

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 9/24

C12N 1/14

//(C12N9/24, C12R1:645)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03117472.8

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1224701C

[22] 申请日 2003.3.17 [21] 申请号 03117472.8

[71] 专利权人 四川大学

地址 610065 四川省成都市磨子桥

[72] 发明人 张文学 何殿松 杨 瑞 胡 承

审查员 罗 霄

[74] 专利代理机构 成都科海专利事务有限责任公司

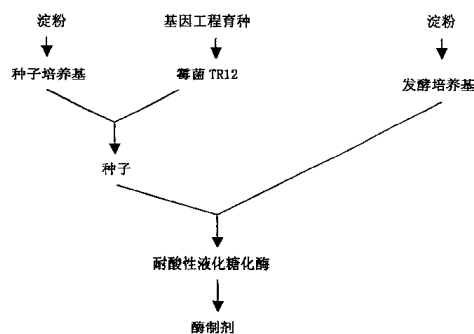
代理人 邓继轩

权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

[54] 发明名称 耐酸性液化糖化酶及其制备方法和用途

[57] 摘要

一种耐酸性液化糖化酶及其制备方法和用途，其特点是借助基因工程技术进行遗传育种，获得含有多拷贝耐酸性 α -淀粉酶和糖化酶融合基因的霉菌 TR12 作为实用菌株，通过发酵工程技术生产酶制剂以及液化糖化过程一体化工艺实现，该酶制剂中耐酸性 α -淀粉酶活性参照行业标准 QB1805.1-93 测定，耐酸性 α -淀粉酶活性为 500 ~ 1000U/g，糖化酶活性参照 QB1805.2-93 测定，糖化酶活性为 20000 ~ 50000U/g，液化糖化酶主要用于淀粉糖制品中的淀粉水解和酒精、氨基酸、有机酸、抗生素发酵工业中的淀粉水解。它具有液化糖化工序同时进行，能耗低、产品粘度低、过滤性好、收率高、质量稳定、无三废污染、大幅度降低生产成本和劳动强度。



ISSN 1008-4274

1、一种由下述方法制得的耐酸性液化糖化酶，其特征在于将玉米粉、玉米浆、黄豆粉淀粉制成种子培养基，接种由基因工程育种所得的霉菌 TR12 菌株，经培养制得种子，该种子接入淀粉制成的发酵培养基中，在通气下，于温度 30~35℃，制得耐酸性液化糖化酶，再经提取获得酶制剂，

其中耐酸性 α -淀粉酶活性参照行业标准 QB1805.1-93 测定，耐酸性 α -淀粉酶活性为 500~1000 U/g，糖化酶活性参照 QB1805.2-93 测定，糖化酶活性为 20000~50000 U/g。

2、按照权利要求 1 所述耐酸性液化糖化酶的制备方法，其特征在于：

(1) 斜面菌种培养

取工程菌 TR12 保存菌种，接种选择斜面培养基，于温度 30-35℃ 培养 7-10 日，选取表面生长均匀，孢子层厚实的斜面菌落，再次移种淀粉培养基，于温度 30-35℃ 培养 5-7 日，获得斜面菌种，

(2) 种子培养

将种子培养基的淀粉质原料加水混合均匀，加热搅拌直至淀粉糊化，冷却后，加 α -淀粉酶液化，用双层纱布过滤，加入玉米浆，定容，分装于锥形瓶中，在温度 118-122℃ 灭菌 20-25 分钟，冷却后接种，在 120-220r/min 的回旋摇床上于温度 32-35℃ 培养 20-30 小时，获得种子，

(3) 摇瓶发酵 不补料发酵工艺

将发酵培养基的淀粉质原料加水糊化，液化，过滤，最后加玉米浆，调 pH，定容，分装于锥形瓶中，在温度 118-122℃ 灭菌 20-30 分钟后，冷却，按 10~20% 的接种量加入已培养好的种子培养物，然后在 120-220r/min 的回旋摇床上于温度 30-32℃ 培养 3-4 日，获得发酵液产物，

(4) 摇瓶发酵 补料发酵工艺

发酵的基础料培养基的配制同上不补料发酵工艺所述的发酵培养基，基础培养基分装于锥形瓶中，在温度 118-122℃ 灭菌 20-30min，冷却后，按 10~20% 的接种量加

