

#### 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： 年 月 日。

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；2004.08.12；特願 2004-235551

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。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

#### 發明領域

本發明是有關於：一種用以生成一含有微生物的微生物生物質量(microbial biomass)的方法，該等微生物會生成包含有多元不飽和脂肪酸作為組成性脂肪酸(constituent fatty acids)的化合物；藉由來自該生物質量的萃取而被獲得之粗製的油和/或粗製的磷脂(phospholipid)，以及藉由該粗製的油和/或粗製的磷脂之精煉(refining)而被獲得之精製的脂肪與油和/或精製的磷脂；以及併入有該生物質量與脂肪或油(粗製的油和/或精製的油)和/或磷脂(粗製的磷脂和/或精製的磷脂)的食品與飲料、治療用營養補充劑(therapeutic nutritional supplements)、動物飼料以及藥劑。

### 【先前技術】

#### 15 發明背景

多元不飽和脂肪酸(polyunsaturated fatty acid)(在下文中被縮寫為“PUFA”)於人體內的生物合成(biosynthesis)存在有兩個代表性系列： $\omega$ 3以及 $\omega$ 6系列(其中 $\omega$ 代表具有第一個雙鍵的碳原子的號碼，從脂肪酸的甲基基團端算起)，而就 $\omega$ 6脂肪酸而言，例如，亞麻油酸(linoleic acid)(18:2  $\omega$ 6)藉由重複的去飽和作用(repeated desaturation)以及碳鏈伸長作用(carbon chain elongation)而被轉變成為 $\gamma$ -次亞麻油酸( $\gamma$ -linolenic acid)(18:3  $\omega$ 6)、升二- $\gamma$ -次亞麻油酸(dinomo- $\gamma$ -linolenic acid)(20:3  $\omega$ 6)、花生四烯酸

(arachidonic acid)(20:4  $\omega$  6)以及4,7,10,13,16-二十二碳五烯酸(4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid)(22:5  $\omega$  6)。

同樣地，就 $\omega$ 3脂肪酸而言， $\alpha$ -次亞麻油酸(18:3  $\omega$  3)藉由重複的去飽和作用以及碳鏈伸長作用而被轉變成二十  
5 碳五烯酸(eicosapentaenoic acid)(20:5  $\omega$  3)、7,10,13,16,19-  
二十二碳五烯酸(7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid)(22:5  
 $\omega$  3)以及4,7,10,13,16,19-二十二碳五烯酸(4,7,10,13,16,19-  
docosapentaenoic acid)(22:6  $\omega$  3)。該等 $\omega$ 3 PUFAs，特別是  
10 中，“DHA”)，被知曉具有許多生理功能[包含對抗諸如動脈  
粥樣硬化(atherosclerosis)與血栓症(thrombosis)的成人病  
(adult diseases)之預防效用(prophylactic effects)或抗癌效用]  
以及學習增強效果(learning reinforcement effects)，而各種  
不同的嘗試曾被做過，俾以將它們應用在藥劑以及特別的  
15 健康食品內。但是，除了 $\omega$ 3類型之外的PUFAs (諸如 $\omega$ 6以  
及 $\omega$ 9)之生理功能最近亦成為受關注的主題。

花生四烯酸構成有生命的器官(諸如血液與肝臟)之脂  
肪酸組份的大約10% (例如，人類血液內的磷脂之脂肪酸組  
成比例是11%花生四烯酸、1%二十碳五烯酸、3%二十二碳  
20 五烯酸)，並且在作為細胞膜之主要結構性組份(structural  
component)上，它有助於調節膜流動性(membrane fluidity)  
並於體內執行各種不同的代謝功能，同時亦扮演一個作為  
前列腺素(prostaglandins)之直接前驅物(direct precursor)的  
重要角色。近年來，花生四烯酸作為一哺育嬰兒用營養素

(nursing infant nutrient)以及作為會展現神經作用的效用 (neurergic effects) 之內生性大麻鹼 (endogenous cannabinoids)[2-花生四烯酸單甘油酯 (2-arachidonoyl monoglycerol)與花生四烯酸乙醇胺(anandamide)]的一個組成性脂肪酸之角色已被注意到。通常地，富含亞麻油酸的食品之攝取會導致它們轉變成為花生四烯酸，但由於在患有成人病或初期病況 (preliminary condition) 的病人體內還有在嬰兒與老年人體內，於它的生物合成中所涉及的酵素之功能被降低，該等個體傾向於會缺乏花生四烯酸；因此，

5 希望能提供技術手段來供它的直接攝取[呈脂肪或油(三酸甘油酯)的組份脂肪酸之形式]。

10

雖然魚油是  $\omega 3$  PUFAs (諸如 EPA 與 DHA) 的豐富來源， $\omega 6$  PUFAs [諸如  $\gamma$ -次亞麻油酸、升二- $\gamma$ -次亞麻油酸、花生四烯酸以及 4,7,10,13,16-二十二碳五烯酸(22:5  $\omega 6$ )]

15 實際上是無法得自於傳統的脂肪或油來源，而因此從微生物的發酵而被獲得之包含有 PUFAs 作為組份脂肪酸的脂肪與油(在下文中被稱之為“含有 PUFA 的脂肪與油”)是當今最常被使用的。例如，用以取得包含有花生四烯酸作為組成性脂肪酸的脂肪與油(在下文中被稱之為“含有花生四烯酸的脂肪與油”)的方法曾被提出，該方法是藉由培養能夠生成含有花生四烯酸的脂肪與油的之各種不同的微生物。

20

已知具有一高比例的花生四烯酸來構成脂肪酸部分的脂肪與油[在下文中被稱之為“富含花生四烯酸的脂肪與油 (“arachidonic acid-rich fats and oils)”) ]可藉由使用屬於被孢

黴屬 (*Mortierella*) 的微生物而被獲得(日本未審查專利公開案號 SHO 63-44891、日本未審查專利公開案號 SHO 63-12290)。近年來，花生四烯酸的基本用途之一是，例如，在養育嬰兒營養的領域中，而且特別地，在經改質的乳品 (modified milk) 內使用藉由發酵而被獲得的含有花生四烯酸之脂肪與油已被引入。含有花生四烯酸的脂肪與油的新效用亦曾被證實[日本未審查專利案號 SHO 2003-48831：對於與腦功能損害 (brain function impairment) 有關聯的症狀與病況具有預防或改善效用的組成物]，而這些被預期在未來來會有高度需求。

藉由被孢黴屬微生物的培養而被獲得的脂肪與油主要地是由三酸甘油脂(大約70%或更多)與磷脂所構成。可食用的脂肪與油是呈三酸甘油脂的形式，而為了上述用途之目的，由細胞所生成之原始的脂肪與油(藉由來自於細胞的萃取而被獲得的脂肪與油，被知之為“粗製的油”)是萃取自藉由微生物的培養而被生成的細胞生物質量，而接著該粗製的油被進行可食用的脂肪/油精煉步驟 (edible fat/oil refining steps)[脫膠 (degumming)、除氧 (dexidation)、脫臭 (deodorization)、脫色 (decolorizing)]，俾以得到減去磷脂之精製的脂肪與油。

因為藉由被孢黴屬 (*Mortierella*) 微生物的培養而被獲得之含有 PUFA 的脂肪與油會蓄積於菌絲 (hyphae) 內，為達到脂肪/油生產之增高的經濟性，培養必須被進行至一較高的濃度，俾以提高每一個培養物之含有 PUFA 的脂肪與油的

產率。每一個培養物之含有PUFA的脂肪與油產率是為細胞濃度與每一個細胞之含有PUFA的脂肪與油含量的乘積，而因此有需要來增加細胞濃度以及每一個細胞之含有PUFA的脂肪與油含量這兩者。細胞濃度可藉由提高培養基氮源的濃度而被增高，該氮源通常會被轉變成細胞組份。

每一個細胞之含有PUFA的脂肪/油含量可以僅藉由滿意地控制細胞形態以及藉由以一適當的氧供應(oxygen supply)來進行培養而被增高。被報導供用於控制細胞形態的方法包含培養基鹽類組成的最佳化[日本國內再公開(Domestic Republication)案號98/029558]，而供應氧氣的方法包含加壓培養方法(pressurized culturing methods)以及富含氧的好氧培養方法(oxygen enriched aerobic culturing methods)(日本未審查專利公開案號HEI 06-153970)。但是，因為這些方法會受到培養條件的些微差異所影響，要確保培養的再現性(reproducibility)是不容易的，而結果穩定的產出(production output)尚不可能達成。

