



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103074378 B

(45) 授权公告日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201210408787. 6

CN 101045919 A, 2007. 10. 03, 全文.

(22) 申请日 2012. 10. 24

审查员 刘俊

(83) 生物保藏信息

CGMCC 6012 2012. 04. 16

(73) 专利权人 枣庄市杰诺生物酶有限公司

地址 277100 山东省枣庄市经济开发区长江  
路 22 号

(72) 发明人 许向阳 宋在伟 刘长青 种法国  
王昌斌

(51) Int. Cl.

C12P 5/02 (2006. 01)

C12R 1/125 (2006. 01)

C12R 1/665 (2006. 01)

C12R 1/885 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101775359 A, 2010. 07. 14, 全文.

CN 102206620 A, 2011. 10. 05, 全文.

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种用于沼气发酵的复合生物制剂

(57) 摘要

本发明公开了一种用于沼气发酵的复合生物制剂,发明涉及一种用于沼气发酵的复合生物制剂。复合生物制剂组成及重量份数组成如下:中温  $\alpha$ -淀粉酶 2-5 份,葡萄糖淀粉酶 3-6 份,纤维素酶 15-25 份,果胶酶 12-28 份,中性木聚糖酶 15-25 份,酸性木聚糖酶 10-20 份,甘露聚糖酶 3-7 份, $\beta$ -葡聚糖酶 10-18 份,枯草芽孢杆菌剂 25-35 份,泡盛曲霉菌剂 12-25 份,康宁木霉菌剂 10-25 份,碳酸钙 1-2 份;尿素 1-2 份;沼气的产气量提高了 26%,且甲烷的含量提高了 30%以上;沼气发酵时间缩短了 5-8 小时。

1. 一种用于沼气发酵的复合生物制剂,其组成及重量分数组成如下:

中温  $\alpha$ -淀粉酶 2-5 份,葡萄糖淀粉酶 3-6 份,纤维尿素酶 15-25 份,果胶酶 12-28 份,中性木聚糖酶 15-25 份,酸性木聚糖酶 10-20 份,甘露聚糖酶 3-7 份, $\beta$ -葡聚糖酶 10-18 份,枯草芽孢杆菌剂 25-35 份,泡盛曲霉菌剂 12-25 份,康宁木霉菌剂 10-25 份,碳酸钙 1-2 份,尿素 1-2 份;所述枯草芽孢杆菌为 CGMCC6012,康宁木霉为 CICC41046,泡盛曲霉为 CGMCC3.350。

2. 根据权利要求 1 所述一种用于沼气发酵的复合生物制剂,其特征在于其组成及重量分数组成如下:

中温  $\alpha$ -淀粉酶 2-5 份,葡萄糖淀粉酶 3-6 份,纤维尿素酶 18-25 份,果胶酶 12-28 份,中性木聚糖酶 15-25 份,酸性木聚糖酶 15-20 份,甘露聚糖酶 3-7 份, $\beta$ -葡聚糖酶 15-18 份,枯草芽孢杆菌剂 30-35 份,泡盛曲霉菌剂 18-25 份,康宁木霉菌剂 15-20 份,碳酸钙 1-2 份,尿素 1-2 份。

3. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述一种用于沼气发酵的复合生物制剂,其特征在于所述枯草芽孢杆菌为冻干菌粉,活菌数量为  $4-8 \times 10^8$  个/g。

4. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述一种用于沼气发酵的复合生物制剂,其特征在于所述枯草芽孢杆菌冻干菌粉制备方法如下:斜面转接培养枯草芽孢杆菌,逐级扩培后的种子液转接入发酵罐中,控制温度为 28-30℃,通风培养 19-24 小时,通气量为 2.0m<sup>3</sup>/分钟;发酵完毕离心分离获得湿菌体,添加保护剂冷冻干燥获得冻干菌粉。

5. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述一种用于沼气发酵的复合生物制剂,复合生物制剂组成及重量分数组成如下:

