



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101979526 A

(43) 申请公布日 2011. 02. 23

(21) 申请号 201010532430. X

*C12N 9/16* (2006. 01)

(22) 申请日 2010. 11. 05

*C12R 1/685* (2006. 01)

(71) 申请人 山西三盟实业发展有限公司

*C12R 1/69* (2006. 01)

地址 030032 山西省太原市经济技术开发区  
正阳街 59 号

*C12R 1/845* (2006. 01)

(72) 发明人 宋春雪 林汲 丁静 张茜  
张春杰 赵红年

(74) 专利代理机构 山西太原科卫专利事务所  
14100

代理人 朱源

(51) Int. Cl.

*C12N 9/00* (2006. 01)

*C12N 9/34* (2006. 01)

*C12N 9/42* (2006. 01)

*C12N 9/62* (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

一种醋用复合酶制剂的制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种醋用复合酶制剂的制备方法,涉及生物工程微生物发酵领域,解决现有酿醋用的大曲活力不高,造成的原料利用率低,环境污染严重,醋的品质低的问题。一种醋用复合酶制剂的制备方法,包括以下步骤:菌种选育;斜面接种;摇瓶扩大培养;两级种子罐培养;2m<sup>3</sup>罐发酵培养;板框过滤;真空低温浓缩,然后将四种浓缩液体酶按照 2 : 2 : 3 : 3 比例混合,即得到醋用复合酶制剂。本发明通过对关键微生物选育并扩大培养,采用液态发酵工艺,生产出适于酿醋用的复合酶系,以补充大曲中相应酶系的不足,强化关键酶系的活性,丰富与老陈醋品质有直接关系的酶系含量,通过与大曲联合应用于酿醋,设计最佳配比,达到提高醋品质及出品率的目的。

1. 一种醋用复合酶制剂的制备方法,其特征是包括以下步骤:

(1) 菌种选育:

将活化后的黑曲霉 AS3.324 接入固体斜面培养基中,30℃,培养 36~40h 后,用生理盐水将菌苔洗下,制备菌悬液,然后在紫外灯 30W,距离 30cm 的条件下照射 50~90s,之后按照 1mg/mL 的加入量加入亚硝基胍,处理 30min,得到高产糖化酶菌株;

以 CICC 编号 2475 黑曲霉为出发菌株,在紫外灯 25~30W,距离 30cm 的条件下照射 150~200s,得到高产纤维素酶菌株;

以沪酿 3042 米曲霉为出发菌株,在紫外灯 20w,距离 28cm 的条件下照射 40~70s,然后接种到氯化锂培养基进行化学诱变 72 小时,得到高产蛋白酶菌株;

以根霉 *Sp. Rhizopus* 3.105 (CICC 编号 40049) 为出发菌株,在紫外灯 30w,距离 20cm 的条件下照射 40~70s,得到高产酯化酶菌株;

(2) 斜面试种:

将上述高产糖化酶菌种接入固体斜面培养基中,30℃,培养 36~40h,所述的固体斜面培养基为 PDA 培养基。

将上述选育的高产纤维素酶黑曲霉菌株接种在斜面培养基上,其中斜面培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的:羧甲基纤维素钠 (CMC) 0.5%、硫酸铵 0.2%、酵母膏 0.1%、琼脂 2%,调 pH7.0~7.2;

将上述选育的高产蛋白酶米曲霉菌株在豆汁斜面培养基中培养,豆汁培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的:豆汁 (5° B'e) 1000mL、可溶性淀粉 20g、磷酸二氢钾 1g、硫酸镁 0.5g、硫酸铵 0.5g、琼脂 20g、调 pH 为 6.5~7.0;

将上述选育的高产酯化酶根霉菌株接种到斜面培养基中培养,在温度 30~35℃ 的条件下培养 72h,斜面培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的:麸皮 20g、蔗糖 1.5g、琼脂 1.5g、水 100mL;

(3) 摇瓶扩大培养:

将上述步骤斜面培养的黑曲霉接种于摇瓶培养基中,其中摇瓶转速为 270r/min,32℃ 恒温摇床培养 120h,其中摇瓶培养基是以下列重量份的各组分为原料制备的:玉米粉 14%,豆饼粉 4%,麸皮 1%,余量为水;

