



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103060411 B

(45) 授权公告日 2014. 02. 05

(21) 申请号 201310001723. 9

(22) 申请日 2013. 01. 05

(83) 生物保藏信息

CCTCC NO:M2012342 2012. 09. 12

(73) 专利权人 义马煤业集团煤生化高科技工程  
有限公司

地址 472300 河南省三门峡市义马市煤化工  
产业集聚区

(72) 发明人 乔国厚 王兰甫 苟万晓 胡元森  
张寅 曹敏 樊崇 张国杰  
许宗浩 卫红伟 田亚鹏 朱广有  
王霞

(74) 专利代理机构 郑州天阳专利事务所(普通  
合伙) 41113

代理人 宋金鼎

(51) Int. Cl.

C12P 21/06(2006. 01)

C12N 1/16(2006. 01)

C12R 1/84(2006. 01)

(56) 对比文件

US 6258559 B1, 2001. 07. 10, 全文.

CN 101778947 A, 2010. 07. 14, 全文.

CN 101939410 A, 2011. 01. 05, 全文.

CN 1167152 A, 1997. 12. 10, 全文.

温刘发等. 抗菌肽酵母制剂的生产及其作饲料  
添加剂应用价值的探讨. 《广东蚕业》. 2001, 第  
35卷(第2期), 第34-36页.

Taisuke Yano, et al.. Activation of the  
oxidative stress regulator PpYap1 through  
conserved cysteine residues during methanol  
metabolism in the yeast *Pichia pastoris*.  
《Biosci. Biotechnol. Biochem.》. 2009, 第73  
卷(第7期), 第1404-1411页.

审查员 皇甫洁琼

权利要求书3页 说明书6页

(54) 发明名称

一种甲醇蛋白肽的生产方法

(57) 摘要

本发明涉及甲醇蛋白肽的生产方法, 有效解决单细胞蛋白作为饲料添加剂后, 出现消化不良、转化效率低的问题, 巴斯德毕赤酵母 HGD-01 菌株接种至 YPD 斜面培养基上, 得试管斜面种子, 试管斜面种子接种到 YPD 液体培养基上, 得摇瓶一级种子, 摇瓶一级种子接种到 BSM 液体培养基上, 得二级种子, 二级种子移种到发酵培养基中发酵得发酵液, 灭活后过滤收集滤饼, 加水稀释得滤饼稀释液, 蛋白酶粉加水溶解, 倒入滤饼稀释液中酶解, 得酶解液, 灭活, 过滤, 收集滤液、滤饼, 回流再次酶解, 收集压滤酶解液, 超滤浓缩, 加淀粉搅拌, 喷雾干燥, 本发明具有蛋白肽含量高, 氨基酸组成合理, B 族维生素丰富的特点, 可作为替代畜禽饲料蛋白的理想原料。

1. 一种甲醇蛋白肽的生产方法,其特征在于,包括如下步骤:

1)、摇瓶一级种子培养

分类命名为巴斯德毕赤酵母 HGD-01 的菌株,已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为:CCTCC NO:M2012342;将巴斯德毕赤酵母 HGD-01 的菌株 0.5mL 用划线法接种至 YPD 试管斜面培养基上,30℃ 培养 48 小时,得试管斜面种子,取 1 支试管斜面种子,用 10mL 无菌水将斜面种子全部冲洗下来,接种到装有 300mL YPD 液体培养基的三角瓶中,瓶口用 8 层纱布包好,摇床振荡培养,培养温度 30℃,摇床转速 220rpm,培养 24~30 小时后,菌体 OD<sub>600</sub> 达到 3~5,获得摇瓶一级种子;所述的 YPD 试管斜面培养基是由重量百分比计的 1% 酵母提取物、2% 胰蛋白胨、2% 葡萄糖、2% 琼脂和余量的水混合在一起组成;所述的 YPD 液体培养基是由重量百分比计的 1% 酵母提取物、2% 胰蛋白胨、2% 葡萄糖和余量的水混合在一起组成;

