



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103667074 B

(45) 授权公告日 2016. 04. 20

(21) 申请号 201310457016. 0

(22) 申请日 2013. 09. 30

(83) 生物保藏信息

CGMCC No. 8154 2013. 08. 30

(73) 专利权人 辽宁石油化工大学

地址 113001 辽宁省抚顺市望花区丹东路西
段一号

(72) 发明人 王战勇 毛海龙 白俊岩 苏婷婷
姜虎生

(74) 专利代理机构 沈阳亚泰专利商标代理有限
公司 21107

代理人 郭元艺

(51) Int. Cl.

C12N 1/14(2006. 01)

B09B 3/00(2006. 01)

C12R 1/77(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101173216 A, 2008. 05. 07,

CN 1997735 A, 2007. 07. 11,

董骞 等. 降解聚丁二酸丁二醇酯菌株的诱
变选育及降解性能. 《环境工程学报》. 2013, 第 7
卷(第 7 期), 摘要, 正文 2792 页左栏第一段.

审查员 武雪梅

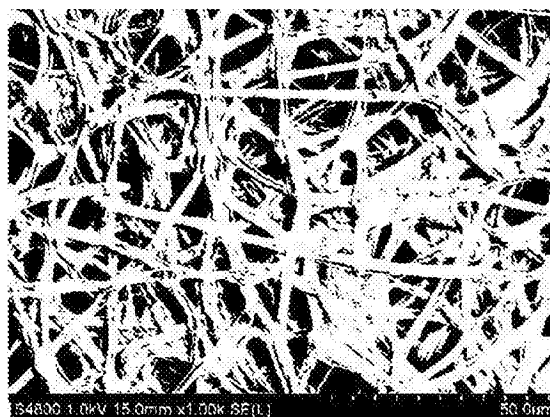
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

腐皮镰刀菌株及其在降解包含聚琥珀酸丁二
醇酯成分的塑料制品方面的应用

(57) 摘要

本发明属微生物和环境生物技术领域, 具体
涉及一株腐皮镰刀菌株及其在降解人工合成塑料
聚琥珀酸丁二醇酯中的应用。本发明提供的菌株
为腐皮镰刀菌 FS01, 保藏号为: CGMCC No. 8154,
其能够以聚琥珀酸丁二醇酯为培养基中唯一碳源
生长, 并对其具有较高的降解作用, 具体降解过程
包括(1) 取聚琥珀酸丁二醇酯薄膜, 70% 乙醇擦
拭表面后, 经紫外灯照射灭菌后, 放入无菌的基础
培养基中作为菌种培养的唯一碳源; (2) 将腐皮
镰刀菌 FS01 菌株 CGMCC No. 8154 接入培养基中,
定期取样, 测定材料失重情况。本发明可应用于以
聚琥珀酸丁二醇酯为主要成分的塑料高分子制品
废弃物的处理及其再生循环应用。



1.一株腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)菌株FS01,其特征在于,保藏号为:CGMCC No. 8154。

2.根据权利要求1所述的腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)菌株FS01在降解包含聚琥珀酸丁二醇酯成分的塑料制品方面的应用,其特征在于,按如下步骤实施:

(1)取聚琥珀酸丁二醇酯薄膜,70%乙醇擦拭表面后,经紫外灯照射,灭菌后,放入无菌的基础培养基中作为菌种培养的唯一碳源;所述基础培养基包括: KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4Cl 及 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;培养基为基础培养基与聚琥珀酸丁二醇酯薄膜的混合物;

(2)将腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株CGMCC No. 8154接入培养基中,定期取样,测定材料失重情况。

腐皮镰刀菌株及其在降解包含聚琥珀酸丁二醇酯成分的塑料 制品方面的应用

技术领域

[0001] 本发明属于微生物技术和环境生物技术领域,具体涉及一株腐皮镰刀菌*Fusarium solani* FS01及其在降解聚琥珀酸丁二醇酯为主要成分的高分子合成塑料中的应用。

