



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104321438 B

(45)授权公告日 2018.06.05

(21)申请号 201280068854.2

NRRL NO.50794 2012.11.30

(22)申请日 2012.12.02

NRRL NO.50795 2012.11.30

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104321438 A

(73)专利权人 普莱瑞阿夸泰克公司
地址 美国南达科他州

(43)申请公布日 2015.01.28

(72)发明人 威廉·R·吉本斯
迈克尔·L·布朗

(30)优先权数据

61/566,557 2011.12.02 US

61/566,487 2011.12.02 US

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 郑霞

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2014.08.01

(51)Int.Cl.

C12P 21/04(2006.01)

C12N 1/16(2006.01)

A23K 10/30(2016.01)

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2012/067508 2012.12.02

(87)PCT国际申请的公布数据
W02013/082574 EN 2013.06.06

(56)对比文件

CN 1609188 A,2005.04.27,

(83)生物保藏信息

NRRL NO.50792 2012.11.30

NRRL NO.50793 2012.11.30

审查员 刘宝

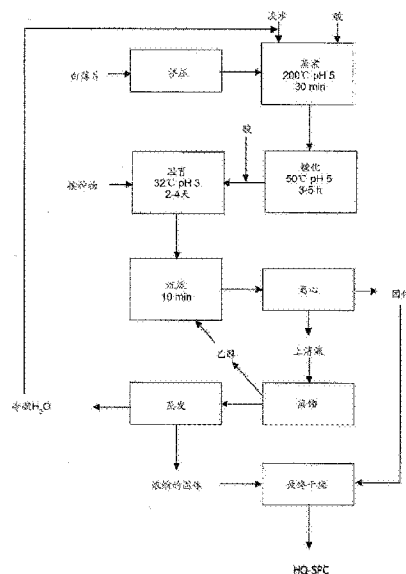
权利要求书1页 说明书32页 附图5页

(54)发明名称

用于高质量蛋白质浓缩物的基于微生物的方法

(57)摘要

本发明描述了通过经由有氧温育转化植物来源的纤维素为生物可利用的蛋白质,产生高质量蛋白质浓缩物(HQPC)的基于生物的方法,包括如此产生的此类HQPC作为营养物的用途,包括在水产养殖食物中作为鱼粉代替物的用途。



1. 一种组合物,包括基于大豆的蛋白质浓缩物,其中所述组合物由蛋白质、单一的有机体、短梗霉聚糖构成并且包含基于干物质至少60%的蛋白质含量,其中所述有机体是出芽短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*)。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物的蛋白质含量在基于干物质的从60%至90%的范围,所述组合物通过包括以下的方法产生:

- a) 在高于室温的温度挤压大豆物质,以形成糊状物;
- b) 添加一种或多种纤维素解构酶以释放糖到所述糊状物中;
- c) 以出芽短梗霉菌接种所述酶处理的糊状物,该出芽短梗霉菌转化释放的糖为蛋白质和短梗霉聚糖,从而增加大豆糊状物的蛋白质含量;
- d) 以乙醇或絮凝剂沉淀所得到的蛋白质、微生物、及胞外多糖;
- e) 经由水动力回收所沉淀的材料;及
- f) 干燥所述沉淀的材料。

3. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述大豆物质以大豆薄片或大豆粉的形式。

4. 根据权利要求2所述的组合物,其中所述出芽短梗霉菌选自自由以下组成的组:NRRL No. 50792、NRRL No. 50793、NRRL No. 50794和NRRL No. 50795及其组合。

5. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述蛋白质浓缩物包括至少0.1g羟赖氨酸/100g浓缩物,或至少1.26g脂类/100g浓缩物。

用于高质量蛋白质浓缩物的基于微生物的方法

[0001] 发明背景

[0002] 这项研究以来自国家科学基金会 (National Science Foundation) 根据合同DBI-1005068的政府支持进行。政府对本发明具有一定的权利。

[0003] 相关申请的交叉参考

[0004] 根据35U.S.C. §119(e), 本申请要求申请日为2011年12月2日的美国临时申请号61/566,487, 及申请日为2011年12月2日的美国临时申请号61/566,557的权益, 其各自通过在此引用其全文被并入。

发明领域

[0005] 本发明一般涉及温育方法, 具体地涉及产生高质量蛋白质浓缩物的基于微生物的有氧温育方法, 包括由其制成的产物和此类产物在营养物饲料的制备中的用途。

[0006] 背景信息

[0007] 在2008年, 约28%的世界野生、海洋鱼类资源被过度开发, 且52%被完全开发, 正如随着增加的人口, 人均鱼类和贝类产物消耗的需求增加。随着野生鱼类资源的减少, 为了努力满足此需求的增加, 商业水产养殖生产急剧增加。然而, 用于水产养殖的饮食制剂的主要成分之一, 鱼粉蛋白质, 也是来源于野生捕捞渔业。据估计, 到2012年将需要至少有6.7mmt的鱼粉以支持商业水产养殖生产。这显然是不可持续的趋势。

[0008] 较低成本、更可持续的植物来源的蛋白质已用于在水产养殖食物中部分代替鱼粉。脱脂大豆粉 (SBM, 42-48%的蛋白质) 已普遍被用以在几个物种的生长食物中代替多达总蛋白质的20%, 而大豆蛋白质浓缩物 (SPC, 65%的蛋白) 在较高的总蛋白质代替水平已被成功地测试, 很大程度上由物种的营养状态制约。这些大豆产物提供高蛋白质和相对良好的氨基酸谱, 但仍然缺乏由肉食性海洋鱼类所需的一些关键氨基酸 (如牛磺酸)。SPC可在相比大豆粉较高的水平使用, 主要因为用于产生SPC的溶剂提取方法除去了抗营养因子 (如低聚糖), 且从而提高了蛋白质的生物利用度。此外, 热步骤已被用于灭活热不稳定的抗原因子。当前的溶剂提取方法的主要限制是其成本、缺乏在该工序中除去的低聚糖的使用、和质量问题, 常常限制内含物至食物中总蛋白质的50%。此外, 从大豆材料向大豆粉或大豆蛋白质浓缩物的加工可造成环境问题 (例如, 与处置用己烷提取相关的化学废物的问题)。

[0009] 玉米副产物, 包括干酒糟及可溶物 (distiller's dried grain with solubles, DDGS), 也已在水产养殖食物中以高达20%的鱼粉代替水平被评价。DDGS具有比大豆产物低的蛋白质 (28-32%), 及更多的纤维, 但售价典型为脱脂大豆粉价值的~50%。一些乙醇工厂已经合并了干法分馏 (dry fractionation) 方法以在转化方法之前除去部分纤维和油, 产生高达42%蛋白质的干馏 (dry-frac) DDGS。虽然这种产物在水产养殖食物中已被用来代替20-40%的鱼粉, 仍需要更高的蛋白质、更易消化的DDGS水产养殖饲料产物。如果蛋白质组分有较高水平的关键氨基酸, 如牛磺酸、赖氨酸、甲硫氨酸和半胱氨酸, 这样的产物将是特别有吸引力的。

[0010] 因此, 对植物来源的蛋白质来源存在需求, 其是成本效益和“绿色”的, 且足够高质

量以完全或实质上在水产养殖食物中代替更多鱼粉。

[0011] 发明概述

[0012] 本公开内容涉及有机、基于微生物的系统,以转化植物材料为高度可消化的、浓缩的蛋白质来源,其还包含微生物胶状物(胞外多糖)的粘合剂,包括适合用作用于人类消耗的动物的饲料的这种浓缩的来源。

[0013] 在实施方案中,公开了含有基于非动物的蛋白质浓缩物的组合物,其中基于干物质,组合物含有至少55%的蛋白质含量,且没有可检测的水苏糖或棉子糖。在一个方面中,组合物包含出芽短梗霉菌(*Aureobasidium pullulans*)的保藏菌株NRRL编号50792、NRRL编号50793、NRRL编号50794、及NRRL编号50795、或其组合。

[0014] 在一个方面,基于非动物的蛋白质浓缩物是从谷物及油料种子植物材料中分离的,所述植物材料包括但不限于,大豆、花生、油菜籽、油菜、芝麻、大麦、棉籽、棕榈仁、葡萄籽、橄榄、红花、向日葵、椰子核(copra)、玉米、椰子、亚麻籽、榛子、小麦、水稻、马铃薯、木薯(cassava)、豆科植物、亚麻芥籽(camelina seed)、芥菜籽(mustard seed)、胚芽粉(germ meal)、玉米蛋白粉(corn gluten meal)、蒸馏/酿酒副产物(distillery/brewery by-product),其部分和组合。

[0015] 在另一个方面,组合物的蛋白质含量在基于干物质的从约56%至约90%的范围,所述组合物通过包括以下的方法产生:在高于室温的温度挤压植物材料,以形成糊状物;添加一种或多种纤维素解构酶以释放糖到糊状物中;以至少一种微生物接种酶处理的糊状物,该微生物转化释放的糖为蛋白质和胞外多糖;以乙醇或絮凝剂沉淀得到的蛋白质、微生物、及胞外多糖;经由水动力回收沉淀的材料;及干燥所述沉淀的材料。

[0016] 在相关的方面,至少一种微生物包括,但不限于,出芽短梗霉菌、硬葡聚糖小核菌(*Sclerotium glucanicum*)、少动鞘脂单胞菌(*Sphingomonas paucimobilis*)、*Ralstonia eutropha*、深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)、克鲁维酵母(*Kluyveromyces* spp)、毕赤酵母(*Pichia* spp)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、糙皮侧耳(*Pleurotus ostreatus*)、根霉(*Rhizopus* spp),及其组合。

[0017] 在一个方面,植物材料以大豆薄片或大豆粉的形式来自大豆。在另一个方面,植物材料来自油料种子或它们的脱油粉。在另一个方面,植物材料来自干酒糟及可溶物(DDGS)。

[0018] 在一个方面,蛋白质浓缩物包括至少0.1g羟赖氨酸/100g浓缩物。

[0019] 在一个实施方案中,公开了包括基于非动物的蛋白质浓缩物的动物饲料,其中组合物包括至少约1.26克脂类/100g组合物,其中基于干物质,组合物不包含可检测的水苏糖或棉子糖,且包含至少55%的蛋白质含量,且其中组合物构成所述动物饲料重量的至少35%。

[0020] 在相关的方面,组合物是对鱼饲料中基于动物的鱼粉的完全代替物。在进一步相关方面,鱼饲料被配制用于的鱼,包括但不限于,西伯利亚鲟(Siberian sturgeon)、小体鲟(Sterlet sturgeon)、闪光鲟(Starry sturgeon)、白鲟(White sturgeon)、巨骨舌鱼(Arapaima)、日本鳗(Japanese eel)、美洲鳗(American eel)、短鳍鳗(Short-finned eel)、长鳍鳗(Long-finned eel)、欧洲鳗(European eel)、遮目鱼(*Chanos chanos*)、遮目鱼(Milkfish)、蓝鳃太阳鱼(Bluegill sunfish)、蓝绿鳞鳃太阳鱼(Green sunfish)、白莓鲈(White crappie)、黑莓鲈(Black crappie)、Asp、卡特拉鲃(Catla)、金鱼(Goldfish)、鲫

鱼 (Crucian carp)、鲮鱼 (Mud carp)、麦瑞加拉鲮鱼 (Mrigal carp)、草鱼 (Grass carp)、鲤鱼 (Common carp)、鲢鱼 (Silver carp)、鳙鱼 (Bighead carp)、Orangefin labeo、Roho labeo、红万鲤鱼 (Hoven's carp)、武昌鱼 (Wuchang bream)、青鱼 (Black carp)、金体美洲鳊 (Golden shiner)、Nilem carp、白阿穆尔鳊鱼 (White amur bream)、泰银鲃 (Thai silver barb)、Java、斜齿鳊 (Roach)、丁鲷 (Tench)、池塘泥鳅 (Pond loach)、Bocachico、金头鲷 (Dorada)、Cachama、Cachama Blanca、Paco、黑鲟 (Black bullhead)、斑点叉尾鲟 (Channel catfish)、鲮科鲶鱼 (Bagrid catfish)、蓝鲶鱼 (Blue catfish)、六须鲶鱼 (Wels catfish)、巨鲶 (Pangasius (Swai, Tra, Basa) catfish)、条纹鲶鱼 (Striped catfish)、泥鳅 (Mudfish)、菲律宾鲶鱼 (Philippine catfish)、香港鲶鱼 (Hong Kong catfish)、北非鲶鱼 (North African catfish)、大头鲶鱼 (Bighead catfish)、Sampa、南美鲶鱼 (South American catfish)、Atipa、白斑狗鱼 (Northern pike)、香鱼 (Ayu sweetfish)、白鲟 (Vendace)、白鲑 (Whitefish)、粉红鲑 (Pink salmon)、大马哈鱼 (Chum salmon)、银大马哈鱼 (Coho salmon)、樱鲑 (Masu salmon)、虹鳟鱼 (Rainbow trout)、红大马哈鱼 (Sockeye salmon)、大鳞大马哈鱼 (Chinook salmon)、大西洋鲑鱼 (Atlantic salmon)、海鲑 (Sea trout)、北极红点鲑 (Arctic char)、溪红点鲑 (Brook trout)、湖红点鲑 (Lake trout)、大西洋鳕鱼 (Atlantic cod)、银汉鱼 (Pejerrey)、Lai、锯盖鱼 (Common snook)、澳洲肺鱼/亚洲海鲈鱼 (Barramundi/Asian sea bass)、尼罗河鲈鱼 (Nile perch)、虫纹石斑鱼 (Murray cod)、金鲈鱼 (Golden perch)、条纹鲈鱼 (Striped bass)、白鲈 (White bass)、欧洲鲈鱼 (European seabass)、香港石斑鱼 (Hong Kong grouper)、宝石石斑鱼 (Areolate grouper)、鲈滑石斑鱼 (Greasy grouper)、斑点东星斑 (Spotted coral grouper)、银鲈 (Silver perch)、白鲈 (White perch)、宝石鲈 (Jade perch)、大口黑鲈 (Largemouth bass)、小口黑鲈 (Smallmouth bass)、欧洲鲈 (European perch)、梭鲈 (Zander, Pike-perch)、黄鲈 (Yellow Perch)、加拿大梭鲈 (Sauger)、大眼梭鲈 (Walleye)、竹荚鱼 (Bluefish)、红鲷 (Greater amberjack)、青鲷 (Japanese amberjack)、卵形鲳鲹 (Snubnose pompano)、佛罗里达州鲳 (Florida pompano)、谷氏鲳 (Palometa pompano)、日本竹荚鱼 (Japanese jack mackerel)、军曹鱼 (Cobia)、红树林红鲷鱼 (Mangrove red snapper)、黄尾笛鲷 (Yellowtail snapper)、黑鲷 (Dark seabream)、白鲷鱼 (White seabream)、深红鲷鱼 (Crimson seabream)、红鲷鱼 (Red seabream)、真鲷 (Red porgy)、金丝鲷 (Goldlined seabream)、金头鲷 (Gilthead seabream)、红鼓鱼 (Red drum)、绿宝丽鱼 (Green terror)、黑带鲷 (Blackbelt cichlid)、淡水石斑鱼 (Jaguar guapote)、墨西哥银鲈 (Mexican mojarra)、Pearlspot、三斑罗非鱼 (Three spotted tilapia)、蓝罗非鱼 (Blue tilapia)、长鳍罗非鱼 (Longfin tilapia)、莫桑比克罗非鱼 (Mozambique tilapia)、尼罗罗非鱼 (Nile tilapia)、罗非鱼 (Tilapia)、荷那龙罗非鱼 (Wami tilapia)、黑颚罗非鱼 (Blackchin tilapia)、伦氏非鲫 (Redbreast tilapia)、福寿鱼 (Redbelly tilapia)、金鲷 (Golden grey mullet)、大鳞鲷 (Largescale mullet)、Gold-spot mullet、Thinlip grey mullet、跳鲷 (Leaping mullet)、Tade mullet、乌鲷 (Flathead grey mullet)、白鲷鱼 (White mullet)、梭状鲷 (Lebranche mullet)、太平洋脂塘鳢 (Pacific fat sleeper)、尖塘鳢 (Marble goby)、白斑臭都鱼 (White-spotted spinefoot)、点蓝子鱼 (Goldlined spinefoot)、刺蓝子鱼 (Marbled spinefoot)、南方黑鲔 (Southern bluefin tuna)、北方黑

鲔鱼(Northern bluefin tuna)、攀鲈(Climbing perch)、Snakeskin gourami、接吻鲈(Kissing gourami)、巨鲈(Giant gourami)、黑鱼(Snakehead)、印尼黑鱼(Indonesian snakehead)、斑点黑鱼(Spotted snakehead)、条纹黑鱼(Striped snakehead)、大菱鲆(Turbot)、大比目鱼(Bastard halibut)(日本牙鲆(Japanese flounder))、夏日鲆(Summer Flounder)、漠斑牙鲆(Southern flounder)、北美黄盖鲆(Winter flounder)、大西洋大比目鱼(Atlantic Halibut)、绿背鲆(Greenback flounder)、欧鲆(Common sole)、及其组合。

