

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2015年7月30日 (30.07.2015)



(10) 国际公布号
WO 2015/109766 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 1/20 (2006.01) A23C 19/032 (2006.01)
C12N 9/64 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/081446
- (22) 国际申请日: 2014年7月2日 (02.07.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410040762.4 2014年1月27日 (27.01.2014) CN
- (71) 申请人: 光明乳业股份有限公司 (BRIGHT DAIRY & FOOD CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市闵行区吴中路 578 号, Shanghai 201103 (CN)。
- (72) 发明人: 杭锋 (HANG, Feng); 中国上海市闵行区吴中路 578 号, Shanghai 201103 (CN)。 郭本恒 (GUO, Benheng); 中国上海市闵行区吴中路 578 号, Shanghai 201103 (CN)。 刘振民 (LIU, Zhenmin); 中国上海市闵行区吴中路 578 号, Shanghai 201103 (CN)。 陈卫 (CHEN, Wei); 中国上海市闵行区吴中路 578 号, Shanghai 201103 (CN)。 王钦博 (WANG, Qinbo); 中国上海市闵行区吴中路 578 号, Shanghai 201103 (CN)。 宋馨 (SONG, Xin); 中国上海市闵行区吴中路 578 号, Shanghai 201103 (CN)。 吴正钧 (WU, Zhengjun); 中国上海市闵行区吴中路 578 号, Shanghai 201103 (CN)。 张灏 (ZHANG, Hao); 中国上海市闵行区吴中路 578 号, Shanghai 201103 (CN)。 朱军伟 (ZHU, Junwei); 中国上海市闵行区吴中路 578 号, Shanghai 201103 (CN)。
- (74) 代理人: 上海弼兴律师事务所 (SHANGHAI BE-SHINING LAW OFFICE); 中国上海市小木桥路 681 号外经大厦 21 楼, Shanghai 200032 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))
- 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。
- 包括按细则 13 之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则 13 之二.4(d)(i)和 48.2(a)(viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: METHOD FOR PREPARING FERMENTATION BROTH EXTRACTS HAVING CHYMOSIN ACTIVITY AND PRODUCTS THEREOF

(54) 发明名称: 具有凝乳酶活性的发酵液提取物的制备方法及其产物

(57) Abstract: Provide in the present invention is a method for preparing fermentation broth extracts having chymosin activity, comprising the steps of: obtaining the fermentation broth by culturing Paenibacillus CGMCC No.8333 using a wheat bran culture medium, and obtaining the extracts by taking the supernatant after centrifuging the resulting fermentation broth. Using these fermentation broth extracts, liquid milk can curdle in a short time, and non-specific hydrolysis of casein is low.

(57) 摘要: 本发明提供一种具有凝乳酶活性的发酵液提取物的制备方法, 包括以下步骤: 利用小麦麸皮培养基培养类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 得到发酵液, 将所得发酵液离心后取上清液即得。利用该发酵液提取物可使液态奶在短时间内发生凝乳, 而且对酪蛋白的非特异水解低。



WO 2015/109766 A1

具有凝乳酶活性的发酵液提取物的制备方法及其产物

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种具有凝乳酶活性的发酵液提取物的制备方法及其产物和应用。

背景技术

凝乳是生产原制干酪的关键步骤，凝乳酶在此过程中发挥至关重要的作用，并直接关系到干酪的品质和得率。传统干酪加工中所使用的凝乳酶（rennet）来源于未断奶小牛的第四胃（皱胃），主要由凝乳酶（chymosin）和胃蛋白酶（pepsin）组成。商业化的小牛皱胃凝乳酶其凝乳酶所占比重在 50~95%。凝乳酶介导凝乳反应涉及两个步骤：（1）酶解酪蛋白：凝乳酶（Chymosin, E.C. 3.4.23.4）对 κ -CN 具有高度特异性，主要水解 κ -CN 中的 Phe₁₀₅-Met₁₀₆ 的肽键，生成由 106-109 残基氨基酸组成的 κ -酪蛋白巨肽（ κ -casein macropeptide）和由 1-105 残基氨基酸组成的副 κ -酪蛋白（para- κ -casein），凝乳酶也能够水解 α _{s1}-CN、 α _{s2}-CN、 β -CN；（2）当足够的 κ -CN 被水解时，副 κ -酪蛋白发生聚集形成三维网状凝胶，Ca²⁺促发酪蛋白胶束聚集，进而引起酪蛋白胶束失稳并形成干酪凝块。

早在 50 多年前，干酪加工中使用的凝乳酶的需求已超过其产量。与此同时，自 1961 年以来，世界干酪产量大约增加了 3.5 倍，小牛皱胃凝乳酶供应量却呈下降趋势。目前，世界小牛皱胃凝乳酶仅能满足世界干酪产量所需凝乳酶的 20~30%。小牛皱胃凝乳酶的供需矛盾和价格高昂、宗教（伊斯兰教和犹太教）、饮食（素食主义）以及食品法规等因素，使得寻求其替代物成为乳品领域科学研究的热点之一。寻求小牛皱胃凝乳酶替代物的研究主要在动物、植物、基因重组以及微生物四个方面开展。动物和植物来源的凝乳酶主要用于特定种类的干酪，其来源和产量同样受到限制；利用基因重组技术制备的凝乳酶具有成分单一等优点，但是，一些国家如法国、德国和荷兰禁止使用重组凝乳酶。

微生物能够产生许多种酶类，其中绝大部分分泌量很小并涉及细胞代谢过程，胞外酶能够消化不溶的纤维素、淀粉和蛋白质大分子物质，并转移至胞内作为细胞生长的营养物质。许多微生物，尤其是霉菌和细菌来源的胞外蛋白酶具有凝乳酶相似的性质。与植物和动物来源凝乳酶（MCEs）相比较，微生物来源的凝乳酶（MCEs）具有生产成本低、具有更加广泛的生化多样性以及基因改造方法简便等优点。微生物来源凝乳酶可分为两类：（a）来源于曲霉（*Aspergillus* spp.）和根霉菌（*Rhizopus* spp.）的类胃蛋白酶（pepsin-like）；（b）来源于毛霉菌（*Mucor* spp.）、根霉菌（*Rhizomucor* spp.）和板栗疫病

菌(*Endothia parasitica*)的类凝乳酶(rennin-like)。目前,米黑根毛霉(*Rhizomucormiehei*)、微小根毛霉(*Rhizomucorpusillus*)和板栗疫病菌(*Endothia parasitica*)三种来源的凝乳酶已用于大规模商业化生产中,已占到了全球蛋白酶市场的33%。然而,近年来微生物凝乳酶研究主要集中在芽孢杆菌属(*Bacillus*),所得蛋白酶通常具有较高的蛋白酶水解活力,并具有耐热性较强、不易灭活,导致蛋白质降解并转化为乳清,因此,对于酪得率具有负面作用,只有部分适合于干酪生产。因此尽管部分微生物凝乳酶已产业化,筛选新型产凝乳酶的微生物菌种仍是该领域的重要研究工作。

发明内容

因此,本发明要解决的技术问题就是针对目前存在的凝乳酶来源和产量严重不足的技术问题,提供了一种具有凝乳酶活性的发酵液提取物的制备方法及其产物和应用。

为解决上述技术问题,本发明采取的技术方案之一是:一种具有凝乳酶活性的发酵液提取物的制备方法,其所述制备方法包括以下步骤:利用小麦麸皮培养基培养类芽孢杆菌(*Paenibacillus damxungensis* sp. nov.) CGMCC No.8333, 15℃~40℃,震荡培养18~120小时得到发酵液,将所得发酵液离心后取上清液即得。

本发明所述小麦麸皮培养基包括小麦麸皮和水。其中所述的小麦麸皮为本领域常规的小麦麸皮,所述小麦麸皮的来源较佳地包括:山东、河南和江苏,优选的来源为山东。

本发明所述小麦麸皮培养基中小麦麸皮的含量较佳地为1%~14%,更佳地为1%~10%,最佳地为3%,所述百分比为质量百分比。本发明所述菌株类芽孢杆菌 CGMCC No.8333的接种量较佳地为1~9%,更佳地为3%~7%,最佳地为5%,所述百分比为体积百分比。其中所述培养温度较佳地为20℃~40℃,更佳地为25℃~35℃,最佳地为30℃;所述震荡速度较佳地为100~300r/min,更佳地为140~300r/min,尤其更佳地为200~300r/min,最佳地为300 r/min,所述培养的时间较佳地为18~120小时,更佳地为20~48小时,最佳地为20小时,其中所述离心的速度较佳地为9000~14000r/min。