中温  $\alpha$ -淀粉酶 3 份,葡萄糖淀粉酶 4 份,纤维尿素酶 22 份,果胶酶 24 份,中性木聚糖酶 20 份,酸性木聚糖酶 18 份,甘露聚糖酶 5 份, $\beta$ -葡聚糖酶 16 份,枯草芽孢杆菌剂 33 份,泡盛曲霉菌剂 20 份,康宁木霉菌剂 18 份,碳酸钙 1 份;尿素 1 份。

6. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述一种用于沼气发酵的复合生物制剂,复合生物制剂组成及重量分数组成如下:

中温  $\alpha$ -淀粉酶 2 份,葡萄糖淀粉酶 6 份,纤维尿素酶 18 份,果胶酶 28 份,中性木聚糖酶 15 份,酸性木聚糖酶 20 份,甘露聚糖酶 3 份, $\beta$ -葡聚糖酶 15 份,枯草芽孢杆菌剂 35 份,泡盛曲霉菌剂 25 份,康宁木霉菌剂 15 份,碳酸钙 2 份;尿素 2 份。

7. 根据权利要求 1 或权利要求 2 所述一种用于沼气发酵的复合生物制剂,复合生物制剂组成及重量分数组成如下:

中温  $\alpha$ -淀粉酶 5 份,葡萄糖淀粉酶 3 份,纤维尿素酶 25 份,果胶酶 12 份,中性木聚糖酶 25 份,酸性木聚糖酶 10 份,甘露聚糖酶 7 份, $\beta$ -葡聚糖酶 10 份,枯草芽孢杆菌剂 25 份,泡盛曲霉菌剂 12 份,康宁木霉菌剂 25 份,碳酸钙 1 份;尿素 1 份,康宁木霉为 CICC41046,泡盛曲霉为 CGMCC3.350,枯草芽孢杆菌为 CGMCC6012。

8. 根据权利要求 1 所述的一种用于沼气发酵的复合生物制剂在沼气发酵方面的应用。

## 一种用于沼气发酵的复合生物制剂

[0001] 技术领域：发明涉及一种用于沼气发酵的复合生物制剂。

### 背景技术：

[0002] 沼气是一些有机物质，在一定的温度、湿度、酸度条件下，隔绝空气（如用沼气池），经微生物作用（发酵）而产生的可燃性气体。它含有少量硫化氢，所以略带臭味。发酵是复杂的生物化学变化，有许多微生物参与。反应大致分两个阶段：(1) 微生物把复杂的有机物质中的糖类、脂肪、蛋白质降解成简单的物质，如低级脂肪酸、醇、醛、二氧化碳、氨、氢气和硫化氢等。(2) 由甲烷菌种的作用，使一些简单的物质变成甲烷。要正常地产生沼气，必须为微生物创造良好的条件，使它能生存、繁殖。沼气池必须符合多种条件。首先，沼气池要密闭。有机物质发酵成沼气，是多种厌氧菌活动的结果，因此要造成一个厌氧菌活动的缺氧环境。在建造沼气池时要注意隔绝空气，不透气、不渗水。其次，沼气池里要维持 20～40℃，因为通常在这种温度下产气率最高。第三，沼气池要有充足的养分。微生物要生存、繁殖，必须从发酵物质中吸取养分。在沼气池的发酵原料中，人畜粪便能提供氮元素，农作物的秸秆等纤维素能提供碳元素。第四，发酵原料要含适量水，一般要求沼气池的发酵原料中含水 80% 左右，过多或过少都对产气不利。第五，沼气池的 pH 值一般控制在 7～8.5。

[0003] 一个完整的大中型沼气发酵工程，无论其规模大小，都包括了如下的工艺流程：原料（废水）的收集、预处理、消化器（沼气池）、出料的后处理和沼气的净化与储存等。

