



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109010853 A

(43)申请公布日 2018.12.18

(21)申请号 201811093738.1

C12P 7/64(2006.01)

(22)申请日 2003.06.20

C11B 1/00(2006.01)

(30)优先权数据

02254262.5 2002.06.19 EP

02258713.3 2002.12.18 EP

(62)分案原申请数据

03814382.8 2003.06.20

(71)申请人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司

地址 荷兰海尔伦

(72)发明人 艾伯特·沙普

迪尼埃尔·韦尔科埃尔腾

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 史悦

(51)Int.Cl.

A61L 2/04(2006.01)

权利要求书1页 说明书18页 附图4页

(54)发明名称

用于微生物细胞和微生物油的巴氏消毒方法

(57)摘要

本发明涉及用于微生物细胞和微生物油的巴氏消毒方法,公开了用于微生物细胞和微生物油的巴氏消毒方法。本发明公开了一种改良的巴氏消毒方案,用以对微生物细胞进行巴氏消毒。所述方案具有三个阶段,即第一加热阶段,第二平台阶段,其间细胞被保持于(最高且)恒定的温度,以及第三冷却阶段。加热和冷却阶段都是迅速的,加热阶段中,细胞的温度在不超过30分钟内经历从40℃至80℃。加热速率为至少0.5℃/分钟,冷却期间为至少-0.5℃/分钟。平台最高温度为70℃至85℃。

1. 一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,所述方法包括:在不超过30分钟内在包括从40℃至70℃的温度加热细胞,或以大于0.5℃/分钟的速率加热细胞。

2. 一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,所述方法包含三个阶段,即(第一)加热阶段,(第二)平台阶段(其间细胞被维持于一个恒定的温度)以及(第三)冷却阶段。

3. 一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,所述方法包含:使用一种巴氏消毒方案加热细胞,从而使时间(分钟)对温度(℃)曲线图下的面积小于13,000℃·分钟。

4. 一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,所述方法包含:加热细胞,然后在平台阶段将细胞在提高的温度(T,℃)下维持一段时间(t,分钟),其中的乘积tT为从140℃·分钟至100,800℃·分钟。

5. 一种如权利要求2或4所述的方法,其中:

(a) 所述平台为最高温度;

(b) 所述巴氏消毒方案在时间(t)对温度(T)曲线图上的形状为梯形;

(c) 所述加热和/或冷却是线性的;和/或

(d) 所述细胞被加热自低于40℃的温度,和/或被加热至高于70℃的温度;和/或

(e) 所述细胞含有或产生PUFA或(可以含有PUFA的)微生物油。

6. 一种如前述任意一项权利要求所述的方法,其中微生物细胞在不超过15分钟内被从40℃加热至70℃,和/或以至少0.6℃/分钟或1.0℃/分钟的速率加热细胞。

7. 一种如前述任意一项权利要求所述的方法,其中:

(a) 以至少2℃/分钟的速率加热所述的微生物细胞;

(b) 所述巴氏消毒(或平台)温度从70℃至100℃,最适为从70℃至85℃;

(c) 所述细胞以至少-0.6℃/分钟或-1.6℃/分钟的速率被冷却;和/或

(d) 所述时间(分钟)对温度(℃)曲线图下的面积小于10,000℃·分钟或8,000℃·分钟。

8. 一种从微生物细胞中获得PUFA或微生物油的方法,所述方法包含:按照前述任意一项权利要求所述,对细胞进行巴氏消毒,再从经过了巴氏消毒的细胞中提取或分离出PUFA或微生物油。

9. 一种微生物油,含有至少90%的甘油三酯,其过氧化值(POV)低于1.5(或1.0),和/或其茴香胺值(AnV)低于15,可选地,低于12。

10. 一种如权利要求9所述的油,其中:

(a) 所述的PUFA包含C18、C20、C22 Ω -3或 Ω -6的脂肪酸;

(b) 所述的PUFA含量为至少40%;

(c) 所述的PUFA包含花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)和/或二十二碳六烯酸(DHA);和/或

(d) 所述的油是粗制的或未经过精炼的油。

用于微生物细胞和微生物油的巴氏消毒方法

[0001] 本申请是基于申请日为2003年6月20日、申请号为201410270273.8、名称为“用于微生物细胞和微生物油的巴氏消毒方法”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,包括在不超过30分钟之内将细胞从40℃加热到70℃。该巴氏消毒过程中,加热速率可以为至少0.5℃/分钟。所述巴氏消毒方法可以包含三个阶段,即加热阶段、平台(其间细胞被保持于恒定的温度)以及冷却阶段。如果用绘图方式来描述该巴氏消毒方案,则其在时间(分钟)对温度(℃)曲线图下的面积小于13,000℃·分钟。巴氏消毒后,可以从细胞中提取出多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid,PUFA),例如花生四烯酸,或者提取出微生物油。所述的油可能具有低过氧化值(peroxide value,POV)和/或低茴香胺值(anisidine value,AnV)。

背景技术

[0003] 多不饱和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid),或PUFA,可以在自然界中发现。各种各样不同的PUFA由不同的单细胞生物(藻类、真菌等)产生。一种特别重要的PUFA是花生四烯酸(arachidonic acid,ARA),它是若干种长链多不饱和脂肪酸(Long Chain Poly-Unsaturated Fatty Acid,LC-PUFA)之一。化学上,花生四烯酸是顺式-5,8,11,14-二十碳四烯酸(20:4),属于LC-PUFA的(n-6)族。

[0004] 花生四烯酸是多种具有生物活性的化合物的主要前体,这些化合物合称为类二十烷酸(eicosanoid),其中包含多种前列腺素(prostaglandin)、凝血噁烷(thromboxane)和白细胞三烯(leukotriene)。花生四烯酸还是人类母乳脂类成分(lipid fraction)的组分之一,并被认为对婴儿的理想神经发育来说是必要的。花生四烯酸具有各种各样的不同应用,包括用于婴儿配方食品(infant formula)、食品和动物饲料。

[0005] WO-A-97/37032(Gist-Brocades)中提到了由经过巴氏消毒的生物物质(biomass)来制备含有PUFA的微生物油。但是,其却并未揭示迅速地加热至巴氏消毒发生的温度或冷却自巴氏消毒发生的温度。此外,对巴氏消毒过程中所使用的能量总数也未有说明。

[0006] WO-A-00/15045和WO-A-01/67886中都提到了在食物制备中使用Mucorales真菌。上述文献中的第一篇提到,在将细胞加入到食品中之前需要进行减少RNA的操作,并暗示使用加热的步骤。单独的巴氏消毒或热激都是可行的。第二篇文献暗示,通过将真菌细胞置于发酵容器内,并使其得以“成熟(ripen)”,可以避免用加热步骤来减少RNA的含量。

[0007] 国际专利申请PCT/EP01/08902中提到了制备油类混合物的方法,该方法通过混合一种粗制的含 ω 6PUFA的油和一种粗制的含 ω 3PUFA的油,制成油类混合物,然后再对该粗制的油类混合物进行提纯。

[0008] 涉及加热生物物质或微生物细胞的方法是已知的。从WO-A-97/37032也可以获知,在被提取出以油的形式存在的PUFA之前,微生物细胞可以被进行巴氏消毒。然而,本申请人已发现,一种新的巴氏消毒方法能够提高从经过巴氏消毒的细胞中提取到的油的质量。具

体而言,得到的油可能氧化更少或更少地被氧化,而且可能具有低过氧化值(POV)和/或低茴香胺值(AnV)。此外,本申请人还发现,上述新的巴氏消毒方法更为高效,因为其只需要更少的能量。故而该方法是有益的,因为其不仅提高了油的质量,而且因其需要的能量更少从而可以降低成本。

发明内容

[0009] 本发明就此提供了一种对微生物细胞进行的改良的巴氏消毒方法。除需要更少的能量之外,本发明的巴氏消毒方法还能得到更高质量的产品。

[0010] 因此,本发明的第一方面涉及一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,该方法包含:在不超过30分钟之内,(于一种温度,包含)从40℃至(60℃或)70℃加热细胞;或以至少0.5℃/分钟的速率加热细胞。该方面因此提供了在巴氏消毒期间对微生物细胞的迅速的加热,这样的高加热速率在本领域还未有披露过。虽然本领域给出过巴氏消毒的温度,但却没有对下列内容有过正面的评价或讨论,包括:加热速率、或者该参数可能是重要的以及相对迅速的速率能带来益处。事实上,高加热速率是与直觉相反的,因为它们可能被认为会导致氧化,或者会降解从细胞中提取出来的PUFA或油。

[0011] 本发明的第二方面涉及一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,该方法包含一种包括(至少)三个阶段的巴氏消毒方案。它们是:一个(第一)加热阶段、一个(第二)平台阶段(其间,微生物细胞被保持于期望温度,或细胞被维持在恒定和/或最高的温度上)以及一个(第三)冷却阶段。本发明的此方面被称为三阶段巴氏消毒方案。如果将该方案绘制于时间对温度的曲线图上,将能得到一个梯形。

[0012] 本发明的第三方面涉及一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,该方法包含:使用一种巴氏消毒方案,使得在时间(分钟)对温度(℃)曲线图下的面积小于13,000℃·分钟。时间对温度曲线图下的面积给出了在巴氏消毒过程中加热细胞所消耗的能量值。现已发现迅速加热和/或迅速冷却(分别对应于第二方面中的第一和第三阶段)能提供益处,例如一种更高质量的油。此外,较之本领域中描述过的巴氏消毒方法,上述的巴氏消毒方法需要的能量也会减少。上述第三方面因此关系到所述巴氏消毒方法所需要的能量输入。

