



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106029624 B

(45) 授权公告日 2021.12.07

(21) 申请号 201480075852.5

(22) 申请日 2014.12.19

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106029624 A

(43) 申请公布日 2016.10.12

(30) 优先权数据  
61/919,026 2013.12.20 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2016.08.18

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2014/071467 2014.12.19

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02015/095694 EN 2015.06.25

(73) 专利权人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司  
地址 荷兰海尔伦

(72) 发明人 B·特里普利特 M·尼达姆  
N·塔巴耶内贾德 G·尚克  
S·K·L·马修斯 J·霍根  
M·巴克 N·F·莱宁格尔

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
代理人 封新琴

(51) Int.Cl.  
C07C 51/42 (2006.01)  
C07C 53/00 (2006.01)  
C07C 57/00 (2006.01)

(56) 对比文件  
CN 101610824 A, 2009.12.23  
CN 103124791 A, 2013.05.29  
CN 103124791 A, 2013.05.29  
刘光诚. 几种破乳方法.《日用化学工业》  
.1983, (第2期), 第49-50页.

审查员 崔艳

权利要求书2页 说明书24页

### (54) 发明名称

用于从微生物细胞获得微生物油的方法

### (57) 摘要

本发明公开了用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFA)的微生物油的方法,其通过裂解细胞以形成裂解细胞组合物然后从所述裂解细胞组合物回收所述油。本发明还公开了包含一种或多种PUFA的微生物油,其通过至少一个本文所述的方法自微生物细胞回收。

1. 一种用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸的微生物油的方法,其中该方法包括:

- (a) 裂解包含所述微生物油的细胞以形成裂解细胞组合物;
- (b) 将所述裂解细胞组合物去乳化以形成去乳化的裂解细胞组合物;
- (c) 从所述去乳化的裂解细胞组合物分离所述油;以及
- (d) 回收所述油;

其中 (b) 包括 (i) 低剪切搅拌, (ii) 轴向流搅拌, 或 (iii) 其组合, 并且其中所述 (i) 低剪切搅拌, (ii) 轴向流搅拌, 或 (iii) 其组合是通过选自以下的叶轮提供的: 液翼叶轮 (fluid foil impeller)、水翼叶轮 (hydrofoil impeller)、斜叶片涡轮 (pitch-blade turbine) 及其组合;

其中 (a) 通过降低细胞的pH至2.5或更低来裂解细胞;

其中 (b) 去乳化通过降低所述裂解细胞组合物的pH至2.5或更低来进行;

其中将 (a) 和 (b) 组合在一起以形成一步裂解及去乳化步骤;且

其中裂解不包括酶的使用。

2. 权利要求1的方法, 其中 (a) 或 (b) 中至少一个还包括将所述细胞或组合物加热到至少60°C。

3. 权利要求1或2的方法, 其中 (a) 或 (b) 中至少一个还包括将所述细胞或组合物加热到60°C至100°C。

4. 权利要求1或2的方法, 其中 (b) 还包括以按重量计所述裂解细胞组合物的0.05%至20%的量添加盐。

5. 权利要求1或2的方法, 其中 (a) 还包括搅拌所述细胞。

6. 权利要求1或2的方法, 其中 (b) 还包括添加乳化剂至所述裂解细胞组合物。

7. 权利要求1或2的方法, 其中 (a) 的细胞是未经洗涤的。

8. 权利要求1或2的方法, 其中 (a) 的细胞包含于发酵液中。

9. 权利要求1或2的方法, 其中 (c) 包括将去乳化的裂解细胞组合物离心。

10. 权利要求1或2的方法, 其中所述多不饱和脂肪酸选自  $\omega$ -3脂肪酸,  $\omega$ -6脂肪酸, 及其混合物。

11. 权利要求1或2的方法, 其中所述多不饱和脂肪酸选自二十二碳六烯酸 (DHA)、二十碳五烯酸 (EPA)、二十二碳五烯酸 (DPA)、花生四烯酸 (ARA)、 $\gamma$ -亚麻酸 (GLA)、二高- $\gamma$ -亚麻酸 (DGLA)、十八碳四烯酸 (stearidonic acid, SDA) 及其混合物。

12. 权利要求11的方法, 其中所述多不饱和脂肪酸是二十二碳六烯酸 (DHA)。

13. 权利要求11的方法, 其中所述多不饱和脂肪酸是花生四烯酸 (ARA)。

14. 权利要求1或2的方法, 其中所述微生物细胞是藻类、酵母、真菌、原生生物, 或细菌细胞。

15. 权利要求1或2的方法, 其中所述微生物细胞来自被孢霉属 (Mortierella)、隐甲藻属 (Cryptothecodinium), 或破囊壶菌目 (Thraustochytriales)。

16. 权利要求14的方法, 其中所述微生物细胞来自破囊壶菌目。

17. 权利要求15的方法, 其中所述微生物细胞来自破囊壶菌属 (Thraustochytrium)、裂殖壶菌属 (Schizochytrium), 或其混合物。

18. 权利要求14的方法,其中所述微生物细胞来自高山被孢霉(*Mortierella Alpina*)。
19. 权利要求1或2的方法,其中所述裂解细胞组合物包含液体、细胞碎片以及微生物油。
20. 权利要求1或2的方法,其中不使用有机溶剂而从所述细胞获得所述油。
21. 权利要求1或2的方法,其中所述去乳化的裂解细胞组合物的平均粒度是至少10微米。
22. 权利要求6的方法,其中所述乳化剂是离子性乳化剂。
23. 权利要求4的方法,其中所述盐选自下组:碱金属盐、碱土金属盐、硫酸盐,及其组合。
24. 权利要求1的方法,其中(d)的油是粗制油。
25. 权利要求24的方法,其中(d)还包括精制所述粗制油以获得精制油。
26. 权利要求1或2的方法,其中所述油包含按重量计至少30%的花生四烯酸。
27. 权利要求1或2的方法,其中所述油包含按重量计至少30%的二十二碳六烯酸。
28. 权利要求1或2的方法,其中所述油具有低于50的茴香胺值。
29. 权利要求1或2的方法,其中所述油具有8ppm或更低的磷含量。
30. 权利要求1或2的方法,其中所述油具有低于5meq/kg的过氧化物值。
31. 权利要求1的方法,其中(b)还包括将所述裂解细胞组合物的pH降低到0.5至2.5。
32. 权利要求1的方法,其中(b)还包括以按重量计所述裂解细胞组合物的0.5%至20%的量添加酸。
33. 权利要求1或2的方法,其中(c)还包括提升所述去乳化的裂解细胞组合物的pH。
34. 权利要求5的方法,其中(a)还包括用径向流式叶轮搅拌细胞。
35. 权利要求34的方法,其中所述径向流式叶轮是拉什顿叶轮(Rushton impeller)。
36. 权利要求1的方法,其中所述(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合是通过水翼叶轮提供的。
37. 权利要求1的方法,其中(a)进一步包括用径向流式叶轮搅拌所述细胞。
38. 权利要求37的方法,其中所述径向流式叶轮是拉什顿叶轮。

## 用于从微生物细胞获得微生物油的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求申请日为2013年12月20日的美国临时申请No.61/919,026的申请日权益,其公开内容在此通过提述并入。

[0003] 发明背景

[0004] 本文公开了用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFA)的微生物油的方法,所述方法通过裂解所述细胞以形成裂解细胞组合物,然后从所述裂解细胞组合物回收该油。本文还公开了包含一种或多种PUFA的微生物油,所述PUFA是通过本发明所述的至少一种方法从微生物细胞回收的。

[0005] 含有一种或多种PUFA的微生物油是由微生物所生产,例如,举例而言,藻类及真菌类。

[0006] 从微生物细胞获得含PUFA的油的通常方法涉及:使能够生产所需的油的微生物在发酵器、池或生物反应器中生长以产生微生物细胞生物质(biomass);从所述生物质生长的发酵培养基分离该生物质;干燥该微生物细胞生物质,使用不与水互溶的有机溶剂(例如己烷)从该干燥的细胞提取所述油;以及从所述油去除该有机溶剂(例如己烷)。此方法还可以涉及用水稀释含有所述细胞生物质的该发酵培养基,然后进行离心以从经稀释的发酵培养基分离所述生物质。

[0007] 从微生物细胞获得含PUFA的油的另一种方法涉及:使能够生产所需的油的微生物在发酵器、池或生物反应器中生长以产生微生物细胞生物质;通过使用机械力(例如均质化)、酶处理、或化学处理破坏细胞壁,从而将所述含PUFA的油释放至该细胞生长的发酵培养基中;以及用可与水混溶的有机溶剂(例如异丙醇)从所得的含有含PUFA的油、细胞碎片和液体的组合物回收该油。可从该组合物机械地分离所述油,并且必须从所述油和水性生物质废物流二者去除醇。

[0008] 从微生物细胞获得含PUFA的油的上述任一项方法的工业规模利用需要使用大量的挥发性且可燃的有机溶剂,这产生了危险的操作条件且需要使用昂贵的防爆设备。此外,使用有机溶剂会产生有机溶剂废物流,其需要执行昂贵的溶剂回收工艺以解决对于挥发性有机化合物(VOC)排放的严格环境限制,这又导致需要更多的人力以及昂贵的设备。

[0009] 并且,上述方法中使用热来干燥细胞和/或从回收的油去除溶剂可降解含PUFA的油且增加能源的使用,这可进一步增加加工成本。当含PUFA的油暴露于氧时(如当微生物细胞壁的完整性被破坏时)和/或微生物细胞暴露于热时,发生降解。

[0010] 用于从微生物细胞获得含PUFA的油的无溶剂方法涉及:使能够生产所需的油的微生物在发酵器、池或生物反应器中生长以产生微生物细胞生物质;通过使用机械力(例如均质化)、酶处理、或化学处理破坏细胞壁而将所述含PUFA的油释放至该细胞生长的发酵培养基中;以及通过提升pH、添加盐、加热,和/或搅拌所得的组合物而从所得的组合物(其包含含有PUFA的油、细胞碎片和液体)回收粗制油。然而,此种从细胞获得含PUFA的油的无溶剂方法可需要长的油回收时间、大量的盐,和/或许多步骤,其都能增加加工成本。

[0011] 结果,仍然需要一种用于从微生物细胞获得高质量的含PUFA的油的方法,其不使

用挥发性有机溶剂、可以使用容易得到的设备进行、需要最小数目的步骤、具有更短的油回收时间,并且能提供高质量的含PUFA的油的高产量/收率(yield)。

[0012] 本文公开了用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFA)的微生物油的方法,其包括(a)裂解包含所述微生物油的细胞以形成裂解细胞组合物;(b)将所述裂解细胞组合物去乳化(包括(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合)以形成去乳化的裂解细胞组合物;(c)从所述去乳化的裂解细胞组合物分离该油;以及(d)回收该油。

[0013] 本文公开了用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFA)的微生物油的方法,其包括(a)裂解包含所述微生物油的细胞以形成裂解细胞组合物;(b)将所述裂解细胞组合物去乳化(包括(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合以及碱)以形成去乳化的裂解细胞组合物;(c)从所述去乳化的裂解细胞组合物分离所述油;以及(d)回收所述油。

[0014] 本文公开了用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFA)的微生物油的方法,其包括(a)裂解包含所述微生物油的细胞以形成裂解细胞组合物;(b)将所述裂解细胞组合物去乳化(包括(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合)以形成去乳化的裂解细胞组合物;(c)从所述去乳化的裂解细胞组合物分离所述油;以及(d)回收所述油,其中(a)或(b)中至少一个还包括将所述组合物加热到至少60℃的温度。

[0015] 本文公开了用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFA)的微生物油的方法,其包括(a)裂解包含所述微生物油的细胞以形成裂解细胞组合物;(b)将所述裂解细胞组合物去乳化(包括(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合以及碱)以形成去乳化的裂解细胞组合物;(c)从所述去乳化的裂解细胞组合物分离所述油;以及(d)回收所述油,其中(a)或(b)中至少一个还包括将所述组合物加热到至少60℃的温度。

[0016] 本文公开了用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFA)的微生物油的方法,其包括(a)裂解包含所述微生物油的细胞以形成裂解细胞组合物;(b)将所述裂解细胞组合物去乳化(包括(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合以及将裂解细胞组合物的pH提升至8或更高)以形成去乳化的裂解细胞组合物;(c)从所述去乳化的裂解细胞组合物分离所述油;以及(d)回收所述油。

[0017] 本文公开了用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFA)的微生物油的方法,其包括(a)裂解包含所述微生物油的细胞以形成裂解细胞组合物;(b)将所述裂解细胞组合物去乳化(包括(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合以及添加至少一种酶)以形成去乳化的裂解细胞组合物;(c)从所述去乳化的裂解细胞组合物分离所述油;以及(d)回收所述油。

[0018] 本文公开了用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFA)的微生物油的方法,其包括(a)裂解包含所述微生物油的细胞以形成裂解细胞组合物;(b)将所述裂解细胞组合物去乳化(包括(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合以及将裂解细胞组合物的pH降至6.5或更低)以形成去乳化的裂解细胞组合物;(c)从所述去乳化的裂解细胞组合物分离所述油;以及(d)回收所述油。

