



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105189769 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 23

(21) 申请号 201480026068. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 03. 03

C12P 7/64(2006. 01)

(30) 优先权数据

13/788, 372 2013. 03. 07 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 11. 06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/019882 2014. 03. 03

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/137894 EN 2014. 09. 12

(71) 申请人 阿尔吉斯有限责任公司

地址 美国俄亥俄州

(72) 发明人 查尔斯·L·罗 詹姆斯·P·永利

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

代理人 巩克栋 杨生平

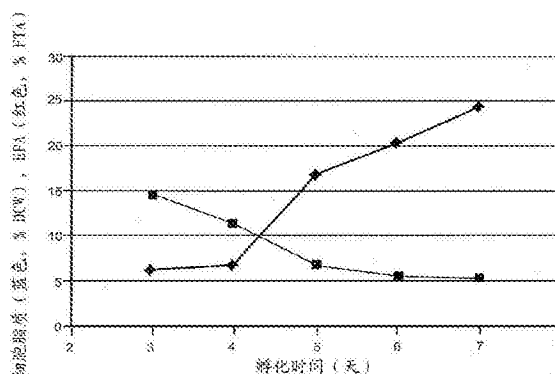
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

从腐霉属物种生产 ω -3 脂肪酸

(57) 摘要

本发明涉及由藻类腐霉属物种生产的三酰基甘油油的生产。在一个实施方案中,所述藻类物种含有至少约 20wt% 的总脂质并含有至少约 10wt% 其总脂肪酸的二十碳五烯酸 (EPA) 和少于约 5wt% 其总脂肪酸的花生四烯酸 (ARA)。在另一个实施方案中,本发明涉及由藻类腐霉属物种生产二十碳五烯酸 (EPA) 的各种方法。特别地,畸雌腐霉可用作可行的生产有机体。



1. 一种来源于腐霉 (Pythium) 生物质的三酰基甘油油, 其包含:
大于 20% w/w 干细胞重量的细胞脂质 ; 和 / 或
大于 10% 总脂肪酸的二十碳五烯酸 (EPA)。
2. 根据权利要求 1 所述的三酰基甘油油, 其中所利用的用于生长所述腐霉生物质的基质选自葡萄糖、右旋糖、乳糖、木糖、蔗糖、果糖或其两种或更多种的任何合适的组合。
3. 根据权利要求 1 所述的三酰基甘油油, 其中所述生物质还包含至少一种氮源, 且所述氮源选自酵母提取物、DAP、尿素、 NaNO_3 、CSL 或其两种或更多种的组合。
4. 一种来源于腐霉生物质的三酰基甘油油, 其包含:
大于 20% w/w 干细胞重量的细胞脂质 ; 和 / 或
大于 10% 总脂肪酸的二十碳五烯酸 (EPA), 其中花生四烯酸 (ARA) 少于 5% 总脂肪酸。
5. 根据权利要求 4 所述的三酰基甘油油, 其中所利用的用于生长所述腐霉生物质的基质选自葡萄糖、右旋糖、乳糖、木糖、蔗糖、果糖或其两种或更多种的任何合适的组合。
6. 根据权利要求 4 所述的三酰基甘油油, 其中所述生物质还包含至少一种氮源, 且所述氮源选自酵母提取物、DAP、尿素、 NaNO_3 、CSL 或其两种或更多种的组合。
7. 一种生产至少一种三酰基甘油油的方法, 所述方法包含如下步骤:
(i) 提供合适量的腐霉培养物 ;
(ii) 使用来自所述合适量的腐霉培养物的基质生长腐霉生物质 ;
(iii) 从所述腐霉生物质中提取三酰基甘油油,
其中所述至少一种三酰基甘油油包含大于 20% w/w 细胞干重的细胞脂质且所述至少一种三酰基甘油油中包含大于 10% 总脂肪酸的二十碳五烯酸 (EPA)。
8. 根据权利要求 7 所述的方法, 其中所利用的用于生长所述腐霉生物质的基质选自葡萄糖、右旋糖、乳糖、木糖、蔗糖、果糖或其两种或更多种的任何合适的组合。
9. 根据权利要求 7 所述的三酰基甘油油, 其中所述生物质还包含至少一种氮源, 且所述氮源选自酵母提取物、DAP、尿素、 NaNO_3 、CSL 或其两种或更多种的组合。

