



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108795814 B

(45) 授权公告日 2021.08.27

(21) 申请号 201810663398.5

(22) 申请日 2018.06.25

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108795814 A

(43) 申请公布日 2018.11.13

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO.M 2018365 2018.06.13

(73) 专利权人 信阳师范学院

地址 464000 河南省信阳市南湖路237号

(72) 发明人 王天文 梁辰 高婉茹 高倩

罗欣琪

(74) 专利代理机构 南京业腾知识产权代理事务

所(特殊普通合伙) 32321

代理人 郑婷

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23K 10/12 (2016.01)

C12R 1/085 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 105950497 A,2016.09.21

CN 103820352 A,2014.05.28

CN 103695354 A,2014.04.02

CN 107099472 A,2017.08.29

CN 107868762 A,2018.04.03

WO 2014145964 A1,2014.09.18

朱辉等.蜡样芽孢杆菌YSQ08与角质蛋白酶联合降解羽毛的研究.《饲料广角》.2016,第19卷第46-49页.

Abhrajyoti Ghosh et al..Degradation of raw feather by a novel high molecular weight extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* DCUW.《J Ind Microbiol Biotechnol》.2008,第35卷第825-834页.

审查员 关靖雯

权利要求书1页 说明书5页

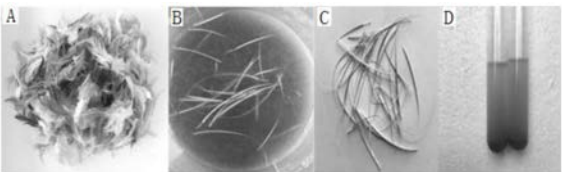
序列表1页 附图1页

(54) 发明名称

一种可降解废弃羽毛的菌株、筛选方法及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种可降解废弃羽毛的菌株,属于微生物技术领域。该菌株为*Bacillus cereus* FDB-18B,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期为2018年6月13日,保藏编号为CCTCC NO.2018365。本发明的菌株是从经风干后茶园土壤中分离获得的,其可高效降解废弃羽毛并得到可用作饲料添加物或农田灌溉的氨基酸和多肽,实现生物质资源的综合利用,同时减少家禽养殖对环境的污染。此外,该菌株可以产生淀粉酶,可以同时实现对废弃羽毛和含淀粉质的食品加工中产生的废水的综合处理。由于该菌降解能力强,发酵周期短,最大程度地保持了蛋白质、多肽及氨基酸成分,可以提高作为饲料添加物的营养价值和利用率。



1. 一种可降解废弃羽毛的菌株,其特征在于,该菌株的分类命名为蜡样芽胞杆菌(*Bacillus cereus*)FDB-18B,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期为:2018年6月13日,保藏编号为:CCTCC NO.2018365。

2. 如权利要求1所述的可降解废弃羽毛的菌株,其特征在于,所述菌株的16S rRNA序列如SEQ ID NO:1所示。

3. 权利要求1或2所述菌株在降解羽毛方面的应用,其特征在于,以完整羽毛为唯一的碳源和氮源制成发酵培养基,向该羽毛发酵培养基中加入种子液,在37℃ 150rpm条件下培养,即可实现对完整羽毛的高效降解。

一种可降解废弃羽毛的菌株、筛选方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种可降解废弃羽毛的菌株,属于微生物技术领域。

背景技术

[0002] 家禽生产产生的废弃羽毛,规模可观。据估计,就中国而言,年产量也可高达100万吨。虽然羽毛的主要成分是蛋白质,但是其中角蛋白的含量高达90%左右,因此难以被降解,更不容易被动物肠道的消化酶所消化。因此,长期以来并未被有效利用。这不但造成这些可利用生物资源的浪费,而且也带来了环境污染的问题。

[0003] 随着近年来中国人民生活水平的提高,动物性食物所占的比例不断增加,家禽养殖的规模也进一步扩大,使由此产生的废弃羽毛数量更为巨大。这些羽毛废弃物主要的处理方法为填埋、焚烧,给生态环境带来严重的挑战。虽然国内外均有关于羽毛利用的报道,但是其采用的方法多是物理方法,如高温高压下水解,膨化,化学法酸碱水解等。这些方法虽然可以在一定程度上促进动物对羽毛的消化利用,但是这些处理过程存在固有的缺陷,耗能高,污染环境。更重要的是,经过这些过程处理后,所得的羽毛粉的营养价值有遭到一定程度的破坏,因为那些不稳定的成分会在处理过程中变质,导致营养物质的流失。开发更为绿色环保和高效的废弃羽毛利用技术,对于解决废弃羽毛带来的资源浪费和环境污染问题,十分必要。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于解决现有技术的不足,提供一种可降解废弃羽毛的菌株,其能快速地降解完整羽毛,得到可利用的氨基酸和多肽,其降解效率高,发酵周期短,避免了大部分氨基酸的损失,提高了羽毛降解产物的可吸收利用性。