2)、二级种子培养

二级种子培养在 50L 发酵罐中进行,具体如下:50L 发酵罐装 30L 的 BSM 液体培养基,BSM 液体培养基灭菌后,用氨水调 BSM 液体培养基 pH 值至 4.5~5.0,然后将摇瓶一级种子 300mL 全部接种到 50L 发酵罐内 pH 值为 4.5~5.0 的 BSM 液体培养基上,接种时罐压为 0.05~0.10MPa,培养时,培养温度 30~32℃,通风比 1:1~1.5 vvm,罐压 0.05MPa, pH4.5~5.0,培养周期 24~30h,得二级种子;所述的 BSM 液体培养基为:质量浓度 85% 磷酸 15mL/L,二水硫酸钙 0.4g/L,硫酸钾 8 g/L,七水硫酸镁 6 g/L,甘油 36g/L 和微量元素溶液 3 mL/L 加水制成,也就是说 BSM 液体培养基为质量浓度 85% 磷酸 15mL,二水硫酸钙 0.4g,硫酸钾 8 g,七水硫酸镁 6 g,甘油 36g 和微量元素溶液 3 mL 加水至 1 L;所述的微量元素溶液为:五水硫酸铜 14g/L,碘化钾 0.08g/L,一水硫酸锰 4g/L,二水钼酸钠 0.1g/L,硼酸 0.1g/L,六水合氯化钴 1g/L,氯化锌 36g/L、七水合硫酸亚铁 65g/L 和质量浓度为 98% 的浓硫酸 5mL/L 加水制成,也就是说微量元素溶液为五水硫酸铜 14g,碘化钾 0.08g,一水硫酸锰 4g,二水钼酸钠 0.1g,硼酸 0.1g,六水合氯化钴 1g,氯化锌 36g、七水合硫酸亚铁 65g 和质量浓度为 98% 的浓硫酸 5mL 加水至 1L;

3)、发酵生产甲醇蛋白

A、发酵培养基的配方和比例与上述 BSM 液体培养基相同:5m<sup>3</sup> 发酵罐内装发酵培养基 3m<sup>3</sup>,打开蒸汽阀,通蒸汽进入罐体外盘管及罐体内,用蒸汽将发酵罐中发酵培养基进行灭菌,打开压力表,待罐内压力升到 0.15MPa 时,调节蒸汽阀门使罐体温度保持在 120℃~125℃,保温 30min,同时对与罐体连接的空气过滤器进行蒸汽灭菌,灭菌结束后,对发酵培养基进行降温,当罐内发酵培养基温度降至 30~35℃时,用质量浓度为 35% 的氨水调节发酵培养基 pH 至 4.5~5.0;

B、将二级种子 30L 移种到 5m<sup>3</sup> 发酵罐内 pH 为 4.5~5.0 的发酵培养基中开始发酵,发酵温度 30~32℃,通风比 1:1.5~2 vvm,罐压 0.04MPa, pH4.5~5.0,培养 16~20h,罐内菌体 OD<sub>600</sub> 达到 32~35,湿重达到 80~100g/L,向罐内流加甲醇,甲醇流加量为 5~6 克/升·小时,打开空气进口阀门,保持罐内溶氧在 30% 以上,当溶氧高于 60% 以上时,加大甲醇流加量,最大流加量达到 10~15 克/升·小时,发酵过程中,每 12 小时补加一次微量元素溶液,每次流加 2 升,直至发酵结束,发酵 72~84 小时后,菌体湿重达 300~360g/L,得发酵液;用蒸汽对罐内发酵液进行灭活处理,发酵液温度达 100℃,保温时间 30min 后,对发酵液降温至 60℃~65℃;

#### 4)、单细胞菌体蛋白的收集与酶解

降温至 60℃~65℃的发酵液用箱式隔膜压滤机过滤,板框过滤面积 30m<sup>2</sup>,过滤流速 0.5~1.5m<sup>3</sup>/h,板框工作压力 0.3~0.5MPa,过滤完成后,将箱式隔膜压滤机上的滤饼清洗下来,投加到 5m<sup>3</sup>的发酵液储罐中,向罐中加入清水将滤饼稀释,清水和滤饼的体积比为 3:1,搅拌均匀,得菌体蛋白稀释液,用向外盘管输入热蒸汽或冷水方式将菌体蛋白稀释液温度调整到 45~50℃,然后称取蛋白酶粉用水溶解,得蛋白酶溶液,以每立方米菌体蛋白稀释液中添加 5Kg 蛋白酶粉的量,将蛋白酶溶液倒入 2m<sup>3</sup> 菌体蛋白稀释液中并搅拌均匀,在 45~50℃,酶解,当水解度达 75%以上时,得酶解液,打开蒸汽阀门,对罐内酶解液中的蛋白酶进行灭活,罐内温度达 100℃,保温时间 20min;

所述的蛋白酶粉型号 SUKAPro AC PW50, 50000U/g;

#### 5)、酶解液的板框压滤及甲醇蛋白肽的提取

将上述酶解液经箱式隔膜压滤机过滤,收集滤液和滤饼,滤液和滤饼再回收到步骤 4) 中的 5m<sup>3</sup> 发酵液储罐内用步骤 4) 同样的方法和用量进行酶解,得压滤酶解液;

压滤酶解液用超滤膜进行浓缩,超滤膜面积 22m<sup>2</sup>,过滤压力 0.6MPa,温度 30℃,得浓缩液,浓缩液中为截获的分子量在 5000Da 以上的小分子蛋白肽;