專利文件1：日本未審查專利公開案號SHO 63-44891

專利文件2：日本未審查專利公開案號SHO 63-12290

專利文件3：日本未審查專利公開案號SHO 2003-48831

專利文件4：日本未審查專利公開案號SHO 98/029558

專利文件5：日本未審查專利公開案號SHO 06-153970

## 【發明內容】

### 發明概要

因此，為了確保利用微生物之含有PUFA的脂肪與油的

穩定生成，有高度的需求要去發展出一種用以確保培養的再現性之方法。

本案發明人對於在藉由微生物的培養來生成含有PUFA的脂肪與油(三酸甘油脂)和/或含有PUFA的磷脂的期間當中會影響被培養的細胞之生長期(growth phase)之初始培養階段條件進行費心的研究，而結果發現到：藉由改善來自於先前步驟中的菌絲或孢子的移植條件(transplanting conditions)，要提高培養的再現性以及達成含有PUFA的脂肪與油(三酸甘油脂)和/或含有PUFA的磷脂之穩定生成是有可能的。

因此，依據本發明，此處提供一種用以生成含有PUFA的脂肪與油(三酸甘油脂)和/或含有PUFA的磷脂和/或含有PUFA的細胞之方法，它是根據被改善的培養再現性以及含有PUFA的脂肪與油(三酸甘油脂)和/或含有PUFA的磷脂之穩定生成，該方法的特徵在於改善來自於先前步驟的菌絲或孢子的移植條件。

特別地，本發明提供一種用以保存微生物之方法，該等微生物能夠微生物性生成多元不飽和脂肪酸或包含有多元不飽和脂肪酸作為組成性脂肪酸的化合物，該方法包括：

- (a) 於一處在pH 4-7之下並含有一養分來源的孢子-形成培養基(spore-forming medium)內形成孢子，該養分來源包含有無機鹽以及醣；
- (b) 將於(a)中所得到的孢子散浮於經滅菌的水或含有一介面活性劑和/或無機鹽之經滅菌的水中以製備一孢

子懸浮液，並且加入一處在5-15%之下的抗凍劑 (cryoprotectant)，俾以製備一低溫保存孢子懸浮液 (cryopreserving spore suspension)；以及

- (c) 將於(b)中所得到的低溫保存孢子懸浮液保存在介於  
5 -100°C與-20°C之間。

在這個方法中，該無機鹽較佳地是一或多種選自於由  
下列所構成之群組中的無機鹽：硝酸鈉、磷酸氫二鉀、硫  
酸鎂、氯化鉀以及硫酸亞鐵[iron (I) sulfate]，而該孢子-形  
成培養基較佳地是被調整至pH值為4-7的察伯瓊脂培養基  
10 (Czapek agar medium) 或察伯-賓克斯瓊脂培養基  
(Czapek-Dox agar medium)。

較佳地，被使用於本案方法中的抗凍劑是甘油。

多元不飽和脂肪酸或包含有多元不飽和脂肪酸作為組  
成性脂肪酸的化合物之實例包括：包含有多元不飽和脂肪  
15 酸作為組成性脂肪酸的三酸甘油酯以及包含有多元不飽和  
脂肪酸作為組成性脂肪酸的磷脂，其中該等多元不飽和脂  
肪酸較佳地是 $\omega$ 6不飽和脂肪酸、 $\omega$ 3多元不飽和脂肪酸或  
 $\omega$ 9多元不飽和脂肪酸或它們的組合。

較佳地，上述 $\omega$ 6不飽和脂肪酸是9,12-十八碳二烯酸  
20 (9,12-octadecadienoic acid)(亞麻油酸) 18:2 $\omega$ 6、6,9,12-十八  
碳三烯酸(6,9,12-octadecatrienoic acid)( $\gamma$ -次亞麻油酸)  
18:3 $\omega$ 6、8,11,14-二十碳三烯酸(8,11,14-eicosatrienoic acid)  
(升二- $\gamma$ -次亞麻油酸) 20:3 $\omega$ 6、5,8,11,14-二十碳四烯酸  
(5,8,11,14-eicosatetraenoic acid)(花生四烯酸) 20:4 $\omega$ 6、

7,10,13,16-二十二碳四烯酸(7,10,13,16-docosatetraenoic acid) 22:4  $\omega$ 6或4,7,10,13,16-二十二碳五烯酸(4,7,10,13,16-docosapentaenoic acid) 22:5  $\omega$ 6。

較佳地，上述  $\omega$ 3不飽和脂肪酸是9,12,15-十八碳三烯酸(9,12,15-octadecatrienoic acid)( $\alpha$ -次亞麻油酸)18:3  $\omega$ 3、6,9,12,15-十八碳四烯酸(6,9,12,15-octadecatetraenoic acid)[硬脂四烯酸(stearidonic acid)] 18:4  $\omega$ 3、11,14,17-二十碳三烯酸(11,14,17-eicosatrienoic acid)(升二- $\alpha$ -次亞麻油酸) 20:3  $\omega$ 3、8,11,14,17-二十碳四烯酸(8,11,14,17-eicosatetraenoic acid) 20:4  $\omega$ 3、5,8,11,14,17-二十碳五烯酸(5,8,11,14,17-eicosapentaenoic acid) 20:5  $\omega$ 3、7,10,13,16,19-二十二碳五烯酸(7,10,13,16,19-docosapentaenoic acid) 22:5  $\omega$ 3或4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸(4,7,10,13,16,19-docosahexaenoic acid) 22:6  $\omega$ 3。

較佳地，上述  $\omega$ 9不飽和脂肪酸是6,9-十八碳二烯酸(6,9-octadecadienoic acid) 18:2  $\omega$ 9、8,11-二十碳二烯酸(8,11-eicosadienoic acid) 20:2  $\omega$ 9或5,8,11-二十碳三烯酸(5,8,11-eicosatrienoic acid)[識別蜜酸(Mead acid)] 20:3  $\omega$ 9。

較佳地，被使用於上述方法的微生物是一種屬於被孢黴屬(genus *Mortierella*)的微生物，諸如高山被孢黴(*Mortierella alpina*)。

本發明是有關一種用以生成多元不飽和脂肪酸或包含有多元不飽和脂肪酸作為組成性脂肪酸的化合物之方法，其特徵在於使用藉由上述方法而被保存的微生物。

## 【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

更特別地，被孢黴屬絲狀真菌(*Mortierella filamentous fungi*)在液態培養物內的時間-依賴性變化(time-dependent change)的特徵之一是細胞質量隨著細胞增殖(細胞生長階段)的增加。在細胞質量上的增加基本上已停止之後，含有PUFA的脂肪與油之細胞內蓄積(intracellular accumulation)會增加(脂肪/油蓄積階段)，最終造成含有PUFA的脂肪與油之豐富的細胞內蓄積。本案發明人曾經報導過利用一為大約兩天的細胞生長期繼而為6天的脂肪/油蓄積階段之培養[J. Biosci. Bioeng., 87:489-494(1999)]。

亦曾被報導的是，細胞形態基本上是於細胞生長期當中被決定，這暗示設定(setting)與操控(managing)初始培養條件的極端重要性。但是，縱然設定與操控初始培養條件看起來是重要的，沒有已公開的報導被發現是有關於初始培養條件的設定，特別是有關於菌絲或孢子的移植條件。專注在這個方面，本案發明人進行費心的研究而導致下列發現：移植方法(transplanting method)對於培養結果具有一主要影響，以及改善移植方法會有助於明顯地改善含有PUFA的脂肪和油之生產力。

為了藉由微生物的液態培養來獲得包含有多元不飽和脂肪酸作為組成性脂肪酸的化合物(含有PUFA的脂肪與油和/或含有PUFA的磷脂)，被保存的菌株(preserved strain)之一少量的細胞首先被播種(seeded)於培養溶液中，且被容許

增殖[第一播種培養階段(first seed culturing stage)]。其次，擴大規模(scaling-up)是藉由連續的轉移至大體積培養基而被達成，而主要的培養(main culturing)是培養的最後步驟，其中微生物物質被回收以獲得含有PUFA的脂肪與油。該播  
5 種培養是為在藉由連續的次培養之擴大規模當中的各個階段下的培養。