[0005] 技术方案

[0006] 一种可降解废弃羽毛的菌株,该菌株为*Bacillus cereus* FDB-18B,保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏日期为:2018年6月13日,保藏编号为:CCTCCNO.2018365。

[0007] 本发明可降解废弃羽毛的菌株是从经风干后茶园土壤中分离获得的。该菌株的生长条件为如下:培养基为典型的LB培养基(胰蛋白胨10g/L,酵母粉5g/L,氯化钠10g/L,121℃20min高压灭菌,pH为6.8-8.3,温度为25-37℃),经过16S rRNA扩增和序列比对分析,鉴定为*Bacillus cereus*,该菌株定命名为*Bacillus cereus* FDB-18B。初筛时,将土壤样品制成的悬液直接加入高温的初筛培养基中,提高了筛选效率,在初筛时以羽毛为主要碳源和氮源,很好地起到了筛选作用,使非目标微生物得到有效淘汰;在后续获得纯培养的过程中,使用常用的LB培养基,使操作更为简便;本发明的*Bacillus cereus* FDB-18B,可应用于高效降解完整羽毛,降解羽毛后得到可利用的氨基酸和多肽,用作饲料添加物。

[0008] 本发明可降解废弃羽毛的菌株的16S rRNA序列如SEQ ID NO:1所示。

[0009] 本发明所述可降解废弃羽毛的菌株的筛选方法:

[0010] (1) 取样:从风干后的茶园土壤样品中,称取4g土壤样品,溶于40ml已灭菌的无菌

水中,充分涡旋振荡后静置,得到土壤悬液;

[0011] (2) 初筛:取1ml土壤悬液,加入到温度不低于90℃的250ml初筛培养基中,在37℃、150rpm的条件下培养两天,得到混合液;

[0012] (3) 复筛:将步骤(2)的混合液取1ml转接到复筛培养基,继续在37℃、150rpm的条件下培养,待羽毛明显降解后,取100μl培养液加入到900μl的无菌水中进行梯度稀释,将稀释液50μl涂布于固体LB平板上,在37℃恒温培养箱中培养过夜;

[0013] (4) 获得纯培养:观察步骤(3)固体LB平板上微生物的生长情况及菌落形态,将具有不同形态的菌落,在新的固体LB平板上进行划线和纯化;重复三次,直至在同一个平板上长出的菌落形态一致为止,得到纯化的菌株;

[0014] (5) 降解能力的定量测定:对筛选获得的各个纯化的菌株,分别接种到含10ml液体LB培养基的试管中,在37℃、150rpm的条件下培养过夜,并按照1:100的比例接种到新鲜液体LB培养基中,在37℃、150rpm的条件下培养至对数生长期,常温下8000r/min离心3min,收集细胞得到种子液,将各种子液按照1.25%的比例分别接种到添加有完整羽毛的羽毛发酵培养基中,在37℃、150rpm的条件下进行摇瓶发酵,在24h时测定剩余羽毛的量,计算降解率,计算公式为 $111.8\% \times (1 - W_{\text{残留}}/W_{\text{初始}})$;选取降解率最高者,作为高效降解羽毛菌株。

[0015] 步骤(2)中,所述初筛培养基组成为:氯化钠1.7mM,磷酸氢二钾8.0mM,磷酸二氢钾5.3mM,氯化镁0.5mM,酵母粉0.2g/L,含剪碎的羽毛10g/L(干重),pH值为7.4-7.8,在121℃灭菌20min。

[0016] 步骤(3)中,所述复筛培养基组成为:氯化钠1.7mM,磷酸氢二钾8.0mM,磷酸二氢钾5.3mM,氯化镁0.5mM,酵母粉0.1g/L,含完整羽毛10g/L(干重),pH值为7.4-7.8;121℃灭菌20min。

[0017] 步骤(3)和(4)中,所述固体LB平板的组成为:蛋白胨10.0g/L,酵母粉5.0g/L,氯化钠10.0g/L,琼脂20.0g/L,pH7.0;121℃灭菌20min。

[0018] 步骤(5)中,所述液体LB培养基的组分为(g/L):蛋白胨10.0g/L,酵母粉5.0g/L,氯化钠10.0g/L,用NaOH溶液调pH7.0;121℃灭菌20min。