[0019] 本文公开了用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸

(PUFA)的微生物油的方法,其包括(a)裂解包含所述微生物油的细胞以形成裂解细胞组合物;(b)将所述裂解细胞组合物去乳化以形成去乳化的裂解细胞组合物;(c)从所述去乳化的裂解细胞组合物分离所述油;以及(d)回收所述油,其中将(a)和(b)组合在一起以形成一步裂解及去乳化步骤,所述步骤包括(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合。

[0020] 本文公开了用于从一个或多个微生物细胞获得包含一种或多种多不饱和脂肪酸(PUFA)的微生物油的方法,其包括(a)用(i)适合形成去乳化的裂解细胞组合物的酶,(ii)适合形成去乳化的裂解细胞组合物的pH,或(iii)其组合裂解包含所述微生物油的细胞以形成去乳化的裂解细胞组合物;(b)从所述去乳化的裂解细胞组合物分离所述油;以及(c)回收所述油,其中所述去乳化的裂解细胞组合物在(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合条件下的所述裂解过程中获得。

[0021] 本发明公开了通过本文所述任一方法获得的微生物油。

[0022] 本领域普通技术人员在阅读以下详细说明后,会更容易了解本发明的特征和优点。应该了解的是,出于更清楚的原因,上文和下文的分开的实施方案的语境中所述的本发明的某些特征也可以组合以形成其次级组合(sub-combinations)。

[0023] 本文作为示例鉴定的实施方案意欲为说明性的而非限制性的。

[0024] 术语“约”意欲获取所述数字以上和以下的变动,其可以实现与所述数字基本相同的结果。

[0025] 基于碳链的长度和饱和度特征来对脂肪酸进行分类。微生物油中存在的脂肪酸能够具有4至28个碳原子,并根据链中存在的碳数目而被称为短链、中链或长链脂肪酸。当碳原子之间不存在双键时,脂肪酸被称为饱和脂肪酸,而当存在双键时脂肪酸则被称为不饱和脂肪酸。当只存在一个双键时,不饱和长链脂肪酸是单不饱和的,而当存在多于一个双键时,不饱和长链脂肪酸是多不饱和的。

[0026] 本文所述的微生物油意指包含一种或多种PUFA且获取自微生物细胞的油。

[0027] 多不饱和脂肪酸(PUFA)是根据距脂肪酸的甲基端的第一个双键的位置来分类的; $\omega$ -3(n-3)脂肪酸在第三个碳上含有第一个双键,而 $\omega$ -6(n-6)脂肪酸在第六个碳上含有第一个双键。例如,二十二碳六烯酸(“DHA”)是一种链长为22个碳并有6个双键的 $\omega$ -3长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA),通常称为“22:6n-3”。在一个实施方案中,PUFA选自 $\omega$ -3脂肪酸、 $\omega$ -6脂肪酸,及其混合物。在另一个实施方案中,PUFA选自LC-PUFA。在又一个实施方案中,PUFA选自二十二碳六烯酸(DHA)、二十碳五烯酸(EPA)、二十二碳五烯酸(DPA)、花生四烯酸(ARA)、 $\gamma$ -亚麻酸(GLA)、二高- $\gamma$ -亚麻酸(DGLA)、十八碳四烯酸(stearidonic acid,SDA),及其混合物。在另一个实施方案中,PUFA选自DHA、ARA,及其混合物。在又一个实施方案中,PUFA是DHA。在又一个实施方案中,PUFA是ARA。

[0028] LC-PUFA是含有至少3个双键且具有18个或更多个碳或是20个或更多个碳的链长的脂肪酸。 $\omega$ -6系列的LC-PUFA包括但不限于二高- $\gamma$ -亚麻酸(C20:3n-6)、花生四烯酸(C20:4n-6)(“ARA”)、二十二碳四烯酸或肾上腺酸(adrenic acid)(C22:4n-6),以及二十二碳五烯酸(C22:5n-6)(“DPA n-6”)。 $\omega$ -3系列的LC-PUFA包括但不限于二十碳三烯酸(C20:3n-3)、二十碳四烯酸(C20:4n-3)、二十碳五烯酸(C20:5n-3)(“EPA”)、二十二碳五烯酸(C22:5n-3),以及二十二碳六烯酸(C22:6n-3)。LC-PUFA还包括具有大于22个碳以及4个或更多个双键的脂肪酸,包括但不限于C24:6(n-3)与C28:8(n-3)。

[0029] PUFA可以为如下形式：游离脂肪酸、盐、脂肪酸酯（例如甲酯或乙酯）、单酰甘油（MAG）、二酰甘油（DAG）、三酰甘油（TAG），和/或磷脂（PL）。

[0030] 高度不饱和脂肪酸（HUFA）是含有4个或更多个不饱和碳-碳键的 $\omega$ -3和/或 $\omega$ -6多不饱和脂肪酸。

[0031] 如本文所用的，“细胞”意指一种含油生物材料，如衍生自油质微生物的生物材料。由微生物生产的或从微生物细胞获得的油称为“微生物油”。由藻类和/或真菌所生产的油也分别称为藻类油和/或真菌油。

[0032] 如本文所用的，“微生物细胞”或“微生物”意指生物体，例如藻类、细菌、真菌、酵母、原生生物，及其组合，例如单细胞生物。在一些实施方案中，微生物细胞是真核细胞。微生物细胞包括但不限于，金藻（例如不等鞭毛类（Stramenopiles）界的微生物）、绿藻、硅藻类、沟鞭藻类（dinoflagellates）（例如沟鞭藻（Dinophyceae）目的微生物，包括隐甲藻属（Crypthecodinium）的成员，如例如，寇氏隐甲藻（Crypthecodinium cohnii或C.cohnii）；破囊壶菌目（Thraustochytriales）的微藻类；酵母（子囊菌类或担子菌类），以及毛霉属（Mucor）和被孢霉属（Mortierella）的真菌，包括但不限于高山被孢霉（Mortierella alpina）及施穆克被孢霉（Mortierella sect.schmuckeri），以及腐霉属（Pythium），包括但不限于诡谲腐霉（Pythium insidiosum）。

[0033] 在一个实施方案中，微生物细胞来自被孢霉属、隐甲藻属，或是破囊壶菌目。在又一个实施方案中，微生物细胞来自寇氏隐甲藻。在又一个实施方案中，微生物细胞选自寇氏隐甲藻、高山被孢霉、破囊壶菌属（Thraustochytrium）、裂殖壶菌属（Schizochytrium），及其混合物。

[0034] 在又一个实施方案中，微生物细胞包括但不限于属于以下的微生物：被孢霉属、耳霉属（Conidiobolus）、腐霉属、疫霉属（Phytophthora）、青霉属（Penicillium）、枝孢霉属（Cladosporium）、毛霉属、镰孢属（Fusarium）、曲霉属（Aspergillus）、红酵母属（Rhodotorula）、虫霉属（Entomophthora）、刺孢囊霉属（Echinosporangium），以及水霉属（Saprolegnia）。在另一个实施方案中，ARA获取自微生物细胞，所述微生物细胞来自被孢霉属，包括但不限于长孢被孢霉（Mortierella elongata）、微小被孢霉（Mortierella exigua）、喜湿被孢霉（Mortierella hygrophila）、高山被孢霉、施穆克被孢霉（Mortierella schmuckeri），以及小被孢霉（Mortierella minutissima）。在另一个实施方案中，ARA获取自微生物细胞，所述微生物细胞来自：长孢被孢霉IF08570、微小被孢霉IF08571、喜湿被孢霉IF05941、高山被孢霉IF08568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS529.72、CBS608.70、和CBS754.68，及其突变体。在又一个实施方案中，微生物细胞来自高山被孢霉。

[0035] 在更进一步中，微生物细胞是来自破囊壶菌目（Thraustochytriales）的微藻，其包括但不限于破囊壶菌属（Thraustochytrium）（物种包括arudimentale、金黄色破囊壶菌（aureum）、benthicola、球破囊壶菌（globosum）、金尼破囊壶菌（kinnei）、动孢破囊壶菌（motivum）、多增殖性破囊壶菌（multirudimentale）、厚皮破囊壶菌（pachydermum）、层出破囊壶菌（proliferum）、粉红破囊壶菌（roseum），以及纹带破囊壶菌（striatum））；裂殖壶菌属（Schizochytrium）（物种包括聚生裂殖壶菌（aggregatum）、limnaceum、红树林裂殖壶菌（mangrovei）、微小裂殖壶菌（minutum）、八孢裂殖壶菌（octosporum））；吾肯氏壶菌属

(Ulkenia) (物种包括变形吾肯氏壶菌 (amoeboides)、克格伦吾肯氏壶菌 (kerguelensis)、小吾肯氏壶菌 (minuta)、深海吾肯氏壶菌 (profunda)、辐射吾肯氏壶菌 (radiate)、sailens、沙氏吾肯氏壶菌 (sarkariana)、schizochytrids、威瑟氏吾肯氏壶菌 (visurgensis)、约肯氏吾肯氏壶菌 (yorkensis)); Aurantiacochytrium 属; Oblongichytrium 属、Sicyoidochytrium 属、Parientichytrium 属、Botryochytrium 属, 及其组合。在吾肯氏壶菌属 (Ulkenia) 内所描述的物种会视为裂殖壶菌属的成员。在另一个实施方案中, 微生物细胞来自破囊壶菌目。在又一个实施方案中, 微生物细胞来自破囊壶菌属。在又一个实施方案中, 微生物细胞来自裂殖壶菌属。在又一个实施方案中, 微生物细胞选自破囊壶菌属、裂殖壶菌属, 或其混合物。

[0036] 在一个实施方案中, 该方法包括裂解包含微生物油的微生物细胞以形成裂解细胞组合物。术语“裂解 (lyse)”及“裂解 (lysing)”意指使微生物细胞的壁和/或膜破裂的方法。在一个实施方案中, 通过至少一种选自下组的处理来裂解微生物细胞: 机械处理、化学处理、酶处理、物理处理, 及其组合。在另一个实施方案中, 所述方法包括裂解包含微生物油的微生物细胞以形成裂解细胞组合物, 其中所述裂解选自机械处理、化学处理、酶处理、物理处理, 及其组合。

[0037] 在一些实施方案中, 在裂解细胞之前, 可对所述细胞进行洗涤和/或巴氏消毒 (pasteurize)。在一些实施方案中, 洗涤细胞包括使用水溶液 (例如水) 来去除任何细胞外的水溶性或水分散性化合物。在一些实施方案中, 可以将细胞洗涤一次、二次、三次, 或更多次。在一些实施方案中, 对细胞进行巴氏消毒包括加热该细胞以使任何不合意的酶 (例如任何可能降解该油或降低 PUFA 产量/收率的酶) 失活。在一些实施方案中, 可以洗涤该细胞然后在裂解该细胞之前对其进行巴氏消毒。在一些实施方案中, 要裂解的细胞包含于发酵液中。

[0038] 在一些实施方案中, 所述方法包括裂解包含微生物油的未洗涤的微生物细胞以形成裂解细胞组合物。在一些实施方案中, 用例如水首先洗涤含有包含微生物油的微生物细胞的发酵液, 然后裂解该细胞以形成裂解细胞组合物。在其他实施方案中, 所述方法包括裂解发酵液中未洗涤的细胞以形成裂解细胞组合物。

[0039] 机械处理包括但不限于均质化、超声、冷压、磨制, 及其组合。在一些实施方案中, 所述方法包括通过均质化来裂解细胞。在一些实施方案中, 所述方法包括用均质机来裂解细胞。

[0040] 均质化包括但不限于使用下列设备的方法: 弗氏细胞压碎器 (French cell press)、超声破碎器、均质机, 微流化器 (microfluidizer)、球磨机、棒磨机、砾磨机 (pebble mill)、珠磨机 (bead mill)、高压碾磨辊、立轴式冲击机 (vertical shaft impactor)、工业共混机、高剪切混合机、桨式混合机、polytron 均质机、工业均质机 (例如 Niro Soavi VHP 均质机及 APV Rannie 和 APV Gaulin 均质机)、工业高剪切流体处理器 (high shear fluid processors) (例如微流体高剪切流体处理器)、细胞裂解/珠磨均质机 (例如 Dyno-Mill 和 Buhler), 及其组合。在一些实施方案中, 细胞流经任选加热的均质机。在一些实施方案中, 合适的均质化可以包括 1 次至 3 次通过处于高压和/或低压的均质机。

[0041] 在一些实施方案中, 均质化过程中的压强为 150 巴 (bar) 至 1,400 巴; 150 巴至 1,200 巴; 150 巴至 900 巴; 150 巴至 300 巴; 300 巴至 1,400 巴; 300 巴至 1,200 巴; 300 巴至 900 巴; 400 巴