用以保存細胞的已知方法包含下列：當中被培養於瓊脂斜面培養基(agar slant medium)上的細胞被保存於一個5°C 冰箱或-20°C 冷凍庫內的方法；當中一絲狀真菌孢子懸浮  
10 液被保存於5°C 冰箱的方法；當中一抗凍劑被加入而且細胞被保存在一個液態氮冷凍器之內或是以液態氮所創造出之介於-150°C與-196°C之間的超低溫下的方法；當中細胞被土壤保存以及乾燥(soil cultured and dried)的方法；以及當中  
15 細胞被冷凍乾燥與冷藏(freeze-dried and refrigerated)的方法[“發酵工程原理(Hakko Kogaku no Kiso)(Fundamentals of Fermentation Engineering)”(1998)，由F. Ishizaki所翻譯，學術出版中心(Center for Academic Publications)，日本]。

又，“Maintaining cultures for Biotechnology and Industry)(1996)”，edited by J.C. Hunter-Cevera & A. Belt,  
20 Academic press比較在一斜面培養下的-20°C保存法(-20°C preservation at a slant)、液態氮保存法(liquid nitrogen preservation)以及冷凍乾燥保存法(freeze-dried preservation)，並概述在存活率(survival rates)與生產力維持(productivity maintenance)上的功效。依據這個報導，在-20

°C下的斜面培養保存方法提供最令人滿意的存活率與生產力維持(第25頁)。

關於絲狀真菌，該報導教示：要穩定地維持細胞呈一活生生的而且純質的狀態是困難的，而雖然不存在有可以被廣泛地應用至所有絲狀真菌的方法，於液態氮中的保存可被認為是理想的[在同一文獻內(ibid)，第105頁]。使用各種不同的抗凍劑之一實施例名單亦被提供，而所有的先前技術是為液態氮保存法或冷凍乾燥法的組合(在同一文獻內，第118頁，表4)。由於液態氮在1大氣壓力下的沸點是-195.8°C，液態氮儲存試管(storage tube)內的溫度被維持在大約-196°C下。

關於被孢黴屬(genus *Mortierella*)的絲狀真菌，在本案發明人的一篇論文[J. Am. Oil Chem. Soc., 75:1501-1505 (1998)]當中，所使用的保存方法以及轉移至播種培養物(seed culture)的方法是為用在察伯瓊脂培養基(Czapek agar medium)上的斜面培養冷藏保存法(slant refrigerating preservation)。在Park等人的論文[Biotechnol. Bioprocess Eng., 6:161-166 (2001)]當中，所使用的方法涉及到利用瓊脂培養基斜面培養來製備一處在 $10^3$ 孢子/mL之下的孢子懸浮液並將之轉移至培養基。

鑒於設定與操控用於初始培養的條件之主要重要性，本案發明人亦專注於並費心地研究有可能會影響初始培養的細胞保存之重要性。結果，我們發現：一種加入一抗凍劑並將該混合物保存在介於-100°C與-20°C之間的方法是有

而成為一有別於斜面培養保存法、液態氮保存法或冷凍乾燥法(該等方法已被報導於先前文獻中)的新方法,同時一種用以製備優異的孢子懸浮液的方法亦被發現。

本發明的目的之一是提供一種用以生成含有PUFA的  
5 脂肪與油(三酸甘油酯)和/或含有PUFA的磷脂和/或含有PUFA的細胞的方法,藉此含有PUFA的脂肪與油(三酸甘油酯)和/或含有PUFA的磷脂呈一具改善的培養再現性之穩定方式被生成,該方法的特徵在於:轉移以及培養藉由一新穎之被保存的細胞製備方法與保存方法而被保存的細胞。

10 本發明是有關包含有多元不飽和脂肪酸作為一組成性脂肪酸的化合物[脂肪與油(三酸甘油酯)和/或磷脂]的生成以及一種用以生成會生成該等化合物[脂肪與油(三酸甘油酯)和/或磷脂]的微生物之方法,它們是藉由轉移以及培養藉由一新穎之被保存的細胞製備方法與保存方法而被保存  
15 的細胞。

因此,培養一種能夠生成包含有多元不飽和脂肪酸作為組成性脂肪酸[脂肪/油(三酸甘油酯)和/或磷脂]之化合物的微生物是必要的。較佳地,此處所指的該微生物是一種會生成來自於下列當中的至少一種類型的多元不飽和脂肪  
20 酸以作為三酸甘油酯和/或磷脂的主要組成性脂肪酸的微生物:具有18個或更高的碳數以及3個或更多的雙鍵之 $\omega$ 6多元不飽和脂肪酸、具有18個或更高的碳數以及2個或更多的雙鍵者之 $\omega$ 9多元不飽和脂肪酸以及具有18個或更高的碳數以及3個或更多的雙鍵之 $\omega$ 3多元不飽和脂肪酸。

作為具有18個或更高的碳數以及3個或更多的雙鍵之 $\omega$ 6多元不飽和脂肪酸，下列可被提出： $\gamma$ -次亞麻油酸(6,9,12-十八碳三烯酸)、升二- $\gamma$ -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)、  
5 7,10,13,16-二十二碳四烯酸(22:4  $\omega$  6)以及DPA  $\omega$  6(4,7,10,13,16-二十二碳五烯酸)；作為具有18個或更高的碳數以及2個或更多的雙鍵之 $\omega$ 9多元不飽和脂肪酸，下列可被提出：6,9-十八碳二烯酸、8,11-二十碳二烯酸以及識別蜜酸(Mead acid)(5,8,11-二十碳三烯酸)；以及作為具有18個或  
10 更高的碳數以及3個或更多的雙鍵之 $\omega$ 3多元不飽和脂肪酸，下列可被提出： $\alpha$ -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)以及DHA (4,7,10,13,16,19-  
15 二十二碳六烯酸)。

因此，依據本發明，可生成一包含有一多元不飽和脂肪酸作為一組成性脂肪酸[脂肪/油(三酸甘油酯)和/或磷脂]的化合物之任一種微生物可被使用。作為能夠生成含有花生四烯酸作為組成性脂肪酸的油與脂肪(三酸甘油酯)的微生物之實例，下列可被提出：屬於被孢黴屬(*Mortierella*)、耳黴屬(*Conidiobolus*)、腐黴屬(*Pythium*)、疫黴屬(*Phytophthora*)、青黴屬(*Penicillium*)、枝孢黴屬(*Cladosporium*)、毛黴屬(*Mucor*)、鐮孢黴屬(*Fusarium*)、黑麴菌屬(*Aspergillus*)、紅酵母屬(*Rhodotorula*)、蠅黴屬

20

製備所得到的菌株之被保存的細胞。用以製備被保存的細胞之方法涉及首先製備一孢子-形成培養基。該孢子-形成培養基是藉由製備一包含有一些或全部的下列組份之培養基而被生成：硝酸鈉、磷酸氫二鉀、硫酸鎂、氯化鉀以及硫酸亞鐵，加上醣類，並調整pH值至4-7的範圍(較佳為5-6.5)。在將瓊脂加入至所製備的培養基並進行加熱滅菌(heat sterilization)之後，被冷卻的固體被使用作為孢子-形成培養基。該孢子-形成培養基不被特別地限制，只要它容許菌絲生長以及孢子形成，但通常它的特徵在於具有一適合於孢子形成的範圍落在4-7的pH值。

作為一個特別的實例，一個可被提出的培養基是藉由下列而被獲得：將鹽酸或硫酸加入至察伯瓊脂培養基(Czapek agar medium)(2 g/L硝酸鈉、1 g/L磷酸氫二鉀、0.5 g/L硫酸鎂七水合物、0.5 g/L氯化鉀、0.01 g/L硫酸亞鐵七水合物、30 g/L蔗糖、13 g/L瓊脂)，俾以將pH值調整至6.0。另一個可被提出的實例是藉由下列而被獲得：將鹽酸或硫酸加入至察伯-賓克斯瓊脂培養基(Czapek-Dox agar medium)(2 g/L硝酸鈉、1 g/L磷酸氫二鉀、0.5 g/L硫酸鎂七水合物、0.5 g/L氯化鉀、0.01 g/L硫酸亞鐵七水合物、30 g/L葡萄糖、13 g/L瓊脂)俾以將pH值調整至6.0。

這個方法被使用以製備一斜面培養基(slant medium)或一平盤培養基(plate medium)，而菌絲或孢子在好氧條件下被接種至培養基內以供固態培養。培養溫度被保持在0-40℃(較佳為10-35℃，且更佳為15-30℃)下，以供細胞生長

與孢子形成。在培養的過程當中，培養溫度可以被改變，而舉例來說，在25°C下的生長可被接續以在5°C下的培養。

在確定孢子形成之後，無菌水被加入至被固態培養的菌絲(solid cultured hyphae)，而混合物藉由一尋常的方法被  
5 攪拌，俾以得到一孢子散浮液。對於被加入之經滅菌的水內之添加劑並無特別的限制，而相對於經純化的水，可被使用是含有被加入的介面活性劑、無機鹽類或相似物的水，或者經製備的鹽水可被使用。攪拌方法可涉及外力(external force)至對固態培養容器的簡單施用，或者力量可  
10 利用一經滅菌的刷子或類似物而被直接地施加至菌絲。

