

裂殖壶菌及其应用、 富含 Sn-2 位 DHA 的微生物油脂及其制备方法和应用

相关申请的交叉引用

5 本申请要求 2019 年 11 月 26 日提交的中国专利申请 201911175787.4 的权益，该申请的内容通过引用被合并于本文。

技术领域

10 本发明涉及微生物技术领域，具体涉及一株裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.) 及其应用，一种富含 Sn-2 位 DHA 的微生物油脂及其制备方法和应用。

背景技术

二十二碳六烯酸 (DHA) 是大脑和眼部中的一种主要结构性脂肪酸，占大脑中 n-3 脂肪酸的 97%，在眼部中的比例达 93%。研究表明与随机结构的甘油三酯相比，DHA 在 Sn-2 位的特殊结构甘油三酯更利于人体吸收。15 另有研究指出进食特殊结构油脂会使 DHA 在大脑中含量最高，而进食随机结构的油脂，DHA 则在肝脏中含量最高，这表明进食不同结构的甘油三酯会导致脂肪酸代谢的差异，即脂肪酸在 Sn-2 位比在 Sn-1、Sn-3 位的吸收利用更有效。胰腺脂肪酶这一主要的脂肪消化酶，通过吸附在油水界面来发20 挥作用，同时它具有专一的酯键分解作用，即只专注水解 Sn-1、Sn-3 的酯键，因此，甘油三酯结构的油脂经胰腺脂肪酶分解后，Sn-1、Sn-3 位脂肪酸形成游离的脂肪酸、Sn-2 位脂肪酸形成单甘油酯，而呈游离态的脂肪酸难以渗入胆盐微胶粒被人体吸收，从而容易与肠道中钙、镁离子结合形成不溶性的皂盐损失掉，而 Sn-2 位脂肪酸形成单甘油酯易渗入胆盐微胶粒被25 人体吸收，所以 Sn-2 位脂肪酸比 Sn-1、Sn-3 位脂肪酸具有更高的人体吸收

率。

微生物油脂作为 DHA 的主要来源之一，随着人们保健意识的加强，已被广泛应用于婴幼儿食品、保健食品中，其营养功效愈来愈得到公众的认识、认可，而微生物油脂中 DHA 的吸收率也愈来愈为公众所关注。微生物油脂中 90% 以上的脂肪酸是甘油三酯结构形式，而目前微生物来源的 DHA 油脂采用吾肯氏菌属、裂殖壶菌属、破囊壶菌目、隐甲藻属、酵母等微生物发酵所获取，得到的甘油三酯型 DHA 的甘油骨架上的分布比例是 Sn-2 位的含量远远低于 Sn-1、Sn-3 位的含量，大量 Sn-1、Sn-3 位 DHA 在人体消化过程中形成皂盐而损失，微生物油脂的保健功效受到了限制。

10

发明内容

本发明的目的是为了克服现有技术存在的微生物油脂中甘油三酯 Sn-1、Sn-3 位 DHA 的比例高导致人体对 DHA 的吸收率低的问题，提供一株裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.) 及其应用，一种富含 Sn-2 位 DHA 的微生物油脂及其制备方法和应用，该微生物油脂通过裂殖壶菌发酵生产所得，富含 DHA 且油脂中甘油三酯 Sn-2 位 DHA 的比例不低于 23 重量%，有效提高 DHA 的人体吸收率。

为了实现上述目的，本发明第一方面提供了一种微生物油脂，所述微生物油脂包含甘油三酯，所述甘油三酯 Sn-2 位 DHA 占 Sn-2 位全脂肪酸的比例不低于 23 重量%。

优选地，所述微生物油脂的总 DHA 的含量不低于 38 重量%。

本发明第二方面提供了一种微生物油脂的制备方法，该方法包括将裂殖壶菌菌株接种到发酵培养基中发酵制得，所述裂殖壶菌菌株为保藏编号为 GDMCC No.60733 的裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.)。

本发明第三方面提供了由上述的方法制备得到的微生物油脂，所述微生物油脂包含甘油三酯，所述甘油三酯 Sn-2 位 DHA 占 Sn-2 位全脂肪酸的

25

比例不低于 23 重量%。

本发明第四方面提供了如上所述的微生物油脂在食品中的应用，所述食品优选为婴幼儿配方食品、保健食品以及健康食品。

本发明第五方面提供一株裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.)，所述裂殖壶菌为保藏编号为 GDMCC No.60733 的裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.)。

本发明第六方面提供如上所述的裂殖壶菌在生产微生物油脂中的应用。

通过上述技术方案，本发明提供的利用裂殖壶菌菌株发酵生产的微生物油脂，不仅富含 DHA，而且甘油三酯 Sn-2 位上 DHA 的比例不低于 23%，提高人体对该微生物油脂中 DHA 的吸收率，从而有效促进人体对功能保健因子 DHA 的吸收与利用。

