

(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
2020 年 12 月 3 日 (03.12.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/238010 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12P 7/64 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2019/114911
- (22) 国际申请日: 2019 年 10 月 31 日 (31.10.2019)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201910442599.7 2019 年 5 月 25 日 (25.05.2019) CN
- (71) 申请人: 华南理工大学 (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。
- (72) 发明人: 娄文勇 (LOU, Wenyong); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 张林尚 (ZHANG, Linshang); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640

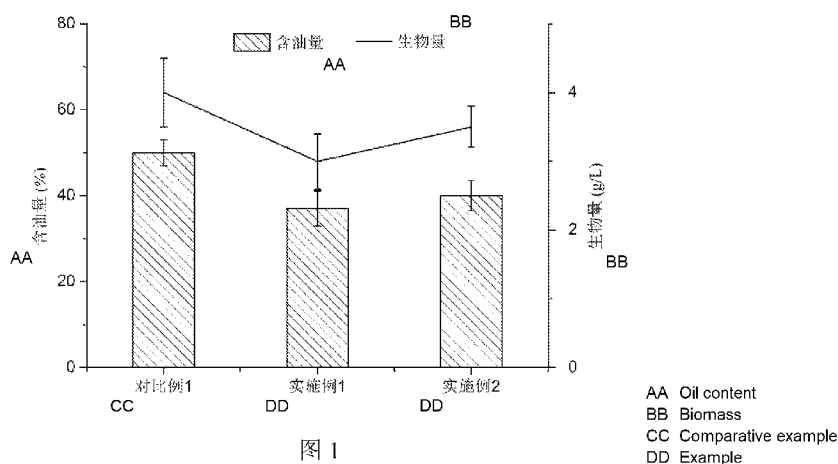
(CN)。 宗敏华 (ZONG, Minhua); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 倪子富 (NI, Zifu); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。 杨继国 (YANG, Jiguo); 中国广东省广州市天河区五山路 381 号, Guangdong 510640 (CN)。

(74) 代理人: 广州粤高专利商标代理有限公司 (YOGO PATENT & TRADEMARK AGENCY LIMITED COMPANY); 中国广东省广州市天河区体育西路中石化大厦 B 塔 4416, Guangdong 510620 (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING SPECIAL OIL OPO USING MICROBIAL FERMENTATION

(54) 发明名称: 一种使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法



(57) Abstract: Provided is a method for producing OPO using microbial fermentation. The method comprises the following steps: inoculating an activation medium with a microorganism, and carrying out shaker culturing to obtain an activated strain; adding organic matter to a basic medium to prepare an optimized medium; inoculating the optimized medium with the strain and carrying out shaker culturing to obtain a culture solution; centrifuging the culture solution, taking a precipitate and carrying out washing and freeze-drying, and adding a hydrochloric acid solution to obtain a mixture; and carrying out extraction on the mixture using an organic solvent, and removing the solvent to obtain OPO, wherein the microorganism is *Rhodococcus opacus*.

(57) 摘要: 使用微生物发酵生产 OPO 的方法, 包括如下步骤: 将微生物接种至活化培养基中摇床培养, 得到活化菌种; 将有机物加入基本培养基制成优化培养基; 菌种接种至优化培养基摇床培养, 得到培养液; 培养液离心, 取沉淀洗涤冻干, 加入盐酸溶液得混合物; 利用有机溶剂萃取混合物, 去除溶剂得 OPO, 其中所述微生物为浑浊红球菌。

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))。

一种使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法

技术领域

[0001] 本发明属于微生物领域，具体涉及一种使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法。

背景技术

[0002] OPO结构脂是婴幼儿配方奶粉的一线油脂（人乳脂替代品），具有易与胆酸钠结合、易于消化吸收、不形成高熔点皂、利于钙镁等金属离子的吸收等特点。OPO的制备方法有酶法、分提法和化学合成法。其中，酶法主要是利用1, 3-位专一性的脂肪酶，以棕榈硬脂为底物，添加油酸或者油酸乙酯或者高油酸油脂，进行酸解或者酯交换制备富含OPO油脂的一种方法。酶法制备OPO是目前工业操作的主流方法，但是该方法成本较高，酶的价格高，另外该方法还存在酰基位移的技术壁垒无法克服。CN109082447A公布了一种以高油酸花生油为油酸来源，通过酶法制备OPO的工艺，其特点是省去了油酸纯化的步骤，将花生油水解或者醇解制备出的油酸或者油酸乙酯直接与棕榈硬脂反应，反应产物再进行分子蒸馏纯化。该方法生产的OPO含量为46.35%-44.17%，完全可以达到GB 30604-2015的要求。CN105219811A公布了一种微波辅助酶法酸解制备OPO的方法，该方法的特点是反应中应用了微波技术，同时在原料中掺入了15%的藻油，所产OPO中含有少量DHA。CN108913725A公布了一种酶法酸解制备OPO方法，其特点是将电子束辐照应用到酶促反应中，电子束剂量为20 Gy，时间2 h，经过处理的酶促反应体系OPO得率提高至61.25%。

[0003] 分提法是利用含OPO的天然油脂（猪油）通过分提技术富集OPO的一种方法。分提法是一个纯物理操作过程，健康风险最小，但是分提工艺复杂、技术难度高，使用溶剂，安全风险大，而且原料仅限于猪油，无法满足宗教的要求，尚无法大规模工业化生产。CN103305332A公布了一种干法分提耦合溶剂分提富集猪油中OPO的方法。最终获得OPO含量大于40%油脂，其主要过程为60℃熔化油脂，迅速降温至28℃，再缓慢降温至16℃，维持10h，然后过滤得到液体组分和

固体组分。液体组分在与丙酮混合，由40°C迅速降温至5°C，并维持20h，真空抽滤得到的液油即为高OPO油脂。

[0004] 化学合成法容易得到高纯度的OPO，但是食品级原料很难获得，因此化学合成的方法只能在实验室中进行，无法真正工业化生产。CN107473963A公布了一种以1, 3-二氯丙醇、十六烷酸甲酯、油酸钠为底物，两步法制备OPO的过程。首先1, 3-二氯丙醇与十六烷酸甲酯在有机溶剂中加热回流制备1, 3-二氯-2-十六烷酸酯。反应的第二步，1, 3-二氯-2-十六烷酸酯在与油酸钠在氮气保护下，50-100°C，反应2-5h，制备的OPO纯度为96%。

