



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119899748 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 29

(21) 申请号 202411870122.6

(22) 申请日 2012.07.20

(30) 优先权数据

61/510,464 2011.07.21 US

(62) 分案原申请数据

201280035935.2 2012.07.20

(83) 生物保藏信息

PTA-10208 2009.07.14

PTA-10209 2009.09.25

PTA-10210 2009.09.25

PTA-10211 2009.09.25

PTA-10212 2009.07.14

PTA-10213 2009.07.14

PTA-10214 2009.07.14

PTA-10215 2009.07.14

PTA-9695 2009.01.07

PTA-9696 2009.01.07

PTA-9697 2009.01.07

PTA-9698 2009.01.07

(71) 申请人 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 约瑟夫·W·普菲弗三世

乔恩·米尔顿·汉森

约瑟·R·加西亚 董晓

保罗·沃伦·伯赫恩斯

柯克·E·阿普特

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 史悦

(51) Int.Cl.

C12N 1/14 (2006.01)

C12P 7/6432 (2022.01)

C12P 7/6434 (2022.01)

C12P 7/6427 (2022.01)

C12P 7/6463 (2022.01)

C12R 1/645 (2006.01)

权利要求书1页 说明书104页

序列表(电子公布) 附图40页

(54) 发明名称

生产二十碳五烯酸的微生物、脂肪酸组合物及其制作方法与用途

(57) 摘要

本发明涉及生产二十碳五烯酸的微生物、脂肪酸组合物及其制作方法与用途,具体地涉及分离的微生物以及其菌株与突变株、生物质、微生物油、组合物及培养物;生产所述微生物油、生物质和突变株的方法;以及使用分离的微生物、生物质及微生物油的方法。

1. 一种微生物的生物质,其包含

微生物油,所述微生物油包含脂肪酸和基于所述微生物油总重量的至少65重量%的甘油三酯部分,其中所述生物质包含基于所述生物质总细胞干重的至少35%的脂肪酸和基于所述脂肪酸总重量的至少20重量%的二十碳五烯酸(EPA),并且其中所述生物质通过如下方法产生,包括:

(a) 在包括发酵液和所述微生物的发酵罐容器中发酵所述微生物,所述微生物包括破囊壶菌微生物;和

(b) 通过包括如下的一个或多个步骤获得所述EPA水平的浓度:(i) 在所述发酵液中以低于30℃的温度发酵所述微生物和(ii) 任选地在步骤(a)的至少一部分期间,向所述发酵罐容器施加大于0.4psi的顶空压强。

2. 根据权利要求1中所述的生物质,其包含所述脂肪酸的总重量的20重量%至55重量%的量的EPA。

3. 根据权利要求1中所述的生物质,其包含所述脂肪酸的总重量的至少25重量%的量的EPA。

4. 根据权利要求1中所述的生物质,其包含所述脂肪酸的总重量的至少30重量%的量的EPA。

5. 根据权利要求1中所述的生物质,其包含所述脂肪酸的总重量的至少35重量%的量的EPA。

6. 根据权利要求1所述的生物质,其中所述温度为20℃至23℃。

7. 根据权利要求1所述的生物质,其进一步包含基于所述脂肪酸的总重量的至少20重量%的量的二十二碳六烯酸(DHA)。

8. 根据权利要求1所述的生物质,其进一步包含基于所述脂肪酸的总重量的5重量%或更少的量的花生四烯酸。

9. 根据权利要求1所述的生物质,其包含基于所述脂肪酸的总重量的20重量%至50重量%的量的EPA。

10. 根据权利要求1所述的生物质,其包含基于所述脂肪酸的总重量的20重量%至60重量%的量的DHA。

11. 根据权利要求1所述的生物质,其包含基于所述生物质的总细胞干重的至少40重量%的脂肪酸。

12. 根据权利要求1所述的生物质,其包含基于所述生物质的总细胞干重的至少45重量%的脂肪酸。

13. 根据权利要求1所述的生物质,其包含基于所述生物质的总细胞干重的至少50重量%的脂肪酸。

14. 根据权利要求1所述的生物质,其包含基于所述微生物油的总重量的至少70重量%的甘油三酯部分。

生产二十碳五烯酸的微生物、脂肪酸组合物及其制作方法与用途

[0001] 本发明申请是申请日为2012年07月20日、中国申请号为“201510526715.5”、发明名称为“生产二十碳五烯酸的微生物、脂肪酸组合物及其制作方法与用途”的发明专利申请的分案申请；而且201510526715.5是申请日为2012年07月20日、中国申请号为“2012800359352”、国际申请号为“PCT/US2012/047728”、发明名称为“生产二十碳五烯酸的微生物、脂肪酸组合物及其制作方法与用途”的发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及分离的微生物以及其菌株与突变株、生物质、微生物油、组合物及培养物；生产微生物油、生物质及突变株的方法；以及使用分离的微生物、生物质及微生物油的方法。

背景技术

[0003] 脂肪酸的分类是基于碳链的长度与饱和特性。根据链中所存在的碳数目，脂肪酸被称作短链、中链或长链脂肪酸，当碳原子之间无双键存在时称作饱和脂肪酸，当有双键存在时称作不饱和脂肪酸。当仅存在一个双键时，不饱和的长链脂肪酸是单不饱和的；当存在一个以上的双键时，则是多不饱和的。

[0004] 多不饱和脂肪酸(PUFAs)的分类是基于自脂肪酸甲基端开始的第一个双键的位置： ω -3(n-3)脂肪酸在第三个碳上具有第一个双键，而 ω -6(n-6)脂肪酸则在第六个碳上具有第一个双键。例如，二十二碳六烯酸(“DHA”)是一种具有22个碳的链长度和6个双键的 ω -3长链多不饱和脂肪酸(LC-PUFA)，通常命名为“22:6n-3”。其它 ω -3LC-PUFAs包括命名为“20:5n-3”的二十碳五烯酸(“EPA”)，和命名为“22:5n-3”的 ω -3二十二碳五烯酸(“DPA n-3”)。DHA及EPA已被称作“必需”脂肪酸。 ω -6LC-PUFAs包括命名为“20:4n-6”的二十碳四烯酸(“ARA”)和命名为“22:5n-6”的 ω -6二十二碳五烯酸(“DPA n-6”)。

[0005] 由于位于细胞膜中， ω -3脂肪酸是影响细胞生理功能的重要的生物学分子，它能调节生物活性化合物的产生与基因表达，并起到生物合成底物的作用。Roche, H.M., Proc.Nutr.Soc.58:397-401(1999)。例如，DHA占人类大脑皮层中脂质的约15%至20%，占视网膜中脂质的30%至60%，在睪丸与精子中富集，并且是母乳中的一个重要组分。Bergé, J.P.和Barnathan, G..Adv.Biochem.Eng.Biotechnol.96:49-125(2005)。DHA占脑中 ω -3脂肪酸的至多97%，并且占视网膜中 ω -3脂肪酸的至多93%。此外，DHA是胎儿与婴儿发育以及维持成人认知功能所必需的。引用同上。因为在人体中无法从头合成 ω -3脂肪酸，因此这些脂肪酸必须从营养来源获取。

[0006] 亚麻仁油与鱼油被认为是良好的 ω -3脂肪酸膳食来源。亚麻仁油不含有EPA、DHA、DPA或ARA，但却含有亚麻酸(C18:3n-3)，其是使机体能够制造EPA的一种结构单元。然而有证据显示代谢转换的速率缓慢且多变，特别在健康不佳的那些个体中。根据具体的物种及其饮食，鱼油在脂肪酸组成的类型与水平方面存在显著的差异。例如，与野生鱼类相

比,水产养殖所饲养的鱼的 ω -3脂肪酸水平较低。此外,鱼油具有含环境污染物的风险,并且可能伴随着稳定性问题和鱼的腥臭或味道。

[0007] 破囊壶菌(*Thraustochytrids*)是破囊壶菌目(*Thraustochytriales*)的微生物。破囊壶菌包括裂殖壶菌属(*Schizochytrium*)与破囊壶菌属(*Thraustochytrium*)的成员,并且已经确认为包括DHA与EPA在内的 ω -3脂肪酸的一种替代来源。参见第5130242号美国专利。与相应的鱼油或微藻油相比,由这些海生异养型微生物所生产的油通常具有更简单的多不饱和脂肪酸分布(profiles)。Lewis, T.E., *Mar. Biotechnol.* 1:580-587 (1999)。已报导破囊壶菌物种的菌株所生产的 ω -3脂肪酸,在该生物体所生产的总脂肪酸中占很高的百分比。第5130242号美国专利;Huang, J.等的*J. Am. Oil. Chem. Soc.* 78:605-610 (2001); Huang, J.等的*Mar. Biotechnol.* 5:450-457 (2003)。然而,分离的破囊壶菌在所生产的LC-PUFAs的种类和量方面不同,这使得一些先前所述的菌株在培养中可能具有不期望的 ω -6脂肪酸水平和/或会表现低的生产力。因此,一直存在对展现出高生产力和所期望的LC-PUFA分布的微生物的分离的需求。

发明内容

[0008] 申请人已经发现,可以通过在微生物发酵时改变发酵液的水相中溶解的二氧化碳(CO_2)的量来调控破囊壶菌所产生的EPA和DHA的量,其中所述破囊壶菌产生具有至少3% EPA的生物物质。本文中提供制备具有脂肪酸和一定浓度的EPA的微生物生物物质的方法,其包含:在具有溶解有气体的发酵液的发酵罐容器中发酵微生物,以产生生物物质,其中微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;并且调节所溶解的气体中溶解的 CO_2 水平。在一个实施方式中,可以调节溶解的 CO_2 水平,来在生物物质中实现所期望的EPA和/或DHA水平。在另一个实施方式中,在发酵液的水相中溶解的 CO_2 的量在总溶解气体的约38至约600ppm范围内、并且具体地在总溶解气体的约38至约135ppm范围内。

[0009] 本文还提供制备具有脂肪酸和一定浓度的EPA的微生物生物物质的方法,其包含:在含有气体的发酵罐容器中发酵微生物,以产生生物物质,其中微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;并且用 CO_2 补充气体。补充指的是以相对于细胞发酵所产生的量而言额外的量或者以环境条件下的量,向容器中加入或充入 CO_2 。在一个实施方式中,向容器中补充 CO_2 ,从而在生物物质中实现所期望的EPA和/或DHA量。

[0010] 本文也提供了制备具有脂肪酸和一定浓度的EPA的微生物生物物质的方法,其包含:在发酵罐容器中发酵微生物,以产生生物物质,其中该微生物包含生产具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;并调节容器中生物物质的量。在本发明的一个实施方式中,调节生物物质,从而在生物物质中实现所期望的EPA或DHA水平。

[0011] 制备具有脂肪酸和一定浓度的EPA的微生物的方法,其包含:在发酵罐容器中发酵微生物以产生生物物质,其中该微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;并且调节生物物质上的压强,例如但不限于控制容器的背压(back pressure)。在一个实施方式中,调节压强,从而在生物物质中实现所期望的EPA或DHA水平。

[0012] 在另一个实施方式中,本文提供了制造具有脂肪酸和一定浓度的EPA的微生物的方法,其包含:在发酵罐容器中发酵微生物以产生发酵液和生物物质,其中该微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;并且调节发酵液中的温度。在一个

实施方式中,调节温度,从而在生物质中实现所期望的EPA或DHA水平。

[0013] 在多个实施方式中,也可以通过提高或降低容器中CO₂的量来调节容器的水相或发酵液中溶解的CO₂的量,从而调控EPA和DHA的量。可以通过额外调节发酵的生物质的量,来调节溶解的CO₂的量。例如,通过在瓶和较大的发酵容器中发酵细胞。也可以通过改变温度,根据本文中所提供的实施方式来改变EPA和DHA。例如可以通过调节容器中温度来额外地调节溶解的CO₂的量。例如,较低的容器温度会产生较高浓度的EPA和较低浓度的DHA。还可以通过调节容器中压强,来调节溶解的CO₂的量。例如升高的压强很可能增加溶解的CO₂,这会增加生物质中EPA的量并降低DHA的量。上述的每一种调节诸如补充CO₂、增加或减少生物质、提高或降低温度、或者提高或降低压强,均可以与其他调节中的任意一个结合,从而在生物质以及由生物质所提取的任何油中实现所期望的EPA和DHA水平。还可以通过pH的改变来调节溶解的CO₂。

[0014] 在一些实施方式中,与脂肪酸和 ω -3脂肪酸总重量的量相比,EPA和DHA的总量(以重量计)保持相对恒定。

[0015] 在其他实施方式中,在对补充的CO₂的量、压强、温度、或者生物质进行调节之前,测量生物质的EPA或DHA含量。

[0016] 虽然不希望受任何理论约束,但是推测EPA或DHA的量的增加或减少与发酵液的水相中溶解的CO₂的量直接相关,并且对CO₂、压强和温度的上述调节会改变生物质中溶解的CO₂的量。

[0017] 在一些实施方式中,本发明提供制备具有升高浓度的EPA的微生物生物质的方法,该方法包含:使微生物在含有小于0.1mg/L维生素B12的培养基中生长,以产生生物质。在一些实施方式中,培养基包含小于0.01mg/L维生素B12。在一些实施方式中,培养基包含小于0.001mg/L维生素B12。在另一些实施方式中,培养基包含小于0.0001mg/L维生素B12。在一些实施方式中,培养基不包含维生素B12。

[0018] 在一些实施方式中,培养基还包含以每50g的无脂生物质计小于1g的酵母提取物。在一些实施方式中,培养基还包含以每50g的无脂生物质计小于0.5g的酵母提取物。在另一些实施方式中,培养基还包含以每50g的无脂生物质计小于0.1g的酵母提取物。

[0019] 在一些实施方式中,与由包含大于0.1mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度相比,EPA浓度增加了至少400%。在一些实施方式中,与来自包含大于0.01mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度相比,EPA浓度增加了至少300%。在另一些实施方式中,与来自包含大于0.001mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度相比,EPA浓度增加了至少200%。在一些实施方式中,与来自包含大于0.0001mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度相比,EPA浓度增加了至少100%。

[0020] 在一些实施方式中,本发明提供制备具有升高浓度的EPA的微生物生物质的方法,其包含:使微生物在含有小于0.1mg/L钴的培养基中生长,以产生生物质。在一些实施方式中,培养基包含小于0.01mg/L钴。在一些实施方式中,培养基包含小于0.001mg/L钴。在另一些实施方式中,培养基包含小于0.0001mg/L钴。在一些实施方式中,培养基不包含钴。

[0021] 在一些实施方式中,微生物是破囊壶菌。在一些实施方式中,微生物产生脂肪酸总重量的至少3%EPA。

[0022] 在一些实施方式中,培养基具有至少5%的溶解的CO₂的水平。在一些实施方式中,培养基具有至少10%的溶解的CO₂的水平。在一些实施方式中,培养基具有至少15%的溶解的CO₂的水平。

[0023] 本发明还提供分离的生物物质以及由本文的任意一种方法的生物物质所提取得到的微生物油。

[0024] 具体地,本发明涉及如下各项:

[0025] 1. 制备具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物物质的方法,其包含:

[0026] (a) 在发酵罐容器中发酵所述微生物,以产生生物物质,其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;和

[0027] (b) 调节容器中生物物质的量,以在生物物质中获得所期望的EPA水平。

[0028] 2. 制备具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物物质的方法,其包含:

[0029] (a) 在发酵罐容器中发酵所述微生物,以产生生物物质,其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;和

[0030] (b) 调节所述生物物质上压强,以在生物物质中获得所期望的EPA水平。

[0031] 3. 制备具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物物质的方法,其包含:

[0032] (a) 在发酵罐容器中发酵所述微生物,以产生发酵液和生物物质,其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;和

[0033] (b) 调节所述发酵液中温度,以在生物物质中获得所期望的EPA水平。

[0034] 4. 制备具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物物质的方法,其包含:

[0035] (a) 在含有气体的发酵罐容器中发酵所述微生物,以产生生物物质,其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;和

[0036] (b) 调节所述气体中CO₂水平,以在生物物质中获得所期望的EPA水平。

[0037] 5. 制备具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物物质的方法,其包含:

[0038] (a) 在发酵罐容器中发酵所述微生物,以产生具有水相的发酵液和生物物质,其中所述水相具有溶解的气体,其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;和

[0039] (b) 调节所述溶解的气体中的溶解CO₂至>2%。

[0040] 6. 如项1和3-5中任意一项所述的方法,其还包含调节所述生物物质上压强,以在生物物质中获得所期望的EPA水平。

[0041] 7. 如项1、2和4-6中任意一项所述的方法,其还包含调节所述发酵液中温度,以在生物物质中获得所期望的EPA水平。

[0042] 8. 在具有脂肪酸和一定浓度的EPA的微生物的生物物质中增加EPA浓度的方法,其包含:

[0043] (a) 在含有气体的发酵罐容器中发酵所述微生物,以产生生物物质,其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;

[0044] (b) 以足以提高生物物质中EPA浓度的CO₂补充所述气体。

[0045] 9. 如项8所述的方法,其中CO₂的量大于或等于腔室中气体的2% (摩尔),并且所述生物物质中EPA浓度增加至大于脂肪酸总重量的约4重量%。

[0046] 10. 如项9所述的方法,其中CO₂的量大于或等于腔室中气体的约5%到至多约20%

(摩尔)。

[0047] 11. 如项10所述的方法, 其中CO₂的量大于或等于容器中气体的约5%到至多约15% (摩尔)。

[0048] 12. 如项9所述的方法, 其中EPA浓度从大于脂肪酸总重量的约4重量%增加到至多约45重量%。

[0049] 13. 如项11所述的方法, 其中EPA浓度从大于脂肪酸总重量的约4重量%增加到至多约40重量%。

[0050] 14. 如项12所述的方法, 其中EPA浓度从脂肪酸总重量的约4重量%增加到脂肪酸总重量的约6重量%至约30重量%的范围。

[0051] 15. 如项9所述的方法, 其中EPA浓度从脂肪酸总重量的约15重量%增加到脂肪酸总重量的至多约40重量%。

[0052] 16. 如项9所述的方法, 其中EPA浓度增加到大于脂肪酸总重量的20重量%。

[0053] 17. 如项9所述的方法, 其中EPA浓度从脂肪酸总重量的约20重量%增加到至多约25重量%。

[0054] 18. 在具有脂肪酸和一定浓度的EPA的微生物的生物物质中增加EPA浓度的方法, 其包含:

[0055] (a) 在发酵罐容器中发酵所述微生物, 以产生生物物质;

[0056] (b) 在所述生物物质上提供大于或等于大气压强以上0.5psi的压强, 提供的时间足以增加所述生物物质中EPA的浓度。

[0057] 19. 如项18所述的方法, 其中所述容器具有从约0.4psi到至多约30psi的顶空压强。

[0058] 20. 如项19所述的方法, 其中所述容器具有从约1psi到至多约30psi的顶空压强。

[0059] 21. 如项20所述的方法, 其中所述容器具有从约1psi到至多约20psi的顶空压强。

[0060] 22. 如项18所述的方法, 其中所述压强的提供时间至多约120小时。

[0061] 23. 如项2所述的方法, 其中所述生物物质具有大于或等于10g/l的密度。

[0062] 24. 如项23所述的方法, 其中所述生物物质具有约10g/l到至多约250g/l的密度。

[0063] 25. 如项3所述的方法, 其中将所述温度被调节至小于约30℃。

[0064] 26. 如项25所述的方法, 其中所述温度小于约22℃。

[0065] 27. 如项26所述的方法, 其中所述温度为约21℃。

[0066] 28. 如项1至27中任意一项所述的方法制得的生物物质。

[0067] 29. 由项28所述的生物物质提取到的油, 其中所述生物物质由在ATCC登录号PTA-10208下保藏的分离的微生物产生, 其中所述油包含脂肪酸, 其中所述脂肪酸还包含 ω -3多不饱和脂肪酸, 其中所述 ω -3多不饱和脂肪酸以所述 ω -3多不饱和脂肪酸总量的大约 ≥ 90 重量%的量包含DHA和EPA, 并且EPA的量为EPA和DHA总量的约6重量%到至多约65重量%。

[0068] 30. 如项29所述的油, 其中EPA的量为EPA和DHA总量的约6重量%到至多约28重量%。

[0069] 31. 如项29所述的油, 其中EPA的量为EPA和DHA总量的约36重量%到至多约65重量%。

[0070] 32. 如项29所述的油, 其中EPA的量为EPA和DHA总量的约28重量%到至多约36重

量%。

[0071] 33.由项28所述的生物质提取到的油,其中所述生物质由在ATCC登录号PTA-10212下保藏的分离的微生物产生,其中所述油包含脂肪酸,其中所述脂肪酸还包含DHA和EPA,并且EPA的量为EPA和DHA总量的约15重量%到至多约70重量%。

[0072] 34.由项28所述的生物质提取到的油,其中所述生物质由在ATCC登录号PTA-9695下保藏的分离的微生物产生,其中所述油包含脂肪酸,其中所述脂肪酸还包含 ω -3多不饱和脂肪酸,其中所述 ω -3多不饱和脂肪酸以所述 ω -3多不饱和脂肪酸总量的约50至70重量%的量包含DHA和EPA,并且EPA的量为EPA和DHA总量的约5重量%到至多约60重量%。

[0073] 35.如项34所述的油,其中所述DHA和EPA的量为所述 ω -3脂肪酸总量的约60重量%。

[0074] 36.制备具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物质的方法,其包含:

[0075] (a)在含有气体的发酵罐容器中发酵所述微生物,以产生生物质,其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物质的破囊壶菌,其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物质的破囊壶菌;

[0076] (b)用CO₂补充所述气体。

[0077] 37.如项2所述的方法,其中在调节所述生物质上压强之前测定所述生物质、EPA或DHA的量。

[0078] 38.如项3所述的方法,其中在调节所述发酵液中温度之前测定所述生物质、EPA或DHA的量。

[0079] 39.如项4所述的方法,其中在调节容器中CO₂之前测定所述生物质、EPA或DHA的量。

[0080] 40.如项5所述的方法,其中在调节溶解的CO₂之前测定所述生物质、EPA或DHA的量。

[0081] 41.生产油的方法,所述方法包含制备如项1-27和36-40中任意一项所述的生物质,并且从所述生物质中获得油。

[0082] 42.如项41所述的方法,其中所述油从所述生物质中提取得到。

[0083] 43.制备微生物的生物质的方法,所述微生物具有增加的浓度的EPA,所述方法包含使所述微生物在含有小于0.1mg/L维生素B12的培养基中生长,以产生生物质。

[0084] 44.如项43所述的方法,其中所述培养基包含小于0.01mg/L维生素B12。

[0085] 45.如项44所述的方法,其中所述培养基包含小于0.001mg/L维生素B12。

[0086] 46.如项45所述的方法,其中所述培养基包含小于0.0001mg/L维生素B12。

[0087] 47.如项46所述的方法,其中所述培养基不包含维生素B12。

[0088] 48.如项43至47中任意一项所述的方法,其中所述培养基还包含以每50g的无脂生物质计小于1g的酵母提取物。

[0089] 49.如项43至48中任意一项所述的方法,其中所述培养基还包含以每50g的无脂生物质计小于0.5g的酵母提取物。

[0090] 50.如项43至49中任意一项所述的方法,其中所述培养基还包含以每50g的无脂生物质计小于0.1g的酵母提取物。

[0091] 51.如项43至50中任意一项所述的方法,其中所述EPA浓度与由含有大于0.1mg/L

维生素B12的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度相比,增加了至少400%。

[0092] 52.如项44至50中任意一项所述的方法,其中所述EPA浓度与由含有大于0.01mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物得到的生物质中EPA浓度相比,增加了至少300%。

[0093] 53.如项45至50中任意一项所述的方法,其中所述EPA浓度与由含有大于0.001mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物得到的生物质中EPA浓度相比,增加了至少200%。

[0094] 54.如项46至50中任意一项所述的方法,其中所述EPA浓度与由含有大于0.0001mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度相比,增加了至少100%。

[0095] 55.制备具有升高浓度的EPA的微生物的生物质的方法,其包含使所述微生物在含有小于0.1mg/L钴的培养基中生长,以产生生物质。

[0096] 56.如项55所述的方法,其中所述培养基包含小于0.01mg/L的钴。

[0097] 57.如项56所述的方法,其中所述培养基包含小于0.001mg/L的钴。

[0098] 58.如项57所述的方法,其中所述培养基包含小于0.0001mg/L的钴。

[0099] 59.如项58所述的方法,其中所述培养基不含钴。

[0100] 60.如项43至59中任意一项所述的方法,其中所述微生物是破囊壶菌。

[0101] 61.如项43至60中任意一项所述的方法,其中所述微生物产生所述脂肪酸总重量的至少3% EPA。

[0102] 62.如项43至61中任意一项所述的方法,其中所述培养基具有至少5%的溶解CO₂水平。

[0103] 63.如项43至62中任意一项所述的方法,其中所述培养基具有至少10%的溶解CO₂水平。

[0104] 64.如项43至63中任意一项所述的方法,其中所述培养基具有至少15%的溶解CO₂水平。

[0105] 65.如项43至64中任意一项所述的分离的生物质。

[0106] 66.如项43至65中任意一项所述的分离的生物质提取到的微生物油。

[0107] 本发明进一步涉及如下各项:

[0108] 1.具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物质,其中所述生物质通过如下方法产生,所述方法包括:

[0109] (a) 在发酵罐容器中发酵所述微生物以产生生物质,和

[0110] (b) 在所述生物质上提供大于或等于大气压强以上0.5psi的压强,提供的时间足以增加所述生物质中EPA的浓度。

[0111] 2.具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物质,其中所述生物质通过如下方法产生,所述方法包括:

[0112] (a) 在发酵罐容器中发酵所述微生物以产生具有水相的发酵液和生物质,其中所述水相具有溶解的气体,其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3%的EPA的生物质的破囊壶菌属;和

[0113] (b) 通过 (i) 将溶解CO₂调节至所述溶解的气体的>2%, (ii) 任选地调节所述生物质上压强,和 (iii) 任选地调节所述发酵液中温度而在所述生物质中得到所期望的EPA水平。

[0114] 3. 具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物物质, 其中所述生物物质通过如下方法产生, 所述方法包括:

[0115] (a) 在发酵罐容器中发酵所述微生物以产生生物物质, 其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3%的EPA的生物物质的破囊壶菌属; 和

[0116] (b) 通过 (i) 调节所述容器中所述生物物质的量和 (ii) 任选地调节所述生物物质上压强而在所述生物物质中得到所期望的EPA水平。

[0117] 4. 具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物物质, 其中所述生物物质通过如下方法产生, 所述方法包括:

[0118] (a) 在发酵罐容器中发酵所述微生物以产生发酵液和生物物质, 其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3%的EPA的生物物质的破囊壶菌属; 和

[0119] (b) 通过 (i) 调节所述发酵液中温度和 (ii) 任选地调节所述生物物质上的压强而在所述生物物质中得到所期望的EPA水平。

[0120] 5. 如项4中所述的生物物质, 其中将所述温度调节至小于约30℃。

[0121] 6. 具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物物质, 其中所述生物物质通过如下方法产生, 所述方法包括:

[0122] (a) 在含有气体的发酵罐容器中发酵所述微生物以产生生物物质, 其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3%的EPA的生物物质的破囊壶菌属; 和

[0123] (b) 通过 (i) 调节所述气体中CO₂水平和 (ii) 任选地调节所述生物物质上的压强而在所述生物物质中得到所期望的EPA水平。

[0124] 7. 具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物物质, 其中所述生物物质通过如下方法产生, 所述方法包括:

[0125] (a) 在含有气体的发酵罐容器中发酵所述微生物以产生生物物质, 其中所述微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3%的EPA的生物物质的破囊壶菌属; 和

[0126] (b) 以足以提高所述生物物质中EPA浓度的CO₂补充所述气体。

[0127] 8. 如项7所述的生物物质, 其中CO₂的量大于或等于腔室中气体的2% (摩尔), 并且所述生物物质中EPA浓度增加至大于脂肪酸总重量的约4重量%。

[0128] 9. 如项8所述的生物物质, 其中EPA浓度从大于脂肪酸总重量的约4重量%增加到至约45重量%。

[0129] 10. 具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物的生物物质, 其中所述生物物质通过如下方法产生, 所述方法包括使所述微生物在含有小于0.1mg/L维生素B12的培养基中生长以产生生物物质。

[0130] 11. 从项1至10中任一项所述的生物物质中提取的油, 其中所述生物物质由以ATCC登录号PTA-10208保藏的分离的微生物产生, 其中所述油包含脂肪酸, 其中所述脂肪酸还包含 ω -3多不饱和脂肪酸, 其中所述 ω -3多不饱和脂肪酸以所述 ω -3多不饱和脂肪酸总量的大约 ≥ 90 重量%的量包含DHA和EPA, 并且EPA的量为EPA和DHA总量的约6重量%多至约65重量%。

[0131] 12. 如项11所述的油, 其中所述油为从生物物质提取且未经过进一步加工的粗制油。

[0132] 13. 如项11所述的油, 其中所述油为精制油。

[0133] 14. 包含项1-10中任一项的生物物质或包含项11-13中任一项的油的饲料产物。

- [0134] 15.如项14的所述饲料产物,其中所述饲料产物为饲料或饲料补充剂。
- [0135] 16.如项14的所述饲料产物,其中所述饲料产物为动物饲料。
- [0136] 17.如项14所述的饲料产物,其中所述饲料产物为水产养殖用饲料。

附图说明

- [0137] 从下文的具体实施方式、附图和附带的序列描述中可较充分地理解本发明的各个实施方式,它们形成本专利申请的一部分。
- [0138] 图1示出了PTA-9695在硫胺素梯度中的性能。
- [0139] 图2示出了PTA-9695在维生素B12梯度中的性能。
- [0140] 图3示出了PTA-9695在生物素梯度中的性能。
- [0141] 图4示出了PTA-9695在泛酸钙梯度中的性能。
- [0142] 图5示出了PTA-9695在TSFM标准品(standards)中的性能。
- [0143] 图6-图19示出了在10% CO₂下PTA-9695在维生素B12梯度中的性能。
- [0144] 图20-图49示出了在10% CO₂下PTA-10208在维生素B12梯度中的性能。

具体实施方式

[0145] 本文所提供的方法和组合物尤其适用于破囊壶菌,该破囊壶菌产生具有其产生的脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物质。本文所提供的产生具有至少3% EPA的生物质的具体的破囊壶菌是在ATCC登录号PTA-10212下所保藏物种的分离的微生物。与ATCC登录号PTA-10212有关的分离的微生物破囊壶菌属菌种27797按照布达佩斯条约(Budapest Treaty)于2009年7月14日保藏于美国维吉尼亚州20110-2209马纳沙斯(Manassas)大学大道(University Boulevard)10801号的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的专利保藏库(Patent Depository)。

[0146] 产生具有至少3% EPA的生物质的具体的破囊壶菌选自在ATCC登录号PTA-10212、PTA-10213、PTA-10214、PTA-10215、PTA-10208、PTA-10209、PTA-10210或PTA-10211下所保藏的分离的微生物。

[0147] 本文所提供的具体实施方式涉及包含18s rRNA的分离的微生物,所述18s rRNA含有SEQ ID NO:1的多核苷酸序列或与SEQ ID NO:1具有至少94%同一性的多核苷酸序列。

[0148] 本文所提供的具体实施方式涉及分离的微生物,其包含与在ATCC登录号PTA-10212下所保藏的微生物的18s rRNA多核苷酸序列具有至少94%同一性的18s rRNA多核苷酸序列。

[0149] 本文所提供的产生具有至少3% EPA的生物质的具体的破囊壶菌涉及在ATCC登录号PTA-10208下所保藏的物种的分离的微生物。

[0150] 本文所提供的具体实施方式涉及在ATCC登录号PTA-10208下所保藏的物种的分离的微生物,其中该微生物所产生的总脂肪酸包含超过约10重量%的二十碳五烯酸。

[0151] 本发明中产生具有至少3% EPA的生物质的具体破囊壶菌涉及具有在ATCC登录号PTA-10208下保藏的物种的特性的分离的微生物,其中该微生物所生产的总脂肪酸包含超过约10重量%的二十碳五烯酸。本文所提供的产生具有至少3% EPA的生物质的具体破囊壶菌选自分离的微生物,该分离的微生物选自在ATCC登录号PTA-10209、PTA-10210或PTA-

10211下保藏的突变株。与ATCC登录号PTA-10209、PTA-10210和PTA-10211有关的微生物按照布达佩斯条约(Budapest Treaty)于2009年9月25日保藏于美国维吉尼亚州20110-2209马纳沙斯(Manassas)大学大道(University Boulevard)10801号的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的专利保藏库(Patent Depository)。

[0152] 本文所提供的各个实施方式涉及上面所描述的微生物、它们的突变株和第12/729013号美国专利申请中所认定的微生物,其通过引用全部并入本文。

[0153] 本文所提供的一个实施方式涉及生产甘油三酯部分的分离的微生物,其中该甘油三酯部分的二十碳五烯酸含量是至少约12重量%。

[0154] 本文所提供的一个实施方式涉及分离的生物物质,其中该生物物质的细胞干重中的至少约20重量%为脂肪酸,其中超过约10重量%的脂肪酸为二十碳五烯酸,并且其中该脂肪酸包含各低于约5重量%的二十碳四烯酸和二十二碳五烯酸n-6。在一些实施方式中,至少约25重量%的脂肪酸为二十二碳六烯酸。

[0155] 在一些实施方式中,本发明涉及包含甘油三酯(triacylglycerol)的分离的生物物质,其中至少约12重量%的甘油三酯为二十碳五烯酸。

[0156] 在一些实施方式中,本发明涉及本发明的任意一种分离的生物物质,其中该脂肪酸还包含各低于约5重量%的油酸、亚油酸、亚麻酸、二十碳烯酸和芥子酸。

[0157] 本发明涉及在ATCC登录号PTA-9695下保藏的破囊壶菌物种的分离的破囊壶菌微生物或由其衍生的菌株,其中所述微生物或由其衍生的菌株所产生的总脂肪酸包含约10重量%或更少的二十碳五烯酸。本文所提供的实施方式涉及上述微生物或由其衍生的菌株以及第US2010/0239533号美国专利申请中所描述的其他相关微生物,该专利通过引用全部并入本文。

[0158] 本文还提供了在具有脂肪酸和一定浓度的EPA的微生物的生物物质中提高EPA浓度的方法,其包含:在含有气体的发酵罐容器中发酵微生物,以产生生物物质,其中微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;并且以足以提高生物物质中EPA浓度的量用CO₂补充气体。可以将EPA浓度的升高与例如未补充CO₂的类似地发酵的微生物中的EPA浓度相比、或者与环境条件下类似地发酵的微生物的EPA浓度相比。

[0159] 在另一个实施方式中,足以提高EPA浓度的CO₂的量大于或等于容器中总气体的2%。在另一个实施方式中,容器中CO₂的量大于或等于容器中总气体的约5%到至多约20%。在另一个实施方式中,容器中CO₂的量大于或等于容器中总气体的约5%到至多约15%。

[0160] 在另一个实施方式中,补充的CO₂的量大于或等于容器中总气体的2%,以提高生物物质中EPA浓度到大于脂肪酸总重量的约4重量%、更具体地大于脂肪酸总重量的约4重量%到至多约45重量%、更具体地大于脂肪酸总重量的约4重量%到至多约40重量%。

[0161] 在另一个实施方式中,补充的CO₂的量足以将EPA水平从脂肪酸总重量的约4重量%提高到约6-30重量%的范围内。在另一个实施方式中,所提供的CO₂的量足以将EPA浓度从脂肪酸总重量的约15重量%提高到至多约40重量%。在另一个实施方式中,所提供的CO₂的量足以将EPA浓度提高到大于脂肪酸总重量的约20重量%。在另一个实施方式中,CO₂是足以将EPA浓度从约20%提高到至多约25%的量提供的。

[0162] 在另一个实施方式中,本文所提供的是提高具有脂肪酸和一定浓度EPA的微生物

的生物物质中EPA浓度的方法,其包含:在发酵罐容器中发酵微生物来生产生物物质;在生物物质上提供足以提高生物物质中EPA浓度的压强。可以将EPA浓度的升高与例如未提供压强的类似地发酵的微生物中的EPA浓度相比、或者与环境条件下类似地发酵的微生物的EPA浓度相比。在另一个实施方式中,在生物物质上所提供的压强高于大气压强约0.5psi。在另一个实施方式中,容器具有大于或等于约0.4psi、更具体地约0.4psi到至多约30psi、甚至更具体地约1到至多约30psi的顶空压强(head pressure或背压)。在另一个实施方式中,容器具有约1到至多约20psi的顶空压强。在另一个实施方式中,将所提供的压强提供足以调节生物物质中EPA的量的时间、具体地至多120个小时。

[0163] 在另一个实施方式中,本文所提供的是制备生产脂肪酸和一定浓度的EPA的微生物生物物质的方法,其包含在足以提高生物物质中EPA浓度的温度下在发酵容器中发酵微生物来生产生物物质,其中微生物包含产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌。在一些实施方式中,足以提高EPA水平的温度小于约30℃、更具体地小于或等于约22℃、并且更具体地该温度为小于或等于约21℃。可以将EPA浓度的升高与例如未调节温度的类似地发酵的微生物中的EPA浓度相比、或者与环境条件下类似地发酵的微生物的EPA浓度相比。

[0164] 在另一个实施方式中,本文所提供的方法改变发酵时所产生的EPA的量,来生产生物物质和所提取的油,其中所提供的EPA的量大于脂肪酸总重量的4重量%、具体地从大于约4重量%到至多约45重量%、更具体地从大于约4重量%到至多约40重量%。在另一个实施方式中,通过本文提供的方法所产生的EPA的量为脂肪酸总重量的约6重量%到至多约30重量%的量。在另一个实施方式中,通过本文提供的方法所产生的EPA的量为脂肪酸总重量的约15重量%到至多约40重量%的量。在另一个实施方式中,通过本文提供的方法所产生的EPA的量为脂肪酸总重量的大于约20重量%的量、更具体地从约20重量%到至多约25重量%的量。

[0165] 在另一个实施方式中,所提供的期望的EPA水平为脂肪酸总重量的大于4重量%、具体地从大于约4重量%到至多约45重量%、更具体地从大于约4重量%到至多约40重量%的量。在另一个实施方式中,通过本文提供的方法所产生的期望的EPA水平为脂肪酸总重量的约6重量%到至多约30重量%的量。在另一个实施方式中,通过本文提供的方法所产生的期望的EPA水平为脂肪酸总重量的约15重量%到至多约40重量%的量。在另一个实施方式中,通过本文提供的方法所产生的期望的EPA水平为脂肪酸总重量的大于约20重量%、更具体地从约20重量%到至多约25重量%的量。

[0166] 提高具有脂肪酸和一定浓度的EPA的微生物生物物质的方法,其包含:在发酵罐容器中发酵微生物来生产生物物质,其中微生物是产生具有脂肪酸总重量的至少3% EPA的生物物质的破囊壶菌;并且以足以提高生物物质中EPA浓度的量增加生物物质。在一些实施方式中,足以提高EPA浓度的量的生物物质具有大于或等于10g/l的密度。在一些实施方式中,足以提高EPA浓度的量的生物物质具有约10g/l到至多250g/l的密度。可以将EPA浓度的升高与例如其中未增加生物物质的类似地发酵的微生物中的EPA浓度相比。

[0167] 在一些实施方式中,在包含较高的CO₂水平(例如在以容器中总气体的大于或等于2%、大于或等于5%、大于或等于10%、大于或等于15%、大于或等于20%、5%至20%、或5%至15%的量含有CO₂的容器中)的培养基中生长的生物物质的EPA浓度比由包含较低的CO₂

水平(例如分别在以容器中总气体的小于2%、小于5%、小于10%、小于15%、小于20%、0%至4%、或1%至3%的量含有CO₂的容器中)的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高至少10%、至少50%、至少100%、至少250%、至少500%、至少750%、至少1000%、至少1100%、至少1200%、至少1300%、至少1400%、至少1500%、至少1600%、至少1700%、至少1800%、至少1900%、或至少2000%。例如,包含较高的CO₂水平(例如在以容器中总气体的大于或等于2%、大于或等于5%、大于或等于10%、大于或等于15%、大于或等于20%、5%至20%、或5%至15%的量含有CO₂的容器中)的培养基中生长的生物质的EPA浓度比由环境CO₂水平下容器中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高至少10%、至少50%、至少100%、至少250%、至少500%、至少750%、至少1000%、至少1100%、至少1200%、至少1300%、至少1400%、至少1500%、至少1600%、至少1700%、至少1800%、至少1900%、或至少2000%。

[0168] 培养基中维生素B12

[0169] 本文中使用时术语“维生素B12”指的是天然存在和合成形式的、化学相关的一类化合物,包括但不限于维生素B12、钴胺素、氰钴胺素和羟钴胺。在一些实施方式中,本发明提供了通过使生产EPA的微生物在具有低水平维生素B12的培养基中或不含维生素B12的培养基中生长,来提高微生物生物质EPA浓度的方法。在一些实施方式中,本发明提供制备具有提高的EPA浓度的微生物的生物学的方法,其包含在含有小于0.1mg/L维生素B12的培养基中生长微生物来生产生物质。在一些实施方式中,培养基包含小于0.05mg/L、小于0.005mg/L、小于0.001mg/L、小于0.0005mg/L、小于0.0001mg/L的维生素B12或者不含维生素B12。

[0170] 在一些实施方式中,培养基包含以每50g的无脂生物质计小于1g的维生素B12源(例如酵母提取物、玉米浸渍固体(corn steep solids)、大豆粉以及其他复合氮源)。在一些实施方式中,培养基包含以每50g的无脂生物质计小于0.8g、小于0.5g、小于0.3g、小于0.1g、小于0.05g或小于0.01g的这种维生素B12源。在一些实施方式中,培养基还包含以每50g的无脂生物质计小于1g酵母提取物、以每50g的无脂生物质中0.8g酵母提取物、以每50g的无脂生物质中小于0.5g酵母提取物、以每50g的无脂生物质中小于0.3g酵母提取物、以每50g的无脂生物质中小于0.1g酵母提取物、以每50g的无脂生物质中小于0.05g酵母提取物、或者以每50g的无脂生物质中小于0.01g酵母提取物。本文使用时,术语“无脂生物质”指的是培养后微生物的目标无脂肪的细胞干重。

[0171] 在一些实施方式中,在包含较低的维生素B12水平的培养基中(例如在含有小于0.1mg/L、小于0.05mg/L、小于0.01mg/L、小于0.005mg/L、小于0.001mg/L、小于0.0005mg/L、小于0.0001mg/L的维生素B12、或者不含维生素B12的培养基中)生长的生物质的EPA浓度比由包含较高的维生素B12水平的培养基中(例如分别包含至少0.1mg/L、至少0.05mg/L、至少0.01mg/L、至少0.005mg/L、至少0.001mg/L、至少0.0005mg/L、至少0.0001mg/L、或至少0.00005mg/L维生素B12的培养基中)生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高至少10%、至少25%、至少50%、至少75%、至少100%、至少150%、至少200%、至少250%、至少300%、至少350%、至少400%、至少450%、至少500%、至少550%、至少600%、至少650%或至少700%。例如,在不包含维生素B12的培养基中生长的生物质的EPA浓度比由包含维生素B12(例如至少0.0001mg/L维生素B12)的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高

至少10%、至少25%、至少50%、至少75%、至少100%、至少150%、至少200%、至少250%、至少300%、至少350%、至少400%、至少450%、至少500%、至少550%、至少600%、至少650%、或至少700%。

[0172] 在一些实施方式中,在环境CO₂水平下包含较低的维生素B12水平的培养基中(例如在含有小于0.1mg/L、小于0.05mg/L、小于0.01mg/L、小于0.005mg/L、小于0.001mg/L、小于0.0005mg/L、小于0.0001mg/L的维生素B12、或者不含维生素B12的培养基中)生长的生物质的EPA浓度比在环境CO₂水平下由包含较高的维生素B12水平的培养基中(例如分别包含至少0.1mg/L、至少0.05mg/L、至少0.01mg/L、至少0.005mg/L、至少0.001mg/L、至少0.0005mg/L、至少0.0001mg/L、或至少0.00005mg/L维生素B12的培养基中)生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、或至少500%。在一些实施方式中,在环境CO₂水平下包含较低的维生素B12水平的培养基中生长的生物质的EPA浓度比在环境CO₂水平下由包含较高的维生素B12水平的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高100%至700%、150%至650%、200%至600%、250%至550%、或300%至500%。在一些实施方式中,在高CO₂水平下(例如至少5%、至少10%、至少15%、或至少20%的溶解的CO₂水平)包含较低的维生素B12水平的培养基中生长的生物质的EPA浓度比在高CO₂水平下由包含较高的维生素B12水平的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少100%。在一些实施方式中,在高CO₂水平下(例如至少5%、至少10%、至少15%、或至少20%的溶解的CO₂水平)包含较低的维生素B12水平的培养基中生长的生物质的EPA浓度比在高CO₂水平下由包含较高的维生素B12水平的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高5%至200%、10%至175%、15%至150%、20%至125%、或25%至100%。例如,在环境CO₂水平下在不含维生素B12的培养基中生长的生物质的EPA浓度比在环境CO₂水平下由包含维生素B12(例如至少0.0001mg/L维生素B12)的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、或至少500%。另一个例子是,在至少10%的溶解的CO₂水平下在不含维生素B12的培养基中生长的生物质的EPA浓度比在至少10%的溶解的CO₂水平下由包含维生素B12(例如至少0.0001mg/L维生素B12)的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或至少100%。

[0173] 在一些实施方式中,与具有大于0.1mg/L维生素B12的培养基中生长的相同微生物相比,在具有小于0.1mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度升高至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、或至少500%。在一些实施方式中,与具有大于0.01mg/L维生素B12的培养基中生长的相同微生物相比,在具有小于0.01mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度升高至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、或至少500%。在一些实施方式中,与具有大于0.001mg/L维生素B12的培养基中生长的相同微生物相比,在具有小于0.001mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度升高至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、或至少500%。在另外一些实施方式中,与具有大于0.0001mg/L维生素B12的培养基中生长的相同微生物相比,在具有小于0.0001mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度升高至少100%、至少

200%、至少300%、至少400%、或至少500%。在一些实施方式中,与具有一定量维生素B12的培养基中生长的相同微生物相比,在不含维生素B12的培养基中生长的微生物的生物物质中EPA浓度升高至少100%、至少200%、至少300%、至少400%、或至少500%。可以通过使微生物在具有较高量维生素B12的培养基中生长、使相同微生物在具有较低量维生素B12的培养基中生长,并比较每个培养物中所得到的生物物质中EPA的浓度,来测定生物物质中EPA浓度的升高。在该测定中,除了它们的维生素B12水平之外,具有较低或较高量的维生素B12的培养基的内容物相同。

[0174] 在一些实施方式中,在包含至少0.1mg/L、至少0.05mg/L、至少0.01mg/L、至少0.005mg/L、至少0.001mg/L、至少0.0005mg/L、或至少0.0001mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物的生物物质的EPA浓度为总脂肪酸的至少1重量%、至少2重量%、至少3重量%、至少4重量%、或至少5重量%的EPA。在一些实施方式中,在包含至少0.1mg/L、至少0.05mg/L、至少0.01mg/L、至少0.005mg/L、至少0.001mg/L、至少0.0005mg/L、或至少0.0001mg/L维生素B12的培养基中生长的微生物的生物物质的EPA浓度为总脂肪酸的1%至50%、1%至40%、1%至30%、1%至20%、2%至50%、2%至40%、2%至30%、或2%至20%的EPA。

[0175] 培养基中钴

[0176] 在一些实施方式中,本发明提供制备具有升高的EPA浓度的微生物的生物物质的方法,其包含使微生物在含有小于0.1mg/L钴的培养基中生长来生产生物物质。在一些实施方式中,培养基包含小于0.05mg/L、小于0.01mg/L、小于0.005mg/L、小于0.001mg/L、小于0.0005mg/L、小于0.0001mg/L的钴、或不含钴。

[0177] 在一些实施方式中,培养基还包含以每50g的无脂生物物质计小于1g的酵母提取物、以每50g的无脂生物物质计小于0.8g的酵母提取物、以每50g的无脂生物物质计小于0.5g的酵母提取物、以每50g的无脂生物物质计小于0.3g的酵母提取物、以每50g的无脂生物物质计小于0.1g的酵母提取物、以每50g的无脂生物物质计小于0.05g的酵母提取物、或者以每50g的无脂生物物质计小于0.01g的酵母提取物。

[0178] 在一些实施方式中,在含有较低钴水平的培养基中(例如在包含小于0.1mg/L、小于0.05mg/L、小于0.01mg/L、小于0.005mg/L、小于0.001mg/L、小于0.0005mg/L、小于0.0001mg/L的钴、或不含钴的培养基中)生长的生物物质的EPA浓度比含有较高钴水平的培养基中(例如在分别包含至少0.1mg/L、至少0.05mg/L、至少0.01mg/L、至少0.005mg/L、至少0.001mg/L、至少0.0005mg/L、至少0.0001mg/L、或至少0.00005mg/L钴的培养基中)生长的微生物所得到的生物物质中EPA浓度高至少10%、至少25%、至少50%、至少75%、至少100%、至少150%、至少200%、至少250%、至少300%、至少350%、至少400%、至少450%、至少500%、至少550%、至少600%、至少650%、或至少700%。例如,在不含钴的培养基中生长的生物物质的EPA浓度比包含钴(例如至少0.0001mg/L钴)的培养基中生长的微生物所得到的生物物质中EPA浓度高至少10%、至少25%、至少50%、至少75%、至少100%、至少150%、至少200%、至少250%、至少300%、至少350%、至少400%、至少450%、至少500%、至少550%、至少600%、至少650%或至少700%。

[0179] 在一些实施方式中,在环境CO₂水平下在包含较低钴水平的培养基中(例如,在包含小于0.1mg/L、小于0.05mg/L、小于0.01mg/L、小于0.005mg/L、小于0.001mg/L、小于0.0005mg/L、小于0.0001mg/L或不含钴的培养基)生长的生物物质的EPA浓度比在环境CO₂水

平下包含较高钴水平的培养基中(例如,在分别包含至少0.1mg/L、至少0.05mg/L、至少0.01mg/L、至少0.005mg/L、至少0.001mg/L、至少0.0005mg/L、至少0.0001mg/L或至少0.00005mg/L钴的培养基中)生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500%。在一些实施方式中,在环境CO₂水平下在包含较低钴水平的培养基中生长的生物质的EPA浓度比在环境CO₂水平下在包含较高钴水平的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高100%至700%、150%至650%、200%至600%、250%至550%或300%至500%。在一些实施方式中,在高CO₂水平(例如,至少5%、至少10%、至少15%或至少20%的溶解的CO₂水平)下在包含较低钴水平的培养基中生长的生物质的EPA浓度比在高CO₂水平下在包含较高钴水平的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。在一些实施方式中,在高CO₂水平(例如,至少5%、至少10%、至少15%或至少20%的溶解的CO₂水平)下在包含较低钴水平的培养基中生长的生物质的EPA浓度比在高CO₂水平下在包含较高钴水平的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高5%至200%、10%至175%、15%至150%、20%至125%或25%至100%。例如,在环境CO₂水平下不含钴的培养基中生长的生物质的EPA浓度比在环境CO₂水平下包含钴(例如至少0.0001mg/L钴)的培养基中高至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500%。另一个例子是,另一个例子是,在至少10%的溶解的CO₂水平下不含钴的培养基中生长的生物质的EPA浓度比在至少10%的溶解的CO₂水平下包含钴(例如至少0.0001mg/L钴)的培养基中生长的微生物所得到的生物质中EPA浓度高至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。

[0180] 在一些实施方式中,与在具有大于0.1mg/L钴的培养基中生长的相同微生物相比,在具有小于0.1mg/L钴的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度提高了至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500%。在一些实施方式中,与在具有大于0.01mg/L钴的培养基中生长的相同微生物相比,在具有小于0.01mg/L钴的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度提高了至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500%。在一些实施方式中,与在具有大于0.001mg/L钴的培养基中生长的相同微生物相比,在具有小于0.001mg/L钴的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度提高了至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500%。在一些实施方式中,与在具有大于0.0001mg/L钴的培养基中生长的相同微生物相比,在具有小于0.0001mg/L钴的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度提高了至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500%。在一些实施方式中,与在具有一定量钴的培养基中生长的相同微生物相比,在不含钴的培养基中生长的微生物的生物质中EPA浓度提高了至少100%、至少200%、至少300%、至少400%或至少500%。可以通过使微生物在具有较高量钴的培养基中生长、使相同微生物在具有较低量钴的培养基中生长,并比较每个培养物中所得到的生物质中的EPA浓度,来测定生物质中EPA浓度的升高。在该测定中,除了它们的钴水平之外,具有较低或较高量的钴的培养基的内容物相同。

[0181] 在一些实施方式中,在包含至少0.1mg/L、至少0.05mg/L、至少0.01mg/L、至少0.005mg/L、至少0.001mg/L、至少0.0005mg/L或至少0.0001mg/L钴的培养基中生长的微生物

物的生物质的EPA浓度为总脂肪酸的至少1重量%、至少2重量%、至少3重量%、至少4重量%或至少5重量%的EPA。在一些实施方式中,在包含至少0.1mg/L、至少0.05mg/L、至少0.01mg/L、至少0.005mg/L、至少0.001mg/L、至少0.0005mg/L或至少0.0001mg/L钴的培养基中生长的微生物的生物质的EPA浓度是总脂肪酸的1重量%至50重量%、1重量%至40重量%、1重量%至30重量%、1重量%至20重量%、2重量%至50重量%、2重量%至40重量%、2重量%至30重量%或2重量%至20重量%的EPA。

[0182] 含有少量维生素B12、酵母提取物和/或钴的培养基还可以包含至少5%、至少10%、至少15%或至少20%的溶解的CO₂水平。本发明涉及本文所公开的方法的分离的生物物质、以及涉及由这些方法的生物物质所提取的微生物油。

[0183] 本发明涉及包含本发明的任意微生物或其混合物的分离的培养物。

[0184] 本发明涉及非人类的动物或人类用的食用产品、化妆品或药物组合物,其包含本发明的任意微生物或生物物质或其混合物。

[0185] 本发明涉及微生物油,其包含至少约20重量%的二十碳五烯酸与各小于约5重量%的二十碳四烯酸、二十二碳五烯酸n-6、油酸、亚油酸、亚麻酸、二十碳烯酸、芥子酸及十八碳四烯酸。在一些实施方式中,该微生物油还包含至少约25重量%的二十二碳六烯酸。

[0186] 本发明涉及包含至少约10重量%的甘油三酯部分的微生物油,其中甘油三酯部分中的至少约12重量%的脂肪酸为二十碳五烯酸,其中甘油三酯部分中的至少约25重量%的脂肪酸为二十二碳六烯酸,以及其中甘油三酯部分中的小于约5重量%的脂肪酸为二十碳四烯酸。

[0187] 本发明涉及非人类的动物或人类用的食用产品、化妆品或药物组合物,其包含本发明的任意微生物油。在一些实施方式中,食用产品是婴儿配方奶粉。在一些实施方式中,婴儿配方奶粉是适合早产婴儿使用的。在一些实施方式中,食用产品是乳、饮料、治疗性饮品、营养饮品或其组合。在一些实施方式中,食用产品是用于非人类的动物或人类食品的添加剂。在一些实施方式中,食用产品是营养补充剂。在一些实施方式中,食用产品是动物饲料。在一些实施方式中,该动物饲料是水产养殖用饲料。在一些实施方式中,该动物饲料是家畜饲料、动物园动物饲料、役畜饲料、牲畜饲料或其组合。

[0188] 本发明涉及用于生产含有 ω -3脂肪酸的微生物油的方法,该方法包括:在培养物中培养本发明的任意分离的微生物或其混合物,以生产含有 ω -3脂肪酸的油。在一些实施方式中,该方法还包含提取(extracting)该油。