[0013] 本发明的第四方面涉及一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,该方法包含:(加热细胞并且)将细胞在一个提高的温度(T ,℃)下维持一段时间(t ,分钟),例如在平台阶段;其中乘积 tT (即时间和温度参数相乘,例如在该平台阶段)为140℃·分钟至100,800℃·分钟。如人们所认识到的,该第四方面与第二方面相似,因为它也含有平台阶段。此时细胞被保持于恒定的或是最高的温度。乘积 tT 因此可以代表此平台阶段在时间对温度曲线图下的面积。

[0014] 本发明涉及如下各项:

[0015] 1.一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,所述方法包括:在不超过30分钟内在包括从40℃至60℃的温度加热细胞,或以大于0.5℃/分钟的速率加热细胞。

[0016] 2.一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,例如根据项1所述的方法,所述方法包含三个阶段,即(第一)加热阶段,(第二)平台阶段(其间细胞被维持于一个恒定的温度)以及(第三)冷却阶段。

[0017] 3.一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,例如根据项1或2所述的方法,所述方

法包含:使用一种巴氏消毒方案加热细胞,从而使时间(分钟)对温度($^{\circ}\text{C}$)曲线图下的面积小于 $13,0000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 。

[0018] 4.一种对微生物细胞进行巴氏消毒的方法,例如根据项1或2所述的方法,所述方法包含:加热细胞,然后在平台阶段将细胞在提高的温度($T,^{\circ}\text{C}$)下维持一段时间($t, \text{分钟}$),其中的乘积 tT 为从 $140^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 至 $100,800^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 。

[0019] 5.一种如项2或4所述的方法,其中:

[0020] (a) 所述平台为最高温度;

[0021] (b) 所述巴氏消毒方案在时间(t)对温度(T)曲线图上的形状为梯形;

[0022] (c) 所述加热和/或冷却是线性的;和/或

[0023] (d) 所述细胞被加热自低于 40°C 的温度,和/或被加热至高于 70°C 的温度:和/或

[0024] (e) 所述细胞含有或产生PUFA或(可以含有PUFA的)微生物油。

[0025] 6.一种如前述任意一项所述的方法,其中微生物细胞在不超过15分钟内被从 40°C 加热至 70°C ,和/或以至少 $0.6^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 或 $1.0^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的速率加热细胞。

[0026] 7.一种如前述任意一项所述的方法,其中:

[0027] (a) 以至少 $2^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的速率加热所述的微生物细胞;

[0028] (b) 所述巴氏消毒(或平台)温度从 70°C 至 100°C ,最适为从 70°C 至 85°C ;

[0029] (c) 所述细胞以至少 $-0.6^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 或 $-1.6^{\circ}\text{C}/\text{分钟}$ 的速率被冷却;和/或

[0030] (d) 所述时间(分钟)对温度($^{\circ}\text{C}$)曲线图下的面积小于 $10,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或 $8,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 。

[0031] 8.根据前述任意一项所述的方法,其中所述细胞被加热至高于 60°C 的温度。

[0032] 9.根据项8所述的方法,其中所述细胞被加热至范围在 100 至 180°C 之间的温度。

[0033] 10.根据前述任意一项所述的方法,其中所述细胞被加热自低于 40°C 的温度。

[0034] 11.根据前述任意一项所述的方法,其中所述平台阶段的温度为 80 – 160°C 。

[0035] 12.根据项11所述的方法,其中所述平台阶段的温度为 100 – 140°C 。

[0036] 13.根据前述任意一项所述的方法,其中所述平台阶段的时间长度为 5 秒至 90 分钟。

[0037] 14.根据项13所述的方法,其中所述平台阶段的时间长度为 1 至 80 分钟。

[0038] 15.一种从微生物细胞中获得PUFA或微生物油的方法,所述方法包含:按照前述任意一项所述,对细胞进行巴氏消毒,再从经过了巴氏消毒的细胞中提取或分离出PUFA或微生物油。

[0039] 16.根据项15所述的方法,其中所述微生物油包含PUFA。

[0040] 17.根据项15或16所述的方法,其中所述PUFA具有至少 18 个碳原子和至少 3 个双键和/或是 C_{18} 、 C_{20} 、 $\text{C}_{22} \Omega-3$ 或 $\Omega-6$ PUFA。

[0041] 18.根据项17所述的方法,其中所述PUFA是花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)或二十二碳六烯酸(DHA)。

[0042] 19.根据项15至18中任意一项所述的方法,其中所述油包含至少 10% 的期望的PUFA。

[0043] 20.根据项19所述的方法,其中所述油包含至少 35% 的期望的PUFA。

[0044] 21.根据项20所述的方法,其中所述油包含至少 40% 的期望的PUFA。

- [0045] 22. 根据项21所述的方法,其中所述油包含至少45%的期望的PUFA。
- [0046] 23. 根据项20所述的方法,其中所述油包含35%至45%的期望的PUFA。
- [0047] 24. 根据项23所述的方法,其中所述油包含40%至45%的期望的PUFA。
- [0048] 25. 根据项15至24中任意一项所述的方法,其中所述油是项36至80中任意一项定义的油。
- [0049] 26. 根据项19至25中任意一项所述的方法,其中所述期望的PUFA是ARA、EPA或DHA。
- [0050] 27. 根据项15至26中任意一项所述的方法,其中使用溶剂从经过巴氏消毒的微生物细胞中提取所述的油。
- [0051] 28. 根据项27所述的方法,其中所述油被提取,获得粗制的含有PUFA的油,并且其中,对所述粗制的含有PUFA的油进行一个或多个精炼步骤。
- [0052] 29. 根据项28所述的方法,其中所述一个或多个精炼步骤包括酸处理或脱胶(degumming)、碱处理或去除游离脂肪酸、脱色(bleaching)或去除色素、过滤、冬化(winterisation)、脱臭(deodorising)和/或上光(polishing)。
- [0053] 30. 根据项15至29中任意一项所述的方法,其中将得到的油添加到人类食品或动物饲料中。
- [0054] 31. 根据项15至29中任意一项所述的方法,其中将得到的油添加到婴儿配方食品中。
- [0055] 32. 根据前述任意一项所述的方法,其中所述细胞是细菌、藻类、真菌或酵母细胞。
- [0056] 33. 根据项32所述的方法,其中所述细胞是Mortierella属的,优选是Mortierella alpina种的。
- [0057] 34. 根据项32所述的方法,其中所述细胞是Crypthecodinium属的,优选是Crypthecodinium cohnii种的。
- [0058] 35. 根据项32所述的方法,其中所述细胞是Thraustochytrium细胞。
- [0059] 36. 一种微生物油,具有至少90%的甘油三酯含量,低于12的过氧化值(POV)和/或低于25的茴香胺值(AnV)。
- [0060] 37. 根据项36所述的油,其中所述油包含多不饱和脂肪酸(PUFA)。
- [0061] 38. 根据项37所述的油,其中所述PUPA具有至少18个碳原子和至少3个双键和/或是C18、C20、C22 Ω -3或 Ω -6PUFA。
- [0062] 39. 根据项38所述的油,其中所述PUFA是花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)或二十二碳六烯酸(DHA)。
- [0063] 40. 根据项36至39中任意一项所述的油,其中所述油包含至少10%的期望的PUPA。
- [0064] 41. 根据项40所述的油,其中所述油包含至少35%的期望的PUFA。
- [0065] 42. 根据项41所述的油,其中所述油包含至少40%的期望的PUFA。
- [0066] 43. 根据项42所述的油,其中所述油包含至少45%的期望的PUFA。
- [0067] 44. 根据项41所述的油,其中所述油包含35%至45%的期望的PUFA。
- [0068] 45. 根据项44所述的油,其中所述油包含40%至45%的期望的PUFA。
- [0069] 46. 根据项40至45中任意一项所述的油,其中所述期望的PUFA是ARA。
- [0070] 47. 根据项40至45中任意一项所述的油,其中所述期望的PUFA是二十二碳六烯酸

(DHA)。

[0071] 48. 根据项40至45中任意一项所述的油,其中所述期望的PUFA是EPA。

[0072] 49. 根据前述任意一项所述的油,其中所述油提取或分离自下述细胞,所述细胞是酵母、真菌、细菌或藻类。

[0073] 50. 根据项49所述的油,其中所述油提取或分离自真菌。

[0074] 51. 根据项50所述的油,其中所述真菌是Mortierella属的。

[0075] 52. 根据项51所述的油,其中所述真菌是Mortierella alpina种的。

[0076] 53. 根据项39或46所述的油,其中ARA的来源是Mortierellaalpina。

[0077] 54. 根据项49所述的油,其中所述油提取或分离自藻类。

[0078] 55. 根据项54所述的油,其中所述藻类是Crypthecodinium属的。

[0079] 56. 根据项55所述的油,其中所述藻类是Crypthecodiniumcohnii种的。

[0080] 57. 根据项39或47所述的油,其中所述DHA来自Crypthecodiniumcohnii。

[0081] 58. 根据项39或47所述的油,其中所述DHA来自Thraustochytrium。

[0082] 59. 根据前述任意一项所述的油,其中所述油具有低于25的AnV。

[0083] 60. 根据项59所述的油,其中所述油具有低于20的AnV。

[0084] 61. 根据项60所述的油,其中所述油具有低于15的AnV,例如低于12的AnV。

[0085] 62. 根据项59至61中任意一项所述的油,其中所述油具有5至25、5至20或5至15的AnV。

[0086] 63. 根据项62所述的油,其中所述油具有10至25、10至20或10至15的AnV。

[0087] 64. 根据前述任意一项所述的油,其中所述油具有低于12的POV。

[0088] 65. 根据项64所述的油,其中所述油具有低于8的POV。

[0089] 66. 根据项65所述的油,其中所述油具有不高于3.0、2.5或2.0的POV。

[0090] 67. 根据项66所述的油,其中所述油具有低于1.5或低于1.0的POV。

[0091] 68. 根据项64至67中任意一项所述的油,其中所述油具有0.4至12、0.4至8、0.4至3.0、0.4至2.5、0.4至2.0、0.4至1.5、0.4至1.3、0.4至1.0或0.4至0.8的POV。