从腐霉属物种生产 ω -3 脂肪酸

[0001] 相关美国申请的交叉引用

[0002] 本发明要求在 2013 年 3 月 7 日提交的题为“PRODUCTION OF OMEGA-3 FATTY ACIDS FROM PYTHIUM SPECIES”的在申请的美国实用新型专利申请 No. 13/788,372 的优先权,其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及由藻类腐霉属物种生产的三酰基甘油油的生产。在一个实施方案中,所述藻类物种含有至少约 20wt% 的总脂质并含有至少约 10wt% 其总脂肪酸的二十碳五烯酸 (EPA) 和少于约 5wt% 其总脂肪酸的花生四烯酸 (ARA)。在另一个实施方案中,本发明涉及由藻类腐霉属物种生产二十碳五烯酸 (EPA) 的多种方法。特别地,畸雌腐霉 (*Pythium irregulare*) 可用作可行的生产有机体。

背景技术

[0004] 二十碳五烯酸 (EPA, C20:5, n-3) 基于其医学上确立的对心血管和其它疾病的治疗能力是 ω -3 脂肪酸系的一种重要的脂肪酸。作为 EPA 主要来源的鱼油具有数个限制,例如不合需要的臭味、重金属污染、由于渔捞过度潜在的缺乏、鱼源的季节实用性变化和生产成本。因此,鉴定和发展新的 EPA 源将是非常有益的。腐霉属微生物包含许多具有产生 EPA 能力的菌株。特别地,已对畸雌腐霉作为 EPA 源进行了广泛研究,但尚未开发由该源生产高 EPA 三酰基甘油油的商业方法。

[0005] 由于 EPA 的营养益处(抗炎性能等),从含高含量(>10% 总脂肪酸)EPA 中真菌/藻类腐霉属物种中得到三酰基甘油油是有利的。为了得到这样的油,如果该油可从含高干细胞质重量(>20% w/w) 的脂质的腐霉中提取,将是有利的。

发明内容

[0006] 本发明涉及由藻类腐霉属物种生产的三酰基甘油油的生产。在一个实施方案中,所述藻类物种含有至少约 20wt% 的总脂质并含有至少约 10wt% 其总脂肪酸的二十碳五烯酸 (EPA) 和少于约 5wt% 其总脂肪酸的花生四烯酸 (ARA)。在另一个实施方案中,本发明涉及由藻类腐霉属物种生产二十碳五烯酸 (EPA) 的多种方法。特别地,畸雌腐霉可用作可行的生产有机体。

[0007] 在一个实施方案中,本发明涉及一种来源于腐霉生物质的三酰基甘油油,包含:大于 20% w/w 细胞干重的细胞脂质,且超过 10% 总脂肪酸的 EPA。

[0008] 在另一个实施方案中,本发明涉及一种来源于腐霉生物质的三酰基甘油油,包含:大于 20% w/w 干细胞重量的细胞脂质;和/或超过 10% 总脂肪酸的二十碳五烯酸 (EPA),其中花生四烯酸 (ARA) 少于 5% 总脂肪酸。

[0009] 在另一个实施方案中,本发明涉及产生至少一种三酰基甘油油的方法,所述方法包含步骤:(i) 提供合适量的腐霉培养物;(ii) 使用来自所述合适量的基质的腐霉培养物

生长腐霉生物质；(iii) 从所述腐霉生物质中提取三酰基甘油油，其中所述三酰基甘油油包含大于 20% w/w 细胞干重的细胞脂质且所述至少一种三酰基甘油油中包含大于 10% 总脂肪酸的二十碳五烯酸 (EPA)。

