

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910104208.7

[43] 公开日 2009年12月2日

[11] 公开号 CN 101591620A

[22] 申请日 2009.6.30

[21] 申请号 200910104208.7

[71] 申请人 重庆大学

地址 400044 重庆市沙坪坝区沙正街174号

[72] 发明人 段传人 贾秋云 朱丽平 唐菊
胡江

[74] 专利代理机构 重庆大学专利中心

代理人 郭吉安

权利要求书1页 说明书9页

[54] 发明名称

一种白腐菌扩大培养固体发酵的方法

[57] 摘要

一种白腐菌扩大培养固体发酵的方法，属于真菌固体发酵的方法。本方法包括菌种活化：液体扩大培养；发酵罐液体扩大培养；罐头瓶固培驯化，发酵罐中发酵；罐头瓶固培驯化和发酵罐中发酵阶段的接种量分别为10%和5%。本发明具有工艺流程简单，可直接应用于工厂大型发酵罐；针对性强，应用于污水处理和造纸工业中混合白腐菌发酵，实用价值高；发酵效率高，发酵成本低等优点。

1、一种白腐菌扩大培养固体发酵的方法,其特征是,步骤如下:

- (1) 菌种活化:将保存的白腐菌菌种,放置于 35℃人工气候箱中 25 分钟后接种于灭菌的 PDA 培养基中,活化 3~5 天;
- (2) 液体扩大培养:将活化菌丝接种到灭菌的液体培养基中培养 3~5 天,每升液体培养基含:豆芽汁 200mL,葡萄糖 10.0g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)3.0g, VB_1 0.001g,吐温 20 2.0g,硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)1.5g,硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.2g,硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)0.2g,硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)0.015g;
- (3) 发酵罐液体扩大培养:将上述所得菌种接种到液体发酵罐中培养 3~5 天,液体培养基组成同上(2);
- (4) 罐头瓶固培驯化:将液体菌种接种到罐头瓶中进行固体发酵,接种量为 5%~15%,经过 12 天发酵驯化,固体培养基配方:将草本或者木本纤维原料与适量合成培养液混合均匀(根据不同原料的吸水能力,需混合的培养液体积不同),合成培养液配方(每升):葡萄糖 10.0g,酒石酸铵($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$)22.0g,磷酸二氢钾(KH_2PO_4)10g, VB_1 0.1g,愈创木酚 1g,吐温 20 2.0g, H_2O_2 5g,硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)3.5g,硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.4g,硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)0.35g,硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)0.065g,无水氯化钙 0.4g,溶解后配平至 1L;
- (5) 发酵罐中发酵:将玻璃瓶中固体发酵驯化 12d 后的白腐菌种分层接入发酵罐,接种量为 3%~7%,培养基配方同上(4)。

2、根据权利要求1所述的一种白腐菌扩大培养固体发酵的方法,其特征是:所述罐头瓶固培驯化和发酵罐中发酵阶段的接种量分别为10%和5%。

一种白腐菌扩大培养固体发酵的方法

技术领域

本发明是属于一种真菌固体发酵的方法，特别涉及一种白腐菌扩大培养固体发酵的方法。

背景技术

白腐菌的独特和有效的降解能力，使其成为环境保护领域的一支强劲的生力军，将这类对异生物质具有光谱进攻性丝状真菌的活性潜能，转化为对环境中不同状态介质内的污染物的现实控制，是各国科学家和相关工业界共同的追求目标和不懈的努力方向。尽管相比于成熟的细菌体系而言，白腐真菌在环境保护中的应用，还处于探索和建立阶段；尽管由于这类菌生理代谢的特殊性和对环境因子近乎苛刻的要求，成为实现工业化的严重障碍；但是这一切，并没有阻挡人们在环境保护实践中利用白腐真菌固体发酵的种种研究、开发和尝试。

将白腐菌固体发酵应用于污染处理的最初和最多的实践，是在生物制浆和水污染控制领域，生物制浆是利用微生物所具有的分解木素的能力来除去制浆原料中的木素，使植物组织与纤维彼此分离制成纸浆的过程。一般是在对植物纤维原料进行化学处理或机械磨浆前对其进行生物预处理，目前生物制浆已经进入了工厂化阶段，并取得了良好的效果。