[0021] 在一个方面,相比包括基于动物的鱼粉或大豆蛋白质浓缩物的相当的鱼饲料,鱼饲料在一个或多个性能方面产生更大的性能,所述性能方面包括但不限于,生长、体重增加、蛋白质功效比、饲料转化率、总消耗、存活率、和弗尔顿氏丰满系数(Fulton's condition factor)。

[0022] 在另一个方面,鱼饲料以小于或等于包括基于动物的鱼粉或大豆蛋白质浓缩物的相当的鱼饲料的蛋白质含量的粗蛋白质含量产生性能方面。

[0023] 在一个方面,动物饲料补充有赖氨酸、甲硫氨酸、脂类、生物素、胆碱、烟酸、抗坏血酸、肌醇、泛酸、叶酸、吡哆醇、核黄素、硫胺素、维生素A、维生素B12、维生素D、维生素E、维生素K、钙、磷、钾、钠、镁、锰、铝、碘、钴、锌、铁、硒或其组合。

[0024] 在另一个实施方案中,公开了产生基于非动物的蛋白质浓缩物的方法,所述方法包括在高于室温的温度挤压植物材料,以形成糊状物,并将所述糊状物转移至生物反应器中;添加一种或多种纤维素解构酶以释放糖到生物反应器中的糊状物中;以至少一种微生物接种酶处理的糊状物,该微生物转化释放的糖为蛋白质和胞外多糖;以乙醇、絮凝剂、或其组合沉淀得到的蛋白质、微生物、及胞外多糖;经由水动力回收沉淀的材料;及干燥沉淀的材料。

[0025] 在相关方面,挤压是在约50℃至约170℃之间,以约3:1的压缩比,且在足以提供针对筒两侧的脊形通道的剪切作用的螺杆转速下进行。

[0026] 在另一相关方面中,方法包括混合挤压的材料与水以达到在生物反应器中至少约5%的固体加载率;和任选地,高压灭菌并冷却稀释的挤压的材料,其中一种或多种纤维素解构酶选自以下组成的组:内切木聚糖酶和β-木糖苷酶、糖苷水解酶、β-葡糖苷酶、半纤维素酶活性,及其组合。

[0027] 在一个相关的方面,方法包括降低酶处理的糊状物的温度至约30℃至约37℃之间;以约2%(v/v)的至少一种微生物的24小时培养物接种冷却的糊状物,其中至少一种微生物包括但不限于,出芽短梗霉菌、硬葡聚糖小核菌、少动鞘脂单胞菌、Ralstonia eutropha、深红红螺菌、克鲁维酵母、毕赤酵母、里氏木霉、糙皮侧耳、根霉,及其组合;任选地,将所述接种的糊状物以约0.05L/L/min充气;且温育至糖的利用终止,或在至少一种微生物的存在下培养约96至120小时后。

[0028] 在一个方面,方法包括加入约0.6升乙醇/L糊状物;离心乙醇处理的糊状物;回收乙醇;任选地回收悬浮的细颗粒,回收离心的固体;及干燥回收的离心的固体。在另一个方面,可干燥上清液,回收干燥的固体,且随后将其与离心的固体混合。

[0029] 在一个实施方案中,公开了选自以下组成的组的出芽短梗霉菌菌株的生物纯培养物:NRRL编号50792、NRRL编号50793、NRRL编号50794、及NRRL编号50795。

[0030] 附图简述

- [0031] 图1显示了HQSPC转化方法的流程图。
- [0032] 图2显示了用于水产饲料的HQSPC转化方法的流程图。
- [0033] 图3显示了工作台规模 (bench scale)、延长的温育试验,以评价HQSPC组成和产量。
- [0034] 图4显示了用于水产饲料的HP-DDGS转化方法的流程图。
- [0035] 图5显示了在100 °C下HP-DDGS的挤压后水分含量和挤压速度对葡萄糖回收的作用。
- [0036] 发明详述
- [0037] 在描述本发明组合物、方法和方法论前,应当理解,此发明并不局限于描述的特定的组合物、方法和实验条件,因为这样的组合物、方法和条件可以变化。也是可以理解的是,本文所使用的术语仅是为了描述特定实施方案,并非意图限制,因为本发明的范围将仅由所附的权利要求书限定。
- [0038] 如此说明书和所附权利要求书中使用,除非上下文另有明确规定,否则单数形式“一 (a)”、“一 (an)”和“该 (the)”包括复数指代对象。因此,例如,提及的“一种核酸”包括一种或多种核酸,和/或本文所描述的该类型的组合物,对于本领域技术人员在阅读本公开内容后其将变得明显、等等。
- [0039] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有由本发明所属领域的普通技术人员所通常理解的相同的含义。类似或等同于本文描述的方法和材料的任何方法和材料可以在本发明的实践或试验中使用,因为将会理解,修改和变化都被涵盖在本公开内容的精神和范围内。
- [0040] 如本文所用,“约 (about)”、“大约 (approximately)”、“基本上 (substantially)”和“显著 (significantly)”将由本领域的普通技术人员理解,且将会取决于它们被使用的上下文在一定程度上变化。如果其中其被使用的上下文中对本领域普通技术人员该术语的使用是不清楚的,“约”和“大约”意味着对特定术语加或减<10%,且“基本上”和“显著”意味着对特定术语加或减>10%。
- [0041] 如本文所用,术语“动物”是指属于动物界的任何生物体,且包括但不限于,人类、鸟类(例如家禽)、哺乳动物(如牛、猪、山羊、绵羊、猫、狗、小鼠和马)以及水产养殖生物,如鱼(如鳟鱼、鲑鱼、鲈鱼)、软体动物(如蛤)和甲壳类动物(如龙虾和虾)。
- [0042] 术语“鱼”的使用包括所有脊椎动物鱼,其可以是硬骨鱼或软骨鱼。
- [0043] 如本文所用的“基于非动物的蛋白质”是指包括至少0.81g粗纤维/100g组合物(基于干物质)的蛋白质浓缩物,粗纤维是作为植物物质的化学分析的残渣获得的主要是纤维素和木质素的材料。
- [0044] 如本文所用,“温育方法”是指用于细菌或细胞的生长和发育的适当条件的规定,其中这样的细菌或细胞使用生物合成途径以代谢各种饲料原料。在实施方案中,例如,温育方法可在有氧条件下进行。在其它实施方案中,温育方法可包括发酵。
- [0045] 如本文所用,术语“温育产物”是指从温育方法/反应直接得到的任何剩余物质。在某些情况下,温育产物含有微生物使得其相比缺乏这样的微生物的温育产物具有增强的营养物含量。温育产物可含有来自温育肉汤 (broth) 的适合成分。例如,温育产物可包括来自温育肉汤的溶解的和/或悬浮的成分。悬浮的成分可包括未溶解的可溶成分(如,其中溶液

是一种或多种组分过饱和的)和/或存在于温育肉汤中的不溶性材料。温育产物可包括在温育结束时存在的基本上全部干物质(例如,通过喷雾干燥温育肉汤、和通过培养产生的生物质),或可包括它们的一部分。温育产物可包括来自温育的粗材料,其中微生物可被分级和/或部分纯化,以增加材料的营养物含量。

[0046] 如本文所用,“转化培养”是指包含在包括足以使微生物生长的材料,例如,水和营养物质,的培养基中的微生物的培养。术语“营养物”是指任何具有营养价值的物质。它可以是动物饲料或用于动物的食品补充剂的一部分。示例性的营养物包括但不限于蛋白质、肽、脂肪、脂肪酸、脂类、水和脂溶性维生素、必需氨基酸、碳水化合物、甾醇、酶和微量矿物质,例如,磷、铁、铜、锌、锰、镁、钴、碘、硒、钼、镍、氟、钒、锡和硅。

[0047] 转化是在适合转化蛋白质/碳水化合物/多糖材料的条件下,培养转化培养中的微生物的过程,例如,大豆材料转化为高品质的蛋白质浓缩物。适当的转化是指,利用90%或更多的特定的碳水化合物,产生微生物细胞物质(cell mass)和/或胞外多糖。在实施方案中,转化可以是需氧或厌氧的。

[0048] 如本文所用“絮凝剂”或“清除剂”是通过凝聚促进胶体离开悬浮液的化学物质,且包括,但不限于,多价离子和聚合物。在实施方案中,这样的絮凝剂/清除剂可包括生物絮凝剂如胞外多糖。

[0049] 大量的植物蛋白质来源可与本公开内容组合使用作为用于转化的饲料原料。在饲料工业使用植物蛋白质的主要原因是替代更昂贵的蛋白质来源,例如动物蛋白质来源。另一个重要的因素是通过饲养动物蛋白质至相同或相关物种的动物的传播疾病的危险。植物蛋白质来源的实例包括,但不限于,来自以下的蛋白质:豆科(Fabaceae)植物,如大豆和花生所示例的,来自十字花科(Brassicaceae)植物,如油菜、棉籽所示例的,菊科(Asteraceae)植物,包括但不限于向日葵,和棕榈科(Arecaceae)植物,包括椰子核。这些蛋白质来源,也通常被定义为油料种子蛋白质,可完整地用于饲养,但其更通常作为油已被除去后的副产物饲养。其它植物蛋白来源包括来自以下的植物蛋白质来源:禾本科(Poaceae),也被称为禾本科(Gramineae),像谷类和谷物特别是玉米、小麦和水稻或其它主要作物如马铃薯、木薯和豆科植物(豌豆类(peas)和菜豆属植物(bans)),一些研磨副产物包括胚芽粉或玉米蛋白粉、或蒸馏/酿酒副产物。在实施方案中,蛋白质的饲料原料包括,但不限于,来自以下的植物材料:大豆、花生、油菜籽、大麦、油菜、芝麻、棉籽、棕榈仁、葡萄籽、橄榄、红花、向日葵、椰子核、玉米、椰子、亚麻籽、榛子、小麦、水稻、马铃薯、木薯、豆科植物、亚麻芥籽、芥菜籽、胚芽粉、玉米蛋白粉、蒸馏/酿酒副产物、及其组合。

[0050] 在鱼类养殖业,据报道使用的植物来源的主要鱼粉代替物包括,但不限于,大豆粉(SBM)、玉米蛋白粉、油菜籽/油菜(芸苔属(Brassica))粉、羽扇豆(羽扇豆属(Lupinus)),像去壳的白(白羽扇豆(Lupinus albus))、甜(狭叶羽扇豆(L.angustifolius))和黄(黄羽扇豆(L.luteus))羽扇豆核粉中的蛋白质、向日葵(向日葵(Helianthus annuus))种子粉、结晶氨基酸;以及豌豆粉(豌豆(Pisum sativum))、棉籽(棉属(Gossypium))粉、花生(花生;落花生(Arachis hypogaea))粉和油渣饼、大豆蛋白质浓缩物、玉米(玉米(Zea mays))蛋白粉和小麦(小麦(Triticum aestivum))谷蛋白、马铃薯(马铃薯(Solanum tuberosum L.))蛋白质浓缩物以及其它植物饲料如辣木(辣木(Moringa oleifera Lam.))叶,都以各种浓度和组合。

[0051] 蛋白质来源可以是未经处理的植物材料的形式和处理和/或提取的植物蛋白质的形式。作为实例,热处理的大豆产物具有较高的蛋白质消化率。

[0052] 蛋白质材料包括任何类型的蛋白质或肽。在实施方案中,可以使用大豆材料或类似材料,如全大豆。全大豆可以是标准的、商品化的大豆;以某种方式已被转基因(GM)的大豆;或非GM身份保留的大豆。示例性的GM大豆包括,例如,被工程化以产生除了水苏糖和棉子糖外的碳水化合物的大豆。示例性的非转GM大豆包括,例如,为了低油、低碳水化合物、且低胰蛋白酶的抑制选育的Schillinger品种。

[0053] 其他类型的大豆材料包括大豆蛋白质粉、大豆蛋白质浓缩物、大豆粉、和分离大豆蛋白质,或其混合物。全大豆向其它形式的大豆蛋白,如大豆蛋白质粉、大豆蛋白质浓缩物、大豆粉、和分离大豆蛋白质的传统加工,包括裂化清洁的、生的全大豆为数块,典型地六(6)至八(8)块,产生大豆片和壳,然后将壳除去。然后将大豆片置于大约60°C,并片成约0.25毫米厚。然后以惰性溶剂,如烃类溶剂,通常是己烷,在多种类型的逆流提取系统之一中提取所得到的薄片,以除去大豆油。对于大豆蛋白质粉、大豆蛋白质浓缩物、和分离大豆蛋白质,重要的是,薄片以最大限度地减少蒸煮或烘烤大豆蛋白质的量以保持水溶性大豆蛋白质的高含量的方式被脱溶剂。这通常是通过使用蒸气脱溶装置或急骤脱溶装置(flash desolventizers)完成的。从该过程获得的薄片,一般称为“食用脱脂薄片”或“白大豆(豆)薄片”。

[0054] 白大豆薄片是大豆蛋白质粉、大豆蛋白质浓缩物、和分离大豆蛋白质的起始原料,具有约50%的蛋白质含量。白大豆薄片然后被粉碎,通常在开环研磨系统中,通过锤式粉碎机、级分粉碎机、滚筒粉碎机或冲击筛粉碎机首先粉碎成粗粉,并以另外的研磨,成为具有所需的颗粒尺寸的大豆粉末。通常使用筛选以排列产物尺寸至均匀的粒径范围,并可以以振动筛或圆筒状离心筛完成。其它油料种子可以以类似的方式被加工。

[0055] 在实施方案中,可以使用干酒糟及可溶物(DDGS)。目前DDGS是由玉米乙醇业制造的。传统的DDGS来自干磨设备,其中整玉米核被研磨和加工。在这些设施中的DDGS通常含有28-32%的蛋白质。

[0056] 蛋白质来源可以是以未经处理的植物材料的形式和处理和/或提取的植物蛋白质的形式。作为实例,热处理的大豆产物具有高的蛋白质消化率。尽管如此,包含在食肉鱼的食物中的全脂或脱脂大豆粉的上限包含水平是在20到30%的包含水平之间,即使热不稳定抗营养因子被排除。在鱼类中,大豆蛋白质已经显示,以超过30%的蛋白质浓度包含水平饲养鱼类造成肠道损伤,且通常减少不同的鱼种的生长表现。事实上,由于这些影响,大多数养鱼场主不愿意在总食物中使用多于10%的植物蛋白。

[0057] 本发明解决了这个问题,并允许植物蛋白质包含水平高达40或甚至50%,取决于,除了其他因素以外,被饲养的动物物种、植物蛋白质来源的源头、不同植物蛋白质来源的比例、蛋白质浓度、和葡聚糖和/或甘露聚糖的量、源头、分子结构和浓度。在实施方案中,植物蛋白质包含水平高达40%、优选高达20%或30%。通常存在于食物中的植物蛋白质是介于5和40%之间,优选在10或15和30%之间。这些百分比界定在动物饲料或食物中的总植物蛋白质来源的百分比量,这包括脂肪、灰分等。在实施方案中,纯蛋白质水平高达50%、典型地高达45%、在实施方案5-95%。

[0058] 在总饲料或食物中的植物蛋白质对其它蛋白质的比例可以是5:95至95:5、15:85

至50:50、或25:75至45:55。

[0059] 微生物

[0060] 本公开的微生物必须能够在转化培养中将碳水化合物和其它营养物质转化为高品质的蛋白质浓缩物。在实施方案中,微生物是酵母样真菌。酵母样真菌的实例是出芽短梗霉菌。其它实例微生物包括酵母,例如克鲁维酵母和毕赤酵母、乳酸菌、里氏木霉、糙皮侧耳、根霉,和许多类型的木质纤维素降解微生物。一般地,示例性的微生物包括那些能代谢水苏糖、棉子糖、木糖及其它糖的微生物。然而,根据公开的方法选择其它合适的微生物是本领域技术人员的能力范围内的,无需过多实验。

[0061] 在实施方案中,可在本方法中使用的微生物有机体包括但不限于,出芽短梗霉菌、硬葡聚糖小核菌、少动鞘脂单胞菌、*Ralstonia eutropha*、深红红螺菌、克鲁维酵母和毕赤酵母、里氏木霉、糙皮侧耳、根霉,及其组合。在实施方案中,微生物是出芽短梗霉菌。