本发明所述小麦麸皮培养基包含的营养成分较佳地为:蛋白质:18.6%,脂肪:6.20%,总碳水化合物:63.9%,水分:7.89%,灰分:3.38%,所述百分比为质量百分比。

本发明所述具有凝乳酶活性的发酵液提取物的制备方法较佳地还包括菌种活化的步骤。所述菌种活化步骤包括:将本发明所述类芽孢杆菌 CGMCC No.8333接种在TYC培养基中,25℃~35℃培养18~48小时作为种子;将活化好的菌种按1~9%的接种量接种于盛有1%~14%的小麦麸皮培养基的250mL锥形瓶中震荡培养,250mL锥形瓶装液量为20 mL~100 mL,摇床转速为140~300 r/min,培养温度为20℃~40℃,培养时间

为 18~120 小时，其中所述百分比为质量百分比。

其中所述菌株类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 接种量更佳地为 1~5%，最佳地为 3%，所述百分比为体积百分比；小麦麸皮培养基中的小麦麸皮含量更佳地为 1%~14%，更佳地为 1%~10%，最佳地为 3%，所述百分比为质量百分比；250mL 锥形瓶中装液量更佳地为 20 mL~100 mL，更佳地为 25 mL~75 mL，最佳地为 30 mL；震荡培养的震荡速度更佳地为 140~300 r/min，最佳地为 300 r/min；培养温度更佳地为 25℃~35℃，最佳地为 30℃；活化时间更佳地为 18~48 小时，更佳地为 18~24 小时，最佳地为 18 小时。

本发明所述具有凝乳酶活性的发酵液提取物的制备方法更佳地还包括将所得上清液经过精制干燥的步骤，所述精制干燥步骤为本领域常规的真空冷冻干燥步骤，所述真空冷冻干燥的温度更佳地为 -44℃~-40℃，优选地为 -40℃。

本发明所述 TYC 培养基为本领域常规的 TYC 培养基，所述 TYC 培养基的配方及制备方法更佳地为：酪蛋白胨或胰蛋白胨 15g，蔗糖 50g，酵母膏 5.0g，L-胱氨酸 0.2g，乙酸钠 20g，Na₂SO₄ 0.1g，NaCl 1g，Na₂HPO₄·12H₂O 2g，NaHCO₃ 2g，琼脂 15-20g，加水至 1L，pH7.3，121℃灭菌 15 分钟即得，上述原料的制备方法均为本领域常规制备方法，或者通过市售可得。

为解决上述技术问题，本发明采取的技术方案之二是：如本发明所述制备方法所得的具有凝乳酶活性的发酵液提取物。本发明制备所得具有凝乳酶活性的发酵液提取物的凝乳酶活力比普通的微生物来源发酵液提取物的凝乳酶活力更高。

为解决上述技术问题，本发明采取的技术方案之三为：本发明所述具有凝乳酶活性的发酵液提取物在制备凝乳酶中的应用。

本发明所述凝乳酶的制备方法为本领域常规的制备方法，只要以本发明所得具有凝乳酶活性的发酵液提取物为原料进行制备即得。

为解决上述技术问题，本发明采取的技术方案之四为：本发明所述具有凝乳酶活性的发酵液提取物在制备发酵乳制品中的应用。

本发明所述发酵乳制品为本领域常规发酵乳制品，更佳地包括发酵乳，乳酸菌饮料，酸乳粉，发酵乳酪，更佳地为发酵乳酪，优选地为干酪。

在符合本领域常识的基础上，上述各优选条件，可任意组合，即得本发明各较佳实例。

本发明所用试剂和原料均市售可得。

本发明的积极进步效果在于：本发明所得具有凝乳酶活性的发酵液提取物的凝乳酶活力高达 6469.72±280.65 SU/mL，并且所得发酵液提取物的蛋白酶水解活力仅为 10.54

±0.65U/mL，二者之比高达 613.82。本发明提供的具有凝乳酶活性的发酵液提取物能够使液态奶在短时间内发生凝乳，并且所得发酵液提取物对酪蛋白的非特异水解活性极低，因此所述具有凝乳酶活性的发酵液提取物在原制干酪生产加工方面具有广阔的应用前景。

生物材料保藏信息

本发明的类芽孢杆菌 BD3526，已于 2013 年 10 月 14 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)，保藏地址：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。该菌株的保藏编号为：CGMCC No.8333。该菌株的分类命名是类芽孢杆菌 *Paenibacillus* sp.，光明乳业股份有限公司菌种库编号为 BD3526。

附图说明

以下结合附图说明本发明的特征和有益效果。

图 1 为本发明所述类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 在 TYC 平板上的菌落图。

图 2 显示本发明类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 的 16S rRNA 系统发育进化树。

图 3 为本发明所述类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 麸皮发酵上清凝乳形态图。

具体实施方式

下面通过实施例的方式进一步说明本发明，但并不因此将本发明限制在所述的实施例范围之中。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，按照常规方法和条件，或按照商品说明书选择。本发明中所述的室温是指进行试验的操作间的温度，一般为 25℃。

Paenibacillus hunanensis FeL05^T (ACCC 10718^T=CGMCC No.1.8907^T) 与 *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842^T (CGMCC No.1.4261^T) 购买自中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC，地址：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)。

实施例 1 菌株 BD3526 的初筛

从西藏自治区当雄县采集牦牛奶，以无菌方式取 1ml，用无菌生理盐水系列稀释，通过涂布的方式将稀释液均匀涂布于固体 TYC 培养基上 (所述 TYC 培养基的组分为：酪蛋白胨或胰蛋白胨 15g，蔗糖 50g，酵母膏 5.0g，L-胱氨酸 0.2g，乙酸钠 20g，Na₂SO₄ 0.1g，NaCl 1g，Na₂HPO₄·12H₂O 2g，NaHCO₃ 2g，琼脂 15-20g，加水至 1L，pH7.3，将上述组分溶解在蒸馏水中，121℃灭菌 15 分钟即得)，30℃培养 24-48 小时。选取粘鼻涕

状、具有良好拉丝性的单菌落多个，分别转接到新的固体 TYC 培养基上，得到纯化的菌落。

实施例 2 菌株 BD3526 的获得及其特征

Biolog 微生物自动检测仪（生产厂商：Biolog 公司）鉴定实验：

Biolog 微生物自动检测仪（生产厂商：Biolog 公司）鉴定实验，是 Biolog 公司独创的碳源利用方法，利用微生物对不同碳源进行呼吸代谢的差异，筛选 95 种不同碳源或其他化学物质，配合显色物质，固定于 96 孔板上（A1 孔为阴性对照）。接种菌悬液培养一定时间，通过检测微生物细胞利用不同碳源进行呼吸代谢过程中产生的化学还原物质欲显色物质发生反应导致的吸光度以及由于微生物生长造成的浊度，生成特征指纹图谱，与标准菌株图谱数据库进行比对，即可得到最终鉴定结果。

1) 取如上所述实施例 1 中的单菌落多个，分别接种到液体 TYC 中，30℃培养 24h。

2) 在 10000r/min 下离心 20min，弃去上清液，加 1mL 生理盐水，在振荡器上振动 5min 使之混匀；再于 10000r/min 下离心 20min，重复 2 次，除去其中的碳源；弃去上清液，加 1mL 生理盐水，在振荡器上振动 5min 使之混匀，于 2000r/min 下离心 1min。

3) 取上清液倒入装有 20mL 已灭菌生理盐水（NaCl, 0.85%）的试管中，并使其 OD₅₉₀ 维持在 0.13±0.02。

4) 将如上所述稀释液加入 Biolog ECO 微平板中（150 μL / 孔），然后在 20℃下培养，每隔 12h 用 Biolog 细菌自动读数仪读取数据，连续测定 2d。结果如表 1 所示。

表 1 菌株 BD3526 的 Biolog 鉴定结果

	PROB	SIM	DIST	种类
1	0.535	0.535	6.927	<i>Virgibacillus sediminis</i>
2	0.117	0.117	7.531	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>
3	0.102	0.102	7.716	<i>Peanibacillus tundrae</i>
4	0.095	0.095	7.802	<i>Peanibacillus polymyxa</i>

