



(21) 申请号 202211049779.7

C12R 1/125 (2006.01)

(22) 申请日 2022.08.30

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 102174503 A, 2011.09.07

申请公布号 CN 115232806 A

CN 107410710 A, 2017.12.01

(43) 申请公布日 2022.10.25

CN 114317503 A, 2022.04.12

(73) 专利权人 云南博仕奥生物技术有限公司

KR 20040045238 A, 2004.06.01

地址 650000 云南省昆明市宜良县工业园区

US 6924133 B1, 2005.08.02

张华等主编.《制剂单元操作及仿真实训》.上海交通大学出版社, 2021, (第1版), 第54页第3段.

(72) 发明人 李伟 蔡发国 黎跃坤 杜景德

赖建彬等.中兽药四黄止痢缓释微丸的研

(74) 专利代理机构 成都明涛智创专利代理有限

制.《今日畜牧兽医》.2019, 第35卷(第3期), 第14-15页.

公司 51289

专利代理师 邓华英

岳珍.托普司他缓释微丸胶囊的研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2017, (第1期), 第E079-54页.

(51) Int. Cl.

C12N 9/96 (2006.01)

C12N 9/54 (2006.01)

C12N 1/20 (2006.01)

B01D 1/18 (2006.01)

审查员 王娟

权利要求书1页 说明书5页

(54) 发明名称

一种中性蛋白酶微丸及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种中性蛋白酶微丸及其制备方法,属于微生物发酵和酶工程技术领域;采用该制备方法依次通过枯草芽孢杆菌发酵菌种到种子液,再到酶活力在20000U/mL以上的发酵液的制备;然后经过离心除杂、过滤除菌、超滤浓缩、造粒酶液制备和喷雾制粒等一系列操作后制得粒度均匀、活性成分均匀的中性蛋白酶微丸,生产高效且生产成本低,推广应用前景广阔,经济效益更高。

1. 一种中性蛋白酶微丸制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、将枯草芽孢杆菌菌种接种在茄子瓶LB培养基中,制得发酵菌种;

S2、将发酵菌种接种于种子罐内的培养基,种子罐内的培养基为:玉米20g/L,豆粕70g/L, Na_2HPO_4 4g/L, KH_2PO_4 0.3g/L,发酵菌种接种量为2%,在温度33~34℃,转速180rpm,风量40~50m³/h环境下培养18~19h,制得种子液;

S3、将步骤S2中的种子液接入产酶发酵罐的发酵培养基中,在温度38℃,转速140~160rpm,风量1:0.8-1:1VVM环境下培养26~28h,制得发酵液,发酵培养基为:玉米58g/L,豆粕42g/L,麸皮50g/L, Na_2HPO_4 4.5g/L, KH_2PO_4 0.3g/L,PH自然;

S4、离心除杂:将发酵液打入卧螺离心机中,收集离心液,卧螺离心机转速2900~3000rpm,离心时间4~5h;

S5、过滤除菌:将收集的离心液打入陶瓷膜过滤,收集过滤酶液,陶瓷膜过滤孔径为500nm,过滤时间8~10h;

S6、超滤浓缩:将收集到的过滤酶液打入超滤浓缩设备,进行酶液的浓缩,浓缩倍数为3-5倍,制得浓缩酶液;

S7、造粒酶液制备:在浓缩酶液中加入糊精或羧甲基纤维素、轻质碳酸钙、玉米淀粉,搅拌均匀,各成分的加入量为:8-12%糊精或羧甲基纤维素,轻质碳酸钙20-30%,玉米淀粉10-20%;

S8、喷雾制粒:将造粒酶液通过隔膜泵打入喷雾干燥塔中进行雾化干燥、制粒,雾化喷嘴型号为1.8mm或2.0mm;隔膜泵压力为40-45 Hz;干燥条件:进口温度150-200℃,塔温70-80℃,出风口温度70-75℃。

2. 根据权利要求1所述的中性蛋白酶微丸制备方法,其特征在于:步骤S1中培养条件为在温度35℃条件下培养28~36h。

一种中性蛋白酶微丸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明公开了一种中性蛋白酶微丸,还公开了一种中性蛋白酶微丸制备方法,属于发酵技术及制剂技术领域。

