



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105166322 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201510149937. X

(22) 申请日 2015. 03. 31

(71) 申请人 台州艾希尔生物科技有限公司

地址 317299 浙江省台州市天台县赤城街道
栖霞东路 161 号

(72) 发明人 许建刚 宋建华 赵维韦 张鑫杰

(74) 专利代理机构 上海三方专利事务所 31127

代理人 吴玮 钱品兴

(51) Int. Cl.

A23J 3/20(2006. 01)

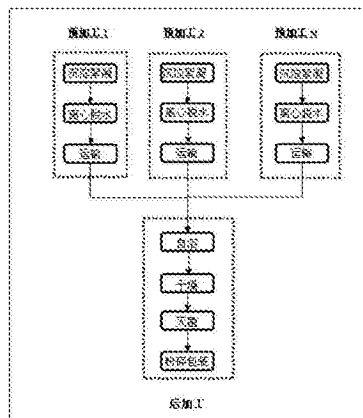
权利要求书2页 说明书13页 附图4页

(54) 发明名称

一种高产量使用自溶工艺生产好氧型单细胞蛋白的方法

(57) 摘要

本发明涉及单细胞蛋白加工技术领域,特别是涉及一种高产量使用自溶工艺生产好氧型单细胞蛋白的方法,其特征在于每个预加工单元中将离心脱水步骤后获得的物料,运输至后加工单元进行集中处理,所述的后加工单元包括自溶步骤、干燥步骤、灭菌步骤和粉碎包装步骤。本发明工艺及其制成的产品使用了自溶工艺,自溶过程中自溶酶充分分解大分子营养物及细胞壁,通过自溶可以产生较高含量的游离氨基酸、游离核苷酸,同时使得细胞壁多糖被分解,使细胞产生通透性从而确保活性物质可以流出细胞外,从而可以被动物直接吸收利用;采用了离心脱水后进行自溶,即可确保自溶的高效率,也可减少在自溶后的干燥工艺所需去除的水分含量,从而减少了干燥成本。



1. 一种高产量使用自溶工艺生产好氧型单细胞蛋白的方法,包括若干个预加工单元和一个后加工单元,预加工单元包括沉淀浓缩步骤、离心脱水步骤和运输步骤,其特征在于每个预加工单元中将离心脱水步骤后获得的 78%~85%含水率的物料,降温后运输至后加工单元进行集中处理,所述的后加工单元包括自溶步骤、干燥步骤、灭菌步骤和粉碎包装步骤,所述的自溶步骤如下:

a) 来自预加工单元的物料输送至保温料仓,然后输送至自溶设备进行自溶处理;

b) 自溶设备通过向双螺杆空心桨叶供热进行升温,达到自溶的温度要求,通过设计及调节与进料速度配套的腔体容积,来达到自溶的时间要求;

c) 所述自溶设备的双螺杆空心桨叶前 1/4 至 1/2 分段为加热段,目的是将物料加热至自溶所需温度,剩余分段为保温段,保持物料自溶温度;

d) 自溶的温度要求为:加热后的物料温度保持在 65%~95℃;

e) 自溶的时间要求为:加热段将物料升温至目标温度的时间应小于 30 分钟,保温段的自溶时间应在 30 分钟~360 分钟;

所述自溶的物料水分要求为:自溶后物料水分含量应不低于 70%;

所述的灭菌步骤采用微波灭菌。

2. 如权利要求 1 所述的一种高产量使用自溶工艺生产好氧型单细胞蛋白的方法,其特征在于所述的加热后的物料温度保持在 65%~80℃,自溶时间为 60~180 分钟。

3. 如权利要求 1 所述的一种高产量使用自溶工艺生产好氧型单细胞蛋白的方法,其特征在于所述的具体方法步骤的顺序如下:

(1) 预加工单元:

a. 沉淀浓缩:将生物反应器产生的菌体蛋白通过管道排入沉淀浓缩池,菌体蛋白在锥形的浓缩池底部沉淀,底部物料含水率降低至 97%以下,可进行后续脱水工序;

b. 使用抽料泵将浓缩池底部物料输送至离心脱水设备;

c. 离心脱水:使用螺旋卧式离心设备进行固液分离,离心后物料含水率降低至 78%~85%,物料呈湿泥状;所述的离心所脱去的水分为菌体蛋白的细胞外水分,胞内水分仍存留在细胞内,这为细胞内的内源酶进行自溶创造了条件;所述的离心后 78%~85%含水率的物料能进行自溶作用;

d. 运输:离心后的物料降温后运输至后加工单元进行集中处理;所述降温是在离心后物料降温至 10℃以下;所述运输是通过保温货车将预加工单元产出的湿泥状物料装运至后加工单元进行后续加工;所述运输的时间应在 0~12 小时内,物料到达后加工单元的料温不高于离开预加工单元时料温的 5℃;

(2) 后加工单元:

a. 自溶:来自预加工单元的物料输送至保温料仓,然后输送至自溶设备进行自溶处理;自溶设备通过向双螺杆空心桨叶供热进行升温,达到自溶的温度要求,通过设计及调节与进料速度配套的腔体容积,来达到自溶的时间要求;所述自溶设备的双螺杆空心桨叶前 1/4 至 1/2 分段为加热段,目的是将物料加热至自溶所需温度,剩余分段为保温段,保持物料自溶温度;自溶的温度要求为:加热后的物料温度保持在 65%~95℃;自溶的时间要求为:加热段将物料升温至目标温度的时间应小于 30 分钟,保温段的自溶时间应在 30 分钟~360 分钟;所述自溶的物料水分要求为:自溶后物料水分含量应不低于 70%;

b. 干燥 : 自溶后的物料通过蛟龙喂料机输送至气流闪蒸干燥设备进行干燥 ; 所述闪蒸干燥的物料接触温度应低于 100℃, 所述干燥后的物料的含水率应在 10% ~ 40% ;

c. 灭菌 : 经干燥后的物料通过气流提升设备输送至隧道式微波干燥灭菌设备进行灭菌 ; 所述微波灭菌后物料含水率为 5% ~ 10% ;

d. 粉碎包装 : 灭菌后的物料经粉碎后包装成成品。

4. 一种采用权利要求 1 所述的方法制得的好氧型单细胞蛋白, 其特征在于采用蛋白含量为 33% -60% 的菌体蛋白制得的好氧型单细胞蛋白 ; 蛋白含量 33.0% -60.0% ; 单位蛋白的游离核苷酸含量不低于 1.40% ; 单位蛋白的游离碱基含量不高于 0.90% ; , 游离碱基与游离核苷酸比值范围应在 0-0.60。

一种高产量使用自溶工艺生产好氧型单细胞蛋白的方法

[技术领域]

[0001] 本发明涉及单细胞蛋白加工技术领域,特别是涉及一种高产量使用自溶工艺生产好氧型单细胞蛋白的方法。

[背景技术]

