

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：95104050

※ 申請日期：95.2.7

※IPC 分類：C12P 1/00, 1/02, 7/64, 9/00
A23D 7/00, A23K 1/00,
A23L 1/00, A61K 31/00,
C12N 1/04, 1/12, 1/14

一、發明名稱：(中文/英文)

使用新穎之細胞處理方法的多元不飽和脂肪酸之生產

PRODUCTION OF POLYUNSATURATED FATTY ACIDS USING
NOVEL CELL TREATMENT METHOD

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

日本水產股份有限公司/NIPPON SUISAN KAISHA, LTD.

代表人：(中文/英文)

垣添直也/KAKIZOE, NAOYA

住居所或營業所地址：(中文/英文)

日本國東京都千代田區大手町 2-6-2

6-2, OTEMACHI 2-CHOME, CHIYODA-KU, TOKYO 100-8686,
JAPAN

國 籍：(中文/英文)

日本/JAPAN

三、發明人：(共 2 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 東山堅一/HIGASHIYAMA, KENICHI
2. 中島俊治/NAKAJIMA, TOSHIHARU

國 籍：(中文/英文)

1. 日本/JAPAN
2. 日本/JAPAN

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為：。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

· 【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 日本、 2005/2/8、 2005-031918

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

一種用以自一微生物質量分離一或多於一化合物之方法，該微生物質量係包含已生產該或該等化合物之微生物，該方法係包含下列步驟：
(a)製備或獲得具有一平均濕含量落在30-80%之間的濕細胞；(b)將該濕細胞引入第一階段乾燥來獲得具有一平均濕含量落在5-50%之間的第一階段乾燥細胞；(c)將該第一階段乾燥細胞引入第二階段乾燥來獲得具有一平均濕含量不超過10%的第二階段乾燥細胞；以及(d)自該由(c)獲得之第二階段乾燥細胞來萃取或分離、純化及/或精製該或該等之個別化合物。

六、英文發明摘要：

A method for isolating one compound or more than one compounds from a biomass which contains microorganisms that have produced the compound or compounds, the method comprising the following steps: (a) preparing or obtaining wet cells having an average moisture content of between 30% and 80%; (b) subjecting the wet cells to primary drying to obtain primary dried cells having an average moisture content of between 5% and 50%; (c) subjecting the primary dried cells obtained in (b) to secondary drying to obtain secondary dried cells having an average moisture content of no greater than 10%; and (d) extracting or isolating purifying and/or refining the compound or each of the compounds from the secondary dried cells obtained in (c).

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(無)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

發明領域

本發明係關於一微生物質量，該微生物質量係包含產生一化合物之微生物，該化合物係包含用為一建構性脂肪酸之多元不飽和脂肪酸；一萃取自該微生物質量所獲得之粗製油脂及/或粗製磷脂；一用以生產一由純化一粗製油脂及/或粗製磷脂所獲得之精製油脂及/或粗製磷脂的方法；以及添加本發明微生物質量、脂肪或油脂(粗製油脂及/或精製油脂)及/或磷脂(粗製磷脂及/或精製磷脂)之食品與飲料、治療用營養補充劑、飼料及藥劑。

【先前技術】

發明背景

人體生物合成多元不飽和脂肪酸(以下簡稱為"PUFA")的兩代表性系列是 $\omega 3$ 及 $\omega 6$ 系列，其中 ω 係代表自脂肪酸甲基基團端部數起具有第一個雙鍵之碳原子編號，且於例如 $\omega 6$ 脂肪酸之情形中，亞麻油酸(18:2 $\omega 6$)是由重複去飽和及碳鏈伸長來轉化為 γ -次亞麻油酸(18:3 $\omega 6$)、二元均聚- γ -次亞麻油酸(18:3 $\omega 6$)、二十碳四烯酸(20:4 $\omega 6$)及4, 7, 10, 13, 16-二十二碳五烯酸(22:5 $\omega 6$)。

類似地，於 $\omega 3$ 脂肪酸之情形中， α -次亞麻油酸(18:3 $\omega 3$)亦是由重複去飽和及碳鏈伸長來轉化二十碳五烯酸(20:5 $\omega 3$)、7, 10, 13, 16, 19-二十二碳五烯酸(22:5 $\omega 3$)(二十二碳五烯酸)以及4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸(22:6

ω3)(二十二碳六烯酸)。據已知，特別是ω3 PUFAs二十碳五
烯酸(以下簡稱為"EPA")及二十二碳六烯酸(以下簡稱為
"DHA")係具有多項生理功能，此等功能係包含防制例如骨
質疏鬆及血栓之成人疾病的預防功能、抗癌功能以及學習
5 補強功能，因此已有許多企劃是使用ω3 PUFAs來作為用於
特定健康用途之藥劑及食品。然而，除了ω3型態之外，例
如ω6及ω9之PUFAs亦已於近期成為注目的焦點。

就例如人體血液磷脂的脂肪酸組成比例是11%二十碳
四烯酸、1%二十碳五烯酸、3%二十二碳六烯酸而言，二十
10 碳四烯酸係構成大約10%之例如血液及肝臟生理器官的脂
肪酸，且二十碳四烯酸是以一細胞膜之主要結構組份來調
節細胞膜流動性及展現多項生理功能，以及扮演一前列腺
素直接前驅物之重要角色。近期研發之二十碳四烯酸用途
是用為一哺乳嬰兒營養劑以及用為一展現神經活性功能且
15 係例如2-二十碳四烯醯基、單一甘油及大麻酯之內分泌大
麻鹼的建構脂肪酸。一般而言，二十碳四烯酸可經由攝取
富含亞麻油酸食物進行轉化來獲得，然而生活型態相關疾
病之病患及初期症狀以及嬰兒及老人會由於涉及生物合成
酵素效能降低而傾向於缺乏二十碳四烯酸；因此所欲是由
20 呈一由建構性脂肪酸所組成之脂肪或油脂(三酸甘油酯)形
態來提供直接攝取之方法。

雖然魚油是富含例如EPA及DHA之ω3 PUFAs的來源，
然而例如γ-次亞麻油酸、二元均聚-γ-次亞麻油酸、二十
碳四烯酸及4, 7, 10, 13, 16-二十二碳五烯酸(22:5 ω6)皆實

第 95104050 號專利申請案說明書修正本

101.03.29

際上無法獲得自傳統的脂肪或油脂來源，因此目前最普遍是由使用微生物發酵來獲得該包含PUFAs且以PUFAs為建構性脂肪酸之脂肪或油脂(以下稱為"包含PUFA之脂肪及/或油脂")。例如，已被提出之方法是由培養多種能夠產生包含二十碳四烯酸之脂肪及/或油脂的微生物來獲得該包含二十碳四烯酸且以二十碳四烯酸為建構性脂肪酸之脂肪或油脂(以下稱為"包含二十碳四烯酸之脂肪及/或油脂")。

