

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6

B6

本案已向：

美 國 ( 地 區 ) 申 請 專 利 ， 申 請 日 期 ： 案 號 ： ，  有  無 主 張 優 先 權  
2000,01,28 60/178,588

有 關 微 生 物 已 寄 存 於 ： ， 寄 存 日 期 ： ， 寄 存 號 碼 ：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

## 五、發明說明（ 1 ）

### 藉由於發酵槽中真核微生物之極高密度培養獲得 內含多烯酸脂肪酸脂質之擴增產量

#### 本發明之相關領域

本發明係有關於一用於培養微生物並回收微生物的脂質之新穎的方法。特別地，本發明係有關於生產微生物的多元不飽和脂質。

#### 本發明之相關背景

在真核微生物中生產多烯酸脂肪酸（具有2或更多個不飽和 碳-碳 鍵的脂肪酸）一般被認為是需要分子氧氣的存在（即有氧的情況）。這是因為在所有非寄生性真核微生物的脂肪酸中形成的順式（cis）雙鍵，被認為牽涉到一直接需氧的去飽和作用（氧化的微生物去飽和酶系統）。其他已知需要分子氧氣的真核微生物脂質包括有真菌與植物硬脂醇、氧基類胡蘿蔔素（即葉黃素）、輔酶Q與任何由這些脂質所製成的化合物（即二次代謝產物）。

某些真核微生物（譬如藻類；真菌類，包括酵母菌；與原生動物）已被證實為在發酵槽中的多烯酸脂肪酸之良好生產者。然而，極高密度培養（生質（biomass）大於為約 100 克/升，特別是在商業規模下）會導致多烯酸脂肪酸含量的減少，並因此降低多烯酸脂肪酸的生產力。這可能係部分源自於幾個因素，包括有因為在發酵培養湯液中高濃度的微生物的高氧氣需求，導致的高溶氧量維持不易。用於維持高溶氧量的方法包括有增加通氣速率、以及

## 五、發明說明 ( 2 )

/或是使用純氧而非空氣，以及/或是增加發酵槽的攪動速率。這些解決辦法通常會增加生產脂質的成本與發酵設備的資金成本，而且會導致額外的問題。例如，增加通氣作用會在高細胞密度之發酵槽中輕易地導致嚴重的氣泡問題，而增加攪動作用會因為在發酵培養湯液中增加剪力，而導致微生物細胞破裂（這會導致該脂質釋放到將使其被氧化以及/或是被酵素分解的發酵培養湯液中）。微生物細胞破裂對已經進行氮氣限制或耗盡作用以誘發脂質之生成的細胞而言，係一增加的問題，因其導致細胞壁變脆弱。

結果，當生產脂質的真核微生物成長到非常高細胞密度時，其脂質通常僅含有非常少量的多烯酸脂肪酸。例如，油脂酵母 (*Lipomyces starkeyi*) 這種酵母菌在以醇類作為碳源培養 140 小時到 153 克/升 的密度時，所得到的脂質濃度為 83 克/升。然而該酵母菌在濃度大於 100 克/升時，其多烯酸脂肪酸含量僅佔全部脂肪酸的 4.2% (自細胞濃度為 20-30 克/升 時之全部脂肪酸的 11.5% 驟降)。Yamauchi 等人，*J. Ferment. Technol.*, 1983, 61, 275-280。這導致了一個僅有約 3.5 克/升 的多烯酸脂肪酸濃度與只有約 0.025 克/升/小時 的多烯酸脂肪酸生產力。另外，在該酵母菌的脂質中唯一發現的多烯酸脂肪酸只有 C18:2。

另一種酵母菌，紅酵母 (*Rhodotorula glutinus*)，被證實具有約 0.49 克/升/小時 的平均脂質生產力，但在其脂質中之全部的多烯酸脂肪酸含量也是低的 (全部脂肪酸

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

### 五、發明說明 ( 3 )

的 15.8%，14.7% 的 C18:2 與 1.2% 的 C18:3)，導致於持續進行培養的情況下，在批次培養 (fed-batch) 中僅有約 0.047 克/升/小時與 0.077 克/升/小時生產力。

在此之前本發明的發明人之一，已經證實了在破囊壺菌目中，某些海生微生物藻類可以成為發酵槽中很好的多烯酸脂肪酸生產者，特別是當其培養在低鹽分含量以及尤其是在低氯鹽含量下。其他被提及的破囊壺菌 (Thraustochytrids) 在培養 120 小時後達到 59 克/升的細胞密度後，展現了一約 0.158 克/升/小時的平均多烯酸脂肪酸 (DHA, C22:6n-3; 與 DPA, C22:5n-6) 生產力。然而，此種生產力僅在約 50% 的海水中，一種會導致不銹鋼發酵槽嚴重腐蝕的濃度之中達成。

生產含有多烯酸脂肪酸的微生物脂質，特別是該高度不飽和的脂肪酸，如 C18:4n-3、C20:4n-6、C20:5n-3、C22:5n-3、C22:5n-6 與 C22:6n-3，一部分由於該含有高多烯酸脂肪酸真核微生物所能成長到之有限的密度，與在此種高細胞濃度下的有限的氧氣供應，以及欲達成高生產力所需的較高溫度，而使得其花費仍然很高。

因此，對於在有助於增加含有多烯酸脂肪酸脂質生產之高濃度下培養微生物的方法仍然是有需要的。

#### 本發明之簡要說明

本發明提供培養能夠生產其生質之至少大約 20% (biomass) 的脂質的真核微生物之一種方法，以及用於生產該脂質的一個方法。該脂質係較佳地含有一或更多的多

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂  
線

## 五、發明說明 ( 4 )

烯酸脂肪酸。該方法包括加入一碳源，較佳地為一非醇類的碳源，以及一限制營養源，到一含有真核微生物個發酵培養液中。較佳地，該碳源與限制營養源係以一種足以增加該發酵培養液之生質密度到大約 100 克/升的速率來加入。

在本發明的一個態樣中，發酵的條件包含有一生質密度增加時期和一脂質生產時期，其中該生質密度增加時期，包括有加入該碳源和限制營養源，而該脂質生產時期，包括有加入該碳源而不加入該限制營養源以產生生產脂質的狀況條件。

在本發明的另一個態樣中，在脂質生產時期中之發酵培養液中的溶氧量，係較生質密度增加時期之發酵培養液中的溶氧量來的低。

而在本發明的另一個態樣中，微生物係選自藻類、真菌（包括酵母）、原生動物、細菌與其混合物的群組，其中該微生物能夠生產一般被認為其合成是需要分子氧氣的多烯酸脂肪酸或者其他的脂質。本發明之特別有用的微生物，是能夠在不到 3% 飽和濃度的氧氣量之發酵培養液中生產脂質的真核微生物。

仍然是在本發明的另一個態樣中，微生物係培養在一批次培養 (fed-batch) 的過程中。

而仍然在本發明的另一個態樣中，在發酵過程後半部分提供了在發酵培養液中維持不到 3% 飽和濃度的氧氣量。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂  
線

## 五、發明說明 ( 5 )

本發明的另一個具體實施例，提供生產真核微生物脂質的方法，其包括：

(a) 在一個發酵培養湯液中培養真核微生物，以至少增加該發酵培養液的生質密度到約 100 克/升；

(b) 提供使該微生物足以生產該脂質的發酵條件；與

(c) 回收該脂質，

其中超過 15% 的該脂質係為多元不飽和脂質。

本發明的另一個態樣提供了一個脂質回收方法，其包括有：

(d) 自該發酵培養湯液移除水份以取得乾的微生物；並且

(e) 自該乾的微生物分離該脂質。

較佳地，該移除水份的步驟包括在沒有先經離心下，直接一個筒型乾燥器上乾燥該發酵培養液。

本發明的另一個態樣提供一脂質回收方法，包括有：

(d) 以通透化、溶解細胞或打破微生物細胞來處理該發酵培養液；與

(e) 在有或沒有一水溶性溶劑的加入，以幫助一以打破該脂質/水乳狀液的情況下，按比重分離的方式，較佳地為一離心作用，自發酵培養液該脂質。

較佳地，在步驟 (c) 中該微生物細胞係在發酵槽或一類

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂  
線

## 五、發明說明 ( 6 )

似容器中進行處理。

在本發明的進一步態樣中，提供了一個增加微生物的多烯酸脂肪酸含量的一個方法。該方法包括在有不到 10% 溶氧量之一成長培養液中發酵該微生物。

本發明的進一步態樣，係用於生產產品與微生物的一個異營方法。該方法包括有在一培養液中培養含有聚乙酰合成酶基因的微生物，並維持不到約百分之 10 溶氧量。

### 圖示的簡要說明

第 1 圖係為相對於發酵培養液中之溶氧量之各種脂質的微生物生產參數之表和略圖。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 7 )

