



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103124791 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201180038452.3

(22)申请日 2011.06.01

(30)优先权数据

61/350,363 2010.06.01 US

61/378,923 2010.08.31 US

61/452,721 2011.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.02.01

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2011/038768 2011.06.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02011/153246 EN 2011.12.08

(73)专利权人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司
地址 荷兰海尔伦

(72)发明人 斯蒂芬·罗伯特·切林科
罗伯特·科迪·克提斯
柯克·E·阿普特
保罗·沃伦·伯赫恩斯
乔恩·米尔顿·汉森
约瑟夫·W·普法伊菲三世
特蕾西·林恩·斯特尔

罗丝·齐克尔

纳斯林·塔巴耶·贝克

克里希纳·拉曼

尼尔·弗朗西斯·莱宁格

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

C12P 7/64(2006.01)

C11B 1/00(2006.01)

(56)对比文件

CN 101224022 A,2008.07.23,权利要求1.

CN 101224022 A,2008.07.23,权利要求1.

CN 101455240 A,2009.06.17,说明书第1页

最后一段至第2页第7段,第5页实施方式3.。

US 2005115897 A1,2005.06.02,说明书第

[0067]段,表5,第[0009]-[0011]段.。

CN 101531690 A,2009.09.16,说明书第4页

第1-0行.

EP 1178103 A1,2002.02.06,全文.

W0 2008088489 A2,2008.07.24,全文.

CN 1374383 A,2002.10.16,全文. (续)

审查员 王涛

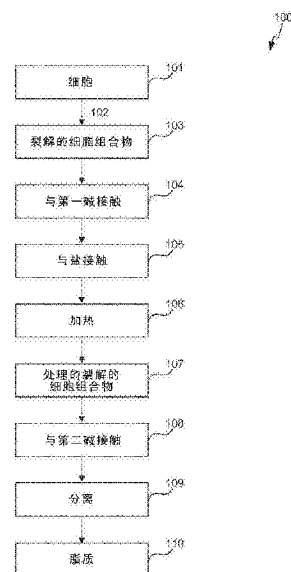
权利要求书1页 说明书109页 附图5页

(54)发明名称

从细胞中提取脂质以及由此获得的产品

(57)摘要

本发明公开了通过裂解细胞从细胞中获得脂质的工艺,使细胞与碱和/或盐接触,并分离脂质,以及通过所述工艺制备的脂质。本发明还公开了具有特定的茴香胺值、过氧化物值和/或磷含量的微生物脂质。



[接上页]

(56)对比文件

US 2006099693 A1, 2006.05.11, 全文.

李猷. 生物法耦合膜技术提取茶籽油的研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库工程科技I辑》.2009, (第7期), 第15-18页.

章绍兵等. 水酶法从菜籽中提取油及水解蛋白的研究.《农业工程学报》.2007, 第23卷(第9

期), 第213-219页.

Bei-Wei Zhu, et al..Extraction of lipid from sea urchin (*Strongylocentrotus nudus*) gonad by enzyme-assisted aqueous and supercritical carbon dioxide methods.《Eur Food Res Technol》.2010, 第230卷第737-743页.

1. 用于从细胞组合物获得脂质的工艺,其包括:
 - (a)裂解所述细胞组合物的细胞以形成裂解的细胞组合物;
 - (b)使所述裂解的细胞组合物破乳以形成破乳的细胞组合物;
 - (c)从所述破乳的细胞组合物分离所述脂质;以及
 - (d)收获所述脂质;其中(b)包括将所述裂解的细胞组合物加热至至少70℃的温度,
其中(b)还包括使所述裂解的细胞组合物与第一碱接触以使所述裂解的细胞组合物的pH升高至8或更高。
2. 根据权利要求1的工艺,其中(b)包括将所述裂解的细胞组合物加热至从70℃至100℃的温度。
3. 根据权利要求1或2的工艺,其中(b)还包括使所述裂解的细胞组合物与盐接触。
4. 根据权利要求1所述的工艺,其中(b)还包括搅动所述裂解的细胞组合物。
5. 根据权利要求1所述的工艺,其中(a)还包括将盐添加至所述细胞组合物。
6. 根据权利要求1所述的工艺,其中(a)包括将所述细胞组合物的pH升高至8或更高。
7. 根据权利要求1所述的工艺,其中(b)还包括使所述裂解的细胞组合物与第二碱接触以使所述裂解的细胞组合物的pH升高至7或更高。
8. 根据权利要求1所述的工艺,其中所述裂解的细胞组合物是包含连续水相和分散的脂质相的混合物的水包油乳液形式。
9. 根据权利要求1所述的工艺,其中(c)包括离心所述破乳的细胞组合物。
10. 根据权利要求1所述的工艺,其中所述脂质是粗制脂质。
11. 根据权利要求10所述的工艺,还包括(e)精制所述粗制脂质以获得精制脂质。
12. 根据权利要求1或权利要求10所述的工艺,其中所述脂质具有26或更小的茴香胺值。
13. 根据权利要求1或权利要求10所述的工艺,其中所述脂质具有5或更小的过氧化物值。
14. 根据权利要求1所述的工艺,其中所述细胞是Thraustochytrium属、Schizochytrium属、Crypcodinium cohnii或其混合的微生物细胞。
15. 根据权利要求1所述的工艺,其中所述脂质包含 ω -3和/或 ω -6多元不饱和脂肪酸。
16. 根据权利要求1所述的工艺,其中所述脂质包含DHA、DPA(n-3)、DPA(n-6)、EPA和/或ARA。
17. 根据权利要求3所述的工艺,其中在步骤(b)中所述盐以按重量计相对于所述裂解的细胞组合物的0.1%至20%的量添加。
18. 根据权利要求3所述的工艺,其中所述盐选自下述:碱金属盐、硫酸盐及其组合。
19. 根据权利要求1或权利要求10所述的工艺,其中所述脂质含有按重量计少于5%的有机溶剂。

从细胞中提取脂质以及由此获得的产品

[0001] 发明背景

技术领域

[0002] 本发明涉及通过裂解细胞、升高细胞的pH和/或使细胞与盐接触并分离脂质而从细胞中获得脂质的工艺。本发明还涉及通过本发明的工艺制备的脂质。本发明还涉及具有具体茴香胺值、过氧化物值和/或磷含量的微生物脂质。

背景技术

[0003] 从微生物细胞获得脂质(比如多元不饱和脂肪酸)的典型工艺包括:使能产生期望的脂质的微生物在发酵罐、槽或生物反应器中生长,分离包含微生物细胞生物质的发酵液,干燥微生物细胞生物质并通过溶剂提取分离脂质。分离步骤可包括用水稀释发酵液,对稀释的发酵液离心,裂解微生物细胞,并通过将与水不相混的溶剂(例如,己烷)添加至其中溶解脂质的混合物,从裂解的细胞中提取细胞内脂质。

[0004] 从微生物细胞去除脂质的另一提取方法是使用机械力(例如,匀质化)、酶处理或化学处理以使细胞壁破裂,来裂解发酵液中的细胞。可使用有机溶剂,例如异丙醇,从得到的包含脂质、微生物细胞生物质和水的组合物中提取脂质。可将脂质与组合物机械分离并且必须从脂质和水性生物质二者的废物流中去除醇。见,例如,国际公开号W001/76385和W001/76715。

[0005] 然而,使用上述工艺的任一种的脂质工业规模生产需要大量挥发性和可燃的有机溶剂,因此产生危险的操作条件。在提取工艺中使用有机溶剂还可使防爆脂质回收系统的使用成为必需,因此增加了脂质回收的花费。而且,从微生物细胞提取脂质的工艺中使用有机溶剂可产生有机溶剂废物流,其需要完备的溶剂回收系统或适当的处置方法,这进一步增加了脂质提取的全部生产成本。例如,对挥发性有机化合物(VOC)排放的严格限制需要更多的人力以及对管道和其他装置的增加的花费。

[0006] 因此,需要不使用有机溶剂从细胞获得脂质的工艺。已提出了从细胞分离脂质的若干工艺,而不使用有机溶剂。例如,美国专利号6,750,048公开了水洗涤工艺,其中将乳液用水洗涤液洗涤直到获得基本上非乳化的脂质。然而,在一些实施方式中,该工艺需要多个洗涤步骤,这需要大量花费和时间。美国专利号7,431,952公开了下述工艺,其中对裂解的细胞离心,以去除细胞壁碎片,然后提取油并纯化。但是,该工艺提供了需要广泛进一步纯化的粗制油。因而,需要的是下述工艺,其不利用挥发性溶剂来从细胞提取脂质并且其可使用可容易得到的装置和最少数目的步骤来进行,以提供高纯度的脂质。

[0007] 发明简述

[0008] 本发明涉及用于从微生物细胞组合物获得脂质的工艺(方法),所述工艺包括将细胞组合物的pH升高至8或更高,并从细胞组合物分离脂质,其中脂质任选地含有按重量计或以体积少于5%的有机溶剂。

[0009] 在一些实施方式中,升高pH使细胞组合物裂解。在一些实施方式中,升高pH使细胞

组合物破乳。

[0010] 在一些实施方式中,方法包括将盐添加至细胞组合物以使细胞组合物破乳。在一些实施方式中,在升高pH之后进行添加盐。

[0011] 在一些实施方式中,方法还包括加热裂解的细胞组合物,以使细胞组合物破乳。在一些实施方式中,在升高pH之后进行加热。

[0012] 在一些实施方式中,方法还包括第二次升高细胞组合物的pH以使细胞组合物破乳。在一些实施方式中,第二次升高pH在添加盐或加热之后进行。

[0013] 本发明还涉及用于从细胞中获得脂质的工艺,所述工艺包括裂解细胞以形成裂解的细胞组合物,升高裂解的细胞组合物的pH至8或更高以使细胞组合物破乳,将盐添加至裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳并从破乳的细胞组合物分离脂质,其中脂质任选地含有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。

[0014] 本发明涉及从细胞组合物获得脂质的工艺,所述工艺包括升高细胞组合物的pH至8或更高以裂解细胞组合物并使细胞组合物破乳,将盐添加至细胞组合物并从破乳的细胞组合物分离脂质,其中脂质任选地含有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。

[0015] 本发明还涉及用于从细胞中获得脂质的工艺,所述工艺包括裂解细胞以形成裂解的细胞组合物,搅动细胞组合物以使细胞组合物破乳并从破乳的细胞组合物分离脂质,其中脂质任选地含有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。

[0016] 在一些实施方式中,方法还包括加热裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳。在一些实施方式中,加热在添加盐之后进行。

[0017] 在一些实施方式中,方法还包括搅动裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳。在一些实施方式中,搅动5分钟至96小时。

[0018] 在一些实施方式中,搅动包括用具有浆尖速度为350厘米/秒至900厘米/秒的叶轮搅动细胞组合物。

[0019] 在一些实施方式中,方法还包括升高裂解的细胞组合物的pH以使细胞组合物破乳。在一些实施方式中,升高裂解的细胞组合物的pH以使细胞组合物破乳包括添加碱。在一些实施方式中,在添加盐或加热之后添加第二碱。

[0020] 在一些实施方式中,加热10分钟至96小时。

[0021] 在一些实施方式中,将细胞组合物加热至温度为60℃至100℃。在一些实施方式中,将细胞组合物加热至温度为90℃至100℃。

[0022] 在一些实施方式中,升高pH包括添加碱。在一些实施方式中,碱具有1至12的pK_b。

[0023] 在一些实施方式中,分离脂质在10℃至100℃的温度下发生。

[0024] 在一些实施方式中,方法包括通过搅拌、混合、掺和、摇动、振动或其组合搅动裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,方法包括以裂解的细胞组合物的0.1hp/1000gal至10hp/1000gal搅动裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,方法包括用具有200ft/min至1,000ft/min的叶轮浆尖速度的搅拌器搅动裂解的细胞组合物。

[0025] 在一些实施方式中,裂解包括机械处理、物理处理、化学处理、酶处理或其组合。在一些实施方式中,机械处理是匀质化。

[0026] 在一些实施方式中,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的0.1%至20%的量添加盐。在一些实施方式中,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的0.5%至15%的量,将盐添加

至裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%至10%的量,将盐添加至裂解的细胞组合物。

[0027] 在一些实施方式中,盐选自由下述盐组成的组:碱金属盐、碱土金属盐、硫酸盐及其组合。在一些实施方式中,盐是氯化钠。在一些实施方式中,盐是硫酸钠。

[0028] 在一些实施方式中,分离包括离心。在一些实施方式中,分离包括在温度30℃至90℃下离心。

[0029] 在一些实施方式中,工艺提供包含按重量计至少50%的甘油三酯的脂质。

[0030] 在一些实施方式中,工艺提供茴香胺(anisidine)值为26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的脂质。

[0031] 在一些实施方式中,工艺提供过氧化物值为5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的脂质。

[0032] 在一些实施方式中,工艺提供磷含量为100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的脂质。

[0033] 在一些实施方式中,工艺提供具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的期望的多元不饱和脂肪酸(PUFA)的脂质。在一些实施方式中,工艺提供下述脂质,所述脂质具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的二十二碳六烯酸("DHA")和/或按重量计至少10%、至少15%或至少20%的二十二碳五烯酸("DPA_{n-6}")和/或按重量计至少10%、至少15%或至少20%的二十碳五烯酸("EPA")和/或按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的花生四烯酸("ARA")。

[0034] 在一些实施方式中,细胞是微生物细胞。在一些实施方式中,方法包括浓缩包含微生物细胞的发酵液。

[0035] 在一些实施方式中,细胞是油籽。在一些实施方式中,油籽选自由下述组成的组:向日葵籽、芥花籽(canola seed)、油菜籽、亚麻籽、蓖麻油籽、芫荽籽、金盏花籽和其遗传改进的变种。

[0036] 在一些实施方式中,方法包括洗涤细胞或细胞组合物。

[0037] 在一些实施方式中,方法包括对细胞或细胞组合物的巴氏灭菌。

[0038] 在一些实施方式中,方法包括浓缩裂解的细胞组合物。

[0039] 在一些实施方式中,方法包括精制脂质。在一些实施方式中,精制选自由下述处理组成的组:碱精制(caustic refining)、脱胶、酸处理、碱处理、冷却、加热、漂白、脱臭、脱酸及其组合。

[0040] 在一些实施方式中,方法包括收获脂质,其中收获包括抽吸脂质而不搅动。

[0041] 本发明还涉及通过本发明的工艺的任一种获得的脂质。

[0042] 在一些实施方式中,脂质包含一种或多种多元不饱和脂肪酸。在一些实施方式中,脂质具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少

45%或至少50%期望的PUFA。在一些实施方式中,脂质具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的DHA和/或按重量计至少10%、至少15%或至少20%的DPA n-6和/或按重量计至少10%、至少15%或至少20%的EPA和/或按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的ARA。

[0043] 在一些实施方式中,脂质具有3或更小的总香气(aroma)强度。在一些实施方式中,脂质具有2或更小的总香味(aromatic)强度。

[0044] 在一些实施方式中,脂质包含按重量计至少10%的三酰基甘油级分,其中三酰基甘油级分中的按重量计至少12%的脂肪酸是二十碳五烯酸,其中三酰基甘油级分中的按重量计至少25%的脂肪酸是二十二碳六烯酸且其中三酰基甘油级分中的按重量计少于5%的脂肪酸是花生四烯酸。

[0045] 在一些实施方式中,脂质包含按重量计至少20%的二十碳五烯酸和按重量计少于5%的花生四烯酸、二十二碳五烯酸n-6、油酸、亚油酸、亚麻酸、二十碳烯酸、芥酸和十八碳四烯酸的每一种。

[0046] 在一些实施方式中,脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。

[0047] 在一些实施方式中,脂质是粗制脂质。在一些实施方式中,粗制脂质任选地具有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。

[0048] 本发明还涉及粗制微生物脂质,其具有26或更小的茴香胺值、5或更小的过氧化物值、100ppm或更小的磷含量和任选地按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。

[0049] 在一些实施方式中,粗制微生物脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。

[0050] 在一些实施方式中,粗制微生物脂质具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的期望的PUFA。在一些实施方式中,粗制微生物脂质具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的DHA和/或按重量计至少10%、至少15%或至少20%的DPA n-6和/或按重量计至少10%、至少15%或至少20%的EPA和/或按重量计至少10%、至少15%、至少20%、

至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的ARA。

[0051] 本发明还涉及一种提取的微生物脂质,其包含按重量计至少70%的甘油三酯级分,其中甘油三酯级分的二十二碳六烯酸含量是按重量计至少50%,其中甘油三酯级分的二十二碳五烯酸n-6含量是从按重量计至少0.5%到按重量计6%且其中油具有26或更小的茴香胺值。

[0052] 本发明还涉及一种提取的微生物脂质,其包含按重量计至少70%的甘油三酯级分,其中甘油三酯级分的二十二碳六烯酸含量是至少40%按重量计,其中甘油三酯级分的二十二碳五烯酸n-6含量是从按重量计至少0.5%至按重量计6%,其中二十二碳六烯酸与二十二碳五烯酸n-6的比率是大于6:1且其中油具有26或更小的茴香胺值。

[0053] 本发明还涉及一种提取的微生物脂质,其包含按重量计至少约70%的甘油三酯级分,其中甘油三酯级分的二十二碳六烯酸含量是按重量计至少60%且其中油具有26或更小的茴香胺值。

[0054] 在一些实施方式中,提取的脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。

[0055] 在一些实施方式中,提取的微生物脂质是粗制脂质或粗制油。在一些实施方式中,粗制脂质任选地具有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。

[0056] 本发明还涉及用于获得脂质的工艺,所述工艺包括精制本发明的粗制脂质。在一些实施方式中,精制品自由下述处理组成的组:碱精制、脱胶、酸处理、碱处理、冷却、加热、漂白、脱臭、脱酸及其组合。

[0057] 附图/图简述

[0058] 并入本文并组成说明书一部分的附图阐释本发明并与说明书一起进一步用来解释本发明的原理并能使相关领域技术人员实施并使用本发明。

[0059] 图1-4提供描述本发明工艺的示意性流程图。

[0060] 图5是在多种pH下裂解的细胞组合物随时间推移的电子顺磁共振图。

[0061] 现将参考附图描述本发明。在附图中,同样的附图标记表示相同的或功能类似的元件。此外,附图标记的最左边的数字可表示首次出现该附图标记的图。

[0062] 发明详述

[0063] 本发明涉及用于从微生物细胞组合物获得脂质的工艺,所述工艺包括升高细胞组合物的pH至8或更高并从细胞组合物分离脂质,其中脂质任选地含有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。在一些实施方式中,方法还包括一次或多次将盐添加至细胞组合物以使细胞组合物破乳,加热细胞以使细胞组合物破乳,搅动细胞组合物以使细胞组合物破乳并第二次升高细胞组合物的pH以使细胞组合物破乳。

[0064] 本发明还涉及用于从细胞中获得脂质的工艺,所述工艺包括裂解细胞以形成裂解

的细胞组合物,升高裂解的细胞组合物的pH至8或更高以使细胞组合物破乳,将盐添加至裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳并从破乳的细胞组合物中分离脂质,其中脂质任选地含有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。细胞可以是微生物细胞或油籽细胞。在一些实施方式中,方法还包括下述处理的一种或多种:加热裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳,搅动裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳和第二次升高裂解的细胞组合物的pH以使细胞组合物破乳。

[0065] 本发明涉及从细胞组合物获得脂质的工艺,所述工艺包括升高细胞组合物的pH至8或更高以裂解的细胞组合物并使细胞组合物破乳,将盐添加至细胞组合物并从破乳的细胞组合物分离脂质,其中脂质任选地含有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。在一些实施方式中,方法还包括下述处理的一种或多种:加热细胞组合物以使细胞组合物破乳、搅动细胞组合物以使细胞组合物破乳和第二次升高细胞组合物的pH以使细胞组合物破乳。

[0066] 本发明涉及用于从微生物细胞获得脂质的工艺,所述工艺包括裂解微生物细胞以形成裂解的细胞组合物,将碱添加至裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳并从破乳的细胞组合物分离脂质,其中脂质任选地含有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。在一些实施方式中,方法还包括下述处理的一种或多种:将盐添加至裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳、加热裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳、搅动裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳和第二次将碱添加至裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳。

[0067] 本发明还涉及用于从细胞中获得脂质的工艺,所述工艺包括裂解细胞以形成裂解的细胞组合物,将碱添加至裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳,将盐添加至裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳并从破乳的细胞组合物分离脂质,其中脂质任选地含有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。细胞可以是微生物细胞或油籽细胞。在一些实施方式中,方法还包括下述处理的一种或多种:加热裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳、搅动裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳和第二次将碱添加至裂解的细胞组合物以使细胞组合物破乳。

[0068] 本发明还涉及用于从细胞中获得脂质的工艺,所述工艺包括裂解细胞以形成裂解的细胞组合物,搅动细胞组合物以使细胞组合物破乳并从破乳的细胞组合物分离脂质,其中脂质任选地含有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。

[0069] 本发明还涉及通过本发明的工艺的任一种获得的脂质。

[0070] 本发明还涉及从细胞中获得脂质的提取工艺,所述工艺包括裂解细胞以形成裂解的细胞组合物,使裂解的细胞组合物与第一碱接触,使裂解的细胞组合物与盐接触,加热裂解的细胞组合物5分钟至96小时,使裂解的细胞组合物与第二碱接触并在10℃至100℃温度下从裂解的细胞组合物分离脂质。

[0071] 本发明还涉及从细胞中获得脂质的提取工艺,所述工艺包括裂解细胞以形成裂解的细胞组合物,使裂解的细胞组合物与盐接触和搅动裂解的细胞组合物5分钟至96小时以提供处理的裂解的细胞组合物和在10℃至100℃温度下从处理的细胞组合物分离脂质。

[0072] 本发明还涉及从细胞中获得脂质的提取工艺,所述工艺包括裂解细胞以形成裂解的细胞组合物,使裂解的细胞组合物与盐接触并在10℃至100℃温度下从裂解的细胞组合物分离脂质。

[0073] 在一些实施方式中,碱或第二碱具有1至12的pK_b。在一些实施方式中,碱或第二碱

具有3至5的pK_b。

[0074] 在一些实施方式中,工艺包括搅动裂解的细胞组合物5分钟至96小时、10分钟至96小时、10分钟至4小时、12小时至84小时或24小时至72小时。

[0075] 在一些实施方式中,方法包括通过搅拌、混合、掺和、摇动、振动或其组合搅动裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,方法包括以裂解的细胞组合物的0.1hp/1000gal至10hp/1000gal搅动裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,方法包括用具有200ft/min至1000ft/min的叶轮浆尖速度的搅拌器搅动裂解的细胞组合物。

[0076] 在一些实施方式中,裂解包括选自下述的工艺:机械处理、物理处理、化学处理、酶处理或其组合。

[0077] 在一些实施方式中,裂解的细胞组合物与以下述量的盐接触,所述量按重量计为裂解的细胞组合物的0.1%至20%、按重量计0.5%至15%或按重量计2%至10%。

[0078] 在一些实施方式中,盐选自由下述盐组成的组:碱金属盐、碱土金属盐、硫酸盐和其组合。在一些实施方式中,盐是氯化钠。在一些实施方式中,盐是硫酸钠。

[0079] 在一些实施方式中,方法包括加热裂解的细胞组合物5分钟至96小时,10分钟至4小时,12小时至84小时或24小时至72小时。

[0080] 在一些实施方式中,分离包括离心。在一些实施方式中,分离包括在10℃至100℃的温度下离心。

[0081] 在一些实施方式中,方法包括在裂解包括细胞的发酵液之前,对包括细胞的发酵液进行洗涤、离心、蒸发或其组合。

[0082] 在一些实施方式中,工艺提供茴香胺值为15或更小的脂质。在一些实施方式中,工艺提供包含按重量计至少50%甘油三酯的脂质。

[0083] 在一些实施方式中,工艺不将有机溶剂添加至裂解的细胞组合物。有机溶剂包括极性溶剂、非极性溶剂、水可混溶的溶剂、与水不相混的溶剂及其组合。

[0084] 在一些实施方式中,方法包括浓缩包含细胞的发酵液。在一些实施方式中,方法包括浓缩裂解的细胞组合物。

[0085] 本发明还涉及通过本文所述的工艺制备的脂质。在一些实施方式中,脂质包含一种或多种多元不饱和脂肪酸。在一些实施方式中,脂质具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的期望的PUFA。在一些实施方式中,脂质具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的DHA和/或按重量计至少10%、至少15%或至少20%的DPA n-6和/或按重量计至少10%、至少15%或至少20%的EPA和/或按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的ARA。在一些实施方式中,脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。

[0086] 在一些实施方式中,脂质包含按重量计至少10%的三酰基甘油级分,其中三酰基甘油级分中的按重量计至少12%的脂肪酸是二十碳五烯酸,其中三酰基甘油级分中的按重量计至少25%的脂肪酸是二十二碳六烯酸和其中三酰基甘油级分中的按重量计少于5%的脂肪酸是花生四烯酸。在一些实施方式中,脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,脂质是粗制脂质。

[0087] 在一些实施方式中,脂质包含按重量计至少20%的二十碳五烯酸以及按重量计少于5%的花生四烯酸、二十二碳五烯酸n-6、油酸、亚油酸、亚麻酸、二十碳烯酸、芥酸和十八碳四烯酸的每一种。在一些实施方式中,脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,脂质是粗制油。

[0088] 本发明还涉及下述粗制微生物脂质,其具有26或更小的茴香胺值、5或更小的过氧化物值、100ppm或更小的磷含量和任选地按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。在一些实施方式中,粗制微生物脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,粗制微生物脂质具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的期望的PUFA。在一些实施方式中,粗制微生物脂质具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的DHA和/或按重量计至少10%、至少15%或至少20%按重量计ofDPA n-6和/或至少10%、至少15%或至少20%的EPA和/或按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的ARA。

[0089] 本发明还涉及一种提取的微生物包含按重量计至少70%的甘油三酯级分的脂质,其中甘油三酯级分的二十二碳六烯酸含量是按重量计至少50%,其中甘油三酯级分的二十二碳五烯酸n-6含量是从按重量计至少0.5%至按重量计至少6%且其中油具有26或更小的茴

香胺值。在一些实施方式中,提取的脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,提取的脂质是粗制脂质。

[0090] 本发明还涉及一种包含按重量计至少70%的甘油三酯级分的提取的微生物脂质,其中甘油三酯级分的二十二碳六烯酸含量是按重量计至少40%,其中甘油三酯级分的二十二碳五烯酸n-6含量是从按重量计至少0.5%至按重量计至少6%,其中二十二碳六烯酸与二十二碳五烯酸n-6的比率是大于6:1且其中油具有26或更小的茴香胺值。在一些实施方式中,提取的脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,提取的脂质是粗制脂质。

[0091] 本发明还涉及一种提取的微生物脂质,所述微生物脂质包含按重量计至少约70%的甘油三酯级分,其中甘油三酯级分的二十二碳六烯酸含量是按重量计至少60%且其中油具有26或更小的茴香胺值。在一些实施方式中,提取的脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,提取的脂质是粗制脂质。

[0092] 本发明还涉及从*Cryptothecodinium cohnii*种微生物中提取的粗制脂质,其具有100ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,粗制脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。

[0093] 本发明还涉及用于获得脂质的工艺,所述工艺包括精制本发明的粗制脂质。在一些实施方式中,精制选自由下述处理组成的组:碱精制、脱胶、酸处理、碱处理、冷却、加热、漂白、脱臭、脱酸及其组合。

[0094] 概述

[0095] 一般而言,本发明的工艺不利用有机溶剂来提取或以其他方式分离脂质。因而,在一些实施方式中,在本发明工艺期间,不将足够提取脂质的量或浓度的有机溶剂添加至包含植物材料的细胞发酵液或包含微生物细胞的发酵液、不将足够提取脂质的量或浓度的有机溶剂添加至细胞组合物,不将足够提取脂质的量或浓度的有机溶剂添加至裂解的细胞组合物,或不将足够提取脂质的量或浓度的有机溶剂添加至脂质。在一些实施方式中,可将有机溶剂添加至细胞组合物、裂解的细胞组合物或破乳的细胞组合物。在这种实施方式中,以按体积计小于5%、小于4%、小于3%、小于2%、小于1%、小于0.5%、小于0.1%或小于0.05%的浓度添加有机溶剂。在本文中使用时,“有机溶剂”是指包含至少一个碳原子的溶剂。在本文中使用时,“溶剂”是指是疏水性的或亲脂性的试剂,并且不是脂质。在本文中使用时,“疏水性的”是指排斥水团的试剂。在本文中使用时,“亲脂性的”是指溶解脂质的试剂。不在本发明的工艺中使用的有机溶剂包括,但不限于,极性溶剂、非极性溶剂、水可混溶的溶剂、与水不相混的溶剂及其组合。有机溶剂的非限制性例子包括取代和未取代的C₄-C₈烷类(例如,己烷等等)、C₅-C₁₂环烷类、C₄-C₁₂烯烃类,C₁-C₈醇类(例如,异丙醇等等),C₁-C₈醛类,C₄-C₈醚类,C₁-C₈酯类,C₆-C₁₂芳烃类,C₁-C₈酰胺类,C₅-C₁₂杂芳烃类及其组合。任选地,本文定义的有机溶剂可例如作为与裂解的细胞组合物接触的碱基组分和/或盐组分添加至裂解的细胞组合物。然而,在这种实施方式中,有机溶剂以使得脂质基本上不被溶剂从细胞组合物、裂解的细胞组合物或破乳的细胞组合物中提取的浓度(即,以按体积计或按重量计小于5%、小于4%、小于3%、小于2%、小于1%、小于0.5%、小于0.1%或小于0.05%的浓度)存在。

[0096] 在一些实施方式中,本发明的工艺不包括洗涤,例如,用水洗涤,或工艺减少了裂解的细胞组合物或破乳的细胞组合物的洗涤次数。“洗涤”是指用例如水或缓冲液稀释组合物并例如,通过离心去除水或缓冲液的工艺。洗涤细胞组合物可减少从细胞获得的脂质的总产率。在本发明中,可将洗涤减少1次、2次、3次或多次。

[0097] 定义

[0098] 在本文中使用时,“脂质”或“油”是指一种或多种脂肪酸(包括游离脂肪酸和脂肪酸的酯)、磷脂、三酰基甘油(即甘油三酯)、二酰甘油酯、单酰甘油酯、溶血磷脂、脂肪酸盐、脂肪酸盐(soap)、磷脂、蜡、甾醇和甾醇酯类、类胡萝卜素、黄叶素、碳水化合物和本领域普通技术人员所已知的其他脂质。脂质包括极性脂质和中性脂质。

[0099] 在本文中使用时,“极性脂质”是指含有极性基团的脂质并且更易溶于极性溶剂。极性脂质包括磷脂。在本文中使用时,“磷脂”是指具有磷酸基团的脂质。在本文中使用时,“中性脂质”是指不含有极性区域的脂质且易溶于非极性溶剂。中性脂质包括三酰基甘油(TAG)。

[0100] 基于碳链的长度和饱和特征将脂肪酸分类。基于在链中存在的碳的数目,将脂肪酸称为短链、中等长度链或长链脂肪酸。在碳原子之间不存在双键时,将脂肪酸称为饱和脂肪酸,存在双键时称为不饱和脂肪酸。当仅存在一个双键时,将不饱和长链脂肪酸称为单不饱和长链脂肪酸,当存在多于一个双键时,称为多元不饱和长链脂肪酸。

[0101] 脂质中存在的脂肪酸可具有4至28个碳原子。在一些实施方式中,脂质包含一种或多种多元不饱和脂肪酸。基于从脂肪酸的甲基端的第一个双键的位置,将多元不饱和脂肪酸(PUFAs)分类: ω -3(n -3)脂肪酸在第三个碳处含有第一个双键,而 ω -6(n -6)脂肪酸在第六个碳处含有第一个双键。例如,二十二碳六烯酸(“DHA”)是具有22个碳和6个双键的 ω -3长链多元不饱和脂肪酸(LC-PUFA),通常命名为“22:6 n -3”。就本申请目的而言,长链多元不饱和脂肪酸(LC-PUFAs)被定义为含有3或更多个双键的18个和更长碳链长度的脂肪酸并且优选的是含有3或更多个双键的20个或更长碳链长度的脂肪酸。 ω -6系列的LC-PUFA包括,但不限于,二-高- γ 亚油酸(C20:3 n -6),花生四烯酸(C20:4 n -6)(“ARA”)、二十二碳四烯酸或肾上腺酸(C22:4 n -6)和二十二碳五烯酸(C22:5 n -6)(“DPA n -6”)。 ω -3系列的LC-PUFA包括,但不限于,二十碳三烯酸(C20:3 n -3)、二十碳四烯酸(C20:4 n -3)、二十碳五烯酸(C20:5 n -3)(“EPA”)、二十二碳五烯酸(C22:5 n -3)和二十二碳六烯酸(C22:6 n -3)。LC-PUFA还包括具有大于22个碳原子和4个或多个双键的脂肪酸,其包括,但不限于,C24:6(n -3)和C28:8(n -3)。

[0102] 术语“脂肪酸”、“多元不饱和脂肪酸”和“PUFA”不仅包括游离脂肪酸形式,还包括其他形式,比如三酰基甘油(TAG)形式、磷脂(PL)形式和其他酯化形式。在本文中使用时,术语“酯”和“酯化”是指用另一取代基替代PUFA分子的羧基团中的氢。典型的酯是本领域技术人员已知的那些,所述酯的讨论由Higuchi,T.et al.,Pro-drugs as Novel Delivery Systems,Vol.14,A.C.S.Symposium Series,Bioreversible Carriers in Drug Design,Edward B.Roche ed.,Amer.Pharma.Assoc.,Pergamon Press(1987)和Protective Groups in Organic Chemistry,McOmie ed.,Plenum Press,New York(1973)提供,其每一篇以其整体通过引用并入本文。通常酯类的例子包括甲基、乙基、三氯乙基、丙基、丁基、戊基、叔丁基、苄基、硝基苄基、甲氧基苄基和二苯甲基酯。

[0103] 在一些实施方式中,脂质包含按重量计至少10%、至少20%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%或至少80%的PUFA。在一些实施方式中,脂质包含按重量计至少10%、至少20%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%或至少80%的DHA。在一些实施方式中,脂质包含按重量计少于50%、少于40%、少于30%、少于20%、少于15%、少于10%或少于5%的EPA。在一些实施方式中,脂质包含按重量计少于10%、少于5%、少于2%、少于1%或少于0.5%的甾醇。在一些实施方式中,一种或多种PUFA以一种或多种形式存在于脂质中,所述形式比如甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯、磷脂、游离脂肪酸、酯化脂肪酸、脂肪酸的碱金属盐、脂肪酸的碱土金属盐及其组合。

[0104] 在一些实施方式中,在本发明的工艺中离心后分离的脂质包含按重量计至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%或50%至95%、50%至90%、50%至85%、50%至80%、50%至75%、60%至95%、60%至90%、60%至85%、70%至95%、70%至90%、70%至85%、75%至95%、75%至90%或75%至85%的甘油三酯。

[0105] 在一些实施方式中,甘油三酯包含按重量计至少10%、至少20%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%或至少80%的DHA。在一些实施方式中,甘油三酯包含按重量计至少50%、至少40%、至少30%、至少20%、至少15%、至少10%或至少5%的EPA。

[0106] 如本文所讨论的,在离心之后,对脂质额外的精制可提供包含按重量计至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或80%至99.5%、80%至99%、80%至97%、80%至95%、80%至

90%、85%至99.5%、85%至99%、85%至97%、85%至95%、85%至90%、90%至99.5%、90%至99%、90%至97%、90%至95%、95%至99.5%、95%至99%、95%至97%、97%至99.5%或98%至99.5%甘油三酯的脂质。

[0107] 在本文中使用时,“细胞”是指含有脂质的生物材料,比如源自植物或微生物的生物材料。在一些实施方式中,合适的植物材料包括但不限于,植物部分和油籽。油籽包括,但不限于,向日葵籽、芥花籽、油菜籽、亚麻籽、蓖麻油籽、芜荑籽、金盏花籽等等和其遗传改进的变种。根据本文中所述的工艺,产自植物材料和/或微生物比如油脂性微生物的油,也称作植物油。产自藻类和/或真菌的油也分别称作藻类油和/或真菌油。

[0108] 在本文中使用时,“微生物细胞”或“微生物”是指生物体(例如,单细胞生物体),比如藻类、细菌、真菌、原生生物及其组合。在一些实施方式中,微生物细胞是真核细胞。适用于本发明的微生物细胞包括但不限于,金藻(例如,Stramenopiles界的微生物)、绿藻、硅藻、甲藻(例如,Dinophyceae目的微生物,其包括Crypthecodinium属的成员,例如,Crypthecodinium cohnii或C.cohnii)、酵母(Ascomycetes或Basidiomycetes)和Mucor and Mortierella属的真菌,包括但不限于Mortierella alpina和Mortierella sect.schmuckeri。适用于本发明的微生物细胞还可包括,但不限于下述生物体组中找到的属:Stramenopiles、Hamatores、Proteromonads、Opalines、Develpayella、Diplophrys、Labrinthulids、Thraustochytrids、Biosecids、Oomycetes、Hypochoytridiomycetes、Commation、Reticulosphaera、Pelagomonas、Pelagococcus、Ollicola、Aureococcus、Parmales、Diatoms、Xanthophytes、Phaeophytes、Eustigmatophytes、Raphidophytes、Synurids、Axodines(包括Rhizochromulinaales、Pedinellales、Dictyochales)、Chrysomeridales、Sarcinochrysidales、Hydrurales、Hibberdiales和Chromulinales。