已知具有一由高比例二十碳四烯酸構成脂肪酸部分之脂肪或油脂(以下稱為"富含二十碳四烯酸之脂肪及/或油脂")可以由使用如日本未審查專利公開案SHO編號第63-44891號及日本未審查專利公開案SHO編號第63-12290號之孢霉屬(*Mortierella*)微生物來獲得。於近年來，二十碳四烯酸之主要應用領域是哺乳嬰兒營養劑，例如且係特別是涉及使用由發酵嬰兒奶粉所獲得之包含二十碳四烯酸的脂肪及/或油脂。包含二十碳四烯酸之脂肪及/或油脂的新效用已於日本未審查專利公開案第2003-48831號(發明名稱：具有預防及減輕腦功能受損效用之組成物)獲得證明，且預計這些新效用於未來會呈高需求。

由培養孢霉屬(*Mortierella*)微生物所獲得之脂肪及/或油脂係大部分是由大約70%或更高之三酸甘油酯及磷脂所組成。可食用脂肪及/或油脂皆呈三酸甘油酯之形態，且就供用於上述目的而言，由細胞所產生之原始脂肪及/或油脂(此由萃取自細胞所獲得之脂肪及/或油脂被稱為"粗製油脂")是萃取自微生物培養所產生之生物總量，且其後將此粗

製油脂引入脫膠、去氧化、脫臭及脫色之可食用脂肪/油脂精製步驟來獲得不具有磷脂之精製脂肪及/或油脂。

由於獲得自培養孢霉屬 (*Mortierella*) 微生物之包含 PUFA 的脂肪及/或油脂會囤積於菌絲，因此就較高之經濟考
5 量而言，培養必須由達到一較高濃度來增加包含 PUFA 之脂
肪及/或油脂的單次培養產率。包含 PUFA 之脂肪及/或油脂
的單次培養產率是意指由細胞或菌絲濃度所構成之產物，
因此細胞濃度與單次培養的包含 PUFA 之脂肪及/或油脂濃
度二者皆必須增高。細胞濃度可以由提高一般被轉換為細
10 胞組份的培養液氮源濃度來增高。包含 PUFA 之脂肪及/或油
脂的單一菌絲含量是由飽和調控細胞形態以及藉由在充足
氧氣存在之下進行發酵來增高。已被報導之控制細胞形態
方法係包含使用最佳化之培養液的鹽組成物(日本國內再
次公開專利案第 98/029558 號)，而供應氧氣的方法係包含加
15 壓培養方法及富含氧氣的需氧培養方法(日本未審查專利
公開案 HEI 編號第 06-053970 號)。

據報導，嘗試改善的並不僅是培養步驟，而且還有接
續培養後的細胞回收步驟。例如，一報導方法是包含獲得
一微生物質量(濕含量 20-75%)，然後在保持該濕含量之
20 下，由生物總量顆粒化來製成顆粒，以及其後將顆粒乾燥
至一低於 20% 之濕含量，藉此顆粒化來協助不僅是乾燥而
且還有抽取標的化合物(WO97/369 96)。此公開案係教示一
抽取方法係較佳是經由造粒形成顆粒，然而一般的抽取方
法並不會改變濕含量。

乾燥顆粒的方法是例如噴射乾燥、流動床乾燥、冷凍乾燥、輸送帶乾燥或抽氣乾燥。另一已知方法是過濾一孢霉屬(*Mortierella*)菌絲型真菌培養液來收集細胞，其後細胞進行乾燥及打破，然後使用一有機溶劑來萃取脂肪及/或油脂(CN132 3904A)，且Yamada等人亦報導一使用珠粒研磨來打破細胞的方法("Industrial applications of single cell oils", edited by D.J. Kyle and C. Ratledge, AOCS press (1992) p.118-138)。因此，雖然已有多種不同的細胞回收方法被公開，然而在沒有研發使用新的乾燥機或揭露使用多重傳統乾燥機組合之下，乾燥仍然不變地是由傳統乾燥單一步驟來完成。再者，目前還沒有任何描述乾燥微生物質量的加工方法。

雖然由損失或減少微生物脂肪/油脂及微生物脂肪/油脂生產的微生物脂肪及/或油脂品質之觀點而言，細胞回收步驟非常重要，然而實際上目前無法找到有關此項加工的研發。

乾燥加工可以大致上區分為3個步驟或階段("Shokuhin Kogaku Kiso Koza (6) Concentration and drying", R. Matsuno et al., Korin Press (1988), Chap. 5)。首先，當材料具有一充分的濕含量時，水份自材料蒸發被認為會等同水份自水滴表面蒸發，且於一被已知為預熱階段之期間內，材料溫度會朝向濕球溫度偏移，獲得自空氣之熱交換數量會完全被濕氣蒸發所消耗，因此材料的濕含量下降與時間呈直接正比。固定乾燥速率的階段稱為固定乾燥速率階

段。於進行更進一步乾燥時，材料內部的水份移動成為速率限制因素，因此濕氣蒸發速率降低，且濕含量會與乾燥空氣達成平衡，最後引發乾燥終止。此階段稱為下降乾燥速率階段。

5 實用的乾燥方法可以大致區分為熱對流方法、熱傳導方法及熱輻射方法。已知的熱輻射方法係包含遠紅外線輻射方法，然而此種方法並不為涉及大規模巨量處理之食品加工所普遍使用，食品加工較廣泛使用的是熱對流及熱傳導方法。

10 一熱對流型乾燥機是由供應熱空氣來快速移除粗製材料內的蒸發濕氣，藉此可強而有力地增進濕氣蒸發；因此就達成大規模運作濕含量降低而言是一有效方法。雖然具有高濕氣含量的粗製材料還會因為導致例如由材料黏附所產生的結塊問題，而降低熱空氣的接觸面積，然而從另一
15 方面來看，供應大量熱空氣則會引發乾燥材料粉末飛散及提高風扇的能源成本。

一熱傳導型乾燥機可以由實際無空氣流動來達成高效率加熱，且能夠因此大幅降低風扇吹風的能源成本及粗製材料粉末的飛散。然而，從另一方面來看，由於加熱僅靠
20 熱傳導，因此乾燥至一低濕含量將難以達成。

日本未審查專利公開案SHO編號第63-44891號

日本未審查專利公開案SHO編號第63-12290號

日本未審查專利公開案第2003-48831號

日本未審查專利公開案HEI編號第06-153970號

日本國內再次公開專利案第98/029558號

WO97/36996

CN1323904A

"Industrial applications of single cell oils", edited by
5 D.J. Kyle and C. Ratledge, AOCS press (1992) p.118-138

"Shokuhin Kogaku Kiso Koza (6) Concentration and
drying", R. Matsuno et al., Korin Press (1988), Chap. 5

【發明內容】

發明概要

10 因此，在考量乾燥加工之預熱階段、固定乾燥速率階段及乾燥速率下降階段的三階段濕氣行為下，高度所欲是研發一適合用以乾燥微生物質量的新穎方法，且此研發是依據對大致區分為對流加熱系統及/或傳導加熱系統之乾燥機優缺點的瞭解來作檢視。