[0092] 69. 根据前述任意一项所述的油,其中所述油具有至少90%的甘油三酯含量。

[0093] 70. 根据前述任意一项所述的油,其是粗制的或未经过精炼的油。

[0094] 71. 包含根据项36至69中任意一项所述的油的、为动物或人类提供的食品和/或食物添加剂。

[0095] 72. 包含根据项36至69中任意一项所述的油的婴儿配方食品。

[0096] 73. 一种方法,包括将根据项36至69中任意一项所述的油添加到为动物或人类提供的食品和/或食物添加剂中。

[0097] 74. 一种方法,包括将根据项36至69中任意一项所述的油添加到婴儿配方食品中。

[0098] 75. 根据项36至69中任意一项所述的油作为用于人类食品或动物饲料的添加剂的用途。

[0099] 76. 根据项36至69中任意一项所述的油作为用于婴儿配方食品的添加剂的用途。

[0100] 77. 一种方法,包括对根据项70所述的油进行一个或多个精炼步骤。

[0101] 78. 根据项77所述的方法,其中所述精炼步骤包括酸处理或脱胶、碱处理或去除游离脂肪酸、脱色或去除色素、过滤、冬化、脱臭和/或上光。

- [0102] 79. 根据项77或78所述的方法,其包括将得到的油添加到人类食品或动物饲料中。
- [0103] 80. 根据项77或78所述的方法,其包括将得到的油添加到婴儿配方食品中。

附图说明

- [0104] 图1是三种巴氏消毒方案的温度(°C)对时间(分钟)的曲线图(A和C属于本发明,B用作对照);
- [0105] 图2是在三种不同温度平台(40°C、70°C和85°C)进行的巴氏消毒的温度(°C)对时间(分钟)曲线图;
- [0106] 图3和4是AnV(及图3的POV)对时间(小时)的曲线图。
- [0107] 图5是具有两种不同(持续/平台)时间(8秒和300秒)的巴氏消毒的POV(meq/kg)和AnV对温度(°C)的曲线图;
- [0108] 图6和7是在五种不同温度(60°C、80°C、100°C、120°C和140°C)下进行的两种不同(持续/平台)时间(图6为8秒,图7为5分钟)的温度(°C)对时间(秒)的曲线图。

具体实施方式

[0109] 第一方面——迅速加热

[0110] 在该方面,细胞被加热,从而其温度在不超过30分钟(例如不超过15分钟)内经历或是从40°C至70°C(或60°C)。从40°C至70°C所经历的时间优选不超过40至50分钟。或者或此外,上述细胞以至少0.5°C/分钟的速率被加热。当然,微生物细胞可以始于(或被加热于)低于40°C的温度。例如,这些细胞可以处于室温或环境温度。这些细胞可以处于发酵温度,例如30°C±5°C。所以,当加热(巴氏消毒)开始时,细胞可以处于20°C至40°C,例如23°C至27°C(或者25°C或29°C至32°C或37°C)。在某些情况下,微生物细胞可以是经过冷却的,例如在发酵结束之后。所以当加热开始时,这些细胞的(初始)温度可以是5°C至10°C,例如7°C至9°C。

[0111] 微生物细胞可以被加热至其温度升高到(60°C或)70°C以上。因此,该温度可以并非巴氏消毒期间微生物细胞的最终温度。事实上,细胞可以被加热到(60°C或)70°C以上的温度。温度可能升高直至达到70°C至90°C、110°C或130°C,例如75°C至87°C,最适为78°C至84°C。巴氏消毒期间的最高温度因此可以在上述范围内,但对于某些实施方式,其也可以达到100°C、120°C或140°C。优选地,细胞被保持或被维持于该(最高)温度。

[0112] 因此可以认识到,对细胞的加热可以在低于40°C的温度下进行或从40°C开始,达到70°C或更高。40°C至70°C的范围可以提供更宽广的加热/温度范围的“快照(snapshot)”,其时间(及由此的速率)可被确定(并由此被计算)。

[0113] 可以计算出,上述的加热(30分钟内从40°C至70°C)速率为1°C/分钟。但是如果必要的话,速率还可以较此稍低,第一方面中的迅速加热意味着加热速率超过0.5°C/分钟。该速率优选为至少0.6°C/分钟、1.0°C/分钟或者甚至1.5°C/分钟。但是,特别快速的加热速率是可以考虑的,它取决于设备和被加热的微生物细胞的体积或质量。因此本发明中也有超过2.0°C/分钟或甚至2.5°C/分钟的加热速率。

[0114] 可以使用专门的设备来获得特别高的加热速率。其可以在一段短时间内达到高温,同时,这样做能将之后被分离出来的PUFA或微生物油的氧化或破坏降至最低。因此,加

热可以在最高温度高达140℃、150℃或者甚至160℃下进行。优选地,加热可以达到100℃至180℃之间的温度范围,例如120℃至160℃,优选从130℃至150℃。采用特别迅速的加热仪,可以特别快地获得上述的温度,例如在少于一分钟的时间(30秒)以内。达到上述的温度可以仅在20、30、40或50秒内,也可以需要150、175、200、225或250秒。然而,上述的温度可以在短如2、4、6、8或10秒内达到,例如采用灌流加热仪(infusion heater),或是相对较小的样品。因此,高达每分钟50℃、100℃、150℃或者甚至200℃的加热速率都是可以获得的。稍低一些的加热速率,每分钟从5℃或10℃至50℃或60℃因此也是可能的,例如每分钟从15℃至45℃。

[0115] 已发现,迅速的巴氏消毒过程中的迅速加热不仅更加高效及需能更少,而且它看上去还是获得更高质量的微生物油(一旦从经过巴氏消毒后的细胞中被提取出来)的原因中的至少一个因素。

[0116] 第二方面——三阶段巴氏消毒方案

[0117] 第一阶段可以是加热阶段。它实际上相当于本发明第一方面中所描述过的迅速加热,因此,第一方面中的所有特征和特性在经过必要的修正后都可以应用于第二方面的第一(加热)阶段。

[0118] 第二阶段是细胞处于(温度)平台之时。由此细胞可以在特定的期望温度下(正负1℃或2℃、5℃或甚至10℃)被保持一段期望长度的时间。上述细胞由此可被维持于恒定的温度。该平台阶段的温度(或温度范围)优选为上述巴氏消毒方案中所达到的最高温度。该平台阶段的温度(和/或巴氏消毒期间的最高温度)优选为至少70℃。它可低于90℃或100℃,适于从70℃至85℃,例如从70℃至77℃。此外,它可从80℃至160℃,例如从100℃至140℃。

[0119] 平台阶段或是细胞被保持于期望或最高温度的时间的长度,可以从5秒至90分钟,例如从1或10分钟至80分钟,例如从20分钟至70分钟。该时间最适于从40或50分钟至60或70分钟,例如从45分钟至65分钟,从55分钟至63分钟是有益的。特别短的时间,例如从8秒至5分钟,也是可能的。

[0120] 第三阶段是冷却阶段。优选地,细胞被冷却至与前面所提到的加热(或第一阶段)伊始时的温度范围相同或在其范围之内的温度。微生物细胞优选被线性地冷却和/或加热(适当地,第一和/或第三阶段),那即是说,当被绘制在时间对温度的曲线图上时,冷却或加热曲线(近似地)为直线。上述细胞可以自然冷却,或者其可以被主动冷却,例如使用热交换器(heat exchanger)和/或冷却物质,例如为了(降低)到环境温度或室温,或者更低。

[0121] 冷却速率优选为至少0.4℃/分钟、0.6℃/分钟、1.0℃/分钟或1.5℃/分钟。这些数值代表了细胞被自然冷却时可获得的冷却速率。但是,更迅速的冷却速率也是有可能的,尤其是采用了主动冷却时。因此,至少为2.0℃/分钟、2.5℃/分钟、3.0℃/分钟或者甚至3.5℃/分钟的冷却速率也是可以得到的。但是,更高的冷却速率,例如高于每分钟5℃也是可能的,例如,每分钟7℃或10℃至50℃或60℃,优选为每分钟15℃至45℃。

[0122] 优选的加热和/或冷却速率优选保持在至少10℃、20℃或30℃以上,虽然在一些实施方式中,可以获得超过至少40℃或50℃的范围的速率。

[0123] 可以认识到,具有迅速加热阶段和迅速冷却阶段的巴氏消毒,其中用到的能量可以被降低。这不仅仅导致了成本的节约,而且还不会对(最终的)微生物油的质量产生负面影响,事实上,它看起来还对油有着有益的效果。