[0189] 本发明涉及用于生产含有 ω -3脂肪酸的微生物油的方法,该方法包含从本发明的任意生物物质中提取含有 ω -3脂肪酸的油。在一些实施方式中,使用有机溶剂提取过程诸如己烷提取来提取该微生物油。在一些实施方式中,使用无溶剂提取过程来提取该微生物油。

[0190] 本发明涉及通过本发明的方法所生产的微生物油。

[0191] 本发明涉及用于生产本发明的生物物质的方法,其包括:使本发明的任意分离的微生物或其混合物在培养物中生长,以生产生物物质。

[0192] 本发明涉及通过本发明的方法所生产的生物物质。

[0193] 本发明涉及用于生产本发明的突变菌株的方法,其包括:诱变本发明的任意微生物,并分离该突变菌株。

[0194] 本发明涉及本发明的任意分离的微生物、生物物质或微生物油或其混合物用于制造

治疗发炎或相关病况的药剂的用途。

[0195] 本发明涉及本发明的任意分离的微生物、生物质或微生物油或其混合物用于治疗发炎或相关病况的用途。

[0196] 本发明涉及用于治疗发炎或相关病况的本发明的任意分离的微生物、生物质或微生物油或其混合物。

[0197] 本发明涉及在有需要的个体中用于治疗发炎或相关病况的方法,其包括:给该个体施用本发明的任意分离的微生物、生物质或微生物油或其混合物以及药学上可接受的载剂。

[0198] 本发明涉及由本发明的微生物生产微生物油和生物质的方法,以及使用微生物、生物质和微生物油的方法。

[0199] 微生物

[0200] 在一些实施方式中,用于本发明用途的微生物细胞是网粘菌门(Phylum Labyrinthulomycota)的微生物。在一些实施方式中,网粘菌门的微生物细胞是破囊壶菌,例如裂殖壶菌属(Schizochytrium)或破囊壶菌属(Thraustochytrium)。根据本发明,术语“破囊壶菌”是指破囊壶菌目(Thraustochytriales)的任何成员,其包括破囊壶菌科(Thraustochytriaceae),并且术语“网粘菌(labyrinthulid)”是指网粘菌目(Labyrinthulales)的任何成员,其包括网粘菌科(Labyrinthulaceae)。

[0201] 网粘菌科的成员从前曾被认为是破囊壶菌目的成员,但是在最近此类生物体的分类学归类的修订版中,网粘菌科现在被认为是网粘菌目的成员。网粘菌目和破囊壶菌目均被认为是网粘菌门的成员。分类学理论现在通常将这两个群的微生物与原生藻菌(Stramenopile)谱系中的藻类或藻样原生生物放在一起。破囊壶菌和网粘菌当前的分类学地位可以归纳如下:

[0202] 界:藻菌界(Stramenopila)(管毛生物界(Chromista))

[0203] 门:网粘菌门(Labyrinthulomycota)(不等鞭毛门(Heterokonta))

[0204] 纲:网粘菌纲(Labyrinthulomycetes)(Labyrinthulae)

[0205] 目:网粘菌目(Labyrinthulales)

[0206] 科:网粘菌科(Labyrinthulaceae)

[0207] 目:破囊壶菌目(Thraustochytriales)

[0208] 科:破囊壶菌科(Thraustochytriaceae)

[0209] 对于本发明的目的而言,描述为破囊壶菌的微生物细胞的菌株包括如下生物体:目:破囊壶菌目;科:破囊壶菌科;属:破囊壶菌属(种:物种,arudimentale、aureum、benthicola、globosum、kinnei、motivum、multirudimentale、pachydermum、proliferum、roseum和striatum),吾肯氏壶菌属(Ulkenia)(种:物种,amoeboidea、kerguelensis、minuta、profunda、radiata、sailens、sarkariana、schizochytrops、visurgensis、yorkensis和物种BP-5601),裂殖壶菌属(种:物种,aggregatum、limnaceum、mangrovei、minutum和octosporum),Japonochytrium属(种:物种,marinum),Aplanochytrium属(种:物种,haliotidis、kerguelensis、profunda和stocchinoi),Althornia属(种:物种,crouchii),或Elina属(种:物种,marisalba和sinorifica)。出于本发明的目的,吾肯氏壶菌属内描述的物种将被看作是破囊壶菌属的成员。Aurantiochytrium和Oblongospora在本

发明中是网粘菌门包括的两个额外的属。在一些实施方式中,微生物细胞属于破囊壶菌属、裂殖壶菌属及其混合物。

[0210] 本发明涉及分离的微生物及由其所衍生的菌株。由本发明的分离的微生物所“衍生”的菌株可以为天然衍生或人工衍生,诸如突变株、变异株或重组菌株。本文中使用时术语“分离的”并不一定反映分离物已被纯化的程度,而是指从天然形式或天然环境中分离或隔离。分离物可包括但不限于分离的微生物、分离的生物物质、分离的培养物、分离的微生物油及分离的序列(诸如本文中所公开的分离的多核苷酸序列)。本文中使用时术语“微生物”包括但不限于术语“微型藻”、“破囊壶菌”及与本文中所述的任意保藏微生物相关联的分类学分类。与本发明的任意一种微生物(包括本文中所述的保藏微生物)相关时所用的术语“破囊壶菌目”(“Thraustochytriales”)、“破囊壶菌”(“thraustochytrid”)、“裂殖壶菌属”(“Schizochytrium”)及“破囊壶菌属”(“Thraustochytrium”)是以包括了可获得的系谱信息的目前的分类学分类为基础的,并且不意图限制在本申请的申请日之后修订分类学分类的事件。

[0211] 在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-10212下所保藏的物种的分离的微生物。与ATCC登录号PTA-10212相关联的分离的微生物在本文中也称为破囊壶菌属物种(*Thraustochytrium* sp.) ATCCPTA-10212。与ATCC登录号PTA-10212相关联的分离的微生物按照布达佩斯条约(Budapest Treaty)于2009年7月14日保藏于美国维吉尼亚州20110-2209马纳沙斯(Manassas)大学大道(University Boulevard)10801号的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的专利保藏库(Patent Depository)。在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-10212下所保藏的一种分离的菌株。在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-10212、PTA-10213、PTA-10214、PTA-10215、PTA-10208、PTA-10209、PTA-10210、或PTA-10211下所保藏的分离的菌株。

[0212] 在一些实施方式中,本发明涉及具有在ATCC登录号PTA-10212下所保藏物种的特性的分离的微生物或由其所衍生的菌株。在ATCC登录号PTA-10212下所保藏物种的特性可以包括其生长性质与表型性质(表型性质的实例包括形态学性质与繁殖性质)、其物理性质与化学性质(诸如干重与脂质分布)、其基因序列及其组合,其中所述特性使这些物种区别于先前认定过的物种。在一些实施方式中,本发明涉及具有在ATCC登录号PTA-10212下所保藏物种的特性的分离的微生物,其中所述特性包括:含有SEQ ID NO:1的多核苷酸序列或与SEQ ID NO:1的同一性至少94%、95%、96%、97%、98%或99%的多核苷酸序列的18s rRNA,在ATCC登录号PTA-10212下所保藏物种的形态学性质与繁殖性质,以及在ATCC登录号PTA-10212下所保藏物种的脂肪酸分布。在一些实施方式中,本发明的分离的微生物具有与在ATCC登录号PTA-10212下所保藏微生物基本相同的表型性质。在一些实施方式中,本发明的分离的微生物具有与在ATCC登录号PTA-10212下所保藏微生物基本相同的生长性质。在一些实施方式中,本发明涉及分离的微生物,其所包含具有SEQ ID NO:1的多核苷酸序列或与SEQ ID NO:1的同一性至少94%、95%、96%、97%、98%或99%的多核苷酸序列的18s rRNA。在一些实施方式中,本发明涉及分离的微生物,其包含与在ATCC登录号PTA-10212下所保藏微生物的18s rRNA多核苷酸序列的同一性至少94%的18s rRNA多核苷酸序列。

[0213] 在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-10212下所保藏微生物的一种突变型菌株。在另一些实施方式中,该突变型菌株是在ATCC登录号PTA-10213、PTA-10214或

PTA-10215下所保藏的菌株破囊壶菌属菌种27797-2、破囊壶菌属菌种27797-13和破囊壶菌属菌种27797-20。与ATCC登录号PTA-10213、PTA-10214及PTA-10215相关联的微生物是按照布达佩斯条约(Budapest Treaty)于2009年7月14日保藏于美国维吉尼亚州20110-2209马纳沙斯(Manassas)大学大道(University Boulevard)10801号的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的专利保藏库(Patent Depository)。

[0214] 在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-10208下所保藏物种的分离的微生物。与ATCC登录号PTA-10208相关联的分离的微生物在本文中也称为裂殖壶菌属菌种27173(9.1)-3-E。与ATCC登录号PTA-10208相关联的微生物是按照布达佩斯条约(Budapest Treaty)于2009年7月14日保藏于美国维吉尼亚州20110-2209马纳沙斯(Manassas)大学大道(University Boulevard)10801号的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的专利保藏库(Patent Depository)。在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-10208下所保藏的分离的菌株。

[0215] 在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-10208下所保藏物种的分离的微生物,其中该微生物所产生的总脂肪酸包含超过约10重量%、超过约11重量%、超过约12重量%、超过约13重量%、超过约14重量%、超过约15重量%、超过约16重量%、超过约17重量%、超过约18重量%、超过约19重量%或超过约20重量%的EPA。在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-10208下所保藏物种的一种分离的微生物,其中该微生物所产生的总脂肪酸包含约10重量%至约55重量%、约10重量%至约50重量%、约10重量%至约45重量%、约10重量%至约40重量%、约10重量%至约35重量%、约10重量%至约30重量%、约15重量%至约55重量%、约15重量%至约50重量%、约15重量%至约45重量%、约15重量%至约40重量%、约15重量%至约35重量%、约15重量%至约30重量%、约20重量%至约55重量%、约20重量%至约50重量%、约20重量%至约45重量%、约20重量%至约40重量%、约20重量%至约35重量%或约20重量%至约30重量%的EPA。

[0216] 在一些实施方式中,本发明涉及具有在ATCC登录号PTA-10208下所保藏物种的特性的分离的微生物,其中该微生物所产生的总脂肪酸包含超过约10重量%的二十碳五烯酸。在ATCC登录号PTA-10208下所保藏微生物的特性包括其生长性质与表型性质(表型性质的实例包括形态学性质与繁殖性质)、其物理性质与化学性质(诸如干重与脂质分布)、其基因序列及其组合,其中所述特性可区别该物种与先前鉴定的物种。在一些实施方式中,本发明涉及具有在ATCC登录号PTA-10212下所保藏物种的特性的分离的微生物,其中该特性包括含有SEQ ID NO:2的多核苷酸序列的18srRNA、在ATCC登录号PTA-10208下所保藏物种的形态学性质与繁殖性质、以及在ATCC登录号PTA-10208下所保藏物种的脂肪酸分布。在一些实施方式中,本发明的分离的微生物所具有的物理性质与化学性质与在ATCC登录号PTA-10208下所保藏的微生物基本相同。

[0217] 在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-10208下所保藏微生物的突变型菌株。在另一些实施方式中,该突变型菌株是在ATCC登录号PTA-10209、PTA-10210或PTA-10211下所保藏的菌株裂殖壶菌属菌种27173(9.1)-3-E#2、裂殖壶菌属菌种27173(9.1)-3-E#4和裂殖壶菌属菌种27173(9.1)-3-E#8。与ATCC登录号PTA-10209、PTA-10210及PTA-10211相关联的微生物是按照布达佩斯条约(Budapest Treaty)于2009年9月25日保藏于美国维吉尼亚州20110-2209马纳沙斯(Manassas)大学大道(University Boulevard)10801号

的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的专利保藏库(Patent Depository)。

[0218] 在一些实施方式中,本发明涉及产生甘油三酯部分的本发明的分离的微生物,其中该甘油三酯部分的EPA含量是至少约12重量%、至少约13重量%、至少约14重量%、至少约15重量%、至少约16重量%、至少约17重量%、至少约18重量%、至少约19重量%或至少约20重量%。在一些实施方式中,本发明涉及生产甘油三酯部分的分离的微生物,其中该甘油三酯部分的EPA含量是约12重量%至约55重量%、约12重量%至约50重量%、约12重量%至约45重量%、约12重量%至约40重量%、约12重量%至约35重量%、约12重量%至约30重量%、约15重量%至约45重量%、约15重量%至约40重量%、约15重量%至约35重量%、约15重量%至约30重量%或约20重量%至约30重量%。

[0219] 在一些实施方式中,本发明涉及产生甘油三酯部分的本发明的分离的微生物的突变株、变异株或重组株,其中该甘油三酯部分的EPA含量是至少约10重量%、至少约11重量%、至少约12重量%、至少约13重量%、至少约14重量%、至少约15重量%、至少约16重量%、至少约17重量%、至少约18重量%、至少约19重量%或至少约20重量%。在一些实施方式中,本发明涉及产生甘油三酯部分的本发明的分离的微生物的突变株、变异株或重组株,其中该甘油三酯部分的EPA含量是约12重量%至约55重量%、约12重量%至约50重量%、约12重量%至约45重量%、约12重量%至约40重量%、约12重量%至约35重量%、约12重量%至约30重量%、约15重量%至约55重量%、约15重量%至约50重量%、约15重量%至约45重量%、约15重量%至约40重量%、约15重量%至约35重量%、约15重量%至约30重量%、约20重量%至约55重量%、约20重量%至约50重量%、约20重量%至约45重量%、约20重量%至约40重量%、约20重量%至约35重量%或约20重量%至约30重量%。可通过公知的程序来产生突变型菌株。常用的程序包括辐射、高温处理及以诱变剂处理。变异型菌株可以是本文中所述物种的其它天然存在的分离株和/或亚分离株。可通过分子生物学中用于表达外源基因或改变内源基因的功能或表达的任何公知的方法来产生重组型菌株。在一些实施方式中,突变株、变异株或重组型菌株比野生型菌株生产更高量的 ω -3脂肪酸、尤其是EPA。在一些实施方式中,突变株、变异株或重组型菌株生产较低量的一种或多种脂肪酸,诸如较低量的DHA、ARA、DPA n-6或其组合。在一些实施方式中,突变株、变异株或重组型菌株比野生型菌株产生每升培养物中更大的细胞干重。这种突变株、变异株或重组型菌株是由本发明的分离的微生物所衍生的菌株的实例。

[0220] 本发明还涉及具有在ATCC登录号PTA-9695下所保藏的破囊壶菌物种的特性的分离的破囊壶菌微生物,其中所述微生物或由其衍生的菌株所产生的总脂肪酸包含约10重量%或更少的二十碳五烯酸。

[0221] 本发明还涉及分离的破囊壶菌微生物或由其衍生的菌株,其包含甘油三酯部分,其中甘油三酯部分的二十二碳六烯酸含量为至少约40重量%,其中甘油三酯部分的二十二碳五烯酸n-6含量为至少约0.5重量%至约6重量%,并且其中所述微生物或由其衍生的菌株所产生的总脂肪酸包含约10重量%或更少的二十碳五烯酸。

[0222] 本发明还涉及具有与在ATCC登录号PTA-9695下所保藏的破囊壶菌或由其衍生的菌株相同的物种的分离的破囊壶菌微生物,其中所述微生物或由其衍生的菌株所产生的总脂肪酸包含约10重量%或更少的二十碳五烯酸。

[0223] 在一些实施方式中,由本发明的分离的破囊壶菌微生物所衍生的菌株是突变型菌株。

[0224] 本发明还涉及在ATCC登录号PTA-9695、PTA-9696、PTA-9697或PTA-9698下所保藏的分离的微生物。

[0225] 本发明还涉及包含本发明的任意一种破囊壶菌微生物或其混合物的破囊壶菌生物质。

[0226] 本发明还涉及分离的破囊壶菌生物质,其中至少约50重量%细胞干重的生物质是脂肪酸,并且其中至少约50重量%的脂肪酸是 ω -3脂肪酸。在一些实施方式中,至少约50重量%的脂肪酸是二十二碳六烯酸。本发明还涉及分离的破囊壶菌生物质,其中至少约25重量%细胞干重的生物质是二十二碳六烯酸。

[0227] 在一些实施方式中,本发明还涉及分离的破囊壶菌生物质,其中约10重量%或更少的脂肪酸是二十碳五烯酸,并且其中二十二碳六烯酸与二十碳五烯酸的重量比为至少约5:1。

[0228] 在一些实施方式中,本发明还涉及分离的破囊壶菌生物质,其中约1.5重量%或更少的脂肪酸是二十碳四烯酸,并且其中二十二碳六烯酸与二十碳四烯酸的重量比为至少约20:1。

[0229] 在一些实施方式中,本发明还涉及分离的破囊壶菌生物质,其以至少约10:1的重量比包含二十二碳六烯酸和二十二碳五烯酸n-6。在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-9695下所保藏物种的破囊壶菌。本文中分离的破囊壶菌也称为裂殖壶菌属菌株27173。与ATCC登录号PTA-9695相关联的破囊壶菌按照布达佩斯条约(Budapest Treaty)下于2009年1月7日保藏于美国维吉尼亚州20110-2209马纳沙斯(Manassas)大学大道(University Boulevard)10801号的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的专利保藏库(Patent Depository)。

[0230] 在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-9695下保藏的分离的破囊壶菌菌株。在一些实施方式中,本发明涉及与在ATCC登录号PTA-9695下保藏的破囊壶菌相同物种的分离的破囊壶菌微生物。

[0231] 在一些实施方式中,本发明涉及具有在ATCC登录号PTA-9695下保藏的物种或由其衍生的菌株的特性的分离的破囊壶菌。在ATCC登录号PTA-9695下保藏的破囊壶菌物种的特性包括其生长性质与表型性质(表型性质的实例包括形态学性质与繁殖性质)、其物理性质与化学性质(诸如干重与脂质分布)及其基因序列。在一些实施方式中,本发明的分离的破囊壶菌具有基本上与在ATCC登录号PTA-9695下保藏的破囊壶菌的相同的表型性质。在一些实施方式中,本发明的分离的破囊壶菌具有基本上与在ATCC登录号PTA-9695下保藏的破囊壶菌的相同的生长性质。

[0232] 在一些实施方式中,本发明涉及本发明的分离的破囊壶菌的突变株、变异株或重组株,其中突变株、变异株或重组株所产生的总脂肪酸包含约10重量%或更少的二十碳五烯酸。可以通过公知的程序来产生突变型菌株。常用的程序包括辐射、高温处理及以诱变剂处理。变异型菌株可以是本文中所述物种的其它天然存在的分离株和/或亚分离株。可以通过分子生物学中用于表达外源基因或改变内源基因的功能或表达的任何公知的方法来产生重组型菌株。在一些实施方式中,突变株、变异株或重组型菌株比野生型菌株生产更高

量的 ω -3脂肪酸(包括DHA和/或EPA)。在一些实施方式中,突变株、变异株或重组型菌株生产较低量的一种或多种脂肪酸,诸如较低量的EPA、ARA、DPA n-6或其组合。在一些实施方式中,突变株、变异株或重组型菌株比野生型菌株产生以每升培养物计更大的细胞干重。这种突变株、变异株或重组型菌株是由本发明的分离的破囊壶菌所衍生的菌株的实例。

[0233] 在一些实施方式中,本发明涉及在ATCC登录号PTA-9695下保藏的破囊壶菌的突变型菌株。在另一些实施方式中,突变型菌株是在ATCC登录号PTA-9696、PTA-9697或PTA-9698下保藏的菌株裂殖壶菌属菌种27173-C、裂殖壶菌属菌种27173-E和裂殖壶菌属菌种27173-G。与ATCC登录号PTA-9696、PTA-9697或PTA-9698相关联的破囊壶菌菌株是按照布达佩斯条约(Budapest Treaty)于2009年1月7日保藏于美国维吉尼亚州20110-2209马纳沙斯(Manassas)大学大道(University Boulevard)10801号的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)的专利保藏库(Patent Depository)。这些保藏的突变型菌株是在ATCC登录号PTA-9695下保藏的破囊壶菌的衍生物。

[0234] 在一些实施方式中,本发明的分离的破囊壶菌(包括其突变株、变异株或重组株)在由破囊壶菌分离的一个或多个部分中包含脂肪酸。由破囊壶菌分离的一个或多个部分包括总脂肪酸部分、固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)以及它们的组合。

[0235] 本发明还涉及包含本发明的任意破囊壶菌微生物或其混合物的分离的破囊壶菌培养物。在一些实施方式中,培养物包含至少约5%的溶解氧。

[0236] 本发明还涉及包含本发明的任意一种破囊壶菌微生物或生物质或者其混合物的动物或人类用的食用产品、化妆品或药物组合物。

[0237] 本发明还涉及包含至少约70重量%的甘油三酯部分的微生物油,其中甘油三酯部分的二十二碳六烯酸含量为至少约50重量%,并且其中甘油三酯部分的二十二碳五烯酸n-6含量为约0.5重量%至约6重量%。在一些实施方式中,微生物油还包含约1.5重量%或更少的甘油三酯部分的二十碳四烯酸含量。

[0238] 本发明还涉及包含至少约70重量%的甘油三酯部分的微生物油,其中甘油三酯部分的二十二碳六烯酸含量为至少约40重量%,并且其中甘油三酯部分的二十二碳五烯酸n-6含量为至少约0.5重量%至约6重量%,并且其中二十二碳六烯酸与二十二碳五烯酸n-6的比例大于约6:1。

[0239] 本发明还涉及包含至少约70重量%的甘油三酯部分的微生物油,其中甘油三酯部分的二十二碳六烯酸含量为至少约60重量%。

[0240] 在一些实施方式中,在微生物油的甘油三酯部分中至少约20%的甘油三酯在甘油三酯中选自sn-1、sn-2和sn-3位置的任意二者的二个位置上含有二十二碳六烯酸。在一些实施方式中,在微生物油的甘油三酯部分中至少约5%的甘油三酯在甘油三酯中的所有sn-1、sn-2和sn-3三个位置上均含有二十二碳六烯酸。

[0241] 在一些实施方式中,本发明的分离的微生物(包括其突变株、变异株或重组株)在由该微生物所分离的一个或多个部分中包含脂肪酸分布。由该微生物所分离的一个或多个部分包括总脂肪酸部分、固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)及其组合。特定部分的脂肪酸分布可以包括与本文中所公开的该特定部分相关联的任意脂肪酸分布。

[0242] 本发明涉及生产突变株的方法,其包括诱变本发明的任意一种微生物并分离突变型菌株。

[0243] 培养物与分离的生物物质

[0244] 本发明涉及培养物,其包含本发明的一种或多种分离的微生物。用于接种、生长及回收微生物区系(诸如微型藻与破囊壶菌)的各种发酵参数在本领域中是已知。参见第5130242号美国专利,其通过引用全部并入本文。液态或固态培养基可以含有天然海水或人造海水。供异养型生长的碳源包括但不限于葡萄糖、果糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、糖蜜、海藻糖、葡萄糖胺、葡聚糖、脂肪类、油类、甘油、乙酸钠和甘露糖醇。氮源包括但不限于蛋白胨、酵母提取物、聚蛋白胨、麦芽提取物、肉提取物、酪蛋白氨基酸、玉米浸液、有机氮源、谷氨酸钠、尿素、无机氮源、乙酸铵、硫酸铵、氯化铵及硝酸铵。

[0245] 用于在ATCC登录号PTA-10212下所保藏微生物生长的典型的培养基示于表1中:

[0246] 表1:PTA-10212容器培养基

	<u>成分</u>	<u>浓度</u>	<u>范围</u>
	Na ₂ SO ₄	g/L 31.0	0-50、15-45 或 25-35
	NaCl	g/L 0.625	0-25、0.1-10 或 0.5-5
[0247]	KCl	g/L 1.0	0-5、0.25-3 或 0.5-2
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/L 5.0	0-10、2-8 或 3-6
	(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L 0.44	0-10、0.25-5 或 0.05-3
	MSG·1H ₂ O	g/L 6.0	0-10、4-8 或 5-7

CaCl ₂	g/L	0.29	0.1-5、0.15-3 或 0.2-1
T 154 (酵母提取物)	g/L	6.0	0-20、0.1-10 或 1-7
KH ₂ PO ₄	g/L	0.8	0.1-10、0.5-5 或 0.6-1.8

高压灭菌后 (金属)

柠檬酸	mg/L	3.5	0.1-5000、10-3000 或 3-2500
FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	10.30	0.1-100、1-50 或 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/L	3.10	0.1-100、1-50 或 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	3.10	0.01-100、1-50 或 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/L	0.04	0-1、0.001-0.1 或 0.01-0.1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/L	0.04	0.001-1、0.005-0.5 或 0.01-0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/L	2.07	0.1-100、0.5-50 或 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	mg/L	2.07	0.1-100、0.5-50 或 1-25

[0248]

高压灭菌后 (维生素)

硫胺素	mg/L	9.75	0.1-100、1-50 或 5-25
维生素 B12	mg/L	0.16	0.01-100、0.05-5 或 0.1-1
Ca ^{1/2} -泛酸	mg/L	2.06	0.1-100、0.1-50 或 1-10
生物素	mg/L	3.21	0.1-100、0.1-50 或 1-10

高压灭菌后 (碳)

甘油	g/L	30.0	5-150、10-100 或 20-50
----	-----	------	----------------------

氮进料:

<u>成分</u>	<u>浓度</u>		
MSG·1H ₂ O	g/L	17	0-150、10-100 或 15-50

[0249] 典型的培养条件包括下列:

pH 约 6.5-约 9.5、约 6.5-约 8.0、或约 6.8-约 7.8;

温度: 约 15-约 30 摄氏度、约 18-约 28 摄氏度、或约 21 至约 23 摄氏度;

[0250] 溶解氧: 约 0.1-约 100%饱和度、约 5-约 50%饱和度、或约 10-约 30%饱和度;
和/或

将甘油控制在: 约 5-约 50 g/L、约 10-约 40 g/L、或约 15-约 35 g/L。

[0251] 在一些实施方式中,在ATCC登录号PTA-10212下所保藏的微生物或其突变株、变异株或重组株在作为碳源的甘油上异营生长,但在作为碳源的葡萄糖上不生长。

[0252] 用于在ATCC登录号PTA-10208下所保藏微生物生长的一种典型的培养基示于表2中:

[0253] 表2:PTA-10208容器培养基

<u>成分</u>		<u>浓度</u>	<u>范围</u>
Na ₂ SO ₄		g/L 8.8	0-25、2-20 或 3-10
NaCl		g/L 0.625	0-25、0.1-10 或 0.5-5
KCl		g/L 1.0	0-5、0.25-3 或 0.5-2
MgSO ₄ ·7H ₂ O		g/L 5.0	0-10、2-8 或 3-6
(NH ₄) ₂ SO ₄		g/L 0.42	0-10、0.25-5 或 0.05-3
CaCl ₂		g/L 0.29	0.1-5、0.15-3 或 0.2-1
T 154 (酵母提取物)		g/L 1.0	0-20、0.1-10 或 0.5-5
KH ₂ PO ₄		g/L 1.765	0.1-10、0.5-5 或 1-3
<u>高压灭菌后 (金属)</u>			
柠檬酸		mg/L 46.82	0.1-5000、10-3000 或 40-2500
FeSO ₄ ·7H ₂ O		mg/L 10.30	0.1-100、1-50 或 5-25
[0254]	MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/L 3.10	0.1-100、1-50 或 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		mg/L 9.3	0.01-100、1-50 或 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O		mg/L 0.04	0-1、0.001-0.1 或 0.01-0.1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O		mg/L 0.04	0.001-1、0.005-0.5 或 0.01-0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O		mg/L 2.07	0.1-100、0.5-50 或 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O		mg/L 2.07	0.1-100、0.5-50 或 1-25
<u>高压灭菌后 (维生素)</u>			
硫胺素		mg/L 9.75	0.1-100、1-50 或 5-25
Ca ^{1/2} -泛酸		mg/L 3.33	0.1-100、0.1-50 或 1-10
生物素		mg/L 3.58	0.1-100、0.1-50 或 1-10
<u>高压灭菌后 (碳)</u>			
葡萄糖		g/L 30.0	5-150、10-100 或 20-50
<u>氮进料:</u>			

[0255]

<u>成分</u>	<u>浓度</u>	
NH ₄ OH	mL/L 23.6	0-150、10-100 或 15-50

[0256] 典型的培养条件包括下列:

pH	约 6.5-约 8.5、约 6.5-约 8.0、或约 7.0-约 8.0;
温度:	约 17-约 30 摄氏度、约 20-约 28 摄氏度、或约 22 至约 24 摄氏度;
[0257] 溶解氧:	约 2-约 100%饱和度、约 5-约 50%饱和度、或约 7-约 20%饱和度; 和/或

将葡萄糖控制在: 约 5-约 50 g/L、约 10-约 40 g/L、或约 20-约 35 g/L。

[0258] 在一些实施方式中,发酵体积(培养物体积)是至少约2升、至少约10升、至少约50升、至少约100升、至少约200升、至少约500升、至少约1000升、至少约10000升、至少约20000升、至少约50000升、至少约100000升、至少约150000升、至少约200000升或至少约250000升。在一些实施方式中,发酵体积是约2升至约300000升、约2升、约10升、约50升、约100升、约200升、约500升、约1000升、约10000升、约20000升、约50000升、约100000升、约150000升、约200000升、约250000升或约300000升。

[0259] 在一些实施方式中,本发明涉及包含本发明的脂肪酸分布的一种分离的生物物质。在一些实施方式中,生物物质的细胞干重的至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%或至少约80%为脂肪酸。在一些实施方式中,生物物质的细胞干重的超过约20%、超过约25%、超过约30%、超过约35%、超过约40%、超过约45%、超过约50%、超过约55%或超过约60%为脂肪酸。在一些实施方式中,生物物质的细胞干重的约20重量%至约55重量%、约20重量%至约60重量%、约20重量%至约70重量%、约20重量%至约80重量%、约30重量%至约55重量%、约30重量%至约70重量%、约30重量%至约80重量%、约40重量%至约60重量%、约40重量%至约70重量%、约40重量%至约80重量%、约50重量%至约60重量%、约50重量%至约70重量%、约50重量%至约80重量%、约55重量%至约70重量%、约55重量%至约80重量%、约60重量%至约70重量%或约60重量%至约80重量%为脂肪酸。在一些实施方式中,生物物质包含超过约10重量%、至少约12重量%、至少约15重量%、至少约20重量%、至少约25重量%、至少约30重量%、至少约35重量%、至少约40重量%或至少约45重量%的脂肪酸是EPA。在一些实施方式中,生物物质包含约10重量%至约55重量%、约12重量%至约55重量%、约15重量%至约55重量%、约20重量%至约55重量%、约20重量%至约40重量%或约20重量%至约30重量%的脂肪酸是EPA。在一些实施方式中,生物物质包含甘油三酯部分,其中甘油三酯部分的至少约12重量%、至少约13重量%、至少约14重量%、至少约15重量%、至少约16重量%、至少约17重量%、至少约18重量%、至少约19重量%或至少约20重量%为EPA。在一些实施方式中,生物物质包含甘油三酯部分,其中甘油三酯部分的EPA含量为至少约12重量%至约55重量%、约12重量%至约50重量%、约12重量%至约45重量%、至少约12重量%至约40重量%、至少约12重量%至约35重量%、或至少约12重量%至约30重量%、约15重量%至约55重量%、约15重量%至约50重量%、约15重量%至约45重量%、约15重量%至约40重量%、约15重量%至约35重量%、约15重量%至约30重量%、约20重量%至约55重量%、约20重量%至约50重量%、约20重量%至约45重量%、至少约20重量%至约40重量%、至少约20重量%至约35重量%或约20重量%至约30重量%。在一些实施方式中,生物物质的细胞干重的至少约20重量%、至少约25重量%、至少约30重量%、至少约35重量%、至少约40重量%、至少约50重量%或至少约60重量%为DHA。在一些实施方式中,生物物质的细胞干重中的约20重量%至约60重量%、约25重量%至约60

重量%、约25重量%至约50重量%、约25重量%至约45重量%、约30重量%至约50重量%或约35重量%至约50重量%为DHA。在一些实施方式中,生物质包含的脂肪酸重量中的约10重量%或更少、约9重量%或更少、约8重量%或更少、约7重量%或更少、约6重量%或更少、约5重量%或更少、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少或约1重量%或更少为DHA。在一些实施方式中,该生物质包含脂肪酸的约1重量%至约10重量%、约1重量%至约5重量%、约2重量%至约5重量%、约3重量%至约5重量%或约3重量%至约10重量%为DHA。在一些实施方式中,生物质基本上不含DHA。在一些实施方式中,生物质所包含的约0.1重量%至低于约5重量%、约0.1重量%至约4重量%、约0.1重量%至约3重量%、约0.1重量%至约2重量%、约0.2重量%至低于约5重量%、约0.2重量%至约4重量%、约0.2重量%至约3重量%、约0.2重量%至约2重量%、约0.3重量%至约2重量%、约0.1重量%至约0.5重量%、约0.2重量%至约0.5重量%、约0.1重量%至约0.4重量%、约0.2重量%至约0.4重量%、约0.5重量%至约2重量%、约1重量%至约2重量%、约0.5重量%至约1.5重量%或约1重量%至约1.5重量%的脂肪酸为ARA。在一些实施方式中,生物质包含低于约5重量%、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少、约1.5重量%或更少、约1重量%或更少、约0.5重量%或更少、约0.4重量%或更少、约0.3重量%或更少、约0.2重量%或更少或约0.1重量%或更少的脂肪酸为ARA。在一些实施方式中,生物质基本上不含ARA。在一些实施方式中,生物质包含约0.4重量%至约2重量%、约0.4重量%至约3重量%、约0.4重量%至约4重量%、约0.4重量%至约5重量%、约0.4重量%至少于约5重量%、约0.5重量%至约1重量%、约0.5重量%至约2重量%、约0.5重量%至约3重量%、约0.5重量%至约4重量%、约0.5重量%至约5重量%、约0.5重量%至少于约5重量%、约1重量%至约2重量%、约1重量%至约3重量%、约1重量%至约4重量%、约1重量%至约5重量%或约1重量%至少于约5重量%的脂肪酸为DPA n-6。在一些实施方式中,生物质包含约5重量%或更少、低于约5重量%、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少、约1重量%或更少、约0.75重量%或更少、约0.6重量%或更少或约0.5重量%或更少的脂肪酸为DPA n-6。在一些实施方式中,生物质基本上不含DPA n-6。在一些实施方式中,生物质所包含的脂肪酸具有约5重量%或更少、低于约5重量%、约4重量%或更少、约3重量%或更少或约2重量%或更少的油酸(18:1n-9)、亚麻油酸(18:2n-6)、亚麻酸(18:3n-3)、二十碳烯酸(20:1n-9)、芥子酸(22:1n-9)或其组合。

[0260] 本发明的分离的生物质的特性是与分离的生物质的内源或原有性质相关联的,而不与外部引入材料的性质相关联。在一些实施方式中,分离的生物质不含聚乙烯吡咯啉酮,或不是由含有聚乙烯吡咯啉酮的培养物所分离的。

[0261] 本发明涉及生产生物质的方法。在一些实施方式中,产生本发明的生物质的方法包括使本发明的任意分离的微生物或其混合物在培养物中生长,来生产生物质。本发明涉及通过该方法所生产的生物质。

[0262] 在一些实施方式中,生物质包含脂肪酸,其中脂肪酸还包含 ω -3多不饱和脂肪酸,其中 ω -3多不饱和脂肪酸以 ω -3多不饱和脂肪酸总量的约 ≥ 90 重量%的量包含DHA和EPA,并且EPA的量为EPA和DHA总量的约6重量%到至多约65重量%。尤其提供的是其中EPA的量为EPA和DHA总量的约6重量%到至多约28重量%的生物质。本文还提供其中EPA的量为EPA和DHA总量的约36重量%到至多约65重量%的生物质。更具体地提供其中EPA的量为EPA和

DHA总量的约28重量%至约36重量%的生物质。

[0263] 本文中提供的一些实施方式包含含有脂肪酸的生物质,其中脂肪酸还包含DHA和EPA,并且EPA的量为EPA和DHA总量的约15重量%到至多约60重量%。

[0264] 本发明的一些实施方式还涉及包含在ATCC登录号PTA-9695下所保藏的破囊壶菌或突变菌株的培养物。用于接种、生长及回收微生物区系的各种发酵参数在本领域中是已知的,例如参见第5130242号美国专利。可以使用用于破囊壶菌生长的任何传统介质(培养基)。液态或固态培养基可以含有天然海水或人造海水。碳源包括但不限于葡萄糖、果糖、木糖、蔗糖、麦芽糖、可溶性淀粉、糖蜜、海藻糖、葡萄糖胺、葡聚糖、脂肪类、油类、甘油、乙酸钠和甘露糖醇。氮源包括但不限于蛋白胨、酵母提取物、聚蛋白胨、麦芽提取物、肉提取物、酪蛋白氨基酸、玉米浸液、有机氮源、谷氨酸钠、尿素、无机氮源、乙酸铵、硫酸铵、氯化铵、硝酸铵、硫酸钠。表3中示出了典型的培养基:

[0265] 表3:PTA-9695容器培养基

	<u>成分</u>	<u>浓度</u>		<u>范围</u>
[0266]	NaCl	g/L	12.5	0-25、5-20 或 10-15
	KCl	g/L	1.0	0-5、0.25-3 或 0.5-2
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	g/L	5.0	0-10、2-8 或 3-6

(NH ₄) ₂ SO ₄	g/L	0.6	0-10、0.25-5 或 0.5-3
CaCl ₂	g/L	0.29	0.1-5、0.15-3 或 0.2-1
T 154 (酵母提取物)	g/L	6.0	0-20、1-15 或 5-10
KH ₂ PO ₄	g/L	1.2	0.1-10、0.5-5 或 1-3

高压灭菌后 (金属)

柠檬酸	mg/L	3.5	0.1-100、1-50 或 2-25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	10.30	0.1-100、1-50 或 5-25
MnCl ₂ ·4H ₂ O	mg/L	3.10	0.1-100、1-50 或 2-25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	mg/L	3.10	0.1-100、1-50 或 2-25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	mg/L	0.04	0.001-1、0.005-0.5 或 0.01-0.1
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	mg/L	0.04	0.001-1、0.005-0.5 或 0.01-0.1
CuSO ₄ ·5H ₂ O	mg/L	2.07	0.1-100、0.5-50 或 1-25
NiSO ₄ ·6H ₂ O	mg/L	2.07	0.1-100、0.5-50 或 1-25

[0267]

高压灭菌后 (维生素)

硫胺素**	mg/L	9.75	0.1-100、1-50 或 5-25
维生素 B12**	mg/L	0.16	0.1-100、0.1-50 或 0.1-1
Ca ^{1/2} -泛酸**	mg/L	3.33	0.1-100、0.1-50 或 1-10

**过滤除菌

高压灭菌后 (碳)

葡萄糖	g/L	30.0	5-150、10-100 或 20-50
-----	-----	------	----------------------

氮进料:

<u>成分</u>	<u>浓度</u>		
NH ₄ OH	mL/L	21.6	0-150、10-100 或 15-50

[0268] 典型的培养条件包括下列:

pH 约 6.5-约 8.5、约 6.5-约 8.0、或约 7.0-约 7.5;

温度: 约 17-约 30 摄氏度、约 20-约 25 摄氏度、或约 22 至约 23 摄氏度;

[0269]

溶解氧: 约 5-约 100%饱和度、约 10-约 80%饱和度、或约 20-约 50%饱和度;

将葡萄糖控制在: 约 5-约 50 g/L、约 10-约 40 g/L、或约 20-约 35 g/L。

[0270] 在一些实施方式中,培养基包含至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%或至少约90%的溶解

氧,作为饱和水平的百分数。在一些实施方式中,培养基包含约5%至约20%、约5%至约50%、约5%至约100%、约10%至约20%、约10%至约50%、约10%至约100%、约20%至约50%或约20%至约100%的溶解氧,作为饱和水平的百分数。

[0271] 本发明还涉及本发明的破囊壶菌的分离的生物物质。本发明的分离的破囊壶菌生物物质是通过用于分离破囊壶菌生物物质的任何常规方法(诸如在第5130242号美国专利与第2002/0001833号美国申请公开中所描述的)而获得的采集的(harvested)细胞生物物质。

[0272] 在一些实施方式中,在包含碳、氮与营养素的来源以及约950ppm至约8500ppm氯离子的pH值约6.5至约8.5的培养基中,在约17℃至约30℃下生长约7天后,从每升培养物中分离的生物物质的细胞干重为至少约50g、至少约60g、至少约70g、至少约80g、至少约100g、至少约120g、至少约140g、至少约160g、至少约180g或至少约200g。在一些实施方式中,在包含碳、氮与营养素的来源以及约950ppm至约8500ppm氯离子的pH值约pH 6.5、约pH 7、约pH 7.5、约pH 8.0或约pH 8.5的培养基中,在约17℃下、约18℃下、约19℃下、约20℃下、约21℃下、约22℃下、约23℃下、约24℃下、约25℃下、约26℃下、约27℃下、约28℃下、约29℃下或约30℃下生长约7天后,从每升培养物中分离的生物物质的细胞干重为至少约50g、至少约60g、至少约70g、至少约80g、至少约100g、至少约120g、至少约140g、至少约160g、至少约180g或至少约200g。在一些实施方式中,在包含碳、氮与营养素的来源以及约950ppm至约8500ppm氯离子的pH值约6.5至约8.5的培养基中,在约17℃至约30℃下生长约7天后,从每升培养物中分离的生物物质的细胞干重为约50g至约200g。在一些实施方式中,在包含碳、氮与营养素的来源以及约950ppm至约8500ppm氯离子的pH值约pH 6.5、约pH 7、约pH 7.5、约pH 8.0或约pH 8.5的培养基中,在约17℃下、约18℃下、约19℃下、约20℃下、约21℃下、约22℃下、约23℃下、约24℃下、约25℃下、约26℃下、约27℃下、约28℃下、约29℃下或约30℃下生长约7天后,从每升培养物中分离的生物物质的细胞干重为约50g至约200g。

[0273] 在一些实施方式中,在包含碳、氮与营养素的来源以及约950ppm至约8500ppm氯离子的pH值约pH 6.5至约pH 8.5的培养基中,在约17℃至30℃下生长约7天后,分离的破囊壶菌培养物具有至少约2g/L/天、至少约4g/L/天、或至少约8g/L/天的 ω -3脂肪酸生产力。在一些实施方式中,在包含碳、氮与营养素的来源以及约950ppm至约8500ppm氯离子的pH值约pH 6.5至约pH 8.5的培养基中,在约17℃至30℃下生长约7天后,分离的破囊壶菌培养物具有约1g/L/天至约20g/L/天、约2g/L/天至约15g/L/天、约2g/L/天至约10g/L/天、约3g/L/天至约10g/L/天或约4g/L/天至约9g/L/天的 ω -3脂肪酸生产力。

[0274] 在一些实施方式中,发酵体积(培养物体积)为至少约2升、至少约10升、至少约50升、至少约100升、至少约200升、至少约500升、至少约1000升、至少约10000升、至少约20000升、至少约50000升、至少约100000升、至少约150000升、至少约200000升或至少约250000升。在一些实施方式中,发酵体积为约2升至约300000升、约2升、约10升、约50升、约100升、约200升、约500升、约1000升、约10000升、约20000升、约50000升、约100000升、约150000升、约200000升、约250000升或约300000升。

[0275] 在一些实施方式中,本发明涉及包含本发明的脂肪酸分布的一种分离的破囊壶菌生物物质。在一些实施方式中,生物物质的细胞干重的至少约50%、至少约60%、至少约70%或至少约80%是脂肪酸。在一些实施方式中,生物物质的细胞干重的超过约50%、超过约55%或超过约60%是脂肪酸。在一些实施方式中,生物物质的细胞干重的约50%至约60重量%、约50

重量%至约70重量%、约50重量%至约80重量%、约55重量%至约70重量%、约55重量%至约80重量%、约60重量%至约70重量%或约60重量%至约80重量%是脂肪酸。在一些实施方式中,生物质所包含的至少约50重量%、至少约60重量%、至少约70重量%或至少约80重量%的脂肪酸是 ω -3脂肪酸。在一些实施方式中,生物质所包含的约50重量%至约60重量%、约50重量%至约70重量%、约50重量%至约80重量%的脂肪酸是 ω -3脂肪酸。在一些实施方式中,生物质所包含的至少约50重量%、至少约55重量%、至少约60重量%、至少约65重量%、至少约70重量%、至少约75重量%或至少约80重量%的脂肪酸是DHA。在一些实施方式中,生物质包含约50重量%至约60重量%、约50重量%至约70重量%或约50重量%至约80重量%的脂肪酸是DHA。在一些实施方式中,生物质细胞干重的至少约25重量%、至少约30重量%、至少约40重量%、至少约50重量%或至少约60重量%是二十二碳六烯酸。在一些实施方式中,生物质细胞干重的约25重量%至约65重量%、约25重量%至约50重量%、约30重量%至约40重量%或约25重量%至约35重量%是二十二碳六烯酸。在一些实施方式中,生物质所包含的约10重量%或更少、约9重量%或更少、约8重量%或更少、约7重量%或更少、约6重量%或更少、约5重量%或更少、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少或约1重量%或更少的脂肪酸是EPA。在一些实施方式中,生物质所包含的约1重量%至约10重量%、约1重量%至约5重量%、约2重量%至约5重量%、约3重量%至约5重量%或约3重量%至约10重量%的脂肪酸是EPA。在一些实施方式中,生物质基本不含EPA。在一些实施方式中,生物质包含至少约5:1、至少约7:1、至少约10:1、至少约11:1、至少约14:1、至少约15:1、至少约17:1、至少约20:1、至少约25:1、至少约50:1或至少约100:1的DHA与EPA的重量比,其中生物质所包含的约10重量%或更少的脂肪酸是EPA。在一些实施方式中,生物质所包含的约0.1重量%至0.2重量%、约0.1重量%至约0.3重量%、约0.1重量%至约0.4重量%、约0.1重量%至约0.5重量%或约0.1重量%至约1.5重量%的脂肪酸是ARA。在一些实施方式中,生物质所包含的约1.5重量%或更少、约1重量%或更少、约0.5重量%或更少、约0.4重量%或更少、约0.3重量%或更少、约0.2重量%或更少或约0.1重量%或更少的脂肪酸是ARA。在一些实施方式中,生物质基本不含ARA。在一些实施方式中,生物质包含至少约20:1、至少约40:1、至少约60:1、至少约80:1、至少约100:1、至少约150:1、至少约200:1、至少约250:1或至少约300:1的DHA与ARA的重量比。在一些实施方式中,生物质所包含的约0.5重量%至约1重量%、约0.5重量%至约2重量%、约0.5重量%至约5重量%、约0.5重量%至约6重量%、约1重量%至约5重量%、约1重量%至约6重量%、约2重量%至约5重量%或约2重量%至约6重量%的脂肪酸是DPA n-6。在一些实施方式中,生物质所包含的约6重量%或更少、约5重量%或更少、约2重量%或更少、约1重量%或更少或约0.5重量%或更少的脂肪酸是DPA n-6。在一些实施方式中,生物质基本不含DPA n-6。在一些实施方式中,生物质包含超过约6:1、至少约8:1、至少约10:1、至少约15:1、至少约20:1、至少约25:1、至少约50:1或至少约100:1的DHA与DPA n-6重量比。在一些实施方式中,生物质包含各具有约5重量%或更少、约4重量%或更少、约3重量%或更少、或约2重量%或更少的亚油酸(18:2n-6)、亚麻酸(18:3n-3)、二十碳烯酸(20:1n-9)和芥子酸(22:1n-9)的脂肪酸。

[0276] 在另一个实施方式中,本文提供包含脂肪酸的生物质,其中脂肪酸还包含 ω -3多不饱和脂肪酸,其中 ω -3多不饱和脂肪酸以 ω -3多不饱和脂肪酸总量的约超过或等于约58-68重量%、具体地约60重量%的量包含DHA和EPA,并且EPA的量为EPA和DHA总重的总量

的约5重量%到至多约60重量%。

[0277] 本发明的分离的生物质的特性是与分离的生物质的内源或原有性质相关联的,而不与外部引入物质的性质相关联。

[0278] 微生物油

[0279] 本文中所提供的是通过如上所述方法制成的油、具体地微生物油。

[0280] 在一些实施方式中,微生物油包含脂肪酸,其中脂肪酸还包含 ω -3多不饱和脂肪酸,其中 ω -3多不饱和脂肪酸以 ω -3多不饱和脂肪酸总量的约 ≥ 90 重量%的量包含DHA和EPA,并且EPA的量为EPA和DHA总量的约6重量%到至多约65重量%。具体提供的是其中EPA的量为EPA和DHA总量的约6重量%到至多约28重量%的微生物油。还提供了其中EPA的量为EPA和DHA总量的约36重量%到至多约65重量%的微生物油。更具体地提供了其中EPA的量为EPA和DHA总量的约28重量%至约36重量%的微生物油。

[0281] 本文中提供的一些实施方式包含含有脂肪酸的微生物油,其中脂肪酸还包含DHA和EPA,并且EPA的量为EPA和DHA总量的约15重量%到至多约60重量%。

[0282] 在另一个实施方式中,本文提供了包含脂肪酸的微生物油,其中脂肪酸还包含 ω -3多不饱和脂肪酸,其中 ω -3多不饱和脂肪酸以约超过或等于约58-68重量%、具体地约60重量%的 ω -3多不饱和脂肪酸总量的量包含DHA和EPA,并且EPA的量为EPA和DHA总量的约5重量%到至多约60重量%。

[0283] 本发明涉及包含本发明的脂肪酸分布的微生物油。本发明的微生物油是“粗制油”或“精制油”,其包含至少约35重量%的甘油三酯部分。“粗制油”是从微生物的生物质提取且未经过进一步加工处理的油。“精制油”是通过精制、脱色和/或除臭的标准程序处理粗制油而得到的油。参见例如第5130242号美国专利,其通过引用全部并入本文。微生物油还包括本文中所述的“最终的油”,其是经植物油稀释的精制油。在一些实施方式中,最终的油是经高油酸的葵花籽油稀释的精制油。本文中使用术语“微生物”包括但不限于术语“微型藻”、“破囊壶菌”以及与本文中所述的任意一种保藏微生物相关联的分类学分类。与本发明所述保藏微生物的任意一种微生物油相关时所用的术语“破囊壶菌目”(Thraustochytriales)、“破囊壶菌”(“thraustochytrid”)、“裂殖壶菌属”(Schizochytrium)及“破囊壶菌属”(Thraustochytrium)是以包括了可获得的系谱信息的目前的分类学分类为基础的,并且不意图限制在本申请的申请日之后修订分类学分类的事件。

[0284] 在一些实施方式中,本文中所述的脂肪酸可以是脂肪酸酯。在一些实施方式中,脂肪酸酯包括 ω -3脂肪酸的酯、 ω -6脂肪酸的酯及其组合。在一些实施方式中,脂肪酸酯是DHA酯、EPA酯或其组合。在一些实施方式中,本文中所述的油或其部分被酯化,来产生包含脂肪酸酯的油或其部分。术语“酯”是指用另一个取代基替换脂肪酸分子的羧酸基中的氢。典型的酯类是本领域技术人员已知的,其相关论述提供于Higuchi, T.与V. Stella在Pro-drugs as Novel Delivery Systems第14卷A.C.S. Symposium Series, Bioreversible Carriers in Drug Design, Ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association, Pergamon Press, 1987和Protective Groups in Organic Chemistry, McOmie编, Plenum Press, New York, 1973中。酯的实例包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、叔-丁基、苄基、硝苄基、甲氧基苄基、二苯甲基和三氯乙基。在一些实施方式中,酯是羧酸保

护性酯基、具有芳烷基(如苄基、苯乙基)的酯、具有低级烯基(如烯丙基、2-丁烯基)的酯、具有低级烷氧基-低级烷基(如甲氧基甲基、2-甲氧基乙基、2-乙氧基乙基)的酯、具有低级烷酰氧基-低级烷基(如乙酰氧基甲基、三甲基乙酰氧基甲基、1-三甲基乙酰氧基乙基)的酯、具有低级烷氧羰基-低级烷基(如甲氧羰基甲基、异丙氧羰基甲基)的酯、具有羧基-低级烷基(如羧基甲基)的酯、具有低级烷氧基羰氧基-低级烷基(如1-(乙氧基羰氧基)乙基、1-(环己氧基羰氧基)乙基)的酯、具有胺甲酰氧基-低级烷基(如胺甲酰氧基甲基)的酯等。在一些实施方式中,所添加的取代基是直链或环状烃基,如C1-C6烷基、C1-C6环烷基、C1-C6烯基或C1-C6芳基酯。在一些实施方式中,酯是烷基酯,例如甲基酯、乙基酯或丙基酯。在一些实施方式中,在脂肪酸处于纯化或半纯化状态时,将酯取代基添加到游离脂肪酸分子中。或者,在甘油三酯转换为酯时形成脂肪酸酯。

[0285] 本发明涉及生产微生物油的方法。在一些实施方式中,该方法包括使本发明的任意分离的微生物或其混合物在培养物中生长,以生产包含 ω -3脂肪酸的微生物油。在一些实施方式中,该方法还包括提取该微生物油。在一些实施方式中,该方法包括从本发明的任意生物物质或其混合物中提取含有 ω -3脂肪酸的微生物油。在一些实施方式中,该方法包括异养型生长分离的微生物,其中培养物包含本文中所述的碳源。该微生物油可以从新采集的生物物质提取得到,或者可以从储存在防止变质的条件下的之前采集的生物物质提取得到。可以使用已知方法来培养本发明的微生物、来从培养物中分离生物物质、从生物物质中提取微生物油、以及分析从生物物质所提取的油的脂肪酸分布。参见例如第5130242号美国专利,其通过引用全部并入本文。本发明涉及通过本发明的任意一种方法所生产的微生物油。

[0286] 在一些实施方式中,通过酶提取法提取微生物油。在一些实施方式中,通过机械提取法提取微生物油。在一些实施方式中,机械提取法包括下列一步或多步:(1)通过均化器处理经巴氏杀菌的发酵液,从而辅助细胞裂解和油从细胞中释放;(2)均化后向发酵液中添加异丙醇,以破坏油和水的乳液;(3)将混合物离心,以回收油相;及(4)添加抗氧化剂并在真空中干燥。在一些实施方式中,将粗制油纯化。在一些实施方式中,粗制油的纯化包括下列一步或多步:(1)将粗制油泵入精制槽中并加热该油,接着在混合下添加酸溶液;(2)在酸处理后,向油中添加苛性碱溶液;

[0287] (3)再次加热粗制油然后离心,以将重相与精制油分离;(4)通过使用例如酸、TriSyl®、黏土和/或过滤作用,从精制油中去除剩余的极性化合物、微量金属及氧化产物;(5)将脱色后的油进行冷过滤,以进一步移除油中的高熔点组分,从而达到所期望的澄清度水平;(6)加热该油,之后将油冷却及放置一段时间,造成高熔融的甘油三酯和蜡结晶;(7)向冷却后的油中添加助滤剂,然后通过过滤去除结晶的固体;(8)在冷过滤之后,使用在高温与真空下运行的除臭器,来去除诸如过氧化物和能够引起变味(off-odor)和味道的任何剩余的低分子量化合物;(9)将油转移至除臭器进料槽中、脱气、除臭,例如在填充柱除臭器中进行;及(10)例如在除臭循环结束时在氮气层(nitrogen blanket)下冷却,并向经除臭的油中添加合适的抗氧化剂,以提供氧化稳定性。

[0288] 在一些实施方式中,微生物油包含约0重量%、至少约0.1重量%、至少约0.2重量%、至少约0.5重量%、至少约1重量%、至少约1.5重量%、至少约2重量%或至少约5重量%的固醇酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含约0重量%至约1.5重量%、约0重量%至约2重量%、约0重量%至约5重量%、约1重量%至约1.5重量%、约0.2重量%至约