至800巴;500巴至700巴;或600巴。在一些实施方案中,均质化过程中的压强为2,000psi至20,000psi;2,000psi至18,000psi;2,000psi至16,000psi;2,000psi至14,000psi;2,000psi至12,000psi;2,000psi至10,000psi;2,000psi至8,000psi;2,000psi至6,000psi;2,000psi至4,000psi;4,000psi至20,000psi;4,000psi至18,000psi;4,000psi至16,000psi;4,000psi至14,000psi;4,000psi至12,000psi;4,000psi至10,000psi;4,000psi至8,000psi;4,000psi至6,000psi;6,000psi至20,000psi;6,000psi至18,000psi;6,000psi至16,000psi;6,000psi至14,000psi;6,000psi至12,000psi;6,000psi至10,000psi;6,000psi至8,000psi;8,000psi至20,000psi;8,000psi至18,000psi;8,000psi至16,000psi;8,000psi至14,000psi;8,000psi至12,000psi;8,000psi至10,000psi;10,000psi至20,000psi;10,000psi至18,000psi;10,000psi至16,000psi;10,000psi至14,000psi;10,000psi至12,000psi;12,000psi至20,000psi;12,000psi至18,000psi;12,000psi至16,000psi;12,000psi至14,000psi;14,000psi至20,000psi;14,000psi至18,000psi;14,000psi至16,000psi;16,000psi至20,000psi;16,000psi至18,000psi;或18,000psi至20,000psi。

[0042] 在一些实施方案中,在均质化前将微生物细胞在高剪切混合机中混合。在一些实施方案中,所述高剪切混合机以如下范围的转速操作:至少5,000rpm;至少7,500rpm;至少10,000rpm;至少12,500rpm;至少15,000rpm;5,000rpm至15,000rpm;5,000rpm至12,500rpm;5,000rpm至10,000rpm;5,000rpm至7,500rpm;7,500rpm至15,000rpm;7,500rpm至12,500rpm;7,500rpm至10,000rpm;10,000rpm至15,000rpm;10,000rpm至12,500rpm;或12,500rpm至15,000rpm。

[0043] 物理处理包括但不限于:加热,其包括但不限于,电阻式(resistive)、对流、蒸汽、流体浴、太阳能,及其组合。在一些实施方案中,在釜中加热细胞,所述釜在其壁之内/之上具有电阻线圈。在一些实施方案中,在液体浴中加热细胞,所述液体浴具有穿过其间的管子。

[0044] 化学处理包括但不限于:提高细胞的pH;降低细胞的pH;使细胞接触化学品;及其组合。

[0045] 在一些实施方案中,通过提高细胞的pH来裂解细胞。在一些实施方案中,通过添加碱来提高pH。碱包括但不限于氢氧化物(例如LiOH、NaOH、KOH、Ca(OH)<sub>2</sub>,及其组合)、碳酸盐类(例如,Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、MgCO<sub>3</sub>,及其组合)、碳酸氢盐类(例如,LiHCO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、KHCO<sub>3</sub>,及其组合),及其组合。碱可以是固体形式(例如晶体,颗粒,与小丸);液体形式(例如水溶液);及其组合。

[0046] 在一些实施方案中,所述碱具有1至12、1至10、1至8、1至6、1至5、2至12、2至10、2至8、2至6、2至5、3至10、3至6、3至5、4至10、4至8、4至6、5至10、或5至8的pK<sub>b</sub>。本文所用的术语“pK<sub>b</sub>”意指碱的碱缔合常数(K<sub>b</sub>)的负对数。K<sub>b</sub>意指碱在水中的离子化的平衡常数,其中:

[0047] 
$$B + H_2O \rightleftharpoons HB^+ + OH^-$$
; 并且碱B的K<sub>b</sub>定义为: 
$$K_b = \frac{[HB^+][OH^-]}{[B]}$$
。

[0048] 在一些实施方案中,pH选自约8或以上;约9或以上;约10或以上;约11或以上;以及约12或以上。在其他实施方案中,pH选自:7至13;7至12;7至11;7至10;7至9;8至13;8至12;8至11;8至10;8至9;9至12;9至11;9至10;10至12;以及10至11。

[0049] 在一些实施方案中,细胞的pH可以通过氯碱法来提升。在一些实施方案中,对含氯化钠和细胞的发酵液进行电解,其导致形成氢氧化钠,这使该细胞的pH提高。在一些实施方案中,发酵液包含氯化钙或氯化钾代替氯化钠,或是除氯化钠之外还有氯化钙或氯化钾,并且电解分别导致形成氢氧化钙或氢氧化钾,由此提高该细胞的pH。

[0050] 在一些实施方案中,通过降低细胞的pH来裂解细胞。在一些实施方案中,通过添加酸来降低pH。酸包括但不限于:硫酸;磷酸;盐酸;氢溴酸;氢碘酸;次氯酸;亚氯酸;氯酸;高氯酸;氟硫酸;硝酸;氟锑酸;氟硼酸;六氟磷酸;铬酸;硼酸;乙酸;柠檬酸;甲酸;及其组合。在一些实施方案中,pH选自约7或更低;约6.5或更低;约6或更低;约5.5或更低;约5或更低;约4.5或更低;约4或更低;约3.5或更低;约3或更低;约2.5或更低;约2或更低;约1.5或更低;约1或更低;和约0.5或更低。在其他实施方案中,pH选自约0.5至约7;约0.5至约6.5;约0.5至约6;约0.5至约5.5;约0.5至约5;约0.5至约4.5;约0.5至约4;约0.5至约3.5;约0.5至约3;约0.5至约2.5;约0.5至约2;约0.5至约1.5;约0.5至约1;约1至约7;约1至约6.5;约1至约6;约1至约5.5;约1至约5;约1至约4.5;约1至约4;约1至约3.5;约1至约3;约1至约2.5;约1至约2;约1至约1.5;约1.5至约7;约1.5至约6.5;约1.5至约6;约1.5至约5.5;约1.5至约5;约1.5至约4.5;约1.5至约4;约1.5至约3.5;约1.5至约3;约1.5至约2.5;约1.5至约2;约2至约7;约2至约6.5;约2至约6;约2至约5.5;约2至约5;约2至约4.5;约2至约4;约2至约3.5;约2至约3;约2至约2.5;约2.5至约7;约2.5至约6.5;约2.5至约6;约2.5至约5.5;约2.5至约5;约2.5至约4.5;约2.5至约4;约2.5至约3.5;约2.5至约3;约3至约7;约3至约6.5;约3至约6;约3至约5.5;约3至约5;约3至约4.5;约3至约4;约3至约3.5;约3.5至约7;约3.5至约6.5;约3.5至约6;约3.5至约5.5;约3.5至约5;约3.5至约4.5;约3.5至约4;约4至约7;约4至约6.5;约4至约6;约4至约5.5;约4至约5;约4至约4.5;约4.5至约7;约4.5至约6.5;约4.5至约6;约4.5至约5.5;约4.5至约5;约5至约7;约5至约6.5;约5至约6;约5至约5.5;约5.5至约7;约5.5至约6.5;约5.5至约6;约6至约7;约6至约6.5;和约6.5至约7。

[0051] 在一些实施方案中,添加如下量的酸以降低pH:按重量(或体积)计细胞培养液(cell broth)的约2%至约10%,约2%至约9%,约2%至约8%,约2%至约7%,约2%至约6%,约3%至约6%,约4%至约6%,约5%至约6%,约2%至约5%,约2%至约4%,约2%至约3%,约3%至约5%,约3%至约4%,或约4%至约5%。

[0052] 酶处理意指通过使细胞接触一种或多种酶来裂解细胞。酶包括但不限于:蛋白酶、纤维素酶、半纤维素酶、壳多糖酶、果胶酶,及其组合。蛋白酶的非限制性实例包括丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、Alacase,及其组合。纤维素酶的非限制性实例包括蔗糖酶、麦芽糖酶、乳糖酶、 $\alpha$ -葡萄糖苷酶、 $\beta$ -葡萄糖苷酶、淀粉酶、溶菌酶、神经氨酸酶、半乳糖苷酶、 $\alpha$ -甘露糖苷酶、葡萄糖醛酸糖苷酶、透明质酸酶、普鲁兰酶(pullulanase)、葡萄糖脑苷脂酶、半乳糖基神经酰胺酶、乙酰基半乳糖胺酶(acetylgalactosaminidase)、岩藻糖苷酶、己糖胺酶、艾杜糖醛酸糖苷酶(iduronidase)、麦芽糖酶-葡萄糖淀粉酶,及其组合。壳多糖酶的非限制性实例包括壳三糖苷酶(chitotriosidase)。果胶酶(pectinase)的非限制性实例包括果胶裂合酶(pectolyase)、Pectozyme、聚半乳糖醛酸酶,及其组合。在一些实施方案中,一些酶通过加热来活化。在一些实施方案中,裂解不包括酶的使用。

[0053] 如本文所用的,“裂解细胞组合物”意指包含一个或多个裂解的细胞(包括细胞碎

片和细胞的其他内容物)、与微生物油(来自所述裂解的细胞)和任选的培养液(其含有液体(如水)、营养物、和微生物细胞)组合的组合物。在一些实施方案中,微生物细胞包含于含水的发酵液或培养基中。在一些实施方案中,裂解细胞组合物意指这样的组合物,其包含一个或多个裂解的细胞、细胞碎片、微生物油、该细胞的天然内容物,以及来自发酵液的水组份。在一个实施方案中,该裂解细胞组合物包含液体、细胞碎片以及微生物油。在一些实施方案中,裂解细胞组合物呈水包油乳液形式,其包含连续水相和分散油相的混合物。在一些实施方案中,分散油相以按重量(或体积)计乳化的裂解细胞组合物的约1%至约60%;约1%至约50%;约1%至约40%;约1%至约30%;约1%至约20%;约5%至约60%;约5%至约50%;约5%至约40%;约5%至约30%;约5%至约20%;约10%至约60%;约10%至约50%;约10%至约40%;约20%至约60%;20%至50%;20%至约40%;约30%至约60%;约30%至约50%;或约40%至约60%的浓度存在。

[0054] 在一些实施方案中,裂解微生物细胞导致自细胞或细胞物质中的内源性材料形成乳液,所述内源性材料包括但不限于蛋白质、磷脂、碳水化合物,及其组合。虽然不被任何的具体理论的束缚,据信本发明的方法能将乳化的裂解细胞组合物破碎或去乳化,允许微生物油从该裂解细胞组合物分离。术语“乳液”和“乳化的”意指两个或更多个不互溶相或层的混合物,其中一个相或层分散于另一个相或层中。术语“破碎(break)”、“破碎(break-up)”、“去乳化(demulsify)”、“去乳化作用(demulsification)”、“去乳化(demulsifying)”,以及“破碎(breaking)”意指分离乳液的不互溶相或层的方法。例如,对乳化的裂解细胞组合物进行破碎或去乳化是意指这样的方法,通过该方法,乳化的裂解细胞组合物从具有一个或多个相或层的乳液转变为具有两个或更多个相或层的组合物。例如,在一些实施方案中,本发明的方法使乳化的裂解细胞组合物从单相破碎成二相或更多相。在一些实施方案中,所述二相或更多相包括油相和水相。在一些实施方案中,本发明的方法使乳化的裂解细胞组合物破碎成至少三相。在一些实施方案中,所述三相选自油相、水相,以及固相。在一些实施方案中,所述相选自油相、乳化相、水相,以及固相。

[0055] 在一些实施方案中,去乳化过程中形成的油珠的平均粒度选自:5微米至50微米;5微米至45微米;5微米至40微米;5微米至35微米;5微米至30微米;5微米至25微米;5微米至20微米;5微米至15微米;10微米至50微米;10微米至45微米;10微米至40微米;10微米至35微米;10微米至30微米;10微米至25微米;10微米至20微米;10微米至15微米;15微米至50微米;15微米至45微米;15微米至40微米;15微米至35微米;15微米至30微米;15微米至25微米;15微米至20微米;20微米至50微米;20微米至45微米;20微米至40微米;20微米至35微米;20微米至30微米;20微米至25微米;25微米至50微米;25微米至45微米;25微米至40微米;25微米至35微米;25微米至30微米;30微米至50微米;30微米至45微米;30微米至40微米;30微米至35微米;35微米至50微米;35微米至45微米;35微米至40微米;40微米至50微米;40微米至45微米;和45微米至50微米。在另一个实施方案中,去乳化过程中形成的油珠的平均粒度选自:至少10微米、至少15微米、至少20微米、至少25微米、至少30微米、至少35微米、及至少40微米或更大。在另一个实施方案中,去乳化过程中形成的油珠的平均粒度选自:至少10微米、至少15微米、至少20微米、及至少25微米。在一些实施方案中,平均粒度可以使用例如Beckman Coulter LS 13 320粒度分析仪(Beckman Coulter,Brea,CA)来测量。在一些实施方案中,平均粒度可以使用例如Malvern MS2000粒度分析仪(Malvern

Instruments Ltd.,Worcestershire,United Kingdom) 来测量。

[0056] 在一些实施方案中,去乳化的裂解细胞组合物在(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合的条件下形成。术语“搅拌(agitating)”和“搅拌(agitation)”意指通过施加力来影响细胞、裂解细胞组合物和/或去乳化的裂解细胞组合物中的运动的方法。在一些实施方案中,所述方法包括通过搅动、混合、共混、振荡、振动,或其组合来搅拌细胞、裂解细胞组合物和/或去乳化的裂解细胞组合物。在一些实施方案中,搅拌器具有一个或多个叶轮。如本文所用的,“叶轮”意指意指这样的装置,其经安排以在旋转时将运动赋予细胞、裂解细胞组合物和/或去乳化的裂解细胞组合物。