[0062] 在实施方案中,出芽短梗霉菌适于在转化过程中遇到的各种环境/压力源。在实施方案中,表示为NRRL保藏号50793,根据布达佩斯条约的条款于2012年11月30日保藏在美国农业研究菌种保藏中心(Agricultural Research Culture Collection, NRRL), Peoria, Ill. 的出芽短梗霉菌菌株,表现出较低的胶状物产生,并且适合于DDGS。在实施方案中,表示为NRRL保藏号50792,根据布达佩斯条约的条款于2012年11月30日保藏在美国农业研究菌种保藏中心(NRRL), Peoria, Ill. 的出芽短梗霉菌菌株,适用于高浓度的抗生素四环素(例如,从大约75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 四环素至约200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 四环素)。在实施方案中,表示为NRRL保藏号50794,根据布达佩斯条约的条款于2012年11月30日保藏在美国农业研究菌种保藏中心(NRRL), Peoria, Ill. 的出芽短梗霉菌菌株,适用于高浓度的抗生素LACTROL®(例如,从约2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 维吉霉素至约6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 维吉霉素)。在实施方案中,表示为NRRL保藏号50795,根据布达佩斯条约的条款于2012年11月30日保藏在美国农业研究菌种保藏中心(NRRL), Peoria, Ill. 的出芽短梗霉菌菌株,适应于浓缩的玉米可溶物。

[0063] 转化培养

[0064] 在示例性的实施方案中,预处理后,蛋白质材料(如挤压的大豆白薄片)可以至少5%的固体加载率与水混合,调节pH至4.5-5.5。然后可加入合适剂量的水解酶,且浆料在50 $^{\circ}\text{C}$ 以150-250rpm搅拌温育3-24小时。冷却至35 $^{\circ}\text{C}$ 后,可以添加出芽短梗霉菌的接种物,且培养物可再温育72-120h,或直至碳水化合物被消耗。在温育过程中,无菌空气可以以0.5-1L/L/h的速率被喷射到反应器中。在实施方案中,转化培养物经过与大豆材料温育少于约96小时的转化。在实施方案中,转化培养物将温育约96小时和约120小时之间。在实施方案中,转化培养物可温育多于约120小时。转化培养物可在约35 $^{\circ}\text{C}$ 下温育。

[0065] 在实施方案中,当经历转化时,转化培养物的pH可为约4.5至约5.5。在实施方案中,转化培养物的pH可以小于4.5(例如,在pH 3)。在实施方案中,可对转化培养物主动地充气,如在Deshpande等人, *Aureobasidium pullulans* in applied microbiology: A status report, *Enzyme and Microbial Technology* (1992), 14 (7): 514中公开的。

[0066] 高品质的蛋白质浓缩物(HQPC),以及短梗霉聚糖和铁载体,可以从转化培养物中按照通过任选地醇沉淀和离心的转化方法被回收。醇的实例是乙醇,尽管本领域技术人员明白,其它醇应当起作用。在实施方案中,盐也可以用于沉淀。示例性的盐可以是钾、钠和镁的氯化物盐。在实施方案中,可以单独使用或与醇组合使用聚合物或多价离子。

[0067] 在实施方案中,最终蛋白质浓缩物固体回收可以通过改变温育时间调节。例如,在温育14天后可实现约75%的蛋白质,其中固体回收率为约16-20%。在实施方案中,温育2-2.5天增加固体回收至约60-64%,且HQPC中的蛋白质水平为58-60%。在实施方案中,4-5天的温育可最大化蛋白质含量(例如,但不限于大于约70%)和固体回收(例如,但不限于大于约60%)两者。取决于饲料原料,这些数值可更大或更低。在实施方案中,蛋白浓缩物(即,HQSPC或HP-DDGS)可以具有特定的脂:蛋白质比,例如,在约0.010:1至约0.03:1、约0.020:1至约0.025:1、或约0.021:1至约0.023:1。

[0068] 在实施方案中,饲料原料可在单螺杆挤压机(例如,BRABENDER PLASTI-CORDER EXTRUDER Model PL2000,Hackensack,NJ)中挤压,以筒长比螺杆直径为1:20和3:1的压缩比,虽然其它几何形状和比例也可使用。饲料原料可被调整为约10%至约15%的水分,至约15%,或至约25%的水分。饲料、筒、和挤压机的出口截面的温度可以保持在约40℃至约50℃、或约50℃至约100℃、约100℃至约150℃、约150℃至约170℃之间,且螺杆转速可以被设置在约50rpm至约75rpm、或约75rpm至约100rpm、或约100rpm至约200rpm至约250rpm。在实施方案中,螺杆转速足以提供针对筒两侧的脊形通道的剪切作用。在实施方案中,螺杆转速被选择以最大化糖的释放。

[0069] 在实施方案中,挤压的饲料原料材料(例如,植物蛋白质或DDGS)可与水混合以达到在反应器(例如,5L NEW BRUNSWICK BIOFLO 3BIOREACTOR;3-4L工作容积)中至少5%的固体加载率。浆料可以被高压灭菌、冷却,然后通过使用酶的混合物进行酶法水解的糖化,所述酶包括,但不限于,内切木聚糖酶和 β -木糖苷酶、糖苷水解酶、 β -葡糖苷酶、半纤维素酶活性。在一方面,酶的混合物包括 NOVOZYME® 酶。剂量可以包括6% CELLICTEK® (每克葡聚糖)、0.3% CELLICHTEK® (每克总固体)、和0.15% NOVOZYME960® (每克总固体)。糖化可以进行大约12h至约24h,在40°至约50℃,且约150rpm至约200rpm,以增溶纤维和低聚糖为单糖。然后温度可以降低至约30℃至约37℃之间,在实施方案中至约35℃,且浆料可以以2% (v/v) 的微生物的24小时培养物接种。浆料可以以0.5L/L/min充气,且温育可一直持续到糖的利用停止或约96h至约120h。在补料分批(fed-batch)转化中,更多的挤压的饲料原料可在糖化和/或微生物转化阶段期间被加入。

[0070] 在实施方案中,接种转化微生物前,饲料原料和/或挤压物可以以一种或多种抗生素处理(例如,但不限于,四环素、青霉素、红霉素、泰乐菌素、维吉霉素、及其组合)以避免,例如,被有害的细菌菌株污染。

[0071] 在温育期间,样品可以以6-12h的间隔取出。用于HPLC分析的样品可被煮沸、离心、过滤(例如,通过0.22 μ m过滤器)、置于自动采样瓶、并冷冻直到分析。在实施方案中,样品可以使用WATERS HPLC系统测定碳水化合物和有机溶剂,虽然可使用其它HPLC系统。可对样品进行平板或血球计数以评价微生物群体。样品也可使用美国国家可再生能源实验室(National Renewable Energy Laboratory)程序测定纤维素、半纤维素和果胶的水平。

[0072] 食物制剂

[0073] 在示例性实施方案中,从已经经受转化的转化培养物中回收的高品质的蛋白质浓缩物用在食物制剂中。在实施方案中,回收的高品质的蛋白质浓缩物(HQPC)将是食物制剂中主要的蛋白质来源。食物制剂中蛋白质来源百分比不意味着是限制性的,且可包括24至80%的蛋白质。在实施方案中,高品质的蛋白质浓缩物(HQPC)将是多于约50%、多于约

60%、或多于约70%的总食物制剂蛋白质来源。回收的HQPC可代替蛋白质来源,如鱼粉、大豆粉、小麦和玉米粉和谷蛋白及浓缩物,及动物副产物,如血液、家禽肉、和羽毛粉。使用收回的HQPC的食物制剂还可包括补充剂,如矿物质和维生素预混物以酌情满足其余的营养需求。

[0074] 在某些实施方案中,HQPC如高品质的大豆蛋白质浓缩物(HQSPC)或高质量DDGS(HP-DDGS)的性能,可以通过比较饲养高品质蛋白质浓缩物食物制剂的动物与饲养对照食物制剂如鱼粉的动物的生长、饲料转化率、蛋白质功效、和存活率来测量。在实施方案中,测试制剂含有一致的蛋白质、脂类和能量含量。例如,当动物是鱼,可测量内脏(脂肪沉积)和器官(肝和脾)的特性、修复(dress-out)百分比、和鱼片近似分析(fillet proximate analysis)、以及肠道组织学(肠炎),以评价食物响应。

[0075] 如所理解的,含有回收的HQPC的单独食物制剂可被优化用于不同种类的动物。在实施方案中,动物是在商业水产养殖生长的鱼。食物制剂优化的方法是众所周知的,且本领域技术人员易于确定而无需过度实验。

[0076] 全价生长食物(Complete grower diets)可以根据各种动物物种已知的营养需求使用HQPC配制。在实施方案中,制剂可用于黄鲈(例如,42%蛋白质、8%脂类)。在实施方案中,制剂可用于虹鳟鱼(45%蛋白质、16%脂类)。在实施方案中,制剂可用于上文提及的任一种动物。

[0077] 可以使用用于基于植物食物的基础矿物质和维生素预混物,以确保微营养需求将得到满足。任何补充剂(如通过分析认为必要)可以通过比较无补充的相同制剂来评价;因此,饲养试验可以在析因设计中完成以考虑到补充作用。在实施方案中,饲养试验可包括基于鱼粉的对照食物及基于ESPC和LSPC的参考食物[传统的SPC(TSPC)是从溶剂洗涤大豆薄片以除去可溶性碳水化合物产生的;纹理(texturized)SPC(ESPC)是由在潮湿、高温下挤压TSPC产生的;及低抗原SPC(LSPC)是从TSPC通过改变加工过程中溶剂洗涤和温度产生的]。可以使用实验室规模的单螺杆挤压机(例如,BRABENDER PLASTI-CORDER EXTRUDER Model PL2000)产生用于饲养试验的小粒。

[0078] 饲养试验

[0079] 在实施方案中,每个处理(即,每个实验组和对照食物混合物)可以使用四个实验单元的重复(例如,各约60天至120天)。试验可以在110-L圆形罐(20鱼/罐)进行,所述罐并联至由离心泵驱动并由固体贮槽、和生物反应器、过滤器(100 μ m袋,碳和紫外线)组成的闭环再循环系统。热泵可被用作维持为物种特异性生长的最佳温度必需的。水质(例如,溶解氧、pH、温度、氨和亚硝酸盐)可以在所有系统中被监测。

[0080] 在实施方案中,实验食物可以根据鱼的大小被递送,并分成二到五个每天饲养量。生长性能可以通过在一至四个星期(取决于鱼的大小和试验持续时间)获取总质量测量来确定;配给可以根据增重进行调整,以允许饱食饲养和减少废物流。消耗可从来自单个罐的未食用的饲料的收集每两周进行评价。未食用的饲料可以干燥至恒定的温度,冷却并称重以估计饲料转化率。蛋白质和能量的消化率可从每个实验的中点期间手动剥离的排泄物材料,或经由饲养试验结束时从下部肠道的剖检确定。存活率、体重增加、生长速率、健康指标、饲料转化率、蛋白质和能量的消化率、和蛋白质功效可以在各处理组之间进行比较。可进行剖检鱼的近似分析以比较各食物处理之间鱼片的组成。根据饲养试验目标,如对鱼片

成分需要的,可进行氨基酸和脂肪酸的分析。食物处理的饲养试验响应可以与对照(如鱼粉)食物响应比较,以确定HQPC食物的性能是否达到或超过对照响应。

[0081] 食物和饲养试验响应的统计分析可以以先验 $\alpha=0.05$ 完成。根据需要,在处理之间的性能参数的分析可以以方差或协方差(Proc Mixed)和事后多重比较的适当的分析进行。鱼性能和组织响应的分析可由非线性模型评价。

[0082] 在实施方案中,本公开内容提出使用,例如,GRAS状态微生物,以转化大豆薄片/粉或DDGS中的纤维和其它碳水化合物为另外的蛋白质。还可产生微生物胞外多糖(即胶状物),其可有助于挤压的饲料小粒形成,省去粘合剂的需求。这种微生物胶状物还可提供免疫刺激活性,以激活保护鱼类远离自应激物产生的常见病原体的先天防御机制。免疫预防的物质,如 β -葡聚糖、细菌产物、和植物成分,在商业饲料中的使用增加,以减少由于传染病的经济损失,并最小化抗生素的使用。本公开内容的微生物还产生胞外肽酶,这将增加代谢过程中谷物蛋白质的消化率和吸收,提供更高的饲料功效和产量。如本文所公开,此微生物温育方法提供了有价值的、可持续的水产养殖饲料,其每单位蛋白质比SPC和鱼粉更便宜。

[0083] 如公开的,本发明的微生物可代谢大豆薄片/粉或DDGS中的个体碳水化合物,产生细胞物质(蛋白质)和微生物胶状物两者。这些微生物的不同菌株还增强纤维解构。本发明的微生物还可将大豆和玉米的蛋白质转化成更易消化的肽和氨基酸。在实施方案中,以下操作可以被执行:1)确定使用本公开内容的精选微生物转化预处理的大豆蛋白质、油料种子蛋白质、DDGS和类似物,以至少45%的蛋白质浓度产生高品质的蛋白质浓缩物(HQPC)的功效,及2)评价HQPC代替鱼粉的功效。在实施方案中,可以进行优化大豆、油料种子、及DDGS预处理和转化条件,以改善微生物的性能和强壮性,对商业重要的鱼类的范围测试所得的生长饲料,验证方法成本和能量需求,并完成规模化和商业化的步骤。在实施方案中,本公开内容的HQPC可以能够代替至少50%的鱼粉,同时提供更高的生长速率和转化效率。生产成本应低于商业大豆蛋白质浓缩物(SPC)且基本上低于鱼粉(包括产量)。

[0084] 图1和图2显示了本公开内容的方法:基于植物产物的预处理,将糖类转化成细胞物质(蛋白质)和胶状物,回收HQSPC并产生水产饲料,并在鱼饲养测试中测试所产生的水产饲料。

[0085] 挤压预处理后,可以评价纤维素解构酶产生糖类,本公开内容的微生物可转化糖类为蛋白质和胶状物。在实施方案中,可以使用这些酶的连续省略(sequential omission)和与纤维素分解微生物共培养的评价。可以评价乙醇沉淀胶状物,并提高HQPC的离心回收。干燥后,HQPC可被掺入到实际的食物制剂。在实施方案中,可以配制(与矿物质和维生素预混物一起)测试生长食物,并可以在以商业重要的鱼类,如黄鲈或虹鳟鱼的饲养试验中,进行与鱼粉对照和商业SPC(SPC与豆粉明显不同,因为它包含痕量的低聚糖和抗原物质大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白)食物的比较。可以检查性能(如生长、饲料转化率、蛋白质功效)、内脏的特性、和肠道组织学,以评价鱼的响应。

[0086] 在其它实施方案中,通过确定最佳预处理和转化条件同时最小化程序输入,改善微生物的性能和强壮性,对一系列商业重要的鱼类测试所得的生长饲料,验证方法成本和能量需求,并完成对规模化和商业化的初步步骤,可进行HQPC生产方法的优化。

[0087] 在过去的几年中,少数设施已安装了在乙醇生产方法之前去除玉米壳和胚芽的干磨机。此干法分提方法产生具有高达42%的蛋白质的DDGS(以下称为干法分提DDGS

(dryfrac DDGS)。在实施方案中,可在预先确定的以迅速产生用于鲈鱼饲养试验使用的足够量的高蛋白质DDGS (HP-DDGS) 的条件下,对常规和干法分提DDGS进行比较。在实施方案中,进行了这种转化的性能(经由化学组成变化)的仔细监测,并鉴定了对HP-DDGS品质影响最大的参数。在一些实施方案中,低油DDGS可以用作转化的底物,其中这些低油DDGS具有比常规的DDGS更高的蛋白质水平。在相关的方面,相比传统DDGS,低油DDGS增加出芽短梗霉菌的生长率。

[0088] 一些研究小组正在评价以植物来源的蛋白质,如大豆粉和DDGS,部分代替鱼粉。然而,较低的蛋白质含量、不恰当的氨基酸平衡、及抗营养因子的存在限制了代替水平至20-40%。初步生长试验表明,没有现有的基于DDGS或SPC的食物提供类似于鱼粉对照食物的性能。在商业化生产的DDGS和SPC之中一些缺陷已被鉴定,主要是在蛋白质和氨基酸组成方面,这赋予生长性能和鱼组合物的变化性。但是,如本文公开的含有营养补充剂(配制以满足或超过所有的需求)的HP-DDGS和HQSPC食物提供类似于或超过鱼粉对照的生长结果。因此,如本文公开的方法及由此开发的产物提供了更高品质的HQSPC或HP-DDGS(相对于营养需求),并支持等同于或比含有鱼粉的食物更好的生长性能。