对结果进行鉴定需要考虑 3 个参数，可能性 (Probability, PROB)、相似性 (Similarity, SIM)、位距 (Distance, DIS)。SIM 和 DIS 值是 2 个重要的参数，表示测试结果与数据库相应的数据的匹配程度。当 DIS<5.0, SIM>0.75 为良好的匹配。结果显示，其中的菌株 BD3526 鉴定的 SIM 值 0.535<0.75，说明与数据库中数据匹配度低，表示与数据库中的菌种在代谢特征上存在较大差异，可能是一个新的微生物种类。

所得菌株 BD3526 于 2013 年 10 月 14 日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)，保藏地址：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。该菌株的保藏编号为：CGMCC No.8333。该菌株的分类命名是 *Paenibacillus* sp.，该菌株的名称是 BD3526。

实施例 3 菌株 BD3526 的特征

1、菌落特征：

取菌株 BD3526 的单菌落，转接到 TYC 固体培养基（琼脂）上，于 30°C 恒温培养箱中培养 24h、36h 和 48h，分别观察其菌落的大小、颜色、边缘、凸起、光滑度、粘性、透明度等特点。结果如图 1 所示。结果显示，菌株 BD3526 在 TYC 固体培养基上形成边缘整齐，光滑，粘稠，表面光泽，不透明的菌落，直径约 3~5mm。

2、形态学观察及生理生化特征：

挑取在 TYC 固体培养基（琼脂）上培养 24h 的新鲜培养物，进行生理生化测试。结果显示，BD3526 为革兰氏阳性杆菌，芽孢端生，为椭圆形，不膨大。BD3526 其理化反应参数如表 2。

表 2 菌株 BD3526 的理化实验结果

氧化酶 -	接触酶 +	β -半乳糖苷酶 +
精氨酸双水解 -	赖氨酸脱羧酶 -	鸟氨酸脱羧酶 +
脲酶 -	柠檬酸盐利用 -	硝酸盐还原 +
吲哚产生 -	VP 反应 +	H ₂ S 产生 -
淀粉水解 +	七叶灵水解 +	明胶液化 +

3、API 50 CHB 鉴定特征

利用 API 50 CHB 鉴定系统（生产厂商：bioMe'rieux）测定菌株 BD3526 发酵碳水化合物的产酸情况。API 50 CHB 的试剂条中，不同的序列号对应不同的碳源，同时，其中含有指示剂，这样，如果其对应的碳源被利用，则培养液 pH 下降，指示剂便会改变颜色，利于观察记录。

1) API 50 CHB 基础培养基成分：胰蛋白胨 1g，酵母膏 0.5g，硫酸铵 2g，酚红 0.18g，无机盐基础（Cohen-Bazire）10ml，磷酸盐缓冲液（pH 7.8）1000ml。

2) 在平板上培养菌株，挑取有多个大小相近，单菌落分离的平板。挑取大小相近的单菌落若干个，加入 1) 中的培养基中，制成 OD₆₀₀=0.4~0.6 的菌悬液。

3) 将接过种的 API 50 CHB 培养基加入到含有实验条的小管中，上面覆盖一层已灭菌的石蜡油。

4) 在 30°C 的恒温培养箱中培养，分别在 24 小时和 48 小时记录实验现象。

菌株 BD3526 利用碳水化合物发酵产酸的结果如表 3 和表 4 所示。

表3 菌株BD3526的API 50 CHB鉴定结果

对照 -	D-半乳糖 +	甘油 -	密二糖 +	龙胆二糖 +
甘露醇 +	D-葡萄糖 +	麦芽糖 +	蔗糖 +	D-来苏糖 -
赤藓醇 -	D-果糖 +	N-乙酰-葡糖胺 +	木糖醇 -	D-塔格糖 -
D-阿拉伯糖 -	D-甘露糖 +	苦杏仁苷 +	棉子糖 +	D-岩藻糖 -
L-阿拉伯糖 +	L-山梨糖 -	熊果甙 +	松三糖 -	L-岩藻糖 -
D-核糖 +	L-鼠李糖 -	七叶灵 +	乳糖 +	D-阿拉伯糖醇 -
D-木糖 +	卫茅醇 -	水杨苷 +	淀粉 +	L-阿拉伯糖醇 -
L-木糖 -	肌醇 -	纤维二糖 +	糖原 +	葡萄糖酸盐 +
阿东醇 -	α -甲基-D-甘露糖甙 -	α -甲基-D-葡萄糖甙 -	5-酮基-葡萄糖酸盐 -	2-酮基-葡萄糖酸盐 +
β -甲基-D-木糖 +	山梨醇 -			

“+”表示利用糖产酸，“-”表示不产酸。

表4 菌株BD3526与其相近类芽孢杆菌的利用碳水化合物水解产酸的对比表

菌株	1	2
甘油	-	w
肌醇	-	w
葡萄糖酸盐	+	w
α -甲基-D-葡萄糖甙	-	w
2-酮基-葡萄糖酸盐	+	-
海藻糖	w	+

注：菌株 1 为 BD3526，菌株 2 为 *Paenibacillus hunanensis* FeL05^T (ACCC 10718^T)；

W 是指 “weak”，弱阳性。

如表 4 所示，菌株 BD3526 与菌株 2 *Paenibacillus hunanensis* FeL05^T (ACCC 10718^T) 利用碳水化合物水解产酸方面有明显差异，属于不同种。

实施例 4 菌株 BD3526 的生长特性

1. 生长曲线：

1) 各取 30mL TYC 液体培养基于 100mL 锥形瓶中，用多层(8-12 层)纱布封口后，121℃ 高温蒸汽灭菌 15 分钟；

2) 挑取在 TYC 固体培养基（琼脂）上培养 24h 的新鲜培养物，接种到上述 TYC 液体培养基，30℃ 摇床培养 20~24h，作为种子。

3) 将 2) 中所培养的 BD3526 种子按 2%(v/v)接种量转接新鲜的无菌接种 TYC 液体培中, 混匀。取 150 μ l 混合液加入 costar 96 孔灭菌微孔板中, 3 份平行, 并以不接种的 TYC 液体培养基做空白。波长 600nm 下测量 OD 值, 间隔 30min。

2. 生长温度:

将 2) 中所培养的 BD3526 种子按 2%(v/v)接种量转接新鲜的无菌接种 TYC 液体培中, 混匀。分别置于 4 $^{\circ}$ C、15 $^{\circ}$ C、30 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C、60 $^{\circ}$ C 的水浴培养, 每个温度梯度做三个平行, 分别在 24h 和 48h 时测定其生长情况。得到菌株 BD3526 生长温度范围为 15~40 $^{\circ}$ C, 较佳地为 30 $^{\circ}$ C。

3. 生长 NaCl 耐受性

将 2) 中所培养的 BD3526 种子按 2%(v/v)接种量转接氯化钠浓度分别为 0.0%、2.0%、5.0%、7.0% 和 10.0% 的 TYC 培养基, 30 $^{\circ}$ C 培养, 分别于 24h 和 48h 的生长状态做记录。结果显示菌株 BD3526 的 NaCl 耐受性为 10%。

4. 生长 pH 范围

用无菌的 HCl 和 NaOH 将灭好菌的 TYC 培养基调至 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0、8.5、9.0、10.0, 将 2) 中所培养的 BD3526 种子按 2%接种量接入, 30 $^{\circ}$ C 培养, 分别于 24h 和 48h 的生长状态做记录。得到菌株 BD3526 生长的 pH 范围为 5.5~8.5, 较佳地为 6.0。

实施例 5 菌株 BD3526 的 16S 系统发育学特征

利用天跟细菌基因组提取试剂盒 (TIANAMP Bacteria DNA Kit), 按照革兰氏阳性菌操作步骤获得菌株 BD3526 的基因组 DNA。分别测定其 230nm、260nm、280nm 的吸光度, 其 A260: A280: A230 为 1: 0.510: 0.445。纯度符合要求。

利用 27F, 1492R 引物扩增菌株 BD3526 的 16S rDNA 片段。纯化, 然后与 pMD19-T Simple Vector 的 TA 克隆载体连接, 放于 16 $^{\circ}$ C 的水浴中反应过夜, 转化到大肠杆菌 DH5 α 的感受态细胞中, 于氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基平板上涂布, 在 37 $^{\circ}$ C 培养 16-20 小时后, 挑取阳性转化子。将上述阳性转化子送上海杰李生物公司测序。将测序结果放到 NCBI 及 EzTaxon 数据库中, 比对得到与最相近的菌株 (*Paenibacillus hunanensis* FeL05^T) 相似性为 96.6%。

