



(10) 授权公告号 CN 113388552 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 27

(21) 申请号 202110829639.0

(22) 申请日 2021.07.22

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113388552 A

(43) 申请公布日 2021.09.14

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 22533 2021.05.17

(73) 专利权人 中国科学院天津工业生物技术研究所

地址 300450 天津市滨海新区空港经济区西七道32号

(72) 发明人 徐松 孙文悦 王敬敬 张小霞
黄志勇

(74) 专利代理机构 北京识然知识产权代理事务所(普通合伙) 11975

专利代理师 曾庆国

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

B09B 3/60 (2022.01)

C12R 1/01 (2006.01)

B09B 101/70 (2022.01)

(56) 对比文件

CN 111117939 A, 2020.05.08

CN 111662853 A, 2020.09.15

CN 112175877 A, 2021.01.05

CN 112251376 A, 2021.01.22

JP H05336951 A, 1993.12.21

JP H08140668 A, 1996.06.04

林辉; 马军伟; 王群; 赵宇华; 符建荣. 纤维素
油脂生产菌株青霉 P-2 的筛选及其纤维素油脂
统合加工行为(英文). 浙江大学学报(农业与生
命科学版). 2014, (006), 全文.

刘振华; 段开红; 田瑞华; 万永青;. 低温沼液
中纤维素降解菌株的分离与纯化. 安徽农业科
学. 2013, (21), 全文.

审查员 张岩

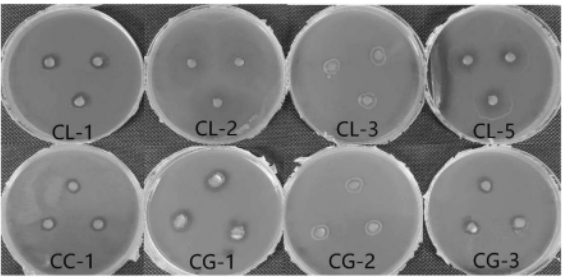
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

一株嗜热纤维素降解菌株及其应用

(57) 摘要

本发明具体涉及一株具有同时降解固体废弃物中纤维素、油脂的耐盐嗜热高效菌株嗜嗜嗜气解硫胺素芽孢杆菌Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2, 优选为中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心的保藏号为CGMCC No. 22533. 该菌株创新性在于具有嗜热(50℃)、酸性(pH5)条件下良好生长特性, 且其同时具有降解纤维素、油脂的能力. 最值得我们注意的是, 在摇瓶小试应用中, 其降解油脂的能力随着油脂含量升高而提升. 在初始油脂浓度为30g/L时, 其降解率高达69.6%. 本发明中涉及的微生物菌株不但可以高效降解纤维素, 还可以降解油脂, 对于影响当今碳减排的政策, 实现废弃物的无害化处理, 具有十分重要的应用价值.



1. 一种嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌, 其特征在于, 所述的菌株的保藏编号为CGMCC No.22533。
2. 权利要求1所述的嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌在降解处理油脂中的应用。
3. 权利要求1所述的嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌在降解处理纤维素中的应用。
4. 一种用于降解油脂和/或纤维素的菌制品, 其特征在于, 所述的制品中包含有权利要求1所述的所述的嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌。

一株嗜热纤维素降解菌株及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于固体废弃物降解处理技术领域,具体涉及一株具有同时降解固体废弃物中纤维素、油脂的耐盐嗜热菌株及其应用。

背景技术

[0002] 随着我国城市化的不断发展和人口数量的急剧增长,城市固体废弃物的体量也随之明显增加。加上城市绿植、餐厨垃圾等废弃物含量占城市总体固体废弃物含量的比例也在不断的升高,因此,城市固体废弃物中纤维素、油脂的降解就成为垃圾处理的关键。

[0003] 城市绿植和餐厨垃圾的大量积累对城市的发展来说都是巨大的挑战和压力,对人类的身体健康产生了极大的影响。这类固体废弃物的严格管理也显示出了国家对固体废弃物处理问题的紧迫性和必要性。所以,随着这些问题的日益凸显,迫切需求高效降解此类固体废弃物的环境友好型技术。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种嗜热纤维素降解菌株及其应用,所提供的菌株具有高效降解纤维素、餐厨垃圾油脂的能力,从而弥补现有技术的不足。

[0005] 本发明首先提供一种嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌 *Aneurinibacillus thermoaerophilus* SX-2,于2021年05月17日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为CGMCC No.22533;

[0006] 本发明所提供的嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌SX-2株用于降解处理油脂;