[0124] 第三方面——时间对温度曲线图下的面积(能量输入)

[0125] 从第二方面可以明显获知,如果将本发明的巴氏消毒方案绘制在一幅时间对温度的曲线图上,将会得到一个梯形。第一(加热)和第三(冷却)阶段的形状可能均为三角形,而中间或第二(平台)阶段(第四方面的主题)(通常)是矩形。时间对温度曲线图下的面积代表输入到系统中的能量值。通过将巴氏消毒方案分为三部分,可计算出曲线图的面积,从而计算出能量输入。

[0126] 在第三方面,时间(分钟)对温度($^{\circ}\text{C}$)的曲线图下的面积小于 $13,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 。但是,远小于此的数量也已经被获得,小于 $11,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 、 $10,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 、 $9,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 、 $8,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或者甚至 $1,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 的数值也是可能的。在本发明的优选方面,这些数值可以不超过 $7,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 、 $6,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或 $800^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 。在所述的曲线图中,时间被绘制在x轴(或水平轴或横坐标)上,0分钟代表原点。温度由此将被绘制在y轴(或垂直轴或纵坐标)上, 0°C 代表原点。

[0127] 微生物细胞一旦被加热至它们巴氏消毒的温度,然后即可冷却(或被冷却)。这些细胞通常被冷却至室温或环境温度,或至少低于 30°C 的温度。因此不但有细胞从 30°C 被加热至 60°C 的时间,也还有细胞从 60°C 冷却至 30°C 的时间。这两个时间可以被加合起来提供组合的 30°C - 60°C - 30°C 的加热和冷却时间。该组合时间优选为少于150分钟,例如是少于120分钟或100分钟。但是,对更小的样品,还能获得更快得多的时间,上述组合(30°C 到 60°C 再回到 30°C)时间可以少于70、50或者甚至30分钟。

[0128] 第四方面——有平台阶段的巴氏消毒方案

[0129] 本方案可以是一种依据第二方面的方案,其中有(例如,第一)加热阶段和(例如,第三)冷却阶段、夹在中间的(例如,第二或中间或居中的)平台阶段。但是,这并不是必需的,其它的巴氏消毒方案也能被设想出来。第四方面涉及上述平台阶段的优选特征。第二(和其它)方面中的所有特征和特性在经过必要的修正后也适用于此第四方面。

[0130] 上述细胞被维持或保持于特定的期望温度(正负 1°C 、 2°C 、 5°C 或者甚至 10°C),在一种温度($T,^{\circ}\text{C}$)下持续一段时间(t ,分钟)。这两个参数可以被乘起来,从而给出乘积 tT 。它适于从 $140^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或 $280^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 至 $50,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或 $100,800^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 。该乘积优选从 $500^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 、 $1,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 、 $2,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或 $3,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或甚至 $6,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 至 $10,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 、 $18,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或 $25,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 。该乘积 tT 最适为 $2,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 至 $6,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$,例如 $3,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 至 $5,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$,最适从 $4,000^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 至 $4,500^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 。在一些实施方式中,该乘积 tT 为从 $13^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 至 $900^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$,例如从 $100^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或 $200^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 至 $700^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或 $800^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$,优选从 $300^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或 $400^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 至 $600^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 或 $700^{\circ}\text{C} \cdot \text{分钟}$ 。

[0131] 因此,通过与第三方面中相似的方式,可以认识到,该乘积 tT 代表了当细胞被保持于升高的温度时的时间对温度曲线图下的面积。因此,该倍增因数 tT 实际上正是平台(但非加热或冷却)阶段曲线图下的面积。

[0132] PUFA的提取

[0133] 本发明的第五方面涉及一种从微生物细胞中获取PUFA的方法,该方法包含:如前所述,根据本发明的第一、第二、第三或第四方面中之任一,对细胞进行巴氏消毒,再从经过巴氏消毒的细胞中提取和/或分离出PUFA。

[0134] 本发明的第六方面涉及微生物油,其可以包含至少40%的花生四烯酸(ARA)和/或具有含量为至少90%的甘油三酯。所述的油可以具有低于2.5、1.5、0.8、0.6或者甚至0.5的POV和/或低于1.0的AnV。所述的油可以通过第五方面的方法来制备。

[0135] 多不饱和脂肪酸(PUFA)和微生物油

[0136] 所述的PUFA可以是一种PUFA,也可以是两种或更多种不同的PUFA。该PUFA或每种PUFA可以是n-3或n-6族的。优选为C18、C20或C22的PUFA。它可以是具有至少18个碳原子和/或至少3或4个双键的PUFA。该PUFA可以以一种游离脂肪酸、一种盐的形式,作为一种脂肪酸酯(例如甲酯或乙酯),作为一种磷脂和/或以甘油单、双或三酯的形式被提供。

[0137] 适合的(n-3和n-6)PUFA包括:

[0138] 二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid,DHA,22:6 Ω 3),适合来自藻类或真菌,例如(甲藻)Cryptocodinium或(真菌)Thraustochytrium;

[0139] γ -亚麻酸(γ -linolenic acid,GLA,18:3 Ω 6);

[0140] α -亚麻酸(α -linolenic acid,ALA,18:3 Ω 3);

[0141] 共轭亚油酸(conjugated linoleic acid,十八碳二烯酸(octadecadienoic acid),CLA);

[0142] 双高- γ -亚麻酸(dihomo- γ -linolenic acid,DGLA,20:3 Ω 6);

[0143] 花生四烯酸(ARA,20:4 Ω 6);和

[0144] 二十碳五烯酸(eicosapentaenoic acid,EPA,20:5 Ω 3)。

[0145] 优选的PUFA包括花生四烯酸(ARA)、二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸(EPA)和/或 γ -亚麻酸(GLA)。具体而言,优选为ARA。

[0146] 所述的PUFA可以通过经本发明的方法进行了巴氏消毒的细胞来生产,例如微生物细胞。其可以是细菌、藻类、真菌或酵母细胞。真菌是优选的,优选为Mucorales目的,例如Mortierella、Phycomyces、Blakeslea、Aspergillus、Thraustochytrium、Pythium或Entomophthora。ARA的优选来源为Mortierella alpina、Blakeslea trispora、Aspergillus terreus或Pythium insidiosum。藻类可以是甲藻(dinoflagellate)和/或包括Porphyridium、Nitzschia或Cryptocodinium(例如Cryptocodinium cohnii)。酵母包括Pichia或Saccharomyces属的,例如Pichia ciferrii。细菌可以是Propionibacterium属的。该微生物油(在室温下)可以为液体。

[0147] 大多数的PUFA优选为以甘油三酯的形式存在。因此,优选为至少50%,例如至少60%,或最优为至少70%的PUFA都以甘油三酯的形式存在。但是,甘油三酯的数量还可以更高,例如为油的至少85%,优选为至少90%,最优为至少95%或98%。这些甘油三酯中,优选至少40%,例如至少50%,而最优为至少60%的PUFA,都处于甘油的 α 位(出现于甘油三酯的主链(backbone)中)也就是所谓的1或3号位。处于 β (2)位的上述PUFA优选为至少20%,例如至少30%,最优为至少40%。

[0148] 上述微生物油可以包含至少10%、35%、40%或45%或更多期望的PUFA,例如花生四烯酸。它可以有至少90%的甘油三酯含量。该微生物油具有的甘油三酯含量优选为从90%至100%,例如至少96%,优选为至少98%,更优选为至少99%,而最优的为超过99.5%。典型地,这种油中二十碳五烯酸(EPA)的含量低于5%,优选为低于1%,而更优选的是低于0.5%。该油中C20、C20:3、C22:0和/或C24:0多不饱和脂肪酸(PUFA)中任何一种的含量可

以少于5%，少于2%，少于1%。游离脂肪酸(free fattyacid,FFA)的含量可以 $\leq 0.4\%$ ，0.2%或0.1%。上述的油可以含有很少或没有GLA和/或DGLA。

[0149] 该微生物油可以是粗制的油。它可以通过使用溶剂从细胞中萃取出来，例如超临界态二氧化碳、己烷或异丙醇。

[0150] 巴氏消毒过程

[0151] 巴氏消毒通常发生于发酵完成之后。在一种优选实施方式中，巴氏消毒将终止发酵，因为巴氏消毒期间的热度会杀死细胞。巴氏消毒因此可以对发酵培养液(或液体(水性)培养基中的细胞)进行，虽然其也能够对从培养液中获得的微生物物质(biomass)进行。在前一种情况中，巴氏消毒可以发生于微生物细胞仍处于发酵罐中时。巴氏消毒优选于微生物细胞受到更多的处理之前进行，例如微粒化(比如通过挤压)粉碎，或者捏炼(kneading)。

[0152] 优选地，巴氏消毒方案足以抑制或失活一种或多种能使PUFA或微生物油降解或者对其产生不良影响的酶，例如脂肪酶。

[0153] 一旦发酵被终止，就可以过滤发酵培养液，或者进行其它处理以去除其中的水或水性液体。水分被移除之后，可以获得一种生物物质“压滤渣(cake)”。如果巴氏消毒还未开展，就可以对这些去水的细胞(或生物物质压滤渣)进行巴氏消毒。