#### 6)、浓缩液喷雾干燥

在浓缩液中添加浓缩液体积 5% 的淀粉并搅拌均匀,用喷雾干燥机,进行喷雾干燥,调节进口温度至 130~150℃、出口温度至 65-80℃,调节进料流量为 0.5 吨/小时,收集蛋白肽干粉。

2. 根据权利要求 1 所述的甲醇蛋白肽的生产方法,其特征在于,包括如下步骤:1)、摇瓶一级种子培养

将巴斯德毕赤酵母 HGD-01 的菌株用划线法接种至 YPD 试管斜面培养基上,30℃培养 48 小时,得试管斜面种子,取 1 支试管斜面种子,用 10mL 无菌水将斜面种子全部冲洗下来,接种到装有 300mL YPD 液体培养基的三角瓶中,瓶口用 8 层纱布包好,摇床振荡培养,培养温度 30℃,摇床转速 220rpm,培养 28 小时后,菌体 OD<sub>600</sub> 达到 4,获得摇瓶一级种子;

#### 2)、二级种子培养

50L 发酵罐装 30L 的 BSM 液体培养基,BSM 液体培养基灭菌后,用氨水调 BSM 液体培养基 pH 值至 4.8,然后将摇瓶一级种子 300mL 全部接种到 50L 发酵罐内 pH 值为 4.8 的 BSM 液体培养基上,接种时罐压为 0.05-0.10MPa,培养时,培养温度 30℃,通风比 1:1~1.5 vvm,罐压 0.05MPa, pH4.8,培养周期 28h,得二级种子;

#### 3)、发酵生产甲醇蛋白

A、发酵培养基的配方和比例与 BSM 液体培养基相同:5m<sup>3</sup> 发酵罐内装发酵培养基 3m<sup>3</sup>,打开蒸汽阀,通蒸汽进入罐体外盘管及罐体内,用蒸汽将发酵罐中发酵培养基进行灭菌,打开压力表,待压力升到 0.15MPa 时,调节蒸汽阀门使罐体温度保持在 120℃~125℃,保温 30min,同时对与罐体连接的空气过滤器进行蒸汽灭菌,灭菌结束后,对发酵培养基进行降温,当罐内发酵培养基温度降至 32℃时,用质量浓度为 35% 的氨水调节发酵培养基 pH 至 4.8;

B、将二级种子 30L 移种到 5m<sup>3</sup> 发酵罐内 pH 为 4.8 的发酵培养基中开始发酵,发酵温度 30℃,通风比 1:1.7 vvm,罐压 0.04MPa, pH4.8,培养 18h,罐内菌体 OD<sub>600</sub> 达到 33,湿重达到

90g/L, 向罐内流加甲醇, 甲醇流加量为 5 ~ 6 克 / 升 · 小时, 打开空气进口阀门, 保持罐内溶氧在 30% 以上, 当溶氧高于 60% 以上时, 加大甲醇流加量, 最大流加量达到 12 克 / 升 · 小时, 发酵过程中, 每 12 小时补加一次微量元素溶液, 每次流加 2 升, 直至发酵结束, 发酵 80 小时后, 菌体湿重达 330g/L, 得发酵液; 用蒸汽对罐内发酵液进行灭活处理, 发酵液温度达 100℃, 保温时间 30min, 将发酵液降温至 65℃;

#### 4)、单细胞菌体蛋白的收集与酶解

降温至 65℃ 的发酵液用箱式隔膜压滤机过滤, 板框过滤面积 30m<sup>2</sup>, 过滤流速 1m<sup>3</sup>/h, 板框工作压力 0.4MPa, 过滤完成后, 将箱式隔膜压滤机上的滤饼清洗下来, 投加到发酵液储罐中 0.5m<sup>3</sup> 滤饼, 向罐中加入 1.5m<sup>3</sup> 的清水将滤饼稀释, 搅拌均匀, 得菌体蛋白稀释液, 降温至 48℃, 然后称取 10Kg 蛋白酶粉, 用水溶解, 倒入菌体蛋白稀释液中并搅拌均匀, 在 48℃, 酶解 4 ~ 5h, 水解度达 75% 以上, 得酶解液, 打开蒸汽阀门, 对罐内酶解液进行灭活, 罐内温度达 100℃, 保温时间 20min;

#### 5)、酶解液的板框压滤及甲醇蛋白肽的提取

将上述酶解液经箱式隔膜压滤机过滤, 收集滤液和滤饼, 滤液和滤饼再回收至步骤 4) 中的发酵液储罐内用步骤 4) 同样的方法和用量进行酶解, 得压滤酶解液;