生物制浆技术是一种高效清洁的制浆工艺。利用白腐菌固体发酵对木素的降解作用脱除木素，可以减轻造纸工业的环境污染问题。白腐菌是目前自然界降解木素最有效的一类微生物，它能产生降解木素或变性木素的活性酶系，木素过氧化物酶(LiP)、锰过氧化物酶(MnP) 和酚氧化酶(漆酶, Laccase) 系统构成了白腐菌降解木素的主要活性酶系。白腐菌的这一特性已经利用在生物制浆、

生物漂白等研究领域，有些已经进入中试阶段，显示了其良好的应用前景。

但是目前文献报道中提到的白腐菌的液体或固体培养条件都只适用于实验室中的基础研究且不系统，不适用于大型工业生产中的应用，而已公开的专利中也没有针对白腐菌扩大培养固体发酵方面的说明。如：中国发明专利 CN1415736 公开了一种低值陈米作为丝孢类真菌孢子粉主要原料的固相发酵方法。该方法将低值陈米浸泡后，经灭菌熟化与发酵菌丝液、添加剂混合接种，在发酵箱或平底盘中培养，再将发酵料加热烘干、过筛制成孢子粉，未涉及真菌扩大培养固体发酵的方法。中国发明专利 CN88101266 公开了一种含糖类培养基的微生物发酵方法。该方法至少分两步进行，第一步主要是连续培养微生物，第二步主要是通过连续或分批加料生成产物。在第二步处理中，将微生物固定在载体材料上，由此可使发酵过程保持长时间的稳定性，并获得高产量，增加糖的利用量。但是并未涉及微生物扩大培养及固体发酵的培养基成分、条件控制等操作方法。中国发明专利 CN1032956 公开了一种菌种扩大培养方法。该方法以培养容器和接种勺代替玻璃器皿和接种针、环，不需种曲三代培养，以扩大培养二代接种制成曲，其特征是将茄式或三角瓶一代原菌扩大培养为二代菌，接种于经处理的发酵制品原料中制作成曲。但是未涉及真菌扩大培养至固体发酵的方法。中国发明专利 CN86100658 公开了一种白僵菌的固体培养方法。该方法除了在培养原料中有部分麦麸或者细米糠或者面粉以外，其特点是在培养原料中以土为主(并加少量尿素和钙镁磷肥)，其中土的比例为 50~85%。但未涉及扩大培养固体发酵的方法。中国发明专利 CN1057483 公开了一种酵母扩大培养方法。该方法的特点在于首次制作的糖化麦汁，除供种罐用外，其余部分分别冷藏于扩大罐和发酵罐内，待扩大罐和发酵需输入酵母液时，再将其内的麦汁温度升高至 12~13~15℃，此法适用于季节性强或检修时长的啤酒厂家使用。但是

并未涉及真菌扩大培养至固体发酵的方法。日本专利 JP11269019 公开了一种摇瓶发酵生产白僵菌作为真菌杀虫剂物质的方法，未涉及扩大培养和以竹木材为基质的固体发酵技术。日本专利 JP200083471 公开了一种用锯木粉、米糠、碟蛹和水的混合基质培养拟青霉的方法，未涉及真菌的扩大培养固体发酵方法。中国发明专利 CN1394232 公开了一种改进的发酵方法，该方法包括一种发酵培养基，它含有：(a)可代谢的碳源和能源；(b)无机氮源；(c)磷酸盐源；(d)至少一种选自碱金属、碱土金属、过渡金属及其混合物组成的组的金属；和(e)基本上不含颗粒物质和细菌的生物素。但未涉及扩大培养及真菌固体发酵的方法。中国发明专利 CN1757614 公开了一种植物纤维素、木质素经真菌发酵制备有机复合肥的方法，该方法解决方案是原料组分及重量百分比为：纤维素：12~55%，木质素：43~85%，发酵菌：1~10%，工艺过程为：原料加工—加发酵菌种—加水搅拌—发酵—翻料—筛选—干燥、除味—辅料与原料复合配制—检测技术指标—分装，复合配制的辅料为尿素，其含氮量为 46.6%；磷酸二铵，其含氮量为 21%，含磷量为 23%；硫酸钾，其含钾量为 44%。但未涉及白腐菌扩大培养及真菌固体发酵的方法。

