

高山被孢霉及其应用、 富含 Sn-2 位 ARA 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 201911175789.3 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，具体涉及一株高山被孢霉 (*Mortierella alpina*) 及其应用，一种富含 Sn-2 位 ARA 的微生物油脂及其制备方法和应用。

背景技术

脂类是人体不可缺少的营养素之一，它不但供给身体能量，还是构成
15 细胞、组织不可或缺的原料，也能提供脂溶性维生素。但是要在体内发挥这些重要作用，首先要被肠道消化、吸收，脂类的消化、吸收主要在小肠中进行，参与消化、吸收的有胰腺与小肠的脂肪酶类、胆汁中的胆酸盐，而胰腺与胆汁分泌碳酸氢盐形成的碱性环境，也是不可缺少的环境条件。脂类被人体吸收的效率取决于参与消化的各种酶及其作用机制、以及脂类
20 的结构形式。大量的研究表明，脂类的结构形式很大程度上影响了人体对脂类的吸收率。甘油三酯结构的脂类，根据脂类在甘油骨架中的结合位置，分为 Sn-1、Sn-2、Sn-3 位脂肪酸，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
25 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。

5 微生物油脂作为脂类的一种，含有丰富的多不饱和脂肪酸，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，而微生物油脂中功能因子-多不饱和脂肪酸，如花生四烯酸（ARA）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，而目前的微生物油脂中脂肪酸在甘油骨架上的分布比例是 Sn-2 位脂肪酸的比例远远低于 Sn-1、Sn-3 位脂肪酸的比例，大量 Sn-1、Sn-3 位脂肪酸在人体消化过程中因形成皂盐而损失，使微生物油脂的保健功效受到了限制。

发明内容

15 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 ARA 的比例高导致人体对 ARA 的吸收率低的问题，提供一株高山被孢霉（*Mortierella alpina*）及其应用，一种富含 Sn-2 位 ARA 的微生物油脂及其制备方法和应用，该微生物油脂通过高山被孢霉发酵生产，且油脂中甘油三酯 Sn-2 位上 ARA 的比例不低于 23 重量%，有效提高 ARA 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型油脂，所述甘油三酯 Sn-2 位 ARA 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 ARA 含量不低于 38 重量%。

25 本发明第二方面提供了一种微生物油脂的制备方法，该方法包括将高山被孢霉菌株接种到发酵培养基中发酵制得，所述高山被孢霉菌株为保藏

编号为 GDMCC No.60734 的高山被孢霉 (*Mortierellaalpina*)。

本发明第三方面提供了由上述方法制备的微生物油脂，所述微生物油脂包含甘油三酯型油脂，所述甘油三酯 Sn-2 位 ARA 占 Sn-2 位全脂肪酸的比例不低于 23 重量%。

5 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高山被孢霉 (*Mortierellaalpina*)，所述高山被孢霉为保藏编号为 GDMCC No.60734 的高山被孢霉(*Mortierellaalpina*)。

10 本发明第六方面提供如上所述的高山被孢霉在生产微生物油脂中的应用。

通过上述技术方案，本发明提供的利用高山被孢霉菌株发酵生产的微生物油脂不仅富含 ARA，而且甘油三酯 Sn-2 位上 ARA 的比例不低于 23%（优选为 30%以上），提高人体对该微生物油脂中 ARA 的吸收率，从而有效促进人体对功能脂肪酸 ARA 的吸收与利用。

15 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：

20 高山被孢霉 (*Mortierellaalpina*)，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.60734。

具体实施方式

25 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。

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

优选地，所述甘油三酯 Sn-2 位 ARA 占 Sn-2 位全脂肪酸的比例不低于 30 重量%，更优选不低于 31 重量%。

在本发明中，ARA 是指花生四烯酸。

10 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 ARA 含量不低于 38 重量%。

应当理解的是，总 ARA 是指测定的微生物油脂中所含的 ARA 总量，可参见 GB26401-2011 的方法。甘油三酯型 ARA 是指甘油三酯构型的 ARA，15 ARA 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 ARA 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，甘油三酯的甘油骨架上 Sn-2 位 ARA 的含量不低于 23%，且甘油三酯型 ARA 含量不低20 于 38%。