入已培养好的种子物，在 120-220r/min 的回旋摇床上，每次 10~20%补料量 1-3 次补料条件下补料培养基，仅碳源浓度为基础料的 3-5 倍，其它成分同，在 30-32°C 培养 4-6 日，获得发酵液产物，

(5) 酶制剂提取

将上述发酵液产物放入离心机内，以 3000~3500 rpm、离心 10~20 分钟、洗涤，上层清液经过滤、合并后得粗酶液，粗酶液在真空度 0.07-0.09Mpa、温度 40-45°C 条件下获得浓缩酶液，浓缩酶液调 pH=3.5-4.5，按每升酶液中加入 10-20 g 玉米淀粉，搅拌均匀，使酶和淀粉充分吸附，在温度 10~20°C 缓慢加入 2-2.5 倍的冷藏乙醇，边加边搅拌，即可看到酶的沉淀，沉淀物离心分离后，所得酶泥放入真空干燥箱中，在真空度 0.07-0.09Mpa、温度 40-45°C 干燥 3-4 小时，获得粗酶制剂成品，

3、按照权利要求 1 所述耐酸性液化糖化酶的用途，其特征在于液化糖化酶用于淀粉糖制备中的淀粉水解和酒精、氨基酸、有机酸、抗生素发酵工业中的淀粉水解。

耐酸性液化糖化酶及其制备方法和用途

一、技术领域

本发明涉及一种耐酸性液化糖化酶及其制备方法，属于淀粉原料的酶水解利用领域。

二、背景技术

淀粉质原料的酶分解，一般由 α -淀粉酶和糖化酶两种酶协同作用，完成淀粉的液化和糖化过程。 α -淀粉酶(α -amylase, EC3.2.1.1.)是一种有内切活性的淀粉酶，在中性pH条件下可从内部切开 α -1, 4糖苷键，将淀粉水解为麦芽糖，麦芽寡糖及少量葡萄糖；糖化酶全称葡萄糖淀粉酶(glucoamylase, EC3.2.1.3.)是一种外切酶，在酸性pH条件下可从淀粉的非还原性末端逐个切开 α -1, 4和 α -1, 6糖苷键，反应最终产物为葡萄糖分子。

由于 α -淀粉酶和糖化酶的最适反应pH不同，中性淀粉酶与酸性糖化酶不能同时使用，淀粉质原料的液化、糖化需由两个工序完成；现市面上虽已有 α -淀粉酶和糖化酶的复合酶出现，基于以上原因，在酿酒等发酵过程的酸性环境下， α -淀粉酶的活性变得极低甚至失去活性；现在虽也有细菌产生的耐酸性 α -淀粉酶面世，但只有国外有极少公司生产，且价格高，远远不能满足市场的需要。

三、发明内容

本发明的目的是针对现有技术的不足而提供一种耐酸性液化糖化酶及其制备方法，其特点是借助基因工程技术进行遗传育种，获得含有多拷贝耐酸性 α -淀粉酶和糖化酶融合基因的特种霉菌TR12菌株(*Journal of The Institute of Brewing*, Vol.105, No.9, 1999)，本发明者旨在以该基因工程菌株作为实用菌株，通过发酵工程技术生产酶制剂以及淀粉液化糖化过程的一体化工艺实现。

本发明的目的由以下技术措施实现。其中所述原料份数除特殊说明外，均为重量份数。

耐酸性液化糖化酶及其制备方法：

淀粉制成种子培养基，接种由基因工程育种所得的霉菌 TR12 菌株，经培养制得种子，该种子接入淀粉制成的发酵培养基中，在通气下，于温度 30~35℃，制得耐酸性液化糖化酶，再经提取获得酶制剂。

(1) 斜面菌种培养

取工程菌 TR12 保存菌种（或冻干管、或砂土管、或保藏斜面），接种选择斜面培养基，于温度 30-35℃培养 7-10 日，选取表面生长均匀，孢子层厚实的斜面菌落，再次移种淀粉培养基，于温度 30-35℃培养 5-7 日，获得斜面菌种，可在温度 4℃，保存 15-30 日。