背景技术

[0002] 目前高分子材料已经渗透到国民经济各个部门和人们生活的各个方面。以石油为原料的化学合成塑料以其质轻、价廉和性能优良的特点被广泛应用,成为现代社会必不可少的高分子材料。塑料已广泛的应用于日常生活和工业生产中。但塑料制品的广泛使用导致了塑料垃圾的与日俱增,造成了不可忽视的环境污染。传统塑料物化性质的稳定性使其难于利用化学、物理及生物的方法进行降解,这阻挠了塑料在医疗器械、药理学、农业和环境等领域的应用。因此利用生物可降解塑料来替代传统塑料是塑料工业的发展趋势。

[0003] 聚琥珀酸丁二醇酯(PBS)由丁二酸和丁二醇经缩聚而得,是目前世界公认的综合性能最好的生物降解塑料之一。PBS类聚酯具有很好的综合性能,其力学性能可以满足通用塑料的使用要求,而且只在堆肥等接触微生物的条件下才降解,在正常储存和使用过程中性能非常稳定。PBS加工性能非常好,可在通用加工设备上各类成型加工,是目前通用型降解塑料中加工性能最好的。PBS聚酯具有出色的耐热性能,热变形温度接近100℃,改性后可超过100℃,满足日常用品的耐热需求,可用于制备冷热饮包装和餐盒。

[0004] 目前有关PBS的研究主要集中于PBS的合成及改性,但PBS在改性或制成产品后,在自然界中往往降解缓慢且存在特殊性;另外,PBS自然环境条件下的降解率比其它可生物降解塑料,如聚己内酯(PCL)、聚β-羟基丁酸酯(PHB)等要低很多,且受周围环境条件的影响。因此在进行PBS材料合成和改性研究的同时,关于PBS的生物降解研究开始受到关注。

[0005] 一般来说,微生物胞外酶降解机制是生物降解塑料重要的降解机理之一。PBS被认为是十分易于降解的一种生物降解塑料,但是与PHB和PCL等易降解生物降解塑料相比,PBS降解菌株和降解酶的报道相对较少,研究也不够深入。

[0006] 目前,对高分子材料的生物降解,大部分都是利用微生物,而降解的最终产物也大多是回归环境循环的水和二氧化碳,很少有对降解初级阶段的降解单体的回收利用。国内目前的PBS工业化生产仍然采用石油基丁二酸和丁二醇,导致PBS生产成本偏高。而如果在PBS制品废弃后对其进行降解处理并回收其降解单体,并重新用于PBS的合成制造,就可以降低PBS生产对石油资源的依赖,如PBS降解单体回收具有经济可行性,则可进一步推进PBS的产业化进程和推广应用。因此如何实现PBS的可控降解,使其在使用期内性能稳定,而在废弃后可以迅速完全的降解进入再循环具有十分重要的意义。

[0007] 综上所述,对PBS降解菌株的选育、降解酶的表征、降解机制的研究及其降解产物回收利用可能性的研究具有重要的理论价值和实际意义。通过这些研究,将有利于深入的了解PBS降解过程,并有助于实现以PBS为代表的生物可降解塑料可控降解机制,促进循环再生系统的开发和利用,为生物可降解塑料早日全面替代传统塑料奠定基础。同时也将为

化学合成新的可降解材料及发现新的能够降解现有塑料的微生物及酶类提供指导信息。

[0008] 分离筛选高效的PBS降解菌株不论是对于PBS降解机理的研究还是对于PBS的循环再生利用体系的建立建都是十分必要的,更是具有重要的理论和实践意义。

发明内容

[0009] 本发明旨在克服现有技术的不足之处而提供一种降解率高,且具有促进PBS生物循环功能的腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)菌株FS01。另外,本发明还提供一种腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)菌株FS01在降解包含聚琥珀酸丁二醇酯成分的塑料制品方面的应用。

[0010] 为解决上述技术问题,本发明是这样实现的。

[0011] 一株腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)菌株FS01,其保藏号为:CGMCC No.8154。

[0012] 腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)菌株FS01的 ITS序列具有SEQ ID NO :1 所示。