1.5重量%、约0.2重量%至约2重量%、或者约0.2重量%至约5重量%的固醇酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含约5重量%或更少、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少、约1重量%或更少、约0.5重量%或更少、约0.3重量%或更少、约0.2重量%或更少、约0.5重量%或更少、约0.4重量%或更少、约0.3重量%或更少或约0.2重量%或更少的固醇酯部分。

[0289] 在一些实施方式中,微生物油包含至少约35重量%、至少约40重量%、至少约45重量%、至少约50重量%、至少约55重量%、至少约60重量%、至少约65重量%、至少约70重量%、至少约75重量%、至少约80重量%、至少约85重量%、或至少约90重量%的甘油三酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含约35重量%至约98重量%、约35重量%至约90重量%、约35重量%至约80重量%、约35重量%至约70重量%、约35重量%至约70重量%、约35重量%至约65重量%、约40重量%至约70重量%、约40重量%至约65重量%、约40重量%至约55重量%、约40重量%至约50重量%、约65重量%至约95重量%、约75重量%至约95重量%、约75重量%至约98重量%、约80重量%至约95重量%、约80重量%至约98重量%、约90重量%至约96重量%、约90重量%至约97重量%、约90重量%至约98重量%、约90重量%、约95重量%、约97重量%或约98重量%的甘油三酯部分。

[0290] 在一些实施方式中,微生物油包含至少约10重量%、至少约11重量%、至少约12重量%、至少约13重量%、至少约14重量%、至少约15重量%、至少约16重量%、至少约17重量%、至少约18重量%、至少约19重量%或至少约20重量%的甘油二酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含约10重量%至约45重量%、约10重量%至约40重量%、约10重量%至约35重量%、约10重量%至约30重量%、约15重量%至约40重量%、约15重量%至约35重量%或约15重量%至约30重量%的甘油二酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含至少约0.2重量%、至少约0.3重量%、至少约0.4重量%、至少约0.5重量%、至少约1重量%、至少约5重量%、至少约10重量%、至少约11重量%、至少约12重量%、至少约13重量%、至少约14重量%、至少约15重量%、至少约16重量%、至少约17重量%、至少约18重量%、至少约19重量%、或至少约20重量%的1,2-甘油二酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含约0.2重量%至约45重量%、约0.2重量%至约30重量%、约0.2重量%至约20重量%、约0.2重量%至约10重量%、约0.2重量%至约5重量%、约0.2重量%至约1重量%、约0.2重量%至约0.8重量%、约0.4重量%至约45重量%、约0.4重量%至约30重量%、约0.4重量%至约20重量%、约0.4重量%至约10重量%、约0.4重量%至约5重量%、约0.4重量%至约1重量%、约0.4重量%至约0.8重量%、约0.5重量%至约1重量%、约0.5重量%至约0.8重量%、约10重量%至约45重量%、约10重量%至约40重量%、约10重量%至约35重量%、约10重量%至约30重量%、约15重量%至约40重量%、约15重量%至约35重量%、约15重量%至约30重量%、或约15重量%至约25重量%的甘油二酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含至少约0.1重量%、至少约0.2重量%、至少约0.5重量%、至少约1重量%、至少约2重量%、至少约2.5重量%或至少约3重量%的1,3-甘油二酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含至少约0.3重量%、至少约0.4重量%、至少约0.5重量%、至少约1重量%、至少约1.5重量%、至少约2重量%、或至少约5重量%的固醇部分。

[0291] 在一些实施方式中,微生物油包含约0.3重量%至约5重量%、约0.3重量%至约2重量%、约0.3重量%至约1.5重量%、约0.5重量%至约1.5重量%、约1重量%至约1.5重

量%、约0.5重量%至约2重量%、约0.5重量%至约5重量%、约1重量%至约2重量%、或约1重量%至约5重量%的固醇部分。在一些实施方式中,微生物油包含约5重量%或更少、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少、约1.5重量%或更少或约1重量%或更少的固醇部分。

[0292] 在一些实施方式中,微生物油包含至少约2重量%、至少约5重量%或至少约8重量%的磷脂部分。在一些实施方式中,微生物油包含约2重量%至约25重量%、约2重量%至约20重量%、约2重量%至约15重量%、约2重量%至约10重量%、约5重量%至约25重量%、约5重量%至约20重量%、约5重量%至约20重量%、约5重量%至约10重量%或约7重量%至约9重量%的磷脂部分。在一些实施方式中,微生物油包含低于约20重量%、低于约15重量%、低于约10重量%、低于约9重量%或低于约8重量%的磷脂部分。在一些实施方式中,微生物油基本不含磷脂。在一些实施方式中,微生物油包含低于约2%、低于约1.5%、低于约1%、或低于约0.5%的油重量的不皂化物。微生物油中所存在的脂质类型,诸如甘油三酯部分,可以通过急骤层析法(flash chromatography)分离并通过薄层层析法(TLC)分析、或通过本领域中已知的其它方法来分离和分析。

[0293] 在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含至少约5重量%、至少约10重量%、超过约10重量%、至少约12重量%、至少约13重量%、至少约14重量%、至少约15重量%、至少约16重量%、至少约17重量%、至少约18重量%、至少约19重量%、至少约20重量%、至少约25重量%、至少约30重量%、至少约35重量%、至少约40重量%、或至少约45重量%的EPA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分中的一或多个部分及它们的组合,包含约5重量%至约55重量%、约5重量%至约50重量%、约5重量%至约45重量%、约5重量%至约40重量%、约5重量%至约35重量%、约5重量%至约30重量%、约10重量%至约55重量%、约10重量%至约50重量%、约10重量%至约45重量%、约10重量%至约40重量%、约10重量%至约35重量%、约10重量%至约30重量%、至少约12重量%至约55重量%、至少约12重量%至约50重量%、至少约12重量%至约45重量%、至少约12重量%至约40重量%、至少约12重量%至约35重量%或至少约12重量%至约30重量%、约15重量%至约55重量%、约15重量%至约50重量%、约15重量%至约45重量%、约15重量%至约40重量%、约15重量%至约35重量%、约15重量%至约30重量%、约15重量%至约25重量%、约15重量%至约20重量%、约20重量%至约55重量%、约20重量%至约50重量%、约20重量%至约45重量%、约20重量%至约40重量%、或约20重量%至约30重量%的EPA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含至少约5重量%、至少约10重量%、至少约15重量%、至少约20重量%、至少约25重量%、至少约30重量%、至少约35重量%、至少约40重量%、至少约50重量%、或至少约60重量%的DHA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含约5重量%至约60重量%、约5重量%至约55重量%、约5重量%至约50重量%、约5重量%至约40重量%、约10重量%至约60重量%、约10重量%至约50重量%、约10重量%至约40重量%、约20重量%至约60重量%、约25重量%至约60重量%、约25重量%至约50重

量%、约25重量%至约45重量%、约30重量%至约50重量%、约35重量%至约50重量%、或约30重量%至约40重量%的DHA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含约10重量%或更少、约9重量%或更少、约8重量%或更少、约7重量%或更少、约6重量%或更少、约5重量%或更少、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少或约1重量%或更少的DHA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,其所包含的约1%至约10重量%、约1重量%至约5重量%、约2重量%至约5重量%、约3重量%至约5重量%或约3重量%至约10重量%的脂肪酸是DHA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,基本不含DHA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含约0.1重量%至约5重量%、约0.1重量%至少约5重量%、约0.1重量%至约4重量%、约0.1重量%至约3重量%、约0.1重量%至约2重量%、约0.2重量%至约5重量%、约0.2重量%至少约5重量%、约0.2重量%至约4重量%、约0.2重量%至约3重量%、约0.2重量%至约2重量%、约0.3重量%至约2重量%、约0.1重量%至约0.5重量%、约0.2重量%至约0.5重量%、约0.1重量%至约0.4重量%、约0.2重量%至约0.4重量%、约0.5重量%至约2重量%、约1重量%至约2重量%、约0.5重量%至约1.5重量%或约1重量%至约1.5重量%的ARA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含约5重量%或更少、低于约5重量%、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少、约1.5重量%或更少、约1重量%或更少、约0.5重量%或更少、约0.4重量%或更少、约0.3重量%或更少、约0.2重量%或更少或约0.1重量%或更少的ARA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,基本不含ARA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含约0.4重量%至约2重量%、约0.4重量%至约3重量%、约0.4重量%至约4重量%、约0.4重量%至约5重量%、约0.4重量%至少约5重量%、约0.5重量%至约1重量%、约0.5重量%至约2重量%、约0.5重量%至约3重量%、约0.5重量%至约4重量%、约0.5重量%至约5重量%、约0.5重量%至少约5重量%、约1重量%至约2重量%、约1重量%至约3重量%、约1重量%至约4重量%、约1重量%至约5重量%或约1重量%至约5重量%或更少的DPA n-6。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含约5重量%、低于约5重量%、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少、约1重量%或更少、约0.75重量%或更少、约0.6重量%或更少或约0.5重量%或更少的DPA n-6。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,基本不含DPA n-6。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、甘油二酯部分、固醇部分、固醇酯部分、游离脂肪

酸部分、磷脂部分中的一个或多个部分及它们的组合,其所包含的脂肪酸具有约5重量%或更少,低于约5重量%、约4重量%或更少、约3重量%或更少或约2重量%或更少的油酸(18:1n-9)、亚麻油酸(18:2n-6)、亚麻酸(18:3n-3)、二十碳烯酸(20:1n-9)、芥子酸(22:1n-9)、十八碳四烯酸(18:4n-3)或其组合物。

[0294] 甘油三酯分子含有3个中心碳原子($C(sn-1)H_2R1-(sn-2)H_2R2-C(sn-3)H_2R3$),使得可以形成不同的位置异构体。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的至少约2%、至少约3%、至少约5%、至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约30%、至少约35%或至少约40%的甘油三酯在选自sn-1、sn-2及sn-3位置的任意两者的甘油三酯中二个位置上含有DHA(双取代的DHA)。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的约2%至约55%、约2%至约50%、约2%至约45%、约2%至约40%、约2%至约35%、约2%至约30%、约2%至约25%、约5%至约55%、约5%至约50%、约5%至约45%、约5%至约40%、约5%至约35%、约5%至约30%、约5%至约25%、约10%至约55%、约10%至约50%、约10%至约45%、约10%至约40%、约10%至约35%、约10%至约30%、约10%至约25%、约10%至约20%、约20%至约40%、约20%至约35%、或约20%至约25%的甘油三酯在选自sn-1、sn-2或sn-3位置的任意两者的甘油三酯中二个位置上含有EPA。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的至少约0.5%、至少约1%、至少约1.5%或至少约2%的甘油三酯在所有sn-1、sn-2及sn-3位置上皆含有DHA(三取代DHA)。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的约0.5%至约5%、约0.5%至约3%、约0.5%至约2.5%、约0.5%至约2%、约1%至约5%、约1%至约3%、或约1%至约2%的甘油三酯在所有sn-1、sn-2及sn-3位置上皆含有DHA。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的至少约10%、至少约15%、至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%或至少约60%的甘油三酯在选自sn-1、sn-2或sn-3位置中的任意一个的甘油三酯中的一个位置上含有DHA。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的约10%至约80%、约10%至约70%、约10%至约60%、约15%至约80%、约15%至约75%、约15%至约70%、约15%至约65%、约15%至约60%、约35%至约80%、约35%至约75%、约35%至约65%、约35%至约60%、约40%至约80%、约40%至约75%、约40%至约70%、约40%至约65%、约40%至约60%或约40%至约55%的甘油三酯在选自sn-1、sn-2及sn-3位置中的任意一个的甘油三酯中的一个位置上含有DHA。

[0295] 本发明还涉及生产微生物油的方法。在一些实施方式中,该方法包括使本发明的破囊壶菌在培养物中生长来生产生物质,并且从生物质中提取包含 ω -3脂肪酸的油。油可以从新鲜采集的生物质提取得到,或者可以从储存在防止变质的条件下的之前采集的生物质提取得到。可以使用已知方法来培养本发明的破囊壶菌、从培养物中分离生物质、从生物质中提取微生物油、以及分析从生物质所提取的油的脂肪酸分布。参见例如第5130242号美国专利。

[0296] 本发明还涉及包含本发明的脂肪酸分布的微生物油。本发明的微生物油可以是衍

生自微生物的任意油,例如:从微生物的生物质提取且未经过进一步加工的粗制油;采用进一步加工步骤诸如精制、脱色和/或除臭来处理粗制微生物油所得到的精制油;通过稀释粗制微生物油或精制微生物油所获得的稀释油;或者例如通过采用其他纯化方法处理粗制微生物油或精制微生物油以增加油中脂肪酸(例如DHA)浓度而获得的富集油。

[0297] 在一些实施方式中,微生物油包含约0重量%、至少约0.1重量%、至少约0.2重量%、至少约0.5重量%、至少约1重量%、至少约1.5重量%、至少约2重量%、或至少约5重量%的固醇酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含约0重量%至约1.5重量%、约0重量%至约2重量%、约0重量%至约5重量%、约1重量%至约1.5重量%、约0.2重量%至约1.5重量%、约0.2重量%至约2重量%、或约0.2重量%至约5重量%的固醇酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含少于约5重量%、少于约4重量%、少于约3重量%、或少于约2重量%的固醇酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含至少约65重量%、至少约70重量%、至少约75重量%、至少约80重量%、至少约85重量%、或至少约90重量%的甘油三酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含约65重量%至约95重量%、约75重量%至约95重量%、或约80重量%至约95重量%、或约97重量%、或约98重量%的甘油三酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含至少约0.5重量%、至少约1重量%、至少约1.5重量%、至少约2重量%、至少约2.5重量%、或至少约5重量%的游离脂肪酸部分。在一些实施方式中,微生物油包含约0.5重量%至约5重量%、约0.5重量%至约2.5重量%、约0.5重量%至约2重量%、约0.5重量%至约1.5重量%、约0.5重量%至约1重量%、约1重量%至约2.5重量%、约1重量%至约5重量%、约1.5重量%至约2.5重量%、约2重量%至约2.5重量%、或约2重量%至约5重量%的游离脂肪酸部分。在一些实施方式中,微生物油包含少于约5重量%、少于约4重量%、少于约3重量%、少于约2重量%、或少于约1重量%的游离脂肪酸部分。在一些实施方式中,微生物油包含至少约0.5重量%、至少约1重量%、至少约1.5重量%、至少约2重量%、或至少约5重量%的固醇部分。在一些实施方式中,微生物油包含约0.5重量%至约1.5重量%、约1重量%至约1.5重量%、约0.5重量%至约2重量%、约0.5重量%至约5重量%、约1重量%至约2重量%、或约1重量%至约5重量%的固醇部分。在一些实施方式中,微生物油包含少于约5重量%、少于约4重量%、少于约3重量%、少于约2重量%、或少于约1重量%的固醇部分。在一些实施方式中,微生物油包含至少约1.5重量%、至少约2重量%、至少约2.5重量%、至少约3重量%、至少约3.5重量%、或至少约5重量%的甘油二酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含约1.5重量%至约3重量%、约2重量%至约3重量%、约1.5重量%至约3.5重量%、约1.5重量%至约5重量%、约2.5重量%至约3重量%、约2.5重量%至约3.5重量%、或约2.5重量%至约5重量%的甘油二酯部分。在一些实施方式中,微生物油包含少于约2重量%、少于约1.5重量%、少于约1重量%、或少于约0.5重量%油重量的不皂化物。微生物油中所存在的脂质类型,诸如甘油三酯部分,可以通过急骤层析法(flash chromatography)分离并通过薄层层析法(TLC)分析、或通过本领域中已知的其它方法来分离和分析。

[0298] 在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含至少约40重量%、至少约45重量%、至少约50重量%、至少约55重量%、至少约60重量%、至少约65重量%、至少约70重量%、至少约75重量%、或至少约80重量%的DHA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选

自甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含约40重量%至约45重量%、约40重量%至约50重量%、约40重量%至约60重量%、约50重量%至约60重量%、约55重量%至约60重量%、约40重量%至约65重量%、约50重量%至约65重量%、约55重量%至约65重量%、约40重量%至约70重量%、约40重量%至约80重量%、约50重量%至约80重量%、约55重量%至约80重量%、约60重量%至约80重量%、或约70重量%至约80重量%DHA。在一些实施方式中,微生物油包含含有约45重量%或更少、约40重量%或更少、约35重量%或更少、约30重量%或更少、约25重量%或更少、约20重量%或更少、约15重量%或更少、或约13重量%或更少的DHA的固醇酯部分。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含约10重量%或更少、约9重量%或更少、约8重量%或更少、约7重量%或更少、约6重量%或更少、约5重量%或更少、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少、或约1重量%或更少EPA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分中的一个或多个部分及它们的组合,包含约2重量%至约3重量%、约2重量%至约3.5重量%、约2.5重量%至约3.5重量%、约2重量%至约6重量%、约2.5重量%至约6重量%、约3.0重量%至约6重量%、约3.5重量%至约6重量%、约5重量%至约6重量%、或约2重量%至约10重量%EPA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,基本不含EPA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,包含至少约5:1、至少约7:1、至少约9:1、至少约10:1、至少约15:1、至少约20:1、至少约25:1、至少约30:1、或至少约50:1的DHA与EPA重量比,其中微生物油和/或其一个或多个部分包含10重量%或更少的EPA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,包含至少约5:1但小于约20:1的DHA与EPA重量比。在一些实施方式中,DHA与EPA重量比为约5:1至约18:1、约7:1至约16:1、或约10:1至约15:1。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,包含约0.1重量%至约0.25重量%、约0.2重量%至约0.25重量%、约0.1重量%至约0.5重量%、或约0.1重量%至约1.5重量%的ARA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,包含约1.5重量%或更少、约1重量%或更少、约0.5重量%或更少、约0.2重量%或更少、或约0.1重量%或更少的ARA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,基本不含ARA。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,包含至少约20:1、至少约30:1、至少约35:1、至少约40:1、至少约60:1、至少约80:1、至少约100:1、至少约150:1、至少约200:1、至少约250:1、或至少约300:1的DMA与ARA的重量比。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部

分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,包含约0.5重量%至约1重量%、约0.5重量%至约2重量%、约0.5重量%至约2.5重量%、约0.5重量%至约3重量%、约0.5重量%至约3.5重量%、约0.5重量%至约5重量%、约0.5重量%至约6重量%、约1重量%至约2重量%、约2重量%至约3重量%、约2重量%至约3.5重量%、约1重量%至约2.5重量%、约1重量%至约3重量%、约1重量%至约3.5重量%、约1重量%至约5重量%、或约1重量%至约6重量%DPA n-6。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,包含约6重量%或更少、约5重量%或更少、约3重量%或更少、约2.5重量%或更少、约2重量%或更少、约1重量%或更少、或约0.5重量%或更少DPA n-6。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,基本不含DPA n-6。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,包含大于约6:1、至少约8:1、至少约10:1、至少约15:1、至少约20:1、至少约25:1、至少约50:1、或至少约100:1的DHA与DPA n-6重量比。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,其所包含的亚麻油酸(18:2n-6)、亚麻酸(18:3n-3)、二十碳烯酸(20:1n-9)和芥子酸(22:1n-9)中的每一个为约5重量%或更少、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少、约1.5重量%或更少、约1重量%或更少、或约0.5重量%或更少。在一些实施方式中,微生物油和/或其选自固醇酯部分、甘油三酯部分、游离脂肪酸部分、固醇部分、甘油二酯部分、极性部分(包括磷脂部分)的一个或多个部分及它们的组合,包含约5重量%或更少、约4重量%或更少、约3重量%或更少、约2重量%或更少、约1.5重量%或更少、或约1重量%或更少的十七烷酸(17:0)。在一些实施方式中,微生物油和/或其一个或多个部分包含约0.01重量%至约5重量%、约0.05重量%至约3重量%、或约0.1重量%至约1重量%的十七烷酸。

[0299] 甘油三酯分子含有3个中心碳原子($C_{sn-1}H_2R1-C_{sn-2}H_2R2-C_{sn-3}H_2R3$),使得可以形成不同的位置异构体。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的至少约20%、至少约30%、至少约35%或至少约40%的甘油三酯在选自sn-1、sn-2及sn-3位置的任意两者的甘油三酯中二个位置上含有DHA(双取代的DHA)。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的约20%至约40%、约20%至约35%、约30%至约40%、约30%至约35%的甘油三酯在选自sn-1、sn-2或sn-3位置的任意两者的甘油三酯中二个位置上含有DHA。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的至少约5%、至少约10%、至少约15%或至少约20%的甘油三酯在所有sn-1、sn-2及sn-3位置上皆含有DHA(三取代的DHA)。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的约5%至约20%、约5%至约15%、约10%至约20%、或约10%至约15%的甘油三酯在所有sn-1、sn-2及sn-3位置上皆含有DHA。相反,第6582941号美国专利中所报道的TAG

物种在所有三个位置上都不含DHA。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、或至少约75%的甘油三酯在选自sn-1、sn-2或sn-3位置中的任意一个的甘油三酯中的一个位置上含有DHA。在一些实施方式中,微生物油包含甘油三酯部分,其中基于HPLC色谱上的峰的相对面积百分比,甘油三酯部分中的约50%至约75%、约50%至约70%、约50%至约65%、约60%至约75%、约60%至约70%、或约60%至约65%的甘油三酯在选自sn-1、sn-2及sn-3位置中的任意一个的甘油三酯中的一个位置上含有DHA。

[0300] 组合物

[0301] 本发明涉及包含本发明的微生物、本发明的分离的生物物质、本发明的微生物油或其组合的组合物。

[0302] 基于该组合物的要求,还可以通过任何已知的技术将本发明的微生物、生物物质或微生物油进行化学改性或物理改性或加工。

[0303] 在用于组合物中之前,可以通过多种方法将微生物细胞或生物物质干燥,这些方法包括但不限于冷冻干燥、风干、喷雾干燥、隧道干燥、真空干燥(冷冻真空干燥)及类似的方法。或者,可以不经干燥而直接将收获(harvested)并清洗过的生物物质用于组合物中。参见例如第5130242号美国专利与第6812009号美国专利,二者均通过引用全部并入本文。

[0304] 可使用本发明的微生物油作为起始原料,来更有效率地生产富含脂肪酸诸如EPA的产物。例如,本发明的微生物油可进行本领域中已知的各种纯化技术,诸如蒸馏或尿素包合,来产生具有更高浓度的EPA或其他脂肪酸的效能更高的产物。本发明的微生物油也可以用于化学反应中,来生产从油中的脂肪酸所衍生的化合物,诸如EPA或其他脂肪酸的酯与盐。

[0305] 本发明的组合物可以包含一种或多种赋形剂。本文中使用时,“赋形剂”是指用于本发明的组合物中以赋予该组合物所期望特性的组分或组分的混合物,该组合物包括食品以及药物组合物、化妆组合物和工业组合物。当添加至药物组合物时,本发明的赋形剂可以描述为“药学上可接受的”赋形剂,其含义是,赋形剂是下述化合物、材料、组合物、盐及/或剂型,其在正确的医学判断范围内适于与人类及非人类动物的组织接触,且在与合理的益处/风险比相称的期望的接触期间无过度的毒性、刺激、过敏性反应或其它有问题的并发症。在一些实施方式中,术语“药学上可接受的”指经联邦或州政府的主管机关核准的、或在美国药典或其它一般所认可的国际药典中列为用于动物、以及更具体地用于人的。可使用各种赋形剂。在一些实施方式中,赋形剂可以是但不限于碱剂、稳定剂、抗氧化剂、黏着剂、分离剂、涂布剂、外相组分、控释性组分、溶剂、表面活性剂、保湿剂、缓冲剂、填料、软化剂或其组合。除了本文中所讨论的之外,赋形剂还可包括但不受限于Remington:The Science and Practice of Pharmacy第21版(2005年)中所列的赋形剂。赋形剂被包括在本文中具体类别(例如“溶剂”)中意图说明而非限制赋形剂的作用。具体的赋形剂可以属于多个类别。

[0306] 本发明的组合物包括但不限于食用产品、药物组合物、化妆品及工业组合物。

[0307] 在一些实施方式中,本组合物是食用产品。食用产品是供非人类的动物或人类消费的任意食品,并且包括固态与液态组合物。食用产品可以是动物或人类食品中的添加剂。食品包括但不限于一般食品;液体产品包括乳、饮料、治疗用饮品及营养饮品;功能性食品;

补充剂;营养药物;婴儿配方奶粉,包括早产婴儿用配方奶粉;供怀孕或哺乳妇女用的食品;成人食品;老人食品;以及动物食品。

[0308] 在一些实施方式中,本发明的微生物、生物质或微生物油可以直接使用作下列一种或多种物质或者用作包括在下列一种或多种物质中的添加剂:油、酥油、涂抹酱、其它脂肪成分、饮料、酱料、基于乳或基于黄豆的食品(诸如乳、酸奶、奶酪与冰淇淋)、烘焙物、营养品如作为营养补充剂(胶囊或片剂形式)、维生素补充剂、膳食补充剂、粉状饮品以及粉状食用产品的成品或半成品。在一些实施方式中,营养补充剂是素食用胶囊形式的,这种素食用胶囊并非由动物来源的任一组分所形成,也不含来自动物来源的任一组分。

[0309] 可包括本发明的微生物油的食物组合物的部份清单,包括但不限于基于黄豆的产品(乳、冰淇淋、酸奶、饮品、鲜乳油、涂抹酱、奶精);汤与汤混合物;面团、面糊及烘培食品,包括例如精致糕点制品、早餐麦片、蛋糕、奶酪蛋糕、馅饼、纸杯蛋糕、饼干、棒、面包、卷、松饼(biscuit)、松糕、糕饼、司康(scone)、脆面包丁、脆饼干、甜点、点心蛋糕、派、燕麦(granola)/点心棒及烤酥饼;糖果;硬质糖果甜点;巧克力和其它糖果甜点;口香糖;液态食用产品例如乳、能量饮品、婴儿配方奶粉、碳酸饮品、茶、液体膳食、果汁、基于水果的饮品、基于蔬菜的饮品;多种维生素糖浆、膳食替代品、药用食品及糖浆;粉状饮料混合配料;面食;加工鱼产品;加工肉产品;加工家禽产品;肉汁与酱料;调味料(西红柿酱、蛋黄酱等);基于植物油的涂抹酱;乳制品;酸奶;黄油;冷冻乳制品;冰淇淋;冷冻甜点;霜冻酸奶;半固态食用产品诸如婴儿食品;布丁与明胶甜点;加工的奶酪和未加工的奶酪;烙饼配料;食物棒包括能量棒、华夫脆饼(waffle)配料;色拉酱;代用蛋配料;坚果与基于坚果的涂抹酱;加盐零食诸如薯片及其它脆片或脆物、玉米片、墨西哥玉米片、膨化零食、爆米花、卷条脆饼、炸薯条和坚果;以及特种零食诸如沾酱、干果零食、肉类零食、猪皮、健康食物棒及米/玉米糕。

[0310] 在一些实施方式中,本发明的微生物油可用于补充婴儿配方奶粉。可以用本发明的微生物油或者与由生产二十碳四烯酸(ARA)的微生物所得到的物理精制油组合来补充婴儿配方奶粉。生产ARA的微生物例如为高山被孢霉(*Mortierella alpina*)或舒马克氏抱霉(*Mortierella sect. Schmuckeri*)。或者,可以用本发明的微生物油与富含ARA的油(包括ARASCO® (Martek Biosciences, Columbia, MD))组合,来补充婴儿奶粉。

[0311] 在一些实施方式中,本组合物是动物饲料。“动物”包括属于动物界的非人类生物体,并且包括但不限于水生动物与陆生动物。术语“动物饲料”或“动物食品”是指预定供非人类动物用的任一食品,不论是否用于鱼类;经济鱼类;观赏鱼类;仔鱼;贝类;软体动物;甲壳动物;贝介类;虾;虾苗;卤虫;轮虫;丰年虾;滤食性生物;两栖动物;爬行类;哺乳动物;家畜;农场动物;动物园动物;运动用动物;种畜;竞赛用动物;表演用动物;传承用动物;稀有或濒临绝种的动物;伴侣动物;宠物诸如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠或马;灵长类动物诸如猴(如卷尾猴、恒河猴、非洲绿猴、赤猴、食蟹猴及草原猴)、猿、红毛猩猩、狒狒、长臂猿及黑猩猩;犬科动物诸如狗和狼;猫科动物诸如猫、狮及虎;马科动物诸如马、驴和斑马;供食用的动物诸如母牛、牛、猪和羊;有蹄动物诸如鹿和长颈鹿;或啮齿动物诸如小鼠、大鼠、仓鼠及豚鼠等。动物饲料包括但不限于水产养殖用饲料、包括宠物饲料的家畜饲料、动物园动物饲料、役畜饲料、牲畜饲料及其组合。

[0312] 在一些实施方式中,组合物是其肉或产物供人消费的任意动物的饲料或饲料补充剂,诸如从中获取肉、蛋或乳供人消费的任意动物。当给这些动物喂食时,可以将营养物诸

如LC-PUFAs掺入这些动物的肉、乳、蛋或其它产品中,来增加它们中这些营养素的含量。

[0313] 在一些实施方式中,组合物是喷雾干燥的物质,其可以被碎裂来形成供浮游动物、卤虫、轮虫及滤食性生物食用的具有适合尺寸的颗粒。在一些实施方式中,将用组合物喂食的浮游动物、卤虫或轮虫相应地用于喂食仔鱼、鱼、贝介类、贝类或甲壳动物。

[0314] 在一些实施方式中,组合物是药物组合物。合适的药物组合物包括但不限于消炎组合物、用于治疗冠心病的药物、用于治疗动脉硬化的药物、化学治疗剂、活性赋形剂、骨质疏松症药物、抗忧郁药物、抗痉挛药物、抗幽门螺杆菌药物、用于治疗神经退行性疾病的药物、用于治疗退行性肝病的药物、抗生素、降胆固醇的组合物及降甘油三酯的组合物。在一些实施方式中,组合物是药用食品。药用食品包括在医师监督下服用或外部施用的组合物中的食品以及预定用于病况的特定膳食管理的食品,该病况的独特营养需求是以公认的科学原理为基础由医学评估而建立的。

[0315] 在一些实施方式中,可以将微生物油配制成剂型。剂型可以包括但不限于包含有效量的微生物油的片剂、胶囊、扁囊剂、小丸剂、丸剂、粉剂和颗粒剂、以及胃肠外剂型,其包括但不限于溶液、悬液液、乳液及干粉。本领域中还已知:这些配方还可以包含药学上可接受的稀释剂、填料、崩解剂、粘结剂、润滑剂、表面活性剂、疏水性载剂、水溶性载剂、乳化剂、缓冲液、保湿剂、增湿剂、助溶剂、防腐剂等。给药形式可包括但不限于片剂、锭剂、胶囊、胶囊形片剂和丸剂,其含有微生物油和一或多种合适的药学上可接受的载剂。

[0316] 对于口服给药来说,微生物油可与本领域中所熟知的药学上可接受的载剂组合。这些载剂能将本发明的微生物油配制成片剂、丸剂、锭剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬液液等,以供待治疗的个体口服摄取。在一些实施方式中,剂型是片剂、丸剂或胶囊形片剂。口服使用的药学制剂可以通过以下来得到:添加固态赋形剂,任选地研磨所得到的混合物,并且如果需要的话在加入合适的助剂后加工颗粒混合物,来制得片剂或糖衣丸芯。合适的赋形剂包括但不限于填料,诸如糖类,其包括但不限于乳糖、蔗糖、甘露糖醇及山梨糖醇;纤维素制剂,诸如但不限于玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠及聚乙烯吡咯啉酮(PVP)。如果需要的话,可添加崩解剂,诸如但不限于交联的聚乙烯吡咯啉酮、琼脂或褐藻酸或其盐类诸如褐藻酸钠。可供口服使用的药物制剂包括但不限于由明胶制成的推入配合式胶囊(push-fit capsules)以及由明胶与塑化剂诸如甘油或山梨糖醇制成的软式密封胶囊。在一些实施方式中,剂型是素食剂型,这种素食剂型并非由动物来源的任一组分所形成,也不含来自动物来源的任一组分。在一些实施方式中,这种素食剂型是素食胶囊。

[0317] 在一些实施方式中,组合物是化妆品。化妆品包括但不限于乳液、乳霜、洗剂、面膜、肥皂、洗发精、洗涤剂、面霜、护发素、彩妆、沐浴剂和分散液。化妆品用剂可为药用的或非药用的。

[0318] 在一些实施方式中,组合物是工业组合物。在一些实施方式中,组合物是用于一种或多种制品的起始材料。制品包括但不限于聚合物、照相感光材料、清洁剂、工业油、或工业清洁剂。例如,第7259006号美国专利描述了含DHA的脂肪和油在二十二酸的生产中的用途以及使用二十二酸生产照相敏感材料的用途。

[0319] 使用组合物的方法

[0320] 在一些实施方式中,组合物可用于治疗人类或非人类动物中的病况。在一些实施

方式中,本组合物可供人类或非人类动物中的营养之用。

[0321] 术语“治疗”和“治疗作用”指治疗性治疗和预防性或防止性措施,其中目标是预防或减缓(减轻)不期望的生理状况、疾病或病症,或获得有益或期望的临床结果。出于本发明的目,有益或期望的临床结果包括但不限于减轻或消除与病况、疾病或病症有关的症状或体征;降低病况、疾病或病症的程度;稳定病况、疾病或病症(即病况、疾病或病症不再恶化);延缓病况、疾病或病症的发作或发展;改善病况、疾病或病症;(不论部分或是全面地,不论可检测或是不可检测地)缓解病况、疾病或病症;或者增进或改善病况、疾病或病症。治疗作用包括引发临床上显著的反应,且无过多的副作用。治疗作用也包括与未接受治疗时所预期的存活时间相比延长存活。

[0322] 在一些实施方式中,组合物用于治疗病况、疾病或病症诸如痤疮、急性发炎、年龄相关性黄斑病变、变态反应、阿尔茨海默症、关节炎、哮喘、动脉粥样硬化、自身免疫病、血脂异常、乳房囊肿、恶病质、癌症、心脏再狭窄、心血管疾病、慢性炎症、冠心病、囊肿纤维症、肝脏的退行性疾病、糖尿病、湿疹、胃肠病症、心脏病、高甘油三酯水平、高血压、活动过度、免疫疾病、抑制肿瘤生长、炎症性病况、肠病症、肾功能障碍、白血病、严重抑郁症、多发性硬化症、神经退行性疾病、骨关节炎、骨质疏松症、过氧化物酶体病症、先兆子痫、早产、牛皮癣、肺部病症、类风湿性关节炎、心脏病风险或血栓症。

[0323] 在一些实施方式中,组合物用于增加第三孕期胎儿的妊娠期长度。

[0324] 在一些实施方式中,组合物用于控制血压。

[0325] 在一些实施方式中,组合物是用于改善或维持认知功能。

[0326] 在一些实施方式中,组合物是用于改善或维持记忆力。

[0327] 可以通过由与组合物或剂型相兼容的任意途径,来将组合物或剂型给药至个体的体内。如果物质被个体引入个体的体内,或者如果物质是由他人、机器或装置引入个体的体内,则该物质视为被“给药”。因此,“给药”包括如自我给药、由他人给药及间接给药。本文中使用时,与“给药”相关的术语“连续的”或“接连的”是指给药频率至少每日一次。然而,请注意给药频率可高于每日一次且仍然是“连续的”或“接连的”,如每日二次或甚至三次,只要未超过本文中所指定的剂量水平即可。用于给药的方式和方法是本领域中已知的,并且技术人员可参考各种用于指导的药理学文献。例如可查阅“Modern Pharmaceuticals,”Banker&Rhodes, Informa Healthcare, USA, 第4版(2002)和“Goodman&Gilman’s The Pharmaceutical Basis of Therapeutics,”McGraw-Hill Companies, Inc., New York, 第10版(2001)。

[0328] “个体(subject)”、“个人(individual)”或“患者”是指人类或非人类的任意个体,对其来说,诊断、预后、治疗或者组合物或剂型的给药是期望的。哺乳动物个体包括但不限于人类;家畜;农场动物;动物园动物;运动用动物;宠物诸如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠或马;灵长类动物诸如猴(如卷尾猴、恒河猴、非洲绿猴、赤猴、食蟹猴和草原猴)、猿、红毛猩猩、狒狒、长臂猿和黑猩猩;犬科动物诸如狗和狼;猫科动物诸如猫、狮和虎;马科动物诸如马、驴和斑马;供食用的动物诸如母牛、牛、猪和羊;有蹄动物诸如鹿和长颈鹿;啮齿动物诸如小鼠、大鼠、仓鼠和豚鼠;等等。术语个体还涵盖模型动物(model animals),如疾病模型动物。在一些实施方式中,术语个体包括在经济上或其它方面有价值的动物,如经济上重要的种畜、竞赛用动物、展示用动物、传承用动物、稀有或濒临绝种的动物或伴侣动物。在某些

实施方式中,个体是人类个体。在某些实施例中,个体是非人类个体。

[0329] 组合物可以依“营养量”、“治疗有效量”、“预防有效量”、“治疗性剂量”或“预防性剂量”给药。“营养量”是指在所需的剂量与时间段情况下有效达到所期望的营养结果的量。营养结果可以是,例如个体中所期望的脂肪酸组分水平的增加。“治疗有效量”或“治疗性剂量”是指在所需的剂量与时间段情况下有效达到所期望的治疗结果的量。治疗结果可以是,例如减轻症状、延长存活、改善活动性等。治疗结果不一定是“治愈”。“预防有效量”或“预防性剂量”是指在所需的剂量与时间段情况下有效达到所期望的预防结果的量。通常,由于预防性剂量在疾病之前或在较早期阶段用于个体中,预防有效量将低于用于治疗晚期疾病的治疗有效量。

[0330] 在待给药于个体的微生物、生物质或微生物油的EPA或其它脂肪酸组分的量的基础上,可以将各种剂量的组合物、剂型或药物组合物给药于个体。本文中术语“每日剂量”、“每日剂量水平”及“日剂量”指的是每日(每24小时期间)给药的EPA或其它脂肪酸组分的总量。因此,例如,以2mg的每日剂量将EPA给药于个体,指的是不论EPA是以包含2mg EPA的单个剂型给药,还是替代性地以各含0.5mg EPA的四个剂型(总共为2mg EPA)给药,个体以每日为基础收到总共2mg的EPA。在一些实施方式中,每日的EPA量是以单个剂型或以二个剂型给药。可单次应用或分多次应用本发明的剂型。例如,如果每日服用四片,每片含0.5mg的EPA,则可每日一次服用所有四片,或每日分二次各服用2片,或每6小时服用1片。在一些实施方式中,每日剂量是约100mg至约15g的EPA。在一些实施方式中,每日剂量是约0.5mg至约250mg、约100mg至约250mg、约100mg至约500mg、约100mg至约1g、约1g至约2.5g、约1g至约5g、约1g至约10g、约1g至约15g、约5g至约10g、约5g至约15g、约10g至约15g、约100mg至约10g、约100mg至约5g或约100mg至约2.5g的EPA、DHA或其组合物。在一些实施方式中,组合物是每剂型包含约0.5mg至约250mg、100mg至约250毫克、约0.5mg至约500mg、约100mg至约500mg、约0.5mg至约1g或约100mg至约1g的EPA、DHA或其组合物的剂型。

[0331] 可使用各种方式,来实现本发明的组合物或剂型的给药。例如,在一些实施方式中,接连地每日进行给药,或者隔日进行给药(两日一次)。给药可一天或多天进行。

[0332] 组合物与剂型的给药可以与用于治疗病况的其它方法组合。例如,本发明的方法可以与饮食疗法(如低碳水化合物饮食、高蛋白质饮食、高纤维饮食等)、运动疗法、减重疗法、戒烟疗法或其组合相结合。本发明的方法也可以与治疗病况的其它药物产品组合使用。本发明的组合物或剂型可以在其它疗法或药物产品之前或之后给药。

[0333] 包含组合物的试剂盒

[0334] 本发明涉及含有一个或多个单位的本发明的组合物的试剂盒或包装。试剂盒或包装可以包括含有本发明的微生物、生物质或微生物油或其组合的食品单元、药物组合物单元、化妆组合物单元或工业组合物单元。试剂盒或包装还可以包括含有本发明的微生物、生物质或微生物油或其组合的添加剂,其用于制备食品、化妆组合物、药物组合物或工业组合物。

[0335] 在一些实施方式中,试剂盒或包装包含一个或多个按照本发明的方法待给药的药物组合物的单元(unit)。试剂盒或包装可以包含一个剂量单位或超过一个剂量单位(即多个剂量单位)。如果多个剂量单位存在于试剂盒或包装中,则可以任选地安排多个剂量单位依次给药。

[0336] 本发明的试剂盒可以任选地包含与该试剂盒的单元或剂型相关的说明书。这种说明可以是管理药物产品的制造、使用或销售的政府机关所指定的形式,此通知反映了该机关核准针对人体给药而制造、使用或销售,以治疗病况或病症。说明书可以是传递与根据本发明的方法的试剂盒中的单元或剂型相关的信息的任意形式。例如,说明书可以是印刷品的形式,或是预先录好的媒体装置的形式。

[0337] 在检查患者期间,医疗专业人员能够确定施用本发明的方法中的一种适于该患者,或医师可以确定通过施用本发明的方法中的一种可以改善患者的病况。在指定任意疗法之前,医师可以就例如与该疗法相关的各种风险与效果方面给患者提供建议。可对患者全盘揭露与该疗法相关的所有已知风险和疑似风险。这种建议辅导可以以口头方式以及以书面方式提供。在一些实施方式中,医师可提供给患者与该疗法有关的文献数据,诸如产品信息、教育材料等。

[0338] 本发明涉及就治疗方法对消费者进行教育的方法,该方法包括在销售点与消费者信息一起分发剂型。在一些实施方式中,分发是在具有药剂师或医疗服务提供者(healthcare provider)的销售点进行的。

[0339] 术语“消费者信息”可以包括但不限于英语本文、非英语本文、视觉图像、图表、电话录音、网站以及与现场的消费者服务代表联络。在一些实施方式中,消费者信息将提供与根据本发明的方法的剂型的使用、适当的使用年龄、适应征、禁忌、适当剂量、警告、电话号码或网址有关的说明。在一些实施方式中,该方法还包括给相关人员提供专业信息,该相关人员负责回答消费者与根据本发明方法所公开的疗法的使用有关的问题。术语“专业信息”包括但不限于与根据本发明方法给药时疗法有关的信息,其被设计为使医学专业人员能够回答消费者问题。“医学专业人员”包括例如医师、医师助理、护士、执业护理师、药剂师及消费者服务代表。

[0340] 在整体地说明本发明之后,可通过参考本文中所提供的实施例来获得进一步的理解。这些实施例仅出于说明的目的,而并非意图限制。

[0341] 实施例1

[0342] 在本实施例中,在含有50ml培养基的250ml锥形(Erlenmeyer)摇瓶中培养 *Schizochytrium* sp.。在同样的培养基中制备接种物,该培养基由0.625g NaCl、1.0g KCl、5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.1g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.29g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.0g谷氨酸单钠一水合物、1.0g酵母提取物和23.8g HEPES缓冲剂溶解于大约900ml蒸馏水中组成。使用NaOH将培养基调到pH 7。培养基的最终体积调至896ml,并且通过高压灭菌法来灭菌培养基。高压灭菌后,将下列组分无菌地加入到培养基中:0.89ml的56.5g/l KH_2PO_4 、100ml的500g/l葡萄糖、2ml的微量金属贮备液和1ml的维生素贮备液。微量金属贮备液包含如下:90g柠檬酸、5.15g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1.55g $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、0.965g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.02g $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.02g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.035g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、1.035g $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 溶解于一升蒸馏水中,并用HCl将pH调至2.5。维生素贮备液包含如下:0.16g维生素B12、9.75g硫胺素和3.33g泛酸钙溶解于一升蒸馏水中。用1ml的接种物接种摇瓶。将一式三份的瓶放置于 CO_2 培养箱中,设定该培养箱以维持空气中5、10或15% CO_2 。另一组一式三份的瓶置于环境 CO_2 水平下的培养箱中。将所有组的瓶在200rpm下摇,并且所有培养箱设定在22.5℃。生长7天后,通过离心从摇瓶中收集生物质,将生物质冷冻干燥并且使用标准甲基酯化程序来测定生物质的脂肪酸谱。 CO_2 水平的升高在生物质、%

脂肪和脂肪酸谱中产生显著的变化。值得注意的是在CO₂条件和环境条件之间% EPA和% DHA值所产生的变化。此外,这些脂肪酸的变化随着CO₂水平提高而变得更明显。结果列于表4中。

[0343] 表4

[0344]

样品	生物质 (g/l)	% 16:0	% EPA	% DHA	% 脂肪
环境 (1)	3.43	33.55	4.24	54.15	54.55
环境 (2)	3.35	33.29	4.30	54.42	52.67
环境 (3)	3.27	33.29	4.29	54.38	50.62
15% CO ₂ (1)	2.96	28.41	26.12	29.52	53.31
15% CO ₂ (2)	2.94	28.13	26.20	29.98	55.46
15% CO ₂ (3)	2.80	28.12	26.61	29.46	53.20
环境 (1)	3.89	35.34	3.95	52.31	60.21
环境 (2)	3.85	34.74	4.00	53.03	58.33
环境 (3)	3.91	34.76	4.04	52.95	58.18
10% CO ₂ (1)	4.91	33.35	12.94	41.13	69.98
10% CO ₂ (2)	5.03	33.28	12.99	41.15	69.58
10% CO ₂ (3)	4.95	33.46	12.84	41.02	69.08
环境 (1)	3.51	29.95	3.00	45.06	58.48
环境 (2)	3.69	30.57	2.97	44.92	54.87
环境 (3)	3.43	29.98	3.13	45.20	53.29
5% CO ₂ (1)	4.18	32.03	5.59	40.55	42.89
5% CO ₂ (2)	4.16	31.87	5.85	40.36	43.47
5% CO ₂ (3)	4.14	31.58	6.13	40.43	44.13

[0345] 实施例2

[0346] 在本实施例中,在含有50ml培养基的250ml锥形(Erlenmeyer)摇瓶中培养 *Schizochytrium* sp.。在同样的培养基中制备接种物,该培养基由0.625g NaCl、1.0g KCl、5g MgSO₄·7H₂O、0.1g (NH₄)₂SO₄、0.29g CaCl₂·2H₂O、1.0g谷氨酸单钠一水合物、1.0g酵母提取物和23.8g HEPES缓冲剂溶解于大约900ml蒸馏水中组成。使用NaOH将培养基调到pH 7。培养基的最终体积调至896ml,并且通过高压灭菌法来灭菌培养基。高压灭菌后,将下列组分无菌地加入到培养基中:0.89ml的56.5g/l KH₂PO₄、100ml的500g/l葡萄糖、2ml的微量金属贮备液和1ml的维生素贮备液。微量金属贮备液包含如下:90g柠檬酸、5.15g FeSO₄·7H₂O、1.55g MnCl₂·4H₂O、0.965g ZnSO₄·7H₂O、0.02g CoCl₂·6H₂O、0.02g Na₂MoO₄·2H₂O、1.035g CuSO₄·5H₂O、1.035g NiSO₄·6H₂O溶解于一升蒸馏水中,并用HCl将pH调至2.5。维生素贮备液包含如下:0.16g维生素B12、9.75g硫胺素和3.33g泛酸钙溶解于一升蒸馏水中。用1ml的接种物接种摇瓶。将一式二份的瓶放置于CO₂培养箱中,设定该培养箱以维持空气中5、10或15% CO₂。另一组一式二份的瓶置于环境CO₂水平下的培养箱中。将所有组的瓶在200rpm下摇,并且所有培养箱设定在22.5℃。生长7天后,通过离心从摇瓶中收集生物质,将生物质冷冻干燥并且使用标准甲基酯化程序来测定生物质的脂肪酸谱。CO₂水平的升高在生物质、%脂肪和脂肪酸谱中产生显著的变化。值得注意的是在CO₂条件和环境条件之间% EPA和%

DHA值中所产生的变化。此外,这些脂肪酸的变化随着CO₂水平提高而变得更明显。结果提供于表5中。

[0347] 表5

样品	生物质 (g/l)	% 16:0	% EPA	% DHA	% 脂肪
环境 (1)	5.81	28.22	3.88	58.69	60.86
环境 (2)	6.03	26.54	3.89	60.87	66.74
15% CO ₂ (1)	4.38	14.67	36.12	35.84	62.44
15% CO ₂ (2)	4.44	14.31	36.09	36.59	63.00

10% CO ₂ (1)	5.36	21.44	19.88	46.40	64.94
10% CO ₂ (2)	5.63	21.39	19.88	46.74	65.82
5% CO ₂ (1)	6.40	24.71	11.56	54.04	77.16
5% CO ₂ (2)	6.33	24.62	11.74	54.36	67.94

[0350] 实施例3

[0351] 在本实施例中,在含有50ml培养基的250ml锥形(Erlenmeyer)摇瓶中培养 *Thrasutochytrium* sp.。在同样的培养基中制备接种物,该培养基由42g Na₂SO₄、0.625g NaCl、1.0g KCl、5g MgSO₄·7H₂O、0.1g (NH₄)₂SO₄、0.29g CaCl₂·2H₂O、1.0g谷氨酸单钠一水合物、1.0g酵母提取物和23.8gHEPES缓冲剂溶解于大约900ml蒸馏水中组成。使用NaOH将培养基调到pH 7。培养基的最终体积调至961ml,并且通过高压灭菌法来灭菌培养基。高压灭菌后,将下列组分无菌地加入到培养基中:0.89ml的56.5g/lKH₂PO₄、35ml的500g/l甘油、2ml的微量金属贮备液和1ml的维生素贮备液。微量金属贮备液包含如下:9g柠檬酸、5.15g FeSO₄·7H₂O、1.55gMnCl₂·4H₂O、0.965g ZnSO₄·7H₂O、0.02g CoCl₂·6H₂O、0.02gNa₂MoO₄·2H₂O、1.035g CuSO₄·5H₂O、1.035g NiSO₄·6H₂O溶解于一升蒸馏水中,并用HCl将pH调至2.5。维生素贮备液包含如下:0.16g维生素B12、9.75g硫胺素和3.33g泛酸钙溶解于一升蒸馏水中。用1ml的接种物接种摇瓶。将一式三份的瓶放置于CO₂培养箱中,设定该培养箱以维持空气中15% CO₂。另一组一式三份的瓶置于环境CO₂水平下的培养箱中。将两组瓶在200rpm下摇,并且两个培养箱设定在22.5℃。生长7天后,通过离心从摇瓶中收集生物质,将生物质冷冻干燥并且使用标准甲基酯化程序来测定生物质的脂肪酸谱。在 *Thraustochytrium* 培养中,空气中15% CO₂的气氛产生了实质性的变化。在高CO₂下,生物质和%脂肪比在环境条件下更低。%16:0和%DHA比在环境条件下更低,并且%EPA比在环境条件下显著更高。结果列于表6中。

[0352] 表6

气氛		生物质 (g/l)	% 16:0	% EPA	% DHA	% 脂肪
----	--	-----------	--------	-------	-------	------

[0354]	环境 (1)		3.39	31.74	11.61	44.65	53.32
	环境 (2)		3.42	30.88	11.95	44.99	53.30
	环境 (3)		3.39	32.13	11.46	44.19	53.93
	15% CO ₂ (1)		2.23	22.12	36.94	19.04	38.73
	15% CO ₂ (2)		2.05	21.40	37.14	18.57	39.34
	15% CO ₂ (3)		2.11	21.68	36.83	18.52	40.86

[0355] 实施例4

[0356] 在本实施例[NBx0614et10]中,在四个100升New Brunswick Scientific BioFlo 6000发酵罐中以80升目标最终(配方)体积来在不同的过压条件下采用碳(葡萄糖)和氮(氢氧化铵)分批进料工艺培养Schizochytrium物种(ATCC PTA-10208),来评估培养物对升高的溶解二氧化碳的敏感性。每个发酵用8升培养物接种。为进行接种物的繁殖(inoculum propagation),采用80升New Brunswick Scientific BioFlo 5000发酵罐。接种物培养基由在六个单独的组中制备的65升培养基组成。第1组由585g MSG*1H₂O、65gKCl、325g MgSO₄*7H₂O、24.05g (NH₄)₂SO₄、40.625g的NaCl、390g的T154(酵母提取物)和13mL Dow 1520US(消泡剂)组成。将第1组在121度下在接种物发酵罐中以大约60升的体积分批灭菌。第2组由18.85g CaCl₂*2H₂O组成。第3组由33.8g KH₂PO₄组成。第2组和第3组在单独的溶液中各自高压灭菌大约45-60分钟并在灭菌后无菌地加到第1组中。第4组由201.5mg MnCl₂*4H₂O、201.5mg ZnSO₄*7H₂O、2.6mg CoCl₂*6H₂O、2.6mg Na₂MoO₄*2H₂O、134.6mg CuSO₄*5H₂O、134.6mg NiSO₄*6H₂O、669.4mg FeSO₄*7H₂O和1.522g柠檬酸组成。将第4组以与第2组和第3组相同的方式高压灭菌。第5组由633.75mg盐酸硫胺素、10.4mg维生素B12和216.5mg泛酸半钙盐组成。将第5组溶解于R0水中并过滤灭菌。第6组由3250g葡萄糖溶解于3000mL体积的R0水中组成。在接种物发酵罐冷却至22.5摄氏度后,将第2、3、4、5和6组添加到发酵罐。在接种前,使用氢氧化钠和硫酸,将发酵罐pH调至7并且溶解氧跨越到100%。将接种物发酵罐用1300mL的较小发酵培养物接种(以65升接种物培养相同的方式制备和培养的较小发酵培养物)并在22.5摄氏度、pH7、180rpm搅拌和32.5lpm空气下培养37小时的时间,此时将8升接种发酵液转移到每个100升发酵罐中。每个100升发酵罐包含80升发酵培养基。以类似的方式制备发酵培养基到接种物发酵罐中。对于每个100升的发酵罐,发酵培养基由分成6批的培养基组组成。对于容器NB5、NB6和NB7,第1组包含704g Na₂SO₄、50g NaCl、80g KCl、400g MgSO₄*7H₂O、33.6g (NH₄)₂SO₄、80g T154酵母提取物和8mL Dow 1520-US消泡剂。在122摄氏度下将第1组在100升发酵罐中以大约35升的体积蒸汽灭菌60分钟。第2组以大约300mL的体积包含23.2g CaCl₂*2H₂O。第3组包含141.2g KH₂PO₄溶解于R0水中。第4组包含248mg MnCl₂*4H₂O、744mg ZnSO₄*7H₂O、3.2mg Na₂MoO₄*2H₂O、165.6mg CuSO₄*5H₂O和165.6mg NiSO₄*6H₂O、824mg FeSO₄*7H₂O和80g柠檬酸,均溶解于R0水中。第5组包含780mg盐酸硫胺素、266.4mg泛酸半钙盐和286.4ug生物素,均溶解并过滤除菌于R0水中。第6组包含在大约3升的R0水中的2400g葡萄糖。将第2、3、4、5和6组合并,并在发酵罐达到22.5摄氏度的运行温度后加入到发酵罐中。对于容器NB8,除了柠檬酸,所有组均与其他三个条件相同。在NB8中,第4组仅包含~3.75g的柠檬酸。每个发酵罐体积在接种之前大约为52-53升。用8升来自上述接种物发酵的发酵液来接种每个发酵罐。采用7.3升4N的氢氧化铵溶解将发

