



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104212859 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 17

(21) 申请号 201410533095. 3

(22) 申请日 2014. 10. 11

(71) 申请人 郑州新威营养技术有限公司

地址 450100 河南省郑州市荥阳市建设东路

(72) 发明人 张新武 张子峰

(74) 专利代理机构 郑州联科专利事务所(普通合伙) 41104

代理人 时立新

(51) Int. Cl.

C12P 21/00(2006. 01)

C12R 1/69(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页

(54) 发明名称

一种发酵法制备小麦水解蛋白的生产方法

(57) 摘要

本发明公开了一种发酵法制备小麦水解蛋白的生产方法,属饲料添加剂生产技术领域。该方法以小麦面筋蛋白粉为原料,通过枯草芽孢杆菌和米曲霉混合发酵所产内切蛋白酶、羧肽酶等蛋白类酶制剂的作用,将小麦面筋蛋白水解成短肽链,并将短肽链末端的疏水性氨基酸切除,从而实现小麦水解蛋白酶解和脱苦一步完成的发酵法生产。与传统酶解方法相比:生产成本低,反应条件温和,工艺技术参数可靠,产品质量稳定,没有苦味,产品风味、色泽等各项指标均优于酶法水解。产品分子量小,溶解性好,谷氨酰胺含量高,可以替代血浆蛋白,添加应用后对提高断奶幼仔动物消化率,解决应激和腹泻优势明显。

1. 一种发酵法制备小麦水解蛋白的生产方法,其特征在于,由以下步骤实现:

(1) 将活化后的米曲霉菌株(*Aspergillus*)转接到液体种子培养基中,于 33°C,200r/min 振荡培养 36h,待生成均一小菌丝球时用于发酵;同时将活化后的枯草芽孢杆菌菌株(*Bacillus subtilis*)接种于种子培养基中,37°C,120r/min 振荡培养 23-24h,使菌体浓度达到 10^6 - 10^8 CFU/mL 备用;(2) 称取小麦面筋蛋白粉,在发酵罐中加水配置成重量百分比浓度为 5%-10%,加入相对于小麦面筋蛋白质量 0.2% 的生长营养包,调整 pH 为 5.5-7.5,然后灭菌降温至 33-37°C,接入上述枯草芽孢杆菌和米曲霉液体菌种,菌种重量比为:枯草芽孢杆菌:米曲霉=2-5:1,接种总量为体系体积的 5-9%;(3) 控制发酵罐发酵转速为 50-180rpm,发酵温度 33-40°C,发酵时间 24-40h;(4) 发酵结束后对发酵液进行蒸发浓缩,然后喷雾干燥制成粉末状小麦水解蛋白产品;

所述的生长营养包由葡萄糖、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾组成,其重量比为 100:1-3:0.5-2:0.1-1。

一种发酵法制备小麦水解蛋白的生产方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物蛋白的综合开发应用领域,特别涉及一种发酵法制备小麦水解蛋白的生产方法,属饲料添加剂生产技术领域。

背景技术

[0002] 小麦面筋蛋白的蛋白质分子量较大,含有较多的疏水性氨基酸和不带电荷的氨基酸,分子内疏水作用区域较大,溶解度低,遇水后易形成面筋状物质,黏度大,在诸多行业的应用效果不理想或是应用范围受到一定限制。小麦水解蛋白作为一种优质的无抗原植物性蛋白源,广泛应用于乳仔猪料、高档水产料、犊牛代奶粉及宠物饲料中。小麦水解蛋白的生产方法主要有化学水解法、酶水解法和微生物发酵法。酸碱水解法产品质量不稳定,水解产生的氨基酸易发生破坏,容易造成营养成分损失;酶水解法是目前小麦水解蛋白生产的主要方法,其不足之处是用于谷朊粉水解的酶,价格相对较高,同时酶解产物在很大程度上都存在着苦味问题,影响产品的口感风味和推广应用;微生物发酵法是通过微生物代谢活动产生的酶类将谷朊粉分解,分解较为彻底,富含营养高的小分子肽。微生物发酵法不仅成本低,可以节省大量昂贵的酶制剂,而且产品风味好。国内外对小麦水解蛋白的制备研究,目前主要集中在利用纯酶制剂进行直接酶解,由于商品酶制剂成本高昂,直接酶解法生产小麦水解蛋白代价巨大,限制了工业化生产与应用,特别限制了产品在某些行业的推广应用。因此,基于间接酶解法的微生物发酵制备多肽的工艺,已日益受到研究人员的关注。

[0003] 微生物是各种酶制剂的重要来源。如果能筛选到一些能直接利用谷朊粉中的蛋白质产小麦肽的微生物菌株,利用微生物的代谢功能产生蛋白酶,将酶解和脱苦这两个步骤有机结合在一起,通过合适的发酵工艺,大批量低成本的生产制备小麦肽,将具有很好的应用价值。目前未见报道。

发明内容

[0004] 为满足市场需求,本发明目的在于提供一种采用液体发酵法制备小麦水解蛋白的新方法,将酶解和脱苦这两个步骤有机结合在一起,从而降低小麦水解蛋白的生产成本,实现工业化生产。

