



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101386873 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 07

(21) 申请号 200810166137. 9

(22) 申请日 2004. 10. 01

(30) 优先权数据

60/508, 505 2003. 10. 02 US

(62) 分案原申请数据

200480035685. 8 2004. 10. 01

(73) 专利权人 DSM IP 资产公司

地址 荷兰海尔伦

(72) 发明人 保罗·W·贝伦斯 约翰·M·汤普森

柯克·阿普特

约瑟夫·W·法伊弗第三

詹姆斯·P·温

詹姆斯·C·利普迈耶

贾奥亚德·菲克塔里 乔恩·汉森

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 吴培善 封新琴

(51) Int. Cl.

C12P 7/64(2006. 01)

C12N 1/12(2006. 01)

C12R 1/89(2006. 01)

(56) 对比文件

US 6410281 B1, 2002. 06. 25, 全文.

US 6566123 B1, 2003. 05. 20, 全文.

Y Jiang and F Chen. Effects of salinity on cell growth and docosahexaenoic acid content of the heterotrophic marine microalga *Cryptocodinium cohnii*.

《Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology》. 1999, 第 23 卷 508 — 513.

王永华等. 隐甲藻发酵产 DHA 最佳无机盐浓度的确定. 《中国油脂》. 2002, 第 27 卷 (第 2 期), 26 — 28.

审查员 苗荻

权利要求书1页 说明书20页 附图1页

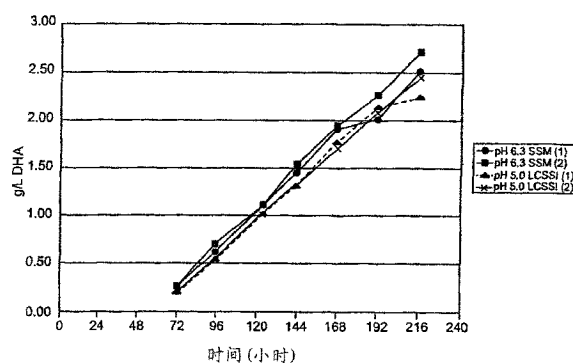
(54) 发明名称

使用改进量的氯和钾在微藻类中产生高水平的 DHA

(57) 摘要

本发明公开了通过海洋微生物, 包括异养的海洋沟鞭藻类隐甲藻, 使用低水平的氯离子产生高度不饱和的脂肪酸的方法。具体地, 通过控制钠离子和钾离子水平在低氯培养基中生长海洋微生物增加高度不饱和的脂肪酸产量的方法。本发明也涉及通过海洋生物在低 pH 水平产生高度不饱和的脂肪酸的方法, 并包括产生耐受低 pH 的菌株的方法。

pH6.3 SSM 中与 pH5.0 LCSSI 中菌株 T 的 DHA 产量对比



1. 通过在培养基中培养甲藻纲的异养的微藻类产生二十二碳六烯酸 (DHA) 的方法, 其中所述的培养基包含:

- (a) 浓度小于或等于 2g/l 的氯离子;
- (b) 浓度为 0.25g/L 至 10g/L 的钾离子; 和
- (c) 浓度为 1g/L 至 15g/L 的钠离子;

其中钠: 钾比例为小于或等于 27:1 的钠: 钾重量比,
其中所述微藻类产生至少 0.04g DHA 每 10^9 个细胞。

- 2. 权利要求 1 的方法, 其中所述微藻类是隐甲藻属的。
- 3. 权利要求 1 的方法, 其中所述微藻类是寇氏隐甲藻菌种的。
- 4. 权利要求 1 的方法, 其中氯离子的浓度小于或等于 1.0g/l。
- 5. 权利要求 1 的方法, 其中氯离子的浓度小于或等于 0.3g/l。
- 6. 权利要求 1 的方法, 其中钾离子的浓度为 0.4g/L 至 10g/L。
- 7. 权利要求 1 的方法, 其中钾离子的浓度为 0.8g/L 至 10g/L。
- 8. 权利要求 1 的方法, 其中钠: 钾比例为小于 15:1 的钠: 钾重量比。
- 9. 权利要求 1 的方法, 其中钠: 钾比例为小于 9:1 的钠: 钾重量比。
- 10. 权利要求 1 的方法, 其中钠离子的浓度为 1g/L 至 8g/l。
- 11. 权利要求 10 的方法, 其中钠离子的浓度为 1.5g/l 至 5g/L。
- 12. 权利要求 1 的方法, 其中钠: 钾比例为 4:1 的钠: 钾重量比至 27:1 的钠: 钾重量比。
- 13. 权利要求 1 的方法, 其中钾离子的浓度为 0.8g/L 和钠离子的浓度为 3.2g/L。
- 14. 权利要求 1 的方法, 其中所述微藻类产生至少 0.10g DHA 每 10^9 个细胞。
- 15. 权利要求 1 的方法, 其中所述微藻类产生至少 0.20g DHA 每 10^9 个细胞。
- 16. 权利要求 1 的方法, 还包括从所述微藻类中回收含 DHA 的脂质。
- 17. 权利要求 1 的方法, 其中钠: 钾比例为 4:1 重量比至 15:1 重量比。
- 18. 权利要求 1 的方法, 其中钾离子的浓度为 0.45g/L 至 10g/L。
- 19. 权利要求 1 的方法, 其中钾离子的浓度为 0.5g/L 至 10g/L。
- 20. 权利要求 1 的方法, 其中钾离子的浓度为 0.6g/L 至 10g/L。
- 21. 权利要求 1 的方法, 其中钾离子的浓度为 0.95g/L 至 10g/L。
- 22. 权利要求 21 的方法, 其中所述培养基包含浓度为 1g/L 至 8g/L 的钠离子。
- 23. 权利要求 22 的方法, 其中 pH 为小于或等于 5。
- 24. 权利要求 1 的方法, 其中 pH 小于或等于 5。
- 25. 权利要求 1 的方法, 其中 pH 小于或等于 4.5。

使用改进量的氯和钾在微藻类中产生高水平的 DHA

[0001] 本申请是申请日为 2004 年 10 月 1 日、申请号为 200480035685.8(PCT/US2004/032383)、题目为“使用改进量的氯和钾在微藻类中产生高水平的 DHA”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明主要涉及通过海洋微生物在培养基中使用改进量的氯和钾离子产生高度不饱和的脂肪酸的方法。更具体地,本发明直接涉及通过培养海洋微藻类 (microalage), 包括异养的海洋沟鞭藻类, 隐甲藻 (*Crypthecodinium*), 在发酵罐中在无腐蚀性的条件下产生高水平的二十二碳六烯酸 (DHA) 的方法, 包括在低氯离子和高钾离子环境中培养。本发明也涉及通过海洋微生物在低 pH 水平产生高度不饱和的脂肪酸, 包括 DHA 的方法。

背景技术

[0003] 已充分证明增加人体内长链 omega-3 脂肪酸的饮食摄入量的有益效果, 所述有益效果包括减少心血管疾病 (cardiovascular) 和炎症疾病 (inflammatory diseases) (即关节炎 (arthritis) 和动脉粥样硬化 (atherosclerosis)), 减少抑郁 (depression), 增加在妊娠末三个月的怀孕期 (gestation) 长度, 和抑制肿瘤生长。已发现几种异养的海洋微生物产生高水平的这些重要的必需脂肪酸, 所述海洋微生物包括隐甲藻属的海洋微生物 (Jiang 和 Chen, *Process Biochemistry* 35(2000)1205-1209; Jiang 和 Chen, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, (1999) Vol. 23, 508-513; Vazhappilly 和 Chen, *Journal of the American Oil Chemists Society*, (1998) Vol. 75, No. 3p 393-397; Kyle, 美国专利 No. 5, 407, 957 ; 美国专利 No. 5, 397, 591 ; 美国专利 No. 5, 492, 938 ; 和美国专利 No. 5, 711, 983)。

[0004] 寇氏隐甲藻 (*Crypthecodinium cohnii*) 是用于产生 DHA (C22:6n-3) 的最理想的生物体之一, 所述的 DHA 是最重要的长链 omega-3 脂肪酸之一。C. cohnii 是有利的因为 DHA 是唯一的通过此生物体以可感知的 (appreciable) 量产生的多不饱和脂肪酸 (PUFA)。其他生物体在它们的脂质中产生两种或更多的多不饱和脂肪酸 (PUFAs), 而且它们的脂质分布 (profile) 的复杂性可限制它们的油在一些食物和药物应用中的用途 (例如由于在油中存在其他不合需要的 PUFAs 或由于不同的 PUFAs 的比例落于具体应用的理想范围之外)。在海洋环境中, 寇氏隐甲藻 (*Crypthecodinium cohnii*) 通常存在于满盐度 (full salinity) 海水中并且, 同样地适于在具有高氯浓度的环境中生长。实际上, 在已发表的关于 C. cohnii 的研究中大多数培养物显示生长和 DHA 生产在盐度大于海水的大约 20% 中最佳 (Jiang 和 Chen)。相当于 20% 海水的氯离子浓度为大约 3870ppm 氯离子或 3.87g/l 氯离子 (Horne 1969)。