[0154] PUFA的提取方法

[0155] 然后PUFA(或通常包含该PUFA的微生物油)就可以从所述(经过巴氏消毒)的微生物细胞中提取得到。其优选从含有细胞的(比如，干燥的)微粒(例如，挤压出的产物)中提取。这种提取可以使用溶剂来进行。优选使用无极性溶剂，例如C₁₋₈，优选为C₂₋₆的链烷，举例来说是己烷。也可以使用二氧化碳(液态形式的，比如处于超临界状态的)。

[0156] 优选地，溶剂被允许从干燥微粒中滤出。在WO-A-97/37032中描述了合适的微生物微粒化和挤压技术以及其后的对含有PUFA的微生物油的提取。

[0157] 上述溶剂可以令我们获得含有PUFA的粗制油。这种油在此状态即可被使用，无需更多处理，或者它也可以再经过一步或数步精炼。然而，粗制的油通常含有溶剂，例如用来萃取该油的溶剂(例如己烷，或醇，例如异丙醇)，或其还未经历下述精炼步骤中的一种(或优选为全部)。PCT/EP01/08902号国际专利申请(该文件的内容和本文中所述及其它所有文件的内容通过引用的方式包括于本文中)中描述了合适的精炼方案。例如，可以对这种油进行一步或数步的精炼，包括：酸处理或脱胶(degumming)、碱处理或去除游离脂肪酸、脱色或去除色素、过滤、冬化(winterisation)(或冷却，例如为了去除饱和的甘油三酯)、脱臭(或对游离脂肪酸的去除)和/或上光(polishing)(或对油不溶性物质的去除)。上述所有精炼步骤在PCT/EP01/08902中都有更为详细的描述，在经过必要的修正后都可以被应用于本申请所描述的步骤中。

[0158] 由此得到的油特别适合于营养上的用途，其可以被添加到(人类)食物或(动物)饲料中。例子包括奶、婴儿配方食品、健康饮品、面包和动物饲料。

[0159] 微生物细胞

[0160] 本发明中使用的微生物细胞(或微生物)可以是上文所述的任何一种，尤其是在关于PUFA和微生物油的一节中的那些。它们可以包含或能被用于生产PUFA或微生物油，所述的PUFA油可以适当地提取或分离自上述的细胞中。这些细胞可以是丝状的形式，例如真菌

或细菌,或者可以是酵母、藻类和细菌等单个的细胞。这些细胞可以包含酵母、真菌、细菌或藻类等微生物。优选的真菌是Mucorales目的,例如该真菌可以是Mortierella、Phycomyces、Blakeslea或Aspergillus属的。优选的真菌是Mortierella alpina、Blakeslea trispora或Aspergillus terreus种的。

[0161] 至于考虑到酵母,优选是Pichia (例如是Pichia ciferrii种的) 或Saccharomyces属的。

[0162] 细菌可以是Propionibacterium属的。

[0163] 如果该细胞来自藻类,优选为甲藻(denoflagellate) 和/或属于Crypthecodinium属的,优选的藻为Crypthecodinium cohnii属的。

[0164] 加热

[0165] 直接或间接地加热(上述细胞)都是可行的。所述的加热,如果是直接的,则可以通过向发酵罐中传送蒸汽。间接的方式可以通过热交换器使用一种介质,其既可以通过发酵罐的壁,也可以有加热线圈,或外部的热交换器,例如板式热交换器(plate heat exchanger)。

[0166] 通常,巴氏消毒将发生于进行发酵的发酵容器中。但是,对一些微生物(例如细菌)而言,通常优选的是首先将细胞移出容器,然后再进行巴氏消毒。巴氏消毒可以发生于对生物进行其它处理之前,例如干燥或微粒化。

[0167] 巴氏消毒通常将杀死大多数的微生物,如果不是全部的话。巴氏消毒后,至少95%、96%或者甚至98%的微生物都已被杀死,即它们已经死亡。

[0168] 酸化

[0169] 在一些情况下,人们期望降低细菌在经过巴氏消毒之后生长的风险。一种可能是用合适的酸来酸化细胞。因此,为了防止微生物物种的生长(outgrowth),将细胞的pH调节到从3至4的范围是合乎期望的。但是根据所述的细胞,也还可以采用更宽的pH范围,所以pH可以调节为2至5,最优是在大约3.3至3.7的范围内。

[0170] 对细胞的酸化可以发生于巴氏消毒之前。然而,其优选却进行于巴氏消毒之后。

[0171] 对pH的调节可以通过任何适当的途径或任何适当的酸来进行。优选是使用磷酸来获得的,例如85%的或稀释的55%或33%的磷酸。

[0172] 过氧化值(POV)

[0173] 上述微生物油的POV优选为从4至8或12,尤其是对粗制的油而言。然而,该POV可以不超过3.0,2.5或2.0。但是,使用本发明的方法还可以获得更低得多的POV,这些值可以低于1.5或低于1.0。低于0.8或0.6以及甚至低于0.4的POV也是能够获得的。(来自于实施方式的)数值变动于1.3(或0.8)至0.4之间。(POV的)单位通常是meq/kg。

[0174] 茴香胺值(AnV)

[0175] 该值表示对醛类含量的测量。上述微生物油的茴香胺值优选为从5、6、7或10至15、20或25,尤其是对粗制的油而言。AnV适于不超过20,例如不超过15。它可以不超过10或者甚至不超过5。优选地,POV和/或AnV是就粗制的而非经过精炼的油而言的。AnV值(在优选的实验中)在15至5之间变化,可以是在12至7之间。

[0176] 粗制油与精炼油的对比

[0177] 下面展示了上述两种油之间的一些区别。每种粗制的或精炼的油都可能具有下表

中恰当对应于粗制或精炼油的一种或多种特征。粗制的油通常含有抗氧化剂(例如生育酚、抗坏血酸棕榈酸)。

[0178]

物质	优选(对粗制的)	粗制的油	精炼的油
未皂化物	< 3.5%(w/w)	< 2.5%(w/w)	1.8%(w/w)
溶剂(例如己烷)	< 2000ppm	100-2000ppm	检测不到或 ≤ 1 ppm
磷脂类(phospholipids)%		2-3.5	0.05
游离脂肪酸, 例如油酸	< 1%	0.2%	0.08%

[0179]

物质	优选(对粗制的)	粗制的油	精炼的油
POV	≤ 10meq/kg	6meq/kg	1.4meq/kg
不溶物	< 0.5%	0.1%	-
磷	< 1000mg/kg	5mg/kg	-
硅	< 500ppm	100ppm	24ppm
砷	< 0.5mg/kg	< 0.04mg/kg	< 0.5mg/kg
镉	< 0.2mg/kg	< 0.02mg/kg	< 0.1mg/kg
汞	< 0.04mg/kg	< 0.4mg/kg	< 0.04mg/kg
铅	< 0.1mg/kg	< 0.1mg/kg	< 0.1mg/kg
铜	< 0.2mg/kg	< 0.2mg/kg	< 0.02mg/kg
水分及挥发性组分	< 1.0%	0.5	< 0.02%
磷脂(phosphatide, P/ppm)		50-100	< 10

[0180] 适当地,本发明中的粗制油可以具有以下特征中的一个或数个:

[0181] (a) 未皂化物含量从2.0%至3.5% (w/w);

[0182] (b) 溶剂(例如己烷)含量从10ppm、50ppm或100ppm至1000ppm、1500ppm或2000ppm;

[0183] (c) 游离脂肪酸含量从0.1%或0.2%至1%,例如0.2%-0.6%或0.3%-0.5%;

[0184] (d) POV从2、3、4或6至10;

[0185] (e) 含磷量为至少2、3或5mg/kg;

[0186] (f) 含硅量为50ppm或100ppm至500ppm;和/或

[0187] (g) 水分含量少于1%或从0.5%至1%或2%。

[0188] 油及PUFA的用途

[0189] 本发明的第六方面涉及一种组合物,其中包含第五方面所述的油以及如果合适的话,还具有一种或多种(额外的)物质。该组合物可以是动物或人类提供的食品 and/或食物

添加剂。在本发明的多种供人类消耗的实施方式中,可以对上述的油进行加工,使其适合人类消耗,典型地是对从微生物中获得的油进行精炼或提纯。

[0190] 上述组合物可以是婴儿配方食品或(人类)食品。此处的配方食品的成分可以经过调节,使其中各种油脂或PUFA的含量与正常母乳相似。这可以包括将本发明的微生物油与其它油类掺合,以获得合适的组合物。

[0191] 上述组合物可以是动物或海产饲料的组合物或添加剂。上述饲料和添加剂可以供给任何的养殖动物,特别是绵羊、牛和家禽。此外,上述饲料或添加剂还可以供给被养殖的海产生物,例如鱼和有壳水生动物。上述组合物因此还可以包括一种或多种适于上述动物的饲料物质或成分。

[0192] 本发明的油可以作为油直接售卖,也可以被包纳于合适的包装中,典型地,是一种内部涂上环氧酚紫胶漆(epoxy phenolic lacquer)并且经过充氮的铝瓶。上述的油可能含有一种或多种抗氧化剂(例如,生育酚、维生素E、棕榈酸),每种浓度例如为50ppm至800ppm,比如从100ppm至700ppm。

