



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102994605 B

(45) 授权公告日 2014. 03. 19

(21) 申请号 201210495067. 8

(22) 申请日 2012. 11. 28

(73) 专利权人 张有聪

地址 100086 北京市海淀区清河安宁庄西路  
15 号怡美家园 1 号楼 3 单元 102 室

(72) 发明人 张有聪 郝永清 史彬林 任国军

(74) 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理  
有限公司 11100

代理人 王淳

(51) Int. Cl.

C12P 39/00 (2006. 01)

C12P 21/06 (2006. 01)

A23K 1/16 (2006. 01)

C12R 1/125 (2006. 01)

C12R 1/685 (2006. 01)

C12R 1/69 (2006. 01)

C12R 1/74 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1698457 A, 2005. 11. 23, 全文.

CN 1403583 A, 2003. 03. 19, 全文.

CN 101440390 A, 2009. 05. 27, 全文.

黄思敏等. 酶解及二次发酵豆粕生产富肽蛋白的研究. 《粮食与饲料工业》. 2012, (第 8 期), 43-46.

姜曼等. 混合菌种固态发酵大豆粕生产大豆肽研究. 《粮食与油脂》. 2009, (第 3 期), 30-31.

常磊等. 饲用酶与芽孢杆菌协同作用发酵豆粕的相关研究. 《饲料工业》. 2011, 第 32 卷 (第 22 期), 21-26.

吴胜华等. 多菌种固态发酵豆粕生产小肽饲料. 《食品与发酵工业》. 2008, 第 34 卷 (第 10 期), 113-115.

张春红等. 复合酶解法制备大豆功能肽的研究. 《粮食加工》. 2008, 第 33 卷 (第 5 期), 36-38.

崔广荣等. 固体发酵制曲结合酶法生产酶解植物蛋白的研究. 《中国调味品》. 2003, (第 288 期), 27-31.

审查员 皇甫洁琼

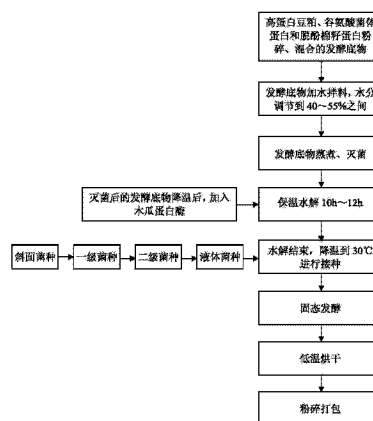
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种通过酶解和微生物发酵生产高效生物肽的方法

(57) 摘要

一种通过酶解和微生物发酵生产高效生物肽的方法, 是将发酵底物粉碎并混合均匀后, 加水拌料, 然后蒸煮灭菌; 待温度降到 50 ~ 55℃ 时, 加入蛋白酶进行水解; 水解完毕后, 温度降至 28 ~ 35℃ 时, 将混合菌液加入水解后的发酵底物中, 搅拌均匀, 在恒温条件下好氧发酵; 发酵完毕的物料经低温烘干后进行粉碎即得到所述高效生物肽成品。所述发酵底物的组成为: 高蛋白豆粕 50 ~ 60 重量份、谷氨酸菌体蛋白 10 ~ 20 重量份以及脱酚棉籽蛋白 30 ~ 40 重量份; 各组分经粉碎并过 40 目筛后混合均匀。所述的混合菌液为黑曲霉、热带假丝酵母、米曲霉和枯草芽孢杆菌的菌液按照 1:1:1:1 的比例混合得到的混合菌液; 混合菌液按 5 ~ 10% 的重量百分比接种入水解后的发酵底物中。



1. 一种通过酶解和微生物发酵生产高效生物肽的方法,其特征在于,  
(1) 将发酵底物粉碎并混合均匀后,加水拌料,然后蒸煮灭菌;  
(2) 灭菌后的发酵底物温度降到 50 ~ 55℃时,加入蛋白酶进行水解;  
(3) 发酵底物水解完毕后,温度降至 28 ~ 35℃时,将混合菌液加入水解后的发酵底物中,搅拌均匀,在恒温条件下好氧发酵;

