

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910040368.X

[51] Int. Cl.

C12N 9/42 (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

C12R 1/66 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 11 月 25 日

[11] 公开号 CN 101586097A

[22] 申请日 2009.6.18

[21] 申请号 200910040368.X

[71] 申请人 中国科学院广州能源研究所

地址 510640 广东省广州市天河区五山园区
能源路 1 号

[72] 发明人 许敬亮 袁振宏 庄新姝 吕鹏梅
王忠铭 马隆龙 吴创之 张 宇

[74] 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理有限公司

代理人 莫瑶江

权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

一种白腐菌预处理稻草秸秆提高产纤维素酶
菌株酶活力的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种白腐菌预处理稻草秸秆提高产纤维素酶菌株酶活力的方法。其步骤包括：1) 将稻草秸秆粉碎得到秸秆粉，过筛备用；2) 在秸秆粉中接入预先培养好的白腐菌种子液；3) 30℃下保温、保湿静置培养，得到预处理的秸秆粉；4) 用预处理的秸秆粉配置液体产酶培养基，在产酶培养基中接种产纤维素酶菌株，用于提高产纤维素酶菌株的酶活力。本发明可通过在液体产酶培养基中添加白腐菌预处理的稻草秸秆，来提高产纤维素酶菌株的酶活力，可以有效降低纤维素酶的生产成本，攻克纤维素乙醇的现有技术瓶颈。

1. 一种白腐菌预处理稻草秸秆提高产纤维素酶菌株酶活力的方法，其特征在于包括如下步骤：
 - 1) 将稻草秸秆粉碎得到秸秆粉，过筛备用；
 - 2) 在秸秆粉中接入预先培养好的白腐菌种子液；
 - 3) 30℃下保温、保湿静置培养，即为预处理的秸秆粉；
 - 4) 用预处理的秸秆粉配置液体产酶培养基，在产酶培养基中接种产纤维素酶菌株，用于提高产纤维素酶菌株的酶活力。
- 2、如权利要求1所述的白腐菌预处理稻草秸秆提高产纤维素酶菌株酶活力的方法，其特征在于所述步骤1)中，用于过筛的筛孔尺寸为60~100目。
- 3、如权利要求1所述的白腐菌预处理稻草秸秆提高产纤维素酶菌株酶活力的方法，其特征在于所述步骤2)中，白腐菌种子液和秸秆粉的体积质量比为10~20%。
- 4、如权利要求1所述的白腐菌预处理稻草秸秆提高产纤维素酶菌株酶活力的方法，其特征在于所述步骤3)中，静置培养的时间为14~28天。
- 5、如权利要求1所述的白腐菌预处理稻草秸秆提高产纤维素酶菌株酶活力的方法，其特征在于所述步骤4)中，所述的液体产酶培养基配方如下： KH_2PO_4 2g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.3g, CaCl_2 0.3g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5mg, MnSO_4 1.6mg, ZnCl_2 1.7mg, CoCl_2 1.7mg, 预处理秸秆粉干重2~10g, 水1000mL, pH 6.0。
- 6、如权利要求1所述的白腐菌预处理稻草秸秆提高产纤维素酶菌株酶活力的方法，其特征在于所述步骤4)中，产纤维素酶菌液和液体产酶培养基的体积比为

5~10%。

一种白腐菌预处理稻草秸秆提高产纤维素酶菌株酶活力的方法

技术领域

本发明涉及一种白腐菌预处理稻草秸秆提高产纤维素酶菌株酶活力的方法，属于生物技术领域。

背景技术

我国是一个农业大国，生物质资源极其丰富，仅每年的农作物秸秆产量就达7亿吨/年，其中稻草秸秆就近2亿吨，占秸秆资源量的30%左右。这些秸秆大部分被废弃在田间地头，或直接燃烧作为生活用能，造成了资源的浪费和环境的污染。利用纤维素酶对经过预处理的秸秆进行糖化并进而发酵生成乙醇，纯乙醇或与汽油混合可直接代替汽油、柴油等化石燃料，对于调整我国现有以煤炭、石油等化石能源为主的能源结构，确保我国能源安全、粮食安全有着极为重要的意义，也是我国生物质液体燃料发展的必由之路。但由于缺乏有效的预处理技术、纤维素酶生产成本较高以及五碳糖较难发酵等技术瓶颈问题的存在，制约着纤维素乙醇的产业化进程。