背景技术

[0002] 作为动物本身可以分泌的内源酶的一种——蛋白酶,是催化肽键水解的一种酶,存在于动物内脏、植物茎叶、果实和微生物中,已广泛应用在皮革、毛皮、丝绸、医药、食品、酿造等方面。由于其特殊性、复杂性,一直以来都是作为复合酶的一个组分被使用。近年来由于养殖者对动物生产最大潜能的开发、蛋白原料价格的上涨以及由简单日粮向复杂日粮的转变,科研工作者对于单一蛋白酶和复合蛋白酶的研究也日渐增多。蛋白酶针对蛋白质中的肽键进行水解,最终的产物是氨基酸,因此外加蛋白酶改善动物生长性能的前提主要是其能否对动物氨基酸消化利用率产生有利影响。

[0003] 动物在摄取蛋白质后,经过蛋白酶与其它酶的协同作用,最后转变为游离氨基酸,从而满足动物正常新陈代谢对氨基酸的需要。蛋白酶按照作用pH范围主要分为酸性蛋白酶、中性蛋白酶和碱性蛋白酶三种,其中中性蛋白酶因作用条件温和,广泛应用于食品、医药以及饲料等领域。而蛋白酶目前主要以微生物代谢生产为主,且市场中性蛋白酶制剂以粉末型为主,此类酶制剂用于动物饲料时,能够明显提高饲料中蛋白质利用率和动物的生产性能,同时降低成本。

[0004] 但由于大部分酶制剂为粉剂,粉剂存在不同环境中耐温性能和稳定性较差,使用时粉尘污染严重,存在浪费的弊端,还易对皮肤造成过敏损伤。为解决上述弊端,有研究者以及从业者将粉剂酶制剂制备成微丸颗粒,比如申请号为200410051993.1的中国发明专利申请公开了一种多色微丸型饲用复合酶及其制备方法,申请号为201410638567.1的中国发明专利申请公开了一种复合酶包衣微丸及其制备方法,申请号为202111548278.9的中国发明专利申请公开了一种颗粒中性蛋白酶及其制备方法;均提到了制备微丸型颗粒的制备方法,但采用的方法为挤压式、摇摆式或流化床制成微丸。而摇摆制粒,挤压制粒、滚筒制粒、旋流流化床制粒等传统制备方法存在单位时间产量低,效率低,成本高,微丸粒度均匀度差,活性成分不均匀等缺点,不能满足实际的生产需求。

发明内容

[0005] (一)要解决的技术问题

[0006] 本发明要解决的技术问题是解决现有的中性蛋白酶粉剂酶制剂活性稳定性差,而传统造粒工艺费时、产量低、粒度和活性成分不均匀的问题。

[0007] (二)技术方案

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种中性蛋白酶微丸制备方法,其包括以下步骤:

[0009] S1、将枯草芽孢杆菌菌种接种在茄子瓶LB培养基中,制得发酵菌种;

[0010] S2、将发酵菌种接种于种子罐内的培养基,在温度33~34℃,转速180rpm,风量40~50m³/h环境下培养18~20h,制得种子液;

[0011] S3、将步骤S2中的种子液接入产酶发酵罐的发酵培养基中,在温度35~38℃,转速140~160rpm,风量1:0.8-1:1VVM环境下培养26~30h,制得发酵液;

[0012] S4、离心除杂:将发酵液打入卧螺离心机中,去除未分解及不溶的培养基颗粒,收集离心液;

[0013] S5、过滤除菌:将收集的离心液打入陶瓷膜过滤,收集过滤酶液;

[0014] S6、超滤浓缩:将收集到的过滤酶液打入超滤浓缩设备,进行酶液的浓缩,浓缩倍数为3-5倍,制得浓缩酶液;

[0015] S7、造粒酶液制备:在浓缩酶液中加入糊精或羧甲基纤维素、轻质碳酸钙、玉米淀粉,搅拌均匀;

[0016] S8、喷雾制粒:将造粒酶液通过隔膜泵打入喷雾干燥塔中进行雾化干燥制粒。

[0017] 进一步,步骤S1中培养条件为在温度35℃条件下培养28~36h。

[0018] 进一步,步骤S2中种子罐内的培养基为:玉米20g/L,豆粕70g/L,Na₂HPO₄ 4g/L, KH₂PO₄ 0.3g/L,发酵菌种接种量为2%。

[0019] 进一步,步骤S3中发酵培养基为:玉米58g/L,豆粕42g/L,麸皮50g/L,Na₂HPO₄ 4.5g/L, KH₂PO₄ 0.3g/L,PH自然。