本发明的其他特征和优点将在随后的具体实施方式部分予以详细说明。

生物保藏

本发明的菌株如下：

裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.)，于 2019 年 8 月 8 日被保藏在广东省微生物菌种保藏中心（地址：广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5 楼，广东省微生物研究所，邮政编码：510070）（保藏单位的缩写为 GDMCC），保藏编号为 GDMCC No.60733。

具体实施方式

在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值，这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说，各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间，以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围，这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

第一方面，本发明提供了一种微生物油脂，所述微生物油脂包含甘油

三酯，所述甘油三酯 Sn-2 位 DHA 占 Sn-2 位全脂肪酸的比例不低于 23 重量%。

在本发明中，DHA 是指二十二碳六烯酸。

优选地，所述微生物油脂中含有甘油三酯，所述微生物油脂中甘油三酯的含量为 90 重量%以上。

优选地，所述微生物油脂的总 DHA 的含量不低于 38 重量%。

应当理解的是，总 DHA 是指测定的微生物油脂中所含的 DHA 总量，可参见 GB26400-2011 的方法，其他脂肪酸的含量测定方法，参见 GB5009.168-2016。甘油三酯型 DHA 是指 DHA 通过酯键与甘油骨架连接。

在本发明的一种优选的实施方式中，所述微生物油脂中甘油三酯 Sn-2 位上 DHA 的比例不低于 23%。

在本发明的一种优选的实施方式中，所述微生物油脂中甘油三酯 Sn-2 位上 DHA 的比例不低于 23%。总 DHA 含量不低于 38%。

第二方面，本发明提供了一种微生物油脂的制备方法，该方法包括将裂殖壶菌菌株接种到发酵培养基中发酵制得，所述裂殖壶菌菌株为保藏编号为 GDMCC No.60733 裂殖壶菌 (*Schizochytrium*sp.)。

在本发明中，可以通过本领域常规使用的方法获得制备该微生物油脂的菌株。

本发明提供的所述裂殖壶菌为通过诱变后筛选得到。

所述诱变的方法可以是本领域常规使用的方法，比如可以为物理诱变（如紫外诱变、ARTP 诱变等）和化学诱变等。

在本发明一种优选的实施方式中，所述诱变的方法为 ARTP 诱变。

ARTP 诱变可以在常规使用的诱变系统中进行，比如可以为北京艾德豪克国际技术有限公司生产的 MPMS——多功能诱变系统。

所述诱变的具体操作方式可参见本领域常规采用的操作方式，优选地，诱变条件包括：等离子诱变功率为 80-120W，气体流量为 8-12SLM，处理

距离为 1-3mm。

诱变时间优选为 5-60s，更优选为 15-30s。

使用菌悬液进行诱变，其 OD₆₀₀ 值优选为 0.6-0.8 或菌浓度优选为 10⁶-10⁸cfu/mL。

5 优选地，所述诱变的操作条件使得裂殖壶菌的致死率为 90-95%。

出发菌株经过诱变后，可以通过多次筛选得到高产油率、且 Sn-2 位 DHA 含量高的菌株。

应当理解的是，本领域技术人员知晓通过比较 Sn-2 位为 DHA 的甘油三酯的比例大小来筛选高产 Sn-2 位为 DHA 的甘油三酯的菌株。

10 在本发明中，Sn-2 位脂肪酸的含量采用“GB/T24894-2010/ISO6800:1997 动植物油脂甘三酯分子 2-位脂肪酸组分的测定”的方法测定。

在本发明中，为了获得稳定性高的菌株，还可以对筛选得到的菌株进行遗传稳定性评价。现代育种的遗传稳定验证理论认为，对于诱变育种，采用 5 代转接后，如果其性能稳定达到预期要求，则认为该诱变得到的菌
15 种的性能稳定。

通过上述诱变、筛选和遗传稳定性评价，得到 Sn-2 位 DHA 含量高的菌株。

本发明的裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.)，于 2019 年 8 月 8 日被保藏在广东省微生物菌种保藏中心（地址：广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5
20 楼，广东省微生物研究所，邮政编码：510070）（保藏单位的缩写为 GDMCC），保藏编号为 GDMCC No.60733。

本发明提供的裂殖壶菌经过发酵产生富含 Sn-2 位 DHA 的微生物油脂，所述发酵的方法没有特别的要求，只要是能使所述裂殖壶菌增殖即可。

所述裂殖壶菌发酵的发酵条件没有特别的要求，可以是获得裂殖壶菌
25 发酵产物常用的选择，为了获得较多的发酵产物，优选地，所述发酵的条件包括：pH 为 6-7.5，温度为 27-31℃，时间为 4-8 天，通气比为 0.5-1.1VVM。

