(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102093992 B
(45)授权公告日 2013.03.20

(21)申请号 201010162644.2
(22)申请日 2010.04.09
(66)本国优先权数据
200910220649.3 2009.12.10 CN
(73)专利权人 大连大学
地址 116622 辽宁省大连市大连经济技术开发区大连大学
(72)发明人 张庆芳 迟乃玉 马莉
(74)专利代理机构 大连智慧专利事务所 21215
代理人 周志舰
(51)Int.Cl.
C12N 9/50(2006.01)
(56)对比文件
王晓辉等. 海洋低温BS070623菌株选育及其发酵培养基优化(I). 《渤海大学学报(自然科学版)》. 2009, 第30卷(第2期), 97-100.
迟乃玉等. 海洋低温蛋白酶菌株发酵条件的研究(Ⅱ). 《微生物学通报》. 2006, 第33卷(第2期), 106-108.
陈秀兰等. 低温蛋白酶的研究进展与应用前景. 《工业微生物》. 2001, 第31卷(第1期), 52-53, 57.
审查员 孙薇

权利要求书 1 页 说明书 4 页

(54)发明名称

微生物发酵生产低温蛋白酶的方法

(57)摘要

本发明所述的一种微生物发酵生产低温蛋白酶的方法是将产生蛋白酶的微生物逐级低温驯化，使其在低温环境中生长良好；将低温驯化后的蛋白酶产生菌在14～20℃逐级扩大培养，按发酵液体积的3～9%接种量接入产酶培养基中，在14～20℃培养48～120h时，即微生物发酵生产低温蛋白酶结束；发酵液在4,000～8,000rpm离心收集液体，收集的液体即为粗酶液；根据不同需要和使用对象不同，将粗酶液进一步浓缩、分离纯化，制备成不同活性、纯度和剂型的酶制剂。

CN 102093992 B

1. 一种微生物发酵生产低温蛋白酶的方法，其包括以下步骤：

(1) 菌种来源于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，菌种编号：1.504或1.775或1.2172，菌株先活化；将上述产生蛋白酶的微生物逐级低温驯化，驯化温度由高到低，25℃→ 22℃→ 20℃→ 18℃→ 16℃→ 14℃，使其在低温环境中生长良好；菌种低温驯化培养基：牛肉膏 0.1% ～ 0.5%，蛋白胨 0.7% ～ 1.2%，NaCl 0.4% ～ 0.6%，琼脂 2%，干酪素 1% ～ 4%，自来水 1000ml，pH 7.4，0.1Mpa，121℃灭菌 20min；

(2) 按常规方法将上述低温驯化后的蛋白酶产生菌在14 ～ 20℃逐级扩大培养，制备成液体一级种子和二级种子；液体种子培养基：葡萄糖 0.8% ～ 1.2%，蛋白胨 0.3% ～ 0.7%，酵母膏 0.3% ～ 0.8%，K_2HPO_4 0.08% ～ 0.12%，$MgSO_4$ 0.01% ～ 0.04%，Na_2CO_3 0.8% ～ 1.2%，pH 8.5，0.1Mpa，121℃灭菌 20min；

(3) 将液体一级种子或二级种子，按发酵液体积的 3 ～ 9% 接种量接入产酶培养基中，在 14 ～ 20℃培养 48 ～ 120 h，即微生物发酵生产低温蛋白酶结束；产酶培养基：葡萄糖 0.9% ～ 1.3%，蛋白胨 0.2% ～ 0.6%，酵母膏 0.3% ～ 0.7%，K_2HPO_4 0.07% ～ 0.13%，$MgSO_4$ 0.01% ～ 0.03%，Na_2CO_3 0.8% ～ 1.3%，pH 8.5，0.1Mpa，121℃灭菌 20min；

