

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016年3月3日 (03.03.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/029647 A1

- (51) 国际专利分类号:
A23K 1/14 (2006.01) A23K 1/18 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/071861
- (22) 国际申请日: 2015年1月29日 (29.01.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410425437.X 2014年8月26日 (26.08.2014) CN
- (71) 申请人: 威海市世代海洋生物科技有限公司 (WEIHAI SHIDAI MARINE BIOTECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国山东省荣成市成山裕兴路128号, Shandong 264319 (CN)。
- (72) 发明人: 李健 (LI, Jian); 中国山东省荣成市成山裕兴路128号, Shandong 264319 (CN)。 李明潭 (LI, Mingtan); 中国山东省荣成市成山裕兴路128号, Shandong 264319 (CN)。
- (74) 代理人: 北京富天文博兴知识产权代理事务所(普通合伙) (WENBOXING INTELLECTUAL PROPERTY AGENT FIRM); 中国北京市海淀区海淀南路21号中关村知识产权大厦B座9楼9105室, Beijing 100080 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) Title: ACTIVE SEAWEED FEED ADDITIVE AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 一种活性海藻饲料添加剂及其制作方法

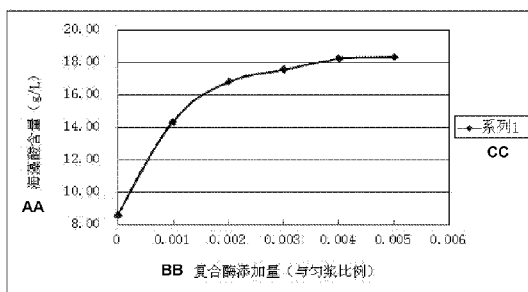


图 5 / Fig. 5

AA CONTENT OF ALGINIC ACID (G/L)
 BB ADDED AMOUNT OF COMPOSITE ENZYME (IN PROPORTION TO HOMOGENATE)
 CC SERIES 1

(57) Abstract: A seaweed biological feed additive or a preparation method for a seaweed biological feed. The method is characterized by adding a composite microorganism enzyme into seaweed serosity that is prepared from seaweed or seaweed residues, and performing enzymolysis to obtain the seaweed biological feed additive, wherein the composite microorganism enzyme consists of several kinds of cellulase, pectinase, protease and amylase.

(57) 摘要: 一种海藻生物饲料添加剂或海藻生物饲料的制备方法, 其特征在于, 所述方法是向由海藻或海藻渣制成的海藻浆液中添加复合微生物酶进行酶解从而获得所述海藻生物饲料添加剂, 其中, 所述复合微生物酶由纤维素酶、果胶酶、蛋白酶和淀粉酶中的多种组成。



WO 2016/029647 A1

说明书

一种活性海藻饲料添加剂及其制作方法

5 技术领域

本发明涉及饲料生产领域，尤其涉及一种利用复合酶进行酶解的活性海藻饲料添加剂及其制作方法。

背景技术

10 我国作为农业大国和水产大国，水产品已成为人们重要的动物性蛋白消费产品，并且每年呈几何式快速增长。随着人们水产品消费水平的不断增加，其大大刺激了我国水产养殖业的快速发展，特别是以海藻为食物源的水产养殖尤为明显，比如鲍鱼、海参等。海藻类植物含有丰富的营养成份，具有药用和保健等功能，同时海藻类植物作为重要的消耗品正逐渐进入人们的生产生活中，
15 并且广泛应用到工业、农业和医药业等领域中。这是由于海藻是自养植物，能进行光合作用，把海洋里的无机物质转化为有机物质，所以海藻是动物丰富的低成本饲料资源，海藻作为饲料原料和饲料添加剂开发潜力很大。此外，海藻含有丰富的海藻多糖、蛋白质、脂肪、维生素、矿物质以及具有特殊功效的生理活性物质，是食品、药物、饲料的原料库。海洋植物营养丰富，含有多种生
20 物活性物质，具有增强机体免疫力、抗病、抗病毒、促进生长等生物活性。因此，开发海洋植物饲料，促进畜牧业发展正日趋受到广泛重视。

但是，近年来，随着人口急剧增加，耕地大量减少，饲料紧缺已成为影响养殖业快速发展的严重的问题，人与动物争粮的矛盾也愈发的严重。由于海藻中含有多种抗营养成分，如纤维素、糖胶、琼脂、木聚糖等非淀粉多糖及其毒
25 素；加之食用海藻的水产动物多为低等动物，其肠道短，消化功能差等因素，极大影响了海藻的消化利用率，造成资源浪费，也易引起水产动物的各种不适症，如肠炎、肿嘴。此外，由于我国水产养殖起步较晚，系统研究滞后，养殖技术不完善，目前处于一种粗放型养殖模式，因此投喂饲料多属凭感觉或经验来操作，造成饲料浪费严重，营养流失，最后引起水环境、池底腐败恶化等现
30 象。因此，如何提高海藻利用率及其营养水平，并降除毒素是当前急需解决的

问题。

面对上述问题，中国专利 CN 102987077 A 公开了一种海藻发酵饲料的制备方法，提高了海藻可吸收的营养价值。但是该制备方法仍然存在制备工艺复杂、制备时间长、成本较高等缺陷，这远不能满足市场的需求。

5

发明内容

针对现有技术之不足，本发明提供了一种海藻生物饲料添加剂的制备方法，其特征在于，所述方法是向由海藻或海藻渣制成的海藻浆液中添加复合微生物酶进行酶解从而获得所述海藻生物饲料，其中，所述复合微生物酶由纤维素酶、果胶酶、蛋白酶和淀粉酶中的多种组成。

根据一个优选实施方式，所述纤维素酶、所述果胶酶、所述蛋白酶和所述淀粉酶在所述复合微生物酶中所占的质量百分比分别是：60~100%，0~40%，0~5%，0~5%，并且所述纤维素酶源于李氏木霉、绿色木霉和/或黑曲霉；所述果胶酶源于米根霉、黑曲霉和/或米曲霉；所述蛋白酶源于木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和/或枯草杆菌；所述淀粉酶源于地衣芽孢杆菌、米曲霉和/或黑曲霉。