[0005] Tuttle 和 Loeblich (1975) 开发了 C. cohnii 的最佳的生长培养基。所公开的培养基包含 342 毫摩尔 (mM) 的氯化钠浓度。在 342mM 氯化钠溶液中钠离子和氯离子的等效的克每升为 7.86g/L 钠离子和 12.12g/L 的氯离子。

[0006] Beach & Holz (1973) 报道当在 NaCl 浓度的范围中 (0.3%、1.8% 和 5.0% (分别为

1.82g/l、10.9g/l 和 30.3g/l 氯离子)) 培养 *C. cohnii* 时, 脂质产量 (表示为 mg 每 10^9 个细胞) 随着 NaCl 浓度减少而下降。在 0.3%NaCl 的脂质产量为在 5.0%NaCl 的脂质产量的大约三分之一。新近, Jiang 和 Chen(1999) 用三种寇氏隐甲藻菌株测定了盐度对于细胞生长和 DHA 含量的影响, 并发现在所有情况下, 最佳的细胞生长速率和 DHA 产量为 5g/L 至 9g/L 氯化钠, 其分别对应于 3.0 和 5.5g/L 氯离子。

[0007] 海水的天然氯浓度 (19,353ppm 或 19.35g/l 氯离子) (Horne 1969, 151 页) 加速不锈钢发酵罐中的腐蚀。例如, 在用于制造发酵罐的两种普通等级的不锈钢中, 当氯水平超过 300ppm(0.3g/l 氯离子) 时 304- 不锈钢是容易腐蚀的, 且当氯水平超过 1000ppm(1g/l 氯离子) 时 316- 不锈钢是容易腐蚀的。存在其他等级的对氯腐蚀更有抵抗力的不锈钢, 但它们非常昂贵且通常只用于生产非常贵重的化合物的发酵设备。

[0008] 虽然可以预测通过降低培养基中的氯浓度可以使不锈钢发酵罐的腐蚀实现最小化, 但是实际上这并不是简单的任务。当源自大海的海洋微藻类在培养物中生长时, 通常需要一定量的氯离子, 优选如氯化钠, 以保持生长和脂质产生。

[0009] 然而, 至今在低氯浓度生长海洋微藻类同时保持 omega-3 多不饱和的脂肪酸如 DHA 的产生水平的尝试还不成功。Jiang 和 Chen(1999) 不能证明在 NaCl 水平小于 5g/L, 对应于大约 3033ppm 或 3g/L 的氯水平时显著的 DHA 产量。

[0010] 2002 年 6 月 25 日颁布给 Barclay 的美国专利 No. 6, 410, 281 提供了在低氯培养基中在降低氯化钠水平时通过以非氯化物钠盐取代以补偿钠的损失而生长广盐性生物 (euryhaline organism) 如破囊壶菌属菌种 (*Thraustochytrium* sp.) 和 *Schizochytrium* sp. 的方法

[0011] 需要能由寇氏隐甲藻产生高产量 DHA, 同时抑制或防止在商业上最理想的生产容器, 不锈钢发酵罐中腐蚀的方法。此方法必须能使所述微生物在含有优选小于 300ppm 氯的培养基中有效地生长。三百 ppm 氯代表比由 Jiang & Chen(1999) 证明的对隐甲藻的菌株的生产反而更好的最低氯水平低 10-18 倍的水平。

[0012] 微生物发酵的另一个理想的特性是在低 pH (小于或等于大约 pH=5.0) 生长细胞以抑制真菌发酵中细菌生长的能力。然而, 文献表明隐甲藻在中性 pH (大约 pH 7) 生长最佳。Tuttle 和 Loeblich 在 *Phycologia* Vol. 14(1) 1-8(1975) 中, 公开了隐甲藻生长的最适 pH 为 6.6, 而低于 pH 5.5 生长是“非常慢”的。需要在低 pH 生长隐甲藻同时保持正常生长和 DHA 产生的菌株 (strain) 和 / 或方法。

发明内容

[0013] 在隐甲藻用的培养基中最小化氯化钠水平的尝试中, 其中氯化钠导致腐蚀发酵罐的问题, 本发明人令人惊讶地发现可以通过在培养基中控制钠盐和优选钾盐以补偿氯离子的减少 (降至 300ppm 或 0.3g/L 氯离子) 而降低氯化钠水平, 同时保持与在大约 4.5g/L NaCl (对应于 2.73g/l 氯离子) 所获得的相似的 DHA 产量。

[0014] 本发明人已确定了培养条件, 所述培养条件允许隐甲藻在具有显著降低的氯水平 (降至大约 0.3g/l 氯离子) 的培养基中生长而当与在正常的“高氯”培养基中的生长进行比较时没有对干重、脂肪含量或 DHA 含量的不良影响。获得可比较的 DHA 产量不仅仅是在培养基中用其他钠盐代替氯化钠的问题。实际上, 用来自其他钠盐 (即硫酸钠) 的等量

(equivalent amount) 的钠代替氯化钠不导致与高氯对照情况可比较的 DHA 产量, 却实际上导致培养物的 DHA 产量进一步降低。然而本发明人令人惊讶地发现当钾浓度 (相对于在 4.5g/lNaCl 的海水中或 17% 的海水中) 显著增加时得到最佳的 DHA 产量。出乎意料, 钠量的基本减少和钾浓度的增加在补偿培养基的氯含量减少中是有效的。

[0015] 在一个实施方案中, 本发明包括在培养基中通过培养甲藻纲 (Dinophyceae) 的异养的微藻类 (heterotrophic microalage) 产生二十二碳六烯酸 (DHA) 的方法。所述培养基包含浓度小于或等于大约 2g/l 的氯离子和浓度大于或等于大约 0.25g/l 的钾离子。在此实施方案中, 所述微藻类产生至少大约 0.04g DHA 每升 7 天培养物 (0.04g DHA per liter of 7 day culture)。7 天培养物通常具有大约 5×10^6 个细胞 /ml 或大约 5×10^9 个细胞 / 升。因此, 在第 7 天具有大约 0.2g/lDHA 的培养物含有大约 0.04gDHA/ 10^9 个细胞。在优选的实施方案中, 所述微藻类是隐甲藻属的。更优选的微藻类是寇氏隐甲藻。优选地, 氯离子的浓度为小于或等于大约 1g/l, 甚至更优选小于或等于大约 0.3g/l。优选地, 钾离子为大于或等于大约 0.4g/l, 并甚至更优选等于或大于大约 0.8g/l。优选地, 钾离子的来源是硫酸钾。在优选的实施方案中, 培养基还包含钠离子的来源以使钠离子浓度为大约 1g/l 至大约 8g/l。更优选地, 钠离子为大约 1.5g/l 至大约 5g/l。钠离子的优选的来源是硫酸钠。通过此方法产生的生物量 (biomass) 包含于本发明中。

[0016] 在另一个实施方案中, 本发明包括在培养基中通过培养甲藻纲的异养的微藻类产生 DHA 的方法。所述培养基包含浓度小于或等于大约 2g/l 的氯离子, 浓度大于或等于大约 0.25g/l 的钾离子和以钠 : 钾小于或等于大约 27:1 重量比的比例存在的钠离子。在此实施方案中, 所述微藻类产生至少大约 0.2gDHA 每升 7 天培养物或 0.04g DHA/ 10^9 个细胞。在优选的实施方案中, 所述微藻类是隐甲藻属的。更优选的微藻类是寇氏隐甲藻。优选地, 氯离子浓度为小于或等于大约 1g/l, 甚至更优选小于或等于大约 0.3g/l。优选地, 钾离子为大于或等于大约 0.4g/l, 和甚至更优选为等于或大于大约 0.8g/l。优选地, 钾离子的来源是硫酸钾。所述培养基还包含钠离子的来源以使钠离子以小于钾离子重量的 27 倍 (重量) (表示为 27:1 的钠 : 钾重量比) 的比例存在于培养基中。在优选的实施方案中, 钠 : 钾比例为小于大约 15:1。更优选的是大约 4:1 的钠 : 钾比例。钠离子的优选的来源是硫酸钠。通过此方法产生的生物量包含于本发明中。

[0017] 本发明人也已确定了培养基条件和菌株, 所述培养基条件和菌株允许隐甲藻在具有显著降低的 pH 水平的培养基中生长, 同时仍保持商业上可实现的生长速率和脂质, 包括 DHA 的生产。在另一个实施方案中, 本发明包括在培养基中通过培养甲藻纲的异养的微藻类产生 DHA 的方法, 其中所述培养基具有低于大约 6 的 pH, 而且其中所述微藻类产生至少大约 0.04g DHA/ 10^9 个细胞。所述培养基可进一步包含浓度小于或等于大约 2g/l 的氯离子, 浓度大于或等于大约 0.25g/l 的钾离子和以钠 : 钾小于或等于大约 27:1 重量比的比例存在的钠离子。在此实施方案中, 所述微藻类产生至少大约 0.04g DHA/ 10^9 个细胞。在优选的实施方案中, 所述微藻类是隐甲藻属的。更优选的微藻类是寇氏隐甲藻。在优选的实施方案中, pH 小于或等于大约 pH 5.5, 更优选小于或等于大约 5.0, 和甚至更优选小于或等于大约 4.5。在优选的实施方案中, 所述培养基还包含小于或等于大约 2g/l, 优选小于或等于大约 1g/l, 甚至更优选小于或等于大约 0.3g/l 的氯离子浓度。所述培养基也包含浓度大于或等于大约 0.25g/l, 大于或等于大约 0.4g/l, 和甚至更优选大于或等于大约 0.8g/l 的钾离子。