白腐菌作为降解木质素能力最强的微生物，广泛地被用于木质纤维素原料的生物预处理。诸多研究表明，秸秆在经过白腐菌预处理后，不仅营养成分有所提高，而且大部分的木质素结构被降解或破坏，非常有利于后续酶解的可及性。对于采用白腐菌生物预处理稻草秸秆，研究生物预处理对产纤维素酶菌株酶活力提高的影响，国内还鲜有专利文献报导。

发明内容

本发明的目的在于提供一种采用白腐菌预处理稻草秸秆提高产纤维素酶菌株酶活力的方法。

本发明通过在粉碎的稻草秸秆上接种白腐菌，保温、保湿预处理一定时间后，取预处理后的稻草秸秆粉接种产酶培养基，可有效提高产纤维素酶菌株的酶活力，从而为降低纤维素酶的生产成本提供了可能。

本发明的具体步骤如下：

- 1) 将稻草秸秆粉碎得到秸秆粉，过筛备用；
- 2) 在秸秆粉中接入预先培养好的白腐菌种子液；
- 3) 30℃下保温、保湿静置培养，得到预处理的秸秆粉；
- 4) 用预处理的秸秆粉配置液体产酶培养基，在产酶培养基中接种产纤维素酶菌株，用于提高产纤维素酶菌株的酶活力。

所述步骤1)中，用于过筛的筛孔尺寸为60~100目。

所述步骤2)中，白腐菌种子液和秸秆粉的体积质量比为10~20% (V/W)。

所述步骤3)中，静置培养的时间为14~28天。

所述步骤4)中，所述的液体产酶培养基配方如下：KH₂PO₄ 2g，(NH₄)₂SO₄ 2.5g，MgSO₄·7H₂O 0.3g，CaCl₂ 0.3g，FeSO₄·7H₂O 5mg，MnSO₄ 1.6mg，ZnCl₂ 1.7mg，CoCl₂ 1.7mg，预处理秸秆粉 2~10g (干重)，水 1000mL，pH 6.0。

所述步骤4)中，产纤维素酶菌液和液体产酶培养基的体积比为5~10%。

所述步骤4)中，产纤维素酶菌株可选用野生型高产菌株，例如木霉、曲霉

和肉座菌等。

本发明通过在液体产酶培养基中添加白腐菌预处理后的秸秆粉的方法，提高产纤维素酶菌株的酶活力，可以有效降低纤维素酶的生产成本，攻克纤维素乙醇的现有技术瓶颈。

具体实施方式

为更好地理解本发明，下面结合实施实例对本发明作进一步描述。这些实施实例仅限于说明本发明，而不适用于限制本发明的范围。此外，针对本发明所作各种等价改动和修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

实施例 1

将稻草秸秆粉碎，过 60 目筛备用。按体积质量比 10% 的比例，在稻草秸秆中接入事先培养好的黄孢原毛平革菌（*Phanerochaete chrysosporium*）40719 种子液，30℃ 下保温、保湿静置培养 14 天后，即得到预处理的秸秆粉。按 0.2%（固液比）的量添加入液体产酶培养基中。

所述的液体产酶培养基配方如下：KH₂PO₄ 2g，(NH₄)₂SO₄ 2.5g，MgSO₄·7H₂O 0.3g，CaCl₂ 0.3g，FeSO₄·7H₂O 5mg，MnSO₄ 1.6mg，ZnCl₂ 1.7mg，CoCl₂ 1.7mg，水 1000mL，pH 6.0，121℃ 灭菌 30min。

