



(10) 授权公告号 CN 117683074 B

(45) 授权公告日 2024.08.16

(21) 申请号 202311708170.0

(22) 申请日 2023.12.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 117683074 A

(43) 申请公布日 2024.03.12

(83) 生物保藏信息
CGMCC NO. 28513 2023.09.22

(73) 专利权人 山东绿邦生物科技有限公司
地址 256500 山东省滨州市博兴县香驰工
业园

(72) 发明人 杨春文 相小翠 赵俊辉 张志勇
韩建园 牟桐 晋晓璐 伏小勇
胡腾飞

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限
公司 11227

专利代理师 王燕

(51) Int.Cl.
C07K 1/14 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
C12R 1/085 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 107227267 A, 2017.10.03

审查员 张天祺

权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

蜡样芽孢杆菌、蛋白酶抑制剂以及提高蛋白渣产量的方法

(57) 摘要

本发明涉及生物技术领域,具体涉及蜡样芽孢杆菌、蛋白酶抑制剂以及提高蛋白渣产量的方法。本发明公开了蛋白酶的抑制剂及其在提高乳清废水的蛋白渣产量中的应用。研究表明,蜡样芽孢杆菌从乳清水气浮渣中分离,具有较高的蛋白酶活性,其存在严重影响了蛋白渣的产量,氟化钠和EDTA-2Na对该菌蛋白酶活性抑制较强烈,抑制率分别达到56.13%和52.21%,但是钙离子对该菌株抑制率达到80%以上,利用钙离子、锰离子和EDTA制备成复合抑制剂,将该抑制剂应用于乳清废水蛋白渣的提取工艺,用量少,蛋白酶活性受到严重抑制,酶活为0U/mL。

1. 蛋白酶的抑制剂,其特征在于,组分为:
 - (I)、 CaCl_2 和 MnCl_2 ;或
 - (II)、 MnCl_2 和EDTA;或
 - (III)、 CaCl_2 、 MnCl_2 和EDTA;所述 CaCl_2 与所述 MnCl_2 的重量比为11:20;
所述 MnCl_2 与所述EDTA的重量比为50:73;
所述EDTA、所述 CaCl_2 与所述 MnCl_2 的重量比为146:55:100。
2. 如权利要求1所述的抑制剂在提高乳清废水的蛋白渣产量中的应用。
3. 提取蛋白渣的方法,其特征在于,包括:取如权利要求1所述的抑制剂与乳清废水混合,分离蛋白渣。
4. 如权利要求3所述的方法,其特征在于:
所述 CaCl_2 在所述抑制剂中的浓度为5.5 g/L;
所述 MnCl_2 在所述抑制剂中的浓度为10 g/L;
所述EDTA在所述抑制剂中的浓度为14.6 g/L;
所述抑制剂与所述乳清废水的体积比为2‰。

蜡样芽孢杆菌、蛋白酶抑制剂以及提高蛋白渣产量的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体涉及蜡样芽孢杆菌、蛋白酶抑制剂以及提高蛋白渣产量的方法。

背景技术

[0002] 大豆分离蛋白和豆制品加工过程中会产生大量的大豆乳清废水,据研究,每生产1吨大豆分离蛋白产品,会产生大约30~35m³的大豆乳清水。大豆乳清水含有丰富的有机物,其主要成分是小分子水溶性蛋白质、蔗糖、无机盐,另外还含有少量的大豆低聚糖、淀粉酶、细胞色素、异黄酮类化合物、大豆皂甙、植酸等营养物质。大豆分离蛋白的用量和适用领域逐年增加,不可避免地增加了大豆乳清废水的产生量,这类乳清废水干物质含量低,利用困难,目前我公司主要采用预处理和生化处理相结合的方式进行处置。乳清废水经过“气浮+板框”提取出一半的悬浮物,剩余废水经过厌氧发酵后再利用好氧发酵,将其中的有机成分通过微生物分解,达到排放标准后排放到城市污水管网中,而提取的悬浮物经过干燥等步骤最终成为饲料原料-蛋白渣,该蛋白渣蛋白含量>45%,水分<13%,是一种优质的蛋白原料。经过近几年的研究发现,每年夏天气浮浮渣较粘,碟螺效果差,导致蛋白渣的产量较低,对浮渣进行菌群分析,发现浮渣中杆菌较多,经过检测发现蛋白酶活性较高达到2.0U/mL以上。

[0003] 芽孢杆菌在自然界中分布广泛,一般为好氧或兼性厌氧的革兰氏阳性杆菌,胞内可产生圆形、椭圆形或柱状的内生芽孢。芽孢壁中有皮质层,对热、紫外线和离子辐射及抗菌素具有很高的抗性,可以耐受饲料加工、储藏、耐酸、高温、耐挤压等,芽孢杆菌具有较强的产蛋白酶、纤维素酶、淀粉酶能力,在蛋白加工废水处理领域,芽孢杆菌的存在造成蛋白产量较低,需要改变条件或加入抑制剂抑制蛋白酶活性。