(4) 发酵完毕的物料经低温烘干后进行粉碎即得到所述高效生物肽成品;

步骤(1)中,所述的发酵底物的组成为:高蛋白豆粕 50 ~ 60 重量份、谷氨酸菌体蛋白 10 ~ 20 重量份以及脱酚棉籽蛋白 30 ~ 40 重量份;各组分经粉碎并过 40 目筛后混合均匀;

步骤(3)中,所述的混合菌液为黑曲霉、热带假丝酵母、米曲霉和枯草芽孢杆菌的菌液按照 1:1:1:1 的比例混合得到的混合菌液;混合菌液按 5 ~ 10% 的重量百分比接种入水解后的发酵底物中。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤(1)中所述的加水拌料,是对发酵底物按料水比 1:1 ~ 2 加水后进行拌料,拌料后发酵底物的水分在 40 ~ 55% 之间;加入的水提前用 0.1 ~ 0.2mol/L 的盐酸和氢氧化钠调节 pH 到 6.0-7.0 之间;

步骤(1)中所述的蒸煮灭菌,是在 115 ~ 121℃、0.07 ~ 0.11MPa 条件下蒸煮灭菌 20 ~ 30min。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤(2)中所述的蛋白酶为木瓜蛋白酶,按发酵底物重量的 1 ~ 2% 加入 40 万 U/g 的木瓜蛋白酶。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤(2)中所述的水解为保持 50 ~ 55℃ 的温度水解 10 ~ 12h。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的黑曲霉菌液和米曲霉菌液是按以下方法制成的:

制备一级种子培养基:蔗糖 30g、NaNO<sub>3</sub> 3g、MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.5g、KCl 0.5g、FeSO<sub>4</sub> · 4H<sub>2</sub>O 0.014g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.0g,蒸馏水 1000mL 混合均匀,调节 pH 为 6.0 ~ 6.5,在温度 115 ~ 121℃ 下灭菌 20 ~ 30min;

制备二级种子培养基和发酵培养基:葡萄糖 20kg、麦芽浸粉 5kg、酵母浸粉 5kg、玉米粉 10kg,无菌纯水 1000L, pH 自然,在温度 115 ~ 121℃ 下灭菌 20 ~ 30min;

一级种子培养:1000mL 三角瓶中装一级种子培养基 500mL,接入菌种斜面制成浓度 1.5 ~ 2.0 × 10<sup>6</sup> 个/mL 的孢子悬液 50mL,28 ~ 30℃ 下以 130r/min 振荡培养 24h;

二级种子培养:将经所述一级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的重量比接种到二级种子罐中,在 28 ~ 30℃、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下,以 100r/min 机械搅拌,培养 24 ~ 48h;

液体发酵培养:将经所述二级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的质量比接种到发酵罐中,在 28 ~ 30℃、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下,以 100r/min 机械搅拌,培养 24 ~ 48h。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的热带假丝酵母菌液是按以下方法制成的:

制备一级种子培养基:麦芽汁培养基 130.1g,蒸馏水 1000mL 混合均匀,在温度 115 ~ 121℃ 下灭菌 15min ~ 30min;

制备二级种子培养基和发酵培养基:蔗糖蜜 120kg、葡萄糖 10kg、麦芽浸粉 10kg、酵母

浸粉 10kg、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5kg、 $KH_2PO_4$  2.0kg, 无菌纯水 1000L, pH 自然, 在温度 115 ~ 121°C 下灭菌 20 ~ 30min ;

一级种子培养 :1000mL 三角瓶中装一级种子培养基 500mL, 将菌种斜面按环 /80 ~ 100mL 的比例接种入一级种子培养基中, 28 ~ 30°C 下以 130r/min 振荡培养 24 ~ 48h ;

二级种子培养 :将经所述一级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的重量比接种到二级种子罐中, 在 28 ~ 30°C、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下, 以 100r/min 机械搅拌, 培养 24 ~ 48h ;

液体发酵培养 :将经所述二级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的重量比接种到发酵罐中, 在 28 ~ 30°C、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下, 以 100r/min 机械搅拌, 培养 24 ~ 48h。

7. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述的枯草芽孢杆菌菌液是按以下方法制成的 :