如上所述的引物对序列为, 1492R: TACCTTGTTACGACTT (SEQ ID NO.2 所示), 27F: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG (SEQ ID NO.3 所示)。

菌株 BD3526 的 16S rRNA 基因测序的结果如 SEQ ID NO.1 所示。

如上所述的 16S rRNA 序列采用软件 CLUSTAL_X program (version 1.83) 进行比对,

使用软件 MEGA version 4.0.2. software 绘制进化关系树。采用 neighbor-joining 计算，并以 maximum-parsimony 和 maximum-likelihood 进行验证计算，bootstrap 设置为 1000 个循环，结果如图 2 所示。从图 2 可见，通过对 16S rRNA 基因的系统发育树分析，菌株 BD3526 可以归入到 *Paenibacillus hunanensis* 簇。但是，菌株 BD3526 与 *Paenibacillus hunanensis* 模式菌株相似性为 96.6%。而 97% 则是同一属内不同种类菌株相似性的 16S rRNA 的阈值，而且很多文献中证明了有些菌 16S rRNA 基因序列的相似性超过了 99%，但是他们仍然属于不同的菌种。故菌株 BD3526 较有可能为新的微生物物种，有待其他生理生化指标的验证。

实施例 6 菌株 BD3526 脂肪酸含量特征

菌株 BD3526 的总脂肪酸含量的测定。

配置如下溶液：I，45g 氢氧化钠溶于 150ml 甲醇及 150ml 蒸馏水；II，190ml 浓盐酸，275ml 甲醇溶于 135ml 蒸馏水；III，200ml 正己烷与 200ml 乙醚混合均匀；IV，10.8 克氢氧化钠溶于 900ml 蒸馏水；V，饱和氯化钠溶液。

1) 取适量细菌培养物，置于 8ml 螺口玻璃管中，加入 1ml 溶液 I，拧紧螺盖，沸水浴 5min，取出振荡 5~10S，继续沸水浴 25min；

2) 待样品管冷却后，加入 2ml 溶液 II，盖严振荡，随后精确控制 $80\pm 1^\circ\text{C}$ 水浴 10min，冰浴冷却；

3) 向上述溶液中，加入 1.25ml 溶液 III，快速振荡 10min 左右，弃去下层水相；

4) 在剩余有机相重加入 3ml 溶液 IV 及 0.1-0.2ml 溶液 V，快速振荡 5min 左右，取三分之二上层有机相置色谱样品瓶中。

HP6890 气相色谱仪，配备分流/不分流进样口，氢化焰离子化检测器 (FID) 及 HP 气相色谱化学工作站；色谱柱为 Ultra-2 柱，长 25m，内径 0.2mm，液膜厚度 0.33 μm ；炉温为二阶程序升温：起始温度 170°C ， $5^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 260°C ，随后 $40^\circ\text{C}/\text{min}$ 升至 310°C ，维持 1.5min；进样口温度 250°C ，载气为氢气，流速 0.5ml/min，分流进样模式，分流比为 100:1，进样量为 2 μl ；检测温度 300°C ，氢气流速为 30ml/min，空气流速为 216ml/min，补充气 (氮气) 流速为 30ml/min。

结果显示，菌株 BD3526 的主要细胞脂肪酸为反异式饱和脂肪酸 $\text{C}_{15:0}$ 、反异式十七碳饱和脂肪酸、十六碳饱和脂肪酸，百分含量分别为 59.02%、11.09%、7.66%。符合类芽孢杆菌属主要的脂肪酸为反异式饱和脂肪酸 $\text{C}_{15:0}$ 。而且同相似菌株脂肪酸种类与含量上，均有差异，以此判断同相似菌株属于不同种类。

实施例 7 菌株 BD3526 的 G+C mol% 含量特征

菌株 BD3526 基因组 DNA 的 G+C mol% 含量测定。

使用熔解温度 (T_m) 法, 以大肠埃希氏 (E. coli K12, AS 1.365) 为参比对照, 所用仪器为 Perkin/Elmer 公司 Lambda35 UV/VIS Spectrometer; 用 PTP-1 数字温度控制仪控温。步骤如下:

1) 将待测 DNA 样品用 0.1×SSC 稀释至 OD_{260 nm} 值于 0.3~0.4 之间;

2) 在波长 260 nm 首先记录 25°C 的 OD 值, 然后设定升温程序, 从 65°C 开始到 95°C, 其间每分钟升高 1°C;

3) OD 值上升表示变性开始, 记录比色皿温度和 OD 值, 直至 OD 值不变表示变性完毕;

4) 根据热变性曲线, 得出熔链温度 (T_m), 计算 G+C mol% 含量。

在 0.1×SSC 溶液中计算公式为:

$$G+C \text{ mol}\% = G+C \text{ mol}\%_{AS_{1.365}} + 2.08 (T_{m \text{ 未知}} - T_{m_{AS_{1.365}}})$$

试验测定的 E. coli K12, AS_{1.365} 的 T_m 为 75.810°C, 待测菌株的 T_m 值和 G+C mol%。

菌株 BD3526 的 G+C mol% 结果见表 5。

表 5 菌株 BD3526 的 G+C mol% 含量

菌株编号	T _m 值°C	G+C mol%
对照 E coli k12	75.810	--
BD3526	74.024	47.48

菌株 BD3526 的 G+C mol% 为 47.48%, Paenibacillus hunanensis FeL05^T (ACCC 10718^T=CGMCC 1.8907^T=DSM 22170^T) G+C mol% 为 53.3% (两者差异大于 5%)。类芽孢杆菌属 G+C 含量范围 45~54 mol%。依据东方秀、蔡秒英主编的《常见细菌系统鉴定手册》, 类芽孢杆菌属 G+C 含量范围 45~54 mol%; 两株菌 G+C mol% 差别大于 5%, 可判断不属于同一个种 (在其他性状相似的情况下也可作上述判断)。由此判断, 菌株 BD3526 归为类芽孢杆菌属 (Paenibacillus sp.), 同最相近的菌株 Paenibacillus hunanensis FeL05^T (ACCC 10718^T=CGMCC 1.8907^T=DSM 22170^T) 属于不同种。

实施例 8 菌株 BD3526 的杂交试验

菌株 BD3526 同遗传亲缘关系最相似的菌种及类芽孢杆菌属模式菌种的杂交试验。

参考 16S rRNA 的结果, 对 BD3526 与遗传亲缘关系最相似的种 Paenibacillus hunanensis FeL05^T (ACCC 10718^T=CGMCC 1.8907^T=DSM 22170^T) 及 Paenibacillus 模式菌株 Paenibacillus polymyxa ATCC 842^T (=CGMCC 1.4261^T=DSM 36^T=KCTC 3858^T)

进行 DNA-DNA 杂交试验。

采用液相复性率方法，所用仪器为 Perkin Elmer Lambda35 UV/VIS Spectrophotometer。温度控制用 PTP-1 Peltier System 数字控温系统。步骤如下：

1) DNA 样品处理：如上所述实施例 5 中提取的 DNA 样品，实验前需先置冰浴中用超声波 40W 打 24 分钟（设定为：打 3 秒/停 3 秒；DNA 样品浓度为 OD₂₆₀ nm 2.0，将 DNA 样品剪切为 2-5×10⁵ 道尔顿的片段。

2) 将待测 DNA 样品（A、B）分别用 0.1×SSC 精确配制成为 OD₂₆₀ nm 1.8~2.0，且两者 OD₂₆₀ nm 值一致（精确到 0.001）；

3) 进入 UV Winlab 程序（生产厂商：Perkin Elmer），出现其方法窗口，在方法窗口中选择时间驱动 TD 方法，通过 Timed. Inst. Sample. 设置页来设定合适的测定参数。测定波长为 260 nm，总测定时间设定为 30 分钟。按照已经测定的 G+C mol% 计算最适复性温度（optimal renaturation temperature, TOR），将比色杯的温度稳定在最适复性温度。在 2×SSC 反应液中，最适复性温度按公式：TOR = 0.51 × (G+C) mol% + 47 计算。

4) 取两株菌种 DNA 样品各 400 μl 分别装在两个离心管中，再取两株菌种 DNA 样品各 200 μl 装在同一个离心管中为混合样品；

5) 单一 DNA 样品和混合 DNA 样品测试前分别通过 PTP-1 控温系统（生产厂商：Perkin Elmer）设置 100℃ 变性 15 min，然后降温至最适复性温度。记录 OD₂₆₀ nm 值，待反应进行到 30 min 时，停止读数，全部过程样品的温度都不得低于 TOR，最终得到一条随时间延长，光吸收值逐渐减小的直线；