发明概述

技术问题

问题的解决方案

技术解决方案

[0005] 为了克服现有技术存在的上述不足，本发明的目的是提供一种使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法。该方法只需要进行发酵、破碎、提油即可以得到高纯度的OPO油脂，工艺简单、成本低廉、工业化前景巨大。

[0006] 本发明的目的至少通过如下技术方案之一实现。

[0007] 本发明提供了一种利用红球菌属微生物发酵生产OPO的方法。所述红球菌属具体为浑浊红球菌（*Rhodococcus opacus* PD630）。发酵生产OPO的步骤为：1、菌种活化；2、在MSM培养基中进行培养，所述MSM培养基为无机盐培养基，其中碳源含有高含量的油酸酯和棕榈酸酯；3、培养结束后收集菌体；4、进行破碎菌体，提取油脂，所得到的油脂即为富含OPO的油脂。

[0008] 本发明提供的一种使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，包括如下步骤：

[0009] （1）菌种活化

[0010] 将微生物接种至活化培养基中，摇床培养处理，得到活化的菌种；

[0011] （2）配制优化培养基

[0012] 将有机物加入基本培养基中，混合均匀，灭菌处理，得到优化培养基；

[0013] （3）将步骤（1）所述活化的菌种接种到步骤（2）所述优化培养基中，摇床培养处理，得到培养液；

- [0014] (4) 将步骤(3)所述培养液进行离心处理, 取沉淀, 洗涤, 洗涤, 冷冻干燥得到冻干粉, 加入盐酸溶液, 得到混合物;
- [0015] (5) 将有机溶剂加入步骤(4)所述混合物中, 进行萃取处理, 去除溶剂得到油脂混合物, 所述油脂混合物中含有特种油脂OPO。
- [0016] 进一步地, 步骤(1)所述菌种包括浑浊红球菌; 所述活化培养基包括肉汤培养基及LB培养基。
- [0017] 进一步地, 步骤(1)所述微生物包括浑浊红球菌; 摇床培养处理的温度为20-40摄氏度, 摇床培养处理的转速为80-250 rpm, 进一步优化为120-200 rpm, 进一步优化为150-180 rpm; 摇床培养处理的时间为12-60 h, 进一步优化为18-48 h, 进一步优化为20-36 h。
- [0018] 进一步地, 步骤(2)所述有机物包括棕榈酸、油酸、棕榈酸酯、油酸酯、十六烷、十八烷、棕榈油、棕榈油的分提产物、高油酸甘油三酯以及这些有机物的混合物; 所述有机物的添加量为培养基质量的0.1-10% (w/w), 进一步优化为0.3-7%, 进一步优化为0.5-4%。
- [0019] 进一步地, 步骤(2)所述灭菌处理的方式包括高温高压灭菌(121摄氏度, 20 min)及中低压灭菌(115摄氏度, 15 min)。
- [0020] 进一步地, 步骤(2)所述基本培养基可以为MSM培养基, 培养基碳源中含有高比例的棕榈酸和油酸, 或者棕榈酸酯和油酸酯, 或者十六烷和油酸及油酸酯, 其中棕榈酰基和油酰基的比例(质量比)为1:1.4~1:3。
- [0021] 进一步地, 步骤(3)所述接种的接种量为优化培养基体积的0.1-10%(v/v), 进一步优化为0.2-6%, 进一步优化为0.5-3%。
- [0022] 进一步地, 步骤(3)所述摇床培养处理的温度为20-40摄氏度, 进一步优化为25-35摄氏度, 进一步优化为26-33摄氏度; 摇床培养处理的转速为80-250 rpm, 进一步优化为120-200 rpm, 进一步优化为150-180 rpm; 摇床培养处理的时间为48-216 h, 进一步优化为60-192 h, 进一步优化为72-144 h。
- [0023] 进一步地, 步骤(4)所述离心处理的转速为3000-12000 rpm, 进一步优化为4000-10000 rpm, 进一步优化为4500-8000 rpm; 离心处理的

时间为1-20 min, 进一步优化为2-15min, 进一步优化为3-10 min。

[0024] 进一步地, 步骤(4)所述洗涤为先用PBS缓冲液洗涤, 再用正己烷洗涤, 以便于去除残留在菌体上的脂溶性化合物。

[0025] 进一步地, 步骤(4)所述盐酸溶液的浓度为1-3mol/L, 所述冻干粉与盐酸溶液的质量体积比为0.1: 2-1: 2g/mL。

[0026] 进一步地, 步骤(5)所述有机溶剂包括正丙烷、丁烷、戊烷、己烷、庚烷、丙酮、三氯甲烷、二氯甲烷、乙醚、甲醇及二氧化碳。

[0027] 本发明提供一种使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法, 所述微生物可以为浑浊红球菌(*Rhodococcus opacus* PD630)。

[0028] 进一步地, 所述棕榈酸酯和油酸酯包括但不限于棕榈酸和油酸的甘一酯、甘二酯、甘三酯、聚甘油酯、甾醇酯及山梨醇酯等。

[0029] 进一步地, 步骤(2)所述优化培养基中的碳源包括能够为微生物生长提供的有机碳源和无机碳源, 所述优化培养基中的碳源包括但不限于葡萄糖、木糖、果糖、蔗糖、糊精、淀粉、纤维素、木质素、多糖等单糖、寡糖和高分子碳水化合物; 各种醇类, 比如甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、戊醇、己醇等醇类; 各种烃类, 比如丙烷、丁烷、戊烷、己烷、庚烷、辛烷、壬烷、癸烷、十一烷、十二烷、十三烷、十四烷、十五烷、十六烷、十七烷、十八烷、十九烷、二十烷等; 各种脂肪酸, 比如辛酸、癸酸、月桂酸、豆蔻酸、软脂酸、硬脂酸、油酸、亚油酸等; 各种油脂, 比如花生油、大豆油、菜籽油、玉米油、棕榈油、葵花籽油、芝麻油、牡丹花籽油、稻米油、山茶油、橄榄油、椰子油、亚麻籽油及藻油等。