当裂殖壶菌以种子液的形式接种时，其接种量可以在较宽的范围内选择，优选地，接种量为 5-10 体积%。

用于裂殖壶菌发酵的培养基可以为本领域常规用于裂殖壶菌发酵的培养基，优选地，所述发酵培养基包含碳源、氮源、无机盐、微量元素和维
5 生素。

本发明中，所述碳源可以为葡萄糖、蔗糖或其他任何可以提供碳源的物质或其组合，氮源可以为谷氨酸钠、酵母粉、酵母浸膏或其他任何可以提供氮源的物质或其组合。

优选地，所述碳源为葡萄糖和/或蔗糖。

10 优选地，所述氮源为谷氨酸钠、酵母粉和酵母浸膏中的一种或多种。

优选地，所述无机盐为钙盐、磷酸盐、钾盐、钠盐、镁盐和铵盐中的一种或多种。

优选地，所述微量元素为镍、铜、钼、钴、锌、铁和锰中的一种或多种。

15 优选地，所述维生素为维生素 B₁、维生素 B₁₂、维生素 B₆、泛酸钙和生物素中的一种或多种。

在本发明中，所述碳源、氮源和无机盐可以通过直接添加的方式添加，但是微量元素和维生素在培养基体积较小的情况下，难以直接添加，往往通过配制母液，并以母液的形式进行添加。

20 在本发明中，所述微量元素母液中各组分的含量可以在较宽的范围内选择，优选地，微量元素母液的配方为：硫酸镍 1-3g/L，硫酸铜 1-3g/L，钼酸钠 0.02-0.08g/L，氯化锰 2-4g/L，氯化钴 0.02-0.08g/L，硫酸锌 2-4g/L，硫酸亚铁 8-10g/L。

在本发明中，所述微生物母液中各组分的含量可以在较宽的范围内选
25 择，优选地，微生物母液的配方为：维生素 B₁ 9-11g/L，维生素 B₁₂ 0.1-0.3g/L，泛酸钙 2-4g/L，生物素 0.005-0.01g/L。

优选地，所述发酵培养基中的氮源包含谷氨酸。

所述谷氨酸的浓度可以在较宽的范围内选择，优选地，所述发酵培养基中，谷氨酸的浓度为 5-15g/L。

所述发酵培养基中碳源的浓度也可以在较宽的范围内选择，优选地，
5 所述发酵培养基中，碳源的浓度为 5-70g/L。

在本发明一种优选的实施方式中，所述发酵培养基中，碳源的含量为 5-70g/L，氮源的含量为 15-45g/L，无机盐的含量为 5-40g/L，微量元素的含量为 0.01-0.04g/L，维生素的含量为 0.01-0.04g/L。优选地，所述发酵培养基中，碳源的含量为 40-60g/L，氮源的含量为 20-35g/L，无机盐的含量为
10 10-25g/L，微量元素的含量为 0.015-0.035g/L，维生素的含量为 0.01-0.03g/L。

优选地，所述发酵培养基中还含有消泡剂，所述消泡剂的含量优选为 0.1-0.5g/L。

其中，所述裂殖壶菌接种到发酵培养基中发酵的过程中，在发酵培养基中投加部分碳源、部分氮源，在发酵过程中根据碳氮比的调控工艺不断
15 流加碳源、氮源，在接近发酵终点时不再补充碳源直至培养基中残糖含量为 0，以此来调控碳氮比形成营养缺陷型营养条件，以确保裂殖壶菌发酵产油量的水平。

为了获得较多的发酵产物，该方法优选包括：所述裂殖壶菌菌株经活化后制作成摇瓶种子液接种到所述种子培养基中培养，然后再转接入发酵
20 培养基中发酵培养。优选地，该方法进一步包括：将所述裂殖壶菌菌株接种到活化培养基中，经活化得到活化液；将活化液接种到种子培养基中进行扩培，得到种子液；然后将种子液接种到所述发酵培养基中发酵培养，制备得到微生物油脂。

在本发明中，所述裂殖壶菌菌株可以是安瓿瓶保存或甘油管保存的菌
25 株。

优选地，所述活化的过程包括将所述裂殖壶菌菌株的冷冻甘油管菌种

解冻、接种到活化培养基中进行活化。

在本发明中，可以通过一次或多次活化以制备活化液。

其中，所述活化的条件可以在较宽的范围内选择，优选地，所述活化的条件包括：温度为 27.5-28.5℃，转速为 150-200r/min，时间为 48-72h。

- 5 优选地，所述活化培养基中包含碳源、氮源、无机盐、微量元素和维生素；其中，所述活化培养基中，碳源的含量为 30-50g/L、氮源的含量为 25-45g/L、无机盐的含量为 25-40g/L、微量元素的含量为 0.015-0.03g/L、维生素的含量为 0.01-0.02g/L。

- 在本发明的一种优选的实施方式中，所述菌株活化培养的过程包括：
- 10 将所述裂殖壶菌菌株的冷冻甘油管菌种解冻，用无菌吸管将所述甘油管菌种接种到已灭菌的活化培养基中，在温度为 27.5-28.5℃、转速为 150-200r/min 的条件下培养 48-72h。其中，所述活化培养基中，碳源的含量为 30-50g/L，氮源的含量为 25-45g/L，无机盐的含量为 25-40g/L，微量元素的含量为 0.015-0.025g/L，维生素的含量为 0.01-0.02g/L。