(2) 种子培养

将种子培养基的淀粉质原料加水混合均匀，加热搅拌直至淀粉糊化，冷却后，加 α -淀粉酶液化，用双层纱布过滤，加入玉米浆，定容。分装于锥形瓶中。在温度 118-122℃灭菌 20-25 分钟，冷却后接种，在 120-220r/min 的回旋摇床上于温度 32-35℃培养 20-30 小时，获得种子。

(3) 摇瓶发酵 不补料发酵工艺

将发酵培养基的淀粉质原料加水糊化，液化，过滤，加玉米浆，调 pH，定容，分装于锥形瓶中，在温度 118-122℃灭菌 20-30 分钟后，冷却，按 10~20%的接种量加入已培养好的种子培养物，然后在 120-220r/min 的回旋摇床上于温度 30-32℃培养 3-4 日，获得发酵液产物。

(4) 摇瓶发酵 补料发酵工艺

发酵的基础料培养基的配制同上不补料发酵工艺所述的发酵培养基，基础培养基分装于锥形瓶中。在温度 118-122℃灭菌 20-30min。冷却后，按 10~20%的接种量加入已培养好的种子物。在 120-220r/min 的回旋摇床上，每次 10~20%补料量、1-3 次补料条件下（补料培养基，仅碳源浓度为基础料的 3-5 倍，其它成分同），在 30-32℃培养 4-6 日，获得发酵液产物。

(5) 酶制剂提取

将上述发酵液产物放入离心机内，以 3000~3500 rpm、离心 10~20 分钟、洗涤，上层清液经过滤、合并后得粗酶液。粗酶液在真空度 0.07-0.09Mpa、温度 40-45℃条件下

获得浓缩酶液。浓缩酶液调 pH=3.5-4.5，按每升酶液中加入 10-20 g 玉米淀粉，搅拌均匀，使酶和淀粉充分吸附，在温度 10~20°C 缓慢加入 2-2.5 倍的冷藏乙醇，边加边搅拌，即可看到酶的沉淀。沉淀物离心分离后，所得酶泥放入真空干燥箱中，在真空度 0.07-0.09Mpa、于温度 40-45°C 干燥 3-4 小时，获得粗酶制剂成品。

酶制剂中的耐酸性 α -淀粉酶活性参照行业标准 QB1805.1-93 测定，耐酸性 α -淀粉酶活性为 500~1000 U/g，糖化酶活性参照 QB1805.2-93 测定，糖化酶活性为 20000~50000 U/g，最适宜温度 50-60°C，pH=4.0-5.0，在 50°C 热稳定性最好， K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 等金属化合物可以作为酶制剂活性的保护剂或促进剂。液化糖化酶主要用于淀粉糖制品中的淀粉水解和酒精、氨基酸、有机酸、抗生素发酵工业中的淀粉水解，本发明的耐酸性液化糖化酶制剂与现有酶制剂指标的比较，详见表 1 所示。

本发明具有如下优点：

1、填补了我国在耐酸性 α -淀粉酶品种上的空白，实现了酸性环境下液化糖化工序一体化，不仅可以替代进口，而且可以出口创汇，为我国国民经济发展做出贡献。

2、本产品应用范围广泛，市场前景广阔，而且对环境和生态的保护具有重要意义。

3、使用耐酸性液化糖化酶，pH=4.0-5.0，液化酸度低，液化糖化工序同时进行，粘度低、能耗低、过滤性好、收率高。例如，每吨酒渣加酶再发酵，可望多产 50° 酒 20 公斤，经济效益显著。

4、可使应用本产品的企业降低生产成本和劳动强度，提高生产力，促进传统产业跃上新台阶。

四、附图说明

图 1 为高效耐酸性液化糖化酶制备的流程图。

五、具体实施方式

下面通过实施例对本发明进行具体的描述，有必要在此指出的是本实施例只用于对本发明进行进一步说明，但不能理解为对本发明保护范围的限制，该领域的技术熟练人员可以根据上述本发明的内容作出一些非本质的改进和调整。

实施例 1 (酶制剂的制备)