[0002] 单细胞蛋白 (Single cell protein 简称 SCP) 又称微生物蛋白或菌体蛋白,是利用工业废水、废气、天然气、石油烷烃类、农副加工产品以及有机废弃物等作为培养基,培养酵母、非病源性细菌、微型菌、真菌等单细胞生物体,然后经过净化干燥处理后制成,是食品工业和饲料工业重要的蛋白质来源。单细胞蛋白产品含有丰富的蛋白质,氨基酸的种类齐全比例适当。单细胞蛋白还含有丰富的脂肪、碳水化合物、核酸、维生素和无机盐,并含有钙、磷、钾、铁、镁、钠、锰等矿物质元素,还含有多种酶。酵母、酵母水解物在动物饲料中已成功用于鱼粉蛋白的替代、动物免疫增强、饲料口感的改善等。单细胞蛋白中核苷酸及其衍生物具有非常重要的生理生化功能,主要的功能有:作为 RNA 和 DNA 合成的原料;作为代谢的调节物质;作为辅酶的成分,如辅酶 A;激活糖原和糖蛋白合成的重要中介物,也是磷脂合成的中介物,活化中间产物;参与遗传信息传递;ATP 是生命过程的直接能;AMP 调节平滑肌的收缩性并可调节血流量;核苷酸还可以作为甲基的供体等。

[0003] 由于有害微生物、有害化学物质、重金属等会对产品质量安全造成危害的考虑。目前已经或正在进行产业化开发的单细胞蛋白产品的品种较少,主要集中于使用安全风险低、来自于食品工业的产品或副产品作为原料进行单细胞蛋白的培养及生产。如啤酒酵母及酶解啤酒酵母作为饲料原料在动物上的使用,啤酒在生产时需要达到严格的食品安全标准,由其产生的有机质副产物和酵母蛋白的生物、化学、物理危害都达到最低,从而为饲料工业的应用提供可靠的安全保证。

[0004] 发明专利 W02009059163A1 提供了一种培养单细胞蛋白的方法,培养出来的单细胞蛋白可用作动物饲料中优质的蛋白源,该技术使用食品或饮料加工厂如啤酒厂产生的废水作为菌体培养的液体培养基。饮料废水中具有丰富的有机质、氮磷等营养物质,且没有有害微生物、有毒化学品的污染,虽然对于饮料工厂来说这些废水没有价值,且处理含有有机质和氮磷的废水会付出较大的成本,从微生物培养角度看,废水中的营养物质可以成为营养丰富的培养基,可以用来生产特定的单细胞蛋白。发明专利 W02009059163A1 通过调节废水中各种营养物质的比例、使用经基因改良的细菌可生产出蛋白含量较高、营养价值高的单细胞蛋白产品,该单细胞蛋白是一种细菌的混合物,主要含有微球菌、芽孢杆菌、硝化细菌、产碱杆菌属等好氧型细菌。同时,饮料废水在培养微生物后营养物质含量会降低,这降低了水质污染的程度,该专利技术既可以实现高质量蛋白的生产又能将废水中有机物浓度降低至法定标准以下,从而具有经济 and 环境保护的双重价值,因此该技术具有非常良好的产业化前景。由于细菌的生长周期短、养料利用效率高,单细胞蛋白培养的产量非常高,这为产业化开发提供经济上的保证,但是由于细菌生长的特点,培养时固形物的含量很低,一般会低于 4000mg/L。如果要将单细胞蛋白加工成产品,就需要考虑如何将单细胞蛋白从水中提

取出来并低成本的加工成低水分含量的干品。基于发明专利 W02009059163A1 中描述的单细胞蛋白的特性,目前的加工技术具有以下缺陷:

[0005] 1) 加工工艺只是将单细胞蛋白当作普通蛋白原料进行生产,只是集中于蛋白的脱水、干燥、灭菌,是以生产蛋白为目标,未考虑到发明专利 W02009059163A1 中的细菌可通过进一步的加工方法生产出高质量的产品;

[0006] 2) 发明专利 W02009059163A1 技术培养出的单细胞蛋白经过研究发现含有大量内源酶,具体包括核酸酶、蛋白酶及溶菌酶。这些酶可以分解大分子营养物质,因此使用自溶技术细菌的内源酶可以酶解出多种的活性物质,如游离氨基酸、核苷酸、单糖等。但现有的工艺在脱水后直接干燥及微波灭菌,这就破坏了大部分的内源酶,因此也就不会产生活性物质;

[0007] 3) 现有的加工工艺的蛋白质消化率仍然不高,仍有进一步提升的空间;

[0008] 4) 单细胞蛋白具有较高含量的核酸,普通工艺干燥处理并未将核酸分解为核苷酸且仍处于细胞内,而通过一定方法将核酸分解为核苷酸可以使单细胞蛋白应用于动物饲料时具有诱食及免疫这两个明显的效果,现有工艺没有考虑如何将核酸分解为高价值的核苷酸。

[0009] 5) 虽然培养的单细胞蛋白的产量非常高,但后续加工设备的产能仍然可以显著高于培养单细胞蛋白的产能,比如发明专利 CN2014100556582 的加工设备的产能受限于培养产出的低产量而无法达到最高产能,甚至不能达到加工设备平均产能。这就导致了投资设备的闲置及浪费。

[0010] 专利号为 201410055658.2 的中国专利公开了一种利用生物泥制备单细胞蛋白粉的方法,是利用生物泥来生产单细胞蛋白(SCP)的资源化回收方法,将生物养殖系统沉淀排出的生物泥浓缩后,经过离心脱水、热风瞬间烘干、气流快速冷却、微波灭菌后,即可获得单细胞粗蛋白粉。该专利为本司的在先申请,但由于缺少自溶工序,细胞蛋白利用效率较低。自溶是指菌体利用自身的内源酶(蛋白酶、核酸酶、溶菌酶等)将菌体内的高分子物质水解为氨基酸、核苷酸、当糖等小分子的过程。自溶过程是一个较复杂的过程,受多种因素影响,包括细菌种类、水分含量、温度、pH 值、时间、内源酶种类等。更重要的是在自然条件下,自溶并不是单一的过程,是生物体在死亡后腐败的前一过程,大分子物质经自溶分解为氨基酸、核苷酸等营养物质,这为腐败微生物生长提供了重要的营养来源。因此,自溶的结果也因微生物种类、自溶条件、目标产物等有较大差别,并且自溶失败会导致腐败产物如氨、硫化氢、三甲胺等产生。

[0011] 专利号为 2008800240991 及 2011102810796 两个中国专利公开了酵母使用自溶工艺进行处理,生产酵母自溶物,用以提高产品风味。但这两项专利并不适合本专利,该专利申请采用的原料为厌氧菌,细菌特性与好氧菌差别较大,自溶的方式也有很大差别,比如厌氧菌自溶的时间更长,需要外添加酶进行促进自溶,厌氧菌自溶对于反应容器、含水率、pH、温度等都有较多限制,并且产物难以控制,容易产生较高含量的腐败产物。

[发明内容]