[0109] 在一些实施方式中,用于本发明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(thraustochytrid),比如Schizochytrium或Thraustochytrium。根据本发明,术语“破囊壶菌”是指Thraustochytriales目的任何成员,其包括Thraustochytriaceae科,术语“labyrinthulid”是指Labyrinthulales目的任何成员,其包括Labyrinthulaceae科。

[0110] Labyrinthulaceae科的成员先前被认为是Thraustochytriales目的成员,但在此类生物体的分类学分类的最近修订中,Labyrinthulaceae科现被认为是Labyrinthulales目的成员。Labyrinthulales和Thraustochytriales二者被认为是网粘菌门的成员。分类学理论家现一般将这两个组的微生物放在Stramenopile谱系的藻类或类藻类原生生物处。破囊壶菌和labyrinthulids的当前分类学地位可总结如下:

[0111] 界:Stramenopila(Chromista)

[0112] 门:Labyrinthulomycota(Heterokonta)

[0113] 纲:Labyrinthulomycetes(Labyrinthulae)

[0114] 目:Labyrinthulales

[0115] 科:Labyrinthulaceae

[0116] 目:Thraustochytriales

[0117] 科:Thraustochytriaceae

[0118] 就本发明目的而言,描述为破囊壶菌的微生物细胞菌株包括下述生物体:目:

Thraustochytriales; 科: Thraustochytriaceae; 属: Thraustochytrium (种: sp., arudimentale、aureum、benthicola、globosum、kinnei、motivum、multirudimentale、pachydermum、proliferum、roseum 和 striatum)、Ulkenia (种: sp., amoeboidea、kerguelensis、minuta、profunda、radiata、sailens、sarkariana、schizochytrids、visurgensis、yorkensis 和 sp. BP-5601)、Schizochytrium (种: sp., aggregatum、limnaceum、mangrovei、minutum 和 octosporum)、Japonochytrium (种: sp., marinum)、Aplanochytrium (种: sp., haliotidis、kerguelensis、profunda 和 stocchinoi)、Althornia (种: sp., crouchii) 或 Elina (种: sp., marisalba 和 sinorifica)。为了本发明的目的, Ulkenia 中的描述的种被认为是属 Thraustochytrium 的成员。Aurantiaochytrium 和 Oblogospora 是本发明中的网粘菌门所包括的两个额外的属。在一些实施方式中, 微生物细胞是 Thraustochytrium 属、Schizochytrium 属和其混合的微生物细胞。

[0119] 适用于本发明的微生物细胞包括, 但不限于 Labyrinthulids, Labyrinthulids 选自目: Labyrinthulales, 科: Labyrinthulaceae, 属: Labyrinthula (种: sp., algeriensis、coenocystis、chattonii、macrocytis、macrocytis atlantica、macrocytis macrocytis、marina、minuta、roscoffensis、valkanovii、vitellina、vitellina pacifica、vitellina vitellina 和 zopfii)、Labyrinthuloides (种: sp., haliotidis 和 yorkensis)、Labyrinthomyxa (种: sp., marina)、Diplophrys (种: sp., archeri)、Pyrrhosorus (种: sp., marinus)、Sorodiplophrys (种: sp., stercorea) 和 Chlamydomyxa (种: sp., labyrinthuloides 和 montana) (但当前对 Pyrrhosorus、Sorodiplophrys 和 Chlamydomyxa 的精确的分类学地位没有共识)。

[0120] 网粘菌门的宿主细胞包括, 但不限于, 保藏的菌株 PTA-10212、PTA-10213、PTA-10214、PTA-10215、PTA-9695、PTA-9696、PTA-9697、PTA-9698、PTA-10208、PTA-10209、PTA-10210、PTA-10211、保藏为 SAM2179 的微生物(由保藏机构命名为“Ulkenia SAM2179”)、任何 Thraustochytrium 种(包括以前的 Ulkenia 种比如 U. visurgensis、U. amoeboidea、U. sarkariana、U. profunda、U. radiata、U. minuta 和 Ulkenia sp. BP-5601) 并包括 Thraustochytrium striatum、Thraustochytrium aureum、Thraustochytrium roseum; 和任何 Japonochytrium 种。Thraustochytriales 的菌株包括, 但不限于 Thraustochytrium sp. (23B) (ATCC20891); Thraustochytrium striatum (Schneider) (ATCC24473); Thraustochytrium aureum (Goldstein) (ATCC34304); Thraustochytrium roseum (Goldstein) (ATCC28210); Japonochytrium sp. (L1) (ATCC28207); ATCC20890; ATCC20892; 源自前述微生物的任一种的突变体菌株; 和其混合。Schizochytrium 包括, 但不限于 Schizochytrium aggregatum、Schizochytrium limacinum、Schizochytrium sp. (S31) (ATCC20888)、Schizochytrium sp. (S8) (ATCC20889)、Schizochytrium sp. (LC-RM) (ATCC18915)、Schizochytrium sp. (SR21)、保藏的菌株 ATCC28209、保藏的 Schizochytrium limacinum 菌株 IF032693、源自前述微生物的任一种的突变体菌株和其混合。在一些实施方式中, 宿主细胞是 Schizochytrium 或 Thraustochytrium。Schizochytrium 可通过连续的二分裂和通过形成最后释放游动孢子的孢子囊二者复制。然而, Thraustochytrium, 仅通过形成接着释放游动孢子的孢子囊来复制。在一些实施方式中, 本发明的宿主细胞是重组宿主细胞。

[0121] 用于本发明的微生物细胞的有效培养条件包括,但不限于,允许脂质产生的有效的培养基、生物反应器、温度、pH和氧条件。有效的培养基是指其中微生物细胞,例如Thraustochytriales微生物细胞被典型地培养的任何培养基。此类培养基典型地包含具有可同化的碳源、氮源和磷酸盐来源,以及适当的盐、矿物质、金属和其他养分,比如维生素的水性培养基。用于本发明的微生物细胞可在常规发酵生物反应器、摇瓶、试管、微量滴定皿和培养皿中培养。在一些实施方式中,培养在适于重组细胞的温度、pH和氧含量下进行。

[0122] 在一些实施方式中,微生物细胞能在12g/L或更少、5g/L或更少或3g/L或更少的氯化钠的盐度水平下生长。

[0123] 在一些实施方式中,微生物细胞产生包含 ω -3和/或 ω -6PUFA的脂质。在一些实施方式中,微生物细胞产生包含DHA、DPA(n-3)、DPA(n-6)、EPA、花生四烯酸(ARA)等等及其组合的脂质。上述公开了产生包含PUFA的脂质的微生物的非限制性例子并且也在美国专利号5,340,594,5,340,742和5,583,019中找到,其每一篇以其整体通过引用并入本文。

[0124] 在一些实施方式中,微生物细胞包含按重量计至少30%脂质、按重量计至少35%脂质、按重量计至少40%脂质、按重量计至少50%脂质、按重量计至少60%脂质、按重量计至少70%脂质或按重量计至少80%脂质。在一些实施方式中,用于本发明的微生物细胞能产生至少0.1g/L/小时(g/L/h)的DHA、至少0.2g/L/h的DHA、至少0.3g/L/h的DHA或至少0.4g/L/h的DHA。

[0125] 工艺

[0126] 本发明的工艺包含裂解细胞或细胞生物质以形成裂解的细胞组合物。在本文中使用,术语“细胞生物质”是指植物种群或微生物细胞种群。在本文中使用,术语“裂解(lyse)”和“裂解(lysing)”是指使细胞的细胞壁和/或细胞膜破裂的工艺。在一些实施方式中,裂解包括下述工艺,比如:机械处理、化学处理、酶处理、物理处理或其组合。

[0127] 在本文中使用,机械处理包括但不限于,匀质化处理细胞、对细胞应用超声、冷压细胞、研磨细胞等等及其组合。在一些实施方式中,工艺包括通过匀质化裂解细胞。在一些实施方式中,工艺包括用匀化器裂解细胞。

[0128] 匀质化处理细胞可包括,但不限于工艺利用弗氏细胞压碎器、超声破碎器、匀化器、球磨机、棒磨机、砾磨机、珠磨机、高压磨辊、立轴冲击器、工业搅拌机、高剪切混合器、浆式混合器、polytron匀化器等等及其组合。在一些实施方式中,将细胞流过任选地被加热的匀化器。在一些实施方式中,合适的匀质化可包括在高压和/或低压下通过匀化器1至3次。在一些实施方式中,匀质化期间的压力可以是150bar至1,400bar、150bar至1,200bar、150bar至900bar、150bar至300bar、300bar至1,400bar、300bar至1,200bar、300bar至900bar、400bar至800bar、500bar至700bar或600bar。

[0129] 在本文中使用,物理处理可包括,但不限于加热细胞、干燥细胞等等及其组合。

[0130] 加热细胞可包括,但不限于电阻加热、对流加热、蒸气加热、在液槽中加热、用太阳能加热、用聚焦太阳能加热等等、其任一种可在罐(tank)、池、管、导管、烧瓶或其他容纳设备中进行。在一些实施方式中,细胞在其壁上/壁中包括电阻线圈的罐中加热。在一些实施方式中,细胞在包括通过其的管道系统的液槽中加热。

[0131] 干燥细胞可包括,但不限于暴露于气流、暴露于热(例如,对流热、热表面等等)、暴露于太阳能、冷冻干燥(冷冻真空干燥)、喷雾干燥及其组合。在一些实施方式中,干燥包括

将细胞应用至任选地被加热的滚筒。

[0132] 在本文中使用时,化学处理包括但不限于,升高细胞的pH、使细胞与化学品接触等等。

[0133] 升高细胞的pH可包括,但不限于,将碱添加至细胞组合物。在一些实施方式中,适用于本发明的碱包括,但不限于,氢氧化物碱(例如,LiOH、NaOH、KOH、Ca(OH)₂等等及其组合)、碳酸盐碱(例如,Na₂CO₃、K₂CO₃、MgCO₃等等及其组合)、碳酸氢盐碱(例如,LiHCO₃、NaHCO₃、KHCO₃等等及其组合)及其组合。碱可以是固体形式(例如,结晶、粒剂、丸剂等等)或液体形式(例如,水性溶液、醇类溶液,比如在甲醇、乙醇、丙醇等等中的氢氧化物碱)及其组合。在一些实施方式中,将细胞组合物的pH升至8或更高、9或更高、10或更高、11或更高、12或更高或升至7至13、7至12、7至11、7至10、7至9、8至13、8至12、8至11、8至10、8至9、9至12、9至11、9至10、10至12或10至11的pH。

[0134] 在一些实施方式中,升高细胞的pH可包括,但不限于,进行氯碱工艺。在一些实施方式中,使细胞组合物和含有氯化钠的发酵液经受电解,所述电解会导致氢氧化钠形成。形成的氢氧化钠升高细胞的pH。在一些实施方式中,发酵液可包括替代氯化钠的氯化钙或氯化钾或除氯化钠之外的氯化钙或氯化钾。使此类发酵液经受电解分别导致氢氧化钙或氢氧化钾形成,因此升高细胞的pH。

[0135] 酶裂解是指通过使细胞与一种或多种酶接触,裂解细胞的细胞壁或细胞膜。适用于本发明的酶包括,但不限于,蛋白酶、纤维素酶、半纤维素酶、几丁质酶、果胶酶及其组合。蛋白酶的非限制性例子包括丝氨酸蛋白酶、苏氨酸蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶、天冬氨酸蛋白酶、金属蛋白酶、谷氨酸蛋白酶、碱性蛋白酶(alacase)及其组合。纤维素酶的非限制性例子包括蔗糖酶、麦芽糖酶、乳糖酶、 α -葡萄糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、淀粉酶、溶菌酶、神经氨酸酶、半乳糖苷酶、 α -甘露糖苷酶、葡萄糖醛酸糖苷酶、透明质酸酶、支链淀粉酶、葡萄糖脑苷脂酶、半乳糖神经酰胺酶、乙酰基半乳糖苷酶、岩藻糖苷酶、己糖胺酶、艾杜糖醛酸酶、麦芽糖酶-葡萄糖淀粉酶及其组合。几丁质酶的非限制性例子包括壳三糖酶。果胶酶的非限制性例子包括果胶酶、pectozyme、多聚半乳糖醛酸酶及其组合。在一些实施方式中,一些酶通过加热活化。

[0136] 在本文中使用时,“裂解的细胞组合物”是指包含一种或多种裂解的细胞的组合物,包括与脂质(来自裂解的细胞)结合的细胞碎片和其他细胞内含物,和任选地含有微生物细胞或植物材料的发酵液。在一些实施方式中,植物材料含在包含植物材料和水的发酵液或培养基中。在一些实施方式中,微生物细胞含在包含微生物细胞和水的发酵液或培养基中。在一些实施方式中,裂解的细胞组合物是指包含一种或多种裂解的细胞、细胞碎片、脂质、细胞的天然内含物和来自发酵液的水性组分的组合物。在一些实施方式中,裂解的细胞组合物是包含连续水相和分散的脂质相的混合物的水包油乳液形式。在一些实施方式中,分散的脂质相以按重量计相对于乳化的裂解的细胞组合物的1%至60%、1%至50%、1%至40%、1%至30%、1%至20%、5%至60%、5%至50%、5%至40%、5%至30%、5%至20%、10%至60%、10%至50%、10%至40%、20%至60%、20%至50%、20%至40%、30%至60%、30%至50%或40%至60%的浓度存在。

[0137] 虽然不限于任何具体理论,相信本发明的工艺破坏(break up)乳化的裂解的细胞组合物,或者说使乳化的裂解的细胞组合物破乳,允许脂质从裂解的细胞组合物中分离。在本文中使用时,术语“乳液”和“乳化的”是指两种或多种不可混溶相或层的混合物,其中一

种相或层分散在另一相或层中。在本文中使用时,术语“打破(break)”、“破坏”“破乳(demulsify)”、“破乳(demulsification)”、“破乳(demulsifying)”和“打破(breaking)”是指分离乳液的不可混溶相或层的工艺。例如,使乳化的裂解的细胞组合物破乳或打破乳化的裂解的细胞组合物是指下述工艺,通过所述工艺,乳化的裂解的细胞组合物从具有一相或多相或层的乳液改变为具有两相或多相或两层或多层层的组合物。例如,在一些实施方式中,本发明的工艺打破乳化的裂解的细胞组合物,从单相成为两相或更多相。在一些实施方式中,两相或更多相包括脂质相和水相。在一些实施方式中,本发明的工艺打破乳化的裂解的细胞组合物,从一相或多相成为至少三相。在一些实施方式中,三相包括脂质相、水相和固体相。在一些实施方式中,三相包括脂质相、乳液相和水相。

[0138] 在一些实施方式中,本发明的工艺使裂解的细胞组合物破乳,以形成破乳的细胞组合物,其通过去除或打破至少75%的乳液、至少80%的乳液、至少85%的乳液、至少90%的乳液、至少95%的乳液、至少99%的乳液来实现。在一些实施方式中,本发明的工艺使裂解的细胞组合物破乳,其通过去除或打破按重量计或按体积计75%的乳液至99%的乳液、75%的乳液至95%的乳液、75%的乳液至90%的乳液、75%的乳液至85%的乳液、75%的乳液至80%的乳液、80%的乳液至99%的乳液、80%的乳液至95%的乳液、80%的乳液至90%的乳液、80%的乳液至85%的乳液、85%的乳液至99%的乳液、85%的乳液至95%的乳液、85%的乳液至90%的乳液、90%的乳液至99%的乳液、90%的乳液至95%的乳液或95%的乳液至99%的乳液来实现。

[0139] 在一些实施方式中,在裂解细胞之前,可将细胞洗涤和/或巴氏灭菌。在一些实施方式中,洗涤细胞包括使用水溶液(比如水)以去除任何细胞外水-可溶的或水-可分散的化合物。在一些实施方式中,可将细胞洗涤一次,两次、三次或多次。在一些实施方式中,对细胞巴氏灭菌包括加热细胞,以使任何不期望的酶失活,例如可降解脂质或减少PUFA产率的任何酶。在一些实施方式中,可先将细胞洗涤,然后巴氏灭菌。

[0140] 在一些实施方式中,细胞是植物生物材料,且在裂解之前形成植物生物材料。在一些实施方式中,通过从植物中去除或提取油籽来形成植物生物材料。在一些实施方式中,通过磨碎、研磨、挤出、除尘、破碎或其组合,从油籽外壳中去除内部油籽。在一些实施方式中,可使用本领域中已知的工艺,可将脱壳油籽匀质化或排出,比如使油籽通过压力,来磨碎脱壳油籽成为饼。在一些实施方式中,可将水添加至饼,以形成乳化的裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,可使用本领域中已知的工艺,将乳化的裂解的细胞组合物过滤,以从裂解的细胞组合物中去除任何剩余的壳碎片。

[0141] 在一些实施方式中,用第一碱处理裂解的细胞组合物破坏(即,破乳)乳化的裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,用第二碱处理裂解的细胞组合物打破(即,破乳)乳化的裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,用盐处理裂解的细胞组合物打破(即,破乳)乳化的裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,加热裂解的细胞组合物打破(即,破乳)乳化的裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,搅动裂解的细胞组合物打破(即,破乳)乳化的裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,同时加热并搅动裂解的细胞组合物打破(即,破乳)乳化的裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,利用一种或多种前述处理破坏(即,破乳)乳化的裂解的细胞组合物。

[0142] 在一些实施方式中,本发明的工艺包括升高细胞组合物的pH以使细胞组合物裂解和/或破乳。在一些实施方式中,本发明的工艺包括升高裂解的细胞组合物的pH以使裂解的

细胞组合物破乳。在一些实施方式中,升高pH包括使碱与细胞组合物或裂解的细胞组合物接触。在一些实施方式中,本发明的工艺包括使裂解的细胞组合物与碱接触以使裂解的细胞组合物破乳。在本文中使用,“接触”是指使细胞组合物或裂解的细胞组合物与第二种组合物组合(例如,通过将组合物添加至细胞组合物或裂解的细胞组合物、通过将细胞组合物或裂解的细胞组合物添加至组合物等等)。在本文中使用,“组合物”包含纯的材料或包括两种或多种材料、物质、赋形剂、部分(portion)等等的组合。使裂解的细胞组合物与第一碱接触升高裂解的细胞组合物的pH。在一些实施方式中,使裂解的细胞组合物与第二碱接触。在一些实施方式中,裂解的细胞组合物或破乳的细胞组合物的pH被第二次升高。在一些实施方式中,第二次升高pH包括使裂解的细胞组合物或破乳的细胞组合物与第二碱接触。在一些实施方式中,裂解的细胞组合物与第一碱接触,然后加热、搅动或其组合并随后与第二碱接触,以提供处理的裂解细胞乳液。

[0143] 在一些实施方式中,第一碱和/或第二碱具有1至12、1至10、1至8、1至6、1至5、2至12、2至10、2至8、2至6、2至5、3至10、3至6、3至5、4至10、4至8、4至6、5至10或5至8的pK_b。在本文中使用,术语“pK_b”是指碱的碱结合常数K_b的负对数。K_b是指碱在水中电离的平衡常数,其中:

[0144] $B + H_2O \rightleftharpoons HB^+ + OH^-$; and 并且

[0145] 碱的K_b被定义为

[0146] $K_b = \frac{[HB^+][OH^-]}{[B]}$

[0147] 适用于本发明的碱包括,但不限于,氢氧化物碱(例如,LiOH、NaOH、KOH、Ca(OH)₂等等及其组合)、碳酸盐碱(例如,Na₂CO₃、K₂CO₃、MgCO₃等等及其组合)、碳酸氢盐碱(例如,LiHCO₃、NaHCO₃、KHCO₃等等及其组合)及其组合。碱可以是固体形式(例如,结晶、粒剂、丸剂等等)或液体形式(例如,水溶液,醇类溶液比如在甲醇、乙醇、丙醇等等中的氢氧化物碱)及其组合。因而,溶剂可任选地存在于用于本发明的碱中。在本文中使用,“溶剂”是指疏水性的或亲脂性的试剂。在本文中使用,“疏水性的”是指排斥水团的试剂。在本文中使用,“亲脂性的”是指溶于脂质的试剂。

[0148] 在一些实施方式中,使细胞组合物或裂解的细胞组合物与碱接触使裂解的细胞组合物的pH升高。在一些实施方式中,使裂解的细胞组合物与碱接触将裂解的细胞组合物的pH升高至8或更高、9或更高、10或更高、11或更高、12或更高或将pH由7升高至13、7升高至12、7升高至11、7升高至10、7升高至9、8升高至13、8升高至12、8升高至11、8升高至10、8升高至9、9升高至12、9升高至11、9升高至10、10升高至12或10升高至11。在一些实施方式中,使裂解的细胞组合物与碱接触给组合物提供8或低于8、7或低于7、6或低于6或5或低于5的pH。

[0149] 在一些实施方式中,添加碱升高细胞组合物或裂解的细胞组合物的pH来抑制脂质氧化,因此使在裂解的细胞组合物中的自由基的量最小化,使得从本发明的工艺中获得的粗制脂质具有低过氧化物值(例如,5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小)和/或低茴香胺值(例如,26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小)。在本文中使用,术语“过氧化物值”或“PV”是指脂质氧化期间产生的初级反应产

物,比如过氧化物和氢过氧化物的测量值。在本文中使用时,过氧化物值以meq/kg的形式测量。在本文中使用时,术语“茴香胺值”或“AV”是指脂质氧化期间产生的二级反应产物,比如醛和酮的测量值。

[0150] 在一些实施方式中,使用电子顺磁共振谱仪,例如Bruker BioSpin e-scan EPR (系统号SC0274)(Bruker BioSpin,Billerica,MA),检测用碱调pH之后裂解的细胞组合物中的自由基。在一些实施方式中,在测量EPR之前,以约1:1比率用去离子水稀释裂解的细胞组合物样品。在一些实施方式中,为了测量EPR,将自旋捕捉化学品添加至裂解的细胞组合物样品。在一些实施方式中,自旋捕捉化学品是本领域中已知的任何自旋捕捉化学品,包括,但不限于,POBN(α -(4-吡啶基1-氧化物)-N-叔-丁基硝酮)或DMP0(5,5-二甲基-1-吡咯啉-N-氧化物)。在一些实施方式中,自旋捕捉化学品是约1.25M,且将约50 μ L自旋捕捉化学品添加至约0.5克裂解的细胞组合物样品。在一些实施方式中,将含有自旋捕捉化学品的样品在室温(例如,约20°C)下孵育。在一些实施方式中,使用了下述光谱仪参数:约86Hz的调制频率、约2高斯的调制振幅、约5mW的微波功率、约20秒的时间常量、约10秒的扫描时间、约100高斯的扫描宽度和扫描次数约为8。随着时间推移测量EPR,以测定在脂质中存在的自由基浓度。在一些实施方式中,在四小时时间段上每小时测量一次EPR。一些实施方式中,在上述列出的参数下,4小时之后,裂解细的胞组合物具有小于 0.15×10^6 、小于 0.14×10^6 、小于 0.13×10^6 、小于 0.12×10^6 、小于 0.11×10^6 、小于 0.1×10^6 、小于 0.09×10^6 、小于 0.08×10^6 、小于 0.07×10^6 、小于 0.06×10^6 或小于 0.05×10^6 的EPR信号强度(强度或振幅)。在一些实施方式中,裂解的细胞组合物具有 0.05×10^6 至 0.15×10^6 、 0.05×10^6 至 0.14×10^6 、 0.05×10^6 至 0.13×10^6 、 0.05×10^6 至 0.12×10^6 、 0.05×10^6 至 0.11×10^6 、 0.05×10^6 至 0.1×10^6 、 0.05×10^6 至 0.09×10^6 、 0.07×10^6 至 0.15×10^6 、 0.07×10^6 至 0.13×10^6 、 0.07×10^6 至 0.11×10^6 、 0.08×10^6 至 0.14×10^6 、 0.08×10^6 至 0.12×10^6 、 0.08×10^6 至 0.1×10^6 、 0.09×10^6 至 0.13×10^6 或 0.09×10^6 至 0.11×10^6 的EPR。在一些实施方式中,导致上述指定EPR的裂解的细胞组合物的pH是8至12、8至11、8至10、8至9、9至12、9至11、9至10、10至12或10至11。在一些实施方式中,具有上述指定EPR信号强度的裂解的细胞组合物导致粗制脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的AV。在一些实施方式中,具有上述指定EPR的裂解的细胞组合物导致粗制脂质具有5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的PV。

[0151] 在一些实施方式中,工艺包括使细胞组合物或裂解的细胞组合物与盐接触以使裂解的细胞组合物破乳。在本文中使用时,“盐”是指通过用金属(例如,碱金属、碱土金属、过渡金属等等)或正电荷化合物(例如, NH_4^+ 等等)替代酸的氢离子形成的离子化合物。适用于本发明的盐包括,但不限于,碱金属盐、碱土金属盐等等及其组合。在用于本发明的盐中存在的负电荷离子种类包括,但不限于,卤化物、硫酸根、硫酸氢根、亚硫酸根、磷酸根、磷酸氢根、二氢磷酸根、碳酸根、碳酸氢根等等及其组合。在一些实施方式中,用于本发明的盐选自:氯化钠、硫酸钠、碳酸钠、氯化钙、硫酸钾、硫酸镁、谷氨酸一钠、硫酸铵、氯化钾、氯化铁、硫酸铁、硫酸铝硫酸盐及其组合。在一些实施方式中,盐不包括NaOH。盐可作为固体(例如,以结晶、非结晶、丸状和/或颗粒形式)添加和/或做为含有例如水、醇类等等及其组合的溶液(例如,稀释溶液、饱和溶液或过度-饱和溶液)添加。

[0152] 在一些实施方式中,以5g/l至25g/l、5g/l至10g/l、10g/l至15g/l、15g/l至20g/l、

20g/l至25g/l或10g/l至20g/l的量添加盐。

[0153] 在一些实施方式中,当添加盐时,细胞组合物或裂解的细胞组合物的温度小于或等于60℃、小于或等于55℃、小于或等于45℃、小于或等于40℃、小于或等于35℃、小于或等于30℃或小于或等于25℃,以使细胞组合物或裂解的细胞组合物破乳。在一些实施方式中,当添加盐时,裂解的细胞组合物的温度是0℃至60℃、0℃至55℃、0℃至50℃、0℃至45℃、0℃至40℃、0℃至35℃、0℃至30℃、0℃至25℃、20℃至60℃、20℃至55℃、20℃至50℃、20℃至45℃、20℃至40℃、20℃至35℃、20℃至30℃、30℃至60℃、30℃至55℃、30℃至50℃、30℃至45℃、30℃至40℃、30℃至40℃、40℃至60℃、40℃至55℃、40℃至50℃或50℃至60℃至,以使细胞组合物或裂解的细胞组合物破乳。

[0154] 在一些实施方式中,工艺包括使细胞组合物或裂解的细胞组合物与按重量计相对于裂解的细胞组合物或细胞组合物的20%或更少、15%或更少、10%或更少、7.5%或更少、5%或更少或2%或更少的盐接触。在一些实施方式中,工艺包括使细胞组合物或裂解的细胞组合物与按重量计细胞组合物或裂解的细胞组合物(例如,总发酵液重量)的0.1%至20%、0.1%至15%、0.1%至10%、0.5%至20%、0.5%至15%、0.5%至10%、0.5%至5%、0.5%至4%、0.5%至3%、0.5%至2.5%、0.5%至2%、0.5%至1.5%、0.5%至1%、1%至20%、1%至15%、1%至10%、1%至5%、1%至4%、1%至3%、1%至2.5%、1%至2%、1%至1.5%、1.5%至5%、1.5%至4%、1.5%至3%、1.5%至2.5%、1.5%至2%、2%至20%、2%至15%、2%至10%、2%至5%、2%至4%、2%至3%、2%至2.5%、2.5%至5%、2.5%至4%、2.5%至3%、3%至5%、3%至4%、4%至5%、5%至20%、5%至15%、5%至10%、10%至20%、10%至15%或15%至20%的盐接触。例如,与按重量计0.5%至20%的盐接触,当裂解的细胞组合物重1,000kg时,需要5kg至200kg的盐与裂解的细胞组合物组合。

[0155] 在一些实施方式中,方法包括加热细胞组合物或裂解的细胞组合物以使裂解的细胞组合物破乳。在一些实施方式中,针对碱和/或盐,将细胞组合物或裂解的细胞组合物加热足够的时间段,以使细胞组合物或裂解的细胞组合物破乳。在一些实施方式中,方法包括加热细胞组合物或裂解的细胞组合物至少5分钟、至少10分钟、至少20分钟、至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少4小时、至少8小时、至少12小时、至少18小时、至少24小时、至少30小时、至少36小时、至少42小时、至少48小时、至少54小时、至少60小时、至少66小时、至少72小时、至少78小时、至少84小时、至少90小时或至少96小时。在一些实施方式中,方法包括加热裂解的细胞组合物5分钟至96小时、5分钟至4小时、5分钟至2小时、5分钟至1小时、10分钟至4小时、10分钟至2小时、10分钟至1小时、1小时至96小时、1小时至84小时、1小时至72小时、1小时至60小时、1小时至48小时、1小时至36小时、1小时至24小时、1小时至4小时、4小时至96小时、4小时至84小时、4小时至72小时、4小时至60小时、4小时至48小时、4小时至36小时、4小时至24小时、8小时至96小时、8小时至84小时、8小时至72小时、8小时至60小时、8小时至48小时、8小时至36小时、8小时至24小时、8小时至12小时、12小时至96小时、12小时至84小时、12小时至72小时、12小时至60小时、12小时至48小时、12小时至36小时、12小时至24小时、24小时至96小时、24小时至84小时、24小时至72小时、24小时至60小时、24小时至48小时或24小时至36小时。

[0156] 在一些实施方式中,细胞组合物或裂解的细胞组合物可在至少10℃、至少20℃、至少25℃、至少30℃、至少35℃、至少40℃、至少45℃、至少50℃、至少55℃、至少60℃、至少65℃、至少70℃、至少75℃、至少80℃、至少85℃、至少90℃、至少95℃或至少100℃的温度下加

热。在一些实施方式中,工艺包括在10°C至100°C、10°C至90°C、10°C至80°C、10°C至70°C、20°C至100°C、20°C至90°C、20°C至80°C、20°C至70°C、30°C至100°C、30°C至90°C、30°C至80°C、30°C至70°C、40°C至100°C、40°C至90°C、40°C至80°C、50°C至100°C、50°C至90°C、50°C至80°C、50°C至70°C、60°C至100°C、60°C至90°C、60°C至80°C、70°C至100°C、70°C至90°C、80°C至100°C、80°C至90°C或90°C至100°C的温度下加热细胞组合物或裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,可在加热期间,将盐添加至细胞组合物或裂解的细胞组合物。

[0157] 在一些实施方式中,可在封闭系统或具有蒸发器的系统中加热细胞组合物或裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,细胞组合物或裂解的细胞组合物可在具有蒸发器的系统中加热,使得在细胞组合物或裂解的细胞组合物中存在的一部分水通过蒸发去除。在一些实施方式中,工艺包括在具有蒸发器的系统中加热细胞组合物或裂解的细胞组合物以去除在细胞组合物或裂解的细胞组合物中存在的按重量计高至1%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%的水。在一些实施方式中,工艺包括在具有蒸发器的系统中加热细胞组合物或裂解的细胞组合物,以去除1%至50%、1%至45%、1%至40%、1%至35%、1%至30%、1%至25%、1%至20%、1%至15%、1%至10%、1%至5%、5%至50%、5%至45%、5%至40%、5%至35%、5%至30%、5%至25%、5%至20%、5%至15%、5%至10%、10%至50%、10%至45%、10%至40%、10%至35%、10%至30%、10%至25%、10%至20%、10%至15%、15%至50%、15%至45%、15%至40%、15%至35%、15%至30%、15%至25%、15%至20%、20%至50%、20%至45%、20%至40%、20%至35%、20%至30%、20%至25%、25%至50%、25%至45%、25%至40%、25%至35%、25%至30%、30%至50%、30%至45%、30%至40%、30%至35%、35%至50%、35%至45%、35%至40%、40%至50%、40%至45%或45%至50%的水。

[0158] 在一些实施方式中,方法包括将细胞组合物或裂解的细胞组合物在器皿中保留预定的时间以使裂解的细胞组合物破乳。在一些实施方式中,方法包括将细胞组合物或裂解的细胞组合物在器皿中保留至少5分钟、至少10分钟、至少20分钟、至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少4小时、至少8小时、至少12小时、至少18小时、至少24小时、至少30小时、至少36小时、至少42小时、至少48小时、至少54小时、至少60小时、至少66小时、至少72小时、至少78小时、至少84小时、至少90小时或至少96小时。在一些实施方式中,方法包括将细胞组合物或裂解的细胞组合物保留5分钟至96小时、5分钟至4小时、5分钟至2小时、5分钟至1小时、10分钟至4小时、10分钟至2小时、10分钟至1小时、1小时至96小时、1小时至84小时、1小时至72小时、1小时至60小时、1小时至48小时、1小时至36小时、1小时至24小时、1小时至4小时、4小时至96小时、4小时至84小时、4小时至72小时、4小时至60小时、4小时至48小时、4小时至36小时、4小时至24小时、8小时至96小时、8小时至84小时、8小时至72小时、8小时至60小时、8小时至48小时、8小时至36小时、8小时至24小时、8小时至12小时、12小时至96小时、12小时至84小时、12小时至72小时、12小时至60小时、12小时至48小时、12小时至36小时、12小时至24小时、24小时至96小时、24小时至84小时、24小时至72小时、24小时至60小时、24小时至48小时或24小时至36小时。

[0159] 在一些实施方式中,方法包括使抗氧化剂与裂解细胞乳液接触。适用于本发明的抗氧化剂包括,但不限于,生育酚、生育三烯酚、多酚、白藜芦醇、类黄酮、类胡萝卜素、番茄红素、胡萝卜素、叶黄素、抗坏血酸、抗坏血酸棕榈酸酯等等及其组合。

[0160] 在一些实施方式中,方法包括允许乳化的裂解的细胞组合物静置(stand),其中使用重力将脂质从乳化的裂解的细胞组合物中分离出。

[0161] 在本文中使用时,术语“搅动(agitating)”和“搅动(agitation)”是指通过施加力影响裂解的细胞组合物运动的工艺。在一些实施方式中,本发明的工艺包括通过搅拌、混合、掺和、摇动、振动或其组合来搅动细胞组合物或裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,搅动细胞组合物或裂解的细胞组合物的工艺使细胞组合物或裂解的细胞组合物破乳。

[0162] 在一些实施方式中,本发明的工艺包括以裂解的细胞组合物的0.1hp/1,000gal至10hp/1,000gal、0.5hp/1,000gal至8hp/1,000gal、1hp/1,000gal至6hp/1,000gal或2hp/1,000gal至5hp/1,000gal搅动裂解的细胞组合物。

[0163] 在一些实施方式中,本发明的工艺包括使用搅拌器搅动细胞组合物或裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,搅拌器是分散细胞组合物或裂解的细胞组合物中的碱和/或盐的分散型搅拌器。在一些实施方式中,搅拌器具有一个或多个叶轮。在本文中使用时,“叶轮”是指当旋转时给细胞组合物或裂解的细胞组合物传递运动的设备。适用于本发明的叶轮包括直叶片叶轮、拉什顿(Rushton)叶片叶轮、轴流叶轮、辐流式叶轮、凹叶圆盘叶轮、高效率叶轮、螺旋桨、桨、涡轮等等及其组合。在一些实施方式中,工艺包括使用叶轮浆尖速度为90ft/min至1,200ft/min、200ft/min至1,000ft/min、300ft/min至800ft/min、400ft/min至700ft/min或500ft/min至600ft/min的搅拌器搅动细胞组合物或裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,工艺包括使用具有叶轮浆尖速度为350厘米/秒至900厘米/秒、350厘米/秒至850厘米/秒、350厘米/秒至800厘米/秒、350厘米/秒至750厘米/秒、350厘米/秒至700厘米/秒、350厘米/秒至650厘米/秒、350厘米/秒至600厘米/秒、350厘米/秒至550厘米/秒、350厘米/秒至500厘米/秒、350厘米/秒至450厘米/秒、350厘米/秒至400厘米/秒、400厘米/秒至900厘米/秒、400厘米/秒至850厘米/秒、400厘米/秒至800厘米/秒、400厘米/秒至750厘米/秒、400厘米/秒至700厘米/秒、400厘米/秒至650厘米/秒、400厘米/秒至600厘米/秒、400厘米/秒至550厘米/秒、400厘米/秒至500厘米/秒、400厘米/秒至450厘米/秒、450厘米/秒至900厘米/秒、450厘米/秒至850厘米/秒、450厘米/秒至800厘米/秒、450厘米/秒至750厘米/秒、450厘米/秒至700厘米/秒、450厘米/秒至650厘米/秒、450厘米/秒至600厘米/秒、450厘米/秒至550厘米/秒、450厘米/秒至500厘米/秒、500厘米/秒至900厘米/秒、500厘米/秒至850厘米/秒、500厘米/秒至800厘米/秒、500厘米/秒至750厘米/秒、500厘米/秒至700厘米/秒、500厘米/秒至650厘米/秒、500厘米/秒至600厘米/秒、500厘米/秒至550厘米/秒、550厘米/秒至900厘米/秒、550厘米/秒至850厘米/秒、550厘米/秒至800厘米/秒、550厘米/秒至750厘米/秒、550厘米/秒至700厘米/秒、550厘米/秒至650厘米/秒、550厘米/秒至600厘米/秒、600厘米/秒至900厘米/秒、600厘米/秒至850厘米/秒、600厘米/秒至800厘米/秒、600厘米/秒至750厘米/秒、600厘米/秒至700厘米/秒、600厘米/秒至650厘米/秒、650厘米/秒至900厘米/秒、650厘米/秒至850厘米/秒、650厘米/秒至800厘米/秒、650厘米/秒至750厘米/秒、650厘米/秒至700厘米/秒、700厘米/秒至900厘米/秒、700厘米/秒至850厘米/秒、700厘米/秒至800厘米/秒、700厘米/秒至750厘米/秒、750厘米/秒至900厘米/秒、750厘米/秒至850厘米/秒或850厘米/秒至900厘米/秒的搅拌器搅动细胞组合物或裂解的细胞组合物。在本文中使用时,“叶轮浆尖速度”是指当叶轮围绕其中心轴旋转时叶轮的外部最大部分的速度。