[0007] 本发明所提供的嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌SX-2株还可用于降解处理纤维素;

[0008] 本发明还提供一种用于降解油脂和/或纤维素的菌制品,所述的制品中包含有所述的嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌SX-2株。

[0009] 本发明所提供菌株的创新性在于其具有同时降解纤维素、油脂的特性,并且可以耐高温,在高油的环境下,依然具有较高水平的油脂降解效率。

附图说明

[0010] 图1:纤维素降解菌的筛选结果图;

[0011] 图2:所筛选的SX-2的培养形态图;

[0012] 图3:菌株SX-2在不同盐度梯度下生长状况图;

[0013] 图4:菌株SX-2在不同pH下生长状况图;

[0014] 图5:不同油脂浓度下菌株SX-2的油脂降解率的变化情况比较图。

具体实施方式

[0015] 下面结合实施例对本发明的菌株筛选、耐受环境压力效果及其在降解纤维素、油脂中的应用效果进行详细的描述。

[0016] 实施例1:嗜热纤维素降解菌株的筛选

[0017] 主要培养基:

[0018] 纤维素降解菌培养基(CMC, g/L):CMC-Na 10.0,硫酸铵4.0,七水合硫酸镁0.5,磷酸二氢钾2.0,蛋白胨1.0,琼脂20.0, pH=6.5。

[0019] 刚果红纤维素培养基:直接购买,备用。

[0020] Luria-Bertani (LB) 培养基(g/L):氯化钠10.0,胰蛋白胨10.0,酵母萃取5.0,蒸馏水加至1L,调节其pH值至7.2。

[0021] 油脂降解菌筛选培养基(g/L):NaCl 5.0,磷酸二氢钾0.3,七水合硫酸镁0.1,磷酸氢二钾1.5,硫酸铵1.0,豆油5ml,琼脂20.0, pH=7.2~7.4。

[0022] 本发明中,培养基除了特别说明之外,均采用120℃高压蒸汽灭菌20min。

[0023] 具体实验方法:

[0024] 取来自于中国科学院天津工业生物技术研究所餐厨垃圾堆放区的土壤样品10g于250ml三角瓶,加入90ml无菌水于30℃下180r/min的摇床中,充分震荡30min,获得悬浮液,梯度稀释至 10^{-7} ,选择 10^{-5} - 10^{-7} 稀释度分别涂布于LB固体培养基平板、CMC固体培养基平板和刚果红纤维素固体培养基平板中,每一梯度涂布3个平板,每个平板涂布200μL稀释的样品悬浮液,将平板封口标号后置于50℃培养箱培养48h,从不同的平板上挑取不同类型的单个菌落在相对应的筛选平板上三区划线法进行分离纯化,挑选单菌落接种于LB液体培养基,在50℃下180r/min摇床培养24h获得单菌的菌液,-80℃保存于25%甘油中,备用。

[0025] 纤维素降解菌的筛选:将分离出的单菌于LB培养基,摇瓶培养获得菌液,取菌液20μL充分润湿置于刚果红纤维素培养基平板的滤纸片,每个平板放置3个滤纸片,设为3个平行。将平板封口后置于50℃培养箱先正置培养1~2个小时,待滤纸片干燥后再倒置培养。培养72h后,根据平板水解圈初步判断菌株对纤维素的降解能力。

[0026] 油脂降解菌的筛选:分别将每种单菌点接到其相对应的筛选平板,每个平板均匀点接3滴10μL的菌液,为3个平行,待菌液晾干后倒置培养于50℃培养箱72h,通过比较透明圈直径(D)和菌落直径(d)的比值(D/d),初步估测菌株对各种物质的降解能力,选择降解能力较强即比值较大的菌株为筛选结果。

[0027] 菌株鉴定:对纯化后的菌株鉴定种属,对筛选获得的菌株提DNA,利用细菌16S rRNA进行PCR扩增,对PCR原液进行琼脂糖凝胶电泳,将有条带的原液送至测序公司进行测序,以获得目标菌株的16S rRNA序列,在BLAST数据库进行相似性比对结合菌株的形态特征、生理生化特性认定菌株的菌属。

[0028] 实验结果:

[0029] 1.纤维素降解菌筛选结果

[0030] 纤维素降解菌是利用不同的培养基平板从土壤样品中分离得到的单菌,共分离得到单菌株8株,将单菌接种至刚果红纤维素培养基进行初筛,根据菌落周围产生红色沉淀圈的颜色深浅(图1),可以初步判断菌株的降解能力,降解结果见表1。