15 本發明人的辛勤研究是針對由微生物發酵生產包含PUFA之脂肪及/或油脂期間的微生物質量回收，且本發明人發現由使用數種依據不同原理之方法，且特別是一由一傳導加熱系統與對流加熱系統所組成之組合來進行乾燥步驟時，個別之加熱系統優點可以被使用來克服缺點及顯著改善乾燥步驟之經濟成本。本發明人更進一步發現由乾燥後裝填包裝前的階段進行乾燥菌絲冷卻，可以獲得一具有所
20 欲品質之包含PUFA的粗製油脂。

特別地，本發明係提供一組合數種方法之新穎乾燥方法，以及一由乾燥菌絲冷卻後進行裝填及包裝之特點來生

產包含PUFA之脂肪及/或油脂(三酸甘油酯)及包含PUFA之
磷脂及包含PUFA之菌絲的生產及貯存方法。

本發明係特別是提供一種用以自一微生物質量分離一
或多於一化合物之方法，該微生物質量係包含已生產該或
5 該等化合物之微生物，且該方法係包含下列步驟：

(a)製備或獲得具有一平均濕含量落在30-80%之間的
濕細胞；

(b)將該濕細胞引入第一階段乾燥來獲得具有一平均濕
含量落在5-50%之間的第一階段乾燥細胞；

10 (c)將該第一階段乾燥細胞引入第二階段乾燥來獲得具
有一平均濕含量不超過10%的第二階段乾燥細胞；以及

(d)萃取或分離、純化及/或精製該由(c)獲得之第二階段
乾燥細胞的化合物或個別化合物。

於上述方法中，步驟(b)之第一階段乾燥細胞是由一傳
15 導加熱系統來完成，該系統係較佳是一錐狀條帶混合乾燥
機、一傳導熱移轉乾燥機、一滾筒乾燥機或一渦流乾燥機。
步驟(c)之第二階段乾燥細胞是由一對流加熱系統來完成，
該系統係例如是一振動流動床乾燥機、一水平連續流動床
乾燥機、一旋轉乾燥機、一箱盒型水平流動乾燥機、一箱
20 盒型空氣流動乾燥機、振動乾燥/冷卻機、一流動床乾燥
機、一寬帶型空氣流動乾燥機或一寬帶型乾燥機。步驟(a)
之濕細胞係較佳是獲得自一培養液進行固體/液體分離，且
該固體/液體分離係較佳是以機械脫水來同時進行。

生物總量是例如一包含一真菌或者是衍生自一真菌。

第 95104050 號專利申請案說明書修正本

101.03.29

此真菌可以是一歸屬於寇氏隱甲藻屬(*Cryptocodinium*)、破囊壺菌屬(*Thrautochytrium*)、裂殖壺菌屬(*Schizochytrium*)、吾肯氏壺菌屬(*Ulkenia*)、日本壺菌屬(*Japanochytrium*)或螺旋菌屬(*Haliphthoros*)之真菌。

5 例如，藻類可以是寇氏隱甲藻(*Cryptocodinium cohnii*)。

化合物係較佳是一脂肪及/或油脂，此脂肪及/或油脂係包含一用為一建構性脂肪酸之多元不飽和脂肪酸，其中該多元不飽和脂肪酸是一具有18或更多個碳原子之具有2或
10 數個雙鍵的 ω 3, ω 6及/或 ω 9脂肪酸，且實例是： α -次亞麻油酸(9, 12, 15-十八碳三烯酸)、6, 9, 12, 15-十八碳四烯酸(18:4 ω 3)、8, 11, 14, 17-二十碳四烯酸(20:4 ω 3)、EPA(5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸)、DPA ω 3(7, 10, 13, 16, 19-二十二碳五烯酸)、DHA(4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸)、 γ -次亞
15 麻油酸(6, 9, 12-十八碳三烯酸)、二元均聚- γ -次亞麻油酸(8, 11, 14-二十碳三烯酸)、花生四烯酸(5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸)、7, 10, 13, 16-二十二碳四烯酸(22:4 ω 6)、DPA ω 6(4, 7, 10, 13, 16-二十二碳五烯酸)、6, 9-十八碳二烯酸(18:2 ω 9)、
20 8, 11-二十碳二烯酸(20:2 ω 9)及/或美德酸(5, 8 11-二十碳三烯酸)。

就一上文所述之較佳方法而言，步驟(c)所獲得的第二階段乾燥細胞可以於經由一下述冷卻處理方法之後被引入步驟(d)：

(i)由提供具有一由氧氣濃度不超過21%所組成之空氣

來冷卻至至少 60°C；或者

(i) 由靜置於一具有一由氧氣濃度不超過 21% 所組成之空氣來冷卻至至少 60°C。

本發明更進一步係提供一種用以自一微生物質量分離
5 一或多於一化合物之方法，該微生物質量係包含已生產該
或該等化合物之微生物，且該方法包含下列步驟：

(a) 製備或獲得具有一平均濕含量落在 30-80% 之間的
濕細胞；

(b) 將該濕細胞引入第一階段乾燥來獲得具有一平均
10 濕含量落在 5-50% 之間的第一階段乾燥細胞；

(c) 將該第一階段乾燥細胞引入第二階段乾燥來獲得
具有一平均濕含量不超過 10% 的第二階段乾燥細胞。

就上述方法而言，步驟(b)之第一階段乾燥實例是由一
傳導加熱系統來完成，而步驟(c)之第二階段乾燥實例是由
15 一對流加熱系統來完成。

本發明係更進一步提供一用以貯存乾燥菌絲之方法，
該乾燥菌絲係包含已生產一化合物或多於一化合物之微生
物的微生物質量，其中：

(1) 乾燥菌絲是獲得自下列步驟：

20 (a) 製備或獲得具有一平均濕含量落在 30-80% 之間的
濕細胞；

(b) 將該濕細胞引入第一階段乾燥來獲得具有一平均濕
含量落在 5-50% 之間的第一階段乾燥細胞；

(c) 將該第一階段乾燥細胞引入第二階段乾燥來獲得具

有一平均濕含量不超過10%的第二階段乾燥細胞；以及其
後

(2) 由一下述方法來將該獲得之第二階段乾燥細胞引入冷卻處理：

5 (i) 由提供具有一由氧氣濃度不超過21%所組成之空氣來冷卻至至少60°C；或者

(ii) 由靜置於一具有一由氧氣濃度不超過21%所組成之空氣來冷卻至至少60°C；以及

(3) 由一下述方法來貯存該冷卻之第二階段乾燥細胞：

10 (I) 將細胞與氮氣一併裝填入一可密封容器，然後貯存於15°C或更低溫；或者

(II) 將細胞與具有氧氣濃度不超過20%之空氣一併裝填入一可密封容器，然後貯存於15°C或更低溫。

於上述方法中，步驟(b)之第一階段乾燥實例是由一傳
15 導加熱系統來完成，而步驟(c)之第二階段乾燥實例是由一對流加熱系統來完成。

本發明更進一步係提供一經由上述方法所分離、萃
取、純化或精製之化合物的用途，此用途是製造一食品組
成物、功能性食品、營養補充劑、早產嬰兒奶粉、足月嬰
20 兒奶粉、哺乳嬰兒奶粉、哺乳嬰兒食品、孕婦食品、老人
食品、化妝品及/或藥學組成物。本發明亦係提供一經由上
述方法所分離、萃取、純化或精製之化合物的用途，此用
途是製造一動物飼料、魚飼料及/或植物肥料。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