### 本發明的詳細說明

本發明提供一培養微生物，如藻類、真菌（包括酵母）、原生動物與細菌的方法。較佳地，該微生物係選自藻類、原生動物與其混合物所組成的群組。更佳地，該微生物為藻類。此外，本發明的方法能用於生產許多脂質化合物，特別是不飽和脂質，較佳地為不飽和的脂質（即至少含有 2 個不飽和 碳-碳 鍵的脂質，如雙鍵），與更佳地為高度不飽和脂質（即至少含有 4 個或更多個不飽和 碳-碳 鍵的脂質），譬如奧米加-3 (omega-3;  $\Omega$ -3) 以及/或者奧米加-6 (omega-6;  $\Omega$ -6) 多元不飽和脂肪酸，包括二十二碳六烯酸 (docosahexaenoic, 即 DHA); 與其他自然生成的不飽和，多元不飽和與高度不飽和化合物。在這裡使用的字“脂質”包括有磷脂質；游離脂肪酸；脂肪酸酯；三酸甘油酯；硬脂醇與硬脂醚；類胡蘿蔔素；葉黃素（即氧基類胡蘿蔔素）；碳氫化合物；類異戊二烯 (isoprenoid) 衍生化合物與其他在本領域中之一般技藝所知的脂質。

更特別地，本發明的方法在生產真核微生物多烯酸脂肪酸、類胡蘿蔔素、真菌的硬脂醇、植物的硬脂醇、葉黃素、輔酶Q，與其他一般相信產生不飽和 碳-碳 鍵時需要氧氣（即需氧的條件）的其他類異戊二烯衍生化合物與其二次代謝物時，是很有用的。特別地，本發明的方法對培養會產生多烯酸脂肪酸的微生物與對生產微生物多烯酸脂肪酸而言是很有用的。

但另一方面，本發明的方法能用於培養許多種微生

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂  
線

## 五、發明說明 ( 8 )

物，並獲得由其產生的含有多元不飽和脂質的化合物，為了簡潔、方便與說明的緣故，本發明的詳細描述將討論用以培養具有生產包括奧米加-3 (omega-3 ;  $\Omega$ -3) 以及/或者奧米加-6 (omega-6 ;  $\Omega$ -6) 多元不飽和脂肪酸的脂質之微生物的方法，特別是能生產 DHA (或其相關的化合物，如 DPA、EPA 或 ARA) 的微生物。較佳的微生物包括有微生藻類、真菌 (包括酵母)、原生動物與細菌。較佳的微生物的一個小組是叫作的原生藻菌 (Stramenopile) 的成員，包括微生藻類與藻類類型的微生物。原生藻菌包括有下列的群組的微生物： Hamatores, Proteromonads, 蛙片蟲目 (Opaline), Developayella, Diplophrys, 網黏菌屬 (Labrinthulid), 破囊壺菌 (Thraustochytrids), Biosecids, 卵菌綱 (Oomycetes), Hypochytridiomycetes, Commation, Reticulosphaera, Pelagomonas, Pelagococcus, Ollicola, Aureococcus, Parmales, 等片藻 (Diatoms), 黃藻目 (Xanthophytes), 褐藻目 (Phaeophytes ; 褐藻類), Eustigmatophytes, Raphidophytes, Synurids, Axodines (including Rhizochromulinaa 升 es, Pedinellales, 硅鞭藻目 (Dictyochales)), Chrysomeridales, Sarcinochrysidales, Hydrurales, Hibberdiales 與單鞭金藻目 (Chromulina 升 es)。其他較佳的微生藻類群組包括綠藻類的成員與溝鞭藻 (雙鞭毛蟲目, *dinoflagellate*), 包括渦鞭毛藻屬 (*Crypthecodiu*) 這種屬的成員。更多特別的、更佳的本發明之具體實施例，將參照一培養特別是藻類之海生微生物的方法而加以討

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 9 )

論，如破囊壺菌目的破囊壺菌，更特別地是破囊壺菌屬和裂殖壺菌屬的破囊壺菌目，包括其係揭示於一起讓渡給 Barclay 的美國專利第 5,340,594 與 5,340,742 號之中的破囊壺菌目，其全部在此一併提供作為參考。應該注意的是許多專家同意，吾肯氏壺菌屬不是獨立的屬，而實際上是裂殖壺菌屬的部分。如同在此所使用的，該裂殖壺菌屬將包括吾肯氏壺菌屬。

較佳的微生物是經由聚乙酰 (polyketide) 合成酶系統，生產感興趣之化合物的微生物。此種微生物包括具有一內生性聚乙酰合成酶系統微生物與一以基因工程轉殖入聚乙酰合成酶系統的微生物。聚乙酰是具有各式各樣的生物活性之結構上多樣化的天然產物，包括有抗生素和藥理學上的特性。聚乙酰碳鏈主鏈的生物合成，是由聚乙酰合成酶催化的。就像結構上與機制上相關的脂肪酸合成酶一般，聚乙酰合成酶重複催化在醯基硫酯之間的去羧基縮合作用，在一次的反應中將該碳鏈延伸兩個碳。然而，聚乙酰合成酶不像脂肪酸合成酶一樣，能夠產生較大結構可變異性最終產物。藉由改變在每一個縮合作用後形成的  $\beta$ -酮基 (beta-keto group) 上之還原反應、脫水作用和脂烯醯基的還原作用，以及利用甲基-或乙基-丙二酸 (methyl- or ethyl-malonate) 作為延伸單元，單一聚乙酰合成酶系統，能夠經由使用除了醋酸鹽以外的起始單元進行此作用。在這裡特別感興趣的是由脫水步驟引入的 碳-碳 雙

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

## 五、發明說明（ 10）

鍵，可以被保留在最終產物中。進一步的說，雖然這些雙鍵最初是在反式 (trans) 結構中，但是他們能夠藉由酵素的異構化 (isomerization) 作用，轉變成在 DHA (與其他感興趣的多烯酸脂肪酸) 中發現的順式 (cis) 結構。脫水酶的作用與異構化作用反應都能夠在沒有分子氧氣的情況下發生。

較佳地，依據本發明提供了一用於生產產品與微生物的異營方法。該方法係較佳地包括在一個成長培養液中培養微生物，其中該微生物具有一個聚乙酰合成酶系統。較佳地溶氧量係維持在不到大約百分之 8、更佳地在不到大約百分之 4、再更佳地在不到百分之 3 且又更佳地在不到大約百分之 1

然而，這為了去理解本發明，而非要本發明的整體如此受到局限，依照這裡的討論，習於此藝者將明白，本發明的概念適用於產生許多其他化合物的其他微生物，包括了其他脂質組成物。

假設藻類有一個相對不變的脂質生產速率，很明顯的，更高的生質 (Biomass) 密度將導致每單位體積生產更高總量的脂質。現行一般的藻類培養發酵方法，可以得到 50 到 80 克/升或者更少的生質密度。本發明的發明者發現透過本發明的方法，能夠達到較目前所知的生質密度有意義地更高的生質密度。較佳地，本發明的方法產生至少大約 100 克/升的生質密度，更佳地至少大約 130 克/升，再更佳地至少大約 150 克/升，又更較佳地至少大約 170

## 五、發明說明 ( 11)

克/升且最佳地大於 200 克/升。因此，在這樣的一高生質密度下，即使該藻類的脂質生產率輕微地減少，該脂質每體積的總生產率較目前所知道的方法有意義地更高。

本發明之用於培養破囊壺菌目微生物的方法，包括有藉由足以增加上述之發酵培養液中的生質密度之速率，加入一碳源與一限制養份到含有該微生物的發酵培養液中。如同在這裡使用的一樣，“限制營養源”這個術語係指對於一個對微生物的成長不可或缺的营养源（包括有該營養本身），當限制養分從成長培養液耗盡時，它的缺乏將實質上限制該微生物的進一步生長或者複製。然而，因為其他的營養物仍然充裕，該有機體能夠繼續製造與累積細胞內的與/或細胞外的的產物。藉由選擇特別的限制養分，人們能夠控制累積產物的種類。因此，以某種速率提供限制營養源使得人們能夠同時控制微生物成長速率與所欲產物（例如脂質）的生產或累積。此種在一增加量（increment）中加入一或更多的基質（例如一碳源與限制營養源）的發酵方法，通常稱作一個批次培養（fed-batch）的發酵方法。現已發現當該基質加入至一批次發酵過程（batch fermentation process），該大量出現的碳源（例如大約 200 克/升或超過每 60 克/升的生質密度）對該微生物有一個不利影響。沒有任何理論依據，人們相信此種大量的碳源，對微生物產生包括滲透壓的不利影響，並抑制微生物的初始生產力。在提供足量的基質以達到上述的該