[0057] 低剪切搅拌和/或轴向流搅拌能通过例如轴向流式叶轮(也称为轴向流式涡轮)和混合流式叶轮来提供。轴向流式叶轮包括叶片与旋转平面呈低于90°的角度的所有叶轮。适合形成去乳化的裂解细胞组合物的轴向流式叶轮包括例如液翼叶轮(fluidfoil impeller)(例如A320(低雷诺数(Reynolds number)叶轮)和A315(气体处理叶轮));高效叶轮;水翼叶轮(hydrofoil impeller)(例如A310/A510(低稠度水翼)和A312(侧进式(side entry)水翼叶轮));螺旋桨(propellers)(例如A100,以及船用型(marine-type)混合叶轮);A200(PBT);A100(折叠-轴向流式叶轮);A200(表面充气机(surface aerator));A333 清洁边缘(Clean edge)(非串接(non-stringing)轴向流);A340(上泵-气体处理(up pumper-gas handling));A400(双螺旋流-低雷诺数);A6000(复合材料);A620(低雷诺数);MBI(底部进入式Mag混合器),及其组合。混合流式叶轮包括例如斜叶片涡轮(pitch-blade turbine)。

[0058] 在一些实施方案中,去乳化的裂解细胞组合物在由轴向流式叶轮提供的(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合的条件下形成。在其他实施方案中,去乳化的裂解细胞组合物在由叶轮提供的(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合的条件下形成,所述叶轮选自:液翼叶轮、高效叶轮、水翼叶轮、螺旋桨、斜叶片涡轮,及其组合。在更进一步的实施方案中,去乳化的裂解细胞组合物在由水翼叶轮提供的(i)低剪切搅拌,(ii)轴向流搅拌,或(iii)其组合的条件下形成。

[0059] 在一些实施方案中,搅拌器具有加热板。在一些实施方案中,搅拌器具有用于搅动的覆盖罩(mantle)。在一些实施方案中,搅拌器是在裂解细胞之前或过程中和/或在将裂解细胞组合物去乳化之后分散碱和/或盐的分散型搅拌器。

[0060] 在一些实施方案中,所述方法还包括(i)在裂解细胞之前或过程中;(ii)在将裂解细胞组合物去乳化之后;或(iii)其组合进行搅拌。适合在裂解细胞之前或过程中和/或在将裂解细胞组合物去乳化之后搅拌的叶轮包括直叶片叶轮、拉什顿叶片叶轮(Rushton blade impeller)、轴向流式叶轮、径向流式叶轮、凹面叶片盘叶轮、高效叶轮、螺旋桨、桨(paddles)、涡轮,及其组合。

[0061] 在一些实施方案中,所述方法还包括以约2hp/1,000gal至约10hp/1,000gal、约2hp/1,000gal至约5hp/1,000gal、约2hp/1,000gal至约4hp/1,000gal、约2hp/1,000gal至约3hp/1,000gal、约2.5hp/1,000gal至约10hp/1,000gal、约2.5hp/1,000gal至约5hp/1,000gal、约2.5hp/1,000gal至约4hp/1,000gal、或约2.5hp/1,000gal至约3hp/1,000gal的组合物来搅拌所述细胞和/或去乳化的裂解细胞组合物。在另一个实施方案中,所述方法包括以约2hp/1,000gal或更多、约2.1hp/1,000gal或更多、约2.2hp/1,000gal或更多、约

2.3hp/1,000gal或更多、约2.4hp/1,000gal或更多、或约2.5hp/1,000gal或更多的组合物来搅拌所述细胞和/或去乳化的裂解细胞组合物。在进一步的实施方案中,所述方法包括以约2hp/1,000gal至约3hp/1,000gal的组合物来搅拌所述细胞和/或去乳化的裂解细胞组合物。在更进一步的实施方案中,所述方法包括以约2hp/1,000gal至约10hp/1,000gal的组合物来搅拌所述细胞和/或去乳化的裂解细胞组合物。

[0062] 在一些实施方案中,所述方法包括以约0.01hp/1,000gal至约2hp/1,000gal、约0.1hp/1,000gal至约2hp/1,000gal、约0.5hp/1,000gal至约2hp/1,000gal、约1hp/1,000gal至约2hp/1,000gal、或约1.5hp/1,000gal至约2hp/1,000gal的组合物来搅拌裂解细胞组合物。在进一步的实施方案中,所述方法包括以约0.01hp/1000gal或更多、约0.1hp/1000gal或更多、约0.2hp/1000gal或更多、约0.3hp/1000gal或更多、约0.4hp/1000gal或更多、或约0.5hp/1000gal或更多的组合物来搅拌裂解细胞组合物。在更进一步的实施方案中,所述方法包括以约0.01hp/1,000gal至约2hp/1,000gal的组合物来搅拌裂解细胞组合物。在更进一步的实施方案中,所述方法包括以约0.5hp/1000gal或更多的组合物来搅拌裂解细胞组合物。

[0063] 在一些实施方案中,所述方法包括以如下转速进行搅拌:10rpm或更低、20rpm或更低、50rpm或更低、100rpm或更低、150rpm或更低、200rpm或更低、250rpm或更低、300rpm或更低、350rpm或更低、400rpm或更低、10rpm至400rpm、10rpm至350rpm、10rpm至300rpm、10rpm至250rpm、10rpm至200rpm、10rpm至150rpm、10rpm至100rpm、10rpm至50rpm、10rpm至20rpm、20rpm至400rpm、20rpm至350rpm、20rpm至300rpm、20rpm至250rpm、20rpm至200rpm、20rpm至150rpm、20rpm至100rpm、20rpm至50rpm、50rpm至400rpm、50rpm至350rpm、50rpm至300rpm、50rpm至250rpm、50rpm至200rpm、50rpm至150rpm、50rpm至100rpm、100rpm至400rpm、100rpm至350rpm、100rpm至300rpm、100rpm至250rpm、100rpm至200rpm、100rpm至150rpm、150rpm至400rpm、150rpm至350rpm、150rpm至300rpm、150rpm至250rpm、150rpm至200rpm、200rpm至400rpm、200rpm至350rpm、200rpm至300rpm、200rpm至250rpm、250rpm至400rpm、250rpm至350rpm、250rpm至300rpm、300rpm至400rpm、300rpm至350rpm、或350rpm至400rpm。在一些实施方案中,搅拌以350rpm或更低的转速进行。

[0064] 在一些实施方案中,所述方法包括用搅拌器来搅拌细胞、裂解细胞组合物、和/或去乳化的裂解细胞组合物,所述搅拌器具有90英尺/分钟至1,200英尺/分钟、200英尺/分钟至1,000英尺/分钟、300英尺/分钟至800英尺/分钟、400英尺/分钟至700英尺/分钟、或500英尺/分钟至600英尺/分钟的叶轮尖端速率。在一些实施方案中,所述方法包括用搅拌器来搅拌,所述搅拌器具有200英尺/分钟至1000英尺/分钟的叶轮尖端速率。

[0065] 在一些实施方案中,方法包括使用搅拌器来搅拌细胞、裂解细胞组合物、和/或去乳化的裂解细胞组合物,所述搅拌器具有如下叶轮尖端速率:5厘米/秒至900厘米/秒、5厘米/秒至750厘米/秒、5厘米/秒至500厘米/秒、5厘米/秒至350厘米/秒、5厘米/秒至300厘米/秒、5厘米/秒至250厘米/秒、5厘米/秒至200厘米/秒、5厘米/秒至150厘米/秒、5厘米/秒至100厘米/秒、5厘米/秒至50厘米/秒、5厘米/秒至25厘米/秒、25厘米/秒至900厘米/秒、25厘米/秒至750厘米/秒、25厘米/秒至500厘米/秒、25厘米/秒至350厘米/秒、25厘米/秒至300厘米/秒、25厘米/秒至250厘米/秒、25厘米/秒至200厘米/秒、25厘米/秒至150厘米/秒、25厘米/秒至100厘米/秒、25厘米/秒至50厘米/秒、50厘米/秒至900厘米/秒、50厘米/秒至

750厘米/秒、50厘米/秒至500厘米/秒、50厘米/秒至350厘米/秒、50厘米/秒至300厘米/秒、50厘米/秒至250厘米/秒、50厘米/秒至200厘米/秒、50厘米/秒至150厘米/秒、50厘米/秒至100厘米/秒、100厘米/秒至900厘米/秒、100厘米/秒至750厘米/秒、100厘米/秒至500厘米/秒、100厘米/秒至350厘米/秒、100厘米/秒至300厘米/秒、100厘米/秒至250厘米/秒、100厘米/秒至200厘米/秒、100厘米/秒至150厘米/秒、150厘米/秒至900厘米/秒、150厘米/秒至750厘米/秒、150厘米/秒至500厘米/秒、150厘米/秒至350厘米/秒、150厘米/秒至300厘米/秒、150厘米/秒至250厘米/秒、150厘米/秒至200厘米/秒、200厘米/秒至900厘米/秒、200厘米/秒至750厘米/秒、200厘米/秒至500厘米/秒、200厘米/秒至350厘米/秒、200厘米/秒至300厘米/秒、200厘米/秒至250厘米/秒、250厘米/秒至900厘米/秒、250厘米/秒至750厘米/秒、250厘米/秒至500厘米/秒、250厘米/秒至350厘米/秒、250厘米/秒至300厘米/秒、300厘米/秒至900厘米/秒、300厘米/秒至750厘米/秒、300厘米/秒至500厘米/秒、300厘米/秒至350厘米/秒、350厘米/秒至900厘米/秒、350厘米/秒至850厘米/秒、350厘米/秒至800厘米/秒、350厘米/秒至750厘米/秒、350厘米/秒至700厘米/秒、350厘米/秒至650厘米/秒、350厘米/秒至600厘米/秒、350厘米/秒至550厘米/秒、350厘米/秒至500厘米/秒、350厘米/秒至450厘米/秒、350厘米/秒至400厘米/秒、400厘米/秒至900厘米/秒、400厘米/秒至850厘米/秒、400厘米/秒至800厘米/秒、400厘米/秒至750厘米/秒、400厘米/秒至700厘米/秒、400厘米/秒至650厘米/秒、400厘米/秒至600厘米/秒、400厘米/秒至550厘米/秒、400厘米/秒至500厘米/秒、400厘米/秒至450厘米/秒、450厘米/秒至900厘米/秒、450厘米/秒至850厘米/秒、450厘米/秒至800厘米/秒、450厘米/秒至750厘米/秒、450厘米/秒至700厘米/秒、450厘米/秒至650厘米/秒、450厘米/秒至600厘米/秒、450厘米/秒至550厘米/秒、450厘米/秒至500厘米/秒、500厘米/秒至900厘米/秒、500厘米/秒至850厘米/秒、500厘米/秒至800厘米/秒、500厘米/秒至750厘米/秒、500厘米/秒至700厘米/秒、500厘米/秒至650厘米/秒、500厘米/秒至600厘米/秒、500厘米/秒至550厘米/秒、550厘米/秒至900厘米/秒、550厘米/秒至850厘米/秒、550厘米/秒至800厘米/秒、550厘米/秒至750厘米/秒、550厘米/秒至700厘米/秒、550厘米/秒至650厘米/秒、550厘米/秒至600厘米/秒、600厘米/秒至900厘米/秒、600厘米/秒至850厘米/秒、600厘米/秒至800厘米/秒、600厘米/秒至750厘米/秒、600厘米/秒至700厘米/秒、600厘米/秒至650厘米/秒、650厘米/秒至900厘米/秒、650厘米/秒至850厘米/秒、650厘米/秒至800厘米/秒、650厘米/秒至750厘米/秒、650厘米/秒至700厘米/秒、700厘米/秒至900厘米/秒、700厘米/秒至850厘米/秒、700厘米/秒至800厘米/秒、700厘米/秒至750厘米/秒、750厘米/秒至900厘米/秒、750厘米/秒至850厘米/秒、750厘米/秒至800厘米/秒、800厘米/秒至900厘米/秒、800厘米/秒至850厘米/秒、或850厘米/秒至900厘米/秒。术语“叶轮尖端速率”，意指当叶轮环绕其中心轴旋转时，其最外部分的速率。

[0066] 在一些实施方案中，搅拌（以及任选的如本文所述的额外步骤）是在含有叶轮的容器中进行的，其中所述叶轮直径与该容器体积之比是0.1至0.5、0.1至0.4、0.2至0.5、0.2至0.4、0.3至0.5、或0.3至0.4。

[0067] 在一些实施方案中，搅拌（以及任选的如本文所述的额外步骤）是在含有叶轮的容器中进行的，其中所述叶轮直径对该容器内径之比是至少0.25、至少0.34、至少0.65、0.25至0.65、0.25至0.33、0.3至0.6、0.3至0.5、0.3至0.4、0.34至0.65、0.34至0.6、0.34至0.55、0.37至0.55、0.4至0.65、0.4至0.6、0.4至0.5、或0.42至0.55。