优选地,钾离子的来源是硫酸钾。在优选的实施方案中,所述培养基还包含钠离子的来源以使钠离子浓度为大约 1g/l 至大约 8g/l。更优选地,钠离子为大约 1.5g/l 至大约 5g/l。钠离子的优选的来源是硫酸钠。通过此方法产生的生物量包含于本发明中。

[0018] 本发明也包括选择甲藻纲的耐受低 pH 的异养的微藻类的方法,其包括将所述的微藻类在低 pH 培养基中传代培养 (subculture) 直到 DHA 的产量大于或等于大约 0.04g DHA/ 10^9 个细胞。在优选的实施方案中,pH 小于或等于大约 6,小于或等于大约 5,小于或等于大约 4.5。通过此方法产生的微藻类和生物量包含于本发明中。

[0019] 通过如下的最佳方式说明、附图和权利要求,本发明的这些和其他目的、特点和优势会变得显而易见。

附图说明

[0020] 图 1 是在 pH 6.3 和 3g/l 氯离子中 (表示为 pH 6.3SSM) 生长的 *C. cohnii* 菌株 T-HF 和适于低 pH,在 pH 5 和 1g/l 氯离子中 (表示为 pH 5.0 LCSSI) 生长 *C. cohnii* 菌株 T-HF 的重复的 DHA 产量的时间过程图示。

[0021] 图 2 是在 pH 6.3 和 3g/l 氯离子中 (表示为 pH 6.3SSM) 生长的 *C. cohnii* 菌株 T-HF 和适于低 pH,在 pH 4.5 和 1g/l 氯离子中 (表示为 pH 5.0 LCSSI) 生长的 *C. cohnii* 菌株 T-HF 的重复的 DHA 产量的时间过程图示。

[0022] 发明详述

[0023] 本发明解决了前面确定的由于生长甲藻纲的海洋微藻类的高氯化钠水平而引起的发酵罐腐蚀的问题。本发明人发现通过在培养基中使用改进量的氯离子和钾离子发现了培养基组分,所述组分在低氯化钠条件下允许生长商业上可行的水平的甲藻纲的海洋微藻类和产生 DHA。更具体地,本发明人已发现由于将氯化钠降低至非-腐蚀的水平而引起的钠的损失可至少部分地通过在培养基中增加钾水平而补偿。

[0024] 本发明也解决了前面确定的允许生长甲藻纲的海洋微藻类同时阻碍细菌生长的问题。更具体地,本发明提供培养海洋生物的方法以使它们变为耐受低 pH。本发明也提供耐受低 pH 的上述微生物的菌株。由本发明人提供的耐受低 pH 的菌株,可在低 pH 水平生长至细胞稠密 (cell densities) 并获得 DHA 产生水平,该 DHA 产生水平可与在更中性的 pH 水平生长的菌株获得的 DHA 产生水平相比较。由于本发明的概念可容易地应用于其他生产生物体和如下详述的其他需要的 PUFAs,这只是本发明包含的技术的一个实施例。

[0025] 本发明的一个实施方案包括在培养基中通过培养甲藻纲的异养的微藻类产生二十二碳六烯酸 (DHA) 的方法,所述培养基包含如下的组分:浓度小于大约 2g/L 的氯离子,和浓度大于大约 0.25g/L 的钾离子,其中所述微藻类产生至少大约 0.2g DHA 每升 7 天培养物。所述 7 天培养物通常具有 5×10^6 个细胞 /ml,导致大约 0.04g DHA/ 10^9 个细胞。在优选的实施方案中,所述异养的微藻类产生至少大约 0.04g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.06g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.08g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.10g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.12g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.14g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.16g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.18g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.20g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.22g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.24g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.26g DHA/ 10^9 个细胞,至少大约 0.28g DHA/ 10^9 个细胞,或至少大约 0.30g DHA/ 10^9 个细胞。如本文中使用的,培养基中

的营养浓度 (neutrient concentration) 是指在培养步骤一开始培养基中的营养浓度, 其包括从所述方法中之前的阶段, 如接种物的制备带来的任何营养物。

[0026] 适合于本发明的微生物包括异养的微藻类, 其包括甲藻纲成员 (沟鞭藻类)。此纲的优选的成员是隐甲藻属的成员。隐甲藻属的优选的成员是 *C. cohnii*。寇氏隐甲藻是专性异养生物 (obligate heterotroph), 其需要减少的碳源用于生长, 并含有脂肪酸分布 (profile), 其中 DHA 是唯一以可感知的量存在的多不饱和脂肪酸。可从许多可公开利用的来源, 包括通过从自然环境收集而获得合适的生物体。例如, 美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) 目前列出了 45 株可用的寇氏隐甲藻的菌株, 其鉴定为 ATCC Nos. 30021、30334-30348、30541-30543、30555-30557、30571、30572、30772-30775、30812、40750、50050-50060 和 50297-50300。如本文中使用的, 任何微生物或生物体的任何具体类型, 包括野生菌株、突变体或重组类型。

[0027] 除去作为本发明主题并在下面更充分讨论的钠、氯和钾浓度之外, 本发明的培养基的其他组分可为本技术领域已知的促进生长和以商业上可实用的水平生产 DHA 的任何组分, 并包括如在美国专利 5, 130, 242, 美国专利 No. 5, 407, 957, 美国专利 No. 5, 397, 591; 美国专利 No. 5, 492, 938; 和美国专利 No. 5, 711, 983 中公开的那些组分, 上述所有专利都全部并入本文作为参考。更具体地, 可使用碳源, 如葡萄糖、各种淀粉、糖蜜、磨碎的玉米 (ground corn) 等。培养基中也包括可吸收的 (assimilable) 有机或无机氮的来源。氮源可包括硝酸盐、尿素、铵盐、氨基酸等。也可提供可吸收的磷的来源。所述培养基也可含有微生物生长因子的来源, 该生长因子是未指明的或指明的化合物, 其增强单细胞微生物的异养的生长, 并可包括酵母或其他提取物, 土壤提取物等。 *C. cohnii* 和相关生物体的生长培养基的具体实例, 例如, 可见于 Jiang 和 Chen, *Process Biochemistry* 35 (2000) 1205-1209; Jiang 和 Chen, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, (1999) Vol. 23, 508-513; Vazhappilly 和 Chen, *Journal of the American Oil Chemists Society*, (1998) Vol. 75, No. 3 p393-397。本发明中使用的优选培养基的具体实施例可见于, 例如, 本文中下面的实施例部分。

[0028] 在本发明的培养基的一个方面, 氯离子浓度以小于或等于大约 2000ppm 或大约 2 克每升培养物, 更优选小于或等于大约 1.9g/l, 更优选小于或等于大约 1.8g/l, 更优选小于或等于大约 1.7g/l, 更优选小于或等于大约 1.6g/l, 更优选小于或等于大约 1.5g/l, 更优选小于或等于大约 1.4g/l, 更优选小于或等于大约 1.3g/l, 更优选小于或等于大约 1.2g/l, 更优选小于或等于大约 1.1g/l, 更优选小于或等于大约 1.0g/l, 更优选小于或等于大约 0.9g/l, 更优选小于或等于大约 0.8g/l, 更优选小于或等于大约 0.7g/l, 更优选小于或等于大约 0.6g/l, 更优选小于或等于大约 0.5g/l, 更优选小于或等于大约 0.4g/l, 和最优选小于或等于大约 0.3g/l 的浓度存在。在可替换的实施方案中, 最小氯浓度为至少大约 0.025g/l, 至少大约 0.05g/l, 或至少大约 0.1g/l。培养基的氯离子组分是优选由氯化物盐得到的, 其优选的盐为氯化钠。培养基中氯的其他来源包括氯化钾和氯化钙。氯离子的来源可包括培养基中的多于一种的含氯化合物, 并可包括用来调节培养基 pH 的氢氯酸, 以及 MnCl_2 和 FeCl_3 。

[0029] 在本发明的培养基的另一个方面, 钾离子浓度为大于大约 0.25g/L。钾离子通常以低水平存在于海水中, 为大约 0.38g/l 海水。本领域已知的用于生长海洋微藻类的培