本發明係關於一生產包含PUFA之脂肪及/或油脂及/或包含PUFA之磷脂的乾燥菌絲及/或包含PUFA之脂肪及/或油脂及/或包含PUFA之磷脂的方法，其中生產是培養一能夠
5 產生多元不飽和脂肪酸化合物之微生物，且該化合物是包含PUFA且以PUFA為一建構性脂肪酸之脂肪及/或油脂。

因此，本發明方法必需培養一能夠產生多元不飽和脂肪酸化合物之微生物，且該化合物是包含PUFA且以PUFA為一建構性脂肪酸之脂肪及/或油脂及/或包含PUFA之磷
10 脂。本案微生物係較佳是一微生物，其可產生至少一多元不飽和脂肪酸型態是具有18或更多個碳原子及3或更多個雙鍵之 ω 6多元不飽和脂肪酸、具有18或更多個碳原子及2或更多個雙鍵之 ω 9多元不飽和脂肪酸、具有18或更多個碳原子及3或更多個雙鍵之 ω 3多元不飽和脂肪酸，且以此多元
15 不飽和脂肪酸作為三酸甘油酯及/或磷脂的主要建構脂肪酸。

具有18或更多個碳原子及3或更多個雙鍵之 ω 6多元不飽和脂肪酸實例是： γ -次亞麻油酸(6, 9, 12-十八碳三烯酸)、二元均聚- γ -次亞麻油酸(8, 11, 14-二十碳三烯酸)、花生四烯酸(5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸)、7, 10, 13, 16-二十二
20 碳四烯酸(22:4 ω 6)及DPA ω 6(4, 7, 10, 13, 16-二十二碳五烯酸)；具有18或更多個碳原子及2或更多個雙鍵之 ω 9多元不飽和脂肪酸實例是：6, 9-十八碳二烯酸、8, 11-二十碳二烯酸及/或美德酸(5, 8 11-二十碳三烯酸)；具有18或更多個碳

第 95104050 號專利申請案說明書修正本

101.03.29

原子及3或更多個雙鍵之 ω 3多元不飽和脂肪酸實例是： α -次亞麻油酸(9, 12, 15-十八碳三烯酸)、6, 9, 12, 15-十八碳四烯酸、8, 11, 14, 17-二十碳四烯酸(20:4 ω 3)、EPA(5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸)、DPA ω 3(7, 10, 13, 16, 19-二十二碳五烯酸)及DHA(4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸)。

因此，本發明可使用任何一種能夠產生一以蘊含多元不飽和脂肪酸作為一建構性脂肪酸之脂肪/油脂(三酸甘油酯)及/或磷脂化合物的微生物。此種能夠產生一以蘊含二十碳四烯酸作為一建構性脂肪酸之脂肪及/或油脂的微生物實例是歸屬於下列屬名之微生物：孢霉屬(*Mortierella*)、耳霉屬(*Conidiobolus*)、腐霉屬(*Pythium*)、疫菌屬(*Phytophthora*)、青黴菌屬(*Penicillium*)、分枝孢子菌屬(*Cladosporium*)、白黴菌屬(*Mucor*)、鐮孢菌屬(*Fusarium*)、麴菌屬(*Aspergillus*)、紅酵母屬(*Rhodotorula*)、蟲黴菌屬(*Entomophthora*)、藍刺頭孢屬(*Echinosporangium*)、水霉屬(*Saprolegnia*)。

歸屬於孢霉屬(*Mortierella*)且亞屬為孢霉屬(*Mortierella*)之微生物實例是 *Mortierella elongate*, *Mortierella exigua*, *Mortierella hygrophila* 及 *Mortierella alpina*。更特別是菌株 *Mortierella elongate* IFO8570、*Mortierella exigua* IFO8571、*Mortierella hygrophila* IFO5941、*Mortierella alpina* IFO8568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、

CBS608.70、CBS754.68 等等。

能夠產生 DHA 的微生物實例是歸屬於下列屬名之微生物：寇氏隱甲藻屬 (*Crypthecodinium*)、破囊壺菌屬 (*Thrautochytrium*)、裂殖壺菌屬 (*Schizochytrium*)、吾肯氏壺菌屬 (*Ulkenia*)、日本壺菌屬 (*Japanochytrium*) 或螺旋菌屬 (*Haliphthoros*)。

大阪發酵研究所 (IFO)、美國菌種中心 (ATCC) 或荷蘭菌種中心列管的所有菌株皆可直接使用。亦可使用由本研究團隊自泥土分離之菌株 *Mortierella alpina* 1S-4 及 *Mortierella elongate* SAM0219 (FERM-P 8703) (FERM-BP 1239)。

就培養一用於本發明之菌株而言，菌株的生長細胞、孢子或菌絲、一由預先培養菌株所獲得之接種培養液、或者收集自接種培養的生長細胞、孢子或菌絲可以由接種於一液體培養液或固體培養液來進行培養。使用之碳源可以是一普遍使用之碳源，且係例如但不限制是葡萄糖、果糖、木糖、蔗糖、麥芽糖、可溶性澱粉、糖蜜、甘油、木糖醇或蔗糖化澱粉。

氮源可使用天然氮源，例如：蛋白月東 (peptone)、酵母菌萃取物、麥芽糖萃取物、肉品萃取物、酪蛋氨基酸、玉米漿、黃豆蛋白質、脫脂黃豆及棉籽粉屑，以及包含尿素之有機氮源或例如硝酸鈉、硝酸銨及硫酸銨之無機氮源，其中特佳之氮源是獲得自黃豆，且特別是黃豆、脫脂黃豆、黃豆粕、可食用黃豆蛋白、奧卡蘿油、豆奶、黃豆

粉及類似物。特佳是使用經加熱脫脂之脫脂黃豆，且更佳是使用一或數種不同型態且以大約70-90°C加熱處理及脫除乙醇可溶成份之脫脂黃豆，且可選擇組合任何一種上述氮源。

- 5 設若為所需，亦可添加微量營養素，微量營養素係包含磷酸鹽離子、鉀離子、鈉離子、鎂離子或鈣離子、例如鐵、銅、鋅、錳或鈷之金屬離子，或者亦可添加維生素。此種培養液成份並無特定限制，惟其濃度必須不會干擾微生物生長。於施行運作時，可添加一碳源總濃度是0.1-40
- 10 重量%且較佳是1-25重量%，一氮源總濃度是2-15重量%且較佳是2-10重量%，且特別是一起始碳源添加量為1-5重量%及一起始氮源添加量為3-8重量%，其後於培養期間追加碳源及氮源(更佳是僅追加碳源)。

- 包含PUFA之脂肪及/或油脂的產率可以由單獨或組合
- 15 使用一不飽和脂肪酸前驅物來增高，此前驅物實例可以是一例如十六烷或十八烷之碳氫化合物；一例如油酸或亞麻油酸或其鹽之脂肪酸；一例如乙酯、甘油脂肪酸酯或山梨糖醇脂肪酸酯之脂肪酸酯；或一例如橄欖油、黃豆油、菜
- 20 籽油、棉籽油或椰子油之脂肪及/或油脂。添加之受質可以是培養液的0.001-10%，較佳是0.05-10%。此種受質亦可被使用為培養之唯一碳源。