- 15 优选地，所述甘油管菌种的接种量按一支甘油管转接 4-6 个三角瓶的方式，比如，三角瓶的规格为 500mL，每个三角瓶中的种子培养基体积为 200-300mL。

在本发明中，所述扩培的方法优选包括：将种子液接入种子培养基中进行扩培，得到种子液。

- 20 优选地，所述扩培的条件包括：温度为 27-28.5℃；时间为 48-72h；通气比为 0.5-0.8VVM。

- 优选地，所述种子培养基中包含碳源、氮源、无机盐、微量元素和维生素；其中，所述种子培养基中，碳源的含量为 25-60g/L，氮源的含量为 10-30g/L，无机盐的含量为 15-35g/L，微量元素的含量为 0.01-0.02g/L，维
- 25 生素的含量为 0.01-0.02g/L。

优选地，所述种子培养基中还含有消泡剂，所述消泡剂的含量优选为

0.1-0.5g/L。

在本发明的一种优选的实施方式中，所述扩培的方法包括：将种子液接入一级种子培养基中进行一级扩培后，接入二级种子培养基中进行二级扩培，得到种子液。

5 优选地，所述一级扩培的条件包括：温度为 27-28.5℃；时间为 48-60h；通气比为 0.5-0.8VVM。

优选地，所述二级扩培的条件包括：温度为 27-28.5℃；时间为 12-24h；通气比为 0.5-0.8VVM。

10 优选地，所述一级种子培养基中，碳源的含量为 25-35g/L，氮源的含量为 10-30g/L，无机盐的含量为 15-35g/L，微量元素的含量为 0.01-0.02g/L，维生素的含量为 0.01-0.02g/L。

优选地，所述二级种子培养基中，碳源的含量为 40-60g/L，氮源的含量为 10-15g/L，无机盐的含量为 15-20g/L，微量元素的含量为 0.01-0.02g/L，维生素的含量为 0.01-0.02g/L。

15 所述活化培养基和种子培养基各组分的种类参见发酵培养基。

本发明可以进一步对上述发酵的产物进行处理，以获得微生物油脂，所述处理的方法没有特别的限制，只要是能从所述发酵的产物中将微生物油脂分离即可，为了获得较高的微生物油脂收率，所述处理包括对所述发酵的产物进行破壁、萃取得到所述发酵的产物中的油脂产物。

20 第三方面，本发明提供了由上述的方法制备得到的微生物油脂，所述微生物油脂包含甘油三酯，所述甘油三酯 Sn-2 位 DHA 占 Sn-2 位全脂肪酸的比例不低于 23 重量%。

优选地，所述微生物油脂的总 DHA 的含量不低于 38 重量%。

第四方面，本发明提供了如上所述的微生物油脂在食品中的应用。

25 所述食品优选为婴幼儿配方食品、保健食品或健康食品。

本发明第五方面提供一株裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.)，所述裂殖壶

菌为保藏编号为 GDMCC No.60733 的裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.)。

所述裂殖壶菌的获取方式在第二方面进行了说明，在此不再赘述。

本发明第六方面提供如上所述的裂殖壶菌在生产微生物油脂中的应用。

优选地，所述微生物油脂包含甘油三酯，所述甘油三酯 Sn-2 位 DHA
5 占 Sn-2 位全脂肪酸的比例不低于 23 重量%。

优选地，所述微生物油脂的总 DHA 的含量不低于 38 重量%。

以下将通过实施例对本发明进行详细描述。

以下实施例中，微生物油脂中 DHA 的含量通过 GB26400-2011 中的方
10 法测定，脂肪酸组分通过 GB5009.168-2016 方法测得；

人体对 DHA 的吸收率测定方法为“人体功效试验的方法”：征集男女
志愿者食用本专利方法生产的 DHA 油脂和对比 DHA 油脂，然后抽取血液
测定血液中 DHA 含量、Sn-2 位 DHA 脂肪酸含量来计算吸收率。

裂殖壶菌常规菌株来自于中国工业微生物菌种保藏管理中心，编号为
15 CICC 11091s；

葡萄糖、蔗糖、酵母粉、谷氨酸钠、酵母浸膏、氯化钠、硫酸镁、氯
化钙、磷酸二氢钾、硫酸镍、硫酸铜、钼酸钠、氯化钴、硫酸锌、硫酸亚
铁、氯化锰、维生素 B₁、维生素 B₁₂、维生素 B₆、泛酸钙、生物素、碳酸
氢钠、硫酸钠、硫酸铵、氯化钾均为市售品。

20 本发明的实施例中，微量元素母液的配方为：硫酸镍 2g/L，硫酸铜 1.9g/L，
钼酸钠 0.04g/L，氯化锰 2.8g/L，氯化钴 0.04g/L，硫酸锌 3.2g/L，硫酸亚铁
9g/L；