(4) 将 (3) 的发酵液在 4,000 ～ 8,000 rpm 离心收集液体，收集到的液体即为粗酶液；

(5) 根据不同需要和使用对象不同，将 (4) 得到的粗酶液进一步浓缩、分离纯化，制备成不同活性、纯度和剂型的酶制剂。

微生物发酵生产低温蛋白酶的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物学、酶工程、发酵工程、生物化学等领域，具体涉及一种低温蛋白酶微生物发酵生产方法。该发明生产的低温蛋白酶主要应用于饲料行业、食品加工、啤酒酿造、奶制品生产、化妆品工业、印染、洗涤、皮革制造以及环境保护等其它蛋白酶应用行业。可以提高原料的利用率、转化率和生产率，降低生产成本，改善并提高产品质量。

背景技术

[0002] 蛋白酶是水解蛋白质肽键的一类酶的总称。蛋白酶作为一类重要的工业用酶，已广泛用于饲料行业、食品加工、啤酒酿造、奶制品生产、化妆品工业、印染、洗涤、皮革制造以及环境保护等其它蛋白酶应用行业。目前使用的蛋白酶一般都是中温和高温型蛋白酶（陈秀兰等，工业微生物，2001）。关于低温蛋白酶的研究尚处于起步阶段，主要集中在菌种选育、发酵条件优化、酶学性质以及相关基因克隆等方面（王全富等，中国水产科学，2005；迟乃玉等，微生物学通报，2006；张琇等，中国水产科学，2006；冯秀萍等，中国生物工程杂志，2009）；而低温蛋白酶的产业化、规模化生产及应用还未见报道（王海亭等，海洋水产研究，2002；赵媛媛等，日用化学品科学，2005）。低温蛋白酶与中温和高温蛋白酶相比具有很大的应用优势，因为低温蛋白酶在低温下具有高酶活及高催化效率，可大大缩短处理过程的时间并省却昂贵的加热或冷却费用；在节能方面有相当大的优势；经过温和的热处理即可使低温蛋白酶的活力丧失，而低温或适温不会影响产品的品质，这将有助于低温蛋白酶的推广和应用。利用低温微生物发酵生产的低温蛋白酶，在应用中可以省却加热与冷却设备和工艺，提高了生产效率，降低了生产成本；在食品工业中应用可以改善并提高产品的质量与风味（孙谧等，海洋水产研究，2002）。低温蛋白酶的应用将对传统的粮食加工、食品、酿造、发酵、纺织品、医药等领域产生深远的影响，也将为人类摆脱生存和发展中所面临的诸如资源、能源危机以及环境污染等困境提供现实的机遇。低温蛋白酶具有非常广阔的开发潜力和应用前景。

发明内容

[0003] 本发明的目的是提供一种微生物发酵生产低温蛋白酶的方法，该方法主要是微生物经过低温驯化后，在 14 ～ 20℃液体发酵生产低温蛋白酶的方法，这种生产方法获得的低温蛋白酶粗酶液活性可以达到 240U/ml，如再经过分离和纯化，可以得到不同浓度和纯度的酶制剂。该酶制剂应用操作简单、方便、快捷、成本低。可以从根本上避免中温、高温酶的加热、冷却设备和工艺。

[0004] 本发明所述的一种微生物发酵生产低温蛋白酶的方法具体包括以下步骤：

[0005] (1) 将产生蛋白酶的微生物逐级低温驯化，驯化温度由高到低，25℃→ 22℃→ 20℃→ 18℃→ 16℃→ 14℃，使其在低温环境中生长良好；

[0006] (2) 按常规方法将低温驯化后的蛋白酶产生菌在 14 ～ 20℃逐级扩大培养，制备成液体一级种子和二级种子；

[0007] (3) 将液体一级种子或二级种子，按发酵液体积的 3 ～ 9％接种量接入产酶培养基中，在 14 ～ 20℃培养 48 ～ 120h 时，即微生物发酵生产低温蛋白酶结束；