酵的pH控制在pH 7下,直到氮耗尽,此时采用4N的氢氧化钠和4N的硫酸来控制pH。在整个发酵中使用180至480rpm搅拌和40LPM至80LPM的空气流来控制溶解氧以保持20%的目标。这些容器中的每一个都控制在不同的顶空压强下(NB5=2、NB6=15和NB7=20PSI),来评估生物对提高的溶解二氧化碳的敏感性。在整个发酵中,进料850g/L的95%葡萄糖溶液(玉米浆),以维持葡萄糖浓度小于50g/L。8天后,每个80升发酵罐的细胞干重和 ω -3滴度都是相似的,NB5为110.1g/L DCW和44.37g/L ω -3;NB6为117.7g/L DCW和45.78g/L ω -3;NB7为114.1g/L DCW和48.43g/L ω -3;NB8为119.5g/L DCW和43.55g/L ω -3。随着压强增加,%DHA/FAME降低,%EPA/FAME升高,并且DHA与EPA的比例降低。当比较2PSI至20PSI的最终脂肪酸含量时,%DHA/FAME从50.48%降低至41.26%,并且%EPA/FAME从18.95%升高至23.28%。结果列于表7中。

[0357] 表7

[0358]

% EPA / FAME				
小时	NB5 (2 PSI)	NB6 (15 PSI)	NB7 (20 PSI)	NB8 (20 PSI)
17.5	12.63	13.43	13.15	14.32
41.5	12.05	12.01	11.54	16.37
65.5	14.03	16.54	15.34	20.37
89.5	18.67	20.04	20.86	23.08
116.5	21.99	21.40	24.55	24.52
139.0	21.24	21.57	25.85	25.25
161.5	19.95	20.42	24.78	24.96
185.5	18.95	18.89	23.28	23.90

% DHA / FAME				
小时	NB5 (2 PSI)	NB6 (15 PSI)	NB7 (20 PSI)	NB8 (20 PSI)
17.5	48.66	52.94	52.56	49.15
41.5	52.62	52.38	52.98	43.43
65.5	45.69	41.45	44.05	35.17
89.5	40.35	39.22	34.81	31.87
116.5	42.26	39.77	34.14	32.42
139.0	45.70	41.83	34.92	33.31
161.5	48.55	44.96	38.09	35.65
185.5	50.48	47.52	41.26	38.38

DHA:EPA比例				
小时	NB5 (2 PSI)	NB6 (15 PSI)	NB7 (20 PSI)	NB8 (20 PSI)
17.5	3.85	3.94	4.00	3.43
41.5	4.37	4.36	4.59	2.65
65.5	3.26	2.51	2.87	1.73
89.5	2.16	1.96	1.67	1.38
116.5	1.92	1.86	1.39	1.32
139.0	2.15	1.94	1.35	1.32
161.5	2.43	2.20	1.54	1.43
185.5	2.66	2.52	1.77	1.61

[0359] 实施例5

[0360] 在本实施例[Nx0719et10]中,在四个14升New Brunswick Scientific BioFlo 310发酵罐中以10升目标最终(配方)体积采用碳(葡萄糖)和氮(氢氧化铵)分批进料工艺培养Schizochytrium物种(ATCC PTA-10208)。在发酵中的不同的时间点,在四个发酵罐的三个中补充二氧化碳,来评估培养物对升高的溶解二氧化碳的敏感性。分别在log时间第12、24、38小时时开始,对NBS1、NBS2和NBS3补充二氧化碳。每个发酵用1升培养物接种。为进行接种物繁殖(inoculum propagation),采用14升Virtis发酵罐。接种物培养基由在四个单独的组中制备的10升培养基组成。第1组由90g MSG*1H₂O、10g KCl、50g MgSO₄*7H₂O、3.3g (NH₄)₂SO₄、6.25g的NaCl、60g的T154(酵母提取物)、4.97g KH₂PO₄、2.9gCaCl₂*2H₂O和2mL

Dow 1520US (消泡剂) 组成。将第1组在121度下以大约9.8升的体积高压灭菌120分钟。第2组由500g葡萄糖溶解于800mL R0水中组成。第3组由31mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、31mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.4mg $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.4mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、20.7mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、20.7mg $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、103mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和234.1mg柠檬酸组成。第2组和第3组均被高压灭菌60分钟。第4组由97.5mg盐酸硫胺素、1.6mg维生素B12和33.3mg泛酸半钙盐组成。将第4组溶解于R0水中并过滤灭菌。在发酵罐冷却至22.5摄氏度后,将第2、3、4和5组添加到发酵罐。在接种前,使用氢氧化钠和硫酸,将发酵罐pH调至7并且溶解氧跨越到100%。将接种物发酵罐用150mL的较小发酵培养物接种(以10升接种物培养相同的方式制备和培养的较小发酵培养物)并在22.5摄氏度、pH 7、433rpm搅拌和5lpm空气下培养44.5小时的时间,此时将1升接种物发酵液转移到每个14升的发酵罐中。每个14升的发酵罐包含10升发酵培养基。以类似的方式制备发酵培养基到接种物发酵罐中。对于每个14升的发酵罐,发酵培养基由分成6批的培养基组组成。对于所有容器来说,第1组包含60g Na_2SO_4 、6.25g NaCl 、10g KCl 、50g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.43g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、10g T154酵母提取物和1mL Dow 1520-US消泡剂。在121摄氏度下将第1组在14升发酵罐中以大约6.5升的体积高压灭菌120分钟。第2组以大约20mL R0水的体积包含2.9g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。第3组包含17.61g KH_2PO_4 溶解于100mL的R0水中。第4组包含31mg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、93mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.4mg $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、20.7mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、20.7mg $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、103mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和10g柠檬酸,均溶解于50mL R0水中。第5组包含97.5mg盐酸硫胺素、33.3mg泛酸半钙盐和36.3ug生物素,均溶解并过滤除菌于10mL的R0水中。第6组包含在大约0.5升的R0水中的300g葡萄糖。将第2、3、4、5和6组合并,并在发酵罐达到22.5摄氏度的运行温度后加入到发酵罐中。每个发酵罐体积在接种之前大约为6.5升。用1升来自上述接种物发酵的发酵液来接种每个发酵罐。采用0.85升4N的氢氧化铵溶液将发酵的pH控制在pH 7下,直到氮耗尽,此时采用4N的氢氧化钠和3N的硫酸来控制pH在设定点7.5处。在整个发酵中使用357至833rpm搅拌和7LPM至7LPM空气流来控制溶解氧以保持20%的目标。容器NBS1、NBS2、NBS3各自在不同的时间段补充二氧化碳,来评估生物对提高的溶解二氧化碳的敏感性。在整个发酵中,进料850g/L的95%葡萄糖溶液(玉米浆),以维持葡萄糖浓度小于50g/L。8天后,每个10升发酵罐的细胞干重和 ω -3滴度根据二氧化碳补充条件的不同而不同。在183小时时,NBS1为109.1DCW和45.87g/L ω -3;NBS1为108.9g/LDCW和45.41g/L ω -3;NBS3为116.4g/L DCW和50.64g/L ω -3;NBS4为95.7g/L DCW和40.36g/L ω -3。二氧化碳补充开始后不久,%DHA/FAME降低,%EPA/FAME升高,并且DHA与EPA的比例降低。当比较补充二氧化碳的条件和环境条件的最大%EPA/FAME含量时,在补充 CO_2 的条件下最大EPA含量升高65%。结果列于表8中。

[0361] 表8

% EPA / FAME				
小时	NBS1 (+CO2 @ 12 小时)	NBS2 (+CO2 @ 24 小时)	NBS3 (+CO2 @ 48 小时)	NBS4 (未添加 CO2)
15	12.29	10.67	10.22	10.14
39	22.82	19.32	10.37	9.85
63	23.79	24.58	19.77	15.09
87	23.69	23.71	23.83	14.09
114	27.85	27.55	26.91	16.98
137	29.47	27.94	26.76	17.81
159	29.13	27.20	26.52	17.81
183	27.62	25.50	25.62	17.09

% DHA / FAME				
小时	NBS1	NBS2	NBS3	NBS4
15	43.27	44.69	46.34	45.91
39	33.34	43.14	39.54	38.81
63	32.18	33.65	36.22	47.31
87	26.33	26.65	27.82	45.79
114	23.99	24.36	28.09	44.13
137	25.43	27.47	31.11	46.47
159	28.54	30.59	33.70	48.59
183	31.83	33.70	35.98	50.98

DHA:EPA 比例				
小时	NBS1	NBS2	NBS3	NBS4
15	3.52	4.19	4.53	4.53
39	1.46	2.23	3.81	3.94
63	1.35	1.37	1.83	3.14
87	1.11	1.12	1.17	3.25
114	0.86	0.88	1.04	2.60
137	0.86	0.98	1.16	2.61
159	0.98	1.12	1.27	2.73
183	1.15	1.32	1.40	2.98

[0363] 突出显示的时间段中补充二氧化碳

[0364] 实施例6

[0365] 在本实施例[Nx0106et10]中,在四个14升New Brunswick Scientific BioFlo 310发酵罐中以10升目标最终(配方)体积采用碳(葡萄糖)和氮(氢氧化铵)分批进料工艺培养Schizochytrium物种(ATCC PTA-10208)。在整个发酵运行中控制温度以对NBS1、NBS2、NBS3和NBS4分别维持21.0℃、22.5℃、24.0℃和25.5℃的目标。每个发酵用1升培养物接种。为进行接种物繁殖(inoculum propagation),采用14升Virtis发酵罐。接种物培养基由在四个单独的组中制备的10升培养基组成。第1组由90gMSG*1H2O、10g KCl、50g MgSO4*7H2O、

3.7g (NH₄)₂SO₄、6.25g的NaCl、60g的T154(酵母提取物)、5.2g KH₂PO₄、2.9g CaCl₂*2H₂O和2mL Dow 1520US(消泡剂)组成。将第1组在121度下以大约9.8升的体积高压灭菌120分钟。第2组由500g葡萄糖溶解于800mLR₀水中组成。第3组由31mg MnCl₂*4H₂O、31mg ZnSO₄*7H₂O、0.4mg CoCl₂*6H₂O、0.4mg Na₂MoO₄*2H₂O、20.7mg CuSO₄*5H₂O、20.7mg NiSO₄*6H₂O、103mg FeSO₄*7H₂O和234.1mg柠檬酸组成。第2组和第3组均被高压灭菌60分钟。第4组由97.5mg盐酸硫胺素、1.6mg维生素B12和33.3mg泛酸半钙盐组成。将第4组溶解于R₀水中并过滤除菌。在发酵罐冷却至22.5摄氏度后,将第2、3、4和5组添加到发酵罐。在接种前,使用氢氧化钠和硫酸,将发酵罐pH调至7并且溶解氧跨越到100%。将接种物发酵罐用200mL的较小发酵培养物接种(以10升接种物培养相同的方式制备和培养的较小发酵培养物)并在22.5摄氏度、pH 7、433rpm搅拌和5lpm空气下培养42小时的时间,此时将1升接种物发酵液转移到每个14升的发酵罐中。每个14升的发酵罐包含10升发酵培养基。以类似的方式制备发酵培养基到接种物发酵罐中。对于每个14升的发酵罐,发酵培养基由分成4批的培养基组组成。对于所有容器来说,第1组包含88g Na₂SO₄、6.25g NaCl、10g KCl、50g MgSO₄*7H₂O、4.2g (NH₄)₂SO₄、2.9gCaCl₂*2H₂O、17.65g KH₂PO₄、10g T154酵母提取物和1mL Dow 1520-US消泡剂。在121摄氏度下将第1组在14升发酵罐中以大约7.0升的体积下高压灭菌120分钟。第2组包含31mg MnCl₂*4H₂O、93mg ZnSO₄*7H₂O、0.4mg Na₂MoO₄*2H₂O、20.7mg CuSO₄*5H₂O、20.7mg NiSO₄*6H₂O、103mg FeSO₄*7H₂O和468mg的柠檬酸,溶解于50mL R₀水中。第2组高压灭菌60分钟。第3组包含97.5mg盐酸硫胺素、33.3mg泛酸半钙盐和35.8ug生物素,均溶解并过滤灭菌于10mL的R₀水中。第4组包含在大约0.5升的R₀水中的300g葡萄糖,并高压灭菌60分钟。将第2、3和4组合并,并在发酵罐达到22.5摄氏度的运行温度后加入到发酵罐中。每个发酵罐体积在接种之前大约为6.5升。用1升来自上述接种物发酵的发酵液来接种每个发酵罐。在整个发酵中采用0.85升4N的氢氧化铵溶液将发酵的pH控制在7.0下,直到氮耗尽,此时采用4N的氢氧化钠和3N的硫酸来控制pH在设定点。控制溶解氧来维持20%的目标,直到氮耗尽。氮耗尽后,在发酵中使用357至714rpm搅拌和8LPM的空气流来控制溶解氧,以保持10%的目标,直到发酵结束。在整个发酵中,进料850g/L的95%葡萄糖溶液(玉米浆),以维持葡萄糖浓度小于50g/L。8天后,细胞干重或 ω -3滴度随着不同的评估温度略有不同;然而,发酵温度越低导致%EPA/FAME越高。在184小时时,NBS1为85.2DCW和29.9g/L ω -3;NBS2为92.0g/L DCW和35.0g/L ω -3;NBS3为86.8g/L DCW和31.7g/L ω -3;NBS4为84.2g/L DCW和29.4g/L ω -3。

[0366] 对于NBS1来说,%EPA/FAME从发酵运行开始到结束由12.36%到19.02%,且最大值21.57%。对于NBS2来说,%EPA/FAME从发酵运行开始到结束由11.72%到18.11%,且最大值20.21%。对于NBS3来说,%EPA/FAME从发酵运行开始到结束由11.49%到15.43%,且最大值18.09%。对于NBS4来说,%EPA/FAME从发酵运行开始到结束由11.65%到13.65%,且最大值15.70%。当比较最大%EPA/FAME时,最低的发酵温度使得最大EPA含量与所评估的最高发酵温度相比提高37%。结果列于下表9中。

[0367] 表9

[0368]

%EPA / FAME				
小时	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22.5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25.5 °C)
24	12.36	11.72	11.49	11.65
40	14.17	13.61	12.21	13.04
64	14.48	14.94	14.23	13.62
89	19.52	18.45	17.42	15.70
112	21.57	20.21	18.09	15.69
136	21.05	20.11	17.15	14.82
160	19.90	18.88	16.15	13.98
184	19.02	18.11	15.43	13.65
%DHA / FAME				

[0369]

小时	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22.5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25.5 °C)
24	56.58	55.61	54.62	53.56
40	52.80	51.58	52.17	49.77
64	47.46	45.36	46.41	44.57
89	38.89	39.69	39.46	39.54
112	40.08	40.89	41.72	42.20
136	43.22	43.87	45.23	45.56
160	45.92	46.98	47.80	48.07
184	48.04	48.99	49.38	49.39
DHA:EPA 比例				
小时	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22.5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25.5 °C)
24	4.58	4.75	4.75	4.60
40	3.73	3.79	4.27	3.82
64	3.28	3.04	3.26	3.27
89	1.99	2.15	2.27	2.52
112	1.86	2.02	2.31	2.69
136	2.05	2.18	2.64	3.07
160	2.31	2.49	2.96	3.44
184	2.53	2.71	3.20	3.62

[0370] 实施例7

[0371] 在本实施例[Nx0614et10]中,在两个14升New Brunswick Scientific BioFlo 310发酵罐中以10升目标最终(配方)体积采用碳(葡萄糖)和氮(氢氧化铵)分批进料工艺培养Schizochytrium物种(ATCC PTA-10208)。从发酵运行的开始到结束,将补充了15%二氧化碳的空气喷入一个发酵罐(NBS15),并且仅用空气喷入另一个发酵罐(NBS17),来评估培养物对提高的溶解二氧化碳的敏感性。每个发酵用1升培养物接种。为进行接种物繁殖(inoculum propagation),采用14升Virtis发酵罐。接种物培养基由在四个单独的组中制

备的10升培养基组成。第1组由90g MSG*1H₂O、10g KCl、50g MgSO₄*7H₂O、3.3g (NH₄)₂SO₄、6.25g的NaCl、60g的T154(酵母提取物)、4.97g KH₂PO₄、2.9g CaCl₂*2H₂O和2mL Dow1520US(消泡剂)组成。将第1组在121度下以大约9.8升的体积高压灭菌120分钟。第2组由500g葡萄糖溶解于800R₀水中组成。第3组由31mg MnCl₂*4H₂O、31mg ZnSO₄*7H₂O、0.4mg CoCl₂*6H₂O、0.4mg Na₂MoO₄*2H₂O、20.7mg CuSO₄*5H₂O、20.7mg NiSO₄*6H₂O、103mg FeSO₄*7H₂O和234.1mg柠檬酸组成。第2组和第3组均被高压灭菌60分钟。第4组由97.5mg盐酸硫胺素、1.6mg维生素B12和33.3mg泛酸半钙盐组成。将第4组溶解于R₀水中并过滤灭菌。在发酵罐冷却至22.5摄氏度后,将第2、3、4和5组添加到发酵罐。在接种前,使用氢氧化钠和硫酸,将发酵罐pH调至7并且溶解氧跨越到100%。将接种物发酵罐用200mL的较小发酵培养物接种(以10升接种物培养相同的方式制备和培养的较小发酵培养物)并在22.5摄氏度、pH 7、433rpm搅拌和51pm空气下培养40小时的时间,此时将1升接种物发酵液转移到每个14升的发酵罐中。每个14升的发酵罐包含10升发酵培养基。以类似的方式制备发酵培养基到接种物发酵罐中。对于每个14升的发酵罐,发酵培养基由分成6批的培养基组组成。对于所有容器来说,第1组包含88g Na₂SO₄、6.25g NaCl、10g KCl、50g MgSO₄*7H₂O、4.2g (NH₄)₂SO₄、10g T154酵母提取物和1mL Dow 1520-US消泡剂。在121摄氏度下将第1组在14升发酵罐中以大约6.5升的体积下高压灭菌120分钟。第2组包含在大约20mL体积的R₀水中2.9g CaCl₂*2H₂O。第3组包含17.65g KH₂PO₄溶解于100mL的R₀水中。第4组包含31mg MnCl₂*4H₂O、93mg ZnSO₄*7H₂O、0.4mg Na₂MoO₄*2H₂O、20.7mg CuSO₄*5H₂O、20.7mg NiSO₄*6H₂O、103mg FeSO₄*7H₂O和468mg的柠檬酸,溶解于50mL R₀水中。第2、3和4组每组都高压灭菌60分钟。第5组包含97.5mg盐酸硫胺素、33.3mg泛酸半钙盐和36.3ug生物素,均溶解并过滤除菌于10mL的R₀水中。第6组包含在大约0.5升的R₀水中的300g葡萄糖,并高压灭菌60分钟。将第2、3、4、5和6组合并,并在发酵罐达到22.5摄氏度的运行温度后加入到发酵罐中。每个发酵罐体积在接种之前大约为6.5升。用1升来自上述接种物发酵的发酵液来接种每个发酵罐。在整个发酵中采用0.85升4N的氢氧化铵溶解将发酵的pH控制在7.0下,直到氮耗尽,此时采用4N的氢氧化钠和3N的硫酸来控制pH在设定点。控制溶解氧来维持20%的目标,直到氮耗尽。氮耗尽后,在发酵中使用357至833rpm搅拌和8LPM的空气流控制溶解氧来保持10%的目标,直到发酵结束。在整个发酵中,进料850g/L的95%葡萄糖溶液(玉米浆),以维持葡萄糖浓度小于50g/L。8天后,每个10升发酵罐的细胞干重和 ω -3滴度根据二氧化碳补充条件的不同而不同。在188小时时,NBS15为54.5DCW和13.7g/L ω -3;NBS17为96.1g/LDCW和37.5g/L ω -3。NBS15(在整个运行中补充CO₂条件)中%DHA/FAME比NBS17(未补充CO₂)高。对于NBS15来说,%EPA/FAME从发酵运行开始到结束由25.50%到35.48%,且最大值38.34%。对于NBS17来说,%EPA/FAME从发酵运行开始到结束由12.31%到19.80%,且最大值22.29%。当比较补充二氧化碳条件和环境条件的最大%EPA/FAME含量时,在补充CO₂条件下最大EPA含量提高73%。

[0372] 在整个发酵运行中,补充CO₂条件下的%DHA/FAME比环境条件低。结果列于下表10中。

[0373] 表10

[0374]

%EPA / FAME				
小时	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22.5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25.5 °C)
24	12.36	11.72	11.49	11.65
40	14.17	13.61	12.21	13.04
64	14.48	14.94	14.23	13.62
89	19.52	18.45	17.42	15.70
112	21.57	20.21	18.09	15.69
136	21.05	20.11	17.15	14.82
160	19.90	18.88	16.15	13.98
184	19.02	18.11	15.43	13.65
%DHA / FAME				
小时	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22.5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25.5 °C)
24	56.58	55.61	54.62	53.56
40	52.80	51.58	52.17	49.77
64	47.46	45.36	46.41	44.57
89	38.89	39.69	39.46	39.54
112	40.08	40.89	41.72	42.20
136	43.22	43.87	45.23	45.56
160	45.92	46.98	47.80	48.07

[0375]

184	48.04	48.99	49.38	49.39
DHA:EPA 比例				
小时	NBS1 (21 °C)	NBS2 (22.5 °C)	NBS3 (24 °C)	NBS4 (25.5 °C)
24	4.58	4.75	4.75	4.60
40	3.73	3.79	4.27	3.82
64	3.28	3.04	3.26	3.27
89	1.99	2.15	2.27	2.52
112	1.86	2.02	2.31	2.69
136	2.05	2.18	2.64	3.07
160	2.31	2.49	2.96	3.44
184	2.53	2.71	3.20	3.62

[0376] 实施例8

[0377] 在本实施例[K019]中,在157000升搅拌的发酵罐中以100000kg的最终(配方)重量采用碳(葡萄糖)和氮(无水氨气)分批进料工艺培养Schizochytrium物种(ATCC PTA-10208)。发酵用4500kg的培养物接种。为进行接种物繁殖,采用7500升搅拌的种子发酵罐。接种物培养基由在四个单独的组中制备的4500kg培养基组成。第1组由40.5kg MSG*1H2O、4.5kg KCl、22.5kg MgSO4*7H2O、1.7kg (NH4) 2SO4、2.81kg的NaCl、27kg的T154(酵母提取物)、2kg KH2PO4、985g CaCl2和0.9kg Dow1520US(消泡剂)溶解在总重量2300kg的处理水

中组成。第2组由247.5kg葡萄糖、1H₂O溶解在总重量1500kg的处理水中。将第1组在种子发酵罐中灭菌,并且将第2组在单独的容器中灭菌,其中的蒸汽(steam-in-place)在122-123摄氏度下30分钟。第3组由14g MnCl₂*4H₂O、14g ZnSO₄*7H₂O、180g CoCl₂*6H₂O、180g Na₂MoO₄*2H₂O、9.3g CuSO₄*5H₂O、9.3g NiSO₄*6H₂O、46.4g FeSO₄*7H₂O和105.3g柠檬酸溶解于5L的蒸馏水中组成。在121摄氏度下将第3组高压灭菌60分钟。第4组由43.9g盐酸硫胺素、720g维生素B12和15g泛酸半钙盐溶解在5L的蒸馏水中组成并过滤除菌。在种子发酵罐冷却至22.5摄氏度后,将第2、3、4组添加到发酵罐。在接种前,使用氢氧化钠和硫酸,将发酵罐pH调至7并且溶解氧跨越到100%。将种子发酵罐用12L的较小发酵培养基接种(以种子培养相同的方式制备和培养的较小发酵培养物)并在22.5摄氏度、pH 7、90rpm搅拌和130-170Nm²/hr空气下培养4-5天的时间,以得到约15g/L的细胞干重。以类似的方式制备发酵培养基到接种物发酵罐中。发酵培养基由5组组成。第1组包含在9000kg溶液中的177kg KH₂PO₄、880kg Na₂SO₄、500kg MgSO₄*7H₂O、4.2kg (NH₄)₂SO₄、100kg T154酵母提取物和10kg的Dow 1520-US消泡剂。第2组包含在9000kg溶液中的21.9kg CaCl₂、62.5kg NaCl、100kg KCl。第1组和第2组均通过热交换器泵入发酵罐中,然后泵入水,以得到发酵罐中67000kg的重量。第3组包含310g MnCl₂*4H₂O、930g ZnSO₄*7H₂O、4g Na₂MoO₄*2H₂O、207g CuSO₄*5H₂O、207g NiSO₄*6H₂O、1.03kg FeSO₄*7H₂O和4.68kg的柠檬酸,溶解于1500kg的处理水中。第4组包含4300kg玉米浆(DE-95, 70.5%)。第3组和第4组在不同的容器中灭菌,其中的蒸汽在122-123摄氏度下30分钟。第5组包含975g盐酸硫胺素、333g泛酸半钙盐和358mg生物素,溶解并过滤除菌于5L蒸馏水中。在发酵罐冷却至22.5摄氏度后将第3、4和5组加入到发酵罐中。发酵罐体积中重量在接种之前大约为73500kg。设定起始发酵条件(温度:22.5℃,压强:0.34bar,空气流:3000Nm³/hr,搅拌:40rpm)后,调节发酵pH至7,并且溶解氧跨越到100%。接种后重量约为78000kg。在开始时,采用无水氨控制pH在7,直到加入550kg氨,并且然后采用30%氢氧化钠溶液来控制pH在设定点7.5处。使用40至100rpm搅拌和2000至8000Nm³/hr的空气流,在氨进料时控制溶解氧来维持20%的目标,并且氨进料之后10%。在整个发酵中,进料65%的DE-95玉米浆溶液,以维持葡萄糖浓度约35g/L。在另一个实施例[K020]中,相对于实施例K019做出了三个变化:1)压强降低至0.15bar,2)接种后重量降低至68000kg,3)空气流在接种后60小时升高到超过5000Nm³/hr,并且在不考虑溶解氧浓度的情况下整个运行中维持在高位。上述三个变化降低了发酵液中的溶解二氧化碳浓度。结果表明,随着CO₂减少,%DHA/FAME从38.38%升高到43.8%,并且%EPA/FAME从24.42%降低到20.68%。DHA:EPA比例从1.57升高到2.12。结果列于下表11中。

[0378] 表11

[0379]

K019

[0380]	时间, 小时	DHA/FAME%	EPA/FAME%	DHA:EPA 比例
	38	56.32	11.47	4.91
	50	51.03	13.2	3.87
	62	43.99	16.97	2.59
	74	34.65	19.94	1.74
	86	32.14	22.56	1.42
	98	30.05	25.2	1.19
	134	31.45	28.36	1.11
	146	33.54	27.43	1.22
	158	35.48	26.29	1.35
	170	37.16	25.47	1.46
	182	38.38	24.42	1.57

[0381] 表12

[0382]	K020 (降低的溶解 CO ₂)			
	时间, 小时	DHA/FAME%	EPA/FAME%	DHA:EPA 比例
	12	56.3	13.03	4.32
	28	58.12	12	4.84
	40	55.55	12.13	4.58
	52	52.13	14.03	3.72
	64	45.14	16.94	2.66
	76	37.54	18.57	2.02
	84	35.06	18.72	1.87
	96	35.24	20.05	1.76
	132	39.42	22.29	1.77
	156	42.05	21.54	1.95
	180	43.8	20.68	2.12

[0383] 实施例9

[0384] 在下表中,使用Henry' 常数计算多个实施例的最大溶解CO₂。第一条件“在1PSI背压和45.5mmol/L/小时CER下10L(NBS4 0719et10)”是表8中在45.5mmol/L/hour的二氧化碳释放速率、10升的发酵体积、0.8vvm的通气率、0PAI背压下,NBS4的计算溶解CO₂。第二条件“在1PSI背压且进气中6% CO₂和50mmol/L/小时CER下10L(NBS2 0719et10)”是表8中在50mmol/L/hour的二氧化碳释放速率、10升的发酵体积、0.8vvm的通气率、0PSI背压且在进气流中6%总气体的CO₂补充(使用Thermo Prima dB质谱仪通过质谱测得的)下,计算的NBS2溶解CO₂。第三条件“在2PSI背压和55mmol/L/小时CER下80升(NB5 0614et10)”是在表7

中55mmol/L/小时的二氧化碳释放速率、80升的发酵体积、1.0vvm的通气率和2PSI背压下计算的NB5溶解CO₂。第四条条件“在15PSI背压和50mmol/L/小时CER下80升(NB6 0614et10)”是在表7中50mmol/L/小时的二氧化碳释放速率、80升的发酵体积、1.0vvm的通气率和15PSI背压下计算的NB6溶解CO₂。第五条条件“在20PSI背压和50mmol/L/小时CER下80升(NB7和NB8 0614et1 0)”是在表7中50mmol/L/小时的二氧化碳释放速率、80升的发酵体积、1.0vvm的通气率和20PSI背压下计算的NB7和NB8的溶解CO₂。所有CER值均使用采用Thermo Prima dB质谱仪所收集的出气CO₂数据来计算。计算的结果提供于下面表13和表14中。

[0385] 表13

[0386]

10 L (NBS4 0719et10), 0 PSI 背压和			
45.5 mmol/L/hour CER	RV	10	L
绝对压强	输入	1.01	bar
空气流	输入	8	LPM
Vvm		0.8	
进气时空气中所需要的 CO ₂	输出	0.14	%
出气中 Delta CO ₂		2.309125	%
出气中 CO ₂		2.446301	%
CO ₂ 分压		0.024708	bar
	溶解 CO ₂	0.000785	mol/L
	溶解 CO ₂	34.53	ppm
10 L (NBS2 0719et10), 0 PSI 背压且进			
气中 6% CO₂和 50 mmol/L/小时 CER	RV	10	L
绝对压强	输入	1.01	bar
空气流	输入	8	LPM
Vvm		0.8	

[0387]

进气时空气中所需要的 CO ₂	输出	7.00	%
出气中 Delta CO ₂		2.5375	%
出气中 CO ₂		9.534653	%
CO ₂ 分压		0.0963	bar
	溶解 CO ₂	0.003059	mol/L
	溶解 CO ₂	134.58	ppm
80 升 (NB5 0614et10), 2 PSI 背压和 55 mmol/L/小时 CER			
RV		80	L
背压	输入	0.138	bar
总压强		1.21	bar
空气流	输入	80	LPM
Vvm		1	
Delta CO ₂	来自(from)CPR	2.233	%
出气中 CO ₂		2.233	%
CO ₂ 分压		0.026975	bar
	溶解 CO ₂	0.000857	mol/L
	溶解 CO ₂	37.70	ppm
80 升(NB6 0614et10), 15 PSI 背压和 50 mmol/L/小时 CER			
RV		80	L
背压	输入	1.0345	bar
总压强		2.10	bar
空气流	输入	80	LPM
Vvm		1	
Delta CO ₂	来自(from)CPR	2.03	%
出气中 CO ₂		2.03	%
CO ₂ 分压		0.042721	bar
	溶解 CO ₂	0.001357	mol/L
	溶解 CO ₂	59.71	ppm
80 升 (NB7 & NB8 0614et10), 20 PSI 背压和 50 mmol/L/小时 CER			
RV		80	L
背压	输入	1.38	bar
总压强		2.45	bar
空气流	输入	80	LPM
Vvm		1	

[0388]	Delta CO ₂	来自(from)CPR	2.03	%
	出气中 CO ₂		2.03	%
	CO ₂ 分压		0.049735	bar
		溶解 CO ₂	0.00158	mol/L
		溶解 CO ₂	69.51	ppm

[0389] 表14

[0390]		NB5 (2 PSI)	NB6 (15 PSI)	NB7 (20 PSI)	NB8 (20 PSI)	NBS2 (+CO ₂ @ 24 小时)	NBS4 (未 添加 CO ₂)
	%EPA/FAME	21.99	21.57	25.85	25.25	27.94	17.81
	%DHA/FAME	40.35	39.22	34.14	32.42	24.36	38.81
	最大溶解 CO ₂	37.70	59.71	69.51	69.51	134.58	34.53

[0391] 实施例10

[0392] 在环境CO₂水平下,使用ATCC登录号PTA-9695在破囊壶菌摇瓶培养基(Thraustochytrium Shake Flask Medium,TSFM)中,进行实验来确定维生素成分对性能(生物质的细胞干重(DW)、%DHA、%脂肪和%EPA)的影响。

[0393] 材料与方法:在具有0.25g/L tastone和0.625g/L NaCl的TSFM培养基中使用四种维生素(盐酸硫胺素(thiamine.HCl)、B12、生物素和泛酸Ca)(参见表16)。向培养基中加入额外的MSG和H₂P0₄,来维持它们的总氮含量和总磷含量。根据所研究的维生素,培养基中整体维生素浓度为0、0.5x、1x、5x、10x、20x或30x标准量(参见表17)。对各种维生素单独进行梯度研究。然而,对于生物素和泛酸Ca的情况,在培养中还掺有标准量的盐酸硫胺素和B12,因为在常规TSFM中后二者的浓度非常低。在实验中还包括三个TSFM对照用于比较。这些对照是具有2g/L tastone(参见表15)、1x盐酸硫胺素和1x B12(C1)的标准TSFM;无任何维生素(A)的无tastone的TSFM;以及具有1x盐酸硫胺素和1x B12(B)的无tastone的TSFM。所有对照包含0.625g/L NaCl。在0.1g DW/L下,使用PTA-9695的三日培养物来接种一式二份的250-ml摇瓶。所有摇瓶(平底,总计50ml培养基)在有氧环境下在22.5+/-1C下在旋转摇床(200RPM)上接种。7天后收获所有培养物,并且对最终的冻干生物质样品进行FAME分析。

[0394] 表15具有2g/L tastone的破囊壶菌摇瓶培养基(TSFM)

组分	每升的量 (g)	[贮备液] (g/l)	每升所使用的贮备 液	
NaCl	0.625	千		
KCl	1	50	20 ml	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	227	22 ml	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	190	1.05 ml	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.29	千		
MSG 一水合物	2	千		
Tastone 154	2	千		
HEPES (100 mM) pH 7	23.8	千		
				高压灭菌后添 加
KH ₂ PO ₄	0.1	56.5	1.77 ml	
[0395] 葡萄糖	50	500	100 ml	高压灭菌后添 加
微量金属		见下面	1 ml	高压灭菌后添 加
维生素		见下面	1 ml	高压灭菌后添 加
微量金属溶液				
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2.9 mg	2.9		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.02 mg	0.02		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8.6 mg	8.6		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.26 mg	0.26		
ZnCl ₂	0.6 mg	0.6		
柠檬酸	12 mg	12 g (千)		
维生素溶液				
[0396] 硫胺素	10 ug	10 mg/l		
维生素 B12	1 ug	1 mg/L		
[0397] 表16具有0.25g/L Tastone的破囊壶菌摇瓶培养基 (TSFM)				

组分	每升的量 (g)	[贮备液] (g/l)	每升所使 用的贮备 液	
NaCl	0.625	千		
KCl	1	50	20 ml	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5	227	22 ml	
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.2	190	1.05 ml	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.29	千		
MSG 一水合物	4.554	千		
Tastone GC 7189-1	0.25	千		
HEPES (100 mM0 pH 7	23.8	千		
[0398] KH ₂ PO ₄	0.1	56.5	4.28 ml	高压灭菌后添加
	葡萄糖	50	500	100 ml 高压灭菌后添加
微量金属		见下面	1 ml	高压灭菌后添加
维生素		见下面	1 ml	高压灭菌后添加
TSMF 微量金属				
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2.9 mg	2.9		
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.02 mg	0.02		
MnCl ₂ ·4H ₂ O	8.6 mg	8.6		
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.26 mg	0.26		
ZnCl ₂	0.6 mg	0.6		
柠檬酸	12 mg	12 g (千)		
维生素溶液				
[0399] 硫胺素	10 ug	10 mg/l		
	维生素 B12	1 ug	1 mg/L	
[0400]	表17本研究中所使用的维生素浓度 (mg/L) :			

	维生素浓度[X]	盐酸硫胺素	B12	生物素	泛酸 Ca
	0	0.0	0.0	0.0	0.0
	0.5	0.005		0.00234	
[0401]	1	0.010	0.001	0.00468	3.33
	5	0.050	0.005		16.65
	10	0.100	0.010	0.0468	33.30
	20	0.200	0.020	0.0936	66.60
	30			0.1404	

[0402] 结果:当向培养基中添加的硫胺素的量是标准水平的5倍(图1)时,得到硫胺素梯度的最高DW和%脂肪(分别为6.7g/L和38.5%)。在硫胺素的这种水平下%DHA为44.1%。低于或高于5x硫胺素时,DW和%脂肪都开始下降。在具有小于5x硫胺素的培养基中%DHA也下降,并且在高于5x硫胺素时稍有波动,没有显著改善。硫胺素梯度培养中%EPA在8.6和11.5之间。当没有向培养基中加入tastone或维生素(图5,培养基A)时,除%DHA外的所有参数明显下降。然而,%DHA上升似乎是假象,因为在这种条件下DW和%脂肪都极低。看上去B12的1x浓度对于DW、%DHA、%脂肪和%EPA来说是最佳的(图2)。在这种维生素B12水平下,得到如下结果:7.1g/L DW、50.6% DHA、42.7%脂肪和2.1%EPA。当没有向培养基中加入B12时,得到最高的%EPA(11.5)。未加入维生素的无Tastone的培养基没有进一步改善该生物体的性能,更高的%DHA看上去似乎是假象,原因如前所述(图5,培养基A)。

[0403] 同样,生物素的1x浓度对于DW、%DHA和%脂肪来说也是最佳的(图3)。这些参数的相应的值分别为:6.8g/L、47.7%和37.9%。这时EPA百分比为1.9。具有1x硫胺素和1x B12的无Tastone的培养基(图5,培养基B)明显降低了PTA-9695的总体性能。

[0404] 当以10x标准量向培养基中加入泛酸Ca时,这种维生素产生最高的DW、%DHA和%脂肪(图4)。这些参数的最佳浓度相应地为:7.0g/L、47.3%和39.1%。在整个泛酸Ca梯度实验中EPA含量小于2%。当生物体在仅具有1x硫胺素和1x B12的无tastone的培养基中生长时,注意到PTA-9695总体性能的显著降低(图5,培养基B)。

[0405] 结果也示于下面的数据表中。

[0406]

Td ID	1a	1b	2a	2b	3a	3b	4a	4b	5a	5b	6a	6b
硫酸软骨素 [x]	0	0	0.5	0.5	1	1	5	5	10	10	20	20
B12 [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
生物素 [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
泛酸钙 [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
%DHA	39.31	38.49	40.43	44.27	45.32	43.95	41.49	46.61	42.87	48.90	44.14	42.29
平均% DHA	38.90	38.90	42.35	42.35	44.63	44.63	44.05	44.05	45.89	45.89	43.21	43.21
%脂肪	32.31	31.47	32.40	37.62	37.25	32.74	34.92	42.03	39.85	39.11	36.63	36.27
平均%脂肪	31.89	31.89	35.01	35.01	35.00	35.00	38.48	38.48	37.98	37.98	36.45	36.45
% EPA	11.48	11.61	10.38	9.11	8.94	8.28	10.28	8.06	10.45	6.88	8.73	10.03
平均% EPA	11.54	11.54	9.74	9.74	8.61	8.61	9.17	9.17	8.57	8.57	9.38	9.38
% 16:0	29.58	29.48	31.34	31.19	30.38	31.87	30.15	31.04	30.20	30.97	31.59	30.00
平均% 16:0	29.53	29.53	31.26	31.26	31.13	31.13	30.58	30.58	30.58	30.58	30.80	30.80
% ARA	1.33	1.38	1.25	1.12	1.03	0.96	1.29	1.05	1.34	0.86	1.05	1.24
平均% ARA	1.36	1.36	1.18	1.18	1.00	1.00	1.17	1.17	1.10	1.10	1.15	1.15

维生素标准浓度 (g/L)	0	0.5	1	5	10	20	30
硫酸软骨素 [x]	1.00E-05	5.00E-06	1.00E-05	5.00E-05	1.00E-04	2.00E-04	3.00E-04
B12 [x]	1.00E-06	5.00E-07	1.00E-06	5.00E-06	1.00E-05	2.00E-05	3.00E-05
生物素 [x]	4.68E-06	2.34E-06	4.68E-06	2.34E-05	4.68E-05	9.36E-05	1.40E-04
泛酸钙 [x]	3.33E-03	1.67E-03	3.33E-03	1.67E-02	3.33E-02	6.66E-02	9.99E-02
总维生素浓度, 包括来自柱的携带污染	2.38E-05	2.88E-05	3.38E-05	7.38E-05	1.24E-04	2.24E-04	3.24E-04
硫酸软骨素 (g/L)	1.37E-08	5.14E-07	1.01E-06	5.01E-06	1.00E-05	2.00E-05	3.00E-05
B12 (g/L)	2.49E-04	2.51E-04	2.53E-04	2.72E-04	2.96E-04	3.42E-04	3.89E-04
生物素 (g/L)	3.10E-05	1.70E-03	3.36E-03	1.67E-02	3.33E-02	6.66E-02	9.99E-02
泛酸钙 (g/L)	2.38E-02	2.88E-02	3.38E-02	7.38E-02	1.24E-01	2.24E-01	3.24E-01
总维生素浓度 (mg/L), 包括来自柱的携带污染	1.37E-05	5.14E-04	1.01E-03	5.01E-03	1.00E-02	2.00E-02	3.00E-02
硫酸软骨素 (g/L)	2.49E-01	2.51E-01	2.53E-01	2.72E-01	2.96E-01	3.42E-01	3.89E-01
B12 (g/L)	3.10E-02	1.70E+00	3.36E+00	1.67E+01	3.33E+01	6.66E+01	9.99E+01
生物素 (g/L)							
泛酸钙 (g/L)							

[0407]

Trt ID →	7a	7b	8a	8b	9a	9b	10a	10b	11a	11b	12a	12b
盐酸硫胺素[x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
B12[x]	0	0	1	1	5	5	10	10	20	20	1	1
生物素[x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
泛酸钙[x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DHA	39.31	38.40	50.45	50.75	50.83	50.05	45.99	46.44	46.90	44.48	42.07	42.74
平均% DHA	38.90	38.90	50.60	50.60	50.44	50.44	46.21	46.21	45.69	45.69	42.04	42.41
%脂肪	32.31	31.47	42.06	43.40	44.43	38.30	36.47	34.72	34.99	33.14	32.04	28.89
平均%脂肪	31.88	31.88	42.73	42.73	41.36	41.36	35.59	35.59	34.06	34.06	30.46	30.46
% EPA	11.48	11.61	2.08	2.05	2.01	2.01	2.11	2.22	2.03	2.16	1.76	2.14
平均% EPA	11.54	11.54	2.06	2.06	2.01	2.01	2.17	2.17	2.10	2.10	1.95	1.95
% 16:0	29.58	29.48	38.79	36.69	36.75	37.41	41.05	40.83	40.33	42.66	44.55	43.42
平均% 16:0	29.53	29.53	38.74	38.74	37.08	37.08	40.94	40.94	41.50	41.50	43.99	43.99
% ARA	1.33	1.38	0.16	0.15	0.17	0.14	0.14	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
平均% ARA	1.36	1.36	0.15	0.15	0.15	0.15	0.07	0.07	0.00	0.00	0.00	0.00

Trt ID →	13a	13b	14a	14b	15a	15b	16a	16b	17a	17b	18a	18b
盐酸硫胺素[x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B12[x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
生物素[x]	0.5	0.5	1	1	10	10	20	20	30	30	0	0
泛酸钙[x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% DHA	48.32	46.94	46.13	48.18	45.43	43.63	44.37	41.79	44.36	42.19	42.07	42.74
平均% DHA	47.63	47.63	47.65	47.65	44.53	44.53	43.08	43.08	43.28	43.28	42.41	42.41
%脂肪	28.16	35.67	34.34	41.39	35.67	32.04	33.84	31.41	35.51	31.11	32.04	28.89
平均%脂肪	31.92	31.92	37.87	37.87	33.85	33.85	32.63	32.63	33.31	33.31	30.46	30.46
% EPA	2.38	1.83	1.92	1.91	1.81	1.77	1.82	1.84	1.94	1.88	1.76	2.14
平均% EPA	2.09	2.09	1.82	1.82	1.78	1.78	1.83	1.83	1.81	1.81	1.85	1.85
% 16:0	38.18	40.33	40.70	38.13	41.84	43.28	42.34	44.57	42.40	44.16	44.55	43.42
平均% 16:0	39.26	39.26	38.42	38.42	42.46	42.46	43.46	43.46	43.28	43.28	43.99	43.99
% ARA	0.21	0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
平均% ARA	0.11	0.11	0.08	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

[0408]

Trt ID →	19a	19b	20a	20b	21a	21b	22a	22b	C1a (0.625 g/L NaCl)	C1b (0.625 g/L NaCl)
硫酸硫酸素 [x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
B12 [x]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
生物素 [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
泛酸钙 [x]	1	1	5	5	10	10	20	20	0	0
% DHA	45.05	41.28	44.94	48.70	50.66	43.87	44.23	38.53	56.95	56.92
平均% DHA		43.16		45.82		47.27		41.38		56.83
% 脂肪	32.05	31.10	32.32	36.07	45.61	32.51	25.50	27.42	50.11	53.39
平均% 脂肪		31.57		34.20		39.06		26.46		51.75
% EPA	1.94	1.73	1.86	1.83	1.87	1.82	2.21	1.73	2.50	2.45
平均% EPA		1.83		1.84		1.85		1.97		2.47
% 16:0	41.55	45.27	41.79	40.36	37.09	42.81	42.30	47.56	31.04	31.08
平均% 16:0		43.41		41.09		40.00		44.93		31.05
% ARA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.20	0.21
平均% ARA		0.00		0.00		0.08		0.00		0.20

Trt ID →	Aa	Ab	Ba	Bb
硫酸硫酸素 [x]	0	0	0	0
B12 [x]	0	0	0	0
生物素 [x]	0	0	0	0
泛酸钙 [x]	0	0	0	0
% DHA	51.82	56.09	50.74	54.23
平均% DHA		53.96		52.48
% 脂肪	9.02	7.13	20.86	26.54
平均% 脂肪		8.07		23.70
% EPA	5.91	6.63	3.71	3.38
平均% EPA		6.27		3.54
% 16:0	25.07	20.69	34.01	31.44
平均% 16:0		22.88		32.72
% ARA	0.00	0.00	0.00	0.23
平均% ARA		0.00		0.11

[0409]

Trt ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
硫酸硫胺素 [x]	0	0.5	1	5	10	20	0	0	0	0	0
B12 [x]	0	0	0	0	0	0	0	1	5	10	20
生物素 [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
泛酸钙 [x]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
平均% DHA	38.90	42.35	44.63	44.05	45.89	43.21	38.90	50.60	50.44	46.21	45.69
平均% 脂肪	31.89	35.01	35.00	38.48	37.98	36.45	31.89	42.73	41.36	35.59	34.06
平均% EPA	11.54	9.74	8.61	9.17	8.57	9.38	11.54	2.06	2.01	2.17	2.10
平均% 16:0	29.53	31.26	31.13	30.59	30.58	30.80	29.53	36.74	37.08	40.94	41.50
平均% ARA	1.36	1.18	1.00	1.17	1.10	1.15	1.36	0.15	0.15	0.07	0.00

Trt ID	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
维生素B12/生物素/泛酸钙 [x]	0.00000	0.50000	1.00000	5.00000	10.00000	20.00000	0.00000	0.10000	0.50000	0.10000	0.20000
维生素浓度 (g/L)	0.00000	0.00005	0.00010	0.00050	0.00100	0.00200	0.0000	0.00001	0.00005	0.00010	0.00020
平均% DHA	38.90	42.35	44.63	44.05	45.89	43.21	38.90	50.60	50.44	46.21	45.69
平均% 脂肪	31.89	35.01	35.00	38.48	37.98	36.45	31.89	42.73	41.36	35.59	34.06
平均% EPA	11.54	9.74	8.61	9.17	8.57	9.38	11.54	2.06	2.01	2.17	2.10
平均% 16:0	29.53	31.26	31.13	30.59	30.58	30.80	29.53	36.74	37.08	40.94	41.50
平均% ARA	1.36	1.18	1.00	1.17	1.10	1.15	1.36	0.15	0.15	0.07	0.00
总维生素浓度 (mg/L)	2.38E-02	2.88E-02	3.38E-02	7.38E-02	1.24E-01	2.24E-01	1.37E-06	1.01E-03	5.01E-03	1.00E-02	2.00E-02
平均DW (g/L)	5.863	6.214	6.112	6.658	6.355	6.277	5.863	7.079	7.001	6.505	6.442

[0410]

TrtID	12	13	14	15	16
盐酸硫胺素[x]	1	1	1	1	1
B12[x]	1	1	1	1	1
生物素[x]	0	0.5	1	10	20
泛酸钙[x]	0	0	0	0	0
平均% DHA	42.41	47.63	47.65	44.53	43.08
平均%脂肪	30.46	31.92	37.87	33.85	32.63
平均% EPA	1.95	2.09	1.92	1.79	1.83
平均% 16:0	43.99	39.26	39.42	42.46	43.46
平均% ARA	0.00	0.11	0.08	0.00	0.00

TrtID	12	13	14	15	16
生物素/生物素/泛酸钙[x]	1/1/0/0	1/1/0.5/0	1/1/1/0	1/1/10/0	1/1/20/0
维生素浓度(g/L)	0.00001/0.000001/0/0	0.00001/0.000001/0.00000234/0	0.00001/0.000001/0.00000468/0	0.00001/0.000001/0.0000468/0	0.00001/0.000001/0.0000936/0
平均% DHA	42.41	47.63	47.65	44.53	43.08
平均%脂肪	30.46	31.92	37.87	33.85	32.63
平均% EPA	1.95	2.09	1.92	1.79	1.83
平均% 16:0	43.99	39.26	39.42	42.46	43.46
平均% ARA	0.00	0.11	0.08	0.00	0.00
总维生素浓度(mg/L)	2.49E-01	2.51E-01	2.53E-01	2.96E-01	3.42E-01
平均DW(g/L)	6.029	5.765	6.813	6.458	6.286

[0411]

Trt ID	17	18	19	20	21
盐酸硫胺素[x]	1	1	1	1	1
B12[x]	1	1	1	1	1
生物素[x]	30	0	0	0	0
泛酸钙[x]	0	0	1	5	10
平均% DHA	43.28	42.41	43.16	45.82	47.27
平均%脂肪	33.31	30.46	31.57	34.20	39.06
平均% EPA	1.91	1.95	1.83	1.84	1.85
平均% 16:0	43.28	43.99	43.41	41.09	40.00
平均% ARA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08

Trt ID	17	18	19	20	21
盐酸硫胺素/B12/生物素/泛酸钙[x]	1/1/30/0	1/1/0/0	1/1/0/1	1/1/0/5	1/1/0/10
维生素浓度(g/L)	0.0000170.00000170.0001454/0	0.0000170.00000170/0	0.0000170.00000170/0.00333	0.0000170.00000170/0.01665	0.0000170.00000170/0.0333
平均% DHA	43.28	42.41	43.16	45.82	47.27
平均%脂肪	33.31	30.46	31.57	34.20	39.06
平均% EPA	1.91	1.95	1.83	1.84	1.85
平均% 16:0	43.28	43.99	43.41	41.09	40.00
平均% ARA	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08

总维生素浓度(mg/L)	3.89E-01	3.10E-02	3.36E+00	1.67E+01	3.33E+01
平均DW(g/L)	6.358	6.029	6.058	6.349	6.961

[0412]

Tr ID ---->	22	C1 (0.625 g/L NaCl)	A	B
盐酸硫胺素 [x]	1	1	0	1
B12 [x]	1	1	0	1
生物素 [x]	0	0	0	0
泛酸钙 [x]	20	0	0	0
平均% DHA	41.38	56.93	53.96	52.48
平均%脂肪	26.46	51.75	8.07	23.70
平均% EPA	1.97	2.47	6.27	3.54
平均% 16:0	44.93	31.05	22.88	32.72
平均% ARA	0.00	0.20	0.00	0.11

Tr ID ---->	22	C1	A	B
盐酸硫胺素/B12/生物素/泛酸钙 [x]	1/1/0/20	1/1/0/0	0/0/0/0	0/0/0/0
维生素浓度 (g/L)	0.00001/0.000001/0/0.0665	0.00001/0.000001/0/0	0/0/0/0	0.00001/0.000001/0/0
平均% DHA	41.38	56.93	53.96	52.48
平均%脂肪	26.46	51.75	8.07	23.70
平均% EPA	1.97	2.47	6.27	3.54
平均% 16:0	44.93	31.05	22.88	32.72
平均% ARA	0.00	0.20	0.00	0.11
6.66E+01				
总维生素浓度 (mg/L)				
平均DW (g/L)	5.492	7.651	0.428	4.809

[0413] 实施例11

[0414] 进行实验,来确定ATCC登录号PTA-9695在10% CO₂下实现最高性能时对于维生素

B12的最低需求,包括PTA-9695培养物在10% CO₂下产生最大干重和DHA产量所需要的维生素B12最低量。

[0415] 温度:22.5+/-1℃ (在10% CO₂下)

[0416] 摇速:200rpm

[0417] 基础培养基:确定的按比例缩小的发酵罐培养基 (DSDFM-B) (表20)。

[0418] 接种:在具有不同浓度的维生素B12的DSDFM-B中生长的PTA-96953日培养物。

[0419] 首先在SDFM-B中将新冻存管中的PTA-9695解冻 (表19),然后在10% CO₂下在确定的SDFM-B中培养并转移几次。使用DSDFM-B中PTA-9695的3日培养物 (4%) 来制备起始接种物瓶,其包含具有各种浓度维生素B12 (即,处理A到I相应地为7.68mg/L至0mg/L的B12,参见表18)的DSDFM-B。通过在10% CO₂下并且每7天将培养物转移至其相应的新鲜培养基,维持每个维生素B12浓度的接种物瓶。每周转移培养物对于洗出任何可能已经储存在细胞内部的过量维生素B12来说是必需的,使得可以更准确地确定对这种维生素的最低需求。采用600nm下光密度,在0.1g/L的理论DW下分别用它们的3日接种物一式二份接种摇瓶。培养物在10% CO₂下生长9天,之后收集并通过FAME试验来进一步分析。

[0420] 结果:

[0421] 注意:在本研究中不考虑3周的数据点,因为在实验室翻修过程中向恒温箱的CO₂的供应已经中断,并且必须将摇瓶从恒温箱中取出6小时。

[0422] PTA-9695长时间暴露 (至多4周) 于高浓度维生素B12会对干重、%脂肪和DHA产量造成不利的影响,而1.5至768ug/L的维生素B12浓度对PTA-9695的DW、%EPA和DHA产量没有显著影响。

[0423] 注意到,在7.68mg/L维生素B12 (处理A) 存在下生长的培养物中单细胞数目增加 (至多15,与3-4相比)。

[0424] 从培养基配方中消除维生素B12会显著地提高%EPA约10%,同时稍微降低%DHA和%16:0。图6-19和下表21示出了实验结果。

[0425] 结论:

[0426] 为了获得最大DW、%DHA、%脂肪和DHA产量,最少需要约1.5ug/L维生素B12 (SDF-B中1/500的标准浓度)。极高浓度的维生素B12 (大于3.84mg/L) 可以显著降低DW、%脂肪和DHA产量,而从PTA-9695中完全除去这种维生素则会显著地 (约10%) 增加其%EPA。极高水平的维生素B12还会在促进“块状” (clumpy) 培养物转变成“单细胞”中起作用。

[0427] 表18维生素B12处理

处理	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
维生素 B12										
(ug/L)	7680	3840	768	384	153.6	76.8	15.36	7.68	1.536	0

[0429] 表19用于PTA-9695的按比例缩小的发酵罐培养基 (SDFM-B), pH 7

[0430]