[0004] 蛋白酶是水解蛋白质肽键的一类酶的总称。按其水解多肽的方式,可以将其分为内肽酶和外肽酶两类。内肽酶将蛋白质分子内部切断,形成分子量较小的肽和胺。外肽酶从蛋白质分子的游离氨基或羧基的末端逐个将肽键水解,而游离出氨基酸,前者为氨基肽酶后者为羧基肽酶。按其活性中心又可将蛋白酶分为丝氨酸蛋白酶、巯基蛋白酶、金属蛋白酶和天冬氨酸蛋白酶。金属离子在蛋白酶水解大豆分离蛋白的过程中起到重要作用,有些金属离子起到抑制作用,降低大豆寡肽得率,有些金属离子起到促进作用,提升大豆寡肽得率。对于大豆分离蛋白废水处理厂,抑制蛋白酶活性,将有利于提高蛋白渣产量,提高企业的经济效益。因此,提供一种抑制蛋白酶活性、提高蛋白渣产量的方法具有重要的显示意义。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明提供了蜡样芽孢杆菌、蛋白酶抑制剂以及提高蛋白渣产量的方法,首先从乳清水中分离出产蛋白酶的主要菌株,然后对菌进行分析和研究,最后提供菌株的抑制条件和抑制剂的制备方法,达到抑制蛋白酶活,提高蛋白渣产量的目的。

- [0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:
- [0007] 本发明提供了用于抑制蛋白酶的抑制剂,包括:
- [0008] (I)、 Ca^{2+} 和 Mn^{2+} ;或
- [0009] (II)、 Mn^{2+} 和EDTA;或
- [0010] (III)、 Ca^{2+} 、 Mn^{2+} 和EDTA;
- [0011] 所述蛋白酶包括蜡样芽孢杆菌产生的蛋白酶。
- [0012] 在本发明的一些具体实施方案中,上述抑制剂中所述蜡样芽孢杆菌的保藏编号为CGMCC No.28513。
- [0013] 在本发明的一些具体实施方案中,上述抑制剂包括:
- [0014] (I)、 CaCl_2 和 MnCl_2 ;或
- [0015] (II)、 MnCl_2 和EDTA;或
- [0016] (III)、 CaCl_2 、 MnCl_2 和EDTA。
- [0017] 在本发明的一些具体实施方案中,上述抑制剂中,所述 CaCl_2 与所述 MnCl_2 的重量比为11:20。
- [0018] 在本发明的一些具体实施方案中,上述抑制剂中,所述 MnCl_2 与所述EDTA的重量比为50:73。
- [0019] 在本发明的一些具体实施方案中,上述抑制剂中,所述EDTA、所述 CaCl_2 与所述 MnCl_2 的重量比为146:55:100。
- [0020] 本发明还提供了上述抑制剂在提高乳清废水的蛋白渣产量中的应用。
- [0021] 本发明还提供了提取蛋白渣的方法,包括:取上述抑制剂与乳清废水混合,分离蛋白渣。
- [0022] 在本发明的一些具体实施方案中,上述方法中:
- [0023] 所述EDTA在所述抑制剂中的浓度为14.6g/L;和/或
- [0024] 所述 CaCl_2 在所述抑制剂中的浓度为5.5g/L;和/或
- [0025] 所述 MnCl_2 在所述抑制剂中的浓度为10g/L;和/或
- [0026] 所述抑制剂与所述乳清废水的体积比为2%。
- [0027] 本发明还提供了蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),其保藏编号为CGMCCNo.28513。
- [0028] 本发明还提供了上述蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)在分解蛋白中的应用。
- [0029] 本发明还提供了微生物菌剂,包括上述蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),以及可接受的辅料或助剂。
- [0030] 本发明的方法有如下效果:
- [0031] 1、实验表明废水气浮渣pH偏酸性,溶解氧含量较高,悬浮物含量较高,镜检发现气浮渣中含有非常多的长杆菌,蛋白渣产量较低可能与杆菌有关,经鉴定发现杆菌为蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*);
- [0032] 2、对废水中的蜡样芽孢杆菌进行实验,结果发现:1)蜡样芽孢杆菌随转速的提高呈现先降低后升高的趋势,在100rpm时蛋白酶活性越低;2)氟化钠和EDTA-2Na对蜡样芽孢杆菌蛋白酶活性抑制率达到50%以上;3) Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Zn^{2+} 、 Mn^{2+} 等金属离子对蜡样芽孢杆菌蛋白酶活有抑制作用,其中 Ca^{2+} 抑制率超过80%, Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 次之。