以這個方式所得到的孢子懸浮液或含有孢子與菌絲的懸浮液被使用作為保存儲液(preservation stock solution)。該保存儲液亦可使用經滅菌的水或一含有介面活性劑或無機鹽類的溶液予以稀釋以供製備最終的保存儲液。其次，一  
15 抗凍劑被加入至該保存儲液。該抗凍劑沒有被特別地限制，只要它是一種慣常地被使用者，而一或多個選自於下列者可以被加入：瓊脂粉末、胎牛血清、DMSO、甘油、肌醇(inositol)、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol)、脫脂乳(skim milk)以及類似物。作為一特別的實例，甘油可被加入至該  
20 抗凍劑至一甘油濃度是為保存溶液的10%。

在加入該抗凍劑之後，保存溶液被分配至一保存容器內。該容器合適地是一經滅菌的塑膠試管或類似物。作為一特別的實例，保存溶液藉由一無菌操作程序而被分配至一為1.2mL體積的凍存管(cryogenic vial)內。其次，該保存

溶液被保存於一超低溫冷凍庫中。該超低溫冷凍庫內部的溫度被控制在一介於 $-100^{\circ}\text{C}$ 與 $-20^{\circ}\text{C}$ 之間的範圍內，較佳為介於 $-90^{\circ}\text{C}$ 與 $-30^{\circ}\text{C}$ 之間，且更佳為介於 $-85^{\circ}\text{C}$ 與 $-50^{\circ}\text{C}$ 之間。

5 以此方式而被儲存在超低溫冷凍庫內的細胞可被安定地保存歷經長時期。

當被保存的細胞要被使用以供培養時，保存溶液首先被解凍。解凍應儘可能被快速地進行，較佳地是在一不高於 $40^{\circ}\text{C}$ 的溫度下於30分鐘內；更佳地是在一不高於 $30^{\circ}\text{C}$ 的溫度下於30分鐘內，且甚至再更佳地，於10分鐘內在不高於 $30^{\circ}\text{C}$ 的溫度下。

以這個方式被解凍的保存溶液被轉移至液態培養基以供培養。被使用的碳源可為一種常見者，諸如葡萄糖 (glucose)、果糖(fructose)、木糖(xylose)、蔗糖(saccharose)、麥芽糖 (maltose)、可溶性澱粉(soluble starch)、糖蜜 15 (molasses)、甘油(glycerol)、甘露糖醇(mannitol)或糖化澱粉 (saccharified starch)，雖然不受限於這些。

作為氮源，可被使用的有下列：諸如朊(peptone)、酵母菌萃取物(yeast extract)、麥芽萃取物(malt extract)、肉萃 20 取物(meat extract)、酪蛋白胺基酸(casmino acid)、玉米浸漬液(corn steep liquor)、大豆蛋白質(soybean protein)、脫脂大豆與棉花籽粉(defatted soybean and cotton seed meal)的天然氮源，還有包含尿素(urea)的有機氮源或是諸如硝酸鈉、硝酸銨以及硫酸銨的無機氮源，而這些當中可被特別地提出的是得自於大豆的氮源，且特別是大豆、脫脂大豆

(defatted soybean)、大豆粕(soybean flakes)、可食用的大豆蛋白質、豆奶渣(okara)、豆漿(soy milk)、大豆粉(soy flour)以及類似物。特別被偏好供使用的是經加熱變性的脫脂大豆(heat denatured defatted soybean)，以及更佳為一或多種不同類型的在大約70-90°C下被加熱處理過並被去除乙醇可溶性組份的脫脂大豆，選擇性地組合以上面提及的氮源之任一者。

若有需要，包含磷酸根離子、鉀離子、鈉離子、鎂離子或鈣離子的微量營養素，諸如鐵、銅、鋅、錳、鎳或鈷的金屬離子，或維生素亦可被加入。該等培養基組份沒有被特別地限制，只要它們是呈不會干擾到微生物的生長之濃度。就實際的應用而言，碳源通常被添加至處於一為0.1-40 wt% (較佳為1-25 wt%)的總濃度下，而氮源是處在一為2-15 wt%且較佳為2-10 wt%的總濃度下，而且特別地是一為1-5 wt%的初始碳源添加與一為3-8 wt%初始氮源添加，而在培養期間進一步進料該碳源與氮源(更佳為該碳源本身)。

含有PUFA的脂肪或油之產率可藉由使用一不飽和脂肪酸前驅物而被增加，例如：一烴，諸如十六烷或十八烷的；一脂肪酸，諸如油酸或亞麻油酸或其一鹽類；一脂肪酸酯，諸如一乙基酯、甘油脂肪酸酯或去水山梨醇脂肪酸酯(sorbitan fatty acid ester)；或一脂肪或油，諸如橄欖油(olive oil)、大豆油、菜籽油(rapeseed oil)、棉花籽油(cottonseed oil)或椰子油(coconut oil)，單獨地抑或組合地。

相對於培養基，基質(substrate)的添加可為處在0.001-10%  
下，且較佳為0.05-10%。該等基質亦可被使用作為唯一的  
碳源以供培養。

有關於會生成含有PUFA的脂肪或油質的微生物之培  
5 養溫度會根據所用的微生物而有不同，並可為5-40°C，而  
較佳為20-30°C，或者藉由培養在20-30°C下而被生長出的細  
胞隨後可被培養在5-20°C下，俾以生成含有PUFA的脂肪與  
油。該溫度控制亦可提高含有PUFA的脂肪與油內的組成性  
脂肪酸的PUFAs比例。播種培養(seed culturing)可以藉由桌  
10 上型培養裝置培養(jar fermenter culturing)、振盪培養(shake  
culturing)或靜態液體培養(stationary liquid culturing)而被  
進行，而桌上型培養裝置培養被進行以供主要培養(main  
culturing)。在主要培養的開始(一旦轉移播種培養物)之時的  
培養基pH值被調整至5-7，且較佳為5.5-6.5。關於各個階段  
15 的播種培養之培養時期通常地會是1-10天，較佳為1-5天，  
而更佳為1-3天。關於主要培養之培養時期通常地會是2-30  
天，較佳為5-20天，而更佳為5-15天。

屬於被孢黴屬、被孢黴亞屬的微生物被知曉會生成包  
含有花生四烯酸作為主要的組成性脂肪酸的化合物[脂肪  
20 和油(含有花生四烯酸的三酸甘油酯)和/或含有花生四烯酸  
的磷脂]，但透過上述菌株的突變作用(mutagenesis)，本案  
發明人已成功獲得一能夠生成包含有升二- $\gamma$ -次亞麻油酸  
作為主要的組成性脂肪酸之脂肪與油的微生物(日本未審  
查專利公開案號HEI 5-91887)，以及能夠生成包含有以 $\omega$ 9

多元不飽和脂肪酸作為主要的組成性脂肪酸之脂肪與油的微生物(日本未審查專利公開案號HEI 5-91888)。

此外，我們已獲得對於高濃度碳源具有抗性的微生物(日本未審查專利公開案號HEI 5-9188、日本未審查專利公開案號HEI 10-57085、日本未審查專利公開案號HEI 5-91886)，該等微生物是屬於被孢黴屬、被孢黴亞屬的真菌並且能夠生成含有PUFA的脂肪與油和/或含有PUFA的磷脂，這是藉由使用已藉由該培養方法而被儲存之被保存的菌株之培養，且特別是依據本發明之新穎的被保存的細胞製備方法與保存方法。但是，本發明不被限制在屬於被孢黴屬、被孢黴亞屬的真菌，而且本發明的培養方法可被應用至能夠生成包含有多元不飽和脂肪酸作為組成性脂肪酸的化合物[脂肪與油(三酸甘油酯)和/或磷脂]之微生物，俾以得到所想要的微生物生物質量、粗製的油和/或粗製的磷脂，以及藉由精製該粗製的油和/或粗製的磷脂而被得到的精製的脂肪與油和/或精製的磷脂。

