

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁶

C12P 7/64

C12N 1/00 C12N 1/12

C12N 1/14

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 97194210.2

[43]公开日 1999 年 5 月 19 日

[11]公开号 CN 1217029A

[22]申请日 97.3.21 [21]申请号 97194210.2 [30]优先权 [32]96.3.28 [33]EP [31]96200835.5 [32]96.3.28 [33]EP [31]96200837.1 [86]国际申请 PCT/EP97/01448 97.3.21 [87]国际公布 WO97/37032 英 97.10.9 [85]进入国家阶段日期 98.10.29 [71]申请人 吉斯特-布罗卡迪斯股份有限公司 地址 荷兰代尔夫特 [72]发明人 H·L·比尔 J·H·沃尔夫 A·沙普 J·M·J·维瑟	[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事 务所 代理人 李 瑛 权利要求书 4 页 说明书 38 页 附图页数 4 页
--	---

[54]发明名称 从用巴氏法灭菌的生物量中制备含有微生物多不饱和脂肪酸的油的方法

[57]摘要

本发明公开了含有微生物多不饱和脂肪酸(PUFA)的油,这种油具有高的甘油三酯含量,并且具有高的氧化稳定性。此外,本文描述了从微生物生物量(这种微生物生物量来源于用巴氏法灭菌的发酵肉汤)中回收所说的油的方法,其中将所说的微生物生物量压成颗粒,干燥,然后使用合适的溶剂从干燥的颗粒中提取所说的油。

ISSN 1 0 0 8 - 4 2 7 4

权 利 要 求 书

1. 一种微生物油, 这种油含有至少一种多不饱和脂肪酸(PUFA), 其中的甘油三酯含量超过 90 %。

2. 按照权利要求 1 的油, 这种油在 80 ℃ 下的 Rancimat 诱导时间大于等于 5 小时。

3. 按照权利要求 1 或 2 的油, 其中所说的多不饱和脂肪酸是 C18、C20 或 C22 ω -3 或者 C18、C20 或 C22 ω -6 多不饱和脂肪酸。

4. 按照权利要求 1、2 或者 3 的油, 其中所说的 PUFA 是 C20 或 C22 ω -3 或 C20 ω -6 多不饱和脂肪酸。

5. 按照上面权利要求之任一的油, 其中所的 PUFA 是花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)和/或二十二碳六烯酸(DHA)。

6. 按照前面权利要求之任一的油, 其中所说的 PUFA 只是 ARA。

7. 按照前面权利要求之任一的油, 其中所说的 PUFA 是由真菌产生的。

8. 按照前面权利要求之任一的油, 其中所说的真菌是被孢霉属(*Mortierella*)的真菌。

9. 按照权利要求 1-5 之任一的油, 其中所说的 PUFA 是由藻类产生的。

10. 按照权利要求 8 的油, 其中所说的藻类是 *Cryptocodinium* 属的藻类。

11. 一种从微生物生物量中获得含有至少一种多不饱和脂肪酸(PUFA)的油的方法, 这种方法包括:

- a) 提供干物质含量为 25-80% 的生物量;
- b) 使生物量成为颗粒状;
- c) 将颗粒干燥, 以便得到干燥的颗粒; 和
- d) 从干燥的颗粒中提取或分离所说的油。

12. 按照权利要求 11 的方法, 其中所说的颗粒的平均干物质含量为 30-70%。

13. 按照权利要求 12 或者 13 的方法, 其中所说的干燥的颗粒的平均干物质含量为至少 80 %。

14. 按照权利要求 11-13 之任一的方法, 其中使用合适的溶剂提取所说的油。

15. 按照权利要求 11-14 之任一的方法, 这种方法还包括精炼所提取油。

16. 按照权利要求 11-15 之任一的方法, 其中(b)步骤中是通过挤压生物量而进行颗粒化的。

17. 按照权利要求 16 的生物量, 将其中所说的生物量在颗粒化之前粉碎或者捏合。

18. 按照权利要求 11-17 之任一的方法, 其中(a)步骤中所说的生物量是通过将发酵肉汤进行固/液分离而得到的。

19. 按照权利要求 18 的方法, 其中所说的固/液分离与机械脱水结合使用。

20. 按照权利要求 11-19 之任一的方法, 其中(a)步骤中所说的干物质含量为 25-80%的生物量是通过将固体物质加入到所说的生物量中而获得的。

21. 按照权利要求 11-20 之任一的方法, 其中(c)步骤中所说的将颗粒化生物量干燥成干物质含量为至少 80%的过程是通过流化床或者半流化(subfluidized)床干燥而完成的。

22. 按照前面权利要求之任一的方法, 其中所说的生物量包括或者起源于真菌。

23. 按照权利要求 22 的方法, 其中所说的真菌属于毛霉目(*Mucorales*)。

24. 按照权利要求 22 或者 23 的方法, 其中所说的真菌属于被孢霉属。

25. 按照权利要求 22-24 之任一的方法, 其中所说的真菌是高山被孢霉(*Mortierella alpina*)。

26. 按照权利要求 11-21 之任一的方法, 其中所说的生物量包括或者

起源于藻类。

27. 按照权利要求 26 的方法, 其中所说的藻类是甲藻和/或属于 *Cryptocodinium* .

28. 按照权利要求 26 或者 27 的方法, 其中所说的藻类是 *Cryptocodinium cohnii* .

29. 按照权利要求 11-28 之任一的方法, 其中所说的化合物是多不饱和脂肪酸(PUFA), 其可以包含也可以不包含在脂类中。

30. 按照权利要求 29 的方法, 其中所说的多不饱和脂肪酸是 C18、C20 或 C22 ω -3 或者 C18、C20 或 C22 ω -6 多不饱和脂肪酸。

31. 按照权利要求 30 的方法, 其中所说的 PUFA 化合物是 C20 或者 C22 ω -3 或者 C20 ω -6 多不饱和脂肪酸。

32. 按照权利要求 11-31 之任一的方法, 其中所说的 PUFA 是花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)和/或二十二碳六烯酸(DHA)。

33. 按照权利要求 1-10 之任一的微生物油在制备食品或者化妆品组合物或者营养添加剂方面的用途。

34. 按照权利要求 33 的用途, 其中所说的食品组合物包括婴儿食品。

35. 人类或动物的食品或者化妆品组合物或者营养添加剂, 其中包含权利要求 1-10 之任一所限定的油。

36. 按照权利要求 35 的食品组合物, 这种食品是婴儿食品。

37. 一种从微生物生物量中分离一种或多种化合物的方法, 这种方法包括:

a) 在使微生物能够产生所说的化合物的条件下于发酵肉汤中培养所说的微生物;

b) 将发酵肉汤或者从中获得的微生物生物量经巴氏法灭菌; 同时

c) 从所说的微生物生物量中提取、分离或者回收所说的化合物。

38. 按照权利要求 37 的方法, 其中所说的巴氏法灭菌至少能够部分灭活存在于所说的生物量或者肉汤中的一种或多种降解化合物的物质。

39. 按照权利要求 38 的方法, 其中所说的物质是降解蛋白酶或者甘油三酯的酶。

40. 按照权利要求 39 的方法, 其中所说的酶是脂肪酶、磷脂酶、或者脂氧合酶。

41. 按照权利要求 37-40 之任一的方法, 其中所说的巴氏法灭菌包括在 50-100 °C 下加热。

42. 按照权利要求 41 的方法, 其中所说的加热为 65-95 °C 下加热。

43. 按照权利要求 41 或者 42 的方法, 其中所说的加热的时间为 30-90 分钟。

44. 按照权利要求 37-43 之任一的方法, 当其中所说的发酵肉汤仍在发酵容器中时就对其进行巴氏法灭菌。

45. 按照权利要求 37-44 之任一的方法, 其中所说的巴氏法灭菌是在发酵完成后进行的。

46. 按照权利要求 37-45 之任一的方法, 其中所说的化合物包括甘油三酯。

47. 按照权利要求 37-46 之任一的方法, 其中所说的化合物包括至少一种多不饱和脂肪酸(PUFA)。

48. 按照权利要求 37-47 之任一的方法, 其中所说的发酵肉汤在巴氏法灭菌之后要进行脱水和/或过滤以便产生微生物生物量。

49. 按照权利要求 48 的方法, 如果需要将其中所说的微生物生物量进行处理以便使干物质含量达到 25-80%。

50. 按照权利要求 49 的方法, 其中先将所得到的微生物生物量颗粒化, 然后将所得的颗粒干燥。

从用巴氏法灭菌的生物量中制备
含有微生物多不饱和脂肪酸的油的方法

发明所属技术领域

本发明涉及含有多不饱和脂肪酸(PUFA)的油, 特别涉及纯的并稳定的含有至少一种多不饱和脂肪酸的微生物油。可以从经巴氏法灭菌的生物量或者发酵肉汤中获得这种油。

发明背景

对各种食物中使用的含有多不饱和脂肪酸的脂质产品(这种产品来源于发酵过程)的需要不断增加。目前最重要的需要是在婴儿食品中加入多不饱和脂肪酸。

对于发酵生产含有多不饱和脂肪酸的脂质或者油的各种过程已经进行了描述。例如 EP-A-0155420 描述了从被孢霉属中生产含有 γ -亚麻酸(GLA)脂的过程; EP-A-0223960、EP-A-0276541 和 WO-A-92/13086 描述了从被孢霉属和/或腐霉属(*Pythium*)中产生含有花生四烯酸(ARA)油的过程; WO-A-91/07498 和 WO-A-91/11918 描述了从 *Crypthecodinium cohnii* 或者破囊壶菌属(*Thraustochytrium*)中产生含有二十二碳六烯酸(DHA)的油的过程; WO-A-91/14427 描述了从 *Nitzschia* 中产生含有二十碳五烯酸(EPA)的油的过程; US 5539133 描述了从微型硅藻产生 ARA 和 EPA 的过程。

通常, 将能够产生含有所要求的多不饱和脂肪酸的脂类的微生物培养在合适的培养基中, 然后收获生物量, 并将其进行预处理, 以确保接下来能够使用合适的溶剂从所说的微生物生物量中提取脂类。这样提取的脂类为粗提物, 通常需要进行若干步骤的精炼。

通常通过干燥(如喷雾干燥或者冻干)和/或机械粉碎(如匀浆或制粉)来对湿的生物量饼状物进行预处理。为了降低溶剂的使用量并防止出现令人烦恼的乳状液, 需要将生物量进行干燥。如果需要分离氧化敏感和热敏

感的脂类(如含有多不饱和脂肪酸的脂类), 则特别需要小心, 尽量避免使它们暴露在能够刺激其发生氧诱导的降解的不良条件下。然而, 本领域中所使用的生物量预处理的方法不能避免这些不利的条件。

Yamada 等(单细胞油的工业应用, Kyle 和 Ratledge 编辑, 118-138 (1992))描述了由高山被孢霉中纯化的含有花生四烯酸的油, 其甘油三酯含量超过 90%。在回收处理中, 在进行己烷抽提前, 将所收获的生物量干燥并经球磨机粉碎。这一方法也不能最大限度地降低其在不利条件下的暴露。

这样, 按照本领域现有的方法从微生物生物量中分离的含有多不饱和脂肪酸的脂类通常暴露在刺激氧化的条件下, 这些条件对所得的油的质量产生不利的影响。

发明描述

按照本发明的第一个方面, 其提供了包含至少一种多不饱和脂肪酸(PUFA)的微生物油, 这种油的甘油三酯含量超过 90%。与现有的含有 PUFA 的油相比, 已经发现这种油特别稳定。可以通过一种或多种适于发酵过程的微生物来产生这种 PUFA。可以通过各种方法步骤从生物量中回收 PUFA, 所说的生物量实质上是从产生 PUFA 的发酵过程中获得的物质。

由于本发明的油可以是微生物来源的, 所以应该理解这种油不包括合成油。尽管申请人不希望受理论束缚, 但是本申请人相信关于“为什么本发明的油较其以前描述的油具有更高的稳定性”这一问题有很多解释。

这种油可以含有一种或多种存在于所说的生物量中的化合物。而这些化合物中的很多物质都可以作为抗氧化剂。另一方面, 这些化合物中的一种或多种可以灭活(部分灭活或者至少抑制)存在于这种油中的一种或多种氧化(或者原氧化剂)物质。

很多物质能够降解含有 PUFA 的油。这些物质包括可以充当催化剂的金属(如铜、铁和/或锌)。此外, 类似的金属可以充当自由基引发剂。其它降解的因素是光和热。还存在一种或多种物质, 例如可以与一种这样的金属复合的物质, 或者它们可以充当自由基净化剂。

