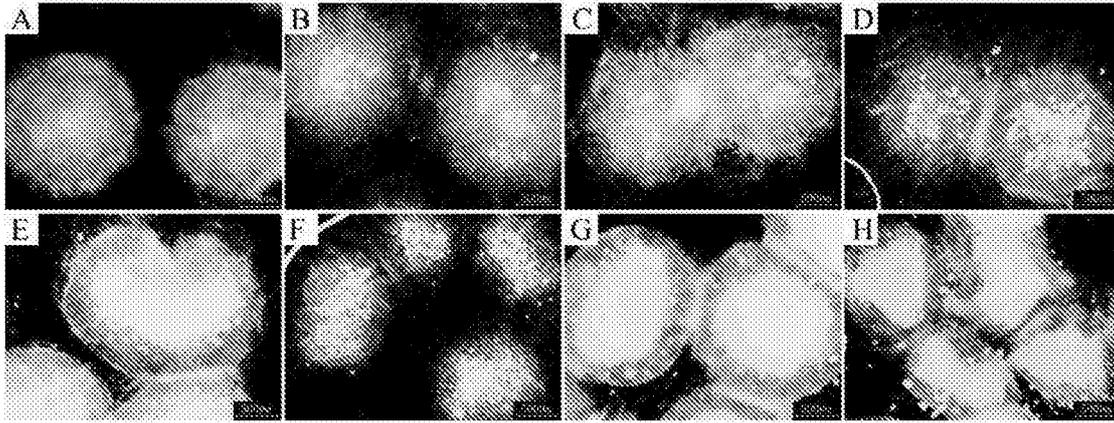


图6

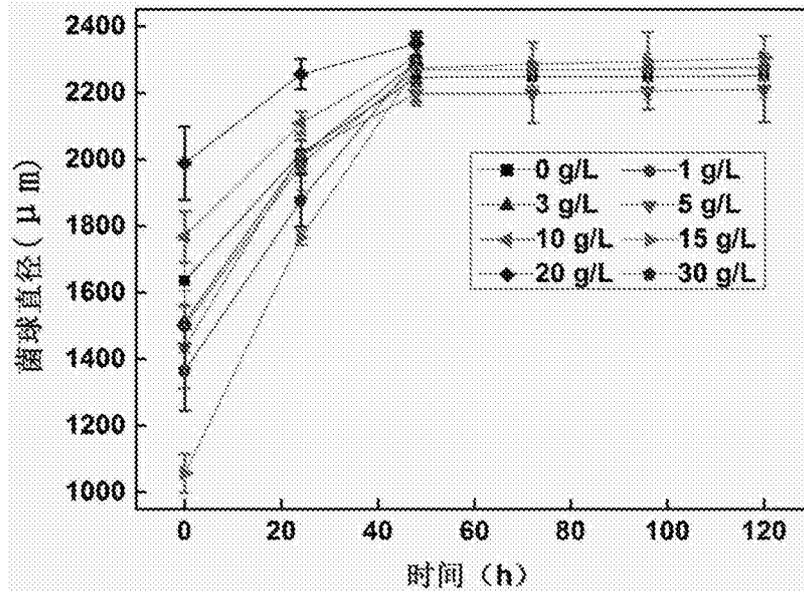


图7