[0033] 3、利用EDTA、氯化钙和氯化锰制备复合抑制剂,往气浮渣中蛋白酶活性为3.53U/mL的废水中加入复合抑制剂后,蛋白酶活降为-0.64U/mL,蛋白酶抑制率超过100%,表明复合抑制剂能显著提高蛋白渣的产量。

[0034] 生物保藏说明

[0035] 生物材料:LBSW23-02,分类命名:蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),于2023年09月22日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,保藏中心地址为: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;保藏编号为CGMCC No.28513。

[0036] 本发明中所述LBSW23-02或GJFL-8即为上述保藏编号为CGMCC No.28513的菌株。

附图说明

[0037] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍。

[0038] 图1示气浮渣镜检菌落形态;

[0039] 图2示菌液蛋白酶活性检测;

[0040] 图3示菌落形态;

[0041] 图4示显微镜下菌株形态;

[0042] 图5示蜡样芽孢杆菌菌落数量检测。

具体实施方式

[0043] 本发明公开了蜡样芽孢杆菌、蛋白酶抑制剂以及提高蛋白渣产量的方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0044] 本发明提供了蜡样芽孢杆菌的抑制条件和抑制剂的制备方法:

[0045] 进一步的,所述抑制条件包括:所述蜡样芽孢杆菌含量低于1.0% (v/v)。

[0046] 进一步的,所述抑制条件包括:所述蜡样芽孢杆菌的转速不超过100rpm。

[0047] 进一步的,所述抑制条件包括:所述蜡样芽孢杆菌抑制剂为EDTA-2Na和氟化钠。

[0048] 更进一步的,所述抑制条件包括:所述蜡样芽孢杆菌抑制剂EDTA-2Na和氟化钠浓度为2mmol/L。

[0049] 进一步的,所述抑制条件包括:所述蜡样芽孢杆菌金属抑制剂为Ca²⁺、Fe³⁺和Mn²⁺。

[0050] 更进一步的,所述抑制条件包括:所述蜡样芽孢杆菌金属抑制剂的浓度为5mmol/L。

[0051] 进一步的,所述抑制剂制备方法包括:所述抑制剂由包括以下组分的原料制备而成:EDTA 14.6重量份,CaCl₂ 5.5重量份,MnCl₂ 10重量份。

[0052] 进一步的,所述抑制剂的应用包括:所述抑制剂的添加量为2‰。

[0053] 进一步的,所述的抑制剂的应用包括:乳清水中加入所述抑制剂蛋白酶活性为0U/mL。

[0054] 本发明所述的乳清废水包括采用“碱溶酸沉”工艺制备的大豆分离蛋白或大豆浓

缩蛋白生产过程中产生的废水。

[0055] 应该理解,表述“……中的一种或多种”单独地包括每个在所述表述后叙述的物体以及所述叙述的物体中的两者或更多者的各种不同组合,除非从上下文和用法中另有理解。与三个或更多个叙述的物体相结合的表述“和/或”应该被理解为具有相同的含义,除非从上下文另有理解。

[0056] 术语“包括”、“具有”或“含有”,包括其语法同义语的使用,通常应该被理解为开放性和非限制性的,例如不排除其他未叙述的要素或步骤,除非另有具体陈述或从上下文另有理解。

[0057] 应该理解,只要本发明仍可操作,步骤的顺序或执行某些行动的顺序并不重要。此外,两个或更多个步骤或行动可以同时进行。

[0058] 本文中的任何和所有实例或示例性语言如“例如”或“包括”的使用,仅仅打算更好地说明本发明,并且除非提出权利要求,否则不对本发明的范围构成限制。本说明书中的任何语言都不应解释为指示任何未要求保护的要素对于本发明的实践是必不可少的。

[0059] 此外,用以界定本发明的数值范围与参数皆是约略的数值,此处已尽可能精确地呈现具体实施例中的相关数值。然而,任何数值本质上不可避免地含有因个别测试方法所致的标准偏差。因此,除非另有明确的说明,应当理解本公开所用的所有范围、数量、数值与百分比均经过“约”的修饰。在此处,“约”通常是指实际数值在一特定数值或范围的正负10%、5%、1%或0.5%之内。

[0060] 如无特殊说明,本发明涉及的原料、试剂、耗材以及仪器皆为普通市售品,均可由市场购得。

[0061] 下面结合实施例,进一步阐述本发明:

[0062] 实施例1:乳清废水气浮渣指标检测

[0063] 对取回的气浮渣进行指标检测,利用溶氧仪(哈希)检测溶氧,pH计检测pH,悬浮物参照GB11901-1989悬浮物的测定。

[0064] 微生物样本制片步骤如下:1)涂片取洁净的载玻片1张,将其在火焰上微微加热,除去上面的油脂,冷却,在中央部位滴加一滴无菌水,用接种环在火焰旁从培养基上挑取少量菌体与水混合。用接种环将菌体涂成直径约1cm的均匀薄层;2)干燥放在桌面上,待其自然干燥;3)固定将已干燥的涂片标本向上,在火焰上通过3~4次固定;4)染色在涂片上滴加0.1%的吕氏碱性美蓝染液1~2滴,使其布满涂菌部分,染色1分钟;5)冲洗斜置玻片,倾去染液。用水轻轻冲去染液,至流水变清;6)吸干用吸水纸轻轻吸去玻片上的水分,干燥后镜检。

[0065] 通过表1和图1可以看出气浮渣pH偏酸性,溶解氧含量较高,悬浮物含量较高,镜检发现气浮渣中含有非常多的长杆菌,产量较低可能与这些杆菌有关。

[0066] 表1:气浮渣指标检测

名称	pH	溶解氧(mg/L)	悬浮物(mg/L)	游离氨基酸(g/L)	粗蛋白(%)
气浮渣1	3.42	0.56	26050	3.75	3.26

[0068] 取气浮渣200mL放入500mL三角瓶中,37°C150rpm震荡培养24小时,取样检测游离氨基酸含量和粗蛋白含量,游离氨基酸检测方法参照GB/T8314-2013茶游离氨基酸总量的测定;粗蛋白检测参照GB/T 6432-2018饲料中粗蛋白的测定凯氏定氮法。结果如表2所示气

浮渣经过24小时培养后,pH升高,溶解氧降低,悬浮物减少,游离氨基酸增加,表明杆菌实现增长,并产生分解蛋白质的蛋白酶,导致悬浮物减少,游离氨基酸增加。

[0069] 表2:气浮渣培养后指标检测

名称	pH	溶解氧(mg/L)	悬浮物(mg/L)	游离氨基酸(g/L)	粗蛋白(%)
气浮渣2	4.25	0.20	24960	5.76	3.17

[0071] 实施例2:芽孢杆菌筛选

[0072] 在山东省滨州市博兴县某污水处理厂中,乳清废水经过“气浮+板框”工艺将乳清废水中的蛋白渣提取出来,但是每年夏天尤其是6~8月,蛋白渣产量较低,经过研究发现气浮渣较粘,叠螺效率较差,因此本发明人挑选较粘气浮渣样品,显微镜镜检发现里面含有非常多的杆状芽孢杆菌,因此分离样品中的菌落,步骤如下:取10g较粘气浮渣加入到90mL带玻璃珠的无菌水中,摇床中震荡30min,继续在超净工作台梯度稀释至 10^{-5} ,取100微升涂布在LB平板上,37°C恒温培养箱中培养24小时,在超净工作台中挑取形态大小不同的单克隆到15mL新鲜的LB液体培养基中,35°C恒温培养箱中培养24小时,每株菌保藏甘油管3管,剩余菌液备用。

[0073] 杆菌功能初筛:对获得菌液进行涂片观察,在显微镜下挑选出形状为杆菌的菌液进行后续操作,对杆菌进行蛋白酶活性检测-福林酚法,检测步骤如下:1) 对照组和实验组分别取菌液1mL放入40°C预热2分钟;2) 对照组加三氯乙酸2mL,实验组加酪素溶液1mL,摇匀,40°C保温10分钟;3) 对照组加酪素溶液1mL,实验组加三氯乙酸2mL,摇匀,40°C保温10分钟,过滤;4) 分别取滤液1mL,加入碳酸钠溶液5mL,后加入福林酚使用液1mL,置于40°C水浴中显色20min;5) 用分光光度计于波长680nm处测吸光度,从标准曲线上查找氨基酸含量;以水代替发酵液进行4)、5)的操作作为参比液。

[0074] 通过镜检和蛋白酶活性检测,共分离菌5株,其中编号GJFL-8蛋白酶活性最高(如表3、图2所示)。将所筛得GJFL-8菌株于LB平板划线,37°C恒温培养箱中培养24h,可形成圆形或椭圆形的白色光滑不透明菌落,菌落形态如图3所示,显微镜下菌体为直杆状,成对或链状排列,革兰氏阳性菌,形态如图4所示,后送华大基因(湖北,武汉)测序。经过BLAST比对,结果显示其与*Bacillus cereus*、*Bacillus pacificus*和*Bacillus sp.*同源,后对其进行生理生化指标检测:该菌能使淀粉水解,甲基红实验、硝酸盐还原实验、运动性实验、V-P实验、明胶液化实验和过氧化氢酶实验均呈阳性;能够利用葡萄糖、蔗糖、果糖、甘露糖、麦芽糖,但不能利用阿拉伯糖、L-鼠李糖、木糖、乳糖、木糖醇、山梨醇和D-甘露醇,经鉴定该菌株属于蜡样芽孢杆菌(*Bacillus cereus*),将其命名为LBSW23-02。