制备一级种子培养基 :蛋白胨 10g、牛肉浸膏 3g、NaCl 5g, 蒸馏水 1000mL 混合均匀, 在温度 115 ~ 121°C 下灭菌 20min ~ 30min ;

制备二级种子培养基和发酵培养基 :葡萄糖 15kg、酵母浸粉 5kg、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5kg, 无菌纯水 1000L, pH 自然, 在温度 115 ~ 121°C 下灭菌 20min ~ 30min ;

一级种子培养 :1000mL 三角瓶中装一级种子培养基 500mL, 将菌种斜面按环 /50 ~ 70mL 的比例接种入一级种子培养基中, 32 ~ 35°C 下以 130r/min 振荡培养 24 ~ 48h ;

二级种子培养 :将经所述一级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的重量比接种到二级种子罐中, 在 32 ~ 35°C、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下, 以 100r/min 机械搅拌, 培养 24 ~ 48h ;

液体发酵培养 :将经所述二级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的重量比接种到发酵罐中, 在 32 ~ 35°C、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下, 以 100r/min 机械搅拌、培养 24 ~ 48h。

8. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 步骤(3)中所述的好氧发酵, 是将由发酵底物和混合菌液搅拌均匀组成的发酵物料平铺在发酵床上, 发酵物料堆高厚度为 25 ~ 30cm, 控制温度在 28 ~ 35°C, 相对湿度在 85 ~ 90% 的条件下发酵 72 ~ 168h, 发酵期间每隔 24h 将物料翻动一次。

9. 根据权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 步骤(4)中所述的低温烘干的温度为 80 ~ 100°C, 所述烘干后物料的粉碎的粒度为至少 95% 通过 80 目筛且 100% 通过 65 目筛。

10. 按照权利要求 1 ~ 9 中任一项所述方法制备得到的高效生物肽。

## 一种通过酶解和微生物发酵生产高效生物肽的方法

### 技术领域

[0001] 本发明是关于一种通过酶解和微生物发酵生产高效生物肽的方法,属于微生物饲料添加剂领域。

### 背景技术

[0002] 现代工业化生产小肽的主要方法有分离法、酸碱水解法、生物合成法、DNA 重组技术、蛋白质酶解法以及生物发酵法。分离法是将动物体组织中富含的多种活性肽提取作为添加剂,但用此法获得的肽成本较高,副作用较大且来源种类有限。酸碱水解法是通过强酸、强碱的作用分解大分子蛋白质为小分子肽,但由于强酸强碱具有腐蚀性,会带来大量污染,并且酸碱水解过程中水解程度不易控制,氨基酸受到较大破坏,影响肽的结构和功能。生物合成法是把精细化工生产的氨基酸人工嫁接成单肽,此法主要用于生产高活性的药理级小肽,其缺点是副产品多、成本高、效率低、产品需分离提纯,而且生产过程中大量使用的有毒溶剂不仅会污染环境,而且有损人体健康。DNA 重组技术目前仅限于大分子活性多肽和蛋白质的生产,该法中小分子基因片段操作、表达与检测均存在着不少困难,且不易筛选到高效表达的菌株、菌株的产量较低。蛋白质酶解法具有产品安全性高、生产条件温和、水解易控制、可定位生产特定的肽等优点。缺点是蛋白质水解过程中产生的苦味、臭味无法完全控制,降低和脱除水解过程中的苦味和臭味的成本较高;蛋白利用率不高;用于水解的酶制剂仅限于食品工业中少数几种微生物蛋白酶、动物蛋白酶和植物蛋白酶;蛋白质酶解法由于没有微生物的参与改造,所产生的肽类大多带有苦味,适口性差,无法完全去除原料中的抗营养因子。生物发酵法则采用现代生物发酵工程技术,通过发酵过程中微生物分泌的酶将基料中的部分蛋白酶解为小肽,它具有原料来源广泛、反应条件温和、生产成本低、环保等优点,但产肽率相对酶解法较低。因此,如何能有效的提高小肽的生产率、降低生产成本同时降低和去除蛋白质酶解造成的产品缺陷,成为了小肽工业化、规模化生产的一个研究重点。