用以從具有被蓄積於細胞內的脂肪或油之微生物來獲得粗製的油和/或粗製的磷脂之方法可涉及到：直接地或在滅菌、濃縮與酸化之後處理經完全培養的溶液(fully cultured solution)，接而藉由平常的固相/液相分離技術手段(諸如自然沉澱、離心分離和/或過濾)來回收被培養的細胞。該固相/液相分離可被輔以一凝集劑(aggregating agent)或過濾助劑(filtering aid)的添加。凝集劑的實例包含氯化鋁、氯化鈣、藻膠(algin)與幾丁聚醣(chitosan)。矽藻土

(diatomaceous earth)可被提出作為過濾助劑。較佳地，被培養的細胞被洗滌(rinsed)、被打破(ruptured)並被乾燥。乾燥可藉由冷凍乾燥法(freeze-drying)、吹乾法(blow drying)、流動床乾燥法(fluidized bed drying)或類似方式來進行。

- 5 用以回收來自被乾燥的細胞之粗製的油和/或粗製的磷脂之方法可為一有機溶劑萃取方法(organic solvent extraction method)或一加壓法(pressing method)，但是在氮氣流(nitrogen stream)下使用一有機溶劑的萃取是較佳的。作為有機溶劑，下列可被使用：乙醇、己烷、甲醇、氯仿、
- 10 二氯甲烷、石油醚(petroleum ether)、丙酮以及類似物，或者可以採用使用下列的交替式萃取(alternating extraction)：甲醇與石油醚，或一由氯仿-甲醇-水所構成的單層溶劑系統。但是，被用來獲得粗製的油和/或磷脂的萃取方法不被限制在上述的方法，而相反地可為任一種會完
- 15 成細胞的脂肪與油(三酸甘油酯)和/或磷脂之有效萃取的方法。例如，使用一起臨界的CO<sub>2</sub>流之萃取可被使用作為一有效的技術手段。

- 藉由減壓移除(reduced pressure removal)而將藉由使用有機溶劑或超臨界流動的萃取所得到的萃取物內的有機溶
- 20 劑或超臨界流動組份移除，有可能得到標的粗製的油和/或粗製的磷脂。同樣地在這個情況下，粗製的油和/或粗製的磷脂可以藉由相同於來自被乾燥的細胞之方法而被萃取出，但是萃取效率(extraction efficiency)可藉由使用一水可相容的溶劑(諸如甲醇、乙醇或丙酮)或一包含有這些的任一

者與水和/或其他溶劑之水可相容的混合物而會更大。

依據本發明而被得到的含有多元不飽和脂肪酸作為組成性脂肪酸的微生物生物質量，或者粗製的油和/或粗製的磷脂，可藉由併入至動物飼料內而被直接地使用。但是，  
5 有關於食品之應用，一常用的脂肪/油精製方法較佳地被使用。被使用的脂肪/油精製方法可為一平常的方法，諸如脫膠(degumming)、除氧(dexidation)、脫臭(deodorization)、脫色(decolorizing)、管柱處理(column treatment)、分子蒸餾(molecular distillation)、越冬(wintering)或類似方法。

10 關於本發明的微生物生物質量、粗製的油、精製的脂肪與油(三酸甘油脂)、粗製的磷脂以及精製的磷脂存在有一無數目限制的用途：例如，它們可被使用作為有關於食品、飲料、化妝品以及藥劑的起始物質與添加劑。用途的目的與用途的總數也是完全不受限制的。

15 作為食物組成物的實例，下列可被提出：一般食品(ordinary foods)，以及功能性食品(functional foods)、營養補充劑(nutritional supplements)、早產兒用經改質的乳品(premature infant modified milk)、成熟嬰兒用經改質的乳品(mature infant modified milk)、哺育嬰兒用經改質的乳品(nursing infant modified milk)、嬰兒食品、母體用食品(maternal foods)、老人用食品(geriatric food)。作為含有脂肪/油食品的實例，下列可被提出：天然的含脂肪/油食品，  
20 諸如肉類、魚類以及堅果類；在加工過程當中被添加以脂肪/油的食物，諸如湯；使用脂肪/油作為加熱介質的食品，

諸如甜甜圈；脂肪與油食品，諸如奶油；在加工過程當中  
被加入脂肪/油的加工食品，諸如餅乾；或者在完成之時被  
噴灑或塗佈以脂肪/油的食物，諸如硬餅乾(hard biscuits)。  
該等組成物亦可被加入至農業用食品(agricultural foods)、  
5 經發酵的食品(fermented foods)、畜產食品(livestock  
foods)、水產食品(marine foods)以及那些不含有脂肪或油的  
飲料。它們亦可以呈功能性食品或藥劑的形式，以及例如，  
呈經加工的形式，諸如腸道營養素(enteral nutrients)、粉  
末、顆粒(granules)、口含錠(lozenges)、口服溶液(oral  
10 solution)、懸浮液(suspension)、乳劑(emulsions)、糖漿(syrups)  
以及類似物。

### 實施例

本發明現在將藉由下列實施例而被更為詳細地解釋，  
而須理解是本發明並不受之所限。

#### 15 實施例1 用以低溫保存孢子懸浮液的方法

高山被孢黴1S-4 (*Mortierella alpina* 1S-4)被使用作為  
一個花生四烯酸-生成菌株。靜態培養在25°C下、於一被提  
供於一試管內的察伯瓊脂培養基(被調整至pH6.0且經滅菌)  
之斜面培養下被進行於歷時7天，而在確定菌絲生長之後，  
20 該試管被儲存於一冰箱(4°C)內歷時10天。

經滅菌的水被加入至該試管內，而混合物被充分地攪  
拌以製備一孢子懸浮液。孢子懸浮液被適當地稀釋並被塗  
佈至一馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基培養皿上，而一菌落計數  
法(colony counting method)被使用以計數該孢子懸浮液內

的孢子，得到一為 $1 \times 10^6$ 孢子/mL的結果。其次，該孢子懸浮液以經滅菌的水予以稀釋100倍。經稀釋的孢子懸浮液、甘油與水以下列比例被混合：經稀釋的孢子懸浮液：甘油：水=1:1:8(以體積計)(水與甘油被預混合並被滅菌)。1 mL 5 部分的混合物被置放於一個1.2 mL體積的經滅菌的凍存管內，並被低溫保存於一處在 $80^{\circ}\text{C}$ 下的超低溫冷凍庫內。

關於高山被孢黴(*M. alpina*)於液體培養中的使用，被低溫保存的菌株在一個 $25^{\circ}\text{C}$ 的培養箱(incubator)內被迅速地解凍，並被轉移至液態培養。

#### 10 比較例1 用以製備孢子懸浮液的方法

高山被孢黴1S-4 (*Mortierella alpina* 1S-4)被使用作為一個花生四烯酸-生成菌株。靜態培養在 $25^{\circ}\text{C}$ 下、於一被提供於一試管內的察伯瓊脂培養基(被調整至pH6.0且經滅菌)之斜面培養下被進行於歷時7天，而在確定菌絲生長 15 之後，該試管被保存於一冰箱內。

關於高山被孢黴1S-4 (*M. alpina* 1S-4)於液體培養中的使用，經滅菌的水被加入至該試管內，而混合物被良好地攪拌以製備一孢子懸浮液。該孢子懸浮液被轉移至液態培養基。

#### 20 實施例2 培養實驗(由於保存方法所致的再現性上的差異)

培養係使用高山被孢黴1S-4 (*M. alpina* 1S-4)，從一藉由實施例1與比較例1的方法而被製備的播種菌株(seed strain)來予以進行。

在轉移0.1體積%之被保存的播種菌株至處在pH 6.3下

並含有1.0%酵母菌萃取物與2.0%葡萄糖的培養基之後，播種培養在100 rpm往復式振盪(reciprocal shaking)、28°C的溫度之條件下被起始，而且培養被持續歷時3天。

其次，25 L的培養基(處在pH 6.3下並含有5.0%脫脂大豆粉末、0.3%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、0.1%  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 、0.05%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.05%  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.8%葡萄糖以及0.1%大豆油)被製備於一個50 L體積的桌上型培養裝置內，而接著100 mL播種培養溶液(seed culture solution)被轉移，以及培養是在92 rpm攪拌、26°C溫度、200 kPa內部壓力以及12.5 L/min氣流(airflow)的條件下被起始。在培養當中，葡萄糖被加入至處於表1中所顯示的濃度下，而培養被持續歷時10天。

表1

葡萄糖進料的時間與濃度(相對於培養溶液的濃度)