產生包含PUFA之脂肪及/或油脂的微生物培養溫度會視所使用的微生物而異，且可以是5-40°C及較佳是20-30°C，或者以20-30°C培養來進行細胞生長者可接續以5-20°C

培養來生產包含PUFA之脂肪及/或油脂。此種溫度控制亦可增加包含PUFA之脂肪及/或油脂內的PUFAs建構性脂肪酸組份比例。接種培養可以由搖瓶發酵培養、振盪培養、靜置液態培養或固態培養來進行，且主要的培養是由搖瓶發

5 酵培養來進行。於自接種培養轉移之主要培養起始時，將培養液的酸鹼值調整至5-7且較佳是5.5-6.5。個別之接種培養階段的培養期係一般為1-10日，較佳是1-5日，且更佳是1-3日。主要培養的培養期則一般為2-30日，較佳是5-20日，且更佳是5-15日。

10 歸屬於孢霉屬 (*Mortierella*) 且亞屬為孢霉屬 (*Mortierella*) 之微生物係被已知會產生包含用為主要建構性脂肪酸之二十碳四烯酸的脂肪或油脂化合物(包含二十碳四烯酸之三酸甘油酯及/或包含二十碳四烯酸之磷脂)，然而經由上述菌株突變，本發明人已成功獲得一能夠產生脂

15 肪或油脂且該脂肪或油脂包含用為主要建構性脂肪酸之二元均聚- γ -次亞麻油酸的微生物(日本未審查專利公開案 HEI 編號第 5-91887 號)以及能夠產生脂肪或油脂且該脂肪或油脂包含用為主要建構性脂肪酸之 ω 9 多元不飽和脂肪酸的微生物(日本未審查專利公開案 HEI 編號第 5-91888 號，日

20 本未審查專利公開案 HEI 編號第 10-57085 號，日本未審查專利公開案 HEI 編號第 5-91886 號)。

此外，本發明人還獲得具有高碳源濃度抗性之微生物，此微生物是歸屬於孢霉屬 (*Mortierella*) 及亞屬為孢霉屬 (*Mortierella*) 且此微生物可由使用本發明生產方法來產生

包含PUFA之細胞及/或包含PUFA之脂肪及/或油脂。然而，本發明方法並不限是歸屬於孢霉屬(*Mortierella*)及亞屬為孢霉屬(*Mortierella*)之微生物，本發明方法可以施用於能夠產生脂肪或油脂(三酸甘油酯)及/或磷脂化合物且此化合物包含用為主要建構性脂肪酸之多元不飽和脂肪酸的微生物，並藉此使獲得之乾燥細胞是於細胞內具有包含PUFA之脂肪及/或油脂及/或包含PUFA之磷脂，且藉此獲得那些脂肪及/或油脂(粗製油及/或精製脂肪及/或油脂)及/或磷脂(粗製磷脂及/或精製磷脂)。

10 用以自具有脂肪及/或油脂囤積於菌絲之微生物獲得粗製油及/或粗製磷脂的方法可以使用直接或滅菌濃縮及酸化後之完全培養液來進行處理，其後由例如自然沉澱、離心分離及/或過濾之一般固體/液體分離方法來回收培養細胞。固體/液體分離方法可以由添加一凝結劑或助濾劑來協助。凝結劑實例係包含氯化鋁、氯化鈣、海藻酸、殼聚糖。矽藻土是一助濾劑實例。

其後乾燥回收培養菌絲。乾燥可以避免於菌絲貯存期間產生腐敗、氧化裂解及水解。乾燥亦可增高自菌絲萃取粗製油之產率。

20 乾燥方法之特徵在於包含一由一傳導加熱系統進行第一階段乾燥及一對流加熱系統進行第二階段乾燥所構成之組合。

對於以一傳導加熱系統進行乾燥並沒有特定限制，惟乾燥機必須使用傳導加熱來作為主要熱源，且較佳是一熱

5 吸附輸送帶型態，更佳是一滾筒式乾燥機。傳導表面之加熱溫度是使用 100-200°C，特別是 105-170°C 且更佳是 120-150°C 來進行加熱乾燥。當使用一雙滾筒乾燥機來進行第一階段乾燥時，第一階段乾燥細胞會具有一由傳導加熱所產生之乾燥如層片狀的細胞表層，且刨刮會產生一具有無固定形狀之屑片。更特別的是，屑片會具有一 0.05-4 毫米且較佳是 0.1-1 毫米之厚度及 1-100 毫米、較佳是 1-40 毫米且更佳是 2-20 毫米之長度及寬度(外圍四邊之長度)。具有乾燥細胞表層之第一階段乾燥細胞可以全部飼入以對流加熱系統來進行之第二階段乾燥。

將該獲得自以傳導加熱系統進行第一階段乾燥之微生物質量全部飼入一對流加熱系統來進行乾燥。對於以一對流加熱系統進行乾燥並沒有特定限制，惟乾燥機必須使用對流加熱來作為主要熱源，且較佳是使用一材料輸送型態、一材料搖盪型態或熱空氣輸送型態，且更佳是一有氣寬帶材料輸送型態或一流動床或振盪流動床材料搖盪型態。對流表面之熱空氣溫度是使用 40-200°C，特別是 60-170°C 且更佳是 80-150°C 來進行供應熱空氣乾燥。

20 由於一對流加熱型態乾燥機會由供應熱空氣來進行自粗製材料空隙快速移除蒸發濕氣，因此被認為是一於所欲是大量降低濕含量時的有效方法。雖然具有高濕氣含量的粗製材料會因為導致例如由材料黏附所產生的結塊問題，而降低熱空氣的接觸面積，然而從另一方面來看，供應大量熱空氣則會引發乾燥材料粉末飛散及提高風扇的能源成

本。

一熱傳導型乾燥機可以由實際無空氣流動來達成高效率加熱，且能夠因此大幅降低風扇吹風的能源成本及粗製材料粉末的飛散。然而，從另一方面來看，由於加熱僅靠熱傳導，因此乾燥至一低濕含量將難以達成。因此，先進地企劃是使用一利用兩種型態優點之系統，其中於預先加熱階段至固定乾燥速率階段期間，由於此期間材料的濕含量較高，因此乾燥是使用一傳導加熱系統來進行，其後於固定乾燥速率階段至乾燥速率下降階段期間，由於此期間材料的濕含量較低，因此乾燥是使用一對流加熱系統來進行。

例如一雙滾筒乾燥機方法，其係以一傳導加熱系統型態來容許於第一階段乾燥進行大幅降低濕含量，且藉此於第二階段乾燥時，由乾燥細胞表層來避免材料黏附產生結塊。再者，由於此型態乾燥機大幅降低濕含量，因此較諸不使用第一階段乾燥之傳統方法而言，於對流加熱系統乾燥步驟中所使用的熱空氣體積及/或熱空氣處理時間可降至最低，且可預期是降低飛散及燃料成本，因此此方法會優於傳統方法。

