



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107022493 B

(45) 授权公告日 2020.11.13

(21) 申请号 201710183858.X

(22) 申请日 2017.03.24

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107022493 A

(43) 申请公布日 2017.08.08

(83) 生物保藏信息  
CGMCCBN0.13575 2017.01.09

(73) 专利权人 江苏天种牧业股份有限公司  
地址 221000 江苏省徐州市云龙区潘塘赵店村

(72) 发明人 高兆建 张铁柱 唐仕荣 李先双  
赵志刚 康志锋 冯奔

(74) 专利代理机构 北京市领专知识产权代理有限公司 11590

代理人 林辉轮

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12N 1/02 (2006.01)

C12N 9/24 (2006.01)

C12N 9/62 (2006.01)

A23K 10/12 (2016.01)

A23K 20/147 (2016.01)

C12R 1/69 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106922952 A, 2017.07.07

审查员 李非儿

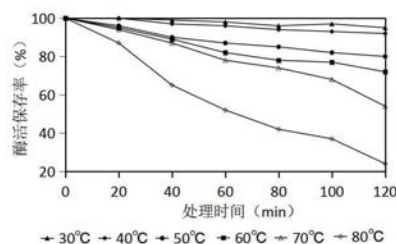
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

### (54) 发明名称

一种高产饲用复合酶的米曲霉菌株及其应用

### (57) 摘要

本发明公开了一种高产饲用复合酶米曲霉菌株及其应用,属于生物发酵技术领域。发酵所用菌株具体为米曲霉DJ36,保藏于中国普通微生物保藏中心,保藏号为CGMCC NO.13575;多肽饲料制备过程结合液态发酵和酶解技术,具体包括:制备米曲霉菌的单孢子菌悬液,液体菌种制备,用三角瓶或发酵罐液态发酵,发酵液酶解杂蛋白,干燥、粉碎、包装等步骤。本发明通过米曲霉发酵和发酵后期酶解共同作用,高效生成功能性的小分子多肽,综合了微生物发酵和酶解技术的优点,大大减少了酶制剂的使用,降低了多肽的生产成本,加快了多肽的产业化进程;且制得的饲料添加剂具有较高的营养价值和抗病性能,具有广阔的应用前景。



1. 一种高产饲用复合酶的米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 菌株, 所述菌株为米曲霉DJ36菌株, 已于2017年2月10日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 保藏号为CGMCC NO.13575。

2. 一种如权利要求1所述的米曲霉菌株的应用, 其特征在于, 所述米曲霉菌株用于制备富多肽饲料添加剂。

3. 一种如权利要求1所述的米曲霉菌株应用于制备富多肽饲料添加剂的方法, 其特征在于, 包括如下步骤:

步骤1、制备米曲霉菌的单孢子菌悬液:

将米曲霉菌菌种活化后, 用含有0.01% v/v吐温80的0.75% 无菌生理盐水将孢子洗下, 放到装有50mL无菌生理盐水和无菌玻璃珠的锥形瓶中, 充分振荡20-30min, 待孢子充分打散后, 调节孢子悬液中孢子的含量为 $1.0 \times 10^8$  CFU/mL, 即得单孢子菌悬液;

步骤2、液体菌种制备:

按照5%-10% v/v的接种量, 将步骤1中所得的单孢子菌悬液接种在装有30-50mL已灭菌的种子培养基的250mL三角烧瓶中, 培养基中加入20粒已灭菌的玻璃珠, 瓶口以6-8层纱布封口, 置于空气摇床中扩大培养, 设定转速为180-220r/min, 温度为26-34℃, 培养2-4d, 得到二级种子培养液;

步骤3、液态发酵制备复合酶:

在发酵容器中装入发酵培养基, 121℃ 灭菌20-30min, 将温度逐渐降至28-32℃, 取步骤2所得的二级种子培养液接种于发酵容器中, 初始发酵控制条件为: 温度28-32℃, 发酵培养基初始pH5.5-6.5; 发酵2-4d, 发酵温度降为25-28℃; 发酵至3d开始补料每隔12h补料一次, 共补料2-3次; 发酵6d时, 将发酵温度提高至35-40℃, 用2mol/L的NaOH调节发酵液pH值; 发酵6d时, 添加灭过菌的豆粕粉和谷朊粉悬浮液; 继续发酵至7d, 接着将温度提高到45-50℃, 并将发酵液pH调节至7.0-7.5, 维持4h, 结束发酵;

步骤4、发酵液酶解杂蛋白:

发酵结束后, 发酵液导入酶解罐中, 向发酵液中添加麸皮、谷糠、豆粕粉、谷朊粉, 使发酵液变成浓稠状, 调节其pH值为5.5, 控制温度为50℃, 维持4-6h, 中间搅拌2-3次; 调节pH到4.0-7.0, 控制温度为50℃, 维持4-6h, 得到发酵酶解料;

步骤5、干燥、粉碎、包装:

酶解结束后, 采取55-65℃低温烘干的方法对以上发酵酶解料进行干燥处理, 粉碎后过150-200目筛, 成品包装得到富多肽饲料添加剂。

4. 根据权利要求3所述的米曲霉菌株应用于制备富多肽饲料添加剂的方法, 其特征在于, 步骤2中所述种子培养基的制备方法为: 分别取蛋白胨5-10g, 黄豆粕粉5-10g, 谷朊粉10-20g, 麸皮粉5-10g, 葡萄糖10-15g, 淀粉10-20g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g, 吐温-80 0.5mL, 无机盐营养液10mL, 充分混合后, 调节pH5.0-6.5, 补充去离子水至1000mL, 再置于121℃ 下灭菌15min。