附图说明

[0010] 图 1 是示出本发明中解决的问题的一个方面的图，即当腐霉中细胞脂质增加至大于 20% 干细胞重量 (DCW) 时，细胞脂质中的 EPA 下降至少于 10% 总脂肪酸。因此，先前不可能从含经济可行量 (>20% w/w 干细胞重量) 的细胞脂质的腐霉生物质得到含高 (>10% 其总脂肪酸) EPA 水平的三酰基甘油油。

具体实施方案

[0011] 本发明涉及三酰基甘油油的生产，其由藻类腐霉属物种产生。在一个实施方案中，所述藻类物种含有至少约 20wt% 的总脂质并含有至少约 10wt% 其总脂肪酸的二十碳五烯酸 (EPA) 和少于约 5wt% 其总脂肪酸的花生四烯酸 (ARA)。在另一个实施方案中，本发明涉及由藻类腐霉属物种生产二十碳五烯酸 (EPA) 的多种方法。特别地，畸雌腐霉可用作可行的生产有机体。

[0012] 本领域技术人员会认识到腐霉属生物体先前被归类为真菌但现在周知已从真菌中单独进化，且更接近地与褐藻和硅藻相关。它们目前的分类是：界：囊泡藻界，门：不等鞭毛门，纲：卵菌纲，目：腐霉目，科：腐霉科，属：腐霉属。腐霉属代表细丝状的、单细胞生物体的一个群体，其生理上类似真菌，且由于它们先前的分类经常被当作真菌对待或指称。在此，这些有机体可指藻类或真菌，或根据最新的分类指卵菌。可用在本发明的实践中的腐霉属物种的实例包括，但不限于，畸雌腐霉、终极腐霉 (*Pythium ultimum*)、诡谲腐霉 (*Pythium insidiosum*)、德巴利腐霉 (*Pythium debaryanum*)、间型腐霉 (*Pythium intermedium*)、大雄腐霉 (*Pythium megalacanthum*)、侧雄腐霉 (*Pythium paroecandrum*) 和林栖腐霉 (*Pythium sylvaticum*)。在另一个实施方案中，当在本文中使用术语“腐霉属物种”指可被利用和 / 或可被遗传地或其他方式修饰以产生 EPA 的任何腐霉属物种。相应地，在一个实施方案中，本发明的腐霉属物种可为通过经典突变或分子生物学 / 遗传工程得到的突变体或转化体菌株。在另一个实施方案中，用于 EPA 生产的腐霉属物种是通过经典突变或分子生物学 / 遗传工程得到的畸雌腐霉突变体或转化体。

[0013] 可使用任何合适的工业设备，例如能够容纳约 10-100m³ 体积的发酵罐或反应容器实施商业规模的富脂肪酸的腐霉生物质的制备。这样的容器对本领域技术人员通常是已知的，且添加或移除介质的装置外也可包含用于例如取样介质（例如，为了测量 pH）的装置，用于检测并调节温度的装置，用于向培养物供应气体（例如，空气、氧气等）的装置，用于搅拌介质的装置等。

[0014] 为了开始工业规模的培养，通常得到基本上纯的腐霉属培养物（例如来自菌种库例如美国典型培养物保藏中心的野生型或通过经典突变或借助分子生物学的遗传工程得到的其他合适来源）并用于在有利于孢子形成的条件下开始腐霉的生长，例如在通常增补有葡萄糖和酵母提取物、pH 约 5.5 至约 6 的的琼脂斜面上生长数天（例如 3-7 天）。为开始系列放大液体培养，首先制备腐霉孢子的接种体，例如通过用蒸馏水、介质等洗涤琼脂表

面,并将所述孢子溶液加入到适合于生物体大规模生长的实验室规模容器中。所述腐霉接种体每升接种的培养基包含约 10^5 至约 10^7 孢子。然后,通过初始接种小体积(例如,1-2 升)随后被转至依次增大的体积,所述培养逐渐“加速”。

