



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102154233 A

(43) 申请公布日 2011.08.17

(21) 申请号 201010618406.8

(22) 申请日 2010.12.31

(71) 申请人 山东西王生化科技有限公司

地址 山东省滨州市邹平县韩店镇西王生化  
科技公司

(72) 发明人 王勇 王一 马仕敏 张树禄

(74) 专利代理机构 济南舜源专利事务所有限公  
司 37205

代理人 辛向东

(51) Int. Cl.

C12N 9/02 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 3 页

(54) 发明名称

一种利用葡萄糖酸盐废菌体制备葡萄糖氧化酶的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种利用葡萄糖酸钠废菌体制备葡萄糖氧化酶的生产方法,包括将葡萄糖酸钠发酵液,经过板框过滤后,分离制得黑曲霉菌体;黑曲霉菌体经洗涤后,经高压均浆机中均质处理,使其破壁自溶;通过两次超滤浓缩,得到粗制酶液;冷冻离心后得到含有葡萄糖氧化酶的上清液;上清液经过盐析沉淀、透析、浓缩后得到食品级葡萄糖氧化酶。本发明方法所提取葡萄糖氧化酶达到我国《食品添加剂使用卫生标准》(GB2760-1996)规定。

1. 一种利用葡萄糖酸盐废菌体制备葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于包括以下步骤:将葡萄糖酸盐发酵液经过板框过滤后,分离制得黑曲霉菌体;菌体洗涤后,经高压均浆机中均质处理,使其破壁自溶;通过两次超滤浓缩,得到粗制酶液,冷冻离心得到含有葡萄糖氧化酶的上清液;上清液经过盐析沉淀、透析、浓缩后得到食品级葡萄糖氧化酶。

2. 如权利要求1所述的制备葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于葡萄糖酸盐发酵液的板框过滤分离所用的滤布孔径不大于 $0.45\mu\text{m}$ 。

3. 如权利要求1所述的制备葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于黑曲霉菌体的洗涤,采用pH值为 $5\sim 6$  Tris-HCl缓冲液,菌体与缓冲液体积比为 $1:(5\sim 10)$ 。

4. 如权利要求1所述的制备葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于黑曲霉菌体破壁自溶,采用转速达 $10000\sim 15000\text{rad/min}$ 的高压均浆机均质处理 $2\sim 4\text{hr}$ 。

5. 如权利要求1所述的制备葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于所述黑曲霉菌体的两次超滤浓缩分别采用 $20000\sim 150000\text{Da}$ 和 $150000\sim 300000\text{Da}$ 分子量的超滤膜。

6. 如权利要求1所述的制备葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于所述葡萄糖氧化酶酶液的冷冻离心采用转速 $12000\sim 15000\text{rad/min}$ 的高压均浆机采用 $12000\sim 15000\text{rad/min}$ 的高压均浆机,在温度 $4^{\circ}\text{C}$ ,冷冻离心 $20\sim 30\text{min}$ ,得到含有葡萄糖氧化酶的上清液。

7. 如权利要求1所述的制备葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于所述葡萄糖氧化酶上清液的盐析沉淀采用 $50\sim 80\%$ 硫酸铵饱和度溶液,pH值为 $5\sim 8$ ,进行盐析沉淀。

8. 如权利要求1所述的制备葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于所述葡萄糖氧化酶上清液的透析采用 $0.5\sim 2\%$ 的碳酸氢钠和 $1\sim 3\text{mmol/L}$ 的EDTA进行透析。

9. 如权利要求1所述的制备葡萄糖氧化酶的方法,其特征在于所述葡萄糖氧化酶上清液的浓缩,采用分子量为 $2000\sim 6000$ 的聚乙二醇进行浓缩,温度为 $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ 。

## 一种利用葡萄糖酸盐废菌体制备葡萄糖氧化酶的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于葡萄糖氧化酶的一种制备方法,具体涉及葡萄糖酸盐系列产品的黑曲霉发酵废菌体中葡萄糖氧化酶的提取方法。

### 背景技术

[0002] 葡萄糖氧化酶是一种需氧脱氢酶,可以除去食品和容器中的氧,从而有效地防止食物的变质,广泛应用于茶叶、冰淇淋、奶粉、啤酒、果酒及其他饮料制品的包装中。

[0003] 目前葡萄糖氧化酶主要从培养黑曲霉或从霉菌中提取,通常利用黑曲霉、青霉发酵后获得的菌丝体,经过破壁,缓冲液,离心提取,获得胞内葡萄糖氧化酶的粗酶液;或直接利用发酵液经过滤、硫酸铵盐析沉淀、Sephadex 脱盐、DEAE-纤维素离子交换层析及 SephadexG-100 凝胶层析进行分离纯化,制得一定量的酶制剂。其生产成本低,提取工艺繁琐,周期长,废水量大。

### 发明内容

[0004] 为了克服现有生产方法中所存在的缺点,本发明提供了一种利用葡萄糖酸盐生产过程中的废菌体提取制备葡萄糖氧化酶的方法。

[0005] 本发明所述的利用葡萄糖酸盐生产中的废菌体制备葡萄糖氧化酶的方法,包括将葡萄糖酸盐发酵液经过板框过滤后,分离制得黑曲霉菌体;菌体洗涤后,经高压均浆机中均质处理,使其破壁自溶;通过两次超滤浓缩,得到粗制酶液,冷冻离心得到含有葡萄糖氧化酶的上清液;上清液经过盐析沉淀、透析、浓缩后得到食品级葡萄糖氧化酶。

[0006] 本发明所述制备葡萄糖氧化酶的方法具体操作方法如下:

#### (1) 过滤

将葡萄糖酸钠发酵液经过滤布孔径不大于  $0.45\mu\text{m}$  的板框过滤后,分离得到废黑曲霉菌体;

#### (2) 洗涤

将分离得到的废黑曲霉菌体,用体积比为 1:(5~10) 的蒸馏水或者 pH5~6 的 Tris-HCl 缓冲液洗涤,去除菌丝体表面的杂质;

#### (3) 破壁自溶

将清洗后的黑曲霉菌体,利用转速达  $12000\sim 15000\text{rad}/\text{min}$  的高压均浆机均质  $2\sim 4\text{hr}$ ,进行破壁处理,并用体积比为 1:(5~10)、pH5~6 的 Tris-HCl 缓冲液保存  $24\text{hr}$ ,使菌体内葡萄糖氧化酶游离出来;

#### (4) 超滤浓缩

将上述菌体液,先用分子量为  $20000\sim 150000\text{Da}$  超滤膜过滤,去除小分子蛋白质及盐类;再用分子量为  $150000\sim 300000\text{Da}$  的超滤膜浓缩,去除大分子蛋白质;

#### (5) 冷冻离心

将菌体液用 Tris-HCl 缓冲液静置  $48\text{hr}$ ,采用  $12000\sim 15000\text{rad}/\text{min}$  的高压均

浆机,在温度 4℃,冷冻离心 20-30min,得到含有葡萄糖氧化酶的上清液;

(6) 盐析沉淀

将含有葡萄糖氧化酶的上清液,采用 pH 值为 5~8 的 50~80% 饱和度硫酸铵溶液进行盐析沉淀,过滤后得到葡萄糖氧化酶沉淀;

(7) 透析

将葡萄糖氧化酶沉淀,用 Tris-HCl 缓冲液稀释后,采用 0.5~2% 的碳酸氢钠和 1~3mmol/L 的 EDTA 进行透析;

(8) 浓缩

将透析液在 0~4℃ 温度下,采用分子量为 2000~6000 的聚乙二醇行浓缩,得到葡萄糖氧化酶酶液成品。

[0007] 本发明制备葡萄糖氧化酶的方法所用的原料为生产葡萄糖酸盐系列产品(如葡萄糖酸钾、钠、锌、钙、铜等)的废弃物——发酵后分离出的废菌体,原料成本极低,所制得的葡萄糖氧化酶的成本不及现有技术的一半,所制备的葡萄糖氧化酶质量达到了我国《食品添加剂使用卫生标准》(GB 2760-1996) 规定,完全可以在食品等行业中使用。

## 具体实施方式

### [0008] 实施例 1

将约 20m<sup>3</sup> 的葡萄糖酸钠发酵液,经过板框过滤后,分离制得黑曲霉菌体 3.7 吨(湿基);将所得的黑曲霉菌体,用 1:10 体积的 Tris-HCl 缓冲液洗涤,去除菌丝体表面的杂质;将黑曲霉菌体利用高压均浆机 40Mpa 破壁 3hr,并用 pH 值 5~6 的 Tris-HCl 缓冲液保存 24hr,使菌体内葡萄糖氧化酶游离出来;将菌体液先用 50000Dal 膜超滤,去除小分子蛋白质及盐类;再用 200000Dal 膜超滤,去除大分子蛋白质,得到浓缩的葡萄糖氧化酶;将浓缩液用 Tris-HCl 缓冲液静置 48hr,15000 rad/min、4℃ 冷冻离心 30min 后,得到含有葡萄糖氧化酶的上清液;将上清液采用 pH 值为 7 的 80% 饱和度硫酸铵溶液进行沉淀,过滤后得到葡萄糖氧化酶沉淀;将沉淀用 Tris-HCl 缓冲液稀释后,透析;将透析液 0℃ 采用聚乙二醇 2000 进行浓缩,得到比活为 145U/mg 的葡萄糖氧化酶酶液 4.9L。

[0009] 实施例 2 和实施例 3 操作步骤与实施例 1 基本相同,详细操作条件见下表:

实施实例操作条件表

操作条件	实施例 1	实施例 2	实施例 3
葡萄糖酸盐原料	酸钠发酵液, 20m <sup>3</sup>	酸钙发酵液, 30m <sup>3</sup>	酸钠发酵液, 200 m <sup>3</sup>
过滤	板框过滤得菌体 3.7 吨	板框过滤得菌体 5.5 吨	板框过滤得菌体 40 吨
洗涤	pH5.6Tris-HCl 缓冲液 1: 10	pH5.6Tris-HCl 缓冲液 1: 5	pH5.6Tris-HCl 缓冲液 1: 8
破壁自溶	高压均浆机 40Mpa 破壁 2hr	高压均浆机 40Mpa 破壁 3hr	高压均浆机 40Mpa 破壁 2hr
超滤 1	50000Dal 超滤膜	80000Dal 超滤膜	50000Dal 超滤膜
超滤 2	200000Dal 超滤膜	300000Dal 超滤膜	300000Dal 超滤膜
离心	15000 rad/min 30min, 4℃	12000 rad/min 20min, 4℃	15000 rad/min 20min, 4℃
盐析	80%饱和度硫酸铵 pH 7	80%饱和度硫酸铵 pH 5	80%饱和度硫酸铵 pH 8
透析	透析水电导 20us/cm	透析水电导 20us/cm	透析水电导 20us/cm
浓缩	聚乙二醇 2000, 0℃	聚乙二醇 2000, 4℃	聚乙二醇 2000, 4℃
葡萄糖氧化酶	4.9L	7.2L	52L
比活	145U/mg	138 U/mg	131 U/mg