## 一种高产饲用复合酶的米曲霉菌株及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物发酵技术领域,具体的涉及一种高产饲用复合酶米曲霉菌株及其应用。

### 背景技术

[0002] 豆粕、棉籽粕、谷朊粉、羽毛粉等农副产品中粗蛋白含量高,价格低廉,但蛋白分子量较大,不易被消化利用,氨基酸组成不平衡,有效利用率较低,其饲料添加量与利用率较低。同时,还存在多种抗营养因子,如胰蛋白酶抑制因子、脲酶等,研究发现,这些抗营养因子影响了畜禽对营养成分的消化、吸收,影响动物的健康及生产性能。而农副产品发酵过程中可产生蛋白酶、非淀粉多糖酶等多种酶活,可消除抗营养因子,把大分子量的饼粕蛋白质分解为多肽、寡肽,甚至小肽,从而增加水溶性,利于动物消化吸收。

[0003] 米曲霉(*Aspergillus oryzae*)是一种好气性真菌,易于培养,又不产生黄曲霉素,是一类有较高利用价值的霉菌。米曲霉是美国食品与药品管理局FDA认可的使用安全的菌种之一,其在食品业、农业、畜牧业、生物技术等方面都得到了广泛的应用。米曲霉是一类产复合酶的菌株,除产蛋白酶外,还可产淀粉酶、纤维素酶、植酸酶等。在蛋白酶的作用下,将不易消化的大分子蛋白质降解为蛋白胨、多肽及各种氨基酸,而且可以使辅料中粗蛋白、粗纤维、植酸等难吸收的物质降解,提高营养价值、保健功效和消化率。

[0004] 目前,多肽的生产方法有酶解法和微生物发酵法。酶解法生产多肽较为简单,易于操作,且生产效率较高,但所用酶制剂较多且昂贵,生产成本很高;微生物发酵法主要是利用微生物对蛋白物料进行发酵处理,既可以将有毒的成分经微生物代谢去除,又可以通过微生物发酵将植物细胞壁彻底破坏,使得营养物质更易释放,有利于动物更快更好的吸收,而且发酵对饲料的营养成分破坏很小,不会造成营养价值降低,且成本较低、并可大量操作。但是,生产多肽需先利用微生物发酵产生蛋白酶,再用蛋白酶将难以被动物消化吸收的大分子蛋白部分降解,产生多种小分子活性多肽,其步骤较为复杂,生产效率偏低。

### 发明内容

[0005] 1.要解决的技术问题

[0006] 本发明要解决的技术问题在于提供一种高产饲用复合酶的米曲霉菌株及利用其以液态发酵和酶解复合技术制备富多肽饲料添加剂的方法,其以富蛋白农副产品为材料,以米曲霉为菌种进行发酵,高效生成后续酶解所需的蛋白酶、菊粉酶等多种酶制剂,用产生的液态混合酶制剂制备富多肽饲料添加剂。该发明充分利用了微生物发酵和酶解技术的优点,大大减少了酶制剂的分离纯化的生产成本,发酵结束后直接用发酵液处理富蛋白农副产品,降低了多肽的生产成本,加快了多肽的产业化进程;且制得的饲料添加剂具有较高的营养价值和抗病性能,具有广阔的应用前景。

[0007] 2.技术方案

[0008] 本发明的目的是提供一种用于发酵产酶用于制备多肽饲料的米曲霉菌株及利用

该菌株发酵制得的酶来酶解蛋白制备富多肽饲料添加剂的方法。

[0009] 由背景技术中可知,要制备多肽饲料,蛋白酶必不可少。另外,菊粉作为一种纯天然的功能性配料,已被世界20多个国家批准为营养增补剂,广泛运用于乳制品、饮料、低脂低热量食品、烘焙食品、保健食品。利用菊粉酶分解菊粉生产的低聚果糖低聚果糖是一种良好的双歧因子和水溶性膳食纤维,有防治便秘、抑制肠内腐败物质形成、提高机体免疫力、改善脂质代谢、降低胆固醇等作用。故而,本发明所要提供的米曲霉菌株要求能高产蛋白酶和菊粉酶。

[0010] 本发明采取如下技术方案:

[0011] 本发明所提供的高产饲用蛋白酶和菊粉酶的米曲霉菌株具体为米曲霉(*Aspergillus oryzae*)DJ36,是从江苏徐州市屠宰场、肉类销售市场、豆制品厂附近土样分离得到。具体制备过程如下:

[0012] (1) 富集培养:吸取2-4mL处理后的土样浑浊液,加入到装有30-60mL富集培养基一的容量为250mL的三角瓶中,置于35-40℃、转速180-200r/min条件下的恒温摇床中培养5-7d;然后在无菌操作下量取30-50mL富集培养液至离心管中,在转速4000-5000r/min下离心5-10min,以富集培养基二将离心后的沉淀洗至装有40-50mL富集培养基二的250mL三角瓶中,置于35-40℃、转速160-200r/min条件下的恒温摇床中培养3-4d;