[0015] 在腐霉的培养过程中,搅拌介质并向生长的培养物供应空气或氧气(通常是空气)。可例如,通过在实验室规模的玻璃瓶培养中摇动或旋转所述培养(例如,在约 150-200rpm 的 rpm 下,通常约 170rpm)或在发酵罐培养中通过搅动或搅拌例如桨、叶轮或其它合适的机械的方式来实施搅拌。在发酵罐培养中,所述发酵罐在培养过程中被充入空气或氧气,通常充入氧气。通常,在整个培养过程中氧气浓度保持在约 10% 至约 80% 的水平。本领域的技术人员会认识到向培养物提供空气或氧气也可用于搅拌所述培养物,当气体是吹入培养物或经过培养物鼓泡时。

[0016] 典型地,为了使富脂肪酸的生物质的生产最大化,以两步实施腐霉的培养。在培养介质与所述微生物接种后,在约 20℃ 至 30℃ 的温度下开始生长阶段,以激励生物质的累积。通常,在该温度范围内保持所述培养约 3 至约 6 天。其后,为了提升腐霉细胞中脂肪酸的累积,温度降低至约 20℃ 或以下。在较低的温度下持续培养约 1 至约 3 天。因此,从开始接种至收获腐霉生物质的总时间天数通常为约 5 至约 7 天。

[0017] 其后,通过本领域技术人员已知的数个合适手段和方法中的任一个收获腐霉生物质,例如通过离心和/或过滤。根据它的目标用途实施所述生物质的后续加工,例如通过脱水和干燥。

[0018] 按照本文描述培养的腐霉产生富含多种脂肪酸的生物质并可用于多种应用。在本发明的一些实施方案中,根据本发明的方法由腐霉产生的富脂肪酸的生物质“依其本身”使用,即,在使用前所述脂肪酸不与生物质分离或隔离。在这样的实施方案中,可被收集并直接使用生物质(例如,作为湿真菌块)但将经常首先通过移除一些或多数或所用的与所述生物质相关联的水而对其处理。因此,本发明也包含多种形式的全部或部分干的(干燥的)由腐霉产生的生物质,所述生物质由于按本文描述培养而富含脂肪酸(例如,EPA)。这样全部干燥的腐霉生物质可用作例如食物来源或添加剂以供养多种生物体,例如鱼(尤其是在水产养殖鱼类“养殖场”中生长的鱼),鸡和其他家禽(火鸡、雌珍珠鸡等),牛、绵羊、山羊、马和其他通常在“农家”环境中饲养的家畜(如狗、猫和家养宠物)等。所述生物质可以用作以任何形式受益于脂肪酸尤其是 EPA 的摄取的任何物种的食物或用于补充其饮食。特别的兴趣可能是饲养产蛋鸡以增加鸡蛋中脂肪酸的质量(类型),或增加鸡蛋中所需的脂肪酸的量。相似地,所述生物质可供应为饲养动物的食物以增加肉类中的脂肪酸的质量(类型),或增加肉类中所需的脂肪酸的量。通常,这样的所需的脂肪酸包括多不饱和脂肪酸(PUFA),和特别地, ω -3 脂肪酸如 EPA。

[0019] 在本发明的其他实施方案中,脂肪酸,特别是 EPA,可从生物质中分离,即基本纯化不同程度,然后使用,例如作为食品补充剂或添加剂。这种脂肪酸制剂可包含一种或多种来源于本发明的腐霉生物质的脂肪酸的混合物,或作为一种选择地,所述脂肪酸可被分离以提供一种或多种基本上纯的脂肪酸。

[0020] 根据本发明的方法制备的生物质和/或脂肪酸可用于除食品外的用途。例如,各种皮肤制物、化妆品、肥皂、洁肤剂、洗液、防晒霜、护发产品和其他可被配制以包含所述生物质自身或一种或多种由所述生物质得到的脂肪酸的制剂。特别地,可制备和销售多种“天