[0012] 本发明的目的在于弥补上述的制备单细胞蛋白的不足及缺陷,提供一种高质量、富含活性成分的使用自溶工艺生产好氧型单细胞蛋白的方法。

[0013] 为了实现上述目的,设计一种高产量使用自溶工艺生产好氧型单细胞蛋白的方法,包括若干个预加工单元和一个后加工单元,预加工单元包括沉淀浓缩步骤、离心脱水步骤和运输步骤,每个预加工单元中将离心脱水步骤后获得的 78%~85%含水率的物料,降温后运输至后加工单元进行集中处理,所述的后加工单元包括自溶步骤、干燥步骤、灭菌步骤和粉碎包装步骤,所述的自溶步骤如下:

[0014] a) 来自预加工单元的物料输送至保温料仓,然后输送至自溶设备进行自溶处理;

[0015] b) 自溶设备通过向双螺杆空心桨叶供热进行升温,达到自溶的温度要求,通过设计及调节与进料速度配套的腔体容积,来达到自溶的时间要求;

[0016] c) 所述自溶设备的双螺杆空心桨叶前 1/4 至 1/2 分段为加热段,目的是将物料加热至自溶所需温度,剩余分段为保温段,保持物料自溶温度;

[0017] d) 自溶的温度要求为:加热后的物料温度保持在 65%~95℃;

[0018] e) 自溶的时间要求为:加热段将物料升温至目标温度的时间应小于 30 分钟,保温段的自溶时间应在 30 分钟~360 分钟;

[0019] 所述自溶的物料水分要求为:自溶后物料水分含量应不低于 70%;

[0020] 所述的灭菌步骤采用微波灭菌。

[0021] 所述的加热后的物料温度保持在 65%~80℃,自溶时间为 60~180 分钟。

[0022] 具体方法步骤如下:

[0023] (1) 预加工单元:

[0024] a. 沉淀浓缩:将生物反应器产生的菌体蛋白通过管道排入沉淀浓缩池,菌体蛋白在锥形的浓缩池底部沉淀,底部物料含水率降低至 97%以下,可进行后续脱水工序;

[0025] b. 使用抽料泵将浓缩池底部物料输送至离心脱水设备;

[0026] c. 离心脱水:使用螺旋卧式离心设备进行固液分离,离心后物料含水率降低至 78%~85%,物料呈湿泥状;所述的离心所脱去的水分为菌体蛋白的细胞外水分,胞内水分仍存留在细胞内,这为细胞内的内源酶进行自溶创造了条件;所述的离心后 78%~85%含水率的物料能进行自溶作用;

[0027] d. 运输:离心后的物料降温后运输至后加工单元进行集中处理;所述降温是在离心后物料降温至 10℃以下;所述运输是通过保温货车将预加工单元产出的湿泥状物料装运至后加工单元进行后续加工;所述运输的时间应在 0~12 小时内,物料到达后加工单元的料温不高于离开预加工单元时料温的 5℃;

[0028] (2) 后加工单元:

[0029] a. 自溶:来自预加工单元的物料输送至保温料仓,然后输送至自溶设备进行自溶处理;自溶设备通过向双螺杆空心桨叶供热进行升温,达到自溶的温度要求,通过设计及调节与进料速度配套的腔体容积,来达到自溶的时间要求;所述自溶设备的双螺杆空心桨叶前 1/4 至 1/2 分段为加热段,目的是将物料加热至自溶所需温度,剩余分段为保温段,保持物料自溶温度;自溶的温度要求为:加热后的物料温度保持在 65%~95℃;自溶的时间要求为:加热段将物料升温至目标温度的时间应小于 30 分钟,保温段的自溶时间应在 30 分钟~360 分钟;所述自溶的物料水分要求为:自溶后物料水分含量应不低于 70%;

[0030] b. 干燥:自溶后的物料通过蛟龙喂料机输送至气流闪蒸干燥设备进行干燥;所述闪蒸干燥的物料接触温度应低于 100℃,所述干燥后的物料的含水率应在 10%~40%;

[0031] c. 灭菌 :经干燥后的物料通过气流提升设备输送至隧道式微波干燥灭菌设备进行灭菌 ;所述微波灭菌后物料含水率为 5%~10% ;

[0032] d. 粉碎包装 :灭菌后的物料经粉碎后包装成成品。

[0033] 所述的自溶设备包括 :带轮、减速机、传动齿轮、盖板、进料口、加热空心桨叶、保温空心桨叶、溢流板、排料口、蒸汽进出口、电动机、主机壳体和传动主轴,主机壳体顶部设有盖板,主机壳体内设有传动主轴,传动主轴上设有双螺杆空心桨叶,盖板上设有进料口,主机壳体底部设有出料口,主机壳体内靠近出料口设有溢流板,传动主轴一端连接传动齿轮,传动齿轮与减速机输出端齿轮啮合,减速机输入端通过带轮连接电机输出端,传动主轴另一端连接蒸汽或导热油进出口,所述的双螺杆空心桨叶前 1/4 至 1/2 分段为加热段,剩余分段为保温段。主机壳体内设有两根传动主轴和两根双螺杆空心桨叶。

[0034] 一种采用上述的方法制得的好氧型单细胞蛋白,采用蛋白含量为 33% -60% 的菌体蛋白制得的好氧型单细胞蛋白水份含量 5.0% -10.0% ;蛋白含量 33.0% -60.0% ;单位蛋白的游离核苷酸不低于 1.40% ;单位蛋白的游离碱基不高于 0.90% ;游离碱基与游离核苷酸比值范围应在 0-0.60。

[0035] 本发明同现有技术相比,工艺及其制成的产品具有以下优点 :

[0036] 1) 体现了单细胞蛋白具有内源酶这一情况,充分利用了现有技术中的菌体蛋白中具有的核酸酶、蛋白酶、溶菌酶 ;

[0037] 2) 使用了自溶工艺,自溶过程中自溶酶充分分解大分子营养物及细胞壁,通过自溶可以产生较高含量的游离氨基酸、游离核苷酸,同时使得细胞壁多糖被分解,使细胞产生通透性从而确保活性物质可以流出细胞外,从而可以被动物直接吸收利用 ;

[0038] 3) 自溶工艺可不需要菌体蛋白的细胞外水分,内源酶在细胞内的微环境中即可发挥作用,因此,采用了离心脱水后进行自溶,即可确保自溶的高效率,也可减少在自溶后的干燥工艺所需去除的水分含量,从而减少了干燥成本 ;

[0039] 4) 使用的自溶设备的升温快、温度易于控制、物料在设备内的停留时间可控,可以确保菌体蛋白在最适的参数条件下进行自溶 ;

[0040] 5) 使用自溶工艺的产品的消化率进一步提高,干物质表观消化率可从 57.7% 提高到 76.9%,蛋白表观消化率可从 66.4% 提高至 89.1% ;

[0041] 6) 制成的产品不仅蛋白质量高、且具有多种活性成分、具有多种生理功能的功能性蛋白饲料原料,生理功能包括 :诱食和提高采食量、口感、气味的改善,免疫功能,保肝护肝,抗应激,防止腹泻,高质量、高效化率的蛋白 ;在动物试验中具有比未自溶的菌体蛋白具有更好的表现性能。