6) 根据软件 UV Winlab，在其中的 Algorithm 栏中选择 Slope，得出复性数率（V），即斜率（通常 V 表示为每分钟吸光值的减少值）；

7) 根据公式计算同源杂交率。

$$\text{同源杂交率 (H) \%} = 4V_m - (V_a + V_b) / 2\sqrt{V_a V_b} \times 100\%$$

DNA-DNA 杂交结果如下：

BD3526/ *Paenibacillus hunanensis* FeL05^T (三次重复):

H%=39.82% (I);

H%=41.60% (II);

H%=42.10% (III)。

BD3526/ *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842^T (三次重复):

H%=41.62% (I);

H%=46.60% (II);

H%=48.60% (III)。

结果显示, 菌株 BD3526 同 *Paenibacillus hunanensis* FeL05^T (ACCC 10718^T=CGMCC 1.8907^T=DSM 22170^T) 的 DNA 同源性的为 39.82~42.10%, 同类芽孢杆菌属的模式菌种 *Paenibacillus polymyxa* ATCC 842^T (=CGMCC 1.4261^T=DSM 36^T=KCTC 3858^T) DNA 的同源性为 41.62~48.60%。根据《伯杰氏细菌鉴定手册》, 在最适的条件下, DNA 同源性在 70%以上是属于同一种的, 在 20%以上是属于同一属的。并结合实施例 2, 3, 4, 5, 6 的数据, 由此判断菌株 BD3526 属于类芽孢杆菌属的一个新种。该菌株的分类地位是 *Paenibacillus* sp., 依照国际细菌系统分类委员会的命名方法, 欲将该种命名为 *Paenibacillus damxungensis* sp. nov., 并选菌株 BD3526 为该种的模式菌株。

实施例 9 菌株 BD3526 的发酵液提取物的凝乳酶活性检测

将实施例 1 所得类芽孢杆菌新种 BD3526 (*Paenibacillus damxungensis* sp. nov.) CGMCC No.8333 接种至 TYC 培养基中 35℃、180r/min 培养 16h 作为种子使用, 按 9% 的接种至 250mL 锥形瓶中装有 20mL 的 1%小麦麸皮培养基中并混匀, 于 20℃, 300r/min 的条件下, 震荡培养 18h。培养结束后, 称取 5mL 培养好的小麦麸皮培养基经 4℃, 9000r/min 离心后得到的上清即为含有凝乳酶的粗提物。

将制备得到的 500μL 的粗酶液按照下述方法进行凝乳实验, 凝乳酶活力(milk clotting activity, MCA) 测定方法包括以下步骤:

将脱脂奶粉以 10%(w/v)的比例配置成 pH=6.0 含有 10mmol/L CaCl₂ 的溶液, 在 35℃ 水浴中孵育 10min 后, 将 500μL 的凝乳酶加入至 35℃ 的 10mL 脱脂乳溶液中, 每 15s 将样品取出并倾斜 45°观察样品组织状态, 以形成不连续颗粒的时间计作凝乳时间。1 个凝乳酶单位 (Soxhlet unite, SU) 定义为 35℃ 条件下, 使 1mL 脱脂乳在 40min 发生凝乳所需的酶量。

$$MCA (SU/mL) = \frac{2400 \times V_S}{T \times V_E} \times D$$

T —— 凝乳时间, 秒

V_S —— 底物体积, mL

V_E —— 酶液体积, mL

D —— 稀释倍率

蛋白酶水解活力 (proteolytic activity, PA) 的测定方法如下:

以酪蛋白为底物, 采用 Folin-Ciocalteu phenol 方法进行蛋白水解活力测定。将 5mL 用 0.05mol/L pH 6.0 的磷酸盐配置 12g/L 的酪蛋白溶液加入至 1mL 发酵上清中, 混合均

匀并在 35℃ 水浴中孵育 10min 后, 加入 0.44mol/L TCA 终止反应, 并于-4℃、10000r/min 离心取上清。取 2mL 上清加入 0.28mol/L 的 NaOH 溶液 5 mL 和按 1:2 比例稀释的 Folin-Ciocalteu phenol 试剂, 35 °C 水浴中孵育 15min 后, 测定 $A_{660\text{ nm}}$ 。配置 100 $\mu\text{g/mL}$ 的酪氨酸溶液, 并按照 Folin-Ciocalteu phenol 方法分别测定 0、20、40、60、80 和 100 $\mu\text{g/mL}$ 酪氨酸溶液的 $A_{660\text{ nm}}$, 建立标准曲线。1 个蛋白水解活力定义为 1min 释放 1 μmol 酪氨酸所需的酶量。

测得实验结果表明, 类芽孢杆菌菌株 BD3526 (CGMCC No.8333) 的凝乳时间为 57.67 \pm 2.05 秒, 根据上述方法测算从该菌株所得具有凝乳酶活性的发酵液提取物的凝乳酶活力为 833.43 \pm 29.98SU/mL; 测得该发酵液提取物的蛋白酶水解活力为 1.53 \pm 0.18U/mL, MCA/PA 比值为 544.72, 利用所得类芽孢杆菌的菌株 BD3526 (CGMCC No.8333) 提取物制备的凝乳形态如图 3 所示。

实施例 10 菌株 BD3526 的发酵液提取物的凝乳酶活性检测

将实施例 1 所得类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 接种至 TYC 培养基中 25℃, 180r/min 培养 20h 作为种子使用, 按 5% 的接种至 250mL 锥形瓶中装有 50mL 的 3% 小麦麸皮培养基中并混匀, 于 30℃, 200r/min 的条件下, 震荡培养 28 h。

培养结束后, 称取 5mL 培养好的小麦麸皮培养基经 0℃, 9000r/min 离心后得到的上清即为含有凝乳酶的粗提物。将制备得到的 500 μL 的粗酶液稀释 5 倍 (D=5) 按照实施例 9 中的方法分别进行 MCA 和 PA 的测定。

测得的凝乳时间为 78.33 \pm 1.25 秒, 计算得到的粗酶液凝乳酶活力为 3064.60 \pm 48.51SU/mL; 测得的蛋白酶水解活力为 5.21 \pm 0.47U/mL, MCA/PA 比值为 588.21。

实施例 11 类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 发酵液提取物的凝乳酶活性检测

将实施例 1 所得类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 接种至 TYC 培养基中 30℃、180r/min 震荡培养 20h 作为种子使用, 按 1% 的接种至 250mL 锥形瓶中装有 100mL 的 14% 小麦麸皮培养基中并混匀, 于 30℃, 200r/min 的条件下, 震荡培养 120h。

培养结束后, 称取 5mL 培养好的小麦麸皮培养基经 4℃, 9000r/min 离心后得到的上清即为含有凝乳酶的粗提物。

将制备得到的 500 μL 的粗酶液按照实施例 9 中的方法分别进行 MCA 和 PA 的测定。

测得的凝乳时间为 67.33 \pm 1.63 秒, 计算得到的粗酶液凝乳酶活力为 716.84 \pm 17.48SU/mL; 测得的蛋白酶水解活力为 1.39 \pm 0.29U/mL, MCA/PA 比值为 515.71。

实施例 12 类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 发酵液提取物的凝乳酶活性检测

将实施例 1 所得类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 接种至 TYC 培养基中 30℃、180r/min

震荡培养 20h 作为种子使用, 按 5% 的接种至 250mL 锥形瓶中装有 30mL 的 3% 小麦麸皮培养基中并混匀, 于 30℃, 300r/min 的条件下, 震荡培养 20h。培养结束后, 称取 5mL 培养好的小麦麸皮培养基经 4℃, 9000r/min 离心后得到的上清即为含有凝乳酶的粗提物。

将制备得到的 500 μ L 的粗酶液稀释 10 倍 (D=10) 按照实施例 9 中的方法分别进行 MCA 和 PA 的测定。

测得的凝乳时间为 74.33 \pm 3.26 秒, 计算得到的粗酶液凝乳酶活力为 6469.72 \pm 280.65SU/mL; 测得的蛋白酶水解活力为 10.54 \pm 0.65U/mL, MCA/PA 比值为 613.82。