将上述步骤经斜面培养的黑曲霉接种于摇瓶培养基中,摇瓶转速为 150r/m,31℃ 恒温培养 96h,其中摇瓶培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的:稻草粉 5%、麸皮 1%、豆饼粉 3%、玉米浆 2%、磷酸二氢钾 0.5%、氯化钙 0.3%,调 pH6.5~7.5;

将经斜面培养的米曲霉接种于不添加琼脂的豆汁培养基中,转速为 150~190r/m,31℃ 恒温培养 96h;

将经斜面培养的根本霉接种于摇瓶培养基,摇瓶转速为 150r/min,36℃ 恒温摇床培养 36h,其中摇瓶培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的:麸皮 6g、黄豆粉 5g、磷酸氢二钾 0.2g、水 100mL、pH7.0;

(4) 两级种子罐培养:

将上述四种经摇瓶扩大培养的菌株分别放入一级种子罐,接种量 10%,在转速 200~280r/min,温度 32℃ 的条件下培养 45-50h;

分别将上述四种经一级种子罐培养的菌种转入二级罐,在转速 220r/min,电机功率

11kW, 温度 34℃ 的条件下培养 30 ~ 35h ;

上述的种子罐培养基分别是按照下列重量比的各组分为原料制备的 :

高产糖化酶黑曲霉菌株种子培养基 : 淀粉 10%、豆饼粉 4%、麸皮 1%、磷酸氢二钾 0.3%、氯化钙 0.1% ;

高产纤维素酶菌株种子培养基 : 稻草粉 5%、玉米粉 1%、麸皮 1%、硫酸铵 0.3%、氯化钙 0.1%、调 pH7.0 ~ 7.2 ;

高产蛋白酶菌株种子培养基 : 麸皮 : 高粱粉 : 水 = 4 : 1 : 4 ;

高产酯化酶菌株种子培养基 : 麸皮 6% , 豆粕水解液 7% , 磷酸氢二铵 0.3% , 氯化钙 0.5% ;

(5) 2m<sup>3</sup> 罐发酵培养 :

将上述四种经二级发酵罐培养的菌种转入 2m<sup>3</sup> 发酵罐, 在电机功率 55kW, 搅拌转速 160-200r/min, 温度 31℃ 的条件下发酵, 待二次测定酶活力单位不再上升时即可终止发酵 ;

(6) 板框过滤 : 操作压力 0.3-0.6Mpa ;

(7) 真空低温浓缩, 然后将四种浓缩液体酶按照 2 : 2 : 3 : 3 比例混合, 即得得到醋用复合酶制剂。

## 一种醋用复合酶制剂的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程微生物发酵领域,涉及酿醋工艺用的酶制剂,具体涉及一种醋用复合酶制剂的制备方法。

### 背景技术

[0002] 大曲是酿造业生产的动力,在酿造过程中起着重要的糖化、发酵、生香作用,直接影响食醋的质量、产量和风格。制曲是山西老陈醋生产过程中的关键阶段之一,制曲阶段的变化主要是依靠微生物分泌大量的酶,如蛋白酶、淀粉酶、肽酶、纤维素酶等,并利用这些酶分解大分子物质,如蛋白酶将蛋白质水解为氨基酸和多肽,淀粉酶将淀粉分解为单糖等。大曲品质是影响食醋内在品质的重要物质基础。多年来的酿醋实践总结出“曲为醅之根,良曲出佳酿”的精辟论断,同时反映了大曲内在品质与食醋内在品质存在极为密切的关系。由于其开放型的发酵工艺、自然接种、微生物及酶的多样性,融有种类繁多的微生物酶系和纷繁复杂的微生物菌系,成为传统固态发酵酿醋的重要物质保障。制醋所用大曲,都是按照传统工艺,属于自然网络微生物,不进行人为添加种曲,环境因素对其影响较为显著。一方面,生产企业所处的自然地域条件(地理、气候、土壤、水质)是不以人的意志为转移的根本条件,它直接制约着大曲微生物的繁衍栖息;另一方面,大曲、贮存等基础,更是制约食醋内在品质的具体生产条件;此外,我国地域辽阔,环境、气候千差万别,生产的大曲质量也不够稳定。