[0075] 表3

名称	蛋白酶活性(U/mL)
GJFL-5	1.04
GJFL-8	6.99
LB-3	0.71
LB-4	0.73
LB-5	3.70

[0077] 实施例3:微生物菌剂制备

[0078] LB培养基配方为:氯化钠1%,酵母粉0.5%,蛋白胨1%,蒸馏水定容,pH 6.8~

7.0,121℃灭菌21min。

[0079] 菌种活化:在超净工作台,挑取斜面菌种LBSW23-02至200mL LB液体培养基中,置于37℃震荡摇床中150rpm培养24h;发酵结束后检测菌落数量,检测方法参照GB 4789.2食品微生物学检验菌落数量检测。如图5所示,经过检测蜡样芽孢杆菌LBSW23-02发酵24小时菌落数量为 1.27×10^8 CFU/mL。

[0080] 实施例4:蜡样芽孢杆菌抑制条件优化

[0081] 4.1接种量对蜡样芽孢杆菌的影响

[0082] 取5个250mL锥形瓶分别加入乳清废水100mL,99mL,98mL,97mL,96mL对应加入培养24小时的实施例3的活化菌种LBSW23-02 0mL,1mL,2mL,3mL,4mL,使接种量分别为0%,1%,2%,3%,4%,以封口膜封口,放入37℃震荡摇床中150rpm培养48小时,培养结束后参照实施例2的步骤检测蛋白酶活性。

[0083] 经过检测,结果如表4所示,随着接种量的提高蛋白酶活性越来越高,所以要抑制蜡样芽孢杆菌LBSW23-02的生长,溶液中蜡样芽孢杆菌的数量应少于 1.27×10^6 CFU/mL,接种量少于1%。

[0084] 表4:接种量对蜡样芽孢杆菌的影响

接种量	指标	氨基酸 (mg/L)	蛋白酶活 (U/mL)
	0%		0.98
1.0%		1.06	1.73
2.0%		1.17	2.38
3.0%		1.83	3.03
4%		1.91	1.67

[0086] 4.2转速对蜡样芽孢杆菌的影响

[0087] 取250mL三角瓶10个,分成2组,对照组和实验组,对照组不接菌,实验组接种1%的实施例3的蜡样芽孢杆菌LBSW23-02,总体积为100mL,转速分别设置为静止(0rpm),50rpm,100rpm,150rpm和200rpm;每个转速里面含有实验组和对照组,培养温度为37℃,时间24小时。培养完成检测发酵液中的氨基酸含量和蛋白酶活性,氨基酸含量检测参照GB/T 8314-2013茶游离氨基酸总量的测定。

[0088] 结果如表5所示,蜡样芽孢杆菌随转速的提高呈现先降低后升高的趋势,在100rpm时蛋白酶活性越低,因此蜡样芽孢杆菌的抑制条件为转速控制在100rpm。

[0089] 表5:转速对蜡样芽孢杆菌的影响

转速 (rpm)	指标	空白对照		试验组	
		氨基酸 (mg/mL)	蛋白酶活 (U/mL)	氨基酸 (mg/mL)	蛋白酶活 (U/mL)
0		1.19	-0.6	1.31	0.81
50		1.22	0	1.46	1.78
100		1.25	0.34	0.82	1.66
150		1.12	0.58	1.30	2.53
200		1.73	0.78	2.68	3.08

[0091] 实施例5:蜡样芽孢杆菌蛋白酶抑制剂筛选

[0092] 5.1氨基酸残基抑制剂对蜡样芽孢杆菌蛋白酶活性的影响

[0093] 将EDTA-2Na、焦磷酸钠、甘油磷酸钠和氟化钠等试剂溶于蒸馏水中,配置成2mmol/

L的溶液,而苯甲基磺酰氟(PMSF)用无水乙醇溶解,同样配成2mmol/L的溶液。用抑制剂处理蜡样芽孢杆菌蛋白酶,观察抑制剂对蛋白酶活性的影响,处理步骤如下:取0.1mL抑制剂与0.9mL实施例3的LBSW23-02发酵液混合,4°C保温30分钟后,取出测定蛋白酶活性。以用蒸馏水代替抑制剂且在4°C保温30分钟后的酶液作为空白对照,蛋白酶活性抑制率计算公式为:

[0094] 抑制率(%) = (空白-处理)*100/空白。

[0095] 结果如表6所示,氟化钠和EDTA-2Na对蜡样芽孢杆菌蛋白酶活性抑制最强烈达到50%以上,而苯甲基磺酰氟(PMSF)对蛋白酶抑制效果较差。

[0096] 表6:蛋白酶抑制剂筛选

名称	指标	蛋白酶活(U/mL)	抑制率(%)
空白对照		17.28	/
EDTA-2Na		8.26	52.21
焦磷酸钠		8.94	48.27
甘油磷酸钠		10.69	38.12
氟化钠		7.58	56.13
苯甲基磺酰氟		14.12	18.25