[0030] 进一步地, 步骤(2)所述优化培养基包含碳源、氮源、磷酸盐、无机盐及水, 其中碳氮物质的量比 ≥ 10 , 进一步优化为 ≥ 20 , 进一步优化为 ≥ 30 。

发明的有益效果

有益效果

[0031] 与现有技术相比, 本发明具有如下优点和有益效果:

[0032] 本发明提供的使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法, 采用了微生物发酵技术, 是一种全新的技术; 其工艺简单, 成本低, 且OPO为菌体内生长, 更加安

全健康。

[0033]

对附图的简要说明

附图说明

[0034] 图1为实施例1、实施例2及对比例1测得的生物量和含油量柱状图；

[0035] 图2为实施例1油脂的脂肪酸组成的气相色谱图；

[0036] 图3为对比例2油脂的脂肪酸组成的气相色谱图；

[0037] 图4为实施例2油脂的脂肪酸组成的气相色谱图。

发明实施例

本发明的实施方式

[0038] 以下结合附图和实例对本发明的具体实施作进一步说明，但本发明的实施和保护不限于此。需指出的是，以下若有未特别详细说明之过程，均是本领域技术人员可参照现有技术实现或理解的。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，视为可以通过市售购买得到的常规产品。

[0039] 实验方法

[0040] (1) 菌种活化

[0041] 将红球菌接入LB培养基中，30℃，160 rpm培养24 h，活化菌种。活化得到的菌种为一级发酵菌种。

[0042] (2) MSM培养基配制

[0043] 参照下表1配制培养基（表1为MSM培养基的成分表），作为举例，培养基的体积为1升。

[0044] 表1

[]

[表1]

	单位	质量/L
葡萄糖	g	24
KH_2PO_4	g	1.5
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	g	9
NH_4Cl	g	1.0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	g	0.5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	mg	20
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	mg	2
$\text{FeNaEDTA} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	mg	5
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	mg	0.2
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	mg	0.1
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	mg	0.05
H_3BO_3	mg	0.3
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	mg	0.1
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	mg	0.2

[0045] (3) 菌的培养

[0046] 参照表1配制MSM培养基，得到的MSM培养基在121 °C条件下进行灭菌处理，灭菌处理时间为12 min；将培养基分装至250mL的锥形瓶中，将步骤（1）活化的菌种接种至250 mL锥形瓶中，接种量为1%(v/v)，在温度为30°C、转速为160 rpm的摇床中培养4天，然后采用离心的方法收菌，离心转速为6000 rpm，离心的时间为2min，得到菌体沉淀。

[0047] (4) 生物量测试方法

[0048] 将步骤（3）所述菌体沉淀，用0.1%（w/w）PBS缓冲液洗涤三次，除去菌体沉淀上的残留培养基，再用正己烷洗涤三次除去培养基中的脂溶性化合物；之

后冻干，得到冻干菌粉，称重，计算生物量。

[0049] (5) 含油量测定方法

[0050] 称取0.1g步骤(4)所述冻干菌粉，加入2 mL浓度为3 mol/L的HCl溶液，混合均匀，然后在80 °C条件下水浴30min，之后加入2 mL三氯甲烷进行萃取，萃取三次，合并三次萃取液，用氮气吹干萃取液中的三氯甲烷，得到油脂类混合物，称重计算含油量。

[0051] (6) 全样脂肪酸测定 (GB 5009.168-2016 食品安全国家标准)

[0052] 取步骤(5)所述油脂类混合物0.02g，将油脂类混合物加入2mL正己烷中溶解，搅拌均匀，然后在加入2mL浓度为0.5 mol/L氢氧化钠的甲醇溶液，在60°C条件下水浴20 min，完成甲酯化反应，取上清液（正己烷）用气相色谱法分析脂肪酸组成。气相色谱法的条件：色谱柱选用HP-5，柱温箱的温度为180°C，进样口的温度为190°C，检测器的温度为270°C。得出结果图，根据峰的保留时间判定脂肪酸种类。

[0053] (7) Sn-2位脂肪酸测定 (GB 5009.168-2016 食品安全国家标准)

[0054] 用薄层层析板将所述油脂类混合物展开，展开剂为正己烷：无水乙醚：冰乙酸=70: 30: 2 (v/v/v)。将甘油酯刮下，用正己烷萃取三次，得到纯甘油酯。将甘油酯装入15 mL离心管，加入tri-HCl盐酸，胆酸钠，CaCl₂和脂肪酶，然后水浴1 min，然后加入1 mL浓度为6 mol/L的盐酸溶液灭活脂肪酶，加入乙醚萃取脂质。将乙醚萃取物在薄层层析板上展开，将甘油酯部分刮下，进行甲酯化，进气相色谱分析脂肪酸组成。

[0055] 对比例1

[0056] (1) 菌种活化

[0057] 将微生物（浑浊红球菌）接种至活化培养基（LB培养基）中，摇床培养处理，摇床培养处理的温度为30摄氏度，摇床培养处理的转速为160rpm，摇床培养处理的时间为24h，得到活化的菌种；

[0058] (2) 配制MSM培养基

[0059] 按照表1配方配制MSM培养基，灭菌处理（高温高压灭菌），得到MSM培养基；

[0060] (3) 将步骤(1)所述活化的菌种接种到步骤(2)所述优化培养基中, 接种量为1% (v/v), 摇床培养处理, 摇床培养处理的温度为30摄氏度, 摇床培养处理的时间为96h, 摇床培养处理的转速为160 rpm, 得到培养液;