[0013] (2) 菌株初筛:将富集后的培养液逐级稀释到 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ ,取各级稀释的培养液0.2mL分别涂布于霉菌筛选培养基上,培养皿晾至表面没有流动液体时,用保鲜膜将培养皿口封好,并置于35-40℃恒温培养箱中倒置培养2-3d,然后将平板置于25-28℃恒温培养箱中继续倒置培养1-2d;将平板上长出的菌落点种到两个初筛选择培养基的相同位置,两个初筛培养基分别为蛋白酶初筛培养基和菊粉酶初筛培养基;接种好的培养皿置于35-40℃恒温培养箱中倒置培养2-4d;待有明显菌落形成,观察蛋白酶初筛培养基上有无明显透明圈出现;将菊粉酶初筛平板上加入一定量0.1%的刚果红染液,染色2-8min;观察菌落周围刚果红颜色是否明显变浅;将在两种初筛平板上均出现明显相应变化的菌株从蛋白酶初筛平板上接种出来,待进行复筛;

[0014] (3) 菌株复筛:将初筛得到的菌株于复筛发酵培养基平板上划线,置于30-37℃恒温培养箱中培养2-3d,重复划线培养,如连续多次观察到菌落形态一致则认为菌株已纯化;将纯化后的菌株接种到固体种子培养基上,选取活性较高的菌株进行划线传代培养,最终得到一株产酶稳定的菌株,即得高产饲用复合酶的米曲霉。

[0015] 上述高产饲用酶复合酶(蛋白酶和菊粉)的米曲霉具有以下微生物学特征:

[0016] (1) 形态学特征

[0017] 本发明所述菌株,菌落在PDA平板上呈辐射状快速生长,菌丝发达,初期菌丝表面疏松、平坦,菌落正面白色,接着因产生分生孢子菌落中间部位而呈现黄绿色,以后逐渐增多,呈褐色或淡绿褐色,菌落背面有褶皱,无色。菌落无渗出液,无特殊气味。在放大400倍的光学显微镜下观察,菌丝发达,有隔膜,菌丝顶端直接产生孢子梗,分生孢子成链状生于小梗上,分生孢子头呈球形。

[0018] (2) 分子鉴定

[0019] 以菌株基因组为模板,PCR扩增到18S rDNA特异性片段,经过测序,所得序列通过Blast与GeneBank中核酸数据进行分析比对,鉴定为米曲霉(*Aspergillus oryzae*)。

[0020] 上述菌株已于2017年2月10日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心(简称CGMCC,地址为:北京市朝阳区北辰西路1号院3号中国科学院微生物研究所,邮编:100101),保藏号为CGMCC NO.13575,分类命名为米曲霉DJ36(*Aspergillus oryzae* DJ36)。

[0021] 本发明还提供了一种上述高产饲用复合酶的米曲霉菌株应用于以液态发酵和酶解复合技术制备富多肽饲料添加剂的方法,包括如下步骤:

[0022] 步骤1、制备米曲霉菌的单孢子菌悬液:

[0023] 将米曲霉菌菌种活化后,用含有0.01%v/v吐温80的0.75%无菌生理盐水将孢子洗下,放到装有50mL无菌生理盐水和无菌玻璃珠的锥形瓶中,充分振荡20-30min,待孢子充分打散后,调节孢子悬液中孢子的含量为 $1.0 \times 10^8$ CFU/mL,即得单孢子菌悬液;

[0024] 步骤2、液体菌种制备:

[0025] 按照5%-10%v/v的接种量,将步骤1中所得的单孢子菌悬液接种在装有30-50mL已灭菌的种子培养基的250mL三角烧瓶中,培养基中加入20粒已灭菌的玻璃珠,瓶口以6-8层纱布封口,置于空气摇床中扩大培养,设定转速为180-220r/min,温度为26-34℃,培养2-4d,得到二级种子培养液;

[0026] 步骤3、液态发酵:

[0027] 在发酵容器中装入发酵培养基,121℃灭菌20-30min,将温度逐渐降至28-32℃,取步骤2所得的二级种子培养液接种于发酵容器中,初始发酵控制条件为:温度28-32℃,发酵培养基初始pH5.5-6.5;发酵2-4d,发酵温度降为25-28℃;发酵至3d开始补料每隔12h补料一次,共补料2-3次;发酵6d时,将发酵温度提高至35-40℃,用2mol/L的NaOH调节发酵液pH值;发酵6d时,添加灭过菌的豆粕粉和谷朊粉悬浮液;继续发酵至7d,接着将温度提高到45-50℃,并将发酵液pH调节至7.0-7.5,维持4h,结束发酵;

[0028] 步骤4、发酵液酶解杂蛋白:

[0029] 发酵结束后,发酵液导入酶解罐中,向发酵液中添加麸皮、谷糠、豆粕粉、谷朊粉,使发酵液变成浓稠状,调节其pH值为5.5,控制温度为50℃,维持4-6h,中间搅拌2-3次;调节pH到4.0-7.0,控制温度为50℃,维持4-6h,得到发酵酶解料;

[0030] 步骤5、干燥、粉碎、包装:

[0031] 酶解结束后,采取55-65℃低温烘干的方法对以上发酵酶解料进行干燥处理,粉碎后过150-200目筛,成品包装得到富多肽饲料添加剂。

[0032] 进一步地,所述步骤3中当所需发酵的二级种子培养液较少时,所述发酵容器为三角瓶,具体步骤为:将装有发酵培养基200-300mL的1000mL三角瓶置于121℃下灭菌20-30min,将温度逐渐降至28-32℃,将步骤2所得的二级种子培养液按照5-10%的接种量接种,置于摇床上震荡发酵;初始发酵温度28-32℃,发酵培养基初始pH5.5-6.5,摇床震荡频率180-200r/min;发酵2d-4d,发酵温度降为25-28℃,摇床震荡频率不变;发酵至3d开始补料,每次补料20-30mL,每隔12h补料一次,共补料2-3次;发酵6d时,将发酵温度提高至35-40℃,用2mol/L的NaOH调节发酵液pH值为5.0-6.5,摇床转速降至160-180r/min;发酵6d时,添加灭过菌的豆粕粉和谷朊粉悬浮液20-30mL;继续发酵至7d,接着将温度提高到45-50℃,并将发酵液pH调节至7.0-7.5,维持4h,结束发酵。