培养基严格 (closely) 遵循海水的组成,具有通常相同或更少的钾离子水平。例如, Tuttle 和 Loeblich (1975) 公开了 9mM KCl,其相当于大约 0.35g/l 钾离子。在藻类学方法手册 (Handbook of Phycological Methods) (Janet R. Stein, Ed., Cambridge University Press, 1973) 中,公开了培养基中的钾离子作为氯化钾为 9.83mM,其相当于大约 0.36g/l 钾离子。在一个实施方案中,本发明包括浓度为大于大约 0.39g/l 的钾离子。本发明人已发现一旦钾离子大于阈值 (threshold level),培养对于钾离子的精确浓度、在钾离子浓度的范围生长良好且产生商业上可行的水平的 DHA 相对不敏感。优选地,钾离子浓度的下界为至少大约 0.2g/l,至少大约 0.25g/l,至少大约 0.3g/l,至少大约 0.35g/l,至少大约 0.4g/l,至少大约 0.45g/l,至少大约 0.5g/l,至少大约 0.6g/l 和至少大约 0.7g/l。优选地,钾离子浓度的上界为至多大约 10g/l,至多大约 6g/l,至多大约 4g/l,至多大约 3g/l,至多大约 2.8g/l,至多大约 2.6g/l,至多大约 2.4g/l,至多大约 2.2g/l,至多大约 2g/l,至多大约 1.9g/l,至多大约 1.8g/l,至多大约 1.7g/l,至多大约 1.6g/l,至多大约 1.5g/l,和至多大约 1g/l。钾离子的最优选的浓度为大约 0.75g/l、0.8g/l、0.85g/l、0.9g/l 和 0.95g/l。钾离子的优选范围为大约 0.45g/l 至大约 1.5g/l;更优选大约 0.5g/l 至大约 1.2g/l;更优选大约 0.6g/l 至大约 1g/l;甚至更优选大约 0.7g/l 至大约 0.9g/l;和最优选大约 0.8g/l。

[0030] 钾离子的来源可来自适合细胞培养并尤其适合甲藻纲的微藻类的任何钾盐。钾离子可源自培养基中的盐的混合物。优选的钾盐包括氯化钾、硫酸钾、乙酸钾、碳酸氢钾、磷酸钾等。优选的钾离子来源是硫酸钾。

[0031] 在本发明的一个方面,从培养物收获的 (at harvest) DHA 产量大于不在本发明的培养基中生长的培养物中的 DHA 产量。在一个实施方案中,使用低氯浓度使用本发明的方法的 DHA 产量为至少 0.2 克 DHA 每升 7 天培养物或 0.04g DHA/ 10^9 个细胞。

[0032] 在本发明的另一个方面,所述培养基也会包含除氯化钠之外附加的钠离子来源。本发明人已发现钠离子水平对于本发明不是关键性的。本发明的海洋生物的培养对于钠离子的精确浓度相对不敏感,在钠离子浓度的范围生长良好且产生商业上可行的水平的 DHA。许多不同来源的钠离子适合本发明,其包括硫酸钠、碳酸钠、碳酸氢钠和乙酸钠。附加的钠离子的优选的来源是硫酸钠。在优选的实施方案中,所述培养基包含至少大约 1g/l 钠离子直至大约 8g/l 钠离子。在该范围的下界,优选的钠离子浓度为至少大约 1g/l,至少大约 1.5g/l,至少大约 2g/l,和至少大约 2.5g/l。优选地,钠离子浓度的上界为至多大约 15g/l,至多大约 12g/l,至多大约 10g/l,至多大约 9g/l,至多大约 8g/l,至多大约 7g/l,至多大约 6g/l,至多大约 5.5g/l,至多大约 5g/l,至多大约 4.5g/l,至多大约 4g/l。最优选的钠离子浓度为大约 2.75g/l、3g/l、3.25g/l、3.5g/l 和 3.75g/l。钠离子的优选范围是大约 1.5g/l 直至大约 7.5g/l,甚至更优选的是大约 2.0g/l 直至大约 6g/l,和甚至更优选的是大于大约 2.5g/l 直至大约 5g/l。在最优选的实施方案中,钠离子为至少大约 3g/l 至大约 3.5g/l。最优选的钠的水平为大约 3.25g/l。如前所述,培养对于钠的精确水平相对不敏感,并由此可使用甚至更高的水平。然而,一旦使用大于大约 8g/l 的钠水平,培养产量开始轻微下降。

[0033] 在另一个实施方案中,本发明包括在培养基中通过培养甲藻纲的异养的微藻类产生 DHA 的方法。所述培养基包含浓度小于或等于大约 2g/l 的氯离子,浓度大于或等于大约 0.25g/l 的钾离子和以钠:钾小于或等于大约 27:1 重量比的比例存在的钠离子。在此实施方案中,所述微藻类产生至少大约 0.2g DHA 每升 7 天培养物或 0.04g DHA/ 10^9 个细胞。在

此实施方案中,所述培养基含有钠离子,其与钾离子的比例小于或等于大约 27:1 重量比。在海水中,钠离子与钾离子的比例为大约 27.3:1。换言之,钠离子的量比钾离子的量高大约 27.3 倍。在本发明中,发明人已发现相对于钠离子增加钾离子增加了培养物中的 DHA 产量。优选的钠离子与钾离子的比例为小于或等于大约 27:1,小于或等于大约 25:1,小于或等于大约 23:1,小于或等于大约 21:1,小于或等于大约 19:1。更优选的是小于或等于大约 17:1,小于或等于大约 15:1,小于或等于大约 13:1,小于或等于大约 11:1 的比例。甚至更优选的是小于或等于大约 9:1,小于或等于大约 7:1,或小于或等于大约 5:1 的比例。优选的比例为大约 4:1。

[0034] 在另一个实施方案中,本发明包括在培养基中通过培养甲藻纲的异养的微藻类产生 DHA 的方法,其中所述培养基具有小于大约 6 的 pH,且其中所述微藻类产生至少大约 0.2g DHA 每升 7 天培养物或 0.04g DHA/ 10^9 个细胞。在优选的实施方案中,pH 为小于或等于大约 5.5,和更优选小于或等于大约 5。在优选的实施方案中,pH 为小于或等于大约 4.5。在优选的实施方案中,所述培养基还包含小于或等于大约 2g/l,优选小于或等于大约 1g/l,甚至更优选小于或等于大约 0.3g/l 的氯离子浓度。所述培养基也优选包含浓度大于或等于大约 0.25g/l,大于或等于大约 0.4g/l,和甚至更优选大于或等于大约 0.8g/l 的钾离子。优选地,钾离子的来源是硫酸钾。在优选的实施方案中,所述培养基还包含钠离子的来源以使钠离子浓度为大约 1g/l 至大约 8g/l。更优选地,钠离子为大约 1.5g/l 至大约 5g/l。优选的钠离子的来源是硫酸钠。通过此方法产生的生物量包含于此实施方案中。

[0035] 在另一个实施方案中,本发明包括制备甲藻纲的菌种的耐受低 pH 的菌株的方法和由此产生的菌株。方法包括低 pH 培养基的制备和理想的甲藻纲菌种的传代培养直到所述培养产生所需量的 DHA。可用如下的方式进行传代培养。将理想的甲藻纲菌种的接种物置于低 pH 培养基中并允许生长限定的时间,优选 7 天。此时间长度不是关键性的,但应进行选择以使菌株在到达衰老之前具有足够的时间生长。计算培养物的 DHA 产量。如果小于所需的量,以如下的方式进行附加的传代培养。制备新鲜的低 pH 培养基并用低 pH 培养的培养物接种,而且温育合适的时间。计算培养物的 DHA 产量。如果 DHA 产量小于所需的量,重复传代培养直到获得所需的 DHA 产量。优选的用于选择耐受性的 pH 为大约 6 或以下,更优选为大约 5.5 或以下,甚至更优选为大约 5 或以下,和甚至更优选为 4.5 或以下。实施此方法的培养基是本领域已知的 pH 调节至所需水平的任何培养基。其中进行传代培养的优选的培养基是实施例 1 中描述的培养基。

[0036] 本发明也包括通过本发明的方法之一产生的生物量。

[0037] 与本发明的生物体和方法相一致的培养条件可通过本领域已知的方法获得,并包括在美国专利 5,130,242,美国专利 No. 5,407,957,美国专利 No. 5,397,591;美国专利 No. 5,492,938;和美国专利 No. 5,711,983 中公开的方法,而且本领域的那些技术人员可容易地确定最佳条件。简单地,可在任何合适的发酵罐,优选在搅拌釜(stirred tank)发酵罐或气升式(air lift)发酵罐中完成培养,所述的发酵罐给微生物提供氧的来源。应将微生物的搅拌保持在一定水平以使在溶氧浓度足够支持培养物生长和 DHA 产生的同时,所述搅拌不剪切或以另外的方式损害微生物。优选的溶氧水平为至少 10% 的空气饱和水平。更优选地,将溶氧水平保持为大约 10% 至大约 50% 的空气饱和水平。