[0164] 在一些实施方式中,搅动(和任选地本文中所述的额外的步骤)在包含叶轮的容器

中进行,其中叶轮直径与容器体积的比率是0.1至0.5、0.1至0.4、0.2至0.5、0.2至0.4、0.3至0.5或0.3至0.4。

[0165] 在一些实施方式中,搅动(和任选地本文中所述的额外的步骤)在包含叶轮的容器中进行,其中叶轮直径与容器内径的比率是至少0.25、至少0.34、至少0.65、0.25至0.65、0.25至0.33、0.3至0.6、0.3至0.5、0.3至0.4、0.34至0.65、0.34至0.6、0.34至0.55、0.37至0.55、0.4至0.65、0.4至0.6、0.4至0.5或0.42至0.55。

[0166] 在一些实施方式中,搅动包括混合细胞组合物或裂解的细胞组合物,使得细胞组合物或裂解的细胞组合物处于由雷诺数为10至10,000、1,000至10,000、1,500至10,000或2,000至10,000所描述的流动条件。在一些实施方式中,搅动期间,裂解细胞乳液具有2,000或更大、3,000或更大或5,000或更大或2,000至10,000、3,000至10,000或5,000至10,000的雷诺数。

[0167] 在一些实施方式中,工艺包括搅动细胞组合物或裂解的细胞组合物至少5分钟、至少10分钟、至少20分钟、至少30分钟、至少1小时、至少2小时、至少4小时、至少8小时、至少12小时、至少18小时、至少24小时、至少30小时、至少36小时、至少42小时、至少48小时、至少54小时、至少60小时、至少66小时、至少72小时、至少78小时、至少84小时、至少90小时或至少96小时。在一些实施方式中,工艺包括搅动细胞组合物或裂解的细胞组合物5分钟至96小时、5分钟至4小时、5分钟至2小时、5分钟至1小时、10分钟至4小时、10分钟至2小时、10分钟至1小时、1小时至96小时、1小时至84小时、1小时至72小时、1小时至60小时、1小时至48小时、1小时至36小时、1小时至24小时、1小时至4小时、4小时至96小时、4小时至84小时、4小时至72小时、4小时至60小时、4小时至48小时、4小时至36小时、4小时至24小时、8小时至96小时、8小时至84小时、8小时至72小时、8小时至60小时、8小时至48小时、8小时至36小时、8小时至24小时、8小时至12小时、12小时至96小时、12小时至84小时、12小时至72小时、12小时至60小时、12小时至48小时、12小时至36小时、12小时至24小时、20小时至40小时、24小时至96小时、24小时至84小时、24小时至72小时、24小时至60小时、24小时至48小时或24小时至36小时。

[0168] 在一些实施方式中,工艺包括同时搅动并加热细胞组合物或裂解的细胞组合物,以使细胞组合物或裂解的细胞组合物破乳。在一些实施方式中,工艺包括在至少10°C、至少20°C、至少25°C、至少30°C、至少35°C、至少40°C、至少45°C、至少50°C、至少55°C、至少60°C、至少65°C、至少70°C、至少75°C、至少80°C、至少85°C、至少90°C、至少95°C或至少100°C的温度下搅动细胞组合物或裂解的细胞组合物。在一些实施方式中,工艺包括在10°C至100°C、10°C至90°C、10°C至80°C、10°C至70°C、20°C至100°C、20°C至90°C、20°C至80°C、20°C至70°C、30°C至100°C、30°C至90°C、30°C至80°C、30°C至70°C、40°C至100°C、40°C至90°C、40°C至80°C、50°C至100°C、50°C至90°C、50°C至80°C、50°C至70°C、60°C至100°C、60°C至90°C、60°C至80°C、70°C至100°C、70°C至90°C、80°C至100°C、80°C至90°C或90°C至100°C的温度下搅动细胞组合物或裂解的细胞组合物。

[0169] 在一些实施方式中,形成裂解的细胞组合物、使裂解的细胞组合物与碱接触或升高裂解的细胞组合物的pH、使裂解的细胞组合物与盐接触、加热裂解的细胞组合物和搅动裂解的细胞组合物的多种组合可在单个器皿中发生。在一些实施方式中,形成细胞组合物、使细胞组合物与碱接触或升高细胞组合物的pH、使细胞组合物与盐接触、加热细胞组合物

和搅动细胞组合物的多种组合可在单个器皿中发生。在一些实施方式中,单个器皿包括发酵器皿。在一些实施方式中,发酵器皿可具有至少20,000升、至少50,000升、至少100,000升、至少120,000升、至少150,000升、至少200,000升或至少220,000升。在一些实施方式中,发酵器皿可具有20,000升至220,000升、20,000升至100,000升、20,000升至50,000升、50,000升至220,000升、50,000升至150,000升、50,000升至100,000升、100,000升至220,000升、100,000升至150,000升、100,000升至120,000升、150,000升至220,000升、150,000升至200,000升或200,000升至220,000升的体积。

[0170] 在一些实施方式中,一定量的在器皿中形成的细胞组合物或裂解的细胞组合物可转移至一个或多个搅动器皿。在一些实施方式中,搅动器皿可具有至少20,000升、至少30,000升、至少40,000升或至少50,000升的体积。在一些实施方式中,搅动器皿可具有20,000升至50,000升、20,000升至40,000升、20,000升至30,000升、30,000升至50,000升、30,000升至40,000升或40,000升至50,000升的体积。

[0171] 在一些实施方式中,搅动器皿可具有下述特性的任何组合。在一些实施方式中,搅动器皿可具有两个叶轮。在一些实施方式中,叶轮是拉什顿叶片叶轮。在一些实施方式中,叶轮通过至少等于最小叶轮直径的距离彼此分离。在一些实施方式中,叶轮从这一头到那一头为30英寸至40英寸、33英寸至37英寸、33英寸、34英寸、35英寸、36英寸或37英寸。在一些实施方式中,搅动器皿具有至少10,000升、至少20,000升、至少30,000升、至少40,000升或至少50,000升的体积。在一些实施方式中,搅动器皿具有90英寸至110英寸、95英寸至105英寸、98英寸、99英寸、100英寸、101英寸或102英寸的内径。在一些实施方式中,第一个叶轮位于从搅动器皿底部15英寸至20英寸、16英寸至19英寸或17英寸至18英寸处,并且第二个叶轮位于第一个叶轮上面60英寸至80英寸、65英寸至75英寸、68英寸、69英寸、70英寸、71英寸、72英寸、73英寸、74英寸或75英寸处。在一些实施方式中,裂解的细胞组合物以至少50rpm、至少60rpm或至少70rpm搅动。在一些实施方式中,裂解的细胞组合物以50rpm至70rpm、50rpm至60rpm或60rpm至70rpm搅动。

[0172] 在一些实施方式中,通过抽吸器皿中的细胞组合物、裂解的细胞组合物或脂质而从器皿中收获细胞组合物、裂解的细胞组合物或脂质。在一些实施方式中,从器皿中收获细胞组合物、裂解的细胞组合物或脂质而不搅动器皿。在一些实施方式中,通过抽吸而不搅动来自器皿的细胞组合物、裂解的细胞组合物或脂质,从器皿中收获细胞组合物、裂解的细胞组合物或脂质。在一些实施方式中,从器皿中收获细胞组合物、裂解的细胞组合物或脂质而不吹入空气。在一些实施方式中,通过上述技术收获细胞组合物、裂解的细胞组合物或脂质,导致粗制脂质具有低的(例如,26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小)茴香胺值和/或低的(例如,100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小)磷含量。

[0173] 如本文中所述的,本发明利用使裂解的细胞组合物与第一碱接触接触或升高裂解的细胞组合物的pH、使裂解的细胞组合物与盐接触、加热裂解的细胞组合物和搅动裂解的细胞组合物的多种组合,以提供处理的裂解的细胞组合物。如本文中所述的,本发明利用使

细胞组合物与第一碱接触或升高细胞组合物的pH、使细胞组合物与盐接触、加热细胞组合物和搅动细胞组合物的多种组合,以提供处理的细胞组合物。较之未处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物,处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物被至少部分破乳。因而,处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物可放在离心机中并且可在其中分离脂质。

[0174] 在一些实施方式中,在例如通过与第一碱接触升高细胞组合物或裂解的细胞组合物的pH之后,加热细胞组合物或裂解的细胞组合物和/或搅动细胞组合物或裂解的细胞组合物可减小处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物的pH。为了通过离心使脂质更有效地从处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物中分离出,将处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物的pH第二次升高,例如通过使处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物与第二碱接触来实现。在一些实施方式中,使处理的裂解的细胞组合物与第二碱接触升高处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物的pH。在一些实施方式中,将处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物与第二碱接触,以将处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物的pH升高至7或更高、7.5或更高、8或更高、8.5或更高、9或更高、9.5或更高、10或更高、10.5或更高、11或更高、11.5或更高或12或更高。在一些实施方式中,将处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物与第二碱接触,以将处理的裂解的细胞组合物的pH升高至7至13、7至12、7至11、7至10、7至9、7至8、7至7.5、7.5至8、8至13、8至12、8至11、8至10、8至9、8至8.5、8.5至9、9至12、9至11、9至10、9至9.5、9.5至10、10至12或10至11。

[0175] 在一些实施方式中,处理的细胞组合物或处理的裂解细胞乳液的pH是7或更小、6或更小、5或更小、4或更小或3或更小。

[0176] 本发明的工艺包括从处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物中分离脂质。在一些实施方式中,在使裂解细胞乳液与第二碱接触之后、在搅动裂解细胞乳液之后或在使裂解细胞乳液与盐接触之后,通过例如使处理的裂解细胞乳液静止足够使脂质从处理的裂解细胞乳液(例如,作为分离层)分离的时间段,使脂质与裂解细胞乳液分离。可例如,通过倾析、撇沫、抽真空、抽吸、吸取、抽取、虹吸或其他从处理的裂解细胞乳液表面去除脂质的方式,随后去除脂质。

[0177] 在一些实施方式中,分离包括对处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物(例如,在30℃至100℃温度下)离心,离心使脂质从处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物分离出。

[0178] 在一些实施方式中,工艺包括在至少10℃、至少20℃、至少25℃、至少30℃、至少35℃、至少40℃、至少45℃、至少50℃、至少55℃、至少60℃、至少65℃、至少70℃、至少75℃、至少80℃、至少85℃、至少90℃、至少95℃或至少100℃的温度下对处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物离心。在一些实施方式中,工艺包括在10℃至100℃、10℃至90℃、10℃至80℃、20℃至100℃、20℃至90℃、20℃至80℃、25℃至100℃、25℃至90℃、25℃至80℃、25℃至75℃、30℃至100℃、30℃至90℃、30℃至80℃、40℃至100℃、40℃至90℃、40℃至80℃、50℃至100℃、50℃至90℃、50℃至80℃、50℃至70℃、60℃至100℃、60℃至90℃、60℃至80℃、60℃至70℃、70℃至100℃或70℃至90℃的温度下对处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物离心。

[0179] 在一些实施方式中,以1千克/分钟(kg/min)至500kg/min、1kg/min至400kg/min、

1kg/min至300kg/min、1kg/min至200kg/min、1kg/min至100kg/min、1kg/min至75kg/min、1kg/min至50kg/min、1kg/min至40kg/min、1kg/min至30kg/min、1kg/min至25kg/min、1kg/min至10kg/min、10kg/min至500kg/min、10kg/min至400kg/min、10kg/min至300kg/min、10kg/min至200kg/min、10kg/min至100kg/min、10kg/min至75kg/min、10kg/min至50kg/min、10kg/min至40kg/min、10kg/min至30kg/min、20kg/min至500kg/min、20kg/min至400kg/min、20kg/min至300kg/min、20kg/min至200kg/min、20kg/min至100kg/min、20kg/min至75kg/min、20kg/min至50kg/min、20kg/min至40kg/min、25kg/min至500kg/min、25kg/min至400kg/min、25kg/min至300kg/min、25kg/min至200kg/min、25kg/min至100kg/min、25kg/min至75kg/min、25kg/min至50kg/min、30kg/min至60kg/min、30kg/min至50kg/min、30kg/min至40kg/min、50kg/min至500kg/min、100kg/min至500kg/min或200kg/min至500kg/min的(处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物进入离心机的)补料速度,进行离心。

[0180] 分离需要的总时间可取决于处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物的体积而改变。用于分离的典型的总时间(例如,离心时间)是至少0.1小时、至少0.2小时、至少0.5小时、至少1小时、至少2小时、至少4小时、至少6小时、至少8小时、至少10小时、至少12小时或0.1小时至24小时、0.5小时至24小时、1小时至12小时、2小时至10小时或4小时至8小时。

[0181] 在一些实施方式中,本发明的工艺包括以1,000g至25,000g、1,000g至20,000g、1,000g至10,000g、2,000g至25,000g、2,000g至20,000g、2,000g至15,000g、3,000g至25,000g、3,000g至20,000g、5,000g至25,000g、5,000g至20,000g、5,000g至15,000g、5,000g至10,000g、5,000g至8,000g、10,000g至25,000g、15,000g至25,000g或至少1,000g、至少2,000g、至少4,000g、至少5,000g、至少7,000g、至少8,000g、至少10,000g、至少15,000g、至少20,000g或至少25,000g的离心力离心处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物。在本文中使用时,“g”是指标准重力或大约 9.8m/s^2 。在一些实施方式中,本发明的工艺包括以4,000rpm至14,000rpm、4,000rpm至10,000rpm、6,000rpm至14,000rpm、6,000rpm至12,000rpm、8,000rpm至14,000rpm、8,000rpm至12,000rpm或8,000rpm至10,000rpm对处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物离心。

[0182] 在一些实施方式中,本发明的工艺包括从处理的细胞组合物或处理的裂解的细胞组合物分离脂质之后干燥脂质,以从脂质中去除水。在一些实施方式中,干燥脂质可包括,但不限于加热脂质以蒸发水。在一些实施方式中,在干燥之后,脂质具有按重量计少于3%、少于2.5%、少于2%、少于1.5%、少于1%、少于0.5%、少于0.1%或0%的脂质的水含量百分比。在一些实施方式中,在干燥之后,脂质具有按重量计0%至3%、0%至2.5%、0%至2%、0%至1.5%、0%至1%、0%至0.5%、0.1%至3%、0.1%至2.5%、0.1%至2%、0.1%至1.5%、0.1%至1%、0.1%至0.5%、0.5%至3%、0.5%至2.5%、0.5%至2%、0.5%至1.5%、0.5%至1%、1%至3%、1%至2.5%、1%至2%、1%至1.5%、1.5%至3%、1.5%至2.5%、1.5%至2%、2%至3%、2%至2.5%或2.5%至3%的脂质的水含量百分比。

[0183] 在一些实施方式中,工艺还包括通过选自碱精制、脱胶、碱-精制、漂白、脱臭、脱酸等等及其组合的一种或多种工艺来精制脂质,以去除一种或多种磷脂、游离脂肪酸、磷脂、发色体、甾醇、气味和其他杂质。在本文中使用时,“精制油”是已被精制的粗制脂质或粗制

油。在本文中使用时，“粗制脂质”或“粗制油”是未被精制的脂质或油。在一些实施方式中，从破乳的细胞组合物中分离的脂质是粗制脂质。

[0184] 图1-4中示意性描述了本发明的多种示例性工艺。关于图1，在一些实施方式中，本发明涉及从细胞(101)获得脂质(110)的工艺(100)，包括裂解(102)细胞(101)以形成裂解的细胞组合物(103)。将裂解的细胞组合物与第一碱(104)接触以使裂解的细胞组合物(103)破乳，与盐(105)接触以使裂解的细胞组合物(103)破乳并加热(106)，例如加热10分钟至96小时，以提供处理的裂解的细胞组合物(107)。将处理的裂解的细胞组合物(107)与第二碱(108)接触并在例如10℃至100℃的温度下分离(109)，以提供脂质(110)。

[0185] 关于图2，在一些实施方式中，本发明涉及用于从细胞获得脂质(210)的工艺(200)，所述工艺包括裂解(102)细胞(101)以形成裂解的细胞组合物(103)。接着将裂解的细胞组合物与碱(204)接触以使裂解的细胞组合物(103)破乳并提供处理的裂解的细胞组合物(207)。将处理的裂解的细胞组合物(207)在例如10℃至100℃的温度下分离(209)，以提供脂质(210)。

[0186] 关于图3，在一些实施方式中，本发明涉及用于从细胞获得脂质(310)的工艺(300)，所述工艺包括裂解(102)细胞(101)以形成裂解的细胞组合物(103)。接着将裂解的细胞组合物与盐接触(305)以使裂解的细胞组合物(103)破乳并提供处理的裂解的细胞组合物(307)，其在例如10℃至100℃的温度下分离(309)，以提供脂质(310)。

[0187] 关于图4，在一些实施方式中，本发明涉及用于从细胞获得脂质(410)的工艺(400)，所述工艺包括裂解(102)细胞(101)以形成裂解的细胞组合物(103)。接着将裂解的细胞组合物与盐(405)接触以使裂解的细胞组合物(103)破乳并搅动(401)，例如搅动5分钟至96小时，和任选地加热(402)，以提供处理的裂解的细胞组合物(407)。接着将处理的裂解的细胞组合物在例如10℃至100℃的温度下分离(409)，以提供脂质(410)。

[0188] 在一些实施方式中，本发明的工艺包括浓缩包含微生物细胞的发酵液、包含植物材料发酵液，和/或浓缩裂解的细胞组合物。在本文中使用时，“浓缩”是指从组合物中去除水。浓缩可包括，但不限于蒸发、化学干燥、离心等等及其组合。

[0189] 在一些实施方式中，包含微生物细胞的发酵液或包含植物材料的发酵液浓缩，以提供按重量计发酵液的至少4%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%或至少30%的脂质浓度。在一些实施方式中，将包含微生物细胞的发酵液或包含植物材料的发酵液浓缩，以提供按重量计发酵液的至40%、4%至30%、4%至20%、4%至15%、5%至40%、5%至30%、5%至20%、10%至40%、10%至30%、10%至20%、15%至40%、15%至30%、20%至40%、20%至30%、25%至40%或30%至40%的脂质浓度。

[0190] 在一些实施方式中，将细胞组合物或裂解的细胞组合物浓缩，以提供按重量计相对于裂解的细胞组合物的至少4%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%或至少30%的脂质浓度。在一些实施方式中，将细胞组合物或裂解的细胞组合物浓缩，以提供按重量计相对于裂解的细胞组合物的4%至40%、4%至30%、4%至20%、4%至15%、5%至40%、5%至30%、5%至20%、10%至40%、10%至30%、10%至20%、15%至40%、15%至30%、20%至40%、20%至30%、25%至40%或30%至40%的脂质浓度。

[0191] 在一些实施方式中，通过本发明的工艺制备的脂质具有2或更小的总香气强度。在本文中使用时，术语“总香气强度”是指由一组感觉分析员给予脂质的嗅觉感觉等级。在本

文中使用时,术语“感觉分析员”是指对物质的感觉特征提供反馈和/或评定物质的感觉特征的受过训练的个体。

[0192] 在一些实施方式中,通过本发明的工艺制备的脂质具有3或更小的总香味强度。在本文中使用时,术语“总香味强度”是指由一组感觉分析员给予脂质的味觉或味道感觉等级。在一些实施方式中,Universal Spectrum描述性分析方法用来评估样品的香气和香味特征。该方法使用0-15的强度分级,其中0=未检测出,15=非常高强度,以测量油的香气和香味属性。

[0193] 在一些实施方式中,通过本发明的工艺制备的脂质不具有表征为鱼腥味的后味。在本文中使用时,术语“后味”是指如通过一组感觉分析员表征的脂质中风味感觉的持久性。

[0194] 在一些实施方式中,本发明的工艺提供过氧化物值(PV)为5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的粗制脂质。在本文中使用时,术语“过氧化物值”或“PV”是指脂质氧化期间产生的初级反应产物,比如过氧化物和氢过氧化物的测量值。在一些实施方式中,PV是脂质质量和在脂质中已产生的氧化程度的指标。与具有大于5的PV的脂质比较,具有低PV(即,5或更小)表明增加的稳定性和感觉情况。在一些实施方式中,如上文讨论的,将碱添加至裂解的细胞组合物,升高了裂解的细胞组合物的pH并抑制脂质氧化,因此使裂解的细胞组合物中的自由基的量最小化,使得从本发明的工艺获得的粗制脂质具有低PV(即,5或更小)。

[0195] 在一些实施方式中,本发明的工艺提供茴香胺值(AV)为26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的粗制脂质。在本文中使用时,术语“茴香胺值”或“AV”是指脂质氧化期间产生的二次反应产物,比如醛和酮的测量值。在一些实施方式中,AV是脂质质量和在脂质中已产生的氧化程度的指标。与具有大于26的AV的脂质相比较,脂质具有低AV(即,26或更小)表明增加的稳定性和感觉情况。在一些实施方式中,如上文讨论的,将碱添加至裂解的细胞组合物,升高裂解的细胞组合物的pH并抑制脂质氧化,因此使裂解的细胞组合物中的自由基的量最小化,使得从本发明的工艺获得的粗制脂质具有低AV(即,26或更小)。

[0196] 在一些实施方式中,本发明的工艺提供磷含量为100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的粗制脂质。

[0197] 在一些实施方式中,与如果使用溶剂(例如,典型的己烷提取或 Friolex[®] 工艺(Westfalia Separator AG,德国))进行的提取比较,本发明的工艺提供了具有更低茴香胺值、更低过氧化物值、更低磷含量和/或更高提取产率粗制脂质。所述 Friolex[®] 工艺是如在美国专利号5,928,696和国际公开号W001/76385和W001/76715工艺中所述的,用水-可溶的有机溶剂提取脂质的工艺,所述参考文献每一篇以其整体通过引用并入本文。

[0198] 在一些实施方式中,加热裂解的细胞组合物引起二次反应产物(例如,醛和酮)与在裂解的细胞组合物中存在的蛋白参与类似于Maillard反应的反应。反应被认为产生具有

抗氧化剂活性的产物,所述产物减少脂质氧化。在一些实施方式中,可将额外的蛋白,例如大豆蛋白添加至裂解的细胞组合物以增加抗氧化剂活性。脂质氧化减少降低了脂质AV、减少脂质任何后味和/或增加脂质稳定性。在一些实施方式中,稳定性增加至少5%、至少10%、至少15%或至少20%。

[0199] 在一些实施方式中,通过本发明的工艺提取的脂质、在提取脂质之后剩余的生物质或其组合可直接用作食物或食物成分,比如婴幼儿食物、婴儿配方、饮料、调味料、基于奶制品的食物(比如牛奶、酸奶酪、乳酪和冰激淋),油(例如,烹饪油或色拉调味汁)和烘焙商品;营养补充剂(例如,以胶囊或片剂形式);用于任何非人类动物的饲料或饲料补充剂(例如,其产物(例如,肉、牛奶或蛋)被人类消耗的那些);食物补充剂;和药物(直接或辅助治疗应用)的成分。术语“动物”是指属于动物界的任何生物体并且包括产物(例如,牛奶、蛋、家禽肉、牛肉、猪肉或羔羊肉)源自其的任何人类动物和非人类动物。在一些实施方式中,脂质和/或生物质可用在海产食物中。海产食物源自,但不限于鱼、虾和甲壳类动物。术语“产物”包括源自此类动物的任何产物,包括,但不限于肉、蛋、牛奶或其他产物。当将脂质和/或生物质饲养此类动物时,多元不饱和脂质可以掺进肉、牛奶、蛋或此类动物的其他产物中,以增加这些脂质它们的含量。

[0200] 微生物脂质

[0201] 在一些实施方式中,本发明涉及根据本发明的工艺提取的微生物脂质。在一些实施方式中,粗制微生物脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,粗制微生物脂质具有按重量计或按体积计少于5%、少于4%、少于3%、少于2%或少于1%的有机溶剂。在一些实施方式中,粗制微生物脂质具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的期望的PUFA。在一些实施方式中,粗制微生物脂质具有按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的DHA和/或按重量计至少10%、至少15%或至少20%的DPA n-6和/或按重量计至少10%、至少15%或至少20%的EPA和/或按重量计至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%或至少50%的ARA。在一些实施方式中,与如果使用溶剂进行的提取比较(例如,典型的己烷提取或Frioalex[®]工艺(Westfalia Separator AG,德国)),根据本发明的工艺提取的粗制微生物脂质导致茴香胺值更低、过氧化物值更低、磷含量更低和/或提取产率更高与。

[0202] 从第一组经分离的破囊壶菌微生物中提取脂质

[0203] 在一些实施方式中,如在美国公开号2010/0239533和国际公开号W02010/107415中描述的,本发明还涉及从破囊壶菌中提取微生物脂质,所述参考文献每一篇以其整体通过引用并入本文。在一些实施方式中,方法包括在培养基中培养破囊壶菌以产生生物质以及从生物质中提取包含 ω -3脂肪酸的脂质。脂质可从新鲜收获的生物质中提取或可从以前

收获的已存储于防止腐败的条件的生物质中提取。已知的方法可用来培养本发明的破囊壶菌,以从培养物中分离生物质并分析从生物质中提取的油的脂肪酸谱。见,例如,通过引用以其整体并入本文的美国专利号5,130,242。脂质可根据本发明的工艺提取。

[0204] 本发明的微生物脂质可以是源自微生物的任何脂质,包括,例如:从微生物生物质中提取的粗制油而没有进一步处理;通过用进一步的处理步骤,比如精制、漂白和/或脱臭处理粗制微生物油获得的精制油;通过稀释粗制或精制微生物油获得的稀释的微生物油;通过例如用进一步的纯化方法处理粗制或精制微生物油以增加油中的脂肪酸(比如DHA)浓度获得的富化(enriched)油。

[0205] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计0%、至少0.1%、至少0.2%、至少0.5%、至少约1%、至少1.5%、至少2%或至少5%的甾醇酯类级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计从0%至1.5%、0%至2%、0%至5%、1%至1.5%、0.2%至1.5%、0.2%至2%或0.2%至5%的甾醇酯类级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计少于5%、少于4%、少于3%或少于2%的甾醇酯类级分。

[0206] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%的甘油三酯级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计从65%至95%、75%至95%或按重量计80%至95%或按重量计97%或98%的甘油三酯级分。

[0207] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计至少0.5%、至少1%、至少1.5%、至少2%、至少2.5%或至少5%的游离脂肪酸级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计从0.5%至5%、0.5%至2.5%、0.5%至2%、0.5%至1.5%、0.5%至1%、1%至2.5%、1%至5%、1.5%至2.5%、2%至2.5%或2%至5%的游离脂肪酸级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计少于5%、少于4%、少于3%、少于2%或少于1%的游离脂肪酸级分。

[0208] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计至少0.5%、至少1%、至少1.5%、至少2%或至少5%的甾醇级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计从0.5%至1.5%、1%至1.5%、0.5%至2%、0.5%至5%、1%至2%或1%至5%的甾醇级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计少于5%、少于4%、少于3%、少于2%或少于1%的甾醇级分。

[0209] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计至少1.5%、至少2%、至少2.5%、至少3%、至少3.5%或至少5%的甘油二酯级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计从1.5%至3%、2%至3%、1.5%至3.5%、1.5%至5%、2.5%至3%、2.5%至3.5%或2.5%至5%的甘油二酯级分。

[0210] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计油的少于2%、少于1.5%、少于1%或少于0.5%的不可皂化物。

[0211] 在微生物油中存在的脂质种类,比如甘油三酯级分,可通过快速色谱法分离并通过薄层色谱法(TLC)分析或通过本领域中已知的其他方法分离并分析。

[0212] 在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%或至少80%的DHA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计从40%至45%、40%至50%、40%至60%、50%至60%、55%至60%、40%至65%、50%至65%、55%至65%、40%至70%、40%至80%、50%至80%、

55%至80%、60%至80%或70%至80%的DHA。在一些实施方式中,微生物脂质包含含有按重量计45%或更小、40%或更小、35%或更小、30%或更小、25%或更小、20%或更小、15%或更小或13%或更小的DHA的甾醇酯类级分。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计10%或更小、9%或更小、8%或更小、7%或更小、6%或更小、5%或更小、4%或更小、3%或更小、2%或更小或1%或更小的EPA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计从2%至3%、2%至3.5%、2.5%至3.5%、2%至6%、2.5%至6%、3.0%至6%、3.5%至6%、5%至6%或2%至10%的EPA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,基本上不含EPA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分包含至少5:1、至少7:1、至少9:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少30:1或至少50:1的DHA比EPA的重量的比率,其中微生物脂质和/或其一种或多种级分包含按重量计10%或更少的EPA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含至少5:1,但小于20:1的DHA与EPA的重量的比率。在一些实施方式中,DHA与EPA的重量的比率从5:1至18:1、从7:1至16:1或从10:1至15:1。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分包含按重量计从0.1%至0.25%、0.2%至0.25%、0.1%至0.5%或0.1%至1.5%的ARA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分包含按重量计1.5%或更少、1%或更少、0.5%或更少、0.2%或更少或0.1%或更少ARA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,基本上不含ARA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含至少20:1、至少30:1、至少35:1、至少40:1、至少60:1、至少80:1、至少100:1、至少150:1、至少200:1、至少250:1或至少300:1的DHA与ARA的重量的比率。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计从0.5%至1%、0.5%至2%、0.5%至2.5%、0.5%至3%、0.5%至3.5%、0.5%至5%、0.5%至6%、1%至2%、2%至3%、2%至3.5%、1%至2.5%、1%至3%、1%至3.5%、1%至5%或1%至6%DPA n-6。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计6%或更少、5%或更少、3%或更少、2.5%或更少、2%或更少、1%或更少或0.5%或更少的DPA n-6。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及

其组合的微生物脂质的一种或多种级分,基本上不含DPA n-6。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含大于6:1、至少8:1、至少10:1、至少15:1、至少20:1、至少25:1、至少50:1或至少100:1的DHA与DPA n-6的重量比率。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分包含按重量计5%或更少、4%或更少、3%或更少、2%或更少、1.5%或更少、1%或更少或0.5%或更少的亚麻酸(18:2n-6)、亚麻酸(18:3n-3)、二十碳烯酸(20:1n-9)和芥酸(22:1n-9)的每一种。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自甾醇酯类级分、甘油三酯级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、甘油二酯级分、极性级分(包括磷脂级分)及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计5%或更少、4%或更少、3%或更少、2%或更少、1.5%或更少或1%或更少的十七酸(17:0)。在一些实施方式中,微生物脂质和/或其一种或多种级分包含按重量计0.01%至5%、按重量计0.05%至3%或按重量计0.1%至1%的十七酸。

[0213] 在一些实施方式中,提取的微生物脂质包含按重量计至少70%的甘油三酯级分,其中甘油三酯级分的二十二碳六烯酸含量是按重量计至少50%,其中甘油三酯级分的二十二碳五烯酸n-6含量是从按重量计至少0.5%至按重量计6%,其中油具有26或更小的茴香胺值。在一些实施方式中,提取的微生物脂质包含按重量计至少70%的甘油三酯级分,其中甘油三酯级分的二十二碳六烯酸含量是按重量计至少40%,其中甘油三酯级分的二十二碳五烯酸n-6含量是从按重量计至少0.5%至按重量计6%,其中二十二碳六烯酸与二十二碳五烯酸n-6的比率大于6:1,且其中脂质具有26或更小的茴香胺值。在一些实施方式中,提取的微生物脂质包含按重量计至少70%的甘油三酯级分,其中甘油三酯级分的二十二碳六烯酸含量是按重量计至少60%,且其中脂质具有26或更小的茴香胺值。在一些实施方式中,具有任何上述脂肪酸谱的提取的微生物脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,具有任何上述脂肪酸谱的提取的微生物脂质从具有保藏于ATCC登记号PTA-9695、PTA-9696、PTA-9697或PTA-9698的破囊壶菌种的特征的经分离破囊壶菌微生物中提取。在一些实施方式中,具有任何上述脂肪酸谱的提取的微生物脂质是粗制脂质。在一些实施方式中,粗制脂质具有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。在一些实施方式中,与如果使用溶剂进行的提取(例如,典型的己烷提取或Friolex®工艺(Westfalia Separator AG,德国))相比较,根据本发明的工艺提取的微生物脂质导致茴香胺值更低、过氧化物值更低、磷含量更低和/或提取产率更高。

[0214] 从第二组经分离的破囊壶菌微生物中提取的脂质

[0215] 在一些实施方式中,如在美国申请号12/729,013和PCT/US2010/028175中描述的,本发明还涉及从破囊壶菌中提取微生物脂质,所述参考文献每一篇以其整体通过引用并入

本文。在一些实施方式中,方法包括在培养基中培养破囊壶菌以产生生物质并从生物质中提取包含 ω -3脂肪酸的脂质。脂质可从新鲜收获的生物质中提取或可从已存储于防止腐败的条件的以前收获的生物质中提取。已知的方法可用来培养本发明的破囊壶菌,以从培养物中分离生物质并分析从生物质中提取的油的脂肪酸谱。见,例如,以其整体通过引用并入本文的美国专利号5,130,242。脂质可根据本发明的工艺提取。

[0216] 本发明的微生物脂质可以是源自微生物的任何脂质,包括,例如:从微生物生物质中提取而没有进一步处理的粗制油;通过用进一步的处理步骤比如精制、漂白和/或脱臭处理粗制微生物油获得的精制油;通过稀释粗制或精制微生物油获得的稀释的微生物油;或通过例如用进一步的纯化方法处理粗制或精制微生物油以增加油中的脂肪酸(比如DHA)浓度获得的富化油。

[0217] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计0%、至少0.1%、至少0.2%、至少0.5%、至少1%、至少1.5%、至少2%或至少5%的甾醇酯类级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计0%至1.5%,0%至2%,0%至5%,1%至1.5%,0.2%至1.5%,0.2%至2%或0.2%至5%的甾醇酯类级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计5%或更小、4%或更小、3%或更小、2%或更小、1%或更小、0.5%或更小、0.3%或更小、0.2%或更小、0.5%或更小、0.4%或更小、0.3%或更小或0.2%或更小的甾醇酯类级分。

[0218] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%的三酰基甘油级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计35%至98%、35%至90%、35%至80%、35%至70%、35%至70%、35%至65%、40%至70%、40%至65%、40%至55%、40%至50%、65%至95%、75%至95%、75%至98%、80%至95%、80%至98%、90%至96%、90%至97%、90%至98%、90%、95%、97%或98%的三酰基甘油级分。

[0219] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%或至少20%的二酰甘油级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计10%至45%、10%至40%、10%至35%、10%至30%、15%至40%、15%至35%或15%至30%的二酰甘油级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计至少0.2%、至少0.3%、至少0.4%、至少0.5%、至少1%、至少5%、至少10%、至少11%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%或至少20%的1,2-二酰甘油级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计0.2%至45%、0.2%至30%、0.2%至20%、0.2%至10%、0.2%至5%、0.2%至1%、0.2%至0.8%、0.4%至45%、0.4%至30%、0.4%至20%、0.4%至10%、0.4%至5%、0.4%至1%、0.4%至0.8%、0.5%至1%、0.5%至0.8%、10%至45%、10%至40%、10%至35%、10%至30%、15%至40%、15%至35%、15%至30%或15%至25%的二酰甘油级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计至少0.1%、至少0.2%、至少0.5%、至少1%、至少2%、至少2.5%或至少3%的1,3-二酰甘油级分。

[0220] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计至少0.3%、至少0.4%、至少0.5%、至少1%、至少1.5%、至少2%或至少5%的甾醇级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计0.3%至5%、0.3%至2%、0.3%至1.5%、0.5%至1.5%、1%至1.5%、0.5%至2%、0.5%至5%、1%至2%或1%至5%的甾醇级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计5%或更少、4%或更少、3%或更少、2%或更少、1.5%或更少或1%或更少的甾醇级分。

[0221] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计至少2%、至少5%或至少8%的磷脂级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计2%至25%、2%至20%、2%至15%、2%至10%、5%至25%、5%至20%、5%至20%、5%至10%或7%至9%的磷脂级分。在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计少于20%、少于15%、少于10%、少于9%或少于8%的磷脂级分。在一些实施方式中,微生物脂质基本上不含磷脂。