[0004] 沼气池的温度条件分为：①常温发酵（也称为低温发酵）10℃～30℃，在这个温度条件下，产气率可为 0.15～0.3m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>·d。②中温发酵 30℃～45℃，在这个温度条件下，池容产气率可达 1m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>·d 左右。③高温发酵 45℃～60℃，在这个温度条件下，池容产气率可达 2～2.5m<sup>3</sup>/m<sup>3</sup>·d 左右。沼气发酵最经济的温度条件是 35℃，即中温发酵。

[0005] 发酵液的浓度范围是 2～30%。浓度愈高产气愈多。发酵液浓度在 20% 以上称为干发酵。气池的发酵液浓度可根据原料多少和用气需要以及季节变化来调整。夏季以温补料浓度为 5～6%；冬季以料补温 10～12%。

[0006] 发酵液的浓度范围是 2～30%。浓度愈高产气愈多。发酵液浓度在 20% 以上称为干发酵。气池的发酵液浓度可根据原料多少和用气需要以及季节变化来调整。夏季以温补料浓度为 5～6%；冬季以料补温 10～12%。

[0007] 沼气发酵微生物对碳素需要量最多，其次是氮素，我们把微生物对碳素和氮素的需要量的比值，叫做碳氮比，用 C：N 来表示。目前一般采用 C：N = 25：1。但并不十分严格，20：1、25：1、30：1 都可正常发酵。

[0008] 沼气发酵适宜的酸碱度为 pH = 6.5～7.5。pH 值响酶的活性，所以影响发酵速率。

[0009] 沼气发酵中菌种数量多少，质量好坏直接影响着沼气的产量和质量。一般要求达到发酵料液总量的 10～30%，才能保证正常启动和旺盛产气。

[0010] 沼气甲烷菌要求在氧化还原电位大于一 330mv 的条件下才能生长。这个条件即：严格的厌氧环境。所以，沼气池要密封。

[0011] 由于目前沼气发酵中使用较多的农作物秸秆，而农作物秸秆主要成分是纤维素，

因此纤维素的分解成为沼气发酵效率的重要因素,由于沼气发酵所用菌种的限制,导致纤维素的分解利用不够,从而不能为沼气发酵提供足够的原料,目前沼气发酵的产率一般在  $0.15 \sim 1\text{m}^3/\text{m}^3 \cdot \text{d}$ 。如何有效改进纤维素的分解利用,提高沼气的产率是有效利用农作物秸秆,更好的推广沼气应用的重要手段。

#### 发明内容:

[0012] 本发明解决的技术问题是提供一种用于沼气发酵的复合生物制剂。

[0013] 复合生物制剂组成及重量份数组成如下:

[0014] 中温  $\alpha$ -淀粉酶 2-5 份,葡萄糖淀粉酶 3-6 份,纤维素酶 15-25 份,果胶酶 12-28 份,中性木聚糖酶 15-25 份,酸性木聚糖酶 10-20 份,甘露聚糖酶 3-7 份, $\beta$ -葡聚糖酶 10-18 份,枯草芽孢杆菌剂 25-35 份,泡盛曲霉菌剂 12-25 份,康宁木霉菌剂 10-25 份,碳酸钙 1-2 份;尿素 1-2 份;

[0015] 优选的组成及重量份数组成如下:

[0016] 中温  $\alpha$ -淀粉酶 2-5 份,葡萄糖淀粉酶 3-6 份,纤维素酶 18-25 份,果胶酶 12-28 份,中性木聚糖酶 15-25 份,酸性木聚糖酶 15-20 份,甘露聚糖酶 3-7 份, $\beta$ -葡聚糖酶 15-18 份,枯草芽孢杆菌剂 30-35 份,泡盛曲霉菌剂 18-25 份,康宁木霉菌剂 15-20 份,碳酸钙 1-2 份;尿素 1-2 份;

[0017] 所述枯草芽孢杆菌为冻干菌粉,其中活菌数量为  $4-8 \times 10^8$  个/g。

[0018] 枯草芽孢杆菌菌剂制备方法如下:从斜面转接培养枯草芽孢杆菌,逐级扩培后的种子液转接入发酵罐中,控制温度为  $28-30^\circ\text{C}$ ,通风培养 19-24 小时,通气量为  $2.0\text{m}^3/\text{分钟}$ ;发酵完毕离心分离获得湿菌体,添加保护剂冷冻干燥获得菌剂,保护剂组成为湿菌体总量 10% 的脱脂奶、5% 的乳糖、5% 的甘油。