此外,获得本发明的油的方法可以除去本来存在于所说的生物量中的一种或多种氧化或导致氧化的物质。

人们相信当 PUFA 是 ARA 时,降解的程度尤其高,因此油中的物质可以抑制或防止这种 PUFA 的降解。

下文将详细描述获得本发明的油的方法包括颗粒状物质(或者甚至是干燥的颗粒)的形成,这种颗粒状形式可以使颗粒或者颗粒形式内的 PUFA 更少地接触空气,特别使氧气,因此可以减少氧化变化。

在本发明的方法中,固醇含量可以减少,这样固醇(如 5-链甾醇)的最大量为 1.5%重量比。

因此所说的油可以含有一种或多种自由基抑制剂、自由基净化剂和/或抗氧剂。

这样本发明涉及含有微生物多不饱和脂肪酸(PUFA)的油,其甘油三酯含量高(如至少 90%),并且具有高的 Rancimat 诱导时间(如 80 °C 下至少 5 小时)。所说的多不饱和脂肪酸可以是 C18、C20 或 C22 ω -3 和 C18、C20 或 C22 ω -6 多不饱和脂肪酸。优选的是 C20 或 C22 ω -3、或者 C20 ω -6 多不饱和脂肪酸。具体地说 PUFA 是花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳六烯酸(DHA)。这些油的例子是被孢霉属的含有花生四烯酸的油,或者 *Cryptocodinium* 的含有二十二碳六烯酸的油。

本发明的油在用于人类和动物的食品、食物、以及食品组合物或者营养添加剂方面是有利的。此外,本发明的油可以用于化妆品中。粒状微粒或者颗粒可以用作食品或者饲料组合物或者添加剂。

本发明的油含有一种或多种多不饱和脂肪酸,同时甘油三酯含量高。与本领域已经描述的含有微生物多不饱和脂肪酸的油相比,这种油具有更高的氧化稳定性。

优选地本发明的油具有下列特征。甘油三酯的含量超过 90%,优选的是 $\geq 93\%$ 。然而,甘油三酯含量 $\geq 95\%$ 是合适的,甘油三酯的含量也可以 $\geq 97\%$ 。此外,它在 80 °C 下的 Rancimat 诱导时间 ≥ 5 小时,优选地 80 °C 下的诱导时间为 5-16 小时。80 °C 下的诱导时间为 7-16 小时是

更合适的, 80 °C 下诱导时间可以也可以不为 10-16 小时。在 80 °C 下测量 Rancimat 诱导时间, 这是因为此温度更适合于含有多不饱和脂肪酸的油。当在 100 °C 下测量时, 本发明的油的诱导时间为 3-5 小时。

应该注意到本发明的油的 Rancimat 诱导时间是在没有加入外源的稳定化合物(如抗氧化剂)的情况下测量的。很明显, 在油中存在稳定添加剂能够增加它的 Rancimat 诱导时间。稳定添加剂(如抗氧化剂)可以来源于油回收过程中的某个步骤的添加物(例如培养微生物的培养基中的添加物), 或者来源于油本身的添加物。Rancimat 检验包括加热所说的物质, 同时进行充分地吹气。如果此物质氧化, 它的重量就增加, 通常氧化在一段特定的时间后比较迅速地发生。因此, 这一时间可以表明此物质的氧化稳定性。

本发明的油的其它特征可以包括甘油二酯含量较低, 优选地低于 2%; 和/或甘油单酯含量较低, 优选地低于 0.1%。此外, 它的颜色较浅, 无味, 茴香胺值低(茴香胺是用来检验醛类的, 其是氧化降解的产物)。

茴香胺值通常为 0.1-5, 优选的是 0.1-2, 更优选的是 0.1-1。本发明的油的颜色通常是黄至浅黄色。

本发明的微生物油通常以一种特定的多不饱和脂肪酸为主(或者只含有一种), 但它可以还含有少量的其它多不饱和脂肪酸。本发明也涉及其中存在不只一种多不饱和脂肪酸的微生物油。

存在于本发明的微生物油中的多不饱和脂肪酸为 C20 ω -3 和 C18、C20 和 C22 ω -6 多不饱和脂肪酸。具体地说, 它们包括 γ -亚麻酸(GLA)、二高- γ -亚麻酸(DLA)、花生四烯酸(ARA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DKA)。

获得本发明的油的微生物生物量可以含有或者来源于任何种类的能够产生含有 PUFA 的油的微生物, 例如细菌、酵母、真菌或藻类(或它们的混合物)。

例如, 本发明的油可以含有二十二碳六烯酸(DHA), 这种酸优选是从藻类或者真菌中获得的。藻类包括腰鞭毛目(如此属的那些藻类)*Cryptothecodinium*。真菌可以是毛霉目属(如 *thraustochytrium*)的真菌,

如优选从真菌(如被孢霉属、腐霉属或者虫霉属(*Entomophthora*))中获得的 γ -亚麻酸(GLA), di homo - γ -亚麻酸或者花生四烯酸(ARA); 或者优选从藻类(如 *Porphyridium* 或者 *Nitzschia*)中分离出来的含有二十碳五烯酸(EPA)的油。通常从这些有机体中获得油主要含有一种特定的多不饱和脂肪酸。然而, 它们还可以含有少量的其它多不饱和脂肪酸。

本发明涉及从微生物生物量中分离含有所说的多不饱和脂肪酸的本发明第一个方面的油的方法; 在提取油之前可以将所说的微生物生物量进行预处理。由于预处理过程相对温和的条件, 存在于所说的油中的热敏感和氧化敏感的多不饱和脂肪酸可以不暴露在导致降解的条件下。

这样, 按照本发明的第二个方面, 本发明提供了从微生物生物量(包含产生所说的 PUFA 的有机体)中获得含有至少一种多不饱和脂肪酸(PUFA)的油的方法, 所说的方法包括:

- a) 提供或者获得干物质含量为 25-80%的生物量;
- b) 使生物量成为颗粒状;
- c) 将颗粒干燥, 以便得到干燥的颗粒; 和
- d) 从干燥的颗粒中提取或分离所说的油。

优选地, 颗粒状物质的平均干物质含量为 30-70%。从(c)步骤中获得的干燥颗粒的最适平均干物质含量为至少 80%。

在本发明的第三方面, 本发明提供了从微生物生物量中分离一种或多种化合物的方法, 所说的方法包括:

- a) 在使微生物能够产生所说的化合物的条件下于发酵肉汤中培养所说的微生物;
- b) 将发酵肉汤或者从中获得的微生物生物量经巴氏法灭菌; 同时
- c) 从所说的微生物生物量中提取、分离或者回收所说的化合物。

(b)步骤的巴氏法灭菌的目的是至少部分灭活可能存在于生物量或者肉汤中的一种或多种降解物质。这些物质可以包括蛋白质, 如酶(例如蛋白酶)。尤其是, 人们的目的是至少部分地灭活脂酶、磷脂酶和/或脂氧合酶。

所说的化合物优选包括甘油三酯, 如上文提到的 PUFA 中的一种。

发酵的最后步骤是巴氏法灭菌。优选地，所说的巴氏法灭菌在任何颗粒化(粉碎或者捏和)之前进行。将发酵肉汤进行巴氏法灭菌是合适的，尽管也可以将由肉汤获得的微生物生物量进行灭菌。

通过巴氏法灭菌，人们认为至少可以部分避免导致化合物(如 PUFA)降解的物质。这一巴氏法灭菌至少能够提高可以由本发明获得的 PUFA 的质量。

由于巴氏法灭菌不仅能够杀死所说的微生物，更重要的是它能够灭活对化合物有不利影响的一种或多种酶，所以巴氏法灭菌是有利的。例如巴氏法灭菌能够灭活各种脂酶，这些酶能够将脂肪酸从甘油三酯的骨架中切割下来。这对 PUFAs 是不利的，而高含量的甘油三酯是优选的。

在巴氏法灭菌后，但在(c)步骤提取之前，可以如本发明第二个方面(b)和(c)的描述进行颗粒化(以便得到颗粒)并将所说的颗粒干燥。本发明的一个方面的优选特性是对等的可适用性，这对其它方面也是如此。

在本发明的方法中，首先将微生物在使得能够产生所说的多不饱和脂肪酸或者其它将要产生的酸的条件下发酵。这种发酵过程是本领域公知的：用碳和氮源以及其它多种能够使微生物生长和/或产生 PUFA 的添加的化学样品或物质培养所说的微生物。合适的发酵条件如实施例 22 所示。

然后将发酵(通常称为肉汤)所得的物质过滤，或者进行其它处理以便至少除去部分含水的组分。优选地除去大部分水分，以便获得生物量饼。此阶段的生物量干物质含量优选为 25-80%。然后将生物量颗粒化。优选通过挤压完成这一过程。然而，无论选择哪种技术进行颗粒化，尽量防止细胞破碎或使之最小化是优选的。然后将所得的颗粒干燥。这些颗粒可以明显地增加接下来的干燥步骤的效率。所得的(干燥)颗粒特别适合于浸渍和渗滤提取。可以调整颗粒的大小使之成为最佳的干燥和提取添加物。

优先选择的颗粒化条件(如挤压过程的条件)是能够使所说的微生物细胞破碎最小的条件。这样可以提高多不饱和脂肪酸的抗氧化能力，这是因为没有破碎的细胞通常是保护定位于细胞内的多不饱和脂肪酸防止其氧化降解的最好形式。

优选地，使用溶剂从干燥的颗粒中提取 PUFA。任何本领域技术人员公知的合适的溶剂都可以使用。然而，使用非极性溶剂是合适的，例如 C₁₋₆ 烷(如己烷)。在超级临界态下使用溶剂也是可能的，例如液态二氧化碳。

本发明的方法可以降低成本并能够有效地提取 PUFA 油，同时可以提供特别高质量的油。例如，干燥的粒状(生物量)允许人们使用特别有效的渗滤提取方法。此外，颗粒使得可以使用相对较低的温度进行提取，而不会降低 PUFA 的产率。此外，干燥的颗粒要求降低提取过程中的溶剂使用量。另外的好处是能够使使用过的溶剂更有效地从生物量中释放出来(此过程通常称为溶剂的释放过程)。

(溶剂)提取后所得的残渣(和甚至溶剂释放后所得的残渣)可以用于饲料或饲料组分(如用于动物的饲料)。

已经提取的 PUFA(油)可以直接使用，而不需要进一步的加工；或者经过一个或几个进一步精炼步骤。由于从干燥的颗粒中提取的 PUFA 油质量很高，所以接下来任何必需的精炼步骤不仅容易，而且可以从简。可以使用标准技术对油进行精炼。例如，将油脱胶、脱酸、漂白和/或除臭。含有 PUFA 的本发明的油的甘油三酯含量可以很高和/或具有较高的氧化稳定性。其特别适合于营养目的。因此，可以将其加入到食品中(食品成品或者在食品的制备过程中加入)。其也可以作为营养添加剂，例如，将其在合适的荚膜中制成胶囊剂(例如胶囊)。因此 PUFA 油可以用于人或者动物的食品组合物中。例如牛奶、保健饮料和面包。本发明的油特别合适用于婴儿食品中。此外，所说的油也可以用于化妆品中。

因此，本发明的第三方面涉及一种包含本发明第一个方面的微生物油的组合物。这种组合物可以是人和/或动物的食品或者饲料或者营养添加剂。如果是食品组合物，优选的是婴儿食品。此外，其可以是化妆品组合物。

使用生物量的干燥颗粒，可以获得较期望分离的化合物更高产量的化合物。这是因为颗粒状结构可以使所用的溶剂最大限度地提取。当然，如果颗粒太大，表面积将更低，导致相应的产量降低。然而，颗粒不

能太小，否则将阻塞提取过程中使用的滤膜。为此，本发明的方法不包括碾磨、剥成薄片或者粉碎步骤或者阶段。

各阶段的含水量也影响产量。干物质含量过高，粉碎的生物量将形成细或者尘埃，如果使用过滤提取法，这是不利的。然而，含水量太高，得到的将是泥浆，其太湿不能成为颗粒。

将材料颗粒化的方法是本领域公知的。然而，在某些阶段它们经常与碾磨和剥成薄片结合使用，这两种方法具有如上所述的缺点。在本发明中，使用的是干燥的颗粒进行化合物提取，而不是碾磨或者剥成薄片的形式。此外，通过颗粒化，可以最大限度地减少对生物量中的细胞的破坏。US 5,340,594 公开了生物量的挤压方法，但是本文的挤压形式用于动物饲料：没有证据表明从那种颗粒形式中提取特定的化合物能够提高产量。

通过将生物量加工成颗粒，有助于颗粒的干燥。生物量在加工成颗粒形式后，干燥可以相当容易而且更有效地进行。

此外，已经发现干燥的颗粒特别稳定，尤其在环境或者室温下。这种生物量可以以这种形式贮存相当长的一段时间而不降解。尽管不希望受理论约束，但一般推测这是因为所说的化合物位于颗粒的内部，因此至少部分地免受环境(对于某些化合物，环境可以导致化合物因氧化而降解)的影响。