[0038] 可在任何维持生命的温度进行培养。通常,微生物将在大约 15°C 至大约 34°C 的温

度范围生长。优选将温度保持在大约 20℃至大约 28℃。

[0039] 可通过本领域的那些技术人员已知的常规手段收获生物体,所述手段诸如离心、絮凝或过滤,并可立即处理或进行干燥用于将来的加工。无论哪一样都可提取脂质。如本文中使用的,术语“脂质”包括磷脂;游离脂肪酸;脂肪酸的酯类;三酰甘油 (triacylglycerol);二酰基甘油酯 (diacylglyceride);单酰基甘油酯 (monoacylglyceride);溶血磷脂 (lysophospholipid);肥皂 (soap);磷脂 (phosphatide);固醇 (sterol) 和固醇酯 (sterol ester);类胡萝卜素 (carotenoids);叶黄素 (xanthophyll) (例如,氧合类胡萝卜素 (oxycarotenoids));碳氢化合物 (hydrocarbons);和本领域的普通技术人员已知的其他脂质。如技术人员充分理解的,本发明涉及的 DHA 可为这些不同脂质的形式,并且不限于游离的脂肪酸。依赖于使用的提取技术,可提取脂质的不同形式或组分。可用有效量的溶剂提取脂质。本领域的那些技术人员可确定合适的溶剂。通常用极性溶剂 (例如,氯仿/甲醇) 提取极性脂质 (例如,磷脂) 而且通常用非极性溶剂 (例如,己烷) 提取中性脂质 (例如,三酰甘油)。优选的溶剂是纯己烷。己烷与干生物量 (dry biomass) 的合适的比例为大约 4 升己烷每千克干生物量。优选将己烷与生物量在搅拌反应容器在大约 50℃的温度混合大约 2 小时。混合后,将生物量过滤并与含油的己烷分离。通过本领域的那些技术人员已知的蒸馏技术从油中移除己烷。常规的含油种子 (oilseed) 加工设备适于进行过滤、分离和蒸馏。如果具体应用要求或需要,可进行本领域的那些技术人员已知的附加的加工步骤。在如下的参考文献中描述了脂质回收的可替换的方法,所述参考文献整体并入作为参考:PCT Publication WO 0176715,题目是“Method for the Fractionation of Oil and Polar Lipid-Containing Native Raw Materials”;PCT Publication W00176385,题目是“Method For The Fractionation Of Oil and Polar Lipid-Containing Native Raw Materials Using Alcohol and Centrifugation”;PCT Publication W00153512,题目是“Solventless Extraction Process”。

[0040] 本发明,虽然是依据具体的生物体和方法公开的,但意欲包括所有这样的方法和菌株,它们可根据在本文中公开的教导得到而且是有用的,所述的教导包括所有替换、修饰和优化,其对于本领域的普通技术人员来说是可利用的手段。为了说明的目的而不是限制本发明的范围提供了如下的实施例和试验结果。

[0041] 实施例 1

[0042] 此实施例描述了含 4.5g/l NaCl 的标准筛选培养基 (Standard Screening Medium) (SSM) 的制备。为了制备该培养基,第一步包括将如下化合物加入蒸馏水至 90% 的最终需要的体积,如表 1 所示。所有化合物可从 Sigma Aldrich, St. Louis, MO 得到。

[0043] 表 1. 高压灭菌之前培养基的量和终浓度

[0044]

化合物	终浓度	加入的 氯离子量(g/l)	加入的 钾离子量(g/l)	加入的 钠离子量(g/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}^1$	0.3 g/l	0.09		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.25 g/l			
NaCl	4.5 g/l	3		1.5
MES	10.7 g/l			
MSG	1.5 g/l			
Tastone 154	0.5 g/l			
KH_2PO_4	0.014 g/l		.004	
KCl	0.14 g/l	0.067	0.073	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.15×10^{-3} g/l			
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.3×10^{-3} g/l	可忽略		
H_3BO_3	10×10^{-3} g/l			
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.5×10^{-3} g/l	可忽略		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3×10^{-3} g/l			
NaOH(以调节 pH 至 6.3)	1.16 g/l			0.67

[0045]

FeCl_2^2	6×10^{-3} g/ml	可忽略		
硫胺素 ³	1×10^{-3} g/l			
生物素 ³	2×10^{-6} g/l			
化合物	终浓度	加入的 氯离子量(g/l)	加入的 钾离子量(g/l)	加入的 钠离子量(g/l)
葡萄糖 ⁴	50 g/l			
每种离子总量		3.16	0.08	2.17

[0046] ¹ 二水合氯化钙为 244g/mol, 含氯 28.7%。[0047] ² 将储液单独高压灭菌并以无菌的方式加入高压灭菌后的培养基; 每两周制备新鲜的。[0048] ³ 将储液通过 0.2 微米过滤器过滤除菌; 在黑暗中贮存于 4℃。以无菌的方式加入高压灭菌后的培养基。[0049] ⁴ 将储液单独高压灭菌。以无菌的方式加入高压灭菌后的培养基。

[0050] 用无菌水使高压灭菌的培养基达到 100% 体积。对于筛选实验,将 35ml 的 SSM 培养基加入无菌的 250ml 锥形瓶 (Erlenmeyer flask)。每个锥形瓶加入 1ml 的接种物用于 1×10^5 个细胞每 ml 的初始细胞浓度。接种物为 5-6 天的培养物。在 26.5°C 在旋转振荡器上以 135rpm 生长培养物。

[0051] 实施例 2

[0052] 此实施例描述了含 1.41g/l NaCl (其连同氯化钙和氯化钾产生大约 1000ppm, 1g/l 氯离子) 的 1000ppm 氯离子筛选培养基 (SSM) 的制备。为了制备该培养基, 第一步包括将如下化合物加入去离子的蒸馏水至 90% 的最终需要的体积, 如表 2 所示。所有化合物可从 Sigma Aldrich, St. Louis, MO 得到。

[0053] 表 2. 高压灭菌之前培养基的量和终浓度

[0054]

化合物	终浓度	加入的 氯离子量(g/l)	加入的 钾离子量(g/l)	加入的 钠离子量(g/l)
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.3 g/l	0.09		
MgSO ₄ -7H ₂ O	1.25 g/l			
NaCl	1.41 g/l	0.85		0.47

[0055]

MES	10.7 g/l			
MSG	1.5 g/l			
Tastone 154	0.5 g/l			
化合物	终浓度	加入的 氯离子量(g/l)	加入的 钾离子量(g/l)	加入的 钠离子量(g/l)
KH ₂ PO ₄	0.014 g/l		0.004	
KCl	0.14 g/l	0.067	0.073	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.15 X 10 ⁻³ g/l			
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.3 X 10 ⁻³ g/l	可忽略		
H ₃ BO ₃	10 X 10 ⁻³ g/l			
MnCl ₂ ·4H ₂ O	4.5 X 10 ⁻³ g/l	可忽略		
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.3 X 10 ⁻³ g/l			
NaOH(以调节 pH 至 6.3)	1.6 g/l			0.67
FeCl ₂ ¹	6 X 10 ⁻³ g/ml	可忽略		
硫胺素 ²	1 X 10 ⁻³ g/l			
生物素 ²	2 X 10 ⁻⁶ g/l			
葡萄糖 ³	50 g/l			
每种离子总量		1.00	0.08	1.14

[0056] ¹ 将储液单独高压灭菌并以无菌的方式加入高压灭菌后的培养基 ;每两周制备新鲜的。

[0057] ² 将储液通过 0.2 微米过滤器过滤除菌 ;在黑暗中贮存于 4℃。以无菌的方式加入高压灭菌后的培养基。

[0058] ³ 将储液单独高压灭菌。以无菌的方式加入高压灭菌后的培养基。

[0059] 用无菌水使高压灭菌的培养基达到 100% 体积。对于筛选实验,将 35ml 的 SSM 培养基加入无菌的 250ml 锥形瓶。每个锥形瓶加入 1ml 的接种物用于 1X 10⁵ 个细胞每 ml 的初始细胞浓度。接种物为 5-6 天的培养物。在 26.5℃ 在旋转振荡器上以 135rpm 生长培养物。

[0060] 实施例 3

[0061] 此实施例描述了含 0.211g/l NaCl (其连同氯化钙和氯化钾产生大约 0.3g/l 氯离子) 的 300ppm 氯离子筛选培养基 (SSM) 的制备。为了制备该培养基,第一步包括将如下化合物加入去离子的蒸馏水至 90% 的最终需要的体积,如表 3 所示。所有化合物可从 Sigma Aldrich, St. Louis, MO 得到。

[0062] 表 3. 高压灭菌之前培养基的量和终浓度

[0063]

化合物	终浓度	加入的 氯离子量(g/l)	加入的 钾离子量(g/l)	加入的 钠离子量(g/l)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.3 g/l	0.09		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.25 g/l			
NaCl	0.211 g/l	0.13		0.07
MES	10.7 g/l			
MSG	1.5 g/l			
Tastone 154	0.5 g/l			
KH_2PO_4	0.014 g/l		0.004	
KCl	0.14 g/l	0.067	0.073	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.15×10^{-3} g/l			
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.3×10^{-3} g/l	可忽略		
H_3BO_3	10×10^{-3} g/l			
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4.5×10^{-3} g/l	可忽略		
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.3×10^{-3} g/l			
NaOH(以调节 pH 至 6.3)	1.16 g/l			0.67
FeCl_2 ¹	6×10^{-3} g/ml	可忽略		
硫胺素 ²	1×10^{-3} g/l			
生物素 ²	2×10^{-6} g/l			
葡萄糖 ³	50 g/l			
每种离子总量		0.30	0.08	0.74