[0020] 进一步,步骤S4中卧螺离心机转速2900~3000rpm,离心时间4~5h。

[0021] 进一步,步骤S5中陶瓷膜过滤孔径为500nm,过滤时间8~10h。

[0022] 进一步,步骤S7中各成分的加入量为:8-12%糊精或羧甲基纤维素,轻质碳酸钙20-30%,玉米淀粉10-20%。

[0023] 进一步,步骤S8中雾化喷嘴型号为1.8mm或2.0mm;隔膜泵压力为40-45Hz;干燥条件:进口温度150-200℃,塔温70-80℃,出风口温度70-75℃。

[0024] 本发明还提供了一种中性蛋白酶微丸,其采用上述所述的中性蛋白酶微丸制备方法制备而成。

[0025] (三)有益效果

[0026] 本发明的上述技术方案具有如下优点:本发明提供的中性蛋白酶微丸及其制备方法,具有生产高效、粒度均匀、活性成分均匀、生产成本低的优势。其从中性蛋白酶生产过程中的发酵工艺等参数着手,优化了培养基,同时,增加了发酵液的分离、浓缩过程;并优化了微丸酶配方,在压力喷雾干燥过程中一次成型制备得到粒度较均匀的中性蛋白酶微丸;喷雾制粒一次成型,单位时间产量高,效率高。具有很好的推广应用前景和市场前景。

[0027] 除了上述所描述的本发明解决的技术问题、构成的技术方案的技术特征以及有这些技术方案的技术特征所带来的优点之外,本发明的其他技术特征及这些技术特征带来的优点,将结合实施例作出进一步说明。

具体实施方式

[0028] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的

前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0029] 实施例1

[0030] 本实施例公开了一种中性蛋白酶微丸及其制备方法,其中,中性蛋白酶微丸制备方法,包括以下步骤:

[0031] S1、将枯草芽孢杆菌菌种接种在茄子瓶LB培养基中,在温度为35℃条件下培养28h,制得发酵菌种;

[0032] S2、将发酵菌种接种在种子罐中,接种量为2%,种子罐中培养基配方为玉米20g/L,豆粕70g/L,Na₂HPO₄ 4g/L,KH₂PO₄ 0.3g/L;培养时间18h,培养环境:温度33℃,转速180rpm,风量40m³/h;制得种子液;

[0033] S3、将步骤S2中的种子液接入产酶发酵罐的发酵培养基中,发酵培养基配方为:玉米58g/L,豆粕42g/L,麸皮50g/L,Na₂HPO₄ 4.5g/L,KH₂PO₄ 0.3g/L,PH自然,培养时间26h,培养环境:温度35℃,转速140rpm,风量1:0.8VVM;制得发酵液,且发酵液酶活力在20000U/mL以上,检测标准:GB/T 23527;

[0034] S4、离心除杂:将发酵液打入卧螺离心机中,转速2900rpm,离心时间4h;去除未分解及不溶的培养基颗粒,收集离心液;

[0035] S5、过滤除菌:将收集的离心液打入陶瓷膜过滤,过滤孔径为500nm,过滤时间8h;收集过滤酶液;

[0036] S6、超滤浓缩:将收集到的过滤酶液打入超滤浓缩设备,进行酶液的浓缩,浓缩倍数为3倍,制得浓缩酶液;

[0037] S7、造粒酶液制备:在浓缩酶液中加入8%糊精或羧甲基纤维素,轻质碳酸钙20%,玉米淀粉10%,搅拌均匀得造粒酶液;

[0038] S8、喷雾制粒:将造粒酶液通过隔膜泵打入喷雾干燥塔中进行雾化干燥制粒,雾化喷嘴型号为:1.8mm;隔膜泵压力为40Hz;干燥条件:进口温度150℃,塔温70℃,出风口温度70℃。

[0039] 本实施例公开的中性蛋白酶微丸由以上本实施例所公开的中性蛋白酶微丸制备方法制备而成。

[0040] 实施例2

[0041] 本实施例公开了一种中性蛋白酶微丸及其制备方法,其中,中性蛋白酶微丸制备方法,包括以下步骤:

[0042] S1、将枯草芽孢杆菌菌种接种在茄子瓶LB培养基中,在温度为35℃条件下培养36h,制得发酵菌种;