[0089] 可以以本公开内容的鱼饲料组合物饲养的鱼包括,但不限于,西伯利亚鲟、小体鲟、闪光鲟、白鲟、巨骨舌鱼、日本鳗、美洲鳗、短鳍鳗、长鳍鳗、欧洲鳗、遮目鱼(Chanos chanos)、遮目鱼(Milkfish)、蓝鳃太阳鱼、蓝绿鳞鳃太阳鱼、白莓鲈、黑莓鲈、Asp、卡特拉鲈、金鱼、鲫鱼、鲮鱼、麦瑞加拉鲮鱼、草鱼、鲤鱼、鲢鱼、鳙鱼、Orangefin labeo、Roho labeo、红万鲤鱼、武昌鱼、青鱼、金体美洲鳊、Nilem carp、白阿穆尔鳊鱼、泰银鲈、Java、斜齿鳊、丁鲷、池塘泥鳅、Bocachico、金头鲷、Cachama、Cachama Blanca、Paco、黑鲷、斑点叉尾鲷、鲮科鲮鱼、蓝鲮鱼、六须鲮鱼、巨鲮(Swai, Tra, Basa)、条纹鲮鱼、泥鳅、菲律宾鲮鱼、香港鲮鱼、北非鲮鱼、大头鲮鱼、Sampa、南美鲮鱼、Atipa、白斑狗鱼、香鱼、白鲟、白鲑、粉红鲑、大马哈鱼、银大马哈鱼、樱鲑、虹鳟鱼、红大马哈鱼、大鳞大马哈鱼、大西洋鲑鱼、海鲟、北极红点鲑、溪红点鲑、湖红点鲑、大西洋鳕鱼、银汉鱼、Lai、锯盖鱼、澳洲肺鱼/亚洲海鲈鱼、尼罗河鲈鱼、虫纹石斑鱼、金鲈鱼、条纹鲈鱼、白鲈、欧洲鲈鱼、香港石斑鱼、宝石石斑鱼、鲈滑石斑鱼、斑点东星斑、银鲈、白鲈、宝石鲈、大口黑鲈、小口黑鲈、欧洲鲈、梭鲈(Zander, Pikeperch)、黄鲈、加拿大梭鲈、大眼梭鲈、竹荚鱼、红鲷、青鲷、卵形鲳鲹、佛罗里达州鲳、谷氏鲳、日本竹荚鱼、军曹鱼、红树林红鲷鱼、黄尾笛鲷、黑鲷、白鲷鱼、深红鲷鱼、红鲷鱼、真鲷、金丝鲷、金头鲷、红鼓鱼、绿宝丽鱼、黑带鲷、淡水石斑鱼、墨西哥银鲈、Pearlspot、三斑罗非鱼、蓝罗非鱼、长鳍罗非鱼、莫桑比克罗非鱼、尼罗罗非鱼、罗非鱼、荷那龙罗非鱼、黑颚罗非鱼、伦氏非鲫、福寿鱼、金鲷、大鳞鲷、Gold-spot mullet、Thinlip grey mullet、跳鲷、Tademullet、乌鲷、白鲷鱼、梭状鲷、太平洋脂塘鳢、尖塘鳢、白斑臭都鱼、点蓝子鱼、刺蓝子鱼、南方黑鲷、北方黑鲷鱼、攀鲈、Snakeskin gourami、接吻鲈、巨鲈、黑鱼、印尼黑鱼、斑点黑鱼、条纹黑鱼、大菱鲆、大比目鱼(日本牙鲆)、夏日鲆、漠斑牙鲆、北美黄盖鲆、大西洋大比目鱼、绿背鲆、欧鲆、及其组合。

[0090] 技术人员可以理解,本公开内容的鱼饲料组合物可以作为用于药物活性物质如例如抗微生物剂,和包括抗细菌或病毒感染的疫苗的免疫学活性的物质,及其任意组合的方便的载体使用。

[0091] 根据本公开内容的鱼饲料组合物可以以液体、可倾倒的乳剂、或糊状的形式、或以

干燥的形式,例如作为颗粒或小粒、粉末、或作为薄片被提供。当鱼饲料组合物作为乳剂,水包脂的乳剂被提供时,其可以以相对浓缩的形式。这样浓缩的乳剂形式,也可以被称为预乳剂,因为它可以以一个或多个步骤在水介质中稀释,以提供用于生物的最终富集培养基(enrichment medium)。

[0092] 在实施方案中,如公开的用于基于微生物的方法的含有纤维素的起始材料是玉米。玉米的大约三分之二是淀粉,淀粉在发酵和蒸馏过程中转化为乙醇和二氧化碳。剩余的营养物或发酵产物可产生冷凝蒸馏可溶物或酒糟如DDGS,它可以在饲料产物中使用。在一般情况下,方法包括玉米的干磨或研磨的初始准备步骤。然后对加工的玉米进行水解并添加酶以在糖化步骤分解主要淀粉组分。允许随后的发酵步骤在添加了根据本公开的实施方案提供的微生物(如酵母)后继续进行以产生气态产物如二氧化碳。进行发酵用于产生乙醇,其可以从发酵液中被蒸馏。然后可干燥发酵培养基的剩余物,以产生包括DDGS的发酵产物。这个步骤通常包括通过离心的固/液分离方法,其中固相组分可以被收集。包括过滤和喷雾干燥技术的其它的方法可用于实现这样的分离。然后可对液相组分进行进一步的蒸发步骤,可以浓缩可溶性副产物,例如糖、甘油和氨基酸,成为称为糖浆或浓缩的玉米可溶物(CCS)的材料。CCS然后可与固相组分重组,干燥为温育产物(DDGS)。应当理解,本发明组合物可以应用于基于干磨的新的或现有的乙醇工厂,以提供集成的乙醇产生方法,其还产生具有增加的价值发酵产物。

[0093] 在实施方案中,根据本公开内容产生的温育产物具有比常规发酵产物更高的商业价值。例如,温育产物可包括具有改善的氨基酸和微量营养元素含量的增强的干燥的固体。因此可以提供“黄金色”产物,相比于深色的HQSP其通常表示较高的氨基酸消化率。例如,根据本文的实施方案,可产生浅色的HQSP,其相比于通常具有较少的营养价值的相对较深色的产物具有增加的赖氨酸浓度。产物的颜色可以是发酵产物或HQSP的品质和营养物质消化率的评价中的重要因素或指标。颜色作为干燥过程中暴露于过量的热的指标使用,所述过量的热引起游离氨基基团和糖的焦糖化和美拉德反应(Maillard reaction),降低了某些氨基酸的品质。

[0094] 干磨或研磨乙醇产生方法的基本步骤可如下所述:粉碎或研磨玉米或其它谷物产物、糖化、发酵、和蒸馏。例如,选择的全玉米粒可通常以典型地锤式粉碎机或滚筒粉碎机粉碎或研磨。颗粒尺寸可影响蒸煮水合和随后的酶促转化。然后粉碎或研磨的玉米可与水混合,制作被蒸煮并冷却的糊状物。在此转化的初始步骤期间包括酶可以是有用的,以降低凝胶淀粉的粘度。然后可将混合物转移至糖化反应器中,维持在选定的温度,如140°F,在那里淀粉通过添加糖化酶转化为可发酵的糖如葡萄糖或麦芽糖。转化的糊状物可被冷却至所需的温度,例如84°F,并供应至发酵反应器,在那里可发酵糖通过使用根据本公开内容提供的微生物的精选的菌株转化成二氧化碳,相比更传统的成分,例如酿酒酵母(*Saccharomyces yeasts*),其产生更富营养的发酵产物。得到的产物可以被闪蒸以分离出二氧化碳,且得到的液体可以被供应至由蒸馏塔和汽提塔构成的回收系统中。乙醇流可被引导至分子筛,在那里剩余的水用吸附技术除去。以少量的汽油变性纯化的乙醇,可产生燃料级乙醇。另一种产物可通过进一步纯化初始馏分乙醇以除去杂质被产生,产生大约99.95%的非燃料用途的乙醇。

[0095] 酒糟(whole stillage)可以从蒸馏装置的底部抽出并离心产生湿酒糟颗粒

(distiller's wet grains, DWG) 和酒糟水 (thin stillage) (液体)。DWG 可以以 55-65% 水分离开离心机, 并可被作为牛的饲料湿地销售, 或干燥作为根据本公开内容提供的增强的发酵产物。这些产物包括可在本文中称为干酒糟 (distiller's dried grains, DDG) 的增强的最终产物。使用蒸发器, 酒糟水 (液体) 可以被浓缩形成酒糟废液 (distiller's solubles), 其可以被加回酒糟过程流并与其合并和干燥。根据本公开内容的实施方案的此合并的产物可以作为具有增加氨基酸和微量营养元素含量的增强的发酵产物销售。应当理解, 本公开内容的各种概念可应用于除本文说明的以外该领域已知的其它发酵方法。

[0096] 本发明另一方面涉及具有增强的浓度的营养物并包括微生物的全价鱼粉组合物, 其特征在于增强的浓度的营养物, 所述营养物例如, 但不限于, 脂肪、脂肪酸、脂类, 如磷脂、维生素、必需氨基酸、肽、蛋白质、碳水化合物、甾醇、酶、和微量矿物质, 如铁、铜、锌、锰、钴、碘、硒、钼、镍、氟、钒、锡、硅、及其组合。

[0097] 在本公开内容的温育方法中, 碳源可被微生物水解为其组分糖以产生醇和其它气态产物。气态产物包括二氧化碳且醇包括乙醇。温育方法后获得的温育产物通常有更高的商业价值。在实施方案中, 相比缺乏微生物的那些产物, 包含微生物的温育产物具有增强的营养物含量。微生物可存在于温育系统、温育肉汤和/或温育生物质中。温育肉汤和/或生物质可被干燥 (例如, 喷雾干燥), 以产生具有增强含量的营养物含量的温育产物。

[0098] 例如, 根据本公开内容, 温育方法后回收的耗尽、干燥的固体是增强的。这些温育产物通常是无毒的、可生物降解、容易得到、价格低廉、且营养物丰富。微生物的选择和温育条件对产生作为饲料或营养补充剂使用的低毒性或无毒性的温育产物是重要的。尽管葡萄糖是从谷物淀粉的水解产生的主要的糖, 通常它不是碳水化合物产生的唯一的糖。不同于由传统的干磨乙醇生产方法产生的 SPC 或 DDG, 其包含了大量的非淀粉的碳水化合物 (例如, 作为中性洗涤剂纤维测量的百分比高达 35% 的纤维素和阿拉伯木聚糖, 按干重计算), 本发明的由非淀粉的碳水化合物的酶水解产生的富含营养物的温育产物对非反刍动物更适口和可消化。

[0099] 本公开内容的富含营养物的温育产物可以具有以重量计从至少约 1% 至约 95% 的营养物含量。营养物含量优选在以重量计至少约 10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、和 70%-80% 的范围内。可用的营养物含量可以取决于其所饲养的动物, 和其余食物的背景, 及在动物的生命周期的阶段。例如, 肉牛需要的组氨酸比奶牛少。为饲养动物选择合适的营养物含量是本领域技术人员所熟知的。

[0100] 温育产物可制备为喷雾干燥的生物质产物。任选地, 生物质可以通过已知的方法, 如离心、过滤、分离、倾析、分离和倾析的组合、超滤或微滤被分离。生物质温育产物可被进一步处理以促进过瘤胃 (rumen bypass)。在实施方案中, 生物质产物可以从温育培养基中分离, 喷雾干燥, 并任选的处理, 以调节过瘤胃, 并添加到饲料中作为营养源。除了在含有微生物的温育方法中产生营养富含的温育产物, 营养富含的温育产物也可以在转基因植物系统中生成。用于产生转基因植物系统的方法是本领域已知的。可选地, 当微生物宿主分泌营养内容时, 可以从通过温育产生的生物质分离富含营养物的肉汤, 且澄清的肉汤可被用作动物饲料成分, 例如, 以液体形式或喷雾干燥形式。

[0101] 使用微生物的温育方法后得到的温育产物可以作为动物饲料或作为人的食品补充剂。温育产物包括至少一种成分, 其具有来自非动物来源 (例如, 细菌、酵母、和/或植物)

的增强的营养物含量。特别是,温育产物富含以下的至少一种或多种:脂肪、脂肪酸、脂类,如磷脂、维生素、必需氨基酸、肽、蛋白质、碳水化合物、甾醇、酶、和微量矿物质,如铁、铜、锌、锰、钴、碘、硒、钼、镍、氟、钒、锡和硅。在实施方案中,肽含有至少一种必需氨基酸。在其它实施方案中,必需氨基酸被封装在温育反应中使用的本发明的修饰的微生物内。在实施方案中,必需氨基酸包含在由微生物表达的异源多肽中。当需要时,在合适的微生物中(例如,真菌)表达异源多肽,并储存在包涵体中。

[0102] 在实施方案中,温育产物具有高的营养物含量。结果是,可以在全价动物饲料中使用较高比例的温育产物。在实施方案中,饲料组合物包括按重量计至少约15%的温育产物。在全价饲料、或食物中,这种材料将与其它材料一起饲养。根据其它材料的营养物含量、和/或被提供该饲料的动物的营养需求,修改的温育产物的范围可以从饲料的15%至饲料的100%。在实施方案中,由于高营养物含量,本发明的温育产物可以提供较低比例的混合。在其它实施方案中,本发明的温育产物可提供非常高的级分饲养,例如超过75%。在合适的实施方案中,饲料组合物包括至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、或至少约75%的本发明的温育产物。通常,饲料组合物包括按重量计至少约20%的温育产物。更常见地,饲料组合物包括按重量计至少约15-25%、25-20%、20-25%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、或60%-70%的温育产物。当需要时,本发明的温育产物可以作为饲料的唯一来源使用。

[0103] 为了多种用途,例如,为了增加重量和动物健康的总体改善,全价鱼粉组合物可具有关于一种或多种必需氨基酸的增强的氨基酸含量。因为在温育产物中游离氨基酸的存在和/或包括必需氨基酸的蛋白质或肽的存在,全价鱼粉组合物可具有增强的氨基酸含量。必需氨基酸可包括精氨酸、半胱氨酸、组氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、牛磺酸、色氨酸、和/或缬氨酸,其可作为游离氨基酸或作为富含所选择的氨基酸的蛋白质或肽的一部分存在于全价动物饲料中。富含至少一种必需氨基酸的肽或蛋白质在肽或蛋白质中可具有每总氨基酸残基至少1%的必需氨基酸残基、在肽或蛋白质中每总氨基酸残基至少5%的必需氨基酸残基、或在肽或蛋白质中每总氨基酸残基至少10%的必需氨基酸残基。通过向动物饲养营养平衡的食物,进行营养物含量的最大利用,实现可比较的生长率、牛奶产生需要较少的饲料,或减少存在于排泄物的营养物,减少废物的生物负载。

[0104] 具有增强的含量的必需氨基酸的全价鱼粉组合物,可具有相对于粗蛋白质和总氨基酸含量的重量的至少2.0wt%的必需氨基酸含量(包括游离的必需氨基酸和存在于蛋白质或肽中的必需氨基酸),且更适宜地,相对于粗蛋白质和总氨基酸含量的重量的至少5.0wt%。全价鱼粉组合物包括来自于微生物的其它营养物,包括但不限于,脂肪、脂肪酸、脂类,如磷脂、维生素、碳水化合物、甾醇、酶、及微量矿物质。

[0105] 全价鱼粉组合物可包括全价饲料形式组合物、浓缩形式组合物、掺合物形式组合物、及基本形式组合物。如果组合物是以全价饲料的形式,百分比营养物水平可以是百分之一约10至约25,更适宜地百分之一约14至约24,其中营养物获得自温育产物中的微生物;然而,如果组合物是以浓缩物的形式,营养物水平可以是百分之一约30至约50,更适宜地百分之一约32至约48。如果组合物是以掺合物(blender)的形式,组合物中的营养物水平可以是百分之一约20至约30,更适宜地百分之一约24至约26;及如果组合物是以基本混合物的形式,组合物中的营养物水平可以是百分之一约55至约65。除在本文另有说明外,百分比是基于重量百分比

计。如果HQPC的单一营养物例如Lys是高的,它将以低比例用作补充剂;如果它的氨基酸和维生素如维生素A和E是平衡的,它将是更全价的饲料且将以更高的比例饲养并补充有低蛋白质、低营养饲料原料,如玉米秸秆。

[0106] 鱼粉组合物可包括存在于温育产物中的具有至少约2%的必需氨基酸含量的肽或粗蛋白质级分。在实施方案中,肽或粗蛋白质级分可具有至少约3%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约30%、至少约40%的必需氨基酸含量,和在实施方案中,至少约50%。在实施方案中,肽可以是100%的必需氨基酸。通常,鱼粉组合物可包括存在于温育产物中的具有高达约10%的必需氨基酸含量的肽或粗蛋白质级分。更常见地,鱼粉组合物可包括存在于温育产物中的具有约2-10%、3.0-8.0%、或4.0-6.0%的必需氨基酸含量的肽或粗蛋白质级分。

[0107] 鱼粉组合物可包括存在于温育产物中的具有至少约2%的赖氨酸含量的肽或粗蛋白质级分。在实施方案中,肽或粗蛋白质级分可具有至少约3%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约30%、至少约40%的赖氨酸含量,和在实施方案中,至少约50%。通常,鱼粉组合物可包括具有高达约10%的赖氨酸含量的肽或粗蛋白质级分。如果需要,鱼粉组合物可包括具有约2-10%、3.0-8.0%、或4.0-6.0%的赖氨酸含量的肽或粗蛋白质级分。