[0013] 腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)菌株FS01在降解包含聚琥珀酸丁二醇酯成分的塑料制品方面的应用。

[0014] 腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)菌株FS01在降解包含聚琥珀酸丁二醇酯成分的塑料制品方面的应用,可按如下步骤实施。

[0015] (1)取聚琥珀酸丁二醇酯薄膜,70%乙醇擦拭表面后,经紫外灯照射,灭菌后,放入无菌的基础培养基中作为菌种培养的唯一碳源。

[0016] (2)将腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株CGMCC No.4366接入培养基中,定期取样,测定材料失重情况。

[0017] 作为一种优选方案,本发明所述基础培养基包括: KH_2PO_4 、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 NH_4Cl 及 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。

[0018] 进一步地,本发明所述培养基为基础培养基与聚琥珀酸丁二醇酯材料的混合物。

[0019] 更进一步地,本发明所述聚琥珀酸丁二醇酯材料可处于粉末、薄膜或乳化液等状态。

[0020] 本发明提供了腐皮镰刀菌*Fusarium solani* FS01,已于2013年8月30日在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:北京朝阳区大屯路,保藏号为CGMCC No.8154。上述腐皮镰刀菌*Fusarium solani* FS01的分类命名为“腐皮镰孢(*Fusarium solani*)”,保藏号为CGMCC No.8154。

[0021] 腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株在PDA培养基上菌落呈棉絮状,正面呈白色,背面呈浅黄色,该菌菌丝的扫描电镜照片见图1。

[0022] 本发明的第二方面,腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株能够以聚琥珀酸丁二醇酯为唯一碳源生长,除唯一碳源外,其基本培养基还包括无机氮源及无机盐等(详见具体实施例)。菌株生长温度范围较宽,最适生长温度为32℃。

[0023] 本发明还提供腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株在降解聚琥珀酸丁二醇酯中的应用,聚琥珀酸丁二醇酯材料的粉末、薄膜及乳化液均能够被本发明的腐皮镰刀菌降解,培养过程中肉眼可见粉末消失、薄膜崩解、乳化液由浊变清等现象。

[0024] 本发明的腐皮镰刀菌在聚琥珀酸丁二醇酯材料的诱导下能够分泌相应降解酶,液体发酵粗酶液对相应材料具有明显的酶解作用,酶解的主要产物为材料的组成单体或寡聚体。

[0025] 由于本发明提供的菌株对聚琥珀酸丁二醇酯材料具有降解特性,因此可应用于聚琥珀酸丁二醇酯合成塑料的降解及生物循环处理。

附图说明

[0026] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步说明。本发明的保护范围不仅局限于下列内容的表述。

[0027] 图1为本发明腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株菌丝的电镜照片。

[0028] 图2为本发明聚琥珀酸丁二醇酯薄膜的降解曲线。

[0029] 图3-1为本发明聚琥珀酸丁二醇酯薄膜被腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株降解前的扫描电镜照片。

[0030] 图3-2为本发明聚琥珀酸丁二醇酯薄膜被腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株降解后的扫描电镜照片。

[0031] 图4 为本发明腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株降解聚琥珀酸丁二醇酯粉末后发酵粗酶液降解琥珀酸丁二醇酯产物的质谱分析图谱。

具体实施方式

[0032] 实施例1 降解菌株的筛选。

[0033] 将土壤样品置于聚琥珀酸丁二醇酯液体培养基中富集后涂布于乳化平板培养基上,30℃培养7-10 天观察菌株的生长和透明圈的形成情况,筛选能够在平板上生长并形成明显透明水解圈的菌株。筛选培养基成分及制作方法如下:

[0034] 基础培养基组成为:4.54g KH_2PO_4 ,11.94g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$,0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,1g NH_4Cl ,0.005g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$,去离子水定容至1L,pH6.8-7.0。