[0068] 在一些实施方案中,搅拌包括将细胞、裂解细胞组合物、和/或去乳化的裂解细胞组合物混合,从而使该细胞、裂解细胞组合物、和/或去乳化的裂解细胞组合物处于由如下雷诺数描述的流动条件下:10至10,000、1,000至10,000、1,500至10,000、或2,000至10,000。在一些实施方案中,搅拌过程中裂解的细胞乳液具有2,000或更多、3,000或更多、或5,000或更多、或2,000至10,000、3,000至10,000、或5,000至10,000的雷诺数。

[0069] 在一些实施方案中,搅拌器皿可以具有2个叶轮。在一些实施方案中,用于在裂解细胞之前或过程中和/或将裂解细胞组合物去乳化之后(即去乳化的裂解细胞组合物)进行搅拌的叶轮是径向流式叶轮。在一些实施方案中,用于在裂解细胞之前或过程中和/或将裂解细胞组合物去乳化之后进行搅拌的叶轮是拉什顿叶片叶轮。在一些实施方案中,所述叶轮是以一定距离互相分离,所述距离至少与最小叶轮的直径相等。在其他实施方案中,当具有直径(x)的器皿中液体的体积与直径(y)的搅拌器叶片(其中 $y=0.3x$ 至 $0.5x$ )时,如果底部叶轮置于距底部 $y/0.33$ 的位置且顶部叶轮置于高于底部叶轮 $y$ 至 $2y$ 的距离(对于轴向泵送而言)或高于底部叶轮 $2y$ 至 $3y$ 的距离(对于径向泵送而言)的话,可以搅拌(x)的液体高度。在一些实施方案中,搅拌器皿具有至少10,000升、至少20,000升、至少30,000升、至少40,000升、至少50,000升、至少60,000升、至少70,000升、至少80,000升、至少90,000、至少100,000、至少150,000、或至少200,000升的体积。在一些实施方案中,裂解细胞组合物以至少50rpm、至少100rpm、或至少200rpm进行搅拌。

[0070] 在一些实施方案中,所述形成去乳化的裂解细胞组合物的方法还包括添加至少一种酶。在一些实施方案中,所述形成去乳化的裂解细胞组合物的方法还包括添加至少一种酶混合液(cocktail)。适于形成去乳化的裂解细胞组合物的酶包括例如 $\beta$ -葡聚糖酶(例如 Vinoflow Max (Novozymes Corp.)和Brewzyme LP (Dyadic Int.));木聚糖酶(例如 Xylanase Plus (Dyadic Int.)和Pentopan (Novozymes Corp.));纤维素酶(例如 Cellustar CL (Dyadic Int.), Fibrezyme G2000 (Dyadic Int.), Celluclast (Novozymes Corp.), Fungamyl (Novozymes Corp.)和(Viscozyme L (Novozymes Corp.));果胶酶(例如 Pectinex (Novozymes Corp.));甘露聚糖酶;淀粉酶(例如 Alphastar Plus (Dyadic Int.)和 Termamyl (Novozymes Corp.));及其组合。在一些实施方案中,所述形成去乳化的裂解细胞组合物的方法还包括添加至少一种选自如下的酶: $\beta$ -葡聚糖酶、木聚糖酶、纤维素酶、果胶酶、甘露聚糖酶、淀粉酶,及其组合。在其他实施方案中,所述形成去乳化的裂解细胞组合物的方法还包括添加至少一种 $\beta$ -葡聚糖酶。

[0071] 在一些实施方案中,所述形成去乳化的裂解细胞组合物的方法还包括以按重量(或体积)计所述组合物的约0.05%至约10%,约0.05%至约9%,约0.05%至约8%,约0.05%至约7%,约0.05%至约6%,约0.05%至约5%,约0.05%至约4%,约0.05%至约3%,约0.05%至约2%,约0.05%至约1%,约0.05%至约0.5%,约0.05%至约0.1%,约0.1%至约10%,约0.1%至约9%,约0.1%至约8%,约0.1%至约7%,约0.1%至约6%,约0.1%至约5%,约0.1%至约4%,约0.1%至约3%,约0.1%至约2%,约0.1%至约1%,约0.1%至约0.5%,约0.5%至约10%,约0.5%至约9%,约0.5%至约8%,约0.5%至约7%,约0.5%至约6%,约0.5%至约5%,约0.5%至约4%,约0.5%至约3%,约0.5%至约2%,约0.5%至约1%,约1%至约10%,约1%至约9%,约1%至约8%,约1%至约7%,约1%至约6%,约1%至约5%,约1%至约4%,约1%至约3%,和约1%至约2%的量添加酶(例如以粉

末形式或溶液)。在进一步的实施方案中,所述形成去乳化的裂解细胞组合物的方法还包括以按重量(或体积)计所述组合物的低于约10%,约9%,约8%,约7%,约6%,约5%,约4%,约3%,约2%,约1%,和约0.5%的量添加酶。

[0072] 在一些实施方案中,所述形成去乳化的裂解细胞组合物的方法进一步包括添加乳化剂。在一些实施方案中,所述乳化剂取代由内源性材料形成的乳液,因为PUFA对于乳化剂具有比内源性材料(例如,蛋白质、磷脂,以及碳水化合物)更强的亲和性。在一些实施方案中,由乳化剂形成的乳液比由内源性材料形成的乳液更稳定。在一些实施方案中,由乳化剂形成的乳液比由内源性材料形成的乳液更容易使用本文的方法来进行去乳化。

[0073] 在一些实施方案中,所述方法包括将裂解细胞组合物去乳化,其通过降低所述裂解细胞组合物的pH来进行。在一些实施方案中,通过添加酸来降低pH。酸包括但不限于:硫酸;磷酸;盐酸;氢溴酸;氢碘酸;次氯酸;亚氯酸;氯酸;高氯酸;氟硫酸;硝酸;氟锑酸;氟硼酸;六氟磷酸;铬酸;硼酸;乙酸;柠檬酸;甲酸;及其组合。在一些实施方案中,所述pH选自7或更低;约6.5或更低;约6或更低;约5.5或更低;约5或更低;约4.5或更低;约4或更低;约3.5或更低;约3或更低;约2.5或更低;约2或更低;约1.5或更低;约1或更低;和约0.5或更低。在一些实施方案中,所述方法包括将裂解细胞组合物的pH降低至约6或更低。在其他实施方案中,所述pH选自约0.5至约7;约0.5至约6.5;约0.5至约6;约0.5至约5.5;约0.5至约5;约0.5至约4.5;约0.5至约4;约0.5至约3.5;约0.5至约3;约0.5至约2.5;约0.5至约2;约0.5至约1.5;约0.5至约1;约1至约7;约1至约6.5;约1至约6;约1至约5.5;约1至约5;约1至约4.5;约1至约4;约1至约3.5;约1至约3;约1至约2.5;约1至约2;约1至约1.5;约1.5至约7;约1.5至约6.5;约1.5至约6;约1.5至约5.5;约1.5至约5;约1.5至约4.5;约1.5至约4;约1.5至约3.5;约1.5至约3;约1.5至约2.5;约1.5至约2;约2至约7;约2至约6.5;约2至约6;约2至约5.5;约2至约5;约2至约4.5;约2至约4;约2至约3.5;约2至约3;约2至约2.5;约2.5至约7;约2.5至约6.5;约2.5至约6;约2.5至约5.5;约2.5至约5;约2.5至约4.5;约2.5至约4;约2.5至约3.5;约2.5至约3;约3至约7;约3至约6.5;约3至约6;约3至约5.5;约3至约5;约3至约4.5;约3至约4;约3至约3.5;约3.5至约7;约3.5至约6.5;约3.5至约6;约3.5至约5.5;约3.5至约5;约3.5至约4.5;约3.5至约4;约4至约7;约4至约6.5;约4至约6;约4至约5.5;约4至约5;约4至约4.5;约4.5至约7;约4.5至约6.5;约4.5至约6;约4.5至约5.5;约4.5至约5;约5至约7;约5至约6.5;约5至约6;约5至约5.5;约5.5至约7;约5.5至约6.5;约5.5至约6;约6至约7;约6至约6.5;和约6.5至约7。在一些实施方案中,所述方法包括将裂解细胞组合物的pH降低到约0.5至约6。

[0074] 在一些实施方案中,所述方法包括通过以如下的量添加酸而将裂解细胞组合物去乳化:按重量(或体积)计细胞培养液(cell broth)或裂解细胞组合物的约0.5%至约20%,约0.5%至约15%,约0.5%至约10%,约0.5%至约9%,约0.5%至约8%,约0.5%至约7%,约0.5%至约6%,约0.5%至约5%,约0.5%至约4%,约0.5%至约3%,约0.5%至约2%,和约0.5%至约1%。在一个实施方案中,所述方法包括通过以按重量(或体积)计裂解细胞组合物的约0.5%至约20%的量添加酸而将裂解细胞组合物去乳化。

[0075] 在一些实施方案中,所述方法包括将裂解和去乳化步骤组合在一起以形成一步裂解及去乳化步骤。

[0076] 在一些实施方案中,所述方法包括将裂解和去乳化步骤组合在一起以形成一步裂



解及去乳化步骤,其包括添加至少一种上述的酶以获得去乳化的裂解细胞组合物。在其他实施方案中,用适于形成去乳化的裂解细胞组合物的至少一种酶来裂解所述细胞。在一些实施方案中,合适的酶是上文已描述用于获得去乳化的裂解细胞组合物的酶。

[0077] 在一些实施方案中,所述乳化剂是去污剂。在一些实施方案中,所述乳化剂为表面活性剂。在一些实施方案中,在裂解之前、过程中,或之后添加乳化剂。在一个实施方案中,在裂解之后添加乳化剂。在一些实施方案中,将乳化剂添加至裂解细胞组合物。本文中所用的术语“乳化剂”意指使乳液稳定的物质。乳化剂选自离子性乳化剂、非离子性乳化剂,及其组合。在一些实施方案中,所述乳化剂是离子性乳化剂。

[0078] 在一些实施方案中,离子性乳化剂选自阴离子乳化剂、阳离子乳化剂,及其组合。在一些实施方案中,阴离子乳化剂可以是阴离子硫酸盐乳化剂,例如烷基硫酸盐(例如月桂基硫酸铵、月桂基硫酸钠(SLS)/十二烷基硫酸钠(SDS),及其组合),烷基醚硫酸盐(例如月桂醇聚醚(laureth)硫酸钠/月桂基醚硫酸钠、肉豆蔻醇聚醚硫酸钠,及其组合),及其组合;阴离子磺酸盐乳化剂,例如多库酯盐(docusate)(例如磺基琥珀酸二辛酯钠、磺酸盐氟表面活性剂(例如全氟辛烷磺酸盐和全氟丁烷磺酸盐)、烷基苯磺酸盐,及其组合);阴离子磷酸盐乳化剂(例如烷基芳基醚磷酸盐、烷基醚磷酸盐,及其组合);阴离子羧酸盐乳化剂(例如烷基羧酸盐(如硬脂酸钠、月桂酰肌氨酸钠(sodium lauroyl sarcosinate)、羧酸盐氟表面活性剂(例如全氟壬酸盐、全氟辛酸盐,及其组合)),及其组合);及其组合。在一些实施方案中,乳化剂是阴离子乳化剂。在一个实施方案中,阴离子乳化剂选自阴离子硫酸盐乳化剂、阴离子磺酸盐乳化剂、阴离子磷酸盐乳化剂、阴离子羧酸盐乳化剂,及其组合。在另一个实施方案中,阴离子乳化剂是阴离子硫酸盐乳化剂。在又一个实施方案中,阴离子硫酸盐乳化剂选自月桂基硫酸铵、十二烷基硫酸钠、月桂醇聚醚硫酸钠、月桂基醚硫酸钠、肉豆蔻醇聚醚硫酸钠,及其组合。在又一个实施方案中,阴离子硫酸盐乳化剂是十二烷基硫酸钠。

[0079] 在一些实施方案中,阳离子乳化剂可以是pH依赖性伯胺;pH依赖性仲胺;pH依赖性叔胺;奥替尼啶二盐酸盐(octenidine dihydrochloride);永久性带电荷季铵阳离子(例如烷基三甲基铵盐(例如鲸蜡基三甲基溴化铵(cetyl trimethylammonium bromide)(CTAB)/十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide)、鲸蜡基三甲基氯化铵(CTAC),及其组合),鲸蜡基氯化吡啶(pyridinium)(CPC)、苯扎氯铵(benzalkonium chloride,BAC)、苜索氯铵(benzethonium chloride,BZT)、5-溴-5-硝基-1,3-二噁烷、二甲基双十八烷基氯化铵、双十八烷基二甲基溴化铵(DODAB),及其组合);及其组合。