维生素母液的配方为：维生素 B₁ 10.3g/L、维生素 B₁₂ 0.16g/L、泛酸钙
3.2g/L、生物素 0.008g/L。

25

制备例

本制备例用于说明本发明所述的裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.) 的获取方法。

活化培养基配方为：葡萄糖 40g/L，谷氨酸钠 31g/L，氯化钠 19g/L，酵母浸膏 5.8g/L，硫酸镁 8g/L，磷酸二氢钾 5.7g/L，微量元素 1g/L，维生素 1g/L。固体培养基时，另含琼脂 18g/L。

取出发菌株保存在安瓿瓶中的菌种，接种到活化培养基中并在 28℃ 活化培养 2 天。将培养得到的菌液涂到活化培养基平板上，在北京艾德豪克国际技术有限公司生产的 MPMS——多功能诱变系统中进行 ARTP 诱变处理：等离子诱变功率为 100W，气体流量为 10SLM，处理距离为 2mm，制备 DHA 菌悬液，其 OD₆₀₀ 值在 0.6-0.8 或菌浓度在 10⁶-10⁸ 之间，诱变时间为 25s，致死率为 92.54%。挑选生长良好的单菌落传代，接种到装有活化培养基的摇瓶中在 27℃ 下培养 4 天，进行初筛，检测培养后的产物中 DHA 含量、Sn-2 位 DHA 的含量，挑选高产菌株。将初筛筛选得到的高产菌株进行摇瓶复筛，在 27℃ 下培养 4 天，再次挑选高产菌株。对复筛得到的高产菌株进行遗传稳定性考察，取传代 5 次后，性状稳定的菌株作为生产菌株并长期保存备用。

经筛选，得到本发明提供的裂殖壶菌 (*Schizochytrium* sp.)，于 2019 年 8 月 8 日被保藏在广东省微生物菌种保藏中心（地址：广州市先烈中路 100 号大院 59 号楼 5 楼，广东省微生物研究所，邮政编码：510070）（保藏单位的缩写为 GDMCC），保藏编号为 GDMCC No.60733。

实施例 1

本实施例用于说明本发明所述的裂殖壶菌的 30L 发酵生产。

本实施例中活化培养基配方为：葡萄糖 40g/L，谷氨酸钠 31g/L，酵母浸膏 5.8g/L，氯化钠 19g/L，硫酸镁 8g/L，磷酸二氢钾 5.7g/L，微量元素 1g/L，维生素 1g/L；

种子培养基配方为：葡萄糖 30g/L，谷氨酸钠 6.3g/L，酵母浸膏 8.3g/L，酵母粉 8.3g/L，氯化钠 1.45g/L，硫酸镁 5.18g/L，磷酸二氢钾 1.66g/L，氯化钙 0.25g/L，碳酸氢钠 0.25g/L，硫酸钠 9.34g/L，硫酸铵 1.04g/L，氯化钾 0.83g/L，微量元素 1g/L，维生素 1g/L，消泡剂 0.3g/L；

- 5 发酵培养基配方为：葡萄糖 50g/L，谷氨酸钠 15g/L，酵母浸膏 10.9g/L，氯化钠 2.6g/L，硫酸镁 5.8g/L，磷酸二氢钾 2.4g/L，氯化钙 0.25g/L，碳酸氢钠 0.22g/L，硫酸钠 3.62g/L，硫酸铵 1.13g/L，氯化钾 0.94g/L，微量元素母液 1.1g/L，维生素母液 1.1g/L，消泡剂 0.19g/L。

具体步骤如下：

- 10 （1）分别将裂殖壶菌常规菌株和本发明所使用的裂殖壶菌菌株（保藏编号为 GDMCC No.60733）进行活化，接种量为 1 支解冻后的甘油管菌种转接到 4 个装有 200mL 活化培养基的摇瓶中，在转速为 180r/min、温度为 28℃的摇床上培养 48h；

- 15 （2）将步骤（1）所得的活化液接种到放有 200mL 活化培养基的摇瓶中进行扩大培养，接种量为 3%，在转速为 180r/min、温度为 28℃的摇床上培养 72h；

（3）种子罐中装有 3L 种子培养基，将 200mL 步骤（2）所得的活化液接入种子罐中，以温度为 28℃、搅拌速度为 180r/min、通气量为 0.6vvm、罐压为 0.03Mpa 的条件培养 50h；

- 20 （4）发酵罐中装有 14L 发酵培养基，将步骤（3）所得的种子液全部转接入发酵罐中，以温度为 29℃、搅拌速度为 140r/min、通气量为 0.95vvm、罐压为 0.03Mpa、pH 为 6.8 的条件培养 5-6 天，发酵过程中流加葡萄糖浓度为 250g/L 的无菌液和谷氨酸钠浓度为 250g/L 的无菌液，以保持谷氨酸浓度为 5-8g/L、碳源浓度为 10-23g/L，96h 后停止补充碳源和谷氨酸，最终获得
25 发酵液；