[0222] 在一些实施方式中,微生物脂质包含按重量计油的少于2%、少于1.5%、少于1%或少于0.5%的不可皂化物。

[0223] 在微生物脂质中存在的脂质种类,比如三酰基甘油级分可通过快速色谱法分离并通过薄层色谱法(TLC)分析或通过本领域中已知的其他方法分离并分析。

[0224] 在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、二酰甘油级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计至少5%、至少10%、多于10%、至少12%、至少13%、至少14%、至少15%、至少16%、至少17%、至少18%、至少19%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的EPA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、游离脂肪酸级分、甾醇级分、二酰甘油级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计5%至55%、5%至50%、5%至45%、5%至40%、5%至35%、5%至30%、10%至55%、10%至50%、10%至45%、10%至40%、10%至35%、10%至30%、至少12%至55%、至少12%至50%、至少12%至45%、至少12%至40%、至少12%至35%或至少12%至30%、15%至55%、15%至50%、15%至45%、15%至40%、15%至35%、15%至30%、15%至25%、15%至20%、20%至55%、20%至50%、20%至45%、20%至40%或20%至30%的EPA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%或至少60%的DHA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计5%至60%、5%至55%、5%至50%、5%至40%、10%至60%、10%至50%、10%至40%、20%至60%、25%至60%、25%至50%、25%至45%、30%至50%、35%至50%或30%至40%的DHA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计10%或更少、9%或更少、8%或更少、7%或更少、6%或更少、5%或更少、4%或更少、3%或更少、2%或更少或1%或更少的DHA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计脂肪酸的1%至10%、1%至5%、2%至5%、3%至5%或3%至10%作为DHA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,基本上不含DHA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计0.1%至5%、0.1%至少于5%、0.1%至4%、0.1%至3%、0.1%至2%、0.2%至5%、0.2%至少于5%、0.2%至4%、0.2%至3%、0.2%至2%、0.3%至2%、0.1%至0.5%、0.2%至0.5%、0.1%至0.4%、0.2%至0.4%、0.5%至2%、1%至2%、0.5%至1.5%或1%至1.5%的ARA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰

甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计5%或更少、少于5%、4%或更少、3%或更少、2%或更少、1.5%或更少、1%或更少、0.5%或更少、0.4%或更少、0.3%或更少、0.2%或更少或0.1%或更少的ARA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,基本上不含ARA。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计0.4%至2%、0.4%至3%、0.4%至4%、0.4%至5%、0.4%至少于5%、0.5%至1%、0.5%至2%、0.5%至3%、0.5%至4%、0.5%至5%、0.5%至少于5%、1%至2%、1%至3%、1%至4%、1%至5%或1%至少于5%的DPA n-6。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含按重量计5%、少于5%、4%或更少、3%或更少、2%或更少、1%或更少、0.75%或更少、0.6%或更少或0.5%或更少的DPA n-6。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,基本上不含DPA n-6。在一些实施方式中,微生物脂质和/或选自三酰基甘油级分、二酰甘油级分、甾醇级分、甾醇酯类级分、游离脂肪酸级分、磷脂级分及其组合的微生物脂质的一种或多种级分,包含具有按重量计5%或更少、少于5%、4%或更少、3%或更少或2%或更少的油酸(18:1n-9)、亚麻酸(18:2n-6)、亚麻酸(18:3n-3)、二十碳烯酸(20:1n-9)、芥酸(22:1n-9)、十八碳四烯酸(18:4n-3)或其组合的脂肪酸。

[0225] 在一些实施方式中,一种提取的微生物脂质包含按重量计至少20%的二十碳五烯酸和按重量计少于5%的花生四烯酸、二十二碳五烯酸n-6、油酸、亚油酸、亚麻酸、二十碳烯酸、芥酸和十八碳四烯酸的每一种。在一些实施方式中,一种提取的微生物脂质包含按重量计至少10%的三酰基甘油级分,其中三酰基甘油级分中的按重量计至少12%的脂肪酸是二十碳五烯酸,其中三酰基甘油级分中的按重量计至少25%的脂肪酸是二十二碳六烯酸和其中三酰基甘油级分中的按重量计少于5%的脂肪酸是花生四烯酸。在一些实施方式中,具有任何上述脂肪酸谱的提取的微生物脂质具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小、2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,具有任何上述脂肪酸谱的提取的微生物脂质从具有保藏于ATCC登记号PTA-10208、PTA-10209、PTA-10210、PTA-10211、PTA-10212、PTA-10213、PTA-10214或PTA-10215的破囊壶菌种的特征的经分离的破囊壶菌微生物中提取。在一些实施方式中,具有任何上述脂肪酸谱的提取的微生物脂质是粗制脂质。在一些实施方式中,粗制脂质具有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。在一些实施方式中,与如果使用典型的己烷提取或Frioalex[®]工艺(Westfalia Separator AG,德国)进行的提取相比较,根据本发明的工艺提取的微生物脂质导致茴香胺值更低和/或过氧化物值更低和/或磷含量更低。

[0226] 在一些实施方式中,通过本发明的任何工艺获得的脂质包含按重量计至少20%的二十碳五烯酸和按重量计少于5%的花生四烯酸、二十二碳五烯酸n-6、油酸、亚油酸、亚麻酸、二十碳烯酸、芥酸和十八碳四烯酸的每一种。在一些实施方式中,通过本发明的任何工艺获得的脂质包含按重量计至少10%的三酰基甘油级分,其中三酰基甘油级分中的按重量计至少12%的脂肪酸是二十碳五烯酸,其中三酰基甘油级分中的按重量计至少25%的脂肪酸是二十二碳六烯酸和其中三酰基甘油级分中的按重量计少于5%的脂肪酸是花生四烯酸。在一些实施方式中,通过本发明的任何工艺获得的具有任何上述脂肪酸谱的脂质具有26或更小的茴香胺值、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小或2或更小或1或更小和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值和/或100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,通过本发明的任何工艺获得的具有任何上述脂肪酸谱的脂质从具有保藏于ATCC登记号PTA-10208、PTA-10209、PTA-10210、PTA-10211、PTA-10212、PTA-10213、PTA-10214或PTA-10215的破囊壶菌种的特征的经分离的破囊壶菌微生物中提取。在一些实施方式中,通过本发明的任何工艺获得的具有任何上述脂肪酸谱的脂质是粗制脂质。在一些实施方式中,粗制脂质具有按重量计或按体积计少于5%的有机溶剂。在一些实施方式中,与如果使用溶剂进行的提取(例如,典型的己烷提取或Friolex®工艺(Westfalia Separator AG,德国))比较,根据本发明的工艺提取的脂质导致茴香胺值更低、过氧化物值更低、磷含量更低和/或提取产率更高。

[0227] 从Crypthecodinium cohnii种的经分离的微生物中提取脂质

[0228] 在一些实施方式中,本发明还涉及从Crypthecodinium cohnii种的微生物中提取的粗制脂质。在一些实施方式中,方法包括在培养基中培养Crypthecodinium cohnii种的微生物以产生生物质并从生物质中提取包含 ω -3脂肪酸的脂质。脂质可从新鲜收获的生物质中提取或可从已存储于防止腐败的条件的以前收获的生物质中提取。已知的方法可用来培养Crypthecodinium cohnii种的微生物并从培养物中分离生物质。见,例如,以其整体通过引用并入本文的美国专利号7,163,811。脂质可根据本发明的工艺提取。

[0229] 在一些实施方式中,与使用典型的己烷提取方法比较,根据本发明的提取方法从Crypthecodinium cohnii种的微生物中提取的粗制脂质可具有更低磷含量。在一些实施方式中,从Crypthecodinium cohnii种的微生物中提取的粗制脂质包含100ppm或更小、95ppm或更小、90ppm或更小、85ppm或更小、80ppm或更小、75ppm或更小、70ppm或更小、65ppm或更小、60ppm或更小、55ppm或更小、50ppm或更小、45ppm或更小、40ppm或更小、35ppm或更小、30ppm或更小、25ppm或更小、20ppm或更小、15ppm或更小、10ppm或更小、5ppm或更小、4ppm或更小、3ppm或更小、2ppm或更小或1ppm或更小的磷含量。在一些实施方式中,粗制油具有26或更小、25或更小、20或更小、15或更小、10或更小、5或更小或2或更小或1或更小的茴香胺值和/或5或更小、4.5或更小、4或更小、3.5或更小、3或更小、2.5或更小、2或更小、1.5或更小、1或更小、0.5或更小、0.2或更小或0.1或更小的过氧化物值。在一些实施方式中,与如果使用溶剂进行的提取(例如,典型的己烷提取或Friolex®工艺(Westfalia Separator AG,

德国))比较,根据本发明的工艺提取的粗制微生物脂质导致茴香胺值更低、过氧化物值更低、磷含量更低和/或提取产率更高。

[0230] 已一般性地描述了本发明,可通过参考本文提供的实施例获得进一步的理解。仅为了阐述目的给出这些实施例并且并不意图是限制性的。下面方法和通过本发明的方法制备的脂质的实施例是说明性的,而不是限制性的。在从细胞中提取脂质通常遇到的各种条件和参数的其他合适的修饰和调整在本发明的精神和范围内,并且对于本领域技术人员是显而易见的。

实施例

[0231] 实施例1

[0232] 将含有微生物细胞(*Schizochytrium*)的细胞发酵液(20,000kg)加热至60°C。将酶(即,Alcalase 2.4L FG 0.5%)添加至细胞生物质以裂解细胞并形成乳化的裂解的细胞组合物。先将乳化的裂解的细胞组合物用第一碱(NaOH, 250kg的50%w/w溶液)处理,直到裂解的细胞组合物的pH为从10.4至10.6。接着,将盐(固体NaCl,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至温度为85°C至102°C并保持在该温度水平24小时至70小时。然后将第二碱(NaOH, 50%w/w溶液, 40kg)添加至裂解的细胞组合物直到pH为高于8。接着将裂解的细胞组合物离心,以将裂解的细胞组合物分为三个相:含有脂质层的顶相、含有乳液层的中间相和含有固体层的底相。接着在40°C至80°C下,使用在6,000rpms下操作的Westfalia RSE110离心机(Westfalia Separator Industry GmbH, 德国),以30kg/min的补料速度将裂解的细胞组合物离心,以从裂解的细胞组合物中分离脂质。离心提供了三个相:含有脂质的上相、含有乳液层的中间相和含有固体/液体乳液的底相。离心期间,将裂解的细胞组合物的pH保持在7.5至8.5。全部20,000kg批次的总离心时间为大约10至11个小时。脂质层被分离出并具有按重量计大约1%的水分含量。

[0233] 实施例2

[0234] 将含有微生物细胞(*Cryptocodium cohnii*)的细胞发酵液(500g)从按重量计发酵液的大约7%的生物物质浓缩至按重量计发酵液的13.5%的生物物质。将发酵液在10,000psi(2次)的压力下匀质化以形成裂解的细胞组合物。将裂解的细胞组合物用碱(即,NaOH, 10g的50%w/w溶液)处理,直到裂解的细胞组合物的pH为10.4至10.6。将盐(固体NaCl,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至温度为85°C至92°C并保持该温度范围15分钟至2小时。然后使用在5,400rpm下操作的Bench Top Sigma 6K15离心机(SIGMA Laborzentrifugen GmbH, 德国),将裂解的细胞组合物在温度70°C至90°C下离心,以将裂解的细胞组合物分为三个相:含有脂质的上相、含有乳液层的中间相和含有固体/液体乳液的底相。离心期间,裂解的细胞组合物的pH保持在6.5至8.5。总离心时间为5分钟。脂质层被分离并具有按重量计大约1%的水分含量。

[0235] 实施例3

[0236] 将含有微生物细胞(*Schizochytrium*)的细胞发酵液(20,000kg)加热至60°C。将酶(即,Alcalase 2.4L FG 0.5%)添加至细胞生物质,以裂解细胞并形成裂解的细胞组合物。接着,将盐(固体Na₂SO₄, 2,000kg或按重量计相对于裂解的细胞组合物的10%)添加至裂解的细

胞组合物。然后将裂解的细胞组合物在室温下搅动24小时至48小时。接着使用在6,000rpm下操作的Westfalia RSE110离心机(Westfalia Separator Industry GmbH,德国),以40kg/min的补料速度,将裂解的细胞组合物在40℃至75℃下离心,以从裂解的细胞组合物中分离脂质。离心提供了三个相:含有脂质的上相、含有乳液层的中间相和含有固体/液体乳液的底相。全部20,000kg批次的总离心时间为大约8至9hrs。将脂质层从离心的裂解的细胞组合物中分离出。

[0237] 实施例4

[0238] 提供了含有微生物细胞(ATCC登记号PTA-10208)的经巴氏灭菌的细胞发酵液(500g)。将酶(即,Alcalase2.4L FG0.5%)添加至细胞生物质,以裂解细胞并形成乳化的裂解的细胞组合物。将乳化的裂解的细胞组合物用第一碱(即,25%的NaOH溶液)处理,以将裂解的细胞组合物的pH调至10.5。接着,将盐(固体NaCl,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至温度为95℃并保持在该温度水平2小时同时搅动裂解的细胞组合物。然后将第二碱(即,25%的NaOH溶液)添加至裂解的细胞组合物,直到pH为8.3。然后将裂解的细胞组合物以5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生脂质层和小的乳液层。

[0239] 实施例5

[0240] 提供浓缩过并经巴氏灭菌的含有微生物细胞(ATCC登记号PTA-9695)的细胞发酵液(500g)。将酶(即,Alcalase2.4L FG0.5%)添加至细胞生物质,以裂解细胞并形成乳化的裂解的细胞组合物。将乳化的裂解的细胞组合物用碱(即,25%的NaOH溶液)处理,以将裂解的细胞组合物的pH调至10.5。接着,将盐(固体NaCl,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至温度为95℃并保持在该温度水平1小时,同时搅动裂解的细胞组合物,并且pH降至8.5。1小时之后,在总共10ml的发酵液中,有约1ml的油层(脂质)和约6ml的乳液层。将裂解的细胞组合物加热总共220分钟并且乳液层开始消失。然后将裂解的细胞组合物以5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物。脂质提取产率为按重量计58.8%。粗制油的茴香胺值(AV)为11.3。细胞破损率按重量计在93%至95%的范围中。

[0241] 实施例6

[0242] 提供含有保藏于ATCC登记号PTA-9695的经分离的破囊壶菌微生物细胞的经巴氏灭菌的细胞发酵液(473g)。将酶(即,Alcalase2.4L FG0.5%)添加至细胞生物质,以裂解细胞并形成乳化的裂解的细胞组合物。将乳化的裂解的细胞组合物用第一碱(即,25%的NaOH溶液)处理,以将裂解的细胞组合物的pH调至10.62。接着,将盐(固体NaCl,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至温度为95℃并保持在该温度水平3小时,同时搅动裂解的细胞组合物。接着将第二碱(即,25%的NaOH碱溶液)添加至裂解的细胞组合物,直到pH为8.13。然后将裂解的细胞组合物以5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生相等量的脂质层和乳液层。为了测定是否升高pH增加脂质层产率,将额外的第二碱(即,25%的NaOH溶液)添加至经分离的裂解的细胞组合物,直到pH为9.02,并将裂解的细胞组合物以5,100rpm再次离心5分钟。这导致类似的脂质层产率。再次将额外的第二碱添加至经分离的裂解的细胞组合物,直到pH为10.12,并且将裂解的细胞组合物以5,100rpm再次离心5分钟。这再次导致类似的脂质层产

率。

[0243] 实施例7

[0244] 提供含有微生物细胞(ATCC登记号PTA-9695)的经巴氏灭菌的细胞发酵液(470g)。将细胞生物质机械匀质化,以裂解细胞并形成乳化的裂解的细胞组合物。将乳化的裂解的细胞组合物用第一碱(即,25%的NaOH溶液)处理,以将裂解的细胞组合物的pH调至10.5。接着,将盐(固体NaCl,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至温度95℃并保持在该温度水平3小时,同时搅动裂解的细胞组合物。然后将第二碱(即,25%的NaOH溶液)添加至裂解的细胞组合物,直到pH为8.07。然后以5,100rpm将裂解的细胞组合物离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生脂质层和乳液层,其中乳液层多于脂质层。为了测定是否升高pH增加脂质层产率,将额外的第二碱添加至经分离的裂解的细胞组合物,直到pH为9.11并将裂解的细胞组合物以5,100rpm再次离心5分钟。这导致类似的脂质层产率。再次将额外的第二碱添加至经分离的裂解的细胞组合物,直到pH为10.09,并将裂解的细胞组合物以5,100rpm再次离心5分钟。这再次导致类似的脂质层产率。

[0245] 实施例8

[0246] 含有微生物细胞(*Cryptocodium cohnii*)的细胞发酵液用在减少生物素的试验发酵罐中。收获20,000kg经洗涤、浓缩并巴氏灭菌的发酵液。其在巴氏灭菌启动时倒出。将其在转移并匀质化之前保持大约1天。将材料在813bar/1次下匀质化并收集回处理罐中。通过显微镜检查,估计裂解了大约80%的细胞。

[0247] 在开始处理之前,将发酵液加热至约40℃。将pH调至10.5,添加2%NaCl并加热至66℃。此时,已形成了显著的油层并且1-2小时之后pH已降至9.5。将发酵液保持在66℃过夜。

[0248] 次日,将发酵液用安装了155mm环闸的Westfalia RSE-110离心。40℃下黏度约180cP。以48kg/min给离心机进料,轻相上有5-10psi背压且重相上有30psi背压。将进料温度保持在70℃。在废物相中不存在油并且在添加异丙醇之后仅有几滴可见。

[0249] 表1显示了对从该程序中获得的粗制油进行分析的结果。

[0250] 表1使用实施例8的工艺获得的粗制油的规格

[0251]

%油	87.79
DHA(mg/g)	531.02
%DHA	60.49
PV	1.95(0.6*)
AV	15
%FFA	0.18
磷(ppm)	8.65
铜(ppm)	0.22
铁(ppm)	0.7
铅(ppm)	0.63

[0252] *经离心的油的PV。

[0253] 按重量计,提供的20,000kg发酵液中10.5%(2,100kg)是生物质。按重量计生物质

的50%是油(1,050kg)。按重量计,油的58.9%是DHA(618kg)。进行上述工艺之后,脂质层中有592.5kg材料,其中按重量计约87.8%(520.2kg)是油。因而,从生物质中油的提取产率为49.5%。按重量计所述油的60.5%(314.6kg)是DHA,因此导致按重量计从生物质中DHA的提取产率为51%。

[0254] 实施例9

[0255] 提供了经洗涤、浓缩并经巴氏灭菌的含有微生物细胞(*Schizochytrium*)的细胞发酵液(约500g)。将发酵液用碱(即,25%的NaOH溶液)进行化学处理,而不进行在先的细胞裂解步骤。添加碱将发酵液的pH从5.8升高至11.2。添加碱以及升高pH裂解了细胞而形成裂解的细胞组合物。接着,将盐(固体Na₂SO₄,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的5%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至90℃至95℃范围的温度并保持在该温度水平90分钟并且裂解的细胞组合物的pH降至9.7。90分钟之后,每45ml发酵液有约2.5ml油层并且没有水分损失。3小时之后,pH已降至9.2。接着将溶液以约5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生脂质层。脂质的提取产率按重量计为81%。粗制油的茴香胺值(AV)为20.1。按重量计细胞破损率在92%至98%的范围。

[0256] 实施例10

[0257] 提供了经洗涤、浓缩且经巴氏灭菌的含有微生物细胞(*Schizochytrium*)的细胞发酵液(约500g)。将发酵液用碱(即,25%的NaOH溶液)进行化学处理,而不用在先的细胞裂解步骤。添加碱将发酵液的pH从4.8升高至11。添加碱以及升高pH裂解了细胞而形成裂解的细胞组合物。接着,将盐(固体NaCl,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至90℃至95℃温度范围并保持在该温度水平3.5小时,裂解的细胞组合物的pH降至8.7并且没有水分损失。接着将溶液以约5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生脂质层。3.5小时之后,脂质的提取产率为按重量计92%。

[0258] 将一部分裂解的细胞组合物保持6小时并且裂解的细胞组合物的pH降至8.6。接着将溶液以约5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生脂质层。6小时之后,脂质的提取产率为按重量计89%。粗制油的茴香胺值(AV)为14.4。细胞破损率为按重量计95%。

[0259] 实施例11

[0260] 提供了经洗涤、浓缩且经巴氏灭菌的含有微生物细胞(*Schizochytrium*)的细胞发酵液(约500g)。将发酵液用碱(即,50%的NaOH溶液)进行化学处理,而没有在先的细胞裂解步骤。添加碱将发酵液的pH从5.8升高至11.2。添加碱以及升高pH裂解了细胞而形成裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物在真空下加热至70℃,以将水含量从88.7%减少至85.5%。蒸发期间,pH降至10.36。接着将溶液以约5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生脂质层。脂质的提取产率按重量计为83.9%。粗制油的茴香胺值(AV)为10.5。细胞破损率按重量计为93.17%。

[0261] 除在真空下将裂解的细胞组合物加热至70℃以将水含量从88.7%减少至79.2%之外,重复工艺。当水含量减少至79.2%时,脂质的提取产率按重量计为87.5%,且细胞破损率按重量计为92.3%。还重复工艺以将水含量从88.7%减少至80.8%。当水含量减少至80.8%时,脂质的提取产率为按重量计90%,且细胞破损率为按重量计95.9%。

[0262] 实施例12

[0263] 提供经洗涤、浓缩且经巴氏灭菌的含有微生物细胞(*Schizochytrium*)的细胞发酵液(约500g)。将发酵液用碱(即,50%的NaOH溶液)进行化学处理,而没有在前的细胞裂解步骤。添加碱将发酵液的pH从5.6升高至11.1。添加碱以及升高pH裂解了细胞而形成裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物在封闭系统中加热至90℃,40分钟。40分钟之后,每40ml发酵液有约1ml油层(脂质)。接着将溶液以约5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生脂质层。脂质的提取产率按重量计为85.1%。粗制油的茴香胺值(AV)为16.3。细胞破损率为按重量计97.6%。

[0264] 实施例13

[0265] 提供经洗涤、浓缩且经巴氏灭菌的含有微生物细胞(*Schizochytrium*)的细胞发酵液(约500g)。将发酵液用碱(即,50%的NaOH溶液)进行化学处理,而没有在前的细胞裂解步骤。添加碱将发酵液的pH从4.9升高至11.2。添加碱以及升高pH裂解了细胞而形成裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物在室温下混合4小时。接着将溶液以约5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生小的脂质层。

[0266] 将一部分裂解的细胞组合物在室温下混合约96小时。接着将溶液以约5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生较大的脂质层。脂质的提取产率按重量计为61.4%。粗制油的茴香胺值(AV)为22.6。

[0267] 实施例14

[0268] 提供经洗涤、浓缩且经巴氏灭菌的含有微生物细胞(ATCC登记号PTA-9695)的细胞发酵液(约500g)。将发酵液用碱(即,50%的NaOH溶液)进行化学处理,而没有在前的细胞裂解步骤。添加碱将发酵液的pH从5.6升高至11.1。添加碱以及升高pH裂解了细胞而形成裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物在70℃至75℃的范围中加热3小时。接着将溶液以约5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生脂质层。脂质的提取产率按重量计为84.4%。

[0269] 将一部分裂解的细胞组合物加热总共5小时。接着将溶液以约5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生类似脂质层。脂质的提取产率按重量计为87.3%。细胞破损率按重量计为89.1%。

[0270] 实施例15

[0271] 提供经洗涤、浓缩且经巴氏灭菌的含有微生物细胞(*Schizochytrium*)的细胞发酵液(约500g)。将发酵液用碱(即,50%的NaOH溶液)进行化学处理,而没有在前的细胞裂解步骤。添加碱将发酵液的pH从7.3升高至11。添加碱以及升高pH裂解了细胞而形成裂解的细胞组合物。接着,将盐(固体Na₂SO₄,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的5%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至温度为90℃并保持在该温度水平2小时。在保持温度为90℃额外的2至4小时时,打开含有裂解的细胞组合物的器皿以允许水蒸发。接着将溶液以约5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生脂质层。脂质的提取产率为按重量计大于70%。粗制油的茴香胺值(AV)为11.6。

[0272] 实施例16

[0273] 提供含有微生物细胞(ATCC登记号PTA-9695)的细胞发酵液(9,925kg)。以按重量计1:1比率用水稀释细胞发酵液以形成稀释的20,000kg发酵液。稀释之前发酵液的固体含量按重量计为16.13%,而稀释之后按重量计为8.25%。混合稀释的发酵液并用除渣离心机以

6,400rpm离心以去除细胞外水-可溶的或水-可分散的化合物。从离心机收集浓缩物(10,250kg)且浓缩物具有按重量计10.5%的固体含量。将收集的浓缩物加热至62℃至64℃,以巴氏灭菌浓缩物。将酶(即,Alcalase2.4L FG0.5%)添加至经巴氏灭菌的浓缩物以裂解细胞并形成乳化的裂解的细胞组合物。将乳化的裂解的细胞组合物用碱(即,25%的NaOH溶液)处理,以将裂解的细胞组合物的pH调至11。接着,将盐(固体Na₂SO₄,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的5%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至温度95℃并保持在温度水平10小时至12小时,同时搅动裂解的细胞组合物。搅动之后,裂解的细胞组合物的pH为8.6并且有非常小的乳液层。将搅动罐冷却至60℃并在冷却时将裂解的细胞组合物的pH增加至9.6。通过添加磷酸,将裂解的细胞组合物的pH降至8.2。添加磷酸不会损害脂质层和非常小的乳液层的分离。然后,以48kg/min的补料速度,以5,100rpm将裂解的细胞组合物在60℃至63℃下离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生具有按重量计1.7%至2.3%水分含量的脂质层。

[0274] 实施例17

[0275] 提供经洗涤、浓缩且经巴氏灭菌的含有微生物细胞(*Cryptocodium cohnii*)的细胞发酵液(500g)。在8,000至12,000psi(2次)的压力下将发酵液匀质化以形成裂解的细胞组合物。将裂解的细胞组合物用碱(即,12.5%的NaOH溶液)处理,直到裂解的细胞组合物达到7.8至8.2的pH。将盐(固体Na₂SO₄,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的5%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至温度为60℃并保持在温度。在有少许至没有水分损失的封闭系统中,通过添加碱(即,12.5%的NaOH溶液),将裂解的细胞组合物的pH保持在7.8至8.2水平10至15小时。然后将裂解的细胞组合物以约5,100rpm离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物并产生油层。这导致40ml样品中约2ml的油层。油的提取产率按重量计为73%。粗制油的茴香胺值(AV)为13.5。细胞破损率按重量计为82%至86%。

[0276] 实施例18

[0277] 提供含有微生物细胞(*Schizochytrium*)的经巴氏灭菌的细胞发酵液(1,000g)。将酶(即,Alcalase2.4L FG0.5%)添加至细胞生物质,以裂解细胞并形成乳化的裂解的细胞组合物。用碱(即,12.5%的NaOH溶液)处理乳化的裂解的细胞组合物,以将裂解的细胞组合物的pH从7.21调至10.52。接着,将盐(固体NaCl,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将发酵液分为4个部分,每个部分保持在4个不同的温度和时间下:1)试验#1保持在90℃,22小时;2)试验#2保持在90℃,2小时,然后保持在25℃,20小时;3)试验#3保持在60℃,22小时;和4)试验#4保持在25℃,22小时。然后将单独的试验离心,而不进行进一步的pH调整。对试验#1、#2和#3,以大约6,600rpm(4,800的重力)将发酵液离心5分钟,以分离裂解的细胞组合物。因为在4,800的重力下试验#4的分离不是良好的(<20%),将重力增加至15,000并将发酵液在15,000的重力下旋转5分钟。作为重量百分比的脂质的提取产率和茴香胺值(AV)在下表中列出。

[0278] 表2. 当改变裂解的细胞组合物的温度和加热时间时的条件和结果

[0279]

试验#	处理时间和温度	离心条件	AV	油产率(%)
1	90℃ 22 小时	pH = 6.22 g-力= 4,800	58.7	51.4
2	90℃ 2 小时, 25℃ 20 小时	pH = 8.19 g-力= 4,800	109.2	82.2
3	60℃ 22 小时	pH = 8.38 g-力= 4,800	91.2	27.2
4	25℃ 22 小时	pH = 10.03 g-力= 15,000	105.2	55.7

[0280] 表2中的茴香胺值比预期的更高。先前实施例和该实施例之间的一个不同之处在于,在提取脂质之前将裂解的细胞组合物长时间放置。假设提取之前长时间放置导致在裂解的细胞组合物中存在的溶解氧氧化。增加的氧化接着导致茴香胺值增加。下述事实支持该假设:最高温度下加热最长时间的试验(试验#1)具有最低茴香胺值,因为随着温度增加,裂解的细胞组合物的溶解氧含量通常减少。增加茴香胺值因此被认为不正常,其是从裂解的细胞组合物中提取脂质延迟的结果。在生产中,在从裂解的细胞组合物提取脂质中不会有延迟时间,并且茴香胺值与先前的26或更小的茴香胺值结果一致。

[0281] 实施例19

[0282] 提供含有微生物细胞(*Schizochytrium*)的经巴氏灭菌的细胞发酵液(1,000g)。将发酵液分为3部分并如下稀释:1)试验#1根本不稀释并作为对照部分;2)试验#2用水稀释25%;和3)试验#3用水稀释50%。将酶(即,Alcalase 2.4L FG0.5%)添加至细胞生物质,以裂解细胞并形成乳化的裂解的细胞组合物。将乳化的裂解的细胞组合物用碱(即,12.5%的NaOH溶液)处理,以将裂解的细胞组合物的pH从6.8调至10.6。接着,将盐(固体NaCl,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将发酵液加热至90℃并保持20小时。保持时间之后,每一试验的发酵液一分为二,一半直接离心,调整另一半的pH至大约8.5,然后离心。接着将两部分都以大约8,545rpm(重力8,000)离心5分钟。作为重量百分比的脂质的提取产率和茴香胺值(AV)在下表中列出。

[0283] 表3.当改变经巴氏灭菌的发酵液的稀释度时的条件和结果。

[0284]

试验#	稀释的	离心条件	AV	油产率(%)
1	未稀释	pH = 6.0 g-力 = 8,000	51.8	81.2
1a	未稀释	pH = 8.4 g-力 = 8,000	44.3	78.1
2	用水稀释 25%	pH = 5.5 g-力 = 8,000	76.1	88.9
2a	用水稀释 25%	pH = 8.4 g-力 = 8,000	85.3	82.1
3	用水稀释 50%	pH = 5.7 g-力 = 8,000	68.5	85.0
3a	用水稀释 50%	pH = 8.5 g-力 = 8,000	79.6	84.0

[0285] 表3中的茴香胺值比预期的更高。先前实施例(除实施例18以外)和该实施例之间的一个不同之处在于,在提取脂质之前将裂解的细胞组合物长时间放置。假设提取之前长时间放置导致在裂解的细胞组合物中存在的溶解氧氧化。增加的氧化接着导致茴香胺值增加。增加茴香胺值因此被认为不正常,其是在从裂解的细胞组合物提取脂质中延迟结果。在生产中,在从裂解的细胞组合物提取脂质中没有延迟时间,并且茴香胺值与先前的26或更小茴香胺值结果一致。

[0286] 实施例20

[0287] 除了改变添加盐的时间(例如,在匀质化之前和之后)和盐的量之外,使用实施例2中描述的工艺处理从多个发酵批次(lots)中获得的细胞发酵液。分析得到的分离脂质并在表4提供分析结果。

[0288] 表4. 使用改变盐添加时间和添加的盐量的本发明工艺获得的脂质的规格

[0289]

发酵批次	P2137	P2137	P4167	P4167	P2137	P2137
添加NaCl*	之前	之前	之后	之后	之后	之后
按重量计NaCl%	2	5	2	5	5	5
脂质%*	27	37	51	72	59	15
按重量计起始固体%	13	12.9	19.2	19.2	13.3	7.5 ⁺
离心之前按重量计固体%	19.7	21.7	19.7	20.1	20.2	8.6

[0290] *匀质化之前或之后添加NaCl;脂质%是指以甘油三酯形式的脂质的百分比

[0291] ⁺将该轮实验稀释,以具有低的起始固体百分比。

[0292] 表4中提供的数据表明匀质化之后添加盐比匀质化之前添加盐导致更高的%脂质值。表4中提供的数据还表明稀释样品导致更低的%脂质值。

[0293] 实施例21

[0294] 使用Alcalase酶处理的获得自微生物细胞(Schizochytrium)的裂解的细胞组合

物样品。样品具有大约5.5的pH。将样品分为4个更小的样品并通过添加氢氧化钠将三个样品的pH分别调至大约7.4、大约10.5和大约12。用去离子水以1:1比率稀释样品。将POBN(α -(4-吡啶基1-氧化物)-N-叔-丁基硝酮, 1.25M; 50 μ L)作为自旋捕捉化学品添加至0.5g的每一稀释的样品。用Bruker BioSpin e-scan EPR(Electron Paramagnetic Resonance)光谱仪(系统号SC0274)(Bruker BioSpin, Billerica, MA)测量样品, 以测量来自脂质氧化的存在的自由基的量。将样品于室温(20 $^{\circ}$ C)下孵育并在调pH后, 将50 μ L含有POBN的每一样品以一小时的间隔测试四小时, 所述测试使用下述光谱仪参数: 调制频率为86Hz、调制振幅为2.11高斯、微波功率为5.19mW、时间常数为20.48秒、扫描时间10.49秒、扫描宽度100高斯和扫描次数为8。图5中提供EPR光谱仪读数的结果。

[0295] 图5中的数据表明, 开始时在pH5.5下的样品的自由基水平最高, 在pH10.5和12下的样品的自由基水平最低。数据还表明4小时期间, pH10.5下的样品的自由基形成的速率最低, pH5.5下的样品自由基形成的速率最高。数据还表明将碱添加至裂解的细胞组合物抑制脂质氧化并因此导致粗制脂质和精制油的低AV。

[0296] 实施例22

[0297] 从油菜籽植物中提取油籽并接着将油籽通过磨碎机以压碎(crack)并打破油籽外壳。接着将油籽通过已知手段脱壳, 所述手段比如通过吸入, 以从油籽壳中去除籽(内部的)肉。接着将脱壳油籽通过使它们通过压力机磨碎脱壳油籽成为饼而匀质化或排出, 以裂解油籽细胞。添加水来形成乳化的裂解的细胞组合物。过滤乳化的裂解的细胞组合物以从裂解的细胞组合物去除任何过量的壳碎片。用碱(即, 25%的NaOH溶液)处理乳化的裂解的细胞组合物, 以将裂解的细胞组合物的pH调至11。接着将盐(固体NaCl, 以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至温度为90 $^{\circ}$ C并保持在该水平6小时至48小时, 同时搅动裂解的细胞组合物。接着将裂解的细胞组合物以5,100rpm离心5分钟, 以分离裂解的细胞组合物并产生脂质层和乳液层。

[0298] 实施例23

[0299] 通过己烷提取获得的粗制脂质的比较分析

[0300] 对使用实施例2中所述的工艺获得自发酵批次的粗制脂质进行分析, 来测定多种规格。使用典型的己烷提取工艺从实施例2中利用的相同微生物细胞中获得额外的粗制脂质。己烷提取工艺包括喷雾干燥发酵液, 将己烷添加至喷雾干燥的生物质以获得按重量计15%至20%固体的溶液。然后将溶液匀质化, 来裂解细胞以形成裂解的细胞组合物。将裂解的细胞组合物离心并去除含脂质和己烷的层。然后从脂质中去除己烷。分析结果在表5中提供。

[0301] 表5. 使用本发明的工艺或己烷提取工艺获得的脂质的规格。

[0302]

发酵批次	A	B	C	D	E	F	G
提取方法	实施例2	己烷	己烷	己烷	己烷	己烷	己烷
AV*	5.9	ND	ND	ND	14.7	17.18	6.7
PV*	1.21	0.65	1.56	0.46	ND	0.85	0.3
%脂质*	89.61	86.94	84.31	86.75	85.53	86.05	86.54
DHA(mg/g)	537.47	508.15	459.32	465.31	510.49	495.82	506.33

%DHA*	59.98	58.39	54.49	53.65	59.71	57.68	58.51
-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------

[0303] AV=茴香胺值;PV=过氧化物值;%脂质是指以甘油三酯形式的脂质百分比;%DHA是指脂质中的DHA百分比

[0304] 表5中提供的数据表明,与通过典型的己烷提取工艺制备的脂质比较,通过本发明的工艺获得的粗制脂质展示优良的茴香胺值、脂质百分比、DHA量和DHA百分比。

[0305] 实施例24

[0306] 通过Frioletx®工艺获得的粗制脂质的比较分析

[0307] 对使用实施例1和3所述的工艺获得自多个发酵批次的粗制脂质进行分析,以测定多种规格。使用Frioletx®工艺(Westfalia Separator AG,德国)获得额外的粗制脂质,所述Frioletx®工艺是如在美国专利号5,928,696和国际公开号W001/76385和W001/76715中描述的用水-可溶的有机溶剂提取脂质的工艺。表6中提供分析结果。

[0308] 表6.使用本发明的工艺或Frioletx®工艺获得的脂质的规格

[0309]