专利查新结果表明，国内外未见白腐菌扩大培养固体发酵的方法记录。白腐菌在降解木质素方面虽然有很多的基础研究，也显示了非常好的效果，但在实际应用方面，仍然存在很多问题。首先，由于白腐菌在木片或纸浆表面生长繁殖以及酶分泌受到基质pH 值、氧化还原电位、菌体的营养需求以及温度和湿度等影响，使得白腐菌产生的木素降解酶活力较低，发酵效率低；其次，在实验室中采用的只针对个别单菌种来做基础研究的培养方法无法满足工业生产中大量高效的需求；最后，白腐菌在降解木素的同时也伴随有纤维素的降解，这将影响纸张的强度性能。总之，白腐菌生物制浆过程的最大困难是难以迅速、

大量地发酵产生木素降解酶来有效降解木质素，现在缺少系统有效的发酵方法来解决这些问题。

发明内容

本发明的目的是为了克服上述现有技术的不足，而提出了一种白腐菌扩大培养固体发酵的方法，解决效率低、操作复杂、成本高、针对性不强等问题。

本发明所涉及的是一种白腐菌扩大培养固体发酵的方法，其方案如下：

- (1) 菌种活化:将保存的白腐菌菌种,放置于 35℃人工气候箱中 25 分钟后接种于灭菌的 PDA 培养基中，活化 3~5 天；
- (2) 液体扩大培养:将活化菌丝接种到灭菌的液体培养基中培养 3~5 天，每升液体培养基含：豆芽汁 200mL，葡萄糖 10.0g，磷酸二氢钾(KH_2PO_4)3.0g， VB_1 0.001g，吐温 20 2.0g，硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)1.5g，硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.2g，硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)0.2g，硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 0.015g；
- (3) 发酵罐液体扩大培养：将上述所得菌种接种到液体发酵罐中培养 3~5 天，液体培养基组成同上（2）；
- (4) 罐头瓶固培驯化:将液体菌种接种到罐头瓶中进行固体发酵，接种量为 5%~15%，经过 12 天发酵驯化，固体培养基配方：将草本或者木本纤维原料与适量合成培养液混合均匀（根据不同原料的吸水能力，需混合的培养液体积不同），合成培养液配方（每升）：葡萄糖 10.0g，酒石酸铵($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_6$)22.0g，磷酸二氢钾(KH_2PO_4)10g， VB_1 0.1g，愈创木酚 1g，吐温 20 2.0g， H_2O_2 5g，硫酸镁($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)3.5g，硫酸亚铁($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)0.4g，硫酸锰($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)0.35g，硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

0.065g, 无水氯化钙 0.4g, 溶解后配平至 1L;

- (5) 发酵罐中发酵:将玻璃瓶中固体发酵驯化 12d 后的白腐菌种分层接入发酵罐, 接种量为 3%~7%, 培养基配方同上(4)。

所述罐头瓶固培驯化和发酵罐中发酵阶段的接种量分别为10%和5%。

本发明的优点

- (1) 工艺流程简单, 方便操作, 可直接应用于工厂大型发酵罐。
- (2) 针对性强, 应用于污水处理和造纸工业中混合白腐菌发酵, 实用价值高。
- (3) 发酵效率高, 酶活: 10 天时, lps 酶活可达 1100U/L, lacs 酶活可达 450U/L, 15 天时, mnps 酶活可达 360U/L。30 天木质素降解率可达 50.2% 。
- (4) 发酵成本低。

具体实施方式

下面结合实施例, 对本发明的技术方案进一步说明如下:

从冰箱中取出于 4℃ 下保存的白腐菌菌种(黄孢原毛平革菌、朱红栓菌(购于中科院微生物所)、平菇(购于重庆市农科所)), 放置 35℃ 恒温箱中 25 分钟, PDA 培养基经 0.5MPa, 121℃ 下, 灭菌 30min, 分装至培养皿中冷却后接种, 然后用保险膜包裹放入 32℃ 生化培养箱 3~5 天。250ml 三角瓶装液 90ml (每升含豆芽汁 200mL, 葡萄糖 10.0g, 磷酸二氢钾(KH₂PO₄)3.0g, VB₁0.001g, 吐温 20 2.0g, 硫酸镁(MgSO₄·7H₂O)1.5g, 硫酸亚铁(FeSO₄·7H₂O)0.2g, 硫酸锰(MnSO₄·H₂O)0.2g, 硫酸铜(CuSO₄·5H₂O) 0.015g), 经 0.5MPa, 121℃ 下, 灭菌 30min, 冷却后接入活化后的菌种, 在温度为 32℃, 湿度为 80 的人工气候箱静置培养 24h 后, 转移到恒温振荡器中培养 3~5 天, 培养温度为 32℃, 转速为 160r/min。将上述所得液体菌种和菌球接入经校正、灭菌、冷却和稳定参数后的