[0019] 步骤(5)中,所述羽毛发酵培养基组分为:氯化钠1.7mM,磷酸氢二钾8.0mM,磷酸二氢钾5.3mM,氯化镁0.5mM,酵母粉0.1g/L,含完整的羽毛10g/L(干重),其pH值为7.4-7.8;102℃蒸煮5min。

[0020] 上述菌株在降解羽毛方面的应用,应用方法:以完整羽毛为唯一的碳源和氮源制成发酵培养基,向该羽毛发酵培养基中加入种子液(种子液用量为1:1000-1:125,羽毛含量为最大30g/L完整干羽毛),在37℃150rpm条件下培养,即可实现对完整羽毛的高效降解。

[0021] 有益效果:

[0022] 1.本发明提供了一种微生物菌株*Bacillus cereus* FDB-18B,该菌株可应用于降解完整羽毛,24h时达到90%以上,降解时,仅需对羽毛进行简单蒸煮(102℃,5min)即可,在完整羽毛含量为7.5g/L,至30g/L范围内,均可对完整羽毛进行高效降解;

[0023] 2.本发明所述的菌种筛选方法中,初筛时,将土壤样品制成的悬液直接加入高温的初筛培养基中,提高了筛选效率;在初筛时以羽毛为主要碳源和氮源,很好地起到了筛选作用,使非目标微生物得到有效淘汰;在后续获得纯培养的过程中,使用常用的LB培养基,使操作更为简便;相对于传统的筛菌方法,先富集而后筛选,更具有针对性,因为混合微生

物在营养丰富的培养基里增殖时,并不能使所有的微生物(尤其是目标微生物)都获得程度一致的增殖。

[0024] 3.本发明的微生物菌株能快速地降解完整羽毛,得到可利用的氨基酸和多肽,用作饲料添加物,同时减少环境污染,与传统物理化学法相比,无需提供设备,能耗降低,同时,其降解效率高,发酵周期短,避免了大部分氨基酸的损失,提高了羽毛降解产物的可吸收利用性。

[0025] 4.本发明的微生物菌株*Bacillus cereus* FDB-18B可以产生淀粉酶,可以同时实现对废弃羽毛和含淀粉质的食品加工中产生的废水的综合处理,表现出更大优势。

附图说明

[0026] 图1为完整羽毛经本发明的菌株降解24h后的照片;

[0027] 图2为本发明的*Bacillus cereus* FDB-18B在含淀粉培养基上的菌落形态图。

具体实施方式

[0028] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明。以下具体实施例为对本发明的上述内容做进一步的详细说明,但并不意味着本发明上述主体的范围仅限于以下实施例。凡基于本发明的上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

[0029] 实施例1:可高效降解废弃羽毛的细菌菌株的筛选和分子鉴定

[0030] 以风干4个月的茶园土壤为样品,通过初筛、复筛、获得纯培养、羽毛降解能力的定量测定、分子鉴定、和菌种保藏等步骤,得到高效羽毛降解菌株*Bacillus cereus* FDB-18B。具体的筛选步骤如下:

[0031] (1)取样:称取风干4个月的茶园土壤样品4g,溶于40ml已灭菌的无菌水中,充分涡旋振荡后,静置5min,得到土壤悬液;

[0032] (2)初筛:取1ml土壤悬液,加入到初筛培养基中(刚灭菌结束,温度不低于90℃),37℃,150rpm的条件下培养2天,得到混合液;

[0033] 羽毛预处理:家禽屠宰点收集到的羽毛经清洗处理后,65℃烘干至恒重,备用。

[0034] 初筛培养基的配制:氯化钠1.7mM,磷酸氢二钾8.0mM,磷酸二氢钾,5.3mM,氯化镁0.5mM,酵母粉0.2g/L,含剪碎的羽毛10g/L(干重),其pH值为7.4-7.8;121℃灭菌20min。

[0035] (3)复筛:将步骤(2)的混合液取出1ml培养液接种于复筛培养基中,并在37℃、150rpm的条件下继续培养;待羽毛明显降解后,取100μl培养液加入到900μl的无菌水中进行梯度稀释,稀释至10⁻⁶,将10⁻⁶的稀释液50μl涂布于固体LB平板上,在37℃恒温培养箱中培养过夜;

[0036] 复筛培养基组成为:氯化钠1.7mM,磷酸氢二钾8.0mM,磷酸二氢钾,5.3mM,氯化镁0.5mM,酵母粉0.1g/L,含完整羽毛10g/L(干重),其pH值为7.4-7.8;121℃灭菌20min。