### 发明内容

[0003] 本发明的目的在于,针对上述缺陷,提供一种通过酶解和微生物发酵生产高效生物肽的方法。

[0004] 为实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0005] 一种通过酶解和微生物发酵生产高效生物肽的方法,其特征在于:

[0006] (1) 将发酵底物粉碎并混合均匀后,加水拌料,然后蒸煮灭菌;

[0007] (2) 灭菌后的发酵底物温度降到 50 ~ 55℃时,加入蛋白酶进行水解;

[0008] (3) 发酵底物水解完毕后,温度降至 28 ~ 35℃时,将混合菌液加入水解后的发酵底物中,搅拌均匀,在恒温条件下好氧发酵;

[0009] (4) 发酵完毕的物料经低温烘干后进行粉碎即得到所述高效生物肽成品;

[0010] 步骤(1)中,所述的发酵底物的组成为:高蛋白豆粕 50 ~ 60 重量份、谷氨酸菌体

蛋白 10 ~ 20 重量份以及脱酚棉籽蛋白 30 ~ 40 重量份 ;各组分经粉碎并过 40 目筛后混合均匀 ;

[0011] 步骤(3)中,所述的混合菌液为黑曲霉(*Aspergillus niger*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的菌液按照 1:1:1:1 的比例混合得到的混合菌液 ;混合菌液按 5 ~ 10% 的重量百分比接种入水解后的发酵底物中。

[0012] 如上所述的方法,优选地,步骤(1)中所述的加水拌料,是对发酵底物按料水比 1:1 ~ 2 加水后进行拌料,拌料后发酵底物的水分在 40 ~ 55% 之间 ;加入的水提前用 0.1 ~ 0.2mol/L 的盐酸和氢氧化钠调节 pH 到 6.0~7.0 之间 ;

[0013] 步骤(1)中所述的蒸煮灭菌,是在 115 ~ 121℃、0.07 ~ 0.11MPa 条件下蒸煮灭菌 20 ~ 30min。

[0014] 如上所述的方法,优选地,步骤(2)中所述的蛋白酶为木瓜蛋白酶,按发酵底物重量的 1 ~ 2% 加入 40 万 U/g 的木瓜蛋白酶。

[0015] 如上所述的方法,优选地,步骤(2)中所述的水解为保持 50 ~ 55℃ 的温度水解 10 ~ 12h。

[0016] 如上所述的方法,优选地,所述的黑曲霉菌液和米曲霉菌液是按以下方法制成的 :

[0017] 制备一级种子培养基 :蔗糖 30g、NaNO<sub>3</sub>3g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g、KCl 0.5g、FeSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.014g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1.0g,蒸馏水 1000mL 混合均匀,调节 pH 为 6.0 ~ 6.5,在温度 115 ~ 121℃ 下灭菌 20 ~ 30min ;

[0018] 制备二级种子培养基和发酵培养基 :葡萄糖 20kg、麦芽浸粉 5kg、酵母浸粉 5kg、玉米粉 10kg,无菌纯水 1000L, pH 自然,在温度 115 ~ 121℃ 下灭菌 20 ~ 30min ;

[0019] 一级种子培养 :1000mL 三角瓶中装一级种子培养基 500mL,接入菌种斜面制成浓度 1.5 ~ 2.0×10<sup>6</sup> 个 /mL 的孢子悬液 50mL,28 ~ 30℃ 下以 130r/min 振荡培养 24h ;

[0020] 二级种子培养 :将经所述一级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的重量比接种到二级种子罐中,在 28 ~ 30℃、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下,以 100r/min 机械搅拌,培养 24 ~ 48h ;

[0021] 液体发酵培养 :将经所述二级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的质量比接种到发酵罐中,在 28 ~ 30℃、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下,以 100r/min 机械搅拌,培养 24 ~ 48h。

[0022] 如上所述的方法,优选地,所述的热带假丝酵母菌液是按以下方法制成的 :

[0023] 制备一级种子培养基 :麦芽汁培养基 130.1g,蒸馏水 1000mL 混合均匀,在温度 115 ~ 121℃ 下灭菌 15min ~ 30min ;