根据一个优选实施方式，所述纤维素酶的酶活为 $(18\sim 24) \times 10^4 \mu/g$ ，所述果胶酶的酶活为 $(2\sim 5) \times 10^4 \mu/g$ ，所述蛋白酶的酶活为 $(10\sim 50) \times 10^4 \mu/g$ ，所述淀粉酶的酶活为 $(1\sim 5) \times 10^4 \mu/g$ 。

根据一个优选实施方式，所述方法是向所述海藻浆液中按照复合微生物酶与海藻浆液的质量比为 $(0.3\sim 3): 100$ 的比例添加复合微生物酶，并在常压、温度为 $30\sim 65^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}3\sim 7$ 的条件下保温酶解 $6\sim 30$ 小时，从而获得所述海藻生物饲料。

根据一个优选实施方式，所述方法还包括以下步骤：将海藻或海藻渣经过无机除杂后剪切并研磨成直径在 1mm 以下颗粒的海藻浆液；将所述海藻浆液打入高速分散釜中第一次加水搅拌，使得水与海带浆液充分混合，并且第一次加水量与所述海带浆液的质量比为 $(30\sim 40): 100$ ；将混合后的海藻浆液打入酶解罐中，第二次加水并且加入所述复合微生物酶，形成所述混合液，并且第一次加水量和第二次加水量的总量与所述海藻浆液的质量比为 $50: 100$ ；以及将所述混合液搅拌均匀后加热保温酶解，并且在酶解过程中，每一小时搅拌一次，并且每次搅拌 5 分钟。

根据一个优选实施方式，将酶解好的混合液通过反冲带式过滤机进行固液分离，并且将分离出的酶解清液在 60~68℃的范围内进行浓缩；或者，将酶解好的混合液进行干燥。

根据一个优选实施方式，所述高速分散釜启动后的转速为 3000 转/分钟，
5 搅动 3 分钟后，所述高速分散釜的转速由 3000 转/分钟降至 1000 转/分钟。

本发明的另一方面，一种海藻生物饲料添加剂，其特征在于，所述海藻生物饲料是按照如前述的制备方法制备而成的。

根据一个优选实施方式，所述海藻饲料还包括鱼粉、鱼油、豆粕、木薯淀粉、玉米粉和粉末大豆磷脂中一种或多种。

10 本发明的另一方面，一种海藻生物饲料，尤其是用于饲养家禽/家畜或水产养殖的饲料，其特征在于，所述饲料包括如前述的制备方法制备而成的海藻生物饲料添加剂或如前述的海藻饲料添加剂。

15 本发明具有制备方法简单，易操作和控制，制备工艺条件温和，制备周期短，成本低等优点。本发明通过向海藻或海藻渣制成的浆液里添加复合微生物酶来提高海藻的利用率，保留了海藻中更多的活性营养成分，在温和的酶解过程中海藻中的活性营养成分没有遭到破坏，有利于动物对活性营养成分的消化吸收，促进动物的增长。

20 附图说明

图 1 是本发明的海藻饲料添加剂制备方法中不同菌种所产纤维素酶的水解效果对照图；

图 2 是本发明的海藻饲料添加剂制备方法中不同菌种所产果胶酶的水解效果对照图；

25 图 3 是本发明的海藻饲料添加剂制备方法中不同菌种所产淀粉酶的水解效果对照图；

图 4 是本发明的海藻饲料添加剂制备方法中不同菌种所产蛋白酶的水解效果对照图；

30 图 5 是本发明的海藻饲料添加剂制备方法中复合微生物酶加量对水解效果的影响；和

图 6 是本发明的海藻饲料添加剂制备方法中复合微生物酶的酶解时间对水解效果的影响。

具体实施方式

5 下面结合附图和实施例进行详细说明。

本发明的海藻生物饲料添加剂或海藻饲料的制备方法，该方法总的技术方案是向由海藻或海藻渣制成的海藻浆液中添加复合微生物酶进行酶解从而获得所述海藻生物饲料，其中，复合微生物酶由纤维素酶、果胶酶、蛋白酶和淀粉酶中的多种组成。

10

1 酶种的选取

为了能够获得水解效果最佳的构成复合微生物酶的酶种，本发明以李氏木霉(*Trichoderma reesei*)、绿色木霉(*Trichoderma viride*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*) 所产纤维素酶为纤维素酶的备选项；以米根霉 (*Rhizopus oryzae*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*) 所产果胶酶为果胶酶的备选项；以木瓜 (*Caricapapaya*) 蛋白酶 Papain、菠萝 (*Ananas spp*) 蛋白酶 (Bromelain)、枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 所产蛋白酶为蛋白酶的备选项；以地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、米曲霉 (*Aspergillus oryzae*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 所产淀粉酶为淀粉酶的备选项。通过研究每种霉菌所产纤维素酶或果胶酶或蛋白酶或淀粉酶对海藻的水解效果来选取霉菌，并且以海藻酸的含量来评判各种酶对海藻的水解效果。本发明所选用的上述霉菌的酶活以及最佳酶解条件如表 1 所示。

表 1

酶种	来源	酶活 (μ/g)	最佳条件
纤维素酶	李氏木霉 <i>Trichoderma reesei</i>	20 万	温度 40°C, pH 4.0-5.5
	绿色木霉 <i>Trichoderma viride</i>	24 万	温度 45°C, pH3.5-5.5
	黑曲霉 <i>Aspergillus niger</i>	18 万	温度 40°C, pH3.2-5.0