[0005] 为实现本发明目的,本发明根据小麦谷朊粉的特性和动物营养学的特点,依据微生物发酵工程原理与理论,利用微生物发酵所产内切蛋白酶、羧肽酶等蛋白类酶制剂的作用将小麦面筋蛋白水解成短肽链,并将短肽链末端的疏水性氨基酸切除,实现酶解和脱苦一步完成小麦水解蛋白发酵法生产工艺。

[0006] 具体技术方案如下:

1) 将活化后的米曲霉菌(*Aspergillus*) 株经传代培养后,转接到液体种子培养基中,于 33°C, 200r/min 振荡培养 36h,待生成均一小菌丝球时用于发酵;同时将活化后的枯草芽孢杆菌菌株(*Bacillus subtilis*) 接种于种子培养基中,37°C, 120r/min 振荡培养 23-24h,使菌体浓度达到 10^6 - 10^8 CFU/mL 备用;

2) 称取小麦面筋蛋白粉,在发酵罐中加水配置成重量百分比浓度为 5%-10%,加入相对于小麦面筋蛋白质量 0.2% 的生长营养包,调整 pH 为 5.5-7.5,然后灭菌降温至 33-37℃,接入上述枯草芽孢杆菌和米曲霉液体菌种,菌种重量比为:枯草芽孢杆菌:米曲霉=2-5:1,接种总量为体系体积的 5-9%;

3) 控制发酵罐发酵转速为 50-180rpm,发酵温度 33-40℃,发酵时间 24-40h;

4) 发酵结束后对发酵液进行蒸发浓缩,然后喷雾干燥制成粉末状小麦水解蛋白产品。

[0007] 所述的营养包由葡萄糖、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾组成,其重量比为 100:1-3:0.5-2:0.1-1。

[0008] 本发明利用微生物发酵所产内切蛋白酶、羧肽酶等蛋白类酶制剂的作用将小麦面筋蛋白水解成短肽链,并将短肽链末端的疏水性氨基酸切除,实现酶解和脱苦一步完成的小麦水解蛋白发酵法生产工艺。该工艺生产的产品是以农副产品为原料进行的深加工转化产品,附加值大,社会经济效益显著。该生产工艺综合生产能力强,转化率高,达到 80% 以上。与传统酶解方法相比:生产稳定,产品没有苦味,苦味值介于 0 和 1 之间,产品风味、色泽优于酶法水解,各项性能指标均优于酶法水解。产品分子量小,溶解性好,谷氨酰胺含量高,可以替代血浆蛋白,添加应用后对提高断奶幼仔动物消化率,解决应激和腹泻优势明显。实验结果如表 1 和表 2:

表:1 小麦水解蛋白酶解法与本发明发酵法结果对比

指标	酶解法	发酵法
水解度 (%)	12	21
苦味值	4	0-1 之间
产品风味	无异味、明显苦味	风味纯正、无异味、无苦味
水分 (%)	6	5.5
结合态谷氨酰胺含量 (%)	28.3	30.14
氮可溶指数 (%)	78	95
转化率 (%)	65	80

苦味鉴定:按 Adier-Nissen 的方法以不同浓度的盐酸奎宁溶液作为标准对小麦水解蛋白液进行评分,蒸馏水为 0 分。

[0009] 表 2 本发明生产的小麦水解蛋白与酶解法产品肽分子量分布对比

分子量范围	本发明发酵法 峰面积百分比 (% , λ 220nm)	酶解法 峰面积百分比 (% , λ 220nm)	小麦面筋蛋白 峰面积百分比 (% , λ 220nm)
5000—3000	6.44	7.78	7.61
3000—2000	3.747	4.03	3.82
2000—1000	15.61	10.22	4.39
1000—500	25.51	17.92	2.89
50—130	36.87	33.03	5.28

注：以上数据为样品可溶性部分检测所得分子量结果

本发明创新点在于：结合小麦面筋蛋白的特性和动物营养学特点，利用微生物发酵所产内切蛋白酶、羧肽酶等蛋白类酶制剂的作用将小麦面筋蛋白水解成短肽链，并将短肽链末端的疏水性氨基酸切除，实现酶解和脱苦一步完成的小麦水解蛋白发酵法生产工艺。经过连续的中试试验和规模生产验证，实现了工业化生产。产品分子量小，溶解性好，谷氨酰胺含量高，可以替代血浆蛋白，添加应用后对提高断奶幼仔动物消化率，解决应激和腹泻优势明显，经济社会效益显著，市场前景广阔。

[0010] 本发明生产的小麦水解蛋白产品与酶解法相比具有如下特点：(1) 利用筛选出的枯草芽孢杆菌和米曲霉常用安全生产菌株混合发酵小麦面筋蛋白制备小麦水解蛋白，生产工艺先进，解决了直接酶解法生产小麦水解蛋白代价大，成本高等问题；(2) 利用微生物的代谢功能产生蛋白酶并酶解小麦水解蛋白，将酶解和脱苦这两个步骤有机结合在一起，解决了酶解法产品苦味大，风味差问题；(3) 产品分子量小，溶解性好，谷氨酰胺含量高。