- （5）将 5L 步骤（4）所得的发酵液经酶解破壁后，用实验室高速离心

机将水相、渣相、油相分离，得到微生物油脂；

(6) 将步骤(5)所得的微生物油脂进行 DHA 含量、脂肪酸组分和油脂中甘油三酯 Sn-2 位 DHA 的比例分析测定，结果见表 1。

5 表 1 实施例 1 中微生物油脂中各参数的数据

	常规菌株	本发明用菌株
DHA (C22:6) , g/100g	40.256	43.139
棕榈酸(C16:0), g/100g	21.894	20.974
硬脂酸(C18:0), g/100g	1.542	1.301
油酸(C18:1), g/100g	0.312	0.273
二十二碳五烯酸 (C22:5) , g/100g	11.012	10.330
甘油三酯 Sn-2 位上 DHA 的比例, %	21.97	43.24
甘油三酯 Sn-1、Sn-3 位上 DHA 的比例, %	56.98	47.55
人体对 DHA 的吸收率, %	44.17	61.8

实施例 2

本实施例用于说明本发明所述的裂殖壶菌的 100L 发酵生产。

本实施例中活化培养基配方为：葡萄糖 30g/L，谷氨酸钠 20g/L，酵母
10 浸膏 5g/L，氯化钠 15g/L，硫酸镁 6g/L，磷酸二氢钾 4g/L，微量元素 0.8g/L，
维生素 0.75g/L；

种子培养基配方为：葡萄糖 25g/L，谷氨酸钠 5.5g/L，酵母浸膏 7g/L，
酵母粉 7g/L，氯化钠 1.1g/L，硫酸镁 4g/L，磷酸二氢钾 1.2g/L，氯化钙 0.15g/L，
碳酸氢钠 0.15g/L，硫酸钠 7g/L，硫酸铵 0.8g/L，氯化钾 0.6g/L，微量元素
15 0.8g/L，维生素 0.75g/L，消泡剂 0.2g/L；

发酵培养基配方为：葡萄糖 30g/L、蔗糖 10g/L，谷氨酸钠 12g/L，酵

母浸膏 9g/L, 氯化钠 2g/L, 硫酸镁 4.5g/L, 磷酸二氢钾 2g/L, 氯化钙 0.2g/L, 碳酸氢钠 0.2g/L, 硫酸钠 2.8g/L, 硫酸铵 1g/L, 氯化钾 0.8g/L, 微量元素 0.9g/L, 维生素 0.9g/L, 消泡剂 0.15g/L。

具体步骤如下:

5 (1) 分别将裂殖壶菌常规菌株和本发明所使用的裂殖壶菌菌株(保藏编号为 GDMCC No.60733)进行活化, 接种量为 1 支解冻后的甘油管菌种接种到 5 个装有 200mL 活化培养基的摇瓶中, 在转速为 150r/min、温度为 28.5℃的摇床上培养 72h;

(2) 将步骤(1)所得的活化液接种到 5 个装有 200mL 活化培养基的
10 摇瓶中进行扩大培养, 接种量为: 将步骤(1)中得到的活化液 2 瓶接种到 5 瓶种子培养基中, 在转速为 150r/min、温度为 28℃的摇床上培养 48h;

(3) 种子罐中装有 6L 种子培养基, 将 400mL 步骤(2)所得的活化液接入种子罐中, 以温度为 28℃、搅拌速度为 150r/min、通气量为 0.5vvm、罐压为 0.03Mpa 的条件培养 48h;

15 (4) 发酵罐中装有 45L 发酵培养基, 将步骤(3)所得的种子液全部转接入发酵罐中, 以温度为 28-29℃、搅拌速度为 90--120r/min、通气量为 0.5-0.8vvm、罐压为 0.03Mpa 的条件培养 5-6 天, 发酵过程中流加葡萄糖浓度为 250g/L 的无菌液和谷氨酸钠浓度为 250g/L 的无菌液, 以保持谷氨酸浓度为 8-12g/L、碳源浓度为 40-65g/L, 96h 停止补充碳源和谷氨酸, 最终获
20 得发酵液;

(5) 将 10L 步骤(5)所得的发酵液经酶解后, 用实验室离心机分离得到微生物油脂;

(6) 将步骤(5)所得的微生物油脂进行 DHA 含量、脂肪酸组分和油脂中甘油三酯 Sn-2 位 DHA 的比例分析测定, 结果见表 2。

25

表 2 实施例 2 中微生物油脂中各参数的数据

	常规菌株	本发明用菌株
DHA (C22:6) , g/100g	42.689	46.786
棕榈酸(C16:0), g/100g	23.13	21.05
硬脂酸(C18:0), g/100g	1.56	1.31
油酸(C18:1), g/100g	0.314	0.271
二十二碳五烯酸 (C22:5) , g/100g	11.012	10.301
甘油三酯 Sn-2 位上 DHA 的比例, %	22.76	43.68
甘油三酯 Sn-1、Sn-3 位上 DHA 的比例, %	57.37	46.68
人体对 DHA 的吸收率, %	43.98	62.8