[0061] (4) 将步骤(3)所述培养液进行离心处理, 离心处理的速率为6000 rpm, 离心处理的时间为2 min, 取菌体沉淀, 洗涤, 将所述菌体沉淀, 用0.1% (w/w) PBS缓冲液洗涤三次, 除去菌体沉淀上的残留培养基, 再用正己烷洗涤三次除去残留培养基中的脂溶性化合物; 之后冻干, 得到冻干菌粉, 称重, 计算生物量;

[0062] (5) 称取0.1g步骤(4)所述冻干菌粉, 加入2 mL浓度为3 mol/L的HCl溶液, 混合均匀, 然后在80 °C条件下水浴30min, 之后加入2 mL三氯甲烷进行萃取, 萃取三次, 合并三次萃取液, 用氮气吹干萃取液中的三氯甲烷, 得到油脂类混合物, 称重计算含油量; 取所述油脂类混合物0.02g, 将油脂类混合物加入2mL正己烷中溶解, 搅拌均匀, 然后在加入2mL浓度为0.5 mol/L氢氧化钠的甲醇溶液, 在60°C条件下水浴20 min, 完成甲酯化反应, 取上清液(正己烷)用气相色谱法分析脂肪酸组成;

[0063] (6) 测试所述油脂混合物的sn-2位脂肪酸组成(根据GB 5009.168-2016 食品安全国家标准测定)。

[0064] 对比例2

[0065] 选取两种油脂, 棕榈硬脂(高棕榈酸含量的HPO)和高油酸葵花籽油(HOSFO), 按照1:2的比例(质量比)进行调配, 然后进行酯交换, 后测定全样脂肪酸组成和sn-2脂肪酸组成(根据GB 5009.168-2016 食品安全国家标准测定)。

[0066] 实施例1

[0067] 一种使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法, 包括如下步骤:

[0068] (1) 菌种活化

[0069] 将微生物(浑浊红球菌)接种至活化培养基(LB培养基)中, 摇床培养处理, 摇床培养处理的温度为30摄氏度, 摇床培养处理的转速为160rpm, 摇床培养处理的时间为24h, 得到活化的菌种;

[0070] (2) 配制优化培养基

- [0071] 按照表1配方配制MSM培养基，在配制的过程中将0.8 g油酸乙酯与0.4 g棕榈酸乙酯（油酸乙酯与棕榈酸乙酯的质量比为2:1）加入培养基中，混合均匀，灭菌处理（高温高压灭菌），得到优化培养基；
- [0072] （3）将步骤（1）所述活化的菌种接种到步骤（2）所述优化培养基中，接种量为1% (v/v)，摇床培养处理，摇床培养处理的温度为30摄氏度，摇床培养处理的时间为96h，摇床培养处理的转速为160 rpm，得到培养液；
- [0073] （4）将步骤（3）所述培养液进行离心处理，离心处理的速率为6000 rpm，离心处理的时间为5 min，得到菌体沉淀，将所述菌体沉淀，用0.1% (w/w) PBS缓冲液洗涤三次，除去菌体沉淀上的残留培养基，再用正己烷洗涤三次除去残留培养基中的脂溶性化合物；之后冻干，得到冻干菌粉，称重，计算生物量；
- [0074] （5）称取0.1g步骤（4）所述冻干菌粉，加入2 mL 浓度为3 mol/L的HCl溶液，混合均匀，然后在80 °C条件下水浴30min，之后加入2 mL三氯甲烷进行萃取，萃取三次，合并三次萃取液，用氮气吹干萃取液中的三氯甲烷，得到油脂类混合物（所述油脂混合物中含有特种油脂OPO）；
- [0075] （6）测试步骤（5）所述油脂混合物的全样脂肪酸组成、sn-2位脂肪酸组成、含油量（根据GB 5009.168-2016 食品安全国家标准测定）。

[0076] 实施例2

[0077] 一种使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，包括如下步骤：

[0078] （1）菌种活化

[0079] 将微生物（浑浊红球菌）接种至活化培养基（LB培养基）中，摇床培养处理，摇床培养处理的温度为30摄氏度，摇床培养处理的转速为160rpm，摇床培养处理的时间为24h，得到活化的菌种；

[0080] （2）配制优化培养基

[0081] 按照表1配方配制MSM培养基，在配制的过程中将0.4 g HPO与0.8 g HOSFO（HPO与HOSFO的质量比为1:2）加入培养基中，混合均匀，灭菌处理（高温高压灭菌），得到优化培养基；

[0082] （3）将步骤（1）所述活化的菌种接种到步骤（2）所述优化培养基中，接种量为1% (v/v)，摇床培养处理，摇床培养处理的温度为30摄氏度，摇床培养处理

的时间为96h，摇床培养处理的转速为160 rpm，得到培养液；

[0083] (4) 将步骤(3)所述培养液进行离心处理，离心处理的速率为6000 rpm，离心处理的时间为5 min，取沉淀，得到菌体沉淀，将所述菌体沉淀，用0.1% (w/w) PBS缓冲液洗涤三次，除去菌体沉淀上的残留培养基，再用正己烷洗涤三次除去残留培养基中的脂溶性化合物；之后冻干，得到冻干菌粉，称重，计算生物量；

[0084] (5) 称取0.1g步骤(4)所述冻干菌粉，加入2 mL浓度为3 mol/L的HCl溶液，混合均匀，然后在80 °C条件下水浴30min，之后加入2 mL三氯甲烷进行萃取，萃取三次，合并三次萃取液，用氮气吹干萃取液中的三氯甲烷，得到油脂类混合物（所述油脂混合物中含有特种油脂OPO）；

[0085] (6) 测试步骤(5)所述油脂混合物的全样脂肪酸组成、sn-2位脂肪酸组成、含油量（根据GB 5009.168-2016 食品安全国家标准测定）。

[0086] 实施例3

[0087] 一种使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，包括如下步骤：

[0088] (1) 菌种活化

[0089] 将微生物（浑浊红球菌）接种至活化培养基（LB培养基）中，摇床培养处理，摇床培养处理的温度为20摄氏度，摇床培养处理的转速为250rpm，摇床培养处理的时间为12h，得到活化的菌种；