已经发现干燥的颗粒是特别稳定的生物量形式。例如在室温下，它们可以贮存若干周(如果不是几年)，降解很少，或者没有降解或者性质变化很少。这就意味其含有的化合物也可以稳定地贮存(或者甚至运输)。此外，它可以在室温下贮存，这就不需要冷冻或者在特别低的温度下贮存，而现有的生物量物质需要在冷冻或者特别低的温度下贮存。很明显，这种稳定性是有利的，这是因为贮存费用相当低。

使生物量颗粒化优选的方法是挤压。这可以使细胞的破坏最小化。已经发现生物量的稳定性有助于最大限度地降低细胞的破碎，换句话说应用本发明的方法可以优化仍然保持完整的细胞的数目。这一点与许多现有的提取方法不同，它们是破碎细胞以便分离所说的化合物。

本发明也涉及从生物量的颗粒中分离一种或多种 PUFA 的方法，所

说的方法包括:

a) 提供干物质含量至少为 80% 的颗粒, 这种颗粒来源于含有微生物的微生物生物量, 所说的微生物能够产生 PUFA; 和

b) 通过溶剂提取法从干燥的颗粒中提取或分离所说的 PUFA 或者每种 PUFA。

优选的提取方法是使用溶剂, 相应地所说的化合物在这种溶剂中是可溶的。优选的提取方法是使用渗滤: 本发明中使溶剂通过颗粒床。在这一技术中, 应该确保所用的颗粒不能太小(例如不应该碾磨或粉碎), 否则得到的将是太多的“粉末”(或者细沫), 它们将阻塞滤膜。也应该避免太大的颗粒, 但是在这两种极限之间, 技术人员可以获得最佳的表面积, 因此优选的颗粒是大于滤膜孔的颗粒。优选地, 所说的颗粒是高度多孔的, 以便使所说的溶剂很容易地接触到将要提取的化合物。

对微生物生物量饼进行预处理, 以便使之形成粒状的微粒将明显改善后来的干燥的过程。所得的干燥粒状的生物量特别适合于浸渍或者渗滤提取。可以将颗粒的大小进行特别的调整以便适应最佳的干燥和提取条件。通过使用按照本发明的预处理的生物量, 对于提取所需要的化合物是有利的, 这样不需要在提取前破碎细胞。

可以使用本发明的过程从几乎任何类型的微生物制备粒状的微粒或者干燥的颗粒。所说的微生物可以是丝状形式(如真菌或者特定的细菌)或者单细胞(如酵母、藻类和细菌)。这样, 这些生物量可以是酵母、真菌、细菌或者藻类的微生物。优选的真菌是毛霉目的真菌。例如, 所说的真菌可以是被孢霉属、须霉属(*Phycomyces*)、布拉霉氏属(*Blakeslea*)或者曲霉属的真菌。优选的真菌是高山被孢霉、三孢布拉氏霉(*Blakeslea trispora*)和土曲霉(*Aspergillus terreus*)的真菌。

就酵母而言, 毕赤酵母属(*Pichia*)的真菌是优选的, 如 *Pichia ciferrii* 种的真菌。

细菌可以是丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)的细菌。

如果生物量中含有藻类, 优选的是腰鞭毛目和/或 *Cryptocodinium* 属的藻类。优选的藻类是 *Cryptocodinium cohnii* 种的藻类。

从按照本发明制备的微生物生物量中的化合物可以位于细胞内，与细胞膜或者细胞壁结合，或者在胞外产生所说的化合物(这种情况下，其在水中可能不溶)。

将要分离的化合物可以是亲水的或者疏水的(如亲脂)。这些化合物的例子是胞内蛋白质或者酶、脂类、如维生素类的次生代谢物(如维生素B₁₂)、大环内酯或者多烯抗菌素、有香味的物质或者类胡萝卜素。优选地，从微生物生物量中将要分离的化合物是亲脂化合物。

从按照本发明所处理的生物量中提取的化合物，由于处理过程所使用的温和条件对化合物的损害极小(如果有的话)，所以化合物的质量很高。因此，本发明特别适合于制备将要从中分离热和/或氧化敏感的化合物的微生物生物量。

本发明的第二个方面适合于制备用来分离高度不饱和化合物(如含有多不饱和脂肪酸(PUFA)的脂类)的微生物生物量。优选的 PUFA 是 C18、C20 或 C22 ω -3 或 ω -6 的多不饱和脂肪酸。例如，所说的化合物可以是二十二碳六烯酸 (DHA)(来源于藻类或者真菌，如腰鞭毛目 *Cryptocodinium* 或者真菌破囊壶菌属); γ -亚麻酸(GLA)、二高- γ -亚麻酸或者花生四烯酸(ARA)(来源于真菌，如被孢霉属、腐霉属或者虫霉属); 或者二十碳五烯酸(EPA)(来源于藻类，如 *Porphyridium* 或者 *Nitzschia*)。可以以其本来的状态分离这些 PUFA 中的任何一种，更常见地是以液体形式分离它们。

按照本发明(本发明的第四方面)可以分离的化合物的其它例子包括：例如从真菌属分离的 β -胡萝卜素(如霉菌目的须霉属或者布拉霉氏属); 从酵母 *Phaffia rhodozyma* 分离的变胞藻黄素; 从酵母 *Pichia ciferrii* 分离的四乙酰植物鞘氨醇(TAPS)和/或从丙酸细菌中分离的维生素 B₁₂。

可以提取的其它化合物包括亲脂性的/非极性的化合物，如 lovastatin、环孢菌素和莱特洛霉素。在这些化合物中，头两个或者可以在细胞外产生，或者在靠近细胞壁的部位产生。因此，合适的溶剂包括庚烷、己烷、丙酮、甲醇和甲苯和乙醇。然而，对于后两个化合物，可以异丙醇或者丁基乙酸盐提取环孢菌素以及使用乙醇或者甲醇提取莱特洛霉

素。一般来说，已烷适合于可溶性的抗生素，如由链霉菌属有机体产生的抗生素。

其它的化合物包括聚酮化合物或者聚酮化合物的代谢物衍生，其中包括许多抗生素。优选的聚酮化合物是那些不含有氮的化合物，并且应该是芳香族的化合物，优选地含有至少 6 个成员的环。优选的聚酮化合物是抑制素，这包括 lovastatin, simvastatin, pravastatin 和 compactin。其它优选的化合物是 HMG-辅酶 A 还原酶抑制剂。这些化合物可以降低血液中的胆固醇水平。

可以提取的另一类化合物包括类固醇和甾醇(如麦角固醇)。这些化合物可以由酵母和霉菌产生。

按照本发明的过程所分离的化合物适合用于人或者动物食品(如婴儿食品)或者其它可食用的组合物中，并且可以用在化妆品，保健品组合物或者补品或者药物组合物中。

在本发明的方法中，可以将选择的微生物首先发酵以便获得足够的生物量来用于接下来的化合物的提取。发酵条件将取决于所用的有机体，并且使得在所得的生物量中优选获得高含量的化合物。

在发酵过程完成后，发酵肉汤，根据将要提取的化合物的类型，将所得的发酵肉汤进行巴氏灭菌以便杀死生产有机体，并且灭活任何不受欢迎的酶。如果需要，可以向肉汤中加入絮凝剂和/或其它加工助剂，以便提高肉汤的可过滤性。

合适的絮凝剂包括 CaCl_2 、 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ 和极性阳离子酰胺。这些物质的加入量为 0.1-2% 重量比。

优选地将生物量(或者肉汤)进行巴氏法灭菌。发酵后，巴氏法灭菌对于获得能够以卫生的方式进行加工的浆液是必需的。在发酵罐中对生物量进行巴氏法灭菌可以有几个优点。首先，生产有机体不会暴露在环境中。另外，可以将影响靶化合物质量的不需要的酶促活性灭活。

根据生产有机体的物种，可以在 60-100 °C 的温度下进行巴氏法灭菌。可以通过蒸汽直接加热发酵罐来进行巴氏法灭菌，也可以通过间接的加热方法，使用介质经换热器或者通过墙壁或者线圈加热，或者经外部换

热器或者其它合适的换热器来进行加热。

可以使用下列的优选的巴氏法灭菌条件，特别是对于被孢霉属的有机体来说。

将发酵肉汤(或者生物量)进行巴氏灭菌以便杀死所说的微生物并且灭活酶活性。这大约在主要发酵罐接种后的 144 小时进行。在 50-95 °C 下对生物量(或者肉汤)进行合适的巴氏杀菌，优选的是 60-75 °C，最优选的是 63-68 °C。灭菌时间为 30-90 分钟，优选的是 50-75 分钟，最优选的是 55-65 分钟。可以使用任何合适的加热方式，但是优选的是直接蒸汽注射，例如将蒸汽直接注射到主要发酵容器中。

巴氏法灭菌后，使肉汤凉下来或者冷却。这一过程大约为 4 小时，大约冷却到 25 °C 是合适的。

如果涉及来源于不同的生物量或者发酵肉汤的两个或者更多的有机体，可以将每一种生物量(或者肉汤)分别进行巴氏法灭菌，或者在混合后，将它们一起进行巴氏法灭菌。然而，前者是优选的，这是因为然后可以使用不同的巴氏法灭菌条件对不同的有机体进行巴氏法灭菌。

通常，在进行发酵的发酵罐中进行巴氏法灭菌。然而，对于一些有机体(如细菌)来说，通常首先从容器中除去微生物，然后再进行巴氏法灭菌(例如在聚成粒状过程的喷雾干燥之前)是优选的。

如我们所理解的，巴氏法灭菌通常将杀害大多数(如果不是全部)微生物。因此，在干燥的颗粒中，至少 95%，(如果不是 95%，则至少为 98%)的微生物已经被杀死(即它们已经比再活着)。

对于一些有机体(如毕赤酵母属)优选地使用非巴氏法灭菌。

为了防止经巴氏法灭菌的生物量在接下来的加工步骤的再污染，可以设计条件以减少微生物生长的危险。一种可能性是使用合适的酸将肉汤酸化。为了防止限度微生物物种的过量生长，3-4 的 pH 范围结合较低的加工温度是足够的。

其它的生物稳定(biostatic)剂，如乙醇、吸着物等等也可用于此目的。

对于热稳定产品的加工，可以在更高的温度(60 -100 °C)下进行。

优选的酸化条件(如用于被孢霉属的有机体)如下。

将经巴氏法灭菌的肉汤的 pH 调节到 2-5 以便改进微生物的稳定性, 优选的 pH 为 3-4, 最优选的 pH 为 3.5。

肉汤的酸化(在巴氏法灭菌之前或之后)还有其它好处。如果化合物是聚化合物酮(例如抑制素), 那么酸化作用可以导致化合物沉淀。对于许多化合物(特别是水溶性的化合物)来说, 在进一步加工之前, 沉淀是合适的, 当过滤肉汤除去水时只损失极少的化合物。因此, 在巴氏法灭菌之前或之后, 可以将化合物沉淀(例如通过酸化方法, 尽管本领域技术人员熟知的任何其它方法都可以使用)。

可以通过合适的方法调节 pH, 如 85%的磷酸, 优选地使用稀释的 55%的磷酸和最优选地使用稀释的 33%的磷酸。

在此阶段可以得到将巴氏法灭菌的肉汤。下阶段, 通过将微生物与其周围的培养基分开将得到生物量。

可以使用固-液分离技术来将生物量与发酵肉汤分开。根据微生物的种类, 通常这种(收获的)生物量的干物质含量为 20-35%。然而, 为了便于挤压(和接下来的干燥), 通常这种生物量的干物质含量应该为 25-80%。

如果生物量的含水量太高(例如对于挤压和/或尔后的干燥来说), 可以将它脱水和/或增加它的干物质含量。可以通过很多方法来完成这一过程。首先, 可以将生物量进行(额外的)脱水。可以使用技术人员已知的任何脱水方法; 期望得到的干物质含量为 25 或 30-80%。

优选使用机械脱水方法。然而, 机械脱水所能够达到的最大干物质含量随微生物类型而变化。对于某些微生物(例如酵母), 在机械脱水后生物量的干物质含量不会超过 35-40%的水平, 而同是这一过程, 在某些富含脂类的微生物的生物量中使用, 干物质含量可高达 45-60%。