本发明第二方面提供了一种微生物油脂的制备方法，该方法包括将高山被孢霉菌株接种到发酵培养基中发酵制得，所述高山被孢霉菌株为保藏编号为 GDMCC No.60734 的高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)。

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25 的菌株。

本发明提供的所述高山被孢霉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
5 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。

所述诱变的时间优选为 1-6min，更优选为 180-210s。

10 优选地，所述诱变的操作条件使得高山被孢霉的致死率为 90-95%。

所述诱变可以对出发菌株的孢子进行诱变，所述孢子可以以孢子悬浮液的形式提供。其中，孢子悬浮液的制备方法可以包括：取出发菌株的菌种，经过斜面活化后得到孢子，使用无菌水制备得到孢子悬浮液。优选地，孢子悬浮液中孢子浓度为 10^6 - 10^8 个/mL。

15 出发菌株的孢子经过诱变后，可以通过多次筛选得到高产 Sn-2 位 ARA 的甘油三酯的菌株。

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

在本发明中，Sn-2 位脂肪酸的含量采用“GB/T24894-2010/ISO6800：
20 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种的性能稳定。

25 通过上述诱变、筛选和遗传稳定性评价，得到高产 Sn-2 位为 ARA 的甘油三酯的菌株。

本发明的高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)，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.60734。

- 5 本发明提供的高山被孢霉经过发酵产生富含 Sn-2 位 ARA 的微生物油脂，所述发酵的方法没有特别的要求，只要是能使所述高山被孢霉增殖即可。

其中，所述高山被孢霉发酵的发酵条件没有特别的要求，可以是获得高山被孢霉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：温度为 27-31℃，时间为 4-8 天，通气比为 0.5-1.1VVM。

当高山被孢霉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%。

用于高山被孢霉发酵的培养基可以为本领域常规用于高山被孢霉发酵的培养基，优选地，所述发酵培养基包括碳源和氮源。

- 15 其中，所述碳源可以为葡萄糖、蔗糖、淀粉或其他任何可以提供碳源的物质或其组合，氮源可以为蛋白胨、酵母粉、玉米浆粉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、淀粉和蔗糖中的一种或多种。

- 20 优选地，所述氮源为蛋白胨、酵母粉、酵母浸膏和玉米浆粉中的一种或多种。

在本发明中，碳源和氮源的比例可以在较宽的范围内选择，优选地，碳氮比为 3-18: 1。

- 25 其中，所述高山被孢霉接种到发酵培养基中发酵的过程中，在发酵培养基中一次性投入配方所需的氮源；碳源除发酵培养基中的基础投加量以外，还可以在发酵过程中根据碳氮比的要求不断补充碳源，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，以确保高山被孢霉发酵产油量的水平。

为了获得较多的发酵产物，该方法优选还包括：所述高山被孢霉菌株经活化和扩培得到种子液后，接种到发酵培养基中发酵。

所述种子液的制备的方法可以是本领域常规采用的方法，优选地，所述种子液的制备方法包括如下步骤：

- (1) 将所述高山被孢霉菌株活化，获得孢子悬浮液；
- (2) 将步骤(1)所得的孢子悬浮液接种于摇瓶种子培养基中摇瓶扩培，得到摇瓶种子液；
- (3) 将步骤(2)所得的摇瓶种子液接种于扩培培养基中进行种子罐扩培，得到种子液。

在本发明中，可以通过一次或多次活化以制备孢子悬浮液。

所述活化的条件优选包括：温度为 25-30℃，培养时间为 4-7 天。

优选地，步骤(1)中，所述活化的方法进一步包括：

将所述高山被孢霉菌株接种于一级活化培养基，并在 25-30℃条件下一级活化培养 5-7 天，得到一级活化后的孢子；

将所述一级活化后的孢子接种于二级活化培养基，在 25-30℃二级活化培养 4-6 天得到成熟孢子和菌丝，并配制成孢子悬浮液。

在本发明中，所述一级活化培养基和所述二级活化培养基可以是本领域常规用于活化高山被孢霉的培养基，优选地，所述一级活化培养基和所述二级活化培养基各自独立地为 PDA 固体培养基。