[0090] (2) 配制优化培养基

[0091] 按照表1配方配制MSM培养基，在配制的过程中将1.6 g油酸乙酯与0.8 g棕榈酸乙酯（油酸乙酯与棕榈酸乙酯的质量比为1:2）加入培养基中，混合均匀，灭菌处理（高温高压灭菌），得到优化培养基；

[0092] (3) 将步骤(1)所述活化的菌种接种到步骤(2)所述优化培养基中，接种量为10% (v/v)，摇床培养处理，摇床培养处理的温度为40摄氏度，摇床培养处理的时间为216h，摇床培养处理的转速为80 rpm，得到培养液；

[0093] (4) 将步骤(3)所述培养液进行离心处理，离心处理的速率为12000 rpm，离心处理的时间为1 min，得到菌体沉淀，将所述菌体沉淀，用0.1% (w/w) PBS缓冲液洗涤三次，除去菌体沉淀上的残留培养基，再用正己烷洗涤

三次除去残留培养基中的脂溶性化合物；之后冻干，得到冻干菌粉，称重，计算生物量；

[0094] (5) 称取0.5g步骤(4)所述冻干菌粉，加入2 mL浓度为1 mol/L的HCl溶液，混合均匀，然后在80 °C条件下水浴30min，之后加入2 mL三氯甲烷进行萃取，萃取三次，合并三次萃取液，用氮气吹干萃取液中的三氯甲烷，得到油脂类混合物（所述油脂混合物中含有特种油脂OPO）；

[0095] (6) 测试步骤(5)所述油脂混合物的全样脂肪酸组成、sn-2位脂肪酸组成、含油量（根据GB 5009.168-2016 食品安全国家标准测定）。

[0096] 实施例4

[0097] 一种使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，包括如下步骤：

[0098] (1) 菌种活化

[0099] 将微生物（浑浊红球菌）接种至活化培养基（LB培养基）中，摇床培养处理，摇床培养处理的温度为40摄氏度，摇床培养处理的转速为80rpm，摇床培养处理的时间为60h，得到活化的菌种；

[0100] (2) 配制优化培养基

[0101] 按照表1配方配制MSM培养基，在配制的过程中将0.8 g HPO与1.6 g HOSFO（HPO:HOSFO质量比为1:2）加入培养基中，混合均匀，灭菌处理（高温高压灭菌），得到优化培养基；

[0102] (3) 将步骤(1)所述活化的菌种接种到步骤(2)所述优化培养基中，接种量为0.1% (v/v)，摇床培养处理，摇床培养处理的温度为20摄氏度，摇床培养处理的时间为48h，摇床培养处理的转速为250 rpm，得到培养液；

[0103] (4) 将步骤(3)所述培养液进行离心处理，离心处理的速率为3000 rpm，离心处理的时间为20 min，得到菌体沉淀，将所述菌体沉淀，用0.1% (w/w) PBS缓冲液洗涤三次，除去菌体沉淀上的残留培养基，再用正己烷洗涤三次除去残留培养基中的脂溶性化合物；之后冻干，得到冻干菌粉，称重，计算生物量；

[0104] (5) 称取2g步骤(4)所述冻干菌粉，加入1 mL浓度为2 mol/L的HCl溶液，混合均匀，然后在80 °C条件下水浴30min，之后加入2 mL三氯甲烷进行萃取，萃取三次，合并三次萃取液，用氮气吹干萃取液中的三氯甲烷，得到油脂类混合物

(所述油脂混合物中含有特种油脂OPO)；

[0105] (6) 测试步骤 (5) 所述油脂混合物的全样脂肪酸组成、sn-2位脂肪酸组成、含油量 (根据GB 5009.168-2016 食品安全国家标准测定)。

[0106] 结果分析

[0107] 测试结果见于下表2、图1、图2、图3及图4，下表2为油脂样品主要脂肪酸组成数据表(%)。

[0108] 表2

[0109]

脂肪酸	实施例1		实施例2		对比例1		对比例2	
	全样	SN-2	全样	SN-2	全样	SN-2	全样	SN-2
C14:0	2.39	5.40	2.40	4.96	1.77	11.1	0.26	0.31
C16:0	29.83	74.54	28.27	65.67	28.94	59.0	30.41	33.72
C16:1	4.07	4.58	5.48	12.38	7.01	0.01		
C18:0		0.95	1.33	2.02	5.53	2.1	3.21	3.18
C18:1	55.78	5.69	60.70	11.46	20.62	0.5	61.49	59.25
C18:2	3.01	0.68	1.81	1.06	1.49		4.04	3.53

[0110] 由表2可知，对比例1中油脂脂肪酸组成油酸含量较低，且棕榈酸与油酸的比例为1:0.7。对比例2中全样脂肪酸与sn-2脂肪酸一致，说明脂肪酸在甘油骨架上为全随机分布。实施例1中，全样脂肪酸组成棕榈酸与油酸比例为1:1.87，sn-2脂肪酸中棕榈酸含量为74.54%，说明甘三酯为OPO。实施例2中，全样脂肪酸棕榈酸与油酸比例为1: 2.15，sn-2脂肪酸棕榈酸含量为65.67%，说明甘三脂为OPO。