[0098] 5.2金属离子对蜡样芽孢杆菌蛋白酶活性的影响

[0099] 称取适量试剂,用蒸馏水将氯化钠、氯化钾、氯化钙、硫酸锌、硫酸铜、硫酸镁,硫酸亚铁、硫酸铁、硫酸锰、氯化镍、氯化钴等配制成5mmol/L的溶液,备用。同样用金属离子处理蜡样芽孢杆菌蛋白酶,观察金属离子对蛋白酶活性的影响,处理步骤如下:取0.1mL 5mmol/L金属离子溶液与0.9mL实施例3的LBSW23-02发酵液混合,4°C保温30分钟后,取出测定蛋白酶活性。用蒸馏水代替金属离子进行相同实验作为空白对照,计算蛋白酶活性抑制率。

[0100] 结果如表7所示, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} 等金属离子对蜡样芽孢杆菌蛋白酶活有抑制作用,其中 Ca^{2+} 抑制率超过80%, Fe^{3+} , Mn^{2+} 次之。

[0101] 表7:金属离子对蛋白酶活性的影响

名称	指标	蛋白酶活(U/mL)	抑制率(%)
空白对照(阴)		7.94	/
K^{+}		10.52	-32.49
Ca^{2+}		1.58	80.10
Na^{+}		8.45	-6.42
Mg^{2+}		7.40	6.80
Cu^{2+}		9.08	-14.36
Fe^{2+}		6.98	23.13
Fe^{3+}		5.42	31.74
Zn^{2+}		6.72	15.37
Mn^{2+}		5.62	29.22
Ni^{2+}		9.19	-15.74
Co^{2+}		10.81	-36.15

[0103] 实施例6:复合抑制剂在提高乳清废水的蛋白渣产量中的应用

[0104] 利用EDTA、氯化钙和氯化锰制备复合抑制剂,分别称取EDTA 14.6g,氯化钙5.5g,氯化锰10g,温度80°C,溶于热水中定容至1000mL,用同样的方法配制5.5g/L氯化钙、10g/L氯化锰、14.6g/L EDTA、5.5g/L氯化钙+14.6g/L EDTA、10g/L氯化锰+14.6g/L EDTA,分别应用于乳清废水蛋白渣提取中,添加量为2% (v/v),空白对照添加相同量的蒸馏水,混合均

匀,放入37°C摇床,150rpm震荡30分钟后,取样5mL检测气浮渣中蛋白酶活性,剩余样品继续放在摇床上培养24小时,发酵结束后检测悬浮物含量,蛋白提高率计算公式为:

$$[0105] \quad W(\%) = (C_{\text{实验}} - C_{\text{空白}}) * 100 / C_{\text{空白}}$$

[0106] $C_{\text{实验}}$ 实验组悬浮物含量;

[0107] $C_{\text{空白}}$ 空白对照悬浮物含量;

[0108] 悬浮物检测参照GB 11901-89水质悬浮物的测定重量法。

[0109] 检测结果如表8所示,气浮渣中蛋白酶活性为3.53U/mL,加入复合抑制剂后蛋白酶活为-0.64U/mL,蛋白酶抑制率超过100%,提高蛋白渣的产量10%以上。

[0110] 表8:复合抑制剂对气浮渣蛋白酶活性的影响

名称	指标	蛋白酶活 (U/mL)	抑制率 (%)	蛋白渣提高率 (%)
空白对照		3.53	/	/
5.5 g/L氯化钙		1.37	61.19	4.71
10 g/L氯化锰		2.31	34.56	0.74
14.6 g/L EDTA		1.42	59.77	2.52
5.5 g/L氯化钙+14.6 g/L EDTA		1.87	47.03	1.02
10 g/L氯化锰+14.6 g/L EDTA		0.84	76.20	6.46
复合抑制剂		-0.64	100	11.40