[0037] 所述固体LB平板的组成为:蛋白胨10.0g/L,酵母粉5.0g/L,氯化钠10.0g/L,琼脂20.0g/L,pH7.0;121℃灭菌20min。

[0038] (4)获得纯培养:观察步骤(3)固体LB平板上微生物的生长情况及菌落形态,将具有不同形态的菌落,在新的固体LB平板上进行划线和纯化;重复三次,直至在同一个平板上长出的菌落形态一致为止,得到纯化的菌株;

[0039] (5) 降解能力的定量测定:对筛选获得的各个纯化的菌株,分别接种到含10ml液体LB培养基的试管中,在37℃、150rpm的条件下培养过夜,并按照1:100的比例接种到新鲜液体LB培养基中,在37℃、150rpm的条件下培养至对数生长期,常温下8000r/min离心3min,收集细胞得到种子液,将各种子液按照1.25%的比例分别接种到添加有完整羽毛的羽毛发酵培养基中,在37℃、150rpm的条件下进行摇瓶发酵,在24h时测定剩余羽毛的量,计算降解率,计算公式为 $111.8\% \times (1 - W_{\text{残留}}/W_{\text{初始}})$;选取降解率最高者,作为高效降解羽毛菌株。

[0040] 所述液体LB培养基的组分为(g/L):蛋白胨10.0,酵母粉5.0,氯化钠10.0,琼脂(粉)20.0,用4M NaOH调至pH7.0;121℃灭菌20min;

[0041] 所述羽毛发酵培养基组分为:氯化钠1.7mM,磷酸氢二钾8.0mM,磷酸二氢钾5.3mM,氯化镁0.5mM,酵母粉0.2g/L,含完整的羽毛10g/L(干重),其pH值为7.4-7.8;102℃蒸煮5min。

[0042] (6) 菌种分子鉴定:将步骤(5)中获得的降解能力最强者,划线接种到固体LB平板上,挑取筛选到的菌株形成的单克隆,接种于10ml液体LB中培养(37℃,150rpm)过夜。利用基因组DNA提取试剂盒(Tiagen公司)进行基因组DNA提取,用16S rRNA通用引物进行PCR扩增,对扩增后获得的PCR产物进行适当纯化后,送Genscript公司测序,序列如SEQ ID NO:1所示,用测序获得的16S rRNA基因序列在NCBI的GenBank数据库进行序列比对,相似性最高者确定为该菌株的学名。

[0043] (7) 菌种保藏:将在步骤(5)中降解率最高者对应的单菌落(来自步骤(5)),接种到LB液体培养基中,培养过夜(37℃,150rpm)后,将培养物与已灭菌的50%的甘油水溶液以3:7的比例混合,于2ml冻存管中冻存于-80℃的冰箱中备用。

[0044] 实施例2:可高效降解废弃羽毛的细菌菌株*Bacillus cereus* FDB-18B的应用

[0045] 从-80℃的冰箱中取出已冻存的菌种管,立即置于37℃的温水中,使其迅速融化,取10μl接种于10ml已灭菌的LB液体培养基中,37℃(150rpm)的摇床中培养过夜(约15h)。按1:50-100的比例,将菌液接种到新的含50ml LB液体培养基的三角瓶中,37℃(150rpm)的摇床中培养至对数期,将此培养物以初始细胞浓度为0.007-0.06(OD600)接种到含有完整羽毛的发酵培养基中,在37℃150rpm条件下继续培养,进行羽毛的降解,并拍照记录完整羽毛经24h降解后的变化,结果见图1。

[0046] 羽毛发酵培养基的具体成分为:氯化钠1.7mM,磷酸氢二钾8.0mM,磷酸二氢钾5.3mM,氯化镁0.5mM,酵母粉0.2g/L,含完整的羽毛10g/L(干重),其pH值为7.4-7.8;102℃蒸煮5min。

[0047] 实验结果:经过24h降解,完整羽毛的降解率不低于90%。完整羽毛经24h降解后的照片如图1所示,其中A-降解前清洗烘干后的完整羽毛,B-降解24h时后形成混合液,C-降解24h后剩下的羽轴部分,D-降解24h时后的降解液静置1h后,由图1可以看出,本发明的细菌菌株*Bacillus cereus* FDB-18B能高效降解废弃羽毛。

[0048] 实施例3:可高效降解废弃羽毛的细菌菌株*Bacillus cereus* FDB-18B的应用的优化

[0049] 从-80℃的冰箱中取出已冻存的菌种管,立即置于37℃的温水中,使其迅速融化,取10μl接种于10ml已灭菌的LB液体培养基中,37℃、150rpm的摇床中培养过夜(约15h)。按1:50-100的比例,将菌液接种到新的含50ml LB液体培养基的三角瓶中,37℃(150rpm)的摇