[0003] 目前市面上的大曲主要存在以下问题:

[0004] (1) 原料利用率不高:现有醋厂存在原料综合利用率低、成本高、资源浪费严重,出品率等问题,直接影响醋厂的经济效益,现有大曲的制作工艺采用粗放式管理,同时,老陈醋也仅仅是用较长的酿造周期和大量粮食的消耗来换取其较高的品质,因而,大曲与酿醋过程中的原料利用率的关系往往被忽略,使得山西老陈醋在醋醅发酵过程中,液化、糖化作用不全面,从而造成了原料的利用率不高、出品率偏低等因素,大大影响了醋厂的利益;

[0005] (2) 菌种多来源于自然环境,酶活普遍偏低:大曲菌系酶系复杂,制曲生产是在开放式操作条件下自然网罗环境中各种各样的微生物菌群菌系并以此为菌种,因此才造就了大曲纷繁复杂的菌系酶系构成,正是因为其制作工艺多采用粗放的环境,造成其代谢产物酶活普遍偏低,因而物料分解率不高,生产周期偏长;

[0006] (3) 制曲专业化水平不高:由于通风制曲的场所一般为屋顶和楼梯,制曲环境污染太重,温度及湿度也不易把握;

[0007] (4) 醋用大曲创新力度不够:和酒用曲比起来,醋用曲的研究和创新略显的缓慢,由于人们的守旧观念,一味的继承,而忽略了创新。

### 发明内容

[0008] 本发明是为了解决由于现有酿醋用的大曲活力不高,造成的原料利用率低,环境污染严重,醋的品质低的问题,而提供了一种醋用复合酶制剂的制备方法。

[0009] 本发明是通过以下技术方案实现的：

[0010] 一种醋用复合酶制剂的制备方法，包括以下步骤：

[0011] (1) 菌种选育：

[0012] 将活化后的黑曲霉 AS3.324 接入固体斜面培养基中，30℃，培养 36～40h 后，用生理盐水将菌苔洗下，制备菌悬液，然后在紫外灯 30W，距离 30cm 的条件下照射 50～90s，之后按照 1mg/mL 的加入量加入亚硝基胍，处理 30min，得到高产糖化酶菌株；

[0013] 以 CICC 编号 2475 黑曲霉为出发菌株，在紫外灯 25～30w，距离 30cm 的条件下照射 150～200s，得到高产纤维素酶菌株；

[0014] 以沪酿 3042 米曲霉为出发菌株，在紫外灯 20w，距离 28cm 的条件下照射 40～70s，然后接种到氯化锂培养基进行化学诱变 72 小时，得到高产蛋白酶菌株；

[0015] 以根霉 *Sp. Rhizopus* 3.105 (CICC 编号 40049) 为出发菌株，在紫外灯 30w，距离 20cm 的条件下照射 40～70s，得到高产酯化酶菌株；

[0016] (2) 斜面接种：

[0017] 将上述高产糖化酶菌种接入固体斜面培养基中，30℃，培养 36～40h，所述的固体斜面培养基为 PDA 培养基。

[0018] 将上述选育的高产纤维素酶黑曲霉菌株接种在斜面培养基上，其中斜面培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的：羧甲基纤维素钠 (CMC) 0.5%、硫酸铵 0.2%、酵母膏 0.1%、琼脂 2%，调 pH7.0～7.2；

[0019] 将上述选育的高产蛋白酶米曲霉菌株在豆汁斜面培养基中培养，豆汁培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的：豆汁 (5° B'e) 1000mL、可溶性淀粉 20g、磷酸二氢钾 1g、硫酸镁 0.5g、硫酸铵 0.5g，琼脂 20g、调 pH 为 6.5～7.0；

[0020] 将上述选育的高产酯化酶根霉菌株接种到斜面培养基中培养，在温度 30～35℃ 的条件下培养 72h，斜面培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的：麸皮 20g、蔗糖 1.5g、琼脂 1.5g、水 100mL；

[0021] (3) 摇瓶扩大培养：

[0022] 将上述步骤斜面培养的黑曲霉接种于摇瓶培养基中，其中摇瓶转速为 270r/min，32℃ 恒温摇床培养 120h，其中摇瓶培养基是以下列重量份的各组分为原料制备的：玉米粉 14%，豆饼粉 4%，麸皮 1%，余量为水；