实施例 3

本实施例用于说明本发明所述的裂殖壶菌的 45M³ 工业发酵生产。

本实施例中活化培养基配方为：葡萄糖 50g/L，谷氨酸钠 35g/L，酵母
 5 浸膏 10g/L，氯化钠 22g/L，硫酸镁 10g/L，磷酸二氢钾 8g/L，微量元素 1.4g/L，
 维生素 1.5g/L；

一级种子培养基配方为：葡萄糖 35g/L，谷氨酸钠 8g/L，酵母浸膏 10g/L，
 酵母粉 10g/L，氯化钠 1.9g/L，硫酸镁 6g/L，磷酸二氢钾 2.1g/L，氯化钙 0.4g/L，
 碳酸氢钠 0.4g/L，硫酸钠 12g/L，硫酸铵 1.3g/L，氯化钾 1.1g/L，微量元素
 10 1.2g/L，维生素 1.2g/L，消泡剂 0.4g/L；

二级种子培养基配方为：葡萄糖 50g/L，谷氨酸钠 5.65g/L，酵母浸膏
 5.65g/L，氯化钠 1.3g/L，硫酸镁 4.65g/L，磷酸二氢钾 1.49g/L，氯化钙 0.22g/L，
 碳酸氢钠 0.22g/L，硫酸钠 8.39g/L，硫酸铵 0.93g/L，氯化钾 0.74g/L，微量
 元素 0.93g/L，维生素 0.93g/L，消泡剂 0.3g/L；

15 发酵培养基配方为：葡萄糖 40g/L、蔗糖 20g/L，谷氨酸钠 20g/L，酵

母浸膏 12g/L, 氯化钠 3.2g/L, 硫酸镁 7g/L, 磷酸二氢钾 3g/L, 氯化钙 0.4g/L, 碳酸氢钠 0.3g/L, 硫酸钠 4.5g/L, 硫酸铵 1.5g/L, 氯化钾 1.2g/L, 微量元素 1.6g/L, 维生素 1.6g/L。

具体步骤如下:

5 (1) 分别将裂殖壶菌常规菌株和本发明所使用的裂殖壶菌菌株(保藏编号为 GDMCC No.60733)进行活化, 接种量为 1 支解冻后的甘油管菌种接种到 6 个装有 200mL 活化培养基的摇瓶中, 在转速为 180r/min、温度为 28℃的摇床上培养 60h;

(2) 将步骤(1)所得的 2 瓶活化液接种到 5 个装有 200mL 活化培养基的三角瓶中进行扩大培养, 在转速为 180r/min、温度为 28±0.5℃的摇床上培养 60h;

(3) 一级种子罐中装有 500L 一级种子培养基, 灭菌冷却至 40℃以下, 然后将 1L 步骤(2)所得的活化液转接入一级种子罐中, 以温度为 28±0.5℃、搅拌速度为 150r/min、pH 为 6.8 的条件培养 55h;

15 (4) 二级种子罐中装有 6M³ 二级种子培养基, 灭菌冷却至 40℃以下, 然后将步骤(3)所得的一级种子液全部在无菌条件下转接到二级种子罐中, 以温度 28±0.5℃、搅拌 150r/min、pH6.8 的条件培养 18h;

(5) 主发酵罐中装有 22M³ 发酵培养基, 灭菌冷却至 40℃以下, 将步骤(4)所得的二级种子液全部在无菌条件下转接到主发酵罐中, 以温度 28±0.5℃、搅拌 100r/min、通气比为 1.0VVM、pH7.5 的条件培养 5 天, 发酵过程中流加葡萄糖浓度为 250g/L 的无菌液和谷氨酸钠浓度为 250g/L 的无菌液, 以保持谷氨酸浓度为 12-15g/L、碳源浓度为 55-70g/L, 96h 停止补充碳源和谷氨酸, 最终获得发酵液;

(6) 发酵液经酶解后, 将发酵液预热到 85-90℃, 用三相离心机分离得到微生物油脂;

(7) 将步骤(6)所得的微生物油脂进行 DHA 含量、脂肪酸组分和油

脂中甘油三酯 Sn-2 位 DHA 的比例分析测定，结果见表 3。

表 3 实施例 3 中微生物油脂中各参数的数据

	常规菌株	本发明用菌株
DHA (C22:6) , g/100g	45.768	50.664
棕榈酸(C16:0), g/100g	22.913	20.859
硬脂酸(C18:0), g/100g	1.321	1.293
油酸(C18:1), g/100g	0.314	0.277
二十二碳五烯酸 (C22:5) , g/100g	12.435	10.366
甘油三酯 Sn-2 位上 DHA 的比例, %	22.148	43.96
甘油三酯 Sn-1、Sn-3 位上 DHA 的比例, %	54.56	46.33
人体对 DHA 的吸收率, %	44.78	63.1