[0108] 鱼粉组合物可包括温育产物中从约1g/Kg的干固体至900g/Kg的干固体的营养物。在实施方案中,鱼粉组合物中的营养物可以以至少约2g/Kg的干固体、5g/Kg的干固体、10g/Kg的干固体、50g/Kg的干固体、100g/Kg干固体、200g/Kg的干固体、及约300g/Kg的干固体存在。在实施方案中,营养物可以以至少约400g/Kg的干固体、至少约500g/Kg的干固体、至少约600g/Kg的干固体、至少约700g/Kg的干固体、至少约800g/Kg的干固体、和/或至少约900g/Kg的干固体存在。

[0109] 鱼粉组合物可包括存在于温育产物中的具有约1g/Kg干固体至900g/Kg的干固体含量的必需氨基酸或含有至少一种必需氨基酸的肽。在实施方案中,在鱼粉组合物中的必需氨基酸或含有至少一种必需氨基酸的肽可以以至少约2g/Kg的干固体、5g/Kg的干固体、10g/Kg干固体、50g/Kg的干固体、100g/Kg的干固体、200g/Kg的干固体、及约300g/Kg的干固体存在。在实施方案中,必需氨基酸或含有至少一种必需氨基酸的肽可以以至少约400g/Kg的干固体、至少约500g/Kg的干固体、至少约600g/Kg的干固体、至少约700g/Kg的干固体、至少约800g/Kg的干固体、和/或至少约900g/Kg的干固体存在。

[0110] 全价鱼粉组合物可包含在温育期间形成的以生物质的形式的富含营养物的温育产物和至少一种另外的营养组分。在另一个实例中,鱼粉组合物包含从温育期间形成的温育肉汤溶解和悬浮的富含营养物的温育产物和至少一种另外的营养组分。在进一步的实施方案中,鱼粉组合物具有粗蛋白质级分,其包括富含至少一种必需氨基酸的蛋白质。鱼粉组合物可以配制以提供必需氨基酸的改善的平衡。

[0111] 对于包括DDGS的组合物,全价组合物形式可包含一种或多种成分,如麦麸("wheat midds")、玉米、大豆粉、玉米蛋白粉、酒糟或酒糟及可溶物、盐、常量矿物质、微量矿物质和维生素。其它潜在的成分通常可包括,但不限于向日葵粉、麦芽和大豆壳。掺合物形式的组合物可包含麦麸、玉米蛋白粉、酒糟或酒糟及可溶物、盐、常量矿物质、微量矿物质和维生素。可选择的成分可通常包括,但不限于,玉米、大豆粉、向日葵粉、棉籽粉、麦芽和大豆壳。基本

形式组合物可包含麦麸、玉米蛋白粉、和酒糟或酒糟及可溶物。可选择的成分可通常包括，但不限于，大豆粉、向日葵粉、麦芽、常量矿物质、微量矿物质和维生素。

[0112] 微生物中的高度不饱和脂肪酸 (HUFA)，当暴露于氧化条件下可转化成为不希望的不饱和脂肪酸或成为饱和脂肪酸。然而，通过向饲料中引入合成的抗氧化剂或天然存在的抗氧化剂，如 β -胡萝卜素、维生素E和维生素C， ω -3HUFA的饱和可被减少或阻止。合成的抗氧化剂，如BHT、BHA、TBHQ或乙氧喹，或天然抗氧化剂如生育酚，通过将它们添加到产物中可被掺入到食品或饲料产物，或它们可以通过在合适的生物中原位生产被掺入。以这种方式掺入的抗氧化剂的量取决于，例如，随后的使用需求，例如产物配制、包装方法、和希望的保质期。

[0113] 温育产物或含有本公开内容的温育产物的全价鱼粉，也可以作为用于人类消耗的营养补充剂使用，如果方法以人等级的原材料开始，且贯穿方法遵守人类食品的质量标准。如本文公开的，温育产物或全价饲料是高营养物含量的。营养物如蛋白质和纤维与健康食物有关。可开发在食品中利用本公开内容的温育产物或全价饲料的食谱，所述食品如谷类食品、薄脆饼干、馅饼、饼干、糕饼、披萨饼皮、熏香肠、肉丸、奶昔，并以食用食品的任何形式。另一种选择可以是开发本公开内容的温育产物或全价饲料为零食或零食棒，类似于燕麦棒 (granola bar)，其可容易地进食，方便分发。零食棒可包括来自谷物的蛋白质、纤维、胚芽、维生素、矿物质，以及营养制品，如葡萄糖胺、HUFA、或辅因子，如维生素Q-10。

[0114] 包含本发明的温育产物的鱼粉还可补充香料。具体香料的选择将取决于被提供饲料的动物。天然和人工的香料和芳香剂，可用于使得饲料更容易接受和适口。这些补充剂可与所有的成分良好地混合，且可作为液体或干产物的形式获得。将在动物饲料中补充的合适的香料、引诱剂、和芳香剂，包括但不限于鱼信息素、胡芦巴、香蕉、樱桃、迷迭香、小茴香、胡萝卜、薄荷牛至 (peppermint oregano)、香草、茴香、加朗姆、枫树、焦糖、柑橘油、丁酸乙酯、薄荷醇、苹果、肉桂，其任何天然或人工的组合。香料和芳香剂可在不同的动物之间互换。类似地，人工的或天然的各种水果香料，可加入到用于人类消耗的包括本发明的温育产物的食品补充剂。

[0115] 本公开内容的温育产物或全价饲料的保质期通常可以比缺乏微生物的温育产物的保质期更长。保质期可以取决于因素，例如，产物的水分含量、多少空气可以流过饲料块、环境条件和防腐剂的使用。可向全价饲料加入防腐剂以增加保质期至几周和几个月。其它增加保质期的方法包括类似青贮饲料管理的管理，如与其它饲料混合和包装，以塑料覆盖或装袋。凉爽的环境，防腐剂和从饲料块排出空气均延长湿副产物的保质期。全价饲料可以在煤仓 (bunker) 或青贮窖袋中储存。将湿的温育产物或全价饲料干燥也可增加产物的保质期，并改善一致性和品质。

[0116] 本公开内容的全价饲料可以被长时期储存。保质期可以通过青贮、添加防腐剂如有机酸、或与其它饲料如大豆壳混合而延长。货物桶 (Commodity bins) 或大容量存储仓库可用于储存全价饲料。

[0117] 如本文所用，“室温”是在标准压力下约25℃。

[0118] 下面的实施例是说明性的，并不旨在限制本公开的主题的范围。

实施例

[0119] 实施例1. 高品质大豆蛋白质浓缩物(HQSPC)。

[0120] 图1显示了总体的方法: 预处理白薄片, 将糖转化为细胞物质(蛋白质)和胶状物, 回收HQSPC和产生水产饲料(图2), 并在鱼饲养试验中测试产生的水产饲料。首先在15%的水分含量, 50℃, 及75rpm对白薄片进行挤压预处理(BRABENDER PLASTI-CORDER SINGLE SCREW EXTRUDER Model PL2000, Hackensack, NJ)以破坏结构, 并允许在随后的糖化中增加水解酶的侵入。这些条件提供了针对在筒两侧的脊形通道的剪切作用, 且先前已经观察到, 这导致了酶水解后50-70%更大的糖释放。然后将挤压的白薄片研磨通过3mm锤磨机筛, 与水混合以达到10%的固体加载率, 并调节至pH 5。加热以对糊状物进行巴氏灭菌或消毒后, 将糊状物冷却到约50℃, 并加入纤维素和低聚糖-解构酶(共15ml/kg白薄片)以水解聚合物为单糖(4-24h水解)。包括的具体剂量是6%CELLIC CTEK(每克葡聚糖)、0.3%CELLIC HTEK(每克总固体)、0.015%NOVOZYME960(每克固体)。然后将所得的糊状物冷却至30℃, 调节pH至3-5, 接种出芽短梗霉菌(1%v/v), 并在50至200rpm的搅拌和0.5L/L/min的充气速率下温育4-5天以转化糖成为蛋白质和胶状物。在温育期间, 样品被定期取出, 并分析糖、细胞计数和胶状物产生。温育后, 将pH提高到6.5, 并加入乙醇(0.6L/L肉汤)以沉淀胶状物。蛋白质、短梗霉菌聚糖和微生物物质(microbial mass)(HQSPC)通过离心回收并干燥, 同时将上清液蒸馏以回收乙醇, 且化学测定剩余的液体用于将来在方法的起始再循环。然后在以黄鲈进行的饲养试验中测试HQSPC, 黄鲈是地方市场重要的鱼。将以HQSPC配制的测试生长食物与鱼粉和竞争的基于植物的成分相比较。检查了性能(如生长、饲料转化率、蛋白质功效)、内脏的特性、和肠道组织学, 以评价鱼的响应。

[0121] 使用大豆白薄片及以出芽短梗霉菌的微生物转化的HQSPC, 用于HQSPC生产的试验性规模系统。

[0122] 系统包含675L生物反应器、变速螺杆泵(variable speed progressive cavity pump)、连续流离心机、及1x 4米的干燥台。用于675L生物反应器的接种物在两个、5L NEW BRUNSWICK BIOFLO 3BIOREACTORS中准备。对于每个试验, 通过以描述的培养出芽短梗霉菌2-3天制备8-10L量的接种物。这种材料用于接种在675L生物反应器中制备的更大量的挤压和糖化的白薄片。温育后, 加入乙醇, 离心糊状物以回收湿固体, 然后干燥湿固体, 并在鱼饲养试验中使用。通过监测转化方法的性能、HQSPC的产量和组成, 观察到若干参数显著影响固体回收率。在大规模试验中, 如表1所示的参数被改变。

[0123] 表1. 预试规模试验变量和关键性能参数。

[0124]

| 参数 | 试验1 | 试验2 | 试验3 | 试验4 | 试验5 | 试验6 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 挤压 | 是 | 是 | 否 | 否 | 否 | 是 |
| 糖化时间(h) | 3 | 3.5 | 4 | 7 | 5 | 5 |
| 温育pH | 4.2 | 5.1 | 4.3 | 4.6 | 3.05 | 3.15 |
| 温育温度(C) | 29-30 | 29-30 | 29-30 | 26-27 | 29-30 | 29-30 |
| 充气(L/L/min) | 0.25 | 0.25 | 0.25 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 温育时间(天) | 16 | 15 | 3.5 | 4.5 | 2 | 2.5 |
| 固体回收率(%) | 20 | 16 | 48 | 48 | 60 | 64 |
| 固体%蛋白质 | 75.18 | 75.04 | 63.93 | 61.5 | 61.61 | 56.86 |

| | | | | | | |
|---------|-------|----|-------|-------|--------|-------|
| 胰蛋白酶抑制剂 | 0 | 0 | NA | NA | 16,750 | 6,538 |
| 上清液%固体 | 2.5 | 5 | 2.1 | 3.89 | 2.39 | 3.4 |
| 上清液%蛋白质 | 78.16 | 80 | 71.66 | 61.47 | NA | NA |

[0125] 从HQSPC产量和蛋白质水平,下列被指出:1) 3-3.5的温育pH和30-32°C的温度,伴随高充气,最大化出芽短梗霉菌生长且最小化短梗霉聚糖的产生,2) 4-5天的温育时间对于蛋白质含量和固体回收率是最佳的,3) 较长的温育时间增加蛋白质含量,但显著降低固体回收率,4) 较短的温育时间保持高的固体回收率,但限制蛋白质含量,及5) 由于在终产物中缺乏水苏糖和棉子糖,挤压和/或降低(省略)酶糖化作用可以是可能的。

[0126] 在5L生物反应器中进行初步工作台规模的试验以优化方法条件。挤压的白薄片以10%的固体加载率使用并糖化24h,随后接种出芽短梗霉菌,并在pH 5、0.5L/L/min充气、200rpm搅拌下温育10天。测试了延长的温育时间,以确定最大化固体回收率百分比和固体中的蛋白质含量两者的最佳收获窗。每日取出样品(100ml)且,隔日,对其进行以下操作:

[0127] 以乙醇沉淀所有的固体,离心并干燥固体,测量得到的上清液中的剩余固体。

[0128] 首先离心肉汤以回收固体,干燥固体,从得到的上清液沉淀短梗霉聚糖并干燥。

[0129] 使用实验室离心机(10,000g),首先乙醇沉淀方法回收约97%的固体(大豆固体、细胞和胶状物),有约3%的固体剩余在液相中。首先离心方法中回收约81.7%的固体(大豆固体和细胞),以乙醇沉淀上清液回收约14.8%的固体(胞外多糖),且约3.5%的固体剩余在液体中。

[0130] 通过这些工作台规模的试验,测量了每天可被回收的蛋白质、短梗霉聚糖、及总固体的水平。预计随着温育的继续,蛋白质和短梗霉聚糖水平会增加,但回收的总固体会减少,因为一些营养物被分解代谢为水和CO₂。来自三次重复的固体的平均蛋白质水平示于图3。在第3-5天蛋白质水平达到70%,而回收的总固体在第5-6天开始下降。由此可见,4-5天的温育时间可能是最佳的。

[0131] HQSPC作为鱼粉代替物在鲈鱼中的性能评价

[0132] 此前鉴定了商业可得的SPC之间的若干差异,主要在于蛋白质和氨基酸组成和抗营养性质,其对生长性能和鱼的组成赋予了可变性。这些实验证明了开发将支持等同于或优于含鱼粉的食物生长性能的较高品质SPC产物的需要。饲养试验利用黄鲈进行,以提供两种HQSPC大豆产物(发酵试验5和6)相比商业SPC和鲱鱼粉对照的评价。

[0133] 饲料制备:七种食物配制如下:

[0134] 食物1=鱼粉对照

[0135] 食物2=商业SPC

[0136] 食物3=商业SPC(补充赖氨酸+甲硫氨酸)

[0137] 食物4=HQSPC试验5

[0138] 食物5=HQSPC试验5(补充赖氨酸+甲硫氨酸)

[0139] 食物6=HQSPC试验6

[0140] 食物7=HQSPC试验6(补充赖氨酸+甲硫氨酸)

[0141] 每种食物制备大约12kg,包括含有1g氧化铬/100g的2kg用于确定消化率。试验食物配制为以42:10的适当的蛋白质:脂类目标含有等同的SPC量。具有69%的最低蛋白质含量的大豆蛋白质浓缩物(SPC,例如,来自Netzcon Ltd.Rehovot,Israel),通过醇水溶液提

取脱脂的非烘烤的白薄片制成。SPC明显不同于大豆粉,因为它含有微量低聚糖和抗原物质大豆球蛋白和 β -伴大豆球蛋白。

[0142] 干混合前,大颗粒成分以Fitzpatrick粉碎机 (Elhurst, IL) 用0.51mm筛研磨。干成分使用具有增强棒的VI-10混合器 (Vanguard Pharmaceutical Machinery, Inc., Spring, TX) 混合20min。然后转移干混合的饲料原料至Hobart HL200混合器 (Troy, OH), 其中加入油和水并混合约5min。然后使用Hobart 4146研磨机以3/16"冲模螺杆挤压饲料, 及在冷却、强制通风条件下干燥。干燥后, 使用食品加工机将饲料研磨成小粒, 筛分以达到一致的小粒大小, 并放置于-20℃冷冻储存。主要蛋白质来源的化学分析可见于表2。

[0143] 表2. 掺入黄鲈实验食物中的主要蛋白质来源的组成 (g/100g, 基于干物质 (dmb))。

[0144]

| 蛋白质来源 | 鲱鱼鱼粉 | 商业 SPC | HQSPC 试验 5 | HQSPC 试验 6 |
|--------------|-------|--------|---------------|---------------|
| 近似的组分 | | | | |
| 蛋白质 | 66.77 | 78.18 | 61.61 | 56.86 |
| 水分* | 7.62 | 9.73 | 5.14 | 7.89 |
| 脂类 | 5.21 | 0.00 | 1.70 | 1.26 |
| 粗纤维 | 0.18 | 10.08 | 0.81 | 4.86 |
| 灰分 | 25.33 | 7.10 | 8.82 | 5.21 |
| 氨基酸 | | | | |
| 丙氨酸 | 3.97 | 3.03 | 2.71 | 2.66 |
| 精氨酸 | 3.69 | 5.30 | 2.44 | 3.65 |
| 天冬氨酸 | 5.47 | 8.08 | 6.72 | 6.45 |
| 胱氨酸 | 0.48 | 0.97 | 0.87 | 0.88 |
| 谷氨酸 | 7.73 | 12.51 | 8.70 | 8.85 |
| 甘氨酸 | 4.81 | 2.96 | 2.67 | 2.51 |
| 组氨酸 | 1.26 | 1.84 | 1.41 | 1.40 |
| 羟赖氨酸 | 0.27 | 0.04 | 0.81 | 0.10 |
| 羟脯氨酸 | 1.19 | 0.08 | 0.10 | 0.07 |
| 异亮氨酸 | 2.73 | 3.30 | 2.89 | 2.92 |
| 羊毛硫氨酸 | 0.00 | 0.02 | 0.00 | 0.00 |
| 亮氨酸 | 4.47 | 5.61 | 4.64 | 4.87 |
| 赖氨酸 | 4.58 | 4.56 | 3.47 | 3.41 |
| 甲硫氨酸 | 1.72 | 1.00 | 0.83 | 0.90 |
| 鸟氨酸 | 0.14 | 0.04 | 0.14 | 0.04 |
| 苯丙氨酸 | 2.51 | 3.62 | 2.89 | 3.08 |
| 脯氨酸 | 3.31 | 3.65 | 3.17 | 2.92 |
| 丝氨酸 | 1.85 | 3.07 | 2.28 | 2.73 |