[0064] ¹ 将储液单独高压灭菌并以无菌的方式加入高压灭菌后的培养基;每两周制备新鲜的。

[0065] ² 将储液通过 0.2 微米过滤器过滤除菌;在黑暗中贮存于 4℃。以无菌的方式加入高压灭菌后的培养基。

[0066] ³ 将储液单独高压灭菌。以无菌的方式加入高压灭菌后的培养基。

[0067] 用无菌水使高压灭菌的培养基达到 100% 体积。对于筛选实验,将 35ml 的 SSM 培养基加入无菌的 250ml 锥形瓶。每个锥形瓶加入 1ml 的接种物用于 1×10^5 个细胞每 ml 的初始细胞浓度。接种物为 5-6 天的培养物。在 26.5℃ 在旋转振荡器上以 135rpm 生长培养

物。

[0068] 实施例 4

[0069] 此实施例描述了在 pH 6.3SSM 中生长和收获寇氏隐甲藻的步骤。

[0070] 依据将哪种培养基进行实验,如实施例 1-3 之一所述制备 SSM 培养基。如实施例 1-3 所述制备附加的培养基组分并加入培养基。收获之前的所有步骤在无菌条件进行。

[0071] 为了制备接种培养物,使用如下的步骤。向 250ml 锥形瓶中,将 49ml SSM(实施例 1 中所述)加入 250ml 锥形瓶。加入 1ml *C. cohnii* 菌株 T-HF(菌株 T-HF 鉴定为已被重复培养的生物体 ATCC 40750)的五天培养物。将培养瓶放置在 27℃无光的培养箱中以 135rpm 旋转的摇动器上。生长三天后,将培养物移至无菌防护罩(sterile hood),移出 1ml 并使用库尔特计数器(Coulter Counter)(Coulter Z2 Particle Count and Size Analyzer,由 Beckman Coulter, Inc. 得到)计数。使用细胞数计算接种培养物的量,所述接种培养物的量必须用于开始新的 50ml 培养物,其细胞密度为 1.0×10^5 个细胞每 ml。

[0072] 为了测试不同的培养基组分,如下所述配制适合的培养基并导入无菌的 250ml 锥形瓶。将如前计算的接种物的量导入含有在锥形瓶中制备的培养基的培养瓶。将所述培养瓶放置在 27℃无光的培养箱中以 135rpm 旋转的摇动器上。7 天的生长之后,如下收获培养物。

[0073] 对于每种培养物而言,将 50ml 离心管(从 VWR Scientific 得到)作标记并称重。对于每种培养物而言,标记另一个 50ml 离心管,但不称重。然后将培养物注入标记的 50ml 管。记录体积并用 Coulter Z2 Particle Count and Size Analyzer 进行细胞计数。测量 pH。

[0074] 将一半培养物注入配衡的(tared)50ml 管,并加入擦洗用异丙醇(isopropyl rubbing alcohol)(IPA)的 70%溶液以使管内的总体积达到 50ml。通过将管倒转 2-3 次混合培养物。然后使用 Sorvall General Purpose RC-3 Centrifuge 将培养物在 4000rpm 离心 5 分钟。倒掉上清。将另一半培养物注入上述沉淀(pellet)上并从 IPA 的 70%溶液开始重复上述步骤。然后以 39%IPA 使用如下步骤将沉淀洗涤两次:将 35ml 39%IPA 加入细胞沉淀;(使用来自 VWR Scientific 的 Vortex Genie-2)将管以全速涡旋 10 秒;收集后,将沉淀冷冻-干燥至少 48 小时。

[0075] 将含有沉淀(生物量)的管称重并计算生物量的干重。如下计算干重:确定含有生物量的管的重量减去管的自重。将此数字除以收获时记录的培养物的体积,除以 1000。

[0076] 可根据在 Morrison 和 Smith, "Preparation of Fatty Acid Methyl Esters and Dimethylacetals from Lipid with Boron Fluoride-Methanol", Journal of Lipid Research, Vo. 5, 1964, 和 the American Oil Chemist's Society Official Methods used to quantitate long chain Fatty Acid and eicosapentaenoic acid(EPA) 和 DHA in marine oils(Method CeIb-89)中公开的步骤测定脂肪酸组成(和%DHA)。简单地,将样品与标准量的油(内标)混合,用 0.5N 甲醇化氢氧化钠(methanolic sodium hydroxide)皂化,并用三氟化硼(boron trifluoride)/甲醇衍生。提取脂肪酸甲酯并在气相色谱上用火焰离子化检测器(使用 30m x 0.25mm x 0.25 μ m Restek FAMEWAX #12497 柱的 Hewlett Packard 5890 Series II Plus 气相色谱)分析。

[0077] 实施例 5

[0078] 此实施例描述了使用现有技术培养基在低 NaCl 水平生长 *C. cohnii* 并产生 DHA。

[0079] 制备 1 升不含 NaCl 的 SSM 并高压灭菌。制备 4 种浓缩的 NaCl 的贮存物 (135g/l、90g/l、45g/l 和 22.5g/l)。在每个含有 48.75ml 无 NaCl 的 SSM 培养基的摇瓶中加入 1.25ml 适合的 NaCl 贮存物。建立两种对照：4.5g/l NaCl 使用如实施例 1 中所述的正常 SSM，和无 NaCl 使用不加 NaCl 的 SSM。使用每个 NaCl 水平的重复。

[0080] 如实施例 4 所述进行生长和收获。表 5 描述了此实施例的结果。所有给出的数字为两次培养的平均值。

[0081] 表 5. 在含有减少量的 NaCl 的 SSM 中生长的 *C. cohnii* 的生物量、%DHA、% 脂肪和 DHA 产量。

[0082]

g/l NaCl	g/l 氯离子 ¹	生物量 干重 g/l	脂肪中的 % DHA (重量比)	生物量中的 %脂肪(重量比)
4.5	2.73	3.53	51.63	52.45
3.38	2.05	3.66	51.55	47.83
2.25	1.37	3.85	52.19	48.40
1.73	0.68	2.73	54.65	54.59
0.56	0.34	2.70	55.48	48.81
0	0	1.99	51.00	34.19

[0083] ¹ 表明只来自氯化钠的氯离子的量 (0.20g/l)。参见实施例 1-3。

[0084] 表 5 显示在含有减少量的 NaCl 的 SSM 中生长的 *C. cohnii* 的生物量的产量、% 脂肪、和 DHA 产量。可以看出随着加入培养物的 NaCl 量的减少,生物量产量和脂肪水平都下降,导致 DHA 的产量降低。

[0085] 实施例 6

[0086] 此实施例描述了用实施例 1 所述的培养基中的 4.5g/l NaCl 获得的 DHA 产量。

[0087] 如实施例 4 所述生长培养物。表 6 显示此实施例的结果。

[0088] 表 6. 在实施例 1 的 SSM 中生长的 *C. cohnii* 的生物量、%DHA、% 脂肪和 DHA 产量。

[0089]

(g/l) 氯化钠	(g/l) 硫酸钠	(g/l) 氯 ¹ 离子	(g/l) 钠离子	脂肪中的 % DHA (重量比)	生物量中 的%脂肪 (重量比)	生物量 干重(g/l)
4.5 g/l		2.73	1.77	53.9	65.03	3.1

[0090] ¹ 表明只来自氯化钠的氯离子的量。

[0091] 实施例 7

[0092] 此实施例描述了使用以硫酸钾和硫酸钠形式的钾离子和钠离子的不同浓度,在低氯培养基中增强的 *C. cohnii* 生长和 DHA 产生。

[0093] 使用 0.18g/l 乙酸钙并省去氯化钙和氯化钾,以实施例 3 中描述的方式制备低氯 SSM。使用二维矩阵相对于 4.9g/l,9.8g/l,14.7g/l,19.6g/l 和 24.5g/l 的 Na_2SO_4 浓度测试 0.16g/l,0.80g/l,1.6g/l,3.2g/l 和 4.8g/l 的 K_2SO_4 浓度的每种可能的组合。如实施例 4 所述生长所有的培养物。结果显示于表 7 中。

[0094] 表 7. 在含有变化浓度的硫酸钾和硫酸钠的培养基中生长的 *C. cohnii* 得到的生物量、%DHA、% 脂肪和 DHA 产量的比较

[0095]

摇瓶	g/L K_2SO_4	g/L Na_2SO_4	钠离子 ¹ (g/L)	钾离子 (g/L)	DW g/L	脂肪中的 %DHA (重量比)	生物量中的 %脂肪 (重量比)
1	0.16	4.90	1.77	0.07	2.55	57.97	60.80
2	0.16	9.80	3.35	0.07	1.53	52.39	41.45
3	0.16	14.70	4.93	0.07	-	-	-
4	0.16	19.60	6.53	0.07	0.75	42.88	13.28
5	0.16	24.50	8.11	0.07	0.71	41.46	12.11
6	0.80	4.90	1.77	0.36	3.79	56.76	63.19
7	0.80	9.80	3.35	0.36	4.03	55.11	64.96
8	0.80	14.70	4.93	0.36	3.66	55.14	64.39
9	0.80	19.60	6.52	0.36	3.07	56.88	58.12
10	0.80	24.50	8.11	0.36	2.91	57.37	53.65
11	1.60	4.90	1.77	0.72	3.74	55.90	63.46
12	1.60	9.80	3.35	0.72	3.83	55.00	65.43
13	1.60	14.70	4.93	0.72	3.49	56.48	60.09
14	1.60	19.60	6.53	0.72	3.18	54.71	54.92
15	1.60	24.50	8.11	0.72	2.83	54.82	49.02
16	3.20	4.90	1.77	1.44	3.51	54.42	63.99
17	3.20	9.80	3.35	1.44	3.36	55.40	61.12
18	3.20	14.70	4.93	1.44	3.40	55.61	59.34