实施例 13 类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 发酵液提取物的凝乳酶活性检测

将实施例 1 所得类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 接种至 TYC 培养基中 30℃、180r/min 震荡培养 18h 作为种子使用, 按 3% 的接种至 250mL 锥形瓶中装有 20mL 的 3% 小麦麸皮培养基中并混匀, 于 40℃, 300r/min 的条件下, 震荡培养 18h。培养结束后, 称取 5mL 培养好的小麦麸皮培养基经 4℃, 14000r/min 离心后得到的上清即为含有凝乳酶的粗提物。

将制备得到的 500 μ L 的粗酶液按照实施例 9 中的方法分别进行 MCA 和 PA 的测定。

测得的凝乳时间为 3720 \pm 86.41 秒, 计算得到的粗酶液凝乳酶活力为 12.91 \pm 0.30SU/mL; 测得的蛋白酶水解活力为 0.04 \pm 0.02U/mL, MCA/PA 比值为 322.75。

实施例 14 类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 发酵液提取物的凝乳酶活性检测

将实施例 1 所得类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 接种至 TYC 培养基中 35℃、180r/min 震荡培养 18h 作为种子使用, 按 7% 的接种至 250mL 锥形瓶中装有 50mL 的 10% 小麦麸皮培养基中并混匀, 于 35℃, 180r/min 的条件下, 震荡培养 48h。培养结束后, 称取 5mL 培养好的小麦麸皮培养基经 4℃, 14000r/min 离心后得到的上清即为含有凝乳酶的粗提物。

将制备得到的 500 μ L 的粗酶液稀释 5 倍 (D=5) 按照实施例 9 中的方法分别进行 MCA 和 PA 的测定。

测得的凝乳时间为 240.33 \pm 2.49 秒, 计算得到的粗酶液凝乳酶活力为 998.72 \pm 10.41SU/mL; 测得的蛋白酶水解活力为 1.67 \pm 0.27U/mL, MCA/PA 比值为 598.03。

实施例 15 类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 发酵液提取物的凝乳酶活性检测

将实施例 1 所得类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 接种至 TYC 培养基中 30℃、140r/min 震荡培养 18h 作为种子使用, 按 5% 的接种至 250mL 锥形瓶中装有 30mL 的 3% 小麦麸皮培养基中并混匀, 于 25℃, 300r/min 的条件下, 震荡培养 20h。培养结束后, 称取 5mL 培养好的小麦麸皮培养基经 4℃, 14000r/min 离心后得到的上清即为含有凝乳酶的粗提物。

将制备得到的 500 μ L 的粗酶液稀释 10 倍 (D=10) 按照实施例 9 中的方法分别进行 MCA 和 PA 的测定。

测得的凝乳时间为 115.67 ± 2.49 秒，计算得到的粗酶液凝乳酶活力为 $4151.77 \pm 88.83 \text{SU/mL}$ ；测得的蛋白酶水解活力为 $6.89 \pm 0.95 \text{U/mL}$ ，MCA/PA 比值为 602.58。

对比实施例 1 不同微生物来源的粗酶液凝乳酶活力检测

将 $500 \mu\text{L}$ 其他微生物来源的粗酶液按照实施例 2 所述方法进行凝乳实验，所得粗酶液的凝乳酶活力数据如表 6 所示：

表 6 其他微生物来源的粗酶液凝乳酶活力测试结果

微生物	粗酶液酶活
Mucor rouxii[1]	1.90 SU/mL
Penicilliumoxalicum[2]	16.8 SU/mg
Nocardiosis spp.[3]	4.7 SU/mL
Bacillus amyloliquefaciens D4[4]	1000 SU/mL
Bacillus subtilis (natto) Takahashi[5]	685.7 SU/mL
Bacillus subtilis B1[6]	1129.05SU/mL
Bacillus subtilis YB-3[7]	200 SU/mL
Bacillus sphaericus NRC 24[8]	1212 SU/mL

其中表 6 所述微生物 Mucor rouxii 请参考文献[1]：Yu P J, Chou C C. Factors affecting the growth and production of milk clotting enzyme by Amylomycesrouxii in rice liquid medium[J]. Food Technology and Biotechnology, 2005, 43(3): 283-288.;

表 6 所述微生物 Penicilliumoxalicum 请参考文献[2]：Hashem MA. Purification and properties of a milk clotting enzyme produced by Penicilliumoxalicum[J]. Bioresource Technology, 2000, 75(3): 219 - 222.;

表 6 所述微生物 Nocardiosis spp. 请参考文献[3]：Cavalcanti MTH, Martinez CR, Furtado VC, Neto BB, Teixeira MF, Lima Filho JL, Porto ALF. Milk-clotting protease production by Nocardiosis sp. in an inexpensive medium[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2005, 21(2): 151-154.;

表 6 所述微生物 Bacillus amyloliquefaciens D4 请参考文献[4]：He X, Zhang W, Ren F, Gan B, Guo H. Screening fermentation parameters of the milk-clotting enzyme produced by newly isolated Bacillus amyloliquefaciens D4 from the Tibetan Plateau in China[J]. Annals of Microbiology, 2012, 62(1): 357-365.;

表 6 所述微生物 Bacillus subtilis (natto) Takahashi 请参考文献[5]：Shieh C J, Phan Thi L A, Shih I L. Milk-clotting enzymes produced by culture of Bacillus subtilis natto[J].

Biochemical Engineering Journal, 2009, 43 (1): 85-91.;

表 6 所述微生物 *Bacillus subtilis* B1 请参考文献[6]: Ding Z Y, Liu S P, Gu Z H, Zhang L, Zhang K C, Shi G Y. Production of milk-clotting enzyme by *Bacillus subtilis* B1 from wheat bran[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(46): 9370-9378.;

表 6 所述微生物 *Bacillus subtilis* YB-3 请参考文献[7]: Li Y, Liang S, Zhi D, Chen P, Su F, Li H. Purification and characterization of *Bacillus subtilis* milk-clotting enzyme from Tibet Plateau and its potential use in yak dairy industry[J]. European Food Research and Technology, 2012, 234(4): 733-741.;

表 6 所述微生物 *Bacillus sphaericus* NRC 24 请参考文献[8]: El-Bendary M A, Moharam M E, Ali T H. Purification and Characterization of Milk Clotting Enzyme Produced by *Bacillus sphaericus*[J]. Journal of Applied Sciences Research, 2007, 3(8): 695-699. 。

从上述实验结果中可以看出,利用本发明所述类芽孢杆菌新种 BD3526(*Paenibacillus damxungensis* sp. nov.) CGMCC No.8333 制备的凝乳酶的活力比其他微生物来源的凝乳酶的活力高出数倍甚至数百倍之多,填补了凝乳酶制备领域的巨大空白。

对比实施例 2 利用不同培养基制备类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 发酵液提取物

将实施例 1 所得类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 接种至 TYC 培养基中 30℃、180r/min 培养 18h 作为种子使用,将所得菌株种子按 3%的接种量,分别接种至 250mL 锥形瓶中装有 50mL 的 3%小麦麸皮培养基和 250mL 锥形瓶中装有 50mL 的 LB 培养基中并混匀,于 30℃, 100r/min 的条件下,震荡培养 30h。培养结束后,分别称取 5mL 培养好的小麦麸皮培养基和 LB 培养基均经 4℃, 9000r/min 离心后得到的上清即为含有凝乳酶的粗提物。

将制备得到的小麦麸皮培养基 500 μ L 的粗酶液稀释 5 倍 (D=5), LB 培养基粗酶液不稀释 (D=1), 分别按照实施例 9 中的方法分别进行 MCA 和 PA 的测定。

小麦麸皮培养基粗酶液测得的凝乳时间为 77.67 ± 2.52 秒,计算得到的粗酶液凝乳酶活力为 3092.31 ± 100.88 SU/mL; 测得的蛋白酶水解活力为 5.23 ± 0.51 U/mL, MCA/PA 比值为 591.26。

LB 培养基粗酶液测得的凝乳时间为 3630.67 ± 137.48 秒,计算得到的粗酶液凝乳酶活力为 13.24 ± 0.51 SU/mL; 测得的蛋白酶水解活力为 0.03 ± 0.001 U/mL, MCA/PA 比值为 441.33。