组分	MW	[贮备液] (g/L)	加入 1L 摇瓶中 的贮备液 ml	1L 摇瓶中的干 成分(克)	最终浓度 (g/L)
NaCl	58.44			0.625	0.625
KCl	74.56	56	17.9		1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.5	227	22		5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	132.14	190	0.525		0.1
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147	60	4.833		0.290
MSG (w/1 摩尔 H ₂ O)	187.1			1.0	1.0
Na ₂ SO ₄	142.04			6.0	6.0
K ₂ SO ₄	174.27			1.0959	1.0959
Tastone (GC9156-1)				1.0	1.0
HEPES (100 mM) pH 7.0	195.2			23.8	23.8
KH ₂ PO ₄	136.07	56.5	0.885		0.05
葡萄糖	180	500	100		50
微量金属混合物					
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.02	1.03	10		0.0103

[0431]

MnCl ₂ ·4H ₂ O	198	3.1	1		0.0031
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.4	9.3	1		0.0093
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.95	0.04	1		0.00004
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.5	2.07	1		0.00207
NiSO ₄ ·6H ₂ O	262.84	2.07	1		0.00207
柠檬酸 (在 FeSO ₄ ·7H ₂ O 中)		117.5			1.175
维生素溶液					
维生素 B12	1355.4	0.768	1		0.000768
盐酸硫胺素	337.3	11.7	1		0.0117
泛酸 Ca	476.54	3.996	1		0.003996
生物素	244.3	0.002	2.17		0.00000434

[0432] 表20确定的SDFM-B (DSDFM-B), pH 7

[0433]

	MW	[贮备液] (g/L)	加入 1L 摇瓶中 的贮备液 ml	1L 摇瓶中的干 成分 (克)	最终浓度 (g/L)
NaCl	58.44			0.625	0.625
KCl	74.56	56	17.9		1.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.5	227	22		5.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	132.14	190	1.1483		0.218
CaCl ₂ ·2H ₂ O	147	60	4.833		0.290
MSG (w/ 1 摩尔 H ₂ O)	187.1			2.188	2.188
Na ₂ SO ₄	142.04			6.0	6.0
K ₂ SO ₄	174.27			1.1240	1.1240
Tastone (GC9156-1)				0.0	0.0
HEPES (100 mM) pH 7.0	195.2			23.8	23.8
KH ₂ PO ₄	136.07	56.5	2.475		0.140
葡萄糖	180	500	100		50
微量金属混合物					
FeSO ₄ ·7H ₂ O	278.02	1.03	10		0.0103

[0434]

MnCl ₂ ·4H ₂ O	198	3.1	1		0.0031
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	287.4	9.3	1		0.0093
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	241.95	0.04	1		0.00004
CuSO ₄ ·5H ₂ O	249.5	2.07	1		0.00207
NiSO ₄ ·6H ₂ O	262.84	2.07	1		0.00207
柠檬酸 (在 FeSO ₄ ·7H ₂ O 中)		117.5			1.175
维生素溶液					
维生素 B12	1355.4	0.768	1		0.000768
盐酸硫胺素	337.3	11.7	1		0.0117
泛酸 Ca	476.54	3.996	1		0.003996
生物素	244.3	0.002	2.65		0.0000053

[0435] 表21实验数据

[0436]

摇瓶序列 (SF)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
处理 ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
维生素 B12 浓度(mg/L)	7680	3840	768	384	153.6	76.8	15.36	7.68	1.536	0
维生素 B12 浓度(Log 10 -mg/L)	3.885 361	3.584 331	2.885 361	2.584 331	2.186 391	1.885 361	1.186 391	0.885 361	0.186 391	0.001
DW (g/L)										
第 1 瓶	2.832	3.48	3.64	4.186	3.728	3.952	3.71	3.96	4.5	3.868
第 2 瓶	3.03	3.324	3.88	3.412	3.626	3.746	4.024	3.682	4.17	4.094
平均	2.931	3.402	3.76	3.799	3.677	3.849	3.867	3.821	4.335	3.981
%脂肪 (以 面积%计算)										
第 1 瓶	56.9	55.5	58.9	63.9	61.6	60.5	60.4	64.7	66.6	60.4
第 2 瓶	52.4	56.7	61.6	59.8	58.7	60.7	64.1	57.9	66.3	62.9
平均	54.6	56.1	60.3	61.9	60.1	60.6	62.2	61.3	66.5	61.7

[0437]

% DHA										
第 1 瓶	45.4	45.8	46.6	48.2	45.3	46.4	47.9	47.4	48.9	46.4
第 2 瓶	45.7	44.0	47.1	46.4	46.3	46.0	48.8	46.6	48.0	46.5
平均	45.5	44.9	46.9	47.3	45.8	46.2	48.4	47.0	48.4	46.5
DHA (mg/g)										
第 1 瓶	260.1	256.6	277.2	310.6	281.1	283.0	291.7	309.4	328.2	283.0
第 2 瓶	241.4	251.1	292.7	279.8	274.2	281.7	315.4	271.9	320.9	294.9
平均	250.8	253.9	285.0	295.2	277.7	282.3	303.5	290.6	324.6	289.0
% 脂肪 (以 mg/g 计算)										
第 1 瓶	57.3	56.0	59.4	64.4	62.1	61.0	60.9	65.2	67.1	60.9
第 2 瓶	52.8	57.1	62.1	60.3	59.2	61.2	64.6	58.4	66.9	63.4
平均	55.1	56.5	60.8	62.4	60.6	61.1	62.7	61.8	67.0	62.2
Fat (g/L)										
第 1 瓶	1.6	1.9	2.2	2.7	2.3	2.4	2.3	2.6	3.0	2.4
第 2 瓶	1.6	1.9	2.4	2.1	2.1	2.3	2.6	2.1	2.8	2.6
平均	1.6	1.9	2.3	2.4	2.2	2.4	2.4	2.4	2.9	2.5
DHA 产量 (g/L)										
第 1 瓶	0.7	0.9	1.0	1.3	1.0	1.1	1.1	1.2	1.5	1.1
第 2 瓶	0.7	0.8	1.1	1.0	1.0	1.1	1.3	1.0	1.3	1.2
平均	0.7	0.9	1.1	1.1	1.0	1.1	1.2	1.1	1.4	1.2
% EPA										
第 1 瓶	19.2	20.1	18.7	16.7	20.4	19.0	16.1	17.5	15.5	19.3
第 2 瓶	18.6	21.6	18.2	18.3	19.0	19.5	15.2	18.9	16.7	19.2
平均	18.9	20.8	18.5	17.5	19.7	19.2	15.6	18.2	16.1	19.3
EPA (mg/g)										
第 1 瓶	108.2	110.3	109.2	105.8	124.7	113.6	96.1	112.2	102.5	115.5
第 2 瓶	96.3	121.4	111.1	108.4	110.6	117.3	96.3	108.1	110.0	120.0

[0438]

平均	102.3	115.8	110.2	107.1	117.7	115.5	96.2	110.1	106.3	117.7
EPA 产量 (g/L)										
第 1 瓶	0.3	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5
第 2 瓶	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5
平均	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.5	0.5
L-F DW (g/L)										
第 1 瓶	1.2	1.5	1.5	1.5	1.4	1.5	1.5	1.4	1.5	1.5
第 2 瓶	1.4	1.4	1.5	1.4	1.5	1.5	1.4	1.5	1.4	1.5
平均	1.3	1.5	1.5	1.4	1.4	1.5	1.4	1.5	1.4	1.5
% 16:0										
第 1 瓶	24.0	22.8	23.1	23.6	22.6	23.0	24.4	23.4	23.9	22.5
第 2 瓶	24.2	22.7	23.1	23.8	23.1	22.8	24.5	23.0	23.6	22.5
平均	24.1	22.7	23.1	23.7	22.9	22.9	24.4	23.2	23.7	22.5
% DPA n-3										
第 1 瓶	1.1	1.0	1.2	1.0	1.2	1.1	1.1	1.1	1.0	1.1
第 2 瓶	1.1	1.1	1.1	1.2	1.1	1.2	1.1	1.1	1.0	1.1
平均	1.1	1.1	1.1	1.1	1.2	1.2	1.1	1.1	1.0	1.1
% DPA n-6										
第 1 瓶	2.1	2.1	2.3	2.5	2.1	2.2	2.4	2.4	2.6	2.2
第 2 瓶	2.2	2.0	2.3	2.2	2.2	2.2	2.5	2.2	2.5	2.2
平均	2.1	2.0	2.3	2.3	2.2	2.2	2.5	2.3	2.5	2.2
%总 ω-3										
第 1 瓶	65.7	66.9	66.5	66.0	66.9	66.5	65.1	66.0	65.4	66.9
第 2 瓶	65.4	66.7	66.5	65.9	66.5	66.7	65.1	66.5	65.8	66.9
平均	65.6	66.8	66.5	65.9	66.7	66.6	65.1	66.3	65.6	66.9
pH										

第 1 瓶	6.81	6.83	6.84	6.83	6.82	6.82	6.83	6.83	6.82	6.81
第 2 瓶	6.81	6.83	6.81	6.82	6.83	6.82	6.82	6.82	6.82	6.81
平均	6.81	6.83	6.83	6.83	6.83	6.82	6.83	6.83	6.82	6.81

[0439]

摇瓶序列 (SF)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
处理 ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
维生素 B12 浓度(mg/L)	7680	3840	768	384	153.6	76.8	15.36	7.68	1.536	0
维生素 B12 浓度(Log 10 -mg/L)	3.885 361	3.584 331	2.885 361	2.584 331	2.186 391	1.885 361	1.186 391	0.885 361	0.186 391	0.001
DW (g/L)										
第 1 瓶	2.01	4.17	4.176	3.764	4.276	4.218	3.916	4.44	4.59	3.676
第 2 瓶	2.574	3.354	4.106	3.824	3.922	4.21	4.046	4.352	4.518	3.174
平均	2.292	3.762	4.141	3.794	4.099	4.214	3.981	4.396	4.554	3.425
% 脂肪 (以 面积%计算)	28.8	62.2	64.4	60.5	65.3	58.8	58.2	66.4	63.0	61.4
第 1 瓶	39.2	55.6	65.0	55.9	62.6	62.2	65.4	62.0	66.3	53.0
第 2 瓶	34.0	58.9	64.7	58.2	63.9	60.5	61.8	64.2	64.7	57.2
平均										
% DHA	38.9	46.4	47.5	46.1	48.0	45.7	43.2	47.7	47.9	38.5
第 1 瓶	40.9	41.3	46.9	43.6	46.3	47.1	45.2	47.6	47.5	35.3
第 2 瓶	39.9	43.9	47.2	44.9	47.1	46.4	44.2	47.6	47.7	36.9
平均										
DHA (mg/g)	109.7	283.1	300.1	273.9	307.2	263.4	246.7	310.6	296.0	232.1
第 1 瓶	157.3	225.4	299.0	239.5	284.4	287.8	290.3	289.4	309.4	183.6
第 2 瓶	133.5	254.3	299.6	256.7	295.8	275.6	268.5	300.0	302.7	207.8
平均	28.8	62.2	64.4	60.5	65.3	58.8	58.2	66.4	63.0	61.4

[0440]

% 脂肪 (以 mg/g 计算)										
第 1 瓶	28.2	61.0	63.1	59.4	64.0	57.7	57.1	65.1	61.9	60.2
第 2 瓶	38.5	54.5	63.7	54.9	61.4	61.1	64.2	60.8	65.1	52.0
平均	33.3	57.8	63.4	57.2	62.7	59.4	60.6	63.0	63.5	56.1
Fat (g/L)										
第 1 瓶	0.6	2.5	2.6	2.2	2.7	2.4	2.2	2.9	2.8	2.2
第 2 瓶	1.0	1.8	2.6	2.1	2.4	2.6	2.6	2.6	2.9	1.7
平均	0.8	2.2	2.6	2.2	2.6	2.5	2.4	2.8	2.9	1.9
DHA 产量 (g/L)										
第 1 瓶	0.2	1.2	1.3	1.0	1.3	1.1	1.0	1.4	1.4	0.9
第 2 瓶	0.4	0.8	1.2	0.9	1.1	1.2	1.2	1.3	1.4	0.6
平均	0.3	1.0	1.2	1.0	1.2	1.2	1.1	1.3	1.4	0.7
% EPA										
第 1 瓶	22.9	19.0	18.8	17.4	17.1	18.8	21.6	18.0	16.4	28.3
第 2 瓶	20.8	24.5	18.8	19.6	18.8	17.0	20.0	16.1	16.8	31.4
平均	21.8	21.8	18.8	18.5	17.9	17.9	20.8	17.0	16.6	29.8
EPA (mg/g)										
第 1 瓶	63.9	114.9	117.4	102.4	108.3	107.6	122.1	115.8	100.5	168.9
第 2 瓶	79.1	132.4	118.6	106.6	114.4	102.8	127.0	96.9	108.3	161.6
平均	71.5	123.6	118.0	104.5	111.4	105.2	124.5	106.4	104.4	165.2
EPA 产量 (g/L)										
第 1 瓶	0.1	0.5	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.6
第 2 瓶	0.2	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4	0.5	0.5
平均	0.2	0.5	0.5	0.4	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.6

[0441]

L-F DW (g/L)										
第 1 瓶	1.4	1.6	1.5	1.5	1.5	1.8	1.7	1.5	1.8	1.5
第 2 瓶	1.6	1.5	1.5	1.7	1.5	1.6	1.5	1.7	1.6	1.5
平均	1.5	1.6	1.5	1.6	1.5	1.7	1.6	1.6	1.7	1.5
% 16:0										
第 1 瓶	26.0	22.5	21.7	24.3	22.5	23.1	23.0	22.0	23.2	20.2
第 2 瓶	25.9	22.1	21.9	24.2	22.6	23.3	22.5	23.5	23.1	19.9
平均	26.0	22.3	21.8	24.3	22.5	23.2	22.7	22.8	23.2	20.0
% DPA n-3										
第 1 瓶	1.5	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	1.4
第 2 瓶	1.2	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.0	0.9	1.4
平均	1.4	1.0	1.1	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.9	1.4
% DPA n-6										
第 1 瓶	1.3	2.3	2.3	2.3	2.5	2.3	1.9	2.4	2.6	1.3
第 2 瓶	1.7	1.6	2.3	2.1	2.3	2.5	2.1	2.6	2.5	1.1
平均	1.5	1.9	2.3	2.2	2.4	2.4	2.0	2.5	2.6	1.2
%总ω-3										
第 1 瓶	63.2	66.4	67.4	64.5	66.1	65.5	65.8	66.6	65.2	68.2
第 2 瓶	62.9	66.9	66.7	64.2	66.1	65.1	66.1	64.6	65.2	68.1
平均	63.1	66.7	67.0	64.4	66.1	65.3	66.0	65.6	65.2	68.1
pH										
第 1 瓶	6.70	6.69	6.72	6.71	6.71	6.72	6.71	6.71	6.72	6.71
第 2 瓶	6.67	6.71	6.72	6.71	6.72	6.72	6.71	6.71	6.72	6.71
平均	6.69	6.70	6.72	6.71	6.72	6.72	6.71	6.71	6.72	6.71
摇瓶序列 (SF)	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3

[0442]

处理 ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
维生素 B12 浓度(mg/L)	7680	3840	768	384	153.6	76.8	15.36	7.68	1.536	0
维生素 B12 浓度(Log 10 -mg/L)	3.885 361	3.584 331	2.885 361	2.584 331	2.186 391	1.885 361	1.186 391	0.885 361	0.186 391	0.001
DW (g/L)										
第 1 瓶	2.786	2.92	4.108	3.258	3.524	4.258	3.974	3.794	3.74	3.902
第 2 瓶	2.868	3.106	2.87	3.376	3.234	4.39	4.834	3.374	4.434	3.82
平均	2.827	3.013	3.489	3.317	3.379	4.324	4.404	3.584	4.087	3.861
% 脂肪 (以 面积%计算)										
第 1 瓶	42.6	41.0	54.5	46.5	50.7	59.8	57.0	51.0	55.9	62.3
第 2 瓶	44.0	43.1	48.4	49.8	49.3	56.8	62.2	52.3	56.4	56.5
平均	43.3	42.0	51.4	48.1	50.0	58.3	59.6	51.7	56.2	59.4
% DHA										
第 1 瓶	42.0	39.8	43.0	43.1	43.1	44.8	45.4	44.0	43.4	45.4
第 2 瓶	41.9	39.9	40.5	42.8	42.5	44.2	46.3	43.8	37.7	38.3
平均	41.9	39.9	41.8	42.9	42.8	44.5	45.9	43.9	40.6	41.9
DHA (mg/g)										
第 1 瓶	177.2	161.7	232.4	198.4	216.2	265.6	256.5	222.5	240.8	280.2
第 2 瓶	182.6	170.3	194.2	210.9	207.6	248.8	285.6	227.2	211.0	214.4
平均	179.9	166.0	213.3	204.6	211.9	257.2	271.1	224.8	225.9	247.3
% 脂肪 (以 mg/g 计算)										
第 1 瓶	42.2	40.6	54.0	46.1	50.2	59.2	56.4	50.5	55.4	61.7
第 2 瓶	43.6	42.7	47.9	49.3	48.9	56.3	61.7	51.9	55.9	56.0
平均	42.9	41.7	51.0	47.7	49.5	57.8	59.1	51.2	55.7	58.8

[0443]

Fat (g/L)										
第 1 瓶	1.2	1.2	2.2	1.5	1.8	2.5	2.2	1.9	2.1	2.4
第 2 瓶	1.2	1.3	1.4	1.7	1.6	2.5	3.0	1.7	2.5	2.1
平均	1.2	1.3	1.8	1.6	1.7	2.5	2.6	1.8	2.3	2.3
DHA 产量 (g/L)										
第 1 瓶	0.5	0.5	1.0	0.6	0.8	1.1	1.0	0.8	0.9	1.1
第 2 瓶	0.5	0.5	0.6	0.7	0.7	1.1	1.4	0.8	0.9	0.8
平均	0.5	0.5	0.8	0.7	0.7	1.1	1.2	0.8	0.9	1.0
% EPA										
第 1 瓶	22.4	24.7	23.9	22.0	23.5	22.1	20.9	22.3	23.8	21.3
第 2 瓶	23.0	24.9	25.7	22.8	24.4	23.0	20.1	22.6	31.3	30.9
平均	22.7	24.8	24.8	22.4	24.0	22.6	20.5	22.4	27.5	26.1
EPA (mg/g)										
第 1 瓶	93.6	99.2	127.3	100.4	116.5	129.6	116.7	111.3	130.2	129.9
第 2 瓶	98.9	105.2	121.5	111.2	118.0	128.1	122.6	115.5	173.1	170.7
平均	96.2	102.2	124.4	105.8	117.2	128.8	119.7	113.4	151.6	150.3
EPA 产量 (g/L)										
第 1 瓶	0.3	0.3	0.5	0.3	0.4	0.6	0.5	0.4	0.5	0.5
第 2 瓶	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.6	0.6	0.4	0.8	0.7
平均	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.6	0.5	0.4	0.6	0.6
L-F DW (g/L)										
第 1 瓶	1.6	1.7	1.9	1.8	1.8	1.7	1.7	1.9	1.7	1.5
第 2 瓶	1.6	1.8	1.5	1.7	1.7	1.9	1.9	1.6	2.0	1.7
平均	1.6	1.8	1.7	1.7	1.7	1.8	1.8	1.8	1.8	1.6

[0444]

% 16:0										
第 1 瓶	24.0	23.8	21.4	23.1	21.7	21.3	21.9	22.0	21.0	21.6
第 2 瓶	23.5	23.5	21.7	22.8	21.4	21.0	21.5	22.0	18.2	18.0
平均	23.7	23.6	21.5	23.0	21.6	21.1	21.7	22.0	19.6	19.8
% DPA n-3										
第 1 瓶	1.2	1.2	1.0	1.2	1.2	1.0	1.0	1.1	1.0	0.9
第 2 瓶	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	1.0	1.0	1.1	1.3	1.4
平均	1.2	1.2	1.1	1.2	1.2	1.0	1.0	1.1	1.2	1.1
% DPA n-6										
第 1 瓶	1.7	1.4	1.8	1.8	1.8	2.0	2.1	1.9	1.8	2.1
第 2 瓶	1.7	1.5	1.5	1.8	1.7	2.0	2.3	1.9	1.2	1.3
平均	1.7	1.5	1.7	1.8	1.8	2.0	2.2	1.9	1.5	1.7
%总 ω-3										
第 1 瓶	65.6	65.8	67.9	66.3	67.7	67.9	67.4	67.4	68.2	67.6
第 2 瓶	66.0	66.0	67.3	66.8	68.1	68.3	67.4	67.5	70.4	70.5
平均	65.8	65.9	67.6	66.6	67.9	68.1	67.4	67.5	69.3	69.1
pH										
第 1 瓶	6.85	6.89	6.89	6.88	6.88	6.88	6.87	6.88	6.88	6.87
第 2 瓶	6.86	6.89	6.89	6.88	6.88	6.89	6.86	6.87	6.88	6.86
平均	6.86	6.89	6.89	6.88	6.88	6.89	6.87	6.88	6.88	6.87

摇瓶序列 (SF)	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
处理 ID	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
维生素 B12 浓度(mg/L)	7680	3840	768	384	153.6	76.8	15.36	7.68	1.536	0
维生素 B12 浓度(Log 10 -mg/L)	3.885 361	3.584 331	2.885 361	2.584 331	2.186 391	1.885 361	1.186 391	0.885 361	0.186 391	0.001

[0445]

DW (g/L)										
flask 1	2.538	2.512	4.242	4.528	2.498	3.796	3.79	3.87	3.676	3.972
flask 2	2.646	3.162	2.86	4.368	2.744	3.774	3.81	4.002	4.202	4.35
average	2.592	2.837	3.551	4.448	2.621	3.785	3.8	3.936	3.939	4.161
% 脂肪 (以 面积%计算)										
第 1 瓶	42.5	41.9	57.5	66.7	43.6	58.1	58.2	60.0	57.1	59.2
第 2 瓶	44.6	32.9	45.4	63.0	43.9	57.3	57.7	59.9	60.4	62.0
平均	43.5	37.4	51.5	64.9	43.8	57.7	57.9	59.9	58.8	60.6
% DHA										
第 1 瓶	41.1	38.0	47.6	47.1	36.6	45.1	46.0	44.6	43.8	38.0
第 2 瓶	40.2	40.8	40.0	46.7	39.0	45.5	45.1	45.9	46.7	40.2
平均	40.7	39.4	43.8	46.9	37.8	45.3	45.5	45.2	45.2	39.1
DHA (mg/g)										
第 1 瓶	172.7	157.5	270.6	311.0	157.7	259.4	264.6	264.2	247.3	222.3
第 2 瓶	177.2	132.8	179.6	290.9	169.2	257.3	257.1	271.7	278.5	246.0
平均	175.0	145.2	225.1	300.9	163.5	258.4	260.9	267.9	262.9	234.2
% 脂肪 (以 mg/g 计算)										
第 1 瓶	42.0	41.4	56.9	66.0	43.1	57.5	57.5	59.3	56.5	58.5
第 2 瓶	44.1	32.5	44.9	62.3	43.4	56.6	57.0	59.2	59.7	61.3
平均	43.0	37.0	50.9	64.1	43.2	57.0	57.3	59.3	58.1	59.9
Fat (g/L)										
第 1 瓶	1.1	1.0	2.4	3.0	1.1	2.2	2.2	2.3	2.1	2.3
第 2 瓶	1.2	1.0	1.3	2.7	1.2	2.1	2.2	2.4	2.5	2.7
平均	1.1	1.0	1.8	2.9	1.1	2.2	2.2	2.3	2.3	2.5
DHA 产量										

[0446]

(g/L)										
第 1 瓶	0.4	0.4	1.1	1.4	0.4	1.0	1.0	1.0	0.9	0.9
第 2 瓶	0.5	0.4	0.5	1.3	0.5	1.0	1.0	1.1	1.2	1.1
平均	0.5	0.4	0.8	1.3	0.4	1.0	1.0	1.1	1.0	1.0
% EPA										
第 1 瓶	22.8	27.1	17.8	16.7	29.2	21.6	20.0	21.9	22.2	31.3
第 2 瓶	24.5	24.4	26.7	19.5	26.3	21.0	20.9	20.5	19.2	28.5
平均	23.6	25.7	22.3	18.1	27.7	21.3	20.4	21.2	20.7	29.9
EPA (mg/g)										
第 1 瓶	94.9	111.3	100.5	109.1	124.9	123.0	114.1	128.8	124.1	181.9
第 2 瓶	106.9	78.5	118.8	120.4	113.0	118.1	117.9	120.4	113.7	173.2
平均	100.9	94.9	109.7	114.7	119.0	120.5	116.0	124.6	118.9	177.6
EPA 产量 (g/L)										
第 1 瓶	0.2	0.3	0.4	0.5	0.3	0.5	0.4	0.5	0.5	0.7
第 2 瓶	0.3	0.3	0.3	0.5	0.3	0.4	0.5	0.5	0.5	0.8
平均	0.3	0.3	0.4	0.5	0.3	0.5	0.4	0.5	0.5	0.7
L-F DW (g/L)										
第 1 瓶	1.5	1.5	1.8	1.5	1.4	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
第 2 瓶	1.5	2.1	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.7	1.7
平均	1.5	1.8	1.7	1.6	1.5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.7
% 16:0										
第 1 瓶	24.1	23.1	22.7	24.5	22.4	21.6	22.3	21.7	22.3	17.8
第 2 瓶	23.6	23.1	21.6	22.0	22.9	21.8	22.5	21.9	22.2	18.4
平均	23.9	23.1	22.1	23.3	22.7	21.7	22.4	21.8	22.2	18.1
% DPA n-3										

[0447]

第 1 瓶	1.5	1.4	1.2	1.2	1.5	1.1	1.2	1.1	1.1	1.4
第 2 瓶	1.5	1.3	1.5	1.1	1.4	1.1	1.1	1.1	1.2	1.3
平均	1.5	1.4	1.4	1.2	1.5	1.1	1.2	1.1	1.1	1.3
% DPA n-6										
第 1 瓶	1.6	1.2	2.4	2.3	1.1	2.1	2.2	2.0	1.9	1.2
第 2 瓶	1.5	1.6	1.4	2.2	1.3	2.1	2.1	2.2	2.2	1.4
平均	1.5	1.4	1.9	2.3	1.2	2.1	2.1	2.1	2.1	1.3
%总ω-3										
第 1 瓶	65.4	66.6	66.6	65.0	67.3	67.8	67.2	67.6	67.0	70.7
第 2 瓶	66.2	66.5	68.2	67.3	66.8	67.6	67.0	67.5	67.1	70.0
平均	65.8	66.5	67.4	66.2	67.0	67.7	67.1	67.5	67.0	70.3
pH										
第 1 瓶	6.83	6.84	6.82	6.84	6.83	6.84	6.84	6.84	6.86	6.85
第 2 瓶	6.82	6.84	6.81	6.84	6.83	6.84	6.84	6.84	6.84	6.85
平均	6.83	6.84	6.82	6.84	6.83	6.84	6.84	6.84	6.85	6.85

[0448] 实施例12

[0449] 在10%CO₂下ATCC登录号PTA-10208维生素B12梯度

[0450] 进行实验来确定提供最佳的PTA-10208生长和EPA生产的维生素B12浓度。

[0451] 温度:23℃

[0452] 摇速:200rpm

[0453] 基础培养基:确定的SDFM-0 (DSDFM-0)

[0454] 接种物:在环境条件下将一小瓶PTA-10208解冻到SDFM-0中。在10%CO₂下转移2mL培养物到48mL的DSDFM-0中。将培养物转移到新鲜的DSDFM-0 (10%CO₂) 中 (参见表22)。将培养物转移到新鲜的DSDFM-0 (10%CO₂) 中。在第1周 (Week#1) 使用培养物来接种维生素12梯度实验 (2mL/瓶) (10%CO₂)。

[0455] 实验设置:

[0456] 所有培养物在50mL摇瓶中培养,每个条件下培养一式二份的摇瓶。每7天在DSDFM-0 (无tastone) 中,将PTA-10208接种到9天的维和素B12梯度中。在整个实验过程中维持用于每个浓度的维生素B12梯度的接种物。通过在降低浓度的维生素B12中继续转移PTA-10208,来有效地将过量的维生素B12洗出到细胞外。每七天,转移用于每个浓度的维生素B12的接种物。使用四日接种物来起始每个9天维生素B12梯度。每个9天梯度被连续地标为实验设置A、B、C、D、E、F、G、H、I、J并列于下表23中。为了转移大致相同量的细胞,在每个梯度接种之前测定每个浓度的维生素B12的光密度。生长9天后,收集所有培养物来测定pH、干重和脂肪酸谱。一旦发现每个维生素B12浓度的干重已经稳定至少3个连续的9天梯度,则结束实验。

[0457]

表 22 用于 Orca 的确定的按比例缩小的发酵罐培养基

[illegible]

[0458]

组分	每升用量 (g)	[贮备液] (g/l)	每升所用 的贮备液 mL						g/l		K	Mg	Ca	Cl	Fe	mg/l	Cu	Mn	Co	Zn
柠檬酸 Fe 溶液									Na											
柠檬酸	1175 mg	117.5																		
FeSO4.7H2O	10.3 mg	1.03													2.07					
微量金属溶液																				
MnCl2.4H2O	3.1 mg	3.1															0.86			2.12
ZnSO4.7H2O	9.3 mg	9.3																		
Na2MoO4.2H2O	0.04 mg	0.04																		
CuSO4.5H2O	2.07 mg	2.07														0.53				
NiSO4.6H2O	2.07 mg	2.07																		
用 HCl 将 pH 调至 2.5																				
维生素溶液																				
维生素 B12	0.768 mg	0.768																		
硫胺素	11.7 mg	11.7																		
泛酸 Ca	3.996 mg	3.996																		
生物素	0.00434 mg	4.34 mg																		
总离子 (ppm)											607.32								995.8536	

[0459] 表23

[]维生素B12	mg/L维生素B12
5x	3.84

1x	0.77
1/2x	0.38
1/5x	0.15
1/10x	0.077
1/20x	0.038
1/50x	0.015
1/100x	0.0077
1/500x	0.0015
0x	0

[0461] 进行七个连续的5x至1/500x维生素B12梯度。在最后一个实验结束时,开始新实验,比较1/500x(0.0015mg/L)和0x(0mg/L维生素B12)下的PTA-10208生长和EPA生产。进行了四个连续的1/500x对(vs)0x维生素B12实验。

[0462] 结果:

[0463] (对于5x-->1/500x维生素B12):对于七个连续的九天实验,在浓度范围从5x(3.84mg/L)到1/500x(0.0015mg/L)的维生素B12中,PAT-10208干重、%EPA、%DHA、%脂肪和EPA产量并未改变。

[0464] (对于1/500x和0x维生素B12):四个连续的九天实验过程中的结果表明,在含有0mg/L维生素B12的DSDFM-0中培养的PTA-10208比在仅1/500x(0.0015mg/L)维生素B12下培养时具有高得多的%EPA。EPA从1/500x(0.0015mg/L)维生素B12时的约18%增加到无任何维生素B12时的约27%,DHA从1/500x(0.0015mg/L)维生素B12时的约45%降低到无任何维生素B12时的约36%。当从DSDFM-0中完全去除维生素B12时,PTA-10208干重和%脂肪略有增加。由于EPA增加并且干重和%脂肪略有增加,当从DSDFM-0中去除维生素B12时PTA-10208EPA产量增加约60%。

[0465] 结果也示于图20-49中以及下表中。

[0466] 实验 600nm g/L

	样品	接种 O.D.	mg/L 维 生素 B12	pH	Tare (g)	Out wt (g)	干燥小球 重量 (g)	生物质
A	5x (1)		3.84	6.80	10.4757	10.723	0.2473	4.95
	5x (2)		3.84	6.80	10.4534	10.689	0.2356	4.71
	1x (1)		0.77	6.80	10.5142	10.7449	0.2307	4.61
	1x (2)		0.77	6.81	10.431	10.6512	0.2202	4.40
	1/2x (1)		0.38	6.82	10.5684	10.7882	0.2198	4.40
	1/2x (2)		0.38	6.82	10.6373	10.8691	0.2318	4.64
	1/5x (1)		0.15	6.81	10.5044	10.7348	0.2304	4.61
	1/5x (2)		0.15	6.82	10.5219	10.747	0.2251	4.50
	1/10x (1)		0.077	6.83	10.5221	10.7481	0.226	4.52
	1/10x (2)		0.077	6.83	10.4705	10.6979	0.2274	4.55
	1/20x (1)		0.038	6.83	10.4743	10.6988	0.2245	4.49
	1/20x (2)		0.038	6.83	10.7322	10.9646	0.2324	4.65
	1/50x (1)		0.015	6.84	10.4777	10.6945	0.2168	4.34
	1/50x (2)		0.015	6.85	10.4766	10.7018	0.2252	4.50
	1/100x (1)		0.0077	6.84	10.4543	10.6863	0.232	4.64
	1/100x (2)		0.0077	6.85	10.5041	10.7452	0.2411	4.82
	1/500x (1)		0.0015	6.86	10.5152	10.7563	0.2411	4.82
	1/500x (2)		0.0015	6.85	10.574	10.8081	0.2341	4.68
B	5x (1)	4.0445	3.84	6.63	10.5021	10.7338	0.2317	4.63
	5x (2)	4.0445	3.84	6.65	10.4735	10.7152	0.2417	4.83
	1x (1)	4.3024	0.77	6.64	10.5011	10.7394	0.2383	4.77
	1x (2)	4.3024	0.77	6.65	10.4004	10.6362	0.2358	4.72
	1/2x (1)	4.1648	0.38	6.64	10.4599	10.71	0.2501	5.00
	1/2x (2)	4.1648	0.38	6.64	10.5630	10.804	0.241	4.82
	1/5x (1)	4.1600	0.15	6.63	10.6521	10.889	0.2369	4.74
	1/5x (2)	4.1600	0.15	6.63	10.5032	10.7341	0.2309	4.62
	1/10x (1)	4.4997	0.077	6.65	10.4726	10.6998	0.2272	4.54
	1/10x (2)	4.4997	0.077	6.64	10.4841	10.7279	0.2438	4.88
	1/20x (1)	4.9716	0.038	6.64	10.3785	10.6112	0.2327	4.65
	1/20x (2)	4.9716	0.038	6.64	10.3832	10.6154	0.2322	4.64
	1/50x (1)	4.3049	0.015	6.65	10.3782	10.612	0.2338	4.68
	1/50x (2)	4.3049	0.015	6.65	10.5546	10.7877	0.2331	4.66
	1/100x (1)	4.6035	0.0077	6.65	10.4858	10.7172	0.2314	4.63

实验 设置	样品	600nm	mg/L 维 生素 B12	pH	Tare (g)	Out wt (g)	干燥小球 重量 (g)	g/L
		接种 O.D.						生物质
	1/100x (2)	4.6035	0.0077	6.66	10.4771	10.7122	0.2351	4.70
	1/500x (1)	4.4494	0.0015	6.65	10.6083	10.8163	0.208	4.16
	1/500x (2)	4.4494	0.0015	6.65	10.5722	10.7896	0.2174	4.35
C	5x (1)	4.1784	3.84	6.77	10.4842	10.7237	0.2395	4.79
	5x (2)	4.1784	3.84	6.80	10.5261	10.7553	0.2292	4.58
	1x (1)	4.2842	0.77	6.80	10.3785	10.6194	0.2409	4.82
	1x (2)	4.2842	0.77	6.77	10.6083	10.8459	0.2376	4.75
	1/2x (1)	4.8865	0.38	6.81	10.5274	10.7183	0.1909	3.82
	1/2x (2)	4.8865	0.38	6.81	10.4713	10.6853	0.214	4.28
	1/5x (1)	4.5411	0.15	6.81	10.3831	10.5997	0.2166	4.33
	1/5x (2)	4.5411	0.15	6.84	10.5444	10.7666	0.2222	4.44
	1/10x (1)	5.2960	0.077	6.80	10.501	10.7181	0.2171	4.34
	1/10x (2)	5.2960	0.077	6.82	10.3783	10.5978	0.2195	4.39
	1/20x (1)	5.2480	0.038	6.82	10.4521	10.6539	0.2018	4.04
	1/20x (2)	5.2480	0.038	6.83	10.4018	10.5881	0.1863	3.73
	1/50x (1)	5.6680	0.015	6.82	10.5049	10.7248	0.2199	4.40
	1/50x (2)	5.6680	0.015	6.83	10.4197	10.6441	0.2244	4.49
	1/100x (1)	4.9024	0.0077	6.83	10.5531	10.7847	0.2316	4.63
	1/100x (2)	4.9024	0.0077	6.83	10.7098	10.9412	0.2314	4.63
	1/500x (1)	4.6011	0.0015	6.83	10.5543	10.7942	0.2399	4.80
	1/500x (2)	4.6011	0.0015	6.83	10.3382	10.5746	0.2364	4.73
D	5x (1)	4.3297	3.84	6.85	10.3415	10.5976	0.2561	5.12
	5x (2)	4.3297	3.84	6.85	10.4549	10.698	0.2431	4.86
	1x (1)	5.3731	0.77	6.85	10.3785	10.6143	0.2358	4.72
	1x (2)	5.3731	0.77	6.85	10.6117	10.8401	0.2284	4.57
	1/2x (1)	4.9040	0.38	6.85	10.4318	10.6573	0.2255	4.51
	1/2x (2)	4.9040	0.38	6.85	10.6572	10.8742	0.217	4.34
	1/5x (1)	4.7084	0.15	6.85	10.552	10.7791	0.2271	4.54
	1/5x (2)	4.7084	0.15	6.85	10.7118	10.9623	0.2505	5.01
	1/10x (1)	4.9843	0.077	6.85	10.6174	10.8589	0.2415	4.83
	1/10x (2)	4.9843	0.077	6.86	10.5229	10.7614	0.2385	4.77
	1/20x (1)	4.7533	0.038	6.84	10.5045	10.7446	0.2401	4.80

[0468]

实验 设置	样品	600nm	mg/L 维 生素 B12	pH	Tare (g)	Out wt (g)	干燥小球 重量 (g)	g/L	
		接种 O.D.						生物质	
[0469]	1/20x (2)	4.7533	0.038	6.84	10.5049	10.7281	0.2232	4.46	
	1/50x (1)	4.3732	0.015	6.86	10.5161	10.7566	0.2405	4.81	
	1/50x (2)	4.3732	0.015	6.85	10.5234	10.7574	0.234	4.68	
	1/100x (1)	4.0902	0.0077	6.86	10.4858	10.7193	0.2335	4.67	
	1/100x (2)	4.0902	0.0077	6.86	10.5523	10.7856	0.2333	4.67	
	1/500x (1)	4.2472	0.0015	6.86	10.553	10.8032	0.2502	5.00	
	1/500x (2)	4.2472	0.0015	6.86	10.4488	10.6976	0.2488	4.98	
	E	5x (1)	4.5635	3.84	6.79	10.3613	10.6103	0.249	4.98
	5x (2)	4.5635	3.84	6.80	10.5311	10.7546	0.2235	4.47	
	1x (1)	4.2673	0.77	6.80	10.3311	10.5651	0.234	4.68	
	1x (2)	4.2673	0.77	6.80	10.466	10.7162	0.2502	5.00	
	1/2x (1)	5.1989	0.38	6.79	10.6796	10.9054	0.2258	4.52	
	1/2x (2)	5.1989	0.38	6.80	10.5552	10.7836	0.2284	4.57	
	1/5x (1)	5.0275	0.15	6.80	10.4877	10.721	0.2333	4.67	
	1/5x (2)	5.0275	0.15	6.80	10.5061	10.7331	0.227	4.54	
	1/10x (1)	5.6680	0.077	6.81	10.3585	10.5946	0.2361	4.72	
	1/10x (2)	5.6680	0.077	6.80	10.6807	10.9116	0.2309	4.62	
	1/20x (1)	5.2891	0.038	6.81	10.3664	10.6143	0.2479	4.96	
1/20x (2)	5.2891	0.038	6.81	10.3745	10.6253	0.2508	5.02		
1/50x (1)	5.0356	0.015	6.81	10.4285	10.682	0.2535	5.07		
1/50x (2)	5.0356	0.015	6.80	10.4022	10.6524	0.2502	5.00		
1/100x (1)	5.7271	0.0077	6.81	10.3332	10.5937	0.2605	5.21		
1/100x (2)	5.7271	0.0077	6.81	10.525	10.7782	0.2532	5.06		
1/500x (1)	5.1000	0.0015	6.81	10.4192	10.6785	0.2593	5.19		
1/500x (2)	5.1000	0.0015	6.81	10.3991	10.6668	0.2677	5.70		
F	5x (1)	4.5635	3.84	6.75	10.524	10.7696	0.2456	5.23	
5x (2)	4.5635	3.84	6.75	10.3291	10.5729	0.2438	4.88		
1x (1)	4.2673	0.77	6.75	10.4927	10.7424	0.2497	4.99		
1x (2)	4.2673	0.77	6.76	10.5257	10.7652	0.2395	4.79		
1/2x (1)	5.1989	0.38	6.75	10.463	10.6908	0.2278	4.56		
1/2x (2)	5.1989	0.38	6.76	10.3756	10.6003	0.2247	4.49		
1/5x (1)	5.0275	0.15	6.76	10.4212	10.6704	0.2492	4.98		

[0469]

实验 设置	样品	600nm	mg/L 维 生素 B12	pH	Tare (g)	Out wt (g)	干燥小球 重量 (g)	g/L
		接种 O.D.						生物质
[0470]	1/5x (2)	5.0275	0.15	6.76	10.5061	10.7509	0.2448	4.90
	1/10x (1)	5.6680	0.077	6.76	10.3829	10.6062	0.2233	4.47
	1/10x (2)	5.6680	0.077	6.76	10.3651	10.6068	0.2417	4.83
	1/20x (1)	5.2891	0.038	6.75	10.5096	10.7442	0.2346	4.69
	1/20x (2)	5.2891	0.038	6.77	10.3875	10.6226	0.2351	4.70
	1/50x (1)	5.0356	0.015	6.78	10.3584	10.6063	0.2479	4.96
	1/50x (2)	5.0356	0.015	6.76	10.5235	10.7671	0.2436	4.87
	1/100x (1)	5.7271	0.0077	6.77	10.3664	10.6148	0.2484	4.97
	1/100x (2)	5.7271	0.0077	6.78	10.5055	10.7441	0.2386	4.77
	1/500x (1)	5.1000	0.0015	6.79	10.3322	10.5868	0.2546	5.09
	1/500x (2)	5.1000	0.0015	6.80	10.3279	10.591	0.2631	5.26
[0470]	G 5x (1)	3.7017	3.84	6.83	10.362	10.6077	0.2457	4.91
	5x (2)	3.7017	3.84	6.82	10.3595	10.6145	0.255	5.10
	1x (1)	4.2905	0.77	6.84	10.3648	10.6151	0.2503	5.01
	1x (2)	4.2905	0.77	6.85	10.3356	10.5972	0.2616	5.23
	1/2x (1)	4.4548	0.38	6.84	10.5096	10.7683	0.2587	5.17
	1/2x (2)	4.4508	0.38	6.84	10.435	10.6889	0.2539	5.08
	1/5x (1)	4.6844	0.15	6.84	10.3305	10.5868	0.2563	5.13
	1/5x (2)	4.6844	0.15	6.85	10.4964	10.7476	0.2512	5.02
	1/10x (1)	5.8389	0.077	6.85	10.3637	10.6173	0.2536	5.07
	1/10x (2)	5.8389	0.077	6.85	10.3351	10.5881	0.253	5.06
	1/20x (1)	4.4483	0.038	6.85	10.4393	10.6958	0.2565	5.13
	1/20x (2)	4.4483	0.038	6.86	10.3798	10.6416	0.2618	5.24
	1/50x (1)	3.9821	0.015	6.86	10.3619	10.619	0.2571	5.14
	1/50x (2)	3.9821	0.015	6.87	10.5179	10.7721	0.2542	5.08
	1/100x (1)	5.0043	0.0077	6.87	10.4756	10.7288	0.2532	5.06
	1/100x (2)	5.0043	0.0077	6.87	10.4993	10.7561	0.2568	5.14
	1/500x (1)	5.0108	0.0015	6.88	10.434	10.6941	0.2601	5.20
	1/500x (2)	5.0108	0.0015	6.87	10.3896	10.6446	0.255	5.10
[0470]	H 1/500x (1)	4.6921	0.0015	6.85	10.3599	10.5954	0.2355	4.71
	1/500x (2)	4.6921	0.0015	6.85	10.3720	10.6254	0.2534	5.07
	0x (1)	4.8144	0.0000	6.85	10.3624	10.6052	0.2428	4.86

实验 设置	样品	600nm	mg/L 维 生素 B12	pH	Tare (g)	Out wt (g)	干燥小球 重量 (g)	g/L
		接种 O.D.						生物质
	0x (2)	4.8144	0.0000	6.86	10.3585	10.6093	0.2508	5.02
I	1/500x (1)	4.7906	0.0015	6.89	10.5492	10.7920	0.2428	4.86
	1/500x (2)	4.7906	0.0015	6.90	10.5958	10.8508	0.255	5.10
	0x (1)	4.7063	0.0000	6.89	10.5505	10.8037	0.2532	5.06
	0x (2)	4.7063	0.0000	6.89	10.5120	10.7693	0.2573	5.15
J	1/500x (1)	5.8805	0.0015	6.99	10.5433	10.8089	0.2656	5.31
	1/500x (2)	5.8805	0.0015	7.00	10.5974	10.8714	0.274	5.48
	0x (1)	4.6385	0.0000	7.00	10.5509	10.8145	0.2636	5.27
	0x (2)	4.6385	0.0000	6.98	10.5462	10.8252	0.279	5.58
K	1/500x (1)	4.7133	0.0015	6.87	10.5424	10.8085	0.2661	5.32
	1/500x (2)	4.7133	0.0015	6.88	10.3444	10.6111	0.2667	5.33
	0x (1)	4.2141	0.0000	6.86	10.3873	10.6587	0.2714	5.43
	0x (2)	4.2141	0.0000	6.86	10.4188	10.6866	0.2678	5.36

[0471]

实验 设置	样品	% 16:0	% ARA	% EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% DHA	% 脂肪
A	5x (1)	27.53	1.67	16.01	2.22	2.33	41.72	67.22
	5x (2)	27.65	1.71	16.02	2.16	2.41	41.17	66.07
	1x (1)	27.73	1.72	16.00	2.15	2.44	41.06	66.25
	1x (2)	27.72	1.75	16.32	2.10	2.48	40.46	65.42
	1/2x (1)	27.86	1.74	16.36	2.09	2.49	40.54	65.45
	1/2x (2)	27.73	1.77	16.53	2.14	2.32	40.93	66.57
	1/5x (1)	27.60	1.73	16.33	2.13	2.38	41.03	66.59
	1/5x (2)	27.88	1.74	15.94	2.17	2.43	41.04	66.28
	1/10x (1)	27.87	1.75	16.28	2.09	2.56	40.66	65.14
	1/10x (2)	27.81	1.74	16.07	2.13	2.48	40.96	65.39
	1/20x (1)	27.70	1.75	16.36	2.08	2.52	40.53	65.64
	1/20x (2)	27.63	1.75	16.42	2.13	2.36	40.93	66.30
	1/50x (1)	27.83	1.76	16.61	2.07	2.43	40.60	66.02
	1/50x (2)	27.82	1.69	16.35	2.11	2.49	40.84	64.97
	1/100x (1)	27.50	1.72	16.13	2.16	2.50	41.19	66.21
	1/100x (2)	27.60	1.69	15.64	2.24	2.34	41.72	66.56

实验 设置	样品	% 16:0	% ARA	% EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% DHA	% 脂肪
	1/500x (1)	27.58	1.70	15.63	2.24	2.28	41.74	66.99
	1/500x (2)	27.57	1.75	16.86	2.06	2.41	40.59	64.91
B	5x (1)	28.30	1.75	16.44	2.32	2.35	42.35	64.09
	5x (2)	28.45	1.74	15.96	2.36	2.36	42.62	62.46
	1x (1)	28.55	1.74	16.10	2.32	2.43	42.35	62.96
	1x (2)	28.47	1.78	16.33	2.33	2.44	42.26	63.13
	1/2x (1)	28.21	1.71	15.90	2.39	2.34	42.95	64.75
	1/2x (2)	28.15	1.75	16.65	2.29	2.33	42.32	63.50
	1/5x (1)	28.51	1.74	16.34	2.29	2.37	42.23	62.02
	1/5x (2)	28.43	1.75	16.35	2.29	2.48	42.24	63.88
	1/10x (1)	28.66	1.77	15.85	2.37	2.45	42.45	62.47
	1/10x (2)	28.52	1.74	15.74	2.40	2.39	42.70	63.14
	1/20x (1)	28.67	1.75	15.86	2.33	2.37	42.55	63.10
	1/20x (2)	28.36	1.75	16.13	2.35	2.26	42.62	63.90
	1/50x (1)	28.36	1.79	16.64	2.29	2.42	42.04	62.31
	1/50x (2)	28.43	1.77	15.92	2.40	2.42	42.57	62.77
	1/100x (1)	28.81	1.75	16.01	2.30	2.49	42.16	61.70
	1/100x (2)	28.61	1.73	15.93	2.35	2.40	42.51	63.60
	1/500x (1)	28.62	1.85	17.15	2.17	2.59	41.19	60.91
	1/500x (2)	28.30	1.84	17.39	2.20	2.43	41.40	61.56
C	5x (1)	27.97	1.95	16.08	2.60	2.43	42.37	67.30
	5x (2)	28.24	1.96	15.99	2.55	2.54	42.02	66.72
	1x (1)	28.20	1.94	15.96	2.60	2.61	42.06	66.98
	1x (2)	28.10	1.98	16.39	2.54	2.64	41.73	66.30
	1/2x (1)	27.77	2.14	17.67	2.40	2.85	40.46	64.53
	1/2x (2)	27.84	2.10	17.27	2.50	2.62	40.85	65.79
	1/5x (1)	27.57	2.06	17.37	2.46	2.64	41.17	66.69
	1/5x (2)	27.71	2.05	17.05	2.50	2.70	41.31	65.86
	1/10x (1)	28.02	2.06	16.89	2.48	2.70	41.27	65.53
	1/10x (2)	27.66	2.05	16.76	2.55	2.64	41.66	65.85
	1/20x (1)	27.64	2.13	17.27	2.52	2.74	41.03	65.00
	1/20x (2)	27.56	2.19	18.62	2.27	2.88	39.82	64.23
	1/50x (1)	27.78	2.02	16.98	2.51	2.52	41.61	66.22

[0472]

实验 设置	样品	%	%	%	(n-6)	(n-3)	%	%
		16:0	ARA	EPA	DPA	DPA	DHA	脂肪
[0473]	1/50x (2)	27.82	2.01	16.92	2.53	2.65	41.47	65.85
	1/100x (1)	27.85	2.01	16.77	2.54	2.67	41.50	65.23
	1/100x (2)	27.91	2.01	16.61	2.58	2.59	41.72	66.87
	1/500x (1)	27.73	2.02	17.42	2.41	2.58	41.10	65.60
	1/500x (2)	27.48	2.05	17.93	2.39	2.54	40.85	65.85
	D 5x (1)	27.80	1.85	15.97	2.59	2.32	42.99	67.08
	5x (2)	27.89	1.86	16.27	2.52	2.42	42.60	66.60
	1x (1)	27.60	1.92	16.59	2.54	2.53	42.42	66.32
	1x (2)	27.75	1.89	16.40	2.53	2.48	42.60	66.35
	1/2x (1)	27.35	1.98	17.19	2.52	2.53	41.97	65.19
	1/2x (2)	27.26	2.01	17.65	2.45	2.45	41.58	66.67
	1/5x (1)	27.42	1.97	17.53	2.42	2.55	41.72	66.69
	1/5x (2)	27.46	1.91	16.60	2.60	2.45	42.44	66.58
	1/10x (1)	27.45	1.97	17.03	2.50	2.61	42.04	66.06
	1/10x (2)	27.45	1.90	16.66	2.52	2.46	42.46	66.91
	1/20x (1)	27.45	1.96	16.95	2.58	2.41	42.11	66.10
	1/20x (2)	27.30	2.00	17.94	2.42	2.45	41.50	65.30
	1/50x (1)	27.58	1.87	16.65	2.55	2.33	42.61	66.84
	1/50x (2)	27.69	1.89	16.85	2.50	2.44	42.27	65.40
	1/100x (1)	27.44	1.92	16.88	2.51	2.51	42.38	65.88
	1/100x (2)	27.47	1.92	16.67	2.58	2.43	42.56	65.83
	1/500x (1)	26.91	1.98	18.05	2.40	2.47	41.66	66.18
	1/500x (2)	27.03	1.99	18.08	2.40	2.36	41.69	65.80
E	5x (1)	27.46	1.89	16.02	2.60	2.30	43.33	66.12
	5x (2)	27.86	1.93	16.05	2.50	2.38	43.02	63.64
	1x (1)	27.75	1.95	15.91	2.58	2.39	43.09	65.41
	1x (2)	27.51	1.94	15.59	2.72	2.29	43.52	67.35
	1/2x (1)	27.07	2.04	16.99	2.52	2.42	42.64	65.01
	1/2x (2)	26.86	2.05	17.23	2.48	2.35	42.59	65.00
	1/5x (1)	27.05	1.96	16.65	2.55	2.29	43.21	65.66
	1/5x (2)	27.12	1.98	16.69	2.52	2.41	43.08	63.58
	1/10x (1)	27.35	1.95	16.45	2.55	2.48	42.94	64.34
	1/10x (2)	27.31	1.92	16.22	2.60	2.41	43.24	64.49

实验 设置	样品	% 16:0	% ARA	% EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% DHA	% 脂肪
[0474]	1/20x (1)	26.72	1.93	16.73	2.64	2.31	43.21	65.83
	1/20x (2)	26.47	1.94	17.11	2.65	2.21	43.14	66.13
	1/50x (1)	26.63	1.86	16.30	2.72	2.19	43.84	65.30
	1/50x (2)	26.68	1.86	16.33	2.69	2.26	43.76	65.67
	1/100x (1)	26.47	1.87	16.39	2.69	2.28	43.89	63.98
	1/100x (2)	26.45	1.89	16.78	2.62	2.38	43.49	65.21
	1/500x (1)	26.06	1.88	17.13	2.60	2.23	43.73	66.13
	1/500x (2)	25.95	1.88	17.58	2.57	2.10	43.40	65.46
	F 5x (1)	25.71	1.96	17.50	2.46	2.34	43.56	65.46
	5x (2)	25.91	1.93	17.26	2.47	2.38	43.73	65.71
	1x (1)	25.93	1.90	16.70	2.54	2.43	43.93	66.05
	1x (2)	26.03	1.94	17.17	2.48	2.39	43.41	65.34
	1/2x (1)	25.76	2.03	18.11	2.43	2.38	42.76	65.27
	1/2x (2)	25.74	2.05	18.52	2.37	2.31	42.52	65.75
	1/5x (1)	25.44	1.95	17.62	2.49	2.27	43.73	65.80
	1/5x (2)	25.41	1.94	17.35	2.52	2.32	43.99	65.88
	1/10x (1)	26.13	2.04	18.06	2.36	2.55	42.43	64.10
	1/10x (2)	25.62	1.98	17.53	2.48	2.44	43.52	65.51
	1/20x (1)	25.77	2.01	17.97	2.45	2.34	42.94	65.21
	1/20x (2)	25.55	2.03	18.45	2.42	2.24	42.78	66.05
	1/50x (1)	25.26	1.96	17.54	2.55	2.18	44.07	66.41
	1/50x (2)	25.48	1.95	17.58	2.50	2.30	43.72	65.93
	1/100x (1)	25.50	1.93	17.00	2.62	2.23	44.36	65.37
	1/100x (2)	25.59	1.96	17.37	2.56	2.26	43.80	65.18
	1/500x (1)	25.54	1.99	18.11	2.45	2.20	43.08	65.05
	1/500x (2)	25.55	2.00	18.59	2.36	2.18	42.66	64.57
G	5x (1)	25.74	1.95	17.58	2.37	2.08	43.04	63.68
	5x (2)	25.79	1.89	16.83	2.51	2.04	43.69	63.67
	1x (1)	26.01	1.90	16.69	2.52	2.08	43.42	64.95
	1x (2)	25.71	1.91	16.74	2.57	1.98	43.85	65.37
	1/2x (1)	25.47	1.93	17.14	2.52	1.97	43.69	64.28
	1/2x (2)	25.68	1.95	17.80	2.42	1.94	42.76	64.15
	1/5x (1)	25.63	1.94	17.43	2.46	2.02	43.21	63.70