[0080] 在一些实施方案中,乳化剂的分子量选自500克/摩尔或更低、450克/摩尔或更低、400克/摩尔或更低、350克/摩尔或更低、和300克/摩尔或更低。在进一步的实施方案中,乳化剂的分子量选自250克/摩尔至500克/摩尔、250克/摩尔至450克/摩尔、250克/摩尔至400克/摩尔、250克/摩尔至350克/摩尔、250克/摩尔至300克/摩尔、300克/摩尔至500克/摩尔、300克/摩尔至450克/摩尔、300克/摩尔至400克/摩尔、300克/摩尔至350克/摩尔、350克/摩尔至500克/摩尔、350克/摩尔至450克/摩尔、350克/摩尔至400克/摩尔、400克/摩尔至500克/摩尔、400克/摩尔至450克/摩尔、和450克/摩尔至500克/摩尔。例如,SDS的分子量是288克/摩尔,而CTAB的分子量是364克/摩尔。在又一个实施方案中,乳化剂的分子量选自250克/摩尔至450克/摩尔、250克/摩尔至400克/摩尔、250克/摩尔至350克/摩尔,以及250克/摩尔至300克/摩尔。

[0081] 在一些实施方案中,乳化剂作为粉末添加。在一些实施方案中,乳化剂在溶液中添加,所述溶液具有如下量的乳化剂浓度:5%至50%、5%至45%、5%至40%、5%至35%、5%至30%、10%至50%、10%至45%、10%至40%、10%至35%、10%至30%、15%至50%、15%至45%、15%至40%、15%至35%、15%至30%、20%至50%、20%至45%、20%至40%、20%至35%、20%至30%、25%至50%、25%至45%、25%至40%、25%至35%、25%至30%、30%至50%、30%至45%、30%至40%、和30%至35%。

[0082] 在一些实施方案中,乳化剂(例如以粉末形式或于溶液中)以选自如下的量添加:按重量(或体积)计发酵液或裂解细胞组合物的0.2%至10%、0.2%至9.5%、0.2%至9%、0.2%至8.5%、0.2%至8%、0.2%至7.5%、0.2%至7%、0.2%至6.5%、0.2%至6%、0.2%至5.5%、0.2%至5%、0.2%至4.5%、0.2%至4%、0.2%至3.5%、0.2%至3%、0.2%至2.5%、0.2%至2%、0.2%至1.5%、0.2%至1%、0.2%至0.5%、0.5%至10%、0.5%至9.5%、0.5%至9%、0.5%至8.5%、0.5%至8%、0.5%至7.5%、0.5%至7%、0.5%至6.5%、0.5%至6%、0.5%至5.5%、0.5%至5%、0.5%至4.5%、0.5%至4%、0.5%至3.5%、0.5%至3%、0.5%至2.5%、0.5%至2%、0.5%至1.5%、0.5%至1%、1%至10%、1%至9.5%、1%至9%、1%至8.5%、1%至8%、1%至7.5%、1%至7%、1%至6.5%、1%至6%、1%至5.5%、1%至5%、1%至4.5%、1%至4%、1%至3.5%、1%至3%、1%至2.5%、1%至2%、1%至1.5%、1.5%至10%、1.5%至9.5%、1.5%至9%、1.5%至8.5%、1.5%至8%、1.5%至7.5%、1.5%至7%、1.5%至6.5%、1.5%至6%、1.5%至5.5%、1.5%至5%、1.5%至4.5%、1.5%至4%、1.5%至3.5%、1.5%至3%、1.5%至2.5%、1.5%至2%、2%至10%、2%至9.5%、2%至9%、2%至8.5%、2%至8%、2%至7.5%、2%至7%、2%至6.5%、2%至6%、2%至5.5%、2%至5%、2%至4.5%、2%至4%、2%至3.5%、2%至3%、2%至2.5%、2.5%至10%、2.5%至9.5%、2.5%至9%、2.5%至8.5%、2.5%至8%、2.5%至7.5%、2.5%至7%、2.5%至6.5%、2.5%至6%、2.5%至5.5%、2.5%至5%、2.5%至4.5%、2.5%至4%、2.5%至3.5%、2.5%至3%、3%至10%、3%至9.5%、3%至9%、3%至8.5%、3%至8%、3%至7.5%、3%至7%、3%至6.5%、3%至6%、3%至5.5%、3%至5%、3%至4.5%、3%至4%、和3%至3.5%。在另一个实施方案中,乳化剂(例如以粉末形式或于溶液中)以选自如下的量添加:按重量(或体积)计选自发酵液或裂解细胞组合物的0.2%至5%、0.5%至5%、1%至5%、1.5%至5%、2%至5%、2.5%至5%、和3%至5%。在又一个实施方案中,乳化剂以如下的量添加:按重量计裂解细胞组合物的0.2%至10%。

[0083] 在一些实施方案中,乳化剂降低发酵液或裂解细胞组合物的界面张力(即表面张力)。如本文所使用的,术语“界面张力”或“表面张力”意指作用于二相之间的界面处一米长的假想线(imaginary line one meter in length)上的力。在一些实施方案中,由乳化剂所形成的乳液的界面张力比由内源性材料所形成的乳液更低。在一些实施方案中,界面张力可以按达因/厘米(dynes/cm)来测量。

[0084] 在一些实施方案中,乳化剂增加发酵液或裂解细胞组合物的 $\zeta$ 电位(zeta potential)绝对值(即提高正 $\zeta$ 电位或是降低负 $\zeta$ 电位)。在一些实施方案中,添加阴离子乳化剂能导致发酵液或裂解细胞组合物的 $\zeta$ 电位下移(即降低正 $\zeta$ 电位或是提高负 $\zeta$ 电位)。在一些实施方案中,添加阳离子乳化剂能导致发酵液或裂解细胞组合物的 $\zeta$ 电位上移(即提高正 $\zeta$ 电位或是降低负 $\zeta$ 电位)。如本文所用的,术语“ $\zeta$ 电位”意指乳液中粒子之间的电动电位。

在一些实施方案中,ζ电位可以按mV来测量。在一些实施方案中,由乳化剂所形成的乳液的ζ电位的绝对值比由内源性材料形成的乳液更高。

[0085] 在一些实施方案中,添加离子性乳化剂产生水包油乳液。在一些实施方案中,水包油乳液包括但不限于,油、水、以及离子性乳化剂。

[0086] 在一些实施方案中,所述形成去乳化的裂解细胞组合物方法还包括提升所述裂解细胞组合物的pH。在一些实施方案中,通过向裂解细胞组合物添加碱来提升pH。可用于将裂解细胞组合物去乳化的碱与上文所述的那些相同。在一些实施方案中,pH选自约7.5或以上;约8或以上;约9或以上;约10或以上;约11或以上;以及约12或以上。在其他实施方案中,所述pH选自7至13;7至12;7至11;7至10;7至9;7至8;8至13;8至12;8至11;8至10;8至9;9至13;9至12;9至11;9至10;10至13;10至12;和10至11。在一些实施方案中,所述pH选自9至11。

[0087] 在一些实施方案中,所述方法还包括向裂解细胞组合物添加盐。术语“盐”意指离子性化合物,其通过用金属(例如,碱金属、碱土金属,及过渡金属)或带正电荷的化合物(例如 $\text{NH}_4^+$ )代替来自酸的氢离子而形成。在一些实施方案中,盐类可以是碱金属盐、碱土金属盐、硫酸盐,或其组合。盐中存在的带负电荷的离子的种类包括但不限于:卤化物、硫酸根、硫酸氢根、亚硫酸根,磷酸根、磷酸氢根、磷酸二氢根、碳酸根、碳酸氢根,及其组合。在一些实施方案中,盐选自:氯化钠、硫酸钠、碳酸钠、氯化钙、硫酸钾、硫酸镁、谷氨酸一钠、硫酸铵、氯化钾、氯化铁、硫酸铁、硫酸铝、乙酸铵,及其组合。在一些实施方案中,盐不包括NaOH。盐可以作为固体(例如以结晶、无定形的、团状的(pelletized),和/或颗粒形式)和/或含例如水的溶液(例如稀释溶液、饱和溶液,或过饱和溶液)添加。

[0088] 在一些实施方案中,以如下量添加盐:5g/l至25g/l、5g/l至10g/l、10g/l至15g/l、15g/l至20g/l、20g/l至25g/l、或10g/l至20g/l。

[0089] 在其他实施方案中,盐以如下量添加至裂解细胞组合物:按重量(或体积)计是裂解细胞组合物的20%或更少,15%或更少,10%或更少,7.5%或更少,5%或更少,或2%或更少。在一些实施方案中,盐以如下量添加至该裂解细胞组合物:按重量(或体积)计细胞裂解组合物(例如总培养液重量(或体积))的约0.05%至约20%、约0.1%至约20%、约0.1%至约15%、约0.1%至约10%、约0.5%至约20%、约0.5%至约15%、约0.5%至约10%、约0.5%至约5%、约0.5%至约4%、约0.5%至约3%、约0.5%至约2.5%、约0.5%至约2%、约0.5%至约1.5%、约0.5%至约1%、约1%至约20%、约1%至约15%、约1%至约10%、约1%至约5%、约1%至约4%、1%至约3%、约1%至约2.5%、约1%至约2%、约1%至约1.5%、约1.5%至约5%、约1.5%至约4%、约1.5%至约3%、约1.5%至约2.5%、约1.5%至约2%、约2%至20%、约2%至约15%、约2%至约10%、约2%至约5%、约2%至约4%、约2%至约3%、约2%至约2.5%、约2.5%至约5%、约2.5%至约4%、约2.5%至约3%、约3%至约5%、约3%至约4%、约4%至约5%、约5%至约20%、约5%至约15%、约5%至约10%、约10%至约20%、约10%至约15%、或约15%至约20%。例如,当裂解细胞组合物重量为1,000kg时,以按重量(或体积)计0.5%至20%的量添加的盐需要添加5kg至200kg的盐至该裂解细胞组合物。在一些实施方案中,盐以如下量添加至该裂解细胞组合物:按重量(或体积)计所述裂解细胞组合物的约0.05%至约20%、按重量(或体积)约0.1%至约20%、按重量(或体积)约0.5%至约15%,或按重量(或体积)约2%至约10%。

[0090] 在一些实施方案中,所述方法还包括在裂解细胞之前、过程中或之后进行加热。在

一些实施方案中,所述加热在添加乳化剂之前、添加乳化剂过程中、或添加乳化剂之后、添加盐之前、添加盐过程中、或添加盐之后、或其组合来进行。在一些实施方案中,所述方法包括将裂解细胞组合物和/或细胞加热到至少10℃、至少20℃、至少25℃、至少30℃、至少35℃、至少40℃、至少45℃、至少50℃、至少55℃、至少60℃、至少65℃、至少70℃、至少75℃、至少80℃、至少85℃、至少90℃、至少95℃、或至少100℃。在其他实施方案中,所述方法包括将裂解细胞组合物和/或细胞加热到约10℃至约100℃、约10℃至约90℃、约10℃至约80℃、约10℃至约70℃、约20℃至约100℃、约20℃至约90℃、约20℃至约80℃、约20℃至约70℃、约30℃至约100℃、约30℃至约90℃、约30℃至约80℃、约30℃至约70℃、约40℃至约100℃、约40℃至约90℃、约40℃至约80℃、约50℃至约100℃、约50℃至约90℃、约50℃至约80℃、约50℃至约70℃、约60℃至约100℃、约60℃至约90℃、约60℃至约80℃、约70℃至约100℃、约70℃至约90℃、约80℃至约100℃、约80℃至约90℃、或约90℃至约100℃。在进一步的实施方案中,所述方法包括将裂解细胞组合物加热到约60℃至约100℃、约70℃至约100℃、约70℃至约90℃、约80℃至约100℃、约80℃至约90℃、或约90℃至约100℃。在更进一步的实施方案中,所述方法包括将裂解细胞组合物加热到至少60℃、至少70℃、至少75℃、至少80℃、至少85℃、至少90℃、至少95℃、或至少100℃。

[0091] 在一些实施方案中,将裂解细胞组合物加热足够的时间以将所述裂解细胞组合物去乳化。

[0092] 在一些实施方案中,细胞和/或裂解细胞组合物可以在密闭系统中或具有蒸发器的系统中进行加热。在一些实施方案中,细胞和/或裂解细胞组合物可以在具有蒸发器的系统中进行加热,从而通过蒸发来去除该细胞和/或该裂解细胞组合物中存在的一部分水。在一些实施方案中,方法包括在具有蒸发器的系统中加热细胞和/或裂解细胞组合物以去除按重量(或体积)计多至1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%的该细胞和/或裂解细胞组合物中存在的水。在一些实施方案中,方法包括在具有蒸发器的系统中加热细胞和/或裂解细胞组合物以去除按重量(或体积)计1%至50%、1%至45%、1%至40%、1%至35%、1%至30%、1%至25%、1%至20%、1%至15%、1%至10%、1%至5%、5%至50%、5%至45%、5%至40%、5%至35%、5%至30%、5%至25%、5%至20%、5%至15%、5%至10%、10%至50%、10%至45%、10%至40%、10%至35%、10%至30%、10%至25%、10%至20%、10%至15%、15%至50%、15%至45%、15%至40%、15%至35%、15%至30%、15%至25%、15%至20%、20%至50%、20%至45%、20%至40%、20%至35%、20%至30%、20%至25%、25%至50%、25%至45%、25%至40%、25%至35%、25%至30%、30%至50%、30%至45%、30%至40%、30%至35%、35%至50%、35%至45%、35%至40%、40%至50%、40%至45%、或45%至50%的水。