[0031] 表1:油脂降解菌初筛结果表

[0032]

编号	D/d(mm)		
	平行 1	平行 2	平行 2
CL-1	+++	+++	+++
CL-2	+	+	+
CL-3	+	+	+
CL-5	+	+	+
CC-1	++	++	++
CG-1	+++	+++	+++
CG-2	+	+	+
CG-3	+++	+++	+++

[0033] 2. 油脂降解菌筛选结果

[0034] 通过油脂降解菌筛选培养基平板,从土壤样品中初步分离得到7株单菌,并且对该7株菌株的降解能力进行测试,测量水解圈直径和菌落直径,比较比值大小得到5株能力较强的菌株,降解结果见表2。

[0035] 表2:油脂降解菌初筛结果表

[0036]

编号	D/d(mm)			平均比值 (mm)
	平行 1	平行 2	平行 2	
Y-1	1.845	2.400	1.950	2.065
Y-3	1.625	1.833	1.750	1.736
Y-4	2.000	1.700	1.750	1.817
Y-5	1.769	1.308	1.500	1.526
CG-3	1.987	2.100	1.968	2.018

[0037] 3. 菌种鉴定结果

[0038] 根据测序结果比对,以及对菌株的形态特征综合分析(图2),确定筛选得到的菌株的菌属,菌株CG-3经鉴定为Aneurinibacillus thermoaerophilus,命名为:Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2。

[0039] 筛选的嗜热嗜气解硫胺素芽孢杆菌Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2,于2021年05月17日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏编号为

CGMCC No.22533。

[0040] 实施例2:盐度和pH对嗜热纤维素降解菌Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2的影响

[0041] 主要培养基:

[0042] Luria-Bertani (LB) 培养基(g/L):氯化钠10.0,胰蛋白胨10.0,酵母萃取5.0,蒸馏水加至1L,调节其pH值至7.2。

[0043] 本发明中,培养基除了特别说明之外,均采用120℃高压蒸汽灭菌20min。

[0044] 具体实验方法如下:

[0045] 盐度的耐受测试:将目标菌株以10%的接种量分别接种于NaCl浓度为10、50、100、150、200g/L的LB液体培养基,每株菌株设置3个平行,在50℃下180r/min的摇床培养24h,测量菌液的OD₆₀₀值,进而判断目标菌株在不同盐浓度梯度的培养基中的生长状况。

[0046] 酸碱的耐受测试:将目标菌株以10%的接种量分别接种于pH为3、5、9、11的LB液体培养基,设置3个平行,在50℃下180r/min的摇床培养24h,测量菌液的OD₆₀₀值,进而判断目标菌株对不同pH下的耐受程度。

[0047] 统计学处理所有统计学分析应用SPSS 20.0统计软件包进行。计量数据采用均数±标准差(x±s)表示。

[0048] 实验结果:

[0049] 1.不同盐度梯度下Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2的生长状况

[0050] 对以上筛选得到的纤维素降解菌Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2进行盐度的耐受测试,以OD₆₀₀作为菌株生长的指标,测试菌株对高盐度环境的耐受程度。具体结果如图3所示,在NaCl浓度为10g/L时,该菌株生长状况较好,其在24小时的OD₆₀₀值可以达到为1.428。

[0051] 2.不同pH下Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2的生长状况

[0052] 对上述实验筛选得到的纤维素降解菌Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2在不同酸碱度的LB液体培养基中培养24h,根据OD₆₀₀判定菌株对酸碱度的耐受程度。如图4所示。通过该研究发现,此菌株可以在pH为5的环境中很好的生长,并且比pH为7时生长状况还要好。其在pH为5和7的条件下,24小时的OD₆₀₀值分别为1.650和1.428。在pH值为3、5的时候,菌株也有生长的迹象,但是生长状况并不好,24小时的OD₆₀₀均值分别为0.297和0.287。

[0053] 实施例3:该嗜热纤维素降解菌Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2对纤维素、油脂降解小试应用效果

[0054] 主要培养基:

[0055] 滤纸培养基(g/L):硫酸铵4.0,七水合硫酸镁0.5,磷酸二氢钾2.0,蛋白胨1.0,滤纸1%,pH=6.5~7.0。

[0056] 油脂降解菌复筛培养基(g/L):蛋白胨1.0,硝酸铵0.2,磷酸氢二钾0.5,磷酸二氢钾0.5,七水合硫酸镁0.1,豆油3.0ml,pH=7.2~7.4。