发 酵 批 次	A	B	B	B	B	C	C	C
提 取 方 法	实施例 1	实施例 1	实施例 3	实施例 1 ^a	实施例 1 ^b	实施例 1	实施例 1	FRIOLEX®
AV*	3.1	1.6	3.9	300	7.1	3.5	4	36
PV*	1.8	0.17	0.14	6.16	0.34	0	0	0.35
% 脂质*	96.27	93.67	92.55	87.20	94.42	95.14	94.31	93.92
DHA (mg/g)	452.4	458.16	455.17	414.66	471.55	416.41	416.05	415.38
提 取 产 率(%)	93.5	87	ND	96	ND	94	94	94

[0310] AV=茴香胺值;PV=过氧化物值;%脂质是指以甘油三酯形式的脂质百分比

[0311] a:没将裂解的细胞组合物加热。

[0312] b:在提取之前,将裂解的细胞组合物放置3周。

[0313] 表6中提供的数据表明,与通过Frioletx®工艺制备的脂质比较,通过本发明的工艺获得的粗制脂质展示优良的茴香胺值(除了不将裂解的细胞组合物加热时获得的脂质之外)。通过本发明的工艺制备的脂质展示了下述茴香胺值,所述茴香胺值是使用Frioletx®工艺制备的脂质的茴香胺值的从4.4%至19.7%。

[0314] 认为通过本发明的工艺制备的脂质具有增加的稳定性。例如,如表6所示的,本发明的工艺用来从裂解的细胞组合物提取脂质,其中在提取工艺之前将裂解的细胞组合物放置3周。认为裂解的细胞组合物中的脂质的茴香胺值随时间推移而增加,因而,期望从3周长的裂解的细胞组合物中提取的脂质具有增加的茴香胺值。然而,如表6所示的,使用本发明的工艺,从3周长的裂解的细胞组合物获得的脂质具有下述茴香胺值,所述茴香胺值是通过Frioletx®工艺制备的脂质的茴香胺值的19.7%。

[0315] 实施例25

[0316] 对使用实施例16所述的工艺获得自微生物细胞(ATCC登记号PTA-9695)发酵液的粗制脂质进行分析,以测定多种规格。使用 **Friolex**[®] 工艺(Westfalia Separator AG, 德国),从微生物细胞(ATCC登记号PTA-9695)发酵液中获得额外的粗制脂质,所述 **Friolex**[®] 工艺是如在美国专利号5,928,696和国际公开号W001/76385和W001/76715中描述的用水-可溶的有机溶剂(例如,异丙醇)提取脂质的工艺。表7中提供分析结果。

[0317] 表7. 粗制脂质比较

	实施例 16	FRIOLEX [®]
%油	9.19	93.73
DHA (mg/g)	570.68	574.33
% DHA	62.1	61.27
% FFA	1.13	0.22
PV	0	0.74
AV	10	73.9
铁 (ppm)	0.11	0
铜 (ppm)	0.67	0.3
铅(ppm)	0.21	0
磷(ppm)	5.22	7.20
提取产率(%)	61.4	45.3

[0319] 表7提供的数据表明,与通过 **Friolex**[®] 工艺制备的脂质比较,通过本发明的工艺获得的粗制脂质展示优良的茴香胺值(AV)和过氧化物值(PV)。数据还表明,与通过 **Friolex**[®] 工艺获得的脂质的提取产率比较,通过本发明的工艺获得的脂质的提取产率较高。

[0320] 实施例26

[0321] 粗制脂质的精制

[0322] 使用实施例1概述的工艺和**Friolex**[®] 工艺获得粗制脂质。连续地通过:1)脱胶和碱精制;2)漂白;3)冷却过滤;和4)用抗氧化剂除臭,对粗制脂质进一步处理。粗制脂质、碱精制脂质、漂白的脂质和除臭脂质在表8a和8b中列出。精制油的比较在表9中列出。

[0323] 表8a. 从**Friolex**[®] 工艺(实施例24)获得的脂质

[0324]

处理步骤	FFA %	PV	AV	DHA (mg/g)	产率 % (Lipid)	产率 % (DHA)
粗制脂质	0.28	0.37	33.6	413.6	N/A	N/A
碱精制脂质	<0.1	0.29	--	416.4	85.7	86.3
漂白的脂质	<0.1	0.16	13.9	413.1	71.5	70.9
过滤的脂质	<0.1	0.19	13.3	424.86	70.3	76.0
除臭脂质 w/AOX*	0.06	<0.1	14.3	401.5	96.6	89.4

[0325] *AOX是指抗氧化剂

[0326] 表8b.从使用NaCl的提取工艺(实施例1) 获得的脂质

处理步骤	FFA %	PV	AV	DHA (mg/g)	产率 % (脂质)	产率 % (DHA)
粗制脂质	1.36	0	3.5	406.7	N/A	N/A
[0327] 碱精制脂质	<0.1	0.27	2.3	410.8	85.9	86.7
漂白的脂质	<0.1	0.16	0.8	404.3	97.0	95.5
过滤的脂质	<0.1	0.37	1.0	414.1	59.3	60.7
除臭脂质 w/AOX	0.06	<0.1	1.8	379.9*	94.9	87.1

[0328] *注意:用高油酸的向日葵油(HOSO)增加稀释是DHA(mg/g)减少的原因。

[0329] 表9. 精制油比较

	FRIOLEX [®] (实施例 24)	实施例 1
DHA (mg/g)	401.5	379.9*
% DHA	42.69	40.18
FFA%	0.06	0.06
PV	<0.1	<0.1
AV	14.3	1.8
铁 (ppm)	0.05	<0.02
[0330] 铜 (ppm)	<0.02	<0.02
铅(ppm)	<0.1	<0.1
砷 (ppm)	<0.1	<0.1
汞 (ppm)	<0.01	<0.01
% 水分和挥发物	<0.01	<0.01
不可皂化物(%)	1.17	1.33
通过 IR 的反式脂肪酸 (%)	<1	<1

[0331] *注意:用HOSO增加的稀释是DHA(mg/g)减少的原因。

[0332] 表8a、表8b和表9中提供的数据表明,与通过 Friolex[®]工艺制备的精制油比较,通过本发明的工艺制备的精制油展示更低茴香胺值。

[0333] 实施例27

[0334] 感觉情况比较

[0335] 通过一组8至12个感觉分析员分析实施例26中获得的精制油。感觉分析员基于香气、香味和后味对多种脂质规格评等级,以提供每种脂质的“总香气强度”。Universal Spectrum 描述性分析方法用来评估样品的香气和香味特征。该方法使用0-15的强度分级,其中0=未检测出,15=非常高的强度,以测量油的香气和香味属性。在表10中提供感觉数值的结果。

[0336] 表10.通过 Friolex[®]工艺(实施例24)制备的脂质和通过本发明的工艺(实施例1)制备的脂质的感觉规格

[0337]

	规格						
	香气						
	总强度	鱼腥 味 海 水 味 (Marine) 复合	青涩味 (Green) 复合	草本 味	坚 果 味 烧烤味	油漆 味	其 他
FRIOLEX [®]	3	1	1	1	0	0	0
实施例 1	2	0	1	1	0	0	0
	香味						
	总强度	鱼腥味海水味复合	青涩味复合	草本 味	坚 果 味 烧烤味	油漆 味	其 他
FRIOLEX [®]	4	1	1	2	0	0	0
实施例 1	3	0	1	2	0	0	0
	后味						
FRIOLEX [®]	草药味/轻微鱼腥味						
实施例 1	草药味						

[0338] 表10提供的数据表明,与通过 Frioless[®]工艺制备的精制油比较,通过本发明的工艺制备的精制油展示优良的感觉数据。如上所示的,通过本发明提供的脂质具有3和2的总香气强度,而Frioless[®]脂质提供分别了4和3的总香气强度。

[0339] 实施例28

[0340] 比较实施例

[0341] 美国专利号6,750,048中公开了从微生物中获得脂质而不使用有机溶剂的提取工艺。表11中提供了获得自通过本发明工艺制备的粗制脂质的精制油和获得自通过美国专利号6,750,048公开的提取工艺制备的粗制脂质的精制油的比较。

[0342] 表11.通过本发明工艺(实施例1)制备的脂质和通过美国专利号6,750,048中公开的工艺制备的脂质的比较数据。

[0343]

	实施例1	U.S.P.N.6,750,048
DHA(mg/g)	379.9	346
%DHA	40.18	37.3
FFA%	0.06	ND
PV	<0.1	0.46
AV	1.8	ND
铁(ppm)	<0.02	0.26
铜(ppm)	<0.02	<0.05
铅(ppm)	<0.1	<0.20
砷(ppm)	<0.1	<0.20
汞(ppm)	<0.01	<0.20
%水分和挥发物	<0.01	0.02
不可皂化物(%)	1.33	ND
通过IR的反式脂肪酸(%)	<1	ND

[0344] 表11提供的数据表明,与获得自通过美国专利号6,750,048中公开的提取工艺制

备的粗制脂质的精制油比较,获得自通过本发明工艺制备的粗制脂质的精制油展示了优良的特性。

[0345] 实施例29

[0346] 表征经分离的破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695),用于分类学分类。

[0347] 低潮期间从潮间带栖息地收集样品。将水、沉积物、活的植物材料和腐败的植物/动物碎片放在50ml无菌管中。每一样品的一部分连同水一起在分离培养基的固体琼脂平板上涂布。分离培养基由下述成分组成:500ml人造海水、500ml蒸馏水、1g葡萄糖、1g甘油、13g琼脂、1g谷氨酸盐、0.5g酵母提取物、0.5g酪蛋白水解物、1ml维生素溶液(100mg/L硫胺、0.5mg/L生物素、0.5mg B₁₂)、1ml痕量矿物质溶液(PII金属,每升含:6.0gFeCl₃6H₂O、6.84g H₃BO₃、0.86g MnCl₂4H₂O、0.06g ZnCl₂、0.026CoCl₂6H₂O、0.052g NiSO₄H₂O、0.002g CuSO₄5H₂O和0.005g Na₂MoO₄2H₂O)以及500mg的青霉素G和链霉素硫酸盐的每一种。将琼脂平板在20-25℃下在黑暗中孵育。2-4天之后,在放大下检查琼脂平板并用无菌牙签挑取细胞集落,并在新的培养基平板上再划线。将细胞在新培养基上重复划线直到去除污染的生物体。

[0348] 将来自琼脂平板的集落转移至有半浓度海水和高压灭菌的新孵化出的卤虫幼虫悬浮液(1ml)的培养皿。卤虫幼虫严重过度生长,2-3天后有孢子囊簇。释放的游动孢子发出双鞭毛,活跃地游动,远离成熟的孢子囊,孢子释放后孢子囊的壁残留物清楚可见(以相差方式)。测量孢子囊直径为12.5μm至25μm,游动孢子大小为2.5μm至2.8μm x 4.5μm至4.8μm。每个单独孢子囊有8至24个孢子。安定的游动孢子变大并快速经历二分裂,导致四分体、八分体,并最终成为孢子囊簇。孢子囊成熟之前,四分体形成在非常早的阶段开始。这些特征和Schizochytrium属一致。

[0349] 基于其18s rRNA基因与已知种的18s rRNA基因的类似性,对分离的破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695)进一步表征。通过标准程序(Sambrook J.and Russell D.2001.分子克隆:实验手册,第三版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York)制备来自破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695)的总基因组DNA并用于18s RNA基因的PCR扩增。用先前描述(Honda et.al.,J.Eukaryot.Microbiol.46(6)1999)的引物进行18s rRNA基因的PCR扩增。用染色体DNA模板的PCR条件如下:在50μL总体积中的0.2μM dNTPs、0.1μM的每一种引物、8%DMSO、200ng染色体DNA、2.5U PfuUltra® II fusion HS DNA聚合酶(Strata基因)和1X PfuUltra®缓冲液(Strata基因)。PCR方案包括下述步骤:(1)95℃,2分钟;(2)95℃,45秒;(3)55℃,30秒;(4)72℃,2分钟;(5)重复步骤2-4,40个循环;(6)72℃,5分钟;以及(7)保持在6℃。

[0350] 使用上述的染色体模板,PCR扩增产生了具有期望大小的不同DNA产物。根据制造商的指导将PCR产物克隆进载体pJET1.2/blunt(Fermentas),并使用提供的标准引物测定插入序列。

[0351] 表12显示了来自破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695)的18s rRNA序列与National Center for Biotechnology Information(NCBI)(NCBI)电子数据库中的DNA序列的比较。简而言之,通过VectorNTI程序(Invitrogen)的“AlignX”程序中的得分矩阵“swgapdnamt”(用于DNA比对的标准),测定“同一性%”。“覆盖度%”从NCBI电子数据库中来自Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)结算的结果中得到,并且其是在包括于比对区段中的查询长度的百分比。

[0352] 表12:18s rRNA序列的比较

[0353]	破囊壶菌	同一性% 计算 #1	覆盖度% 计算 #2
	<i>Thraustochytrium aggregatum</i> (p)	98	90
	<i>Thraustochytriidae</i> sp. HU1	84	86
	<i>Thraustochytriidae</i> sp. 8-7	84	91
	<i>Thraustochytrium multirudimentale</i>	81	88
	<i>Thraustochytriidae</i> sp. PW19	81	85
	<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888	81	95

[0354] (p):表示部分序列

[0355] 如表12所示,从同一性%角度发现,来自破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695)的18s rRNA基因序列与Honda,D.et al.,J.Euk.Micro.46(6):637-647(1999)中提供的T.aggregatum的18s rRNA基因序列,虽然不相同,但密切相关。公布的Thraustochytrium aggregatum的18s rRNA序列是部分序列,序列中间有大约71个DNA核苷酸缺口。从百分比覆盖度角度,本发明的隔离群的18s rRNA基因序列与Schizochytrium sp.ATCC20888比与T.aggregatum更密切相关。

[0356] 高保守的蛋白,比如肌动蛋白和 β -微管蛋白连同18s rRNA基因一起已广泛用作用于评估生物体之间系统发育关系的标记物(Baldauf,S.M.Am.Nat.154,S178(1999))。来自破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695)的总基因组DNA也用作用于肌动蛋白和 β -微管蛋白基因二者PCR扩增的模板。用针对来自T.aggregatum的肌动蛋白和 β 微管蛋白DNA序列的保守区域设计的引物,进行PCR扩增。

[0357] 用染色体DNA模板的PCR条件如下:在50 μ L总体积中的0.2 μ MdNTPs、0.1 μ M的每一种引物、8%DMSO、200ng染色体DNA、2.5U **Herculase®** II fusion DNA聚合酶(Strata基因)和1X **Herculase®** 缓冲液(Strata基因)。PCR方案包括下述步骤:(1)95 $^{\circ}$ C,2分钟;(2)95 $^{\circ}$ C,30秒;(3)55 $^{\circ}$ C,30秒;(4)72 $^{\circ}$ C,2分钟;(5)重复步骤2-4,40个循环;(6)72 $^{\circ}$ C,5分钟;和(7)保持在6 $^{\circ}$ C。

[0358] 使用上述染色体模板,PCR扩增产生具有期望大小的不同的DNA产物。根据制造商的指导,将各自的PCR产物克隆进载体pJET1.2/blunt(Fermentas),并使用提供的标准引物,测定每一种插入序列。

[0359] 表13显示来自破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695)的肌动蛋白氨基酸序列与公用数据库中得到的肌动蛋白序列比较的同一性。通过使用VectorNTI程序的“AlignX”程序内的得分矩阵“blosum62mt2”(用于蛋白比对的标准),测定同一性。

[0360] 表13:肌动蛋白蛋白序列同一性%的比较

[0361]

破囊壶菌	同一性%
<i>Thraustochytriidae</i> sp.RT49	98

Schizochytrium sp.ATCC20888	96
Thraustochytrium striatum	96
Thraustochytrium aggregatum	96
Japonochytrium marinum	95
Thraustochytrium aureum	95

[0362] 表14显示来自破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695)的 β -微管蛋白氨基酸序列与公众数据库中得到的 β -微管蛋白序列比较的同一性。通过使用VectorNTI程序的“AlignX”程序内的得分矩阵“blosum62mt2”(用于蛋白比对的标准),测定同一性。

[0363] 表14: β -微管蛋白序列同一性%的比较

[0364]

破囊壶菌	同一性%
Aplanochytrium kerguelense	100
Aplanochytrium stocchini	100
Japonochytrium marinum	100
Labyrinthula sp.N8	100
Thraustochytriidae sp.RT49	100
Thraustochytrium aggregatum	100
Thraustochytriidae sp.HU1	100
Thraustochytrium aureum	100
Thraustochytrium kinnei	100
Thraustochytriidae sp.#32	100
Thraustochytriidae sp.PW19	100
Schizochytrium aggregatum	100
Schizochytrium sp.ATCC20888	100

[0365] 基于上述特征,经分离的破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695)被认为代表新的Schizochytrium种并因此还被命名为Schizochytrium sp.ATCC PTA-9695。

[0366] 实施例30

[0367] 在如下所述的,在改变的培养条件下,经分离的破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695)产生高水平的细胞生长。表15中示出了典型的培养基和培养条件。还观察到高水平的脂肪酸和DHA(即,按重量计干细胞重量的大于50%是脂肪酸和按重量计大于50%的脂肪酸甲酯是DHA)。

[0368] 表15:器皿培养基

	成分	浓度	范围
	NaCl	g/L 12.5	0-25, 5-20 或 10-15
[0369]	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
[0370]	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
[0371]	<u>高压灭菌后(金属)</u>			
	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
[0372]	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
[0373]	<u>高压灭菌后(维生素)</u>			
[0374]	硫胺	mg/L	9.75	0.1-100, 1-50 或 5-25
[0375]	维生素B12	mg/L	0.16	0.1-100, 0.1-10 或 0.1-1
[0376]	Ca1/2-泛酸盐	mg/L	3.33	0.1-100, 0.1-50 或 1-10
[0377]	<u>高压灭菌后(碳)</u>			
[0378]	葡萄糖	g/L	30.0	5-150, 10-100 或 20-50
[0379]	<u>氮原料</u>			
[0380]	<u>成分</u>	<u>浓度</u>		
[0381]	NH ₄ OH	mL/L	21.6	0-150, 10-100 或 15-50
[0382]	典型的培养条件包括下述条件:			
[0383]	pH 约6.5-约8.5, 约6.5-约8.0 或 约7.0-约7.5			
[0384]	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			
[0385]	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			
[0386]	葡萄糖控制在: 约5-约50g/L, 约10-约40g/L 或 约20-约35g/L。			
[0387]	在pH7.0、22.5℃下, 有20%溶解氧、8200ppm Cl ⁻ 的进料碳和氮的培养中, 7天培养之后, 隔离群产生140g/L的干细胞重量, 按重量计有70%的脂肪酸含量。使用了闭环氮进料并且pH保持在7.0。在这些条件下, 7天中, ω-3生产力为8.92g/(L*天), 有4.7g/L的EPA(按重量计脂肪酸的5%)和56.3g/L的DHA(按重量计脂肪酸的57%)。			
[0388]	在pH7.0、22.5℃下, 有20%溶解氧、3640ppm Cl ⁻ 的进料碳和氮的培养中, 7天培养之后, 隔离群产生82g/L的干细胞重量, 有按重量计58%的脂肪酸含量。在这些条件下, 7天中, ω-3生产力为4.5g/(L*天), 有2.1g/L EPA(按重量计脂肪酸的4.3%)和28.5g/L DHA(按重量计脂肪酸的58.7%)。			
[0389]	在pH7.0、22.5℃下有20%溶解氧、980ppm Cl ⁻ 的进料碳和氮的培养中, 7天培养之后, 隔离群产生了60g/L的干细胞重量, 有按重量计53%的脂肪酸含量。在这些条件下, 7天			

中, ω -3生产率为2.8g/(L*天), 有1.1g/LEPA(按重量计脂肪酸的3.4%)和18.4g/L DHA(按重量计脂肪酸的56.8%)。

[0390] 实施例31

[0391] 从经分离的破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695)的生物物质样品(样品A)中提取油。在pH7.0、22.5℃下有20%溶解氧、980ppm Cl^- 的进料碳和氮的培养中, 产生生物物质样品。通过己烷提取工艺, 从生物物质样品A中提取油, 以产生微生物油样品A1。简而言之, 使用不锈钢管和不锈钢球轴承, 用己烷将干燥的生物物质磨碎大约2小时。将淤浆真空过滤并收集过滤物。使用旋转蒸发器去除己烷。还使用FRIOLEX®工艺(GEA Westfalia Separator UK Ltd., Milton Keynes, England)从生物物质样品A中提取油, 以产生微生物油样品A2。使用低压快速色谱法, 从微生物油样品A1和A2中分离单独的脂质种类, 并测定每一种类的重量百分比。使用具有火焰离子化检测的气相色谱(GC-FID), 测定每一种类的脂肪酸谱, 表示为脂肪酸甲酯(FAME)。

[0392] 快速色谱法-快速色谱法用来分离在粗制油中存在的脂质种类, 并测定在油中存在的每一种类的重量百分比。色谱系统利用硅胶60(EMD Chemical, Gibbstown, NJ), 用以3mL/min的含有石油醚和乙酸乙酯的流动相。步长式梯度(step gradient)用来从柱中选择性洗脱每一脂质种类。流动相梯度从100%石油醚开始并用50%乙酸乙酯结束(随后100%甲醇洗涤)。使用GilsonFC204大床级分收集器(large-bed fraction collector)(Gilson, Inc., Middleton, WI), 将级分收集在10mL试管中。通过薄层色谱法(TLC)分析每一管, 并将(如通过具有预期保留因子(R_f)的TLC板上的单点判断的)含有单独脂质种类的管合并、浓缩至干燥并称重。然后重量测量法测定总级分含量。

[0393] TLC分析-在硅胶板上进行薄层色谱法。使用由石油醚:乙基醚:乙酸(80:20:1)组成的溶剂系统洗脱板, 并使用碘蒸汽显现。然后将每一点的 R_f 值与每一脂质种类的报道文献值比较。

[0394] 脂肪酸分析-针对表示为FAME的脂肪酸组合物, 分析生物物质样品和经分离的脂质种类。将样品直接在螺帽试管中称重, 并将1mL在甲苯中的C19:0内标物(NuCheck, Elysian, MN)和2mL在甲醇中的1.5N HCl添加至每一管。将管短时间旋转并放在100℃下的加热块中2小时。将管从加热块中去除、冷却并添加1mL的饱和NaCl水。将管再次旋转、离心并将一部分的顶(有机)层放在GC小瓶中并通过GC-FID分析。使用Nu-Chek-Prep GLC参照标准(Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN)产生的3点内标物校准曲线量化FAME并基于保留时间试验性鉴定FAME。存在的脂肪酸表示为mg/g和总FAME的%。

[0395] 通过将粗制油溶于己烷并应用至柱头, 制备样品A1。使用快速色谱法将样品分级之后, 甾醇酯级分按重量计占粗制油的1.2%, 三酰基甘油酯(TAG)级分按重量计占粗制油的82.7%, 游离脂肪酸(FFA)级分按重量计占粗制油的0.9%和二酰甘油(DAG)级分按重量计占粗制油的2.9%。在下面表16和表17中分别示出了计算为mg/g和%FAME的样品A1粗制油和经分离的级分的总脂肪酸谱。

[0396] 表16: 计算为每克FAME的毫克数的样品A1脂肪酸谱

[0397]

	生物物质	粗制油	甾醇酯	TAG	FFA	DAG
Wt. %	NA	38%	1.2%	82.7%	0.9	2.9%

脂肪酸	FAME(mg/g)	FAME(mg/g)	FAME(mg/g)	FAME(mg/g)	FAME(mg/g)	FAME(mg/g)
C12:0*	0.6	0.0	1.9	3.2	1.7	0.0
C14:0*	5.7	13.6	12.8	20.2	13.0	17.6
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	1.3	3.4	3.1	3.1	2.1	2.6
C16:0*	105.5	239.5	222.2	274.3	183.3	225.1
C16:1*	0.0	0.0	0.8	0.0	0.8	0.0
C18:0*	6.4	16.4	43.1	16.8	9.8	14.0
C18:1N9*	0.0	3.8	1.9	3.3	1.0	3.5
C18:1N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:2N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:0*	1.8	5.5	13.0	4.7	2.0	2.9
C18:3N3*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:4N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.0
C20:2N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3N6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0*	0.0	0.8	7.3	0.8	0.0	1.2
C20:4N7	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0
C20:3N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4N6*	1.0	3.4	0.0	2.6	2.0	1.9
C22:1N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4N3	1.5	4.1	1.5	3.5	2.1	2.1
C20:5N3*	18.2	39.5	3.5	38.4	30.6	42.8
C24:0*	0.0	0.0	6.3	0.0	0.0	0.0
C22:4N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5N6*	11.9	29.5	8.9	26.9	14.8	18.7
C22:5N3*	1.1	4.7	0.9	3.6	3.4	2.7
C22:6N3*	253.5	569.7	107.3	556.5	352.8	451.4
总FAME的和	408.6	934.0	435.4	958.0	620.1	786.4

[0398] 表17:表示为总FAME的百分比的样品A1脂肪酸谱

[0399]

	生物质	粗制油	甾醇酯	TAG	FFA	DAG
脂肪酸	%FAME	%FAME	%FAME	%FAME	%FAME	%FAME
C12:0*	0.1	0.0	0.4	0.3	0.3	0.0
C14:0*	1.4	1.5	2.9	2.1	2.1	2.2
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.3	0.4	0.7	0.3	0.3	0.3
C16:0*	25.8	25.6	51.0	28.6	29.6	28.6
C16:1*	0.0	0.0	0.2	0.0	0.1	0.0

C18:0*	1.6	1.8	9.9	1.8	1.6	1.8
C18:1N9*	0.0	0.4	0.4	0.3	0.2	0.4
C18:1N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:2N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:0*	0.4	0.6	3.0	0.5	0.3	0.4
C18:3N3*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:4N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0
C20:2N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3N6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0*	0.0	0.1	1.7	0.1	0.0	0.1
C20:4N7	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0
C20:3N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4N6*	0.3	0.4	0.0	0.3	0.3	0.2
C22:1N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4N3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.3	0.3
C20:5N3*	4.5	4.2	0.8	4.0	4.9	5.4
C24:0*	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0
C22:4N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5N6*	2.9	3.2	2.1	2.8	2.4	2.4
C22:5N3*	0.3	0.5	0.2	0.4	0.5	0.3
C22:6N3*	62.0	61.0	24.6	58.1	56.9	57.4
FAME%的和	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

[0400] 通过将粗制油溶于己烷并应用至柱头,制备样品A2。使用快速色谱法将样品分级之后,甾醇酯级分按重量计占粗制油的0.8%,三酰基甘油酯(TAG)级分按重量计占粗制油的83.4%,游离脂肪酸(FFA)级分按重量计占粗制油的1.8%和二酰甘油(DAG)级分按重量计占粗制油的5.6%。下面表18和表19中分别示出了计算为mg/g和%FAME的样品A2粗制油和经分离的级分的总脂肪酸谱。

[0401] 表18:表示为每克FAME的毫克数计算的样品A2脂肪酸谱

[0402]

	生物质	粗制油	甾醇酯	TAG	FFA	DAG
Wt %	NA	NA	0.8%	83.4%	1.8%	5.6%
脂肪酸	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0.6	0.0	0.0	1.5	0.0	1.0
C14:0*	5.7	13.2	8.9	14.1	9.5	5.4
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	1.3	3.3	2.8	3.4	2.1	2.2
C16:0*	105.5	233.7	183.8	246.1	159.7	137.3
C16:1*	0.0	0.0	0.0	0.8	0.0	0.0
C18:0*	6.4	16.6	23.6	16.9	11.3	5.6
C18:1 N9*	0.0	7.6	5.0	4.3	2.4	2.6
C18:1 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:2 N6*	0.0	2.2	0.7	1.6	0.8	5.1
C20:0*	1.8	5.2	12.1	5.5	2.6	1.1
C18:3 N3*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:4 N3	0.0	0.0	0.0	0.8	1.0	0.0
C20:2 N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N6	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0
C22:0*	0.0	0.7	6.0	1.3	0.8	0.0
C20:4 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N6*	1.0	3.0	0.0	3.1	2.3	1.2
C22:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N3	1.5	4.1	1.4	4.3	2.7	1.0
C20:5 N3*	18.2	38.6	2.7	38.6	39.5	45.5
C24:0*	0.0	0.0	4.7	0.6	0.0	0.3
C22:4 N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5 N6*	11.9	28.2	8.6	29.6	18.0	14.7
C22:5 N3*	1.1	3.4	0.0	3.5	2.5	2.2
C22:6 N3*	253.5	566.7	102.2	575.0	475.3	447.2
总 FAME 的和	408.6	926.5	362.3	951.3	730.4	672.5

[0403] 表19:表示为总FAME的百分比的样品A2脂肪酸谱

[0404]

	生物质	粗制油	甾醇酯	TAG	FFA	DAG
脂肪酸	%FAME	%FAME	%FAME	%FAME	%FAME	%FAME
C12:0*	0.1	0.0	0.0	0.2	0.0	0.2
C14:0*	1.4	1.4	2.4	1.5	1.3	0.8
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.3	0.4	0.8	0.4	0.3	0.3
C16:0*	25.8	25.2	50.7	25.9	21.9	20.4
C16:1*	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0

C18:0*	1.6	1.8	6.5	1.8	1.5	0.8
C18:1N9*	0.0	0.8	1.4	0.5	0.3	0.4
C18:1N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:2N6*	0.0	0.2	0.2	0.2	0.1	0.8
C20:0*	0.4	0.6	3.3	0.6	0.4	0.2
C18:3N3*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C18:4N3	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0
C20:2N6*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3N6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0*	0.0	0.1	1.7	0.1	0.1	0.0
C20:4N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4N6*	0.3	0.3	0.0	0.3	0.3	0.2
C22:1N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4N3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.2
C20:5N3*	4.5	4.2	0.7	4.1	5.4	6.8
C24:0*	0.0	0.0	1.3	0.1	0.0	0.0
C22:4N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5N6*	2.9	3.0	2.4	3.1	2.5	2.2
C22:5N3*	0.3	0.4	0.0	0.4	0.3	0.3
C22:6N3*	62.0	61.2	28.2	60.4	65.1	66.5
FAME%的和	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0

[0405] 注意到,分别使用典型的己烷提取工艺和 Friolex[®] 工艺,提取样品A1和A2。预期如果使用本发明的工艺提取样品,表16-19的脂肪酸谱基本上相同。

[0406] 实施例32

[0407] 如实施例31所述的,使用Friolex工艺从发酵液中提取油之后,通过精制、漂白和除臭步骤进一步处理粗制油以获得最终油。将最终油用高油酸的向日葵油稀释,以获得具有大约400mg/g的DHA含量的最终的商业油。分离单独的脂质种类,并用具有火焰离子化检测的气相色谱(GC-FID),测定每一种类的脂肪酸谱,表示为脂肪酸甲酯(FAME)。

[0408] 快速色谱法-快速色谱法用来分离在最终油中存在的脂质种类并测定在油中存在的每一种类的重量百分比。色谱系统利用硅胶60(EMD Chemical,Gibbstown,NJ),用以3mL/min的含有石油醚和乙酸乙酯的流动相。步长式梯度用来从柱中选择性洗脱每一脂质种类。流动相梯度从100%石油醚开始并用结束50%乙酸乙酯(随后100%甲醇洗涤)。将使用Gilson FC204large-bed级分收集器(Gilson,Inc.,Middleton,WI),级分收集在10mL试管中。通过薄层色谱法(TLC)分析每一管,并将(如通过具有预期保留因子(Rf)的TLC板上的单点判断的)含有单独脂质种类的管合并、浓缩至干燥并称重。然后重量测量法测定总级分含量。

[0409] TLC分析-在硅胶板上进行薄层色谱法。使用由石油醚:乙基醚:乙酸(80:20:1)组成的溶剂系统洗脱板,并使用碘蒸汽显现。然后将每一点的Rf值与每一脂质种类的报道文献值比较。

[0410] 脂肪酸分析-针对表示为FAME的脂肪酸组合物,分析最终油样品和经分离的脂质种类。将样品直接称重进入螺帽试管,并将1mL在甲苯中的C19:0内标物(NuCheck,Elysian,MN)和2mL在甲醇中的1.5N HCl添加至每一管。将管短时间旋转并放在100℃下的加热块中2小时。将管从加热块中去除、冷却并添加1mL饱和NaCl水。将管再次旋转、离心机并将一部分的顶(有机)层放在GC小瓶中并通过GC-FID分析。使用Nu-Chek-Prep GLC参照标准(Nu-Chek Prep, Inc., Elysian, MN)产生的3点内标物校准曲线量化FAME并基于保留时间试验性鉴定。存在的脂肪酸表示为mg/g和总FAME的%。

[0411] 通过将250mg最终油溶于600μL己烷并应用至柱头,制备样品。使用快速色谱法将样品分级之后,甾醇酯级分按重量计占最终油的1.2%,三酰基甘油酯(TAG)级分按重量计占最终油的92.1%,游离脂肪酸(FFA)级分按重量计占最终油的2.1%,甾醇级分按重量计占最终油的1.1%,二酰基甘油酯(DAG)级分占最终油的2.8%按重量计。

[0412] 合并的级分的TLC分析显示,FFA和甾醇级分分别与TAG和DAG混合。在下面表20和表21中分别示出了计算为mg/g和%FAME的FRIOLEX®最终油和经分离的级分的总脂肪酸谱。

[0413] 表20:计算为每克FAME的毫克数的脂肪酸谱

[0414]

	最终油	酯醇酯	TAG	FFA	酯醇	DAG
Wt. %	NA	1.2	92.1	2.1	1.1	2.8
脂肪酸	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0*	0.0	0.0	1.0	0.0	1.2	0.6
C14:0*	11.5	5.1	11.3	6.0	9.6	5.7
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	2.3	0.0	2.3	1.2	2.0	1.9
C16:0*	183.3	80.0	180.8	99.9	149.3	132.2
C16:1*	0.0	0.0	0.9	0.0	0.8	0.6
C18:0*	19.6	17.5	19.6	7.5	16.2	6.7
C18:1 N9*	243.3	242.8	249.6	62.9	190.5	84.0
C18:1 N7	1.9	1.7	2.0	0.8	1.9	0.9
C18:2 N6*	13.8	5.6	13.8	6.2	14.3	9.1
C20:0*	4.3	6.6	4.5	1.5	3.6	1.4
C18:3 N3*	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
C20:1 N9*	0.0	0.0	0.8	0.0	0.8	0.0
C18:4 N3	0.0	0.0	0.7	1.3	0.9	0.4
C20:2 N6*	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0
C20:3 N6	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0
C22:0*	3.3	61.0	3.2	1.1	3.0	1.2
C20:4 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N6*	1.7	0.0	2.3	1.4	1.9	1.3
C22:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N3	2.4	4.5	3.0	2.2	2.6	1.3
C20:5 N3*	28.1	3.0	27.7	38.6	25.6	43.2
C24:0*	1.4	64.3	1.4	0.0	2.0	1.0
C22:4 N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5 N6*	20.0	7.6	21.0	10.1	17.2	14.4
C22:5 N3*	2.8	0.0	3.1	3.7	3.4	2.9
C22:6 N3*	407.1	72.5	417.4	443.6	350.5	428.5
总 FAME 的 和	936.1	572.1	967.6	688.0	797.3	737.3

[0415] 表21:表示为总FAME的百分比的脂肪酸谱

[0416]

	最终油	甾醇酯	TAG	FFA	甾醇	DAG
脂肪酸	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0*	0.0	0.0	0.1	0.0	0.2	0.1
C14:0*	1.2	0.9	1.2	0.9	1.2	0.8
C14:1*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.3
C16:0*	19.6	14.0	18.7	14.5	18.7	17.9
C16:1*	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.1
C18:0*	2.1	3.1	2.0	1.1	2.0	0.9
C18:1 N9*	26.0	42.4	25.8	9.1	23.9	11.4
C18:1 N7	0.2	0.3	0.2	0.1	0.2	0.1
C18:2 N6*	1.5	1.0	1.4	0.9	1.8	1.2
C20:0*	0.5	1.1	0.5	0.2	0.5	0.2
C18:3 N3*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 N9*	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0
C18:4 N3	0.0	0.0	0.1	0.2	0.1	0.1
C20:2 N6*	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0
C20:3 N6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0*	0.4	10.7	0.3	0.2	0.4	0.2
C20:4 N7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 N3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N6*	0.2	0.0	0.2	0.2	0.2	0.2
C22:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 N3	0.3	0.8	0.3	0.3	0.3	0.2
C20:5 N3*	3.0	0.5	2.9	5.6	3.2	5.9
C24:0*	0.2	11.2	0.1	0.0	0.2	0.1
C22:4 N9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 N9*	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:5 N6*	2.1	1.3	2.2	1.5	2.2	1.9
C22:5 N3*	0.3	0.0	0.3	0.5	0.4	0.4
C22:6 N3*	43.6	12.7	43.1	64.5	44.0	58.1
FAME%的和	100	100	100	100	100	100

[0417] 注意到,使用Friolex[®]工艺,从提取的样品中获得了表20和21的脂肪酸谱。预期如果使用本发明的工艺提取样品,表20和21的脂肪酸谱基本上相同。