[0145]

| | | | | |
|-----|------|------|------|------|
| 牛磺酸 | 0.42 | 0.08 | 0.09 | 0.10 |
| 苏氨酸 | 2.32 | 2.80 | 2.36 | 2.31 |
| 色氨酸 | 0.58 | 1.00 | 0.79 | 0.82 |
| 酪氨酸 | 2.01 | 2.57 | 1.98 | 2.25 |
| 缬氨酸 | 3.10 | 2.51 | 3.13 | 3.10 |
| 低聚糖 | | | | |
| 棉籽糖 | -- | 0.00 | 0.00 | 0.00 |
| 水苏糖 | -- | 0.24 | 0.00 | 0.00 |
| | | | | |
| 植酸 | -- | 0.23 | 0.39 | 0.18 |

[0146] *所有成分以基于干物质表示,水分除外(原样)。

[0147] 分析是对粗蛋白质(AOAC 2006,方法990.03)、粗脂肪(AOAC 2006,方法9903)、粗纤维(AOAC 2006,方法978.10)、水分(AOAC 2006,方法934.01)、氧化铬(AOAC2006,方法990.08)、灰分(AOAC 2006,方法942.05)、及氨基酸(AOAC 2006,方法982.30E(a,b,c))。

[0148] 小粒特性

[0149] 每种食物样品一式三份分析水分(%)、水分活度(a_w)、单位密度(kg/m^3)、小粒耐久性指数(%)、水稳定性(min)、和颜色(L、a、b);以 $n=10$ 个重复确定了抗压强度(g)、和直径(mm)。水分(%)使用标准方法2.2.2.5(NFTA,2001)获得。2g小粒样品的水分活度(a_w)以Lab Touch a_w 分析仪(Nocasina,Lachen SZ,Switzerland)测量。三色变量以分光光度色量计(spectrophotocolorimeter)(LabScan XE,HunterLab,Reston,VA)作为Hunter L(亮度/暗度)、Hunter a(红度绿度)和Hunter b(黄度/蓝度)分析。单位密度(UD)通过称量100ml颗粒并以质量(kg)除以 0.0001m^3 估算。小粒耐久性指数(PDI)根据标准方法S269.4(ASAE2003)确定。PDI计算为: $\text{PDI}(\%) = (M_a/M_b) \times 100$,其中 M_a 是翻转后的质量(g)且 M_b 是翻转前的质量(g)。小粒的稳定性(min)由静态($W_{\text{静态}}$)方法(Ferouz等人,Cereal Chem(2011)88:179-188)确定,以模拟罐中的颗粒浸取直到其被耗尽。稳定性以从浸取的重量损失/最初样品的干重量计算。使用常规的卡钳测量小粒直径。使用TA.XT Plus Texture Analyzer(Scarsdale,NY)测试了小粒的抗压强度。

[0150] 饲养试验

[0151] 黄鲈($2.95\text{g} \pm 0.05\text{SE}$)被以21条鱼/罐随机放养至并联连接成闭环再循环水产养殖系统(RAS)的28个圆形罐(110升)。以双固体储水罐组成的离心泵、生物反应器、珠过滤器、UV过滤器、和热泵保持RAS水流和水质。系统的水是市政的,将其脱氯并储存在15,200L罐。每个处理的四个重复在罐中随机应用。水流量保持在 $\sim 1.5\text{L}/\text{min}/\text{罐}$ 。温度保持在 $22^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ 。以YSI Pro Plus(Yellow Springs Instrument Company, Yellow Springs, OH)测量温度和溶解氧。氨氮、亚硝酸盐氮、硝酸盐氮、碱度(以 CaCO_3)、及游离氯使用Hach DR 3900分光光度计(Hach Company, Loveland, CO)测试。

[0152] 鱼以手工每天两次饲养至饱食,饲养率依据罐重量、观察的生长速率和饲料消耗评价修改。消耗(%)从饲养的已知数量的小粒并通过计数饲养30min后未食用的小粒估算。

未食用的饲料的收集,及随后的干重也被用于估算消耗。每周的罐消耗估算值乘以每周的配给,得到每周的消耗(g)。处理的适口性通过消耗或拒绝的饲料数量确定。每隔一周测量罐质量(+0.01g)以调整饲养速率并计算性能指标。每隔一周还对四条从各处理随机取样的鱼测量个体的长度(mm)和重量(+0.01g)。

[0153] 饲料转化率(FCR)的计算为:

[0154] $FCR = \text{消耗的饲料的质量(干,g)} / \text{生长(湿,g)}$

[0155] 蛋白质转化率的计算为:

[0156] $PER = \text{生长(湿,g)} / \text{消耗的蛋白质的质量(干,g)}$

[0157] 弗尔顿氏型丰满系数(K)的计算为:

[0158] $K = \text{重量(g)} / [\text{长度(mm)}]^3 \times 10,000$

[0159] 比增长率(SGR)的计算为:

[0160] $SGR = [\ln(\text{最终wt(g)}) - \ln(\text{起始wt(g)})] \times 100/n(\text{天})$

[0161] 食物和饲养试验响应的统计分析以方差分析(ANOVA,先验 $\alpha=0.05$)进行。显著F检验后进行了事后Tukey检验以分离处理手段。

[0162] 小粒和饲养结果

[0163] 饲料制剂是基于来自试验3(表1)的HQSPC营养分析,而在试验食物中以45%(100%鱼粉代替)同等地包括所有大豆蛋白质浓缩物。计划的饲养试验开始日期后完成试验5和6的分析(表2),通常导致相似、但不是等含氮量的食物。食物配制成含有42%的蛋白质和10%的脂类,具有能量与蛋白质(E:P)比率为7.91至7.94(kcal/g)。最近的分析表明,粗蛋白质(dmb)为44.9%(食物1)、43.2%(食物2和3)、36.8%(食物4和5)、和37.5%(食物6和7)。粗脂类在所有食物中为大约10%。相比黄鲈需求,饲料的氨基酸分析没有显示在未补充的食物之中的任何潜在的缺陷(表3)。

[0164] 表3.用于鲈鱼饲养试验的实验设计、食物制剂、及组成。

[0165]

| 成分 (g/100g, dmb) | 食物 # | | | | | | |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| 鲱鱼鱼粉 ^a | 50.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 商业SPC | 0.0 | 45.0 | 45.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| HQSPC试验5 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 45.0 | 45.0 | 0.0 | 0.0 |
| HQSPC试验6 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 45.0 | 45.0 |
| 黄玉米蛋白 ^b | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| 小麦粉 ^c | 18.0 | 21.0 | 21.0 | 21.0 | 21.0 | 21.0 | 21.0 |
| 小麦蛋白 ^b | 6.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| CMC ^d | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 | 5.0 |
| Celufil ^d | 3.7 | 3.6 | 3.6 | 3.5 | 3.0 | 3.5 | 3.0 |
| 鲱鱼油 ^e | 4.59 | 8.19 | 8.19 | 8.37 | 8.37 | 8.37 | 8.37 |
| 亚麻油 ^f | 0.51 | 0.91 | 0.91 | 0.93 | 0.93 | 0.93 | 0.93 |
| 维生素预混料 ^g | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| 矿物质预混料 ^h | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 | 0.1 |
| 维生素C ⁱ | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 胆碱 ^j | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| 植酸酶 ^k | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 | 0.037 |
| 啤酒酵母 ^l | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |

[0166]

| | | | | | | | |
|---------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| L-赖氨酸 ^j | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.3 | 0.0 | 0.3 |
| L-甜菜碱 ^j | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 | 0.5 |
| L-甲硫氨酸 ^j | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.2 |
| 氯化钠 ^m | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 氯化钾 ^m | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 | 0.8 |
| 氧化镁 ^m | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 |
| 磷酸钙 ^m | 2.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 1.0 |
| 估算的近似组成 | | | | | | | |
| 蛋白质(%) | 42.1 | 42.2 | 42.7 | 42.0 | 42.5 | 42.0 | 42.5 |
| 脂类(%) | 10.06 | 10.01 | 10.01 | 10.03 | 10.03 | 10.03 | 10.03 |
| 灰分(%) | 4.46 | 3.46 | 3.46 | 3.46 | 3.46 | 3.46 | 3.46 |
| 总能量(kcal) | 334.3 | 334.3 | 337.1 | 333.5 | 336.3 | 333.5 | 336.3 |
| E:P (kcal/g) | 7.94 | 7.93 | 7.94 | 7.91 | 7.94 | 7.94 | 7.91 |

[0167] ^a Special Select, Omega Protein, Houston, TX; ^b Consumers Supply Distribution, Sioux City, IA; ^c Bob's Red Mill Natural Foods, Milwaukie, OR; ^d USB Corporation, Cleveland, OH; ^e Virginia Prime Gold, Omega Protein, Houston TX; ^f Thomas Laboratories, Tolleson, AZ; ^g ARS 702 Premix, Nelson and Sons, Murray, UT; ^h SS#3 Trace Mix, Nelson and Sons, Murray, UT; ⁱ U.S. Nutrition, Bohemia, NY; ^j Pure Bulk, Roseburg, OR; ^k DSM Nutritional Products, Parsippany, NJ; ^l Diamond V Mills, Cedar Rapids, IA; ^m Fisher Scientific, Pittsburg, PA.

[0168] 除了直径以外,小粒饲料在各处理之间的测量结果表现出显著的差异(表4)。

[0169] 表4. 饲料挤压物的物理特性

[0170]

| 食物 # | | | | | | | |
|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 特性 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
| MC (% db) | 8.5 ± 0.2 ^a | 11.0 ± 0.3 ^b | 11.0 ± 0.1 ^b | 14.1 ± 0.1 ^c | 9.9 ± 0.1 ^d | 10.1 ± 0.1 ^d | 12.2 ± 0.1 ^c |
| $a_w(-)$ | 0.58 ± 0.02 ^a | 0.67 ± 0.00 ^b | 0.69 ± 0.00 ^c | 0.68 ± 0.00 ^{bc} | 0.68 ± 0.00 ^{bc} | 0.68 ± 0.00 ^{bc} | 0.74 ± 0.01 ^d |
| BD (kg/m ³) | 634.8 ± | 648.6 | 659.4 | 675.4 ± | 688.9 ± | 669.3 | 695.9 |

[0171]

| | | | | | | | |
|----------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | 3.0 ^a | ±3.2 ^b | ±2.4 ^{bc} | 0.5 ^d | 0.6 ^e | ±2.8 ^{cd} | ±2.2 ^e |
| CS (g) | 24.4 ± 0.7 ^a | 56.1 ± 1.8 ^b | 42.9 ± 2.3 ^c | 44.9 ± 3.8 ^{bc} | 54.8 ± 2.3 ^b | 67.0 ± 2.2 ^b | 60.1 ± 3.9 ^b |
| PDI (%) | 98.1 ± 0.4 ^a | 98.1 ± 0.8 ^a | 98.1 ± 0.7 ^a | 98.3 ± 0.3 ^a | 99.3 ± 0.3 ^b | 99.5 ± 0.2 ^b | 99.5 ± 0.3 ^b |
| WSI _静 (%) | 10.2 ± 0.0 ^{ab} | 11.9 ± 0.0 ^a | 9.1 ± 0.0 ^{ab} | 8.9 ± 0.0 ^{ab} | 9.1 ± 0.0 ^{ab} | 8.2 ± 0.0 ^{ab} | 6.7 ± 0.0 ^b |
| $L(-)$ | 47.9 ± 0.2 ^a | 58.5 ± 0.1 ^b | 68.5 ± 0.5 ^c | 59.9 ± 0.3 ^{bd} | 53.7 ± 0.2 ^e | 60.6 ± 0.3 ^d | 63.8 ± 0.4 ^f |
| $a(-)$ | 5.2 ± 0.0 ^a | 2.8 ± 0.0 ^b | 3.2 ± 0.1 ^c | 4.3 ± 0.0 ^d | 4.4 ± 0.0 ^d | 2.9 ± 0.0 ^b | 2.9 ± 0.0 ^b |
| $b(-)$ | 22.8 ± 0.1 ^a | 18.1 ± 0.1 ^b | 20.2 ± 0.1 ^c | 22.8 ± 0.1 ^a | 21.4 ± 0.1 ^d | 20.3 ± 0.0 ^{ce} | 20.7 ± 0.1 ^e |
| 直径(mm) | 2.2 ± 0.0 ^a | 2.1 ± 0.1 ^a | 2.1 ± 0.0 ^a | 2.0 ± 0.0 ^a | 2.0 ± 0.0 ^a | 2.0 ± 0.0 ^a | 2.0 ± 0.0 ^a |

[0172] 给出的值是与处理手段相关的平均值(±SE)。在给定的行内,非显著差异($P > 0.05$)的值具有相同的字母。MC(% db) = 水分含量; $a_w(-)$ = 水分活度; BD (kg/m³) = 单位密度; CS (g) = 抗压强度; PDI (%) = 小粒耐久性指数; WSI_静(%) = 静水中水溶指数; $L(-)$ = Hunter亮度; $a(-)$ = Hunter黄度; $b(-)$ = Hunter红度; 直径 (mm) = 直径。

[0173] 水分含量(MC)范围从约8.49% (食物1)至约14.07% (食物4)。MC有助于对其它特性的作用,如PDI、抗压强度、和颜色。没有鉴定出MC和其它变量间明显的相关性。

[0174] 水分活度,小粒中未结合水的量度,是高的(约0.58至约0.74),相比所有其它处理,食物1(鱼粉)的显著较低(约0.58),且食物7的显著较高(约0.74)。超过0.6的值表示较

低的存储稳定性,并可能允许微生物生长增殖。饲料在-20℃保存在冷冻库。

[0175] 单位密度(BD),是每单位体积饲料重量的量度,范围从约634.87至约695.9。食物1(鱼粉)有较低的DB,且尽管不受理论的限制,这最有可能是由于鱼油和鱼粉较低的包含。大豆蛋白质浓缩物食物具有较高的BD,因为它们含有更多的油来改善脂类需求。

[0176] 抗压强度(CS)被以来自垂直轴向的应力-应变曲线的峰值断裂力计算。CS从约24.36至约67.03显著变化。食物1(鱼粉)表现出最低抗压强度(约24.36)。尽管不受理论的限制,这最有可能归因于小粒的异质性,小粒的异质性是由造粒方法产生的(例如,螺杆按压而不是挤压)。挤压以水分、压力、温度和机械剪切的组合蒸煮饲料。这个方法胶化淀粉,它可以大幅增加CS。

[0177] 小粒耐久性指数(PDI)在所有食物中非常高(约98.05%至约99.48%),各处理间无显著差异。这些高PDI值可能是高MC,以及羧甲基纤维素(CMC)粘合剂添加的结果。

[0178] 水溶指数(WSI)在所有食物中是低的(约9.65至约14.43),且食物4展示最高值,其相比最低的,在约9.65的食物7,显著不同。由于相比挤压饲料的螺杆按压的性质,WSI预期是低的。由于淀粉的胶化减少了水的渗透,挤压饲料是更水稳定的。

[0179] Hunter颜色参数(L、a、b)显示了与生长表现的相似性。Hunter a(红度)在食物1最高(5.15)且在食物2最低(2.80),Hunter b(黄度)在食物4(22.81)和食物1(22.76)最高且在食物2最低(18.07)。Hunter L(亮度)在食物3最高(68.48)且在食物1最低(47.91)。相比较深的饲料,颜色较浅的饲料被发现含有较高浓度及更大的可用性的赖氨酸。鱼的性能

[0180] 食物6提供了相比食物1(鱼粉)在生长性能方面最可比较的结果。生长性能在各处理间在所有类别中显著不同(表5)。

[0181] 表5:性能方面。

[0182]

| 食物 | WG | SGR | S | TC | FCR | PER | K |
|----|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1 | 102.1 ± 8.0 ^a | 1.66 ± 0.1 ^a | 100.0 ± 0.0 ^a | 450.2 ± 5.8 ^a | 1.27 ± 0.05 ^a | 1.76 ± 0.06 ^a | 1.06 ± 0.01 ^{ab} |
| 2 | 12.6 ± 6.4 ^b | 0.55 ± 0.12 ^b | 82.3 ± 0.6 ^b | 140.9 ± 4.7 ^b | 2.59 ± 0.49 ^b | 0.98 ± 0.17 ^b | 1.01 ± 0.02 ^a |
| 3 | 23.7 ± | 0.59 ± | 96.4 ± | 181.6 ± | 2.0 ± | 1.17 ± | 1.02 ± |