果胶酶	米根霉 Rhizopus oryzae	3 万	温度 45℃, pH3.2-4.5
	黑曲霉 Aspergillus niger	5 万	温度 45℃, pH3.5-5.5
	米曲霉 Aspergillusoryzae	2 万	温度 45℃, pH3.5-5.5
蛋白酶	木瓜 Caricapapaya	20 万	温度 35℃, pH3.5-4.5
	菠萝 Ananas spp.	50 万	温度 35℃, pH3.5-5.5
	枯草杆菌 Bacillus subtilis	10 万	温度 45℃, pH5.5-6.5
淀粉酶	地衣芽孢杆菌 Bacillus licheniformis	5 万	温度 55℃, pH3.2-4.5
	米曲霉 Aspergillus oryzae	1 万	温度 55℃, pH3.5-5.5
	黑曲霉 Aspergillus niger	4 万	温度 55℃, pH3.5-5.5

将表 1 中不同来源的纤维素酶、果胶酶、蛋白酶和淀粉酶进行水解实验，测试结果附图 1 至图 4 所示。

图 1 示出了李氏木霉、绿色木霉及黑曲霉等菌种所产纤维素酶的水解效果对照，水解效果以释放海藻酸的量为标准。其中，李氏木霉所产纤维素酶的水解效果最好，且随着酶添加量从 1‰~5‰，水解的海藻酸含量为 8g/L~22g/L，绿色木霉所产的纤维素酶随酶添加量从 1‰~5‰，水解的海藻酸含量为 9g/L~19.5g/L，黑曲霉所产的纤维素酶随酶添加量从 1‰~5‰，水解的海藻酸含量为 7g/L~17g/L。因此本发明优选以李氏木霉所产纤维素酶作为复合酶中纤维素酶的选择，当然采用绿色木霉、黑曲霉所产纤维素酶也是可行的。

图 2 示出了黑曲霉、米曲霉及米根霉等菌种所产果胶酶的水解效果对照，水解效果以释放海藻酸的量为标准，其中，米根霉所产果胶酶的水解效果最好，随酶添加量从 1‰~5‰，水解的海藻酸含量为 6.5g/L~11.6g/L，黑曲霉所产

果胶酶随酶添加量从 1‰~5‰, 水解的海藻酸含量为 5.9g/L~11g/L, 米曲霉所产果胶酶随酶添加量从 1‰~5‰, 水解的海藻酸含量为 6.1g/L~13g/L。因此本发明优选以米根霉所产果胶酶作为复合酶中果胶酶的选择, 当然, 采用黑曲霉、米曲霉所产果胶酶也是可行的。

5 图 3 示出了枯草杆菌蛋白酶、木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶的水解效果对照, 水解效果以释放海藻酸的量为准, 其中, 菠萝蛋白酶的水解效果最好, 随着酶添加量从 0.5‰~2.5‰, 水解的海藻酸含量为 5.58g/L~6.8g/L, 添加量超过 1‰时, 水解的海藻酸含量降为 6.7 g/L 且趋于平衡。木瓜蛋白酶的水解效果随酶添加量从 0.5‰~2.5‰, 水解的海藻酸含量为 5.89g/L~6.6g/L。枯草杆菌
10 蛋白酶的水解效果随酶添加量从 0.5‰~2.5‰, 水解的海藻酸含量为 5.78g/L~6.2g/L。因此本发明优选菠萝蛋白酶作为复合酶中蛋白酶的选择, 当然, 采用枯草杆菌蛋白酶、木瓜蛋白酶也是可行的。

图 4 示出了黑曲霉、米曲霉、地衣芽孢杆菌等菌种所产淀粉酶的水解效果图, 水解效果以释放海藻酸的量为准, 其中, 地衣芽孢杆菌所产淀粉酶的水解
15 效果最好, 随着酶添加量从 1‰~5‰, 水解的海藻酸含量为 5.77g/L~6.2g/L, 米曲霉所产淀粉酶随着酶添加量从 1‰~5‰, 水解的海藻酸含量为 5.6g/L~5.88g/L, 黑曲霉所产淀粉酶随着酶添加量从 1‰~5‰, 水解的海藻酸含量为 5.55g/L~5.78g/L。因此本发明优选地衣芽孢杆菌所产淀粉酶作为复合酶中淀粉酶的选择, 当然采用黑曲霉、米曲霉所产淀粉酶也是可行的。

20 综上所述, 本发明的一个最优实施方式是, 选取李氏木霉所产纤维素酶为复合微生物酶中的纤维素酶, 选取米根霉所产果胶酶为复合微生物酶中的果胶酶, 选取菠萝蛋白酶为复合微生物酶中的蛋白酶, 选取地衣芽孢杆菌所产淀粉酶为复合微生物酶中的淀粉酶。并且, 本发明的复合微生物酶以纤维素酶为主, 果胶酶次之, 蛋白酶又次之, 淀粉酶再次之。本发明优选复合微生物的单酶来源及性能如表 2 中所示。
25

表 2

酶种	来源	酶活 (μ /g)	最佳条件	生产厂家	参考价格
纤维素酶	李氏木霉	20 万	40°C pH4.0-5.5	宁夏和氏璧生物技术 有限公司	380 元\公斤

果胶酶	米根霉	3 万 μ	45°C pH3.2-4.5	山东隆大生物工程有 限公司	560 元\公斤
蛋白酶	菠萝	50 万 μ	35°C pH3.5-5.5	帝斯曼 (中国) 有限公 司	1900 元\公斤
淀粉酶	地衣芽 孢杆菌	5 万 μ	55°C pH3.2-4.5	诺维信 (中国) 生物技 术有限公司	690 元\公斤

2 复合微生物酶的配比设计

本发明按照表 3 中的配比进行实施例 1~6 的酶解实验。

表 3

实施例	1	2	3	4	5	6
纤维素酶	100% (20 万 μ /g)	60% (12 万 μ /g)	60% (12 万 μ /g)	60% (12 万 μ /g)	70% (14 万 μ /g)	60% (12 万 μ /g)
果胶酶	0	40% (1.2 万 μ /g)	35% (1.05 万 μ /g)	35% (1.05 万 μ /g)	27% (0.81 万 μ /g)	30% (0.81 万 μ /g)
蛋白酶	0	0	5% (2.5 万 μ /g)	0	3% (1.5 万 μ /g)	5% (2.5 万 μ /g)
淀粉酶	0	0	0	5% (0.25 万 μ /g)	0	5% (0.25 万 μ /g)
藻酸量 g/L	17.25	19.56	21.32	19.62	22.35	24.46