[0023] 将上述步骤经斜面培养的黑曲霉接种于摇瓶培养基中，摇瓶转速为 150r/m，31℃ 恒温培养 96h，其中摇瓶培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的：稻草粉 5%、麸皮 1%、豆饼粉 3%、玉米浆 2%、磷酸二氢钾 0.5%、氯化钙 0.3%，调 pH6.5～7.5；

[0024] 将经斜面培养的米曲霉接种于不添加琼脂的豆汁培养基中，转速为 150～190r/m，31℃ 恒温培养 96h；

[0025] 将经斜面培养的根本霉接种于摇瓶培养基，摇瓶转速为 150r/min，36℃ 恒温摇床培养 36h，其中摇瓶培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的：麸皮 6g、黄豆粉 5g、磷酸氢二钾 0.2g、水 100mL、pH7.0；

[0026] (4) 两级种子罐培养：

[0027] 将上述四种经摇瓶扩大培养的菌株分别放入一级种子罐，接种量 10%，在转速 200～280r/min，温度 32℃ 的条件下培养 45～50h；

[0028] 分别将上述四种经一级种子罐培养的菌种转入二级种子罐,在转速 220r/min,电机功率 11kW,温度 34℃的条件下培养 30 ~ 35h;

[0029] 上述的种子罐培养基分别是按照下列重量比的各组分为原料制备的:

[0030] 高产糖化酶黑曲霉菌株种子培养基:淀粉 10%、豆饼粉 4%、麸皮 1%、磷酸氢二钾 0.3%、氯化钙 0.1%;

[0031] 高产纤维素酶菌株种子培养基:稻草粉 5%、玉米粉 1%、麸皮 1%、硫酸铵 0.3%、氯化钙 0.1%、调 pH7.0 ~ 7.2;

[0032] 高产蛋白酶菌株种子培养基:麸皮:高粱粉:水 = 4 : 1 : 4;

[0033] 高产酯化酶菌株种子培养基:麸皮 6%,豆粕水解液 7%,磷酸氢二铵 0.3%,氯化钙 0.5%;

[0034] (5) 2m<sup>3</sup> 罐发酵培养:

[0035] 将上述四种经二级发酵罐培养的菌种转入 2m<sup>3</sup> 发酵罐,在电机功率 55kW,搅拌转速 160 ~ 200r/min,温度 31℃的条件下发酵,待二次测定酶活力单位不再上升时即可终止发酵;

[0036] (6) 板框过滤:操作压力 0.3 ~ 0.6Mpa;

[0037] (7) 真空低温浓缩,然后将四种浓缩液体酶按照 2 : 2 : 3 : 3 比例混合,即得到醋用复合酶制剂。

[0038] 本发明通过对关键微生物选育并扩大培养,采用液态发酵工艺,生产出适于酿醋用的复合酶系,以补充大曲中相应酶系的不足,强化关键酶系的活性,丰富与山西老陈醋品质有直接关系的酶系含量,通过与大曲联合应用于酿醋,设计最佳配比,达到提高醋品质及出品率的目的。

[0039] 通过研究,醋用复合酶主要包括上述四种酶,其中各种酶的活力分别为:糖化酶:12000U/g;酯化酶:750U/g;纤维素酶:3000U/g;蛋白酶:2000U/g。

[0040] 经过大量试验表明,醋用复合酶制剂与大曲的最佳配比为 1 : 50。

[0041] 按照传统山西老陈醋酿造工艺,分 A、B 两组,每组 5 批,A 组只加传统大曲,B 组添加使用本发明醋用复合酶制剂大曲,结果如下表 1 和表 2 所示,

[0042] 表 1 产品对比

[0043]

项目	产品指标	
	醋用复合酶制剂大曲	传统大曲
	酿制山西老陈醋	酿制山西老陈醋
色泽	红棕色	红棕色
香气	特有醋香、熏香、酯香、陈香	特有醋香、熏香、酯香、陈香
滋味	入口绵酸、酸甜适口、回味绵长	入口绵酸、酸甜适口、回味绵长
体态	澄清	澄清
总酸, g/100mL	5.52	5.26
不挥发酸, g/100mL	1.57	1.48
还原糖, g/100mL	1.32	1.15
可溶性无盐固形物, g/100mL	7.62	7.37
总酯, g/100mL	2.65	2.38