[0418] 实施例33

[0419] 有980ppm Cl⁻的进料碳和氮的培养(破囊壶菌培养基)中制备经分离的破囊壶菌(ATCC登记号PTA-9695)的两天大烧瓶接种物。

[0420] 根据下述程序进行诱变:

[0421] 将大约50ml的无菌的T=2天大烧瓶接种物倒进40ml无菌玻璃匀化器。培养物在匀化器中接受50次均化(plunge)。将培养物吸出并过滤通过放在50ml无菌管中的无菌50微米

筛网过滤器(网孔用作保留更大的集落丛,同时让更小的簇和单细胞通过50微米网孔的手段)。在无菌50ml管中收集全部浓缩的浸渍物(macerate)。旋转浸渍的培养物并在含有破囊壶菌培养基的管中制得以高至1:100倍的水平稀释液。将稀释的浸渍样品旋转,之后将200 μ l的接种物添加至含有4-5个玻璃珠子(3mm玻璃珠子)的100x15mm破囊壶菌培养基琼脂培养皿。将每一个板轻轻搅动,努力使珠子将接种物均匀地在板各处扩展。将珠子从板上丢弃并将板盖上盖子静置大约5分钟至干燥。和在暗光中进行的程序一样,将无菌罩和毗邻区域两处的光关掉。仅有极微的光来运行程序,但仅仅是间接的且暗的。

[0422] 将五个重复板放在XL交联剂(Spectronics Corporation, New York)底部,盖子打开,同时辐照样品。交联剂以微焦耳方式传递能量并且寻求实现90%-95%杀死率水平。使用相同方案,用未诱变处理的细胞接种五个重复对照板。这些细胞计数用来计算%杀死率。一旦辐照结束,将板取出,将盖子放回原处并将板在封口膜中包裹,随后在铝箔中包裹。第一周使板在黑暗中生长是必须的,使得它们不能修复损伤的基因。

[0423] 将板放在22.5℃房间中约10天,之后对集落计数。当得到最终计数时,用无菌接种环挑取单独的集落并在新的破囊壶菌培养基板上再划线。将每一集落在单独的板上铺平板。当板生长密集时,使用接种环取样,并接种进含有50ml破囊壶菌培养基的250ml无菌摇瓶。将该烧瓶放在在22.5℃房间中的200rpm的摇床上。T=7天时,摇瓶培养物收获于50ml无菌管中。得到pH并将样品旋转以收集生物质球团。将每一样品漂洗并再悬浮在异丙醇和蒸馏水的50:50混合物中之后再次旋转。将收集的球团冷冻干燥称重并进行FAME分析。表22-28中的数据表示用上述工艺产生的突变体。

[0424]

表 22: 破囊壶菌菌株 ATCC 登记号 PTA-9695 的突变体

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 1	突变体 2	突变体 3	突变体 4	突变体 5	突变体 8	突变体 9	突变体 10
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.10	0.10	0.08	0.08	0.13	0.07	0.11	0.08	0.08
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.11	0.11	0.17	0.13	0.12	0.18	0.11	0.15	0.14
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.79	1.85	1.49	1.37	2.36	1.29	1.85	1.72	1.57
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:0	30.98	28.75	29.96	29.97	30.33	29.86	30.97	30.11	29.20
% 16:1	0.27	0.20	0.31	0.14	0.25	0.27	0.16	0.27	0.24
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.12	0.15	0.13	0.17	0.27	0.12	0.16	0.13	0.13
% 18:0	1.29	1.22	1.38	1.47	1.22	1.57	1.25	1.34	1.34
% 18:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.03	0.00	0.00	0.07	0.00	0.03	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.39	0.36	0.42	0.45	0.34	0.46	0.37	0.40	0.40
% 20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.37	0.38	0.32	0.42	0.44	0.32	0.41	0.33	0.36
% 20:4 ARA	0.55	0.55	0.94	0.57	0.80	0.89	0.60	0.73	0.75

[0425]

表 22 续表

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 1	突变体 2	突变体 3	突变体 4	突变体 5	突变体 8	突变体 9	突变体 10
% 20:5 n-3 EPA	2.62	2.94	3.01	2.40	3.64	2.83	2.54	2.81	2.81
% 22:0	0.08	0.08	0.09	0.09	0.07	0.10	0.07	0.09	0.09
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n-6	3.19	3.19	2.94	3.43	3.35	2.87	3.34	3.01	3.15
% 22:5 n-3	0.18	0.18	0.21	0.23	0.20	0.18	0.20	0.17	0.18
% 22:6 n-3 DHA	56.88	58.63	57.56	57.85	54.87	57.98	56.62	57.53	58.52
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.09	0.00
%脂肪	46.83	46.10	31.23	47.39	49.78	30.62	54.71	37.72	37.87
%未知	0.85	0.46	0.35	0.51	0.51	0.36	0.50	0.38	0.39

[0426]

表 23: 破囊壶菌菌株 ATCC 登记号 PTA-9695 的突变体

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 11	突变体 13	突变体 14	突变体 15	突变体 16	突变体 20	突变体 21	突变体 22
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.10	0.10	0.08	0.09	0.11	0.11	0.09	0.09	0.10
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.11	0.15	0.16	0.14	0.13	0.12	0.17	0.16	0.13
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.79	1.89	1.43	1.75	1.83	1.98	1.76	1.77	1.81
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:0	30.98	31.08	30.27	29.92	31.79	30.18	28.84	30.05	30.81
% 16:1	0.27	0.32	0.26	0.28	0.21	0.24	0.23	0.23	0.33
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.12	0.24	0.15	0.13	0.15	0.12	0.14	0.16	0.14
% 18:0	1.29	1.36	1.44	1.31	1.36	1.21	1.28	1.34	1.33
% 18:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.03	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.39	0.38	0.42	0.39	0.40	0.37	0.37	0.38	0.38
% 20:1 n-9	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.37	0.43	0.36	0.33	0.36	0.37	0.33	0.35	0.34
% 20:4 ARA	0.55	0.79	0.72	0.80	0.64	0.62	0.83	0.73	0.69
% 20:5 n-3 EPA	2.62	3.17	2.72	2.97	2.52	2.66	3.03	2.90	2.87
% 22:0	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08

[0427]

表 23 续表

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 11	突变体 13	突变体 14	突变体 15	突变体 16	突变体 20	突变体 21	突变体 22
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n-6	3.19	3.25	3.06	2.97	3.07	3.16	2.98	3.01	3.02
% 22:5 n-3	0.18	0.20	0.19	0.17	0.19	0.16	0.17	0.18	0.18
% 22:6 n-3 DHA	56.88	55.17	57.52	57.63	56.02	57.38	58.58	57.45	56.65
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.00	0.08
%脂肪	46.83	46.19	37.00	38.41	48.46	47.32	37.71	40.23	43.55
%未知	0.85	0.47	0.39	0.36	0.47	0.44	0.37	0.39	0.38

[0428]

表 24: 破囊壶菌菌株 ATCC 登记号 PTA-9695 的突变体

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 24	突变体 26	突变体 27	突变体 29	突变体 30	突变体 33	突变体 34	突变体 35
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.10	0.11	0.09	0.09	0.08	0.08	0.10	0.11	0.09
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.11	0.12	0.13	0.14	0.16	0.14	0.12	0.12	0.10
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.79	1.98	1.71	1.69	1.63	1.66	1.93	2.01	1.59
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.70	0.54	0.39
% 16:0	30.98	30.61	30.32	30.21	29.70	29.50	30.26	32.28	30.78
% 16:1	0.27	0.19	0.22	0.22	0.26	0.26	0.29	0.26	0.16
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.12	0.15	0.18	0.16	0.13	0.13	0.26	0.16	0.12
% 18:0	1.29	1.24	1.31	1.31	1.32	1.30	1.32	1.37	1.34
% 18:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.11	0.09
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.39	0.37	0.39	0.40	0.40	0.39	0.37	0.40	0.40
% 20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.14
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.37	0.38	0.37	0.35	0.35	0.35	0.00	0.00	0.00
% 20:4 ARA	0.55	0.61	0.59	0.69	0.68	0.32	0.34	0.24	0.28
% 20:5 n-3 EPA	2.62	2.62	2.70	2.85	2.90	2.91	3.28	2.51	2.59
% 22:0	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08

[0429]

表 24 续表

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 24	突变体 26	突变体 27	突变体 29	突变体 30	突变体 33	突变体 34	突变体 35
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n-6	3.19	3.10	3.11	3.05	3.10	3.11	3.43	3.26	3.56
% 22:5 n-3	0.18	0.16	0.18	0.19	0.18	0.18	0.18	0.15	0.24
% 22:6 n-3 DHA	56.88	57.03	57.46	57.46	57.96	58.52	55.92	54.96	56.73
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.07	0.07	0.07
% 脂肪	46.83	47.80	43.50	38.86	38.60	38.16	46.95	46.43	51.55
%未知	0.85	0.45	0.42	0.39	0.37	0.82	1.25	1.23	1.25

[0430]

表 25: 破囊壶菌菌株 ATCC 登记号 PTA-9695 的突变体

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 36	突变体 37	突变体 38	突变体 39	突变体 40	突变体 42	突变体 43	突变体 44
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.10	0.00	0.11	0.00	0.11	0.09	0.08	0.12	0.09
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.11	0.44	0.09	0.24	0.12	0.11	0.12	0.08	0.15
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.79	1.25	1.99	1.48	1.96	1.76	1.43	2.17	1.75
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	2.12	0.48	0.71	0.54	0.55	0.36	0.62	0.50
% 16:0	30.98	26.95	28.04	32.28	30.84	30.25	25.77	43.37	30.18
% 16:1	0.27	0.00	0.26	0.23	0.22	0.21	0.10	1.05	0.22
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.12	0.95	0.13	0.28	0.16	0.16	0.10	0.26	0.13
% 18:0	1.29	1.58	1.11	1.79	1.30	1.29	1.25	2.21	1.34
% 18:1 n-9	0.00	0.37	0.08	0.25	0.09	0.09	0.12	0.09	0.10
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.39	0.34	0.31	0.43	0.38	0.39	0.36	0.61	0.40
% 20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.43	0.00	0.14	0.15	0.15	0.49
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:4 ARA	0.55	0.41	0.31	0.24	0.27	0.24	0.30	0.35	0.23
% 20:5 n-3 EPA	2.62	5.36	2.77	4.00	2.72	2.80	3.21	3.47	2.80
% 22:0	0.08	0.00	0.07	0.14	0.07	0.08	0.07	0.14	0.08

[0431]

表 25 续表

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 36	突变体 37	突变体 38	突变体 39	突变体 40	突变体 42	突变体 43	突变体 44
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.06	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n-6	3.19	2.40	3.94	2.57	3.48	3.29	3.89	2.37	3.33
% 22:5 n-3	0.18	0.00	0.19	0.00	0.17	0.17	0.30	0.33	0.17
% 22:6 n-3 DHA	56.88	57.52	58.57	54.20	56.24	57.09	60.99	41.61	56.76
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.00	0.08	0.00	0.08	0.09	0.08	0.06	0.09
%脂肪	46.83	12.73	54.86	18.08	45.74	42.59	42.48	56.44	41.20
%未知	0.85	0.29	1.36	0.73	1.28	1.20	1.31	0.90	1.20

[0432]

表 26: 破囊壶菌菌株 ATCC 登记号 PTA-9695 的突变体

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 45	突变体 46	突变体 47	突变体 48	突变体 49	突变体 50	突变体 51	突变体 52
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.10	0.10	0.13	0.11	0.07	0.09	0.09	0.09	0.11
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.11	0.11	0.10	0.09	0.13	0.09	0.13	0.10	0.09
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.79	1.79	2.07	1.86	1.52	1.62	1.78	1.78	1.85
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	0.41	0.76	0.57	0.46	0.48	0.55	0.53	0.53
% 16:0	30.98	28.79	24.90	30.07	29.07	31.21	30.46	30.79	32.53
% 16:1	0.27	0.19	0.24	0.18	0.17	0.17	0.18	0.21	0.22
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.12	0.11	0.24	0.16	0.12	0.14	0.17	0.18	0.15
% 18:0	1.29	1.24	1.07	1.28	1.41	1.43	1.36	1.48	1.35
% 18:1 n-9	0.00	0.08	0.07	0.09	0.09	0.08	0.10	0.09	0.06
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.12	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.39	0.36	0.29	0.37	0.42	0.42	0.39	0.40	0.41
% 20:1 n-9	0.00	0.15	0.13	0.11	0.24	0.13	0.19	0.16	0.19
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.37	0.00	0.12	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:4 ARA	0.55	0.29	0.65	0.26	0.18	0.21	0.22	0.24	0.24
% 20:5 n-3 EPA	2.62	3.05	4.28	2.66	2.93	2.46	2.71	2.94	2.44

[0433]

表 26 续表

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 45	突变体 46	突变体 47	突变体 48	突变体 49	突 变 体 50	突变体 51	突变体 52
% 22:0	0.08	0.07	0.06	0.07	0.09	0.09	0.08	0.08	0.08
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.06	0.07	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n-6	3.19	3.59	4.28	3.46	3.07	3.32	3.17	3.18	3.24
% 22:5 n-3	0.18	0.25	0.27	0.18	0.17	0.17	0.16	0.17	0.17
% 22:6 n-3 DHA	56.88	57.74	58.32	56.70	58.65	56.45	56.83	56.19	55.06
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.07	0.15	0.10	0.10	0.11	0.10	0.10	0.07
%脂肪	46.83	48.91	58.95	54.80	35.41	48.60	44.93	43.01	51.93
%未知	0.85	1.55	1.63	1.57	1.09	1.35	1.31	1.28	1.19

[0434]

表 27 破囊壶菌菌株 ATCC 登记号 PTA-9695 的突变体

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 53	突变体 54	突变体 55	突变体 56	突变体 57	突变体 58	突变体 60	突变体 61	突变体 65
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.10	0.09	0.08	0.12	0.08	0.08	0.08	0.08	0.10	0.08
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.11	0.11	0.12	0.08	0.09	0.13	0.16	0.14	0.09	0.14
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.79	1.74	1.63	2.13	1.67	1.59	1.59	1.59	1.85	1.58
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	0.53	0.52	0.48	0.51	0.52	0.45	0.50	0.51	0.48
% 16:0	30.98	30.13	29.54	33.01	31.08	29.37	30.65	29.39	31.15	30.03
% 16:1	0.27	0.21	0.23	0.26	0.26	0.14	0.25	0.22	0.26	0.25
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.12	0.15	0.14	0.14	0.14	0.16	0.12	0.13	0.14	0.13
% 18:0	1.29	1.30	1.30	1.37	1.38	1.37	1.46	1.30	1.30	1.35
% 18:1 n-9	0.00	0.08	0.08	0.00	0.06	0.11	0.09	0.10	0.07	0.07
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.39	0.38	0.39	0.40	0.42	0.38	0.43	0.39	0.39	0.41
% 20:1 n-9	0.00	0.19	0.16	0.13	0.19	0.20	0.17	0.14	0.13	0.21
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.37	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:4 ARA	0.55	0.25	0.21	0.26	0.22	0.25	0.51	0.20	0.24	0.19
% 20:5 n-3 EPA	2.62	2.75	2.78	2.81	2.67	2.78	5.76	2.72	2.59	2.82
% 22:0	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.08	0.09	0.08	0.08	0.09

[0435]

表 27 续表

脂肪酸	对照 ATCC PTA-9695	突变体 53	突变体 54	突变体 55	突变体 56	突变体 57	突变体 58	突变体 60	突变体 61	突变体 65
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.06	0.00
% 22:5 n-6	3.19	3.47	3.20	3.25	3.19	3.43	2.62	3.30	3.42	3.18
% 22:5 n-3	0.18	0.18	0.18	0.17	0.17	0.20	0.59	0.17	0.17	0.17
% 22:6 n-3										
DHA	56.88	56.99	58.07	54.04	56.38	57.76	54.09	58.21	55.91	57.56
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.09	0.09	0.07	0.10	0.09	0.11	0.10	0.07	0.08
%脂肪	46.83	45.83	39.59	48.81	41.92	43.97	33.96	36.97	50.40	36.21
%未知	0.85	1.28	1.19	1.19	1.29	1.35	0.77	1.24	1.48	1.17

[0436]

表 28 破囊壶菌菌株 ATCC 登记号 PTA-9695 的突变体

脂肪酸	对照 ATCC PTA- 9695	突变体 66	突变体 67	突变体 68 ATCC PTA- 9696	突变体 69	突变体 70 ATCC PTA- 9697	突变体 71	突变体 72 ATCC PTA- 9698	突变体 73	突变体 74
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	2.42	2.29	2.07	2.09	2.11	2.21	2.27	2.29	1.97	2.05
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.55	0.47	0.48	0.47	0.47	0.44	0.46	0.40	0.50	0.47
% 16:0	39.19	31.02	26.20	25.84	27.79	28.14	28.89	33.49	24.50	23.95
% 16:1	0.43	0.19	0.00	0.00	0.00	0.00	0.19	0.21	0.00	0.00
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00
% 18:0	1.67	1.68	1.22	1.22	1.44	1.49	1.51	2.24	1.11	1.02
% 18:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.18	0.20	0.21	0.19	0.17	0.22	0.16	0.22	0.22
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.49	0.41	0.32	0.31	0.35	0.37	0.44	0.52	0.29	0.27
% 20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

[0437]

表 28 续表

脂肪酸	对照 ATCC PTA- 9695	突变体 66	突变体 67	突变体 68 ATCC PTA- 9696	突变体 69	突变体 70 ATCC PTA- 9697	突变体 71	突变体 72 ATCC PTA- 9698	突变体 73	突变体 74
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n- 9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n- 6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n- 3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:4 ARA	0.18	0.16	0.33	0.27	0.24	0.37	0.30	0.27	0.38	0.39
% 20:5 n- 3 EPA	1.76	2.30	3.86	3.97	3.32	4.12	3.09	2.74	4.43	4.53
% 22:0	0.33	0.46	0.35	0.44	0.48	0.38	0.43	0.12	0.35	0.34
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n- 6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n- 6	2.62	2.83	3.17	2.66	2.72	2.95	3.46	2.79	3.17	3.19
% 22:5 n- 3	0.18	0.18	0.46	0.42	0.34	0.61	0.25	0.27	0.48	0.57
% 22:6 n- 3 DHA	49.52	57.01	60.60	61.42	59.74	58.03	55.62	53.06	61.83	62.23
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
% 脂肪	52.70	49.32	48.51	49.49	48.80	53.65	40.38	63.40	48.27	46.63
%未知	0.35	0.82	0.73	0.66	0.67	0.73	2.46	1.18	0.78	0.76

[0438] 实施例34
[0439] 分离微生物

[0440] 低潮期间,从沿着北美西海岸(加利福尼亚、俄勒冈州和华盛顿)和夏威夷的潮间带栖息地,包括湾和河口收集样品。将水、沉积物、活的植物材料和腐败的植物/动物碎片放在无菌50ml管中。将每一样品的一部分连同水一起在分离培养基的固体琼脂平板涂布。分离培养基由下述组成:500ml人造海水、500ml蒸馏水、1g葡萄糖、1g甘油、13g琼脂、1g谷氨酸盐、0.5g酵母提取物、0.5g酪蛋白水解物、1ml维生素溶液(100mg/L硫胺、0.5mg/L生物素、0.5mg B₁₂)、1ml痕量矿物质溶液(PII金属、每升含6.0gFeCl₃6H₂O、6.84g H₃BO₃、0.86g MnCl₂4H₂O、0.06g ZnCl₂、0.026CoCl₂6H₂O、0.052g NiSO₄H₂O、0.002g CuSO₄5H₂O和0.005g Na₂MoO₄2H₂O)以及500mg的青霉素G和链霉素硫酸盐的每一种。将琼脂平板在20-25℃下在黑暗中孵育。2-4天之后,在放大下检查琼脂平板并用无菌牙签挑取细胞集落并在新的培养基板上再划线。将细胞在新培养基上重复划线直到去除污染的生物体。两种经分离的微生物保藏于ATCC登记号PTA-10212和PTA-10208。

[0441] 保藏于ATCC登记号PTA-10212的经分离的微生物的分类学特征

[0442] 保藏于ATCC登记号PTA-10212(“PTA-10212”)的经分离的微生物的培养物显现出白色的、湿的、模糊的集落,而没有可见的分离的孢子群。

[0443] 将PTA-10212在固体和液体FFM、固体KMV、KMV淤泥(1%)、KMV发酵液和MH发酵液上生长,以进一步检查生长特征。观察到PTA-10212在KMV和MH上快速生长。见,例如,Porter D.,1989.Phylum Labyrinthulomycota.In Margulis,L.,Corliss,J.O.,Melkonian,M.,Chapman,D.J.(Eds.)Handbook of Protoctista,Jones and Bartlett,Boston,pp.388-398(KMV);Honda et al.,Mycol.Res.102:439-448(1998)(MH);和美国专利号5,130,242(FFM)。

[0444] PTA-10212在固体FFM培养基上生长若干天之后,在KMV培养基和MH发酵液中生长72小时之后,得到下述观察。孢子囊在任何培养基中/任何培养基上不是丛生的并且非常小(5-10μm)。PTA-10212没有展示Schizochytrium分裂型的丰富的四分体特征。在转移至新鲜固体培养基之后约24小时显现变形虫样的细胞。这些变形虫样的细胞几天后消失并且在液体或淤泥培养基中不是明显的。和Yokoyama,R.et al.,Mycoscience48(6):329-341(2007)所述的、如具有“烧瓶底部上小沙粒”外观的Aurantiochytrium不同,当在液体培养基中生长时,PTA-10212不沉在烧瓶底部,但悬浮在KMV和MH液体培养基二者中。孢子囊不像典型的Schizochytrium或Oligochytrium一样密集,所述Schizochytrium或Oligochytrium还具有PTA-10212不存在的强健的细胞外质网络。当大多数种在若干小时期间经历由较大孢子囊分裂(division)而成的小孢子囊或同化细胞无性分裂时,PTA-10212形成哑铃状伸长的同化细胞,所述细胞接着形成拉开分离的哑铃端的细峡部。得到的细胞显现为小的同化细胞。观察不到变形虫样的细胞直接形成哑铃状同化细胞。观察到游泳的典型的鞭毛游动孢子但相对稀少。通过营养性分裂分裂的PTA-10212不大量繁殖。观察不到直接释放的游动孢子,但观察到游动孢子游泳。营养性细胞非常小(2μm to 5μm)。

[0445] 使用流过技术进一步检查PTA-10212,其中通过将一小部分的琼脂-生长集落悬浮于一滴半浓度海水中制备显微镜载玻片。用该技术,观察到初级孢子囊是球形的且直径大约10μm。壁非常薄并且当原生质体的二分裂开始时观察不到残留物。重复的二分裂产生8-16个更小的(直径4-5μm)次级孢子囊。次级孢子囊保持静止若干小时,之后再次释放无定形原生质体。无定形原生质体通过收聚和拖拉、最初产生典型的哑铃状中间阶段并最终导致

直径为2.5–2.8 μm 的4–8个小球形体来分裂。后者保持若干分钟至1–2小时,接着改变形状(伸长的)并成为2.3–2.5 $\times$ 3.7–3.9 μm 的双鞭毛游动孢子。游动孢子是大量的并且当静止时可精确测量。游动孢子接着变圆并开始新的发育循环。游动孢子比*Sicyoidochytrium minutum*更大并且比*Ulkenia visurgensis*更小。

[0446] 基于其18s rRNA基因与已知种的18s rRNA基因的类似性,将PTA-10212进一步表征。通过标准程序制备来自PTA-10212的基因组DNA。见,例如,Sambrook J.和Russell D.2001.分子克隆:实验手册,第三版。Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York。简而言之:(1)离心来自对数培养中间段的500 μL 细胞。将细胞再次离心并从具有小孔端(bore tip)的细胞球团去除痕量液体;(2)用200 μL 裂解缓冲液(20mM Tris pH8.0、125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶K、50mM NaCl、10mM EDTA pH8.0、0.5%SDS)再悬浮球团;(3)将细胞在50 $^{\circ}\text{C}$ 下裂解1小时;(4)将裂解混合物吸进相锁定凝胶(PLG-Eppendorf)2mL管;(5)添加相等体积的P:C:I并混合1.5小时;(6)将管以12,000 $\times$ g离心5分钟;(7)从PLG管中的上述凝胶中去除水相并将相等体积的氯仿添加至水相并混合30分钟;(8)将管以14,000 $\times$ g离心大约5分钟;(9)将远离氯仿的顶层(水相)吸出并放在新管中;(10)添加0.1体积的3MNaOAc并混合(倒转若干次);(11)添加2体积的100%EtOH并混合(倒转若干次),基因组DNA沉淀剂在该阶段形成;(12)将管在微型离心机中4 $^{\circ}\text{C}$ 下以14,000 $\times$ g离心大约15分钟;(13)将液体轻轻倒出,基因组DNA留在管底部;(14)用0.5mL70%EtOH洗涤球团;(15)将管在微型离心机中4 $^{\circ}\text{C}$ 下以14,000 $\times$ g离心大约15分钟;(16)将EtOH轻轻倒出并干燥基因组DNA球团;并(17)将适当体积的H₂O和RNase直接添加至基因组DNA球团。用先前描述(Honda et.al., J.Euk.Micro.46(6):637–647(1999)的引物进行18s rRNA基因的PCR扩增。用染色体DNA模板的PCR条件如下:在50 μL 总体积中的0.2 μM dNTPs、0.1 μM 每一引物、8%DMSO、200ng染色体DNA、2.5U **Herculase®** II Fusion DNA聚合酶(Strata基因)和**Herculase®**缓冲液(Strata基因)。PCR方案包括下述步骤:(1)95 $^{\circ}\text{C}$,2分钟;(2)95 $^{\circ}\text{C}$,35秒;(3)55 $^{\circ}\text{C}$,35秒;(4)72 $^{\circ}\text{C}$,1分钟30秒;(5)重复步骤2–4,30个循环;(6)72 $^{\circ}\text{C}$,5分钟;和(7)保持在4 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0447] 使用上述染色体模板,PCR扩增产生具有期望大小的不同的DNA产物。根据制造商的指导,将PCR产物克隆进载体pJET1.2/blunt(Fermentas)并使用提供额标准引物测定插入序列。

[0448] 系统发育分析将PTA-10212放在包括具有中等支撑的*Thraustochytrium pachydermum*和*Thraustochytrium aggregatum*的谱系中。*T.pachydermum*的孢子囊具有非常厚的细胞壁。*T.aggregatum*形成清楚可见的不透明的孢子群的丛。PTA-10212没有显示这些特征中的一个。已在其他分类群,比如*Ulkenia*,*T.gaertnerium*,*A.limiacinum*和*S.mangrovei*描述过存在许多变形虫样的细胞;然而,与这些分类群关联的描述不同于隔离群的观察到的特征。而且,PTA-10212没有显示接近任何这些分类群的系统发育亲和性。

[0449] 表29显示来自保藏于ATCC登记号PTA-10212的微生物的18s rRNA序列与National Center for Biotechnology Information(NCBI)电子数据库中的DNA序列的比较。使用两种不同的算法,测定百分比同一性。“算法#1”考虑来自非同源区域或部分序列的在序列中存在的任何“缺口”(AlignX-VectorNTI缺省设定)。“算法#2”不包括针对缺口计算的惩罚(AlignX-VectorNTI“IDENTITY”矩阵设定)。

[0450] 表29:18s rRNA序列的比较

[0451]	破囊壶菌	同一性% 算法 #1	同一性% 算法#2
	<i>Thraustochytrium pachydermum</i>	85%	93%
	<i>Thraustochytrium aggregatum</i> (p)	83%	92%
	<i>Thraustochytrium gaertnerium</i>	82%	92%
	<i>Ulkenia visurgensis</i>	82%	92%
	<i>Schizochytrium</i> sp. PTA-9695	80%	92%
	<i>Schizochytrium mangrovei</i>	80%	91%
	<i>Schizochytrium</i> sp. ATCC 20888	80%	90%
	<i>Aurantiochytrium limiacinum</i>	79%	90%

[0452] (p):表示部分序列

[0453] 如表29中所示的,从同一性%的角度发现,来自保藏于ATCC登记号PTA-10212的微生物的18s rRNA基因序列与在NCBI数据库中可得到的18srRNA基因序列尽管不是相同的,但是是相关的。下述是公认的,生物体可具有密切相关的18s rRNA基因序列而属于不同的属或种。

[0454] 基于上述特征,经分离的微生物(ATCC登记号PTA-10212)被认为代表新的Thraustochytrium种,并因此还被命名为Thraustochytrium sp.ATCCPTA-10212。

[0455] 保藏于ATCC登记号PTA-10208的经分离的微生物的分类学特征

[0456] 如美国公开号2010/0239533和国际公开号WO2010/107415所述的,将保藏于ATCC登记号PTA-10208("PTA-10208")的微生物被鉴定为保藏于ATCC登记号PTA-9695("PTA-9695")的微生物的亚隔离群(分离自培养物并保存为新分离且有区别的培养物的单独细胞)。

[0457] PTA-10208与PTA-9695共有分类学特征。发现PTA-9695有发出双鞭毛的游动孢子,所述游动孢子活跃地游动,远离成熟的孢子囊,其中在孢子释放之后壁残留物清楚可见的(在相差中)。测量PTA-9695孢子囊直径为12.5μm至25μm,且游动孢子大小为2.5μm至2.8μm x 4.5μm至4.8μm。每个单独的PTA-9695孢子囊有8至24个孢子。安定的PTA-9695游动孢子变大并快速经历二分裂,导致四分体、八分体和最终成为孢子囊簇。孢子囊成熟之前,四分体形成在非常早的阶段开始。这些特征和Schizochytrium属一致。从同一性%的角度发现,PTA-10208所共有的PTA-969518s rRNA基因序列,与Honda,D.et al.,J.Euk.Micro.46(6):637-647(1999)中提供的T.aggregatum的18s rRNA基因序列尽管不相同,但是是相关的。针对Thraustochytrium aggregatum公开的18s rRNA序列是部分序列,在序列中间有大约71个DNA的核苷酸缺口。PTA-9695被认为代表新Schizochytrium种。同样地,亚隔离群PTA-10208被命名为Schizochytrium sp.ATCC PTA-10208。

[0458] 实施例35

[0459] 保藏于ATCC登记号PTA-10212的经分离的微生物的生长特征

[0460] 如下所述的,在单独的发酵运行中,针对生长特征检查经分离的微生物(ATCC登记号PTA-10212)。典型的培养基和培养条件在表30中示出。

[0461] 表30:PTA-10212器皿培养基

	<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
	KCl	g/L 1.0	0-5, 0.25-3 或 0.5-2
[0462]	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
[0463]	<u>高压灭菌后(金属)</u>		
	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
[0464]	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
[0465]	<u>高压灭菌后(维生素)</u>		
	硫胺	mg/L 9.75	0.1-100, 1-50 或 5-25
[0466]	维生素 B12	mg/L 0.16	0.01-100, 0.05-5 或 0.1-1
	Ca ^{1/2} -泛酸盐	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
[0467]	<u>高压灭菌后(碳)</u>		
[0468]	甘油	g/L 30.0	5-150, 10-100或20-50
[0469]	<u>氮原料:</u>		
[0470]	<u>成分</u>	<u>浓度</u>	
[0471]	MSG · 1H ₂ O	g/L 17	0-150, 10-100或15-50

[0472] 典型的培养条件包括下述:

[0473] pH 约6.5-约9.5,约6.5-约8.0或约6.8-约7.8;

[0474] 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;

[0475] 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

[0476] 甘油控制在:约5-约50g/L,约10-约40g/L或约15-约35g/L。

[0477] 在22.5℃、pH7.3下有20%溶解氧、1000ppm Cl^- 的进料碳(甘油)和氮的培养中,在10L发酵罐体积中培养138小时之后,PTA-10212产生26.2g/L的干细胞重量。脂质产率为7.9g/L; ω -3产率为5.3g/L;EPA产率为3.3g/L;和DHA产率为1.8g/L。脂肪酸含量为按重量计30.3%;EPA含量为脂肪酸甲酯(FAME)的41.4%;和DHA含量为26.2%的FAME。在这些条件下,脂质生产力为1.38g/L/天, ω -3生产力为0.92g/L/天,有0.57g/L/天的EPA生产力和0.31g/L/天的DHA生产力。

[0478] 在22.5℃、pH7.3下有20%溶解氧、有1000ppm Cl^- 的进料碳(甘油)和氮的培养中,在10L发酵罐体积中培养189小时之后,PTA-10212产生38.4g/L的干细胞重量。脂质产率为18g/L; ω -3产率为12g/L;EPA产率为5g/L;和DHA产率为6.8g/L。脂肪酸含量按重量计为45%;EPA含量为7.8%的FAME;和DHA含量为37.9%的FAME。这些条件下,脂质生产力为2.3g/L/天, ω -3生产力为1.5g/L/天,有0.63g/L/天的EPA生产力和0.86g/L/天的DHA生产力。

[0479] 在pH6.8-7.7、22.5℃下的有20%溶解氧、1000ppm Cl^- 的进料碳(甘油)和氮的培养中,在10L发酵罐体积中培养189小时之后,PTA-10212产生13g/L的干细胞重量。脂质产率为5.6g/L; ω -3产率为3.5g/L;EPA产率为1.55g/L;和DHA产率为1.9g/L。脂肪酸含量按重量计为38%;EPA含量为29.5%的FAME;和DHA含量为36%的FAME。在这些条件下,脂质生产力为0.67g/L/天, ω -3生产力为0.4g/L/天,有0.20g/L/天的EPA生产力和0.24g/L/天的DHA生产力。

[0480] 在pH6.6-7.2、22.5-28.5℃下,有1000ppm Cl^- 、20%溶解氧的进料碳(甘油)和氮的培养中,在10L发酵罐体积中培养191小时之后,PTA-10212产生36.7g/L-48.7g/L的干细胞重量。脂质产率为15.2g/L-25.3g/L; ω -3产率为9.3g/L-13.8g/L;EPA产率为2.5g/L-3.3g/L;和DHA产率为5.8g/L-11g/L。脂肪酸含量按重量计为42.4%-53%;EPA含量为9.8%-22%的FAME;和DHA含量为38.1%-43.6%的FAME。在这些条件下,脂质生产力为1.9g/L/天-3.2g/L/天, ω -3生产力为1.2g/L/天-1.7g/L/天,有0.31g/L/天-0.41g/L/天的EPA生产力和0.72g/L/天-1.4g/L/天的DHA生产力。

[0481] 保藏于ATCC登记号PTA-10208的经分离的微生物的生长特征

[0482] 如下面所述的,在单独的发酵运行中,针对生长特征,检查经分离的微生物(ATCC登记号PTA-10208)。典型的培养基和培养条件在表31中示出。

[0483] 表31:PTA-10208器皿培养基

	成分	浓度	范围
	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
[0484]	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
[0485]	<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
	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
[0486]	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
[0487]	<u>高压灭菌后(维生素)</u>		
[0488]	硫胺	mg/L 9.75	0.1-100, 1-50 或 5-25
[0489]	Ca1/2-泛酸盐	mg/L 3.33	0.1-100, 0.1-50 或 1-10
[0490]	生物素	mg/L 3.58	0.1-100, 0.1-50 或 1-10
[0491]	<u>高压灭菌后(碳)</u>		
[0492]	葡萄糖	g/L 30.0	5-150, 10-100 或 20-50
[0493]	<u>氮原料:</u>		
[0494]	成分	浓度	
[0495]	NH ₄ OH	mL/L 23.6	0-150, 10-100 或 15-50
[0496]	典型的培养条件包括下述:		
[0497]	pH: 约6.5-约8.5, 约6.5-约8.0 或 约7.0-约8.0;		
[0498]	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;		
[0499]	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		
[0500]	葡萄糖控制在: 约5-约50g/L, 约10-约40g/L 或 约20-约35g/L。		
[0501]	在22.5℃、pH7.0下的有1000ppm Cl ⁻ 、20%溶解氧的进料碳(葡萄糖)和氮的培养中, 其后氮原料和10%溶解氧期间, 在10L发酵罐体积中培养200小时之后, PTA-10208产生		

95g/L的干细胞重量。脂质产率为53.7g/L; ω -3产率为37g/L; EPA产率为14.3g/L; 和DHA产率为21g/L。脂肪酸含量按重量计为57%; EPA含量为27.7%的FAME; 和DHA含量为39.1%的FAME。在这些条件下, 脂质生产力为6.4g/L/天, ω -3生产力为4.4g/L/天, 有1.7g/L/天的EPA生产力和2.5g/L/天的DHA生产力。

[0502] 在22.5℃、pH7.5下的有1000ppm Cl^- 、20%溶解氧的进料碳(葡萄糖)和氮的培养中, 其后氮原料和10%溶解氧期间, 在10L发酵罐体积中培养139小时之后, PTA-10208产生56g/L的干细胞重量。脂质产率为53g/L; ω -3产率为34g/L; EPA产率为11.5g/L; 和DHA产率为22g/L。脂肪酸含量按重量计为58%; EPA含量为21.7%的FAME; 和DHA含量为41.7%的FAME。在这些条件下, 脂质生产力为9.2g/L/天, ω -3生产力为5.9g/L/天, 有2g/L/天的EPA生产力和3.8g/L/天的DHA生产力。