[0096]

19	3.20	19.60	6.53	1.44	3.07	57.07	59.44
20	3.20	24.50	8.11	1.44	2.77	57.00	57.07
21	4.80	4.90	1.77	2.15	2.82	54.94	57.43
22	4.80	9.80	3.35	2.15	2.81	53.97	58.12
摇瓶	g/L K ₂ SO ₄	g/L Na ₂ SO ₄	钠离子 ¹ (g/L)	钾离子 (g/L)	DW g/L	脂肪中的 %DHA (重量比)	生物量中 的%脂肪 (重量比)
23	4.80	14.70	4.93	2.15	2.94	54.26	58.75
24	4.80	19.60	6.52	2.15	2.82	55.53	56.88
25	4.80	24.50	8.11	2.15	2.50	57.02	53.00

[0097] ¹ 包括由 0.45g/l 氯化钠或 0.18g/l 钠离子加入的钠离子。

[0098] 表 7 中显示的结果表明增加的钾水平使 *C. cohnii* 的生长和 DHA 的产量可与在高氯水平获得的情况相比较。此实施例中的增强效果出现在 0.8g/l 硫酸钾, 其为测定的第二低的水平, 并且其后对于硫酸钾的量相对地不敏感。在测定的硫酸钾的最高水平 4.8g/l, 好像产量有轻微的下降。生长和 DHA 产量也显得对于使用的硫酸钠的量相对不敏感, 然而, 从大约 19.6g/l 硫酸钠开始, 随着使用的硫酸钠的量的增加, 生长和产量轻微地降低。基于 DHA 以 g/L 表示的量的最佳组合是那些使用: 0.8g/L K₂SO₄ 和 9.8g/L Na₂SO₄, 其代表在 (实施例 3 中描述的) 正常的低氯 SSM 之上钾的 5x 增加和钠的 2x 增加; 和 1.6g/L K₂SO₄ 和 9.8g/L Na₂SO₄, 其代表在 (实施例 3 中描述的) 正常的低氯 SSM 之上钾的 10x 增加和钠的 2x 增加。

[0099] 实施例 8

[0100] 此实施例说明使用含有 0.32g/l, 0.64g/l, 0.96g/l, 1.28g/l, 1.60g/l 和 1.9g/l 的硫酸钾和 4.9g/l 和 9.8g/l 的硫酸钠的范围的培养基的 *C. cohnii* 生长和 DHA 产生的增强。

[0101] 以实施例 7 中描述的方式制备低氯 SSM, 并如实施例 4 所述生长所有的培养物。结果显示于表 8 中。

[0102] 表 8. 在含有变化浓度的硫酸钾和硫酸钠的培养基中生长的 *C. cohnii* 得到的生物量、%DHA、% 脂肪和 DHA 产量的比较

[0103]

摇瓶	g/L K ₂ SO ₄	g/L Na ₂ SO ₄	DW g/L	脂肪中的 %DHA (重 量比)	生物量中 的%脂肪 (重量比)	钠离子 ¹ (g/L)	钾离子 (g/L)
1	0.32	4.90	3.22	57.76	75.22	1.77	0.14
2	0.32	9.80	3.05	57.61	66.15	3.35	0.14
3	0.64	4.90	3.49	58.66	61.45	1.77	0.29
4	0.64	9.80	3.47	58.50	63.22	3.35	0.29
5	0.96	4.90	3.43	58.45	59.98	1.77	0.43
6	0.96	9.80	3.66	51.91	58.03	3.35	0.43
7	1.28	4.90	3.51	58.72	58.67	1.77	0.57
8	1.28	9.80	3.67	56.93	75.09	3.35	0.57
9	1.60	4.90	3.32	57.16	65.76	1.77	0.72
10	1.60	9.80	3.57	56.89	62.11	3.35	0.72
11	1.90	4.90	3.36	56.15	59.95	1.77	0.85
12	1.90	9.80	3.54	54.74	60.42	3.35	0.085

[0104] ¹ 包括由 0.45g/l 氯化钠或 0.18g/l 钠离子加入的钠离子。

[0105] 表 8 所示的结果显示最佳的 DHA 产量出现在 K₂SO₄ 浓度为 1.28g/L 及 Na₂SO₄ 浓度为 9.8g/L。表 8 所示的结果说明在硫酸钾水平低至 0.32g/l 时可看出附加钾的效果,并呈现相对的恒定直到 1.90g/l。对于 4.9g/l 或 9.8g/l 的硫酸钠水平而言,生长和产量相对不敏感。

[0106] 实施例 9

[0107] 如下实施例描述了传代培养 *C. cohnii* 以获得适于在 pH 5 生长的菌株。

[0108] 以实施例 4 中描述的方式在摇瓶中,在实施例 1 所述的培养基中培养 *C. cohnii* 菌株 T-HF,除了在培养开始时培养基的 pH 为 pH 5。7 天之后,使用来自该培养物的接种物在相同条件下在 pH 5 开始新的培养。起初在 pH 5 生长是缓慢的,但在多次传代 (multiple transfers) 后,DHA 产量开始增加而且一段时间后已经达到在 pH 6.3 生长的培养物中所见的产量,从而产生低 pH 菌株。参见图 1。注意到在 7 天生长期结尾所述培养物的 pH 为 5.4。由于柠檬酸盐、苹果酸盐、乙酸盐和乳酸盐缓冲液对于菌株 T-HF 的毒性作用 (toxic effect),使用这些缓冲液以使所述菌株适应 (adapt) 的尝试是不成功的。

[0109] 然后在前述的 pH 5 培养基中生长低 pH 菌株,但将 pH 保持在 5.0。所述适应低 pH 的菌株在 pH 5 和在 pH 5.4 同样生长良好。

[0110] 实施例 10

[0111] 如下的实施例描述了来自在 pH 6.3 和 2730ppm 氯离子培养基中生长的 *C. cohnii* 菌株 T-HF 的 DHA 产量与在 pH 5 在 1000ppm 氯离子培养基中的低 pH 菌株的 DHA 产量的比

较。

[0112] 在如实施例 1 所述的培养基中,如实施例 4 所述生长 *C. cohnii* 菌株 T-HF。在添加了硫酸钾和硫酸钠的如实施例 2 所述的低氯培养基中生长 *C. cohnii* 菌株。每个实验重复进行,每天收获所有的摇瓶以测定 DHA 产量的动力学。结果显示于图 1 中。图 1 显示在两种不同的培养基条件下 DHA 产量的动力学几乎相同。

[0113] 实施例 11

[0114] 如下的实施例描述了使 *C. cohnii* 菌株 T-HF 适应于在 pH 4.5 在 2730ppm 氯离子培养基中生长的尝试。

[0115] 以实施例 10 中描述的方式生长 *C. cohnii* 菌株 T-HF,除了将培养基调节到 pH 4.5 并用赖氨酸代替一半的 MSG,同时保持培养基中有机氮的恒定水平。

[0116] 重复培养后,得到的 DHA 产量为在 pH 5 或 pH 6.3 所见产量的大约三分之一。

[0117] 实施例 12

[0118] 如下的实施例描述了通过控制钾浓度限定在 pH 4.5 *C. cohnii* 生长和 DHA 产量的条件的尝试。

[0119] A. 在 pH 4.5 在 2.73g/l 氯离子进行析因实验 (factorial experiment) 以评估钾离子的效果 (0.16g/l 至 3.2g/l)。结果显示钾离子的更高水平使 DHA 产量增加到在 pH 6.3 及如实施例 1 所述的培养基生长的 *C. cohnii* 得到的产量的大约三分之二。

[0120] B. 以上述 A 部分所述的方式进行析因实验,除了将氯离子水平保持恒定在 1.0g/l。结果显示钾离子的更高水平使 DHA 产量增加到在 pH 6.3 及如实施例 1 所述的培养基生长的 *C. cohnii* 得到的产量的大约三分之二。在 2.73g/l 氯离子 (上面 A 部分所述) 和在 1.0g/l 氯离子得到的 DHA 产量是可以比较的。

[0121] 实施例 13

[0122] 此实施例描述了比较使用实施例 12 中所述的 pH 4.5 菌株和菌株 T-HF 在 pH 6.3, 1.0g/l 氯离子得到的 DHA 的产量的时间过程实验。