[0111] 实施例3与实施例4的效果与实施例1相似，可以参照图1、图2、图4与表2。

[0112] 以上实施例仅为本发明较优的实施方式，仅用于解释本发明，而非限制本发明，本领域技术人员在未脱离本发明精神实质下所作的改变、替换、修饰等均应属于本发明的保护范围。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，其特征在于，包括如下步骤：
- (1) 将微生物接种至活化培养基中，摇床培养处理，得到活化的菌种；
 - (2) 将有机物加入基本培养基中，混合均匀，灭菌处理，得到优化培养基；
 - (3) 将步骤（1）所述活化的菌种接种到步骤（2）所述优化培养基中，摇床培养处理，得到培养液；
 - (4) 将步骤（3）所述培养液进行离心处理，取沉淀，洗涤，冷冻干燥得到冻干粉，加入盐酸溶液，混合均匀得到混合物；
 - (5) 将有机溶剂加入步骤（4）所述混合物中，进行萃取处理，去除溶剂得到所述特种油脂OPO。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述的使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，其特征在于，步骤（1）所述菌种包括浑浊红球菌；所述活化培养基包括肉汤培养基及LB培养基。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述的使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，其特征在于，步骤（1）所述微生物包括浑浊红球菌；摇床培养处理的温度为20-40摄氏度，摇床培养处理的转速为80-250 rpm，摇床培养处理的时间为12-60 h。
- [权利要求 4] 根据权利要求1所述的使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，其特征在于，步骤（2）所述有机物包括棕榈酸、油酸、棕榈酸酯、油酸酯、十六烷、十八烷、棕榈油、棕榈油的分提产物及高油酸甘油三酯；所述有机物的添加量为基本培养基质量的0.1-10%；所述基本培养基包括MSM培养基。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述的使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，其特征在于，步骤（2）所述灭菌处理的方式包括高温高压灭菌及中低压灭菌。

- [权利要求 6] 根据权利要求1所述的使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，其特征在于，步骤（3）所述接种的接种量为优化培养基体积的0.1-10%。
- [权利要求 7] 根据权利要求1所述的使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，其特征在于，步骤（3）所述摇床培养处理的温度为20-40摄氏度，摇床培养处理的转速为80-250 rpm，摇床培养处理的时间为48-216 h。
- [权利要求 8] 根据权利要求1所述的使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，其特征在于，步骤（4）所述离心处理的转速为3000-12000rpm，离心处理的时间为1-20min。
- [权利要求 9] 根据权利要求1所述的使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，其特征在于，步骤（4）所述盐酸溶液的浓度为1-3mol/L，所述冻干粉与盐酸溶液的质量体积比为0.1： 2-1： 2g/mL。
- [权利要求 10] 根据权利要求1所述的使用微生物发酵生产特种油脂OPO的方法，其特征在于，步骤（5）所述有机溶剂包括正丙烷、丁烷、戊烷、己烷、庚烷、丙酮、三氯甲烷、二氯甲烷、乙醚、甲醇及二氧化碳。