[0019] 枯草芽孢杆菌为常见使用菌种;

[0020] 优选的枯草芽孢杆菌使用 CGMCC6012。

[0021] 泡盛曲霉菌剂制备:泡盛曲霉培养物制备:菌种培养,固体发酵培养:孢子液接种到米曲霉固态发酵培养料中, $26-35^\circ\text{C}$  培养至菌丝长满培养料,低温流化床干燥,粉碎干燥物;

[0022] 康宁木霉菌剂:菌种培养,固体发酵培养:孢子液接种到固态发酵培养料中,

[0023]  $26-35^\circ\text{C}$  培养至菌丝长满培养料,低温流化床干燥,粉碎干燥物;

[0024] 制备方法:

[0025] 将中温  $\alpha$ -淀粉酶,葡萄糖淀粉酶,纤维素酶,果胶酶,中性木聚糖酶,酸性木聚糖酶,甘露聚糖酶, $\beta$ -葡聚糖酶,枯草芽孢杆菌剂,泡盛曲霉菌剂,康宁木霉菌剂,上述物质混合后添加粉碎的碳酸钙和尿素造粒。

[0026] 使用方法:在一个完整的沼气发酵周期(8-12 个月)内,复合生物制剂总添加量占沼气池发酵物料总重量的 0.1-10%。如是新池启动一次性投料时,可分 2 次添加:在沼气池启用时添加复合生物制剂总添加量的  $2/3$ ,发酵 7-10 个小时时添加  $1/3$ 。如是半连续发酵池,间隔进出料时,可分 3 次添加:在沼气池启用时添加复合生物制剂总添加量的  $1/3$ ,发酵 2 个月时添加  $1/3$ ,发酵 6 个月时添加剩余  $1/3$ 。

[0027] 有益效果:

- [0028] 1、沼气的产气量提高了 26%，且甲烷的含量提高了 30% 以上；
- [0029] 2、沼气发酵时间缩短了 5-8 小时；
- [0030] 3、加快甲烷菌群的生长速度；
- [0031] 4、提高甲烷菌群的个体密度；
- [0032] 枯草芽孢杆菌和泡盛曲霉和康宁木霉菌发酵培养物中含有的有效剂量的葡聚糖酶、木聚糖酶、纤维素酶和淀粉酶，这些生物菌种在其中的生长繁殖为沼气发酵提供丰富的底物和原材料。为沼气发酵提供了丰富的分解后底物，有效提高了沼气发酵的速率和产量。添加的尿素为沼气菌种的生长发酵提供了有效氮源，碳酸钙的添加则可以有效维持反应的环境在中性偏碱性的环境，促进反应顺利进行。