[0044] 表 2 添加传统大曲和醋用复合酶制剂的原料淀粉利用率和食醋出品率对比  
[0045]

批次	1					2		3		4		5	
	原料淀粉利用率 (%)	传统	54.83	53.81	53.42	54.63	53.98	本发明	60.25	60.37	59.66	59.67	60.09
每公斤主粮食醋出品率 (%)	传统	6.92	7.06	6.94	6.83	7.11	本发明	8.42	8.47	8.39	8.37	8.41	

[0046] 由表 1 和表 2 分析发现,使用本发明复合酶制剂的老陈醋各项性能指标均优于使用传统大曲的效果,尤其是总酸、总酯以及还原糖含量有明显提高,还原糖含量提高了 14.7%,不挥发酸提高了 6.1%,可溶性无盐固形物提高了 4.1%,总酯提高了 11.3%,原料淀粉利用率较平均提高了 5.87%,每公斤主粮食醋出品率平均提高了 1.44%。

### 具体实施方式

[0047] 实施例 1

[0048] 一种醋用复合酶制剂的制备方法,包括以下步骤:

[0049] (1) 菌种选育:

[0050] 将活化后的黑曲霉 AS3.324 接入固体斜面培养基中,30℃,培养 36h 后,用生理盐水将菌苔洗下,制备菌悬液,然后在紫外灯 30W,距离 30cm 的条件下照射 70s,之后按照 1mg/mL 的加入量加入亚硝基胍,处理 30min,得到高产糖化酶菌株;

[0051] 以 CICC 编号 2475 黑曲霉为出发菌株,在紫外灯 25W,距离 30cm 的条件下照射 180s,得到高产纤维素酶菌株;

[0052] 以沪酿 3042 米曲霉为出发菌株,在紫外灯 20w,距离 28cm 的条件下照射 40s,然后

接种到氯化锂培养基进行化学诱变 72 小时,得到高产蛋白酶菌株;

[0053] 以根霉 *Sp. Rhizopus* 3.105(CICC 编号 40049) 为出发菌株,在紫外灯 30w,距离 20cm 的条件下照射 60s,得到高产酯化酶菌株;

[0054] (2) 斜面接种:

[0055] 将上述高产糖化酶菌种接入固体斜面培养基中,30℃,培养 38h,所述的固体斜面培养基为 PDA 培养基。

[0056] 将上述选育的高产纤维素酶黑曲霉菌株接种在斜面培养基上,其中斜面培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的:羧甲基纤维素钠(CMC)0.5%、硫酸铵 0.2%、酵母膏 0.1%、琼脂 2%,调 pH7.0;

[0057] 将上述选育的高产蛋白酶米曲霉菌株在豆汁斜面培养基中培养,豆汁培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的:豆汁(5° B'e)1000mL、可溶性淀粉 20g、磷酸二氢钾 1g、硫酸镁 0.5g、硫酸铵 0.5g,琼脂 20g、调 pH 为 6.5;

[0058] 将上述选育的高产酯化酶根霉菌株接种到斜面培养基中培养,在温度 30℃的条件下培养 72h,斜面培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的:麸皮 20g、蔗糖 1.5g、琼脂 1.5g、水 100mL;

[0059] (3) 摇瓶扩大培养:

[0060] 将上述步骤斜面培养的黑曲霉接种于摇瓶培养基中,其中摇瓶转速为 270r/min,32℃恒温摇床培养 120h,其中摇瓶培养基是以下列重量份的各组分为原料制备的:玉米粉 14%,豆饼粉 4%,麸皮 1%,余量为水;

[0061] 将上述步骤经斜面培养的黑曲霉接种于摇瓶培养基中,摇瓶转速为 150r/m,31℃恒温培养 96h,其中摇瓶培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的:稻草粉 5%、麸皮 1%、豆饼粉 3%、玉米浆 2%、磷酸二氢钾 0.5%、氯化钙 0.3%,调 pH6.5;