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝

訂

線

## 五、發明說明（ 12）

微生物生質密度時，本發明的方法避免了該非所欲的不利影響。

本發明之用於培養微生物的方法，包括了一生質密度增加時期。在生質密度增加時期中，該發酵方法的首要目標是要增加發酵培養液中的生質密度，以獲得上述的生質密度。該碳源的加入速率係典型地維持在一不會對該微生物生產力或微生物造成不利影響，或因為該發酵裝備容量不足以自該液體培養湯液中移除熱量與交換氣體，所導致的對該微生物之生存能力造成一有意義的不利影響之特定程度或範圍。在發酵過程期間特定微生物所需要的該碳源之數量的適當範圍，係為習於此藝者所熟知的。較佳地，本發明之一碳源為一非-醇類的碳源，即一不含醇類的碳源。如同在這裡所使用的一樣，“醇類”這個術語係指一具有一羥基的 4 個或更少個碳原子的化合物，例如，甲醇、乙醇與異丙醇，但對為了本發明的目的不包括如乳酸與類似的化合物的羥基有機酸。更佳地，本發明的碳源是一個碳水化合物，包括有但不局限於果糖、葡萄糖、蔗糖、糖密與澱粉。其他合適的單元與複合的碳源和氮源，揭露於上述引為參考的專利中。然而，典型地，一碳水化合物，較佳地為玉米糖漿，係用作主要的碳源。以羥基脂肪酸的形式之脂肪酸、三-甘油脂、與二-和單-甘油脂的形式之脂肪酸也能夠當作碳源。

特殊較佳的氮源為尿素、硝酸鹽、亞硝酸鹽、大豆蛋白質、氨基酸、蛋白質、玉米浸液、酵母萃取物、動物

## 五、發明說明 ( 13 )

副產品、無機銨鹽、更佳地硫酸鹽、氫氧化物的銨鹽，而最佳地是銨氫氧化物。其他限制營養源包括有碳源（如上述定義）、磷酸來源、維生素來源（例如維生素 B12 來源、泛酸鹽 (pantothenate) 來源、硫胺素來源）、和微量的金屬來源（例如鋅源、銅源、鈷源、鎳源、鐵源、錳源、鉬源），以及主要金屬來源（例如鎂源、鈣源、鈉源、鉀源與矽源等等）。微量金屬來源和主要金屬來源，包括有這些金屬的硫酸鹽和氯化物的鹽（例如，但不局限於  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 、 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 、 $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 、 $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 、 $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、 $CaCl_2$ ； $K_2SO_4$ 、 $KCl$  與  $Na_2SO_4$ ）。

當以銨作為氮源時，如果不經由添加鹼或者緩衝液來調控，發酵培養液將變為酸性。當以氫氧化銨作為主要氮源時，其也可以用作 pH 值的調控。破囊壺菌目此種微生物，特別是在破囊壺菌屬與裂殖壺菌屬中的特定破囊壺菌，可以生長在如 pH 5 到 pH 11 的廣大範圍中。對一個特定微生物進行發酵的適當 pH 值，係為習於此藝者的知識領域。

本發明之培養微生物的方法也包括了生產時期。在這個時期，該微生物使用該基質的主要用途，不在增加生質密度而是用該基質來生產脂質。應該瞭解的是，在生質密度增加時期的期間，該微生物也生產脂質；然而，如上所述，生質密度增加時期中的主要目地是要增加生質密度。典型

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂 · 線

## 五、發明說明 ( 14)

地，在該生產時期期間限制養分基質的加入，係被減少的或較佳地被停止。

以往一般相信，在發酵培養液中含有溶解氧氣，對於真核微生物生成包括  $\Omega$ -3 與/或  $\Omega$ -6 之多元不飽和脂肪酸的多元不飽和化合物是至關緊要的。因此，一般相信在發酵培養液中含有相對大量的溶解氧氣係較佳的。然而，令人驚訝地和出乎意料地，本發明的發明者發現，當減少該生產時期期間的溶氧氣量時，脂質的生產速率會急劇增加。因此，在該生質密度增加時期的期間發酵培養液中的溶氧量較佳地係至少約 8% 飽和濃度的含量，且更佳地至少約 4% 飽和濃度的含量，而在該生產時期期間發酵培養液中的溶解氧氣減少到約 3% 飽和濃度的含量或者少，較佳地約 1% 飽和濃度含量或者少，且更佳地約 0% 飽和濃度的含量。在發酵開始時溶氧量值可能為飽和濃度或接近飽和濃度，並且在該微生物生長時，其將會趨向於降低到這些低溶氧量預設值。在本發明的一個特定具體實施例中，在發酵培養液中的溶氧量在發酵過程期間會改變。譬如，對總發酵時間為約 90 小時到約 100 小時的發酵過程而言，在開始的 24 小時發酵培養液中的溶氧量維持在約 8%，在約 24 小時到約 40 小時為約 4%，而從約 40 小時到發酵過程結束為約 0.5% 或更少。

發酵培養液中的溶氧量能夠藉由控制發酵槽的上部空間 (head-space) 中的氧氣量而加以調控，或較佳地藉由控制該發酵培養液的攪動 (或攪拌) 加以調控。譬如，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明（ 15）

高攪動（或攪拌）速率較低攪動速率會導致在發酵培養液中之相對更高的溶氧量。例如，在一約 14,000 加侖容量之發酵槽中，在開始的 12 小時，把攪拌速率設定在從大約 50 轉/分到 70 轉/分，在大約 12 小時到大約 18 小時的期間為約 55 轉/分到約 80 轉/分，而自大約 18 小時到發酵過程的結束為約 70 轉/分到約 90 轉/分，以在大約 90 小時到大約 100 小時的總發酵過程時間中達到上面討論的溶氧量。為了在發酵培養液中達到特定溶氧量之特定攪拌速度範圍，是能夠輕易地由一個一般的習於此藝者來確定的。

本發明之方法的一個較佳溫度為至少約 20°C，更佳地為 25°C，最佳地為 30°C。

應該理解的是冷水比暖水能夠保有更高的溶氧量。因此，一個較高的發酵培養液液溫具有減少溶氧量的附加優點，其係如同上述一般特別適宜。

某些微生物在發酵培養液中可能需要某種數量的鹽水礦物。這些鹽水礦物、尤其是氯化物離子，會導致發酵槽與其他下游處理設備的腐蝕。為了避免存在發酵培養液中的相對大量的氯化物離子所導致非所欲的效應，本發明的方法也包括使用含有非-氯化物的鈉鹽，較佳地為鈉硫酸鹽，以在發酵培養液中作為鈉來源。更特別地，發酵作用中鈉需求的主要部分係由含有非氯化物的鈉鹽來提供。例如，發酵培養液中不到約 75% 的鈉，係以鈉氯化物供給更佳地不到約 50%，且又更佳地不到約 25%。

## 五、發明說明 ( 16)

本發明的微生物能夠在不到約 3 克/升 的氯化物濃度中生長，較佳地不到約 500 毫克/升，更佳地不到約 250 毫克/升，且又較佳地在約 60 毫克/升和大約 120 毫克/升之間。

含有非-氯化物的鈉鹽包括小蘇打灰（碳酸鈉和鈉的氧化物之混合物）和碳酸鈉、碳酸氫鈉、硫酸鈉和其混合物，較佳地包括硫酸鈉。小蘇打灰、碳酸氫鈉與硫酸鈉易於增加發酵培養液的 pH 值，因此需要控制步驟以維持培養液的適當 pH 值。硫酸鈉的濃度是足以滿足該微生物的鹽濃度需求的，較佳地此鈉濃度（以克/升的鈉表示）係至少 1 克/升，更佳地從約 1 克/升 到約 50 克/升，又更佳地從約 2 克/升 到約 25 克/升。

在美國專利第 5,130,242 號中，詳盡地討論對於接種、培養與回收微生物的各種發酵參數，其全都在這裡一併以供參考。任何目前已知的分離方式，都能夠用來自發酵培養液中分離微生物，包括有離心、過濾、超高速離心、重覆傾析法和溶劑蒸發作用。本發明的發明者發現，由於本發明的方法所產生的的一高生質密度，當使用離心作用來回收該微生物時，透過加入水來稀釋該發酵培養液是較佳的，這將會減少生質密度，因而使得微生物能更有效的自發酵培養液中分離。