在本发明中，PDA 培养基可以通过商购获得，也可以通过自制得到。

优选地，PDA 培养基中包含：马铃薯 100-300g/L，蔗糖 10-30g/L。当 PDA 培养基为固体培养基时，另外添加琼脂 15-17g/L。

所述高山被孢霉菌株可以是安瓿瓶保存或甘油管保存的菌株。

其中，所述一级活化可以在试管斜面上进行。

其中，所述二级活化可以在茄子瓶斜面上进行。

在本发明中，可以将成熟孢子和菌丝使用水洗下，制备得到孢子悬浮液。优选地，所述水为无菌水。

在本发明中，优选地，步骤（2）中，所述摇瓶扩培的条件包括：培养温度为 25-30℃，培养时间为 5-8 天。

- 5 优选地，所述摇瓶种子培养基包含碳源和氮源，所述摇瓶种子培养基中碳源的含量为 50-70g/L，氮源的含量为 15-25g/L，所述摇瓶种子培养基的 pH 为 6.5-7.2。

在本发明中，所述摇瓶培养在摇床中进行，摇床振荡速度优选为 180-200r/min。

- 10 在本发明中，步骤（3）中，所述种子罐扩培的方法优选包括：将步骤（2）所得的摇瓶种子液接入扩培培养基中进行扩培，得到种子液。

优选地，所述扩培的条件包括：温度为 27-31℃；时间为 1-2 天；通气比为 0.5-0.8VVM。

优选地，所述扩培培养基包含碳源和氮源，其碳氮比为 3-8:1。

- 15 在本发明的一种优选的实施方式中，步骤（3）中，所述种子罐扩培的方法包括：将步骤（2）所得的摇瓶种子液接入一级扩培培养基中进行一级扩培后，接入二级扩培培养基中进行二级扩培，得到种子液。

优选地，所述一级扩培的条件包括：温度为 27-31℃；时间为 1-2 天；通气比为 0.5-0.8VVM。

- 20 优选地，所述二级扩培的条件包括：温度为 27-31℃；时间为 1-2 天；通气比为 0.5-0.8VVM。

优选地，所述一级扩培培养基包含碳源和氮源，其碳氮比为 3-8:1。

优选地，所述二级扩培培养基包含碳源和氮源，其碳氮比为 3-8:1。

- 25 在本发明中，涉及的各种培养基中的碳源和氮源的种类均参见发酵培养基部分说明的碳源和氮源。

在本发明的一种优选的实施方式中，所述种子液的制备方法包括如下

步骤:

(1) 将所述高山被孢霉菌株接种到 PDA 斜面上培养至孢子生成并成熟, 获得孢子悬浮液;

(2) 将步骤 (1) 所得的孢子悬浮液接种于摇瓶种子培养基中培养获得摇瓶种子液;

(3) 将步骤 (2) 所得的摇瓶种子液接入第一级种子罐中培养 1-2 天后, 接入第二级种子罐中培养 1-2 天, 形成所述种子液。

进一步优选地, 所述步骤 (1) 包括: 将所述高山被孢霉接种于 PDA 试管斜面上在 25-30℃ 培养 5-7 天, 将生成的孢子转接至 PDA 茄子瓶斜面上在 25-30℃ 培养 4-6 天至生成成熟的孢子, 取下培养基上的菌丝和孢子, 用无菌水配制成所述孢子悬浮液。

进一步优选地, 所述步骤 (2) 包括: 将步骤 (1) 所得的孢子悬浮液接种到摇瓶种子培养基中进行培养, 培养温度为 25-30℃, 培养时间为 3-6 天, 摇床振荡速度为 180-200r/min, 所述摇瓶种子培养基中碳源为 50-70g/L, 氮源为 15-25g/L, pH 为 6.8-7.2。