進料時間	進料濃度
第1天	4.5%
第2天	4.5%
第3天	4%
第4天	3%
第5天	2%
第6天	1%

在起始播種菌株保存之後的不同天數下，培養藉由同樣的方法被進行數次。就各個培養物而言在培養的第10天所得到的花生四烯酸的產率被顯示於表2中。

就藉由實施例1的方法而被製備並被保存的播種菌株來論，對於各個培養物而言，花生四烯酸產率再現性是令人滿意的。但是，當使用藉由比較例1的方法而被製備並被

保存的播種菌株時，對於各個培養物有不良的再現性產生。

表2

結果

播種菌株製備方法	孢子懸浮液低溫保存法 (實施例1的方法)	以斜面培養製備孢子懸浮液 (比較例1的方法)
播種菌株保存方法	孢子懸浮液的低溫保存	察伯瓊脂培養基斜面培養 固態-培養的菌絲之冷藏
保存的天數	1天	1天
花生四烯酸產率	13.9 g/L	13.8 g/L
保存的天數	30天	30天
花生四烯酸產率	13.0 g/L	13.5 g/L
保存的天數	30天	30天
花生四烯酸產率	14.2 g/L	10.5 g/L
保存的天數	60天	60天
花生四烯酸產率	12.9 g/L	14.2 g/L
保存的天數	60天	60天
花生四烯酸產率	13.6 g/L	10.5 g/L
保存的天數	90天	90天
花生四烯酸產率	13.5 g/L	13.5 g/L
保存的天數	90天	90天
花生四烯酸產率	14.1 g/L	10.1 g/L

實施例3 培養實驗 [使用延長的保存而在生產力

5 (productivity)上的變化]

培養係使用高山被孢黴1S-4 (*M. alpine* 1S-4)，從一藉由實施例1與比較例1的方法而被製備的播種菌株(seed strain)來予以進行。

10 在轉移0.1體積%之被保存的播種菌株至處在pH 6.3下並含有1.0%酵母菌萃取物與2.0%葡萄糖的培養基之後，播種培養在100 rpm往復式振盪、28°C的溫度之條件下被起始，而且培養被持續歷時3天。

其次，25 L的培養基(處在pH 6.3下並含有1.0%酵母菌萃取物、1.8%葡萄糖以及0.1%大豆油)被製備於一個50 L體

積的桌上型培養裝置內，而接著100 mL播種培養溶液被轉移，以及培養是在200 rpm攪拌、28°C溫度、150 kPa內部壓力以及25 L/min氣流(airflow)的條件下被起始。在培養當中，葡萄糖被加入至處於表2中所顯示的濃度下，而培養被

5 持續歷時7天。

表3

葡萄糖進料的時間與濃度(相對於培養溶液的濃度)

進料時間	進料濃度
第1天	1.5%
第2天	1.5%
第3天	1%
第4天	1%

在起始播種菌株保存之後的不同天數下，培養藉由同樣的方法被進行數次。就各個培養物而言在培養的第7天所

10 得到的花生四烯酸的產率被顯示於表4中。

就藉由實施例1的方法而被製備並被保存的播種菌株來論，即令使用經延長的保存，花生四烯酸生產力令人滿意地被再現。但是，就藉由比較例1的方法而被製備並被保存的播種菌株而言，在經延長的保存期間當中，花生四烯

15 酸的生產力傾向於下跌。

表4

## 結果

播種菌株製備方法	孢子懸浮液低溫保存法 (實施例1之方法)	以斜面培養製備孢子懸浮液 (比較例1的方法)
播種菌株保存方法	孢子懸浮液的低溫保存	察伯瓊脂培養基斜面培養 固態-培養的菌絲之冷藏
保存的天數	1天	1天
花生四烯酸產率	3.7 g/L	3.6 g/L
保存的天數	4年	4年
花生四烯酸產率	4.0 g/L	2.5 g/L
保存的天數	8年	8年
花生四烯酸產率	3.9 g/L	2.2 g/L

## 實施例4 孢子-形成培養基pH之影響

高山被孢黴1S-4 (*M. alpine* 1S-4)被使用作為一個花生四烯酸-生成菌株。具有不同pH值的兩種不同的察伯瓊脂培養基(具有被顯示於表5中的組成)被製備於試管中。未經pH值調整的察伯培養基之pH值被量測是為8.5。

表5

	pH值被調整 (6.0)	無pH值調整(*2)
硝酸鈉( $\text{NaNO}_3$ )	2 g/L	2 g/L
磷酸氫二鉀( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	1 g/L	1 g/L
硫酸鎂七水合物( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.5 g/L	0.5 g/L
氯化鉀(KCl)	0.5 g/L	0.5 g/L
硫酸亞鐵七水合物( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	0.01 g/L	0.01 g/L
蔗糖	30 g/L	30 g/L
瓊脂粉末	13 g/L	13 g/L
HCl溶液	被加入(*1)	未被加入

\*1:被加入用以調整pH值至6.0

\*2:被量測到的pH為8.5。

一個接種環量(one loop)的菌絲各自被轉移至具有不同pH值的兩個瓊脂培養基，而靜態培養在25°C下被進行歷時7天，並在確定菌絲生長之後，試管被儲存於一個冰箱(4°C)內歷時10天。

經滅菌的水被加入至各個試管，而混合物被良好地攪拌以製備一孢子懸浮液。該孢子懸浮液被適當地稀釋並被塗佈至一馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基培養皿上，而菌落計數法被使用以計數孢子懸浮液內的孢子，得到下列結果：在

5 處於pH 6.0下的瓊脂培養基內所得到的 $1 \times 10^6$ 孢子/mL，而在未經pH調整的培養基(被量測到的pH值為8.5)內所得到的 $5 \times 10^4$ 孢子/mL。

藉由這兩種方法而被製備的孢子懸浮液被使用以供藉由實施例3的方法之培養，而花生四烯酸產率被比較。結果，一為3.5 g/L的花生四烯酸產率是從被調整至pH 6.0的培養基內所生成的孢子懸浮液而被獲得，而一為2.9 g/L的花生四烯酸產率是從未經pH值調整的培養基(被量測到的pH值為8.5)而被獲得。

10

#### 實施例5 低溫保存系統

15 實施例1被重複，但使用如下而被製備之被保存的孢子懸浮液：被製備於一個1.2 mL體積的凍存管內，並被保存於一個 $-20^{\circ}\text{C}$ 冷凍庫內以作為條件(5-1)、於一個 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低溫冷凍庫內以作為條件(5-2)以及於液態氮(大約 $-196^{\circ}\text{C}$ )內作為條件(5-3)。在這3個條件下保存30天之後，培養係以相同

20 於實施例2的方式被進行。結果，孢子存活率與花生四烯酸生產力這兩者在保存於一個 $-80^{\circ}\text{C}$ 超低溫冷凍庫內的條件下是為較佳的。

表6

條件	5-1 -20°C 儲存	5-2 -80°C 儲存	5-3 液態氮儲存
解凍後的孢子數目	$2 \times 10^2$ 孢子/mL	$9 \times 10^3$ 孢子/mL	$1 \times 10^2$ 孢子/mL
花生四烯酸產率	9.1 g/L	13.0 g/L	8.7 g/L

實施例6 利用大型槽式培養之經冷凍的菌株之培養再現性的確認

培養係使用高山被孢黴1S-4 (*M. alpine* 1S-4)，從一藉  
5 由實施例1的方法而被製備的播種菌株來予以進行。

在轉移0.1體積%之被保存的播種菌株至處在pH 6.3下  
並含有1.0%酵母菌萃取物與2.0%葡萄糖的培養基之後，播  
種培養在100 rpm往復式振盪、28°C的溫度(第一階段)之條  
件下被起始，而且培養被持續歷時3天。

10 其次，30 L的處在pH 6.3下並含有1.0%酵母菌萃取物、  
2%葡萄糖以及0.1%大豆油的培養基被製備於一個50 L體積  
的桌上型培養裝置內，而接著播種培養(第一階段)溶液被轉  
移，而播種培養(第二階段)是在200 rpm攪拌、28°C溫度、  
150kPa內部壓力以及12.5 L/min氣流的條件下被起始，以供  
15 2天的培養。

其次，4500 L的培養基(培養基A: 336 kg大豆粉末、16.8  
kg  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、2.8 kg  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、2.8 kg  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、5.6 kg  
大豆油)被調整至一為4.5的pH值，並在121°C、20分鐘的條  
件下被滅菌。作為一另外的培養基，以下述方式來製備培  
20 養基C：在140°C下將1000L的培養基[培養基B：112 kg含水的  
葡萄糖(hydrous glucose)]滅菌歷時40秒並將它加入至前  
述的培養基A。在將培養基C調整至pH 6.3之後，一為28 L