[0024] 制备二级种子培养基和发酵培养基 :蔗糖蜜 120kg、葡萄糖 10kg、麦芽浸粉 10kg、酵母浸粉 10kg、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1.5kg、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>2.0kg,无菌纯水 1000L, pH 自然,在温度 115 ~ 121℃ 下灭菌 20 ~ 30min ;

[0025] 一级种子培养 :1000mL 三角瓶中装一级种子培养基 500mL,将菌种斜面按环 /80 ~ 100mL 的比例接种入一级种子培养基中,28 ~ 30℃ 下以 130r/min 振荡培养 24 ~ 48h ;

[0026] 二级种子培养 :将经所述一级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的重量比接种到二级

种子罐中,在 28 ~ 30℃、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下,以 100r/min 机械搅拌,培养 24 ~ 48h ;

[0027] 液体发酵培养:将经所述二级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的重量比接种到发酵罐中,在 28 ~ 30℃、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下,以 100r/min 机械搅拌,培养 24 ~ 48h。

[0028] 如上所述的方法,优选地,所述的枯草芽孢杆菌菌液是按以下方法制成的:

[0029] 制备一级种子培养基:蛋白胨 10g、牛肉浸膏 3g、NaCl 5g,蒸馏水 1000mL 混合均匀,在温度 115 ~ 121℃ 下灭菌 20min ~ 30min。

[0030] 制备二级种子培养基和发酵培养基:葡萄糖 15kg、酵母浸粉 5kg、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5kg,无菌纯水 1000L,PH 自然,在温度 115 ~ 121℃ 下灭菌 20min ~ 30min。

[0031] 一级种子培养:1000mL 三角瓶中装一级种子培养基 500mL,将菌种斜面按环 /50 ~ 70mL 的比例接种入一级种子培养基中,32 ~ 35℃ 下以 130r/min 振荡培养 24 ~ 48h ;

[0032] 二级种子培养:将经所述一级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的重量比接种到二级种子罐中,在 32 ~ 35℃、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下,以 100r/min 机械搅拌,培养 24 ~ 48h ;

[0033] 液体发酵培养:将经所述二级种子培养的菌液按照 5 ~ 10% 的重量比接种到发酵罐中,在 32 ~ 35℃、通风量体积比为 1:0.5 ~ 1 的条件下,以 100r/min 机械搅拌、培养 24 ~ 48h。

[0034] 如上所述的方法,优选地,步骤(3)中所述的好氧发酵,是将由发酵底物和混合菌液搅拌均匀组成的发酵物料平铺在发酵床上,发酵物料堆高厚度为 25 ~ 30cm,控制温度在 28 ~ 35℃,相对湿度在 85 ~ 90% 的条件下发酵 72 ~ 168h,发酵期间每隔 24h 将物料翻动一次。

[0035] 如上所述的方法,优选地,步骤(4)中所述的低温烘干的温度为 80 ~ 100℃,所述烘干后物料的粉碎的粒度为至少 95% 通过 80 目筛且 100% 通过 65 目筛。

[0036] 如上所述的方法制备得到的高效生物肽。

[0037] 如上所述方法制备得到的高效生物肽,其中的生物活性小肽含量 > 26.10%,粗蛋白质含量 > 52.00%。

[0038] 本发明的有益效果在于:

[0039] 本发明选用性能优良的菌种和蛋白酶,并采用酶解和微生物固态发酵相结合的生产工艺,经过对酶解、接种后的高蛋白豆粕、谷氨酸菌体蛋白和脱酚棉籽蛋白混合发酵底物进行深度固态发酵后,可获得高浓度微生物活性肽产品,从而提供了一种易于规模化生产的生物活性肽的制备方法及按照该方法所制备得到的活性肽制品。

[0040] 更具体地说,本发明提供的通过酶解和微生物发酵生产高效生物肽的方法具有以下优点:

[0041] 1、利用本发明方法,生物活性小肽的生产率大幅提高,并且本发明方法的生产工艺简单、生产成本低,易于大规模工业化生产。

[0042] 2、本发明对酶解后的物料通过微生物二次发酵后对某些苦味肽基团进行修饰和重组,使小肽之间、小肽与氨基酸之间发生移接、重排,制得的活性肽产品具有溶解性好,无苦味和异味,口感好,溶解粘度小,受热不凝固等优点。克服了酶解法产品苦味大和口感差