[0475]	实验 设置	样品	% 16:0	% ARA	% EPA	(n-6) DPA	(n-3) DPA	% DHA	% 脂肪
		1/5x (2)	25.86	1.91	17.03	2.47	2.04	43.16	64.14
		1/10x (1)	26.34	1.95	17.09	2.48	2.14	42.35	63.27
		1/10x (2)	26.24	1.93	16.79	2.52	2.04	42.93	64.71
		1/20x (1)	25.47	1.97	18.06	2.37	2.12	42.62	63.38
		1/20x (2)	25.38	1.98	18.16	2.40	1.95	42.73	62.81
		1/50x (1)	25.46	1.94	18.06	2.37	2.02	42.72	63.38
		1/50x (2)	25.50	1.94	17.46	2.46	2.04	43.15	63.66
		1/100x (1)	25.52	1.92	16.69	2.60	1.81	44.16	65.74
		1/100x (2)	25.96	1.92	17.11	2.48	1.96	43.00	63.89
		1/500x (1)	25.71	1.95	17.78	2.41	1.97	42.83	64.61
		1/500x (2)	25.56	2.02	18.25	2.37	1.90	42.63	64.80
	H	1/500x (1)	25.19	2.03	19.36	2.14	2.02	41.86	65.21
		1/500x (2)	25.41	1.94	17.85	2.37	1.83	43.31	65.75
		0x (1)	21.45	2.62	27.54	1.31	2.50	35.78	67.83
		0x (2)	21.79	2.63	27.33	1.30	2.51	35.66	67.07
	I	1/500x (1)	25.21	2.02	19.89	2.15	2.10	41.48	64.17
		1/500x (2)	25.00	2.02	20.00	2.11	2.09	41.63	64.04
		0x (1)	21.82	2.62	28.55	1.20	2.61	34.16	67.22
		0x (2)	21.66	2.64	28.83	1.18	2.55	34.20	66.93
	J	1/500x (1)	24.44	1.81	16.75	2.49	2.22	45.20	63.43
		1/500x (2)	24.34	1.82	17.73	2.39	1.95	44.71	63.88
		0x (1)	21.56	2.58	26.96	1.30	2.60	36.04	66.74
		0x (2)	21.53	2.61	27.30	1.31	2.43	35.96	65.71
	K	1/500x (1)	23.87	1.82	17.33	2.46	2.00	45.45	64.67
		1/500x (2)	24.07	1.82	17.67	2.42	1.93	45.06	64.30
		0x (1)	21.77	2.63	26.13	1.39	2.81	36.49	66.14
	0x (2)	21.91	2.63	27.19	1.29	2.63	35.60	66.81	
实验 设置	样品	(g/L) EPA 产量	mg/g EPA	DHA 产量	(g/L) mg/g DHA	(g/L) LFDW	g B12/ g LFDW	g/L 脂肪	
A	5x (1)	0.53	107.64	1.39	291.68	1.62	0.0024	3.32	

实验 设置	样品	(g/L)	mg/g	DHA	(g/L)	(g/L)	g B12/	
		EPA			mg/g	LFDW	g LFDW	g/L 脂肪
[0476]	5x (2)	0.50	105.83	1.28	282.95	1.60	0.0024	3.11
	1x (1)	0.49	105.99	1.26	282.93	1.56	0.00049	3.06
	1x (2)	0.47	106.77	1.17	275.34	1.52	0.00051	2.88
	1/2x (1)	0.47	107.06	1.17	275.98	1.52	0.00025	2.88
	1/2x (2)	0.51	110.04	1.26	283.39	1.55	0.00025	3.09
	1/5x (1)	0.50	108.74	1.26	284.18	1.54	0.00010	3.07
	1/5x (2)	0.48	105.63	1.22	282.95	1.52	0.00010	2.98
	1/10x (1)	0.48	106.01	1.20	275.47	1.58	0.000049	2.94
	1/10x (2)	0.48	105.07	1.22	278.58	1.57	0.000049	2.97
	1/20x (1)	0.48	107.36	1.19	276.71	1.54	0.000025	2.95
	1/20x (2)	0.51	108.87	1.26	282.24	1.57	0.000024	3.08
	1/50x (1)	0.48	109.67	1.16	278.77	1.47	0.000010	2.86
	1/50x (2)	0.48	106.19	1.19	275.96	1.58	0.000010	2.93
	1/100x (1)	0.50	106.81	1.27	283.69	1.57	0.0000049	3.07
	1/100x (2)	0.50	104.11	1.34	288.86	1.61	0.0000048	3.21
	1/500x (1)	0.50	104.68	1.35	290.83	1.59	0.00000094	3.23
	1/500x (2)	0.51	109.46	1.23	274.01	1.64	0.00000091	3.04
B	5x (1)	0.49	105.34	1.26	279.16	1.66	0.0023	2.97
	5x (2)	0.48	99.71	1.29	273.81	1.81	0.0021	3.02
	1x (1)	0.48	101.34	1.27	274.22	1.77	0.00044	3.00
	1x (2)	0.49	103.10	1.26	274.39	1.74	0.00044	2.98
	1/2x (1)	0.52	102.99	1.39	286.04	1.76	0.00022	3.24
	1/2x (2)	0.51	105.75	1.30	276.38	1.76	0.00022	3.06
	1/5x (1)	0.48	101.36	1.24	269.37	1.80	0.000083	2.94
	1/5x (2)	0.48	104.41	1.25	277.49	1.67	0.000090	2.95
	1/10x (1)	0.45	98.98	1.20	272.75	1.71	0.000045	2.84
	1/10x (2)	0.48	99.38	1.31	277.29	1.80	0.000043	3.08
	1/20x (1)	0.47	100.10	1.25	276.16	1.72	0.000022	2.94
	1/20x (2)	0.48	103.06	1.26	280.15	1.68	0.000023	2.97
	1/50x (1)	0.48	103.67	1.22	269.42	1.76	0.0000085	2.91
	1/50x (2)	0.47	99.90	1.25	274.84	1.74	0.0000086	2.93
	1/100x (1)	0.46	98.77	1.20	267.53	1.77	0.0000043	2.86

实验 设置	样品	(g/L)	mg/g EPA	mg/g DHA	(g/L)	(g/L)	g B12/ g LFDW	g/L 脂肪
		产量			产量	LFDW		
	1/100x (2)	0.48	101.29	1.27	278.11	1.71	0.0000045	2.99
	1/500x (1)	0.43	104.49	1.04	258.03	1.63	0.00000092	2.53
	1/500x (2)	0.47	107.03	1.11	262.14	1.67	0.00000090	2.68
C	5x (1)	0.52	108.25	1.37	292.82	1.57	0.0025	3.22
	5x (2)	0.49	106.70	1.29	287.91	1.53	0.0025	3.06
	1x (1)	0.51	106.88	1.36	289.31	1.59	0.00048	3.23
	1x (2)	0.52	108.67	1.31	284.09	1.60	0.00048	3.15
	1/2x (1)	0.44	114.02	1.00	268.13	1.35	0.00028	2.46
	1/2x (2)	0.49	113.61	1.15	275.95	1.46	0.00026	2.82
	1/5x (1)	0.50	115.85	1.19	281.94	1.44	0.00010	2.89
	1/5x (2)	0.50	112.29	1.21	279.43	1.52	0.00010	2.93
	1/10x (1)	0.48	110.70	1.17	277.71	1.50	0.000051	2.85
	1/10x (2)	0.48	110.39	1.20	281.73	1.50	0.000051	2.89
	1/20x (1)	0.45	112.23	1.08	273.88	1.41	0.000027	2.62
	1/20x (2)	0.45	119.57	0.95	262.65	1.33	0.000029	2.39
	1/50x (1)	0.49	112.42	1.21	282.97	1.49	0.000010	2.91
	1/50x (2)	0.50	111.40	1.23	280.41	1.53	0.000010	2.96
	1/100x (1)	0.51	109.40	1.25	278.02	1.61	0.0000048	3.02
	1/100x (2)	0.51	111.08	1.29	286.49	1.53	0.0000050	3.09
	1/500x (1)	0.55	114.30	1.29	276.88	1.65	0.00000091	3.15
	1/500x (2)	0.56	118.05	1.27	276.25	1.61	0.00000093	3.11
D	5x (1)	0.55	107.16	1.48	296.16	1.69	0.0023	3.44
	5x (2)	0.53	108.39	1.38	291.37	1.62	0.0024	3.24
	1x (1)	0.52	110.03	1.33	288.89	1.59	0.00048	3.13
	1x (2)	0.50	108.83	1.29	290.26	1.54	0.00050	3.03
	1/2x (1)	0.51	112.05	1.23	281.00	1.57	0.00024	2.94
	1/2x (2)	0.51	117.67	1.20	284.69	1.45	0.00026	2.89
	1/5x (1)	0.53	116.92	1.26	285.74	1.51	0.00010	3.03
	1/5x (2)	0.55	110.50	1.42	290.20	1.67	0.000090	3.34
	1/10x (1)	0.54	112.52	1.34	285.20	1.64	0.000047	3.19
	1/10x (2)	0.53	111.48	1.36	291.77	1.58	0.000049	3.19
	1/20x (1)	0.54	112.02	1.34	285.86	1.63	0.000023	3.17

[0477]

实验 设置	样品	(g/L)	mg/g EPA	mg/g DHA	(g/L)	(g/L)	g B12/	
		产量			产量	LFDW	g LFDW	g/L 脂肪
[0478]	1/20x (2)	0.52	117.18	1.21	278.32	1.55	0.000025	2.91
	1/50x (1)	0.54	111.32	1.37	292.53	1.59	0.0000094	3.22
	1/50x (2)	0.52	110.19	1.29	283.91	1.62	0.0000093	3.06
	1/100x (1)	0.52	111.21	1.30	286.73	1.59	0.0000048	3.08
	1/100x (2)	0.51	109.75	1.31	287.74	1.59	0.0000048	3.07
	1/500x (1)	0.60	119.41	1.38	283.11	1.69	0.00000089	3.31
	1/500x (2)	0.59	118.98	1.37	281.74	1.70	0.00000088	3.27
	E 5x (1)	0.53	105.94	1.43	294.23	1.69	0.0023	3.29
	5x (2)	0.46	102.13	1.22	281.16	1.63	0.0024	2.84
	1x (1)	0.49	104.07	1.32	289.48	1.62	0.00048	3.06
	1x (2)	0.53	104.97	1.47	301.01	1.63	0.00047	3.37
	1/2x (1)	0.50	110.46	1.25	284.65	1.58	0.00024	2.94
	1/2x (2)	0.51	112.01	1.26	284.34	1.60	0.00024	2.97
	1/5x (1)	0.51	109.31	1.32	291.38	1.60	0.000094	3.06
	1/5x (2)	0.48	106.13	1.24	281.31	1.65	0.000091	2.89
	1/10x (1)	0.50	105.82	1.30	283.74	1.68	0.000046	3.04
	1/10x (2)	0.48	104.57	1.29	286.39	1.64	0.000047	2.98
	1/20x (1)	0.55	110.12	1.41	292.12	1.69	0.000022	3.26
	1/20x (2)	0.57	113.13	1.43	293.02	1.70	0.000022	3.32
	1/50x (1)	0.54	106.44	1.45	294.03	1.76	0.0000085	3.31
	1/50x (2)	0.54	107.21	1.44	295.14	1.72	0.0000087	3.29
	1/100x (1)	0.55	104.88	1.46	288.40	1.88	0.0000041	3.33
	1/100x (2)	0.55	109.40	1.44	291.26	1.76	0.0000044	3.30
	1/500x (1)	0.59	113.27	1.50	296.97	1.76	0.00000085	3.43
	1/500x (2)	0.66	115.09	1.62	291.79	1.97	0.00000076	3.73
F	5x (1)	0.60	114.57	1.49	292.02	1.80	0.00212779	3.42
	5x (2)	0.55	113.41	1.40	294.25	1.67	0.00229687	3.20
	1x (1)	0.55	110.28	1.45	297.11	1.70	0.00045415	3.30
	1x (2)	0.54	112.21	1.36	290.41	1.66	0.00046376	3.13
	1/2x (1)	0.54	118.20	1.27	285.84	1.58	0.00024017	2.97
	1/2x (2)	0.55	121.79	1.26	286.25	1.54	0.00024686	2.95
	1/5x (1)	0.58	115.91	1.43	294.66	1.70	0.00008801	3.28

实验 设置	样品	(g/L)	mg/g EPA	mg/g DHA	(g/L)	(g/L)	g B12/	
		产量			产量	LFDW	g LFDW	g/L 脂肪
[0479]	1/5x (2)	0.56	114.29	1.42	296.75	1.67	0.00008979	3.23
	1/10x (1)	0.52	115.79	1.21	278.51	1.60	0.00004803	2.86
	1/10x (2)	0.56	114.86	1.38	291.97	1.67	0.00004619	3.17
	1/20x (1)	0.55	117.21	1.31	286.75	1.63	0.00002328	3.06
	1/20x (2)	0.57	121.84	1.33	289.39	1.60	0.00002381	3.11
	1/50x (1)	0.58	116.45	1.45	299.69	1.67	0.00000901	3.29
	1/50x (2)	0.56	115.90	1.40	295.17	1.66	0.00000904	3.21
	1/100x (1)	0.55	111.13	1.44	296.95	1.72	0.00000448	3.25
	1/100x (2)	0.54	113.25	1.36	292.35	1.66	0.00000463	3.11
	1/500x (1)	0.60	117.81	1.43	286.97	1.78	0.00000084	3.31
	1/500x (2)	0.63	120.03	1.45	282.05	1.86	0.00000080	3.40
	G							
[0479]	5x (1)	0.55	111.96	1.35	279.27	1.78	0.00215168	3.13
	5x (2)	0.55	107.14	1.42	283.43	1.85	0.00207251	3.25
	1x (1)	0.54	108.42	1.41	287.31	1.75	0.00043883	3.25
	1x (2)	0.57	109.44	1.50	292.04	1.81	0.00042495	3.42
	1/2x (1)	0.57	110.17	1.45	286.10	1.85	0.00020558	3.33
	1/2x (2)	0.58	114.19	1.39	279.49	1.82	0.00020874	3.26
	1/5x (1)	0.57	111.03	1.41	280.46	1.86	0.00008062	3.27
	1/5x (2)	0.55	109.25	1.39	282.05	1.80	0.00008326	3.22
	1/10x (1)	0.55	108.14	1.36	273.02	1.86	0.00004134	3.21
	1/10x (2)	0.55	108.66	1.41	283.05	1.79	0.00004313	3.27
	1/20x (1)	0.59	114.48	1.39	275.22	1.88	0.00002023	3.25
	1/20x (2)	0.60	114.04	1.41	273.40	1.95	0.00001951	3.29
[0479]	1/50x (1)	0.59	114.46	1.39	275.82	1.88	0.00000797	3.26
	1/50x (2)	0.57	111.16	1.40	279.89	1.85	0.00000812	3.24
	1/100x (1)	0.56	109.75	1.47	295.79	1.73	0.00000444	3.33
	1/100x (2)	0.56	109.31	1.41	279.92	1.85	0.00000415	3.28
	1/500x (1)	0.60	114.86	1.44	281.92	1.84	0.00000081	3.36
	1/500x (2)	0.60	118.27	1.41	281.47	1.79	0.00000084	3.31
	H							
	1/500x (1)	0.59	126.25	1.29	279.17	1.64	0.00000092	3.07
	1/500x (2)	0.59	117.35	1.44	291.28	1.74	0.00000086	3.33
	0x (1)	0.91	186.81	1.18	248.20	1.56	0.00000000	3.29

实验 设置	样品	(g/L)	mg/g EPA	DHA 产量	(g/L)	(g/L)	g B12/	
		EPA 产量			mg/g DHA	LFDW	g LFDW	g/L 脂肪
[0480]	0x (2)	0.92	183.32	1.20	244.63	1.65	0.00000000	3.36
	I 1/500x (1)	0.62	127.64	1.29	272.24	1.74	0.00000086	3.12
	1/500x (2)	0.65	128.06	1.36	272.66	1.83	0.00000082	3.27
	0x (1)	0.97	191.93	1.16	234.87	1.66	0.00000000	3.40
	0x (2)	0.99	192.97	1.18	234.10	1.70	0.00000000	3.44
	J 1/500x (1)	0.56	106.22	1.52	292.66	1.94	0.00000077	3.37
	1/500x (2)	0.62	113.25	1.57	291.57	1.98	0.00000076	3.50
	0x (1)	0.95	179.92	1.27	245.50	1.75	0.00000000	3.52
	0x (2)	1.00	179.38	1.32	241.17	1.91	0.00000000	3.67
	K 1/500x (1)	0.60	112.09	1.56	298.08	1.88	0.00000080	3.44
	1/500x (2)	0.61	113.60	1.55	293.84	1.90	0.00000079	3.43
	0x (1)	0.94	172.82	1.31	244.79	1.84	0.00000000	3.59
	0x (2)	0.97	181.66	1.27	241.23	1.78	0.00000000	3.58

[0481] 结论：在10% CO₂下DSDFM-0中维生素B12浓度范围在5x (3.84mg/L) 和1/500x (0.0015mg/L) 之间时,PTA-10208的生长和EPA生产不会改变。然而,当从DSDFM-0中完全去除维生素B12时,%EPA增加约50%,而干重和%脂肪也略有增加,导致EPA生产增加60%。

[0482] 本文中所描述的各种方面、实施方式以及选项可以组合到任意一种与所有变种中。

[0483] 在本说明书中所提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,如同具体且单独地指明各个出版物、专利和专利申请通过引用并入本文一样。