本發明所達到的很高的生質密度，也有助於“無溶劑”的微生物脂質回收方法。用於在發酵槽中溶解細胞的較佳方法，描述於 2000 年 1 月 19 日提出申請，標題為

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

表

訂

線

## 五、發明說明（ 17）

"SOLVENTLESS EXTRACTION PROCESS"之美國申請案號第 60/ 177,125 號之暫准專利中、2001 年 1 月 19 日提出申請，標題為 "SOLVENTLESS EXTRACTION PROCESS"申請序號第\_\_\_\_\_號之美國專利，與 2001 年 1 月 19 日提出申請，標題為 "SOLVENTLESS EXTRACTION PROCESS"申請序號第\_\_\_\_\_號之部分繼續申請專利，在這裡一併提供作為參考。在發酵槽中，一旦這些細胞是可通透性的、破裂的或溶解的（其使得該脂質乳狀物被打破而富有脂質的部分得以被回收），較佳的回收該脂質的方法，包括 WO 96/05278 中所略述的去油方法，在此一併提供作為參考。在這個方法中的水溶性化合物，例如醇類或甲酮，被加入油/水乳狀液中，而所得到的混合液以比重分離法，例如離心作用，加以分離。這個過程能夠變更為使用其他試劑（水溶性與/或脂溶性）來打破該乳狀液。

另外，該乾燥的微生物經由蒸發發酵培養液的水而自發酵培養液回收，例如經過直接將該發酵培養液與一鼓式乾燥器裝置接觸（即不經如離心作用之預先濃縮作用），即一個直接鼓式乾燥器之回收過程（方法）。當使用此直接鼓式乾燥器回收方法來分離微生物時，典型地為使用一個蒸汽加熱的鼓式乾燥器。此外當使用直接鼓式乾燥器回收方法時，發酵培養液的生質密度係較佳地至少 130 克/升，更佳地至少是約 150 克/升，最佳地至少 180 克/升。此高生質密度通常為直接鼓式乾燥器回收過程所

## 五、發明說明（ 18）

需的，因為在一低生質密度，發酵培養液具有足量的水以顯著地冷卻此鼓，因而導致該微生物的乾燥不完全。其他乾燥細胞的方法，包括噴灑乾燥法，為一般習於此藝者所知。

本發明的方法提供一至少約 0.5 克/升/小時的平均脂質生產速率，較佳地至少約 0.7 克/升/小時，更佳地至少約 0.9 克/升/小時，最佳地約 1.0 克/升/小時。此外，由本發明的方法生產的脂質，所含有的多元不飽和脂質數量大於約 15%，較佳地大於約 20%，更佳地大於約 25%，再更佳地大於約 30%，最佳地大於約 35%。脂質能夠從乾的微生物或者從發酵培養液中的微生物之一中回收。一般而言，至少約 20% 由本發明之方法中的微生物的脂質為  $\Omega$ -3 與/或  $\Omega$ -6 之多元不飽和脂肪酸，較佳地至少大約 30% 的脂質為  $\Omega$ -3 與/或  $\Omega$ -6 之多元不飽和脂肪酸，更佳地至少大約 40% 的脂質為  $\Omega$ -3 與/或  $\Omega$ -6 之多元不飽和脂肪酸，且最佳地至少大約 50% 的脂質為  $\Omega$ -3 與/或  $\Omega$ -6 之多元不飽和脂肪酸。另外，本發明的方法提供一個平均為至少 0.2 克  $\Omega$ -3 脂肪酸（例如 DHA）/升/小時的  $\Omega$ -3 脂肪酸（例如 DHA）的生產速率，較佳地至少 0.3 克  $\Omega$ -3 脂肪酸（例如 DHA）/升/小時，更佳地至少 0.4 g  $\Omega$ -3 脂肪酸（例如 DHA）/升/小時，與最佳地至少 0.5 克  $\Omega$ -3 脂肪酸（例如 DHA）/升/小時。另外，本發明的方法提供一個平均為至少 0.07 克  $\Omega$ -6 脂肪酸（例如 DPAN-6）/升/小時的  $\Omega$ -6 脂肪酸（例如 DPAN-6）

## 五、發明說明 ( 19)

的生產速率，較佳地至少 0.1 克  $\Omega$ -6 脂肪酸（例如 DPAN-6）/升/小時，更佳地至少 0.13 克  $\Omega$ -6 脂肪酸（例如 DPAN-6）/升/小時，與最佳地至少 0.17 克  $\Omega$ -6 脂肪酸（例如 DPAN-6）/升/小時。又另外，至少約 25% 的脂質為 DHA（以脂肪酸甲基酯的總量為基準），較佳地至少約 30%，更佳地至少約 35% 與最更佳地至少約 40%。

脂質從而萃取的微生物，在經脂質萃取以後剩餘的該生質或其合併物，可以直接作為食品原料，如飲料、醬汁、乳品為主要的食物（譬如牛奶、酸奶、乳酪與冰淇淋）與烘培商品的原料；營養補充品（以膠囊或藥錠的形式）；提供任何一種其肉或產品係供人類消費之用的動物之餵食或餵食物的補充；包括了幼兒食品與嬰兒特別配方之食品添加物；與藥物（間接或附屬的治療應用）。“動物”這個字代表了任何屬於動物界（kingdom Animalia）的生物，同時，並非限制地，包括了，從而獲得家禽肉、海鮮、牛肉、豬肉或者小羊肉的任何動物。海鮮係，並非限制地，來自魚、小蝦與貝類。“產品”這個字包括除了肉以外的任何從這樣的動物獲得的產品，並非限制地，包括了雞蛋、牛奶或者其他的產品。當餵食此種動物時，多元不飽和脂質能夠結合到肉牛奶、雞蛋或此種動物的其他的產品裡，以增進其之該種脂質的含量。

本發明之另外的目的、優點與新穎的特徵，對習於此藝者而言在以下並不是要來侷限本發明的實施例之驗證下將更顯著。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

表

訂

線

## 五、發明說明 ( 20)

### 實施例

在不同的發酵條件下，在這些例子中所使用的裂殖壺菌屬菌株，以約 3:1 的比例產生兩種主要的多烯酸，DHAn-3 與 DPAn-6，以及少量的其他多烯酸，例如 EPA 與 C20:3。因此，雖然下面的例子僅列出 DHA 的數量，人們可以藉由使用上面所述的生產比例輕易地計算 DPA(n-6) 生產數量。

### 實施例 1

此實施例說明了發酵培養液中的氧氣含量對脂質生產力的影響。在許多不同程度的溶氧量下測量裂殖壺菌屬 ATCC 第 20888 號菌株的發酵結果。其結果表示在第 1 圖中，其中 RCS 為糖的剩餘濃度，而 DCW 是乾細胞的重量。

### 實施例 2

此實施例也說明了發酵培養液中，低氧氣含量對最後的生質產物之 DHA 含量之影響。

“縮小規模 (scale-down)”類型的實驗在 250 毫升的 Erlenmeyer 燒瓶中進行，以模擬在大規模發酵槽培養的裂殖壺菌種中，低氧氣含量對 DHA 含量的影響。裂殖壺菌種 (ATCC 20888) 係培養在 O4-4 培養液中。每升的培養液含有以下溶解在去離子水中的成分：Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 12.61 克；MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 1.2 克；KCl 0.25 克，CaCl<sub>2</sub> 0.05 克；單鈉穀氨酸鹽 7.0 克；葡萄糖 10 克；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 克；NaHCO<sub>3</sub> 0.1 克；酵母萃取物 0.1 克；維生素混合物 1.0

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

線

## 五、發明說明（ 21）

毫升；PII 金屬 1.00 毫升。PII 金屬混合物含有(每升)：  
6.0 克  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 、0.29 克  $\text{FeC}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、6.84 克  $\text{H}_3\text{BO}_3$ 、  
0.86 克  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.06 克  $\text{ZnCl}_2$ 、0.026 克  
 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.052 g  $\text{NiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.002 克  $\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  與  
0.005 克  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。維生素混合物含有(每升)：100  
毫克硫胺素、0.5 毫克維生素H 與 0.5 毫克維他命 $\text{B}_{12}$ 。  
此培養液的 pH 值調整至 7.0 然後過濾滅菌。

縮小規模實驗背後的概念，係在近乎全滿之燒瓶中以不同  
體積的培養液來培養細胞，（例如在 250 毫升搖動的燒瓶  
中裝入 200 毫升的培養液），將無法在搖動桌上混合均勻，  
而因此在細胞生長時，將會造成低溶氧量的情況。因此，  
在實驗中制定了 4 種處理方式，每一中都施行兩組：(1)  
250 毫升燒瓶裝滿 50 毫升的培養液；(2) 250 毫升燒瓶  
裝滿 100 毫升的培養液；(3) 250 毫升燒瓶裝滿 150 毫  
升的培養液；與 (4) 250 毫升燒瓶裝滿 200 毫升的培養  
液。八個燒瓶中每一個都接種以第一種處理方式，在  $28^\circ\text{C}$   
下 220 轉/分的振盪桌上，用 O4-4 培養液培養 48 小時  
的裂殖壺菌老細胞。該實驗所有的八個燒瓶，係置於培養  
器中 ( $28^\circ\text{C}$ ) 之振動桌上 (220 rpm)，並在黑暗中培養 48  
小時。在實驗的末尾，用 YSI 溶氧計測量每一個燒瓶子  
中的溶氧量，並測定培養液的 pH 值，同時測量細胞的  
乾重量與其脂肪酸含量。實驗的結果略述於表 1。