等缺点,应用前景较好,是生产饲用小肽的最佳选择。

[0043] 3、采用本发明方法生产的高效生物肽中,小肽含量较高且质量好,本发明产品中的生物活性小肽含量(DM) > 26.10%,粗蛋白质含量(DM) > 52.00%。

#### 附图说明

[0044] 图1为本发明方法的流程示意图。

#### 具体实施方式

[0045] 以下通过具体实施例详细说明本发明的技术及特点,但这些实施例并非用以限定本发明的保护范围。

[0046] 本发明以下实施例中所用黑曲霉(*Aspergillus niger*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)菌种是分别购买于中国普通微生物菌种保藏管理中心(CGMCC)和中国农业微生物保藏管理中心(ACCC)的野生菌种。保藏号分别为:CGMCC 3.316、CGMCC 2.617、CGMCC 3.4437、ACCC 10619。

[0047] 实施例1

[0048] 参见图1,按照以下方法制备本实施例的生物活性肽:

[0049] 1. 将高蛋白豆粕500kg、谷氨酸菌体蛋白200kg、脱酚棉籽蛋白350kg经粉碎后过40目筛混合均匀制成发酵底物。

[0050] 2. 发酵底物按料水比1:1.2进行加水拌料,将物料水分调节到50%左右,加入的水提前用0.2mol/L的盐酸和氢氧化钠调节pH到6.5,然后在121℃、0.11MPa条件下蒸煮灭菌30min。

[0051] 3. 待灭菌后的发酵底物温度降到50℃时,按发酵底物重量1%的比例加入木瓜蛋白酶(40万U/g)1kg,保温水解12h。

[0052] 4. 将黑曲霉(*Aspergillus niger*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)分别按以下方法进行增菌培养和液态发酵:

[0053] (1) 黑曲霉(*Aspergillus niger*)和米曲霉(*Aspergillus oryzae*)

[0054] A. 制备一级种子培养基:蔗糖30g、NaNO<sub>3</sub>3g、MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.5g、KCl0.5g、FeSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.014g、K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>1.0g,蒸馏水1000mL混合均匀,调节pH为6.0~6.5,在温度115℃下灭菌30min。

[0055] B. 制备二级种子培养基和发酵培养基:葡萄糖20kg、麦芽浸粉5kg、酵母浸粉5kg、玉米粉10kg,无菌纯水1000L,pH自然,在温度121℃下灭菌30min。

[0056] C. 培养条件:

[0057] 一级种子培养:1000mL三角瓶中装一级种子培养基500mL,接入菌种斜面制成的孢子悬液(1.5~2.0×10<sup>6</sup>个/mL)50mL,28℃、130r/min、振荡培养24h。

[0058] 二级种子培养:10L自动种子发酵罐装二级种子培养基5L,然后将上述经一级种子培养的菌液按照10%的质量比接种到二级种子罐中,28~30℃、通风量体积比1:1、机械搅拌100r/min、培养24h。

[0059] 液体发酵培养:50L 自动发酵罐装发酵培养基 25L,将上述经二级种子培养的菌液按照 10% 的质量比接种到发酵罐中,28℃、通风量体积比 1:1、机械搅拌 100r/min、培养 24h。

[0060] (2) 热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)

[0061] A. 制备一级种子培养基:麦芽汁培养基 130.1g,蒸馏水 1000mL 混合均匀,在温度 115℃ 下灭菌 15min。

[0062] B. 制备二级种子培养基和发酵培养基:蔗糖蜜 120kg、葡萄糖 10kg、麦芽浸粉 10kg、酵母浸粉 10kg、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1.5kg、 $KH_2PO_4$  2.0kg,无菌纯水 1000L, pH 自然,在温度 121℃ 下灭菌 30min。

[0063] C. 培养条件:

[0064] 一级种子培养:1000mL 三角瓶中装一级种子培养基 500mL,将菌种斜面按环/100mL 的比例接种入一级种子培养基中,28℃、130r/min、振荡培养 24h。