[0033] 进一步地,所述步骤3中当所需发酵的二级种子培养液较多时,所述发酵容器为发酵罐,具体步骤为:在15L的发酵罐中装入发酵培养基8-10L,发酵罐夹套升温至95℃,再将

蒸汽直接通入发酵培养基中,121℃灭菌20-30min,将温度逐渐降至28-32℃,取步骤2所得的二级种子培养液400-1000mL以火焰法接种于发酵罐中,发酵罐压为0.05MPa;初始发酵控制条件为:温度28-32℃,发酵培养基初始pH5.5-6.5,无菌空气通风比1:0.6-0.8 (V/V),搅拌转速260-300r/min,保持溶氧20-30%;发酵过程观察泡沫情况,并流加以消泡剂泡敌,消除培养过程中产生的过多泡沫;发酵2-4d,发酵温度降为25-28℃,无菌空气通风比1:0.4-0.6 (V/V),通过自动流加氨水调节pH,控制pH于6.0-6.5;发酵至3d开始补料,每次补料500-1000mL,每隔12h补料一次,共补料2-3次;发酵6d时,将发酵温度提高至35-40℃,用2mol/L的NaOH调节发酵液pH值为6.0-7.0,降低无菌空气通风比1:0.4-0.6 (V/V),搅拌转速降至200-240r/min;发酵6d时,添加灭过菌的豆粕粉和谷朊粉悬浮液1-2L;继续发酵至7d,接着将温度提高到45-50℃,并将发酵液pH调节至7.0-7.5,维持4h,结束发酵。

[0034] 具体地,步骤2中所述种子培养基的制备方法为:分别取蛋白胨5-10g,黄豆粕粉5-10g,谷朊粉10-20g,麸皮粉5-10g,葡萄糖10-15g,淀粉10-20g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g,吐温-80 0.5mL,无机盐营养液10mL,充分混合后,调节pH5.0-6.5,补充去离子水至1000mL,再置于121℃下灭菌15min。

[0035] 具体地,步骤3中所述发酵培养基中含有菊粉;所述发酵培养基的制备方法为:分别取黄豆粕粉10-20g,谷朊粉10-20g,菊粉5-10g,麸皮粉5-10g,淀粉10-20g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g,吐温-80 0.5mL,玉米浆15-30g,无机盐营养液10mL,充分混合后,补充去离子水至1000mL,再置于121℃下灭菌15min。

[0036] 3.有益效果

[0037] (1) 本发明采用米曲霉作为菌种,充分利用了微生物发酵的优点,且米曲霉菌易于培养,使用安全,又不产生黄曲霉素。本发明具体采用高产饲用复合酶米曲霉,其制得的复合酶活力高,且复合酶中的蛋白酶具有较高的热稳定性和广泛的耐酸范围,在加工过程中不易失活,适合在饲料中使用;且米曲霉发酵产生的复合酶中还含有菊粉酶,在其发酵培养基中添加菊粉,菊粉酶分解菊粉产生低聚果糖,添加在饲料中,有利于增强饲料的营养价值和抗病性能。

[0038] (2) 本发明采用米曲霉菌和富蛋白农副产品共同发酵产生大量蛋白酶、菊粉酶等多种酶活,为后期酶解过程提供主要作用酶,实现两种技术的有效关联。

[0039] (3) 本发明结合液态发酵技术和酶解技术,先采用液态发酵技术发酵米曲霉菌种和农副产品,产生大量蛋白酶、菊粉酶等多种酶活;再采用酶解技术,利用上述多种酶活将富含粗蛋白的农副产品分解,消除抗营养因子,把大分子量的饼粕蛋白质分解为多肽、寡肽,甚至小肽,从而增加水溶性,利于动物消化吸收。可以节约大量的酶制剂,降低多肽的生产成本,加快多肽的产业化进程。

[0040] 本发明以富蛋白农副产品为材料,米曲霉为菌种进行发酵,高效生成后续酶解所需的蛋白酶、菊粉酶等多种酶制剂,用产生的液态混合酶制剂制备富多肽饲料添加剂。充分利用了微生物发酵和酶解技术的优点,大大减少了酶制剂的使用,减少了酶制剂的分离纯化的生产成本,降低了多肽的生产成本,加快了多肽的产业化进程;且制得的饲料添加剂具有较高的营养价值和抗病性能,具有广阔的应用前景。

## 附图说明

- [0041] 图1为实施例中复筛后得到的纯化的米曲霉菌株；
- [0042] 图2为实施例1中米曲霉所产蛋白酶在不同温度下的活性测定折线图；
- [0043] 图3为实施例1中米曲霉蛋白酶于50℃在不同pH条件下的活性测定折线图；
- [0044] 图4为实施例1中米曲霉蛋白酶于酸性(pH5.0)的条件下在不同温度下的热稳定性测定折线图；
- [0045] 图5为实施例1中米曲霉蛋白酶在30℃在不同pH条件下的pH稳定性测定折线图。

## 具体实施方式

[0046] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。

[0047] 实施例1

[0048] 1. 高产饲用复合酶蛋白酶与菊粉酶菌株的制备

[0049] (1) 采样及样品处理：

[0050] 从江苏省徐州市屠宰场、肉类销售市场、豆制品加工厂、菊芋种植地等富含蛋白质及菊芋的地方取土样20份。称取固体土样5g，放入装有玻璃珠及100mL已灭菌的生理盐水的三角瓶中，以180r/min的转速室温振荡20-30min，制成悬液备用。