具体地, 摇瓶种子培养基中的接种量按每支茄子瓶种子接 2-3 个三角瓶的方式, 其中, 茄子瓶和三角瓶的规格可以为 500mL。

具体地, 所述步骤 (3) 中, 所述第一级种子罐和所述第二级种子罐的培养条件包括: 温度为 27-31℃, 时间为 1-2 天, 通气比为 0.5-0.8VVM, 碳氮比为 3-8:1。

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萃取得到微生物油脂。

本发明第三方面提供了由上述方法制备的微生物油脂, 所述微生物油脂包含甘油三酯型油脂, 所述甘油三酯 Sn-2 位 ARA 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 ARA 含量不低于 38 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。

- 5 本发明第五方面提供一株高山被孢霉 (*Mortierellaalpina*)，所述高山被孢霉为保藏编号为 GDMCC No.60734 的高山被孢霉(*Mortierellaalpina*)。

所述高山被孢霉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高山被孢霉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型油脂，所述甘油三酯 Sn-2 位 ARA 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 ARA 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。

- 15 以下实施例中，微生物油脂中 ARA 的含量采用 GB26401-2011 中的方法测定；脂肪酸组分采用 GB5009.168-2016 中的方法测定；

人体对 ARA 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 ARA 油脂和常规菌株生产的 ARA 油脂，然后抽取血液测定 ARA 脂肪酸含量来计算吸收率；

- 20 高山被孢霉常规菌株来自于中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC)，菌株编号为 CICC 11092s；

葡萄糖、淀粉、酵母粉、酵母浸膏、蛋白胨、玉米浆粉、马铃薯、琼脂均为市售品。

- 25 本发明实施例中 PDA 培养基的配方为：马铃薯 200g、蔗糖 20g、琼脂 15-17g、水 1000mL。

实施例 1-实施例 3 用于说明本发明所述的高山被孢霉发酵制备微生物油脂的方法。

制备例

5 本制备例用于说明本发明所述的高山被孢霉的获取方法。

取出发菌株保存在安瓿瓶中的菌种，接种到 PDA 斜面上并在 27℃ 培养 5 天，将生成的孢子转接至 PDA 培养基斜面上在 27℃ 培养 4 天至生成成熟的孢子，用 20mL 无菌水将 PDA 斜面上的孢子洗脱下来，配制成孢子悬浮液，其孢子浓度控制在 10^6 - 10^8 。

10 将 1μL 孢子悬浮液涂到经过灭菌处理的样品载片上，放入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，诱变时间为 200s，致死率为 93.33%。挑选生长良好的单菌落传代，接种到装有 PDA 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
15 物中 Sn-2 位 ARA 含量高的菌株。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保存。

经筛选，得到本发明提供的高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)，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
20 100 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.60734。

实施例 1

本实施例用于说明本发明所述的高山被孢霉发酵制备微生物油脂的方
25 法。

（1）分别将高山被孢霉常规菌株和本发明所使用的高山被孢霉菌株

(保藏编号为 GDMCC No.60734) 接种到 PDA 试管斜面上在 27℃培养 5 天, 将生成的孢子转接至 PDA 培养基茄子瓶斜面上在 27℃培养 4 天至生成成熟的孢子, 取下培养基上的菌丝和孢子, 用 20mL 无菌水配制成孢子悬浮液。

5 (2) 将步骤(1)所得的孢子悬浮液接种到放有摇瓶种子培养基的摇瓶中进行培养获得摇瓶种子液, 接种量按每支 PDA 茄子瓶接 2-3 个三角瓶的方式, 置于温度为 27℃、振荡速度为 180r/min 的摇床上培养 4 天, 得到摇瓶种子液。摇瓶种子培养基中葡萄糖为 50g/L, 酵母粉为 15g/L, pH 为 7.2。