1) 斜面菌种培养

取工程菌 TR12 保藏菌种, 接种选择斜面培养基 (KCl 2g/L, K_2HPO_4 1g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02g/L, Sugar 1mol/L, 乙酰胺 10mM, CsCl 15mM, 琼脂 15g/L), 于温度 32°C, 培养 7 日, 移种淀粉斜面培养基 (玉米淀粉 20g/L, KNO_3 2g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.2g/L, KH_2PO_4 2.7g/L, 琼脂粉 20g/L, pH 5.0), 于温度 32°C 培养 7 日, 获得斜面菌种。

2) 种子培养

将种子培养基 (玉米粉 60 g/L, 玉米浆 20 g/L, 黄豆粉 20 g/L) 淀粉质原料加水混合均匀, 加热搅拌直至淀粉糊化。冷却后加入 α -淀粉酶液化, 双层纱布过滤后, 加入玉米浆成分, 定容。按每瓶 50ml 分装 250-ml 锥形瓶, 8 层纱布塞住瓶口, 牛皮纸包扎。在 121°C 灭菌 20 分钟, 冷却后接种, 然后在 210r/min 的回旋摇床上 32°C 培养 25 小时。

3) 摇瓶发酵

将发酵培养基 (玉米粉 50 g/L, 玉米浆 20 g/L, 黄豆粉 20 g/L, 麸皮 30 g/L, 柠檬酸调 pH 值 3.5-4.0) 的淀粉质原料加水糊化、液化, 过滤, 最后加玉米浆, 调 pH, 定容, 按 50ml 分装 250-ml 锥形瓶中。于温度 121°C 灭菌 20 分钟, 冷却, 按 10% 的接种量加入已培养好的种子培养物, 然后在 210r/min 的回旋摇床上于温度 32°C 培养 4 天, 获得发酵液产物。

4) 酶制剂提取

将上述发酵液产物加入离心机内, 以 3500 rpm 离心 15 分钟、洗涤, 上面清液经纱布过滤, 合并后得到的含耐酸性 α -淀粉酶活性 20.9 U/ml、糖化酶活性 786 U/ml 的粗酶液, 在真空度 0.09Mpa、45°C 水浴中浓缩, 获得含耐酸性 α -淀粉酶活性 202.9 U/ml、糖化酶活性 7540 U/ml 的浓缩酶液。浓缩酶液调 pH=3.5, 加入 1% 玉米粉, 搅拌均匀, 在 10~20°C 缓慢加入 2.2 倍的冷藏乙醇, 边加边搅拌, 析出酶的沉淀, 离心后酶泥放入真空干燥箱中, 在真空度 0.09Mpa、温度 45°C 下干燥 3 小时, 干燥物为含耐酸性 α -淀粉酶活性 863 U/g、糖化酶活性 30736 U/g 的粗酶制剂成品。

实施例 2 (酶制剂的制备)

1) 斜面菌种培养

同实施例 1。

2) 种子培养

同实施例 1。

3) 摇瓶发酵

将发酵培养基（玉米粉 50 g/L，玉米浆 20 g/L，黄豆粉 20 g/L，麸麦 30 g/L，柠檬酸调 pH 值 3.5）的淀粉质原料加水糊化、液化，过滤。按 800 mL 分装于 3000ml 锥形瓶中。于温度 122℃ 灭菌 25min。冷却后，按 15% 的接种量加入已培养好的锥形瓶种子物。在 160r/min 的回旋摇床上 32℃ 培养，并分别在 32 小时、80 小时按 20% 量各补料 1 次（补料培养基，仅碳源浓度为基础料的 3 倍，其它成分同），培养 5 日后，获得发酵液产物。

4) 酶制剂提取

提取方法与实施例 1 同，上述发酵液产物经离心、洗涤、过滤、浓缩、干燥后，获得含耐酸性 α -淀粉酶活性 925 U/g、糖化酶活性 35142 U/g 的粗酶制剂成品。