[0193] 合适的组合物可以包括药用或动物治疗用的(veterinary)组合物,例如,口服或化妆品用途的组合物。所述的油可以按照所述的方式被使用,或者还可以被装入胶囊,例如在一种壳(shell)里,因此可以成为胶囊的形式。所述的壳或胶囊可以包含明胶和/或甘油。所述的组合物可以含有其它成分,例如调味料(比如柠檬或酸橙香料)或者一种药用或动物治疗可接受的载体或赋形剂。

[0194] 本发明中一个方面的优选特征和特性在进行必要的修正后同样可适用于另一个方面。

[0195] 现在将采用举例的方式通过下述的实施例来对本发明进行描述,下述的实施例通过阐述对本发明提供支持,而并非欲对本发明的范围进行限制。

[0196] 实施例1

[0197] 含有PUFA的微生物油在生产过程中的氧化,被认为是由酶活性导致的。巴氏消毒被当作一种在处理微生物细胞以获得微生物油的过程中稳定(stabilising)氧化的方法。现发现,这种稳定的程度取决于巴氏消毒的条件。

[0198] 为此,我们开展了若干项实验,来确定巴氏消毒的哪些条件会影响到油的氧化水平特别是其过氧化值(POV)。过氧化值采用AOCS: Cd8-53中详细描述的标准方案来测定。

[0199] 上述实验遵循以下方案:发酵;贮藏;巴氏消毒;(微生物油的)提取;对油的分析。

[0200] 真菌Mortierella alpina被培养于发酵罐中。发酵持续了大约148小时。M.alpina生产名为花生四烯酸(ARA)的PUFA。上述生物物质被移出发酵罐,并被贮藏(于低于-18℃的温度)。

[0201] 当发酵培养液还处于发酵罐中时,就将M.alpina生物物质的样品从发酵培养液中移出,而且立刻将其冷冻起来。

[0202] 我们尝试了多种巴氏消毒方案。巴氏消毒被进行于三种不同的温度,即40℃、70℃和85℃。上述方案遵循一种三阶段方法,其具有迅速加热的第一阶段,接着为处于期望温度也即是所使用的最高温度的平台(第二或中间阶段)。然后是迅速冷却的(第三)阶段。不同的生物物质样品经历了具有三种不同时间的中间(平台)阶段,即一个、两个和24个小时。

[0203] 巴氏消毒之后,采用湿法提取(wet extraction)技术来获得微生物油。生物物质

样品被过滤、(在压力下)压榨,油被提取出来。

[0204] 然后对微生物油进行分析,首先是用AOCs方法来分析过氧化值(POV)。一些样品中的ARA含量也被测定。分析显示,获得的每kg微生物油具有大约420g的ARA。

[0205] 详细方案:发酵和样品提取

[0206] 从发酵罐容器中移出一升的发酵培养液,并将其过滤(Seitz两升过滤器,F-FA10)。得到的压滤渣用600ml的去离子水漂洗。上述湿压滤渣被风吹干燥一分钟,然后在400bar进行压榨(使用HAFICO™装置,酊压(tincture press),C-0A021,300-400Atm)。再用Ultra Turrax™仪器,在室温(20℃至25℃)下用500ml的己烷(Merck)对湿的压出物进行一小时的萃取以得到微生物油。然后将己烷移走。再用250ml新鲜的己烷在室温对剩下的压滤渣进行漂洗(搅拌下30分钟)。移走己烷,并将其加入到前次萃取后的己烷中。

[0207] 然后将一种玻璃过滤器和一种GFA玻璃过滤器联合使用来过滤萃取物。再使用Rotavapor™仪器,使己烷于50℃左右从澄清的萃取物中挥发约15分钟。上述的油被转移至气密性杯中,然后对每只样品杯充氮30秒。再将上述样品杯关好并贮藏于-18℃。

[0208] 巴氏消毒方案

[0209] 我们试验了三种不同的方案(A、B和C)。每种都由三个阶段组成,即第一加热阶段,(处于最高温度的)第二平台阶段和第三冷却阶段。下表1显示了这三种巴氏消毒模式的方案。

[0210] 表1

[0211]

	时间 (t, 分钟)	时间 (t) 对 应的温 度 (T, °C)	阶段	阶段 中的温 度变化 (°C)	每个阶 段的时 间 (分 钟)	曲 线 下 面 (°C·分 钟)	加热 / 冷 却速 率 (°C/ 分钟)	经 历 40°C 至 70°C 的 时 间 (分 钟)	40-70- 40°C 的组 合时 间(分 钟)	t 对 T 曲线 图下 的面 积 (°C·分 钟)
	0	25								7575
模 式 A	75	70	加热	45	t 加 热 =75	1687.5	0.6	50	100	
	135	70	巴氏消 毒	0	t 消 毒 =60	4200	0			
	210	25	冷却	45	t 冷 却 =75	1687.5	0.6	50		
模 式 B (本 发 明 之 对 照)	0	25							200.11	13968
	102	72	加热	48	t 加 热 =102	4896	0.46	65.11		
	162	72	巴氏消 毒	0	t 消 毒 =60	4320	0			
	360	28	冷却	48	t 冷 却 =198	4752	0.22	135		
	0	7							21.58	5607.5
	25	70	加热	63	t 加 热 =25	787.5	2.52	11.90		
	85	70	巴氏消 毒	0	t 消 毒 =60	4200	0			
	105	8	冷却	62	t 冷 却 =20	620	3.10	9.68		

[0212] 所述的三种巴氏消毒模式A、B和C还另外以绘图方式展现于图1中。可以认识到,对每种模式中的三个步骤的每一个而言,其在温度(T, °C)对时间(t, 分钟)曲线图下的面积都能被计算出来,然后将它们加合,就能给出三种模式中每一种在曲线图下的总面积。此类计算还显示于上表1中。

[0213] 从经历A、B和C三种巴氏消毒方案后的细胞中萃取得到的油,其过氧化值(POV)被测定。所述萃取的油的POV分别为8.7、14.3和2.4。模式B的加热和冷却速率缓慢,其仅作为对照出现。它的POV最高,为14.3。

[0214] 与之相反,模式A和C都是本发明的内容。模式A比模式B在第一和第三阶段的加热和冷却速率都更快。在本发明中,加热和冷却速率优选为至少和模式A中所示的一样快。模式A给出的POV为8.7。

[0215] 但是,使用模式C才获得了最好的结果,其POV仅为2.4。如图1所示,它具有一个非常迅速的加热阶段和快速的冷却(第三)阶段。

[0216] 实施例2

[0217] 我们进行了与实施例1类似的实验,区别只在于此处巴氏消毒的温度变化更宽,即为40°C(用作对照)、70°C和85°C。温度(°C)对时间(分钟)的曲线显示于下面的图2和表2中。

所有样品的曲线都基本一样,当然除了其适当具有巴氏消毒平台的延伸(一个小时到4或24小时)。

[0218] 表2

40°C		70°C		85°C	
时间	温度	时间	温度	时间	温度
0	10.0	0	8.0	0	7.0
10	27.0	10	55.0	10	40.0
20	40.1	17	70.0	20	66.0
25	40.0	77	68.2	30	79.0
40	41.4	82	44.3	40	83.5
50	41.0	87	31.3	100	79.8
80	38.7	92	21.8	105	55.3
85	27.5	97	16.0	110	38.7
90	19.3	102	9.7	115	26.3
95	14.5			120	21.0
100	9.7			125	15.2
110	7.5			130	11.3

[0220] 对来自两次不同长度的不同的发酵的样品(均为*M.alpina*)进行检测。样品号11至20。表3是一次略为长一点的发酵,其中有约两升的培养液被转移至一个接种体发酵罐,发酵延续了48小时,其中没有任何额外的葡萄糖的加入。

[0221] 巴氏消毒后对上述样品进行加工,先是在大约1bar氮气的压力下进行过滤。得到的压滤渣再被工艺用水(process water,大约为初始的培养液体积的0.6倍)漂洗。使用水果压榨机在300至400bar的活塞压力下完成脱水。接着加入500ml新鲜的己烷,使用Ultra-turrax仪来混合一分钟。然后在环境温度下进行大约一小时的萃取。过滤后,用250ml新鲜的己烷对得到的压滤渣进行漂洗,得到的溶剂于60°C至70°C在真空下挥发。然后充氮,再贮藏于-18°C。

[0222] 表3中显示了上述结果,包括第一次和第二次测量的过氧化值,以及这两个数值的平均值,还有茴香胺值(AnV)。图3和图4(分别对应较短和较长的发酵)中还示出了POV和AnV的降低。

[0223] 表3

样品号	T _{消毒} (°C)	t _{消毒} (小时)	POV1	POV2	POV _{平均}	AnV
1	—	0	6.0	5.4	5.7	25.7
2	40	1	8.8	8.5	8.6	25.9
3	40	4	3.8	3.8	3.8	27.1
4	40	24	2.1	2.2	2.1	21.0

5	70	1	2.2		2.2	30.2
6	70	3.5	1.1	1.1	1.1	33.5
7	70	22	0.7	0.7	1.0	15.9
8	85	1	1.2	1.2	1.2	25.9
9	85	3.3	0.7	0.8	0.7	27.1
10	85	20.5	0.5	0.5	0.5	12.9
11	—	0	5.9	5.4	5.6	39.3
12	40	1	9.9	10.1	10.0	38.7
13	40	4	4.8	4.5	4.6	40.7
14	40	24	2.5	3.0	2.8	32.3
15	70	1	2.7	2.8	2.7	40.3
16	70	3.5	1.6	1.7	1.3	32.7
17	70	22	1.0	0.9	1.3	14.5
18	85	1	1.8	1.8	1.8	39.7
19	85	3.3	1.1	1.1	1.1	32.4
20	85	20.5	0.9	1.0	0.9	16.1