[0051] (2) 富集培养：

[0052] 吸取2-4mL处理后的土样浑浊液，加入至装有30-60mL富集培养基一的容量为250mL的三角瓶中，置于35-40℃、转速180-200r/min下恒温摇床中培养5-7d；然后无菌操作下量取30-50mL富集培养液至离心管中，4000-5000r/min离心5-10min，倒掉上清液，以富集培养基二将离心后的沉淀洗至装有40-50mL富集培养基二的250mL三角瓶中，再次置于35-40℃、转速160-200r/min的恒温摇床中培养3-4d。

[0053] 上述富集培养基一的制备方法为：分别取豆粕粉1g、谷朊粉0.5g，无机盐营养液1mL，混合均匀后补充水至100mL，调节pH值为4.5；在121℃温度下灭菌15min，自然冷却后，加入过滤除菌的氨苄青霉素至溶液最终浓度为50mg/L。

[0054] 上述富集培养基二的制备方法为：分别取菊芋粉2g、无机盐营养液1mL，混合均匀后补充水至100mL，调节pH值为4.5；在121℃温度下灭菌15min，自然冷却后，加入过滤除菌的氨苄青霉素至溶液最终浓度为50mg/L。

[0055] 上述制备方法中无机盐营养液的制备方法为：分别取 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g， $\text{NaNO}_3$  2.0g，尿素2g， $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1.5g， $\text{CaCl}_2$  1.5g， $\text{MgSO}_4$  0.1g， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01g， $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1.6mg， $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.05g， $\text{CoCl}_2$  0.5mg，去离子水1000mL，混合均匀。

[0056] (3) 初筛：

[0057] 将富集后的培养液逐级稀释到 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$ 、 $10^{-6}$ ，取各级稀释的培养液0.2mL分别涂布于霉菌筛选培养基上，培养皿晾至表面没有流动液体时，用保鲜膜将培养皿口封好，并置于35-40℃恒温培养箱中倒置培养2-3d，然后将平板置于25-28℃恒温培养箱中继续倒置培养1-2d。

[0058] 将平板上长出的菌落点种到两个初筛选择培养基的相同位置，两个初筛培养基分别为蛋白酶初筛培养基和菊粉酶初筛培养基。接种好的培养皿置于35-40℃恒温培养箱中倒置培养2-4d。待有明显菌落形成，观察蛋白酶初筛培养基上是否有明显透明圈出现。将菊粉

酶初筛平板上加入一定量0.1%的刚果红染液,染色2-8min,倒掉染色液。观察菌落周围刚果红颜色是否明显变浅。将在两种初筛平板上均出现水解圈的菌株从蛋白酶初筛平板上接种出来,待进行复筛。

[0059] 上述霉菌筛选培养基的制备方法为:分别取PDA培养基800mL,无机盐营养液10mL,混合均匀后,补水至1000mL,再加入琼脂粉15g并充分混合;在121℃温度下灭菌15min后加入孟加拉红0.01-0.02g,氯霉素0.1-0.2g,混合均匀。

[0060] 所述PDA培养基包括马铃薯浸出液和蔗糖,具体的制备方法为:称取200g马铃薯,洗净去皮切碎,加水1000mL煮沸半个小时,再用纱布过滤取滤液,补充水至1000mL,然后加入20g蔗糖并混合均匀。

[0061] 上述蛋白酶初筛培养基的制备方法为:分别取PDA培养基100mL,干酪素1-2g,无机盐营养液1mL,琼脂粉1.5g,混合均匀后,调节pH值为5.0-5.5;培养基在121℃温度下灭菌20min后,充分摇匀,随着摇动,在60-70℃下倒入平板中。

[0062] 上述菊粉酶初筛培养基的制备方法为:分别取菊粉1-2g,酵母粉0.1-0.2g,无机盐营养液1mL,琼脂1.5g,混合均匀后,加蒸馏水定容至100mL,调节pH值为4.5;在121℃温度下灭菌15min。

[0063] (3) 复筛

[0064] 初筛得到的菌株于复筛发酵培养基平板上划线,置于30-37℃恒温培养箱中培养2-3d,重复划线培养三次以上,如连续多次观察到菌落形态一致则认为菌株已纯化。本发明所述菌株如图1所示,编号为DJ36。

[0065] 将初筛得到的菌株纯化后,接种到固体种子培养基上,35-40℃下培养3-5d,切取1平方厘米的菌苔接种到装有30-50mL液体种子培养基的250mL三角瓶中,在160-180r/min转速下37-40℃进行液体震荡培养。培养3-4d后,按照6-10% (v/v) 的接种量,将液体种子接种到液体发酵培养中,在160-180r/min转速下30-37℃进行液体震荡发酵培养。发酵培养3-5d,将发酵液在8000r/min转速下离心10min后,收集上清液并测定蛋白酶活性和菊粉酶活性,结果如表1所示。选取活性较高的菌株 (DJ36) 进行划线传代培养,最终得到一株产酶稳定且有较高酶活的蛋白酶、菊粉酶高产菌株。纯化的菌株接种于PDA斜面培养基上,在4℃条件下保藏。

[0066] 上述复筛发酵培养基的制备方法为:分别取菊粉2-3g,无机盐营养液1mL,蛋白胨1g,大豆蛋白1-2g,麸皮粉2-3g,吐温-800.5mL,无机盐营养液1mL,混合均匀后,补充去离子水至100mL;在121℃温度下灭菌15min。