取 1.8 ~ 2.0m<sup>3</sup> 压滤酶解液用超滤膜进行浓缩, 超滤膜面积 22m<sup>2</sup>, 过滤压力 0.6MPa, 温度 30℃, 得浓缩液, 浓缩液中为截获的分子量在 5000Da 以上的小分子蛋白肽, 浓缩液体积 0.6 ~ 0.8m<sup>3</sup>;

#### 6)、浓缩液喷雾干燥

在浓缩液中添加浓缩液体积 5% 的淀粉并搅拌均匀, 用喷雾干燥机, 进行喷雾干燥, 调节进口温度至 130 ~ 150℃、出口温度至 65-80℃, 调节进料流量为 0.5 吨 / 小时, 收集蛋白肽干粉。

## 一种甲醇蛋白肽的生产方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物领域,特别是一种甲醇蛋白肽的生产方法。

### 背景技术

[0002] 应用发酵法生产单细胞蛋白作为饲料,在国内外已有较多报导,部分加工工艺较为成熟,如用假丝酵母、酿酒酵母等作为发酵菌种,以甜菜渣、啤酒糟、柑橘废渣、糖蜜等一些农副产品为原料生产的单细胞蛋白报道较多。目前,以甲醇为主要碳源生产单细胞蛋白的报道还不多,国内外生产甲醇蛋白的方法主要有细菌发酵法和酵母菌发酵法,细菌法包括英国的 ICI 法、德国的 Hoechst-Uhde 法和瑞典的 Norprotein 法;酵母菌种生产法包括日本的 MGC 法、法国的 IFP 法和美国的 Philips Petroleum 法,除 ICI 法工业化生产外(目前已停产),其他均未工业化。我国部分研究单位公布的实验室小试生产甲醇蛋白方法多是利用酵母菌生产单细胞蛋白,此蛋白的主要用作动物饲料添加。但研究表明,动物对此类蛋白的消化利用率较低,甚至出现消化不良的情况。

### 发明内容

[0003] 针对上述情况,为克服现有技术缺陷,本发明之目的就是提供一种甲醇蛋白肽的生产方法,可有效解决单细胞蛋白作为饲料添加剂后,出现消化不良、转化效率低的问题。

[0004] 本发明解决的技术方案是,包括如下步骤:首先将巴斯德毕赤酵母 HGD-01 菌株接种至 YPD 试管斜面培养基上,培养得试管斜面种子,试管斜面种子接种到 YPD 液体培养基上,培养得摇瓶一级种子,摇瓶一级种子接种到 pH 值为 4.5 ~ 5.0 的 BSM 液体培养基上,培养得二级种子,将二级种子全部移种到发酵罐内的发酵培养基中进行甲醇蛋白的发酵生产,发酵 72 ~ 84 小时后,取样测定发酵液菌体湿重达 300 ~ 360g/L,得发酵液,经灭活后用箱式隔膜压滤机进行板框过滤收集滤饼(即菌体蛋白),然后将滤饼置于发酵液储罐中,加入滤饼体积 3 倍的水稀释并搅拌均匀,得滤饼稀释液,再对滤饼稀释液降温至 45 ~ 50℃,然后取蛋白酶粉(苏柯汉生物工程有限公司,产品型号 SUKAPro AC PW 50,50000U/g),加水溶解,倒入滤饼稀释液(又称菌体蛋白稀释液)中,蛋白酶粉的用量为每立方米滤饼稀释液中加 5Kg 蛋白酶粉,酶解,当水解度达到 75% 以上时,得酶解液,灭活后,经箱式隔膜压滤机(820-U 型,徐州市添缘压滤机厂)过滤,收集滤液、滤饼,回流再次酶解,收集压滤酶解液后用超滤膜(上海赛奥分离技术工程有限公司)进行超滤浓缩,最后向浓缩液添加淀粉并搅拌均匀,进行喷雾干燥,收集蛋白肽干粉,即得甲醇蛋白肽。

[0005] 本发明所用巴斯德毕赤酵母 HGD-01 菌体蛋白含量高达 56%,能以甲醇为主要碳源,以氨水为氮源,辅以磷酸,二水硫酸钙,硫酸钾,七水硫酸镁,甘油和微量元素溶液等制成无机盐发酵培养基进行甲醇蛋白生产。本发明已对 50L、500L 及 5m<sup>3</sup> 发酵罐获得的甲醇蛋白进行甲醇蛋白肽的生产,经过 5m<sup>3</sup> 发酵罐中试验生产表明,本发明生产的单细胞蛋白具有蛋白肽含量高,氨基酸组成合理,B 族维生素丰富的特点,可作为替代畜禽饲料蛋白的理想原料。