添加 2g 预处理后的秸秆粉（干重）到灭菌的液体产酶培养基中，按 5% 的体积比，接种产纤维素酶肉座菌（*Hypocrea* sp.）Z28 于产酶培养基，用于提高 Z28 菌株的酶活力。

实施例 2

将稻草秸秆粉碎，过 80 目筛备用。按体积质量比 15% 的比例，在稻草秸秆中接入事先培养好的黄孢原毛平革菌（*Phanerochaete chrysosporium*）40719 种子液，30℃ 下保温、保湿静置培养 21 天后，即得到预处理的秸秆粉。按 0.6%（固液比）的量添加入液体产酶培养基中。

所述的液体产酶培养基配方如下：KH₂PO₄ 2g，(NH₄)₂SO₄ 2.5g，MgSO₄·7H₂O 0.3g，CaCl₂ 0.3g，FeSO₄·7H₂O 5mg，MnSO₄ 1.6mg，ZnCl₂ 1.7mg，CoCl₂ 1.7mg，水 1000mL，pH 6.0，121℃ 灭菌 30min。

添加 6g 预处理后的秸秆粉（干重）到灭菌的液体产酶培养基中，按 8% 的体积比，接种产纤维素酶肉座菌（*Hypocrea* sp.）Z28 于产酶培养基，用于提高 Z28 菌株的酶活力。

实施例 3

将稻草秸秆粉碎，过 80 目筛备用。按体积质量比 15% 的比例，在稻草秸秆中接入事先培养好的黄孢原毛平革菌（*Phanerochaete chrysosporium*）40719 种子液，30℃ 下保温、保湿静置培养 21 天后，即得到预处理的秸秆粉。按 0.6%（固液比）的量添加入液体产酶培养基中。

所述的液体产酶培养基配方如下：KH₂PO₄ 2g，(NH₄)₂SO₄ 2.5g，MgSO₄·7H₂O 0.3g，CaCl₂ 0.3g，FeSO₄·7H₂O 5mg，MnSO₄ 1.6mg，ZnCl₂ 1.7mg，CoCl₂ 1.7mg，预处理秸秆粉 6g（干重），水 1000mL，pH 6.0，121℃ 灭菌 30min。

按 8%的体积比，接种产纤维素酶肉座菌（*Hypocrea* sp.）Z28 于产酶培养基，用于提高 Z28 菌株的酶活力。

实施例 4

将稻草秸秆粉碎，过 100 目筛备用。按体积质量比 20%的比例，在稻草秸秆中接入事先培养好的黄孢原毛平革菌（*Phanerochaete chrysosporium*）40719 种子液，30℃下保温、保湿静置培养 28 天后，即为预处理的稻草秸秆。按 1.0%（固液比）的量添加入液体产酶培养基中。

所述的液体产酶培养基配方如下：KH₂PO₄ 2g，(NH₄)₂SO₄ 2.5g，MgSO₄·7H₂O 0.3g，CaCl₂ 0.3g，FeSO₄·7H₂O 5mg，MnSO₄ 1.6mg，ZnCl₂ 1.7mg，CoCl₂ 1.7mg，预处理秸秆粉 10g（干重），水 1000mL，pH 6.0，121℃灭菌 30min。

按 10%的体积比，接种产纤维素酶肉座菌（*Hypocrea* sp.）Z28 于产酶培养基，用于提高 Z28 菌株的酶活力。

分别以羧甲基纤维素钠、Whatman 1 号定性滤纸和 4-硝基苯基-β-D-吡喃葡萄糖苷为底物测定 CMC 酶活、滤纸酶活（FPA）和 β-葡萄糖苷酶酶活。相应实施例的酶活提高如下：

实施例	CMC 酶活 提高 (%)	滤纸酶活（FPA） 提高 (%)	β-葡萄糖苷酶 酶活提高 (%)
1	29.12	32.6	16.4

2	27.4	44.1	38.6
3	27.4	47	29.5
4	31.4	51.2	49.2