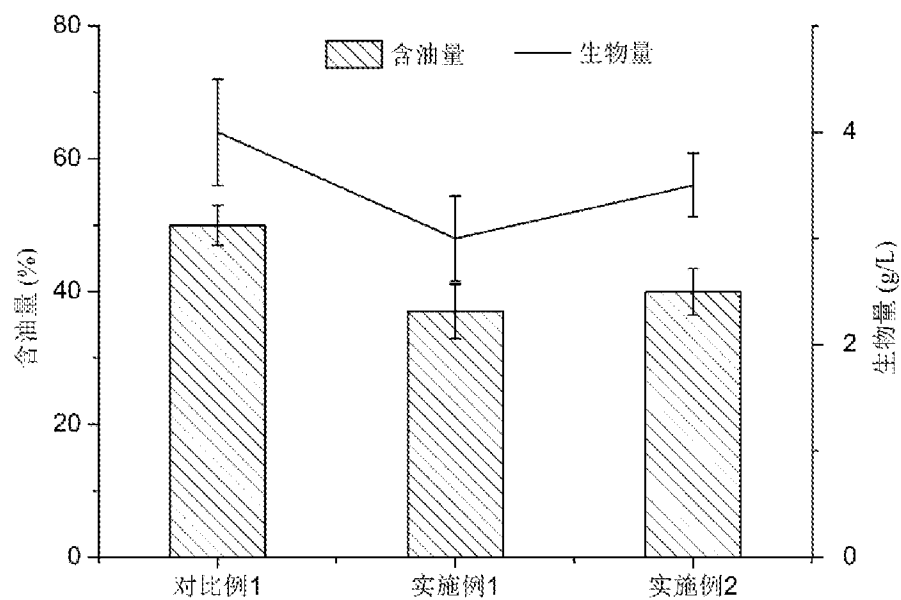


图 1

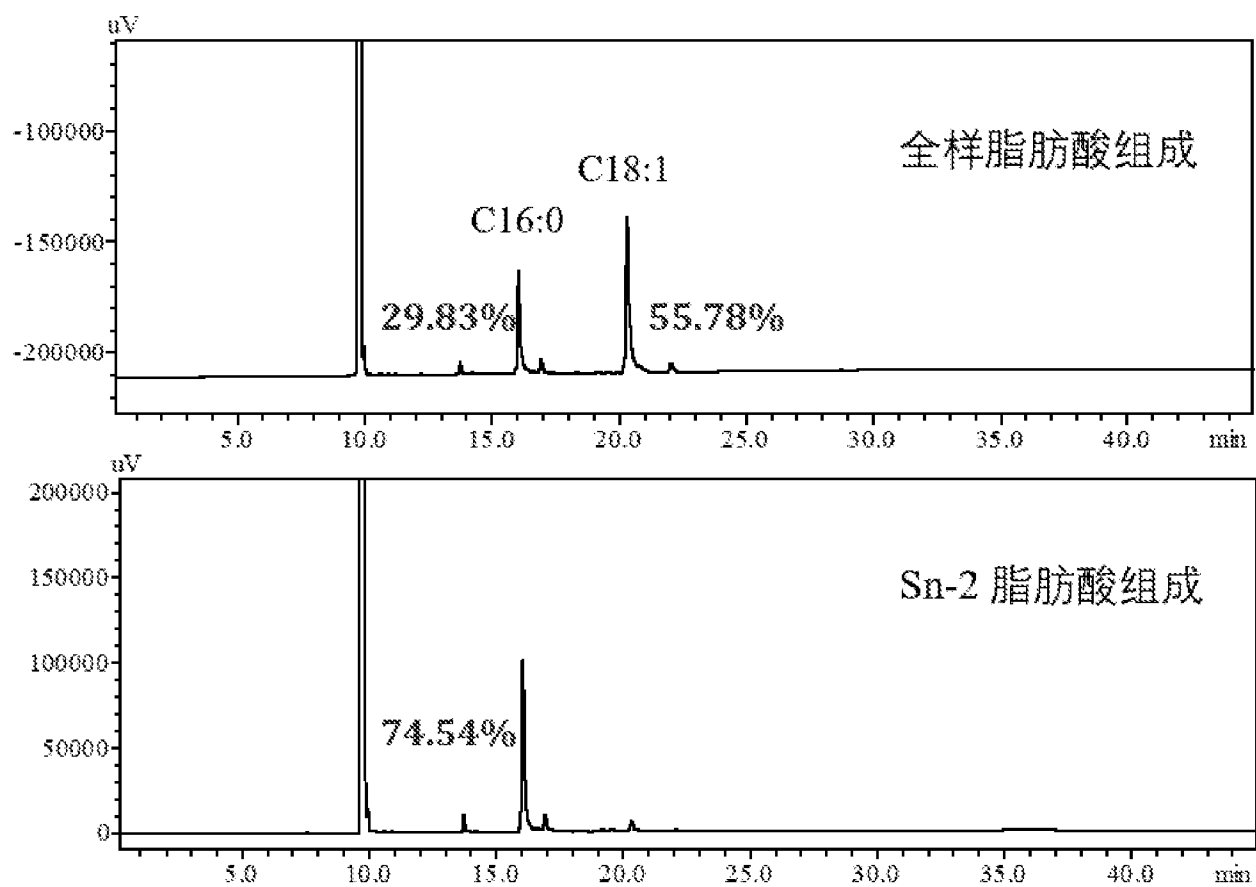


图 2

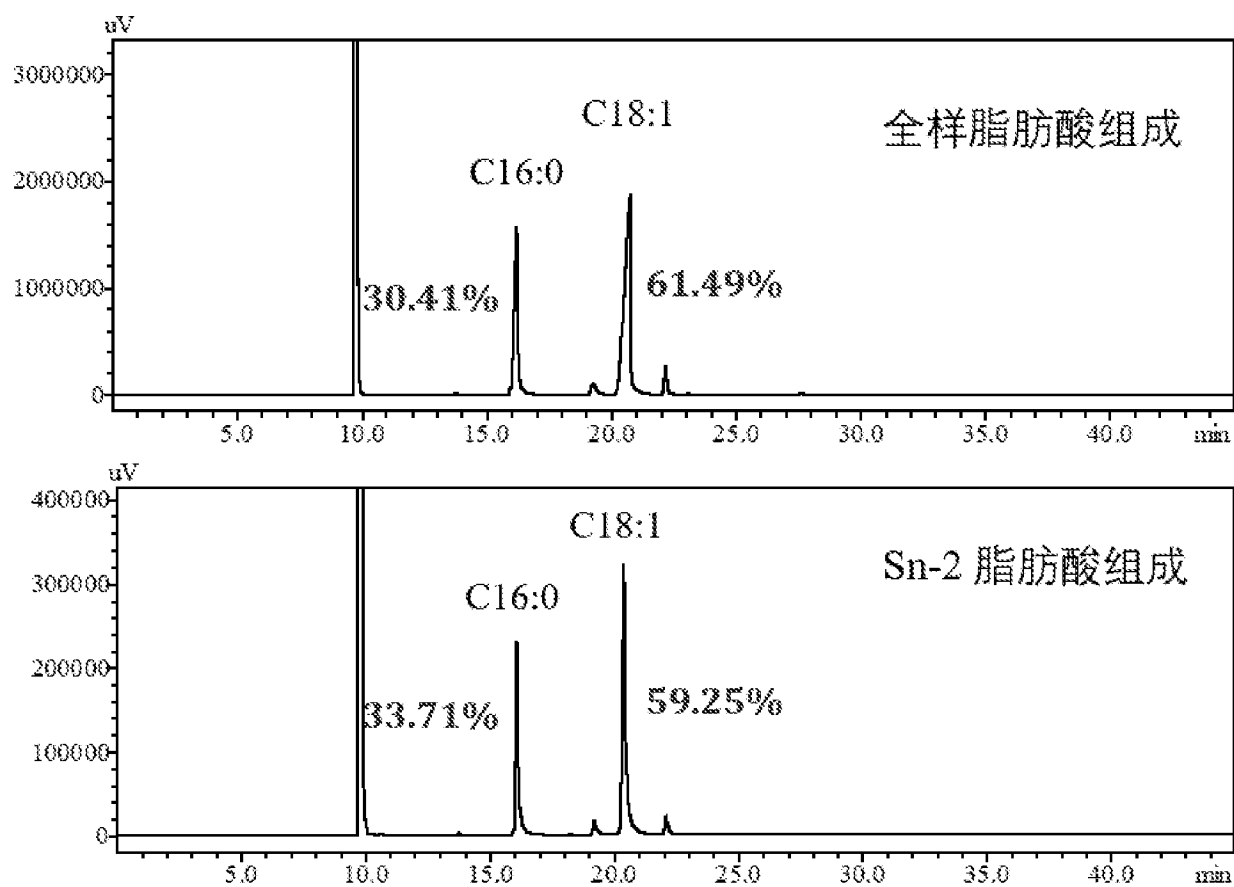


图 3

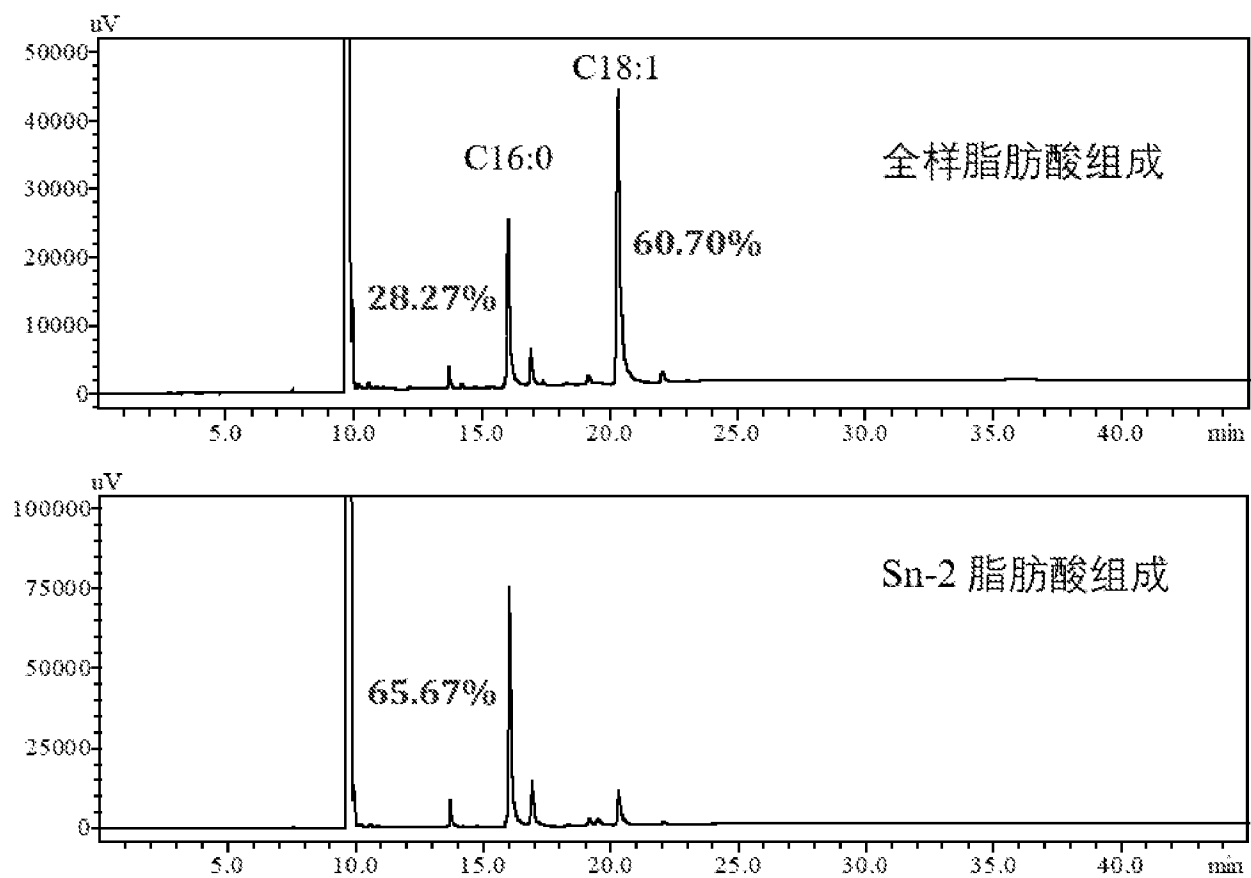


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/114911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/64(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n

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)

C12P, C12R

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)

CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, VEN, CJFD, CNKI, 百度学术, GOOGLE SCHOLAR, 超星读秀: OPO, 二油酸棕榈酸甘油三酯, 结构油脂, 结构脂, 微生物油脂, 浑浊红球菌, 红球菌, 微生物, 发酵, 培养, 萃取, dioleoyl palmitoyl triglyceride, structural grease, microbial oil, Rhodococcus opacus, Rhodococcus, microbe, microorganism, ferment, culture, extract.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 110184311 A (SOUTH CHINA UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 30 August 2019 (2019-08-30) claims 1-10	1-10
A	CN 104561145 A (CHANGZHOU JUNSHI BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 29 April 2015 (2015-04-29) entire document	1-10
A	CN 105441492 A (COFCO CORP; COFCO NUTRITION & HEALTH RES INST CO., LTD. et al.) 30 March 2016 (2016-03-30) entire document	1-10
A	李翔等 (LI, Xiang et al.). "微生物油脂产业化应用研究进展 (The research progress of Microbial oil industrialization)" <i>China Oils and Fats</i> , Vol. 35, No. 11, 30 November 2010 (2010-11-30), pp. 10-14	1-10
A	相光明等 (XIANG, Guangming et al.). "微生物油脂研究进展 (Research Progress on Microbial Lipids)" <i>粮油加工 (Cereals and Oils Processing)</i> , No. 9, 30 September 2008 (2008-09-30), pp. 56-60	1-10

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"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

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 January 2020

Date of mailing of the international search report

06 February 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/114911