## 具体实施方式

[0006] 以下结合实际情况对本发明的具体实施方式作详细说明。

[0007] 本发明包括如下步骤：

[0008] 1)、摇瓶一级种子培养

[0009] 分类命名为巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) HGD-01 的菌株,已保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏编号为:CCTCC NO:M2012342,保藏日期为:2012年9月12日;将巴斯德毕赤酵母 HGD-01 的菌株 0.5mL 用划线法接种至 YPD 试管斜面培养基(试管规格 180mm×20mm)上,30℃培养 48 小时,得试管斜面种子,取 1 支试管斜面种子,用 10mL 无菌水将斜面种子全部冲洗下来,接种到装有 300mL YPD 液体培养基的三角瓶中,瓶口用 8 层纱布包好,摇床振荡培养,培养温度 30℃,摇床转速 220rpm,培养 24~30 小时后,菌体 OD<sub>600</sub> 达到 3~5,获得摇瓶一级种子;所述的 YPD 试管斜面培养基是由重量百分比计的 1% 酵母提取物(oxiod 公司产品,公知技术,下同)、2% 胰蛋白胨(oxiod 公司产品,公知技术,下同)、2% 葡萄糖、2% 琼脂(北京奥博星化学试剂有限公司产品,公知技术,下同)和余量的水混合在一起组成;所述的 YPD 液体培养基是由重量百分比计的 1% 酵母提取物、2% 胰蛋白胨、2% 葡萄糖和余量的水混合在一起组成;

[0010] 2)、二级种子培养

[0011] 二级种子培养在 50L 发酵罐中进行,具体如下:50L 发酵罐装 30L 的 BSM 液体培养基,BSM 液体培养基灭菌后,用氨水调 BSM 液体培养基 pH 值至 4.5~5.0,然后将摇瓶一级种子 300mL 全部接种到 50L 发酵罐内 pH 值为 4.5~5.0 的 BSM 液体培养基上,移种前检查种子质量,镜检菌体整齐,健壮,出芽数在 2~3 个,无杂菌污染,接种时罐压为 0.05~0.10MPa,培养时,培养温度 30~32℃,通风比 1:1~1.5 vvm,罐压 0.05MPa, pH4.5~5.0,培养周期 24~30h,得二级种子;所述的 BSM 液体培养基为:质量浓度 85% 磷酸 15mL/L,二水硫酸钙 0.4g/L,硫酸钾 8 g/L,七水硫酸镁 6 g/L,甘油 36g/L 和微量元素溶液 3 mL/L 加水制成,也就是说 BSM 液体培养基为质量浓度 85% 磷酸 15mL,二水硫酸钙 0.4g,硫酸钾 8 g,七水硫酸镁 6 g,甘油 36g 和微量元素溶液 3 mL 加水至 1 L;所述的微量元素溶液为:五水硫酸铜 14g/L,碘化钾 0.08g/L,一水硫酸锰 4g/L,二水钼酸钠 0.1g/L(北京奥博星化学试剂公司产品,公知技术,下同),硼酸 0.1g/L,六水合氯化钴 1g/L(北京奥博星化学试剂公司产品,公知技术,下同),氯化锌 36g/L、七水合硫酸亚铁 65g/L 和质量浓度为 98% 的浓硫酸 5mL/L 加水制成,也就是说微量元素溶液为五水硫酸铜 14g,碘化钾 0.08g,一水硫酸锰 4g,二水钼酸钠 0.1g,硼酸 0.1g,六水合氯化钴 1g,氯化锌 36g、七水合硫酸亚铁 65g 和质量浓度为 98% 的浓硫酸 5mL 加水至 1L;

[0012] 3)、发酵生产甲醇蛋白

[0013] A、发酵培养基的配方和比例与上述 BSM 液体培养基相同:5m<sup>3</sup> 发酵罐内装发酵培养基 3m<sup>3</sup>,打开蒸汽阀,通蒸汽进入罐体外盘管及罐体内,用蒸汽将发酵罐中发酵培养基进行灭菌,打开压力表,待罐内压力升到 0.15MPa 时,调节蒸汽阀门使罐体温度保持在 120℃~125℃,保温 30min,同时对与罐体连接的空气过滤器进行蒸汽灭菌,灭菌结束后,对发酵培养基进行降温,当罐内发酵培养基温度降至 30~35℃时,用质量浓度为 35% 的氨水调节发酵培养基 pH 至 4.5~5.0;