床中培养至对数期,将此培养物以初始细胞浓度为0.015 (OD600) 接种到含有完整羽毛的发酵培养基中(添加可溶性淀粉浓度为0,1.25%,2.5%,5%,10%,重量/体积比,其中,以添加可溶性淀粉浓度为0的作为对照组,其余的为实验组),在37℃、150rpm条件下继续培养,进行羽毛的降解,24h时测定羽毛的降解率。

[0050] 结果发现,在添加可溶性淀粉为1.25%的实验组中,降解效率与对照组相比提高了8%,*Bacillus cereus* FDB-18B在含淀粉培养基上的菌落形态图见图2,在图2上能很明显的看到*Bacillus cereus* FDB-18B产淀粉酶形成的透明圈,这说明本发明的*Bacillus cereus* FDB-18B能产淀粉酶。

[0051] 以上所述,仅为本发明已探索的并取得良好效果的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明披露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 信阳师范学院	
[0003]	<120> 一种可降解废弃羽毛的菌株、筛选方法及其应用	
[0004]	<160> 1	
[0005]	<170> SIPOSequenceListing 1.0	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 813	
[0008]	<212> DNA/RNA	
[0009]	<213> 蜡状芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)	
[0010]	<400> 1	
[0011]	gcagcgagcg aaggaaagag cgccagaaga gcggcggacg gggagaacac ggggaaccgc	60
[0012]	ccaaagacgg gaaaccggg aaaccggggc aaaccggaaa cagaaccgca ggcgaaagaa	120
[0013]	aggcggccgg cgcacaggag gaccgcgcgc caagcagggg aggaacggcc accaaggcaa	180
[0014]	cgagcgagcc gaccgagagg ggacggccac acgggacgag acacggccca gaccacggg	240
[0015]	aggcagcaga ggggaaccgc aaggacgaaa gcgacggagc aacgccgcgg aggagaaggc	300
[0016]	cgggcgaaaa ccggagggaa gaacaaggca ggaaaagcgg caccgacgga ccaaccagaa	360
[0017]	agccacggca acacggccag cagccgcgga aacgaggggc aagcgaccgg aaagggcgaa	420
[0018]	agcgcgcgca ggggcaagcg aggaaagccc acggccaacc gggagggcag gaaacgggag	480
[0019]	acgaggcaga agaggaaagg gaaccaggag cgggaaagcg agagaaggag gaacaccagg	540
[0020]	gcgaaggcga ccggcgaacg acacgaggcg cgaaagcggg ggagcaaaca ggaagaaccc	600
[0021]	ggagccacgc cgaaacgaga ggcaaggaga gggccgcca ggcgaagaac gcaaagcacc	660
[0022]	cgccggggag acggccgcaa ggcgaaacca aaggaagacg ggggcccgc caagcgggga	720
[0023]	gcagggaacg aagcaacgcg aagaaccacc aggcgacacc cgaaaaccca gagaagggcc	780
[0024]	cccgggagca gaggacagg ggcagggcgc agc	813

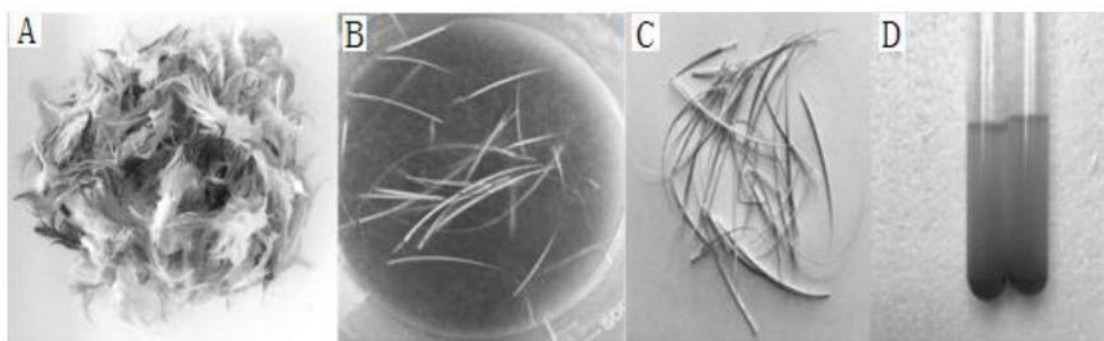


图1



图2