[0112] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

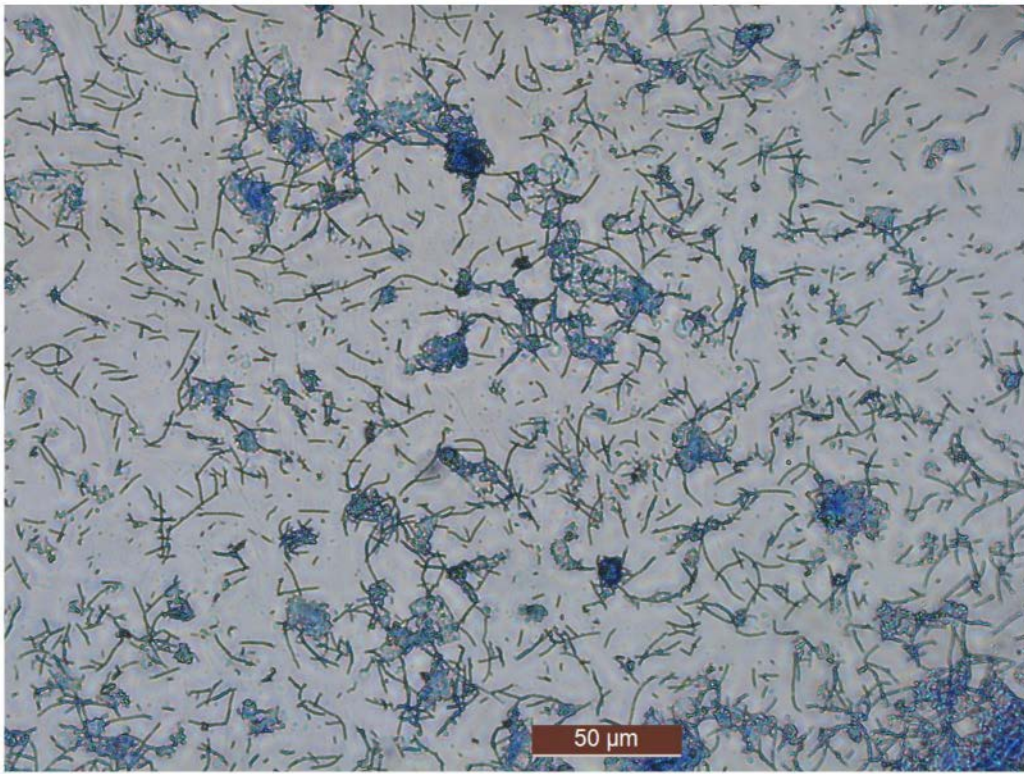


图1