[0014] B、将二级种子 30L 移种到 5m<sup>3</sup> 发酵罐内 pH 为 4.5 ~ 5.0 的发酵培养基中开始发酵, 发酵温度 30 ~ 32℃, 通风比 1 : 1.5 ~ 2 vvm, 罐压 0.04MPa, pH 4.5 ~ 5.0, 培养 16 ~ 20h, 发酵培养基中的甘油消耗完, 溶氧开始持续上升, 罐内菌体 OD<sub>600</sub> 达到 32 ~ 35, 湿重达到 80 ~ 100g/L, 向罐内流加甲醇, 甲醇流加量为 5 ~ 6 克 / 升 · 小时, 打开空气进口阀门, 保持罐内溶氧在 30% 以上, 当溶氧高于 60% 以上时, 加大甲醇流加量, 最大流加量达到 10 ~ 15 克 / 升 · 小时, 发酵过程中, 每 12 小时补加一次微量元素溶液, 每次流加 2 升, 直至发酵结束, 发酵 72 ~ 84 小时后, 取样测定菌体湿重达 300 ~ 360g/L, 得发酵液 ; 用蒸汽对罐内发酵液进行灭活处理, 发酵液温度达 100℃, 保温时间 30min 后, 对发酵液降温至 60℃ ~ 65℃ ;

[0015] 4)、单细胞菌体蛋白的收集与酶解

[0016] 降温至 60℃ ~ 65℃ 的发酵液用箱式隔膜压滤机 (820-U 型, 徐州市添缘压滤机厂) 过滤, 板框过滤面积 30m<sup>2</sup>, 过滤流速 0.5 ~ 1.5m<sup>3</sup>/h, 板框工作压力 0.3 ~ 0.5MPa, 过滤完成后, 将箱式隔膜压滤机上的滤饼清洗下来, 投加到 5m<sup>3</sup> 的发酵液储罐中, 向罐中加入清水将滤饼稀释, 清水和滤饼的体积比为 3 : 1, 搅拌均匀, 得菌体蛋白稀释液, 用向外盘管输入热蒸汽或冷水方式将菌体蛋白稀释液温度调整到 45 ~ 50℃, 然后称取蛋白酶粉 (苏柯汉生物工程有限公司, 产品型号 SUKAPro AC PW 50, 50000U/g) 用水溶解, 得蛋白酶溶液, 以每立方米菌体蛋白稀释液中添加 5Kg 蛋白酶粉的量, 将蛋白酶溶液倒入 2m<sup>3</sup> 菌体蛋白稀释液中并搅拌均匀, 在 45 ~ 50℃, 酶解, 酶解过程中, 每 30min 取样测定水解度, 当水解度达 75% 以上时, 得酶解液, 打开蒸汽阀门, 对罐内酶解液中的蛋白酶进行灭活, 罐内温度达 100℃, 保温时间 20min ;

[0017] 5)、酶解液的板框压滤及甲醇蛋白肽的提取

[0018] 将上述酶解液经箱式隔膜压滤机 (820-U 型, 徐州市添缘压滤机厂) 过滤, 收集滤液和滤饼, 滤液和滤饼再回收至步骤 4) 中的 5m<sup>3</sup> 发酵液储罐内用步骤 4) 同样的方法和用量进行酶解, 得压滤酶解液 ;

[0019] 压滤酶解液用超滤膜 (上海赛奥分离技术工程有限公司, 膜元件型号 SG-UE-P5-4040) 进行浓缩, 超滤膜面积 22m<sup>2</sup>, 过滤压力 0.6MPa, 温度 30℃, 得浓缩液, 浓缩液中为截获的分子量在 5000Da 以上的小分子蛋白肽 ;

[0020] 6)、浓缩液喷雾干燥

[0021] 在浓缩液中添加浓缩液体积 5% 的淀粉并搅拌均匀, 用喷雾干燥机, 进行喷雾干燥, 调节进口温度至 130 ~ 150℃、出口温度至 65-80℃, 调节进料流量为 0.5 吨 / 小时, 收集蛋白肽干粉 (即甲醇蛋白肽)。

[0022] 实施例 1 :

[0023] 1)、摇瓶一级种子培养

[0024] 将巴斯德毕赤酵母 HGD-01 的菌株用划线法接种至 YPD 试管斜面培养基上, 30℃ 培养 48 小时, 得试管斜面种子, 取 1 支试管斜面种子, 用 10mL 无菌水将斜面种子全部冲洗下来, 接种到装有 300mL YPD 液体培养基的三角瓶中, 瓶口用 8 层纱布包好, 摇床振荡培养, 培养温度 30℃, 摇床转速 220rpm, 培养 28 小时后, 菌体 OD<sub>600</sub> 达到 4, 获得摇瓶一级种子 ;

[0025] 2)、二级种子培养

[0026] 50L 发酵罐装 30L 的 BSM 液体培养基, BSM 液体培养基灭菌后, 用氨水调 BSM 液体培养基 pH 值至 4.8, 然后将摇瓶一级种子 300mL 全部接种到 50L 发酵罐内 pH 值为 4.8 的 BSM