對於用以進行細胞乾燥之機器並沒有特定限制，惟乾燥機必須是傳導及對流加熱系統，且較佳是下列特定實例。然而，本發明並不限制使用這些特定機器，在沒有任何特定限制之下，本發明可使用任何能夠運作相同乾燥原理之其他機器。

傳導加熱型態機器實例如下：

錐狀條帶混合乾燥機，製造商：Ookawara Mfg. Co., Ltd；

傳導熱移轉乾燥機，製造商：Ookawara Mfg. Co., Ltd；

5 滾筒乾燥機，製造商：Yamamoto Giken Koki Co., Ltd；

渦流乾燥機，製造商：Okadara Co., Ltd。

對流加熱型態機器實例如下：

振動流動床乾燥機，製造商：Dalton Co., Ltd；

水平連續流動床乾燥機，製造商：Dalton Co., Ltd；

10 旋轉乾燥機，製造商：Dalton Co., Ltd；

箱盒型水平流動乾燥機，製造商：Dalton Co., Ltd；

箱盒型空氣流動乾燥機，製造商：Dalton Co., Ltd；

振動乾燥/冷卻機，製造商：Shinko Denki Co., Ltd；

流動床乾燥機，製造商：Ookawara Mfg. Co., Ltd；

15 寬帶型空氣流動乾燥機，製造商：Ookawara Mfg. Co., Ltd；

寬帶型乾燥機，製造商：Daiwa Sanko Mfg. Co., Ltd。

於細胞被乾燥之後，進行回收包含PUFA之脂肪及/或油脂及/或包含PUFA之磷脂。回收粗製油脂及/或磷脂的方法
20 可以使用一有機溶劑萃取方法或一擠壓方法，惟較佳是於一氬氣沖流下使用有機溶劑萃取。可使用之有機溶劑是乙醇、己烷、甲醇、氯仿、二氯甲烷、石油醚、丙酮及類似物，或者可以使用由甲醇與石油醚所組成之選擇性萃取或一由氯仿-甲醇-水所組成之單層溶劑系統。然而，用以獲得

粗製油脂及/或磷脂的萃取方法並不限制是上述方法，且可以是任何一種可達成有效萃取細胞脂肪或油脂(三酸甘油酯)及/或磷脂之方法。例如，一有效方法可以使用一超臨界二氧化碳沖流萃取。

- 5 使用減壓自萃取物移除有機溶劑或超臨界沖流組份可獲得該使用有機溶劑或超臨界沖流所萃取之產物，藉此獲得標的粗製油脂及/或粗製磷脂。

 由本發明方法所獲得之該包含化合物且該化合物係包含用為一建構性脂肪酸之多元不飽和脂肪酸(包含PUFA之
10 脂肪及/或油脂及/或包含PUFA之磷脂)的乾燥細胞或粗製油脂(包含PUFA之粗製油脂)及/或粗製磷脂(包含PUFA之粗製磷脂)可以被使用來直接組合入動物飼料。然而，就製造食物而言，較佳是使用一常用的純化方法來獲得一包含
15 是脫膠、去氧化、脫臭、脫色、管柱處理、分子蒸餾、靜置或類似方法。

 微生物質量、包含脂肪或油脂(三酸甘油酯)及/或磷脂之乾燥細胞、粗製油脂、精製脂肪/油脂(三酸甘油酯)、粗製磷脂及精製磷脂具有無限多的用途，例如：其可以被使
20 用為食品、飲料、化妝品及藥劑之起始材料或添加物。使用目的及使用數量亦完全不受任何限制。

 食品組成物之實例是一般食品、功能性食品、營養補充劑、早產嬰兒奶粉、足月嬰兒奶粉、哺乳嬰兒奶粉、哺乳嬰兒食品、孕婦食品或老人食品。包含脂肪/油脂食品實

例是於例如煮湯之製造期間將本發明脂肪/油脂添加入例如肉、魚及核果所製成之天然的包含脂肪/油脂食品，使用本發明脂肪/油脂作為加熱媒質且係例如甜甜圈之食品，例如奶油之脂肪/油脂食品，於加工期間添加本發明脂肪/油脂且係例如餅乾之加工食品，或者於完成時被噴灑或塗覆用本發明脂肪/油脂且係例如硬餅乾之食品。此種組成物亦可被添加入農業肥料、發酵食品、牲畜飼料、養殖飼料及不含脂肪或油脂之飲料。其亦可呈功能性食品或藥劑之形態以及呈例如腸道營養劑、粉末、顆粒、錠劑、口服液、懸浮液、乳化劑、糖漿及類似物之加工形態。

實施例

現在本發明將於瞭解本發明並不受此限制之下，以下列實施例來作更詳細的解釋。

實施例1 以流動床冷卻之乾燥細胞

以1.0體積%將一孢霉屬菌株(*Mortierella alpine* 1S-4)之孢子懸浮液轉移至一包含1.0%酵母菌萃取物及2.0%葡萄糖且酸鹼值為6.3之培養液，然後以100 rpm交互型搖盪、溫度28°C且歷時3日之條件開始進行接種培養(第一階段)。

接續，將包含1%酵母菌萃取物及2%葡萄糖及0.1%黃豆油且酸鹼值為6.3之30公升培養液製備入一50公升發酵槽培養箱，然後由此培養液內轉移接種培養(第一階段)且以200 rpm搖盪、溫度28°C、培養箱內部壓力150 kPa且歷時2日之條件來開始進行接種培養(第二階段)。

接續，將一4500公升之培養液(培養液A: 336公斤黃豆

第 95104050 號專利申請案說明書修正本

101.03.29

粉、16.8 公斤磷酸鉀 (KH_2PO_4)、2.8 公斤氯化鎂 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)、2.8 公斤氯化鈣 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、5.6 公斤黃豆油)調整酸鹼值至 4.5，然後以 121°C 滅菌 20 分鐘。就另一培養液而言，一 1000 公升之培養液(培養液 B: 112 公斤之水合葡萄糖)是以 140°C 歷時 40 秒來進行滅菌，其後由添加入前述培養液 A 來製成培養液 C。於培養液 C 由添加無菌水性氫氧化鈉來調整酸鹼值至 6.1 之後，將一體積 28 公升之接種培養物(第二階段)，然後合併總量為 5600 公升之起始培養液(10 仟公升培養箱體積)。培養是以一溫度 26°C 、一空氣流速 49 立方公尺/小時及一培養箱內部壓力 200 kPa 來開始進行。於培養期間，培養液是依照下述表格所顯示之飼入程序來完成一總時數 306 小時之主要培養。於培養完成時，培養液體積是 7730 公升，此體積是由飼入培養液增加及蒸發減少所產生之結果。

主要培養時間

供應培養液

第 19 小時	280 公斤/460 公升水合葡萄糖
第 43 小時	280 公斤/450 公升水合葡萄糖
第 67 小時	252 公斤/390 公升水合葡萄糖
第 91 小時	252 公斤/410 公升水合葡萄糖
第 120 小時	224 公斤/370 公升水合葡萄糖
第 140 小時	168 公斤/280 公升水合葡萄糖
第 163 小時	168 公斤/270 公升水合葡萄糖