[0123] 在如表 9 具体说明的低氯, pH 4.5 培养基中以实施例 4 所述的方式后,在摇瓶中生长实施例 12 的 pH 4.5 菌株。使用实施例 1 中所述的培养基以实施例 4 所述的方式生长 *C. cohnii* 菌株 T-HF。在 pH 4.5 制备用于 pH 4.5 实验的接种物,并由于细胞在 pH 4.5 聚结 (clumping) 而估计接种物的量。

[0124] 表 9. 低氯, pH 4.5 培养基

[0125]

化合物	终浓度	加入的 氯离子量(g/l)	加入的 钾离子量(g/l)	加入的 钠离子量(g/l)
CaCl ₂ -2H ₂ O	0.3 g/l	0.09		
MgSO ₄ -7H ₂ O	1.25 g/l			
NaCl	1.41	0.86		0.55
MES	10.7 g/l			
MSG	0.75 g/l			
Tastone 154	0.5 g/l			
赖氨酸-HCl	0.37			
KH ₂ PO ₄	0.014 g/l		0.004	
K ₂ SO ₄	0.15		0.07	
Na ₂ SO ₄	3.46			1.12
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.15 X 10 ⁻³ g/l			

[0126]

H ₃ BO ₃	10 X 10 ⁻³ g/l			
MnCl ₂ -4H ₂ O	4.5 X 10 ⁻³ g/l	可忽略		
ZnSO ₄ -7H ₂ O	0.3 X 10 ⁻³ g/l			
NaOH(以调节 pH 至 6.3)	1.16 g/l			0.67
FeCl ₂ ¹	6 X 10 ⁻³ g/ml	可忽略		
硫胺素 ²	1 X 10 ⁻³ g/l			
生物素 ²	2 X 10 ⁻⁶ g/l			
葡萄糖 ³	50 g/l			
每种离子总量		0.30	0.08	0.74

[0127] 每天收获摇瓶以测定 DHA 产量的动力学。实验的结果(图 2)显示在 pH 4.5 的 DHA 产量总是低于在 pH 6.3 的产量,但是 DHA 产量增加的速率作为时间的函数在每个 pH 是大致相同的。这说明在 pH 4.5,所述培养物能够以与 pH 6.3 的培养物相同的速率积累 DHA,然而,与 pH 6.3 相比,在 pH 4.5 生长的培养物的 DHA 产量存在迟滞。

[0128] 此结果说明给定额外的时间,即大约 24 小时,在 pH 4.5 的 DHA 产量与在 pH 6.3 相同。不清楚所述的迟滞是否是由于在 pH 4.5 DHA 积累的延迟引起,并作为结果,所述 pH 4.5 培养物总是具有低于相同菌龄(same age)的 pH 6.3 培养物的 DHA 产量,或所述的迟滞是

否是由于所述 pH 4.5 培养物未接受等量的接种物引起。在 pH 4.5, 菌株 T-HF 细胞聚结以致不可能得到培养物的准确的细胞计数, 而且必须估计使用的接种物的量。因此, 可能所述 pH 4.5 培养物接受较少的接种物并因此在 DHA 产量的动力学中产生明显的迟滞。

[0129] 无论如何, 这些数据表明通过使用所述适应低 pH 的 *C. cohnii* 菌株和直接的 (instant) pH 4.5 培养基, 如果延长培养时间, 可获得与在 pH 6.3 的培养基相同的 DHA 产量。

[0130] 实施例 14

[0131] 使用实施例 10 中描述的技术, 进行上面实施例 13 中描述的离子浓度的进一步优化和已经适应 pH 5 的 *C. cohnii* 菌株 T-HF 的进一步传代培养, 以减少迟滞时间, 导致在 pH 4.5 的 7 天 DHA 产量可与在 pH 6.3 及如实施例 1 所述的培养基中生长的 *C. cohnii* 得到的产量相比较。

[0132] 在前述说明书中已经描述了本发明的原理、优选的实施方案和操作模式。然而, 不应将意欲在本文中被保护的本发明理解为局限于公开的具体形式, 因为它们将被认为是说明性的而不是限制性的。本领域的普通技术人员可以在不背离本发明的精神的前提下进行变化和改变。因此, 应将前述实施本发明的最佳方式认为实际上是说明性的, 并且不作为如在所附的权利要求中列出的本发明的范围和精神的限制。

pH6.3 SSM 中与 pH5.0 LCSSI 中菌株 T 的 DHA 产量对比

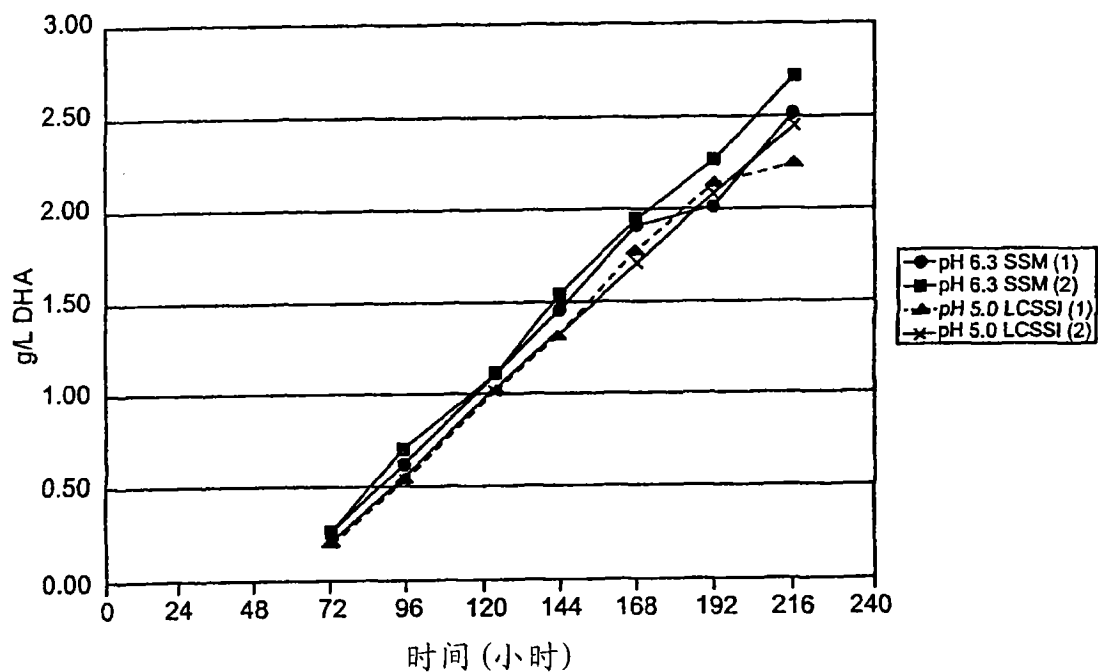


图 1

pH6.3 SSM 中与 pH4.5 LCSSI 中菌株 T 的 DHA 产量对比

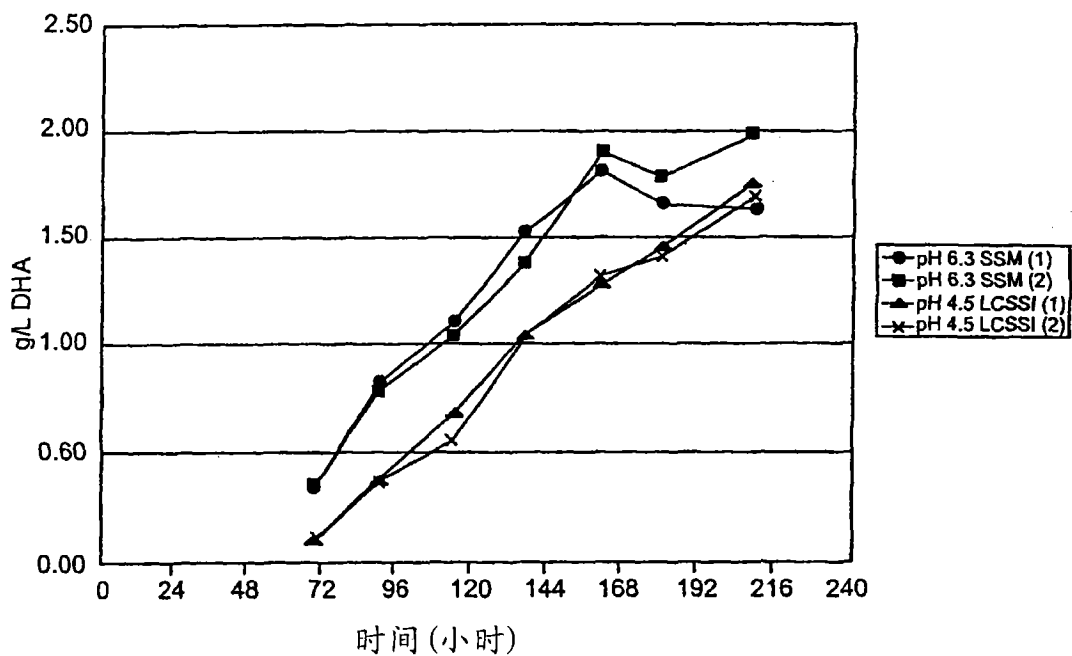


图 2