[0225] 从上述结果中看到,没有巴氏消毒时,POV为5.6或5.7。40℃下的巴氏消毒降低了POV,但在该巴氏消毒温度,需要相对较长的一段时间(例如24小时)来将POV降低至可接受的数值2.1。

[0226] 更高的温度则要成功得多。例如,在70℃仅进行1小时的巴氏消毒,就能得到2.2的POV,相比之下在40℃要24小时才能获得2.1的POV。在更高的温度上还获得了甚至更好的数值,85℃进行1小时得到的POV仅为1.2。(上述数据只是较短发酵的,虽然从在较长的发酵中生长的细胞上也能获得类似的结果)。

[0227] 图3和图4以图的形式展示了POV和AnV值是怎样随不同的巴氏消毒时间而变化的。同预计一样,较长的巴氏消毒时间给出了较低的AnV和POV值。然而,更重要的是,在巴氏消毒期间使用相对高的温度。当巴氏消毒温度($T_{\text{消毒}}$)增加至70℃时,就能发现AnV和POV有了显著的降低,在85℃时还能发现甚至更低的数值。(以十字形、实心圆和星号表示的顶部三条线显示了AnV,而以菱形、方形和三角形表示的较低的一条线给出了POV)。

[0228] 下表4显示了九个不同的巴氏消毒方案(三个不同的平台温度以及持续三段不同的时间)的计算乘积 tT (℃·分钟)。该乘积能有效地代表(加热阶段之后、但早于冷却阶段的)平台阶段的(时间, t ,分钟对温度, T ,℃)的曲线图下的面积。

[0229] 表4

	温度 (T , °C)	40	70	85
时间 (t , 小时/分钟)				
1 (60)		2,400	4,200	5,100
4 (240)		9,600	16,800	20,400
24 (1440)		57,600	100,800	122,400

[0231] 实施例3

[0232] 如前例,用真菌*M.alpina*进行生产规模的发酵,然后用发酵培养液来进行更多的巴氏消毒试验。将未经过巴氏消毒的培养液(800升)转移出来并贮藏于4℃。再将该培养液转移至一个700升的搅动容器中,并展开10种不同的巴氏消毒方案。

[0233] 首先,于五种不同的(最高)温度,即140℃、120℃、100℃、80℃和60℃,进行巴氏消毒,(在最高温度)持续(平台)时间为8秒。此外,还在140℃、120℃、100℃、80℃和60℃,进行于最高温度持续(平台)时间*为300秒的巴氏消毒。

[0234] 将样品(2升)取出并直接冷冻于-18℃。消毒后的样品(200ml)被取出后冷冻,然后采用下述方案从样品中回收得到粗制的花生四烯酸油。

[0235] 在1bar的N₂下过滤发酵培养液的样品(1.7升)。用0.6倍体积的冷凝水漂洗压滤渣,再在400kg/cm²下进行约5分钟的压榨。然后,将正己烷(500ml)加入到湿的压滤渣中,使用Ultra Turrax仪在24,000rpm进行粉碎。在环境温度(约21℃)下对油进行超过约110分钟的萃取。使用GF/A Whatman过滤介质对悬浮液进行真空过滤。再用250ml新的己烷来漂洗压滤渣。己烷在温度为大约60℃至70℃的水浴中挥发15分钟。然后将得到的油转移至气密性的样品杯中,充氮30秒,接着将其关好并在分析前贮藏于-18℃。

[0236] 图5、6和7提供了分析后的数据。图6和7显示了上述两套实验的时间对温度曲线,分别为:在五种温度设置,一是平台(持续)时间为8秒,二是平台(持续)时间为5分钟。如上述的图所示,中间的水平线(代表8秒或5分钟)显示平台阶段。

[0237] 图5显示了全部10种巴氏消毒体系下获得的POV和AnV。如图所示,随着温度逐渐变得更高,获得的POV则更低;并且较长的持续时间(5分钟)给出了最低的POV。