[0062] 将经斜面培养的米曲霉接种于不添加琼脂的豆汁培养基中,转速为 150r/m,31℃恒温培养 96h;

[0063] 将经斜面培养的根霉接种于摇瓶培养基,摇瓶转速为 150r/min,36℃恒温摇床培养 36h,其中摇瓶培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的:麸皮 6g、黄豆粉 5g、磷酸氢二钾 0.2g、水 100mL、pH7.0;

[0064] (4) 两级种子罐培养:

[0065] 将上述四种经摇瓶扩大培养的菌株分别放入一级种子罐,接种量 10%,在转速 250r/min,温度 32℃的条件下培养 45h;

[0066] 分别将上述四种经一级种子罐培养的菌种转入二级罐,在转速 220r/min,电机功率 11kW,温度 34℃的条件下培养 30h;

[0067] 上述的种子罐培养基分别是按照下列重量比的各组分为原料制备的:

[0068] 高产糖化酶黑曲霉菌株种子培养基:淀粉 10%、豆饼粉 4%、麸皮 1%、磷酸氢二钾 0.3%、氯化钙 0.1%;

[0069] 高产纤维素酶菌株种子培养基:稻草粉 5%、玉米粉 1%、麸皮 1%、硫酸铵 0.3%、氯化钙 0.1%、调 pH7.0;

[0070] 高产蛋白酶菌株种子培养基:麸皮:高粱粉:水=4:1:4;

[0071] 高产酯化酶菌株种子培养基:麸皮 6%,豆粕水解液 7%,磷酸氢二铵 0.3%,氯化



钙 0.5% ;

[0072] (5) 2m<sup>3</sup> 罐发酵培养 ;

[0073] 将上述四种经二级发酵罐培养的菌种转入 2m<sup>3</sup> 发酵罐,在电机功率 55kW,搅拌转速 200r/min,温度 31℃ 的条件下发酵,待二次测定酶活力单位不再上升时即可终止发酵 ;

[0074] (6) 板框过滤 :操作压力 0.6Mpa ;

[0075] (7) 真空低温浓缩,然后将四种浓缩液体酶按照 2 : 2 : 3 : 3 比例混合,即得到醋用复合酶制剂。

[0076] 实施例 2

[0077] 一种醋用复合酶制剂的制备方法,包括以下步骤 :

[0078] (1) 菌种选育 :

[0079] 将活化后的黑曲霉 AS3.324 接入固体斜面培养基中,30℃,培养 38h 后,用生理盐水将菌苔洗下,制备菌悬液,然后在紫外灯 30W,距离 30cm 的条件下照射 50s,之后按照 1mg/mL 的加入量加入亚硝基胍,处理 30min,得到高产糖化酶菌株 ;

[0080] 以 CICC 编号 2475 黑曲霉为出发菌株,在紫外灯 27W,距离 30cm 的条件下照射 150s,得到高产纤维素酶菌株 ;

[0081] 以沪酿 3042 米曲霉为出发菌株,在紫外灯 20w,距离 28cm 的条件下照射 55s,然后接种到氯化锂培养基进行化学诱变 72 小时,得到高产蛋白酶菌株 ;

[0082] 以根霉 *Sp. Rhizopus* 3.105(CICC 编号 40049) 为出发菌株,在紫外灯 30w,距离 20cm 的条件下照射 70s,得到高产酯化酶菌株 ;

[0083] (2) 斜面接种 :

[0084] 将上述高产糖化酶菌种接入固体斜面培养基中,30℃,培养 36h,所述的固体斜面培养基为 PDA 培养基。

[0085] 将上述选育的高产纤维素酶黑曲霉菌株接种在斜面培养基上,其中斜面培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的 :羧甲基纤维素钠 (CMC)0.5%、硫酸铵 0.2%、酵母膏 0.1%、琼脂 2%,调 pH7.1 ;

[0086] 将上述选育的高产蛋白酶米曲霉菌株在豆汁斜面培养基中培养,豆汁培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的 :豆汁 (5° B'e)1000mL、可溶性淀粉 20g、磷酸二氢钾 1g、硫酸镁 0.5g、硫酸铵 0.5g,琼脂 20g、调 pH 为 6.8 ;