[0035] PBS培养基:基础培养基添加0.2g 聚琥珀酸丁二醇酯粉末。

[0036] 乳化平板的制备:0.1g 聚琥珀酸丁二醇酯粉末溶于2ml 三氯甲烷中,将所得溶液与100ml 含有0.04g十二烷基硫酸钠的基础培养基混合,经超声波处理,制得聚琥珀酸丁二醇酯乳化液,70℃加热90min除去三氯甲烷,得到聚琥珀酸丁二醇酯乳化培养基,加入2.0 % 琼脂制得乳化平板。

[0037] 通过上述方法,从来源于石油污染土壤中筛选到了本发明提供的对聚琥珀酸丁二醇酯具有降解作用的腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株。

[0038] 实施例2腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株对聚琥珀酸丁二醇酯薄膜的降解。

[0039] 将聚琥珀酸丁二醇酯薄膜剪裁为1cm×3cm 大小,准确称重后,70%乙醇擦拭表面后经紫外灯照射30min灭菌后放入无菌的基本培养基中作为菌种培养的唯一碳源。将腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株接入培养基,32℃,150rpm 摇瓶培养,定期取样,将薄膜烘干至恒重后称量,计算失重率。

[0040] 在对聚琥珀酸丁二醇酯薄膜进行降解的实验中,经过15 天的培养,聚琥珀酸丁二醇酯薄膜的失重率达63%,并出现崩解现象,而对照薄膜并未发生失重及崩解,说明膜的降解是菌株或其产物作用的结果,而非单纯的水解作用。SEM 扫描电镜观察,可以明显的看到膜表面发生的变化(图3)。

[0041] 实施例3腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株对聚琥珀酸丁二醇酯粉末及乳化液的降解。

[0042] 将腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株接入以PBS粉末为唯一碳源的培养基,培养基同实施例1,32℃,150rpm 摇瓶培养,定期观察,过程中可发现随着培养时间的延长,粉末明显减少,在培养时间达到10d时,粉末几乎完全消失。

[0043] 腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株培养于PBS乳化液培养基,培养基同实施例1,32℃,150rpm 摇瓶培养5-6 天后,发现乳化液培养基液体明显变得清澈。

[0044] 实施例4 腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株发酵粗酶液的制备及其聚琥珀酸丁二醇酯降解产物的分析。

[0045] 腐皮镰刀菌(*Fusarium solani*)FS01菌株培养于PBS培养基,培养基同实施例1,培养7-8 天后,12000rpm 离心收集上清液,即为发酵粗酶液。将发酵粗酶液分别与PBS乳化液底物混合,50℃保温60分钟,12000rpm 离心取上清反应液,超滤(截留分子量3000道尔顿)后,膜下液采用LDI-1700 激光解吸电离飞行时间质谱仪测定其中的降解产物。仪器工作参数为:质量范围:0-800m/z,排斥电压:30kV,吸引电压:9.3kV,检测器电压:-4.75kV,真空度: 1×10^{-4} Pa。测定结果(图4) 显示,聚琥珀酸丁二醇酯的酶解产物包括丁二酸(质谱峰为117.1),丁二醇(质谱峰为89.2),丁二酸酐丁二醇(质谱峰为189.1),二丁二酸酐丁二醇(质谱峰为288.9)以及丁二酸酐二丁二醇(质谱峰为261.1)。