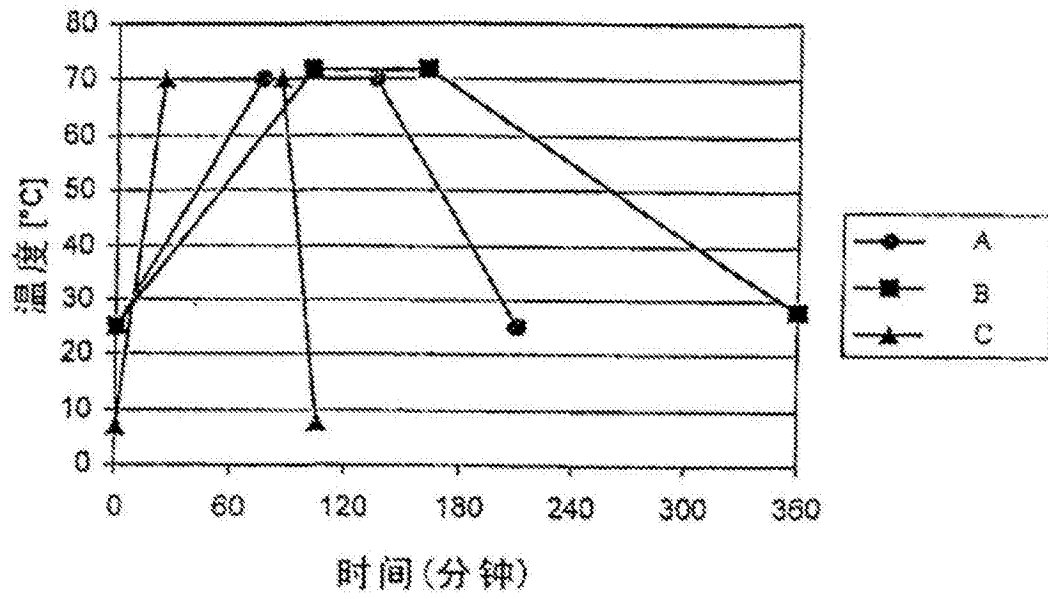


图1

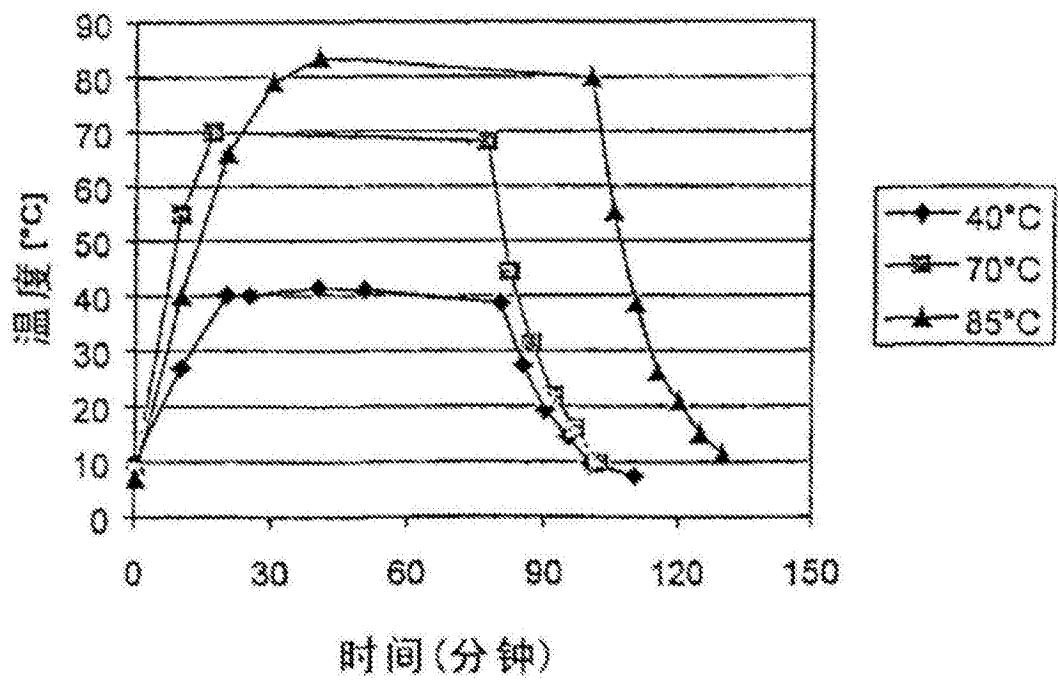


图2

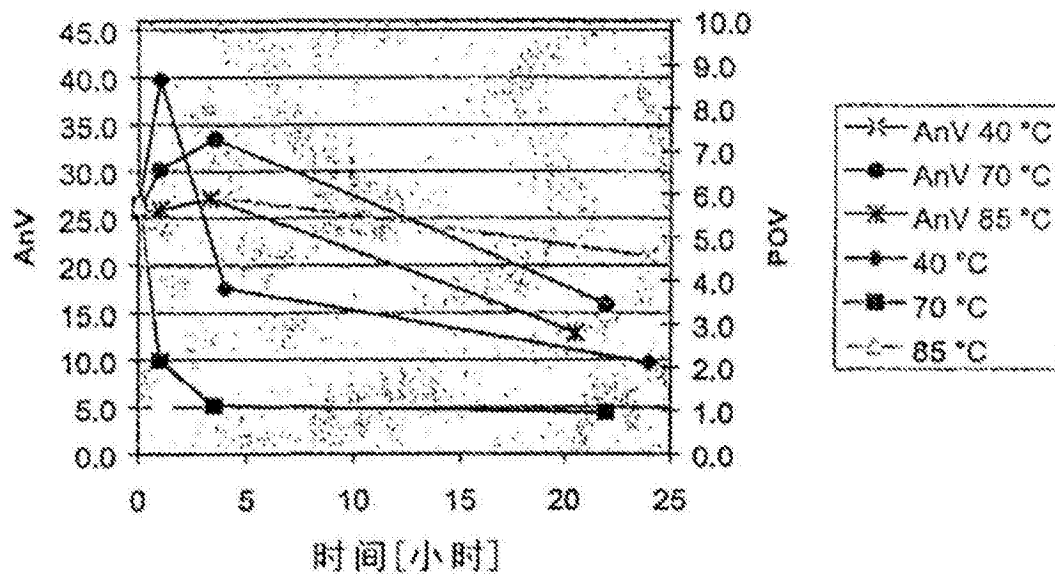


图3

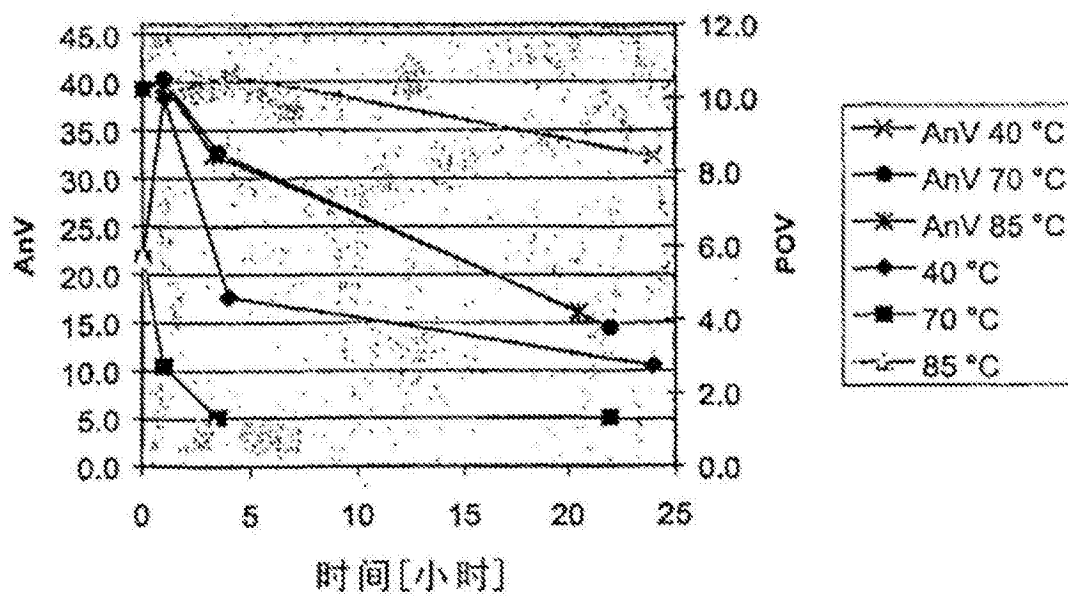


图4

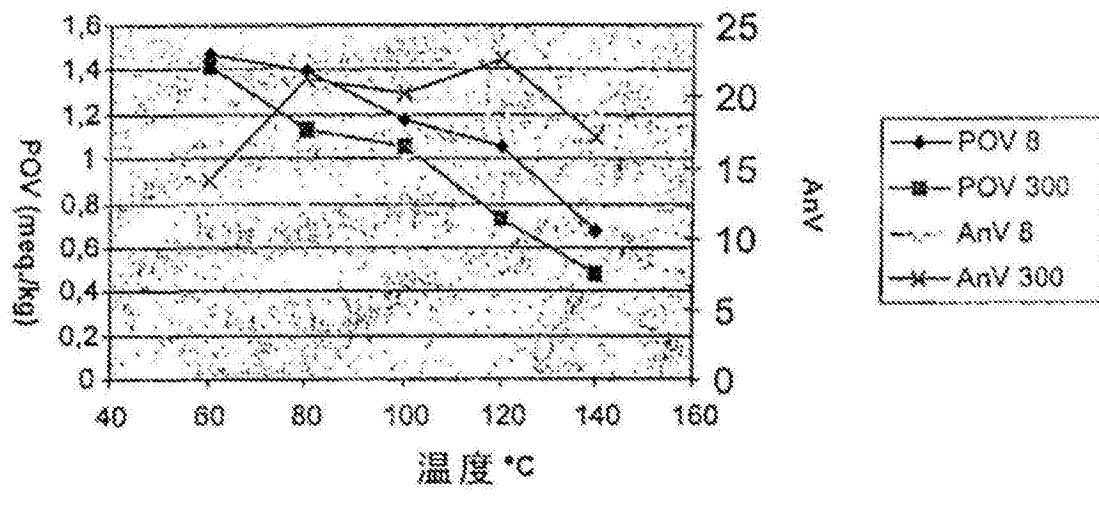


图5

持续时间为8秒

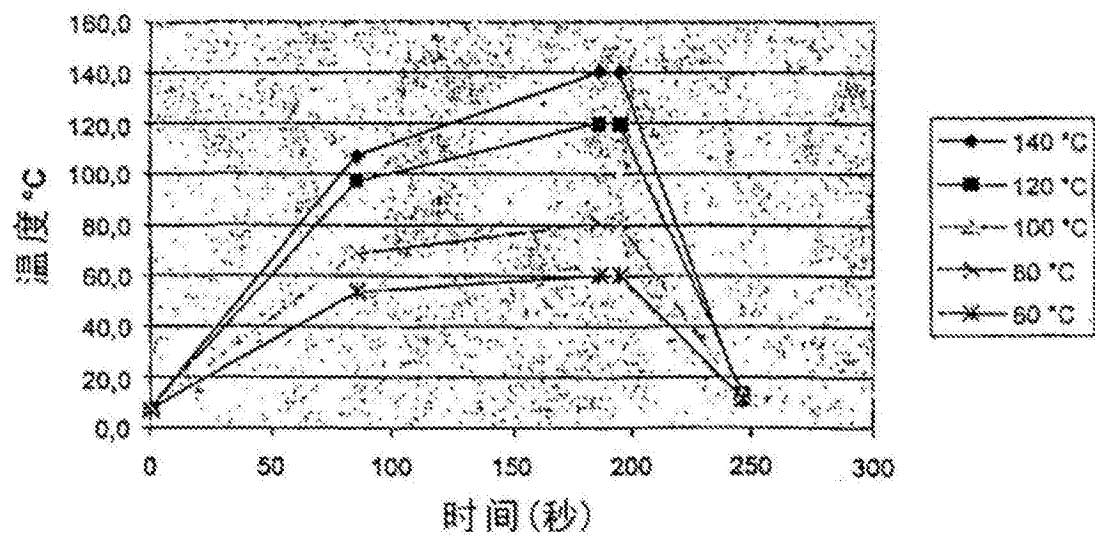


图6

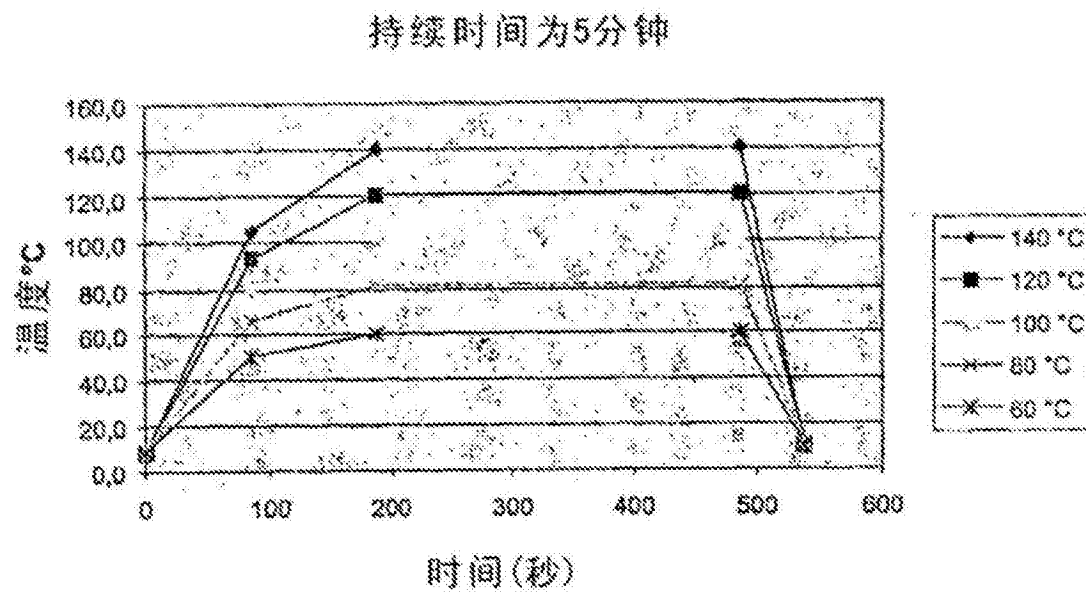


图7