5 实施例 1

本发明的一种复合微生物酶，其是由 100%纤维素酶构成，其中选用的纤维素酶的酶活为 20 万 μ /g。取 100ml 海带浆液，按与由海藻或海藻渣制成的浆液的质量比为 0.4%的比例添加该复合微生物酶形成混合液，保温酶解 25h，测定上清液中海藻酸的含量为 17.25g/L。

10 实施例 2

本发明的一种复合微生物酶，其是由质量百分比为 60%的纤维素酶和 40%的果胶酶混合而成，其中选用的纤维素酶的酶活为 12 万 μ /g，果胶酶的酶活为 1.2 万 μ /g。取 100ml 海带浆液，按与由海藻或海藻渣制成的浆液的质量比为

0.4%的比例添加该复合微生物酶形成混合液，保温酶解 25h，测定上清液中海藻酸的含量为 19.56g/L。

实施例 3

5 本发明的一种复合微生物酶，其是由质量百分比为 60%的纤维素酶和 35%的果胶酶以及 5%的蛋白酶混合而成，其中选用的纤维素酶的酶活为 12 万 μ /g，果胶酶的酶活为 1.05 万 μ /g，蛋白酶的酶活为 2.5 万 μ /g。取 100ml 海带浆液，按与由海藻或海藻渣制成的浆液的质量比为 0.4%的比例添加该复合微生物酶形成混合液，保温酶解 25h，测定上清液中海藻酸的含量为 21.32g/L。

实施例 4

10 本发明的一种复合微生物酶，其是由质量百分比为 60%的纤维素酶和 35%的果胶酶以及 5%的淀粉酶混合而成，其中选用的纤维素酶的酶活为 12 万 μ ，果胶酶的酶活为 1.05 万 μ /g，淀粉酶的酶活为 0.25 万 μ /g。取 100ml 海带浆液，按与由海藻或海藻渣制成的浆液的质量比为 0.4%的比例添加该复合微生物酶形成混合液，保温酶解 25h，测定上清液中海藻酸的含量为 19.62g/L。

15 实施例 5

本发明的一种复合微生物酶，其是由质量百分比为 70%的纤维素酶和 27%的果胶酶以及 3%的蛋白酶混合而成，其中选用的纤维素酶的酶活为 14 万 μ ，果胶酶的酶活为 0.81 万 μ /g，蛋白酶的酶活为 1.5 万 μ /g。取 100ml 海带浆液，按与由海藻或海藻渣制成的浆液的质量比为 0.4%的比例添加该复合微生物酶形成混合液，保温酶解 25h，测定上清液中海藻酸的含量为 22.35g/L。

实施例 6

25 本发明的一种复合微生物酶，其是由质量百分比为 60%的纤维素酶和 30%的果胶酶、5%的蛋白酶以及 5%的淀粉酶混合而成，其中选用的纤维素酶的酶活为 12 万 μ /g，果胶酶的酶活为 0.81 万 μ /g，蛋白酶的酶活为 2.5 万 μ /g，淀粉酶的酶活为 0.25 万 μ /g。取 100ml 海带浆液，按与由海藻或海藻渣制成的浆液的质量比为 0.4%的比例添加该复合微生物酶形成混合液，保温酶解 25h，测定上清液中海藻酸的含量为 24.46g/L。

30 结合实施例 1~6 的复合微生物酶对海藻的降解效果（酶解效果以释放海藻酸的量为标准）可以看出，复合微生物酶对鲜海带的酶解效果要比使用单一酶

效果好。鲜海带中除了含有纤维素、粗蛋白，还含有海带多糖，分别是褐藻胶、褐藻糖胶及褐藻淀粉。其中褐藻淀粉是一种细胞内多糖，主要由 β -1,3-D-葡聚糖组成，长链上有少量 β -1,6 链间糖苷键存在，在海带中的含量一般为 1% 左右。因此复合微生物酶中选用淀粉酶作为辅助酶，可以使得鲜海带得到更充分的酶解。另，海带中粗蛋白的含量为 5~9%，含量相对较低，而从表 2 中可以看出蛋白酶的价格比较高，若选用蛋白酶的用量跟其他酶种相当，会使得加工成本增加，造成资源浪费。因此，本发明中选用的纤维素酶、果胶酶的质量百分比远大于蛋白酶和淀粉酶，确定采用纤维素酶、果胶酶为复合微生物酶的基本酶种，蛋白酶和淀粉酶为复合微生物酶的辅助酶种。表 3 显示了实施例 6 组成的复合微生物酶对海带浆液的酶解效果最好。因此将实施例 6 作为复合微生物酶配比的最优实施例。

3 复合微生物酶加量对水解效果的影响

以实施例 6 中的最优配比组成的复合微生物酶来研究复合微生物酶的加量对海藻水解效果的影响。其水解效果如图 5 中所示。

随着复合微生物酶的添加量从 0~0.6% 的变化，海藻酸的含量逐渐增加；并且随着复合微生物酶添加量从 0~0.3% 的变化，海藻酸含量呈大致线性增加；当复合酶添加量为 0.3% 时，海藻酸含量为 17.5g/L；当复合酶添加量到达 0.4% 时，海藻酸含量到达 18g/L；当复合酶添加量超过 0.4% 时，海藻酸的含量趋于平衡，不再增加。因此，综合成本和时间的考虑，本发明的复合微生物酶的添加量优选 0.3~0.4%。

4 酶解工艺参数的确定

表 4 列出了本发明的复合微生物酶酶解过程中的反应温度、酶添加量、pH 值和酶解时间等参数。表 5 列出了按照表 4 中所示参数进行正交试验的实施例 7~15 的结果分析。本发明通过表 4 和表 5 确定出本发明的优选工艺参数。