表 1. 低溶氧濃度對裂殖壺菌的長鏈高度不飽和脂肪酸  
(DHA % 乾重) 含量的影響的實驗結果。

## 五、發明說明 ( 22)

培養液體積(毫升)	脂肪酸甲基酯(%TFA)	DHA(%乾重)	生質(克/升)	最終的PH值	溶氧量(%飽和)
50	16.5	7.4	4.2	7.4	31
100	17.0	6.5	3.9	7.2	29
150	22.4	9.2	2.7	7.0	11
200	35.9	14.5	1.8	6.9	3

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

該結果說明了在低溶氧量下培養的細胞之脂質含量(%脂肪酸甲基酯)與DHA的含量(%乾重)較高—溶氧量越低,脂質和DHA的含量越高。這是未曾預料到的,因為一般相信氧氣係形成去飽和(雙)鍵所必需。在低溶氧量的情況下有那麼多的DHA生成是令人驚奇的,因為DHA是最不飽和的脂肪酸之一。雖然在溶氧量減少的情況下產生的生質會減少,但是DHA的含量卻會增加。因此,在成長階段使用較高的溶氧量以達到最大的生質生成量,然後用較低的溶氧量以達到最大的長鏈脂肪酸的產生量是有利的。

### 實施例3

這個例子說明本發明方法的可再現性。

以一標示的工作體積為1,200加侖的發酵槽生產微生物。將所得到的發酵培養湯液濃縮並且以一鼓式乾燥器將微生物乾燥。萃取與純化來自所得到的完整微生物之脂質,以得到精製的、變白的、除臭的油。為了添加營養的

## 五、發明說明 ( 23)

目的在分析脂質之前加入大約百萬分之 3,000 的 d-升- $\alpha$ -維他命 E。

以裂殖壺菌 ATCC 第 20888 號菌株進行九組的發酵作用，其結果表示在表 2 中。溶氧量在開始的 24 小時期間是大約為 8%，之後大約為 4%。

表 2. 自裂殖壺菌中生產 DHA 的批次培養 (Fed-batch) 發酵作用。

組別	培養時間 (小時)	產率 <sup>1</sup> (克/升)	DHA <sup>2</sup> (%)	脂肪酸甲基酯 <sup>3</sup> (%)	生產力 <sup>4</sup>
1	100.3	160.7	17.8	49.5	0.285
2	99.8	172.4	19.4	51.3	0.335
3	84.7	148.7	14.4	41.4	0.253
4	90.2	169.5	19.7	53.9	0.370
5	99.0	164.1	12.5	38.9	0.207
6	113.0	187.1	19.7	47.2	0.326
7	97.0	153.5	13.7	41.0	0.217
8	92.8	174.8	16.4	48.6	0.309
平均值 <sup>5</sup>	97.1	166.4	16.7	46.5	0.288
標準差 <sup>6</sup>	8.4	12.3	2.9	5.4	0.058
變異係數 <sup>7</sup> (%)	8.7	7.4	17.3	11.7	20.2

1. 生質密度的實際產量。
2. 以細胞乾重之百分比表示的 DHA 含量。
3. 以細胞乾重之百分比表示的脂肪酸總含量 (以甲基酯測量)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 · 線

## 五、發明說明 ( 24)

4. (DHA 克數) / 升 / 小時。
5. 平均值。
6. 標準差。
7. 變異係數。變異係數低於 5% 表示一個有極佳的可再現性的方法，變異係數界於 5% 和 10% 之間表示一個好的可再現性的方法，變異係數界於 10% 和 20% 之間表示一個合理的可再現性的方法。

加入玉米糖漿直到發酵槽中的的體積到達約 1,200 加侖，在此時停止加入玉米糖漿。一旦殘餘葡萄糖濃度低於 5 克/升發酵過程便會停止。從接種到最後的典型的時間是大約 100 小時。

發酵培養湯液，即，發酵培養液，以約 2:1 的比例用水稀釋以減少最終產物的殘骸含量，進而幫助改善在離心步驟期間的相位分離效果 (phase separation)。將該濃縮細胞的糊狀物加熱到 160° F (約 71° C) 並以一 Blaw Knox 雙-鼓式乾燥器 (42"x36") 乾燥。然而，較佳地，微生物係不經離心在一個鼓式乾燥器上直接乾燥。

自表 2 中每個組別之整體中萃取的脂質之分析結果，如表 3 所概述。

表 3. 表 2 中的批次培養發酵作用所生產之微生物生質的分析。

組別	% DHA 相對於脂肪 酸甲基酯之含量 <sup>1</sup>	總脂質 % 總 重.
1	36.0	72.3

## 五、發明說明 ( 25)

2	37.8	70.3
3	34.8	61.5
4	36.5	74.8
5	32.1	52.8
6	41.7	67.7
7	33.4	49.9
8	33.7	61.4
平均值	35.8	63.8
標準差 <sup>3</sup>	3.0	9.1
變異係數 <sup>4</sup> (%)	8.5	14.2

1. 參照表 2。
2. 如上面所述。
3. 標準差。
4. 變異係數。變異係數低於 5% 表示一個有極佳的可再現性的方法，變異係數界於 5% 和 10% 之間表示一個好的可再現性的方法，變異係數界於 10% 和 20% 之間表示一個合理的可再現性的方法。

除非有特別說明，在實施例部分中所使用的發酵培養液含有下列成分，其中第一個數目表示其標示的預定濃度，而在括弧中的數目表示其可接受的範圍：硫酸鈉 12 克/升 (11-13)；KCl 0.5 克/升 (0.45-0.55)；MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 2 克/升 (1.8-2.2)；Hodag K-60 antifoam 0.35 克/升 (0.3-0.4)；K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.65 克/升 (0.60-0.70)；KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 克/升 (0.9-1.1)；

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 · 線

## 五、發明說明 ( 26)

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 克/升 (0.95-1.1) ; CaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O 0.17 克/升 (0.15-0.19) ; 95 DE小麥糖漿 (固態基礎) 4.5 克/升 (2-10) ; MnCl<sub>2</sub>•4H<sub>2</sub>O 3 毫克/升 (2.7-3.3) ; ZnSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 3 毫克/升 (2.7-3.3) ; CoCl<sub>2</sub>•6H<sub>2</sub>O 0.04 毫克/升 (0.035-0.045) ; Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>•2H<sub>2</sub>O 0.04 毫克/升 (0-0.045) ; CuSO<sub>4</sub>•5H<sub>2</sub>O 2 毫克/升 (1.8-2.2) ; NiSO<sub>4</sub>•6H<sub>2</sub>O 2 毫克/升 (1.8-2.2) ; FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 10 毫克/升 (9-11) ; 硫胺素 9.5 毫克/升 (4-15) ; 維他命 B<sub>12</sub> 0.15 毫克/升 (0.05-0.25) 與泛酸鈣 (Calcium Pantothenate) 3.2 毫克/升 (1.3-5.1) 。另外，利用 28% 的 NH<sub>4</sub>OH 溶液作為氮來源。

乾的微生物殘骸含量約為重量的 6% 。

### 實施例 4

本實施例說明在 14,000 加侖的規模下，在發酵培養液中減少的溶氧量對微生物生產力的影響。

利用如實施例 3 中所描述的方法，使用一裂殖壺菌的野生型來進行一標示體積為 14,000-加侖發酵作用，該野生型的裂殖壺菌可藉由上述的美國專利第 5,340,742 號與第 5,340,594 號所揭示的分離方法而獲得。在開始的 24 小時間，發酵培養液中的溶氧量大約是 8%，從第 24 小時到第 40 小時大約是 4%，而從第 40 小時到發酵過程結束大約為 0.5%。在發酵過程中培養液的低溶氧量的結果如表 4 中所示。