[0042] 7) 使用新的生产工艺进一步降低了生产的能耗,原因是 :a) 自溶对干燥前的物料进行了预加热,提高了干燥前的温度 ;b) 自溶后的菌体蛋白的细胞壁通透性增强,水分及胞内物质更易流出胞外,干燥难度进一步降低。

[0043] 8) 新工艺考虑到了后加工的自溶、干燥等工艺的产能显著高于单细胞蛋白培养及脱水产能这一情况。整个加工工艺分割为两段,在高效控温的运输方法的协助下连接整个工艺流程。从而可以发挥所有加工设备的生产效率,可以显著提高产能,可以减少设备重复投资进而降低成本。

[附图说明]

[0044] 图 1 是本发明的步骤示意图；

[0045] 图 2 是本发明中实施例 1 中游离核苷酸标准品的色谱图；

[0046] 图 3 是本发明中实施例 1 中游离碱基标准品的色谱图；

[0047] 图 4 是本发明中自溶设备的正视图；

[0048] 图 5 是本发明中自溶设备的侧视图；

[0049] 图 6 是本发明中自溶设备的俯视图；

[0050] 图中：1. 带轮 2. 减速机 3. 传动齿轮 4. 盖板 5. 进料口 6. 加热空心桨叶 7. 保温空心桨叶 8. 溢流板 9. 排料口 10. 蒸汽进出口 11. 电动机 12. 主机壳体 13. 传动主轴；

[0051] 指定图 1 作为本发明的摘要附图。

[具体实施方式]

[0052] 下面结合附图对本发明作进一步说明，这种方法的原理和采用的设备对本专业的人来说是非常清楚的。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

[0053] 实施例 1：游离核苷酸及游离碱基检测方法的建立

[0054] 使用游离核苷酸和游离碱基作为自溶工艺参数调整和产品自溶前后对比的主要指标。原理是：酵母、菌体蛋白等原料经过自溶或者酶解会含有游离的核苷酸与碱基，经水溶液提取后的试样进入高效液相色谱分析，经 C18 柱，紫外检测器、缓冲盐作流动相，可使用外标法对 5 种核苷酸、5 种核苷和 5 种碱基作定量测定。

[0055] 游离核苷酸是指 5 种核苷酸及 5 种核苷的总和，包括胞苷酸、尿苷酸、鸟苷酸、肌苷酸、腺苷酸、胞苷、尿苷、肌苷、鸟苷、腺苷。游离碱基是指 5 种核酸碱基的总和，具体包括胞嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、腺嘌呤。

[0056] 单细胞蛋白产品含有丰富的核苷酸，市场上酵母类的产品是饲料工业主要的核苷酸提供者。由于工艺特点的原因，自溶酵母、酶解酵母、水解酵母等产品含有较多游离态的核酸水解物，研究发现现有很多酵母产品既含有游离核苷酸，也含有较高含量的碱基。游离核苷酸能被动物快速吸收，发挥重要生理功能，碱基则会对动物肝脏肾脏造成不良影响。碱基含量过多意味着生产过程当中有重要营养价值的核苷酸被酶解、水解或微生物代谢。这会造成酵母产品的质量下降，提供的核苷酸含量降低，进而能为动物提供免疫功能的作用减少，同时增加的碱基如腺嘌呤则会对动物造成毒性。判断单细胞蛋白的生产工艺对核苷酸的破坏程度，使用既能反应工艺条件的优劣又能为产品质量控制提供科学的、反映营养价值的评估方法就变得极为重要。游离核苷酸代表了自溶的程度，数值越高说明代表内源酶分解核酸为核苷酸的程度越高。游离碱基是细菌代谢的产物，含量越高说明腐败微生物生长越多，作为查看自溶后产品腐败程度的指标。

[0057] 试剂和溶液：

[0058] 除非另有说明，本法所用试剂均为分析纯，水为去离子水，符合 GB/T 6682 二级水的规定。

[0059] 磷酸二氢钾：分析纯。

- [0060] 氢氧化钾：分析纯。
- [0061] 甲醇：色谱纯。
- [0062] 乙腈：色谱纯。
- [0063] 20% w/v 氢氧化钾溶液：称取氢氧化钾 100 克，溶解于 500ml 水中，保存于容量瓶内。
- [0064] 流动相 A：0.1M 磷酸二氢钾溶液，称取磷酸二氢钾 27.2 克，溶解于 1000ml 水中，添加 20% 氢氧化钾溶液 1.0ml，加水定容至 2 升。0.45um 水系滤膜过滤后备用。
- [0065] 流动相 B：25% 甲醇溶液，量取甲醇 250ml 溶解于 750ml 水中，搅拌混匀后 0.45um 有机系滤膜过滤后备用。
- [0066] 腺苷酸 AMP：sigma#A2252。
- [0067] 胞苷酸 CMP：sigma#C1131。
- [0068] 肌苷酸 IMP：sigma#I2897。
- [0069] 鸟苷酸二钠 GMP：sigma#G8377。
- [0070] 尿苷酸 UMP：sigma#U1752。
- [0071] 腺苷 Adenosine：sigma#A9251。
- [0072] 胞苷 Cytidine：sigma#C122106。
- [0073] 鸟苷 Guanosine：sigma#V900311。
- [0074] 肌苷 Inosine：sigma#I4125。
- [0075] 尿苷 Uridine：sigma#V900421。
- [0076] 制备核苷酸混合标准液：依次使用尿苷酸、腺苷酸、鸟苷酸二钠、胞苷酸、肌苷酸、鸟苷、腺苷、尿苷、肌苷、胞苷配制混合标准液，各核苷酸浓度依次为 20.000ug/ml、20.000ug/ml、20.000ug/ml、20.000ug/ml、20.00ug/ml、10.000ug/ml、10.000ug/ml、10.000ug/ml、10.000ug/ml、10.000ug/ml 分装至 0.5ml 冻存管内，-20℃ 保存，有效期一年。
- [0077] 胞嘧啶 Cytosine：sigma#V900462。
- [0078] 尿嘧啶 Uracil：sigma#V900439。
- [0079] 鸟嘌呤 Guanine：sigma#V900473。
- [0080] 胸腺嘧啶 Thymine：sigma#V900437。
- [0081] 腺嘌呤 Adenine：sigma#V900471。
- [0082] 制备碱基混合标准液：依次使用胞嘧啶、尿嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、腺嘌呤配制混合标准液，混合标准液碱基的浓度依此为 16.00ug/ml、16.00ug/ml、20.00ug/ml、16.00ug/ml、16.00ug/ml。分装至 0.5ml 冻存管内，-20℃ 保存，有效期一年。
- [0083] 仪器与设备：
- [0084] 高效液相色谱仪系统（梯度洗脱、紫外检测、可控柱温）；色谱柱：Athena C18，4.6×150mm；分析天平；离心机；超声清洗器；1mL 一次性注射器；0.45um 一次性水相过滤器；0.5ml 离心管；100ml 容量瓶；250ml 容量瓶；40ml 带盖螺盖玻璃管；1000ul 移液器；5000ul 移液器；15mL 塑料离心管。
- [0085] 测定步骤：
- [0086] 样品处理：
- [0087] (1) 称取 0.1000 克样品至于 40ml 玻璃管内。每个待测样品重复取样至少两组。