具体实施方式

[0011] 下面的实施例对本发明作进一步的说明。

[0012] 实施例 1

将活化后的米曲霉菌株(*Aspergillus*) 转接到液体种子培养基中，于 33℃，200r/min 振荡培养 36h，待生成均一小菌丝球时用于发酵；同时将活化后的枯草芽孢杆菌菌株(*Bacillus subtilis*) 接种于种子培养基中，37℃，120r/min 振荡培养 24h 左右，使菌体浓度达到 10^6 - 10^8 CFU/mL 备用。称取小麦面筋蛋白粉，在发酵罐中加入小麦面筋蛋白粉和水配置成重量百分比浓度为 6%，加入相对于小麦面筋蛋白质量 0.2% 的生长营养包，控制营养包中葡萄糖、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾的重量比例为 100:1:1:0.5，调整 pH 为 6.0，然后灭菌降温至 33℃，接入上述培养成熟的枯草芽孢杆菌和米曲霉液体菌种，菌种重量比例为：枯草芽孢杆菌：米曲霉 =2:1，接种量为体系体积的 5%；控制发酵罐发酵转速为 80rpm，发酵温度 33℃，发酵时间 38h；发酵结束后对发酵液进行蒸发浓缩，然后喷雾干燥制成粉末状小麦水解蛋白产品。

[0013] 实施例 2

将活化后的米曲霉菌株(*Aspergillus*) 转接到液体种子培养基中，于 33℃，200r/min 振荡培养 36h，待生成均一小菌丝球时用于发酵；同时将活化后的枯草芽孢杆菌菌株(*Bacillus subtilis*) 接种于种子培养基中，37℃，120r/min 振荡培养 24h 左右，使菌体浓度达到 10^6 - 10^8 CFU/mL 备用。称取小麦面筋蛋白粉，在发酵罐中加入小麦面筋蛋白粉和水配置成重量百分比浓度为 7%，加入相对于小麦面筋蛋白质量 0.2% 的生长营养包，控制营养包中葡萄糖、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾的重量比例为 100:1.5:1.5:0.6，调整 pH 为 6.5，然后灭菌降温至 34℃，接入上述培养成熟的枯草芽孢杆菌和米曲霉液体菌种，菌种重量比例为：枯草芽孢杆菌：米曲霉 =3:1，接种量为体系体积的 6%；控制发酵罐发酵转速为 120rpm，发酵温度 34℃，发酵时间 40h；发酵结束后对发酵液进行蒸发浓缩，然后喷雾干燥制成粉末状小麦水解蛋白产品。

[0014] 实施例 3

将活化后的米曲霉菌株(*Aspergillus*) 转接到液体种子培养基中，于 33℃，200r/

min 振荡培养 36h,待生成均一小菌丝球时用于发酵;同时将活化后的枯草芽孢杆菌菌株 (*Bacillus subtilis*) 接种于种子培养基中,37°C,120r/min 振荡培养 24h 左右,使菌体浓度达到 10^6 - 10^8 CFU/mL 备用。称取小麦面筋蛋白粉,在发酵罐中加入小麦面筋蛋白粉和水配置成重量百分比浓度为 8%,加入相对于小麦面筋蛋白质量 0.2% 的生长营养包,控制营养包中葡萄糖、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾的重量比例为 100:2:1:0.3,调整 pH 为 7.0,然后灭菌降温至 35°C,接入上述培养成熟的枯草芽孢杆菌和米曲霉液体菌种,菌种重量比例为:枯草芽孢杆菌:米曲霉=5:1,接种量为体系体积的 7%;控制发酵罐发酵转速为 160rpm,发酵温度 35°C,发酵时间 38h;发酵结束后对发酵液进行蒸发浓缩,然后喷雾干燥制成粉末状小麦水解蛋白产品。

[0015] 实施例 4

将活化后的米曲霉菌株 (*Aspergillus*) 转接到液体种子培养基中,于 33°C,200r/min 振荡培养 36h,待生成均一小菌丝球时可用于发酵;同时将活化后的枯草芽孢杆菌菌株 (*Bacillus subtilis*) 接种于种子培养基中,37°C,120r/min 振荡培养 24h 左右,使菌体浓度达到 10^6 - 10^8 CFU/mL 备用。称取小麦面筋蛋白粉,在发酵罐中加入小麦面筋蛋白粉和水配置成重量百分比浓度为 10%,加入相对于小麦面筋蛋白的质量 0.2% 生长营养包,控制营养包中葡萄糖、氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾的重量比例为 100:3:2:1,调整 pH 为 5.6,然后灭菌降温至 33°C,接入上述培养成熟的枯草芽孢杆菌和米曲霉液体菌种,菌种重量比例为:枯草芽孢杆菌:米曲霉=4:1,接种量为体系体积的 8%;控制发酵罐发酵转速为 50rpm,发酵温度 33°C,发酵时间 40h;发酵结束后对发酵液进行蒸发浓缩,然后喷雾干燥制成粉末状小麦水解蛋白产品。