表 4. 在減少的溶解氧氣濃度中，14,000-加侖規模的裂殖壺菌批次培養 (fed-batch) 發酵作用結果

## 五、發明說明 ( 27)

組別	培養時間 (小時)	產率 (克/升)	% DHA	% 脂肪酸 甲基酯	%DHA含量 相對於脂 肪酸甲基 酯含量	DHA 生產力 (DHA之 克數/升/ 小時)
1	82.0	179.3	21.7	52.4	41.4	0.474
2	99.0	183.1	22.3	55.0	40.5	0.412
3	72.0	159.3	-	-	40.9	-
4	77.0	161.3	-	-	43.2	-
5	100.0	173.0	23.9	53.3	44.9	0.413
6	102.0	183.3	21.6	50.8	42.6	0.388
7	104.0	185.1	23.7	55.0	43.1	0.422
8	88.0	179.3	22.3	52.6	42.4	0.454
9	100.0	166.4	22.5	53.5	42.1	0.374
10	97.0	182.6	22.8	51.6	44.1	0.429
11	87.5	176.5	19.8	45.6	43.5	0.399
12	67.0	170.8	18.8	48.1	39.1	0.479
13	97.0	184.9	23.2	52.7	44.0	0.442
14	102.0	181.9	23.6	52.9	44.6	0.421
15	102.0	186.9	19.9	47.8	41.8	0.365
16	97.0	184.4	19.6	45.5	43.0	0.373
17	98.0	174.7	19.7	45.1	43.7	0.351
18	103.5	178.8	18.3	44.5	41.2	0.316
19	102.0	173.7	15.8	43.1	36.7	0.269
20	94.0	190.4	19.3	46.9	41.1	0.391
21	72.0	172.5	22.8	52.8	43.2	0.546
22	75.0	173.1	21.0	51.7	40.8	0.485

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

線

## 五、發明說明 ( 28)

23	75.0	152.7	20.3	50.3	40.4	0.413
24	75.5	172.5	21.9	51.7	42.3	0.500
25	61.0	156.4	17.3	45.7	37.8	0.444
26	74.5	150.6	20.2	50.1	40.2	0.408
27	70.5	134.3	14.8	40.6	36.6	0.282
28	75.5	146.1	21.3	49.7	42.8	0.412
29	82.0	174.3	21.4	50.4	42.5	0.455
30	105.0	182.3	21.7	50.7	42.8	0.377
31	66.0	146.2	16.4	44.6	36.7	0.363
平均值	87.2	171.5	20.6	49.5	41.6	0.409
標準差	13.9	14.1	2.4	3.8	2.3	0.061
變異係數	16.0%	8.2%	11.6%	7.7%	5.5%	15.0%

## 實施例 5

本實施例說明在 41,000 加侖的規模下，發酵培養液中減少的溶氧量對微生物生產力的影響。

除了是在 41,000 加侖的發酵槽中進行發酵之外，本實施例運用如實施例 4 中所描述的方法。增加培養液的體積以在此規模下維持預定的化合物濃度。結果如表 5 中所示。

表 5. 41,000-加侖規模的裂殖壺菌發酵作用。

組別	培養時間 (小時)	產率 (克/升)	% DHA	%脂肪 酸甲 基酯	%DHA相對 於脂肪酸甲 基酯之含量	DHA 生產力 (DHA克數/ 升/小時)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

表

訂

線

## 五、發明說明 ( 29)

1	75.0	116.1	17.3	46.1	37.4	0.268
2	99.0	159.3	17.4	47.0	37.1	0.280
3	103.0	152.6	16.0	47.2	33.8	0.237
4	68.0	136.8	17.9	45.9	39.1	0.360
5	84.0	142.0	17.5	47.0	37.2	0.296
平均值	85.8	141.4	17.2	46.6	36.9	0.288
標準差	15.1	16.6	0.7	0.6	1.9	0.046
變異係數	17.5%	11.8	4.2%	1.3%	5.2%	15.8%

## 實施例 6

本實施例說明在本發明在發酵過程中額外的氮之影響。

以類似實施例 4 的步驟，進行四組 250-升規模的批次培養實驗。

進行兩組控制組與兩組具有額外的氮（正常數量的 1.15 和 1.25 倍）之實驗組的實驗。結果如表 6 所示。

表 6. 額外的氮對裂殖壺菌發酵作用的影響。

培養時間 (hrs)	產率 (克/升)	生質生產力	轉換效率	DHA 含量	脂肪酸甲基酯含量	DHA 生產力
預設糖濃度：7 克/升，鹼性 pH 值設定值：5.5，酸性 pH 值設定值：7.3，1.0X NH <sub>3</sub>						
48	178	3.71 克/升/小時	51.5%	10.7%	37.8%	0.40 克/升/小時
60	185	3.08 克/升/小時	46.9%	16.3%	47.2%	0.50 克/升/小時

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

## 五、發明說明 ( 30)

72	205	2.85 克/升 /小時	45.2%	17.4%	47.4%	0.50 克/ 升/小時
84	219	2.61 克/升 /小時	43.8%	17.1%	45.5%	0.45 克/ 升/小時
90	221	2.46 克/升 /小時	44.1%	18.4%	48.9%	0.45 克/ 升/小時
預設糖濃度：7 克/升，鹼性 pH 值設定值：5.5，酸性 pH 值 設定值：7.3，1.15X NH <sub>3</sub>						
48	171	3.56 克/升 /小時	55.6%	12.0%	36.3%	0.43 克/ 升/小時
60	197	3.28 克/升 /小時	54.6%	9.4%	38.4%	0.31 克/ 升/小時
72	191	2.65 克/升 /小時	52.8%	9.4%	40.0%	0.25 克/ 升/小時
84	190	2.26 克/升 /小時	52.5%	10.0%	42.5%	0.23 克/ 升/小時
90	189	2.10 克/升 /小時	52.2%	9.2%	43.3%	0.19 克/ 升/小時
預設糖濃度：7 克/升，鹼性 pH 值設定值：5.5，酸性 pH 值 設定值：7.3，1.25X NH <sub>3</sub>						
48	178	3.71 克/升 /小時	56.4%	11.5%	33.7%	0.43 克/ 升/小時
60	179	2.98 克/升 /小時	48.6%	10.3%	36.0%	0.31 克/ 升/小時
72	180	2.50 克/升 /小時	48.8%	12.0%	37.6%	0.30 克/ 升/小時
84	181	2.15 克/升 /小時	46.1%	13.6%	40.1%	0.29 克/ 升/小時
90	185	2.06 克/升 /小時	45.7%	12.6%	40.7%	0.26 克/ 升/小時
預設糖濃度：7 克/升，鹼性 pH 值設定值：5.5，酸性 pH 值 設定值：7.3，1.0X NH <sub>3</sub>						

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

## 五、發明說明 ( 31)

48	158	3.29 克/升 /小時	55.7%	13.1%	36.5%	0.43 克/ 升/小時
60	174	2.90 克/升 /小時	48.9%	17.9%	39.2%	0.52 克/ 升/小時
72	189	2.63 克/升 /小時	45.7%	21.0%	39.4%	0.55 克/ 升/小時
84	196	2.33 克/升 /小時	44.1%	22.4%	40.1%	0.52 克/ 升/小時
90	206	2.29 克/升 /小時	44.8%	22.1%	40.3%	0.51 克/ 升/小時

一般而言，額外的氮氣對發酵作用有一負面的影響，譬如，在兩批增加額外氮的實驗組中所發現的DHA生產力之顯著降低。如表6所示，相較於補充額外氮那一批所獲得佔總細胞乾重的9.2% (1.15倍的氮) 與12.6% (1.25倍的氮) 之最後的DHA含量，對照組獲得之最後含量為18.4% 與22.1%。

**實施例 7**

本實施例說明在本發明在發酵過程中之動態概貌 (Kinetic profile)。

使用與實施例4類似的一個步驟進行一1000-加侖規模的批次培養實驗。發酵過程的動態概貌如表7中所示。

表7. 的1000-加侖規模的裂殖壺菌批次培養發酵作用的動態概貌。

培養時間 (小時)	產率 (克/升)	生質生產力	轉換效率	%DHA 含量	%脂肪 酸甲基 酯含量	DHA 生產力
-----------	----------	-------	------	---------	-------------	---------

## 五、發明說明 ( 32)

24	118	4.92克/升 /小時	78.2 %	7.4	18.8	0.36克/ 升/小時
30	138	4.60 克/ 升/小時	60.3 %	10.6	30.9	0.49克/ 升/小時
36	138	3.83克/升 /小時	46.6 %	11.6	36.5	0.44克/ 升/小時
42	175	4.17克/升 /小時	49.8 %	13.4	41.7	0.56克/ 升/小時
48	178	3.71克/升 /小時	45.1 %	18.7	52.8	0.69克/ 升/小時
48*	164	3.42克/升 /小時	41.5 %	15.3	33.1	0.52克/ 升/小時
54	196	3.63克/升 /小時	45.7 %	16.6	51.2	0.60克/ 升/小時
60	190	3.17克/升 /小時	41.7 %	16.9	33.9	0.54克/ 升/小時
72	189	2.62克/升 /小時	39.1 %	15.6	31.8	0.41克/ 升/小時
84	195	2.32克/升 /小時	38.5 %	16.4	32.7	0.38克/ 升/小時
90	200	2.22克/升 /小時	39.0 %	18.8	33.3	0.42克/ 升/小時
90	171	1.90克/升 /小時	33.3 %	22.2	61.6	0.42克/ 升/小時 **