- [0088] (2) 加水 15ml (溶解体积, V), 漩涡震荡 3 次, 每次 1min, 每次间隔 20min。
 [0089] (3) 震荡后超声 20min。再次漩涡震荡。
 [0090] (4) 从玻璃管内取试液 3ml 至 5ml 离心管内。12000g 高速离心 15min。
 [0091] (5) 取上清液 2ml 至 5ml 离心管内, 加水 2ml, 稀释一倍。混匀后保存过滤上机测定。
 [0092] 用高效液相色谱法对样品进行测定, 采用以下色谱条件:

[0093]

环境温度:	25°C ~ 30°C
色谱柱:	Athena C18, 4.6 × 150mm
检测波长:	260nm
柱温:	30°C
流动相 A:	0.1mol/L 磷酸二氢钾溶液
流动相 B:	25% 甲醇
进样量:	20ul

[0094]

流速:	0.5mL/min
-----	-----------

[0095] 洗脱程序如下表 1:

[0096] 表 1

[0097]

梯度洗脱程序		
Time(min)	Phase A %	Phase B %
0.00	100	0
15.00	100	0
15.01	60	40
28.00	60	40
28.01	40	60
40.00	40	60
42.00	0	100
55.00	0	100
55.01	100	0
70.00	100	0

[0098] 如图 2、图 3 所示, 上述步骤能将这几种游离的核苷酸、碱基很好的分离。

[0099] 结果计算:

[0100] 使用外标法测定出样品中游离碱基、核苷酸的含量。

[0101] 试样中碱基、核苷、核苷酸含量 ω ，以质量分数标识，数值以%表示，按公式计算：

$$C = \frac{A}{A_{st}} \times C_{st} \dots\dots\dots (1)$$

$$\omega_x = \frac{C \times V \times 2}{m \times 1000 \times 1000} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

[0104] 式中：

[0105] A——样品核苷酸、碱基的色谱峰面积

[0106] A_{st} ——标准品的色谱峰面积

[0107] C_{st} ——标准品的浓度

[0108] x——某一核苷酸、或核苷，或碱基

[0109] C——核苷酸浓度 ug/ml；

[0110] V——溶解体积 ml；

[0111] m——样品重量 (g)；

[0112] ω_x ——含量%；

[0113] 测定结果用平行测定的算术平均值表示，保留 2 位有效数字。

[0114] 精密度：

[0115] 重复以上检测，使获得的两次独立测定结果的绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

[0116] 使用上述测定方法测得的自溶工艺产品的游离核苷酸及游离碱基的含量见下表 2，表中可以看出产品在自溶后可以产生较高含量的核苷酸，且要高于市售的酵母产品。

[0117] 表 2

[0118]

样品	游离核苷酸，%	游离碱基，%
自溶产品一(50%蛋白)	1.18	0.25
自溶产品二(35%蛋白)	0.80	0.12
未自溶产品	0.10	0.00
市售啤酒酵母渣	0.38	0.14
市售鱼粉	0.28	0.48
市售酵母一	0.66	0.81
市售酵母二	0.26	0.10
市售酵母三	0.39	0.46

[0119] 实施例 2：自溶生产工艺及产品

[0120] 本发明开发的自溶生产工艺及产品是利用发明专利 W02009059163A1 的培养技术

制成的单细胞蛋白产品,但不限于此,也适用于与该发明类似的好氧型单细胞蛋白产品的加工。

[0121] 一种高产量自溶单细胞蛋白的加工方法,实现的方式是将加工过程分成两大部分,分别由不同的生产单元来完成。其中第一部分是预加工单元,包含了单细胞蛋白培养完成后从沉淀浓缩至离心脱水的过程。在此部分,可以设置多个预加工单元,如 2~10 个均是可以的。第二部分是后加工单元,包含了自溶、干燥、灭菌的操作。第一部分至第二部分采用了运输的方式实现。在此部分,设置一个后加工单元。

[0122] 当预加工单元为 1 个时,预加工单元与后加工单元可以合二为一。

[0123] 当基地单元为 2 个及 2 个以上时,预加工单元与后加工单元各自分开。

[0124] 预加工单元与后加工单元距离为 0~500 公里。优选在 400 公里以内。

[0125] 如图所示,本例中设置 3 个预加工单元及一个后加工单元。

[0126] 在预加工单元中完成以下操作:

[0127] 1) 沉淀浓缩:定期将生物反应器产生的菌体蛋白通过管道排入沉淀浓缩池,菌体蛋白在锥形的浓缩池底部沉淀,底部物料含水率降低至 97% 以下,可进行后续脱水工序。

[0128] a) 本实施例中的池体直径:15 米,深度:3.5 米,有效容积:477 立方米。

[0129] 2) 使用容积式单螺杆泵将浓缩池底部物料输送至离心脱水设备。

[0130] 3) 离心脱水:使用螺旋卧式离心设备进行固液分离。离心后物料含水率降低至 78%~82%,物料呈湿泥状。

[0131] a) 本实施例中的离心机的物料处理能力为 10-30 立方/小时,工作转速为 2000-3200 转/分钟,出料量为 1.5 吨/小时,进料含固率为 3.0-5.0%。上清液的含固率 $\leq 0.2\%$,物料回收率 $\geq 95\%$ 。

[0132] 4) 运输:离心后的物料降温后运输至后加工单元进行集中处理。

[0133] a) 本实施例中运输前将物料降温至 5℃ 以下。

[0134] b) 本实施例中通过保温货车将预加工单元产出的湿泥状物料装运至后加工单元进行后续加工。

[0135] c) 本实施例中 3 个预加工单元距离后加工单元都小于 300 公里,运输的时间在 4 小时内,物料到达后加工单元的料温不高于离开预加工单元时料温的 4℃。

[0136] 运输时间通过不同温度、不同时间处理样品的试验进行确定。自溶的物料蛋白含量为 50%,含水率 82%。样品在不同试验温度和不同的保存时间条件下存放,后进行自溶。自溶的条件为:温度 70℃,时间为 180 分钟。试验的结果见下表:

[0137] 表 3 中可以看出,低于 10℃ 时放置 15 小时内产品进行自溶并不会造成核苷酸及碱基的异常,说明低于 10℃ 保存时菌体蛋白的酶活、有害菌等因素并无重大变化。可以说明此温度情况下在一定时间内进行菌体蛋白的运输并不会对产品造成影响。

[0138] 表 3

[0139]

保温温度	保温时间	游离核	游离
		苷酸,%	碱基,%
5℃	1 小时	1.22	0.27
	5 小时	1.23	0.27
	10 小时	1.22	0.24
	15 小时	1.24	0.26
10℃	1 小时	1.21	0.24
	5 小时	1.23	0.27
[0140]			
	10 小时	1.20	0.27
	15 小时	1.22	0.29
15℃	1 小时	1.20	0.29
	5 小时	1.23	0.28
	10 小时	1.20	0.31
	15 小时	1.08	0.46
25℃	1 小时	1.19	0.30
	5 小时	1.11	0.38
	10 小时	1.02	0.47
	15 小时	0.96	0.55