[0093] 在一些实施方案中,使裂解细胞组合物经受乳化剂、碱、盐、热以及搅拌中的一种或多种以形成去乳化的裂解细胞组合物。

[0094] 在一些实施方案中,所述方法包括将含有微生物油的未洗涤的裂解细胞去乳化以形成未洗涤的去乳化的溶解细胞组合物;然后从所述未洗涤的去乳化的裂解细胞组合物分离所述油。未洗涤的去乳化的裂解细胞组合物意指这样的方法,其中例如不用水或缓冲液(其随后通过例如离心除去)洗涤裂解细胞组合物。洗涤裂解细胞组合物可减少从细胞获得的油的总产量/收率。

[0095] 在可供选择的实施方案中,所述裂解细胞组合物的洗涤次数可以减少1次、2次、3次或更多次。在一些实施方案中,洗涤不超过1次、2次,或3次。

[0096] 在一些实施方案中,形成裂解细胞组合物、添加乳化剂至裂解细胞组合物、使裂解细胞组合物接触碱或提升裂解细胞组合物的pH、使裂解细胞组合物接触盐、加热裂解细胞组合物、以及搅拌裂解细胞组合物的各种组合可以在单一器皿中进行。在一些实施方案中,形成细胞、使细胞接触碱或提升细胞的pH、添加乳化剂至裂解细胞组合物、使细胞接触盐、加热细胞,以及搅拌细胞的各种组合可以在单一器皿中进行。在一些实施方案中,所述单一器皿包括发酵器皿。在一些实施方案中,所述发酵器皿可具有20,000升、至少50,000升、至少100,000升、至少120,000升、至少150,000升、至少200,000升、或至少220,000升的容积。在一些实施方案中,所述发酵器皿可具有20,000升至220,000升、20,000升至100,000升、20,000升至50,000升、50,000升至220,000升、50,000升至150,000升、50,000升至100,000升、100,000升至220,000升、100,000升至150,000升、100,000升至120,000升、150,000升至220,000升、150,000升至200,000升、或200,000升至220,000升的容积。

[0097] 在一些实施方案中,可将在器皿中形成的一定量的细胞和/或裂解细胞组合物转移至一个或多个搅拌器皿中。在一些实施方案中,所述搅拌器皿可具有至少20,000升、至少30,000升、至少40,000升或至少50,000升的容积。在一些实施方案中,所述搅拌器皿可具有20,000升至50,000升、20,000升至40,000升、20,000升至30,000升、30,000升至50,000升、30,000升至40,000升或40,000升至50,000升的容积。

[0098] 一般而言,本文所述的方法不利用有机溶剂来从微生物细胞获得、分离,或者以其他方式回收微生物油。在一些实施方案中,从微生物细胞获得微生物油时不使用有机溶剂。在另一个实施方案中,在本文所述方法的过程中,不将有机溶剂以足以获得微生物油的量或浓度的添加至细胞、裂解细胞组合物,和/或油。有机溶剂包括极性溶剂、非极性溶剂、水混溶溶剂、水不混溶溶剂,及其组合。

[0099] 在一些实施方案中,所述方法还包括从去乳化的裂解细胞组合物分离油。在一些实施方案中,所述方法包括通过将去乳化的裂解细胞组合物离心而从该去乳化的裂解细胞组合物分离油。在一些实施方案中,通过允许去乳化的裂解细胞组合物静置而从该去乳化的裂解细胞组合物分离油,其中所述油是使用重力从该去乳化的裂解细胞组合物分离的(例如作为分离层)。在一些实施方案中,分离通过亲脂性膜实现。在一些实施方案中,所述分离包括在10℃至100℃的温度离心。在一些实施方案中,通过如下从去乳化的裂解细胞组合物分离所述油:首先提升pH至中性(例如通过添加如上所述的碱),然后离心该去乳化的裂解细胞组合物以获得该油。

[0100] 在一些实施方案中,所述方法包括从去乳化的裂解细胞组合物分离油,所述分离是通过在至少10℃、至少20℃、至少25℃、至少30℃、至少35℃、至少40℃、至少45℃、至少50℃、至少55℃、至少60℃、至少65℃、至少70℃、至少75℃、至少80℃、至少85℃、至少90℃、至少95℃、或至少100℃的温度离心所述去乳化的裂解细胞组合物来进行的。在一些实施方案中,所述方法包括从去乳化的裂解细胞组合物分离油,所述分离是通过在10℃至100℃、10℃至90℃、10℃至80℃、20℃至100℃、20℃至90℃、20℃至80℃、25℃至100℃、25℃至90℃、25℃至80℃、25℃至75℃、30℃至100℃、30℃至90℃、30℃至80℃、40℃至100℃、40℃至90℃、40℃至80℃、50℃至100℃、50℃至90℃、50℃至80℃、50℃至70℃、60℃至100℃、60℃至

90℃、60℃至80℃、60℃至70℃、70℃至100℃、70℃至90℃、70℃至80℃、80℃至100℃、80℃至90℃、或90℃至100℃的温度离心所述去乳化的裂解细胞组合物来进行的。

[0101] 在一些实施方案中,离心是以1千克每分钟(kg/min)至500kg/分钟、1kg/分钟至400kg/分钟、1kg/分钟至300kg/分钟、1kg/分钟至200kg/分钟、1kg/分钟至100kg/分钟、1kg/分钟至75kg/分钟、1kg/分钟至50kg/分钟、1kg/分钟至40kg/分钟、1kg/分钟至30kg/分钟、1kg/分钟至25kg/分钟、1kg/分钟至10kg/分钟、10kg/分钟至500kg/分钟、10kg/分钟至400kg/分钟、10kg/分钟至300kg/分钟、10kg/分钟至200kg/分钟、10kg/分钟至100kg/分钟、10kg/分钟至75kg/分钟、10kg/分钟至50kg/分钟、10kg/分钟至40kg/分钟、10kg/分钟至30kg/分钟、20kg/分钟至500kg/分钟、20kg/分钟至400kg/分钟、20kg/分钟至300kg/分钟、20kg/分钟至200kg/分钟、20kg/分钟至100kg/分钟、20kg/分钟至75kg/分钟、20kg/分钟至50kg/分钟、20kg/分钟至40kg/分钟、20kg/分钟至30kg/分钟、25kg/分钟至500kg/分钟、25kg/分钟至400kg/分钟、25kg/分钟至300kg/分钟、25kg/分钟至200kg/分钟、25kg/分钟至100kg/分钟、25kg/分钟至75kg/分钟、25kg/分钟至50kg/分钟、30kg/分钟至60kg/分钟、30kg/分钟至50kg/分钟、30kg/分钟至40kg/分钟、50kg/分钟至500kg/分钟、100kg/分钟至500kg/分钟、或200kg/分钟至500kg/分钟的(去乳化的裂解细胞组合物进入离心机的)进料速率进行的。

[0102] 在一些实施方案中,所述方法包括以1,000g至25,000g、1,000g至20,000g、1,000g至10,000g、2,000g至25,000g、2,000g至20,000g、2,000g至15,000g、3,000g至25,000g、3,000g至20,000g、5,000g至25,000g、5,000g至20,000g、5,000g至15,000g、5,000g至10,000g、5,000g至8,000g、10,000g至25,000g、15,000g至25,000g、或至少1,000g、至少2,000g、至少4,000g、至少5,000g、至少7,000g、至少8,000g、至少10,000g、至少15,000g、至少20,000g、或至少25,000g的离心力对去乳化的裂解细胞组合物进行离心。如本文所用的,“g”意指标准重力或约 $9.8\text{m/s}^2$ 。在一些实施方案中,所述方法包括以4,000rpm至14,000rpm、4,000rpm至10,000rpm、6,000rpm至14,000rpm、6,000rpm至12,000rpm、8,000rpm至14,000rpm、8,000rpm至12,000rpm、或8,000rpm至10,000rpm离心去乳化的裂解细胞组合物。

[0103] 在一些实施方案中,可以通过例如倾析、撇除(skimming)、真空处理、泵送、吸取(sucking off)、抽取(drawing off)、虹吸(siphoning),或以其他方式从分离的组合物表面回收微生物油来回收所述油。

[0104] 在一些实施方案中,所述方法包括将回收的油进行干燥以从该油去除水。在一些实施方案中,干燥该油可包括但不限于加热该油以蒸发水。在一些实施方案中,干燥后所述油具有按油的重量(或体积)百分比计为低于3%、低于2.5%、低于2%、低于1.5%、低于1%、低于0.5%、低于0.1%、或0%的水含量。在一些实施方案中,干燥后所述油具有按油的重量(或体积)百分比计为0%至3%、0%至2.5%、0%至2%、0%至1.5%、0%至1%、0%至0.5%、0.1%至3%、0.1%至2.5%、0.1%至2%、0.1%至1.5%、0.1%至1%、0.1%至0.5%、0.5%至3%、0.5%至2.5%、0.5%至2%、0.5%至1.5%、0.5%至1%、1%至3%、1%至2.5%、1%至2%、1%至1.5%、1.5%至3%、1.5%至2.5%、1.5%至2%、2%至3%、2%至2.5%、或2.5%至3%的水含量。

[0105] 本发明公开了可以通过本文所述任一种方法从微生物细胞获得的微生物油。在一些实施方案中,所述油包含按重量(或体积)计至少30%的花生四烯酸。在一些实施方案中,所述油包含按重量(或体积)计至少30%的二十二碳六烯酸。

[0106] 茴香胺值(AV)根据AOCS官方方法Cd 18-90来确定。在一个实施方案中,本文所述的油具有低于约50;低于约40;低于约30;低于约20;低于约15;或低于约10的AV。在一些实施方案中,所述油具有低于约50的AV。术语茴香胺值意指次级反应产物(例如油的氧化过程中产生的醛和酮)的测量值。

[0107] 过氧化物值(PV)根据AOCS官方方法Cd 8-53来确定。在一个实施方案中,本文所述的油具有低于约20meq/kg;低于约10meq/kg;或低于约5meq/kg的PV。在一些实施方案中,所述油具有低于5meq/kg的PV。术语过氧化物值意指初级反应产物(例如油的氧化过程中产生的过氧化物和氢过氧化物)的测量值。如本文所用,过氧化物值以meq/kg测量。

[0108] 在一些实施方案中,所述油具有100ppm或更低、95ppm或更低、90ppm或更低、85ppm或更低、80ppm或更低、75ppm或更低、70ppm或更低、65ppm或更低、60ppm或更低、55ppm或更低、50ppm或更低、45ppm或更低、40ppm或更低、35ppm或更低、30ppm或更低、25ppm或更低、20ppm或更低、15ppm或更低、10ppm或更低、9ppm或更低、8ppm或更低、7ppm或更低、6ppm或更低、5ppm或更低、4ppm或更低、3ppm或更低、2ppm或更低、或1ppm或更低的磷含量。在一些实施方案中,所述油具有约8ppm或更低的磷含量。

[0109] 在一些实施方案中,所述油包含一种或多种PUFA。在一些实施方案中,所述油包含至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少60%、至少70%或至少80%的PUFA(按PUFA重量计)。在一些实施方案中,所述油包含至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少60%、至少70%或至少80%的DHA(按DHA重量计),和/或至少10%、至少15%、或至少20%的DPA n-6(按DPA n-6重量计),和/或至少10%、至少15%、或至少20%的EPA(按EPA重量计),和/或至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、或至少80%的ARA(按ARA重量计)。在一些实施方案中,所述油包含低于50%、低于40%、低于30%、低于20%、低于15%、低于10%、或低于5%的EPA(按EPA重量计)。在一些实施方案中,所述油包含低于50%、低于40%、低于30%、低于20%、低于15%、低于10%、或低于5%的DHA(按DHA重量计)。在一些实施方案中,油包含按重量(或体积)计低于10%、低于5%、低于2%、低于1%、或低于0.5%的固醇类。

[0110] 在一些实施方案中,油包含按重量(或体积)计至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、或50%至95%、50%至90%、50%至85%、50%至80%、50%至75%、60%至95%、60%至90%、60%至85%、70%至95%、70%至90%、70%至85%、75%至95%、75%至90%、或75%至85%的甘油三酯。

[0111] 在一些实施方案中,所述甘油三酯包含按重量(或体积)计至少10%、至少20%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%或至少80%的DHA。在一些实施方案中,所述甘油三酯包含按重量(或体积)计至少10%、至少20%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、或至少80%的ARA。在一些实施方案中,所述甘油三酯包含按重量(或体积)计至少50%、至少40%、至少30%、至少20%、至少15%、至少10%、或至少5%的EPA。

[0112] 在一些实施方案中,通过本文所述方法的任一种获得和/或回收的微生物油是粗制油。在另一个实施方案中,本文所述的油是精制油。“粗制油”是从微生物细胞获得的、未