#### 具体实施方式：

- [0033] 例 1：100 公斤复合生物制剂组成及重量分数组成如下：
- [0034] 中温  $\alpha$ -淀粉酶 3 份，葡萄糖淀粉酶 4 份，纤维素酶 22 份，果胶酶 24 份，中性木聚糖酶 20 份，酸性木聚糖酶 18 份，甘露聚糖酶 5 份， $\beta$ -葡聚糖酶 16 份，枯草芽孢杆菌剂 33 份，泡盛曲霉菌剂 20 份，康宁木霉菌剂 18 份，碳酸钙 1 份；尿素 1 份；
- [0035] 将中温  $\alpha$ -淀粉酶，葡萄糖淀粉酶，纤维素酶，果胶酶，中性木聚糖酶，酸性木聚糖酶，甘露聚糖酶， $\beta$ -葡聚糖酶，枯草芽孢杆菌剂，泡盛曲霉菌剂，康宁木霉菌剂，上述物质混合后添加粉碎的碳酸钙和尿素造粒。
- [0036] 所述枯草芽孢杆菌为冻干菌粉，冻干菌粉中活菌数量为  $6 \times 10^8$  个/g。
- [0037] 所述枯草芽孢杆菌为枯草芽孢杆菌 CGMCC6012。
- [0038] 本发明提供一种饲料生产用枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 菌种，该菌株已经于 2012 年 4 月 16 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏地址位于北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，(邮编 100101)，保藏编号为 CGMCC No. 6012。
- [0039] CGMCC No. 6012 菌种的获得过程：
- [0040] 采取紫外诱变方法：以 CICC10023 为出发菌株，制成菌悬液，涂布于培养基平皿上，紫外照射 90s 后 37℃ 培养箱中培养。
- [0041] 菌种筛选
- [0042] 从 90s 平皿上挑 30 个长得强壮的单菌落，接种于斜面上，37℃ 培养箱中，培养 24 小时，0—4℃ 冷藏保存；以原始菌种作为对照，采用常规选育条件，羧甲基纤维素钠作为碳源和蛋白水解圈方法筛选产纤维素酶和蛋白酶强的菌株，筛选获得产纤维素酶和蛋白酶强的菌株枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) L1，此菌株产纤维素酶能力比原始菌株提高了 25%。将该菌种在中国普通微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心保藏，保藏编号为 CGMCC No6012。
- [0043] 泡盛曲霉菌剂的制备方法：
- [0044] 斜面菌种活化培养：将泡盛曲霉斜面菌种转接到斜面培养基上，27℃ 培养 3 天。菌种为泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) CGMCC3.350，购自中国普通微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心；
- [0045] 固体一级种子培养：挑取泡盛曲霉斜面菌种接入装有 100 克培养基的 500 毫升三角瓶中进行种子培养，30℃ 培养 3 天即可。

[0046] 固体二级种子培养:将上述培养好的固体一级种子搅拌为碎块后加入装有 1000 克培养基的 5000 毫升三角瓶中进行种子培养,培养条件:30℃培养 3 天即可。

[0047] 固体发酵培养:将二级摇瓶种子粉碎,加入装有灭菌培养基的发酵池或托盘中混合均匀后培养,曲料培养温度控制在 30℃,湿度 85%,每隔 10 小时翻料一次,培养时间 6 天;固体曲料的培养采用常用曲料培养技术;待培养料长满菌丝即可结束培养,培养基预先经高温蒸煮灭菌处理,灭菌条件控制温度 121℃,时间 1 小时。

[0048] 干燥粉碎:发酵结束培养料在流化床或其他干燥设备上干燥,干燥温度控制在 60℃,干燥到水分含量在 10%以下,然后将固体培养料进行粉碎,物料粉碎孔径在 60 目以上。

[0049] 培养基组成:固体原料:麸皮 80%,豆饼粉 10%,玉米淀粉 10%,添加等量自来水;初始 pH 自然。

[0050] 枯草芽孢杆菌菌剂的制备:

[0051] 1. 发酵液的获得:采用斜面菌种逐级扩培获得枯草芽孢杆菌发酵液;

[0052] (1) 一级种子培养:将枯草芽孢杆菌斜面菌种接入 500 毫升摇瓶中,培养基装量 100 毫升,旋转式摇床 180 转/分,培养温度 30℃,培养时间 24 小时;

[0053] (2) 二级种子培养:将一级种子按照 10%的接种量接入 500 毫升二级种子摇瓶中,培养条件与一级种子相同;

[0054] (3) 三级种子培养:将二级种子以 10%接种量接入 5000 毫升三级种子摇瓶中,培养基装量 1000 毫升,旋转式摇床 100 转/分,培养温度 30℃,培养时间 24 小时;

[0055] (4) 一级种子罐培养:将三级种子以 10%接种量接入总容积为 150L 的一级种子罐,发酵培养基装量 100L,培养温度 28℃,搅拌速度 100 转/分,通风量 (V/V) 1 : 0.5,罐压 0.05Mpa,培养时间 24 小时;