[0057] 本发明中,培养基除了特别说明之外,均采用120℃高压蒸汽灭菌20min。

[0058] 具体实验方法如下:

[0059] 纤维素降解菌的小试:将菌液Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2接种至滤纸培养基,计算菌株对滤纸的降解率定量测定菌株的降解能力,从而选出高效降解菌。接

种至滤纸培养基摇瓶培养,设置三个平行和一组不接种的对照组CK,于完全相同的条件下在180r/min,50℃培养3d后测定滤纸重量的变化。

[0060] 滤纸降解率=(CK滤纸重量-处理滤纸重量)/CK滤纸重量

[0061] 滤纸质量的测定:将纱布平铺覆盖于1L烧杯口将培养液经过纱布倒入烧杯中,滤纸碎屑被过滤留在纱布上,用蒸馏水洗涤三角瓶1~2次,洗涤液从留在纱布上的滤纸碎屑上缓缓倒入,将滤纸碎屑中残留的培养液的菌液洗下去,滤渣基本呈白色。轻轻挤出滤纸残渣剩余的水分,置于培养皿中并于真空干燥箱中105℃抽真空干燥,直至质量不再变化,测量剩余滤纸的质量。

[0062] 油脂降解效果的小试:将筛选的菌种Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2接种至油脂降解小试摇瓶培养基作为菌剂处理组,并且设置一组CK作为空白对照,初始油脂浓度为3g/L,同时将两个处理组放置在完全相同的环境中180r/min,50℃培养,48h测定含油量变化。

[0063] 油脂降解率=(CK豆油浓度-处理豆油浓度)/CK豆油浓度

[0064] 餐厨垃圾油脂标准曲线的制作:研究发现餐厨垃圾油脂最大的吸收峰为225nm,所以取7个50ml的容量瓶,以石油醚为溶剂,配制0.1,0.2,0.4,0.5,0.6,0.8,1.0mg/ml的7个浓度的豆油的溶液,测定OD₂₂₅值,以豆油浓度为横坐标,吸光度值为纵坐标,绘制标准曲线。每个浓度有三个重复样品,据此方法得到以标准油浓度为横坐标,以吸光度OD₂₂₅为纵坐标,做出针对餐厨垃圾油脂的标准曲线。本课题组先前已得到标准曲线: $Y=0.58893X+0.00548$, $R^2=0.99375$ 。

[0065] 培养基中含油量的测定:将摇瓶培养基移入250ml分液漏斗,加入1ml浓盐酸酸化,再加入约2% (m/v) 的NaCl,用5ml石油醚清洗摇瓶,洗液倒入分液漏斗中,5ml石油醚重复洗涤一次。将分液漏斗充分震荡,静置使其分层。分层后,水层移至三角瓶,石油醚层移入100ml陶瓷坩埚中并盖上盖子以减少石油醚挥发(或移入小烧杯用培养皿盖住)。将三角瓶中的水层再次移入分液漏斗,10ml石油醚重复萃取一次。向回收的石油醚中加入适量无水硫酸钠,搅拌后盖上盖子,静置半小时以上,以保证充分脱水。然后将石油醚转移至25ml容量瓶中,滴加石油醚定容至刻度线,充分混匀后,测量OD₂₂₅值,根据标准曲线得出培养基的含油量。

[0066] 不同初始含油量的降解效率:分别配制豆油初始浓度为3、9、15、30、45g/L的油脂降解培养基,以10%的接种量接种目标菌株于油脂降解培养基中,50℃下180r/min的摇床培养48h,测定培养基中豆油含量并计算降解率。

[0067] 统计学处理所有统计学分析应用SPSS 20.0统计软件包进行。计量数据采用均数±标准差(x±s)表示。

[0068] 实验结果如下:

[0069] 1. 该纤维素降解菌株对滤纸降解小试

[0070] 将接种至滤纸培养基测定滤纸降解率,定量判断菌株对纤维素的降解能力。根据实验结果发现,于CK相比,菌株Aneurinibacillus thermoaerophilus SX-2经过50℃,180r/min摇床培养3d后,收集剩余得到滤纸的,烘干、称量剩余质量计算出降解率约为32.9%。

[0071] 2. 该菌株在3g/L油脂浓度下摇瓶小试

[0072] 根据绘制的油脂石油醚溶液的标准曲线,对初步筛选得到的菌株 *Aneurinibacillus thermoaerophilus* SX-2进行摇瓶小试,测定该菌株在48小时对油脂的小试降解率,定量判断该菌株的降解能力,初步计算得到其对大豆油脂48小时的降解率为:53.4%。