10 (3) 1M³ 第一级种子罐中装有 500L 一级扩培培养基, 将 1L 步骤(2)中所得的摇瓶种子液接入第一级种子罐中, 以温度为 29℃、搅拌速度为 180r/min、通气量为 0.65vvm 的条件培养 2 天后, 得到一级扩培种子液。一级扩培培养基中, 葡萄糖为 30g/L, 酵母浸膏为 15g/L, pH 为 7.2。

15 (4) 10M³ 第二级种子罐中装有 7M³ 二级扩培培养基, 将 500L 步骤(3)中所得的一级扩培种子液接入第二级种子罐中, 以温度为 29℃、搅拌速度为 120r/min、通气量为 0.65vvm 的条件培养 2 天、待菌丝浓度≥3.5%后, 得到种子液, 转接入主发酵罐中。二级扩培培养基中, 葡萄糖为 30g/L, 酵母浸膏为 15g/L, pH 为 7.2。

20 (5) 45M³ 主发酵罐中装有 22M³ 发酵培养基, 将 2M³ 步骤(4)中所得的种子液接入主发酵罐中, 以温度为 29℃、搅拌速度为 90r/min、通气量为 0.9vvm、碳氮比为 (8-16):1 的条件发酵培养 6 天, 发酵过程中流加葡萄糖浓度为 250g/L 的无菌糖液以控制碳氮比, 最终获得发酵液; 发酵罐培养基中蔗糖为 50g/L, 酵母浸膏为 15g/L, pH 为 7.5。

25 (6) 将步骤(5)所得的发酵液分离, 得到湿菌体, 烘干得到干菌体, 利用正己烷作为萃取剂萃取干菌体中的油脂, 萃取后分离得到的固相物转入萃取容器中进行重复萃取 4-7 次, 控制萃取后的残渣中残油含量<7%,

萃取时溶剂与干菌体的重量比为 1.5:1，将每次萃取后过滤分离得到的混合油脱溶，得到微生物油脂。

(7) 将步骤 (6) 所得的微生物油脂进行 ARA 含量、脂肪酸组分和油脂中甘油三酯 Sn-2 位 ARA 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	本发明的菌株
ARA (C20:4) , g/100g	40.71	44.067
棕榈酸(C16:0), g/100g	7.356	7.274
硬脂酸(C18:0), g/100g	6.825	6.714
油酸(C18:1), g/100g	6.013	5.924
亚油酸(C18:2), g/100g	5.922	6.044
甘油三酯 Sn-2 位上 ARA 的比例, %	21.97	32.65
甘油三酯 Sn-1、Sn-3 位上 ARA 的比例, %	56.15	52.8
人体对 ARA 的吸收率, %	46.7	65.7

实施例 2

本实施例用于说明本发明所述的高山被孢霉发酵制备微生物油脂的方法。

10

(1) 分别将高山被孢霉常规菌株和本发明所使用的高山被孢霉菌株 (保藏编号为 GDMCC No.60734) 接种到 PDA 试管斜面上在 28℃培养 6 天, 将生成的孢子转接至 PDA 培养基茄子瓶斜面上在 28℃培养 5 天至生成成熟的孢子, 取下培养基上的菌丝和孢子, 用 20mL 无菌水配制成孢子悬浮液。

15

(2) 将步骤 (1) 所得的孢子悬浮液接种到放有摇瓶种子培养基的摇

瓶中进行培养获得摇瓶种子液,接种量按按每支茄子瓶种子接 2-3 个三角瓶的方式,置于温度为 28℃、振荡速度为 200r/min 的摇床上培养 5 天,得到摇瓶种子液。摇瓶种子培养基中,葡萄糖为 60g/L,酵母粉为 10g/L,蛋白胨为 10g/L, pH 为 7.0。

5 (3) 5L 种子罐中装有 3L 扩培培养基,将 200mL 步骤(2)中所得的摇瓶种子液接入种子罐中,以温度为 28℃、搅拌速度为 200r/min、通气量为 0.6vvm 的条件培养 1 天后,得到种子液。扩培培养基中,葡萄糖为 35g/L,酵母粉为 20g/L, pH 为 7.2。