[0043] S2、将发酵菌种接种在种子罐中,接种量为2%,种子罐中培养基配方为玉米20g/L,豆粕70g/L,Na₂HPO₄ 4g/L,KH₂PO₄ 0.3g/L;培养时间20h,培养环境:温度34℃,转速180rpm,风量50m³/h;制得种子液;

[0044] S3、将步骤S2中的种子液接入产酶发酵罐的发酵培养基中,发酵培养基配方为:玉米58g/L,豆粕42g/L,麸皮50g/L,Na₂HPO₄ 4.5g/L,KH₂PO₄ 0.3g/L,PH自然,培养时间30h,培养环境:温度38℃,转速140~160rpm,风量1:0.8-1:1VVM;制得发酵液,且发酵液酶活力在20000U/mL以上,检测标准:GB/T 23527;

[0045] S4、离心除杂:将发酵液打入卧螺离心机中,转速3000rpm,离心时间5h;去除未分

解及不溶的培养基颗粒,收集离心液;

[0046] S5、过滤除菌:将收集的离心液打入陶瓷膜过滤,过滤孔径为500nm,过滤时间10h;收集过滤酶液;

[0047] S6、超滤浓缩:将收集到的过滤酶液打入超滤浓缩设备,进行酶液的浓缩,浓缩倍数为5倍,制得浓缩酶液;

[0048] S7、造粒酶液制备:在浓缩酶液中加入12%糊精或羧甲基纤维素,轻质碳酸钙30%,玉米淀粉20%,搅拌均匀得造粒酶液;

[0049] S8、喷雾制粒:将造粒酶液通过隔膜泵打入喷雾干燥塔中进行雾化干燥制粒,雾化喷嘴型号为:2.0mm;隔膜泵压力为45Hz;干燥条件:进口温度200℃,塔温80℃,出风口温度75℃。

[0050] 本实施例公开的中性蛋白酶微丸由以上本实施例所公开的中性蛋白酶微丸制备方法制备而成。

[0051] 实施例3

[0052] 本实施例公开了一种中性蛋白酶微丸及其制备方法,其中,中性蛋白酶微丸制备方法,包括以下步骤:

[0053] S1、将枯草芽孢杆菌菌种接种在茄子瓶LB培养基中,在温度为35℃条件下培养32h,制得发酵菌种;

[0054] S2、将发酵菌种接种在种子罐中,接种量为2%,种子罐中培养基配方为玉米20g/L,豆粕70g/L,Na₂HPO₄ 4g/L,KH₂PO₄ 0.3g/L;培养时间19h,培养环境:温度34℃,转速180rpm,风量50m³/h;制得种子液;

[0055] S3、将步骤S2中的种子液接入产酶发酵罐的发酵培养基中,发酵培养基配方为:玉米58g/L,豆粕42g/L,麸皮50g/L,Na₂HPO₄ 4.5g/L,KH₂PO₄ 0.3g/L,PH自然,培养时间28h,培养环境:温度36℃,转速160rpm,风量1:1VVM;制得发酵液,且发酵液酶活力在20000U/mL以上,检测标准:GB/T 23527;

[0056] S4、离心除杂:将发酵液打入卧螺离心机中,转速2900~3000rpm,离心时间5h;去除未分解及不溶的培养基颗粒,收集离心液;

[0057] S5、过滤除菌:将收集的离心液打入陶瓷膜过滤,过滤孔径为500nm,过滤时间10h;收集过滤酶液;

[0058] S6、超滤浓缩:将收集到的过滤酶液打入超滤浓缩设备,进行酶液的浓缩,浓缩倍数为4倍,制得浓缩酶液;

[0059] S7、造粒酶液制备:在浓缩酶液中加入12%糊精或羧甲基纤维素,轻质碳酸钙28%,玉米淀粉18%,搅拌均匀得造粒酶液;

[0060] S8、喷雾制粒:将造粒酶液通过隔膜泵打入喷雾干燥塔中进行雾化干燥制粒,雾化喷嘴型号为:2.0mm;隔膜泵压力为45Hz;干燥条件:进口温度180℃,塔温80℃,出风口温度75℃。

[0061] 本实施例公开的中性蛋白酶微丸由以上本实施例所公开的中性蛋白酶微丸制备方法制备而成。

[0062] 上面对本发明的具体实施方式作了详细说明,但是本发明并不限于上述实施方式,在本领域普通技术人员所具备的知识范围内,还可以在不脱离本发明宗旨的前提下作

出各种变化。