[0141] 在后加工单元中完成以下操作：

[0142] 5) 自溶：来自 3 个预加工单元的物料输送至保温料仓，然后输送至自溶设备进行自溶处理。

[0143] a) 本实施例自溶设备是由双螺杆空心桨叶干燥机改进而来，通过向空心桨叶供热进行升温，达到自溶的温度要求，设备的腔体容积为 7.5 立方米，有效容积在 5.0 ~ 7.0 立方米，使用溢流板高度调节控制有效容积，设备可以满足实施例 3 个预加工单元的物料生产。

[0144] b) 本实施例自溶设备的两根双螺杆空心桨叶前 1/3 分段为加热段，使用 0.5-0.6Mpa 压力的蒸汽进行升温。剩余分段为保温段，使用 0.1Mpa 低压蒸汽和前段加热后的蒸汽冷凝水进行保温，以达到维持自溶温度的作用。

[0145] c) 本实施例自溶的温度要求为：加热后的物料温度保持在 68% ~ 80℃，优选的自溶温度为：70℃。

[0146] d) 本实施例自溶的时间要求为：加热段将物料升温至目标温度的时间应小于 20 分钟。保温段的自溶时间应在 60 ~ 90 分钟。

[0147] e) 本实施例自溶的物料水分要求为：自溶后物料水分含量应不低于 70%。

[0148] 6) 干燥：自溶后的物料通过蛟龙喂料机输送至气流闪蒸干燥设备进行干燥。

[0149] a) 本实施例闪蒸干燥的物料接触温度应低于 100℃。

[0150] b) 本实施例干燥后的物料的含水率应在 15% ~ 30%。

[0151] 7) 灭菌:经干燥后的物料通过气流提升设备输送至隧道式微波干燥灭菌设备进行灭菌。

[0152] a) 本实施例微波灭菌后的物料的霉菌总数、细菌总数符合 GB 13078-2001 饲料卫生标准。

[0153] b) 所述微波灭菌后物料含水率为 5%~10%。

[0154] 8) 粉碎包装:灭菌后的物料经粉碎后包装成成品。

[0155] 经上述生产工艺制成的单细胞蛋白应同时具有以下质量指标:

[0156] a) 单位蛋白的游离核苷酸含量应高于 1.40%

[0157] b) 单位蛋白的游离碱基含量应低于 0.90%

[0158] c) 游离碱基与游离核苷酸的比值应在 0~0.60 范围内。

[0159] 蛋白含量为 50% 的菌体蛋白经过上述加工方法的加工后所获得的产品的关键指标见表 4。

[0160] 表 4

[0161]

产品关键指标	结果	参考范围
水分含量	9.40%	≤10.0%
蛋白含量(干基)	50.70%	
游离核苷酸(干基)	0.80%	
游离碱基(干基)	0.12%	
游离核苷酸(占单位蛋白)	2.64%	≥1.40%
游离碱基(占单位蛋白)	0.34%	≤0.90%
游离碱基与游离核苷酸比值	0.15	0~0.60

[0162] 实施例 3:消化率试验

[0163] 通过动物试验评估了使用自溶工艺的菌体蛋白与普通菌体蛋白在表观消化率上的差异。

[0164] 消化率是动物所摄取的饲料成分中,可消化养分占食入饲料养分的百分率。指示剂法就是用饲料中存在的或人工均匀掺入的指示剂。饲喂鱼后从单位饲料和粪中所含单位指示剂的量求算消化率。以饲料原料营养素的可消化值为依据进行配方编制,对于提高配合饲料的消化利用率、减少饲料物质对养殖水环境的污染具有重要意义。

[0165] 试验方案:

[0166] 评估原料:将蛋白含量为 50% 的菌体蛋白按照实施例二的方法进行自溶生产,普通未自溶蛋白含量同为 50% 的同批次单细胞蛋白。

[0167] 试验饲料由“70%基础饲料+30%待测原料”组成。试验饲料中加入 0.01% 氧化钪作为指示剂,采用逐级扩散法均匀混合于饲料粉料中。配制试验饲料时,所有原料均过 40 目,用制粒机制成粒径 3mm 的颗粒饲料。

[0168] 试验在 145 升塑料水族箱中进行,水源为曝气自来水,水族箱使用充氧泵充气,每个水族箱使用加热棒控温。每天换水 2/3,保持水质清洁。试验期间水温 15±1℃,pH6.5-7.5,溶氧≥4.0mg/l。试验鱼为虹鳟鱼。

[0169] 基础饲料及 2 种试验饲料共 3 个试验组, 每组 3 个重复, 共 9 个水族箱。每箱放 50 尾鱼。

[0170] 试验鱼投入水族箱驯化 7 天后, 投喂试验饲料, 7 天后开始正式试验。试验期间, 每天饱食投喂 2 次 (8:30 ;15:30), 每次投饵 0.5 小时后用虹吸管将残饵吸出。每天在试验鱼排粪高峰期收集粪便, 每次用密抄网将粪便及时捞出, 然后用镊子将包膜完整的粪便颗粒挑于培养皿中, 于 70℃ 烘箱中烘干至恒重, 然后将粪便放入干燥器中待以分析, 直至粪便够检测为止。

[0171] 结果计算:

[0172] 试验饲料和基础饲料干物质、蛋白质表观消化率的计算公式为:

[0173] 干物质表观消化率 (%) = $100 \times (1 - B/B')$

[0174] 营养成分表观消化率 (%) = $[1 - (A'/A) \times (B/B')] \times 100$

[0175] 其中, A、B 分别为饲料中某营养成分和氧化钼含量, A'、B' 分别为粪便中某相应营养成分和氧化钼含量。

[0176] 原料干物质、蛋白质及氨基酸的表观消化率计算公式为^[1,2,3]:

[0177]

$$\text{消化率}/\% = \frac{DT - rDR}{1 - r}$$

[0178] 式中: DT 和 DR 分别为试验饲料和基础饲料营养成分的消化率

[0179]

$$r = \frac{\text{试验饲料中基础饲料重量}}{\text{试验饲料重量}} \times \frac{\text{基础饲料中某营养成分含量}}{\text{试验饲料中某营养成分含量}}$$

[0180] 结果:

[0181] 从下表 4 可以看出, 使用自溶工艺的单细胞蛋白的干物质及蛋白消化率得到了显著提高, 说明在自溶后细菌的细胞壁得到充分破壁, 核苷酸、蛋白等营养物质游离到细胞外, 从而更易被动物所吸收。

[0182] 表 4

[0183]