 (4) 30L 发酵罐中装有 15L 发酵培养基,将 1.5L 步骤(3)中所得的
10 种子液接入发酵罐中,以温度为 28℃、搅拌速度为 220r/min、通气量为 0.8vvm、碳氮比为 (5-12):1 的条件培养 7 天,发酵过程中流加葡萄糖浓度为 250g/L 的无菌糖液以控制碳氮比,最终获得发酵液。发酵培养基中,葡萄糖为 50g/L,淀粉为 10g/L,酵母浸膏为 20g/L, pH 为 8。

 (5) 将步骤(4)所得的发酵液分离,得到湿菌体,烘干得到干菌体,
15 利用正己烷作为萃取剂萃取干菌体中的油脂,萃取后分离得到的固相物转入萃取容器中进行重复萃取 4-7 次,控制萃取后残渣中残油含量<7%,萃取时溶剂与干菌体的重量比为 1.5:1,将每次萃取后过滤分离得到的混合油,脱溶,得到微生物油脂。

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

表 2 实施例 2 中微生物油脂中各参数的数据

	常规菌株	本发明的菌株
ARA (C20:4) g/100g	39.36	43.18
棕榈酸(C16:0) g/100g	8.541	7.236

硬脂酸(C18:0) g/100g	7.136	6.696
油酸(C18:1) g/100g	6.132	5.891
亚油酸(C18:2) g/100g	5.879	6.007
甘油三酯 Sn-2 位上 ARA 的比例, %	20.97	32.17
甘油三酯 Sn-1、Sn-3 位上 ARA 的比例, %	57.83	51.4
人体对 ARA 的吸收率, %	43.8	62.1

实施例 3

本实施例用于说明本发明所述的高山被孢霉发酵制备微生物油脂的方法。

- 5
- (1) 分别将高山被孢霉常规菌株和本发明所使用的高山被孢霉菌株（保藏编号为 GDMCC No.60734）接种到 PDA 试管斜面上在 29℃培养 7 天，将生成的孢子转接至 PDA 培养基茄子瓶斜面上在 29℃培养 6 天至生成成熟的孢子，取下培养基上的菌丝和孢子，用 20mL 无菌水配制成孢子悬浮液。
- 10
- (2) 将步骤（1）所得的孢子悬浮液接种到放有摇瓶种子培养基的摇瓶中进行培养获得摇瓶种子液，接种量按每支 PDA 茄子瓶种子接 2-3 个三角瓶的方式，置于温度为 29℃、振荡速度为 190r/min 的摇床上培养 6 天，得到摇瓶种子液。摇瓶种子培养基中葡萄糖为 60g/L，淀粉为 10g/L，酵母粉为 25g/L，pH 为 7.2。
- 15
- (3) 10L 种子罐中装有 6L 扩培培养基，将 300mL 步骤（2）中所得的摇瓶种子液接入种子罐中，以温度为 30℃、搅拌速度为 220r/min、通气量为 0.75vvm 的条件培养 2 天后，得到种子液。扩培培养基中，葡萄糖为 40g/L，酵母粉为 25g/L，pH 为 6.8。
- (4) 100L 发酵罐中装有 55L 发酵罐培养基，将 2.75L 步骤（3）中所

得的种子液接入发酵罐中，以温度为 30℃、搅拌速度为 200r/min、通气量为 0.85vvm、碳氮比为 (3-10):1 的条件培养 5 天，发酵过程中流加葡萄糖浓度为 250g/L 的无菌糖液以控制碳氮比，最终获得发酵液。发酵罐培养基中，葡萄糖为 45g/L，玉米浆粉为 10g/L，蛋白胨为 10g/L，pH 为 7.0。