表 4

因子 水平	温度 (°C) A	酶量 (%) B	pH C
1	50	0.3	5.0

2	55	0.4	5.5
3	60	0.5	6.0

表 5

实施例	温度 (°C)	酶量 (%)	pH	海藻酸含量 (g/L)			
				I	II	III	均值
7	A1	B1	C2	15.35	14.98	15.13	15.15
8	A1	B2	C1	17.05	16.89	17.13	17.02
9	A1	B3	C3	18.56	19.01	18.75	18.77
10	A2	B1	C1	17.99	18.24	18.13	18.12
11	A2	B2	C2	23.22	22.83	22.53	22.86
12	A2	B3	C3	21.89	21.55	22.15	21.86
13	A3	B1	C3	20.88	21.51	21.23	21.21
14	A3	B2	C1	21.15	20.33	20.47	20.65
15	A3	B3	C2	21.26	20.89	21.33	21.16

取 2700ml 鲜海带匀浆, 分装至 27 个 250ml 的三角瓶中, 每瓶装量 100ml, 三个一组按照正交试验的实施例 7~15 进行实验, 每组中三个样品按照一个实施例进行实验, 酶解结束后测定上清液中海藻酸的含量, 每个实施例中海藻酸含量取每组三个样品所测的海藻酸含量的平均值。由表 3 可知, 实施例 11 为各因素的最优实施例。

5 酶解时间对水解效果的影响

10 实施例 16

取 15L 的鲜海带匀浆, 将其加入酶解罐中, 再加入复合微生物酶, 其中复合微生物酶按照优选实施例 6 的配比混合, 并且按照优选实施例 11 的工艺参数设置反应温度、复合微生物酶添加量及 pH 值, 经测试其酶解后海藻酸含量平均值为 23.2g/L。

15 图 6 示出了优选实施例 11 的条件下, 即酶解温度为 55°C, 复合生物酶添加量为 0.4%, pH 为 5.5 时, 酶解时间对酶解效果的影响。随着酶解时间的增加,

海藻酸含量逐渐增加，并且当酶解时间从 0~20h 变化时，海藻酸含量呈大致线性增加，酶解时间达到 18h 时，海藻酸含量达到 20g/L；酶解时间为 25h 左右时，海藻酸含量达到最大，此时的海藻酸含量为 23g/L。之后随着酶解时间的增加海藻酸含量趋于平衡不再变化。综合成本考虑，本发明选用酶解时间为 5 18h。

6 海藻生物饲料的制备

在确定好复合酶微生物酶的酶种及各种酶的相关配比以及最佳的酶解工艺参数之后，制备本发明的海藻生物饲料添加剂或海藻生物饲料。本发明的海藻生物饲料添加剂或海藻生物饲料的制备方法具体包括以下步骤：

(1) 将海藻或海藻渣经过无机除杂后剪切并研磨成直径在 1mm 以下颗粒的海藻浆液；将海藻或海藻渣研磨至 1mm 以下，使得海藻颗粒的活性营养物质充分暴露，从而使得复合微生物酶与活性物质充分接触，进而提高水解效率。

(2) 将海藻浆液打入高速分散釜中第一次加水搅拌，使得水与海带浆液充分混合，并且第一次加水量与所述海带浆液的质量比为 (30~40): 100；进一步优选为 35:100。

(3) 将混合后的海藻浆液打入酶解罐中，第二次加水并且加入预先配好的复合微生物酶，形成混合液。此时，进行第二次加水，并且第一次加水量和第二次加水量的总量与所述海藻浆液的质量比为 50: 100，合理控制加水量有利于控制水分含量，提高海藻饲料的营养含量。

(4) 将混合液搅拌均匀后加热保温酶解，并且在酶解过程中，每一小时搅拌一次，并且每次搅拌 5 分钟，使得海藻中的活性营养物质与复合微生物酶充分接触，提高水解效率。

根据一个优选实施方式，在经历过上述四步骤之后的混合液通过反冲带式过滤机进行固液分离，并且将分离出的酶解清液在 60~68℃的范围内进行浓缩；或者，将酶解好的混合液进行干燥，从而获得本发明的海藻生物饲料添加剂或海藻生物饲料。

根据一个优选实施方式，在搅拌过程中，为了使海藻浆液混合的更加均匀，使海藻浆与水能够充分混合，高速分散釜启动后的转速为 3000 转/分钟，搅动 3 分钟后，高速分散釜的转速由 3000 转/分钟降至 1000 转/分钟。

根据一个优选实施方式，本发明的纤维素酶、果胶酶、蛋白酶和淀粉酶在复合微生物酶中所占的质量百分比分别是：60~100%，0~40%，0~5%，0~5%，并且纤维素酶源于李氏木霉、绿色木霉和/或黑曲霉；果胶酶源于米根霉、黑曲霉和/或米曲霉；蛋白酶源于木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和/或枯草杆菌；淀粉酶
5 源于地衣芽孢杆菌、米曲霉和/或黑曲霉。

根据一个优选实施方式，本发明的纤维素酶的酶活为 $(18\sim 24) \times 10^4 \mu/g$ ，果胶酶的酶活为 $(2\sim 5) \times 10^4 \mu/g$ ，蛋白酶的酶活为 $(10\sim 50) \times 10^4 \mu/g$ ，淀粉酶的酶活为 $(1\sim 5) \times 10^4 \mu/g$ 。

根据一个优选实施方式，本发明的制备方法是向所述海藻浆液中按照复合
10 微生物酶与海藻浆液的质量比为 $(0.3\sim 3): 100$ 的比例添加复合微生物酶，并在常压、温度为 $30\sim 65^\circ\text{C}$ 、 $\text{pH}3\sim 7$ 的条件下保温酶解 $6\sim 30$ 小时，从而获得所述海藻生物饲料添加剂或海藻生物饲料。

在本发明总的技术方案的指导下，本发明的另一方面涉及一种海藻生物饲料添加剂或海藻生物饲料，本发明的海藻生物饲料添加剂或海藻生物饲料是按照如前述的制备方法制备而成的。
15