15 於完成培養及以 120°C 滅菌 20 分鐘之後，使用一連續式脫水機來回收及打破濕細胞，其後乾燥是由使用一振盪流動床乾燥機來進行熱空氣乾燥(熱空氣溫度： 120°C)至一 1 重量%之濕含量。於流動床中，乾燥細胞是由供應室溫空

第 95104050 號專利申請案說明書修正本

101.03.29

氣來冷卻至 40°C ，其後使用一空氣輸送機將乾燥細胞輸送入裝填區。獲得之乾燥細胞與氮氣一併被裝填入一具有大約1立方公尺體積之鋁質口袋式包裝袋，其後於貯存入一低於 10°C 冰箱之前，袋口以加熱密封。

- 5 將包裝袋內的乾燥細胞引入己烷萃取，其後由過濾己烷溶液來移除固體部分，然後由減壓下加熱來移除己烷，藉此獲得一包含用為一建構性脂肪酸之二十碳四烯酸的粗製油脂。

實施例2 靜置冷卻乾燥細胞

- 10 於參照實施例1之方法來培養及滅菌之後，亦由使用如實施例1之方法來進行細胞回收及乾燥。將乾燥細胞轉移入一平坦的槽桶內，然後由均勻鋪排成一厚度不超過1公分之層體來進行室溫靜置冷卻。於冷卻至 50°C 時，將乾燥細胞與氮氣一併被裝填入一具有大約200公升體積之鋁質口袋式包裝袋，其後於貯存入一低於 10°C 冰箱之前，袋口以加熱密封。

比較實施例1 由不經冷卻來裝填乾燥細胞

- 於參照實施例1之方法來培養及滅菌之後，亦由使用如實施例1之方法來進行細胞回收及乾燥。將乾燥細胞與氮氣一併被裝填入一具有大約200公升體積之鋁質口袋式包裝袋，其後於貯存入一低於 10°C 冰箱之前，袋口以加熱密封。

實施例3 分析乾燥細胞

於裝填歷時1週後，開啟由實施例1、實施例2及比較實施例1所製備之裝填包裝袋，然後鑑別乾燥細胞之外觀。其

第 95104050 號專利申請案說明書修正本

101.03.29

後將粗製油引入一使用正己烷為溶劑之 Soxlet 萃取方法來進行萃取，及測定油脂成份。分析由實施例1方法所萃取之粗製油脂的過氧化物數值(POV)。

- 藉此可鑑定於比較實施例1由不經冷卻來裝填乾燥細胞時，細胞及油脂部分的品質會大幅下降。

表 1

	實施例1的細胞	實施例2的細胞	比較實施例1的細胞
細胞外觀	等同飼入時間 (棕色磨碎狀態)	等同飼入時間 (棕色磨碎狀態)	不等同於飼入時間 (深棕色團塊)
油脂含量	55%	53%	20%
粗製油脂外觀	黃色	黃色	棕色
粗製油脂POV (毫當量/公斤)	0.7 毫當量/公斤	1.0 毫當量/公斤	200 毫當量/公斤

實施例4比較飼入顆粒化微生物質量之傳統方法與由對流加熱系統及傳導加熱系統乾燥機微生物質量之本發明方法

- 於參照實施例1之方法來培養該能夠生產二十碳四烯酸之孢霉屬菌株(*Mortierella alpine* 1S-4)之後，將產物飼入一連續式脫水機(SEKISUI CS-1，製造商:Yanagawa Engineering)來進行過濾，藉此獲得一濕細胞總量。此濕細胞之濕含量是由乾燥失重方法(溫度105°C)來測定，測定結果指示濕含量為52%。其後實施例4-1至4-2的濕細胞總量是由下列條件來進行乾燥：實施例4-1是以室溫進行造粒，其顯示造粒前後濕含量沒有改變。於實施例4-2，第一階段乾燥是使用一雙滾筒乾燥機來進行。

接續，顆粒化細胞及第一階段乾燥細胞是由飼入一流動床乾燥機來予以乾燥至一大約2%之濕含量。此乾燥細胞

是使用實施例2的方法來進行冷卻，其後進行萃取油脂/脂肪部分及測定外觀及過氧化物數值。外觀及10毫當量/公斤或更低之過氧化物數值(POV)皆令人滿意，此結果顯示已獲得具有令人滿意之可用以生產精製脂肪/油脂之粗製起始

5 油脂。較諸由單一階段來乾燥之實施例4-1而言，由兩階段來進行乾燥之實施例4-2具有較佳之乾燥時間及乾燥產率。

表 2

	實施例4-1	實施例4-2
第一階段處理機器	萃取造粒機	雙滾筒乾燥機
第一階段處理溫度	室溫(不使用第一階段乾燥)	第一階段乾燥之滾筒表面溫度為140°C
第一階段處理產物之形態	顆粒(顆粒尺寸: ~2-3毫米)	無固定形狀(屑片)
模造產物濕含量	52%	21%
↓使用流動床乾燥機進行第二階段乾燥(乾燥熱空氣溫度:120°C)		
乾燥所需時間	20分鐘	11分鐘
乾燥產物濕含量	2.0%	1.9%
乾燥產率*	92%	94%

*乾燥產率(%)=乾燥體積(為乾燥物質)/飛散材料裝載體積
(為乾燥物質)x100

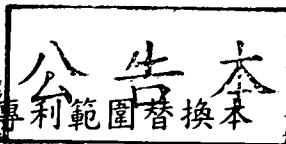
10

【圖式簡單說明】

(無)

【主要元件符號說明】

(無)



十、申請專利範圍：

1. 一種用以自微生物質量(microbial biomass)分離一或多於一化合物之方法，該微生物質量係包含已生產該或該等化合物之微生物，且該方法包含下列步驟：
 - (a)製備或獲得具有一平均濕含量落在30-80%之間的濕細胞；
 - (b)將該濕細胞引入第一階段乾燥來獲得具有一平均濕含量落在5-50%之間的第一階段乾燥細胞，其中該第一階段乾燥係藉由一熱吸附輸送帶型態的傳導加熱系統來達成；
 - (c)將由步驟(b)所獲得之第一階段乾燥細胞引入第二階段乾燥來獲得具有一平均濕含量不超過10%的第二階段乾燥細胞；以及
 - (d)萃取或分離、純化及/或精製該由步驟(c)所獲得之第二階段乾燥細胞的化合物或個別化合物。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該步驟(b)之第一階段乾燥是由一傳導加熱系統來完成。
3. 如申請專利範圍第2項之方法，其中該傳導加熱系統是一錐狀條帶混合乾燥機、一傳導熱移轉乾燥機、一雙滾筒乾燥機或一渦流乾燥機。
4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該步驟(c)之第二階段乾燥是由一對流加熱系統來完成。
5. 如申請專利範圍第4項之方法，其中該對流加熱系統是一振動流動床乾燥機、一水平連續流動床乾燥機、一旋

第 95104050 號專利申請案申請專利範圍替換本 103 年 01 月 24 日

轉乾燥機、一箱盒型水平流動乾燥機(box-type parallel flow drier)、一箱盒型空氣流動乾燥機、一振動乾燥/冷卻機、一流動床乾燥機、一寬帶型空氣流動乾燥機或一寬帶型乾燥機。