5 (5) 将步骤(4)所得的发酵液分离，得到湿菌体，烘干得到干菌体，利用正己烷作为萃取剂萃取干菌体中的油脂，萃取后分离得到的固相物转入萃取容器中进行重复萃取 4-7 次，控制萃取后残渣中残油含量<7%，萃取时溶剂与干菌体的重量比为 1.5:1，将每次萃取后过滤分离得到的混合油，脱溶，得到微生物油酯。

10 (6) 将步骤(5)所得的微生物油脂进行 ARA 含量、脂肪酸组分和油脂中甘油三酯 Sn-2 位 ARA 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	本发明的菌株
ARA (C20:4) g/100g	38.73	41.17
棕榈酸(C16:0) g/100g	8.136	7.257
硬脂酸(C18:0) g/100g	7.167	6.721
油酸(C18:1) g/100g	6.939	5.916
亚油酸(C18:2) g/100g	6.871	6.009
甘油三酯 Sn-2 位上 ARA 的比例，%	20.15	31.98
甘油三酯 Sn-1、Sn-3 位上 ARA 的比例，%	56.91	52.31
人体对 ARA 的吸收率，%	42.1	63.1

15 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型油脂，所述甘油三酯 Sn-2 位 ARA 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 ARA 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，该方法包括将高山被孢霉菌株接种到发酵培养基中发酵制得，所述高山被孢霉菌株为保藏编号为
10 GDMCC No.60734 的高山被孢霉（*Mortierella alpina*）；

 优选地，所述发酵的条件包括：温度为 27-31℃，时间为 4-8 天，通气比为 0.5-1.1VVM；

 优选地，所述发酵培养基包括碳源和氮源，碳氮比为 3-18: 1；

 优选地，该方法还包括：对发酵产物进行萃取，得到微生物油脂。

15

4、根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于，该方法还包括：所述高山被孢霉菌株经活化和扩培得到种子液后，接种到所述发酵培养基中发酵；

 优选地，所述种子液的制备方法包括如下步骤：

 （1）将所述高山被孢霉菌株活化，获得孢子悬浮液；

20 （2）将步骤（1）所得的孢子悬浮液接种于摇瓶种子培养基中摇瓶扩培，得到摇瓶种子液；

 （3）将步骤（2）所得的摇瓶种子液接种于扩培培养基中进行种子罐扩培，得到种子液；

 更优选地，步骤（1）中，所述活化的方法进一步包括：将所述高山被孢霉菌株接种于一级活化培养基，并在 25-30℃ 条件下一级活化培养 5-7 天，
25 得到一级活化后的孢子；将所述一级活化后的孢子接种于二级活化培养基，

在 25-30℃活化培养 4-6 天得到成熟孢子和菌丝，并配制成孢子悬浮液；

优选地，步骤(2)中，所述摇瓶扩培的条件包括：培养温度为 25-30℃，培养时间为 5-8 天；

优选地，步骤(3)中，所述种子罐扩培的条件包括：温度为 27-31℃；
5 时间为 1-2 天；通气比为 0.5-0.8VVM。

5、根据权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述摇瓶种子培养基包含碳源和氮源，所述摇瓶种子培养基中碳源的含量为 50-70g/L，氮源的含量为 15-25g/L，所述摇瓶种子培养基的 pH 为 6.5-7.2；和/或
10 所述扩培培养基包含碳源和氮源，其碳氮比为 3-8:1。

6、根据权利要求 3 或 5 所述的方法，其特征在于，所述碳源为葡萄糖、淀粉和蔗糖中的一种或多种，和/或
15 所述氮源为蛋白胨、酵母粉、酵母浸膏和玉米浆粉中的一种或多种。

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，其特征在于，所述微生物油脂包含甘油三酯型油脂，所述甘油三酯 Sn-2 位 ARA 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 ARA 含量不低于 38 重量%。
20

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。

9、一株高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)，其特征在于，所述高山被孢霉为保藏编号为 GDMCC No.60734 的高山被孢霉 (*Mortierella alpina*)。
25

10、权利要求 9 所述的高山被孢霉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型油脂，所述甘油三酯 Sn-2 位 ARA 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 ARA 含量不低于 38 重量%。