更为理想的方法是使用膜滤器压榨(带有压榨膜的干版和支架滤器压榨), 这种方法可以结合带有机械脱水装置的固-液分离方法, 并且特别适合于获得所需要的干物质含量。

此外, 可以通过加入增稠(或者干燥)剂来增加所需要的微生物生物量的干物质含量。这些增稠剂最好是干燥的, 优选地对化合物的提取过程和

/或化合物的性质没有副影响。例如，增稠剂可以包括淀粉和/或植物纤维(如燕麦或者小麦的糠或者纤维素)。甚至可以使用另一种生物量(含水量更低的生物量)。所说的物质可以以任何方式加入，只要其能够改进挤压性。

有时，例如在固-液分离和/或机械脱水之后，所说的生物量可以形成很大的饼状物。这可能不适合于粒状化(例如挤压)。为了将生物量的大小降至能够进行颗粒化的程度(例如压出机的有效输送)，将生物量粉碎、捏制和/或混合是合适的。可以通过在高剪切混合器中进行(短时间的)处理来完成这一和/或捏制的过程。在此过程中，可以加入也可以不加入所说的或其它的增加稠度的试剂。

接下来将所得的(经粉碎或者捏制，也可以不经过这一过程)生物量进行颗粒化，以便形成颗粒状的微粒。可以通过很多种方法进行颗粒化。

另一种较低含水量(或者增加干物质含量)的方法是使用盐(例如盐水)洗涤所说的生物量或者(也是优选的)在所说的生物量与肉汤分开后进行洗涤，例如使用洗涤过滤方法。

在本发明优选的实施方案中，通过挤压过程获得所需要的微粒结构和大小。为了优化干燥和/或提取过程，颗粒的特性(如结构和大小)是重要的。在干燥步骤中，如果微粒太小，可能出现的问题是产生尘埃和细沫，而太大的微粒则不能流动并且干燥表现差。在提取过程中，颗粒太小则无法使用渗滤过程，这是因为生物量床的压力将太高。太多的细沫可能使接下来的纯化步骤出现问题。颗粒太大将妨碍提取过程中溶剂有效地渗入。此外，微粒结构应该是充分紧凑的，以便在干燥和提取期间防止破碎，但是微粒(干燥的颗粒)优选具有一定的孔隙度，以便在提取过程中使溶剂有效地渗入。

技术人员可以调整挤压条件，以便获得所需要结构和大小的生物量颗粒。

可以调整挤压条件以便使细胞破裂最大限度地减少。最小限度的细胞破裂可以确保易变的，氧化敏感的化合物得到最佳的保护，使之免受氧化诱导的降解。因此，优选地挤压在较低的温度下进行，没有任何的加热手段。优选的温度范围为 20-30 °C，如大约在室温下。在挤压过程中，颗粒

可能自然形成,“被挤压的物质”因其本身的重量,在重力的影响下从模板上落下。然而,如果生物量是天然的,那么经模板挤压后形成长条(如意大利面条)状,然后将类似意大利面条的东西切割成所需要东西的颗粒。

已经发现生物量的温度影响在挤压过程中产生的颗粒的性质。优选地,生物量的温度在挤压前为 6-15 ℃。然而,压出机中生物量的温度可能升高至 10-60 ℃,尽管优选的温度为 15-30 ℃。温度的上升取决于对生物量施加的压力和它的干物质含量。

在挤压过程中,通常通过向着模板的桶(经常是通过螺丝连接的)来给生物量施加压力。对桶不进行加热是优选地。事实上,当桶为冷的时是有利的。冷却剂(例如含水溶液,如水)的温度为 1-4 ℃是合适的,如大约为 2 ℃。

一般地说,挤压不能改变含水量。这就是为什么阶段(b)的干物质含量与阶段(a)的干物质含量相同。然而,正象我们理解的那样,其它颗粒化技术(如下文描述的技术)的确能够改变含水量,即可以减少含水量(换句话说增加了干物质的含量)。对于含有真菌(例如毛霉目的真菌,特别是产生 PUFA 的真菌)的生物量,步骤(a)中的干物质含量(其通常与挤压颗粒化过程中产生的颗粒的干物质含量相同)为 35 -60%是合适的,优选地为 50-60%。干燥后,干燥颗粒的干物质含量优选地为至少 90%,例如至少 95%。

优选的颗粒化技术是使用压出机。综合来看,性能良好的压出机是 W. Pietsch 生产的(“通过团聚增加大小”: Wiley 和 Sons 1991, 385 页)。所说的机器可以是间歇式或者连续式的压出机。对于连续式的压出机,有已经提到的简单单一螺杆压出机(两轴径向运输)。此外,还有双螺杆的压出机,为共计算器或者计算器旋转。运输将要挤压的生物量,它们经穿孔的模板部分地被压紧密并压缩。另一组压出机包括球团机。圆柱状的压缩工具压过置于穿孔板上的材料层。

如果通过挤压的方式获得生物量,那么需要可挤压形式的生物量。根据生物量的状况、所使用的微生物和挤压条件,如果需要,可以调节生物

量的含水量。可以通过加入固体(例如淀粉)来除去水分或者增加干物质含量。可以通过这种方式调节生物量的稠度,通常相当于糊状物的稠度。

虽然可以将所说的颗粒用于所说化合物的提取,此外,这些颗粒的确代表可以贮存的生物量的稳定形式。这些颗粒可能的其它用途:例如,它们可以用于制备婴儿食品,其中所说的生物量含有一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFAs)。

本发明也涉及了其它能够形成(颗粒状)微粒的颗粒化方法。例如,多级干燥过程可以包括喷雾干燥和流化床的结合使用,这种方法也可以产生颗粒状的微粒。

也可以使用其它类型的颗粒化技术。通常的颗粒化是在颗粒状的形式上通过增加大小或者减少大小获得固体的行为。一般来说,使用增加大小的方式。综合来看,现有的较好的颗粒化过程类型如 W. Pietsch("通过团聚方式增加大小"(Wiley 和 Sons,1991,参见上文))描述的类型。在该文中可以得到许多种不同的颗粒化技术,其中包括几种下文将描述的团聚方法。团聚使小微粒彼此吸附在一起(团聚),结果形成较大的微粒(此时为颗粒状的微粒)。因此,如果第一种技术形成的微粒太小,然后可以使用团聚技术来得到较大的(颗粒状)微粒。

通常使用滚动和/或旋转卷筒或者带有吸附特性粉末(以便使微粒粘结在一起)的锥形物干燥器来进行滚动团聚。有些情况下,可以将额外加入的粘合剂。通过这一机理,可以形成了圆形微粒。

通常压力团聚方法的特征在于将很大的力量作用在大量的颗粒状物质上。一般来说,使用细沫或者“塑料”(非弹性)物质来完成这一过程。通常这一过程用于磨碎的物质上(然而,通常它也用于干燥的酵母生产上,以便产生具有一定稠度的生面团)。将成形的微粒干燥,以便使干物质含量最适于贮存。可以通过活塞、滚筒、均衡的和/或压出机压力来完成压力团聚。上文提到的 Pietsch 书对这一类型的装置作了很好的描述。

挤压压力通常使用壁面摩擦,通过孔或开放末端的模产生对塑料材料流的抗性。特别是在螺杆压出机上进行充分地混合,并使用很强的剪切力。

一般来说，具有低熔解或者增塑温度的材料可以直接进行团聚。

其它的团聚技术也是可能的。例如，与流化床团聚器结合使用的喷雾干燥方法。首先，可以将生物量经喷口雾化或者使用喷雾干燥器的旋转轮子来干燥。回收细微粒，再加入到喷雾部分。将得到的粘性粉末在流化床中进一步团聚。在某些情况下，将粉末润湿可以改进团聚过程。所描述技术被称为多步干燥。

为了更详细地描述多步干燥过程，首先将生物量进行喷雾干燥。这样可以得到细粉。喷雾干燥的温度通常为 160-260 °C 和/或空气出口温度为 75-90 °C。在本发明中，通过快速旋转盘或能够产生细微粒的喷口使所说的生物量喷雾。然后在重力作用下使微粒落向喷雾干燥塔的底部。我们能够提供可以使用热空气进行干燥(90-95 °C 是合适的)的流化床。这样能够发生团聚，并且微粒可以粘着在一起。然后，将团聚的(颗粒状的)微粒进行干燥，例如在带状干燥床或者半流化床上进行干燥。在开始加工前，生物量的干物质含量可能低于 30%。在喷雾干燥后，干物质的含量可能增加至 75-90%，在团聚后，干物质的含量可能增加至 90-95%。在干燥后，干物质的含量可以增加至至少 95%。

另一种技术是使用流化床团聚器。使粉末在气流中流动。在微粒床上，气流可以和水一起喷射，其中水可以湿润粉末并能够改进团聚作用。

一般来说，所描述的团聚过程是用于能够被塑化的干燥的粉末。此外还有在多步干燥器上的干燥。在干燥剂后，喷雾干燥结合使用流化床的干燥方法适合于多种不同类型生物量的团聚。然而，这种过程并不总是适合于容易热分解的产品或对(热)空气的氧化敏感的产品。产生颗粒状的干燥生物量的好方法是挤压经机械脱水的膜饼，之后进行合适的干燥(如流化床或者半流化床干燥)。

另一种团聚(干燥的)生物量的方法是使喷雾干燥的产品重新湿润，然后进行挤压，再干燥(如在流化床干燥器上进行干燥)。具有低熔点或低增塑温度的粉末(或者某些含有大量细胞内油的干燥的生物量，其由于压出机的压力而部分溶化)可以进行挤压。在模板上形成合适的小球。

如上所述，可以将(挤压或者其它方式获得的)颗粒状生物量进行干

燥，其中在使得这些微粒能够保持完整的条件下进行干燥是合适的。在颗粒化过程后形成的生物量的微粒结构和大小应该能够使生物量的干燥更有效。可以使用各种干燥器进行干燥，如带状干燥器、真空或者真空带状干燥器、流体或半流化床干燥器。技术人员有能力选择间歇式或者连续的过程。

在本发明的过程中特别优选使用流体或半流化床干燥器。可以在空气或者氮气中进行干燥。使用流体和半流化床干燥方法，床内的温度可以调整到预定值。这些预定值的范围很广，例如 50-120 °C (如 50-90 °C)，或者为 60-80 °C。如果需要从生物量中分离易变的化合物，可以将干燥过程中的温度很容易地调整到较低的范围，以防止其氧化或降解。

此外可以使用真空干燥过程，例如时间为 1-2 小时。

干燥有以下几个方面的好处。首先，生物量微粒的干燥(形成颗粒)能够形成可以稳定贮存一段相当长时间的中间材料。所说的生物量的(相对)较高干物质含量可以防止从其中将要提取的化合物的降解。从这一点来说，可以将干燥的颗粒认为是存在于所说的生物量中或者与生物量结合存在的化合物的稳定形式。

例如，这些颗粒可以作为酶的载体，因此在挤压前通过将适量的交联剂(如戊二醛)混合在所说的生物量中，可以使这些酶稳定地存在于颗粒中。

此外，按照本发明制备的干燥的颗粒的好处是可以直接用作，例如食品或者饲料组合物或者添加剂。

所说的微粒和/或颗粒(例如通过挤压产生的)具有下列性质。

所说的颗粒具有巧克力糖果的性状。挤压的颗粒的直径为 0.1-12 mm，如 0.3-10 mm。更理想的是 1.5mm-6mm 和最理想的(对于干燥后的提取)直径为 2-3 mm。颗粒的长度可以是直径的大约 2-5 或者 6 倍。然后可以很容易地包装它们，并用在市售的提取器上(确保床的通透性)。通常大部分(如果不是实质上的全部)颗粒具有相同的大小，确实，技术人员可以获得高度一致或者均一的颗粒，其中全部颗粒的至少 80%(如 90%) 在限定的范围内具有特定的性质。

第二方面的组合物(颗粒)优选是不能流动的。在形状上它们大约为圆柱形。可以使用挤压来得到这种形状。这些微粒的直径与用于挤压的模板的孔大致相同(尽管可能略大)。在这一过程中,微粒可以在流出模板时自动形成。在这种情况下,微粒的长度是可变的。然而,如果技术人员使用剪切手段,例如刀(如紧挨模板的一个或多个旋转刀片),微粒的长度将受到影响,大部分微粒(不是全部)将实质上具有相同的长度。这些微粒优选的长度是至少 2mm, 如至少 3mm。颗粒的大小和含水量应该使它们容易“清倒”, 容易贮存和运输。一般地说, 尽管大多数微粒实质上是细长的, 但有些近乎球形。颗粒优选的脂类含量为重量比 30-50%。