不同加工工艺菌体蛋白的干物质及蛋白的表观消化率		
饲料	干物质, %	蛋白, %
自溶单细胞蛋白	78.3	90.0
未自溶单细胞蛋白	56.8	65.4

[0184] 实施例五: 采食量试验

[0185] 通过仔猪的双料槽偏好性试验评估使用自溶工艺的菌体蛋白与普通菌体蛋白在诱食及采食量方面的差异。仔猪的双料槽模型试验可以测定仔猪对特定原料风味的偏好, 对于仔猪来说采食其偏好的饲料可以提高采食量, 进而提高生长速度。

[0186] 试验方案:

[0187] 评估原料: 蛋白为 50% 的自溶单细胞蛋白, 普通未自溶蛋白含量同为 50% 的单细胞蛋白。试验饲料, 基础日粮为市售断奶仔猪饲料, 试验饲料配比见下表 5。

[0188] 试验动物：选择断奶日龄、体重接近，采食正常、健康的断奶仔猪 45 头，随机分成 3 组。

[0189] 表 5

[0190]

编号	A 饲料	B 饲料
饲料	基础饲料	
试验对象	未自溶单细胞蛋白	自溶单细胞蛋白
添加量	2%	2%
饲料量	100kg	100kg

[0191] 试验方法：

[0192] 在同一栏内放入料位和规格型号相同的料槽 2 个（要求每个料槽的料位必须与试验猪数量一致），分别在料槽内加入一定数量的试验饲料（要求饲料的数量必须充足，保证 2 小时内不会出现饲料不够的情况），A 料槽加 A 料，B 料槽加 B 料，让猪自由采食 2 小时后收集料槽中剩余的饲料并计量，然后在 A 料槽中加 B 料，B 料槽中加 A 料进行上述相同的试验。

[0193] 在试验期间观察两个料槽采食饲料猪的数量，并用摄像机和照相机跟踪拍摄两个料槽猪采食情况和猪数量变化情况。要求：试验连续进行 3～4 次，每次 3～4 个重复。共 3～5 天，或某一饲料采食结束为止。

[0194] 结果计算：

[0195] 测定指标：采食量和偏嗜指数：

[0196] A 日粮偏食指数 = A 组总采食量 / B 组总采食量

[0197]