[0056] (5) 发酵培养:将一级种子罐菌种以 10%接种量接入总容积为 1.5 吨二级种子罐,发酵培养基装量 1 吨,培养条件培养温度 28℃,搅拌速度 100 转/分,通风量 (V/V) 1 : 0.5,罐压 0.05Mpa,培养时间 24 小时,培养结束菌浓度在  $5.0 \times 10^8$  个/ml。

[0057] (6) 离心分离:采用离心机分离获得菌体。

[0058] (7) 真空冷冻干燥:添加保护剂后采用喷雾干燥工艺处理获得干粉菌剂;保护剂组成为脱脂奶 10%、乳糖 5%、甘油 5%。真空冷冻干燥工艺参见中国科学院微生物研究所编著菌种保藏手册,1980 年出版. 第 610-653。

[0059] 培养基组成:葡萄糖 6%,酵母提取物 1%,蛋白胨 0.2%,CaCO<sub>3</sub> 1%, pH6.8。

[0060] 康宁木霉菌剂的制备方法:

[0061] 斜面菌种活化培养:将斜面菌种转接到斜面培养基上 (5Bé 麦芽汁琼脂), 27℃培养 3 天。康宁木霉 CICC41046。

[0062] 固体一级种子培养:挑取斜面菌种接入装有 100 克培养基的 500 毫升三角瓶中进行种子培养,30℃培养 3 天即可。

[0063] 固体二级种子培养:将上述培养好的固体一级种子搅拌为碎块后加入装有 1000 克培养基的 5000 毫升三角瓶中进行种子培养,培养条件:30℃培养 3 天即可。

[0064] 固体发酵培养:将二级摇瓶种子粉碎,加入装有灭菌培养基的发酵池或托盘中混合均匀后培养,曲料培养温度控制在 28℃,湿度 80%,每隔 10 小时翻料一次,培养时间 5

天;固体曲料的培养采用常用曲料培养技术;待培养料长满菌丝即可结束培养,培养基预先经高温蒸煮灭菌处理,灭菌条件控制温度 121℃,时间 1 小时。

[0065] 干燥粉碎:发酵结束培养料在流化床或其他干燥设备上干燥,干燥温度控制在 55℃,干燥到水分含量在 10%以下,然后将固体培养料进行粉碎,物料粉碎孔径在 60 目以上。

[0066] 培养基组成:固体原料:麸皮 60%,秸秆 20%,豆饼粉 10%,玉米淀粉 10%,添加等量自来水;初始 pH 自然。

[0067] 例 2:100 公斤复合生物制剂,制备方法同例 1

[0068] 组成及重量分数组成如下:

[0069] 中温  $\alpha$ -淀粉酶 2 份,葡萄糖淀粉酶 6 份,纤维素酶 18 份,果胶酶 28 份,中性木聚糖酶 15 份,酸性木聚糖酶 20 份,甘露聚糖酶 3 份, $\beta$ -葡聚糖酶 15 份,枯草芽孢杆菌剂 35 份,泡盛曲霉菌剂 25 份,康宁木霉菌剂 15 份,碳酸钙 2 份;尿素 2 份。

[0070] 例 3:100 公斤复合生物制剂,制备方法同例 1

[0071] 组成及重量分数组成如下:

[0072] 中温  $\alpha$ -淀粉酶 5 份,葡萄糖淀粉酶 3 份,纤维素酶 25 份,果胶酶 12 份,中性木聚糖酶 25 份,酸性木聚糖酶 10 份,甘露聚糖酶 7 份, $\beta$ -葡聚糖酶 10 份,枯草芽孢杆菌剂 25 份,泡盛曲霉菌剂 12 份,康宁木霉菌剂 25 份,碳酸钙 1 份;尿素 1 份;

[0073] 康宁木霉 CICC41046。泡盛曲霉 (*Aspergillus awamori*) CGMCC3.350,枯草芽孢杆菌 CGMCC6012。