[0183]

| | | | | | | | |
|---|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| | 1.3 ^{bc} | 0.04 ^{bc} | 0.3 ^a | 2.5 ^{bc} | 0.09 ^{ab} | 0.06 ^b | 0.03 ^{ab} |
| 4 | 46.6 ± 8.3 ^{cd} | 1.06 ± 0.12 ^c | 94.1 ± 0.5 ^{abc} | 283.4 ± 8.9 ^{bc} | 1.6 ± 0.04 ^a | 1.7 ± 0.04 ^a | 1.11 ± 0.04 ^{ab} |
| 5 | 49.1 ± 11.0 ^{cd} | 1.10 ± 0.14 ^d | 92.9 ± 0.3 ^{abc} | 306.3 ± 11.2 ^{ac} | 1.73 ± 0.10 ^{ab} | 1.59 ± 0.10 ^a | 1.14 ± 0.03 ^b |
| 6 | 84.4 ± 2.4 ^{ae} | 1.48 ± 0.05 ^{ad} | 98.8 ± 0.3 ^{ac} | 451.5 ± 13.4 ^a | 1.43 ± 0.04 ^a | 1.87 ± 0.05 ^a | 1.07 ± 0.03 ^{ab} |
| 7 | 61.8 ± 4.8 ^{de} | 1.28 ± 0.12 ^{ad} | 94.1 ± 0.6 ^{abc} | 338.1 ± 10.8 ^{ac} | 1.58 ± 0.03 ^a | 1.69 ± 0.03 ^a | 1.06 ± 0.02 ^{ab} |

[0184] 鲈鱼饲养试验食物的平均体重增加(WG,%)、比生长率(SGR)、存活率(S,%)、总消耗(TC,g)、食品转化率(FCR)、蛋白质功效比(PER)和弗尔顿型丰满系数(K)值。给出的值是与处理手段相关的平均值(±SE)。在给定的行内,非显著差异(P>0.05)的值具有相同的字母。

[0185] 补充的食物(食物3和5),比其未补充的对应物稍微好一点,除了食物6和7。食物6在所有方面都胜过食物7。尽管不被理论所束缚,这可能是与结晶氨基酸补充剂的生物利用度相关的计时问题的结果。

[0186] 体重增加(WG)在食物1最高(鱼粉为102.1%),其次为食物6和7(分别为84.4%和61.8%)。食物2和3(商业SPC)表现最低的WG(分别为12.62%和23.69%)。比生长率(SGR)与WG结果平行。SGR在食物1中最高(1.66),且在食物2中最低(0.55)。

[0187] 蛋白质功效比(PER)在食物6中最高(1.87),其次为食物1(1.76)和食物4(1.70)。食物2和3具有最低的PER,分别为0.98和1.17。PER在未补充食物4和6比在补充食物5和7中更好。

[0188] 饲料转化率(FCR)遵循类似的模式,以食物1和食物6最低(分别为1.39和1.59)。这些FCR值表示非常高的营养饲料品质。食物2和3具有最高的FCR(分别为2.91和2.24)。

[0189] 总消耗(dmb)以食物6(451.5g)和食物1(450.20g)为最高,以食物2(140.91)和食物3(181.60)为最低。所有食物均饲养至饱食。食物消耗被视为指示适口性,这也是喂食食物2的鱼类生存率显著较低(82.29%)的原因。存活率在食物1为100%且食物6为98.81%。

[0190] 弗尔顿氏丰满系数(K)在食物5最高(1.14),且在食物2最低(1.01)。对于此特定性能参数,所有HQSPC食物达到或超过鱼粉对照。商业SPC食物比其它所有的食物更低。

[0191] 其它测定

[0192] 试验分析的结束可包括最终的生长、FCR、PER、消耗和经由剖检的对于营养不足的检查。对赖氨酸和甲硫氨酸,可使用标准方法完成血浆测定(Plasma assay)。个体鱼可通过颈脱位法安乐死,以便定量肌肉比、肝体指数、脏体指数、鱼片组成、及后肠组织学(肠炎的炎症评分)。试验食物中蛋白质和能量的可用性可以使用饲料和排泄物材料中的氧化铬(CrO₃)标志物估计。排泄物材料可经由剖检从肠道下部收集。

[0193] 对于试验食物中的营养物的表观消化系数 (ADC) 可以使用以下公式计算:

$$[0194] \quad ADC_{\text{测试成分}} = ADC_{\text{测试食物}} + [(ADC_{\text{测试食物}} - ADC_{\text{参考食物}}) \times (0.7 \times D_{\text{参考}} / 0.3 \times D_{\text{成分}})]$$

[0195] 其中 $D_{\text{参考}}$ = 参考食物糊状物 (原样) 的 % 营养 (kJ/g 总能量) 且 $D_{\text{成分}}$ = 测试成分 (原样) 的 % 营养 (kJ/g 总能量)。

[0196] 总结

[0197] 使用两种 HQSPC 饲料、对照鱼粉、及商业大豆蛋白质浓缩物 (SPC) 例证了用于黄鲈的螺杆菌组合饲料。基于 HQSPC 的食物具有相比鱼粉可比较的性能, 且表现优于商业 SPC。生长和转化性能超出预期, 考虑到 HQSPC 食物中的粗蛋白质含量比鱼粉对照少约 7%, 比商业 SPC 少 6%。因此, HQSPC 食物可作为鱼粉的完全代替物。

[0198] HQSPC 作为鱼粉代替物在虹鳟鱼中的性能评价

[0199] 除了上文黄鲈的结果, 使用驯养的虹鳟鱼品系 (Shasta) 进行了 90 天的饲养试验。表 6 按鱼的种类和大小总结了蛋白质目标。这些饮食蛋白质目标或水平 (%) 可在用于这些商业上重要的有鳍鱼类的实验食物的配制中使用。

[0200] 表 6. 按重量范围的对于各种有鳍鱼类的蛋白质目标。

| 种类 | 重量范围 (g) | | | | |
|--------------|----------|--------|---------|-----------|---------|
| | < 20 | 20-200 | 200-600 | 600-1,500 | > 1,500 |
| [0201] 大西洋鲑鱼 | 48 | 44 | 40 | 38 | 34 |
| 太平洋鲑鱼 | 55 | 45 | 40 | 38 | 38 |
| 虹鳟鱼 | 48 | 40 | 38 | 38 | 36 |
| 斑点叉尾鲷 | 44 | 36 | 32 | 32 | 28 |
| 尼罗罗非鱼 | 40 | 34 | 30 | 28 | 26 |

[0202] 鳟鱼以对照鱼粉食物或以 HQSPC 产物代替 70% 的鱼粉的食物 (食物 2-35% 包含 (inclusion)) (试验 6) 饲养 (见表 7)。

[0203] 表 7. 虹鳟鱼饲养试验中使用的测试食物配制

| 成分 (g) | 食物 1 | 食物 2 |
|----------------------------|----------|-----------|
| Omega prime special select | 40 | 15 |
| HQSPC | 0 | 35 |
| 黄玉米蛋白 | 20 | 16 |
| 小麦粉 | 15 | 11 |
| 羧甲基纤维素 | 6.7 | 3 |
| 维生素预混料 | 1.5 | 1.5 |
| 微量矿物质预混料 | 1.5 | 1.5 |
| Stay-C | 0.5 | 0.5 |
| DVAqua | 0.1 | 0.1 |
| 甲硫氨酸 | 0 | 0.2 |
| [0204] 氯化钠 | 0.5 | 0.5 |
| 氯化钾 | 0.5 | 0.5 |
| 氧化镁 | 0 | 0 |
| 磷酸钙 | 0 | 0.5 |
| 鲱鱼油 | 13.7 | 14.7 |
| <u>近似物</u> | | |
| 蛋白质 | 42.87 | 42.89 |
| 脂肪 | 16.37 | 16.38 |
| 纤维 | 0.61 | 2.14 |
| 灰分 | 12.31 | 8.15 |
| Kcal | 398.54 | 398.68 |
| E:P | 9.30 | 9.29 |

[0205] 使用35%包含水平以超过对其它大豆蛋白质浓缩物如Selecta SPC60推荐的30%包含。使用等热量、等含氮量食物的此试验,证明对照和所提供的测试食物之间的等效的性能。

[0206] 表8总结了90天饲养试验期间观察的虹鳟鱼的性能特点。食物2,含有HQSPC,显示了体重增加或饲料转化率/功效没有下降,且其中没有死亡(100%存活)。这些观察结果复制了在黄鲈试验中观察到的结果。

[0207] 表8.使用HQSPC对虹鳟鱼的性能试验。

| | FM:HQSPC (%) | 食物 1 (40:0) | 食物 2 (15:35) |
|--------|--------------|----------------|---------------|
| | 起始重量 (g) | 795 ± 67 | 882 ± 44 |
| | 结束重量(g) | 3,400 ± 216 | 3,706 ± 172 |
| [0208] | 增加 (g) | 2,605 ± 149 ab | 2,824 ± 133 a |
| | 增加 (%) | 327.7 | 320.2 |
| | 饲养的食物(g) | 3,608 ± 189 | 3,880 ± 68 |
| | FCR | 1.39 ± 0.06 a | 1.38 ± 0.07 a |
| | 死亡率 (%) | 0.0 ± 0.0 | 0.0 ± 0.0 |

[0209] 给出的值是与处理手段相关的平均值(±SE)。

[0210] 总结

[0211] 使用HQSPC食物和对照鱼粉示例了用于虹鳟鱼的螺杆按压的组合饲料。在这个试

验中基于HQSPC的食物具有相比鱼粉可比较的性能。同样地,这些数据表明,HQSPC食物超过使用SPC的预期结果(例如,HQSPC可以以大于30%包含水平的浓度使用),并可以作为有效的鱼粉代替物。实施例2.使用微生物转化生产HP-DDGS。

[0212] 关于挤压对改善DDGS的糖化作用的影响使用单螺杆挤压机(BRABENDER PLASTI-CORDER EXTRUDER Model PL2000, Hackensack, NJ)以筒长比螺杆直径为1:20和压缩比为3:1来研究(图4和5)。确定,25%的DDGS水分含量,温度为100°C至160°C,且螺杆速度为200rpm导致了从玉米纤维的36%的糖回收率(图5)。多种NOVOZYME木质纤维素解构酶的性能被单独评价,并发现,6%CELLIC CTEK2(每克葡聚糖)和0.3%CELLIC HTEK2(每克总固体)导致高达70%的糖回收率。这些预处理和糖化条件可被用于产生HP-DDGS。可进行下面的选项,例如与纤维素酶生产者共同培养,以减少添加酶的需要,以及使用补料分批生物反应器以降低加工成本。

[0213] 进行了微生物在大豆粉中发现的碳水化合物上的生长和胶状物产生的评价,且发现通过使用本文公开的方法蛋白质含量可以从42%增加到至少60%。这表明,微生物(例如,出芽短梗霉菌)可以有效地改变宽范围的难以代谢的低聚糖为细胞物质(即蛋白质)和微生物胶状物。用大豆粉取得的这一成就是基于以前的研究开始,以前的研究评价从玉米加工副产物,如酒糟、酒糟水、和浓缩的玉米可溶物生产一系列微生物胶状物(胞外多糖)。通过这项工作,已经积累了多种微生物菌种,其有效地在各种玉米加工副产物上生长并从可用糖产生高水平的细胞物质和胶状物。已经鉴定和开发了关键操作参数和较低成本的胶状物回收方法。基于这项研究的主体,和微生物的菌株产生宽范围的水解酶的知识,已经鉴定了允许有效地转化DDGS为HP-DDGS的稳健的方法(例如,出芽短梗霉菌菌株NRRL编号50793)。

[0214] 对于预处理,将常规、干法分提(dryfrac),和/或低油的DDGS在单螺杆挤压机(BRABENDER PLASTI-CORDER EXTRUDER Model PL2000, Hackensack, NJ)中以筒长比螺杆直径为1:20和压缩比为3:1挤压。DDGS样品(调整到25%的水分),饲料、筒、和挤压机的出口截面的温度保持在100°C至160°C,且螺杆转速设置为200rpm,提供针对筒两侧的脊形通道的剪切作用。这些选定的水平的温度、螺杆转速和水分是基于由于DDGS基质的破坏导致了从玉米纤维的36%的糖释放的先前定义的优化条件。

[0215] 将挤压的常规和干法分提的DDGS与水混合,达到在5L NEW BRUNSWICK BIOFLO 3BIOREACTOR (3-4L工作体积)在pH为5.8的至少5%的固体加载率。高压灭菌并冷却后,将浆料使用NOVOZYME酶混合物糖化,其初步数据先前已收集。在初始试验中使用的剂量包括6%CELLIC CTEK2(每克葡聚糖)和0.3%CELLIC HTEK2(每克总固体)。糖化在50°C及150rpm下进行24小时,以溶解纤维和低聚糖为单糖。然后将温度降低至35°C,将pH值调节至4.0(以优化细胞的生长),且向浆料中接种2%(v/v)的微生物的24小时培养物。将浆料以0.5L/L/min充气并继续温育直到糖利用停止(预期96-120h)。然后评价以下的参数:

[0216] 1) 以将与微生物共培养的产生纤维素酶的微生物代替纤维素酶;

[0217] 2) 最大化初始固体加载率;及

[0218] 3) 在糖化作用和/或微生物转化阶段(即,补料分批操作)期间加入更多的挤压底物,以最小化净酶量,最大化蛋白质和胶状物的浓度,并最小化产物回收成本。

[0219] 在温育过程中,样品以6-12h间隔被除去。用于HPLC分析的样品被煮沸(使酶失

活)、离心、通过0.22 μ m过滤器过滤,置于自动采样瓶,并冷冻直到分析。这些样品使用WATERS HPLC系统测定碳水化合物和有机溶剂。对样品进行微生物计数,以评价微生物群体。也可使用美国国家可再生能源实验室程序测定样品的纤维素和半纤维素的水平。

[0220] 然后对转化的浆料进行乙醇沉淀,并离心以将蛋白质、微生物胶状物和微生物物质(HP-DDGS)与剩余的培养液分离。尽管不被理论所束缚,沉淀胶状物的存在改善了在回收悬浮的固体时离心的功效。然后确定HP-DDGS的组成,并在鱼饲养试验中使用。乙醇经由蒸馏从液体流中回收,且剩余的液体被化学分析,以评价潜在用途(如,掺入HP-DDGS中或沼气生产)。

[0221] 这样生产的HP-DDGS含有作为粘合剂且可能作为免疫刺激剂的微生物胶状物。由微生物分泌的其它水解酶将释放肽、氨基酸、和任何剩余的脂类,从而在鱼饲养试验中增加饲料摄入量、生长性能、和营养利用率。HP-DDGS作为鱼粉代替物在鲈鱼饲料中的性能的评价

[0222] 对来自上文的常规和干法分提的HP-DDGS鉴于目标物种的需求分析了营养能力,尤其侧重于黄鲈。将对样品进行化学分析:近似分析、Van Soest纤维、不溶性碳水化合物、氨基酸、脂肪酸、和矿物质。这保证了营养基准得到满足。将HP-DDGS的任何抗营养特性(如植酸含量)与目前的DDGS相比较,并为进一步的方法改进提供了基础。

[0223] 完全的实际食物依据黄鲈的已知营养需求(例如,42%的蛋白质、8%的脂类)使用常规和干法分提的HP-DDGS配制。使用用于基于植物食物的基础矿物质和维生素预混料以确保满足微量营养物的需求。任何补充剂(如通过分析认为必要的)通过比较没有补充的相同的制剂评价;因此,饲养试验以析因设计完成以考虑到补充作用。所有饲养试验包括基于鱼粉的对照食物和包含分级水平的HP-DDGS的食物。饲养试验使用的小粒使用实验室规模的单螺杆挤压机(BRABENDER PLASTI-CORDER EXTRUDER Model PL2000)生产。

[0224] 全部饲养试验使用每个处理四个实验单元的重复(每个60至120天)。试验在110-L圆形罐(20条鱼/罐)中完成,其并联至由离心泵驱动的和由固体贮槽、生物反应器、和过滤器(100 μ m袋,碳和紫外线)组成的闭环再循环系统。热泵如所需地使用以维持物种特异性生长的最佳温度。水质(例如,溶解氧、pH、温度、氨和亚硝酸盐)在所有系统中被监测。