[0065] 二级种子培养:10L 自动种子发酵罐装二级种子培养基 5L,将上述经一级种子培养的菌液按照 10% 的重量比接种到二级种子罐中,28℃、通风量体积比 1:0.8、机械搅拌 100r/min、培养 24h。

[0066] 液体发酵培养:50L 自动发酵罐装发酵培养基 25L,将上述经二级种子培养的菌液按照 10% 的质量比接种到发酵罐中,28℃、通风量体积比 1:0.8、机械搅拌 100r/min、培养 24h。

[0067] (3) 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)

[0068] A. 制备一级种子培养基:蛋白胨 10g、牛肉浸膏 3g、NaCl 5g,蒸馏水 1000mL 混合均匀,在温度 121℃ 下灭菌 30min。

[0069] B. 制备二级种子培养基和发酵培养基:葡萄糖 15kg、酵母浸粉 5kg、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.5kg,无菌纯水 1000L, pH 自然,在温度 121℃ 下灭菌 30min。

[0070] C. 培养条件:

[0071] 一级种子培养:1000mL 三角瓶中装一级种子培养基 500mL,将菌种斜面按环/50mL 的比例接种入一级种子培养基中,35℃、130r/min、振荡培养 24h。

[0072] 二级种子培养:10L 自动种子发酵罐装发酵培养基 5L,将上述经一级种子培养的菌液按照 10% 的质量比接种到二级种子罐中,35℃、通风量体积比 1:1、机械搅拌 100r/min、培养 24h。

[0073] 液体发酵培养:50L 自动种子发酵罐装发酵培养基 25L,将上述经二级种子培养的菌液按照 10% 的质量比接种到发酵罐中,35℃、通风量体积比 1:1、机械搅拌 100r/min、培养 24h。

[0074] 5. 发酵底物水解完毕后,温度降至 30℃ 时,将 4 种菌液按 1:1:1:1 比例进行混合,然后将混合菌液按 10% 的重量百分比接种入水解后的发酵底物中,混合均匀后平铺在发酵床上,发酵物料堆高厚度为 25cm,控制温度 30℃,相对湿度 85~90% 条件下发酵 120h,发酵期间每隔 24h 将物料翻动一次。

[0075] 6. 发酵完毕的物料经 80℃ 低温烘干后进行细粉碎即得高效生物肽成品,粉碎粒度为至少 95% 通过 80 目筛、100% 通过 65 目筛。

[0076] 7. 按照以上方法制备得到的高效生物肽,采用三氯乙酸法检测小肽含量为 26.90% (DM),凯氏定氮法检测粗蛋白质含量为 55.00% (DM)。



[0077] 实施例 2

[0078] 参见图 1, 按照以下方法制备本实施例的生物活性肽:

[0079] 1. 将高蛋白豆粕 600kg、谷氨酸菌体蛋白 100kg、脱酚棉籽蛋白 300kg 经粉碎后过 40 目筛混合均匀制成发酵底物。

[0080] 2. 发酵底物按料水比 1:1.2 进行加水拌料, 将物料水分调节到 50% 左右, 加入的水提前用 0.2mol/L 的盐酸和氢氧化钠调节 pH 到 6.5, 然后在 121℃、0.11MPa 条件下蒸煮灭菌 30min。

[0081] 3. 待灭菌后的发酵底物温度降到 50℃ 时, 按发酵底物重量 1.5% 的比例加入木瓜蛋白酶(40 万 U/g) 1kg, 保温水解 12h。

[0082] 4. 将黑曲霉(*Aspergillus niger*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)分别按如实施例 1 所述的方法进行增菌培养和液态发酵。

[0083] 5. 发酵底物水解完毕后, 温度降至 30℃ 时, 将 4 种菌液按 1:1:1:1 比例进行混合, 然后将混合菌液按 10% 的重量百分比接种入水解后的发酵底物中, 混合均匀后平铺在发酵床上, 发酵物料堆高厚度为 25cm, 控制温度 30℃, 相对湿度 85~90% 条件下发酵 120h, 发酵期间每隔 24h 将物料翻动一次。