由此可见,利用小麦麸皮培养基制备的凝乳酶粗酶液与利用 LB 培养基制备的粗酶液相比,所得发酵液提取物的凝乳酶活力提高了 233.56 倍。

应理解，在阅读了本发明的上述内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

虽然以上描述了本发明的具体实施方式，但是本领域的技术人员应当理解，这些仅是举例说明，在不背离本发明的原理和实质的前提下，可以对这些实施方式做出多种变更或修改。因此，本发明的保护范围由所附权利要求书限定。

权利要求

1、一种具有凝乳酶活性的发酵液提取物的制备方法，其特征在于，所述制备方法包括以下步骤：利用小麦麸皮培养基培养类芽孢杆菌（*Paenibacillus damxungensis* sp. nov.）CGMCC No.8333，15℃~40℃，震荡培养 18~120 小时得到发酵液，将所得发酵液离心后取上清液即得。

2、如权利要求 1 所述的制备方法，其特征在于，所述小麦麸皮培养基的组分包括小麦麸皮和水，其中小麦麸皮的含量为 1%~14%，所述百分比为质量百分比。

3、如权利要求 1 或 2 所述的制备方法，其特征在于，所述震荡培养的震荡速度为 100 r/min~300 r/min。

4、如权利要求 3 所述的制备方法，其特征在于，所述小麦麸皮培养基中小麦麸皮的质量百分比含量为 1%~10%，所述震荡培养的震荡速度为 140 r/min~300 r/min，震荡培养的时间为 20 小时~48 小时。

5、如权利要求 1~4 中的至少一项所述的制备方法，其特征在于，所述离心的温度为 0℃~4℃，离心速度为 9000 r/min~14000r/min。

6、如权利要求 1~5 中的至少一项所述的制备方法，其特征在于，所述制备方法还包括菌种活化步骤，所述菌种活化步骤为：将所述类芽孢杆菌 CGMCC No.8333 接种在 TYC 培养基中，25℃~35℃活化培养 18~48 小时作为种子使用；将活化好的菌种按体积百分比 1~9%的接种量，接种于包含质量百分比为 1%~14%小麦麸皮的小麦麸皮培养基中震荡培养。

7、如权利要求 6 所述的制备方法，其特征在于，活化培养的时间为 18 小时~48 小时，所述震荡培养的震荡速度为 140~300 r/min，震荡培养的温度为 25℃~35℃；震荡培养的时间为 18 小时~120 小时。

8、如权利要求 1~7 中的至少一项所述的制备方法，其特征在于，所述制备方法还包括将所得上清液经过精制干燥的步骤，所述精制干燥步骤为真空冷冻干燥，真空冷冻干燥的温度为-44℃~-40℃。