经进一步加工的油。“精制油”是通过用精制、漂白,和/或脱臭的标准流程处理粗制油所获得的油。参见例如,美国专利No.5,130,242。在一些实施方案中,精制包括但不限于:苛性精制法(caustic refining)、脱胶、酸处理、碱处理、冷却、加热、漂白、脱臭、脱酸,及其组合。

[0113] 在一些实施方案中,所述方法包括浓缩包含微生物细胞的发酵液。在一些实施方案中,该方法包括浓缩裂解细胞组合物。如本文使用的,“浓缩”意指从组合物去除水。浓缩可以包括但不限于,蒸发、化学干燥、离心等等,及其组合。在一些实施方案中,将细胞组合物或裂解细胞组合物浓缩以提供按所述组合物的重量(或体积)计至少4%,至少5%,至少10%,至少15%,至少20%,至少25%,或至少30%的油浓度。在一些实施方案中,将细胞组合物或裂解细胞组合物浓缩以提供按所述组合物的重量(或体积)计4%至40%、4%至30%、4%至20%、4%至15%、5%至40%、5%至30%、5%至20%、10%至40%、10%至30%、10%至20%、15%至40%、15%至30%、20%至40%、20%至30%、25%至40%、或30%至40%的油浓度。

[0114] 供本发明使用的微生物细胞的有效培养条件包括但不限于,允许生产油的有效培养基、生物反应器、温度、pH、以及氧条件。有效的培养基是指任何这样的培养基,其中通常培养微生物细胞,例如破囊壶菌目微生物细胞。此类培养基通常包含水性基质,其具有可同化的碳源、氮源、与磷酸盐源,以及适当的盐、矿物质、金属,及其他营养物,如维生素。供本发明使用的微生物细胞可以培养于常规的发酵生物反应器、摇瓶、试管、微滴定盘,以及培养皿(petri plate)内。

[0115] 在一些实施方案中,微生物细胞包含按重量(或体积)计至少30%的油,按重量(或体积)计至少35%的油,按重量(或体积)计至少40%的油,按重量(或体积)计至少50%的油,按重量(或体积)计至少60%的油,按重量(或体积)计至少70%的油,或按重量(或体积)计至少80%的油。在一些实施方案中,供本发明使用的微生物细胞能够产生至少0.1克每升每小时(g/L/h)的DHA,至少0.2g/L/h的DHA,至少0.3g/L/h的DHA,或至少0.4g/L/h的DHA。在一些实施方案中,供本发明使用的微生物细胞能够产生至少0.01克每升每小时(g/L/h)的ARA,至少0.05g/L/h的ARA,至少0.1g/L/h的ARA,至少0.2g/L/h的ARA,至少0.3g/L/h的ARA,或至少0.4g/L/h的ARA。

[0116] 在一些实施方案中,根据本文所述方法的任一种而获得的油、用过的生物质,或其组合可以直接地用作食品或食品成分,如儿童食品,婴儿配方、饮料、酱汁、基于乳品的食品(例如奶、酸乳、奶酪与冰淇淋)、油类(例如烹调油(cooking oil)或色拉调味汁(salad dressing)),以及烘焙食物;营养补充剂(例如以胶囊或片剂形式);用于任何非人动物(例如其产物(例如肉、奶、或蛋)供人消耗的那些)的饲料或饲料补充剂;食物补充剂;以及药物(于直接或附加疗法应用中)中的成分。术语“动物”意指属于动物界(kingdom Animalia)的任何生物,且包括任何人类动物,和由其得到产品(例如奶、蛋、禽肉、牛肉、猪肉或羊肉)的非人动物。在一些实施方案中,该油和/或生物质可以用于海产食品中。海产食品来源于,但不限于鱼、虾与贝类。术语“产物”包括由此类动物得到的任何产品,包括但不限于肉、蛋、奶或其他产物。当将该油和/或生物质喂予此类动物时,多不饱和油可并入此类动物的肉、奶、蛋或其它产品中以增加这些油中它们的含量。



## 实施例

### [0117] 实施例1

[0118] 将含有微生物细胞(裂殖壶菌属菌种(Schizochytrium sp.))的未洗涤的细胞培养液(500-700kg)于60℃巴氏消毒1小时。通过添加50wt%NaOH溶液以将培养液的pH调整至7.2-7.5,和按培养液重量计0.5%的**Alcalase®**2.4FG(可从Novozymes(Franklinton,NC)得到)并于55-60℃搅拌2小时,来裂解细胞。通过如下将裂解细胞组合物去乳化:用窄叶片水翼叶轮以190-221RPM连续搅拌组合物;添加50wt.%NaOH以将pH调整至4;添加按组合物重量计2%的NaCl;并加热至90℃。在90℃数小时后,通过如下从去乳化的裂解细胞组合物分离微生物油:以1750RPM将组合物离心(Seital SR 1010(Seital srl,Italy))以提供粗制油,其(平均)产出76.47%的DHA(以DHA重量计)。

### [0119] 实施例2

[0120] 将含有微生物细胞(裂殖壶菌属菌种)的未洗涤的细胞培养液(500-700kg)于60℃巴氏消毒1小时。通过如下形成去乳化的裂解细胞组合物:添加按培养液重量计1.5%的98%硫酸溶液以将pH调整至1.6-2.1并加热至90℃,同时用窄叶片水翼叶轮和加热用水(water for heating)以190-221RPM搅拌。在90℃数小时后,通过如下从去乳化的裂解细胞组合物分离微生物油:添加50wt.%NaOH以将pH调整至中性(6.5至8.5)并以1750RPM将组合物离心(Seital SR 1010(Seital srl,Italy))以提供粗制油,其(平均)产出84.57%的DHA(以DHA重量计)。

### [0121] 实施例3

[0122] 将含有微生物细胞(裂殖壶菌属菌种)的未洗涤的细胞培养液(500-700kg)于60℃巴氏消毒1小时。通过如下形成去乳化的裂解细胞组合物:添加按培养液重量计1.5%的98%硫酸溶液以将pH调整到1.6至2.1并加热至90℃,同时用窄叶片水翼叶轮和加热用蒸汽以221RPM搅拌。在90℃数小时后,通过如下从去乳化的裂解细胞组合物分离微生物油:添加50wt.%NaOH以将pH调整至中性(6.5至8.5)并以1750RPM将组合物离心(Seital SR 1010(Seital srl,Italy))以提供粗制油,其产出87.08%的DHA(以DHA重量计)。

### [0123] 实施例4

[0124] 将含有微生物细胞(裂殖壶菌属菌种)的未洗涤的细胞培养液(500-700kg)于60℃巴氏消毒1小时。通过如下形成去乳化的裂解细胞组合物:添加按培养液重量计4%的98%硫酸溶液以将pH调整为<1.0然后加热至90℃,同时用窄叶片水翼叶轮和加热用水或蒸汽以151-190RPM搅拌。在90℃数小时后,通过如下从去乳化的裂解细胞组合物分离微生物油:添加50wt.%NaOH以将pH调整至中性(6.5至8.5)并以1750RPM将组合物离心(Seital SR 1010(Seital srl,Italy))以提供粗制油,其(平均)产出93.61%的DHA(以DHA重量计)。

### [0125] 实施例5

[0126] 将含有微生物细胞(裂殖壶菌属菌种)的未洗涤的细胞培养液(500-700kg)于60℃巴氏消毒1小时。通过如下裂解细胞:添加50wt%NaOH溶液以将pH调整到7.2至7.5,和按培养液重量计0.5%的**Alcalase®**2.4FG(可从Novozymes(Franklinton,NC)得到),并于55-60℃搅拌2小时。通过如下将裂解细胞组合物去乳化:用窄叶片水翼叶轮和加热用水或蒸汽以221RPM连续搅拌组合物;添加50wt.%NaOH以将pH调整至10.5;添加按组合物重量计2%的NaCl;以及加热至90℃。在90℃数小时后,通过如下从去乳化的裂解细胞组合物分离微生物

油:以1750RPM将组合物离心(Seital SR 1010(Seital srl,Italy))以提供粗制油,其(平均)产出72.77%的DHA(以DHA重量计)。

[0127] 实施例6

[0128] 将含有微生物细胞(裂殖壶菌属菌种)的未洗涤的细胞培养液(500-700kg)于60℃巴氏消毒1小时。通过如下裂解细胞:添加50wt%NaOH溶液以将pH调整到7.2至7.5,和按培养液重量计0.5%的Alcalase® 2.4FG(可从Novozymes (Franklinton,NC)得到),并于55-60℃搅拌8小时同时将pH控制在7.2-7.5。通过如下将裂解细胞组合物去乳化:用窄叶片水翼叶轮和加热水或蒸汽以221RPM连续搅拌组合物;添加50wt.%NaOH以将pH调整至10.5;添加按组合物重量计2%的NaCl;以及加热至90℃。在90℃数小时后,通过如下从去乳化的裂解细胞组合物分离微生物油:添加50wt.%NaOH以将pH调整至中性(6.5至8.5)并以1750RPM将组合物离心(Seital SR 1010(Seital srl,Italy))以提供粗制油,其(平均)产出85.28%的DHA(以DHA重量计)。

[0129] 实施例7

[0130] 将含有微生物细胞(裂殖壶菌属菌种)的未洗涤的细胞培养液(500-700kg)于60℃巴氏消毒1小时。通过如下步骤裂解细胞:添加50wt%NaOH溶液以将pH调整到7.2至7.5,和按培养液重量计0.5%的Alcalase® 2.4FG(可从Novozymes (Franklinton,NC)得到),并于55-60℃搅拌2小时同时控制pH。通过如下将裂解细胞组合物去乳化:用窄叶片水翼叶轮和加热水或蒸汽以221RPM连续搅拌组合物;添加50wt.%NaOH以将pH调整至10.5;添加按组合物重量计2%的NaCl;以及加热至90℃。在90℃数小时后,通过如下从去乳化的裂解细胞组合物分离微生物油:添加50wt.%NaOH以将pH调整至中性(6.5至8.5)并以1750RPM将组合物离心(Seital SR 1010(Seital srl,Italy))以提供粗制油,其(平均)产出81.12%的DHA(以DHA重量计)。

[0131] 实施例8

[0132] 将含有微生物细胞(裂殖壶菌属菌种)的未洗涤的细胞培养液(500-700kg)于60℃巴氏消毒1小时。通过如下裂解细胞:添加50wt%NaOH溶液以将pH调整到7.2至7.5,和按培养液重量计0.5%的Alcalase® 2.4FG(可从Novozymes (Franklinton,NC)得到),并于55-60℃搅拌2小时。通过如下将裂解细胞组合物去乳化:用窄叶片水翼叶轮以221RPM连续搅拌组合物;添加50wt.%NaOH以将pH调整至10.5;添加按组合物重量计2%的NaCl;以及加热至90℃。在90℃数小时后,将50wt.%NaOH添加至组合物以将pH重新调整至9-10.5并将组合物伴随搅拌保持在90℃数小时。通过如下从去乳化的裂解细胞组合物分离微生物油:以1750RPM将组合物离心(Seital SR 1010(Seital srl,Italy))以提供粗制油,其(平均)产出86.57%的DHA(以DHA重量计)。

[0133] 实施例9

[0134] 将含有微生物细胞(裂殖壶菌属菌种)的未洗涤的细胞培养液(500-700kg)于60℃巴氏消毒1小时。通过如下裂解细胞:添加50wt%NaOH溶液以将pH调整到7.2至7.5,和按培养液重量计0.5%的Alcalase® 2.4FG(可从Novozymes (Franklinton,NC)得到),并于55-60℃搅拌2小时。通过如下将裂解细胞组合物去乳化:用窄叶片水翼叶轮以221RPM连续搅拌组合物;添加按培养液重量计2.5%的50%NaOH溶液以将pH调整至11.8;添加按组合物重量计

2%的NaCl;以及加热至90℃。在90℃数小时后,将50wt.%NaOH添加至组合物以将pH重新调整至10.5并将组合物伴随搅拌保持在90℃。再过数小时后,通过如下从去乳化的裂解细胞组合物分离微生物油:添加50wt.%NaOH以将pH调整至中性(6.5至8.5),并以1750RPM将组合物离心(Seital SR 1010(Seital srl,Italy))以提供粗制油,其(平均)产出>96%的DHA(以DHA重量计)。

[0135] 实施例10

[0136] 将含有微生物细胞(裂殖壶菌属菌种)的未洗涤的细胞培养液(500-700kg)于60℃巴氏消毒1小时。通过如下裂解细胞:添加50wt.%NaOH溶液以将pH调整到7.2至7.5,和按培养液重量计0.5%的**Alcalase®**2.4FG(可从Novozymes(Franklinton,NC)得到),并于55-60℃搅拌2小时。通过如下将裂解细胞组合物去乳化:用窄叶片水翼叶轮以221RPM连续搅拌组合物;添加按培养液重量计2.5%的50%NaOH溶液以将pH调整至11;添加按组合物重量计2%的NaCl;以及加热至90℃。在90℃数小时后,将50wt.%NaOH添加至组合物以将pH重新调整至10.5并将组合物伴随搅拌保持在90℃。再过数小时后,通过如下从去乳化的裂解细胞组合物分离微生物油:以1750RPM将组合物离心(Seital SR 1010(Seital srl,Italy))以提供粗制油。