[0084] 6. 发酵好的物料经 80℃ 低温烘干后进行细粉碎即得高效生物肽成品, 粉碎粒度为至少 95% 通过 80 目筛、100% 通过 65 目筛。

[0085] 7. 按照以上方法制备得到的高效生物肽, 采用三氯乙酸法检测小肽含量为 26.10% (DM), 凯氏定氮法检测粗蛋白质含量为 52.00% (DM)。

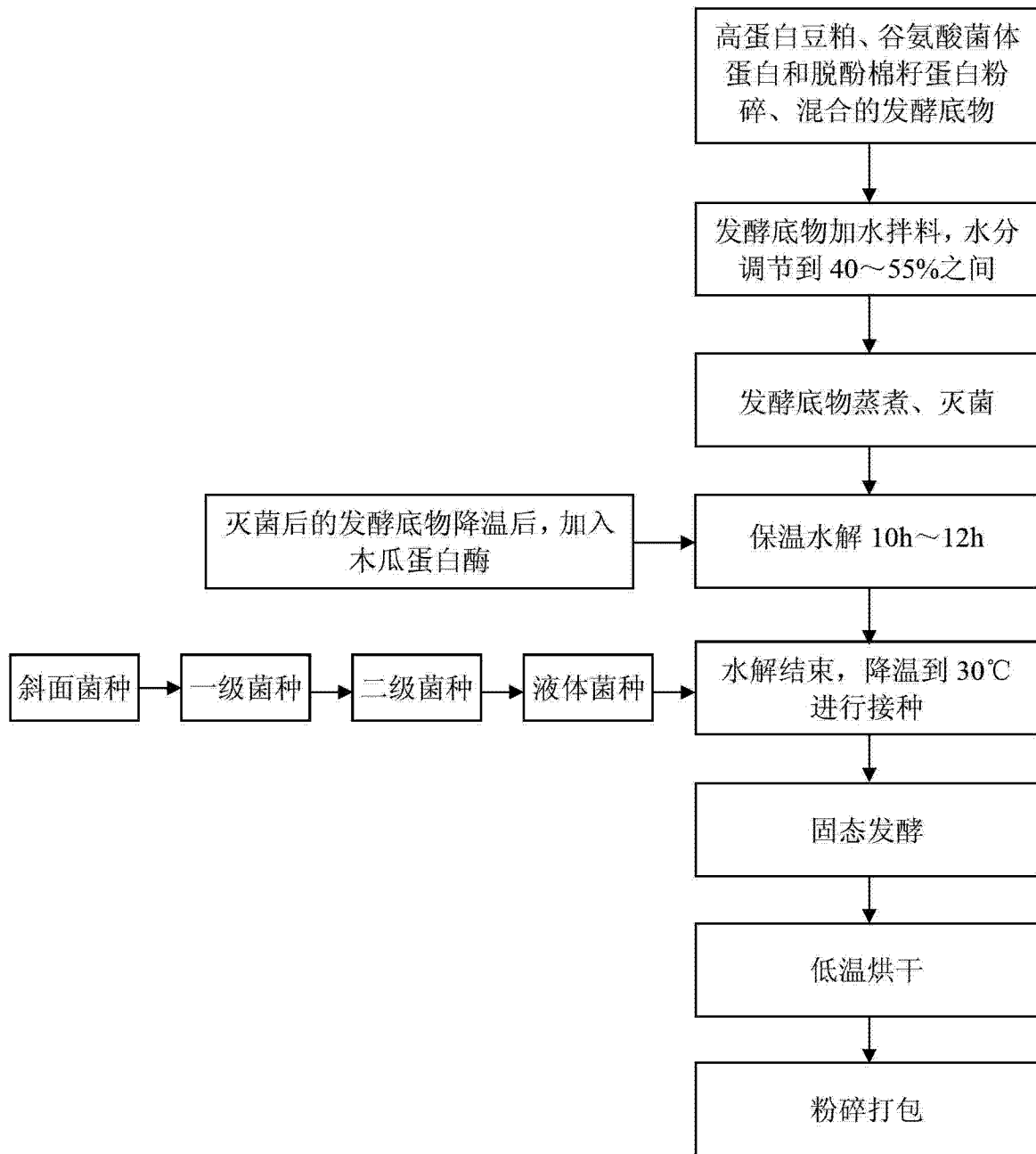


图 1