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	110184311	A	30 August 2019	None	
CN	104561145	A	29 April 2015	None	
CN	105441492	A	30 March 2016	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/114911

A. 主题的分类

C12P 7/64(2006.01)i; C12R 1/01(2006.01)n

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12P, C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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))

CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, VEN, CJFD, CNKI, 百度学术, GOOGLE SCHOLAR, 超星读秀: OP0, 二油酸棕榈酸甘油三酯, 结构油脂, 结构脂, 微生物油脂, 浑浊红球菌, 红球菌, 微生物, 发酵, 培养, 萃取, dioleoyl palmitoyl triglyceride, structural grease, microbial oil, Rhodococcus opacus, Rhodococcus, microbe, microorganism, ferment, culture, extract.

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 110184311 A (华南理工大学) 2019年 8月 30日 (2019 - 08 - 30) 权利要求1-10	1-10
A	CN 104561145 A (常州骏石生物技术有限公司) 2015年 4月 29日 (2015 - 04 - 29) 全文	1-10
A	CN 105441492 A (中粮营养健康研究院有限公司, 等) 2016年 3月 30日 (2016 - 03 - 30) 全文	1-10
A	李翔等. “微生物油脂产业化应用研究进展” 中国油脂, 第35卷, 第11期, 2010年 11月 30日 (2010 - 11 - 30), 第10-14页	1-10
A	相光明等. “微生物油脂研究进展” 粮油加工, 第9期, 2008年 9月 30日 (2008 - 09 - 30), 第56-60页	1-10

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“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)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“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

“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

“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

“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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 1月 15日

国际检索报告邮寄日期

2020年 2月 6日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

孔佳音

电话号码 86-(010)-62411058

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/114911

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	110184311	A	2019年 8月 30日	无	
CN	104561145	A	2015年 4月 29日	无	
CN	105441492	A	2016年 3月 30日	无	