液体培养基上,移种前检查种子质量,镜检菌体整齐,健壮,出芽数在 2~3 个,无杂菌污染,接种时罐压为 0.05-0.10MPa,培养时,培养温度 30℃,通风比 1:1~1.5 vvm,罐压 0.05MPa, pH4.8,培养周期 28h,得二级种子;

### [0027] 3)、发酵生产甲醇蛋白

[0028] A、发酵培养基的配方和比例与 BSM 液体培养基相同:5m<sup>3</sup> 发酵罐内装发酵培养基 3m<sup>3</sup>,打开蒸汽阀,通蒸汽进入罐体外盘管及罐体内,用蒸汽将发酵罐中发酵培养基进行灭菌,打开压力表,待压力升到 0.15MPa 时,调节蒸汽阀门使罐体温度保持在 120℃~125℃,保温 30min,同时对与罐体连接的空气过滤器进行蒸汽灭菌,灭菌结束后,对发酵培养基进行降温,当罐内发酵培养基温度降至 32℃时,用质量浓度为 35% 的氨水调节发酵培养基 pH 至 4.8;

[0029] B、将二级种子 30L 移种到 5m<sup>3</sup> 发酵罐内 pH 为 4.8 的发酵培养基中开始发酵,发酵温度 30℃,通风比 1:1.7 vvm,罐压 0.04MPa, pH4.8,培养 18h,发酵培养基中的甘油消耗完,溶氧开始持续上升,罐内菌体 OD<sub>600</sub> 达到 33,湿重达到 90g/L,向罐内流加甲醇,甲醇流加量为 5~6 克/升·小时,打开空气进口阀门,保持罐内溶氧在 30% 以上,当溶氧高于 60% 以上时,加大甲醇流加量,最大流加量达到 12 克/升·小时,发酵过程中,每 12 小时补加一次微量元素溶液,每次流加 2 升,直至发酵结束,发酵 80 小时后,取样测定菌体湿重达 330g/L,得发酵液;用蒸汽对罐内发酵液进行灭活处理,发酵液温度达 100℃,保温时间 30min,将发酵液降温至 65℃;

### [0030] 4)、单细胞菌体蛋白的收集与酶解

[0031] 降温至 65℃的发酵液用箱式隔膜压滤机过滤,板框过滤面积 30m<sup>2</sup>,过滤流速 1m<sup>3</sup>/h,板框工作压力 0.4MPa,过滤完成后,将箱式隔膜压滤机上的滤饼清洗下来,投加到发酵液储罐中 0.5m<sup>3</sup> 滤饼,向罐中加入 1.5m<sup>3</sup> 的清水将滤饼稀释,搅拌均匀,得菌体蛋白稀释液,降温至 48℃,然后称取 10Kg 蛋白酶粉,用水溶解,倒入菌体蛋白稀释液中并搅拌均匀,在 48℃,酶解 4~5h,酶解过程中,每 30min 取样测定水解度,水解度达 75% 以上,得酶解液,打开蒸汽阀门,对罐内酶解液进行灭活,罐内温度达 100℃,保温时间 20min;

### [0032] 5)、酶解液的板框压滤及甲醇蛋白肽的提取

[0033] 将上述酶解液经箱式隔膜压滤机(820-U 型,徐州市添缘压滤机厂)过滤,收集滤液和滤饼,滤液和滤饼再回收到步骤 4) 中的发酵液储罐内用步骤 4) 同样的方法和用量进行酶解,得压滤酶解液;

[0034] 取 1.8~2.0m<sup>3</sup> 压滤酶解液用超滤膜进行浓缩,超滤膜面积 22m<sup>2</sup>,过滤压力 0.6MPa,温度 30℃,得浓缩液,浓缩液中为截获的分子量在 5000Da 以上的小分子蛋白肽,浓缩液体积 0.6~0.8m<sup>3</sup>;

### [0035] 6)、浓缩液喷雾干燥

[0036] 在浓缩液中添加浓缩液体积 5% 的淀粉并搅拌均匀,用喷雾干燥机,进行喷雾干燥,调节进口温度至 130~150℃、出口温度至 65-80℃,调节进料流量为 0.5 吨/小时,收集蛋白肽干粉,称重,25 公斤/袋,包装。

[0037] 本发明用甲醇和氨水作为主要碳源和氮源,配以无机盐和微量元素溶液配制成发酵培养基,利用巴斯德毕赤酵母 HGD-01 在该培养基中发酵获得单细胞菌体蛋白,再对菌体进行灭活处理,对灭活菌体蛋白进行酶解获得小分子甲醇蛋白肽。其中,发酵液先经 100℃