[0067] 上述固体种子培养基的制备方法为:分别取PDA培养基99mL,无机盐营养液1mL,琼脂粉1.5g,混合均匀后,调节pH值为5.0;在121℃温度下灭菌15min。

[0068] 上述液体种子培养基的制备方法为:分别取菊粉2-3g,大豆蛋白1g,蛋白胨1g,无机盐营养液1mL,混合均匀后,补充去离子水至100mL;在121℃温度下灭菌15min。

[0069] 上述菊粉酶活力的测定步骤为:发酵结束后,过滤,得到的滤液在8000r/min的转速下离心20min;收集滤液作为粗酶液,取适当稀释的粗酶液0.2mL与0.8mL 2%菊糖 (用0.1mol/L, pH4.5醋酸缓冲液配制) 在60℃条件下反应20min后,于100℃加热5min终止酶反应,然后取1mL的反应液用DNS显色法测定产物中还原糖的量。在相同的条件下,用100℃灭活的粗酶液作为对照。菊粉酶酶活力定义为:在pH4.5, 60℃的环境中反应20min,每分钟转



化成 $1\mu\text{mol}$ 还原糖的酶量为一个酶活单位。

[0070] 上述发酵液中蛋白酶活的测定步骤为:采用Folin-酚法测定,以酪蛋白(2%)为底物,1mL酶液在pH5.0、40℃下,一个蛋白酶活力单位(U)定义为每分钟释放出 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸所需的酶量。

[0071] 表1各菌株粗酶液酶活

[0072]	菌株	DJ2	DJ12	DJ24	DJ36	DJ37	DJ42	DJ55	DJ61
	蛋白酶酶活(U/mL)	352.1	3415.6	3214.1	6748.6	4251.6	1124.0	3485.9	847.6
	菊粉酶酶活(U/mL)	10.5	105.7	25.4	545.9	48.9	86.7	685.7	79.8
	菌株	DJ67	DJ71	DJ77	DJ81	DJ88	DJ94	DJ101	DJ105
	酶活(U/mL)	2045.2	2578.1	584.1	786.3	987.1	253.1	2387.5	663.9
	菊粉酶酶活(U/mL)	287.8	15.4	23.7	300.6	28.4	39.1	280.7	11.2

[0073] 2. 菌株的鉴定

[0074] 上述高产饲用复合酶(蛋白酶和菊粉酶)的米曲霉DJ36具有以下微生物学特征:

[0075] (1) 形态学特征

[0076] 本发明所述菌株DJ36,菌落在PDA平板上呈辐射状快速生长,菌丝发达,初期菌丝表面疏松、平坦,菌落正面白色,接着因产生分生孢子菌落中间部位而呈现黄绿色,以后逐渐增多,呈褐色或淡绿褐色,菌落背面有褶皱,无色。菌落无渗出液,无特殊气味。在放大400倍的光学显微镜下观察,菌丝发达,有隔膜,菌丝顶端直接产生孢子梗,分生孢子成链状生于小梗上,分生孢子头呈球形。

[0077] (2) 分子鉴定

[0078] 以上形态特征与《真菌鉴定手册》中米曲霉的形态特征相符合;根据其分子生物学特征,以菌株DJ36基因组为模板,PCR扩增到18srDNA特异性片段,经过测序,所得序列通过Blast与GeneBank中核酸数据进行分析比对,鉴定为米曲霉(*Aspergillus oryzae*)。米曲霉具有丰富的蛋白酶系,是美国食品与药物管理局和美国饲料公司协会公布的安全微生物菌株之一,也是国内酱油等发酵食品生产的主要菌株。因此,米曲霉用于发酵制备富多肽蛋白饲料是非常安全的。

[0079] 3. 米曲霉产酶中蛋白酶的特性研究

[0080] (1) 米曲霉蛋白酶的最适作用温度

[0081] 最适温度的测定:在 $0.02\text{mol/L}$ , pH4.5的醋酸缓冲液中,不同温度(30–65℃)下进行酶促反应。酶在不同温度下的测定结果如图2所示。在温度30–50℃之间,酶活性随温度上升大幅增加,但当温度高于50℃时,酶活性逐渐降低。故酶最适作用温度为50℃。在较高的温度下酶保持高活性,在蛋白酶的应用中具有重要意义;温度高可以加快酶促反应;另一方面,较高的温度可以有效防止腐败微生物大量繁殖,有效防止腐败变质。

[0082] (2) 米曲霉蛋白酶最适作用pH

[0083] 配制一系列pH范围为3.0–11.0的缓冲溶液,将米曲霉蛋白酶适当稀释后,于50℃下测定其在不同pH条件下的活性,结果见图3。由图3可以看出,米曲霉蛋白酶系在pH4.0–7.0广泛范围内都具有较高的活力,该范围内酶活力均在90%以上;因此该酶适合在饲料中应用。

[0084] (3) 温度对米曲霉蛋白酶活性的影响

[0085] 分别在30℃, 40℃, 50℃, 60℃, 70℃, 80℃下测定米曲霉蛋白酶在酸性(pH5.0)的热稳定性。结果图4所示, 蛋白酶在60℃以下比较稳定, 经过60min的孵育后, 残余酶活性都在80%以上。故该蛋白酶属于耐热性酶, 在加工过程中, 高温环境下不易失活, 适合在饲料中使用。