并且，根据一个优选实施方式，本发明的海藻饲料添加剂或海藻生物饲料还包括鱼粉、鱼油、豆粕、木薯淀粉、玉米粉和粉末大豆磷脂中一种或多种。而且，根据需要，本发明的海藻生物饲料可以制备成粉状或颗粒状或不定形态。

在本发明总的技术方案的指导下，本发明的另一方面涉及一种海藻生物饲料，尤其是用于饲养家禽/家畜或水产养殖的饲料。该海藻生物饲料包括如前述的制备方法制备而成的海藻生物饲料添加剂或如前述的海藻饲料添加剂。
20

通过本发明制备的海藻生物饲料添加剂或海藻生物饲料既大大提高了海藻的消化吸收率，减少浪费，又可增强机体免疫力，同时减少抗生素的使用，是一种健康、高效、新型的养殖饲料。并且本发明和现有技术中的其他制备方法
25 相比，其制备过程简单，易操作，生产时间短，适用于短时间内的大规模生产。

需要注意的是，上述具体实施例是示例性的，本领域技术人员可以在本发明公开内容的启发下想出各种解决方案，而这些解决方案也都属于本发明的公开范围并落入本发明的保护范围之内。本领域技术人员应该明白，本发明说明书及其附图均为说明性而并非构成对权利要求的限制。本发明的保护范围由权
30

利要求及其等同物限定。

权利要求书

1、一种活性海藻饲料添加剂的制作方法，**其特征在于**，所述方法是向由海藻或海藻渣制成的海藻浆液中添加复合微生物酶进行酶解从而获得所述活性海藻饲料添加剂，其中，所述复合微生物酶由纤维素酶、果胶酶、蛋白酶和淀粉酶中的多种组成。

2、如权利要求 1 所述的活性海藻饲料添加剂的制作方法，**其特征在于**，所述纤维素酶、所述果胶酶、所述蛋白酶和所述淀粉酶在所述复合微生物酶中所占的质量百分比分别是：60~100%，0~40%，0~5%，0~5%，并且

所述纤维素酶源于李氏木霉、绿色木霉和/或黑曲霉；

所述果胶酶源于米根霉、黑曲霉和/或米曲霉；

所述蛋白酶源于木瓜蛋白酶、菠萝蛋白酶和/或枯草杆菌；

所述淀粉酶源于地衣芽孢杆菌、米曲霉和/或黑曲霉。

15

3、如权利要求 2 所述活性海藻饲料添加剂的制作方法，**其特征在于**，所述纤维素酶的酶活为 $(18\sim 24) \times 10^4 \mu/g$ ，所述果胶酶的酶活为 $(2\sim 5) \times 10^4 \mu/g$ ，所述蛋白酶的酶活为 $(10\sim 50) \times 10^4 \mu/g$ ，所述淀粉酶的酶活为 $(1\sim 5) \times 10^4 \mu/g$ 。

20

4、如权利要求 1 所述活性海藻饲料添加剂的制作方法，**其特征在于**，所述方法是向所述海藻浆液中按照复合微生物酶与海藻浆液的质量比为 (0.3~3):100 的比例添加复合微生物酶，并在常压、温度为 30~65℃、pH3~7 的条件下保温酶解 6~30 小时，从而获得所述活性海藻饲料添加剂。

25

5、如权利要求 4 所述活性海藻饲料添加剂的制作方法，**其特征在于**，所述方法还包括以下步骤：

将海藻或海藻渣经过无机除杂后剪切并研磨成直径在 1mm 左右颗粒的海藻浆液；

30 将所述海藻浆液打入高速分散釜中第一次加水搅拌，使得水与海带浆液充

分混合，并且第一次加水量与所述海带浆液的质量比为 (30~40): 100;

将混合后的海藻浆液打入酶解罐中，第二次加水并且加入所述复合微生物酶，形成所述混合液，并且第一次加水量和第二次加水量的总量与所述海藻浆液的质量比为 50: 100; 以及

5 将所述混合液搅拌均匀后加热保温酶解，并且在酶解过程中，每一小时搅拌一次，并且每次搅拌 5 分钟。

6、如权利要求 5 所述活性海藻饲料添加剂的制作方法，**其特征在于**，将酶解好的混合液通过反冲带式过滤器进行固液分离，并且将分离出的酶解清液
10 在 60~68℃的范围内进行浓缩; 或者，将酶解好的混合液进行干燥。

7、如权利要求 5 所述活性海藻饲料添加剂的制作方法，**其特征在于**，所述高速分散釜启动后的转速为 3000 转/分钟，搅动 3 分钟后，所述高速分散釜的转速由 3000 转/分钟降至 1000 转/分钟。

15

8、一种活性海藻饲料添加剂，**其特征在于**，所述活性海藻饲料添加剂是按照如权利要求 1~7 之一所述的制作方法制作而成的。

9、如权利要求 8 所述的活性海藻饲料添加剂，**其特征在于**，所述活性海藻饲料添加剂还包括鱼粉、鱼油、豆粕、木薯淀粉、玉米粉和粉末大豆磷脂中
20 一种或多种。

10、一种活性海藻饲料，尤其是用于饲养家禽/家畜或水产养殖的饲料，**其特征在于**，所述饲料包括如权利要求 1~7 之一所述的制作方法制作而成的活性
25 海藻饲料添加剂或如权利要求 8 或 9 所述的活性海藻饲料添加剂。