體積的播種培養物(第二階段)被轉移，以作為一合併的總數為5600 L的初始培養溶液(10 kL體積培養槽)。

為了轉移播種培養溶液(第二階段)至主要培養用培養基(main culturing medium)，蒸氣被通經連接播種培養槽

5 (seed culturing tank)與主要培養槽(main culturing tank)的管線以達滅菌(在121-126°C下， $\geq 30$ 分鐘)，且接著無菌的空氣被引入通經該管線以供冷卻至一為低於60°C的管線表面溫度。在冷卻之後，播種培養物(第二階段)呈一被指定的體積被允許通過並被輸送至主要培養槽。當該播種培養物至

10 該主要培養基的轉移被完成時，培養是在一為26°C的溫度下、一為49 Nm<sup>3</sup>/hr的氣流量與一為200 kPa的內部壓力下被起始。培養基是依據被顯示於下列表格內之排定流程而在培養期間當中被進料，以供306小時的主要培養。當培養完成時，培養物體積因為培養基進料的增加以及蒸發的損失

15 之結果而成為7750 L。一旦完成培養，每一個培養物的花生四烯酸產率是18.2g/L。

主要培養時間	進料培養基
19小時後	280 kg含水葡萄糖/460 L
43小時後	280 kg含水葡萄糖/450 L
67小時後	252 kg含水葡萄糖/390 L
91小時後	252 kg含水葡萄糖/410 L
120小時後	224 kg含水葡萄糖/370 L
140小時後	168 kg含水葡萄糖/280 L
163小時後	168 kg含水葡萄糖/270 L

在培養完成之後，滅菌於120°C、20分鐘的條件下被進行，而接著濕細胞質塊(wet cell mass)使用一連續式脫水器

(continuous dehydrator)予以回收，並且使用一振盪式流動床乾燥器(oscillating fluidized bed drier)予以乾燥至1 wt%的含水量(moisture content)，而被乾燥的細胞質塊使用一氣動輸送機(air conveyer)被輸送至一包裝處所(packaging location)。所得到的乾細胞質塊與氮氣一起被包裝至一為大約1 m<sup>3</sup>體積鋁質袋容器袋(aluminum pouch container bag)內，而於儲存之前該袋之開口在一低於10°C下的冷儲藏室內被加熱密封。

在從容器袋移出後，乾細胞質塊被進行己烷萃取(hexane extraction)，而己烷溶液被過濾以去除掉固體部分，在這之後，它在減壓下被加熱以去除己烷，而得到一包含有花生四烯酸作為一主要組成性脂肪酸之粗製的油。

同樣的培養被重複3次。培養完成之時的花生四烯酸產率的結果被概述於表7中。被保存的菌株之再現性是令人滿意的，因而確認更為安定的花生四烯酸生產力已被達成。

表7

完成培養時花生四烯酸產率的摘要

培養	
1	18.2 g/L
2 (1年後)	17.8 g/L
3 (5年後)	17.9 g/L

實施例7 經冷凍的升二- $\gamma$ -次亞麻油酸-生成菌株的培養再現性之確認

高山被孢黴SAM1860 (*Mortierella alpina* SAM1860)被使用作為一個升二- $\gamma$ -次亞麻油酸-生成菌株。靜態培養在25°C下、於一被提供於試管內的察伯瓊脂培養基(被調整至

pH 6.0且經滅菌)之斜面培養中被進行歷時12天，而在確定菌絲生長後，該試管被儲存於一個冰箱內(4°C)歷時20天。

經滅菌的水被加入至該試管內，混合物被良好地攪拌以製備一孢子懸浮液。該孢子懸浮液被適當地稀釋以及塗佈至一馬鈴薯葡萄糖瓊脂培養基培養皿上，菌落計數法被使用以計數孢子懸浮液內的孢子，而提供一為 $5 \times 10^6$ 孢子/ml的結果。

其次，孢子懸浮液以無菌水予以稀釋100倍。經稀釋的孢子懸浮液、甘油以及經滅菌的水以下列比例被混合：經稀釋的孢子懸浮液：甘油：經滅菌的水=1：1：8 (以體積計)。1 mL部分的混合物被置放於一個1.2 mL體積的經滅菌的凍存管內，並被低溫保存於一處在-80°C下的超低溫冷凍庫內歷時1個月。

作為一比較例，以同樣的方法被製備的孢子懸浮液被儲存於一個冰箱(5°C)內歷時1個月。

被儲存歷時1個月的這兩個被保存的菌株藉由相同於實施例3的方法被使用於培養。結果，DGLA產率被顯示於表8中，這顯示出低溫保存法的效果。

表8

結果

播種菌株製備方法	孢子懸浮液的低溫保存	孢子懸浮液的冷藏
DGLA產率	3.1 g/L	2.7 g/L

實施例8 其他經冷凍的花生四烯酸-生成菌株的培養再現性之確認

長被孢黴IFO8570 (*Mortierella elongata* IFO8570)以及

高山被孢黴CBS754.68 (*Mortierella alpina* CBS754.68)被使用作為花生四烯酸-生成菌株。

靜態培養在25°C下、於一被提供於試管內的察伯瓊脂培養基(被調整至pH 6.0且經滅菌)之斜面培養中被進行歷時10天，而在確定菌絲生長後，該試管被儲存於一個冰箱內(4°C)歷時20天。

經滅菌的水被加入至試管內，而混合物被良好地攪拌以製備一孢子懸浮液。該孢子懸浮液以經滅菌的水予以稀釋10倍。經稀釋的孢子懸浮液、甘油以及經滅菌的水以下列比例被混合：經稀釋的孢子懸浮液：甘油：經滅菌的水 = 1 : 1.5 : 7.5 (以體積計)。1 mL部分的混合物被置放於一個1.2 mL體積的經滅菌的凍存管內，並被低溫保存於一處在-80°C下之超低溫冷凍庫內歷時1個月。

作為一比較例，以同樣的方法被製備的孢子懸浮液被儲存於一個冰箱(5°C)內歷時1個月。

被保存歷時1個月的4個被保存的菌株(兩種不同的菌株x兩種不同的保存方法)各自被轉移至一處在pH 6.3下並含有1%酵母菌萃取物以及2%葡萄糖的培養基，並於100 rpm往復式振盪、28°C溫度的條件下被使用以供3天的播種菌株培養。

其次，25 L的培養基(500 g葡萄糖、775 g脫脂大豆粉末、50g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 、7.5g/L  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、7.5g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、25 g大豆油、pH 6.0)被製備於一個50 L體積的桌上型培養裝置內，而接著該種培養溶液被轉移，並且主要培養是在200

rpm攪拌、28°C溫度、150 kPa內部壓力的條件下被起始。培養被持續歷時186小時，而大約每24小時加入一個50%葡萄糖溶液以達一葡萄糖濃度為大約1.2%。結果，被顯示於表9內的花生四烯酸產率被得到，這顯示出低溫保存法的效果。

表9

結果

播種菌株製備方法	孢子懸浮液的低溫保存	孢子懸浮液的冷藏
花生四烯酸產率		
長被孢黴IFO8570	3.4 g/L	2.0 g/L
高山被孢黴CBS754.68	7.2 g/L	5.1 g/L

#### 實施例9 L-乾燥法(L-drying method)與低溫保存法對於經9年-保存的樣品之比較

一孢子懸浮液被製備，而乾燥的孢子安瓿(ampule)藉由傳統已知的L-乾燥法(L-drying method)被製造並被保存["Maintaining cultures for Biotechnology and Industry (1996)", edited by J.C. Hunter-Cevera & A. Belt, Academic Press, p.115]。在製造與保存歷時9年之後，6個經L-乾燥的安瓿被打開，而它們的內含物被重建並被塗佈至瓊脂培養基上，並且存活的孢子之數目被計數。同樣地，藉由實施例1之方法被製備(並被低溫保存歷時9年)的6個1.2 mL體積凍存管被打開，並且存活的孢子之數目被計數。

被顯示於下列表格中的結果確認：相較於先前技術的L-乾燥法，依據實施例1之保存方法會造成一明顯較優的存活率。總而言之，本發明的方法對於微生物菌株的延長保存而言是一高度有效的方法。

表10

條件	L-乾燥法	低溫保存法
存活的安瓿數	3個安瓿存活 3個安瓿死亡	全部6試管皆存活
存活的孢子數	存活安瓿內為2 死亡安瓿內為0	每個管內200個

**【圖式簡單說明】**

(無)

5 **【主要元件符號說明】**

(無)