[0073] 3.该降解菌在不同初始含油量下降解率

[0074] 菌株 *Aneurinibacillus thermoaerophilus* SX-2在不同豆油浓度的培养基中培养,48h后测定豆油含量,计算豆油降解率。在不同豆油浓度培养基中,菌株的降解率如图5所示。值得注意的是,结果显示该菌株 *Aneurinibacillus thermoaerophilus* SX-2的降解率在初始含油量3-30g/L的浓度范围内,其降解率随着油脂浓度升高而降解率升高,在初始含油量为30g/L时,其降解率高达69.6%。即使在浓度为45g/L时,对豆油的降解率仍然保持有22.6%的降解率效果。

[0075] 综上所述,本发明的菌株 *Aneurinibacillus thermoaerophilus* SX-2具有纤维素降解能力的同时具有极好的油脂降解能力,在酸性环境下(pH5)具有良好的生长能力。该菌株随着油脂浓度升高,其降解率随时升高,在油脂含量高达30g/L的时候,依然保持较高的油脂降解率。上述结果表明本发明的菌株 *Aneurinibacillus thermoaerophilus* SX-2在降解纤维素、餐厨油脂时具有优秀的效果,具有很好的应用推广价值。

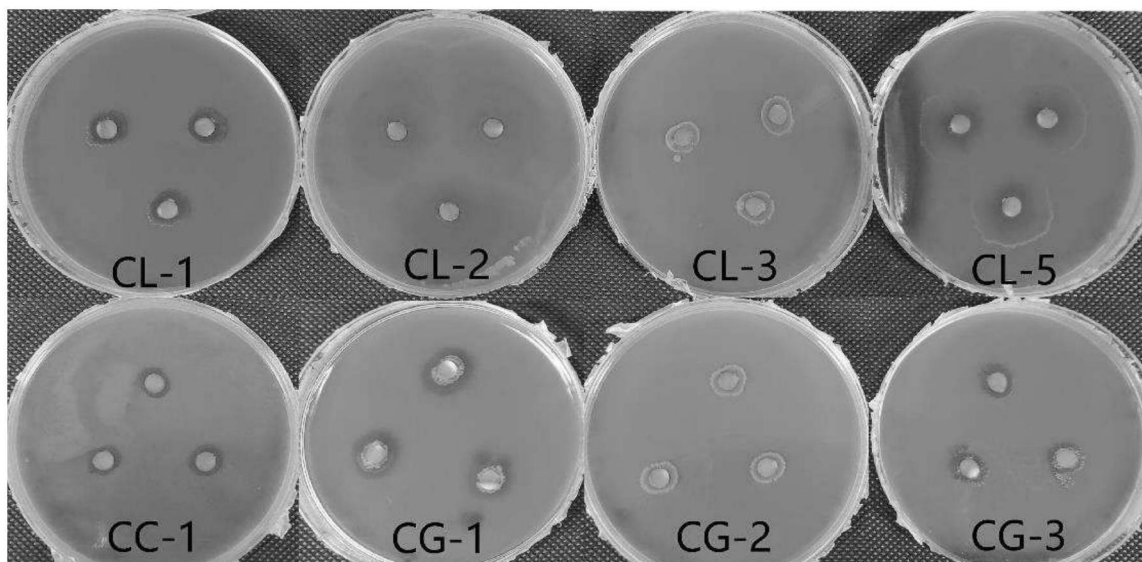


图1



图2

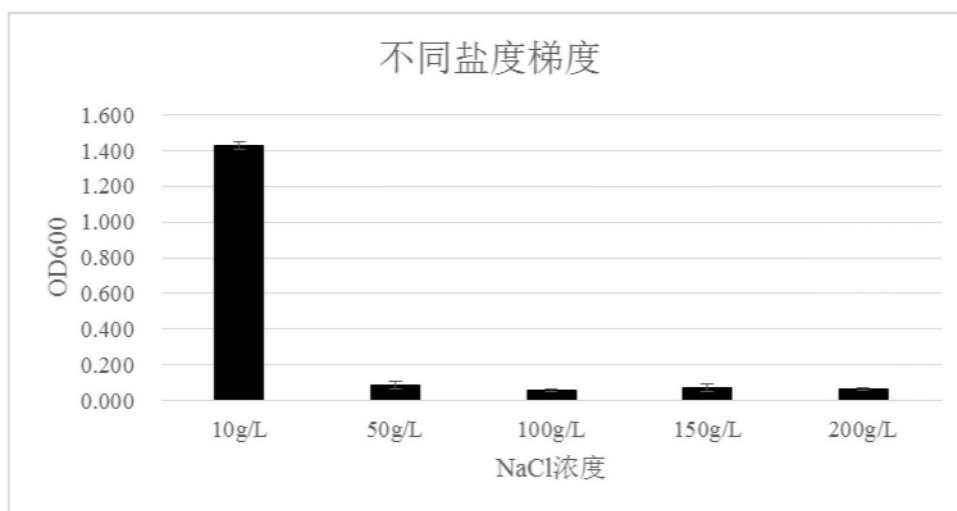


图3

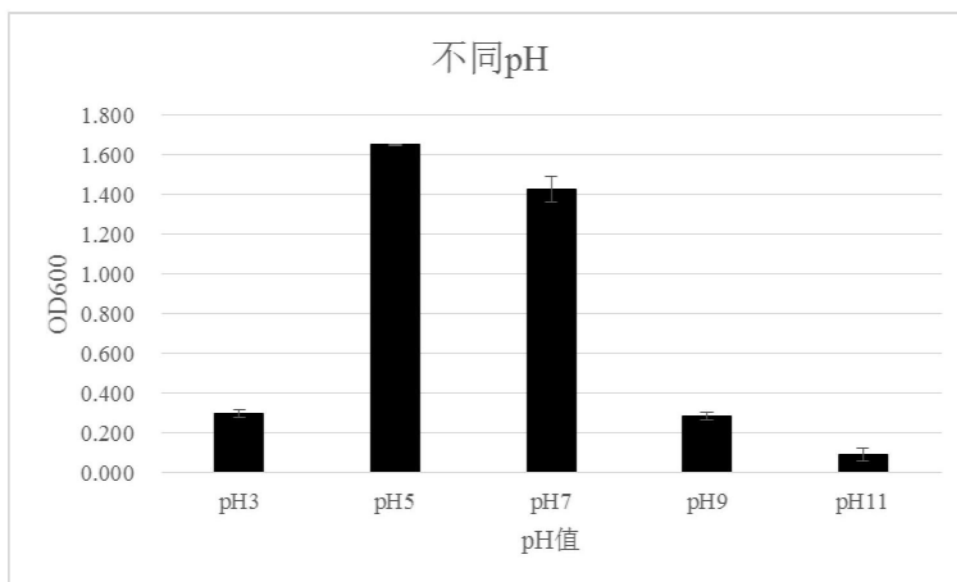


图4

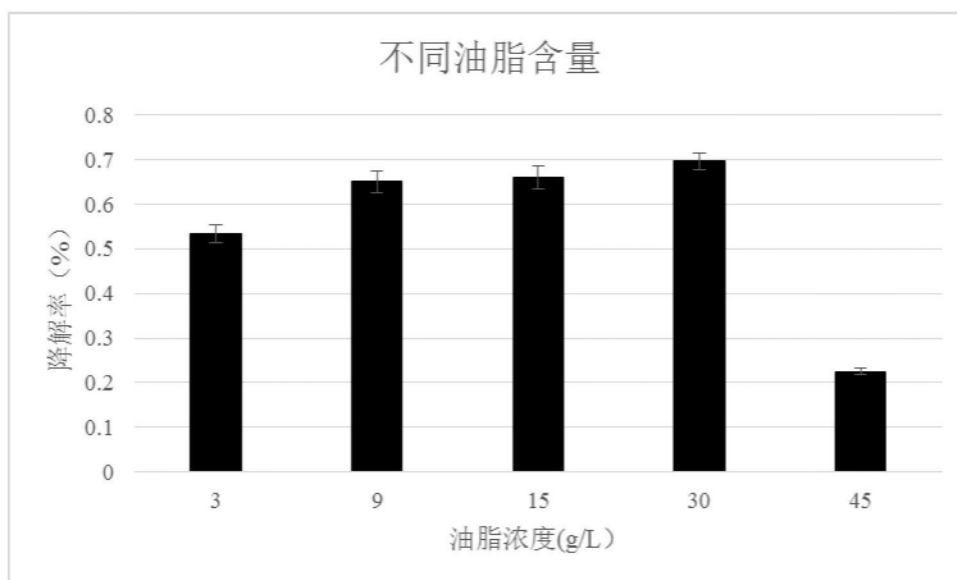


图5