说明书附图

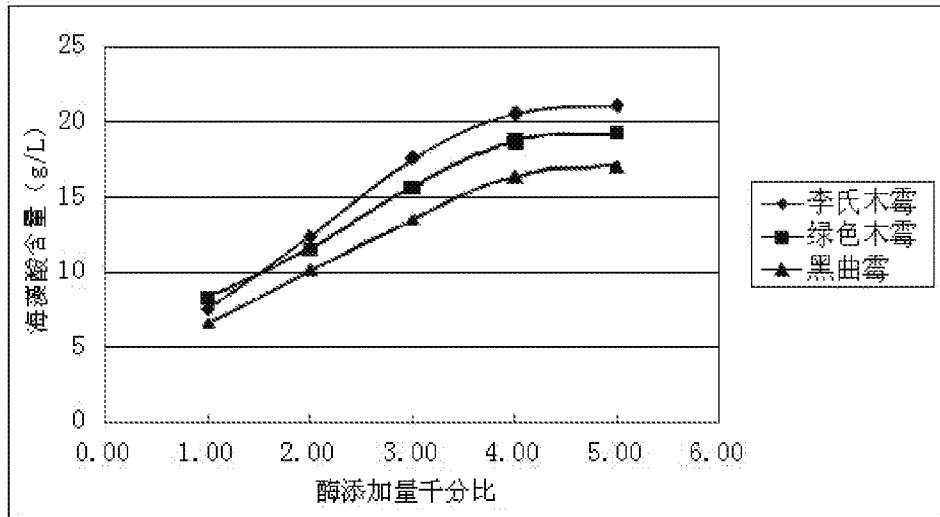


图 1

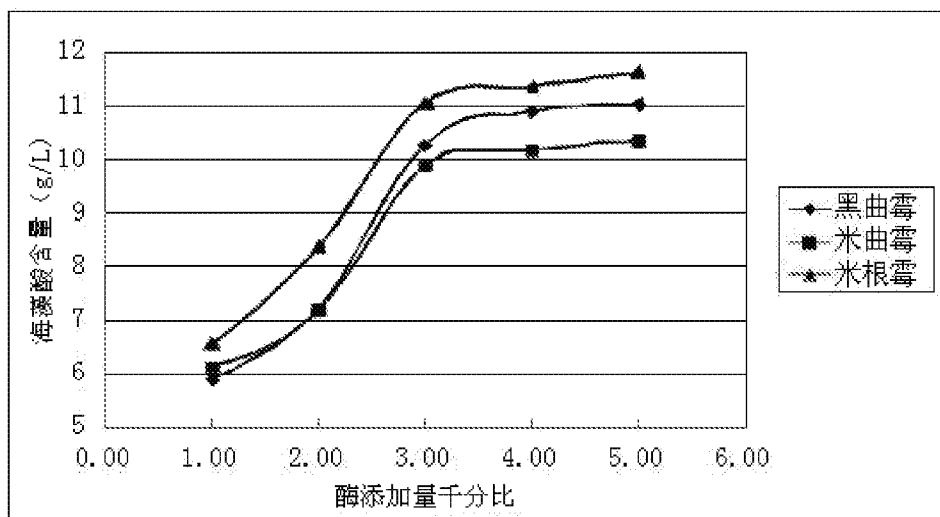


图 2

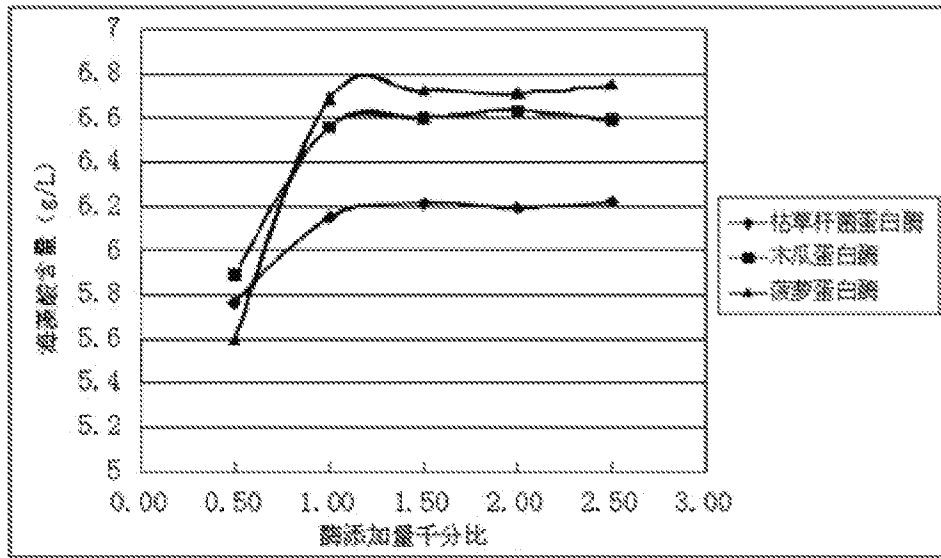


图 3

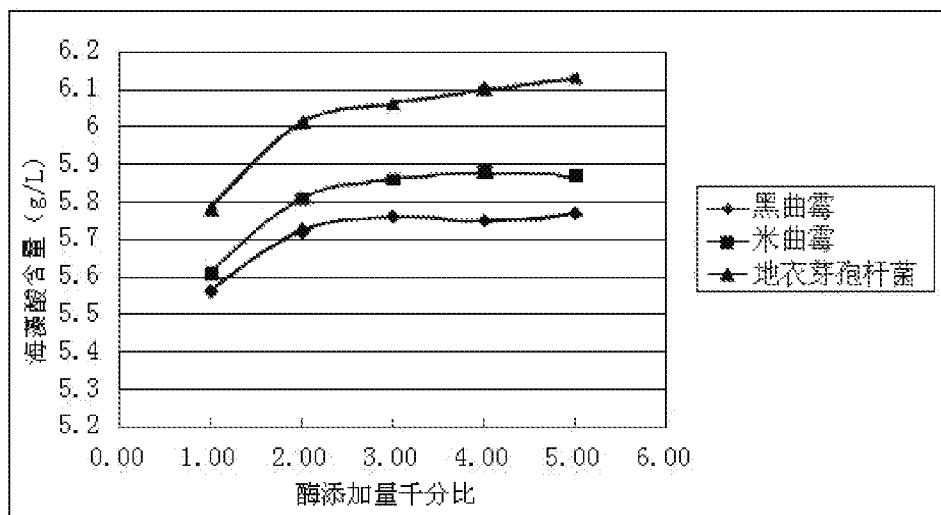


图 4

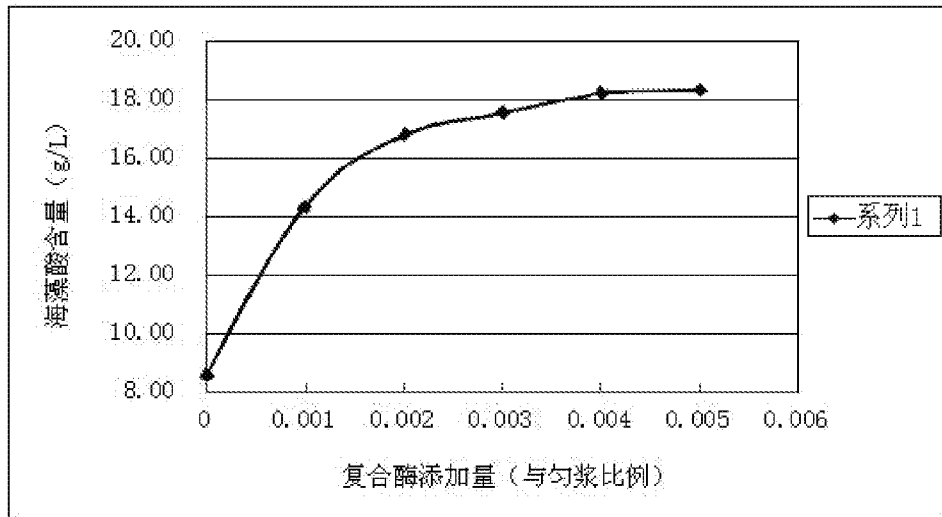


图 5

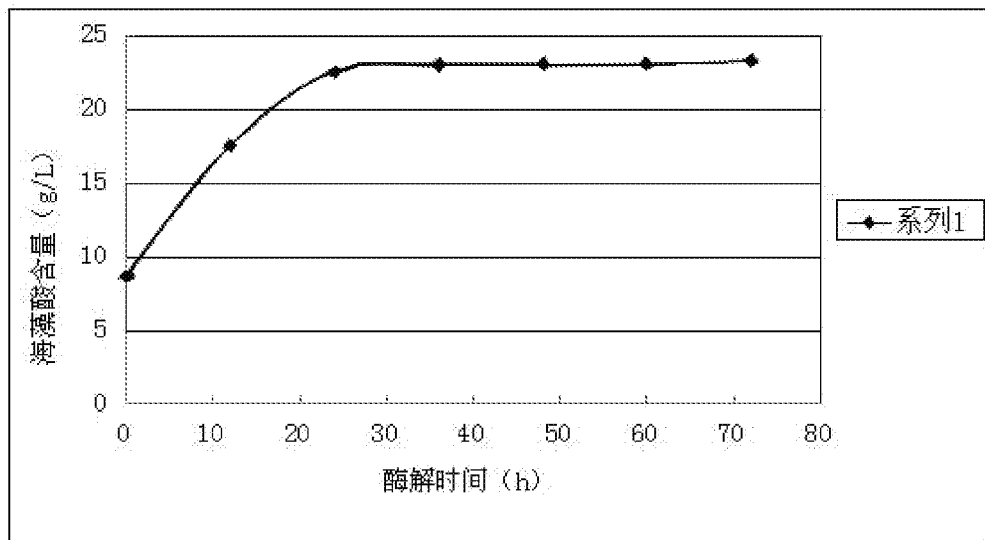


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/071861**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

A23K 1/14 (2006.01) i; A23K 1/18 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23K, A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI: feed enzymolysis seaweed+ algae+ slurry complex enzyme compound enzyme cellulase pectinase protease amylase corn soybean meal fishmeal fish oil

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102217768 A (JIMEI UNIVERSITY), 19 October 2011 (19.10.2011), claim 1	1-10
Y	CN 101999517 A (BEIJING RESOURCES YATAI FEED TECHNOLOGY CO., LTD.), 06 April 2011 (06.04.2011), claims 2-4	1-10

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	“&” document member of the same patent family
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 09 March 2015 (09.03.2015)	Date of mailing of the international search report 09 April 2015 (09.04.2015)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Jianbin Telephone No.: (86-10) 62411184

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/071861

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102217768 A	19 October 2011	None	
CN 101999517 A	06 April 2011	CN 101999517 B	27 November 2013

<p>A. 主题的分类</p> <p>A23K 1/14(2006.01)i; A23K 1/18(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>												
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A23K, A23L</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, 海藻 饲料 浆液 酶 酶解 复合酶 纤维素酶 果胶酶蛋白酶 淀粉酶 玉米 豆粕 鱼粉 鱼油 seaweed+ algae+ slurry complex enzyme compound enzyme cellulase pectinase protease amylase corn soybean meal fishmeal fish oil</p>												