颗粒的堆密度通常为 $400-1100 \text{ kg/m}^3$ 。

如上所讨论的, 理想的颗粒是多孔的, 以便使溶剂很容易地渗入到将要提取的化合物中。优选地, 所说的颗粒具有空的通道, 这些通道朝向并达到颗粒的中心。通道的数目应该使颗粒体积的 40-60%(如 45-55%, 优选的是 50%)是空的。就通道而言, 它们的长度可以为它们平均直径的 10-20 倍。一般地说, 这些颗粒在组成上是同质的, 这是因为颗粒的外部实质上与中心的材料相同。这一点与现有的酵母组合物不同, 这种酵母组合物的外部比较坚固, 但中心比较空。

这些颗粒可以稳定地贮存在最终将要提取的化合物适于的温度。

干燥颗粒优选的干物质含量为超过 80%, 更优选地至少 85 %, 最优选地至少 90%, 最理想的温度范围为 $93-97^\circ\text{C}$ 。可以使用与水可混溶的溶剂提取干物质含量较低的颗粒。

通常(干燥的)颗粒是多孔的, 以便在提取过程中使用的溶剂可以很容易地加进入到颗粒的内部。这样, 在挤压和干燥期间, 可以将尘埃的量降至最小(这样可以增加产率), 同时可以避免在提取物蒸发前, 对(溶剂)提取物进行额外的过滤。

颗粒的孔隙率取决于颗粒状微粒的(水或者)干物质含量。通常颗粒中的水分在干燥过程中蒸发, 留下(空的)孔。干燥的颗粒的孔隙率优选地为 15-50%, 如 20-40%, 最理想地为 25-35 %。

优选地, 颗粒中的大部分细胞(如果不是实质上的全部)是完整的(也就

是说, 没有破裂)。特别是来源于霉菌生物量的颗粒可以是完全生物量微粒, 它的直径为 0.3-10 mm, 优选地直径为 0.7-5 mm, 最理想地为 1-3 mm。一般地, 这些微粒以所要求的长度自动形成。另外, 也可以将这些颗粒切割成所要求的长度。如果通过挤压进行颗粒化, 那么压出机模板上的孔相当于颗粒的直径。

在颗粒化之前或过程中, 可以加入也可以不加入抗氧化剂。所说的抗氧化剂包括酚和抗坏血酸棕榈酸盐, 例如含量可多达 0.1%(重量比)。

这样本发明可以提供生物量材料, 这些生物量材料的特征是能够使化合物的提取更经济更有效。然后, 将存在于其中的化合物纯化、分离或者(优选地)提取。本发明的过程使得能够使用渗滤提取过程。这一提取过程的优点似乎归功于材料的结构、大小和较高的干物质含量。干燥的挤出物要求提取有效化合物的溶剂使用量减少。此外, 使用挤出物形式的生物量可以使脱溶剂的烘烤过程进行得更好和更有效。

在脱溶剂烘烤过程中和的挤出物残渣可以用作饲料组分。

90-95%的挤出物的干物质含量使所说的挤出物可以稳定地贮存, 而干物质含量高于 85%已经可以明显地改进接下来的提取过程。

优选地使用溶剂进行提取。所使用的溶剂取决于将要提取的化合物, 但是值得一提的是 C_{1-10} 烷基酯(例如乙基或丁基醋酸酯)、甲苯、 C_{1-3} 醇(如甲醇、丙醇)和 C_{3-6} 烷烃(例如己烷)和/或超临界流体(例如液态 CO_2 或者超临界丙烷)。按现有技术, 可以在肉汤的微生物中直接使用溶剂。然而, 在颗粒上进行提取, 可以明显地减少所使用的溶剂量。在申请人的部分实验中, 用于提取的溶剂量减少了 20-30 倍。这样不仅明显地节省了开支(因为使用的溶剂减少了), 而且最大限度地减少了蒸发问题。使用颗粒, 尤其使与溶剂接触的面积明显增加, 因此可以获得更好的产量。

如果将要提取的化合物是疏水的, 那么优选使用非极性溶剂。对于亲水的化合物, 使用极性溶剂(如醇)是合适的。

可以使用各种技术进行提取。优选的方法是使用滤膜进行渗滤提取。使用干燥的颗粒填充柱子。然后加入溶剂(己烷), 浸没所说的颗粒。尽管可以使溶剂只通过柱和干燥的颗粒一次, 但优选的是把溶剂循环起来(或

者作为关闭和开放的系统)。将溶剂循环 3-7 次是合适的, 如大约 5 次, 循环一次的合适的时间为半小时至一个半小时。图 3 为合适的渗滤提取器。在与含有干燥颗粒的渗滤器连接前, 将溶剂加入到容器中。借助于泵使日循环。使用光滑的滤膜以便除去细沫。

也可以使用其它的渗滤器。这些渗滤器可以是反流或者错流型的。对于前者, 可以把干燥的颗粒装入到被分割成各个部分的旋转量筒量筒(如 carousel)。溶剂从一个方向通过一个部分的颗粒, 然后通过(以同一个方向是优选的)另一个部分(如相邻的部分)的颗粒。这些机器经常称作 carousel 提取器, 并且可以从 Kripp(德国)买到。

在另一种技术中, 可以将颗粒放置在, 例如移动(例如多孔的)带或者运输器上, 所说的移动带或者运输器实质上以与溶剂相反的方向运动。这就意味着使用已经通过其它颗粒的溶剂提取新鲜的颗粒, 同时在已经由所说的溶剂事先提取过的颗粒上使用使用新鲜的溶剂。这一安排是最有效的。

在错流技术中, 使用新鲜的溶剂提取各批颗粒。

也可以使用本发明的过程从不同的微生物中通过由两种或更多的微生物混合物制备颗粒状微粒或者颗粒来获得一种或两种化合物的混合物。可以通过在发酵完成后直接将两种或更多不同微生物的发酵肉汤混合来获得微生物混合物, 或者刚好在颗粒化(如挤压过程)之前通过合并两种或更多微生物的生物量来获得微生物的混合物。在提取过程前, 混合两种或更多不同微生物挤出物也是可能的。

按照本发明的更为优选的过程如下:

a) 在允许所说的微生物产生所期望的化合物的条件下, 在合适的培养基中发酵一种或多种微生物, 这种发酵能够(在周围的培养基中)产生(微生物)肉汤;

b) 如果需要, 沉淀或者固化所说的化合物, 如通过酸化作用;

c) 把在肉汤中的微生物与培养基分开, 可以通过固/液分离(如过滤)方法来进行分离以便获得生物量;

d) 将从(a)中获得的肉汤或者(c)中获得的生物量进行巴氏法灭菌;

e) 如果需要, 可以增加干物质的含量, 例如通过加入干物质或者通过降低含水量(例如通过脱水或干燥技术);

f) 将所得的生物量粉碎和/或控制(可以增加也可以不增加干物质含量, 通过加入一种或多种干物质来完成);

g) 例如通过挤压方法将所说的生物量颗粒化以便得到颗粒状的微粒;

h) 将颗粒状的微粒干燥以便获得干燥的颗粒;

i) 例如通过使用合适的溶剂提取一种或多种化合物。

按照本发明分离的化合物可以具有很高的质量, 并且适合用于人或者动物营养品中。尤其是按照本发明分离的含有多不饱和脂肪酸(PUFA)的脂类适合于营养目的, 特别适合加入到婴儿食品中。

下文通过实施例来描述本发明, 所说的实施例是以例证的形式提供的。这些实施例中伴随下列附图:

图 1 是温度和干物质(%)对时间的分布图, 表明不同量的挤压生物量在不同温度的干燥行为;

图 2 是油产量对温度的分布图, 表明在不同时间段由挤压的生物量中提取的油;

图 3 是(已知)渗滤提取过程的流程图; 和

图 4 是油产量对时间的分布图, 表明提取的油量和其提取时间的关系。

实施例 1-6

被孢霉属发酵肉汤的处理

将 160 l 事先经巴氏法灭菌的(68 °C, 1 小时)(盘上生长)高山被孢霉的发酵肉汤在标准的 Dieffenbach 平板和框压滤器(纱布类型: nycot 2794)上过滤。以最大使用压力为 1.0 bar 过滤肉汤。在 20 分钟内, 将 160 l 的肉汤经过 4.35 m² 的总过滤面积, 这样平均流速为大约 110 l/m²h。使用大约 3 倍饼体积的处理水(≈150 l)洗涤过滤的饼。

回收大约 30 kg 干物质含量大约为 25 % 的湿饼。使用三种类型的干燥过程。

真空干燥:

35 ℃下, 在真空(大约 50 mbar)托盘干燥器(大约 1m² 干燥表面)中干燥 10kg 的滤饼, 在 24 小时的干燥过程中, 得到大约 2.5kg 干物质含量大约为 94 % 的干燥生物量。干燥生物量包含粉碎的生物量和一些大块生物量。由于块大的原因, 真空干燥很费时间。

通风托盘干燥器:

35 ℃下, 于氮气中在通风托盘干燥器(大约 1m² 的干燥面积)中干燥 10kg 的滤饼, 历时 24 小时。总共回收了大约 2.5kg 的干物质含量大约为 93 % 的干燥生物量。干燥的生物量由粉碎的生物量和一些大块组成。可能由于含有大块, 通风托盘干燥器需要较长时间。

流化床干燥器:

在 AEROMATIC 的实验室型流化床干燥器(MP-1 类型)中干燥 5kg 的滤饼, 入口气温为大约 200 ℃。出口温度为大约 40 ℃。大约 45 分钟, 湿的生物量得到干燥, 获得大约 1kg 干物质含量为大约 81 % 的干燥的生物量。

将通过最后一种方法回收的干燥的物质用于提取油, 在 6 种不同的温度(这就是实施例 1-6)下通过己烷方法进行提取。在氮覆盖条件下, 使用 1500ml 的己烷(加热到回流)提取 150g 干燥的生物量, 90 分钟。过滤除去细胞群, 在真空条件下于旋转蒸发仪上将所得的微胶粒上的溶剂蒸发掉。得到粗制的 PUFA 油。结果如表 1 所示。室温下提取的产率较低, 温度升高后, 产率提高。

表 1 从生物量中提取油

实验号	生物量/己烷比例	温度(℃)	提取时间(分钟)	油(g)/100g 干燥的生物量
1	300	80	30	19.2
2	100	23	30	16.4
3	150	45	60	22.6
4	200	23	120	17.1
5	200	23	30	11.8
6	100	23	120	13.5

富含甘油三酯的油是一种浅黄色的油，其中含有一些固体物质。

实施例 7 和对比实施例 8

被孢霉属发酵肉汤的处理

将 500 l 肉汤(预先如前面实施例所述经巴氏法灭菌)在薄膜滤器(SCHULE)中过滤，压力差为 0.5 bar。使用 10 倍于滤饼体积的加工水洗涤滤饼，之后在 5.5 bar 下压榨 30 分钟。所得的饼的干物质含量大约为 46 %。在中试(pilot)挤出机(ODEKERKE，桶的直径为 50 mm， profiled 桶)上挤压以这种方式回收的饼。此模板上有 10 个直径为 1.6mm 的孔。在大约 45 分钟内挤压了总共 19kg 的滤饼。

在中试工厂流化床干燥器(T4 AEROMATIC 0.26 m² 干燥表面)上干燥以这一方法回收的压出物。65℃下，在大约 45 分钟内干燥压出物，最后的干物质含量大约为 85 % (实施例 7)。

在同一实验过程中，一些滤饼没有挤压(用于比较的实施例 8)，并于 40℃下在真空托盘干燥器中干燥。由于块大，这一干燥过程很费时间。

这两种物质都使用己烷进行提取。所得物质的特性如下：

干燥压出物(实施例 7)：主要由小球组成，提取过程相当容易

真空干燥的生物量(用于比较的实施例 8)：小球和块，许多细沫，提取过程难，过滤特性不好。

实施例 9 和 10

使用下列压出机对与实施例 7 相同的肉汤进行挤压实验:

LALESSE (Amhem, 荷兰):

在实施例 9 中, 使用 LALESSE 单一螺丝通用压出机。这种类型的压出机通常用于小食品的产生。首先以玉米粉(干物质含量大约 95 %)进行实验, 加入到压出机中, 然后在一定的压力和温度下, 挤压玉米; 直到成型的膨胀挤出物不再出来。

这种类型压出机的桶为模式桶, 目的是运输加工的玉米。用于挤压的螺丝的类型取决于所加工的材料。螺丝是通用的运输螺丝或者直径为 48mm 的压缩螺丝。LALESSE 机器是 7.5 Kw 中试机器(驱动容量)。机器的总功率需要为 12.1 Kw。压出机的桶可以加热或者冷却。在生物量的挤压过程中, 使用带有 1-4 个孔(直径为 1.8、2.0、2.2)的模板。

处理被孢霉属生物量的容量(冷却桶)大约为 40 kg/h。在挤压过程中, 模板上孔的长/直径(L/D)比是变化的。

ALMEX (Zutphen, 荷兰):