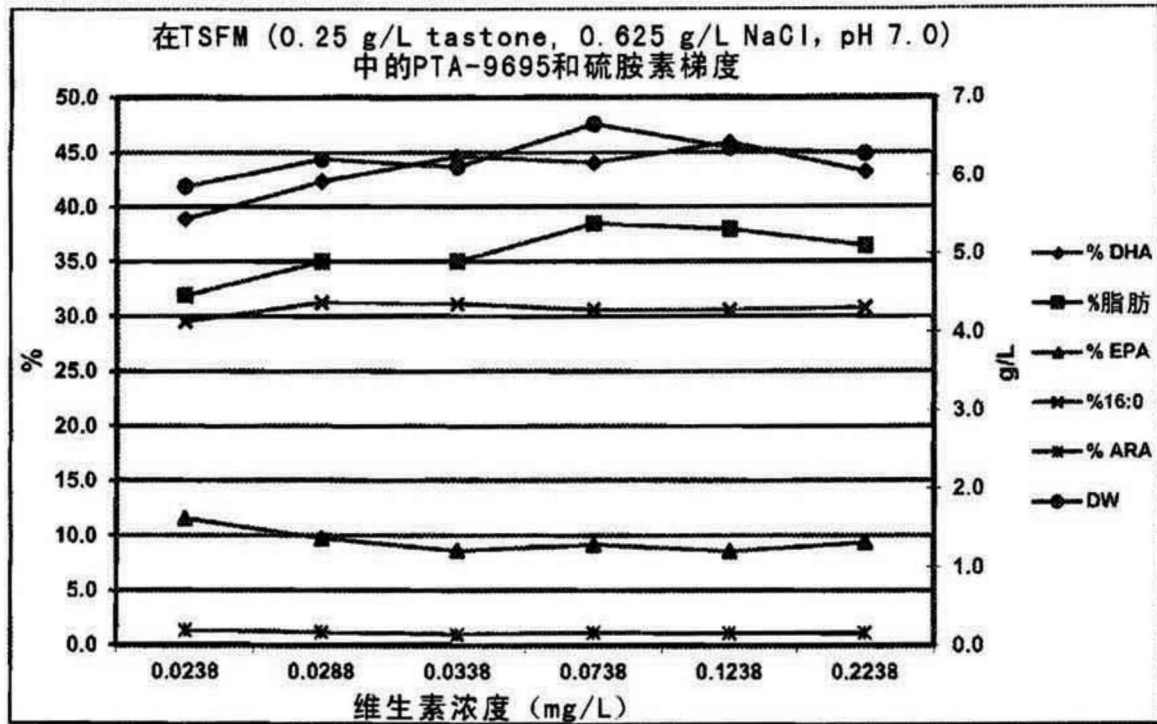


图1

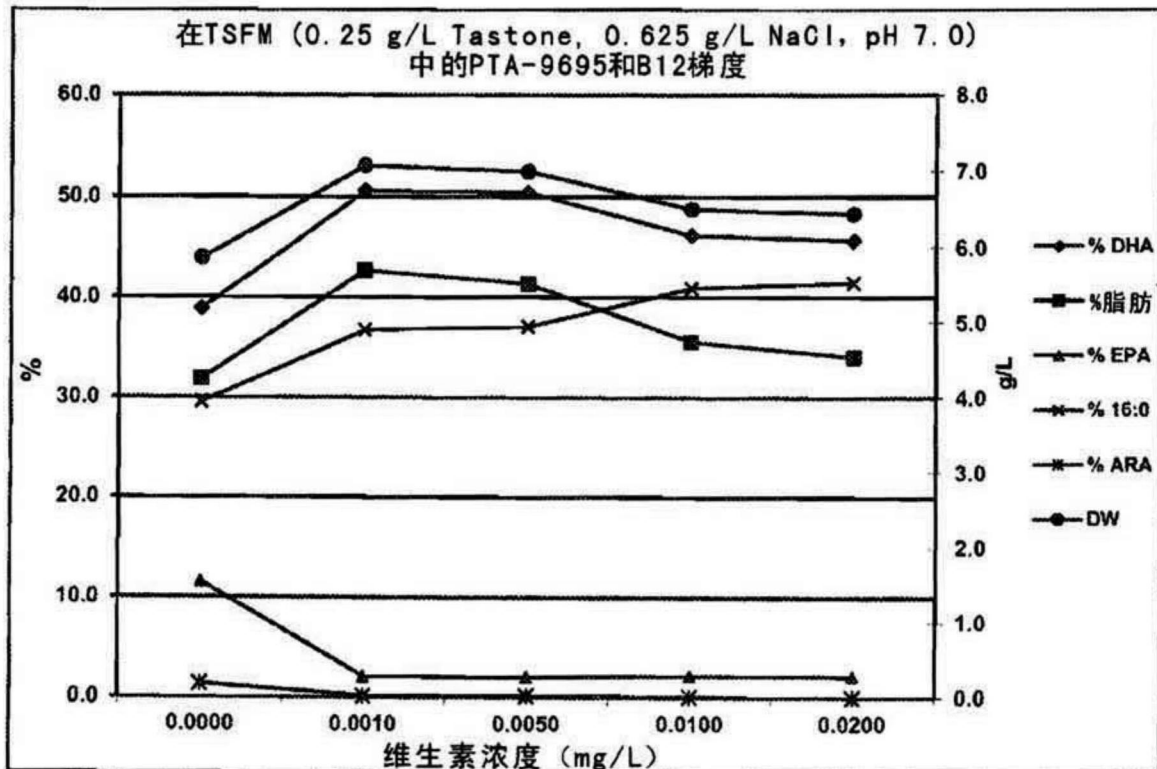


图2

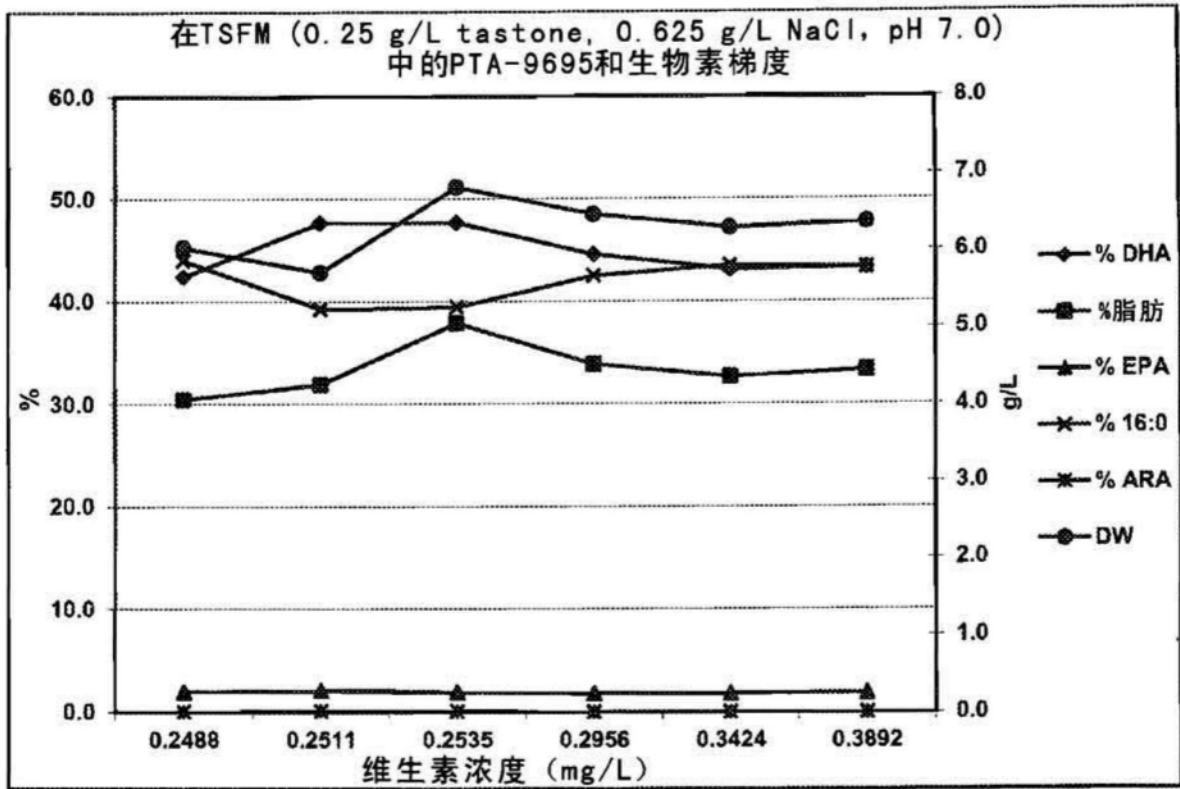


图3

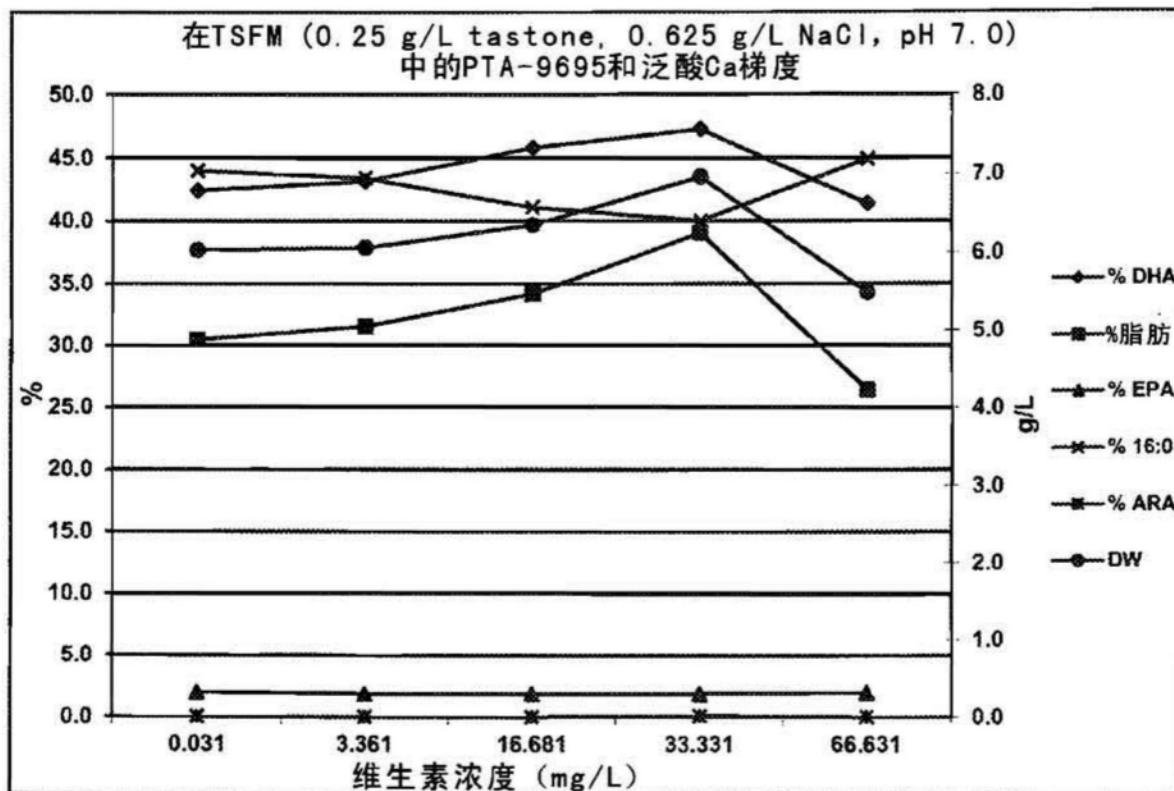


图4

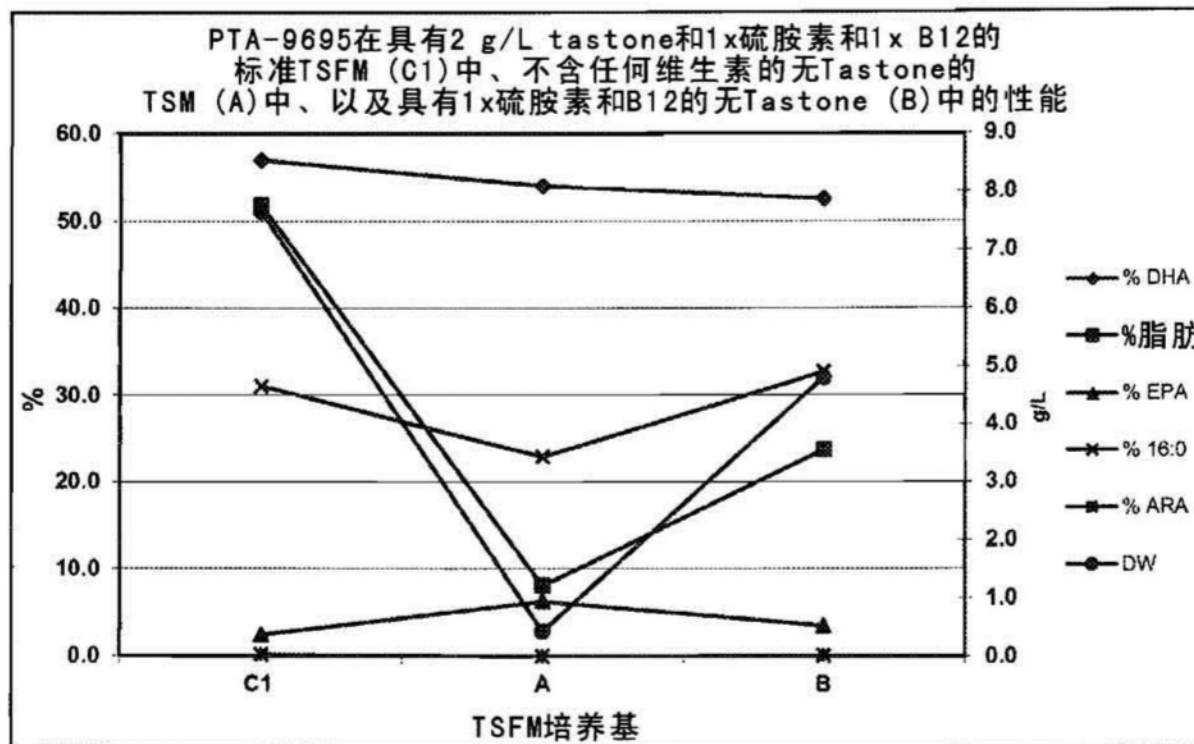


图5

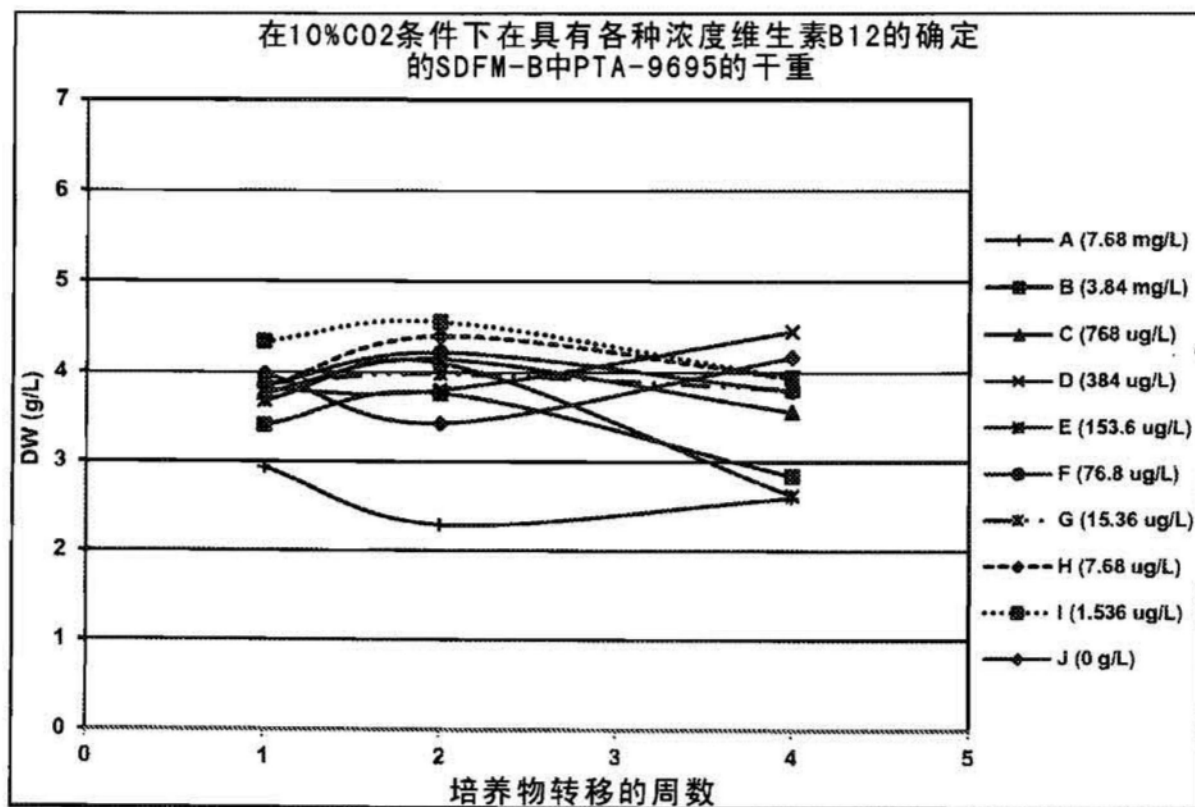


图6

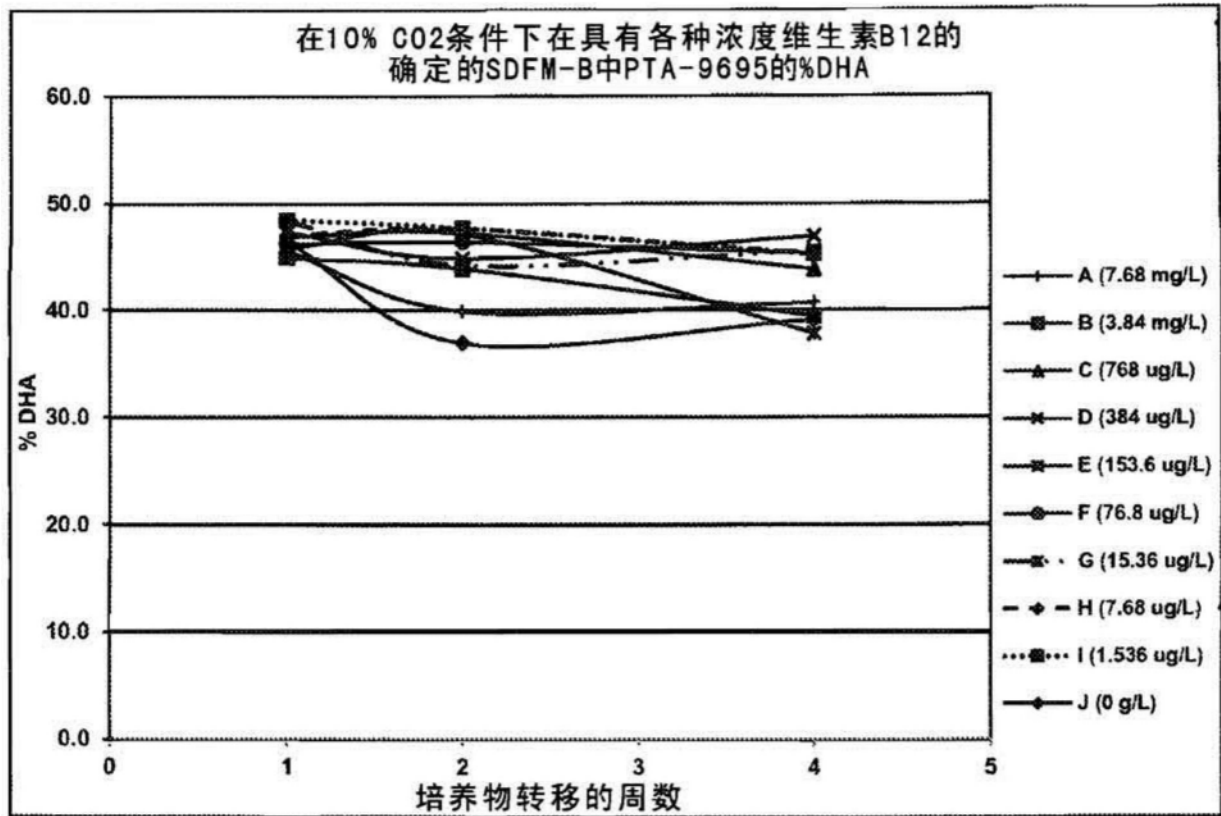


图7

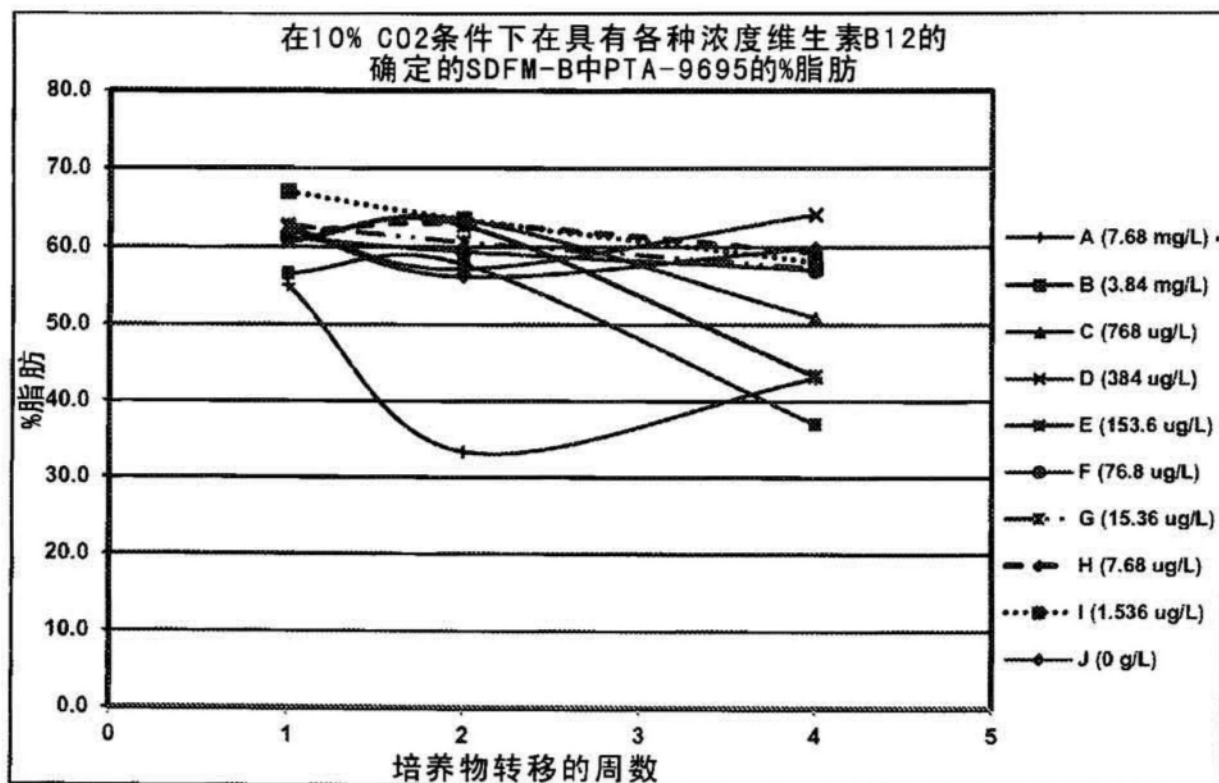


图8

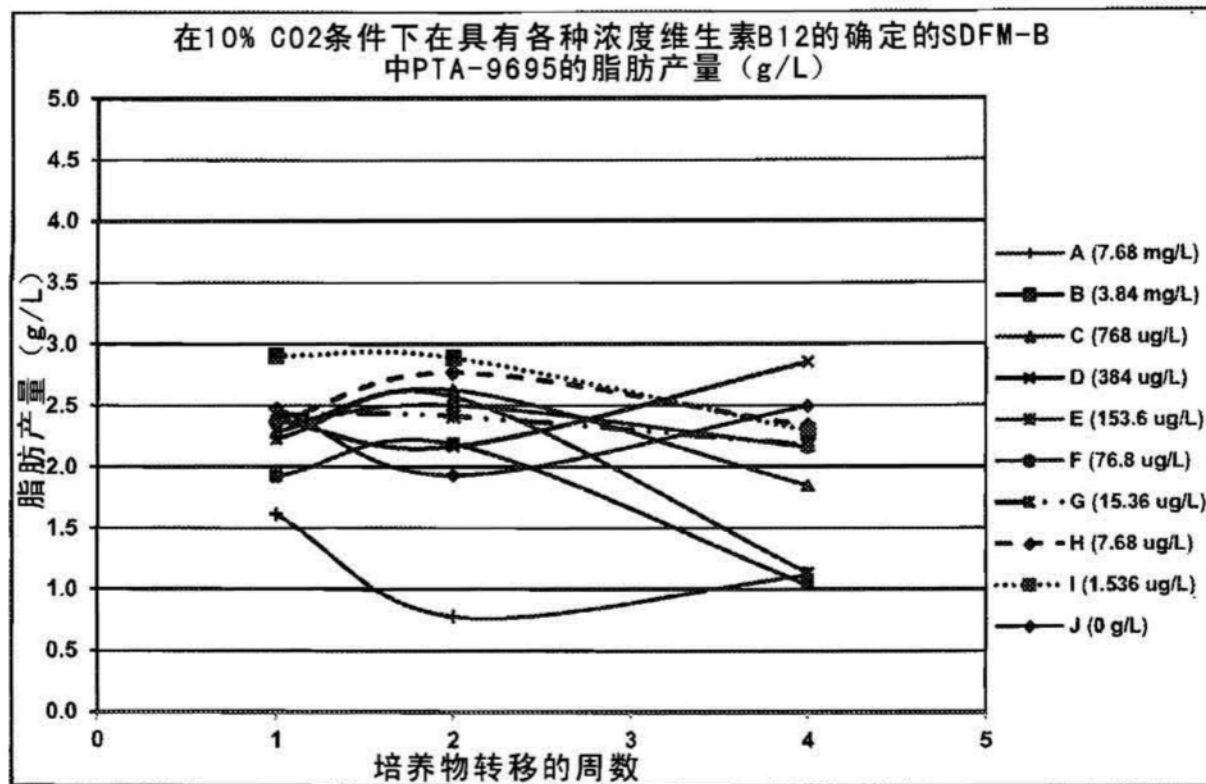


图9

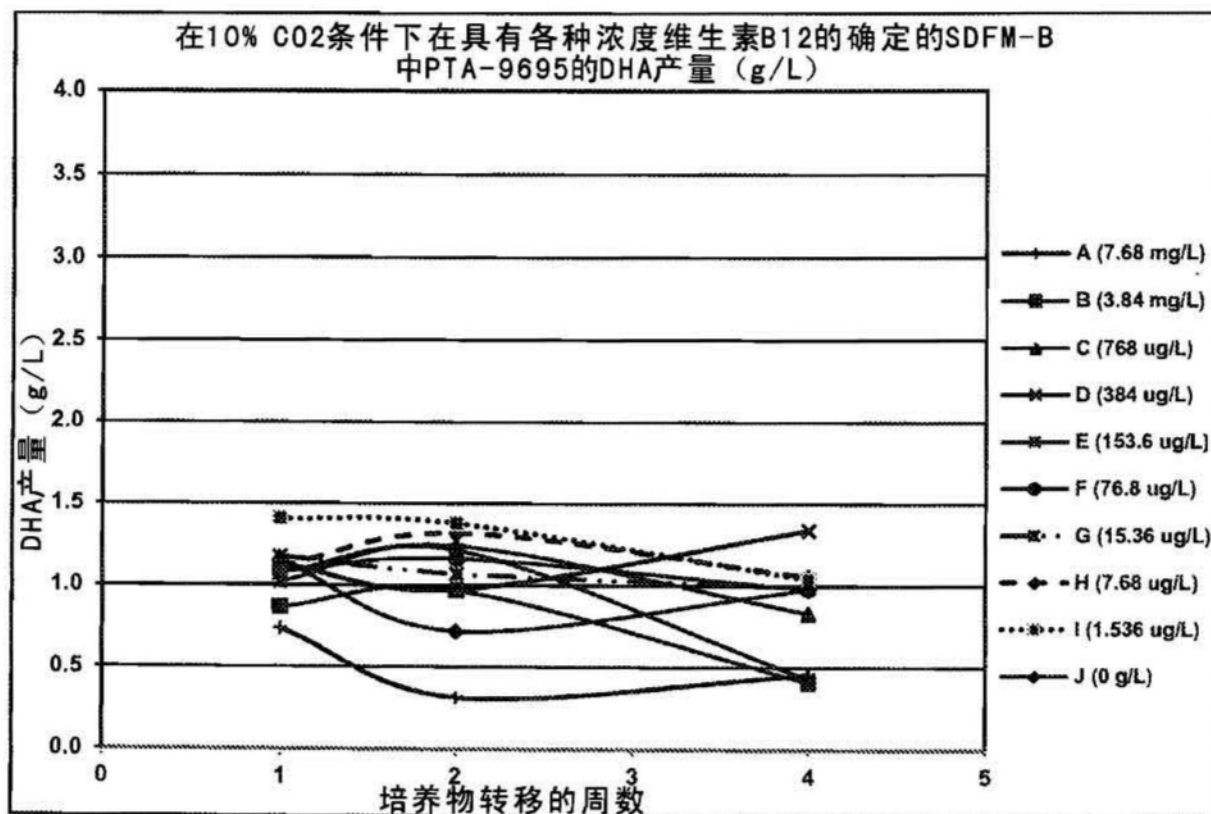


图10

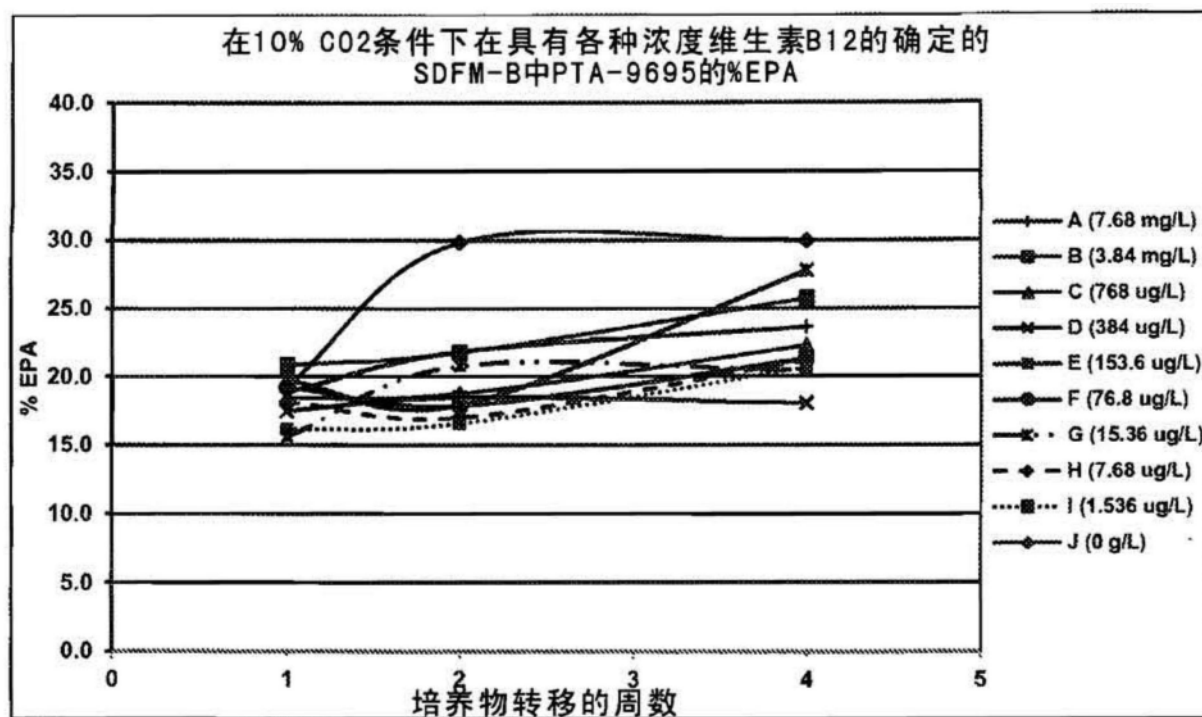


图11

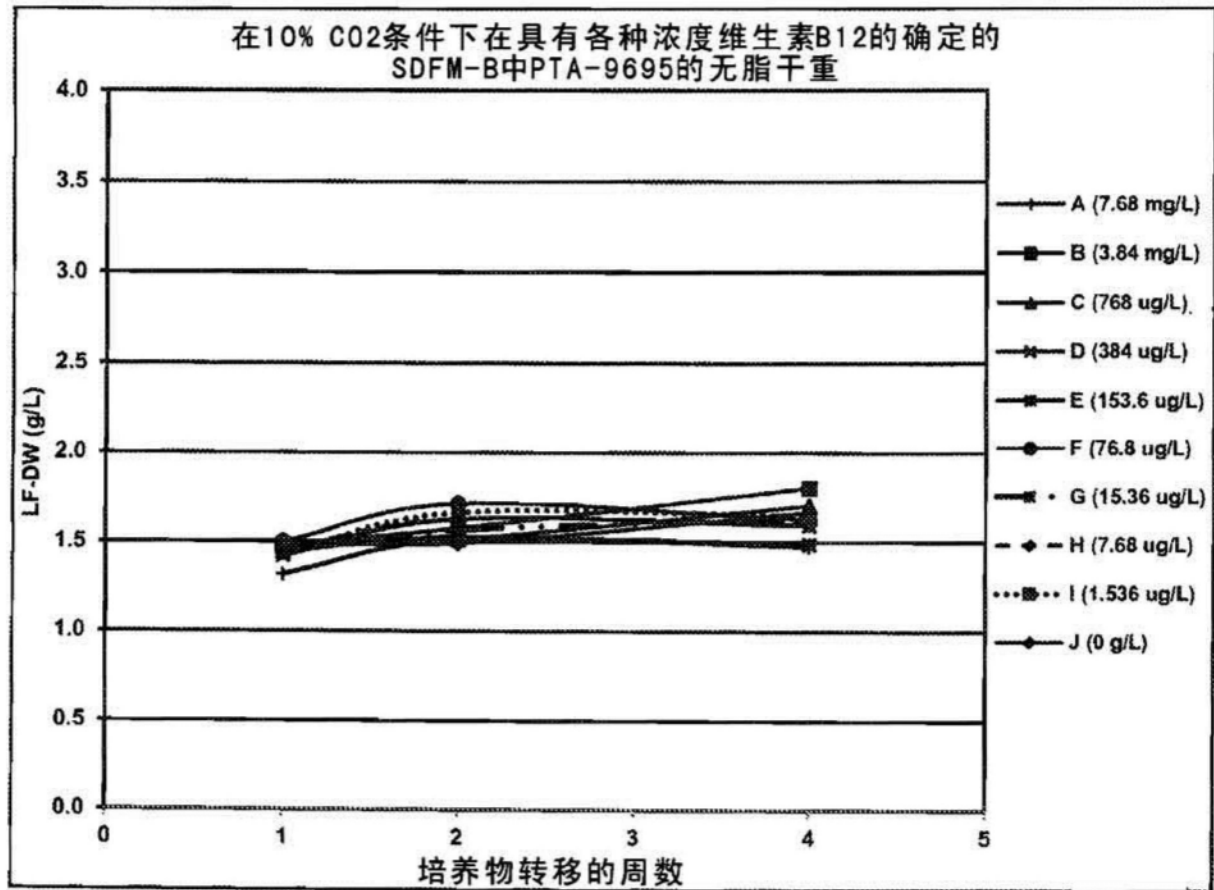


图12

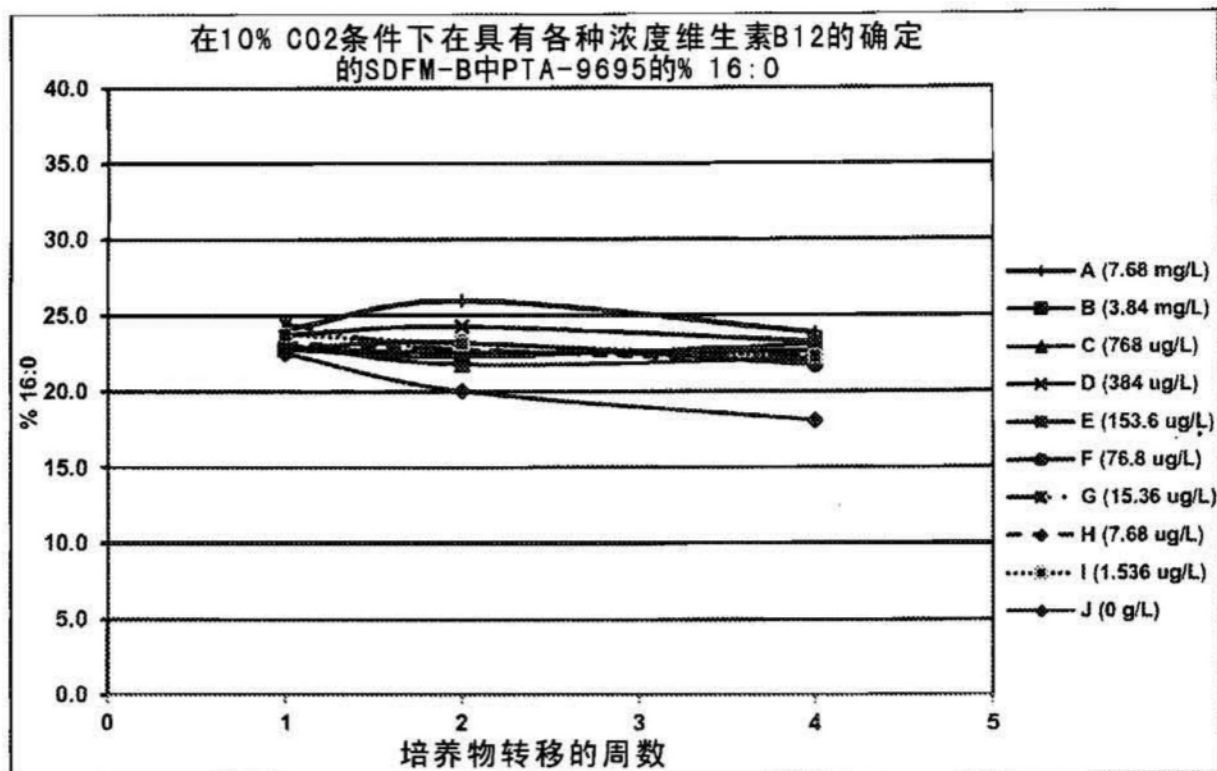


图13

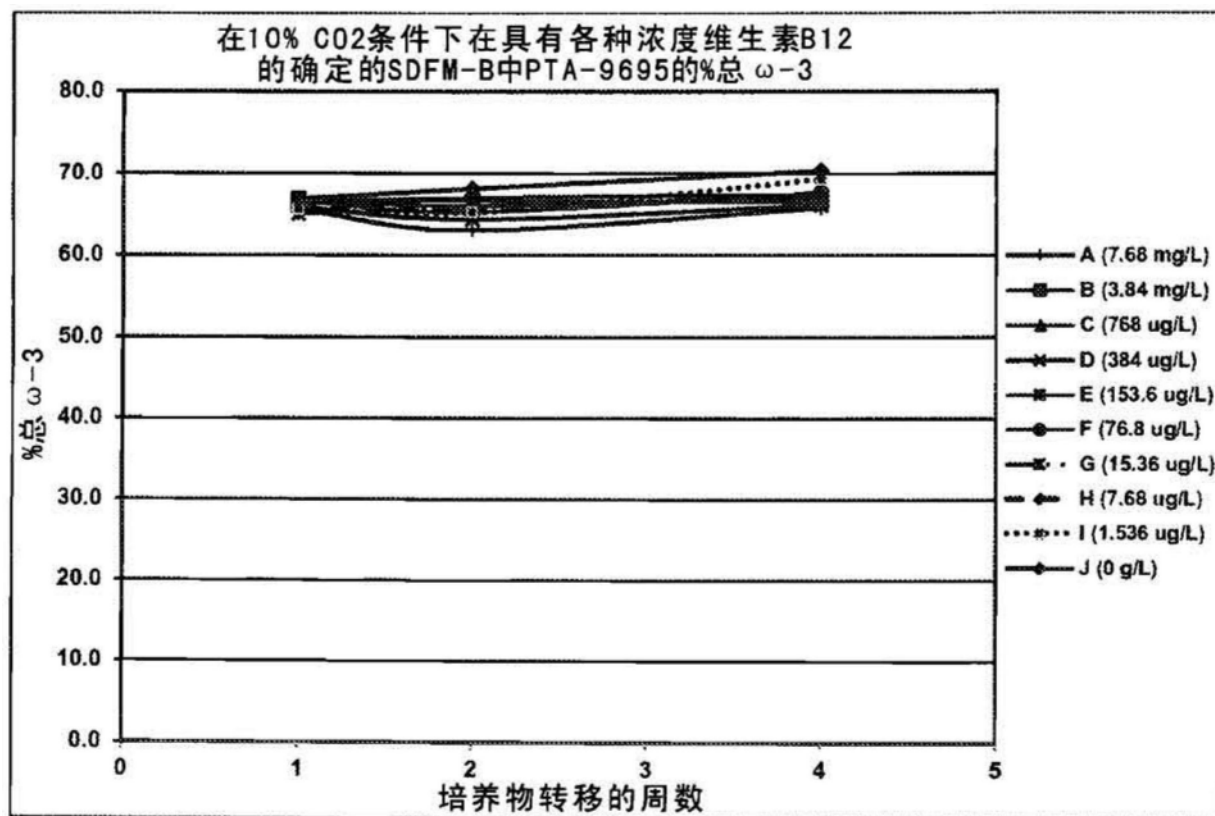


图14

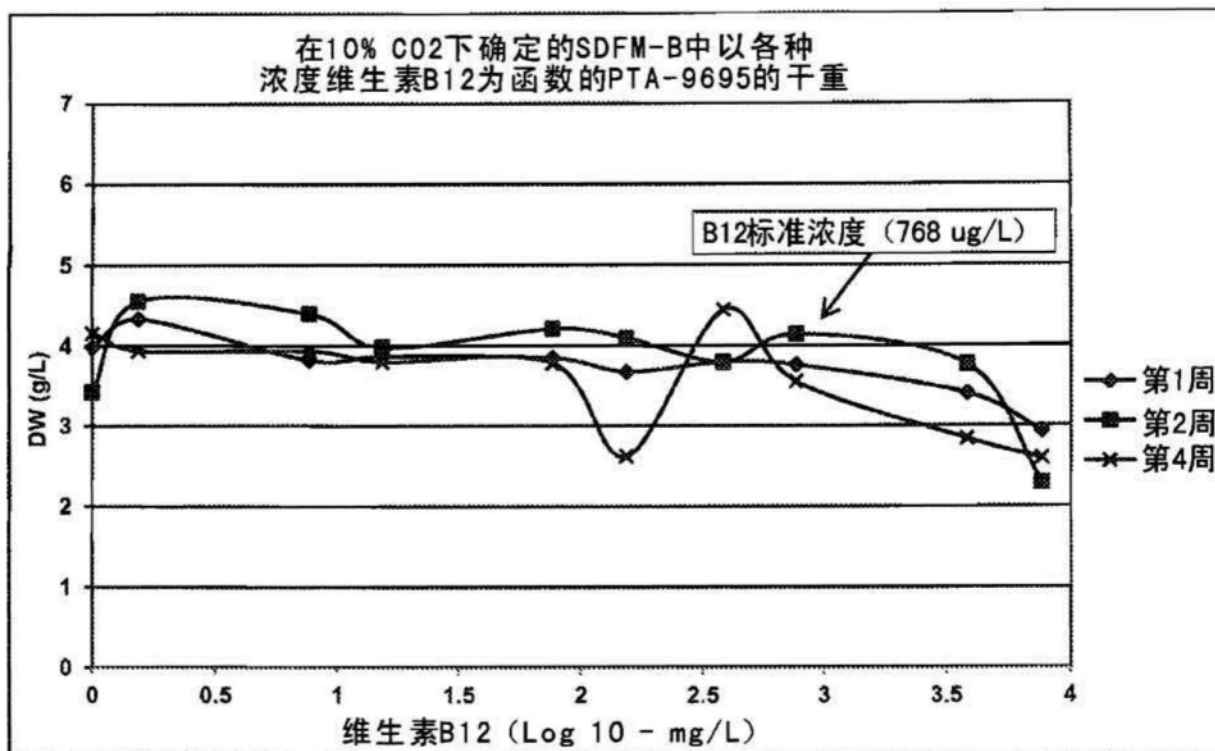


图15

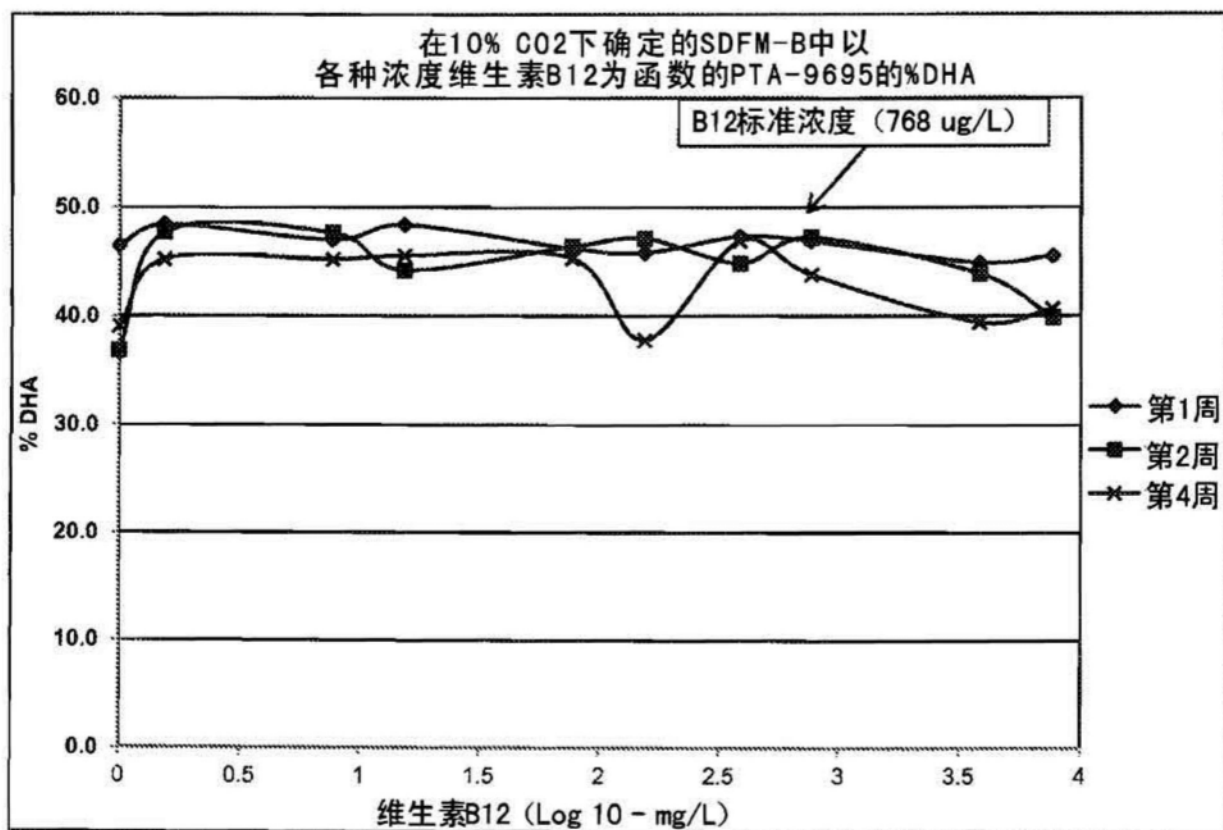


图16

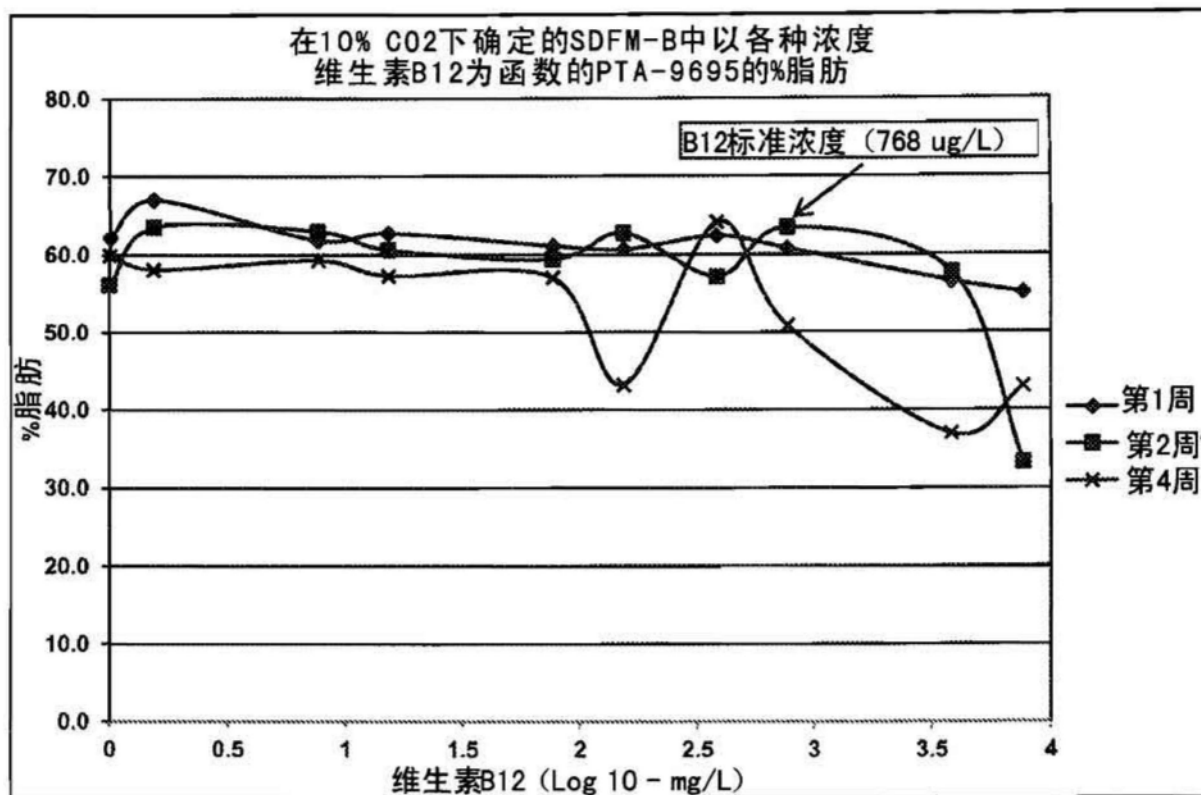


图17

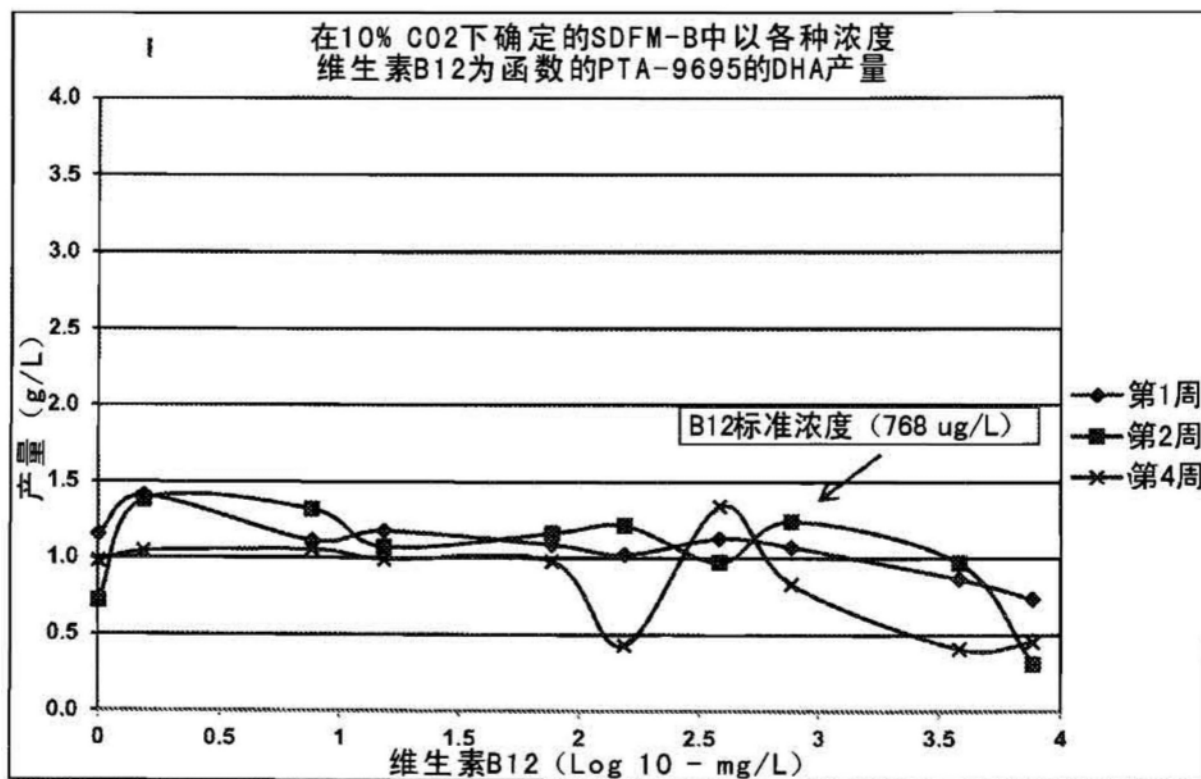


图18

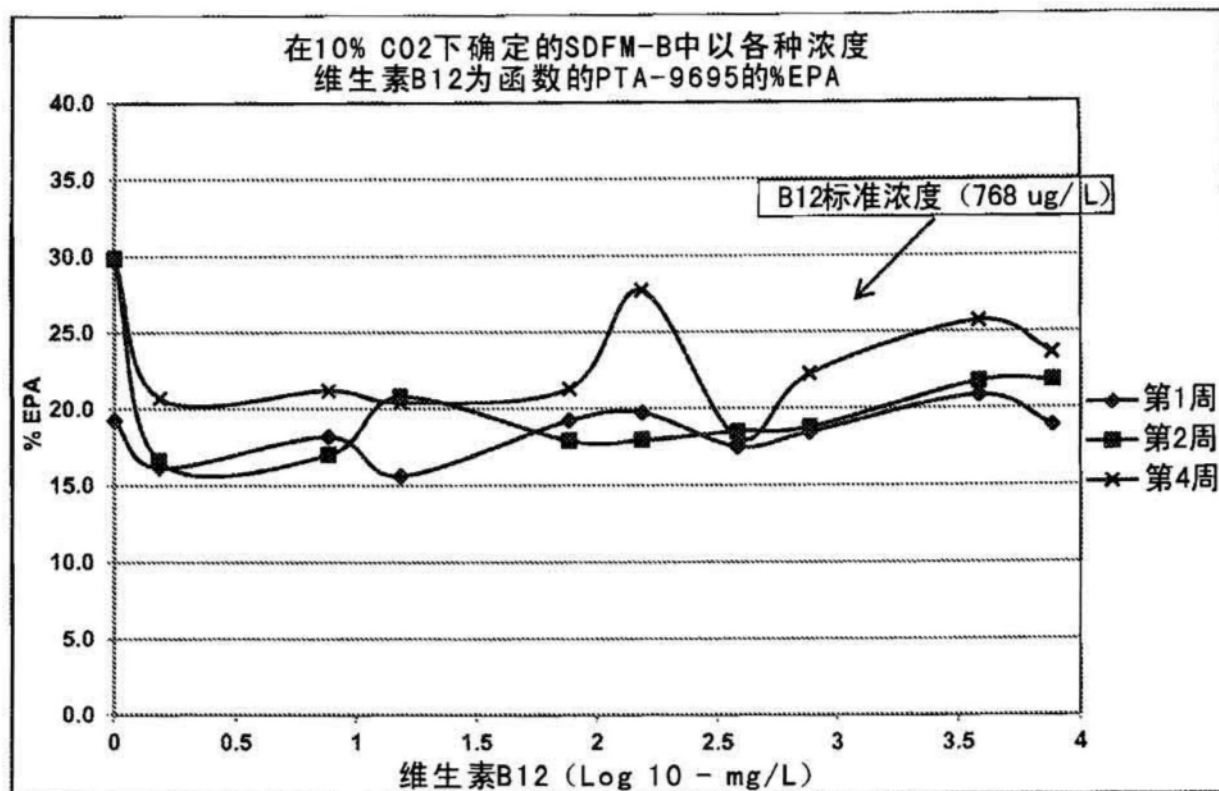


图19

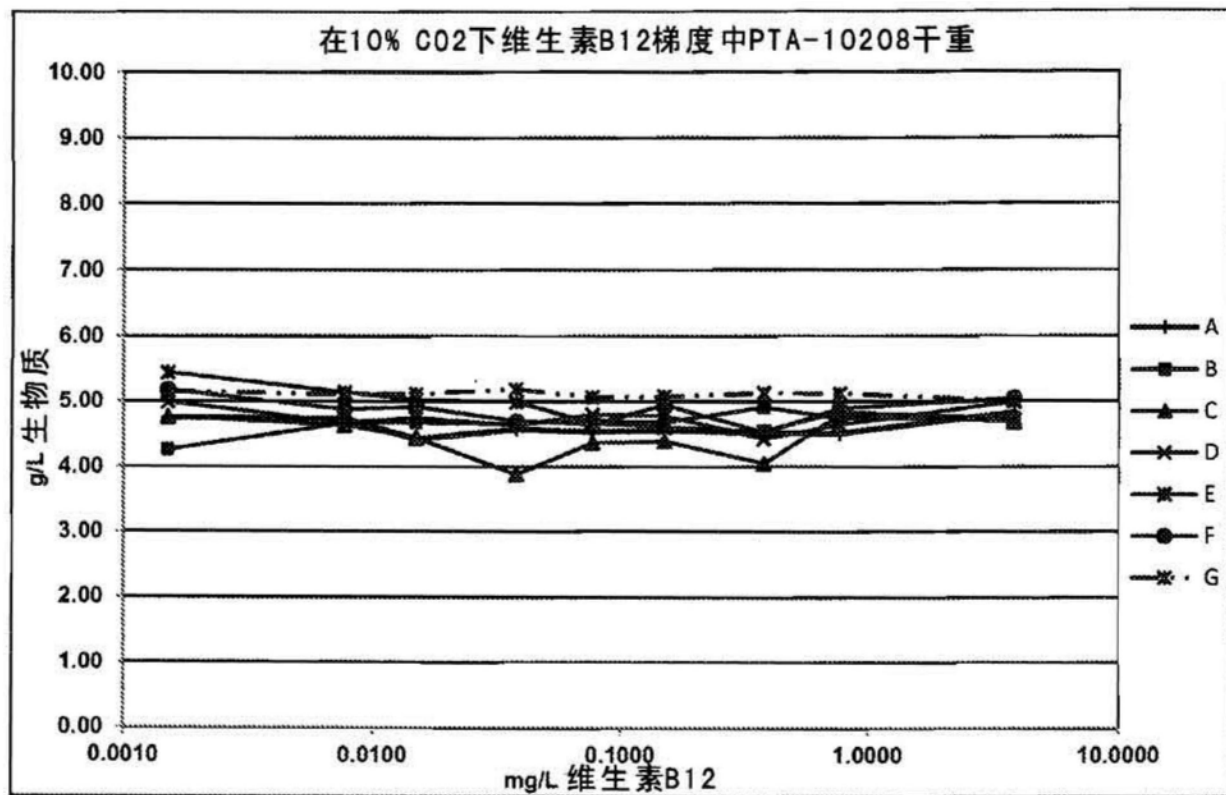


图20

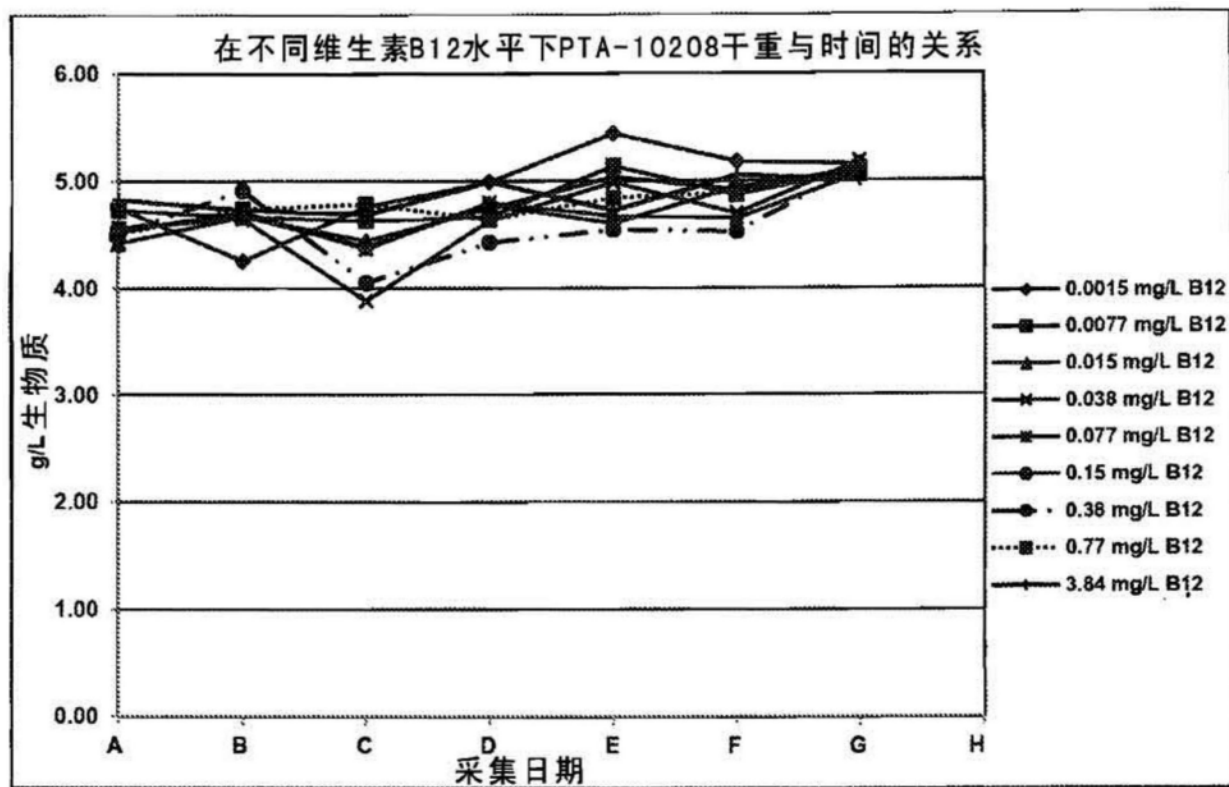


图21

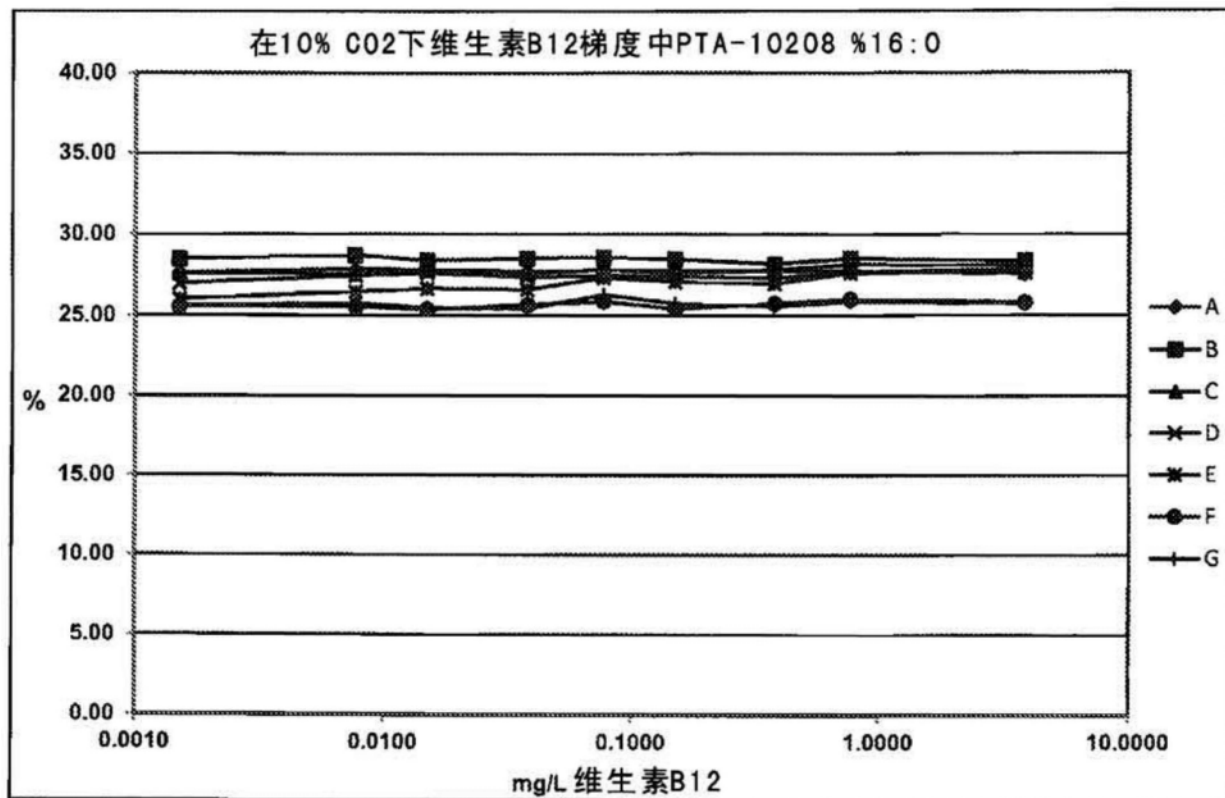


图22

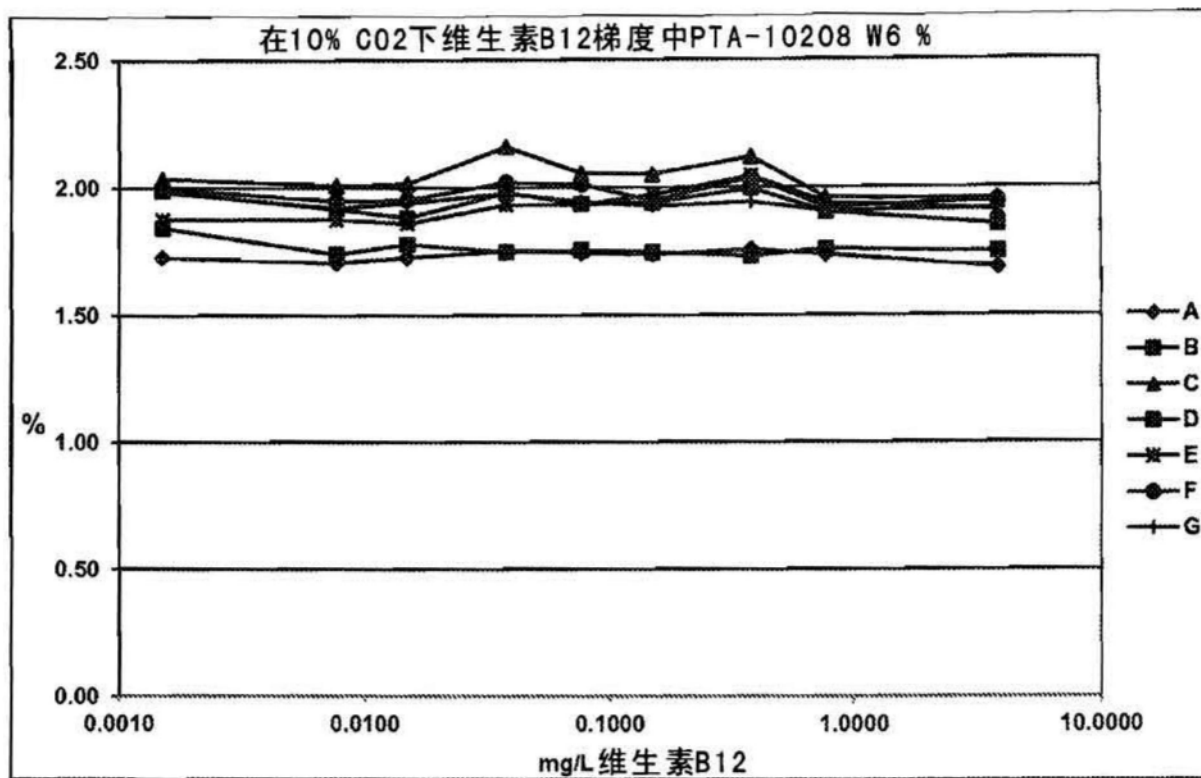


图23

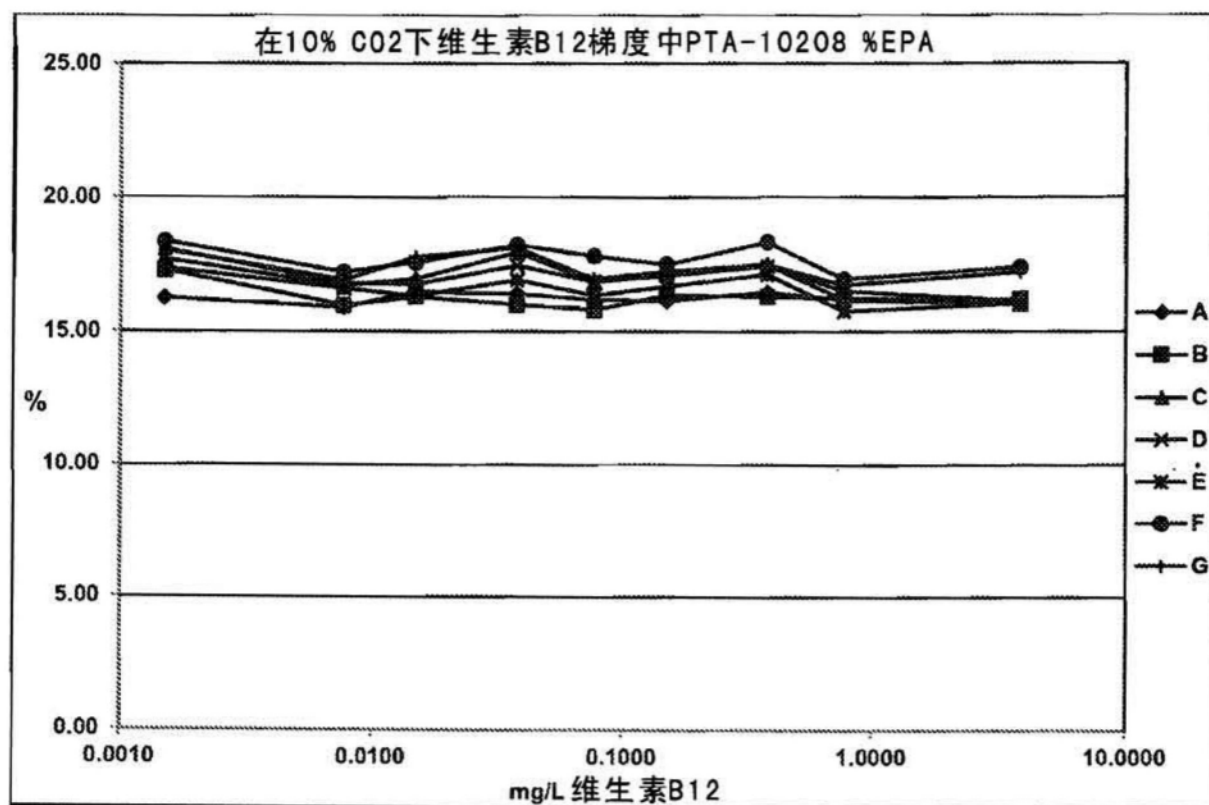


图24

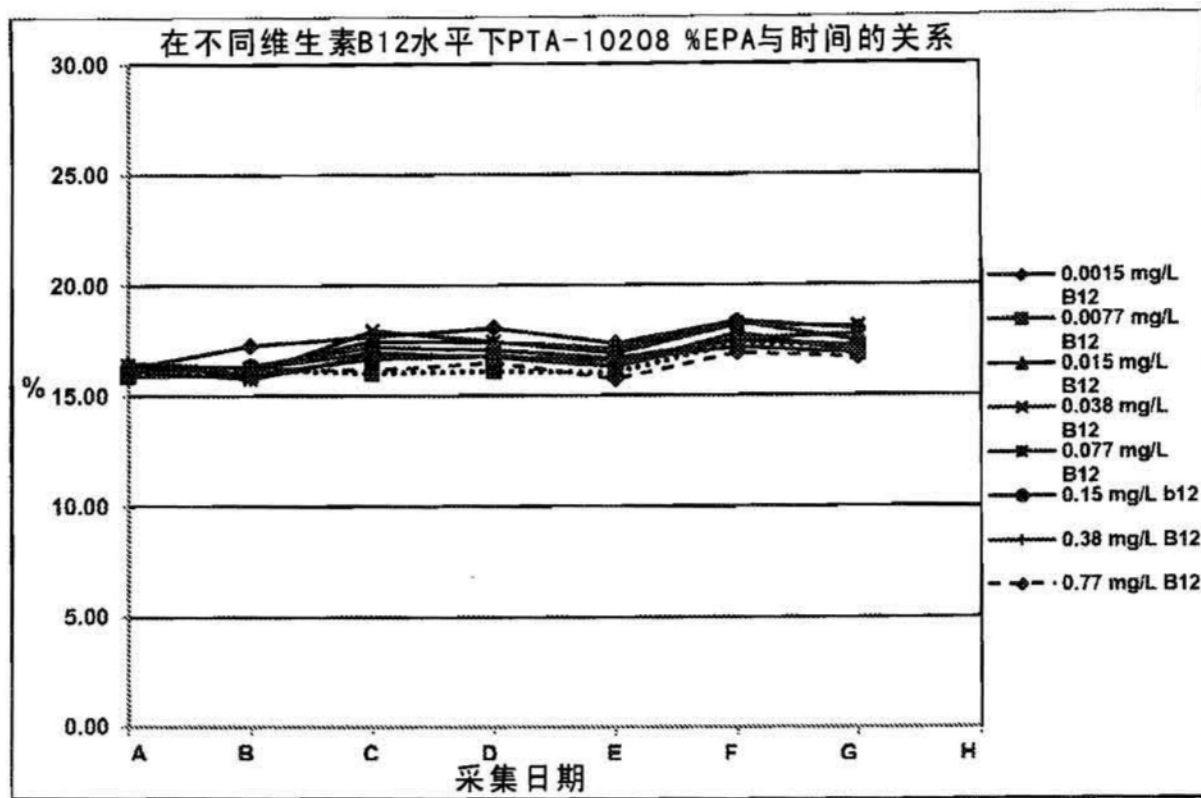