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>CN 102217768 A (集美大学) 2011年 10月 19日 (2011 - 10 - 19) 权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 101999517 A (北京资源亚太饲料科技有限公司) 2011年 4月 6日 (2011 - 04 - 06) 权利要求2-4</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	Y	CN 102217768 A (集美大学) 2011年 10月 19日 (2011 - 10 - 19) 权利要求1	1-10	Y	CN 101999517 A (北京资源亚太饲料科技有限公司) 2011年 4月 6日 (2011 - 04 - 06) 权利要求2-4	1-10	
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求										
Y	CN 102217768 A (集美大学) 2011年 10月 19日 (2011 - 10 - 19) 权利要求1	1-10										
Y	CN 101999517 A (北京资源亚太饲料科技有限公司) 2011年 4月 6日 (2011 - 04 - 06) 权利要求2-4	1-10										
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型:</p> <table border="0"> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</td> <td>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td> <td></td> </tr> </table>			“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性	“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件	“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件	
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件											
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性											
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性											
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件											
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件												
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2015年 3月 9日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2015年 4月 9日</p>										
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>汪建斌</p> <p>电话号码 (86-10)62411184</p>										

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/071861

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	102217768	A	2011年 10月 19日	无	
CN	101999517	A	2011年 4月 6日	CN	101999517 B 2013年 11月 27日