[0503] 在22.5℃、pH7.0下的有1000ppm Cl^- 、20%溶解氧的进料碳(葡萄糖)和氮的培养中, 其后氮原料和10%溶解氧期间, 在2000L发酵罐体积中培养167小时之后, PTA-10208产生93.8g/L的干细胞重量。脂质产率为47.2g/L; ω -3产率为33.1g/L; EPA产率为10.5g/L; 和DHA产率为20.4g/L。脂肪酸含量按重量计为50.6%; EPA含量为23%的FAME; 和DHA含量为42.6%的FAME。在这些条件下, 脂质生产力为6.8g/L/天, ω -3生产力为4.7g/L/天, 有1.5g/L/天的EPA生产力和2.9g/L/天的DHA生产力。

[0504] 在22.5℃、pH7.0下的有1000ppm Cl^- 、20%溶解氧的进料碳(葡萄糖)和氮的培养中, 其后氮原料和10%溶解氧期间, 在2000L发酵罐体积中培养168小时之后, PTA-10208产生105g/L的干细胞重量。脂质产率为46.4g/L; ω -3产率为33g/L; EPA产率为10.7g/L; 和DHA产率为20.3g/L。脂肪酸含量按重量计为43.9%; EPA含量为24%的FAME; 和DHA含量为43.7%的FAME。在这些条件下, 脂质生产力为6.6g/L/天, ω -3生产力为4.7g/L/天, 有1.5g/L/天的EPA生产力和2.9g/L/天的DHA生产力。

[0505] 在22.5℃、pH7.0下的有1000ppm Cl^- 、20%溶解氧的进料碳(葡萄糖)和氮的培养中, 其后氮原料和10%溶解氧期间, 在2000L发酵罐体积中培养168小时之后, PTA-10208产生64.8g/L的干细胞重量。脂质产率为38.7g/L; ω -3产率为29.9g/L; EPA产率为8.5g/L; 和DHA产率为16.7g/L。脂肪酸含量按重量计为59.6%; EPA含量为23%的FAME; 和DHA含量为42.3%的FAME。在这些条件下, 脂质生产力为5.53g/L/天, ω -3生产力为3.8g/L/天, 有1.2g/L/天的EPA生产力和2.3g/L/天的DHA生产力。

[0506] 实施例36

[0507] 微生物菌株ATCC PTA-10208和PTA-10212的脂肪酸谱

[0508] 对四种生物质样品(PTA-10208样品#1; PTA-10208样品#2; PTA-10212样品#1; 和PTA-10212样品#2)分析通过溶剂提取的总粗制油含量, 通过高效液相色谱/蒸发光散射检测器(HPLC/ELSD)测定脂质种类, 通过HPLC/质谱(HPLC/MS)分析三酰基甘油(TAG), 且通过具有火焰离子化检测的气相色谱(GC-FID)测定脂肪酸(FA)谱。使用己烷的溶剂磨碎测定每一冷冻干燥的生物质的粗制脂质含量并与通过直接酯交换产生的FAME之和(mg/g)比较, 并通过GC/FID分析量化产生的脂肪酸甲酯(FAME)。还通过酯交换量化在提取的粗制脂质中的脂肪酸并使用对产生的FAME的GC/FID分析进行量化。使用具有ELSD和常压化学电离-MS(APCI-MS)鉴定的正相HPLC, 测定提取的粗制脂质中的所有中性脂质(NL)和游离脂肪酸(FFA)的重量百分比。所述方法分离并量化甾醇酯(SE)、TAG、游离脂肪酸(FFA)、1,3-二酰甘

油(1,3-DAG)、甾醇、1,2-二酰甘油(1,2-DAG)和单酰基甘油(MAG)。结果在下面表32和33中示出。注意到,从使用溶剂提取的样品中获得表32和33的脂肪酸谱。预期如果使用本发明的工艺提取样品,表32和33的脂肪酸谱基本上相同。

[0509] TAG和磷脂(PL)分离自从四种生物质样品(PTA-10208样品#1;PTA-10208样品#2;PTA-10212样品#1;和PTA-10212样品#2)提取的粗制油。使用低压快速色谱法分离TAG,使用固体相提取(SPE)分离PL。通过薄层色谱法(TLC)确认每一种分离的级分的身份。直接酯交换之后,使用GC-FID,测定经分离的TAG和PL级分的脂肪酸谱,表示为FAME。结果在下面表34和35中示出。

[0510] 还对来自微生物菌株ATCC PTA-10212(PTA-10212样品#3和PTA-10212样品#4)的两个额外的生物质样品,测定总粗制油含量和经分离的脂质种类的脂肪酸谱。通过己烷提取从每一样品获得粗制油并使用低压快速色谱法分离单独的脂质种类。使用GC-FID,测定生物质、粗制油和经分离的级分的脂肪酸谱,表示为FAME。结果在下面表36-39中示出。注意到,从使用典型的己烷提取提取的样品中获得表36-39的脂肪酸谱。预期如果使用本发明的工艺提取样品,表36-39的脂肪酸谱基本上相同。

[0511] 从来自使用**FRIOLEX®**工艺先前提取的微生物菌株ATCC PTA-10212(PTA-10212样品#5)的粗制油样品中分离单独的脂质种类,且使用GC-FID,测定每一种类的脂肪酸谱,表示为FAME。结果在下面表40和41中示出。注意到,从使用**FRIOLEX®**工艺提取的样品中获得表40和41的脂肪酸谱。预期如果使用本发明的工艺提取样品,表40和41的脂肪酸谱基本上相同。

[0512] 使用具有ELSD和APCI-MS鉴定的正相HPLC,从来自微生物菌株ATCC PTA-10208(PTA-10208样品#3)的粗制油样品中分离单独的脂质种类。

[0513] 实验程序

[0514] 粗制油提取-使用溶剂磨碎从冷冻-干燥的生物质样品中提取粗制油。例如,在Swedish管中称大约3克的生物质。将三个球轴承和30mL的己烷添加至Swedish管,管用氯丁橡胶塞子密封并放在摇床中2小时。使用Buchner漏斗和Whatman滤纸过滤产生的淤浆。收集过滤的液体,在真空下去除溶剂,并重量测量法测定剩余的粗制脂质的量。

[0515] 脂肪酸分析-对生物质样品、提取的粗制脂质和经分离的脂质种类分析作为FAME的脂肪酸组合物。简而言之,在螺帽试管中直接称冷冻-干燥的生物质和经分离的脂质种类,而将粗制油样品溶于己烷以产生大约2mg/mL的浓度。将含有内标物的甲苯和在甲醇中的1.5N HCl添加至每一管。旋转管,盖上帽,并加热至100℃,2小时。将管冷却并添加饱和NaCl水。将管再次旋转并离心至使层分离。接着将一部分有机层放在GC小瓶中并通过GC-FID分析。使用Nu-Check-Prep GLC参照标准(NuCheck,Elysian,MN)产生的3点校准曲线,量化FAME。在提取物中存在的脂肪酸表示为mg/g和重量百分比。假设当通过GC-FID分析时对内标物有相等响应值,评估样品中的脂肪含量。

[0516] HPLC/ELSD/MS方法-

[0517] 仪器Agilent1100HPLC,Alltech3300ELSD,Agilent1100MSD

[0518] 柱Phenomenex Luna Silica,250x4.6mm,5μm颗粒大小w/Guard柱

[0519] 流动相A-99.5%己烷(Omnisolv)

[0520] 0.4%异丙醇(Omnisolv)

- [0521] 0.1%乙酸
 [0522] B-99.9%乙醇(Omnisolv,95:5乙醇:IPA)
 [0523] 0.1%乙酸
 [0524] 梯度
 [0525]

时间,min.	%A	%B
0	100	0
5	100	0
15	85	10
20	0	100
25	0	100
26	100	0
35	100	0

- [0526] 柱温.30℃
 [0527] 流速 1.5mL/min
 [0528] 注入体积 5μL
 [0529] ELSD检测 温度35℃,气流1.2L/min
 [0530] MSD 质量范围200-1200,碎裂电压225V
 [0531] 干燥气温350℃
 [0532] 蒸发器温度325℃
 [0533] 毛细管电压3500V
 [0534] 电晕电流10μA
 [0535] 固体相提取-使用放在Vac Elut装置(Varian Inc,Palo Alto,USA)中的2g氨基丙基筒(cartridge)(Biotage,Uppsala,Sweden),通过固体相提取(SPE)从粗制脂质中分离PL级分。用15mL的己烷调节筒使并将~60mg的每一样品溶解在1mL CHCl₃中并应用至筒。用15mL的2:1CHCl₃:异丙醇洗涤柱以洗脱所有的中性脂质,所述中性脂肪酸被丢弃。接着用15mL在醚中的2%乙酸(HOAc)洗脱脂肪酸,所述脂肪酸被丢弃。用15mL的6:1甲醇:氯仿洗脱PL部分,将所述PL部分收集、在氮气下干燥并称重。
 [0536] 快速色谱法-快速色谱法用来分离在粗制油中存在的脂质种类。将溶于己烷的大约200mg的粗制油注入柱头。色谱系统利用硅胶60(EMD Chemical,Gibbstown,NJ),用以5mL/min(表6-7)或3mL/min(表8-13)的含石油醚和乙酸乙酯的流动相。步长式梯度用来从柱中选择性洗脱每一脂质种类。流动相梯度从100%石油醚开始并用50%乙酸乙酯结束。使用Gilson FC204大床级分收集器(Gilson,Inc.,Middleton,WI),将级分收集于10mL试管中。通过薄层色谱法(TLC)分析每一管,并将(如通过具有预期保留因子(Rf)的TLC板上的单点判断的)含有单独脂质种类的管合并、浓缩至干燥并称重。然后重量测量法测定总级分含量。
 [0537] TLC分析-在硅胶板上进行薄层色谱。使用由石油醚:乙基醚:乙酸(80:20:1)组成的溶剂系统洗脱板,并使用碘蒸汽显现。然后将每一点的Rf值与每一脂质种类的报道文献值比较。

[0538] TAG和PL级分的分析-对经分离的TAG和PL级分分析作为脂肪酸甲酯(FAME)的脂肪酸组合物。将TAG级分溶于己烷以产生大约1-2mg/mL的浓度。将1mL等分部分的溶液在氮气下浓缩至干燥。将含有内标物的甲苯和在甲醇中的1.5N HCl添加至每一管。旋转管、盖上帽并加热至100℃,2小时。将内标物和HCl甲醇直接添加至含有PL级分的管并加热。将管冷却并添加饱和NaCl水。将管再次旋转并离心以使层分离。然后将一部分有机层放在GC小瓶中并通过GC-FID分析。使用Nu-Check-Prep GLC502B参照标准(NuCheck,Elysian,MN)产生的3-点校准曲线量化FAME。在提取物中存在的脂肪酸表示为mg/g和FAME的%。

[0539] 结果

[0540] PTA-10208样品#1

[0541] 使用GC/FID测定PTA-10208样品#1的生物质和提取的粗制脂质的脂肪酸谱。通过直接在FAME管中称28.6mg生物质,原位酯交换生物质中的脂肪酸,而通过在50mL体积烧瓶中称55.0mg粗制脂质并将1mL转移至分离FAME管,制备提取的粗制脂质样品。使用具有FID检测的GC,估计的生物质的粗制脂质含量测定为53.2%(表示为FAME的和),而从干燥生物质中提取了52.0%(wt/wt)脂质,产生97.8%的总脂质回收率。使用GC/FID,粗制脂质测定为91.9%脂肪酸(表示为FAME的和)。粗制脂质中含有的主要脂肪酸是C16:0(182.5mg/g)、C20:5n-3(186.8mg/g)和C22:6n-3(423.1mg/g)。

[0542] 通过在50mL体积烧瓶中称55.0mg粗制脂质并将一个等分部分转移至HPLC小瓶用于HPLC/ELSD/MS分析,测定提取的粗制脂质的脂质种类谱。根据HPLC/ELSD/MS分析,粗制脂质含有0.2%甾醇酯(SE)、95.1%TAG、0.4%甾醇和0.5%1,2-二酰甘油(DAG)。5%的TAG级分包括在TAG峰之后直接洗脱的峰,但不能给出可辨认的质谱。

[0543] 如通过快速色谱法测定的,来自该样品的经分离的TAG组成大约92.4%的粗制油。在SPE分离之后通过重量或TLC未检测出PL。TAG中含有的主要脂肪酸(>50mg/g)为C16:0(189mg/g)、C20:5n-3(197mg/g)和C22:6n-3(441mg/g)。

[0544] PTA-10208样品#2

[0545] 使用GC/FID测定PTA-10208样品#2的生物质和提取的粗制脂质的脂肪酸谱。通过直接在FAME管中称32.0mg生物质原位酯交换生物质中的脂肪酸,而通过在50mL体积烧瓶中称60.1mg粗制脂质并将1mL转移至分离FAME管,制备提取的粗制脂质样品。使用具有FID检测的GC,估计的生物质的粗制脂质含量测定为52.4%(表示为FAME的和),而从干燥生物质中提取48.0%(wt/wt)的脂质,产生91.7%的总脂质回收率。使用GC/FID,粗制脂质测定为95.3%脂肪酸(表示为FAME的和)。粗制脂质中含有的主要脂肪酸是C16:0(217.5mg/g)、C20:5n-3(169.3mg/g)和C22:6n-3(444.1mg/g)。

[0546] 通过在50mL体积烧瓶中称60.1mg粗制脂质并将一等分部分转移至HPLC小瓶用于HPLC/ELSD/MS分析,测定提取的粗制脂质的脂质种类谱。根据HPLC/ELSD/MS分析,粗制脂质含有0.2%SE、95.7%TAG、0.3%甾醇和0.7%1,2-DAG。5.1%TAG级分包括在TAG峰之后直接洗脱的峰,但不能给出可辨认的质谱。

[0547] 来自该样品的经分离的TAG组成大约93.9%粗制油。在SPE分离之后通过重量或TLC未检测出PL。在TAG中含有的主要脂肪酸(>50mg/g)为C16:0(218mg/g)、C20:5n-3(167mg/g)和C22:6n-3(430mg/g)。

[0548] PTA-10208样品#3

[0549] 使用HPLC/ELSD/MS,分析来自保藏于ATCC登记号PTA-10208的微生物(样品PTA-10208#3)的粗制油样品。回收了全部98.38%的脂质,甾醇酯(SE)级分占0.32%、TAG级分占96.13%、1,3-二酰甘油(DAG)级分占0.22%、1,2-DAG级分占0.78%和甾醇级分占0.93%。

[0550] PTA-10212样品#1

[0551] 使用GC/FID,测定PTA-10212样品#1的生物物质和提取的粗制脂质的脂肪酸谱。通过直接在FAME管中称27.0mg生物物质,原位酯交换生物物质中的脂肪酸,而通过在50mL体积烧瓶中称52.5mg粗制脂质并将1ml转移至分离FAME管,制备提取的粗制脂质样品。使用具有FID检测的GC,估计的生物物质的粗制脂质含量测定为38.3%(表示为FAME的和),而从干燥生物物质中提取36.3%(wt/wt)脂质,产生94.6%的总脂质回收率。使用GC/FID,粗制脂质测定为83.2%脂肪酸(表示为FAME的和)。粗制脂质中含有的主要脂肪酸是C16:0(328.5mg/g)、C20:5n-3(90.08mg/g)和C22:6n-3(289.3mg/g)。

[0552] 通过在50mL体积烧瓶中称52.5mg粗制脂质并将一等分部分转移至HPLC小瓶用于HPLC/ELSD/MS分析,测定提取的粗制脂质的脂质种类谱。根据HPLC/ELSD/MS分析,粗制脂质含有0.2%SE、64.2%TAG、1.9%FFA、2.8%1,3-DAG、1.4%甾醇、18.8%1,2-DAG和0.5%MAG。3.4%的TAG级分包括在TAG峰之后的直接洗脱的峰,但不能给出可辨认的质谱。

[0553] 来自该样品的经分离的TAG组成大约49.8%的粗制油。经分离的PL组成大约8.1%的粗制油。AG级分中含有的主要的脂肪酸(>50mg/g)是C16:0(400mg/g)、C20:5n-3(91mg/g)和C22:6n-3(273mg/g)。PL级分中含有的主要的脂肪酸(>50mg/g)是C16:0(98mg/g)、C20:5n-3(33mg/g)和C22:6n-3(227mg/g)。

[0554] PTA-10212样品#2

[0555] 使用GC/FID,测定PTA-10212样品#2的生物物质和提取的粗制脂质的脂肪酸谱。通过直接在FAME管中称29.5mg生物物质,原位酯交换生物物质中的脂肪酸,而通过在50mL体积烧瓶中称56.5mg粗制脂质并将1ml转移至分离FAME管,制备提取的粗制脂质样品。使用具有FID检测的GC,估计的生物物质的粗制脂质含量测定为40.0%(表示为FAME的和),而从干燥生物物质中提取了41.3%(wt/wt)脂质,产生106.1%的总脂质回收率。使用GC/FID,粗制脂质测定为82.8%脂肪酸(表示为FAME的和)。粗制脂质中含有的主要脂肪酸是C16:0(327.3mg/g)、C20:5n-3(92.5mg/g)和C22:6n-3(277.6mg/g)。

[0556] 通过在50mL体积烧瓶中称56.5mg粗制脂质并将一等分部分转移至HPLC小瓶用于HPLC/ELSD/MS分析,测定提取的粗制脂质的脂质种类谱。根据HPLC/ELSD/MS分析,粗制脂质含有0.2%SE、58.2%TAG、2.3%FFA、3.4%1,3-DAG、1.7%甾醇、23.4%1,2-DAG和0.6%MAG。3.3%的TAG级分包括在TAG峰之后直接洗脱的峰,但不能给出可辨认的质谱。

[0557] 来自该样品的经分离的TAG组成大约51.9%的粗制油。分离的PL组成大约8.8%的粗制油。在TAG级分中含有的主要脂肪酸(>50mg/g)是C16:0(402mg/g)、C20:5n-3(92mg/g)和C22:6n-3(245mg/g)。PL级分中含有的主要脂肪酸(>50mg/g)是C16:0(121mg/g)、C20:5n-3(48mg/g)和C22:6n-3(246mg/g)。

[0558] 表32:PTA-10208和PTA-10212生物物质和提取的粗制脂质的脂肪酸谱(mg/g)

[0559]

	PTA-10208 样品#1 生物质	PTA-10208 样品 #1 粗制脂质	PTA-10208 样品#2 生物质	PTA-10208 样品 #2 粗制脂质	PTA-10212 样品#1 生物质	PTA-10212 样品 #1 粗制脂质	PTA-10212 样品#2 生物质	PTA-10212 样品#2 粗制脂质
脂肪 酸	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	1.47	2.43	1.80	3.14	0.99	1.90	0.87	1.91
C14:0	11.62	20.12	16.72	31.03	5.51	12.91	5.97	13.69
C14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C15:0	2.43	3.75	3.60	6.22	9.13	20.42	9.39	20.81
C16:0	105.04	182.47	117.72	217.49	145.87	328.45	147.87	327.27
C16:1	0.00	0.00	0.06	0.01	6.26	14.53	7.46	16.89
C18:0	5.37	8.96	4.77	8.37	6.77	15.39	6.77	15.15
C18:1 n-9	0.00	3.26	0.00	3.09	0.03	4.04	0.08	5.87
C18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:0	1.48	1.79	1.40	1.85	1.60	3.09	1.67	3.20
C18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:4 n-3	0.91	1.61	1.10	2.00	2.28	2.56	2.21	2.64
C20:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:0	0.10	0.00	0.08	0.00	0.30	0.12	0.35	0.24
C20:4 n-7	0.81	0.45	0.67	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-6	7.22	12.23	6.84	12.18	1.19	2.26	1.31	2.32
C22:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-5	0.63	0.52	0.00	0.46	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-3	3.45	5.45	3.33	5.58	0.00	2.40	0.00	2.34
C20:3 n-3	0.09	0.00	0.11	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:5 n-3	107.31	186.83	92.99	169.32	40.32	90.08	43.15	92.54
C22:4 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C24:0	0.60	0.00	0.52	0.00	2.81	6.83	2.74	6.53
C24:1 n-9	1.55	3.26	0.85	2.04	0.43	1.34	0.42	1.24
C22:5 n-6	9.66	15.84	10.27	17.98	2.42	4.68	2.32	4.21
C22:5 n-3	20.44	35.13	9.92	17.50	2.41	4.94	2.69	5.23

[0560]

	PTA-10208 样品#1 生物质	PTA-10208 样品 #1 粗制脂质	PTA-10208 样品#2 生物质	PTA-10208 样品 #2 粗制脂质	PTA-10212 样品#1 生物质	PTA-10212 样品 #1 粗制脂质	PTA-10212 样品#2 生物质	PTA-10212 样品#2 粗制脂质
C22:6 n-3	246.98	423.10	245.96	444.08	139.58	289.34	137.35	277.57
FAME 的和	527.15	907.18	518.71	942.75	367.89	805.29	372.63	799.68

[0561] 表33:PTA-10208和PTA-10212生物质和提取的粗制脂质的脂肪酸谱(%)

[0562]

	PTA-10208 样 品#1 生物质	PTA-10208 样品#1 粗制脂 质	PTA-10208 样 品#2 生物质	PTA-10208 样 品#2 粗制脂 质	PTA-10212 样 品#1 生物质	PTA-10212 样 品#1 粗制脂 质	PTA-10212 样 品#2 生物质	PTA-10212 样 品#2 粗制脂 质
脂肪 酸	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0.28	0.27	0.35	0.33	0.27	0.24	0.23	0.24
C14:0	2.20	2.22	3.22	3.29	1.50	1.60	1.60	1.71
C14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C15:0	0.46	0.41	0.69	0.66	2.48	2.54	2.52	2.60
C16:0	19.93	20.11	22.70	23.07	39.65	40.79	39.68	40.93
C16:1	0.00	0.00	0.01	0.00	1.70	1.80	2.00	2.11
C18:0	1.02	0.99	0.92	0.89	1.84	1.91	1.82	1.89
C18:1 n-9	0.00	0.36	0.00	0.33	0.01	0.50	0.02	0.73
C18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:0	0.28	0.20	0.27	0.20	0.43	0.38	0.45	0.40
C18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:4 n-3	0.17	0.18	0.21	0.21	0.62	0.32	0.59	0.33
C20:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:0	0.02	0.00	0.01	0.00	0.08	0.02	0.09	0.03
C20:4 n-7	0.15	0.05	0.13	0.04	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-6	1.37	1.35	1.32	1.29	0.32	0.28	0.35	0.29
C22:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-5	0.12	0.06	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-3	0.65	0.60	0.64	0.59	0.00	0.30	0.00	0.29

[0563]

	PTA-10208 样品#1 生物质	PTA-10208 样品#1 粗制脂质	PTA-10208 样品#2 生物质	PTA-10208 样品#2 粗制脂质	PTA-10212 样品#1 生物质	PTA-10212 样品#1 粗制脂质	PTA-10212 样品#2 生物质	PTA-10212 样品#2 粗制脂质
C20:3 n-3	0.02	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:5 n-3	20.36	20.59	17.93	17.96	10.96	11.19	11.58	11.57
C22:4 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C24:0	0.11	0.00	0.10	0.00	0.76	0.85	0.74	0.82
C24:1 n-9	0.29	0.36	0.16	0.22	0.12	0.17	0.11	0.16
C22:5 n-6	1.83	1.75	1.98	1.91	0.66	0.58	0.62	0.53
C22:5 n-3	3.88	3.87	1.91	1.86	0.65	0.61	0.72	0.65
C22:6 n-3	46.85	46.64	47.42	47.10	37.94	35.93	36.86	34.71
FAME %的和	100	100	100	100	100	100	100	100

[0564] 表34:PTA-10208和PTA-10212分离的TAG的脂肪酸谱

	PTA-10208 样品#1	PTA-10208 样品#1	PTA-10208 样品#2	PTA-10208 样品#2	PTA-10212 样品#1	PTA-10212 样品#1	PTA-10212 样品#2	PTA-10212 样品#2
脂肪酸	FAME (mg/g)	% FAME	FAME (mg/g)	% FAME	FAME (mg/g)	% FAME	FAME (mg/g)	% FAME
C12:0	2.57	0.27	3.35	0.36	0.00	0.00	0.00	0.00
C14:0	21.07	2.23	31.37	3.41	14.05	1.61	14.45	1.69
C14:1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C15:0	3.89	0.41	6.17	0.67	23.27	2.66	23.14	2.71
C16:0	189.28	20.07	218.78	23.75	399.51	45.75	402.43	47.07
C16:1	0.00	0.00	0.00	0.00	15.23	1.74	17.62	2.06
C18:0	9.21	0.98	8.07	0.88	22.70	2.60	23.10	2.70
C18:1 n-9	3.35	0.36	3.64	0.40	6.12	0.70	7.48	0.87
C18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:0	1.86	0.20	1.55	0.17	4.76	0.55	5.32	0.62
C18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:4 n-3	1.64	0.17	2.00	0.22	2.25	0.26	2.24	0.26
C20:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

[0565]

[0566]

	PTA-10208 样品#1	PTA-10208 样品#1	PTA-10208 样 品#2	PTA-10208 样 品#2	PTA-10212 样 品#1	PTA-10212 样品#1	PTA-10212 样 品#2	PTA-10212 样 品#2
C22:0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.55	0.06	0.89	0.10
Un-已知	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-7	0.39	0.04	0.05	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-6	12.79	1.36	11.82	1.28	2.33	0.27	2.25	0.26
C22:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-5	0.39	0.04	0.07	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-3	5.52	0.59	5.09	0.55	2.87	0.33	2.98	0.35
C20:5 n-3	197.14	20.90	166.68	18.10	91.17	10.44	91.78	10.74
C24:0	0.00	0.00	0.00	0.00	6.93	0.79	7.36	0.86
C22:4 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
C24:1 n-9	1.08	0.11	<0.1	<0.1	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:5 n-6	15.88	1.68	16.57	1.80	4.01	0.46	3.39	0.40
C22:5 n-3	36.05	3.82	16.00	1.74	4.53	0.52	5.07	0.59
C22:6 n-3	440.99	46.76	429.83	46.67	273.02	31.26	245.38	28.70
FAME 的和	943.11	-	921.03	-	873.31	-	854.89	-
总% FAME	-	100.00	-	100.00	-	100.00	-	100.00

[0567] 表35:PTA-10212分离的PL的脂肪酸谱

[0568]

	PTA-10212 样品#1	PTA-10212 样品#1	PTA-10212 样品#2	PTA-10212 样品#2
脂肪酸	FAME (mg/g)	% FAME	FAME (mg/g)	% FAME
C12:0	0.00	0.00	0.00	0.00
C14:0	0.93	0.22	1.89	0.39
C14:1	0.00	0.00	0.00	0.00
C15:0	3.44	0.82	5.07	1.05
C16:0	98.29	23.50	120.98	25.00
C16:1	1.15	0.27	3.07	0.63
C18:0	3.25	0.78	3.72	0.77
C18:1 n-9	1.12	0.27	0.95	0.20
C18:1 n-7	<0.1	<0.1	0.02	0.003
C18:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:0	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
C18:4 n-3	3.71	0.89	3.24	0.67
C20:2 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:0	0.00	0.00	0.00	0.00
Un 已知	42.33	10.12	44.71	9.24
C20:4 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-6	0.84	0.20	1.54	0.32
C22:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-5	0.00	0.00	0.00	0.00
C20:4 n-3	<0.1	<0.1	0.27	0.06
C20:5 n-3	33.39	7.98	47.91	9.90
C24:0	<0.1	<0.1	0.01	0.001
C22:4 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
C24:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
C22:5 n-6	3.08	0.74	3.82	0.79
C22:5 n-3	<0.1	<0.1	0.66	0.14
C22:6 n-3	226.68	54.20	246.09	50.85
FAME 的 和	418.21	-	483.94	-
总% FAME	-	100	-	100

[0569] PTA-10212样品#3

[0570] PTA-10212样品#3的生物质的脂质含量估计为34%，表示为FAME的和，且溶剂提取之后获得的粗制油的量按重量计为37%，产生在生物质中存在的脂肪的109%回收率。使用快速色谱法分级之后，分离出大约46%粗制油为TAG，分离出28%为DAG。粗制油含有309mg/g DHA和264mg/g EPA。经分离的TAG含有341mg/g DHA和274mg/g EPA。经分离的DAG级分含有262mg/g DHA和237mg/g EPA。下面表36和表37中分别示出了计算为mg/g和%FAME的生物质、

提取的粗制油和经分离的级分的总脂肪酸谱。

[0571] 表36:PTA-10212样品#3生物质和提取的粗制脂质的脂肪酸谱(mg/g)

	生物质	粗制油	TAG	DAG
Wt. %	NA	37.2%	46.0%	27.9%
脂肪酸	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0.0	0.0	0.0	0.0
C14:0	3.6	10.3	11.5	9.4
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	4.1	10.6	9.8	6.6
C16:0	70.5	181.8	231.7	111.3
C16:1	6.7	19.1	18.7	17.1
C18:0	2.4	10.2	14.2	0.0
C18:1 n-9	0.0	6.7	0.0	0.0
C18:1 n-7	0.0	1.2	0.0	0.0
C18:2 n-6	0.0	1.8	0.0	0.0
C20:0	0.0	2.4	0.0	0.0
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	0.0	0.3	0.0	1.7
C18:4 n-3	1.9	3.4	3.2	4.4
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0	3.3	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-7	0.0	2.1	1.5	0.0
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	6.8	17.9	21.4	13.8
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0.0	1.3	1.3	0.0
C20:4 n-3	3.0	8.5	10.9	6.4
C20:5 n-3	102.0	263.6	274.2	237.4
C24:0	0.0	1.7	3.9	0.0
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.0	0.0	4.2	0.0
C22:5 n-6	3.2	8.3	10.7	6.1
C22:5 n-3	3.8	10.4	15.1	6.6

[0572]

	生物质	粗制油	TAG	DAG
C22:6 n-3	131.2	309.4	341.1	261.9
FAME的和	342.4	871.1	973.2	682.6

[0573]

[0574] 表37:PTA-10212样品#3生物质和提取的粗制脂质的脂肪酸谱(%)

[0575]

	生物质	粗制油	TAG	DAG
Wt. %	NA	37.2%	46.0%	27.9%

脂肪酸	FAME(mg/g)	FAME(mg/g)	FAME(mg/g)	FAME(mg/g)
C12:0	0.0	0.0	0.0	0.0
C14:0	1.1	1.2	1.2	1.4
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	1.2	1.2	1.0	1.0
C16:0	20.6	20.9	23.8	16.3
C16:1	2.0	2.2	1.9	2.5
C18:0	0.7	1.2	1.5	0.0
C18:1n-9	0.0	0.8	0.0	0.0
C18:1n-7	0.0	0.1	0.0	0.0
C18:2n-6	0.0	0.2	0.0	0.0
C20:0	0.0	0.3	0.0	0.0
C18:3n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1n-9	0.0	0.0	0.0	0.2
C18:4n-3	0.6	0.4	0.3	0.6
C20:2n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0	1.0	0.0	0.0	0.0
C20:4n-7	0.0	0.2	0.2	0.0
C20:3n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4n-6	2.0	2.1	2.2	2.0
C22:1n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4n-5	0.0	0.1	0.1	0.0
C20:4n-3	0.9	1.0	1.1	0.9
C20:5n-3	29.8	30.3	28.2	34.8
C24:0	0.0	0.2	0.4	0.0
C22:4n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1n-9	0.0	0.0	0.4	0.0
C22:5n-6	0.9	1.0	1.1	0.9
C22:5n-3	1.1	1.2	1.6	1.0
C22:6n-3	38.3	35.5	35.1	38.4
总%FAME	100.0	100.0	100.0	100.0

[0576] PTA-10212样品#4

[0577] PTA-10212样品#4含有测定为FAME的和的大约23%脂质,其中使用己烷提取回收了107%。使用快速色谱法分级之后,分离出大约42%粗制油为TAG,分离出18%为DAG。粗制油含有275mg/g DHA和209mg/g EPA。分离的TAG含有296mg/g DHA和205mg/g EPA。分离的DAG级分含有245mg/g DHA和219mg/g EPA。下面表38(mg/g)和表39(%FAME)中示出了生物质、提取的粗制油和经分离的级分的总脂肪酸谱。

[0578] 表38:PTA-10212样品#4生物质和提取的粗制脂质的脂肪酸谱(mg/g)

[0579]

	生物质	粗制油	TAG	DAG
Wt. %	NA	24.7%	42.2%	18.4%
脂肪酸	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0.0	0.0	2.1	2.4
C14:0	2.0	8.3	9.8	9.6
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	4.8	16.8	0.4	0.9
C16:0	63.3	210.6	285.7	138.0
C16:1	1.6	6.7	7.4	7.5
C18:0	2.8	12.2	19.9	4.6
C18:1 n-9	0.0	3.7	0.7	1.1
C18:1 n-7	0.0	0.0	0.3	1.2
C18:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:0	0.0	3.3	6.0	1.5
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	0.0	0.0	0.7	1.2
C18:4 n-3	1.4	3.8	3.6	5.0
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0.0	0.0	0.4	0.0
C22:0	1.5	0.0	1.9	0.0
C20:4 n-7	0.0	0.0	0.9	0.6
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	2.5	10.1	13.0	10.3
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0.0	0.0	0.8	0.7
C20:4 n-3	1.4	6.3	8.6	6.0
C20:5 n-3	57.6	209.1	205.4	219.0
C24:0	0.0	2.6	0.8	0.0
C22:4 n-9	0.1	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.0	0.0	1.1	0.5
C22:5 n-6	1.4	6.1	7.9	4.5
C22:5 n-3	4.0	15.8	20.8	12.9
C22:6 n-3	87.7	275.0	296.4	244.8
FAME 的和	232.2	790.1	894.8	672.4

[0580] 表39:PTA-10212样品#4生物质和提取的粗制脂质的脂肪酸谱(%)

[0581]

	生物质	粗制油	TAG	DAG
Wt. %	NA	24.7%	42.2%	18.4%
脂肪酸	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0.0	0.0	0.2	0.4
C14:0	0.9	1.0	1.1	1.4
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	2.1	2.1	0.0	0.1
C16:0	27.3	26.7	31.9	20.5
C16:1	0.7	0.8	0.8	1.1
C18:0	1.2	1.5	2.2	0.7
C18:1 n-9	0.0	0.5	0.1	0.2
C18:1 n-7	0.0	0.0	0.0	0.2
C18:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:0	0.0	0.4	0.7	0.2
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	0.0	0.0	0.1	0.2
C18:4 n-3	0.6	0.5	0.4	0.7
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0
C22:0	0.6	0.0	0.2	0.0
C20:4 n-7	0.0	0.0	0.1	0.1
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	1.1	1.3	1.5	1.5
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0.0	0.0	0.1	0.1
C20:4 n-3	0.6	0.8	1.0	0.9
C20:5 n-3	24.8	26.5	23.0	32.6
C24:0	0.0	0.3	0.1	0.0
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.0	0.0	0.1	0.1
C22:5 n-6	0.6	0.8	0.9	0.7
C22:5 n-3	1.7	2.0	2.3	1.9
C22:6 n-3	37.8	34.8	33.1	36.4
总% FAME	100.0	100.0	100.0	100.0

[0582] PTA-10212样品#5

[0583] 使用 **FRIOLEX®** 工艺,从PTA-10212生物质中提取(GEA Westfalia Separator UK Ltd.,Milton Keynes,England)粗制油样品,以产生微生物油PTA-10212样品#5。使用低压快速色谱法,从PTA-10212样品#5中分离单独的脂质种类并测定每一种类的重量百分比。使用GC-FID测定每一种类的脂肪酸谱。

[0584] 简而言之,通过将240mg粗制油溶于600μL己烷并应用至柱头制备样品。使用快速色谱法将样品分级之后,所有级分的组合重量是240mg,产生100%回收率。甾醇酯级分占0.9%,TAG级分占42.6%,游离脂肪酸(FFA)级分占1.3%,甾醇级分占2.2%和DAG级分占41.6%。

在下面表40和表41分别示出了计算为mg/g和%FAME的 FRIOLEX®粗制油和经分离的级分的总脂肪酸谱。

[0585] 表40:PTA-10212样品#5粗制油的脂肪酸谱(mg/g)

	粗制油	TAG	DAG
Wt. %	NA	42.6%	41.6%
脂肪酸	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	0	0.7	1.0
C14:0	7.7	7.7	8.5
C14:1	0	0.0	0.0
C15:0	10.3	11.7	9.3
C16:0	179.3	217.7	134.6
C16:1	18.1	16.3	25.9
C18:0	8.1	13.2	2.3
C18:1 n-9	4.7	8.4	0.7
C18:1 n-7	0	1.8	1.0
C18:2 n-6	1.8	3.3	0.7
C20:0	1.9	3.6	0.2
C18:3 n-3	0	0.0	0.0
C20:1 n-9	0	0.7	1.0
C18:4 n-3	3.1	2.8	3.8
C20:2 n-6	0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0	0.6	0.4
C22:0	0	1.5	0.0
C20:4 n-7	0	1.0	0.7
C20:3 n-3	0	0.0	0.0
C20:4 n-6	12.7	16.1	13.6
C22:1 n-9	0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0	1.5	0.8
C20:4 n-3	6.5	9.3	6.4
C20:5 n-3	213.3	223.7	252.8
C24:0	2.3	4.4	0.6

[0586]

[0587]