[0008] (4) 将 (3) 的发酵液在 4,000 ～ 8,000rpm 离心收集液体；收集到的液体即为粗酶液；

[0009] (5) 根据不同需要和使用对象不同，将 (4) 得到的粗酶液进一步浓缩、分离纯化，制备成不同活性、纯度和剂型的酶制剂。

[0010] 本发明中使用的菌种来源于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)，初期活化和生长条件按菌种保藏单位提供的说明进行。蛋白酶产生菌 (CGMCC 菌种编号：1.504 或 1.775 或 1.2172 等)，菌株先活化，再经过逐级低温驯化，发酵生产低温蛋白酶时按本发明方法进行培养，低温驯化后的菌株在 4℃环境中可保存 2 个月，用 25 ～ 30％甘油制成的菌悬液在零下 80℃条件下可以长期保藏。

具体实施方式：

[0011] 实施例一：

[0012] (1)、培养基制备

[0013] ①菌种活化培养基：牛肉膏 0.3％，蛋白胨 1.0％，NaCl 0.5％，干酪素 2％，琼脂 2％，自来水 1000ml，pH7.4，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0014] ②菌种低温驯化培养基：牛肉膏 0.1％～ 0.5％，蛋白胨 0.7％～ 1.2％，NaCl 0.4％～ 0.6％，琼脂 2％，干酪素 1％～ 4％，自来水 1000ml，pH 7.4，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0015] ③液体种子培养基：葡萄糖 0.8％～ 1.2％，蛋白胨 0.3％～ 0.7％，酵母膏 0.3％～ 0.8％，K_2HPO_4 0.08％～ 0.12％，$MgSO_4$ 0.01％～ 0.04％，Na_2CO_3 0.8％～ 1.2％，pH 8.5，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0016] ④产酶培养基：葡萄糖 0.9％～ 1.3％，蛋白胨 0.2％～ 0.6％，酵母膏 0.3％～ 0.7％，K_2HPO_4 0.07％～ 0.13％，$MgSO_4$ 0.01％～ 0.03％，Na_2CO_3 0.8％～ 1.3％，pH 8.5，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0017] (2) 将产生蛋白酶的菌种，按中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 提供的菌株说明进行初始活化；

[0018] (3) 将 (2) 活化好的菌种逐级低温驯化，驯化温度由高到低，25℃→ 22℃→ 20℃→ 18℃→ 16℃→ 14℃，使其在低温环境中生长良好；

[0019] (4) 按常规方法将低温驯化后的蛋白酶产生菌在 14 ～ 20℃培养 24 ～ 48h，按 4％的接种量进行逐级扩大培养，制备成液体一级种子和二级种子；

[0020] (5) 将 (4) 制备的二级种子按发酵液体积 3 ～ 5％的接种量接入 10L 的产酶培养基中，在 14 ～ 16℃培养 96 ～ 120h，即微生物发酵生产低温蛋白酶结束；

[0021] (6) 将 (5) 的发酵液在 4,000 ～ 8,000rpm 离心收集液体，收集到的液体即为粗酶液；

[0022] (7) 根据不同需要和使用对象不同，将 (6) 得到的粗酶液进一步浓缩、分离纯化，制备成不同活性、纯度和剂型的低温蛋白酶制剂。

[0023] 实施例二：

[0024] (1)、培养基制备

[0025] ①菌种活化培养基：牛肉膏 0.3%，蛋白胨 1.0%，NaCl 0.5%，干酪素 2%，琼脂 2%，自来水 1000ml，pH7.4，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0026] ②菌种低温驯化培养基：牛肉膏 0.1%～0.5%，蛋白胨 0.7%～1.2%，NaCl 0.4%～0.6%，琼脂 2%，干酪素 1%～4%，自来水 1000ml，pH 7.4，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0027] ③液体种子培养基：葡萄糖 0.8%～1.2%，蛋白胨 0.3%～0.7%，酵母膏 0.3%～0.8%，K_2HPO_4 0.08%～0.12%，$MgSO_4$ 0.01%～0.04%，Na_2CO_3 0.8%～1.2%，pH 8.5，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0028] ④产酶培养基：葡萄糖 0.9%～1.3%，蛋白胨 0.2%～0.6%，酵母膏 0.3%～0.7%，K_2HPO_4 0.07%～0.13%，$MgSO_4$ 0.01%～0.03%，Na_2CO_3 0.8%～1.3%，pH 8.5，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0029] (2) 将产生蛋白酶的菌种，按中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 提供的菌株说明进行初始活化；