6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該步驟(a)之濕細胞是由一培養液進行固體/液體分離所獲得。
7. 如申請專利範圍第6項之方法，其中該固體/液體分離是以機械脫水來同時進行。
8. 如申請專利範圍第1-7項中任一項之方法，其中該微生物質量係包含一真菌或者是衍生自一真菌。
9. 如申請專利範圍第8項之方法，其中該真菌是歸屬於毛黴目(*Mucorales*)。
10. 如申請專利範圍第8項之方法，其中該真菌是歸屬於孢霉屬(*Mortierella*)。
11. 如申請專利範圍第8項之方法，其中該真菌是高山孢霉菌(*Mortierella alpina*)。
12. 如申請專利範圍第1-7項中任一項之方法，其中該微生物質量係包含一藻類或者是衍生自一藻類。
13. 如申請專利範圍第12項之方法，其中該藻類是歸屬於寇氏隱甲藻屬(*Crypthecodinium*)、破囊壺菌屬(*Thrautochytrium*)、裂殖壺菌屬(*Schizochytrium*)、吾肯氏壺菌屬(*Ulkenia*)、日本壺菌屬(*Japanochytrium*)或螺旋菌屬(*Haliphthoros*)。
14. 如申請專利範圍第12項之方法，其中該藻類是寇氏隱甲

第 95104050 號專利申請案申請專利範圍替換本 103 年 01 月 24 日

藻(*Cryptocodinium cohnii*)。

15. 如申請專利範圍第 1-7 項中任一項之方法，其中該化合物是一包含用為一建構性脂肪酸之多元不飽和脂肪酸的三酸甘油酯及/或磷脂。
16. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該多元不飽和脂肪酸是一具有 18 或更多個碳原子之具有 2 或數個雙鍵的 $\omega 3$ 、 $\omega 6$ 及/或 $\omega 9$ 脂肪酸。
17. 如申請專利範圍第 15 項之方法，其中該多元不飽和脂肪酸是 α -次亞麻油酸(9, 12, 15-十八碳三烯酸)、6, 9, 12, 15-十八碳四烯酸(18:4 $\omega 3$)、8, 11, 14, 17-二十碳四烯酸(20:4 $\omega 3$)、EPA(5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸)、DPA $\omega 3$ (7, 10, 13, 16, 19-二十二碳五烯酸)、DHA(4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸)、 γ -次亞麻油酸(6, 9, 12-十八碳三烯酸)、二元均聚- γ -次亞麻油酸(8, 11, 14-二十碳三烯酸)、花生四烯酸(5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸)、7, 10, 13, 16-二十二碳四烯酸(22:4 $\omega 6$)、DPA $\omega 6$ (4, 7, 10, 13, 16-二十二碳五烯酸)、6, 9-十八碳二烯酸(18:2 $\omega 9$)、8, 11-二十碳二烯酸(20:2 $\omega 9$)及/或美德酸(Mead acid, 5, 8, 11-二十碳三烯酸)。
18. 如申請專利範圍第 1-7 項中任一項之方法，其特徵在於步驟(c)所獲得的第二階段乾燥細胞是於經由下述冷卻處理方法之一之後被引入步驟(d)：
 - (i) 由提供具有一由氧氣濃度不超過 21% 所組成之空氣來冷卻至至少 60°C；或者

第 95104050 號專利申請案申請專利範圍替換本 103 年 01 月 24 日

(ii)由靜置於一具有一由氧氣濃度不超過21%所組成之空氣來冷卻至至少60°C。

19. 一種用以自微生物質量分離一或多於一化合物之方法，該微生物質量係包含已生產該或該等化合物之微生物，且該方法係包含下列步驟：

(a)製備或獲得具有一平均濕含量落在30-80%之間的濕細胞；

(b)將該濕細胞引入第一階段乾燥來獲得具有一平均濕含量落在5-50%之間的第一階段乾燥細胞，其中該第一階段乾燥係藉由一熱吸附輸送帶型態的傳導加熱系統來達成；

(c)將由步驟(b)所獲得之第一階段乾燥細胞引入第二階段乾燥來獲得具有一平均濕含量不超過10%的第二階段乾燥細胞。

20. 一種由如申請專利範圍第1項之方法製造之組成物，該組成物包含乾燥細胞，該乾燥細胞是衍生自一微生物質量且具有一不高於10%之平均濕含量並具有屑片形狀。

21. 如申請專利範圍第20項之組成物，其中該乾燥細胞是獲得自使用一傳導加熱系統及一對流加熱系統之雙階段乾燥。

22. 一種用以貯存乾燥細胞之方法，該乾燥細胞係包含已生產一或多於一化合物之微生物的微生物質量，其中：

(1)乾燥細胞是獲得自下列步驟：

(a)製備或獲得具有一平均濕含量落在30-80%之

第 95104050 號專利申請案申請專利範圍替換本 103 年 01 月 24 日

間的濕細胞；

(b)將該濕細胞引入第一階段乾燥來獲得具有一平均濕含量落在5-50%之間的第一階段乾燥細胞；

(c)將由步驟(b)所獲得之第一階段乾燥細胞引入第二階段乾燥來獲得具有一平均濕含量不超過10%的第二階段乾燥細胞；以及其後

(2)由一下述方法來將該獲得之第二階段乾燥細胞引入冷卻處理：

(i)由提供具有一由氧氣濃度不超過21%所組成之空氣來冷卻至至少60°C；或者

(ii)由靜置於一具有一由氧氣濃度不超過21%所組成之空氣來冷卻至至少60°C；以及

(3)由一下述方法來貯存該冷卻之第二階段乾燥細胞：

(I)將細胞與氮氣一併裝填入一可密封容器，然後貯存於15°C或更低溫；或者

(II)將細胞與具有氧氣濃度不超過20%之空氣一併裝填入一可密封容器，然後貯存於15°C或更低溫。

23. 一種用以自微生物質量分離一或多於一化合物之方法，該微生物質量係包含已生產該或該等化合物之微生物，其中：

(1)乾燥細胞是獲得自下列步驟：

(a)製備或獲得具有一平均濕含量落在30-80%之間的濕細胞；

第 95104050 號專利申請案申請專利範圍替換本 103 年 01 月 24 日

(b)打破該濕細胞以獲得具有一平均濕含量落在 30%-80%之間之經打破的細胞；

(c)乾燥該經打破的細胞以獲得具有一平均濕含量不超過10%的乾燥細胞；以及其後

(2)由一下述方法來將該獲得之乾燥細胞引入冷卻處理：

(i)由提供具有一由氧氣濃度不超過21%所組成之空氣來冷卻至至少60°C；或者

(ii)由靜置於一具有一由氧氣濃度不超過21%所組成之空氣來冷卻至至少60°C；且將細胞與具有氧氣含量不超過20%之空氣一併置入一可密封容器，然後將其等貯存於15°C或更低溫；以及

(3)自該冷卻乾燥細胞來純化、萃取、分離及/或精製該或該等之個別化合物。