图25

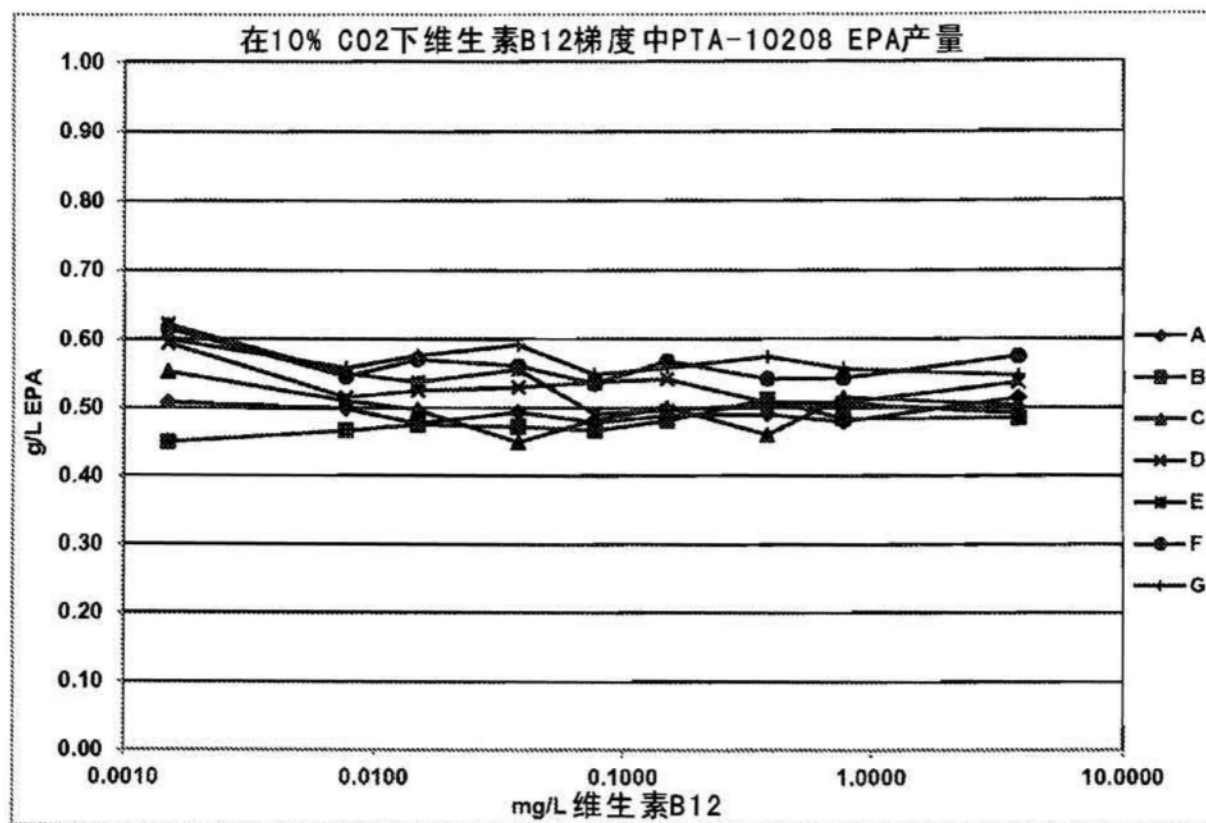


图26

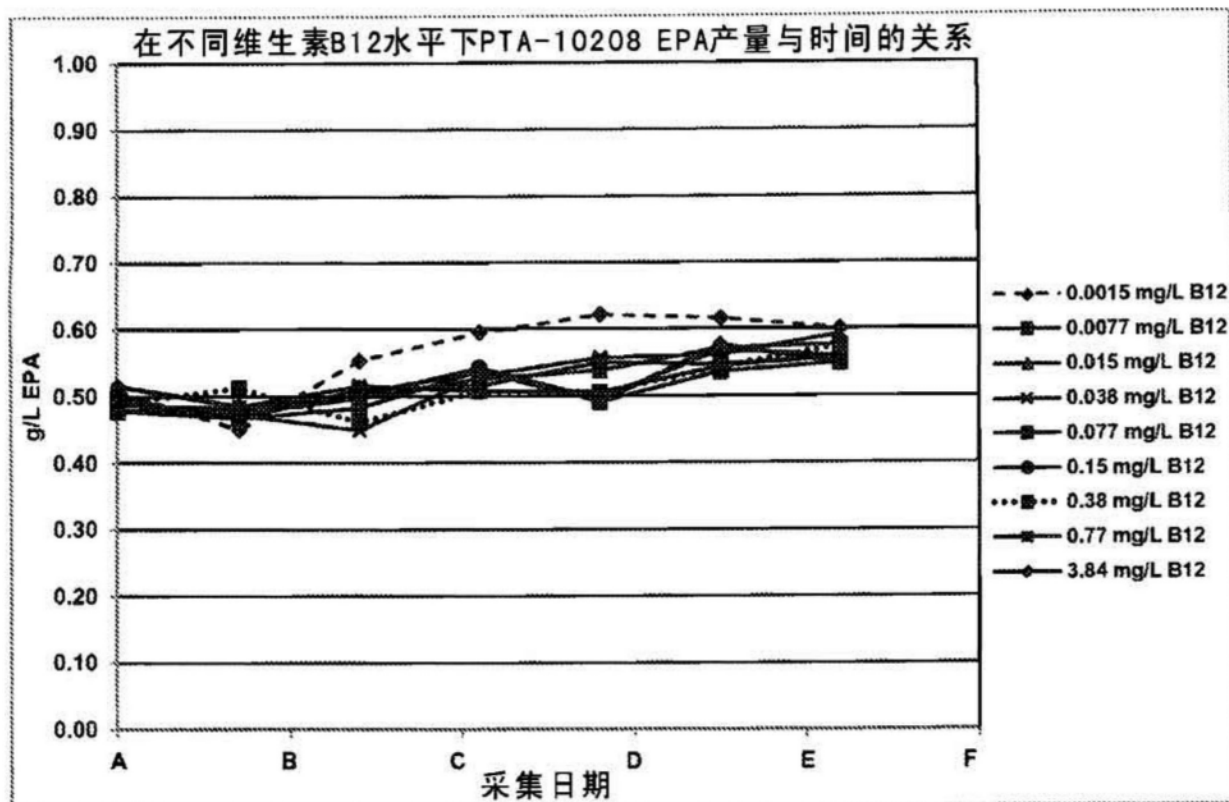


图27

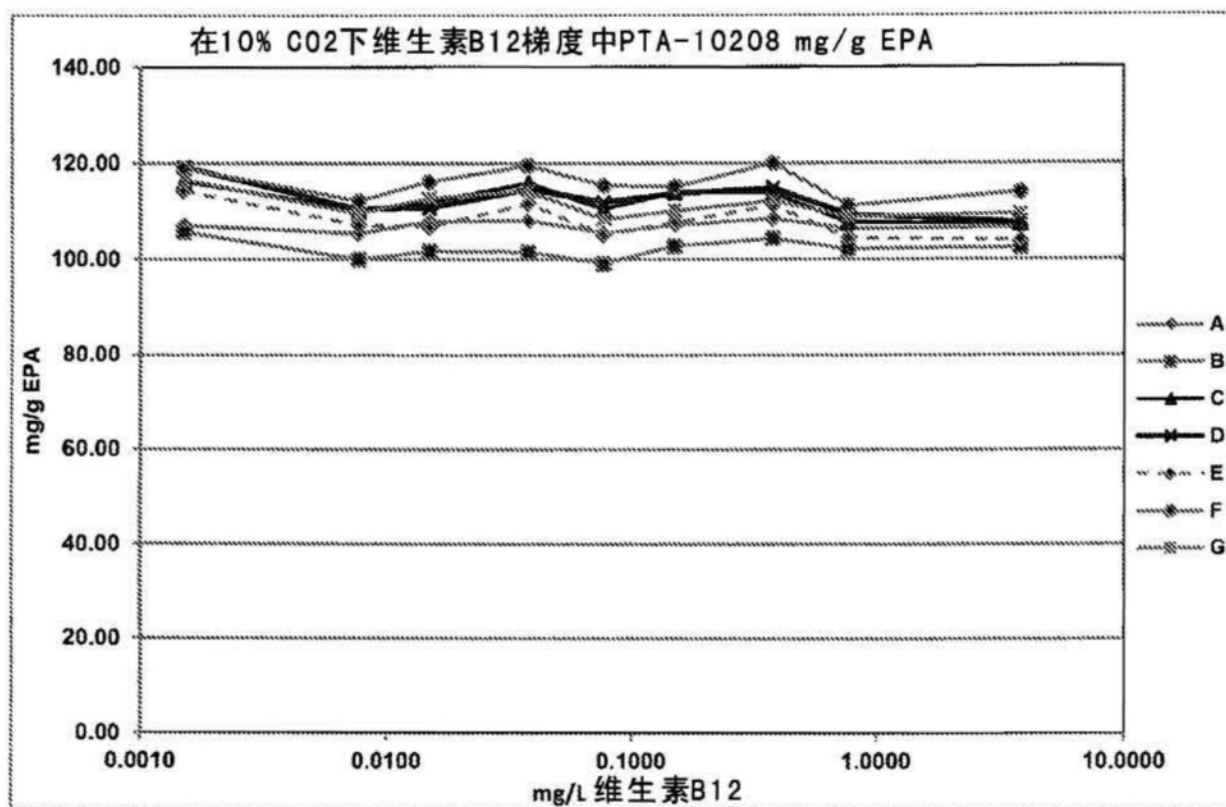


图28

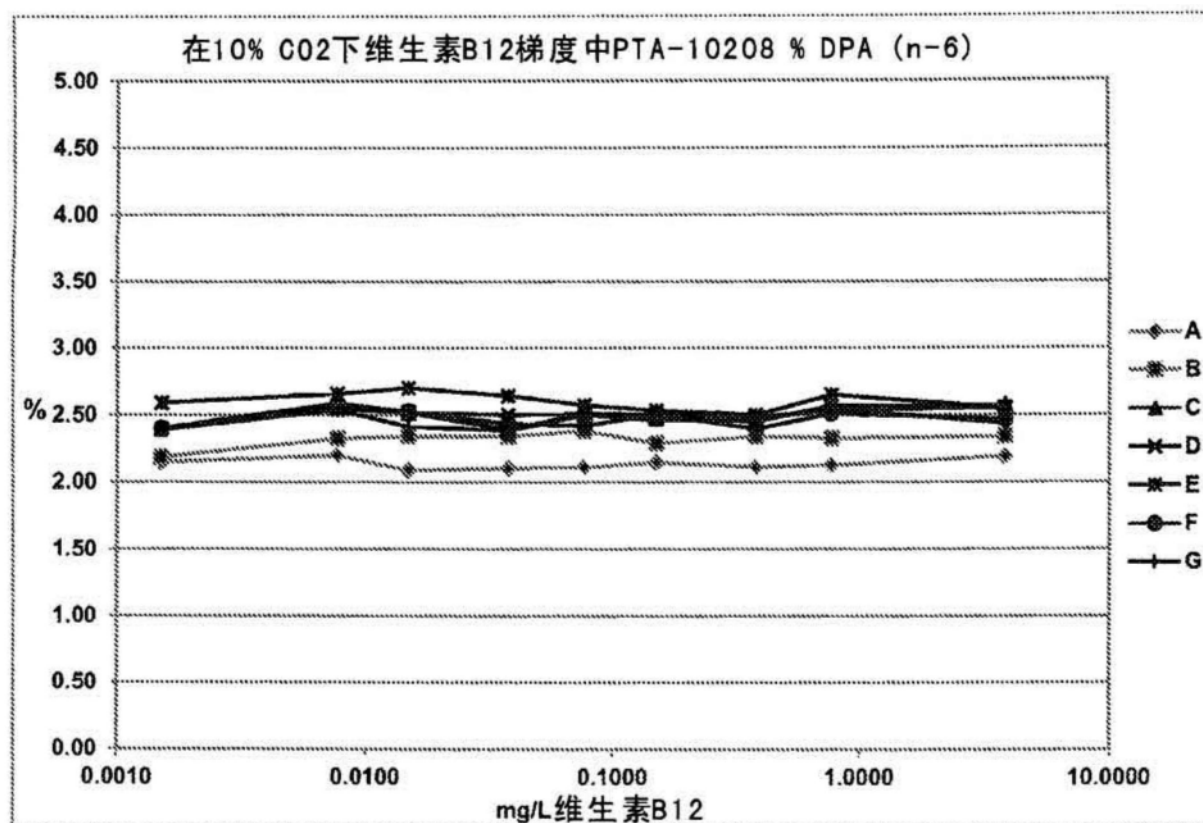


图29

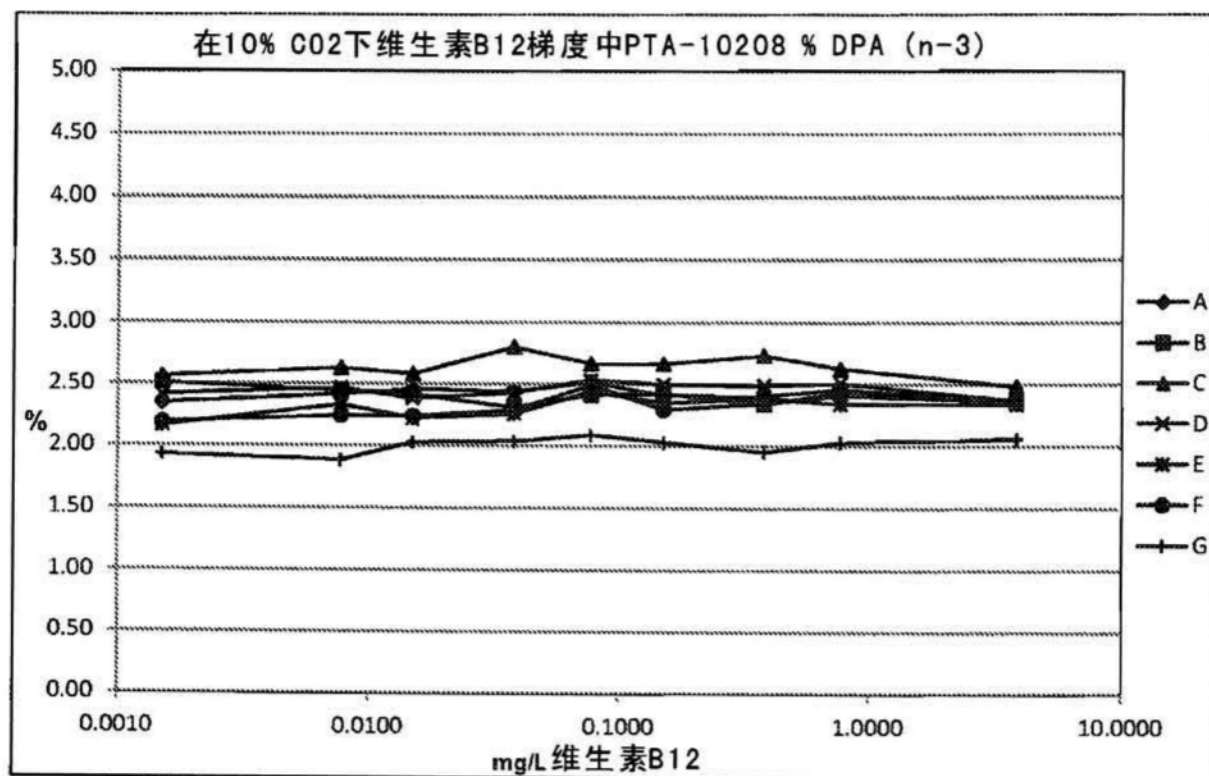


图30

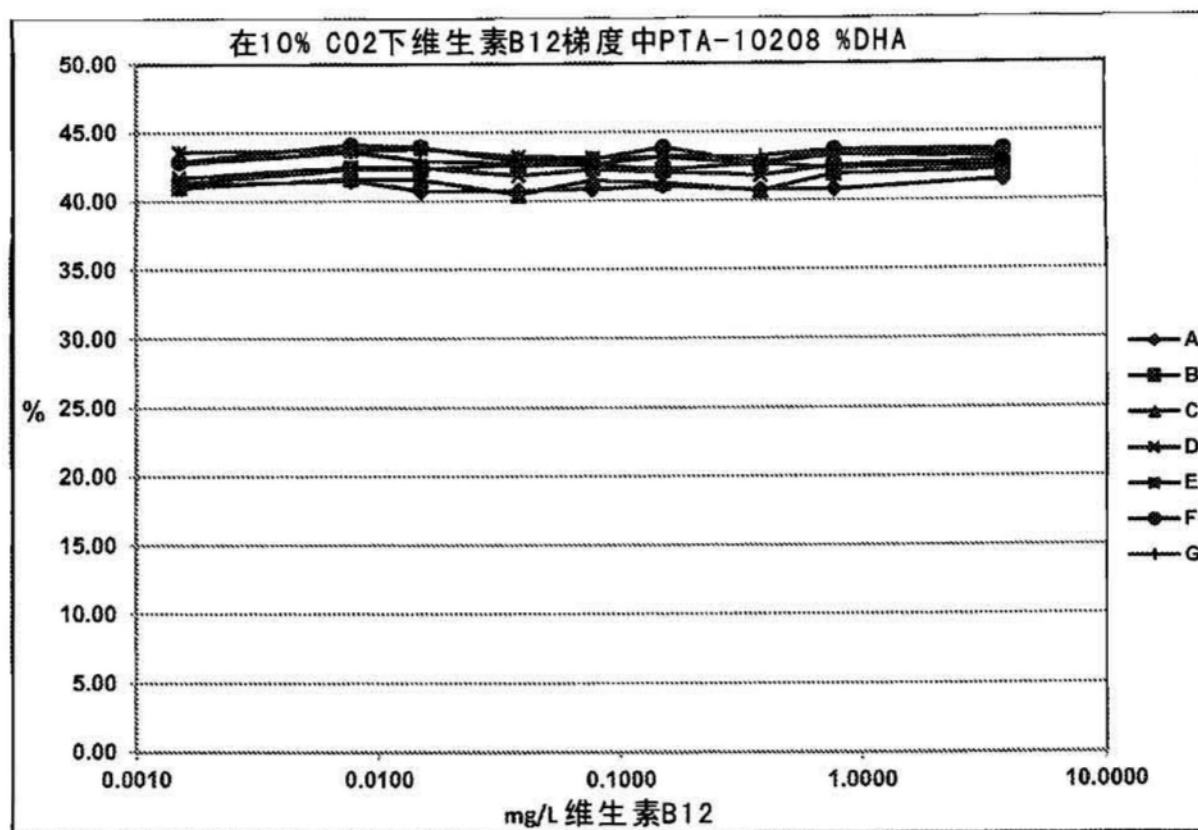


图31

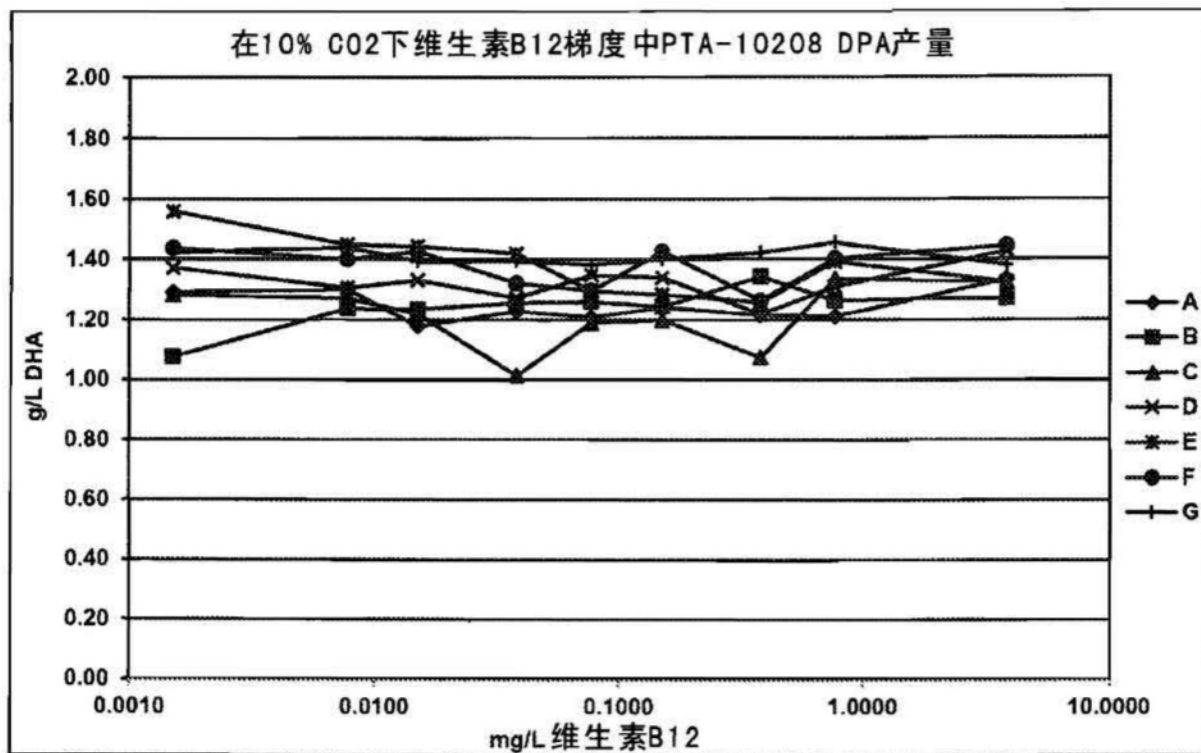


图32

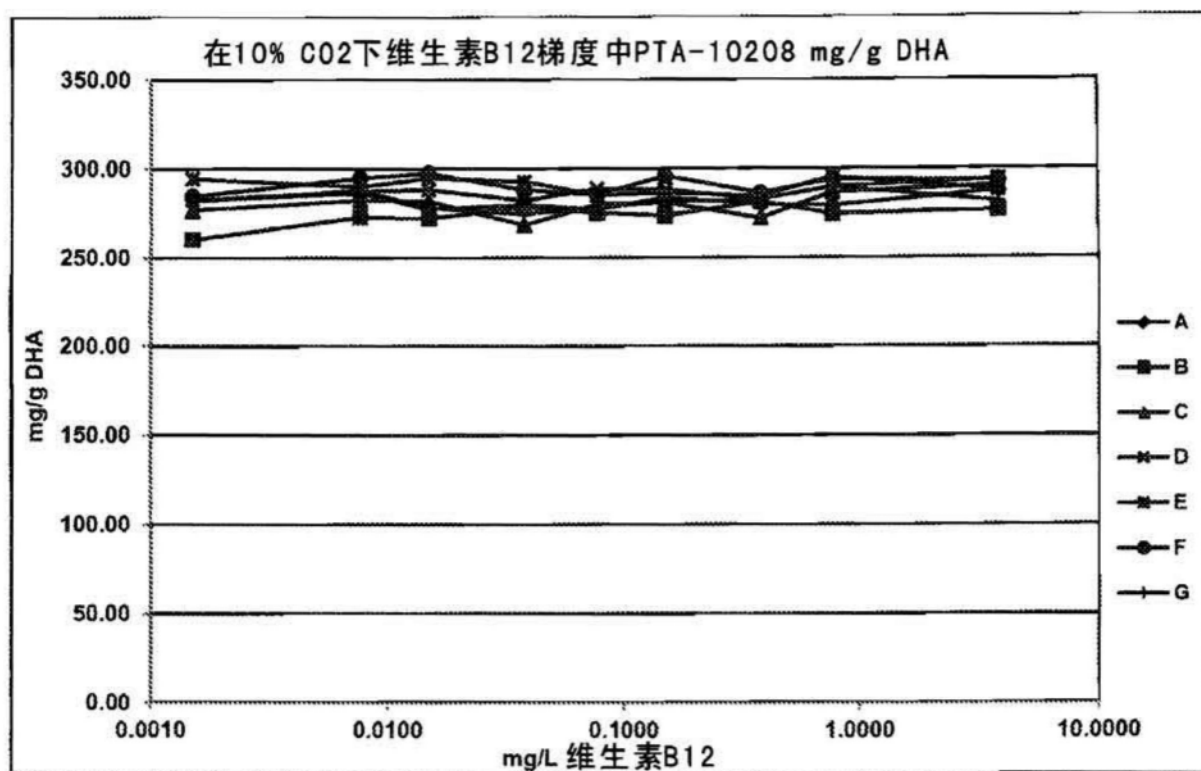


图33

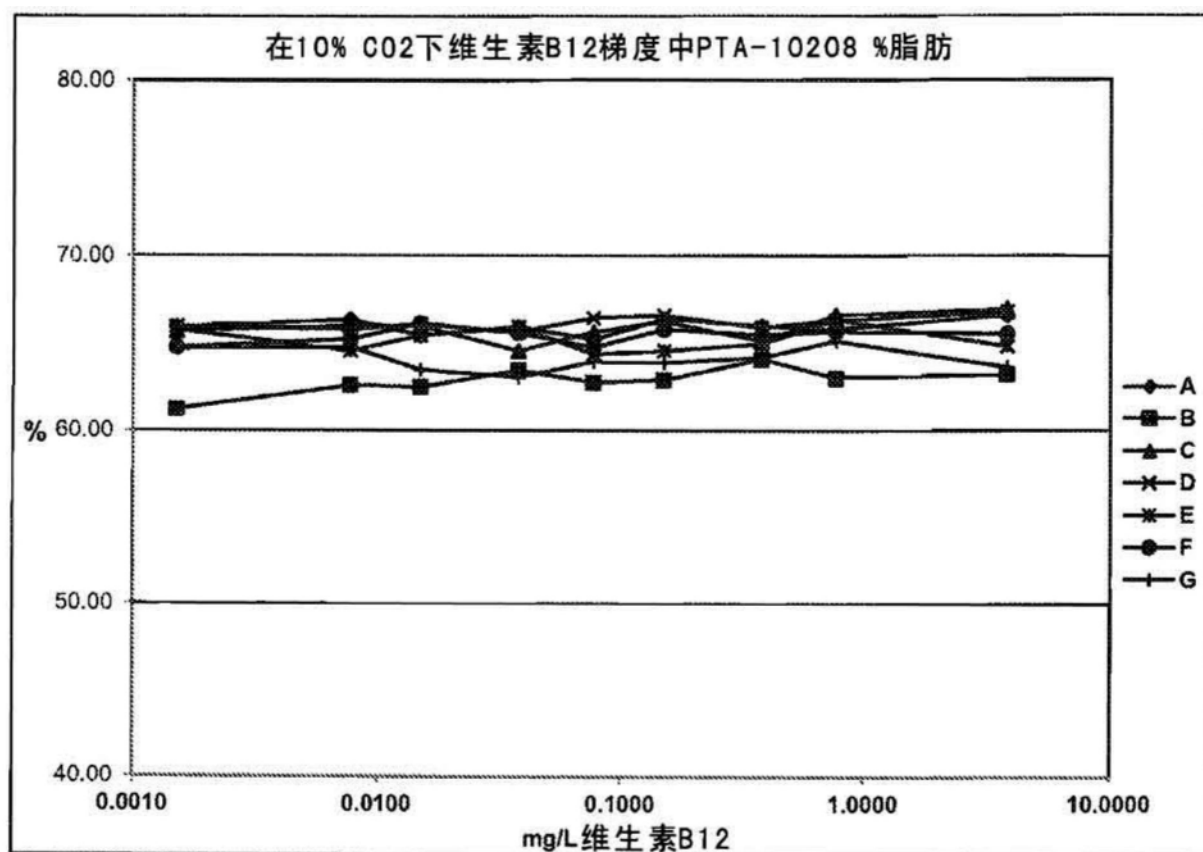


图34

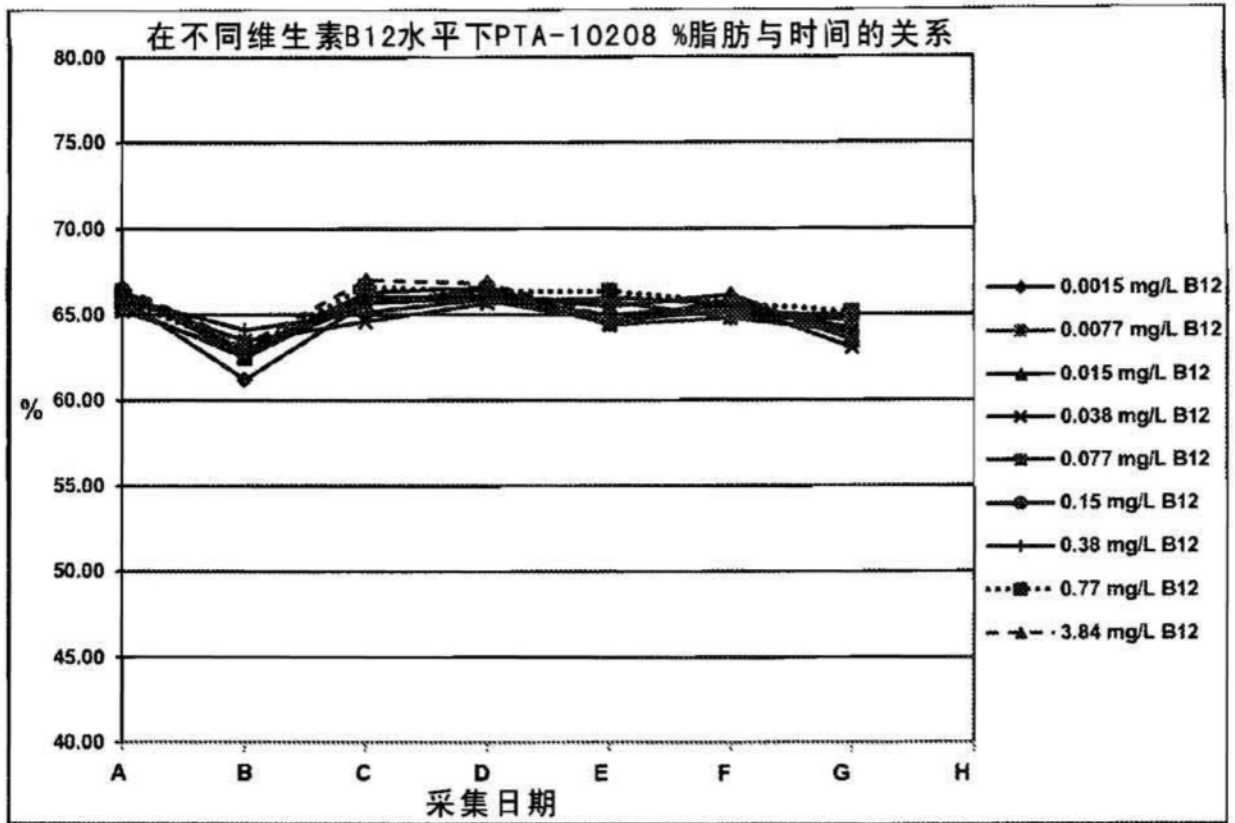


图35

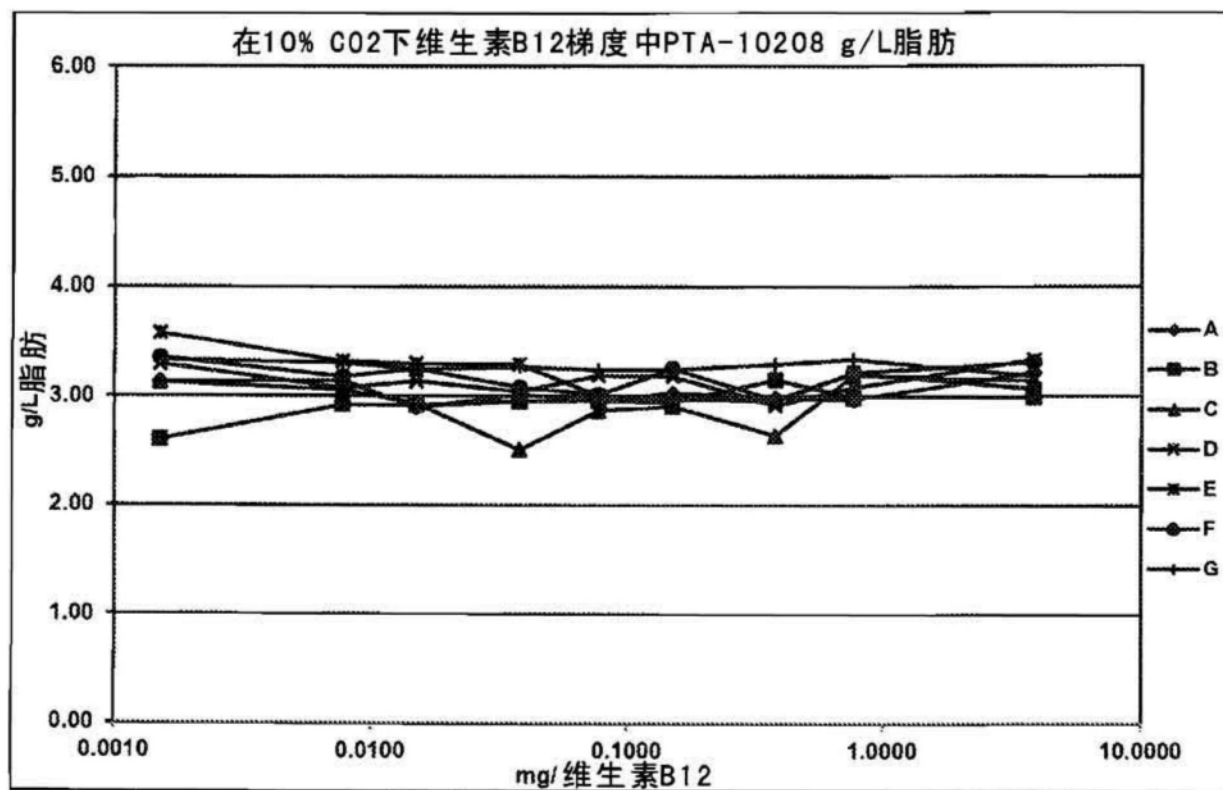


图36

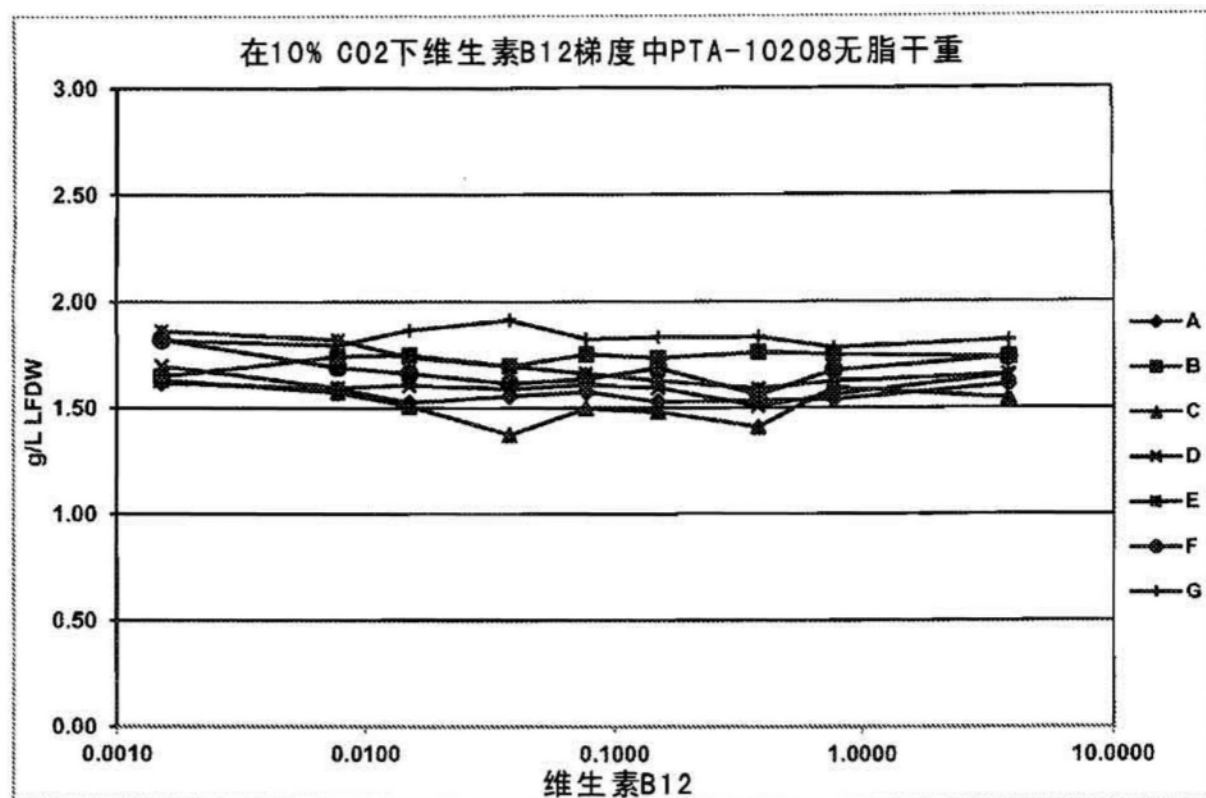


图37

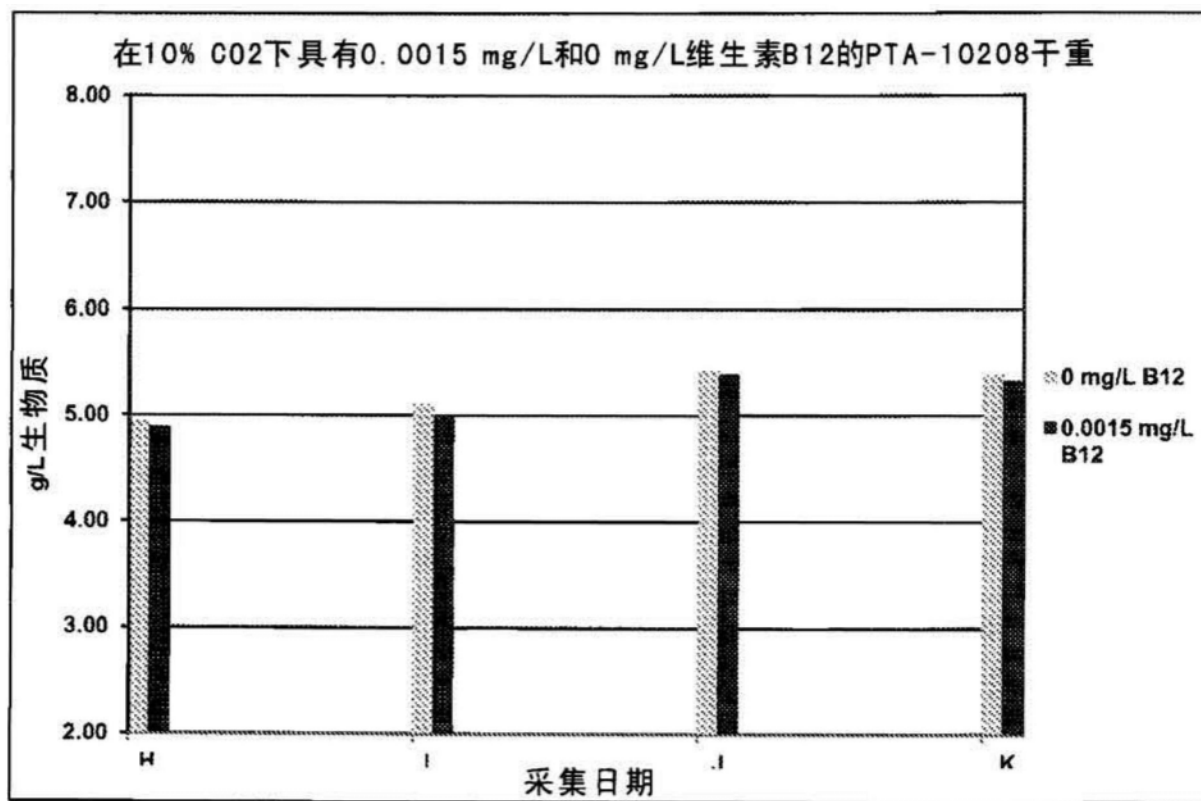


图38

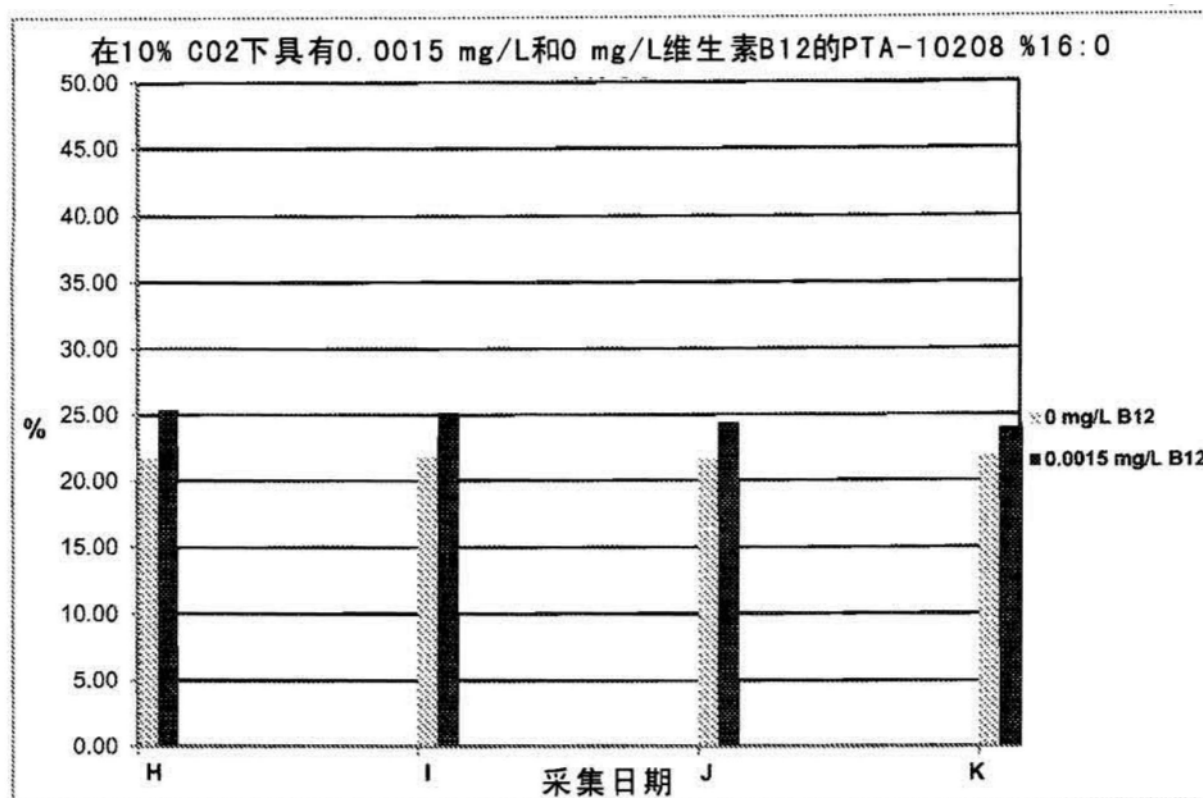


图39

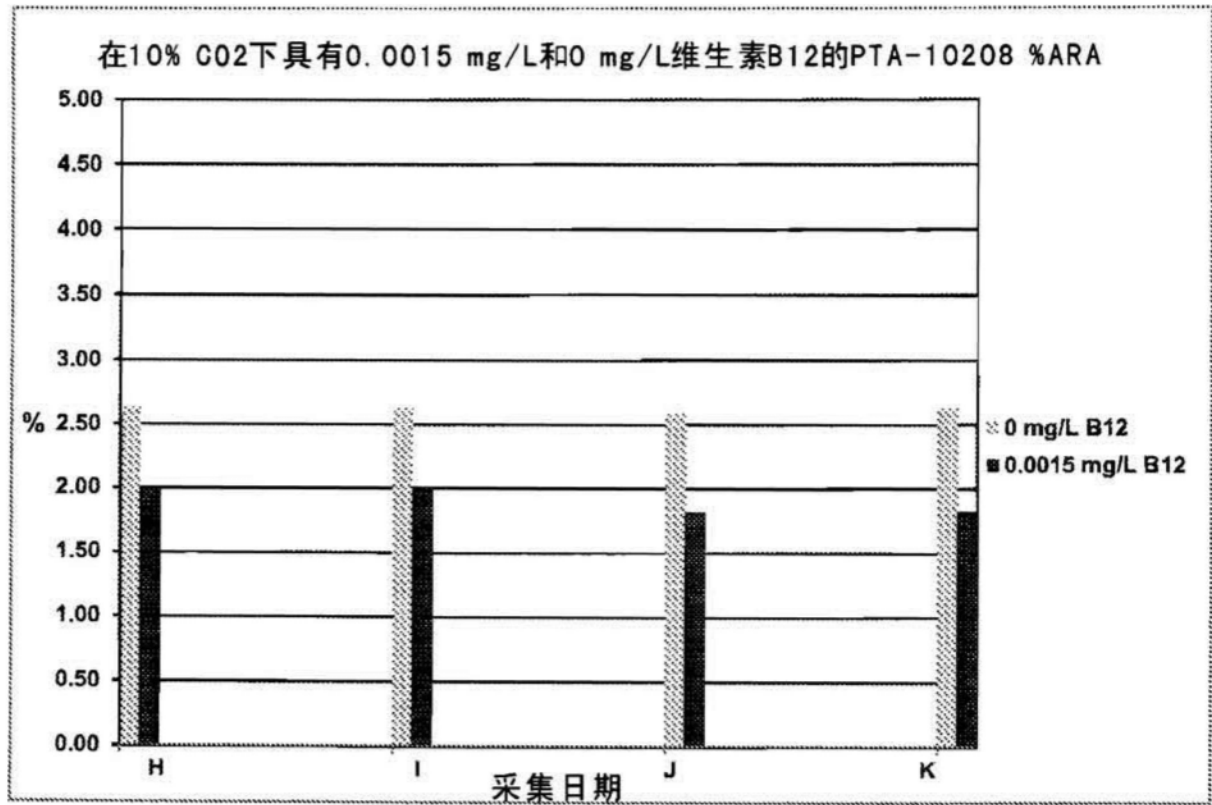


图40

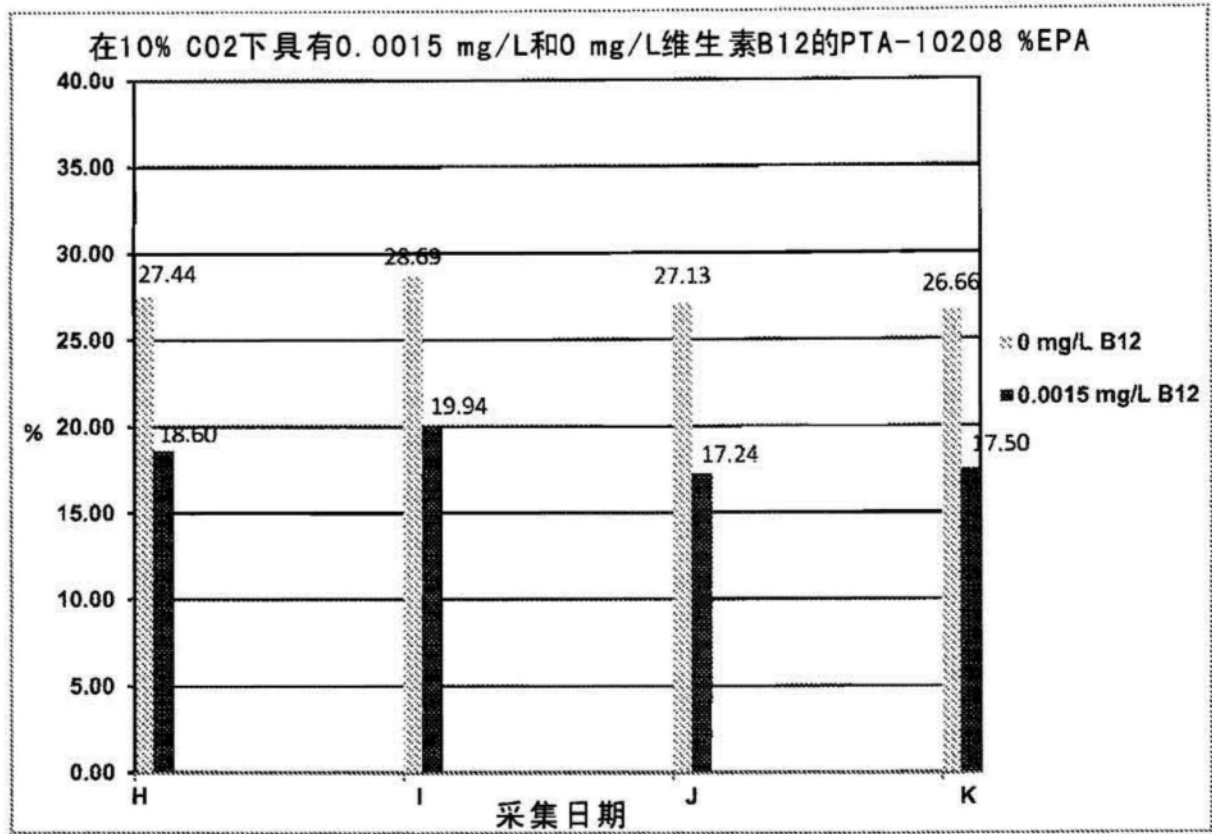


图41

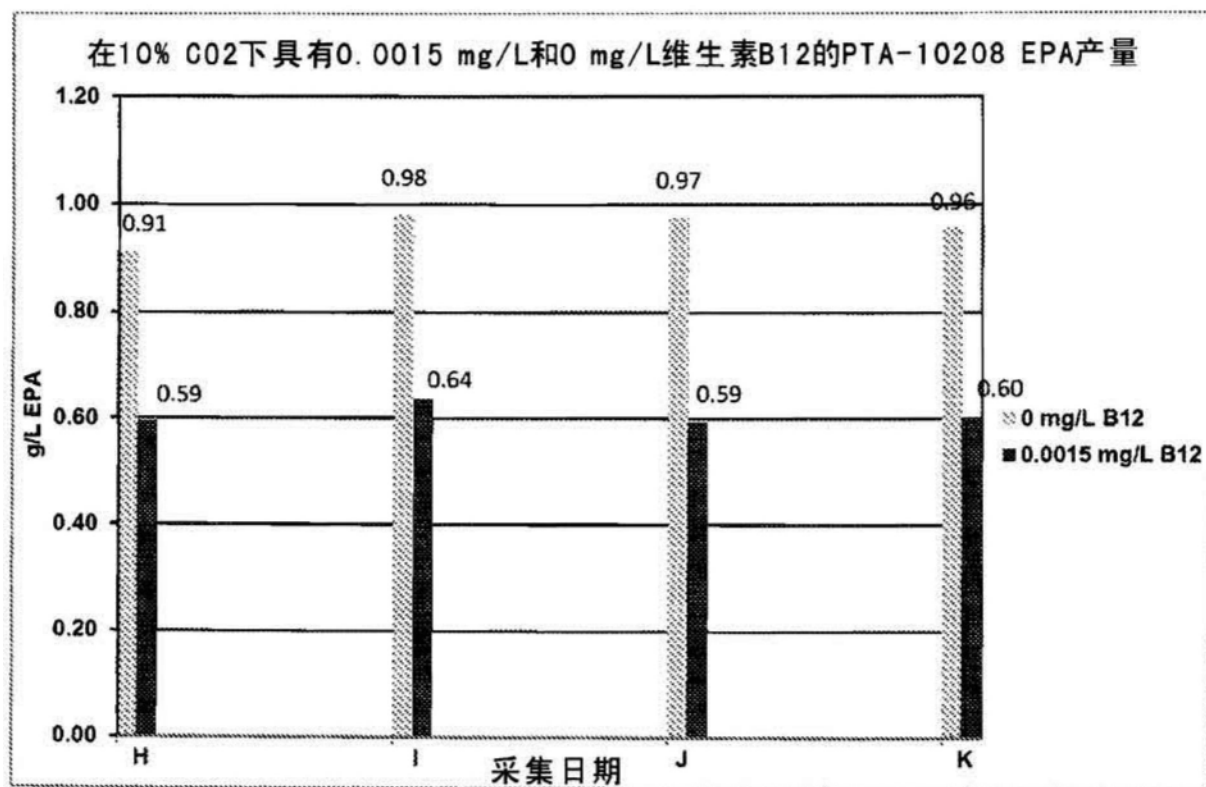


图42

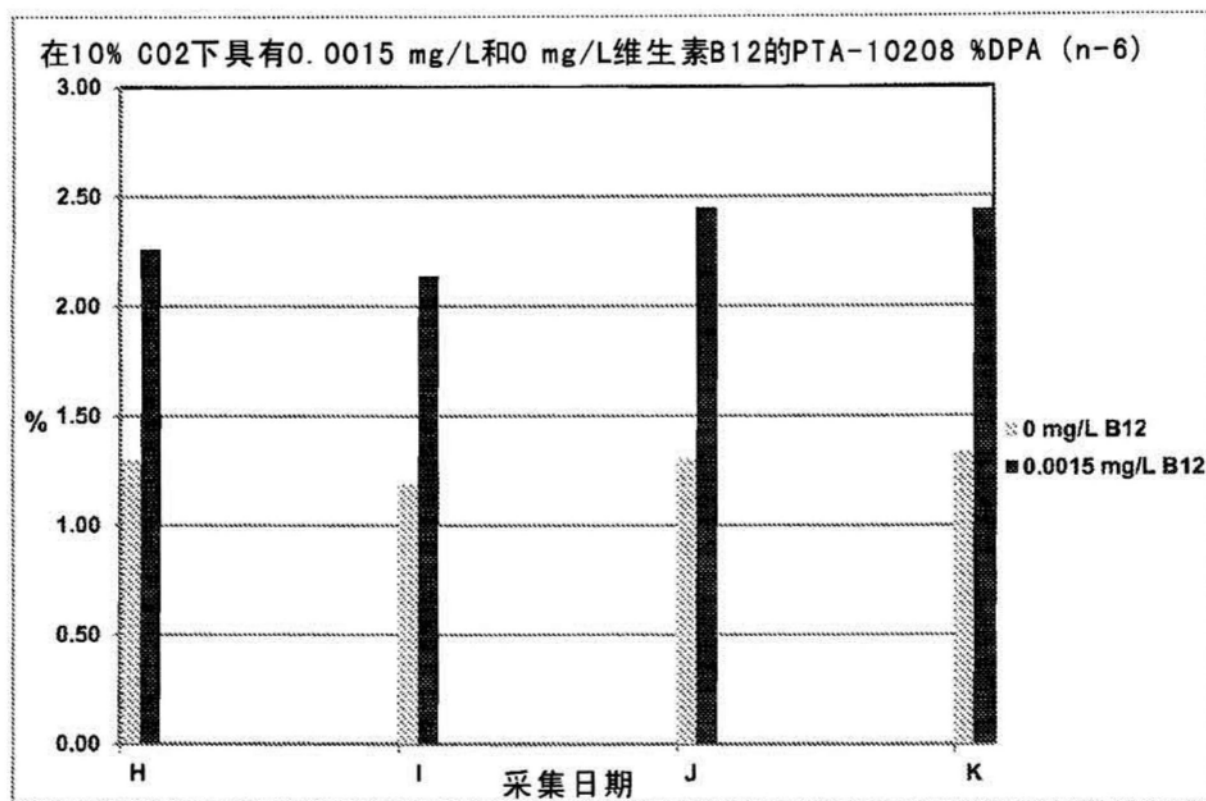


图43

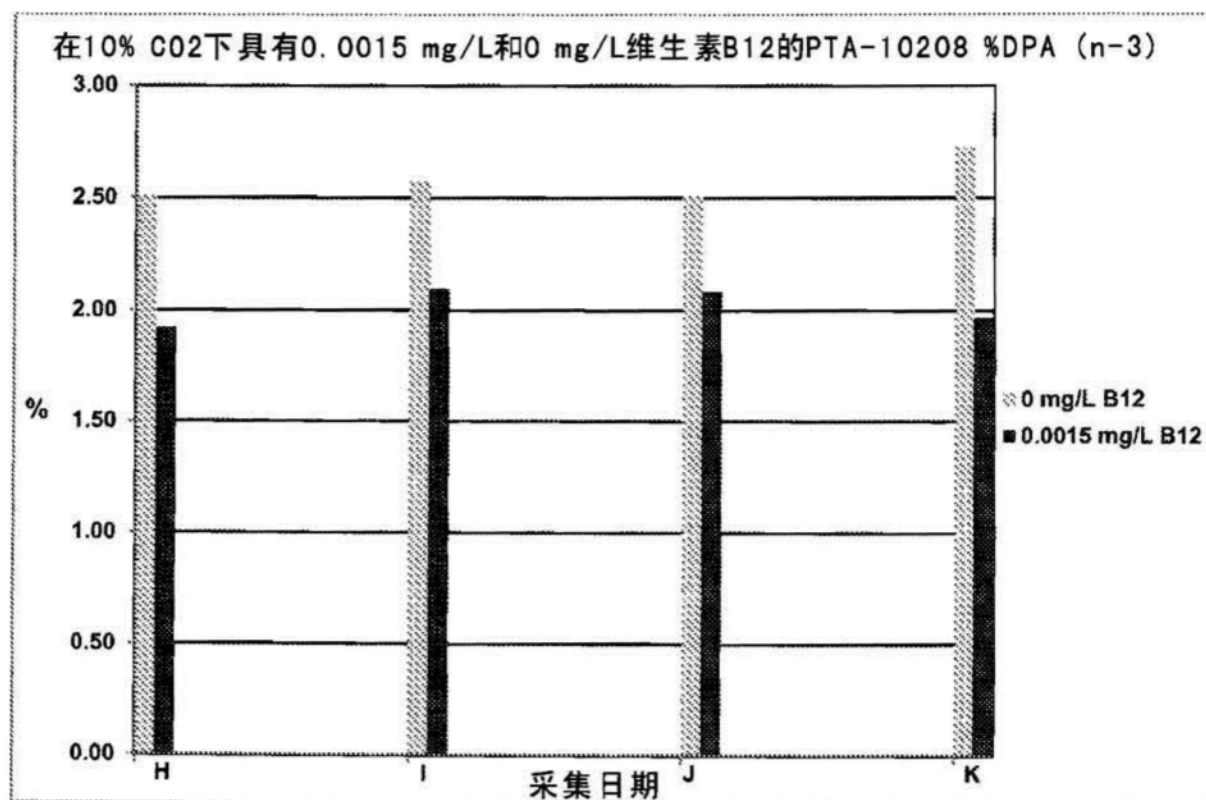


图44

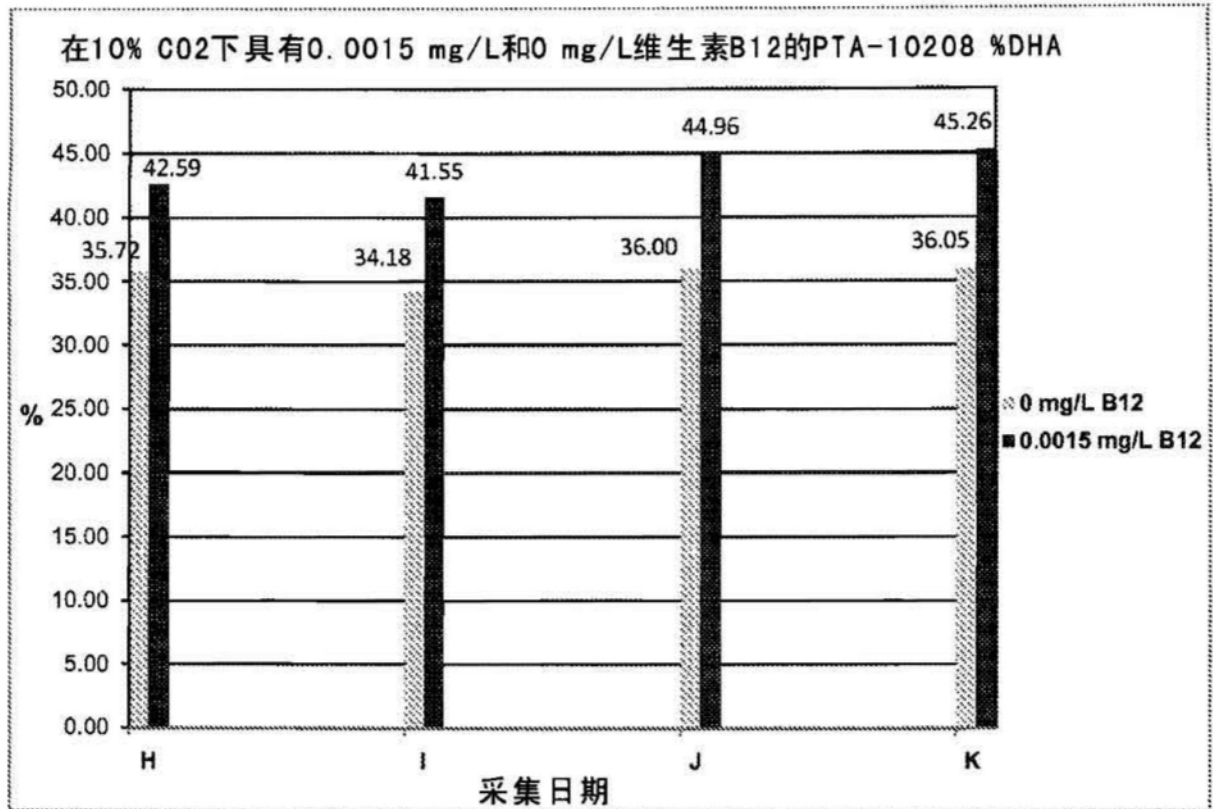


图45

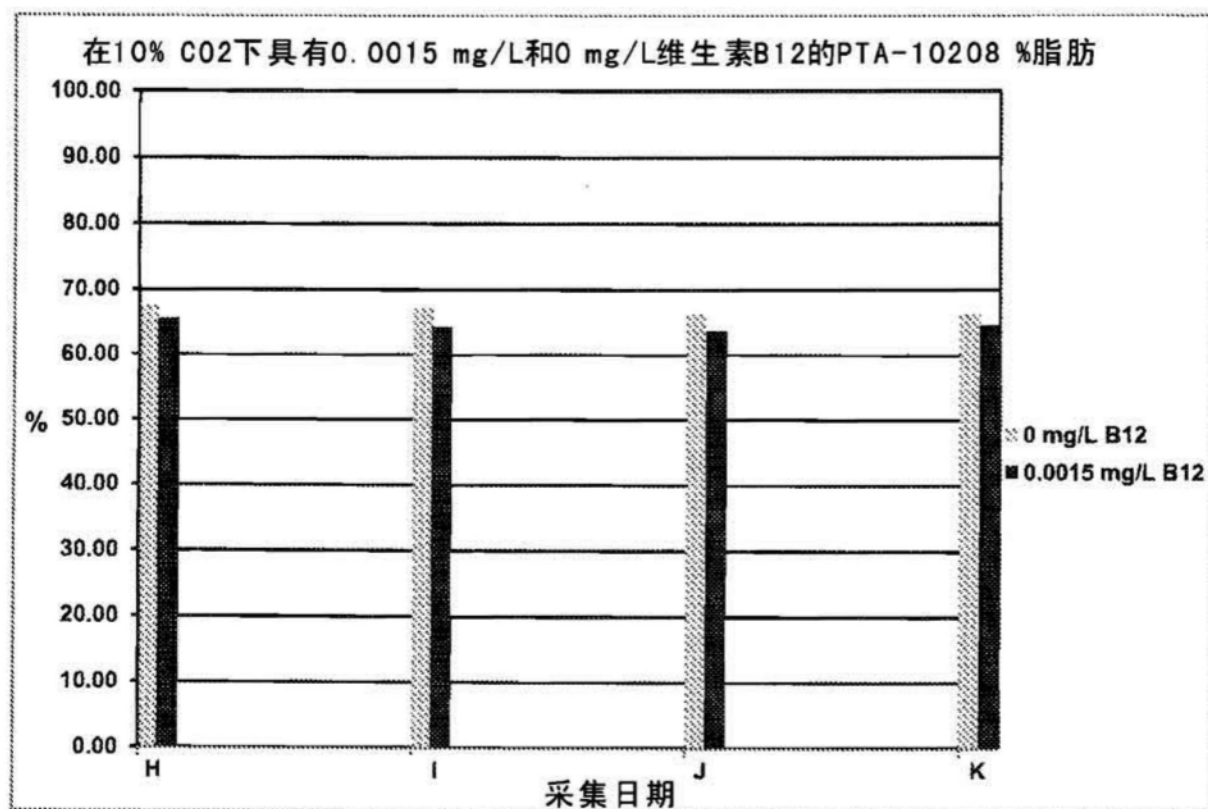


图46

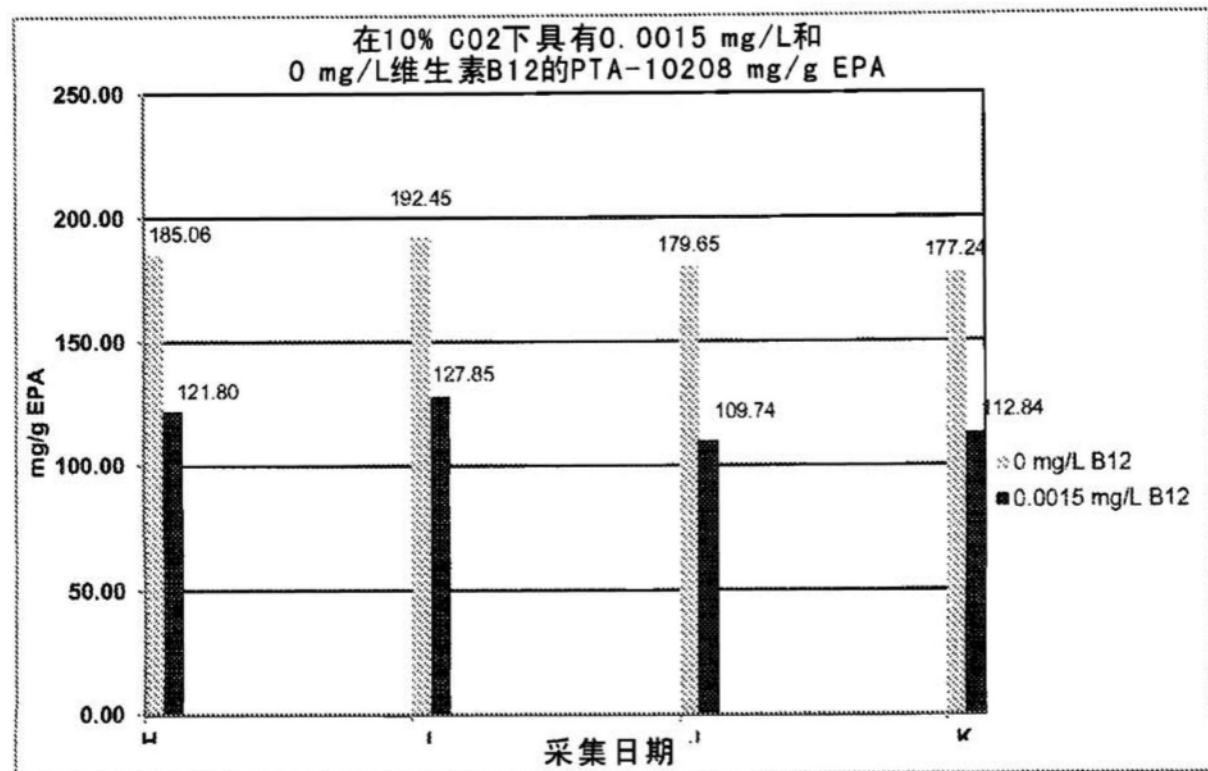


图47

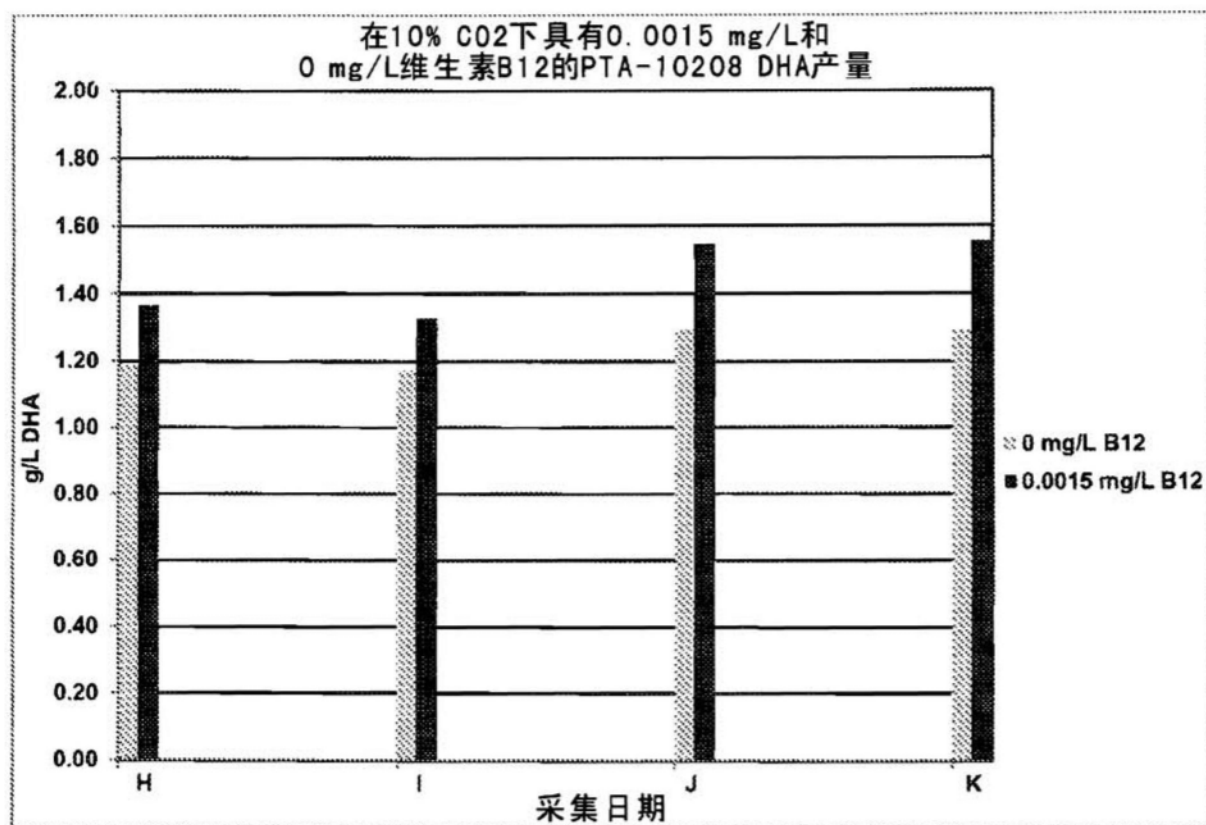


图48

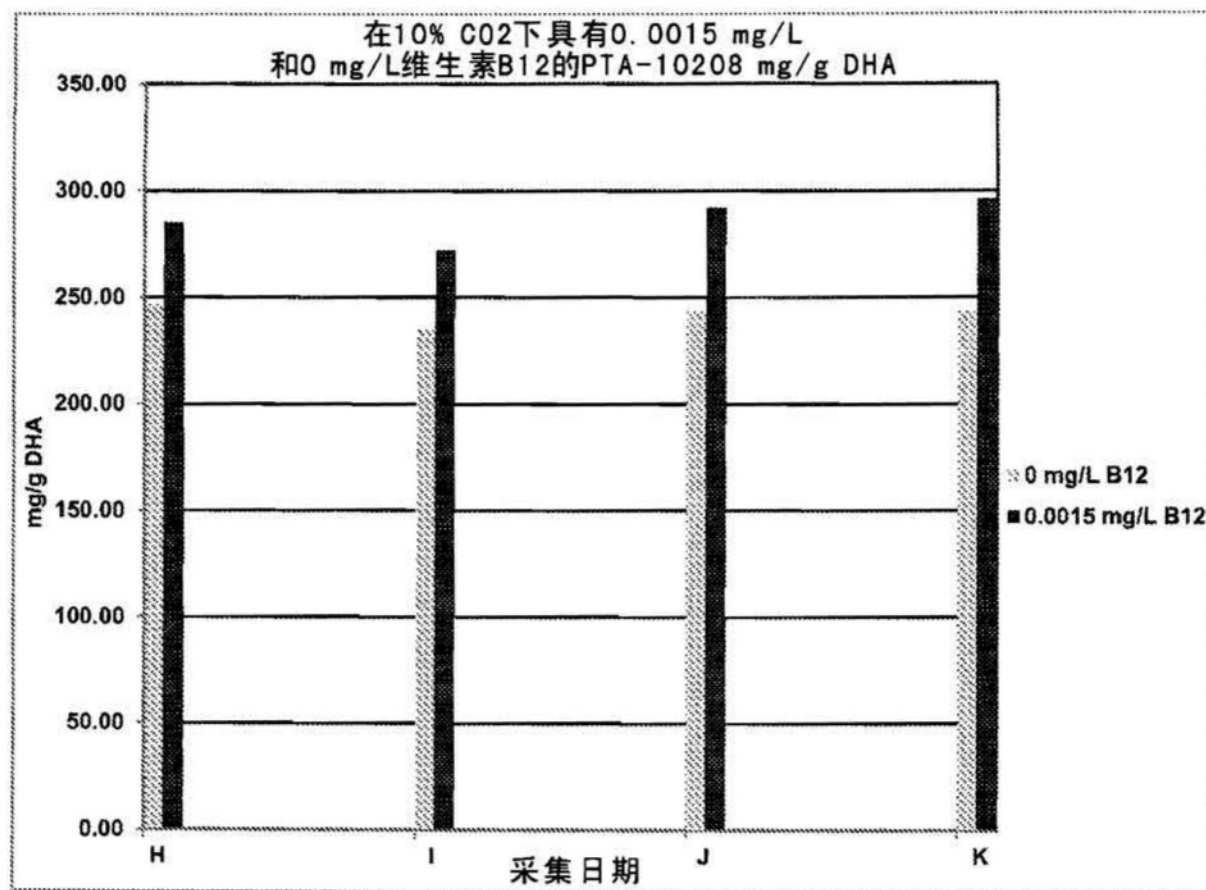


图49