在实施例 10 中, 使用实施例 7 的被孢霉属生物量和 ALMEX 公司的加大压出机。这种类型的压出机用于宠物食品的生产。它具有配备针的光滑的桶, 这种桶能够运输生物量。这些针具有相同的功能, 即如 LALESSE 压出机中桶的模式。这种加大的压出机的螺丝是标准螺丝。

技术数据: ALMEX Contivar 150

L/D 为 10 (螺丝长与螺丝直径的比例)

螺丝最大转速为 180 rpm

22 Kw (驱动容量)

螺丝直径为 150 mm

使用自来水冷却

模板: 3 环孔, 每个孔的直径为 1.8 mm

在处理过程中, 将生物量的温度升高到大约 25 °C。机器的容量是每小时大约为 250kg 被孢霉属压出物。

比较实施例 11

比较以不同方法进行的固/液分离

倾泻器:

将 350 l 高山被孢霉的发酵肉汤移入到“FLOTTWEG”倾泻器(类型 Z 23-3/441)中。将速度设置在大约 4000rpm。在操作过程中,速度在 7.5-20rpm 的范围内变化。

流入速度设置为 400 l/h。洗涤所说的生物量。总共倒出 350 l 肉汤。饲料温度为 8℃,上清液温度为 15℃。回收的干物质含量为大约 25%。

倾泻器+转鼓真空过滤机:

将从上述实验的倾泻器中获得的 20kg 生物量(干物质含量为 25%)悬浮在 500 l 处理水中,其中溶解有 10kg NaCl。在使用带进行卸货的转鼓真空过滤机((PAXMAN, 纱布类型: 865.912 K/5 polyprop))上过滤所得的浆,没有另外洗涤。鼓的速度为 1rpm,压力差最大为 600 mbar。在 15 分钟之内总共过滤了 400 l。净滤面积为大约 0.3 m²,这样平均流速为 5000 l/m²h(滤面)。过滤速度十分合适,但所得的饼相当不好。回收的过滤生物量的干物质含量为大约 35%。

板框压滤器:

在板框压滤器(标准 R&B, 纱布类型: nycot 2794)上过滤 500 l 肉汤。使用 0.3bar 压力差过滤肉汤。在 35 分钟内,在总共为 5m²的过滤面积上过滤 500l 的肉汤,平均流速为 ±175 l/m²h。在 30 分钟内使用大约于 2.5 倍饼体积的处理水洗涤滤饼,平均流速为 400 l/m²h。

用空气将所说的饼吹干 30 分钟,所回收的生物量的干物质含量为大约 25%。

膜式压滤器:

在膜式压滤器(SCHULE, 纱布类型: propex 46K2)上过滤 700 l 肉汤。使用 0.3bar 压力差过滤肉汤。在 30 分钟内,在总共为 6.8m²的过滤面积上过滤 700l 的肉汤,平均流速为 205 l/m²h。

在 7 分钟内使用大约于 3 倍饼体积的加工水(≈300 l)洗涤滤饼,平均流速为 375 l/m²h。

与板框压滤器相比,膜式压滤器的优点为过滤后,可以以很高的压力



挤榨滤饼，这样可以提高干物质的含量。在 5.5bar 的压力下压榨所说的饼 30 分钟，这样所回收的生物量的干物质含量为大约 45 %。

在另一个实验中，在膜式压滤器(SCHULE, 纱布类型: propex 46K2)上过滤 1100 l 肉汤。使用 0.3bar 压力差过滤肉汤。在 45 分钟内，在总共为 12.3m^2 的过滤面积上过滤 1100 l 的肉汤，平均流速为 $120\text{ l/m}^2\text{h}$ 。在 18 分钟内使用大约于 3 倍饼体积的 1 % NaCl 溶液($\approx 600\text{ l}$)洗涤滤饼，平均流速为 $162\text{ l/m}^2\text{h}$ 。

6bar 下，将所得的饼压榨 30 分钟，这样所回收的滤饼的干物质含量为大约 55 %。

压榨并使用 1 % 的盐溶液洗涤可以明显增加滤饼的干物质含量。

实施例 12

挤压干物质含量不同的生物量

挤压干物质含量不同的生物量，这些生物量是通过如实施例 7(参见表 2)所示的方法获得的。使用带有模式桶和通用螺丝的单螺杆压出机进行挤压。在挤压中使用的模板上的孔的数量不同，孔的直径大约为 2mm。

挤压后所得的微粒的直径为大约 2 mm。

表现及压出物的质量取决于用于挤压的生物量的干物质百分含量。尽管 25 % 的干物质的结果不够理想，对于其它的微生物，这样低的干物质含量还是可以使用的。

% 干物质	挤压表现	压出物的质量
25	不好	十分粘的材料
35	好	比较粘的材料
45	很好	非粘性压出物
55	很好	疏松的压出物

表 2.使用不同干物质含量生物量的挤压实验结果。

实施例 13 和 14 及比较实施例 15

高山被孢霉常规和挤压的生物量干燥

真空干燥:

40 ℃下，将通过常规方法回收的生物量(比较实施例 15，没有挤压)在真空托盘中干燥器中干燥 50 小时。由于大块的存在，干燥进行的十分缓慢。以这种方法干燥的生物量的干物质含量大约为 92.5 %。

作为比较，将大约 20g 干物质含量为 55 % 的压出物(从实施例 11 获得的， $\phi_{\text{微粒}} = 2\text{mm}$)5 在旋转蒸发仪上以实验室标准进行干燥。水浴温度为 68 ℃，所用的压力为 40 mbar。干燥表现适中，只是干燥的生物量粘贴到壁上，并有少量的油渗出。干燥后干物质含量是 92.3 %。

流化床干燥：

在实施例 13 中，在不同温度下将生物量干燥。对于没有进行预处理的生物量，生物量中的大块没有完全被干燥。在这种情况下，由于微粒的大小不同，生物量的干燥是十分不均匀的。

如果在干燥前，通过挤压将生物量进行预处理，干燥的效能可以得到充分地改进。在这种情况下，所干燥的生物量的微粒大小是比较均一的。

从这些结果可知，可以对不同形式分离的生物量进行流化床干燥，但是使用挤压物可以改进干燥效果。

在另一个实验中(实施例 14)，在流化床干燥器上，使用空气($8000\text{Nm}^3/\text{m}^2\text{h}$)对不同量的(15 和 30kg)压出物进行干燥。在干燥过程中取样并计算干物质含量。温度和这两种不同量挤出物的干物质含量之间的关系如图 1 所示。

床温度设置为 80 ℃。挤压的生物量的直径是 1.3 mm。干燥后挤压的生物量的干物质含量为大约 96 %。

实施例 16

从高山被孢霉的干燥的压出物中提取脂类

在不同温度下，通过搅拌提取干燥的压出物：

使用 500ml 己烷或者 500ml 丙醇-2 提取 100g 干物质含量分别为 93.4 % 和 97.8 % 的干燥压出物样品，如果使用己烷，温度为 20 ℃、35 ℃和 50 ℃，如果使用丙醇-2，温度为 20 ℃、40 ℃和 70 ℃。在“四-颈”的圆底烧瓶中使用两个叶片式搅拌器搅拌浆液，并通过加热罩进行加热。最后通过回流冷却器再循环蒸发的己烷或丙醇-2。

在提取过程中，每个 30 分钟在搅拌器停止和微粒沉降后，从烧瓶中去上清液 15ml。将 1ml 样品用吸移管移到预先称重的 2ml 微量离心管中。40 ℃下，在真空条件过夜后，称量微量离心管的重量并计算了所有的油。图 2 中显示了此实验的结果。

已烷提取的结论:

- 温度对可以提取的脂类的总量没有影响，即在比较低的提取温度下可以获得较好的脂类产量;
- 温度对提取所有可提取的脂类总量所用的时间只有非常小的影响;
- 在高于 20 ℃的温度下，可以在 30 分钟内使用 5 倍体积的已烷从生物量中提取所有的脂类。

丙醇-2 提取的结论:

- 温度对可以提取的脂类的总量有明显的影响;
- 温度对提取所有可提取的脂类总量所用的时间有明显的影响;
- 在 73 ℃下，可以在 2 小时内使用 5 倍体积的丙醇-2 从生物量中提取所有的脂类。

所得油的组分取决于提取过程中所用的溶剂(参见表 3)。提取溶剂的极性越大，提取的磷脂就越多。可以选择溶剂的极性以便优化所得油的组分。

物质	已烷油	丙醇-2 油
三-甘油酯	93 %	85 %
二-甘油酯	2 %	2 %
单-甘油酯	2 %	2 %
甾醇	3%	3%
磷脂	2 %	6.5 %

表 3：在室温下使用两种不同的溶剂提取干燥的被孢霉属的生物量。

在较大规模提取中存在着菌丝过滤的问题，这是由于在提取过程中很高的搅拌器速度使压出物破裂成为小的微粒。

使用渗滤提取代替搅拌提取可以避免这些问题。

使用己烷对干燥的压出物进行渗滤提取:

以中试规模进行几种渗滤提取(参见图 3 的过程图)。20 ℃下使用己烷提取大约 40-45 kg 的干燥挤压生物量(己烷/生物量的最初比为 4.4 l/kg)。齿轮泵的流速设置为 1.5 m³/h。以大约 0.1bar 的压力使用氮气清洗装样容器。

提取 4 小时(提取过程中温度从 18 增加到 25 ℃)。每隔 30 分钟从菌丝中取样。将每一个样品 100 ml 在真空(大约 50 mbar)条件下于旋转蒸发器(T_{水浴}是 64 ℃)中以实验室规模蒸发 20 分钟。评价所得油的量。结果如图 4 所示。可以注意到 2 小时后达到平衡。之后,使用大约 0 ℃ 6 备床体积的己烷洗涤提取的生物量。在提取过程中床的高度不变。

蒸发前将菌丝体仔细过滤。在提取过程中我们注意到菌丝体变得越来越清晰,这是由于因为在微粒床上进行深度过滤的原因。

实施例 17 和比较实施例 18

从三孢布拉氏霉中回收β-胡萝卜素油

使用实验室过滤设备收获 10 升真菌三孢布拉氏霉的发酵肉汤(预先在 75 ℃经巴氏法灭菌 15 分钟)。为了提高肉汤的过滤性,向其中加入了 CaCl₂(终浓度为 5g/l)。在这种方式中,使用通用的水果压汁机(柑橘类的植物压汁机, HAFICO D.G.M)将回收的生物量以实验室规模进行机械脱水(压榨),直到干物质含量为 45 %。通过不锈钢注射器挤压以这种方式回收的饼,所说的不锈钢上装备有模板,模板上有 4 个孔,每个孔的直径为 1.8mm。以实验室规模在流化床干燥器中干燥所得的压出物(T_{空气} = 40 ℃,干燥时间为 90 分钟,气流速度为 150 Nm³/h, AEROMAIC MP-1)。以这一方法干燥的生物量的干物质含量为大约 95 %。

使用渗滤提取方法以乙酸乙酯(最初体积/生物量比为 30 l/kg)提取大约为 50g 的干燥的压出物样品。50 ℃下提取 2 小时后,通过真空过滤收获提取物。使用 1 倍床体积的乙酸乙酯洗涤生物量。蒸发前,使用软化水(提取物/水比为 5v/v)将以这种方式回收的提取物洗涤两次。在 50 ℃(T_{水浴})下蒸发乙酸乙酯,直到β-胡萝卜素的浓度为 8g/l。

通过有控制的结晶和尔后的过滤从浓缩物中回收β-胡萝卜素晶体。

使用经混合和干燥，但没有如此挤压的生物量进行同样的实验(实施例 18)。混合干燥的生物量提取后，其过滤性于干燥的压出物相比很差。

实施例 19

从 *Cryptocodinium* 回收 DHA 油

使用实验室离心机(BECKMAMN JM/6E 型)从 7 l *Cryptocodinium cohnii* 的发酵肉汤(预先在 65 °C 下经巴氏法灭菌 1 小时)中收获生物量。将肉汤以 5000rpm，每次 800ml 进行离心，得到澄清的上清液。

总共回收 224g 干物质含量为 13 % 的生物量。这就意味着生物量在发酵肉汤中的浓度大约为 4 g/kg。向回收的生物量中加入 300g 淀粉(ROQUETTE，10EV0024 批)以便增加干物质含量。通过使用通用螺丝和模式桶的单一螺丝实验室压出机挤压以这种方式回收的饼。模板上孔的直径是 2mm，模板的厚度是 6mm，这样模板的 L/D 为 3。50 °C 下，在真空条件下将所得的光滑压出物过夜干燥，得到带有裂纹的干燥的压出物。以这一方法干燥的生物量的干物质含量是大约 94 %。