然”或“绿色”的产品作为“天然”富含有价值脂肪酸的生物物质。

[0021] 如上所述,腐霉是天然产生二十碳五烯酸(20:5, EPA)的丝状真菌(藻类)。当总细胞脂质水平低(小于或等于10% w/w 干细胞重量)时,细胞脂质的EPA含量通常高达12-18%总脂肪酸。然而当总细胞脂质低(小于或等于10% w/w 细胞干重)时,己烷可提取的脂质,包括三酰基甘油(在食品和营养补充剂中脂质的常用形式)是非常低的。通过改变培养条件可能将腐霉中的细胞脂质的重量增加至大于20%(w/w 干细胞总量)脂质。在这些条件下,细胞的三酰基甘油含量高且可被经济地提取(如用己烷或其他溶剂)以产生适合用作食品成分或营养补充剂的富三酰基甘油的油。然而当腐霉中的细胞脂质水平高(例如,至少约20百分数w/w的干细胞重量),EPA水平下降至低水平(小于10%总脂肪酸),如图1所示例。对于用作适用于食品成分或营养补充剂用途的富EPA的三酰基甘油油,所述油的EPA含量应优选大于10%。应注意的是,较高水平的花生四烯酸(例如,大于5%总细胞脂质水平)也可伴随某些腐霉属菌株。花生四烯酸(ARA)是一种为关键炎症性中间体的多不饱和 ω -6脂肪酸20:4(ω -6),且也可以作为血管扩张剂。ARA因此常被认为是成人和动物消耗的不合需要的脂肪酸。

[0022] 因此,在一个实施方案中,本发明涉及来源于腐霉细胞的三酰基甘油油,所述腐霉细胞含有大于20%(w/w 细胞干重)的细胞脂质,其富含EPA(大于10%总脂肪酸)。

[0023] 本发明解决了如下问题:允许从腐霉属真菌/藻类的细胞中提取富含EPA且基本不含DHA的营养的三酰基甘油油。尽管其他人已使腐霉生长以积累高水平的细胞脂质,然而尚未成功由含>20% w/w 干细胞重量的细胞脂质的腐霉生物物质得到含高EPA水平(大于10%总脂肪酸)的三酰基甘油油。

[0024] 腐霉细胞在如下条件下培养(下降的生长温度):允许可感知的细胞生长(正如通过最终细胞干重测量的)和脂质累积(正如通过总细胞脂质测量的)同时诱导细胞累积含高水平EPA(大于10%总脂肪酸)的细胞脂质。所述油还包含非常低水平的花生四烯酸(ARA)。

[0025] 在一个非限制性实例中,50mL的培养介质产生高于10g/L的干细胞重量,并产生含高于25% w/w 的脂质的腐霉生物物质,且所述脂质包含高于(总脂肪酸的)10%的EPA。

[0026] 在这里所附的图1详细说明了当细胞脂质增加至大于20%干细胞重量(DCW)时,细胞脂质中的EPA下降至小于10%总脂肪酸。

[0027] 下面表1示出了根据本发明可得到一种生物物质,其包含大于25%的细胞脂质且在所述细胞脂质中具有大于10%的EPA。由该生物物质可得到富EPA的三酰基甘油油。

[0028] 表1

[0029]

	烧瓶 1	烧瓶 2	通常 25°C 烧瓶
细胞脂质 (% DCW)	35.98	36.84	29.83
脂肪酸	总脂肪酸的百分数 (% TFA)		
14:0	10.73	9.97	6.93
16:0	—	—	—
16:1	25.90	24.03	31.06
18:0	—	—	—
18:1	24.57	22.86	27.63
18:2	10.19	9.38	10.37
18:3(n-6)	—	—	—
20:3/20:4	6.78	7.47	6.70
20:4(n-6) ARA	2.25	2.65	3.27
20:5(n-3) EPA	11.87	13.92	6.38
EPA/ARA	5.28	5.25	1.95