## 五、中文發明摘要：

一種用以保存一微生物之方法，該微生物能夠微生物性生成一多元不飽和脂肪酸或一包含有一多元不飽和脂肪酸作為一組成性脂肪酸的化合物，該方法包括：(a)於一處在pH 4-7之下並含有一養分來源的孢子-形成培養基(spore-forming medium)內形成孢子，該養分來源包含有一無機鹽以及一糖；(b)將於(a)中所得到的孢子散浮於經滅菌的水或含有一介面活性劑和/或一無機鹽之經滅菌的水中以製備一孢子懸浮液，並且加入一處在5-15%之下的抗凍劑(cryoprotectant)，俾以製備一低溫保存孢子懸浮液(cryopreserving spore suspension)；以及(c)將於(b)中所得到的低溫保存孢子懸浮液保存在介於-100°C與-20°C之間。

## 六、英文發明摘要：

A method for preservation of a microorganism capable of microbial production of a polyunsaturated fatty acid or a compound comprising a polyunsaturated fatty acid as a constituent fatty acid, which method comprises: (a) forming spores in a spore-forming medium at pH 4-7 containing a nutrient source comprising an inorganic salt and a saccharide; (b) suspending the spores obtained in (a) in sterilized water, or sterilized water containing a surfactant and/or an inorganic salt to prepare a spore suspension, and adding a cryoprotectant at 5-15% to prepare a cryopreserving spore suspension; and (c) preserving the cryopreserving spore suspension obtained in (b) at between -100°C and -20°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：

(無)

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)

公告本
-----

# 發明專利說明書

99年2月9日	修正 補充頁
---------	-----------

(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：94127188

※ 申請日期：94.08.10

※IPC 分類：C12N 1/04, 1/14  
C12P 7/64

## 一、發明名稱：(中文/英文)

使用新穎細胞保存技術以生成多元不飽和脂肪酸的方法

METHOD FOR POLYUNSATURATED FATTY ACID PRODUCTION USING  
NOVEL CELL PRESERVATION TECHNIQUE

## 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 1 人)

姓名：(中文/英文)

東山堅一/HIGASHIYAMA, KENICHI

國籍：(中文/英文)

日本/JAPAN

100年9月21日修正

(*Entomophthora*)、棘孢子囊菌屬(*Echinosporangium*)以及水黴屬(*Saprolegnia*)的真菌。

作為屬於被孢黴屬、被孢黴亞屬的真菌之實例，下列可被提出：長被孢黴(*Mortierella elongata*)、微小被孢黴  
5 (*Mortierella exigua*)、喜濕被孢黴(*Mortierella hygrophila*)，以及高山被孢黴(*Mortierella alpina*)。更特別地，可被提出的菌株(strains)為：長被孢黴 IFO8570，微小被孢黴 IFO8571，喜濕被孢黴 IFO5941，以及高山被孢黴 IFO8568、  
10 ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70、CBS754.68 等等。

作為能夠生成 DHA 的微生物之實例，下列可被提出：屬於 *Cryptocodinium*、破囊壺菌屬(*Thrautochytrium*)、裂壺菌屬(*Schizochytrium*)、*Ulkenia*、日本壺菌屬(*Japonochytrium*)  
15 以及海壺菌屬(*Haliphthoros*)的微生物。

所有的這些菌株可在無任何特殊限制下而獲取自大阪的發酵研究中心(Institute for Fermentation, Osaka, IFO)、美國類型培養物收集中心(American Type Culture Collection, ATCC)或中央局酵母培養部(Centrabureau voor  
20 Schimmelcultures, CBS)。下列菌株亦可被使用：高山被孢黴(*Mortierella alpina*) 1S-4 以及長被孢黴(*Mortierella elongata*) SAM0219 (FERM-P 8703)(FERM-BP1239)，由本發明的研究群組從土壤分離出來的。

為了培養一要被使用於本發明中的菌株，有需要首先

## 十、申請專利範圍：

100年9月21日  
申請專利範圍

1. 一種用以保存一微生物之方法，該微生物能夠微生物性生成一多元不飽和脂肪酸或一包含有一多元不飽和脂肪酸作為一組成性脂肪酸的化合物，該方法包括：

5 (a) 於一處在 pH 4-7 之下並含有一養分來源的孢子-形成培養基內形成該微生物之孢子並同時使菌絲生長，該養分來源包含有一無機鹽以及一醣；

10 (b) 將於(a)中所得到的孢子散浮於經滅菌的水或含有一介面活性劑和/或一無機鹽之經滅菌的水中，以製備一孢子懸浮液，並且加入一處在 5-15% 之下的抗凍劑，俾以製備一低溫保存孢子懸浮液；以及

(c) 將於(b)中所得到的低溫保存孢子懸浮液保存在介於  $-100^{\circ}\text{C}$  與  $-20^{\circ}\text{C}$  之間。

15 2. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其中該無機鹽是選自於下列所構成之群組中的至少一種類型的無機鹽：硝酸鈉、磷酸氫二鉀、硫酸鎂、氯化鉀以及硫酸亞鐵。

20 3. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其特徵在於該孢子-形成培養基是被調整至 pH 值為 4 至 7 的察伯瓊脂培養基 (Czapek agar medium) 或察伯-寶克斯瓊脂培養基 (Czapek-Dox agar medium)。

4. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其特徵在於該抗凍劑是甘油。

5. 如申請專利範圍第 1 項的用以保存一微生物之方法，其特徵在於該多元不飽和脂肪酸或該包含有一多元不飽

和脂肪酸作為組成性脂肪酸的化合物是一種包含有一多元不飽和脂肪酸作為組成性脂肪酸的三酸甘油脂或一種包含有一多元不飽和脂肪酸作為組成性脂肪酸的磷脂。

- 5 6. 如申請專利範圍第1項的用以保存一微生物之方法，其特徵在於該多元不飽和脂肪酸是一 $\omega$ 6不飽和脂肪酸、 $\omega$ 3不飽和脂肪酸或 $\omega$ 9不飽和脂肪酸，或它們的一個組合。
- 10 7. 如申請專利範圍第6項的用以保存一微生物之方法，其特徵在於該 $\omega$ 6不飽和脂肪酸是9,12-十八碳二烯酸(亞麻油酸)18:2 $\omega$ 6、6,9,12-十八碳三烯酸( $\gamma$ -次亞麻油酸)18:3 $\omega$ 6、8,11,14-二十碳三烯酸(升二- $\gamma$ -次亞麻油酸)20:3 $\omega$ 6、5,8,11,14-二十碳四烯酸(花生四烯酸)20:4 $\omega$ 6、7,10,13,16-二十二碳四烯酸22:4 $\omega$ 6或4,7,10,13,16-  
15 二十二碳五烯酸22:5 $\omega$ 6。
- 20 8. 如申請專利範圍第6項的用以保存一微生物之方法，其特徵在於該 $\omega$ 3不飽和脂肪酸是9,12,15-十八碳三烯酸( $\alpha$ -次亞麻油酸)18:3 $\omega$ 3、6,9,12,15-十八碳四烯酸(硬脂四烯酸)18:4 $\omega$ 3、11,14,17-二十碳三烯酸(升二- $\alpha$ -次亞麻油酸)20:3 $\omega$ 3、8,11,14,17-二十碳四烯酸20:4 $\omega$ 3、5,8,11,14,17-二十碳五烯酸20:5 $\omega$ 3、7,10,13,16,19-二十二碳五烯酸22:5 $\omega$ 3或4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸22:6 $\omega$ 3。
9. 如申請專利範圍第6項的方法，其特徵在於該 $\omega$ 9不飽和

脂肪酸是 6,9-十八碳二烯酸 18:2 $\omega$ 9、8,11-二十碳二烯酸 20:2 $\omega$ 9 或 5,8,11-二十碳三烯酸(識別蜜酸)20:3 $\omega$ 9。

10. 如申請專利範圍第 1 項的方法，其特徵在於該微生物是一屬於被孢黴屬(*Mortierella*)的微生物。

5 11. 如申請專利範圍第 10 項的方法，其特徵在於該屬於被孢黴屬的微生物是高山被孢黴(*Mortierella alpina*)。

12. 一種用以生成一多元不飽和脂肪酸或一包含有一多元不飽和脂肪酸作為組成性脂肪酸的化合物之方法，包含：

10 藉由一如申請專利範圍第 1 項的方法來保存微生物以低溫保存孢子；以及

從該低溫保存孢子所培養出的微生物獲得一多元不飽和脂肪酸或一包含有一多元不飽和脂肪酸作為組成性脂肪酸的化合物。

15 13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其包含在一不高於 40°C 的溫度下，將該低溫保存孢子解凍 30 分鐘或更短的時間。