[0086] (4) 酸碱性对米曲霉蛋白酶活性的影响

[0087] 米曲霉蛋白酶pH稳定性测定是将酶液加入到20mL的不同pH值缓冲液中, 于30℃下保温1h, 按照标准方法测定酶活性。所用缓冲液: pH 6.0-7.5的磷酸氢二钠-磷酸二氢钠缓冲液, pH 8.0-8.5的Tris-HCl缓冲液, pH 9.0-10.5的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液, pH 11.0-12.0的磷酸氢二钠-氢氧化钠缓冲液。结果如图5所示, 从图看出蛋白酶在有广泛的酸性范围内都保持高活性, 在pH2.0-8.0之间, 酶活保持在80%以上。

[0088] 实施例2

[0089] 用三角瓶发酵制备富多肽饲料添加剂(适用于所需发酵的二级种子培养液较少的情况), 包括如下步骤:

[0090] 步骤1、菌种活化

[0091] 从保存的米曲霉DJ36菌种斜面上刮取1环米曲霉孢子, 接种于菌种的活化固体种子培养基上, 在28-32℃的生化培养箱中静止培养, 培养3-5d, 让菌种活化, 孢子充分成熟后, 结束培养。

[0092] 步骤2、制备米曲霉菌的单孢子菌悬液

[0093] 用含有0.01%v/v吐温80的0.75%无菌生理盐水将步骤1培养好的孢子洗下, 放到装有50mL无菌生理盐水和无菌玻璃珠的锥形瓶中, 充分振荡20-30min。待孢子充分打散后, 制备孢子含量为 $1.0 \times 10^8$ CFU/mL的孢子悬液, 即得单孢子菌悬液。

[0094] 步骤3、液体菌种制备

[0095] 按照5%-10%v/v的接种量, 将上述单孢子菌悬液接种在装有30-50mL已灭菌的种子培养基的250mL三角烧瓶中, 培养基中加20粒灭菌的玻璃珠, 以6-8层纱布封口, 置于空气摇床中扩大培养, 设定转速为180-220r/min, 于26-34℃下培养2-4d。

[0096] 上述种子培养基的制备方法为: 分别取蛋白胨5-10g, 黄豆粕粉5-10g, 谷朊粉10-20g, 麸皮粉5-10g, 葡萄糖10-15g, 淀粉10-20g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1g, 吐温-80 0.5mL, 无机盐营养液10mL, 混合均匀后, 调节pH至5.0-6.5, 补充去离子水至1000mL; 在121℃温度下灭菌15min。

[0097] 步骤4、液态发酵制备复合酶

[0098] 将装有发酵培养基200-300mL的1000mL三角瓶置于121℃下灭菌20-30min, 将温度逐渐降至28-32℃, 将步骤2所得的二级种子培养液按照5-10%的接种量接种, 置于摇床上震荡发酵; 初始发酵温度28-32℃, 发酵培养基初始pH5.5-6.5, 摇床震荡频率180-200r/min; 发酵2d-4d, 发酵温度降为25-28℃, 摇床震荡频率不变; 发酵至3d开始补料, 每次补料20-30mL, 每隔12h补料一次, 共补料2-3次; 发酵6d时, 将发酵温度提高至35-40℃, 用2mol/L的NaOH调节发酵液pH值为5.0-6.5, 摇床转速降至160-180r/min; 发酵6d时, 添加灭过菌的豆粕粉和谷朊粉悬浮液20-30mL; 继续发酵至7d, 接着将温度提高到45-50℃, 并将发酵液pH调节至7.0-7.5, 维持4h, 结束发酵。测定发酵液蛋白酶活力达到6800-7000U/ml, 菊粉酶活

力达到:712-786U/ml。

[0099] 上述发酵培养基的制备方法为:分别取黄豆粕粉10-20g,谷朊粉10-20g,菊粉5-10g,麸皮粉5-10g,淀粉10-20g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  1g,吐温-80 0.5mL,玉米浆15-30g,无机盐营养液10mL,混合均匀后,补充去离子水至1000mL;在121℃温度下灭菌15min。

[0100] 步骤5、发酵液酶解杂蛋白

[0101] 发酵结束后,发酵液导入酶解罐中,进一步向发酵液中添加麸皮、谷糠、豆粕粉、谷朊粉,使发酵液变成浓稠状,调节其pH值为5.5,控制温度为50℃,维持4-6h,中间搅拌2-3次;再次调节pH到4.0-7.0,控制温度为50℃,维持4-6h;得到发酵酶解料。

[0102] 步骤6、干燥、粉碎、包装

[0103] 酶解结束后,采取55-65℃低温烘干的方法对以上发酵酶解料干燥处理,然后粉碎过150-200目筛,成品包装得到富多肽富蛋白酶饲料添加剂。

[0104] 实施例3

[0105] 用发酵罐发酵制备富多肽饲料添加剂(适用于所需发酵的二级种子培养液较多的情况),其制备步骤与实施例2中的不同之处在于,步骤4中液态发酵制备复合酶的具体操作为:

[0106] 在15L的发酵罐中装入发酵培养基8-10L,发酵罐夹套升温至95℃,再将蒸汽直接通入发酵培养基中,121℃灭菌20-30min,将温度逐渐降至28-32℃,取步骤2所得的二级种子培养液400-1000mL以火焰法接种于发酵罐中,发酵罐压为0.05MPa;初始发酵控制条件为:温度28-32℃,发酵培养基初始pH5.5-6.5,无菌空气通风比1:0.6-0.8(V/V),搅拌转速260-300r/min,保持溶氧20-30%;发酵过程观察泡沫情况,并流加以消泡剂泡敌,消除培养过程中产生的过多泡沫;发酵2-4d,发酵温度降为25-28℃,无菌空气通风比1:0.4-0.6(V/V),通过自动流加氨水调节pH,控制pH于6.0-6.5;发酵至3d开始补料,每次补料500-1000mL,每隔12h补料一次,共补料2-3次;发酵6d时,将发酵温度提高至35-40℃,用2mol/L的NaOH调节发酵液pH值为6.0-7.0,降低无菌空气通风比1:0.4-0.6(V/V),搅拌转速降至200-240r/min;发酵6d时,添加灭过菌的豆粕粉和谷朊粉悬浮液1-2L;继续发酵至7d,接着将温度提高到45-50℃,并将发酵液pH调节至7.0-7.5,维持4h,结束发酵。测定发酵液蛋白酶活力达到6800-7000U/ml,菊粉酶活力达到:712-786U/ml。

[0107] 其他步骤同实施例2。

[0108] 产品分析

[0109] 通过以上发酵工艺和发酵液酶解工艺最终大豆粕蛋白和谷朊粉中总蛋白转化为多肽的得率高达65%。对制备的多肽粉进行分析确定,分子量小于6Kda的多肽占总肽量的72.1%,其中分子量介于2-6Kda之间的多肽占总肽量的34.5%,有5.62%的多肽分子量在6-20Kda之间。

[0110] 本技术领域中的普通技术人员应当认识到,以上的实施例仅是用来说明本发明,而并非用作为对本发明的限定,只要在本发明的实质精神范围内,对以上所述实施例的变化、变型都将落在本发明的权利要求范围内。

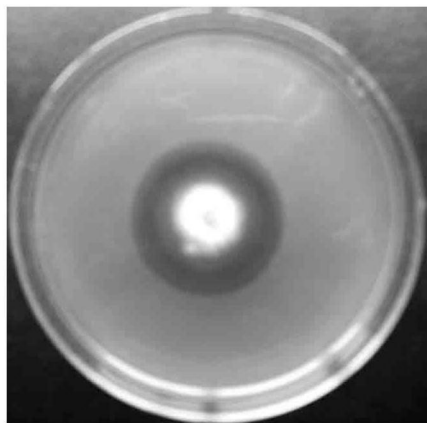


图1

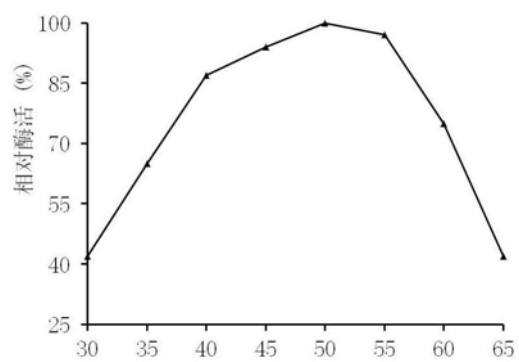


图2

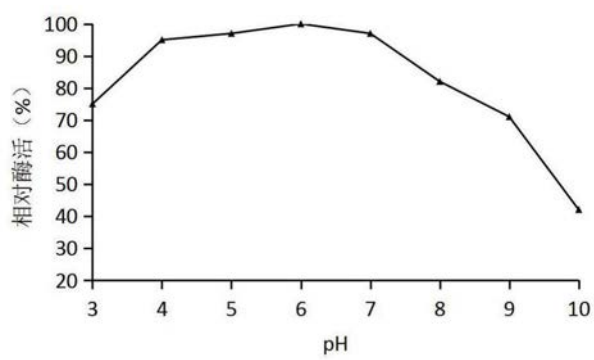


图3

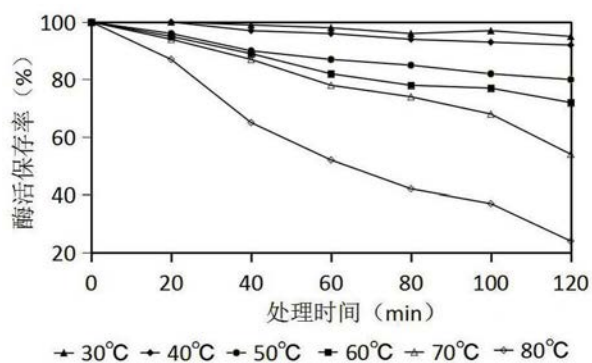


图4

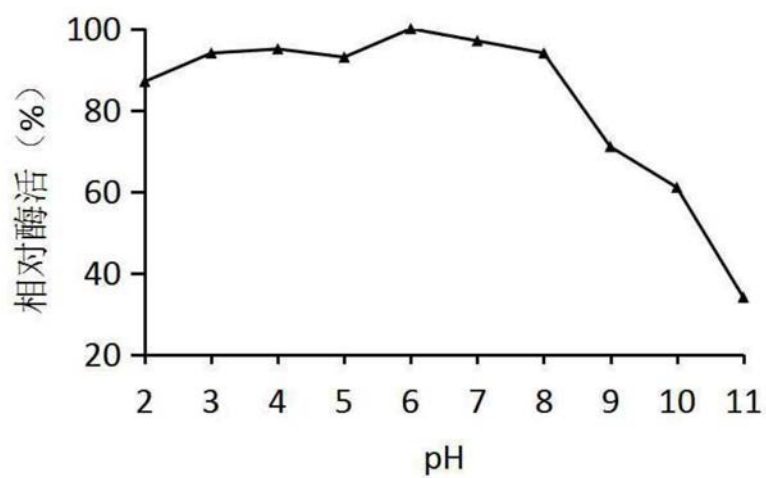


图5