[0087] 将上述选育的高产酯化酶根霉菌株接种到斜面培养基中培养,在温度 33℃ 的条件下培养 72h,斜面培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的 :麸皮 20g、蔗糖 1.5g、琼脂 1.5g、水 100mL ;

[0088] (3) 摇瓶扩大培养 :

[0089] 将上述步骤斜面培养的黑曲霉接种于摇瓶培养基中,其中摇瓶转速为 270r/min,32℃ 恒温摇床培养 120h,其中摇瓶培养基是以下列重量份的各组分为原料制备的 :玉米粉 14%,豆饼粉 4%,麸皮 1%,余量为水 ;

[0090] 将上述步骤经斜面培养的黑曲霉接种于摇瓶培养基中,摇瓶转速为 150r/m,31℃ 恒温培养 96h,其中摇瓶培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的 :稻草粉 5%、麸皮 1%、豆饼粉 3%、玉米浆 2%、磷酸二氢钾 0.5%、氯化钙 0.3%,调 pH7.5 ;

[0091] 将经斜面培养的米曲霉接种于不添加琼脂的豆汁培养基中,转速为 170r/m,31℃

恒温培养 96h；

[0092] 将经斜面培养的根霉接种于摇瓶培养基，摇瓶转速为 150r/min，36℃恒温摇床培养 36h，其中摇瓶培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的：麸皮 6g、黄豆粉 5g、磷酸氢二钾 0.2g、水 100mL、pH7.0；

[0093] (4) 两级种子罐培养：

[0094] 将上述四种经摇瓶扩大培养的菌株分别放入一级种子罐，接种量 10%，在转速 200r/min，温度 32℃的条件下培养 50h；

[0095] 分别将上述四种经一级种子罐培养的菌种转入二级罐，在转速 220r/min，电机功率 11kw，温度 34℃的条件下培养 33h；

[0096] 上述的种子罐培养基分别是按照下列重量比的各组分为原料制备的：

[0097] 高产糖化酶黑曲霉菌株种子培养基：淀粉 10%、豆饼粉 4%、麸皮 1%、磷酸氢二钾 0.3%、氯化钙 0.1%；

[0098] 高产纤维素酶菌株种子培养基：稻草粉 5%，玉米粉 1%，麸皮 1%，硫酸铵 0.3%，氯化钙 0.1%，pH7.1；

[0099] 高产蛋白酶菌株种子培养基：麸皮：高粱粉：水 = 4：1：4；

[0100] 高产酯化酶菌株种子培养基：麸皮 6%，豆粕水解液 7%，磷酸氢二铵 0.3%，氯化钙 0.5%；

[0101] (5) 2m<sup>3</sup> 罐发酵培养：

[0102] 将上述四种经二级发酵罐培养的菌种转入 2m<sup>3</sup> 发酵罐，在电机功率 55kW，搅拌转速 160r/min，温度 31℃的条件下发酵，待二次测定酶活力单位不再上升时即可终止发酵；

[0103] (6) 板框过滤：操作压力 0.3Mpa；

[0104] (7) 真空低温浓缩，然后将四种浓缩液体酶按照 2：2：3：3 比例混合，即得到醋用复合酶制剂。

[0105] 实施例 3

[0106] 一种醋用复合酶制剂的制备方法，包括以下步骤：

[0107] (1) 菌种选育：

[0108] 将活化后的黑曲霉 AS3.324 接入固体斜面培养基中，30℃，培养 40h 后，用生理盐水将菌苔洗下，制备菌悬液，然后在紫外灯 30W，距离 30cm 的条件下照射 90s，之后按照 1mg/mL 的加入量加入亚硝基胍，处理 30min，得到高产糖化酶菌株；

[0109] 以 CICC 编号 2475 黑曲霉为出发菌株，在紫外灯 30W，距离 30cm 的条件下照射 200s，得到高产纤维素酶菌株；

[0110] 以沪酿 3042 米曲霉为出发菌株，在紫外灯 20w，距离 28cm 的条件下照射 70s，然后接种到氯化锂培养基进行化学诱变 72 小时，得到高产蛋白酶菌株；

[0111] 以根霉 *Sp. Rhizopus* 3.105 (CICC 编号 40049) 为出发菌株，在紫外灯 30w，距离 20cm 的条件下照射 40s，得到高产酯化酶菌株；