\* 對在 48 個小時分離的兩個樣本加以分析。

\*\* 此為一個清洗過之乾細胞重量 (DCW) 的樣本。其他報告的值為未清洗過之樣本。

### 實施例 8

本實施例說明碳源數量對於生產力的影響。

運用實施例 4 之方法進行三組使用不同的數量的碳源來的發酵過程。結果如表 8 所示。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

## 五、發明說明 ( 33)

表 8. 以各種數量的碳源進行之裂殖壺菌發酵作用所得到的發酵結果。

培養時間 (小時)	產率 (克/升)	碳源 進料	轉換 效率	%DHA 含量	%脂肪酸 甲基酯 含量	生產力 (克/升/ 小時)
90	171	51.3%	33.3%	22.2	61.6	0.42
94	122	40.5%	30.1%	19.1	57.3	0.25
59	73	20.0%	36.5%	11.9	40.8	0.15

## 實施例9

本實施例說明限制養分對碳源轉變為生質、脂質與特別是 DHA 之效率的影響。透過在2-公升之 Applikon 發酵槽中，使用含有以下化合物之基礎培養液 (ICM-2)，來培養裂殖壺菌菌種 ATCC 第 20888 號菌株，以進行一連續性培養實驗來研究營養限制性的影響。

第一組成分：(標示濃度)： $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (18.54 克/升)、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (2.0 克/升) 與  $\text{KCl}$  (0.572 克/升)；第二組成分 (每一種均分別配製)：葡萄糖 (43.81 克/升)、 $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (1.28 克/升)、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.025 克/升) 與  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (6.538 克/升)；第三組成分：(標示濃度)： $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (6.0 毫克/升)、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (0.29 毫克/升)、 $\text{H}_3\text{BO}_3$  (6.84 毫克/升)、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (0.86 毫克/升)、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.237 毫克/升)、 $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.026 毫克/升)、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0.005 毫克/升)、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (0.002 毫克/升) 與  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 · 線

## 五、發明說明 ( 34 )

(0.052 毫克/升)；與第四組成分：硫胺素(thiamine HCl；0.2 毫克/升)、維他命 B<sub>12</sub> (0.005 毫克/升)、泛酸鈣(Calcium pantothenate；0.2 毫克/升)。第一與第二組以高溫高壓滅菌法滅菌，而第三與第四組在加入到發酵槽之前以過濾滅菌法滅菌。然後以裂殖壺菌接種成長培養液，並在30°C、pH 5.5 與20% 的飽和濃度溶氧量的控制條件下，培養直到到達了細胞密度的最大值。

經由不停地以一足以維持稀釋比率為 0.06 小時<sup>-1</sup> 的流速，將無菌 ICM-2 飼用培養液(feed medium) 注入發酵槽並移走含有裂殖壺菌細胞的培養湯液，而建立了一個連續性的操作模式，直到達成穩定狀態。為了瞭解營養局限性的影響，該含有必需養份之特定的化合物在 ICM-2 飼用培養液中的含量較低，所以該養份在出口之含有細胞的培養湯液中被耗盡，因此該細胞的成長將因為缺乏特定的必需營養而受到限制。一旦每一個條件都達到了穩定的操作狀態，測量最終培養湯液的乾燥生質量、殘糖、與限制養份濃度、該細胞的脂質含量與 DHA 含量。葡萄糖的轉變為生質量的效率，藉著將葡萄糖總量除以總乾燥生質量而加以計算，並以百分比的基礎形式表示。

每個單一的養份對限制成長的影響，藉由針對下面的表中所列的養分，重複這個實驗而加以研究。最後的結果統整在下面的表中。

表 9. 限制養分對裂殖壺菌的生質產量、轉換效率(葡萄糖->生質)、脂質含量與DHA 的含量的影響。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

## 五、發明說明 ( 35)

限制 養分	生質 <sup>1</sup> (克/升)	$Y_{x/s}$ <sup>2</sup>	殘糖濃度 <sup>3</sup> (克/升)	脂質含量 <sup>4</sup> (%)	DHA 含量 <sup>5</sup> (%)
葡萄糖	18.7	46.8	0.0	19.8	7.3
氮氣	14.5	36.3	0.6	47.5	10.3
磷酸鹽	17.8	44.5	0.8	37.0	8.2
硫胺素	7.5	18.8	7.7	11.1	4.0
鋅	16.0	40.0	1.3	27.8	7.2
銅	14.0	35.0	10.4	13.8	5.3
鈷	14.5	36.3	0.0	22.2	6.9
鎳	17.8	44.5	0.0	21.9	8.0
鐵	15.9	39.8	3.5	18.5	7.2
鎂	12.5	31.3	3.4	26.1	8.0
錳	13.9	34.8	5.3	18.7	6.4
鈣	16.7	41.8	4.3	18.7	6.4
維生素 B12	19.6	49.0	0.0	17.5	6.3
鉬	18.9	47.3	0.0	19.3	7.0
泛酸鹽	19.2	48.0	0.0	20.4	6.7
鈉	17.9	44.8	1.8	21.8	8.2
鉀	13.0	32.5	8.8	14.1	5.3

1. 生質濃縮結果 (克/升)。
2. 生產係數 (% 產生的生質/消耗的葡萄糖)。
3. 培養湯液中剩餘的葡萄糖濃度 (克/升)。
4. 乾燥生質的脂質含量(脂質之克數 (以脂肪酸甲基酯之克數)/乾燥生質之克數)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂 線

## 五、發明說明 ( 36)

## 5. 乾燥生質的DHA 含量(DHA之克數/乾燥生之克數質)。

從表中明顯可知，限制氮源將導致細胞中最高 DHA 累積，其次是磷酸、鈉、鎳、錳、葡萄糖（碳源）、鋅和鐵。經由以一個能夠限制細胞成長的速率，對一批發酵反應供給一或更多個此類營養，使得此資訊可供商業應用。在最佳的情況中，氮氣係以一限制的方式提供給一批發酵反應，以得到該細胞最大的 DHA 含量。其他養分（或其混合物）可藉由一限制的方式提供，以達到生質或者其他有價值的產品之最大生產力。其他未經評估的生物所需的元素或營養，譬如硫，也能在此種發酵調控方式中當成限制養分使用。

如在此所描寫與描述之本發明所包括的成分、方法、過程、系統與/或裝置的各種具體實施例中，包含了其之各種不同的具體實施例、次組合與和子集合。那些習於此藝者在理解本發明之揭露內容以後，將知道如何製備與使用本發明的事物。在許多種具體實施例中，本發明包括了提供沒有在此或有關於此的許多具體例中描寫與/或描述之缺少項目的裝置與方法，包括有如許多已經用於以前的裝置或者過程方法的缺少項目，例如，為改良其表現、達成其便利性與/或減少操作的費用。

本發明前面的討論是基於說明與描述的目的而提供的。前面的討論並不是為了將本發明局限於在此所揭露的形式中。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

表

訂

線

## 五、發明說明 ( 37)

雖然本發明的敘述包括了一或更多個具體實施例與某些改變及修正的描述，但是在理解本揭露內容之後的其他變化與修正，例如，包含在此技藝中的技術與知識，也包含在本發明的範圍中。為了擴張可准專利之範圍，本發明希望涵蓋包括其他具體例的權利，包括有所請求者之替代物，可替換的和/或等效的結構、功能、範圍、或步驟，不論此種替代物，可替換的和/或等效的結構、功能、範圍、或步驟是否有在此揭示出來，而不至於將任何可准專利標的物貢獻給大眾。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂  
線

四、中文發明摘要 (發明之名稱：

藉由於發酵槽中真核微生物之極高密度培養獲得內含多烯酸脂肪酸脂質之擴增產量)

本發明係提供了一用於培養能夠產生脂質之真核微生物的方法，特別是內含多烯酸脂肪酸的脂質。本發明也提供了一用於產生真核微生物脂質的方法。

英文發明摘要 (發明之名稱：

ENHANCED PRODUCTION OF LIPIDS )  
CONTAINING POLYENOIC FATTY ACIDS BY  
VERY HIGH DENSITY CULTURES OF  
EUKARYOTIC MICROBES IN FERMENTORS