[0030] (3) 将 (2) 活化好的菌种逐级低温驯化，驯化温度由高到低，25℃→22℃→20℃→18℃→16℃→14℃，使其在低温环境中生长良好；

[0031] (4) 按常规方法将低温驯化后的蛋白酶产生菌在 14～20℃培养 24～48h，按 5% 的接种量进行逐级扩大培养，制备成液体一级种子和二级种子；

[0032] (5) 将 (4) 制备的二级种子按发酵液体积 5～7% 的接种量接入 50L 的产酶培养基中，在 16～18℃培养 72～96h，即微生物发酵生产低温蛋白酶结束；

[0033] (6) 将 (5) 的发酵液在 4,000～8,000rpm 离心收集液体，收集到的液体即为粗酶液；

[0034] (7) 根据不同需要和使用对象不同，将 (6) 得到的粗酶液进一步浓缩、分离纯化，制备成不同活性、纯度和剂型的低温蛋白酶制剂。

[0035] 实施例三：

[0036] (1)、培养基制备

[0037] ①菌种活化培养基：牛肉膏 0.3%，蛋白胨 1.0%，NaCl 0.5%，干酪素 2%，琼脂 2%，自来水 1000ml，pH7.4，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0038] ②菌种低温驯化培养基：牛肉膏 0.1%～0.5%，蛋白胨 0.7%～1.2%，NaCl 0.4%～0.6%，琼脂 2%，干酪素 1%～4%，自来水 1000ml，pH 7.4，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0039] ③液体种子培养基：葡萄糖 0.8%～1.2%，蛋白胨 0.3%～0.7%，酵母膏 0.3%～0.8%，K_2HPO_4 0.08%～0.12%，$MgSO_4$ 0.01%～0.04%，Na_2CO_3 0.8%～1.2%，pH 8.5，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0040] ④产酶培养基：葡萄糖 0.9%～1.3%，蛋白胨 0.2%～0.6%，酵母膏 0.3%～0.7%，K_2HPO_4 0.07%～0.13%，$MgSO_4$ 0.01%～0.03%，Na_2CO_3 0.8%～1.3%，pH 8.5，0.1Mpa，121℃灭菌 20min。

[0041] (2) 将产生蛋白酶的菌种，按中国普通微生物菌种保藏管理中心 (CGMCC) 提供的菌株说明进行初始活化；

[0042] (3) 将 (2) 活化好的菌种逐级低温驯化，驯化温度由高到低，25℃→ 22℃→ 20℃→ 18℃→ 16℃→ 14℃，使其在低温环境中生长良好；

[0043] (4) 按常规方法将低温驯化后的蛋白酶产生菌在 14 ～ 20℃培养 24 ～ 48h，按 5％的接种量进行逐级扩大培养，制备成液体一级种子和二级种子；

[0044] (5) 将 (4) 制备的二级种子按发酵液体积 7 ～ 9％的接种量接入 100L 的产酶培养基中，在 18 ～ 20℃培养 48 ～ 72h，即微生物发酵生产低温蛋白酶结束；

[0045] (6) 将 (5) 的发酵液在 4,000 ～ 8,000rpm 离心收集液体，收集到的液体即为粗酶液；

[0046] (7) 根据不同需要和使用对象不同，将 (6) 得到的粗酶液进一步浓缩、分离纯化，制备成不同活性、纯度和剂型的低温蛋白酶制剂。