[0112] (2) 斜面接种：

[0113] 将上述高产糖化酶菌种接入固体斜面培养基中，30℃，培养 40h，所述的固体斜面培养基为 PDA 培养基。

[0114] 将上述选育的高产纤维素酶黑曲霉菌株接种在斜面培养基上，其中斜面培养基是

按照下列重量比的各组分为原料制备的：羧甲基纤维素钠 (CMC) 0.5%、硫酸铵 0.2%、酵母膏 0.1%、琼脂 2%，调 pH7.2；

[0115] 将上述选育的高产蛋白酶米曲霉菌株在豆汁斜面培养基中培养，豆汁培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的：豆汁 (5° B'e) 1000mL、可溶性淀粉 20g、磷酸二氢钾 1g、硫酸镁 0.5g、硫酸铵 0.5g，琼脂 20g、调 pH 为 7.0；

[0116] 将上述选育的高产酯化酶根霉菌株接种到斜面培养基中培养，在温度 35℃ 的条件下培养 72h，斜面培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的：麸皮 20g、蔗糖 1.5g、琼脂 1.5g、水 100mL；

[0117] (3) 摇瓶扩大培养：

[0118] 将上述步骤斜面培养的黑曲霉接种于摇瓶培养基中，其中摇瓶转速为 270r/min，32℃ 恒温摇床培养 120h，其中摇瓶培养基是以下列重量份的各组分为原料制备的：玉米粉 14%，豆饼粉 4%，麸皮 1%，余量为水；

[0119] 将上述步骤经斜面培养的黑曲霉接种于摇瓶培养基中，摇瓶转速为 150r/m，31℃ 恒温培养 96h，其中摇瓶培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的：稻草粉 5%、麸皮 1%、豆饼粉 3%、玉米浆 2%、磷酸二氢钾 0.5%、氯化钙 0.3%，调 pH7.0；

[0120] 将经斜面培养的米曲霉接种于不添加琼脂的豆汁培养基中，转速为 190r/m，31℃ 恒温培养 96h；

[0121] 将经斜面培养的黑曲霉接种于摇瓶培养基，摇瓶转速为 150r/min，36℃ 恒温摇床培养 36h，其中摇瓶培养基是按照下列重量比的各组分为原料制备的：麸皮 6g、黄豆粉 5g、磷酸氢二钾 0.2g、水 100mL、pH7.0；

[0122] (4) 两级种子罐培养：

[0123] 将上述四种经摇瓶扩大培养的菌株分别放入一级种子罐，接种量 10%，在转速 280r/min，温度 32℃ 的条件下培养 47h；

[0124] 分别将上述四种经一级种子罐培养的菌种转入二级罐，在转速 220r/min，电机功率 11kW，温度 34℃ 的条件下培养 35h；

[0125] 上述的种子罐培养基分别是按照下列重量比的各组分为原料制备的：

[0126] 高产糖化酶黑曲霉菌株种子培养基：淀粉 10%、豆饼粉 4%、麸皮 1%、磷酸氢二钾 0.3%、氯化钙 0.1%；

[0127] 高产纤维素酶菌株种子培养基：稻草粉 5%、玉米粉 1%、麸皮 1%、硫酸铵 0.3%、氯化钙 0.1%、调 pH7.2；

[0128] 高产蛋白酶菌株种子培养基：麸皮：高粱粉：水 = 4：1：4；

[0129] 高产酯化酶菌株种子培养基：麸皮 6%，豆粕水解液 7%，磷酸氢二铵 0.3%，氯化钙 0.5%；

[0130] (5) 2m<sup>3</sup> 罐发酵培养：

[0131] 将上述四种经二级发酵罐培养的菌种转入 2m<sup>3</sup> 发酵罐，在电机功率 55kW，搅拌转速 180r/min，温度 31℃ 的条件下发酵，待二次测定酶活力单位不再上升时即可终止发酵；

[0132] (6) 板框过滤：操作压力 0.5Mpa；

[0133] (7) 真空低温浓缩，然后将四种浓缩液体酶按照 2：2：3：3 比例混合，即得到醋用复合酶制剂。