[0030] 考虑到上述情况,在一个实施方案中本发明有可能由含腐霉的生物物质产生三酰基甘油油,其包含:大于 20% w/w 干细胞重量的细胞脂质,其中高于 10% 总脂肪酸的是二十碳五烯酸 (EPA)。在另一个实施方案中,本发明涉及一种源自腐霉生物物质的三酰基甘油油,其包含:大于 20% w/w 干细胞重量的细胞脂质,其中二十碳五烯酸 (EPA) 高于 10% 总脂肪酸,且其中花生四烯酸 (ARA) 小于 5% 总脂肪酸。因此,在一些实施方案中,本发明允许生产具有独特脂质和 / 或脂肪酸含量的三酰基甘油油同时产生含较低量 ARA 的三酰基甘油油。

[0031] 在另一个实施方案中,本发明涉及使用发酵步骤生产至少一种三酰基甘油油的方法,其通过选自以下的原料实现:甘油(原油或精炼的)、葡萄糖 / 右旋糖 (glucose / dextrose)、乳糖、木糖、蔗糖、果糖或其两种或更多种的任何合适的组合。在另一个实施方案中,本发明涉及使用合适的培养基产生至少一种三酰基甘油油的方法,所述合适的培养基包含合适的氮源例如酵母提取物、DAP、尿素、NaNO₃、CSL 等,所述氮源含足够量的氮以在

至少 30g/L 的浓度下生长生物物质。

[0032] 实施例

[0033] 下面的实施例应被广泛地理解并且是非限制性的。

[0034] 富脂质生物物质的培养

[0035] 在含 50mL 的 M#1 (YE) 介质的 250mL 锥形烧瓶中培养畸雌腐霉 ATCC10951。所述培养介质含 30g/L 葡萄糖、3.0g/L 酵母提取物、7.0g/L KH_2PO_4 、1.5g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.0g/L NaCl 、4.8mg/L FeCl_3 、1mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.1mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和 0.1mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 。用 1mL 通过在含 10mL 无菌蒸馏水和约二十个 5mm 直径无菌玻璃球的无菌管中涡旋含畸雌腐霉菌苔的 1.5cm x 1.5cm 段的 M#1 (YE) 琼脂板 [具有 20g/L 琼脂的 M#1 (YE)] 产生的菌丝悬浮体接种所述摇瓶。

[0036] 在 5°C 下接种所述摇瓶 4-8 周。通过在 15000x g 下离心 5min 并将上清液立即移除获得生物物质。用 40mL 蒸馏的 H_2O 洗涤所述生物物质并然后对其冷冻干燥。

[0037] 含高 EPA 的油的提取

[0038] 用杵和臼将冻干的生物物质研磨以形成细粉末。将粉末放入预先称量的锥形烧瓶中使用重量分析来测定生物物质的质量。将每克干生物物质五毫升己烷添加至所述干生物物质中并然后所述生物物质 / 己烷浆体被周期性搅拌并在实验室温度下孵育至少 16 小时。通过在重力下经过 Whatman No. 1 滤纸的过滤从己烷提取物 (胶束) 中移除所述生物物质并用另外的每克干生物物质 2mL 己烷洗涤生物物质。所述胶束在旋转蒸发仪中干燥且三酰基甘油 (TAG) 再溶解在乙酸乙酯中。通过玻璃棉过滤器 (玻璃棉塞进玻璃吸管中) 将 TAG 溶液过滤至预先称重的管中。在 N_2 流下移除乙酸乙酯并用重量分析来测定所提取的 TAG 的量。

[0039] 脂质分析

[0040] 取提取的 TAG 样品 (约 20mg) 并用含 2mL MeOH 和 0.15mL 乙酰氯的反应混合物将其酯化。将反应混合物加热至 55°C 4h 然后冷却。用干 Na_2CO_3 中和脂肪酸甲酯 (FAME) 制备物并通过 0.45 μm 尼龙过滤器过滤。滤液用于 GC 分析。