9、如权利要求 1~8 中的至少一项所述制备方法所得的具有凝乳酶活性的发酵液提取物。

10、如权利要求 9 所述的具有凝乳酶活性的发酵液提取物在制备凝乳酶中的应用。

11、如权利要求 9 所述的具有凝乳酶活性的发酵液提取物在制备发酵乳制品中的应用，其中所述发酵乳制品为干酪。

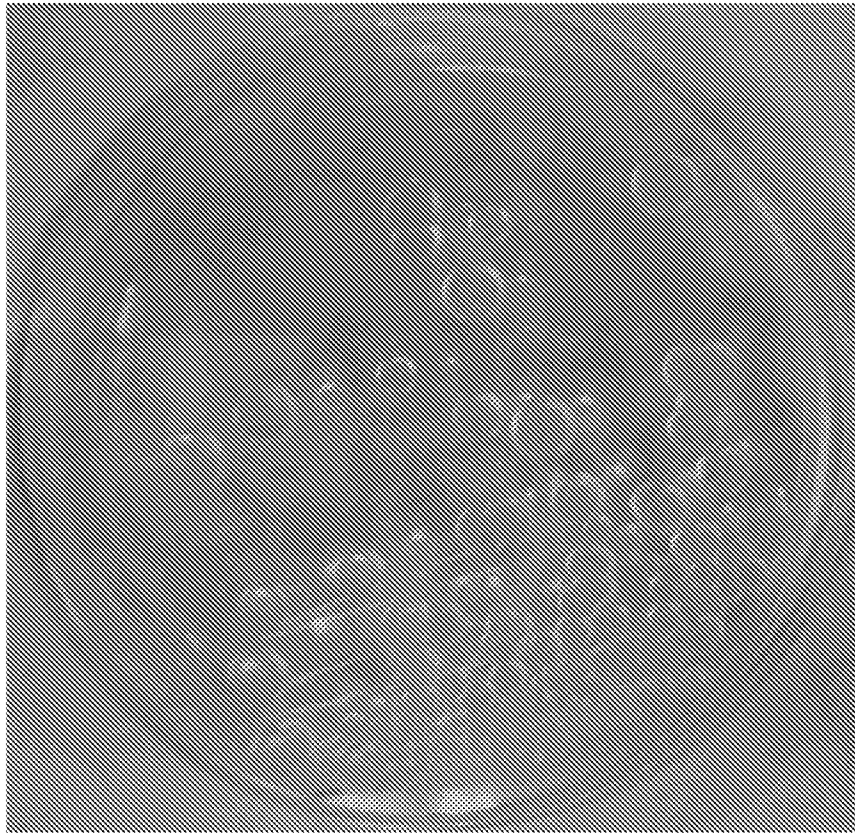


图 1

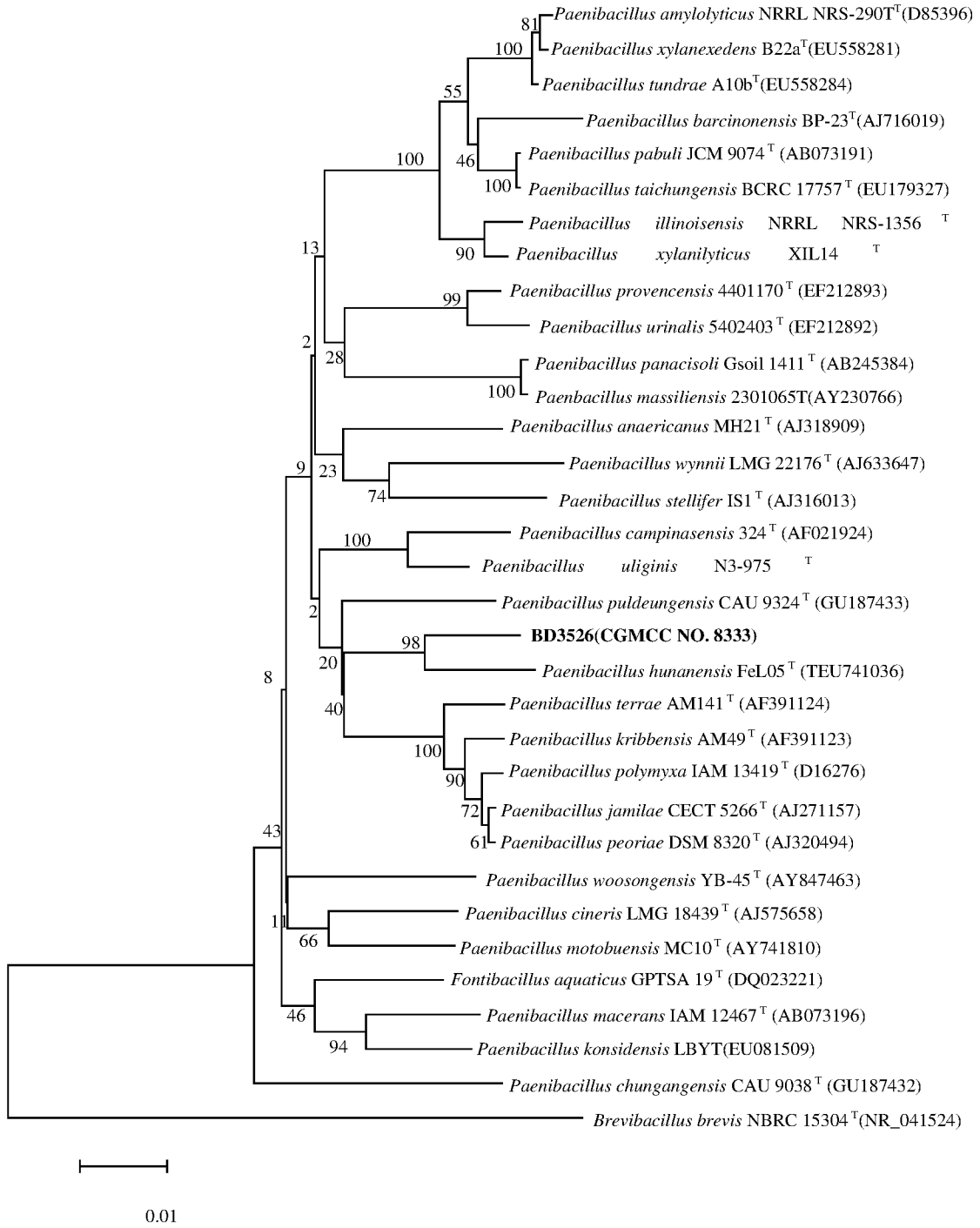


图 2

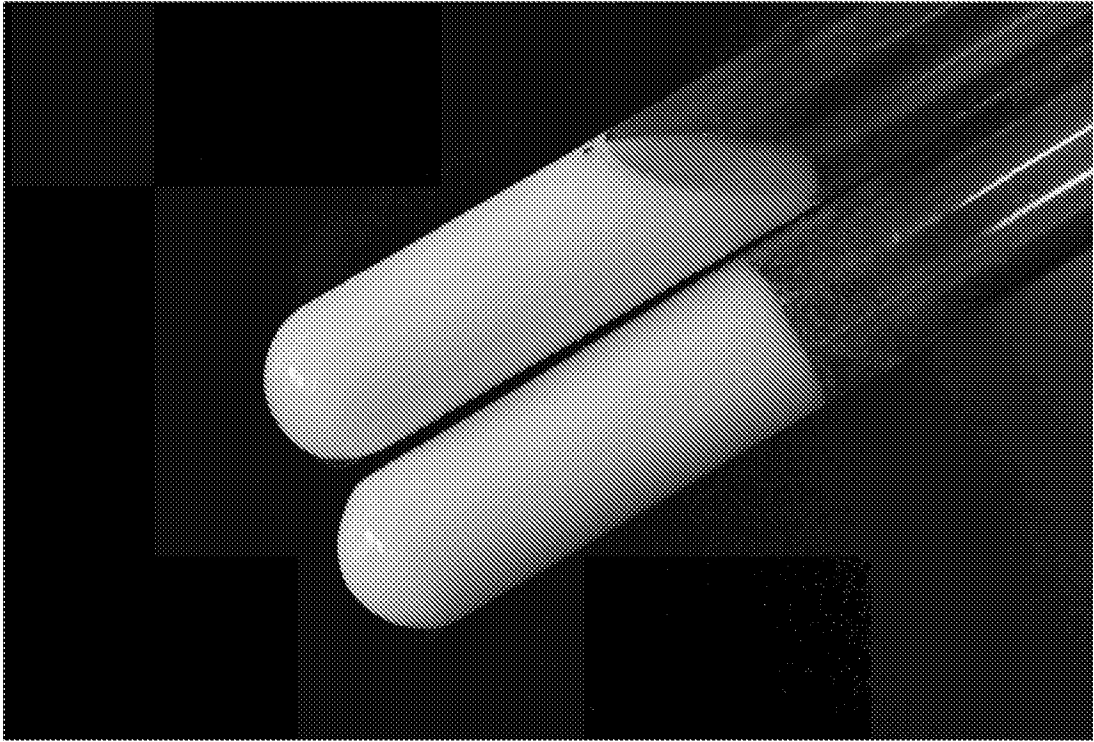


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/081446

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20 (2006.01) i; C12N 9/64 (2006.01) i; A23C 19/032 (2006.01) i; C12R 1/01 (2006.01) n
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N A23C C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CNABS; DWPI; CNKI; BIOSIS; PubMed: cheese, pepsin, rennet, chymosin, rennin, paenibacillus, bacillus, damxungensis

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 102041237 A (GANSU AGRICULTURAL UNIVERSITY), 04 May 2011 (04.05.2011), see the whole document	1-11
A	CN 103211035 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 24 July 2013 (24.07.2013), see the whole document	1-11
PA	CN 103740618 A (BRIGHT DAIRY & FOOD CO., LTD.), 23 April 2014 (23.04.2014), see the whole document	1-11
A	SONG, Xi et al. "Separation and Identification of A Chymosin Producing Bacterium from Soil of Yak Grazing District in Tianzhu Country of Gansu Province", FOOD SCIENCE, volume 30, number 11, 31 December 2009 (31.12.2009), pages 158-162	1-11
A	ZHANG, Weibing et al. "Study on isolation, identification of Bacillus amyloliquefaciens producing chymosin and enzyme properties", SCIENCE AND TECHNOLOGY OF FOOD INDUSTRY, number 7, 31 December 2012 (31.12.2012), pages 172-176 and 180	1-11

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
28 September 2014 (28.09.2014)

Date of mailing of the international search report
04 November 2014 (04.11.2014)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
SU, Lin
Telephone No.: (86-10) **62411030**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/081446

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102041237 A	04 May 2011	CN 102041237 B	25 July 2012
CN 103211035 A	24 July 2013	None	
CN 103740618 A	23 April 2014	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/081446

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12N 1/20(2006.01)i; C12N 9/64(2006.01)i; A23C 19/032(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N A23C C12R</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;DWPI;CNKI;BIOSIS;PubMed:凝乳酶, 类芽孢杆菌, 干酪, 芽孢杆菌, 类芽孢杆菌, pepsin, rennet, chymosin, rennin, paenibacillus, bacillus, pepsin, damxungensis</p>																														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 102041237 A (甘肃农业大学) 2011年 5月 04日 (2011 - 05 - 04) 参见全文</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 103211035 A (江南大学) 2013年 7月 24日 (2013 - 07 - 24) 参见全文</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>PA</td> <td>CN 103740618 A (光明乳业股份有限公司) 2014年 4月 23日 (2014 - 04 - 23) 参见全文</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>宋曦, 等. "天祝放牧牦牛生活环境土壤中一株产凝乳酶细菌的分离与鉴定." 食品科学, 第30卷卷, 第11期期, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 第158-162页</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>张卫兵, 等. "一株产凝乳酶解淀粉芽孢杆菌的筛选、鉴定及酶学性质." 食品工业科技, 第7期期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 第172-176和180页</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table> <p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</td> </tr> <tr> <td>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)</td> <td>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td>"&" 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td> <td></td> </tr> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 102041237 A (甘肃农业大学) 2011年 5月 04日 (2011 - 05 - 04) 参见全文	1-11	A	CN 103211035 A (江南大学) 2013年 7月 24日 (2013 - 07 - 24) 参见全文	1-11	PA	CN 103740618 A (光明乳业股份有限公司) 2014年 4月 23日 (2014 - 04 - 23) 参见全文	1-11	A	宋曦, 等. "天祝放牧牦牛生活环境土壤中一株产凝乳酶细菌的分离与鉴定." 食品科学, 第30卷卷, 第11期期, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 第158-162页	1-11	A	张卫兵, 等. "一株产凝乳酶解淀粉芽孢杆菌的筛选、鉴定及酶学性质." 食品工业科技, 第7期期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 第172-176和180页	1-11	"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件	"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性	"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)	"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性	"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	"&" 同族专利的文件	"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																												
A	CN 102041237 A (甘肃农业大学) 2011年 5月 04日 (2011 - 05 - 04) 参见全文	1-11																												
A	CN 103211035 A (江南大学) 2013年 7月 24日 (2013 - 07 - 24) 参见全文	1-11																												
PA	CN 103740618 A (光明乳业股份有限公司) 2014年 4月 23日 (2014 - 04 - 23) 参见全文	1-11																												
A	宋曦, 等. "天祝放牧牦牛生活环境土壤中一株产凝乳酶细菌的分离与鉴定." 食品科学, 第30卷卷, 第11期期, 2009年 12月 31日 (2009 - 12 - 31), 第158-162页	1-11																												
A	张卫兵, 等. "一株产凝乳酶解淀粉芽孢杆菌的筛选、鉴定及酶学性质." 食品工业科技, 第7期期, 2012年 12月 31日 (2012 - 12 - 31), 第172-176和180页	1-11																												
"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件																													
"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性																													
"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 (如具体说明的)	"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性																													
"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	"&" 同族专利的文件																													
"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件																														
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																													
2014年 9月 28日	2014年 11月 04日																													
ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员																													
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国	苏林																													
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62411030																													

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/081446

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 102041237 A	2011年 5月 04日	CN 102041237 B	2012年 7月 25日
CN 103211035 A	2013年 7月 24日	无	
CN 103740618 A	2014年 4月 23日	无	