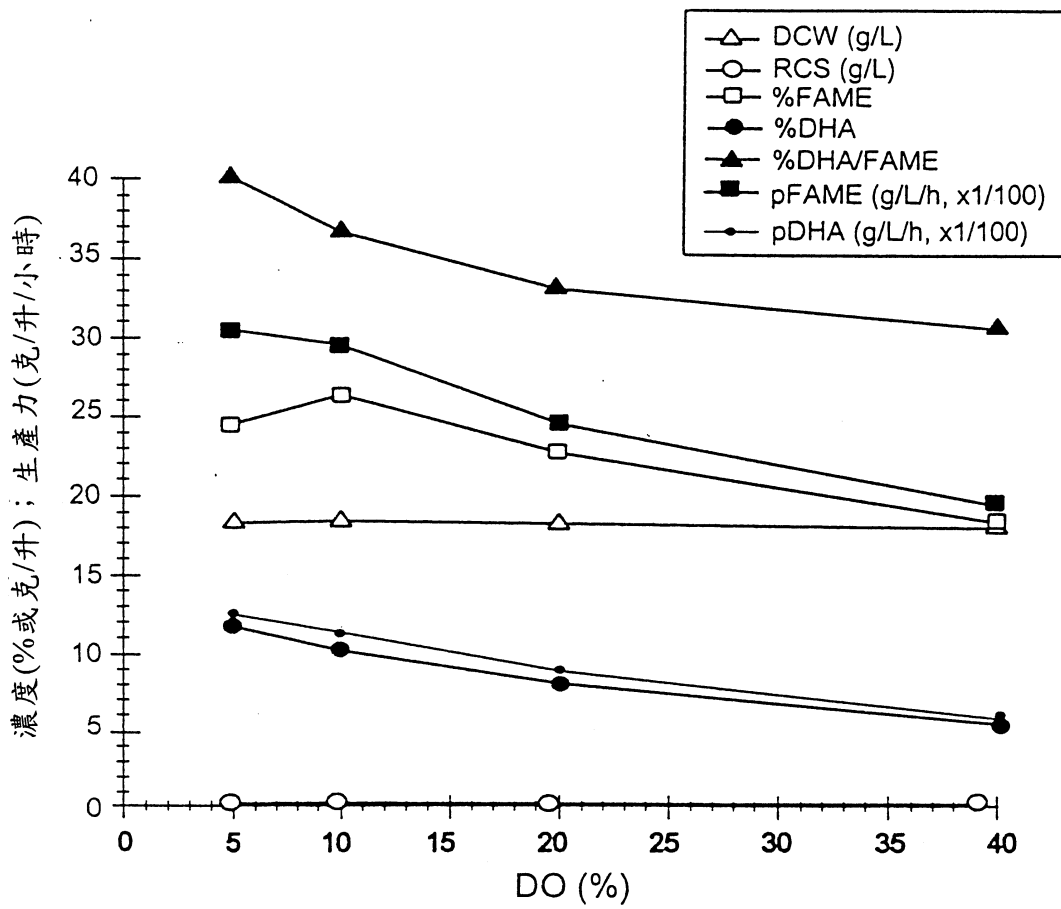
The present invention provides a process for growing eukaryotic microorganisms, which are capable of producing lipids, in particular, lipids containing polyenoic fatty acids. The present invention also provides a process for producing eukaryotic microbial lipids.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

錄



溶氧量在DHA/FAME的影響

DO (%)	RCS (g/L)	DCW (g/L)	FAME (g/L)	DHA (g/L)	FAME (%)	DHA (%)	DHA/FAME (%)	pFAME (g/L/h)	pDHA (g/L/h)
5	0.0	18.1	5.0	2.0	24.4	11.3	40.0	0.302	0.121
10	0.0	18.3	4.9	1.8	26.3	9.6	36.7	0.292	0.107
20	0.0	18.0	4.1	1.3	22.6	7.4	33.0	0.244	0.080
40	0.0	17.8	3.2	1.0	18.2	5.6	30.6	0.191	0.059

第 1 圖

申請日期	90.4.10
案 號	90101664
類 別	C12P7/64, C12N1/14

A4  
C4

(以上各欄由本局填註)

第90101664號		<b>發 明 專 利 說 明 書</b>	修正頁 2004年3月
一、發明名稱	中 文	藉由於發酵槽中真核微生物之極高密度培養獲得內含多烯酸脂肪酸脂質之擴增產量	
	英 文	ENHANCED PRODUCTION OF LIPIDS CONTAINING POLYENOIC FATTY ACIDS BY VERY HIGH DENSITY CULTURES OF EUKARYOTIC MICROBES IN FERMENTORS	
二、發明人	姓 名	(1)小理察 B. 貝里 (5)克瑞格 M. 魯艾克 (2)唐恩·迪瑪席 (6)喬治 T. 維德三世 (3)瓊 M. 漢森 (7)金子 達夫 (4)彼得 J. 米拉蘇 (8)威廉 R. 巴克雷	
	國 籍	(1)-(6)、(8)美國 (7)日本	
	住、居所	(1)美國加州戴馬爾·坎米紐特卡麥爾13412號 (2)美國加州聖地牙哥市·伯拉席卡街12220號 (3)美國加州修拉維薩·巴優那圓環563號 (4)美國加州聖地牙哥市·卡塔里納大道1241號 (5)美國加州聖地牙哥市·皮皮羅街9238號 (6)美國加州雷蒙那·主街2674號 (7)美國加州聖地牙哥市·肯永點巷7753號 (8)美國柯羅拉多州波爾德·帕諾拉瑪道7356號	
三、申請人	姓 名 (名稱)	馬特克生物科技公司	
	國 籍	美 國	
	住、居所 (事務所)	美國馬里蘭州哥倫比亞市鷺馬路6480號	
	代 表 人 姓 名	巴克 喬治 P.	

裝

訂

線

96年12月13日 X

## 六、申請專利範圍

第90101664號專利申請案申請專利範圍修正本

修正日期：2007年12月13日

1. 一種生產真核微生物脂質的方法，其包含有：
  - (a) 於一培養基中進行發酵，該培養基包含破囊壺菌 (Traustochytriales) 目之真核微生物、一碳源及一氮源，並提供條件使足以於該發酵培養基中維持一至少4%飽和度之溶氧量而足以增加該發酵培養基之生質密度；
  - (b) 提供條件使足以降低該發酵培養基中之溶氧量至3%飽和度或更低，並提供條件使足以容許該微生物產生該脂質；以及
  - (c) 回收該微生物脂質；其中至少15重量%的該微生物脂質為多元不飽和脂質。
2. 如申請專利範圍第1項之方法，其中步驟(a)包含加入該碳源及限制營養源，且步驟(b)包含加入該碳源而不加入或僅加入少量的該限制營養源以誘導出可誘發生產脂質的限制營養條件。
3. 如申請專利範圍第1項之方法，其中在步驟(b)時期之發酵培養液中的溶氧量係少於1%。
4. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該碳源包括一碳水化合物。
5. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該限制營養源包括一無機銨鹽。
6. 如申請專利範圍第1項之方法，其中該限制營養源包括一氫氧化銨。

## 六、申請專利範圍

7. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該發酵培養液的 pH 值係藉由該氮源加以調控。
8. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該發酵培養液的溫度係至少 20°C。
9. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該方法以一至少 0.5 克/升/小時的平均速率生產脂質。
10. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中至少 20% 的該脂質係為多元不飽和脂質。
11. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中奧米加-3(omega-3) 與奧米加-6(omega-6) 脂肪酸的總量至少為該脂質的 20%。
12. 如申請專利範圍第 9 項之方法，其中至少 25% 的該脂質係為二十二碳六烯酸(docosahexaenoic acid)。
13. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該微生物能夠在溶氧量低於 3% 飽和濃度的狀況下生產脂質。
14. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該微生物係以饋料批次培養(fed-batch)方法加以培養。
15. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該微生物係選自由破囊壺菌屬 (*Traustochytrium*)、裂殖壺菌屬 (*Schizochytrium*) 及其混合物所組成的群組。
16. 一種以破囊壺菌(*Traustochytriales*)目之真核微生物生產脂質的方法，其包含有：
  - (a) 於一培養基中進行發酵，該培養基包含該微生物、一非醇類碳源及一氮源以增加該微生物之生質密度，其

六、申請專利範圍

中存在於該發酵培養基中之溶氧量為至少該發酵培養基中4%飽和度；

(b) 提供條件足使該微生物生產該微生物脂質，其中該條件包含在脂質生產期間一具3%飽和度或更低之降低的溶氧量；以及

(c) 回收該微生物脂質；其中至少 15 重量%的該微生物脂質為多元不飽和脂質。

17. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中在步驟(b)期間該發酵培養液中之溶氧量係少於 1%。

18. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中該碳源係為一非醇類碳源。

19. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該限制營養源包括一無機銨鹽。

20. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中該微生物係選自由破囊壺菌屬、裂殖壺菌屬及其混合物所組成的群組。

21. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中奧米加-3(omega-3)與奧米加-6(omega-6)脂肪酸的總量至少為該脂質的 20%。

22. 如申請專利範圍第 16 項之方法，其中至少 25% 的該脂質係為二十二碳六烯酸。