[0041] 使用 Zebrum ZB Wax 柱 (30m 长, 直径为 0.25mm) 使用 GC 分析确定脂肪酸图谱。初始箱温是 160°C 并以 10°C /min 倾斜升温至 250°C。然后将所述柱在 250°C 保持 9min。使用火焰离子化检测器检测 FAME 并基于保留时间和与可信标准的对比进行鉴定。

[0042] 尽管根据专利法规已提出本发明的最佳模式和一些实施方案, 本发明的范围不限于此, 而在于受限于所附的范围。照此, 在本发明的精神和范围内的其他变体是可能的并会为本领域技术人员所知。

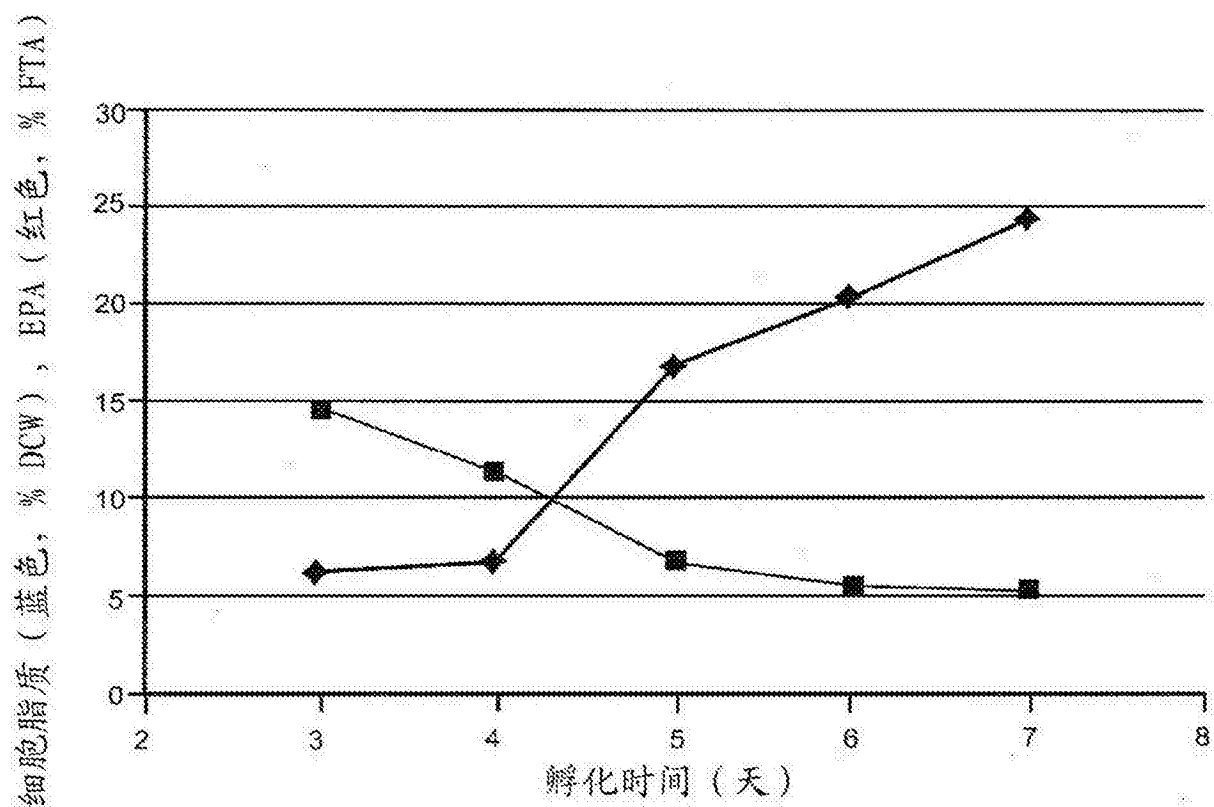


图 1