处理 30min 以使单细胞蛋白变性,用酶活力  $1 \times 10^5$  U/g 的蛋白酶进行酶解,酶解结束后再用 100℃ 高温处理 20min 使酶蛋白失活;酶解液需先经压滤板框过滤去除部分未酶解菌体,再用超滤膜截获 5000Da 以上的小分子蛋白肽,最后将超滤浓缩液添加 5% 的淀粉再进行喷雾干燥,获得小分子甲醇蛋白肽成品;本发明甲醇蛋白肽的粗蛋白含量  $\geq 56\%$ ,蛋白小肽  $\geq 40\%$ ,细胞壁多糖含量大于 5%;大大提高了甲醇蛋白饲料的功能性作用。

[0038] 其中,甲醇转化率达 45% 以上,发酵周期短、遗传稳定性和安全性好,经 50 吨发酵罐进行工业化中试表明,本发明实现了工业化生产,具体如下:

[0039] 对 8 批次的 5L 和 10L 发酵罐中发酵的甲醇蛋白产量分别进行检测(见表 1),5L 发酵罐中各批次湿菌体产量均在 108-150g/L 之间,其平均值为 125g/L;10L 发酵罐中各批次湿菌体产量均在 180-250g/L 之间,其平均值为 212.5g/L。

[0040] 表 1. 8 批次的 5L 和 10L 发酵罐甲醇蛋白产量

[0041]

批次	1	2	3	4	5	6	7	8
产量 (g/L)								
5L 发酵罐	145	132	110	127	108	110	136	132
10L 发酵罐	217	220	242	189	206	219	214	193

[0042] 对 10 批次 50L 发酵罐发酵并对甲醇蛋白产量分别进行检测(见表 2),50L 发酵罐中各批次湿菌体产量均在 250-300g/L 之间,其平均值为 272g/L。该发酵结果比较稳定,每批次甲醇蛋白产量的偏差在 8% 以内。

[0043] 表 2 50L 发酵罐 10 批次甲醇蛋白发酵结果

[0044]

批次	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
产量 (g/L)										
50L 发酵罐	289	292	285	290	291	294	283	289	291	291

[0045] 对甲醇蛋白生产菌株在  $5\text{m}^3$  发酵罐进行的 6 批次发酵结果进行分析,发现发酵罐中各批次湿菌体产量均在 310-355g/L 之间,其平均值为 331g/L (表 3)。

[0046] 表 3. 6 批次的  $5\text{m}^3$  发酵罐甲醇蛋白产量

[0047]

批次	1	2	3	4	5	6
产量 (g/L)						
$5\text{m}^3$ 发酵罐	337	345	310	325	352	318

[0048] 对甲醇蛋白生产菌株在  $50\text{m}^3$  发酵罐的 6 批次产品进行跟踪检测,发酵罐中各批次湿菌体产量均在 350-400g/L,其平均值为 374g/L (表 4)。

[0049] 表 4. 6 批次的  $50\text{m}^3$  发酵罐甲醇蛋白产量

[0050]

批次 产量(g/L)	1	2	3	4	5	6
50m <sup>3</sup> 发酵罐	367	378	392	372	381	354

[0051] 本发明甲醇蛋白肽的喂养统计数据：

[0052] 试验组是在饲料中添加 20-30% 的本发明蛋白干粉，对照组是不添加本发明蛋白粉的饲料，饮水和饲养制度两组均相同。各选 227 只生畜，其中，仔猪 112 只，肉牛 115 只，选择体重 5-12 公斤，体重差异 25% 的仔猪，每天加料 6 次，平均每头仔猪日采食量为 512g，喂养 10 天，测试结果：试验组每头平均日增重 412g，成活率 96%，对照组每头平均日增重 350g，成活率 85%，仔猪试验组的体况明显优于对照组仔猪的体况；选用 260 公斤的肉牛，日喂 2 次，间隔 12 小时，早晚各喂 1 次，平均每头肉牛日采食量为 6.5 公斤，喂养 15 天，试验组肉牛的精神状态明显优于对照组，基本未出现畜群闹栏骚动，皮毛较光亮，肢蹄强健，试验组采食量高于对照组 10%；试验组比对照组平均增重 5-8%，试验组肉牛未出现疾病，未出现食欲不振及消化不良的现象，而对照组出现 5 例食欲不振，少食；肉牛试验组的体况明显优于对照组肉牛的体况，本发明生产的单细胞蛋白中活细胞数达 180 亿 /g，加到饲料中喂养动物，改善动物体内微生态环境，改善动物体质。本发明生产的甲醇蛋白肽是应用在功能性动物饲料原料的生产与添加中，可作为替代畜禽饲料蛋白的理想原料。并经大、小鼠急性毒性试验表明，本发明产品是一种安全、无副作用的的饲料添加剂，具有消化转化好的功能，对增加动物体重效果好，缩短出栏率，是饲料上的一大创新。