[0046] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

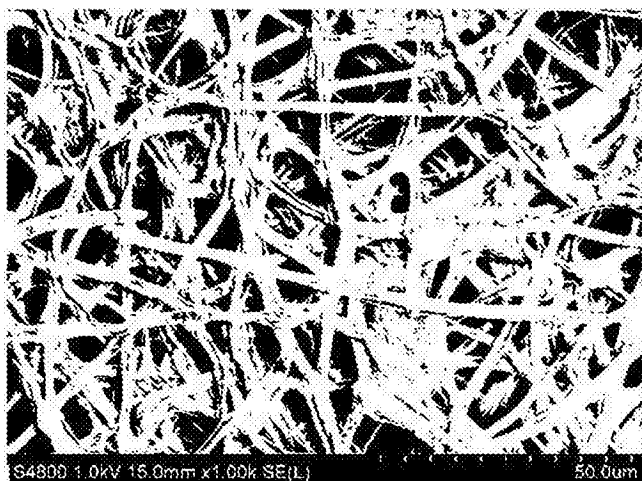


图1

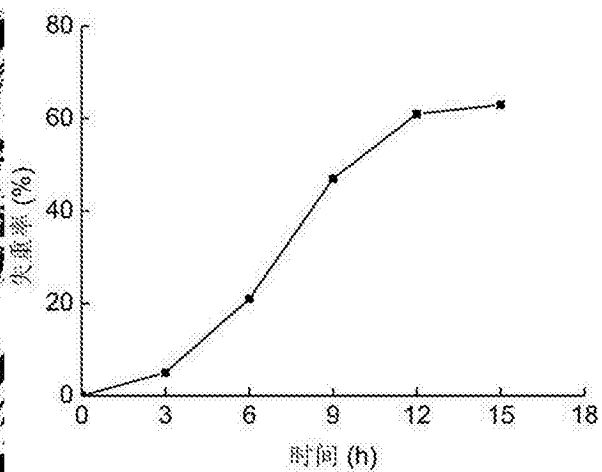


图2

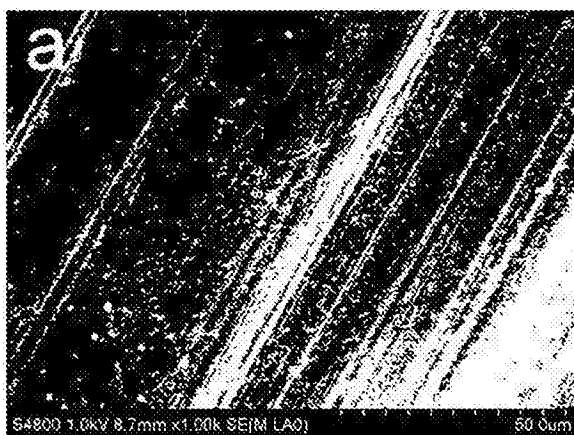


图3-1

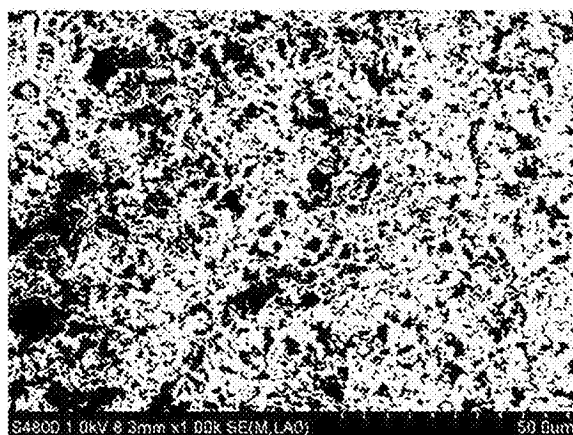


图3-2

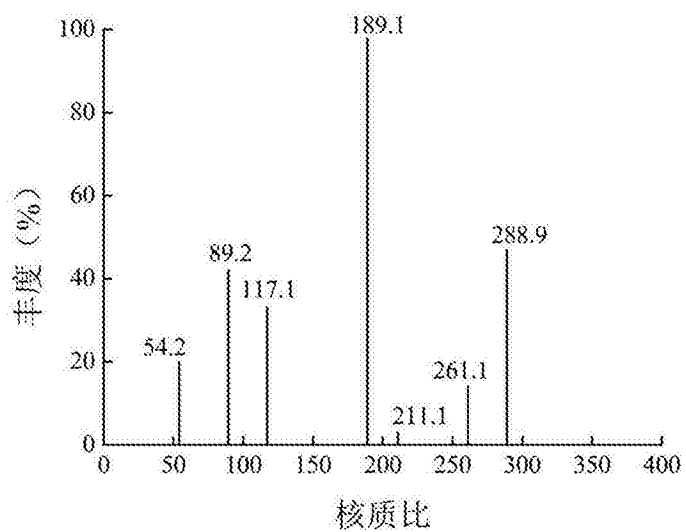


图4