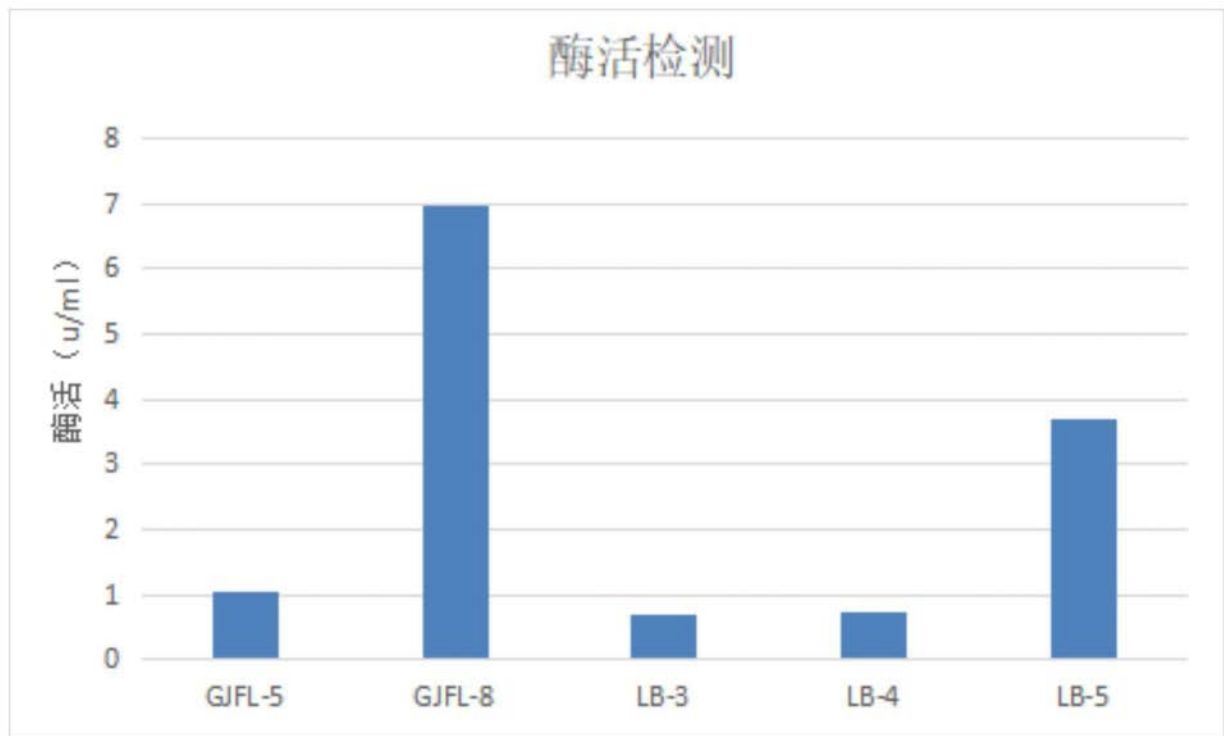


图2

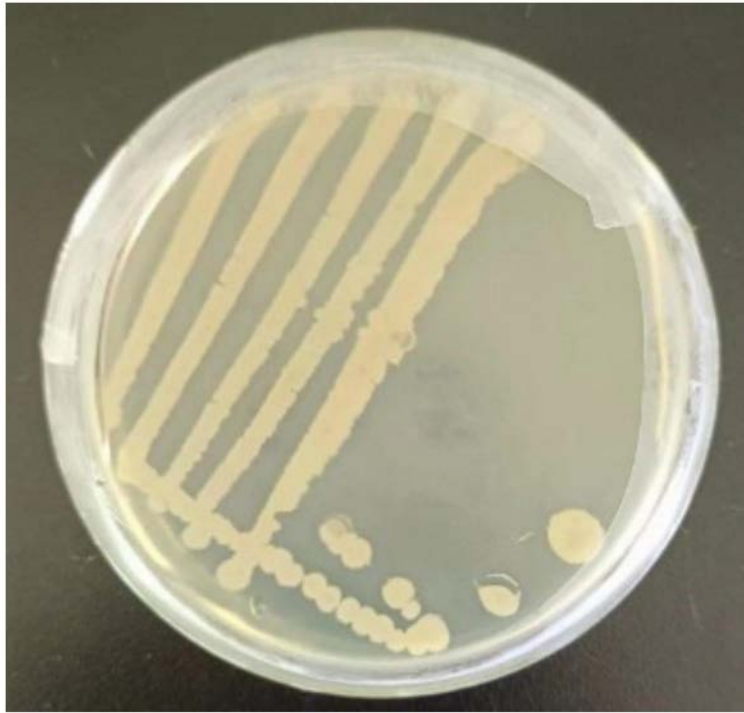


图3

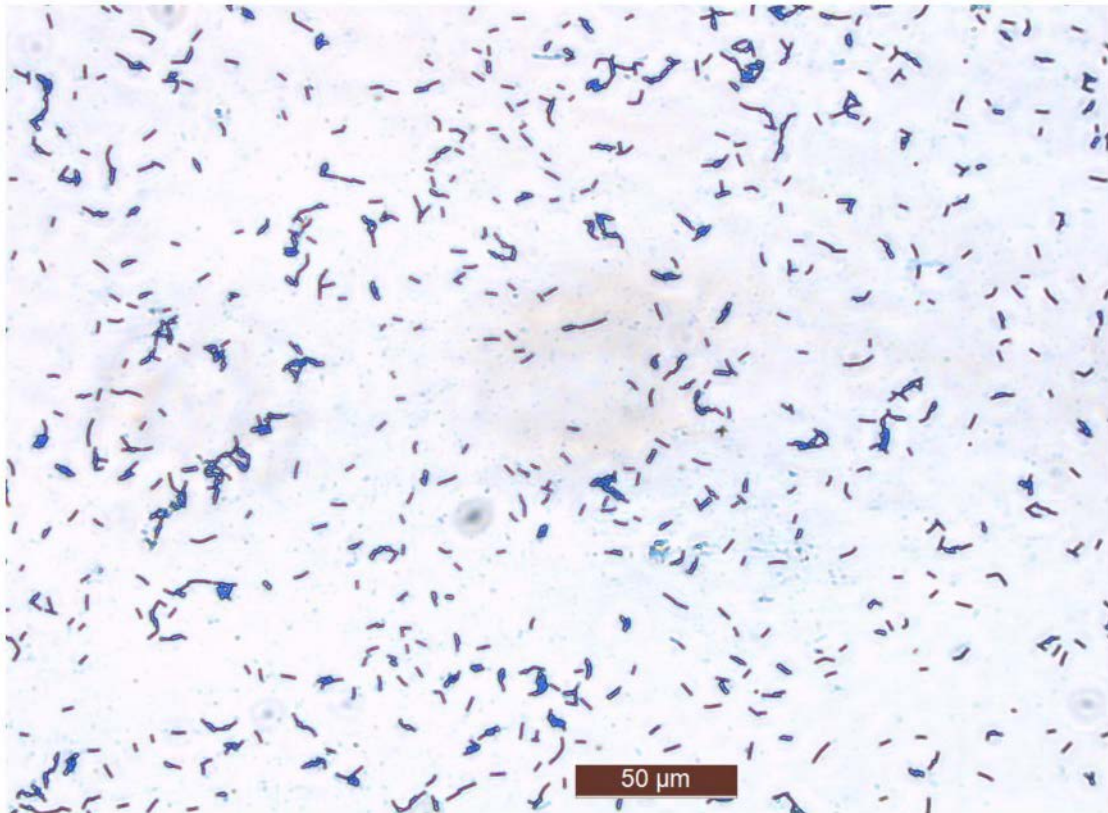


图4



图5