饲料	采食量, 克	偏食指数
A料	1122	0.86
B料	1298	1.16

[0198] 试验结果显示，在实施例试验条件下，断奶仔猪对于自溶单细胞蛋白具有偏好性，对于含有其成本饲料采食量更高，自溶出的游离核苷酸表现出了诱食效果。

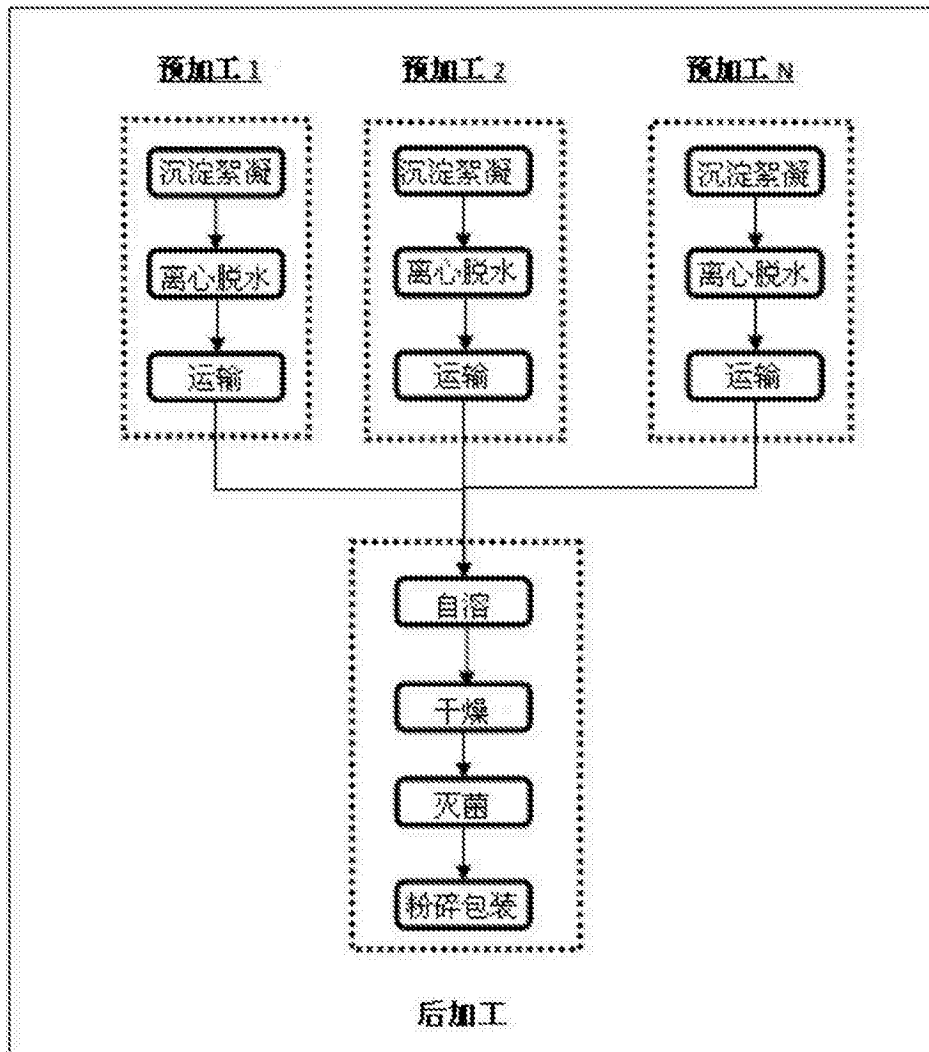


图 1

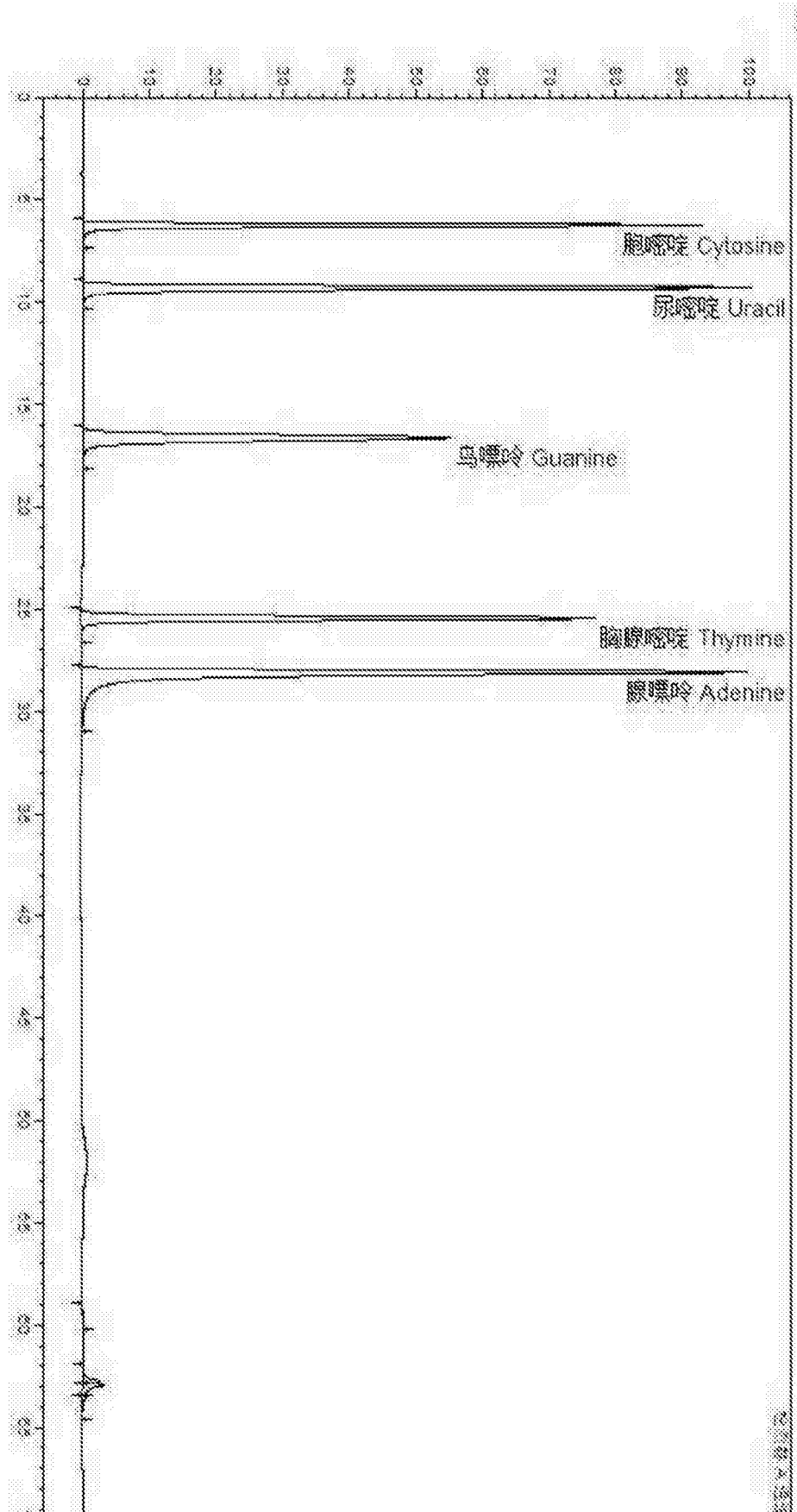


图 3

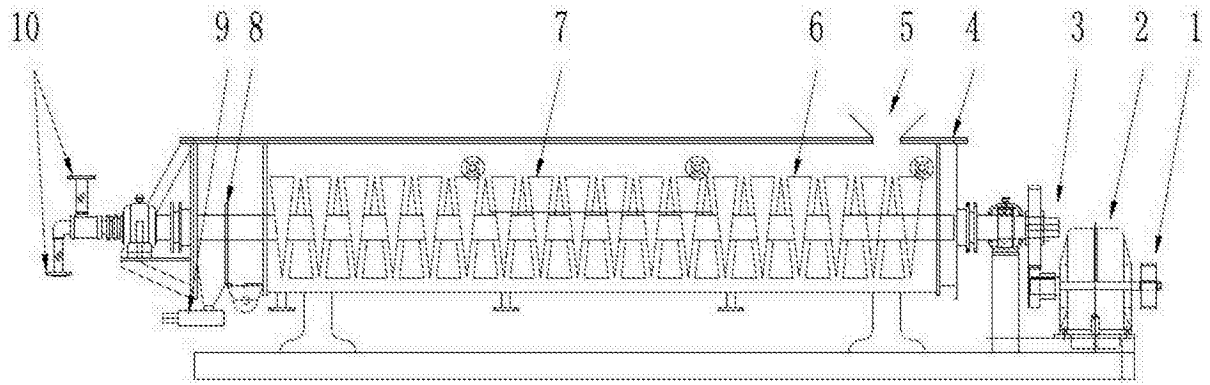


图 4

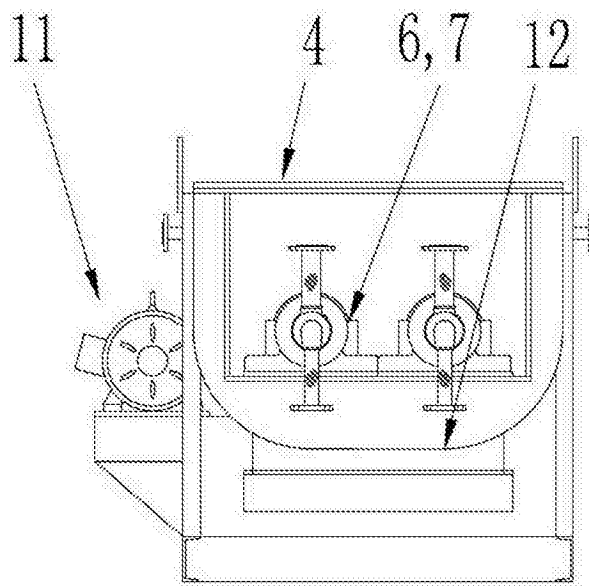


图 5

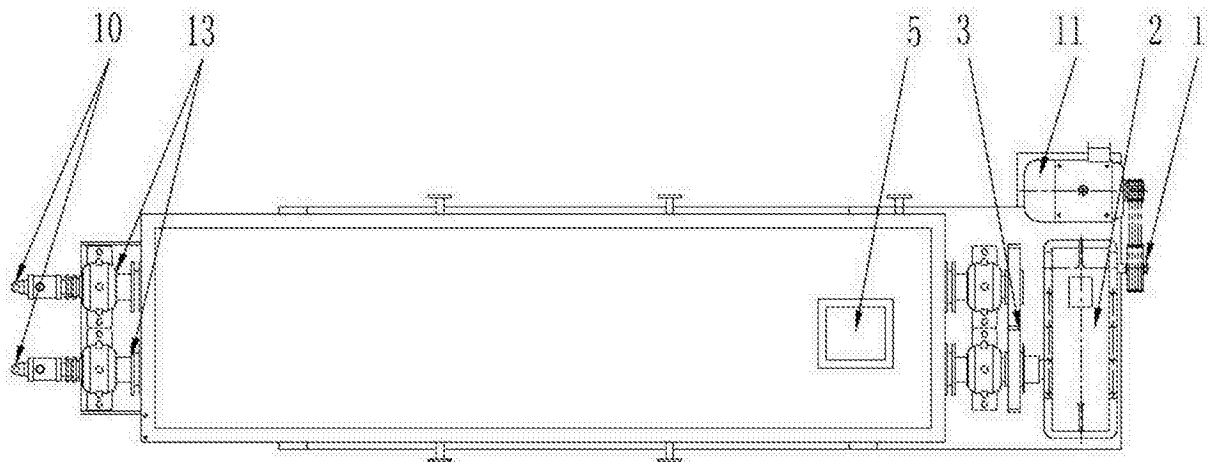


图 6