实施例 3（酶制剂的制备）

1) 斜面菌种培养

同实施例 1。

2) 种子培养

同实施例 1。

3) 摇瓶发酵

将发酵培养基（玉米粉 50 g/L，玉米浆 20 g/L，黄豆粉 20 g/L，麸麦 30 g/L，柠檬酸调 pH 值 3.5）的淀粉质原料加水糊化、液化，过滤。按 500 ml 分装于 3000-ml 锥形瓶中。于温度 118℃ 灭菌 30min。冷却后，按 20% 的接种量加入已培养好的锥形瓶种子物。在 160r/min 的回旋摇床上 32℃ 培养，并分别在 32 小时、64 小时、96 小时按 15% 量各补料 1 次（补料培养基，仅碳源浓度为基础料的 5 倍，其它成分同），培养 6 日后，获得发酵液产物。

4) 酶制剂提取

提取方法与实施例 1 同，上述发酵液产物经离心、洗涤、过滤、浓缩、干燥后，获得含耐酸性 α -淀粉酶活性 711 U/g、糖化酶活性 21754 U/g 的粗酶制剂成品。

应用实例 1（葡萄糖浆制备）

玉米淀粉加水调成浓度 300~320g/L 的淀粉乳，用 HCl 水溶液将淀粉乳调至 pH4.5-4.6，按每千克干淀粉添加氯化钙 500mg 和氯化钠 10mg。加入本实验室自制酶 8 U/g 淀粉（以耐酸性 α -淀粉酶活性计），在 60-65℃保温 60min 左右，至用碘液测试呈棕橙色，液化纯度 20-22%为止。再降温到 55℃，再补充加入自制的酶制剂 100 U/g 淀粉（以糖化酶活性计）继续糖化 30 小时左右，保温测定糖化度至 96%~98%。加活性炭 1%-1.5%，加热至 80℃-90℃保温脱色 30min，调 pH4.0-4.2。经过滤、离子交换树脂处理，可得到纯净的葡萄糖浆。

应用实例 2（酒精发酵）

称取玉米粉 50g，加 2.5 倍量的水调浆，调 pH 值为 4.6，煮沸糊化 2 min，冷却至 60℃，加入 10 U/g 淀粉（以耐酸性 α -淀粉酶活性计）的自制酶液，于 60℃液化糖化 15 min，再降温到 50℃，补加 150 U/g 淀粉（以糖化酶活性计）的自制酶液继续糖化 30min，至稀碘液显棕色。把糖化液装入 500-ml 三角瓶中，糖化液补水至 225g，加入 1g 干酵母，常温 25℃发酵 3 日。蒸馏，获浓度 28.3%v/v 的酒精 80 ml，乙醇收率为 45.28 ml/100g 淀粉。

应用实例 3（酒精发酵）

称取玉米粉 50g，加 2.5 倍量的水调浆，调 pH 值为 4.6 后，直接加入 10 U/g 淀粉（以耐酸性 α -淀粉酶活性计）的自制酶液，于 60℃液化糖化 1h，再降温到 50℃，补加 80 U/g 淀粉（以糖化酶活性计）的自制酶液继续糖化 30min，至稀碘液显棕色。把糖化液装入 500-ml 三角瓶中，糖化液补水至 225g，加入 1g 干酵母，常温 25℃发酵 4 日。蒸馏，获浓度 30.9%v/v 的酒精 80 ml，乙醇收率为 49.44 ml/100g 淀粉。

表1 本发明的耐酸性液化糖化酶制剂与现有酶制剂指标的比较:

类似的技术 (产品)	生产状况(参考)		最适 pH	产品参考规格 (U/g)	产品参考 价格 (元/kg)	主要应用领域
	国内	国外				
一般 α -淀粉酶	生产	生产	6-7	1200-2500	10-20	淀粉加工
耐热性 α -淀粉酶	生产	生产	6-7	1200-2500	15-25	酒精工业
耐酸性 α -淀粉酶 (食品级)	无	生产	5-6	1000-1500	50-400	酿酒工业
耐酸性 α -淀粉酶 (分析级)	无	生产	4-6	10000	750	试验分析
本发明的耐酸性 液化糖化酶 (工业级)	生产	无	4-5	耐酸性 α -淀粉 酶活性 500-1000	50	淀粉加工、酒精 工业、白酒工 业、果汁制造、 医药工业、饲料 工业、环保等
				糖化酶活性 20000-50000		