使用乙烷(最初的己烷/生物量比为 5l/kg)提取大约 180g 干燥的压出物样品。60 °C 下，提取 3 小时之后，经 Whatman 滤纸将菌丝过滤。使用 1000ml 新鲜的己烷将得到的提取生物量洗涤一次。将以这一方法回收的过滤菌丝在 68 °C (T_{水浴}) 蒸发。以这一方法，回收了含有 DHA 的油的粗制品。借助于 GC 分析，油中的 DHA 浓度是 32.6 %。以这一方法回收的油含有大约 67 % 的甘油三酯，12 % 的二甘油酯，3.7 % 的甾醇和大约 0.2 % 的消泡剂(NMR)。这种油的其它特征是类胡萝卜素的水平(β -胡萝卜素为 0.15 mg/ml， γ -胡萝卜素为 5mg/ml)。

实施例 20

从丙酸杆菌属(*Propionibacterium*)的未知种中回收维生素 B12

通过 BRPX-213-SGV 型沉降器以大约 5000 G-因子从大规模的丙酸杆菌属未知种的发酵液(28 吨)中收获肉汤(ALFA LAVAL, 3 - 7 t 吨/小时)，所说的肉汤在 90 °C 下热激 2 分钟。使用带有大约 150 m² 螺旋形聚乙烯砜膜(5 kD 截断)的 ABCOR KOCH 组件(HFK 131-VSV 型)通过超滤

将以这种方式澄清的肉汤浓缩 2.5 倍。以 500 % 的含有加工水的浓缩体积将所得的超滤液渗滤。通过真空蒸发以 3 倍浓缩所得的渗滤物。

将所得的浓缩物颗粒化，并在 NIRO 250 多步干燥器(流化床喷射干燥器/团聚器)上干燥。干燥器的入口空气温度为大约 250 °C，出口空气温度是大约 70 °C。所用的气流是大约 3000 m³/h。这样产物的温度为大约 70-80 °C。加入到干燥器中的浓缩物的密度为大约 1050 kg/m³。

环境温度下，使用 125ml 大约 75 % 的乙醇(含有水可以使提取/技术表现最佳)将大约 2g 的干燥的颗粒样品在锥形瓶中通过搅拌提取 60 分钟(澄清的提取物)。提取后，使用 Whatman 滤纸(过滤容易)将提取的生物量过滤。分析以这一方法回收的澄清的粉红滤液中的维生素 B₁₂。使用 25ml 大约 75 % 的乙醇洗涤所得的生物量。以这种方法，从颗粒化的生物量中提取了大约 90 % 的维生素 B₁₂(表 4)。

样品号	0	g	ml	密度 (kg/m ³)	维生素 B12(mg/kg)	总维生素 B12(mg)
VTB9606 ^E /001	输入颗粒	2.01	---	---	842	1.69
VTB9606 ^E /002	输出颗粒	1.46	---	---	104.5	0.15
VTB9606 ^E /003	提取	---	110	856	11.7	1.10
VTB9606 ^E /004	洗涤	---	24	856	6.01	0.12

表 4 从多步团聚的丙酸细菌中提取维生素 B₁₂ 的数据

实施例 21

C. cohnii 和高山被孢霉的协同挤压

将 10 升高山被孢霉真菌的发酵肉汤和 10 升 *Cryptocodinium cohnii* 的发酵肉汤混合在一起。为了改进混合肉汤的过滤性 CaCl₂(终浓度为 5g/l)。将过滤混合的肉汤，使用通用的水果压汁机(柑橘类的植物压汁机，HAFICO)将所得的饼进行机械脱水。

通过使用带有位于模式桶上的通用运输螺丝和上面带有一个 2mm 孔的模板的单螺丝实验室压出机回收多说的饼。压出物的直径为大约

2mm，在实验室规模在流化床干燥器中干燥—这种方式获得的压出物($T_{\text{空气}} = 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ ，干燥时间为 1 小时，气流速度为 $150\text{ Nm}^3/\text{h}$ ，AEROMAHC MP-1)。以这一方法干燥的生物量的干物质含量为大约 92 %。

使用己烷(最初体积/生物量比为 4 l/kg)提取大约为 100g 的干燥的压出物样品。环境温度下提取 2 小时后，通过真空过滤回收菌丝。使用 4 倍床体积的新鲜己烷(最初体积/生物量比为 4 l/kg)洗涤剩下的提取过的压出物。将洗涤的己烷与菌丝混合，将所得的菌丝在 $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($T_{\text{水浴}}$)下蒸发。通过这种方式回收含有 ARA($\text{C}_{20}: 4\omega6$)和 DHA($\text{C}_{22}: 6\omega3$)的 PUFA 油的粗制品。

按照通常用于食用/植物油的方法精炼所得的油的粗制品。

比较实施例 22

下表列出了用于获得前面实施例中描述的生物量和肉汤的各种培养条件。

微生物	产品	加工类型	营养成分(g/l)	温度(℃)	pH	时间(小时)
<i>Pichia ciferrii</i> (= 西弗汉逊酵母)	四-乙酰-植 物-鞘氨醇 (=TAPS) (细胞外)	分批加入(加 入葡萄糖)	葡萄糖: 30 酵母提取物: 3 麦芽提取物: 3 蛋白胨: 5	25	6.5-6.8	96
高山被孢霉	花生四烯酸	分批	葡萄糖: 50 酵母提取物: 5 NaNO ₃ : 5 K ₂ HPO ₄ : 3 MgSO ₄ ·7H ₂ O: 0.5 铵盐 矿物质	25	5.5-7	120-168
<i>Blakeslea</i> <i>trispora</i>	β-胡萝卜素 (细胞内)	分批	Pharmamedia: 75 葡萄糖: 10 KH ₂ PO ₄ : 0.5 MnSO ₄ ·H ₂ O: 0.1 大豆油: 30 棉籽油: 30 糊精: 60	26-28	6.5	7 天

				Triton X-100:1.2 抗坏血酸: 2 盐酸硫胺: 2mg 异烟肼: 0.075 %			
土曲霉	Lovastatin	分批加入(葡萄糖 + 氧)	葡萄糖: 20 酵母提取物: 11.3 KH_2PO_4 : 3.5 Na_2SO_4 : 1.0 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 1.4 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.1 PPG(2000)(消泡剂): 0.1 微量元素	28	6.5	8天	
丙酸杆菌属未知种	维生素B12(细胞内)	分批加入(厌氧菌(加入葡萄糖 + 4天: 10mg/l 5.6二甲基苯并咪唑))	葡萄糖: 10 玉米浆: 80 $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$: 16 KH_2PO_4 : 0.4 $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$: 1.5 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.5 泛酸钙矿物质: 10mg	30	5-7.5	168	

发酵技术的参考文献

1. Maister H.G., Rogovin S.p., Stodola F.H., Wickerham L.J., "微生物细胞外鞘脂的形成 IV. 通过西弗汉逊酵母中试生产四乙酰植物鞘氨醇". 应用微生物, 10, 401-406(1962)
2. Zu-Yi Li, Yingyin Lu, Yadwad V.B., Ward O.P., "通过高山被孢霉菌株生产花生四烯酸的过程"
3. 加拿大生物化学杂志, 英语 73, 135-139 (1995)
4. Finkelstein M., Huang C-C., Byng G.S., Tsau B-R., Leach J., "能够增加 β -胡萝卜素生产的三孢布拉氏霉的配对培养物"美国专利 5,422,247 (1995)
5. Kojima I., Kouji K., Sate H., Oguchi Y., "通过发酵技术生产维生素 B12 的过程, 和产生维生素 B12 的微生物"美国专利 4,544,633(1985)
6. Kyle D.J., Reeb S.E., Sicotte V.J., "通过腰鞭毛目生产二十二碳六烯酸"美国专利 5,407,957(1995)

实施例 23

原油和精炼油的分析

通过实施例 1 描述的方法(流化床干燥和已烷提取)制备各批原油。

应用于油上的所有分析都是按照“美国油化学家学会(AOCS)”描述的程序。使用 600 MHz 仪器通过 H-NMR 测定三、二、单甘油单酯和磷脂含量。

原油具有下列组分

批	a	b	c
三甘油单酯(%)	96.6	96.5	96.6
酸值 mg/g	1.7	0.3	0.2
过氧化值 meq/kg	2.7	1.3	1.3
茴香胺值	<1.0	0.3	0.1

使用用于食用油加工过程的标准方法精炼原油。

简言之, 通常在排除包埋的空气的情况下, 将油加热到 80 -90 °C。向油中加入稀释的 NaOH 溶液(化学计量的 125 % 相当于游离脂肪酸的

量)。反应 30 分钟后, 通过离心分离水相。用水洗涤油, 直到酚酞反应为中性。(为此, 使用油量的 10% 洗涤 3 次足够)。通过离心除去水层。所有洗涤步骤完成后, 70 ℃ 下将油进行真空干燥。加入漂白粉 Tonsil Supreme FF 将干燥的油漂白。(加入的量为 2% 重量比)。60 ℃ 下, 于 10-15mbar 的压力下使漂白粉与油接触。反应结束后, 在 1bar(含氮)的压力下, 通过叶滤机过滤除去漂白粉。180 ℃, 2-5bar 下, 将过滤的油分批真空除臭 2 小时。蒸汽用作除去的介质。这样的蒸汽在加入到油中的水分的原位形成。反应结束后, 将油冷却。加入氮气, 使反应器中的压力降至 1bar。

经过这一加工过程, 得到含有下列组分的澄清的油:

组分	a	b	c
磷脂(%)	<0.05	<0.05	<0.05
甘油三酯(%)	96.6	96.5	96.6
二脂酸甘油酯 (%)	1.6	1.3	1.0
酸价 mg/g	0.2	0.15	0.1
过氧化值 meq/kg	1.6	0.8	0.4
茴香胺值	4.1	1.9	3.1

Rancimat 诱导时间:

130 ℃(小时)	2.5		
100 ℃(小时)	>4	>4	>4
80 ℃(小时)	>10	>10	>10

说明书附图

挤压的被孢霉属生物量的空气干燥
温度和%DM 随时间的变化过程

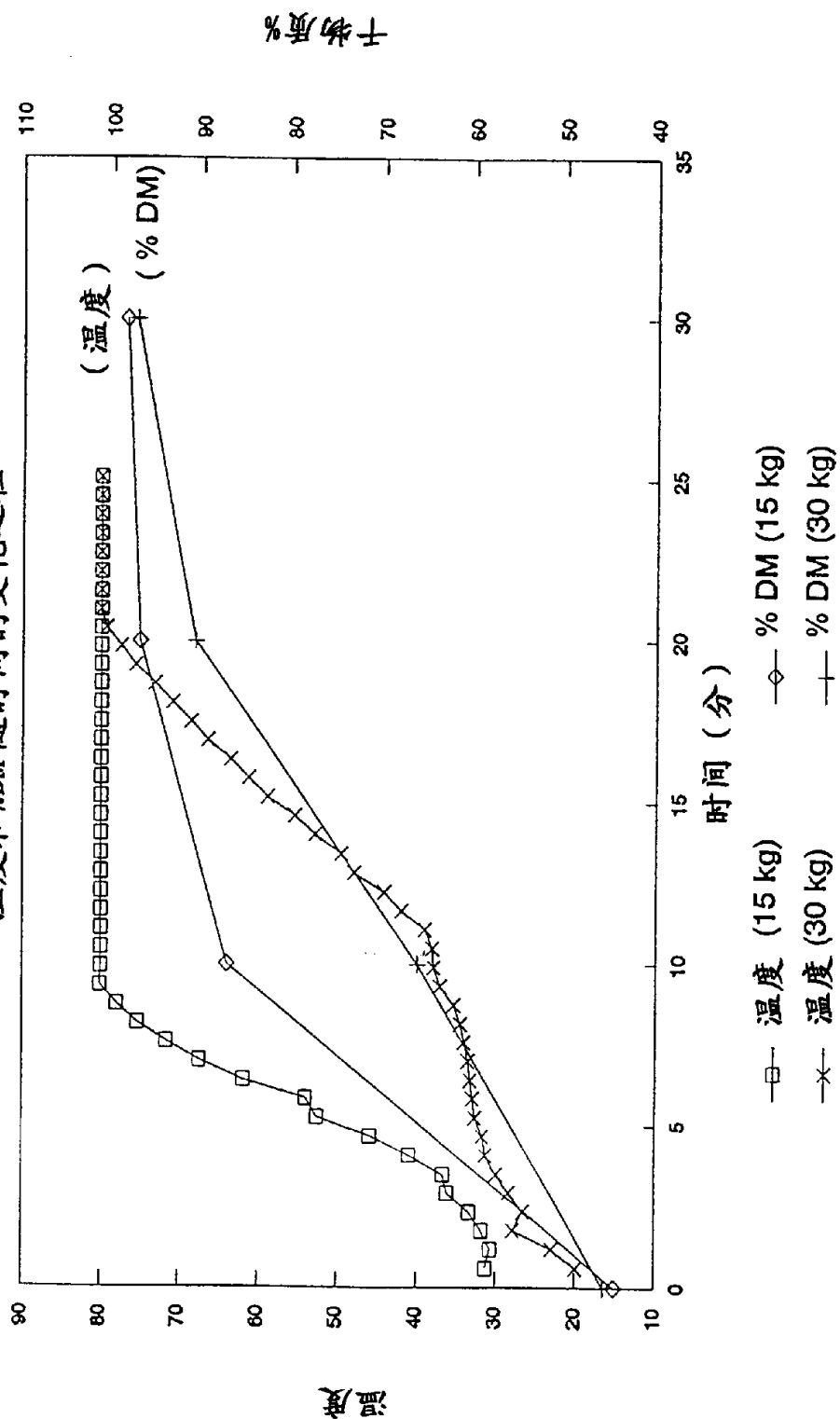


图 1

被孢霉属生物量的提取
空气干燥; 盐洗

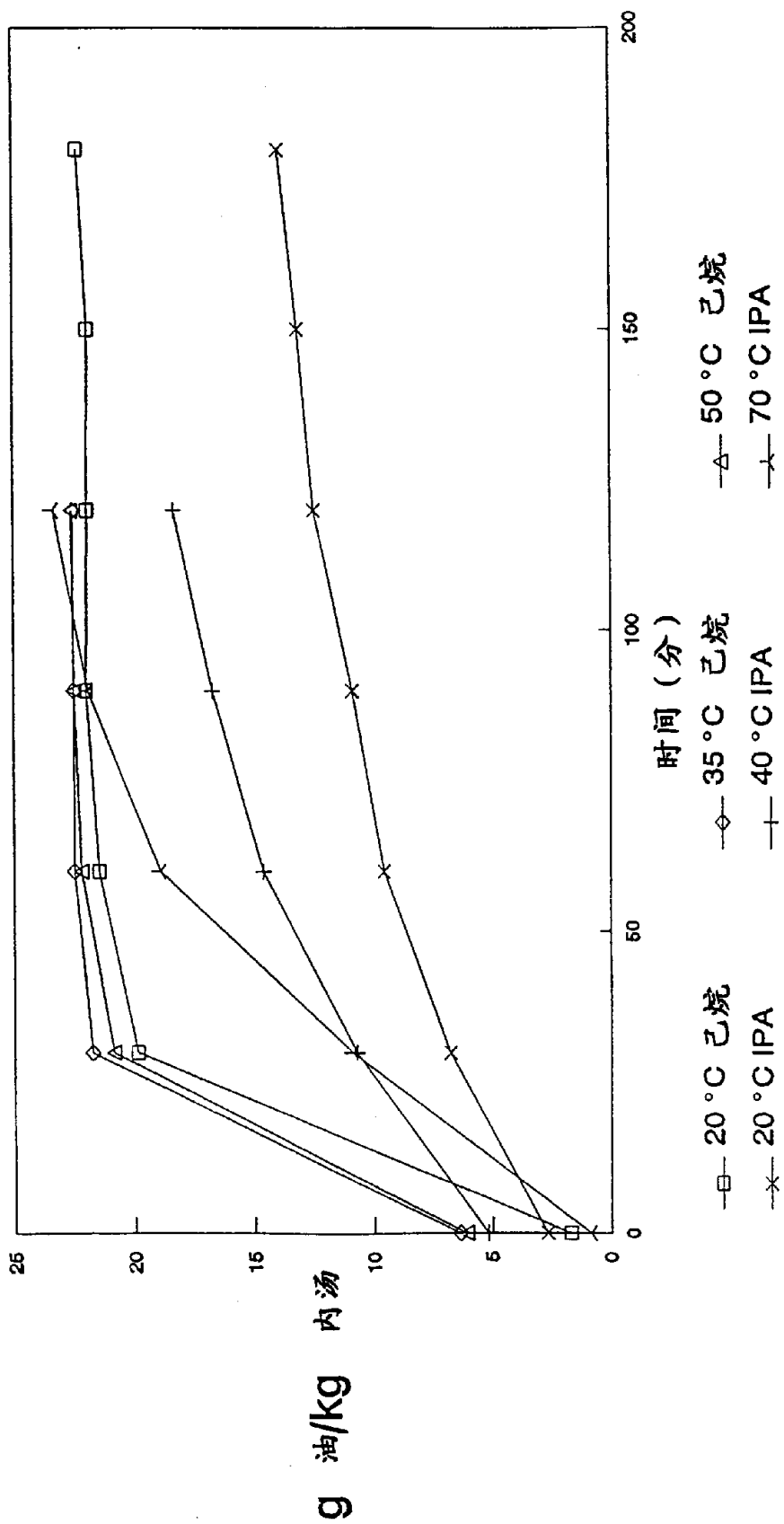


图 2

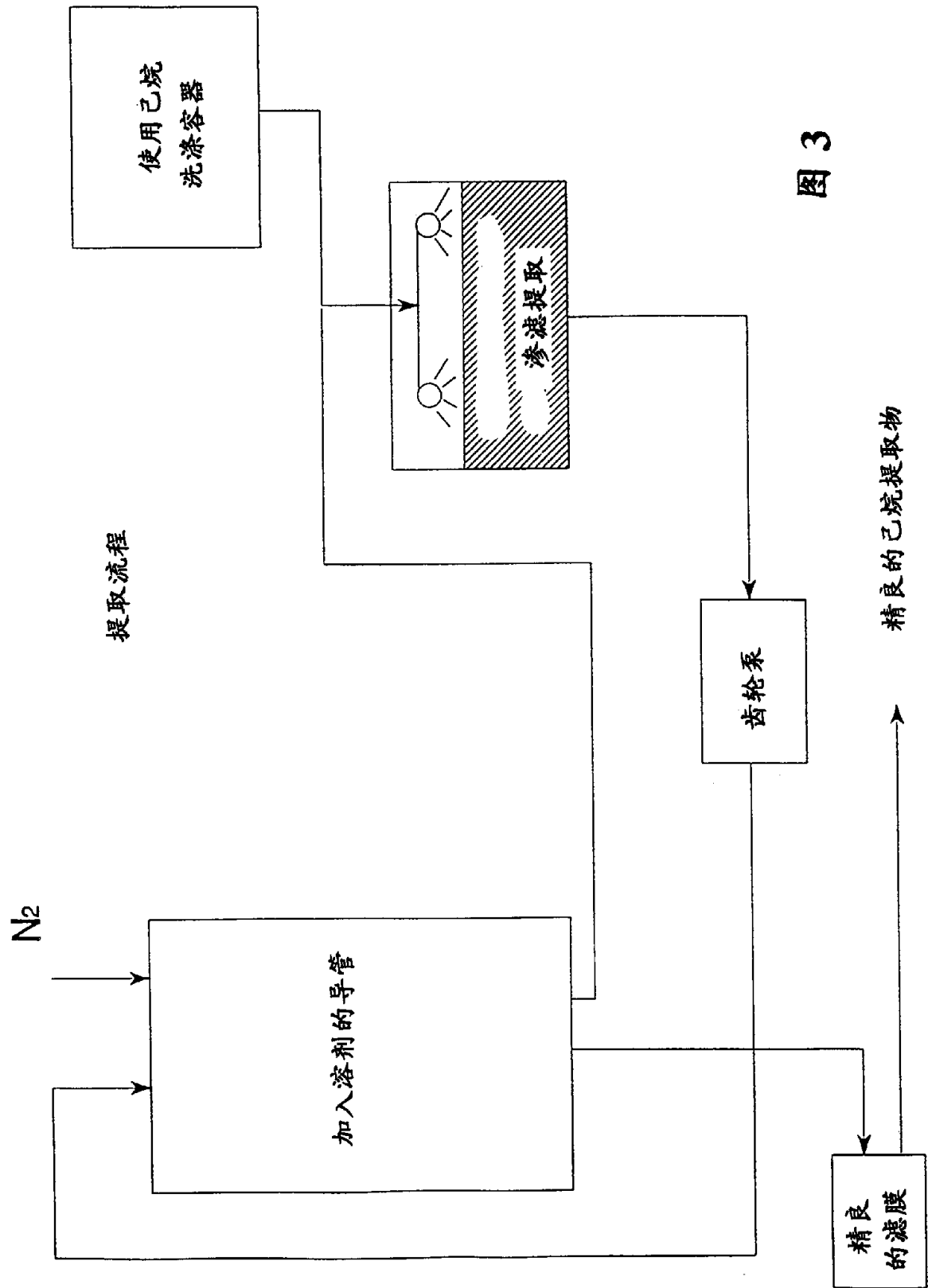


图 3

干燥的被孢霉属生物量的提取

使用己烷进行渗滤提取

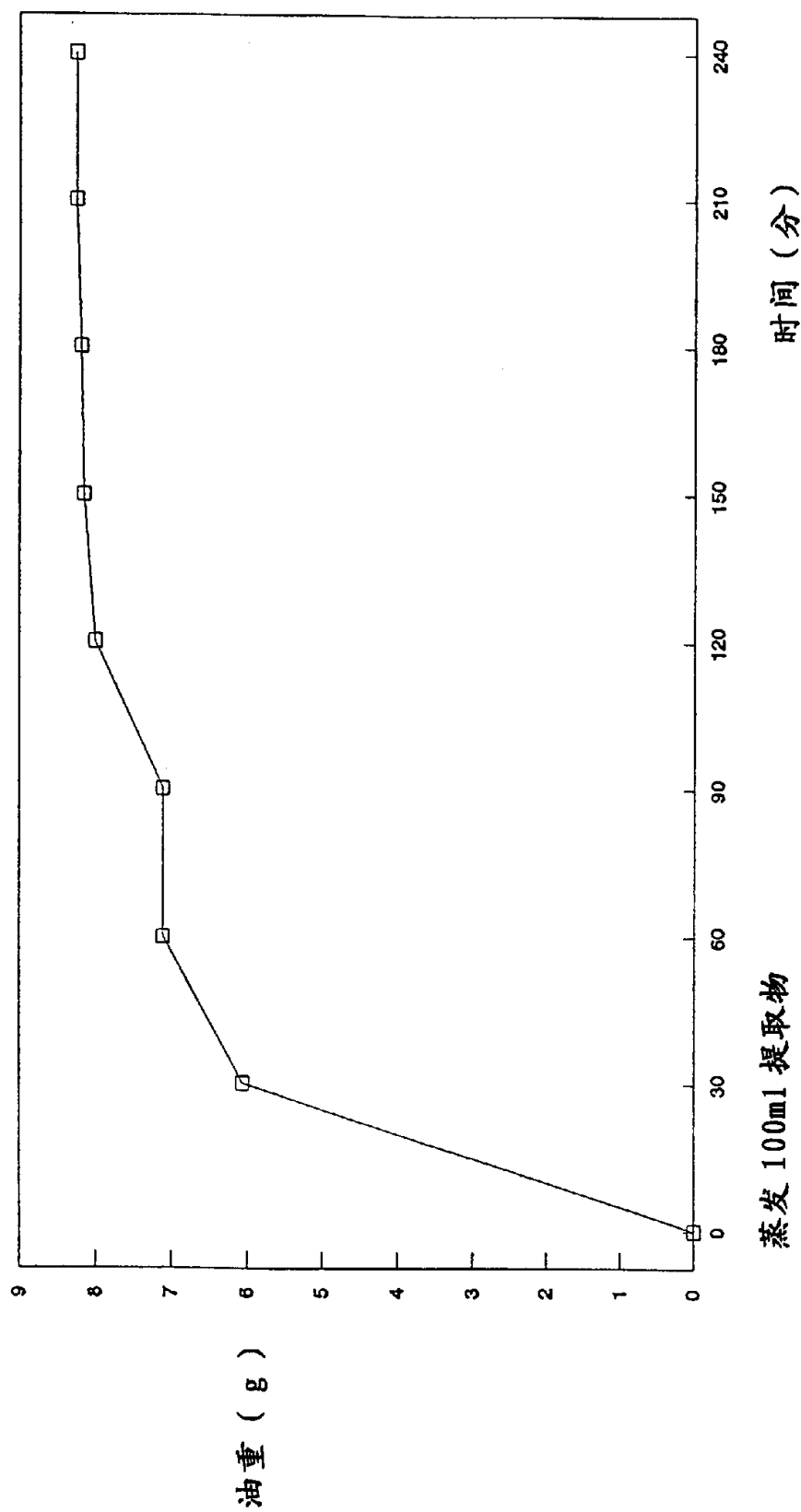


图 4