C22:4 n-9	0	1.9	0.9
C24:1 n-9	0	0.0	0.0
C22:5 n-6	7.9	9.5	8.3
C22:5 n-3	13	20.6	9.7
C22:6 n-3	305.6	327.4	353.8
FAME 的和	796.6	905.3	837.4

[0588] 表41:PTA-10212样品#5粗制油的脂肪酸谱(%)

[0589]

	粗制 油	TAG	DAG
脂肪酸	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0	0.1	0.1
C14:0	1	0.9	1.0
C14:1	0	0.0	0.0
C15:0	1.3	1.3	1.1
C16:0	22.5	24.0	16.1
C16:1	2.3	1.8	3.1
C18:0	1	1.5	0.3
C18:1 n-9	0.6	0.9	0.1
C18:1 n-7	0	0.2	0.1
C18:2 n-6	0.2	0.4	0.1
C20:0	0.2	0.4	0.0
C18:3 n-3	0	0.0	0.0
C20:1 n-9	0	0.1	0.1
C18:4 n-3	0.4	0.3	0.5
C20:2 n-6	0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0	0.1	0.0
C22:0	0	0.2	0.0
C20:4 n-7	0	0.1	0.1
C20:3 n-3	0	0.0	0.0
C20:4 n-6	1.6	1.8	1.6
C22:1 n-9	0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0	0.2	0.1
C20:4 n-3	0.8	1.0	0.8
C20:5 n-3	26.8	24.7	30.2
C24:0	0.3	0.5	0.1
C22:4 n-9	0	0.2	0.1
C24:1 n-9	0	0.0	0.0
C22:5 n-6	1	1.1	1.0
C22:5 n-3	1.6	2.3	1.2
C22:6 n-3	38.4	36.2	42.3
总% FAME	100	100	100

[0590] 实施例37

[0591] 通过精制、漂白和除臭,对粗制油进一步处理,以获得精制油。用高油酸的向日葵油稀释精制油,以获得具有大约400mg/g的DHA含量的最终油。分离单独的脂质种类并使用GC-FID测定每一种类的脂肪酸谱,表示为FAME。

[0592] PTA-10208最终油

[0593] PTA-10208最终油#1-5的脂肪酸谱总结在表42-43中,包括与经分离的TAG级分(表44-45)和经分离的甾醇/DAG级分(表46-47)关联的谱。

[0594] 还使用快速色谱法(表48)和具有ELSD和APCI-MS确认的正相HPLC(表49),测定最终油中的单独的脂质种类。

[0595] 表42:PTA-10208最终油的脂肪酸谱(mg/g)

	PTA-10208 最终油 #1	PTA-10208 最终油 #2	PTA-10208 最终油 #3	PTA-10208 最终油 #4	PTA-10208 最终油 #5
脂肪酸	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	2.5	2.4	2.8	2.7	2.7
C14:0	16.1	14.9	21.0	18.4	17.5
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	3.8	3.6	4.4	3.9	3.9
C16:0	192.1	179.1	193.1	184.3	194.6
C16:1	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5
C17:0	0.6	0.5	0.9	0.8	2.1
C18:0	12.8	13.9	11.5	12.3	12.9
C18:1 n-9	23.5	82.0	25.7	26.0	29.5
C18:1 n-7	0.2	0.7	0.1	0.1	0.1
C18:2 n-6	3.7	8.1	4.0	4.1	4.3
C20:0	4.3	4.1	3.7	4.0	4.0
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:4 n-3	2.4	2.5	2.8	2.7	2.8
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
C22:0	1.2	1.8	1.0	1.1	1.1
C20:4 n-7	1.7	1.6	1.7	1.8	1.6
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	12.9	12.1	13.5	13.5	13.3
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	1.6	1.4	1.5	1.7	1.5
C20:4 n-3	6.0	5.7	6.0	6.0	6.1

[0596]

C20:5 n-3	173.8	163.3	196.4	209.6	197.9
C24:0	1.4	1.6	1.3	1.3	1.0
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	3.4	3.2	2.3	2.6	2.3
C22:5 n-6	14.9	14.0	14.4	13.0	12.9
C22:5 n-3	43.9	41.3	32.8	40.3	36.9
C22:6 n-3	394.8	373.7	373.2	374.3	364.2
FAME 的和	918.1	932.2	914.7	925.1	914.1

[0597]

[0598] 表43:PTA-10208最终油的脂肪酸谱(%)

[0599]

	PTA-10208 最终油 #1	PTA-10208 最终油 #2	PTA-10208 最终油 #3	PTA-10208 最终油 #4	PTA-10208 最终油 #5
脂肪酸	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
C14:0	1.8	1.6	2.3	2.0	1.9
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4
C16:0	20.9	19.2	21.1	19.9	21.3
C16:1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1
C17:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
C18:0	1.4	1.5	1.3	1.3	1.4
C18:1 n-9	2.6	8.8	2.8	2.8	3.2
C18:1 n-7	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:2 n-6	0.4	0.9	0.4	0.4	0.5
C20:0	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:4 n-3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C22:0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
C20:4 n-7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	1.4	1.3	1.5	1.5	1.5
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 \n-5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C20:4 \n-3	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7
C20:5 n-3	18.9	17.5	21.5	22.7	21.6
C24:0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.4	0.3	0.2	0.3	0.2
C22:5 n-6	1.6	1.5	1.6	1.4	1.4
C22:5 n-3	4.8	4.4	3.6	4.4	4.0
C22:6 n-3	43.0	40.1	40.8	40.5	39.9

[0600] 表44:PTA-10208最终油的经分离的TAG脂肪酸谱(mg/g)

[0601]

	PTA-10208 最终油 #1	PTA-10208 最终油 #2	PTA-10208 最终油 #3	PTA-10208 最终油 #4	PTA-10208 最终油 #5
脂肪酸	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	2.5	2.3	2.7	2.5	2.6
C14:0	16.3	15.1	21.3	18.6	18.1
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	3.9	3.6	4.4	4.0	4.0
C16:0	194.2	181.9	196.1	186.1	199.8
C16:1	0.4	0.4	0.6	0.5	0.7
C17:0	0.6	0.5	0.9	0.8	0.8
C18:0	12.9	14.2	11.7	12.5	13.2
C18:1 n-9	24.3	84.0	26.8	26.1	34.0
C18:1 n-7	0.1	0.7	0.1	0.1	0.3
C18:2 n-6	3.2	7.7	3.4	3.5	4.0
C20:0	4.4	4.2	3.8	4.0	4.2
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	0.2	<0.1	<0.1	0.1
C18:4 n-3	2.5	2.4	2.8	2.6	2.7
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	0.2	0.2	0.1	0.1	0.1
C22:0	1.2	1.9	1.0	1.1	1.1
C20:4 n-7	1.7	1.6	1.8	1.8	1.7
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	13.2	12.3	13.8	13.7	13.8
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	1.6	1.5	1.6	1.7	1.5
C20:4 n-3	6.1	5.7	6.1	5.9	6.2
C20:5 n-3	176.0	166.1	199.0	211.2	204.2
C24:0	1.2	1.3	1.0	1.1	1.2
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	3.3	3.2	2.2	2.5	2.4
C22:5 n-6	15.0	14.2	14.7	13.2	13.5
C22:5 n-3	44.4	42.0	33.3	40.5	38.3
C22:6 n-3	397.9	378.4	376.4	375.5	375.5
FAME 的和	926.9	945.7	925.5	929.6	944.1

[0602] 表45:PTA-10208最终油的经分离的TAG脂肪酸谱(%)

[0603]

	PTA-10208 最终油 #1	PTA-10208 最终油 #2	PTA-10208 最终油 #3	PTA-10208 最终油 #4	PTA-10208 最终油 #5
脂肪酸	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3
C14:0	1.8	1.6	0.3	0.3	0.3
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

[0604]

C15:0	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4
C16:0	20.9	19.2	21.2	20.0	21.2
C16:1	<0.1	<0.1	0.1	0.1	0.1
C17:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C18:0	1.4	1.5	1.3	1.3	1.4
C18:1 n-9	2.6	8.9	2.9	2.8	3.6
C18:1 n-7	<0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:2 n-6	0.3	0.8	0.4	0.4	0.4
C20:0	0.5	0.4	0.4	0.4	0.4
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:4 n-3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C22:0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1
C20:4 n-7	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	1.4	1.3	1.5	1.5	1.5
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
C20:4 n-3	0.7	0.6	0.7	0.6	0.7
C20:5 n-3	19.0	17.6	21.5	22.7	21.6
C24:0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.4	0.3	0.2	0.3	0.3
C22:5 n-6	1.6	1.5	1.6	1.4	1.4
C22:5 n-3	4.8	4.4	3.6	4.4	4.1
C22:6 n-3	42.9	40.0	40.7	40.4	39.8

[0605] 表46:PTA-10208最终油的经分离的甾醇/DAG脂肪酸谱(mg/g)

[0606]

	PTA-10208 最终油 #1	PTA-10208 最终油 #2	PTA-10208 最终油 #3	PTA-10208 最终油 #4	PTA-10208 最终油 #5
脂肪酸	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)	FAME (mg/g)
C12:0	1.9	2.1	2.9	2.1	1.9
C14:0	9.9	9.5	9.7	10.3	8.0
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	2.4	2.3	2.2	2.3	2.0
C16:0	132.6	128.6	110.1	116.8	106.4
C16:1	0.2	0.3	<0.1	0.3	0.4
C17:0	0.3	0.2	0.3	0.3	0.3
C18:0	7.3	8.1	6.4	6.8	6.1
C18:1 n-9	15.0	55.1	47.4	19.0	30.1
C18:1 n-7	0.4	0.7	0.1	<0.1	0.2
C18:2 n-6	13.1	16.7	21.6	13.5	18.4

[0607]

C20:0	2.0	2.1	1.2	1.8	1.4
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:4 n-3	2.3	2.4	2.4	2.4	2.0
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C22:0	0.6	1.0	0.5	0.6	0.5
C20:4 n-7	0.8	0.9	2.1	0.9	0.7
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	5.7	5.8	4.8	6.1	4.5
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	<0.1	<0.1	<0.1	0.6	<0.1
C20:4 n-3	2.7	2.7	2.1	2.7	2.0
C20:5 n-3	92.9	94.5	91.9	111.6	84.8
C24:0	1.2	1.3	1.1	1.1	1.3
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	1.9	2.0	1.2	1.5	1.2
C22:5 n-6	7.8	8.0	6.7	7.0	5.5
C22:5 n-3	22.2	22.9	13.9	20.7	14.2
C22:6 n-3	246.3	252.7	223.5	240.3	196.3
FAME 的和	569.3	619.8	552.1	568.7	488.2

[0608] 表47:PTA-10208最终油的经分离的甾醇/DAG脂肪酸谱(%)

[0609]

	PTA-10208 最终油 #1	PTA-10208 最终油 #2	PTA-10208 最终油 #3	PTA-10208 最终油 #4	PTA-10208 最终油 #5
脂肪酸	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME	% FAME
C12:0	0.3	0.3	0.5	0.4	0.4
C14:0	1.7	1.5	1.8	1.8	1.6
C14:1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C15:0	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
C16:0	23.3	20.8	19.9	20.5	21.8
C16:1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	0.1
C17:0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.1
C18:0	1.3	1.3	1.2	1.2	1.2
C18:1 n-9	2.6	8.9	8.6	3.3	6.2
C18:1 n-7	0.1	0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:2 n-6	2.3	2.7	3.9	2.4	3.8
C20:0	0.4	0.3	0.2	0.3	0.3
C18:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:1 n-9	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C18:4 n-3	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
C20:2 n-6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:3 n-6	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
C22:0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1

[0610]

C20:4 n-7	0.1	0.1	0.4	0.2	0.1
C20:3 n-3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-6	1.0	0.9	0.9	1.1	0.9
C22:1 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C20:4 n-5	<0.1	<0.1	<0.1	0.1	<0.1
C20:4 n-3	0.5	0.4	0.4	0.5	0.4
C20:5 n-3	16.3	15.2	16.6	19.6	17.4
C24:0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.3
C22:4 n-9	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
C24:1 n-9	0.3	0.3	0.2	0.3	0.2
C22:5 n-6	1.4	1.3	1.2	1.2	1.1
C22:5 n-3	3.9	3.7	2.5	3.6	2.9
C22:6 n-3	43.3	40.8	40.5	42.3	40.2

[0611] 表48:通过快速色谱法的脂质种类分离(wt%)

[0612]

脂质种类分离	PTA-10208 最终油 #1	PTA-10208 最终油 #2	PTA-10208 最终油 #3	PTA-10208 最终油 #4	PTA-10208 最终油 #5
TAG	93.4	95.4	94.0	95.7	95.1
甾醇/DAG	3.1	2.9	2.6	3.0	2.9
回收 (%)	96.5	98.3	96.6	98.7	98.0

[0613] 表49:通过HPLC-ELSD的脂质种类分离(wt%)

[0614]

	甾醇酯	TAG	FFA	甾醇	1,3-DAG	1,2-DAG	MAG	总共
PTA-10208 最终油 #1	0.4	90.8	ND	0.8	0.5	0.5	N.D.	93.0
PTA-10208 最终油 #2	0.4	88.5	ND	0.6	0.6	0.6	N.D.	90.7
PTA-10208 最终油 #3	0.3	89.4	ND	0.8	0.6	0.5	N.D.	91.6
PTA-10208 最终油 #4	0.3	88.0	ND	0.8	0.5	0.5	N.D.	90.1
PTA-10208 最终油 #5	0.3	86.3	ND	0.7	0.8	0.5	N.D.	88.6
PTA-10208 最终油 #6	0.36	100.76	ND	0.84	0.54	0.61	N.D.	103.11

[0615] ND=未检测出

[0616] PTA-10212最终油

[0617] DHA以41.63%和366.9mg/g存在于PTA-10212最终油中,而EPA以16.52%存在。测定单独的脂肪酸谱并总结在表50中。

[0618] 表50:PTA-10212最终油的脂肪酸谱(%FAME)

[0619]

脂肪酸	%FAME
C6:0	ND
C7:0	ND
C8:0	ND

C9:0	ND
C10:0	ND
C11:0	ND
C12:0	ND
C13:0	ND
C14:0	0.84
C14:1	ND
C15:0	1.33
C16:0	27.09
C16:1	1.03
C17:0	0.34
C17:1	ND
C18:0	1.26
C18:1n-9	2.14
C18:1n-7	0.18
C19:0	ND
C18:2n-6	0.58
C20:0	0.32
C18:3n-3	ND
C20:1n-9	ND
C18:3n-6	ND
C20:2n-6	0.26
C20:3n-6	ND
C22:0	0.14
C20:3n-3	ND
C20:4n-6	1.34
C22:1n-9	ND
C23:0	ND
C20:5n-3	16.53
C24:0	0.53
C24:1n-9	ND
C22:5n-6	1.50
C22:5n-3	1.30
C22:6n-3	41.63
未知	0.87

[0620] ND=未检测出

[0621] 实施例38

[0622] 在根据表30和31的培养基中,将以ATCC登记号PTA-10208和10212保藏的经分离的微生物的两天大烧瓶接种物制备为碳和氮进料的培养物。

[0623] 根据下述程序进行诱变：

[0624] 将大约50ml的无菌T=2天大烧瓶，倒进40ml无菌玻璃匀化器。培养在匀化器中接受50次均化。吸出培养物并过滤通过放在50ml无菌管中的无菌的50微米筛网过滤器(网孔用作保留更大的集落丛同时让更小的簇和单细胞通过50微米网孔的手段)。在无菌50ml管中收集全部浓缩的浸渍物。旋转浸渍的培养物并制得高至1:100倍的水平稀释液。旋转稀释的浸渍物样品，之后将200 μ l接种物添加至含有4-5个玻璃珠(3mm玻璃珠)的100x15mm培养基琼脂板。将每一个板轻轻搅动，努力使珠子将接种物均匀地在板各处扩展。将珠子从板上丢弃并将板盖上盖子静置大约5分钟至干燥。和在暗光中进行的程序一样，将无菌罩和毗邻区域两处的光关掉。仅有极微的光来运行程序，但仅仅是间接的且暗的。

[0625] 将五个重复板放在XL交联剂(Spectronics Corporation, New York)底部，盖子打开，同时辐照样品。交联剂以微焦耳方式传递能量并寻求实现90%-95%杀死率的水平。使用相同方案用未诱变处理的细胞接种五个重复对照板。这些细胞计数用来计算%杀死率。一旦辐照结束将板取出，将盖子放回原处并将板在封口膜中包裹，随后在铝箔中包裹。第一周使板在黑暗中生长是必须的，使得它们不能修复损伤的基因。

[0626] 将板放在22.5℃屋子中约10天，之后对集落计数。当得到最终计数时，用无菌接种环挑取单独集落并在新培养基板上再划线。每一集落在单独板上铺平板。当板生长密集时，使用接种环取样，并接种进含有50ml培养基的无菌250ml摇瓶。将该烧瓶放在在22.5℃房间中的200rpm的摇床上。T=7天时，将摇瓶培养物收获于50ml无菌管中。得到pH并将样品离心以收集生物质球团。将每一样品漂洗并再悬浮在异丙醇和蒸馏水的50:50混合物中，之后再次离心。将收集的球团冷冻干燥称重并进行FAME分析。表51和52中的数据分别表示用上述工艺从菌株PTA-10208和PTA-10212产生的突变体。

[0627] 表51:PTA-10208突变体

[0628]

脂肪酸	对照 PTA-10208	突变体 1 PTA-10209	突变体 2 PTA-10210	突变体 3 PTA-10211
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.11	0.10	0.22	0.19
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.19	0.19	0.15	0.16
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	1.94	1.82	2.98	2.59
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	2.66	2.22	1.76	1.66
% 16:0	24.87	24.97	23.71	25.01
% 16:1	0.20	0.25	0.07	0.07
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	1.49	1.21	0.62	0.66
% 18:0	1.13	1.14	0.91	1.01
% 18:1 n-9	0.07	0.07	0.06	0.06
% 18:1 n-7	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.05	0.04
% 18:3 n-3	0.09	0.08	0.17	0.14
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.31	0.33	0.24	0.30
% 20:1 n-9	0.00	0.04	0.00	0.00
% 20:2	0.00	0.00	0.05	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.12	0.13	0.08	0.04
% 20:3 n-3	0.42	0.42	0.08	0.06
% 20:4 ARA	0.68	0.67	1.44	1.11
% 20:5 n-3 EPA	6.56	6.47	11.99	9.87
% 22:0	0.07	0.07	0.06	0.07
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.11	0.09	0.10	0.08
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00

[0629]

脂肪酸	对照 PTA-10208	突变体 1 PTA-10209	突变体 2 PTA-10210	突变体 3 PTA-10211
% 22:5 n-6	2.32	2.36	2.36	2.36
% 22:5 n-3	0.48	0.66	0.66	0.52
% 22:6 n-3 DHA	51.58	52.27	48.17	49.35
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.00	0.00	0.00
%脂肪	47.87	49.41	66.00	63.12
%未知	4.61	4.45	4.07	4.64

[0630] 表52:PTA-10212突变体

[0631]

脂肪酸	对照 PTA-10212	突变体 1 PTA-10213	突变体 2 PTA-10214	突变体 3 PTA-10215
% 08:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 09:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 10:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 11:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 12:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 13:0	0.00	0.00	0.21	0.20
% 13:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 14:0	0.68	0.77	0.62	0.97
% 14:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 15:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:0	17.36	19.94	15.27	23.61
% 16:1	1.45	2.33	1.40	2.57
% 16:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 16:3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 17:0	0.20	0.21	0.18	0.27
% 18:0	0.78	0.82	0.79	0.81
% 18:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:1 n-7	0.18	0.27	0.20	0.19
% 18:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:3 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 18:4 n-3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:1 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-9	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
% 20:3 n-3	0.90	0.77	0.99	0.66
% 20:4	1.43	1.32	1.65	0.72

[0632]

脂肪酸	对照 PTA-10212	突变体 1 PTA-10213	突变体 2 PTA-10214	突变体 3 PTA-10215
ARA				
% 20:5 n-3 EPA	13.33	14.93	14.14	8.54
% 22:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:1	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:2	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:3	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:4 n-6	0.00	0.00	0.00	0.00
% 22:5 n-6	2.39	1.95	2.59	2.18
% 22:5 n-3	0.73	0.79	0.80	0.68
% 22:6 n-3 DHA	59.18	54.31	59.89	56.39
% 24:0	0.00	0.00	0.00	0.00
% 24:1	0.00	0.00	0.00	0.00
%脂肪	45.69	38.08	42.88	48.48
%未知	1.38	1.58	1.27	2.19

[0633] 实施例39

[0634] 将含有微生物细胞(Schizochytrium)的两个细胞发酵液(大约13.3kg)在20升发酵罐中加热至60°C。发酵罐具有两个直径为15cm的6-叶片Rushton叶轮。顶部叶轮放置在12升标记处且底部叶轮放置在顶部叶轮下10cm处。将第一个细胞发酵液以307厘米/秒连续搅动。将第二个细胞发酵液以464厘米/秒连续搅动。将酶(即,Alcalase 2.4L FG0.5%)添加至细胞生物质,以裂解细胞并形成乳化的裂解的细胞组合物。将乳化的裂解的细胞组合物首先用碱(NaOH, 250kg的50%w/w溶液)处理,直到裂解的细胞组合物的pH从10.4至10.6。接着,将盐(固体NaCl,以按重量计相对于裂解的细胞组合物的2%的量)添加至裂解的细胞组合物。然后将裂解的细胞组合物加热至温度90°C并保持在该温度水平20小时。取每一种细胞发酵液样品,将pH调至8.0并放在50ml试管中。将试管离心并测量油提取数据。油提取数据在表53中提供。

[0635] 表53. 来自pH8.0下的50mL管中的提取测试的结果。

[0636]

307 厘米/秒			
用于提取的测试的湿发酵液(g)	回收的油的质量(g)	%产率(油/发酵液)	%产率(油/固体)*
49.990	3.881	7.76	27.81
50.814	2.747	5.41	19.36
50.772	2.418	4.76	17.05
464 厘米/秒			
用于提取的测试的湿发酵液(g)	回收的油的质量(g)	%产率(油/发酵液)	%产率(油/固体)*
51.154	7.067	13.81	49.13
51.092	7.055	13.81	49.11
50.132	6.606	13.18	46.86

[0637] *基于未处理的经巴氏灭菌的发酵液的固体内容物

[0638] 表53提供的数据表明,更高搅动速度导致回收的油的质量更大,来自发酵液的油%产率更大和来自未处理的经巴氏灭菌的发酵液的固体内容物的油%产率更大。

[0639] 结论

[0640] 本文中所述的所有多种实施方式或选项可以任何变化形式组合,并可以与任何变化形式组合。尽管参考本发明的一些实施方式已经具体显示和描述了本发明,但是本领域技术人员应当理解,它们仅仅以举例的方式呈现,而不是限制性的,并且在形式和细节上可作出多种改变而不背离本发明的精神和范围。因而,本发明的宽度和范围不被任何上述的示例性实施方式所限制,而仅根据所附权利要求和其等同物来限定。

[0641] 本文中引用的所有文献,包括期刊论文或摘要、公布的或相应的美国专利申请或外国专利申请、授权专利或外国专利或任何其他文献,其每一篇通过引用全部并入本文,所述引用包括在引用的文献中列出的数据、表、图和正文。

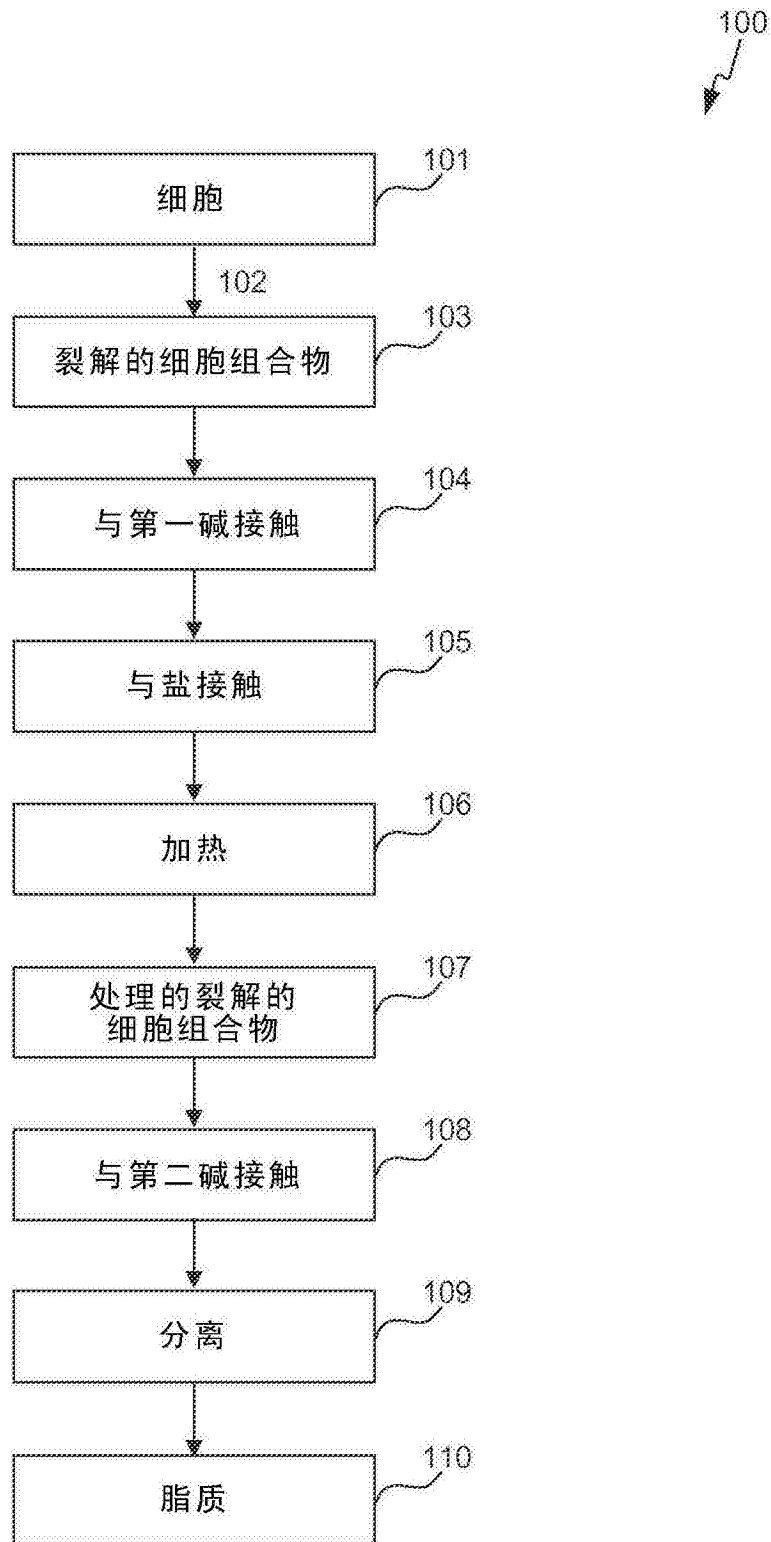


图1

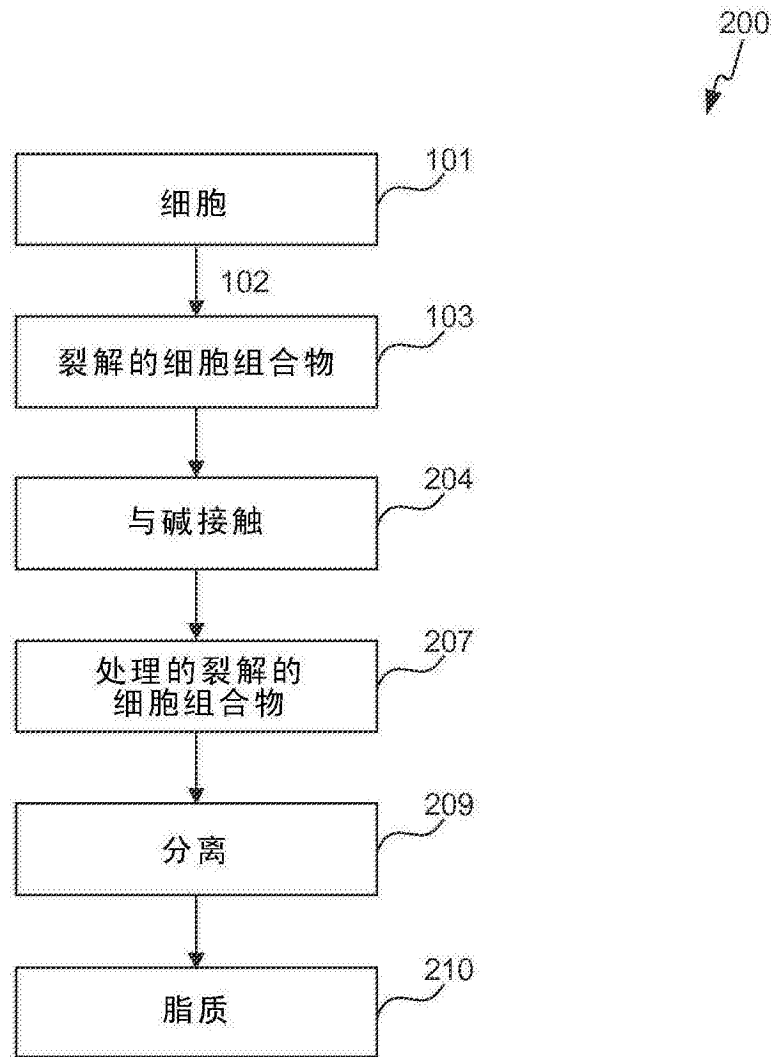


图2

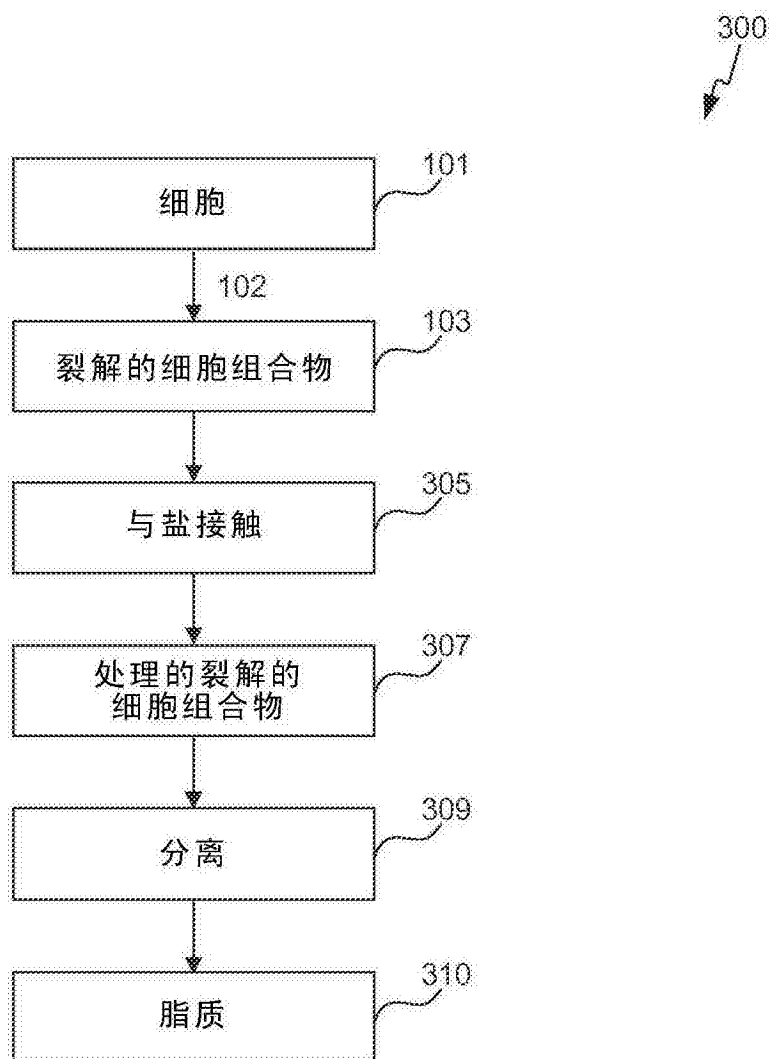


图3

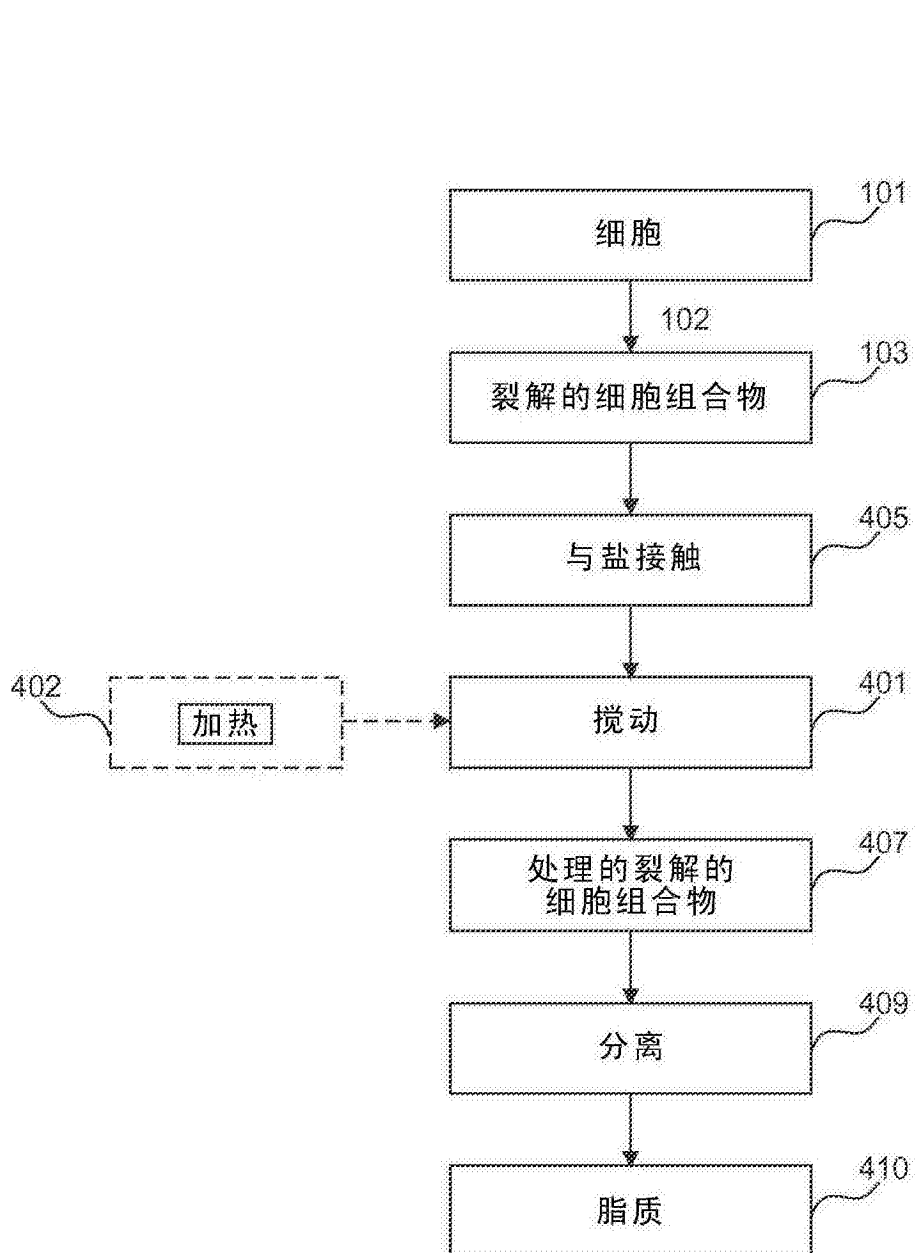


图4

使用EPR光谱的碱处理的作用

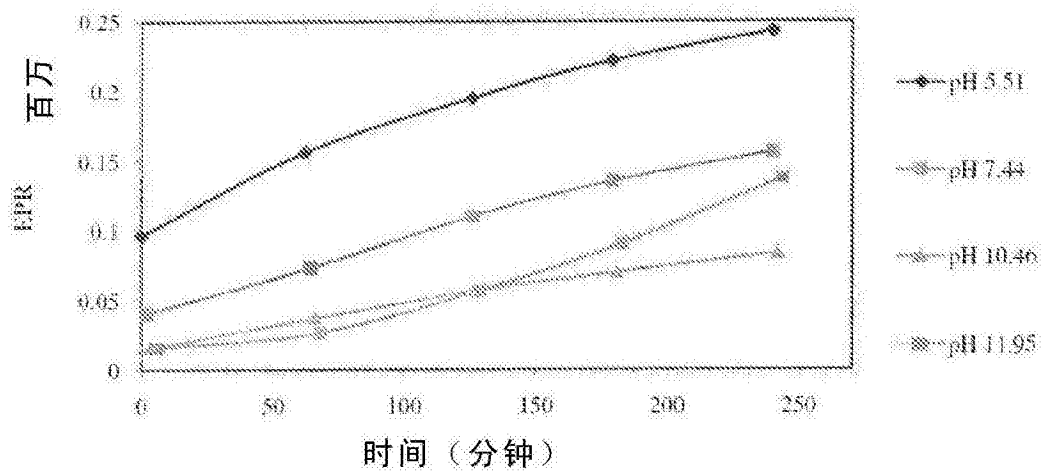


图5