7L 液体发酵罐中培养 3~5 天，液体培养基配方同上。然后将所得液体菌种接种到灭菌后的罐头瓶（每瓶装 20g 固体培养基）中进行固体发酵驯化 12 天，固体培养基配方：竹材与麸皮（质量比为 8：2）的混合物 900g，与合成培养液混合均匀（水 1000mL，葡萄糖 10.0g，酒石酸铵($C_4H_{12}N_2O_6$)22.0g，磷酸二氢钾(KH_2PO_4)10g，VB₁0.1g，愈创木酚 1g，吐温 20 2.0g，H₂O₂ 5g，硫酸镁($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)3.5g，硫酸亚铁($FeSO_4 \cdot 7H_2O$)0.4g，硫酸锰($MnSO_4 \cdot H_2O$)0.35g，硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$) 0.065g，无水氯化钙 0.4g)。接着将罐头瓶中经驯化后的白腐菌种分层接入 20L 发酵罐（自主发明：公开号 CN201241154），培养基配方同上，含水率约 60%，分装在纱布袋子里，在立式高压灭菌锅中，0.5MPa，121℃下，灭菌 30min，冷却后放入发酵罐中，分层接种。自然发酵 5 天后开始取物料，挤出酶液，测定木素过氧化物酶(LiP)、锰过氧化物酶(MnP)、漆酶(Laccase)的酶活，以后每 5 天测定一次酶活，每 10 天测定一次纤维素和木质素降解率。

表1 不同接种量条件下发酵罐中30天时竹材木质素降解率的变化情况

罐头瓶中接种量	5%	10%	15%
3%	39.3%	41.7%	42.5%
5%	45.4%	50.2%	50.4%
7%	45.8%	50.4%	50.5%

以下是对比实验：

表 2 随时间变化三种主要酶的活性变化情况

处理时间 (天)	lips酶活 (U/L)	lacs酶活 (U/L)	mnps酶活 (U/L)
0	0	0	0
5	790	110	170
10	1100	450	240
15	820	390	360
20	510	320	210

而在用其他方法进行白腐菌发酵降解竹材时得出的一组酶活数据是：

表 3 随时间变化三种主要酶的活性变化情况

处理时间 (天)	lips酶活 (U/L)	lacs酶活 (U/L)	mnps酶活 (U/L)
0	0	0	0
5	220	70	50
10	310	90	110
15	390	140	260
20	470	270	290
25	830	370	220
30	540	210	130

表 4 不同处理时间下竹材主要组分降解率的变化情况

处理时间 (天)	木质素降 解率(%)	纤维素降 解率(%)	半纤维素 降解率(%)	干物质 损失(%)
0	0	0	0	0
10	40	25.2	4.3	3.2
20	42.7	27.5	6.2	6.9
30	50.2	30	9.8	11.2
40	54.8	38.1	14.5	18.7

而在用其他方法进行白腐菌发酵降解竹材时得出的一组降解率数据是：

表 5 不同处理时间下竹材主要组分降解率的变化情况

处理时间 (天)	木质素降 解率(%)	纤维素降 解率(%)	半纤维素 降解率(%)	干物质 损失(%)
0	0	0	0	0
10	20	22.2	3.3	2.2
20	32.7	26.5	6.2	4.9
30	34.8	21.5	7.8	9.6
40	37.2	28	10.3	12.5

从表2至表4的对比可以看出，应用此方法对造纸原料进行发酵，高效降解木质素方面有很大的改进，酶活峰值提前出现、木质素降解率明显高于利用其他方法的处理效果，可以缩短处理周期，纤维素降解率较低，这正是造纸生产中最需要的理想效果，即高效降解木质素，更低的降解纤维素，以确保造纸原料的节省和充分利用。对木质素的高效降解可以减轻造纸工业中利用强碱对木

质素降解的化学污染进而造成的废水污染。这对环保方面的作用非常明显。