- 5 以上详细描述了本发明的优选实施方式，但是，本发明并不限于此。在本发明的技术构思范围内，可以对本发明的技术方案进行多种简单变型，包括各个技术特征以任何其它的合适方式进行组合，这些简单变型和组合同样应当视为本发明所公开的内容，均属于本发明的保护范围。

权利要求书

1、一种微生物油脂，其特征在于，所述微生物油脂包含甘油三酯，所述甘油三酯 Sn-2 位 DHA 占 Sn-2 位全脂肪酸的比例不低于 23 重量%。

5 2、根据权利要求 1 所述的微生物油脂，其特征在于，所述微生物油脂的总 DHA 的含量不低于 38 重量%。

3、一种微生物油脂的制备方法，其特征在于，该方法包括将裂殖壶菌菌株接种到发酵培养基中发酵制得，所述裂殖壶菌菌株为保藏编号为
10 GDMCC No.60733 的裂殖壶菌（*Schizochytrium*sp.）；

 优选地，发酵的条件包括：pH 为 6-7.5、温度为 27-31℃、时间为 4-8 天、通气比为 0.45-1.1VVM；和/或

 优选地，所述发酵培养基包含碳源、氮源、无机盐、微量元素和维生素；

15 更优选地，所述发酵培养基中的氮源包含谷氨酸；进一步优选地，所述发酵培养基中，谷氨酸的浓度为 5-15g/L

 更优选地，所述发酵培养基中，碳源的含量为 5-70g/L，氮源的含量为 15-45g/L，无机盐的含量为 5-40g/L，微量元素的含量为 0.01-0.04g/L，维生素的含量为 0.01-0.04g/L。

20

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，该方法进一步包括：将所述裂殖壶菌菌株接种到活化培养基中，经活化得到活化液；将活化液接种到种子培养基中进行扩培，得到种子液；然后将种子液接种到所述发酵培养基中发酵培养，制备得到微生物油脂；

25 优选地，所述活化的条件包括：温度为 27.5-28.5℃，转速为 150-200r/min，时间为 48-72h；

优选地，所述活化培养基中包含碳源、氮源、无机盐、微量元素和维生素；其中，所述活化培养基中，碳源的含量为 30-50g/L，氮源的含量为 25-45g/L，无机盐的含量为 25-40g/L，微量元素的含量为 0.015-0.025g/L，维生素的含量为 0.01-0.02g/L；

5 优选地，所述扩培的条件包括：温度为 27-28.5℃；时间为 48-72h；通气比为 0.5-0.8VVM；

优选地，所述种子培养基中包含碳源、氮源、无机盐、微量元素和维生素；其中，所述种子培养基中，碳源的含量为 25-60g/L，氮源的含量为 10-30g/L，无机盐的含量为 15-35g/L，微量元素的含量为 0.01-0.02g/L，维
10 生素的含量为 0.01-0.02g/L。

5、根据权利要求 3 或 4 所述的方法，其特征在于，所述碳源为葡萄糖和/或蔗糖，和/或

所述氮源为谷氨酸钠、酵母粉和酵母浸膏中的一种或多种，和/或
15 所述无机盐为钙盐、磷酸盐、钾盐、钠盐、镁盐和铵盐中的一种或多种，和/或

所述微量元素为镍、铜、钼、钴、锌、铁和锰中的一种或多种，和/或
所述维生素为维生素 B1、维生素 B12、维生素 B6、泛酸钙和生物素中的一种或多种。

20

6、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，该方法还包括对所述发酵的产物进行萃取得到所述发酵的产物中的油脂产物。

7、由权利要求 3-6 中任意一项所述的方法制备的微生物油脂，其特征
25 在于，所述微生物油脂包含甘油三酯，所述甘油三酯 Sn-2 位 DHA 占 Sn-2 位全脂肪酸的比例不低于 23 重量%；

优选地，所述微生物油脂的总 DHA 的含量不低于 38 重量%。

8、权利要求 1、2 和 7 中任意一项所述的微生物油脂在食品中的应用，所述食品优选为婴幼儿配方食品、保健食品以及健康食品。

5

9、一株裂殖壶菌 (*Schizochytrium*sp.)，其特征在于，所述裂殖壶菌为保藏编号为 GDMCC No.60733 的裂殖壶菌 (*Schizochytrium*sp.)。

10、权利要求 9 所述的裂殖壶菌在生产微生物油脂中的应用；

10 优选地，所述微生物油脂包含甘油三酯，所述甘油三酯 Sn-2 位 DHA 占 Sn-2 位全脂肪酸的比例不低于 23 重量%；

优选地，所述微生物油脂的总 DHA 的含量不低于 38 重量%。