[0225] 实验食物根据鱼的大小被递送,分成二到五次的每天饲养量。生长性能通过在一至四个星期(取决于鱼的大小和试验持续时间)进行总质量测量来确定;配给根据增重进行调整,以允许饱食饲养和减少废物流。消耗从来自单个罐的未食用的饲料的收集每两周进行评价。将未食用的饲料干燥至恒定的温度,冷却并称重以估计转化效率。蛋白质、能量、和磷的消化率从每个实验的中点期间手动剥离的排泄物材料,或经由饲养试验结束时从下部肠道的剖检确定。存活率、体重增加、生长速率、健康指标、饲料转化率、蛋白质和能量的消化率、蛋白质功效、和磷的利用率在各处理组之间进行比较。完成剖检鱼的近似分析以比较各食物处理之间鱼片的组成。根据饲养试验目标,按照鱼片成分的需要,完成氨基酸和脂肪酸的分析。

[0226] 食物和饲养试验响应的统计分析以先验 $\alpha=0.05$ 完成。根据需要,以方差或协方差(Proc Mixed)和事后多重比较的适当的分析完成在各处理之间的性能参数的分析。鱼性能和组织响应的分析通过非线性模型评价。确定初步的物料平衡、能量需求、和成本。

[0227] 监测常规和干法分提HP-DDGS转化方法的输入和输出,并用于建立方法物料平衡。

类似地,测量和/或估算方法的能量需求以计算总能量使用。总之,这些输入用于评价初步成本,将其与传统的和干法分提的HP-DDGS的值比较。

[0228] 本文引用的所有参考文献都通过引用以其全文并入。

[0229] 从上文的讨论,本领域的技术人员能确定本发明的本质特征,且可以对实施方案进行各种变化和修改,以适应各种用途和条件而不偏离其精神和范围。因此,实施方案的各种修改,除了本文所示和描述的那些,从前面的描述将对本领域技术人员是明显的。这些修改也旨在落入所附权利要求书的范围之内。

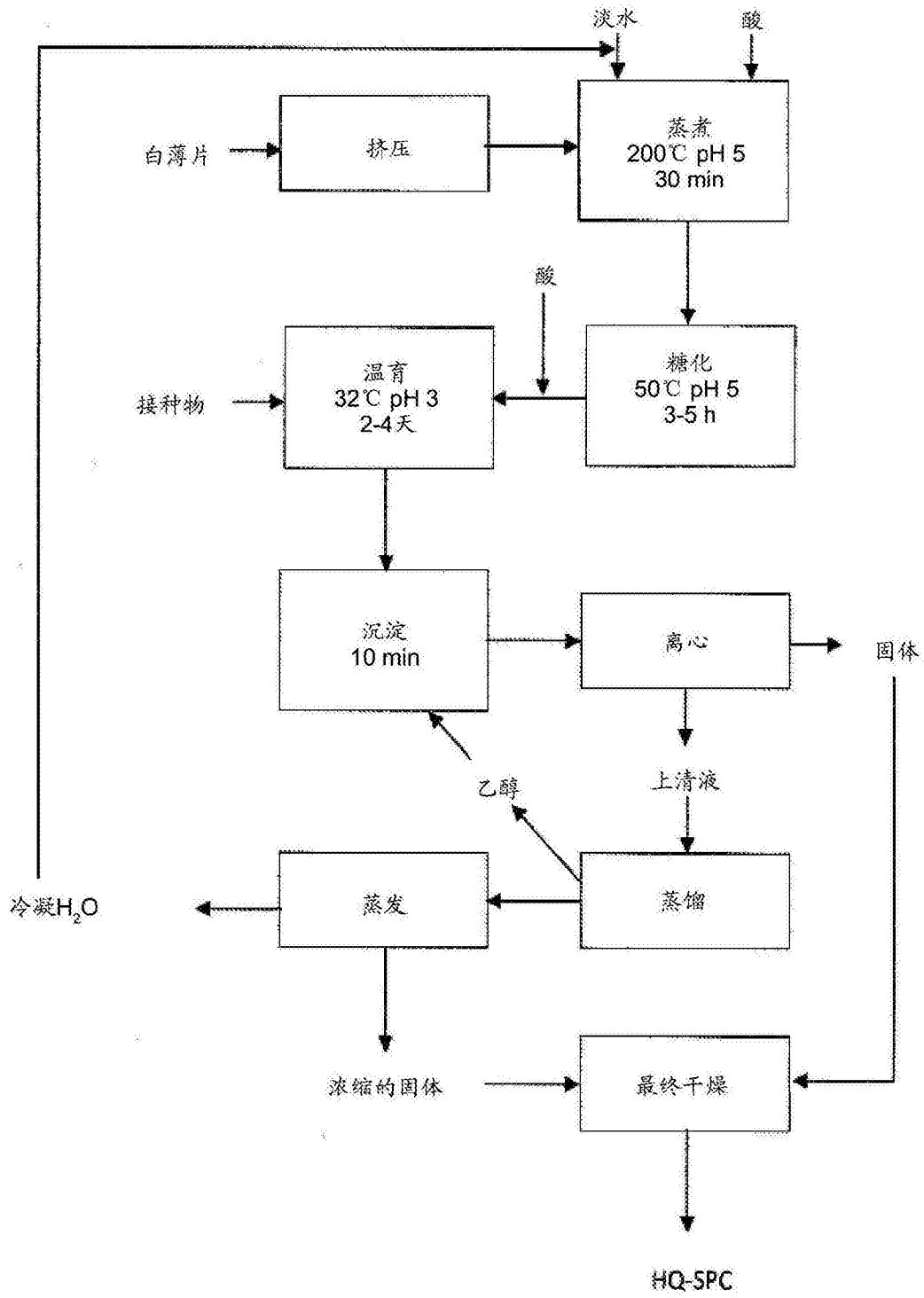


图1

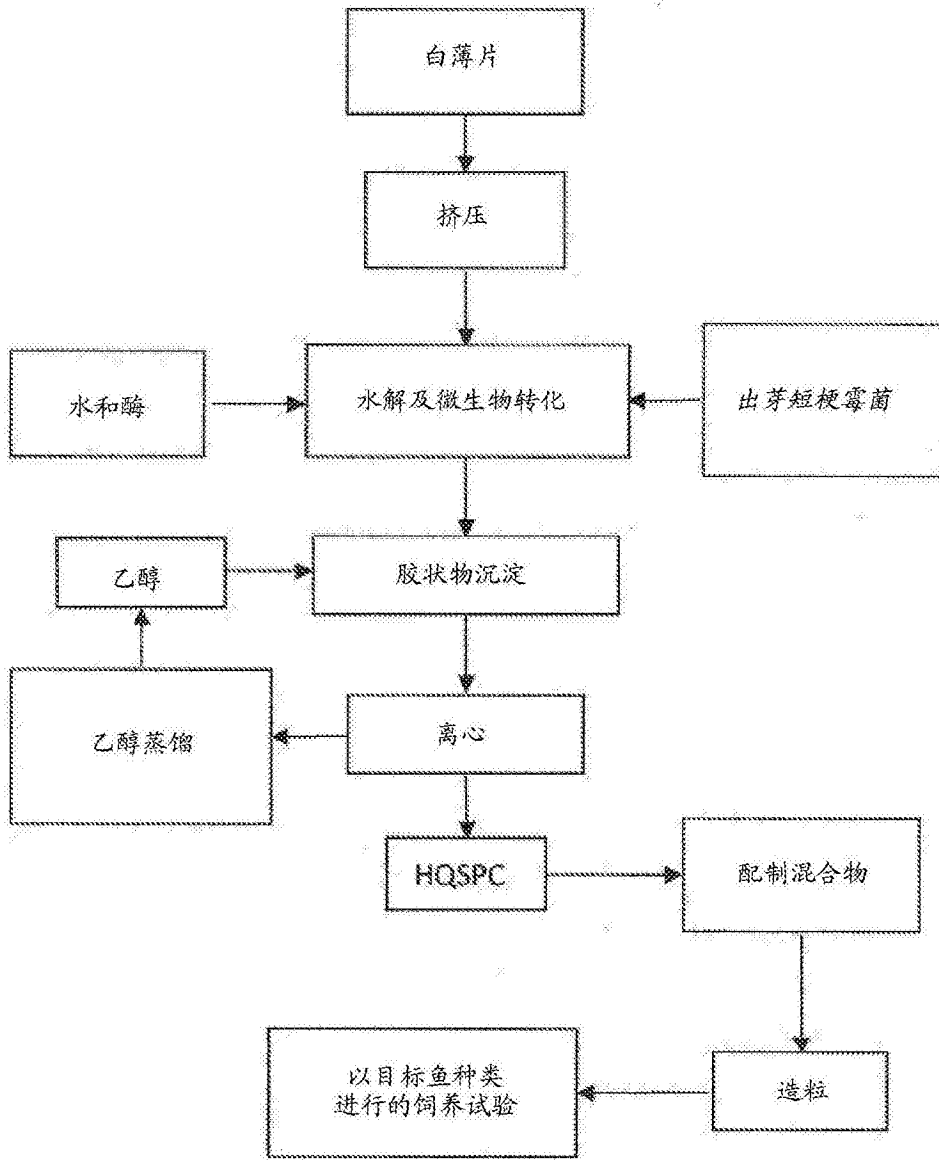


图2

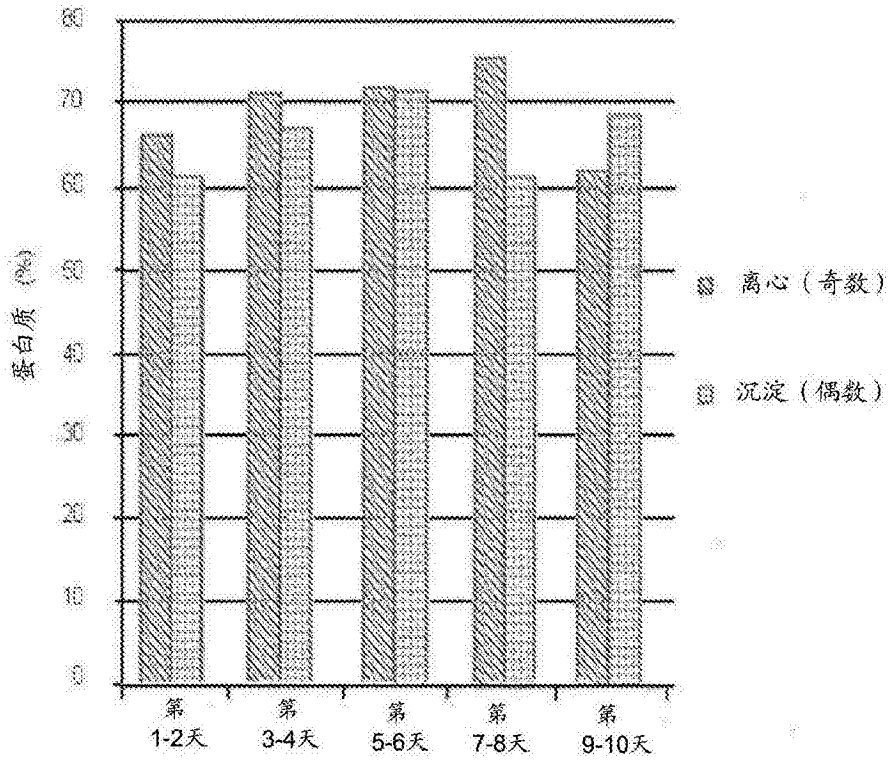


图3

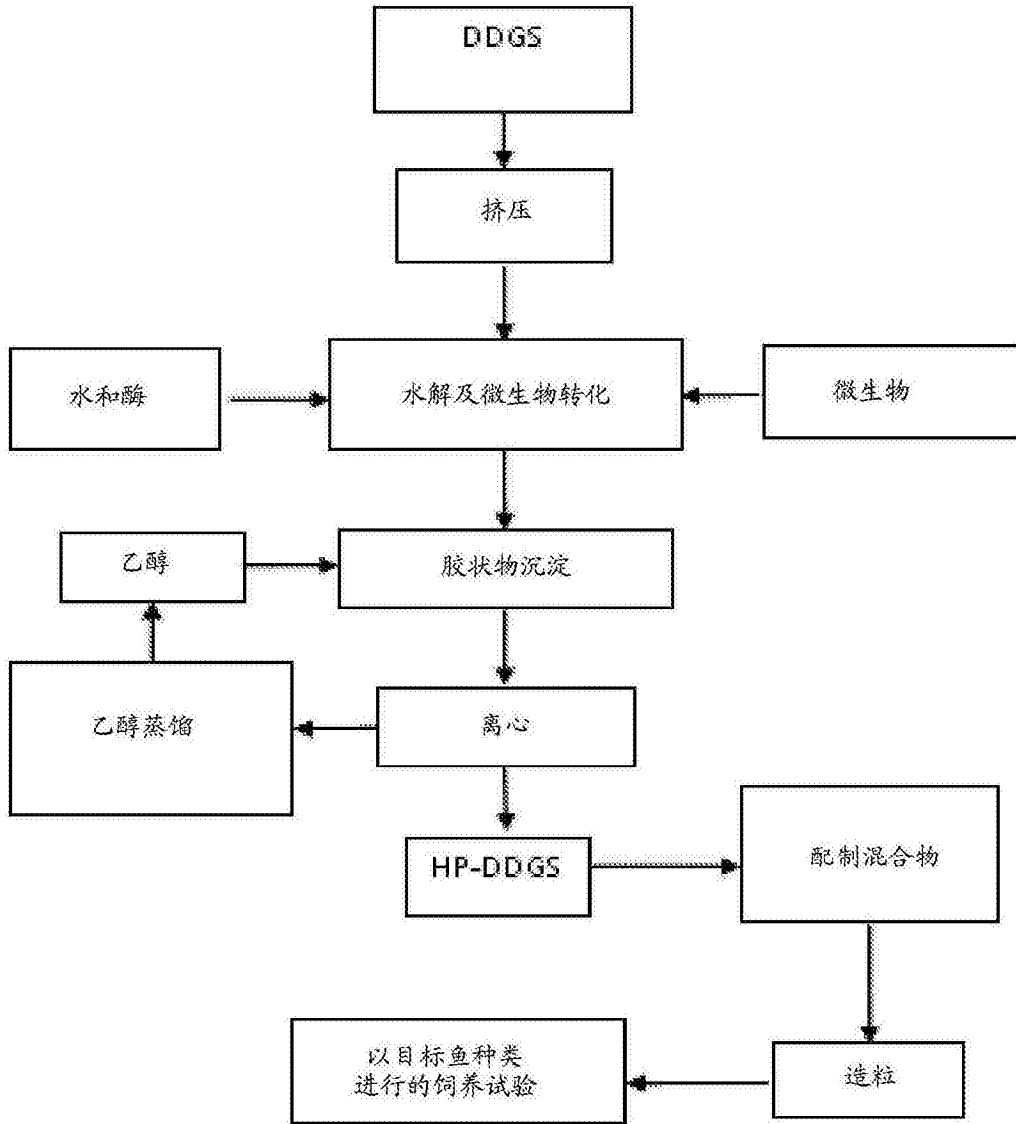


图4

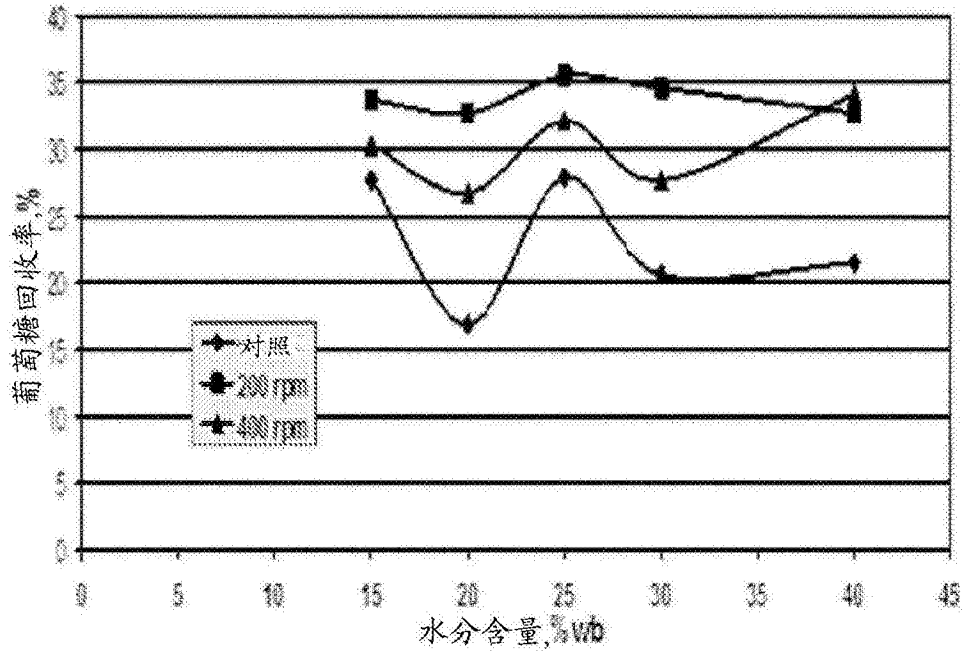


图5